

种子中特异表达 *IPT* 基因的植物二元载体构建及转基因水稻获得

张红心^{1,2}, 王桂兰¹, 陈超¹, 赵璞³, 马春红³

(1. 唐山师范学院 生命科学系 河北 唐山 063000; 2. 厦门大学 生命科学学院 福建 厦门 361005;
3. 河北省农林科学院 遗传生理研究所 河北省植物转基因中心 河北 石家庄 050051)

摘要: 为研究细胞分裂素在水稻籽粒发育中的作用, 构建了 p1300-p*PG-5α*-*IPT*-*Nos* 植物表达载体, 并对水稻进行遗传转化。以水稻品种 9311 为材料, 采用 PCR 法获得种子中特异表达的 *PG-5α* 基因启动子, 并将此启动子与 p1300 相连接, 构建 p1300-p*PG-5α* 载体, 用 *Nco* I 和 *Spe* I 双酶切 pSG516, 获得 *IPT*-*Nos* 核酸片段, 然后将此核酸片段插入到 p1300-p*PG-5α* 中, 构建 p1300-p*PG-5α*-*IPT*-*Nos* 植物表达载体。以水稻品种日本晴愈伤组织为材料, 采用农杆菌介导的方法进行遗传转化。成功构建了植物表达载体 p1300-p*PG-5α*-*IPT*-*Nos*, 获得了阳性率为 81.3% 转 *IPT* 基因群体。获得转基因株系后, 将为进一步筛选高效表达株系及观察其籽粒生长发育过程提供基础。

关键词: *PG-5α* 启动子; *IPT*; p1300-p*PG-5α*-*IPT*-*Nos*; 水稻; 遗传转化

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)06-0061-05

doi: 10.7668/hbnxb.2015.01.010

The Construction of a Vector for Endosperm-specific Expression of *IPT* Gene and It's Transformation in Rice

ZHANG Hong-xin^{1,2}, WANG Gui-lan¹, CHEN Chao¹, ZHAO Pu³, MA Chun-hong³

(1. Faculty of Life Science, Tangshan Normal University, Tangshan 063000, China; 2. The School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Plant Genetic Engineering Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: In order to specifically express *IPT* gene in the endosperm of developing rice seed, the binary vector p1300-p*PG-5α*-*IPT*-*Nos* was constructed firstly, the promoter of *PG-5α* was obtained by PCR amplification from rice genomic DNA (variety: 9311) and p1300-p*PG-5α* was constructed by inserting p*PG-5α* into p1300, then the *IPT*-*Nos* fragment was obtained by cutting pSG516 with *Nco* I and *Spe* I. After *IPT*-*Nos* inserted into p1300-p*PG-5α*, p1300-p*PG-5α*-*IPT*-*Nos* was constructed. p*PG-5α*-*IPT*-*Nos* was transformed into *Oryza sativa* (subsp. japonica cv. Nipponbare) cells by agrobacterium mediated method and regenerative seedlings were obtained. The results of PCR showed that about 81.3% seedlings were positive.

Key words: The promoter of *PG-5α*; *IPT*; p1300-p*PG-5α*-*IPT*-*Nos*; *Oryza sativa*; Transformation

植物激素特别是细胞分裂素对禾本科作物籽粒、小穗和小花的发育起着重要的作用^[1], 籽粒充实度好, 灌浆速度快的水稻品种灌浆前期玉米素及核苷含量高, 而且峰值出现时间早, 而籽粒充实度差的品种则反之^[2]。外施细胞分裂素可以显著增加可育颖花数目以及籽粒重^[3-4]。

IPT 基因是细胞分裂素合成途径中的一个关键

基因, 其编码蛋白催化异戊烯焦磷酸 (Isopentenyl pyrophosphate) 和 AMP 转化为 Isopentenyl AMP。而 iPMP 可以在植物中转化为具有生物活性的细胞分裂素^[5]。近年来, 有关 *IPT* 基因在植物种子中的特异表达已有初步研究报道, 如 Ma 等^[6] 将 *Vicillin-IPT* 转移到烟草中, 观察到 *IPT* 基因在发育种子中特异表达及转基因烟草种子中细胞分裂素含量升

收稿日期: 2014-09-09

基金项目: 唐山师范学院博士基金项目 (09A01); 农业部“948”项目 (2011-G1(3)-07); 河北省科技计划项目 (13396401D)

作者简介: 张红心 (1970-), 男, 山西运城人, 副教授, 博士, 主要从事植物分子生物学研究与教学研究。

通讯作者: 马春红 (1968-), 女, 浙江金华人, 研究员, 主要从事作物抗病生理及生物防治研究。

高转基因烟草胚细胞分裂快,成熟种子的重量显著高于对照。

水稻是我国重要的粮食作物之一,研究外源 *IPT* 基因在水稻种子中特异表达及其对种子发育乃至产量的影响在理论和生产上都有重要的意义,为此我们构建了种子中特异表达载体 *p1300-pPG-5 α -IPT-Nos* 并以水稻胚性愈伤组织为材料,将 *pPG-5 α -IPT-Nos* 转入到水稻中,获得了阳性转基因株系。

1 材料和方法

1.1 试验材料

水稻品种: 9311、日本晴由山东农业科学院水稻研究所提供。

菌株和质粒: 克隆载体 *pMD18-T* 购自大连宝生生物有限公司; 大肠杆菌 *DH5 α* 、质粒 *p1300* 由南京农业大学惠赠。

试剂和酶: *Taq* 和各种内切酶购自大连宝生生物有限公司; 凝胶回收试剂盒及其他各种生化试剂购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 采取 CTAB 法提取基因组 DNA^[7], 采用碱裂解法提取质粒 DNA^[8]。

