

文章编号: 1000-4025(2010)09-1721-07

水稻 *XIOsPR10* 基因表达调控的初步研究

郭迟鸣, 毛倩, 杨晓坡, 郭立佳, 王丽娟, 陈亮*

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建厦门 361005)

摘要: 为探索水稻 PR10 蛋白在水稻抗细菌性条斑病中的作用, 构建了 *XIOsPR10* 基因的植物过量表达载体 p1301-*XIOsPR10* 及 RNAi 表达载体 pDS1301-*XIOsPR10*, 通过农杆菌介导分别转化水稻愈伤组织, 获得了相应的再生植株。经 GUS 检测和 PCR 分析, 证实 *XIOsPR10* 基因以及 RNAi 片段分别整合到水稻再生植株基因组中; 半定量 RT-PCR 分析显示, 过量表达植株中 *XIOsPR10* 基因的表达量高于对照, 而 RNAi 转基因植株中 *XIOsPR10* 基因的表达被抑制。

关键词: *XIOsPR10*; 过量表达载体; RNAi 表达载体; 水稻

中图分类号: Q789 文献标识码: A

Preliminary Study on Regulation of *XIOsPR10* Gene Expression in Rice

GUO Chiming, MAO Qian, YANG Xiaopo, GUO Lijia, WANG Lijuan, CHEN Liang*

(Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: In order to study the function of rice *XIOsPR10* gene which is related to the plant disease resistant reaction, we constructed plant over expression and RNAi expression vector and integrated into the genome of rice via *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, respectively. The transgenic cultivars were identified by PCR and GUS gene expression detection. The analysis result showed that the transcription level of *XIOsPR10* of over-expression transgenic rice was higher than that of control. In construct, *XIOsPR10* gene expression was blocked in RNAi transgenic rice.

Key words: *XIOsPR10*; over-expression vector; RNAi expression vector; rice

病程相关蛋白 10 (pathogenesis-related protein 10, PR10) 是一类分子量为 16~19 kD、位于细胞内液和细胞质的酸性蛋白。在对双子叶植物西芹 (*Petroselinum crispum*)^[1]、豌豆 (*Pisum sativum*)^[2]、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)^[3]、大豆 (*Glycine max* cv Mandarin)^[4]、桤木 (*Alnus glutinosa*)^[5]、苹果 (*Malus domestica*)^[6]、苜蓿 (*Medicago sativa*)^[7]、及单子叶植物芦笋 (*Asparagus officinalis*)^[8]、水稻 (*Oryza sativa*)^[9]、百合花 (*Lilium longiflorum*)^[10] 和高粱 (*Sor-*

ghum bicolor)^[11] 等的研究中都报道存在 PR10 蛋白。PR10 蛋白的表达与植物系统获得性抗性反应 (SAR) 关系密切, 在很多植物对病原菌的防御反应中 PR10 类蛋白都有转录表达活性, 当植物受到外界逆境胁迫后 PR10 蛋白表达上调进而诱导植物 SAR 的产生^[12], 因此 PR10 类蛋白在植物防御反应中具有重要作用。在转基因马铃薯和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 研究中, 特异 PR10 基因的过量表达能增强植物对病害的抗性^[13]。研究发现 PR10 类

* 收稿日期: 2010-02-26; 修改稿收到日期: 2010-08-17

基金项目: 科技部 863 专题 (2007AA10Z132); 国家重大科技专项 (2008ZX08001-001, 2009ZX08009-045B); 教育部重点项目 (011102)

作者简介: 郭迟鸣 (1982-), 男 (回族), 硕士研究生, 主要从事植物细胞工程与基因工程的研究。E-mail: gcm326@163.com

* 通讯作者: 陈亮, 教授, 博士生导师, 主要从事植物细胞工程与基因工程的研究。E-mail: chenlg@xmu.edu.cn

蛋白参与了水稻对病原菌入侵的应答,且主要与抗病反应中的茉莉酸(JA)信号途径有关^[3-5],但JA对PR10蛋白的具体调控方式和途径还不是很清楚。

本研究根据获得的水稻 *XIOsPR10* 基因(GenBank 登录号: AK061606.1), 构建了 *XIOsPR10* 的植物过量表达载体和 RNAi 表达载体; 利用农杆菌介导的方法分别将其转入水稻中, 获得相应的转基因植株, 并通过转基因植株的转录水平分析, 对水稻 *XIOsPR10* 基因的表达调控方式进行了初步研究。本研究将为进一步阐明 *XIOsPR10* 基因在水稻细菌性条斑病抗性网络中的功能地位奠定了基础, 对认识水稻细菌性条斑病的抗性机理、培育抗细菌性条斑病的水稻品种具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

以水稻品种‘中花 11’ (*Oryza sativa* L. variety Zhonghua 11) 为材料, 取其开花后 10~15 d 左右的幼胚, 诱导愈伤组织。

