

T/HEBQIA

团 体 标 准

T/HEBQIA XXXX—2025

农杆菌介导棉花遗传转化技术规程

Technica code of practice for agrobacterium-mediated genetic transformation of
cotton

(征求意见稿)

2025 - XX - XX 发布

2025 - XX - XX 实施

河北省质量信息协会 发布

目次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 设备和用具 1

6 试剂 2

7 培养基 2

8 无菌苗培养 3

9 侵染液制备 4

10 遗传转化 4

11 生根培养 4

12 炼苗移栽 5

13 目的基因检测 5

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由河北省农林科学院棉花研究所提出。

本文件由河北省质量信息协会归口。

本文件起草单位：河北省农林科学院棉花研究所、河北农业大学、武汉天问生物科技有限公司、XXX。

本文件主要起草人：迟吉娜、刘琳琳、甄军波、刘迪、封丛华、张冬梅、李梦喆、凌飞、XXX。

内部讨论资料 严禁非授权使用

农杆菌介导棉花遗传转化技术规程

1 范围

本文件规定了农杆菌介导棉花遗传转化技术的原理、设备和用具、试剂、培养基、无菌苗培养、侵染液制备、遗传转化、生根培养、炼苗移栽、目的基因检测。

本文件适用于农杆菌介导棉花遗传转化的操作过程。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

农杆菌介导 agrobacterium mediation

利用土壤中普遍存在的革兰氏阴性细菌-农杆菌，来实现外源基因向植物细胞的转移和整合的转基因技术。

3.2

遗传转化 genetic transformation

同源或异源的游离DNA分子（质粒和染色体DNA）被自然或人工感受态细胞摄取，并得到表达的水平方向的基因转移过程。

4 原理

农杆菌介导法是通过诱导农杆菌侵染过的下胚轴产生转化的愈伤组织，再将转化的愈伤组织进行扩增，进一步诱导产生胚性愈伤并诱导植株再生。以棉花幼苗下胚轴为受体材料，利用农杆菌中Ti质粒或Ri质粒上的T-DNA可被转移并整合到棉花基因组的特性，通过棉花下胚轴受伤后释放的信号分子激活农杆菌的Vir基因，促使T-DNA携带目的基因进入棉花细胞并整合到基因组中，使棉花获得新性状。

5 设备和用具

5.1 仪器

电子天平（精度0.0001 g、0.01 mg）、超净工作台、培养箱、细菌培养箱、超低温冰箱（-80℃）。

5.2 用具

剪刀、手术刀、镊子、无菌滤纸、培养瓶、离心管、培养皿、营养钵。

6 试剂

6.1 除非另有规定，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或无菌水。所有试剂溶液宜大体积（1 L）配制、小体积（10 mL）分装后经高压灭菌后使用，不宜高压灭菌的试剂通过 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

6.2 试剂：硝酸钾、硫酸镁或七水合硫酸镁、磷酸二氢钾、无水氯化钙或二水合氯化钙、硼酸、四水硫酸锰或一水硫酸锰、七水硫酸锌、六水合氯化钴、五水硫酸铜、碘化钾、二水合钼酸钠、硫酸亚铁、乙二胺四乙酸二钠、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、甘氨酸、肌醇、葡萄糖、植物凝胶、2, 4-D、激动素、硝酸铵、六水合氯化镁、硫酸卡那霉素、头孢类抗生素、吡啶丁酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、牛肉浸膏、酵母提取物、氯化钠、琼脂粉、利福平、胰蛋白胍、甘露醇。