1.2 方法

1.2.1 过量表达载体的构建 分析 pCMVFL3-*XIOsPR10* 质粒(本实验室保存) 酶切位点, 用 *EcoR* I/*Xba* I 双酶切获得完整的 *XIOsPR10* cDNA 序列, 将其亚克隆至 pBPF Ω 7 质粒, 获得超表达中间载体 pBPF-*XIOsPR10*。然后用 *Hind* III 酶切 pBPF-*XIOsPR10*, 得到 *XIOsPR10* 基因超表达单元, 插入 pCambia1301 载体, 构建成植物表达载体 p1301-35S-*XIOsPR10*-Tnos(图 1)。

1.2.2 RNAi 表达载体的构建 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 RNAi 基因片段引物 RNAi+5K: 5'-GCCGGTACC TGCTGT GGATGATGGG-3', RNAi-3B: 5'-CGCGGATCCTAGGGT GAGCGAG GAGGT-3' 以及 RNAi+5S: 5'-CGCACTAGT GCTGTGGATGATGGG-3', RNAi-3S: 5'-CGCGAGCTGTAGGGT GAGCGACGAGGT-3' 分别引入 *Kpn* I、*Bam* H I、*Sac* I、*Spe* I 酶切位点(下划线)。

以含 *XIOsPR10* 基因的质粒为模板, 用两对引物 RNAi+5K/RNAi-3B 和 RNAi+5S/RNAi-3S, PCR 扩增后得到 *XIOsPR10* 基因的正义片段 KB 和反义片段 SS。 *Sac* I/*Spe* I 不完全双酶切 SS 片段, 与 pDS1301 质粒后进行连接, 得到 pDS1301-SS, 然后用 *Kpn* I/*Bam* H I 双酶切 KB 片段, 与 pDS1301-SS 质粒连接, 得到连有正义和反义片段的 RNAi 表达载体 pDS1301-SS-KB(图版 iv, 1)。

1.2.3 根癌农杆菌介导的转化 农杆菌感受态制备与转化: 培养 EHA 105 农杆菌至浓度 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 将菌液转入离心管中, 4℃冰浴 30 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加 2 mL 20 mmol/L CaCl₂ 重悬菌体, 分装后 4℃保存。取 20 μ g 质粒 DNA, 加入 200 μ L 感受态细胞中混匀, 冰浴 5 min, 转入液氮冷冻 8 min, 迅速置于 37℃中温浴 5 min, 加入 800 μ L LB 培养基, 28℃ 250 r/min 摇菌 4~5 h 后将菌液涂布在 Kan^r 的 LB 平板, 28℃倒置培养 1~2 d。挑取单克隆作 PCR 和酶切鉴定。

农杆菌转化水稻愈伤组织: 将含有重组质粒的农杆菌接种到 LB 液体培养基中, 28℃ 250 r/min 条件下培养至 OD₆₀₀ 为 1.0 时, 离心收集菌体, 用 30 mL 加 100 μ mol/L AS 的 AAM^[14] 液体培养基重悬。将水稻愈伤组织浸入重悬菌液中, 真空处理 15 min(0.05 MPa), 静置 15 min, 用无菌滤纸吸干愈伤表面液体, 移入共培养培养基(NB^[15] + 4 mg/L 2, 4-D + 100 μ mol/L AS) 中暗培养 3 d(25~26℃)。然后转入筛选培养基(NB + 2 mg/L 2, 4-D + 0.5 mg/L

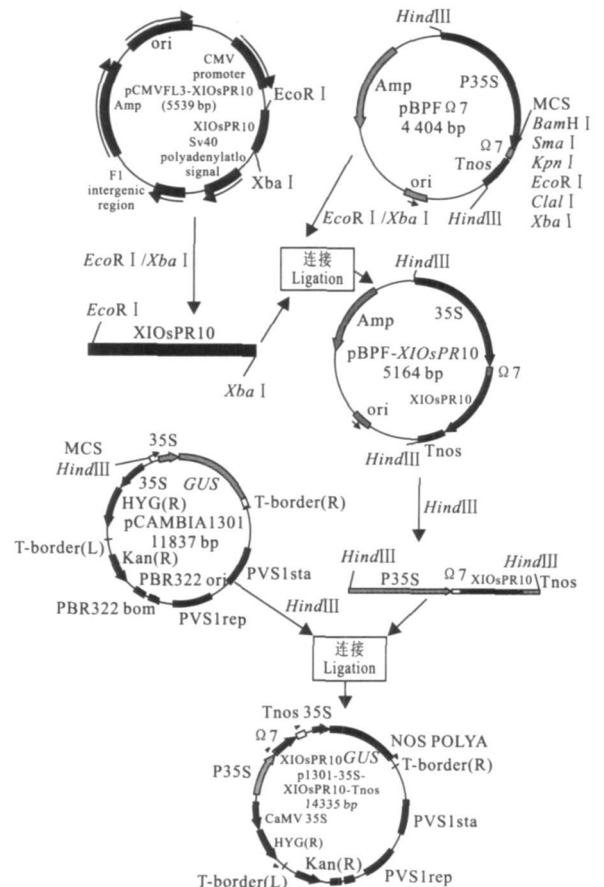


图 1 植物表达载体 p1301-35S-*XIOsPR10*-Tnos 的构建

Fig. 1 Construction process of plant expression

vector of p1301-35S-*XIOsPR10*-Tnos

Carb+ 100 mg/L Hyg) 进行筛选培养。

将经两次继代筛选(30 d)后长出的乳白色、微透亮的抗性愈伤转至预分化培养基(NB+ 2 mg/L ABA+ 3 mg/L 6-BA+ 1 mg/L NAA+ 200 mg/L Carb+ 25 mg/L Hyg)中,一周后可以看到抗性愈伤上有绿点产生,再经一周后抗性愈伤长出再生小苗,之后经水培移出温室于室外栽培。

1.2.4 转基因水稻检测 采用以下3种方法对转基因植株进行检测:(1)PCR检测目的基因和筛选标记基因:设计合成 *XIOsPR10* 基因两端引物 *O_sPR10-F* (5'-ATGGCTCCGGTCAGCATG-3') 和 *O_sPR10-R* (5'-AATTTTAA GCAT ACTCG-3'), 用以 p130F-*XIOsPR10* 转基因植株 PCR 检测。同时根据载体 pDS1301 上 *Hyg* 基因的序列合成设计引物 *Hyg-F* (5'-ATGTTGGCGACCTCGTATT-3') 及 *Hyg-R* (5'-CGTTATGTTTATCGGCACTTT-3'), 用以扩增 *Hyg* 基因 500 bp 片段,对 pDS130F-*XIOsPR10* 转化植株进行检测。CTAB 法抽提水稻 DNA, 用基因两端特异引物 *XIOsPR10-F/XIOsPR10-R* 或 RNAi 表达载体上 *Hyg* 抗性基因的引物 *Hyg-F/Hyg-R* 进行 PCR 扩增鉴定转基因植株。(2)RT-PCR 检测:设计合成水稻 *actin* 基因两端引物 *Actin-F* (5'-CCTTCAACACCCCTGCTATG-3') 及 *Actin-R* (5'-CAATGCCAGGGAACATAGTG-3')。TRIzol(Invitrogen)提取水稻总 RNA, 以反转录后得到的 cDNA 为模板, 水稻 *actin* 基因为 RT-PCR 反应的内标, 引物为 *Actin-F/Actin-R*, 扩增目的片段长度 600 bp; *XIOsPR10* 基因的引物为 *XIOsPR10-F/XIOsPR10-R*, 扩增片段长度 483 bp。通过半定量 RT-PCR 的方法对目的基因 *XIOsPR10* 进行表达量分析。反应程序:94℃ 预变性 7 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 25 个循环; 72℃ 延伸 7 min。(3)GUS 染色法:取转基因植株以及对照植株的叶片, 于 X-gluc(上海生工)染液中 37℃ 染色过夜, 观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 *XIOsPR10* 基因过量表达载体的构建和转基因植株的分析

2.1.1 *XIOsPR10* 基因过量表达载体的构建与鉴定 用 *EcoR* *iv* 和 *Xba* *iv* 双酶切 pCMVFL3-*XIOsPR10* 质粒, 获得 760 bp 的完整 *XIOsPR10* cDNA 序列片段(图 2, 1 泳道)。将酶切片段与 pBPF 质粒连接, 转化后挑取单克隆用 *EcoR* *iv* 和 *Xba* *iv* 进行双

酶切鉴定, 得到 760 bp 的条带(图 2, 2 泳道), 该中间质粒命名为 pBPF-*XIOsPR10*。该质粒上含有约 2 600 bp 的 *XIOsPR10* 基因超表达单元, 即 *XIOsPR10* 基因上游的 35S 启动子、 Ω 因子和下游的 Tnos 终止子。*Hind* III 酶切 pBPF-*XIOsPR10*, 得到 *XIOsPR10* 基因超表达单元; 将其插入 pCAMBIA1301 载体, 构建成植物表达载体 p130F-35S-*XIOsPR10*Tnos(图 1), 简称 p130F-*XIOsPR10*。抽提阳性克隆质粒, 分别用 *Hind* III 单酶切和 *EcoR* *iv/Xba* *iv* 双酶切鉴定(图 3, 1、3 泳道; 图 2, 4 泳道)。将质粒 p130F-*XIOsPR10* 送 Invitrogen 公司测序以确保其序列正确。

2.1.2 *XIOsPR10* 基因过量表达转基因水稻的 PCR 检测 以 *XIOsPR10* 过量表达转基因水稻和对照水稻叶片总 DNA 为模板, 用引物 *XIOsPR10-F/XIOsPR10-R* 进行 PCR 扩增(图 4), 从图 4 可以看出, 转化的水稻植株中均扩增出 483 bp 的 *XIOsPR10* 基因编码区片段(图 4, 1~ 3 泳道), 而阴性对照无此条带(图 4, 4 泳道), 表明 *XIOsPR10* 基因已转化并整合到水稻染色体组中。另外, 转基因水稻和对照植株均扩增到 780 bp 的带(图 4, 1~ 4 泳道), 这是因为水稻的基因组 *XIOsPR10* 基因中含有一个 297 bp 的内含子。