7 培养基

7.1 MS 培养基

MS培养基成分见表1，加蒸馏水定容至1 L，调节pH=5.85~5.90。

表1 MS 培养基成分

成分		化合物	母液浓度/（g/L）	贮备液倍数
大量元素母液		硝酸钾	38	20
		硫酸镁/七水合硫酸镁	3.8/7.4	
		磷酸二氢钾	3.40	
		无水氯化钙/二水合氯化钙	6.6/8.8	
微量元素母液	5倍母液I	硼酸	3.1	1000
		四水硫酸锰/一水硫酸锰	11.50/8.45	
		七水硫酸锌	4.3	
	20倍母液II	六水合氯化钴	0.050	
		五水硫酸铜	0.050	
		碘化钾	1.66	
		二水合钼酸钠	0.50	
		铁盐母液		
		乙二胺四乙酸二钠	3.73	
B5有机物		盐酸硫胺素	1.0	100
		盐酸吡哆醇	0.1	
		烟酸	0.1	
		甘氨酸	2.0	
		肌醇	10.0	

7.2 无菌苗培养基

成分：1/2大量元素、15 g葡萄糖、2.6 g植物凝胶，加蒸馏水定容至1 L，调节pH=6.00~6.10。

7.3 共培养培养基

成分：MS培养基、0.1 mg 2, 4-D、0.1 mg激动素、1.65 g硝酸铵、1.0g六水合氯化镁、30 g葡萄糖、2.6 g植物凝胶，加蒸馏水定容至1 L，调节pH=5.85~5.95。

7.4 愈伤组织诱导培养基

成分：MS培养基、0.1 mg 2, 4-D、0.1 mg激动素、1.65 g硝酸铵、1.0g六水合氯化镁、30 g葡萄糖、2.6 g植物凝胶，加蒸馏水定容至1 L，调节pH=5.85~5.95。灭菌后加50 mg硫酸卡那霉素、400 mg头孢类抗生素。

7.5 愈伤组织分化培养基

成分：MS培养基、0.5 mg吲哚丁酸、0.15 mg激动素、1.9 g硝酸钾、1.0 g谷氨酰胺、0.5 g天冬酰胺、30 g葡萄糖、2.6 g植物凝胶，加蒸馏水定容至1 L，调节pH=5.90~5.95。

7.6 生根培养基

成分：1/2MS培养基、15 g葡萄糖、2.6 g植物凝胶，加蒸馏水定容至1 L，调节pH=5.90~5.95。

7.7 YEP 固体培养基

成分：5 g牛肉浸膏、10 g酵母提取物、5 g氯化钠、10 g琼脂粉、50 mg利福平、50 mg硫酸卡那霉素，加蒸馏水定容至1 L，调节pH=6.50~7.00。

7.8 YEP 液体培养基

成分：5 g牛肉浸膏、10 g酵母提取物、5 g氯化钠、50 mg利福平、50 mg硫酸卡那霉素，加蒸馏水定容至1 L，调节pH=6.50~7.00。

7.9 侵染液培养基

成分：5 g胰蛋白胨、5 g氯化钠、0.1 g七水合硫酸镁、0.25 g磷酸二氢钾、5 g甘露醇、1.0 g甘氨酸，加蒸馏水定容至1 L，调节pH=5.80~5.85。

8 无菌苗培养

8.1 种子处理

8.1.1 收获的棉花种子经轧花脱去长绒，用适量硫酸脱去表面短绒后，用去离子水洗净表面硫酸残留，将种子晾干。

8.1.2 在超净工作台上，挑选籽粒健康饱满的种子，剥除坚硬种皮，移至灭菌的培养瓶中，用0.1%氯化汞浸泡8 min~10 min。

8.1.3 使用无菌水洗净表面氯化汞残留，将灭菌后的种子置于含无菌苗培养基的培养瓶中（每个培养瓶宜放5粒~6粒种子），放入培养箱中，在26℃~28℃下暗培养，待露白发芽。

8.2 幼苗培养

培养1 d~2 d后进行扶苗，将生长出的胚根插入无菌苗培养基中，在26℃~28℃培养箱中，暗培养5 d~6 d，待幼苗下胚轴伸长至6 cm~7 cm，即可进行农杆菌侵染。

9 侵染液制备

9.1 从超低温冰箱中取出带有目的基因的农杆菌菌液，将菌液在含相应抗生素（根据构建的载体所带的抗性基因选择）的 YEP 固体培养基板上划线培养，于细菌培养箱 26℃~28℃条件下培养 2 d~3 d。