2.1.3 *XIOsPR10* 基因过量表达转基因植株的 *gus* 基因表达分析 取转基因植株叶片和对照叶片, 于 X-gluc 染液中 37℃ 染色过夜, 可见转基因植株叶片

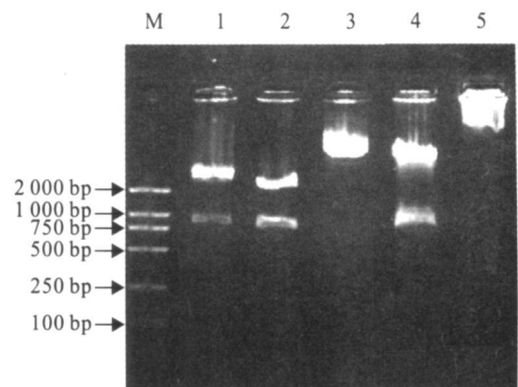


图 2 阳性克隆双酶切鉴定

M. DL2000 marker; 1. *EcoR* *iv/Xba* *iv* 酶切 pCMVFL3-*XIOsPR10*;
2. *EcoR* *iv/Xba* *iv* 酶切 pBPF-*XIOsPR10*; 3. pBPF-*XIOsPR10*;
4. *EcoR* *iv/Xba* *iv* 酶切 p130F-*XIOsPR10*; 5. p130F-*XIOsPR10*
Fig. 2 Enzyme digestion of positive clone with *EcoR* *iv* and *Xba* *iv*
M. DL2000 marker; 1. pCMVFL3-*XIOsPR10* digested by
EcoR *iv/Xba* *iv*; 2. pBPF-*XIOsPR10* digested by *EcoR* *iv/Xba* *iv*;
3. pBPF-*XIOsPR10*; 4. p130F-*XIOsPR10* digested
by *EcoR* *iv/Xba* *iv*; 5. p130F-*XIOsPR10*

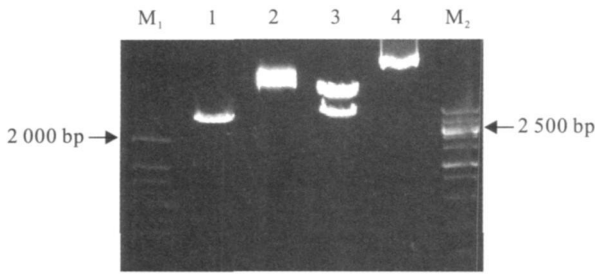


图3 阳性克隆单酶切鉴定

M₁. DL2000 marker; 1. *Hind* III 酶切 pBPF-*XIOsPR10*;
 2. 重组质粒 pBPF-*XIOsPR10*; 3. *Hind* III 酶切 p1301-*XIOsPR10*;
 4. p1301-*XIOsPR10*; M₂. Wide range DNA marker (100~6 000 bp)

Fig. 3 Restriction analysis of positive clone

M₁. DL2000; 1. pBPF-*XIOsPR10* digested by *Hind* III ;
 2. pBPF-*XIOsPR10*; 3. p1301-*XIOsPR10* digested by *Hind* III ;
 4. p1301-*XIOsPR10*; M₂. Wide range DNA marker (100~6 000 bp)

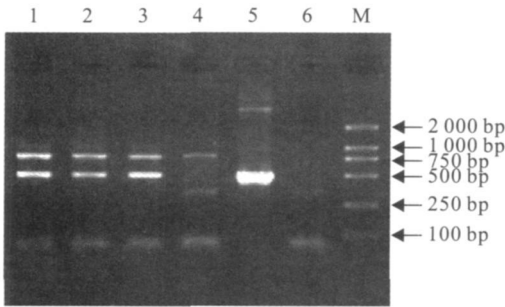


图4 转基因水稻 p1301-*XIOsPR10* 的 PCR 鉴定

1~3. 转化植株; 4. 未转化植株; 5. 质粒;
 6. 空白对照; M. DL2000 marker

Fig. 4 PCR analysis of transgenic rice of p1301-*XIOsPR10*

1~3. Transgenic plants; 4. Control plant; 5. Plasmid;
 6. No template control; M. DL2000 marker

断面处呈现蓝色, 而对照叶片不变色(图版 iv, 2), 表明 p1301-*XIOsPR10* 质粒上的 *gus* 基因已经成功整合到水稻基因组, 并表达出具有活性的 GUS 蛋白。

2.1.4 *XIOsPR10* 基因过量表达转基因水稻的 *XIOsPR10* 基因表达分析

提取过量表达植株及对照植株的总 RNA, 经反转录后获得 cDNA, 以 cDNA 为模版, *actin* 为内标, PCR 扩增 *actin* 基因和 *XIOsPR10* 基因(图 5)。从图 5 可以看出, 在没有受到诱导的情况下, 对照植株叶片中的 *XIOsPR10* 基因基本没有表达, 而转基因过量表达植株的 *XIOsPR10* 基因具有较高的表达水平, 转录水平明显高于对照植株。这表明 *XIOsPR10* 基因在转基因植株中能够稳定高表达。

2.2 RNAi 表达载体的构建转化和分析

2.2.1 RNAi 表达载体的构建及鉴定

sPR10 基因的质粒为模板, 用 RNAi-5K/RNAi-3B 和 RNAi-5S/RNAi-3S 两对引物分别进行 PCR 扩增, 得到大小约 250 bp, 反向互补的 *XIOsPR10* 基因的正义片段 KB 和反义片段 SS。

通过酶切连接的方法将反向互补的 KB 和 SS 片段构建进 pDS1301 载体中, RNAi 表达载体 pDS1301SS-KB。阳性克隆 PCR 扩增可得到约 250 bp 的扩增条带(图 6, 3、4 泳道); 阳性克隆质粒分别进行 *Sac* I/*Spe* I 双酶切和 *Kpn* I/*Bam* H I 双酶切鉴定。因 KB 和 SS 内含有 *Sac* I 酶切位点, 所以 *Sac* I/*Spe* I 酶切后可以得到约 2 kb、150 bp 以及

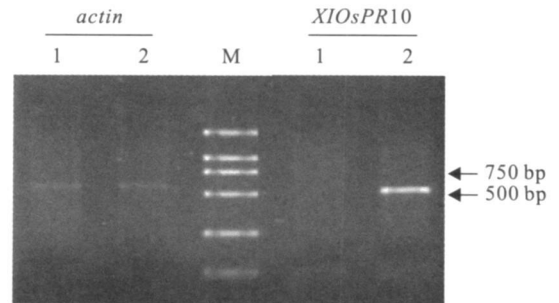


图5 转基因水稻 p1301-*XIOsPR10* 中 *XIOsPR10* 基因转录水平分析

1. 对照; 2. p1301-*XIOsPR10* 转基因水稻; M. DL2000 marker

Fig. 5 Transcription level analysis of *XIOsPR10* gene transgenic plant of p1301-*XIOsPR10* by RT-PCR

1. Control; 2. p1301-*XIOsPR10* transgenic rice; M. DL2000 marker

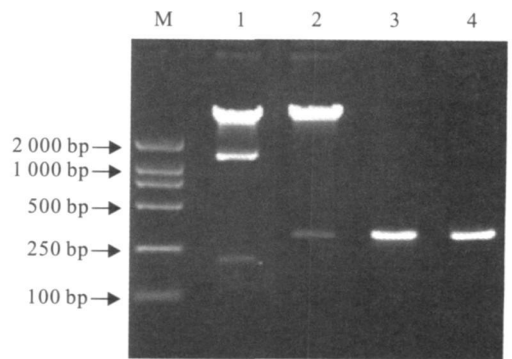


图6 RNAi 表达载体 PCR 及酶切鉴定

M. DL2000 marker; 1. *Sac* I / *Spe* I 酶切 pDS1301-*XIOsPR10*;
 2. *Kpn* I / *Bam* H I 酶切 pDS1301-*XIOsPR10*; 3. 以 RNAi-5S/
 RNAi-3S 为引物的 PCR 扩增; 4. 以 RNAi-5K/RNAi-3B
 为引物的 PCR 扩增

Fig. 6 Identification of RNAi expression vector by PCR and digestion

M. DL2000 marker; 1. pDS1301-*XIOsPR10* digested by *Sac* I /
Spe I ; 2. pDS1301-*XIOsPR10* digested by *Kpn* I / *Bam* H I ;
 3. PCR amplification with RNAi-5S/RNAi-3S primers;
 4. PCR amplification with RNAi-5K/RNAi-3B primers

200 bp 的 3 个小片段(图 6, 1 泳道); *Kpn* *iv*/*Bam* *H* *iv* 酶切后可以得到约 350 bp 的小片段(图 6, 2 泳道), 表明已获得 *XIOsPR10* 基因 RNAi 表达载体 pDS130F-SS-KB, 简称 pDS130F-*XIOsPR10*。将质粒 pDS130F-*XIOsPR10* 送 Invitrogen 公司测序以确保其序列正确。

2.2.2 RNAi 表达植株的 PCR 检测 用引物 *Hyg-F*/*Hyg-R* 对 RNAi 植株的 DNA 进行 PCR 鉴定。结果表明, 转化的水稻植株均扩增出 500 bp 左右的目的条带, 而阴性对照没有出现相应的条带(图 7)。表明 pDS130F-*XIOsPR10* 质粒的 T-DNA 区已经成功整合到水稻染色体组中。