9.2 挑选单菌落到 YEP 液体培养基中，26℃~28℃条件下，扩繁 12 h~16 h。

9.3 将菌液移入离心管中，4℃条件下，6000 rpm，离心 5 min~8 min，倒掉上清液，收集菌体。

9.4 用侵染液培养基重悬菌体，使 OD600 值至 0.5~1.0，4℃保存备用。

10 遗传转化

10.1 下胚轴预处理

用剪刀剪去幼苗子叶端和胚根端各1.0 cm，用手术刀将下胚轴切成0.5 cm~0.8 cm的切段，将切段保存备用。

10.2 农杆菌浸染

10.2.1 取农杆菌菌液溶解于侵染液培养基中，26℃~28℃条件下，置于摇床振荡活化。

10.2.2 将切段移至培养瓶中，用处理后的农杆菌菌液侵染 5 min~8 min，期间轻微晃动使侵染均匀。

10.2.3 侵染后用镊子取出切段，用无菌滤纸吸掉多余菌液，在培养皿中晾干。

10.3 共培养

待切段表面稍干燥，转接到铺有无菌滤纸的共培养培养基上，每段下胚轴均应接触到无菌滤纸。在培养箱20℃~22℃条件下，暗培养36 h~48 h。

10.4 选择培养

使用无菌水将下胚轴冲洗干净，用无菌滤纸吸去表面水分，将下胚轴移至含有50 mg/L硫酸卡那霉素、400 mg/L头孢类抗生素的愈伤组织诱导培养基上，或者根据各菌株中植物表达载体筛选基因选择相对应的筛选剂，在培养箱26℃~28℃条件下，16 h光照/8 h暗培养，光照强度宜为1500 Lx~2000 Lx，20 d~30 d继代培养一次。

10.5 分化诱导

10.5.1.1 在超净工作台，用镊子取下胚轴两端疏松的淡黄或白色愈伤组织。

10.5.1.2 待愈伤组织长至指甲盖大小，移至愈伤组织分化培养基上继续诱导培养。

10.5.1.3 每 28 d 挑选淡黄色、小米粒状的胚性愈伤组织，转接至愈伤组织分化培养基上，在 26℃~28℃，光照强度宜为 1500 Lx~2000 Lx，16 h 光照/8 h 暗培养条件下，进行继代培养。

11 生根培养

将愈伤组织分化出的子叶胚移至生根培养基上，将子叶胚根部插入生根培养基内诱导生根，培养条件为25℃~28℃，光照强度宜为1500 Lx~2000 Lx，16 h光照/8 h暗培养20 d~30 d。

12 炼苗移栽

12.1 炼苗

打开培养瓶的封口膜，在26℃~28℃，光照强度宜为1500 Lx~3000 Lx，16 h光照/8 h暗培养条件下，炼苗2 d~3 d。

12.2 室内移栽

12.2.1 选择根系生长健壮的幼苗，用无菌水洗净附着的培养基，水培7 d左右，每2 d~3 d换一次水。

12.2.2 将幼苗移栽于营养钵中，放在温室中培养，定期浇水，遮阴缓苗7 d~14 d。

13 目的基因检测

13.1 PCR 扩增检测

13.1.1 按 GB/T 19495.7 的规定对幼苗进行抽样，采用 PCR 检测方法对幼苗进行目标基因检测。

13.1.2 待转化苗长出7片~8片叶时，取2片~3片叶提取基因组DNA，对目的基因进行PCR扩增，扩增结果有目的基因条带的，说明目的基因转入转化苗并表达成功。

13.2 抗生素抗性检测

13.2.1 使用一定浓度的卡那霉素溶液或其他抗生素涂抹棉花叶片，10 d后观察棉花的药害情况。

13.2.2 对照非转基因棉花的老叶出现退绿、新叶萎缩畸形等药害反应，转基因棉花植株仅有个别新生叶片出现轻度萎缩的轻微药害，但仍保持正常生长活性。说明目的基因转入棉花再生植株并成功表达。