2.2.3 RNAi 表达植株 *gus* 基因表达组化分析 取转基因植株叶片和对照叶片, 于 X-glucc 染液中 37 °C 染色过夜, 可见转基因植株叶片断面处呈现蓝色, 而对照叶片不变色(图版 iv, 3), 表明 pDS130F-*XIO-*

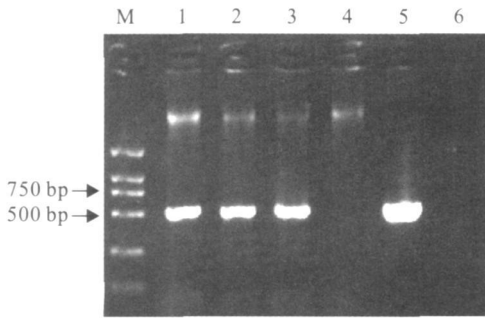


图 7 转基因水稻 pDS130F-*XIOsPR10* 的 PCR 鉴定

M, DL2000 marker; 1~3, 转化植株; 4, 未转化植株; 5, 质粒; 6, 空白对照

Fig. 7 PCR analysis of pDS130F-*XIOsPR10* transgenic rice

M, DL2000 marker; 1~3, Transgenic plants; 4, Control plant; 5, Plasmid; 6, No template control

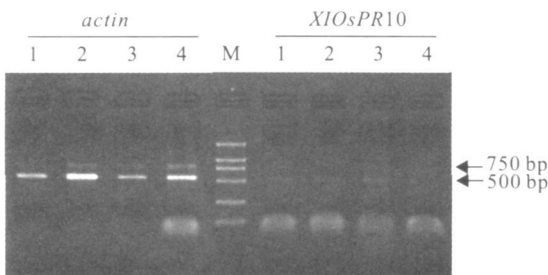


图 8 转基因水稻 pDS130F-*XIOsPR10* 中 *XIOsPR10* 基因转录水平分析

1, 野生型; 2~4, pDS130F-*XIOsPR10* 转基因水稻;

M, DL2000 marker

Fig. 8 *XIOsPR10* gene transcription level analysis of pDS130F-*XIOsPR10* transgenic rice by RT-PCR

1, Wild type; 2~4, pDS130F-*XIOsPR10* transgenic plant; M, DL2000 marker

sPR10 质粒上的 *gus* 基因已经成功整合到水稻基因组, 并表达出具有活性的 GUS 蛋白。

2.2.4 RNAi 表达植株 *XIOsPR10* 基因表达分析

对 3 株转 RNAi 水稻以及对对照植株接种病原菌 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* (简写“Xooc”), 诱导 *XIOsPR10* 基因的表达, 再用半定量 RT-PCR 方法分析 *XIOsPR10* 基因的转录水平。结果显示, 野生型水稻在受到病原菌感染后, 叶片中有 483 bp 的 *XIOsPR10* 基因编码区片段。(图 8, 右 1 泳道); 一株转基因水稻未能检测到 *XIOsPR10* 基因编码区片段(图 8, 右 4 泳道), 另两株能检测到 *XIOsPR10* 基因编码区片段(图 8, 右 2、3 泳道), 表明 *XIOsPR10* 基因 RNAi 表达载体 pDS130F-*XIOsPR10* 抑制 *XIOsPR10* 基因表达的效率在不同的转化植株中表现不同。

3 讨论

PR10 蛋白与植物的抗逆和抗病性关系密切。当植物受到外界环境如铜^[7], 苯并噻二唑^[16]、冷冻^[17]、创伤^[9,10] 和病原菌如植物病毒^[18]、细菌^[7,19] 和真菌^[9,11] 的胁迫时, 能够诱导 PR10 基因的表达。人参^[13]、羽扇豆^[20]、棉花^[19]、甜椒^[21]、甘蓝型油菜^[17]、水稻^[18] 等的 PR10 蛋白都具有 RNase 活性, 可以抑制病菌的生长。对于 PR10 基因在植物防御反应中的作用, 有假说认为一些 PR10 蛋白具有的 RNase 活性与植物的超敏反应有关, 或者直接对病原菌发生作用从而起到保护植物的作用^[13]。对花生 (*Arachis hypogaea* L.) AhPR10 蛋白的研究结果表明, AhPR10 蛋白通过其 RNase 活性对病原菌起到抑制的作用^[22]。

在转基因植物研究中人们发现, PR10 基因的过量表达并不一定能够抑制病原菌的生长。大豆 YPR10 家族成员中 *STH-2* 基因过量表达后, 并没有增强马铃薯对 *Phytophthora infestans* 和 Potato virus X 病原菌的抗性^[13]。此外可能由于使用了不同的宿主/病原体系统, 豌豆 (*Pisum sativum* L.) PR10-1 蛋白在油菜 (*Brassica campestris* L.) 中的过量表达并不能对 *Leptosphaeria maculans* 起到很好的抑制作用^[13]。但是大豆 PR10-1 基因在马铃薯中的过量表达对一些病害起到抑制作用^[19]。转玉米 *ZmPR10* 基因的烟草叶汁表现出 RNase 活性, 同时能抑制玉米病原体 *Aspergillus flavus* 的生长^[23]。因此 PR10 基因在植物里过量表达有可能能够提高植物对病原菌的抵抗能力。

在水稻对外源病菌入侵的应答反应研究中表明, PR10 蛋白参与了水稻对外来刺激的应急反应, 并且处于抗病反应中的 JA (茉莉酸) 信号途径的下游^[3-5], 但其如何抵御外来病害及在整个信号途径中具体功能和地位还需要进一步的研究。为进一步了解 XIOsPR10 蛋白的功能, 提高水稻抗病性, 本课题组构建了 XIOsPR10 植物过量表达载体, 并通过农杆菌介导的方法将其转入水稻中, 获得了过量表达 XIOsPR10 的转基因水稻。半定量 RT-PCR 分析表明转 XIOsPR10 基因的水稻在 XIOsPR10 基因转录水平上明显高于野生型对照, 说明 XIOsPR10 基因已经整合到水稻基因组中, 并稳定表达。

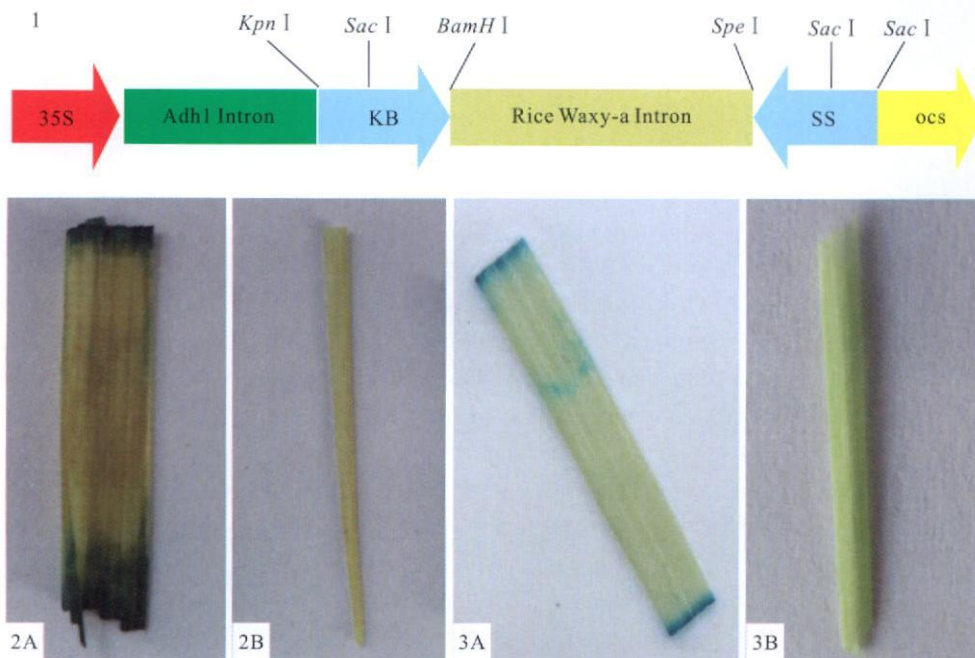
RNAi 技术是对植物内源基因进行表达调控的另外一种重要方式, 它通过双链 RNA (dsRNA) 特异性地降解靶 mRNA, 使靶基因发生基因沉默。构

建可形成发卡结构的 hpRNA 载体, 导入植物体后, 发卡茎部形成的 dsRNA 可诱导同源的内源基因沉默^[24], hpRNA 类 RNAi 表达载体具有较高的沉默效率, 并且大多数表现出显著的表现^[6, 24]。为更好地研究 XIOsPR10 基因的功能, 本实验构建了 XIOsPR10 基因的 ihpRNA 类 RNAi 表达载体 pDS130I-XIOsPR10, 并成功转入水稻中, 获得 RNAi 转基因水稻。通过半定量 RT-PCR 分析显示, 获得了 XIOsPR10 基因表达受抑制的转基因植株。上述 XIOsPR10 基因超表达和 RNAi 转基因植株的获得, 对 XIOsPR10 基因的表达调控方式进行了初步的分析, 为今后通过对获得的两种转基因植株进一步研究 XIOsPR10 蛋白在水稻应答外源病菌入侵反应中的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] SOMSSICH I E, SCHMELZER E, BOLLMANN J, HAHNBROCK K. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis related" proteins in cultured parsley cells[J]. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**(8): 2 427- 2 430.
- [2] FRISTENSKY B, HOROVITZ D, HADWIGER L A. cDNA sequences for pea disease resistance response genes[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1988, **11**(5): 713- 715.
- [3] MATTION D P, BRISSON N. Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato[J]. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1989, **2**(6): 325- 331.
- [4] CROWELL D N, JOHN M E, RUSSELL D, AMASINO R M. Characterization of a stress-induced, developmentally regulated gene family from soybean[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1992, **18**(3): 459- 466.
- [5] BREITENEDER H, FERREIRA F, REIKERSTORFER A, et al. Complementary DNA cloning and expression in *Escherichia coli* of *Aln g* I, the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*) [J]. *J. Allergy Clin. Immun.*, 1992, **90**(6): 909- 917.
- [6] VANEKKREBITZ M, HOFFMANN SOMMERGRUBER K, MACHADO M, SUSANI M, EBNER C, KRAFT D, SCHEINER O, BREITENEDER H. Cloning and sequencing of Mal d I, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen [J]. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 1995, **214**(2): 538- 551.
- [7] BREDA C, SALLAUD C, EL-TURK J, et al. Defense reaction in *Medicago sativa*: a gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles [J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 1996, **9**(8): 713- 719.
- [8] WARNER S, SCOTT R, DRAPER J. Characterisation of a wound-induced transcript from the monocot asparagus that shares similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (PR) proteins [J]. *Plant Mol. Biol.*, 1992, **19**(4): 555- 561.
- [9] MIDOHN, IWATA M. Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1996, **37**(1): 9- 18.
- [10] HUANG J C, CHANG F C, WANG C S. Characterization of a lily tapetal transcript that shares sequence similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (IPR) proteins [J]. *Plant Mol. Biol.*, 1997, **34**(4): 681- 686.
- [11] LOSC C, HIPSKIND J D, NICHOLSON R L. cDNA cloning of a sorghum pathogenesis-related protein (PR-10) and differential expression of defense-related genes following inoculation with *Cochliobolus heterostrophus* or *Colletotrichum sublineolum* [J]. *Mol. Plant Microbe In.*, 1999, **12**(6): 479- 489.
- [12] RYALS J A, NEUENSCHWANDER U H, WILLITS M G, et al. Systemic acquired resistance [J]. *The Plant Cell*, 1996, **8**(10): 1809.
- [13] LIU J J, EKRAMODDOULLAH A K M. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses [J]. *Physiol. Mol. Plant P.*, 2006, **68**(1- 3): 3- 13.
- [14] HIEI Y, OHTA S, KOMARIT, KUMASHIRO T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. *The Plant Journal*, 1994, **6**(2): 271- 282.
- [15] CHEN H (陈惠), ZHAO Y (赵原), ZHONG K (钟康). Improved high-efficiency system for rice transformation using mature em-

- bryø-derived calli[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学报), 2008, **25**(3): 322– 331(in Chinese).
- [16] ZIADI S, POU PARD P, BRISSET M N, PAULIN J P, SIMONEAU P. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid[J]. *Physiol. Mol. Plant P*, 2001, **59**(1): 33– 43.
- [17] LIU J J, EKRAMODDOULLAH A K M, YU X S. Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold hardening[J]. *Physiol. Plantarum*, 2003, **119**(4): 544– 553.
- [18] PUHRINGER H, MOH D, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, *et al.* The promoter of an apple *Ypr 10* gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible[J]. *Plant Sci.*, 2000, **152**(1): 35– 50.
- [19] ZHOU X J, LU S, XU Y H, WANG J W, CHEN X Y. A cotton cDNA (*GaPR-10*) encoding a pathogenesis-related 10 protein with *in vitro* ribonuclease activity[J]. *Plant Sci.*, 2002, **162**(4): 629– 636.
- [20] BANTIGNIES B, SEGUIN J, MUZAC I, DEDALDECHAMP F, GULICK P, IBRAHIM R. Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2000, **42**(6): 871– 881.
- [21] PARK C J, KIM K J, SHIN R, PARK J M, SHIN Y C, PAEK K H. Pathogenesis related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway[J]. *Plant J.*, 2004, **37**(2): 186– 198.
- [22] CHADHA P, DAS RH. A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: An insight of its mode of antifungal activity[J]. *Planta*, 2006, **225**(1): 213– 222.
- [23] XIE Y R, CHEN Z Y, BROWN R L, BHATNAGAR D. Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*[J]. *J. Plant Physiol.*, 2010, **167**(2): 121– 130.
- [24] SMITH N A, SINGH S P, WANG M B, STOUT JESDIJK P A, GREEN A G, WATERHOUSE P M. Gene expression: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs[J]. *Nature*, 2000, **407**(6 802): 319– 320.



图版 iv 1. 水稻 *XIOsPR10* RNAi 结构示意图(KB RNAi 正义片段; SS RNAi 反义片段); 2. *GUS* 基因在转基因水稻中的稳定表达(A. 过量表达转基因水稻; B. 野生型); 3. *GUS* 基因在转基因水稻中的稳定表达(A. RNAi 转基因水稻; B. 野生型)。

Plate iv Fig. 1. RNAi structure of rice *XIOsPR10* (KB RNAi sense fragment; SS RNAi anti-sense fragment); Fig. 2 Stable *GUS* expression in transgenic rice(A. over-expression plant; B. wild type); Fig. 3. Stable *GUS* expression in transgenic rice(A. Inhibited expression plant; B. Wild type).