1.2.2 PCR 扩增和克隆、测序 根据 *PG-5 α* 基因启动子的序列, 设计一对引物, 其核苷酸序列分别为: 正义引物: 5'-GAAACTAGTGGGAATACGGTGGTG GAGATGGG-3'; 反义引物: 5'-ATCTCCATGGCTCTG GGACATAGATCTTTC-3' (下划线为引入的 *Noc* I 酶切位点)。

以水稻总 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94 °C 10 min; 94 °C 45 s, 50 °C 45 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C, 10 min。反应体系为 20 μ L, 内含 1.5 mmol/L 的镁离子, 2.0 mmol/L dNTP, 0.1 mmol/L 的引物, 0.2 U 的 *Taq* 酶。用凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增片段, 直接克隆于 *pMD18-T* 载体上, 转化大肠杆菌感受态细胞, 在含有 Amp 抗性的培养基上挑选白色菌落于 LB 液体培养基中, 在 37 °C, 200 r/min 的条件下培养 12 h 后, 少量提取质粒, 进行 PCR 和酶切鉴定, 挑选 PCR 和酶切都呈阳性的克隆进行测序。

1.2.3 *p1300-pPG-5 α* 如图 1 所示, 首先用 *Xba* I 和 *Pst* I 分别双酶切重组子 *pMD18T-pPG-5 α* 和 *p1300*, 分别回收 *pPG-5 α* 核酸片段和双酶切后 *p1300*, 然后在 16 °C 条件下连接过夜, 反应体系为: 1 μ L 10 \times 连接酶缓冲液, 1 μ L *T₄* DNA 连接酶, 5 μ L *pPG-5 α* 核酸片段, 1 μ L *p1300*, 2 μ L 蒸馏水, 连接产

物转化 *DH5 α* , 获得克隆子, 提取质粒, 然后进行 PCR 和酶切鉴定。

1.2.4 *p1300-pPG-5 α -IPT-Nos* 植物表达载体的构建 用 *Xba* I 和 *Nco* I 双酶切 *p1300-pPG-5 α* , 回收后备用。用 *Nco* I 和 *Spe* I 双酶切 *pSG516*, 获得 *IPT-Nos*, 将 *IPT-Nos* 和 *p1300-pPG-5 α* 连接后, 转化 *DH5 α* , 获得克隆子, 提取质粒, 然后进行 PCR、酶切鉴定及测序验证(图 1)。

1.2.5 水稻遗传转化^[9-10] 其主要步骤为取水稻未成熟种子, 用 70% 酒精消毒 45 s, 无菌水清洗 3 次。然后加入 10% 的次氯酸钠消毒 45~60 min 后, 用无菌水清洗 3~5 次。然后用解剖针取出未成熟胚, 接种至诱导培养基上(MS + 2 μ -D 2 mg/L), 在 25~26 °C 黑暗条件下诱导愈伤组织, 5 d 后将愈伤继代 1 次。将农杆菌(EHA 105, 含有 *p1300-pPG-5 α -IPT-Nos* 质粒) 菌液涂布在卡那抗性的 LB 平板, 28 °C 倒置培养 3 d, 进行 PCR 和酶切鉴定。挑取阳性克隆, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时, 吸取 10 mL 菌液, 8 000 r/min 离心后, 收集菌体, 然后用共培养基悬浮(MS + 2 μ -D 4 mg/L + AS 100 μ mol/L), 用于遗传转化。挑选新鲜愈伤组织, 放入共培养基中浸泡 20 min 后, 将愈伤组织转移到固体共培养基中培养 3 d, 然后转移到筛选培养基上(NB + 2 μ -D 2 mg/L + Cb 500 mg/L + Hyg 100 mg/L), 60 d 后挑选生长良好、结构致密的抗性愈伤组织转移到预分化培养基中(NB + ABA 2 mg/L + 6-BA 3 mg/L + NAA 1 mg/L + Cb 250 mg/L + Hyg 25 mg/L), 在 25 °C, 12 h 光照条件下培养, 待出现绿点后, 将愈伤转移到分化培养基(NB + 6-BA 3 mg/L + NAA 1 mg/L + Sorbitol 13 g/L + Cb 250 mg/L + Hyg 25 mg/L) 上进行分化, 1 周后可见绿苗分化, 4 周后将再生小苗转移至水中培养, 然后移栽到土中。

1.2.6 转基因植物的 PCR 检测 用 CTAB 法提取再生植株叶片 DNA, 利用特异于潮霉素抗性基因引物(5'-CTTATCTGGGAAGTACTCACACA-3' 和 5'-ATCACCAGTCTCTCTACAAATC-3') 进行 PCR 反应, 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 58~60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 34 个循环; 72 °C 5 min。反应体系为 20 μ L, 内含 1.5 mmol/L 的镁离子, 2.0 mmol/L 的 dNTP, 0.1 mmol/L 的引物, 0.2 U 的 *Taq* 酶。

2 结果与分析

2.1 *PG-5 α* 基因启动子 PCR 扩增

以水稻总 DNA 为模板, 用特异于 *PG-5 α* 基因启动子引物进行 PCR 扩增后, 得到一条约 800 bp 的

特异片段(图2),将PCR产物与T载体相连后,转化DH5 α ,获得重组子并进行PCR鉴定后,挑选阳性克隆并用EcoR I和Pst I进行双酶切鉴定,切出约

800 bp的酶切片段(图3),说明PCR产物已经克隆到T载体上。测序结果验证了此片段即为PG-5 α 基因启动子。

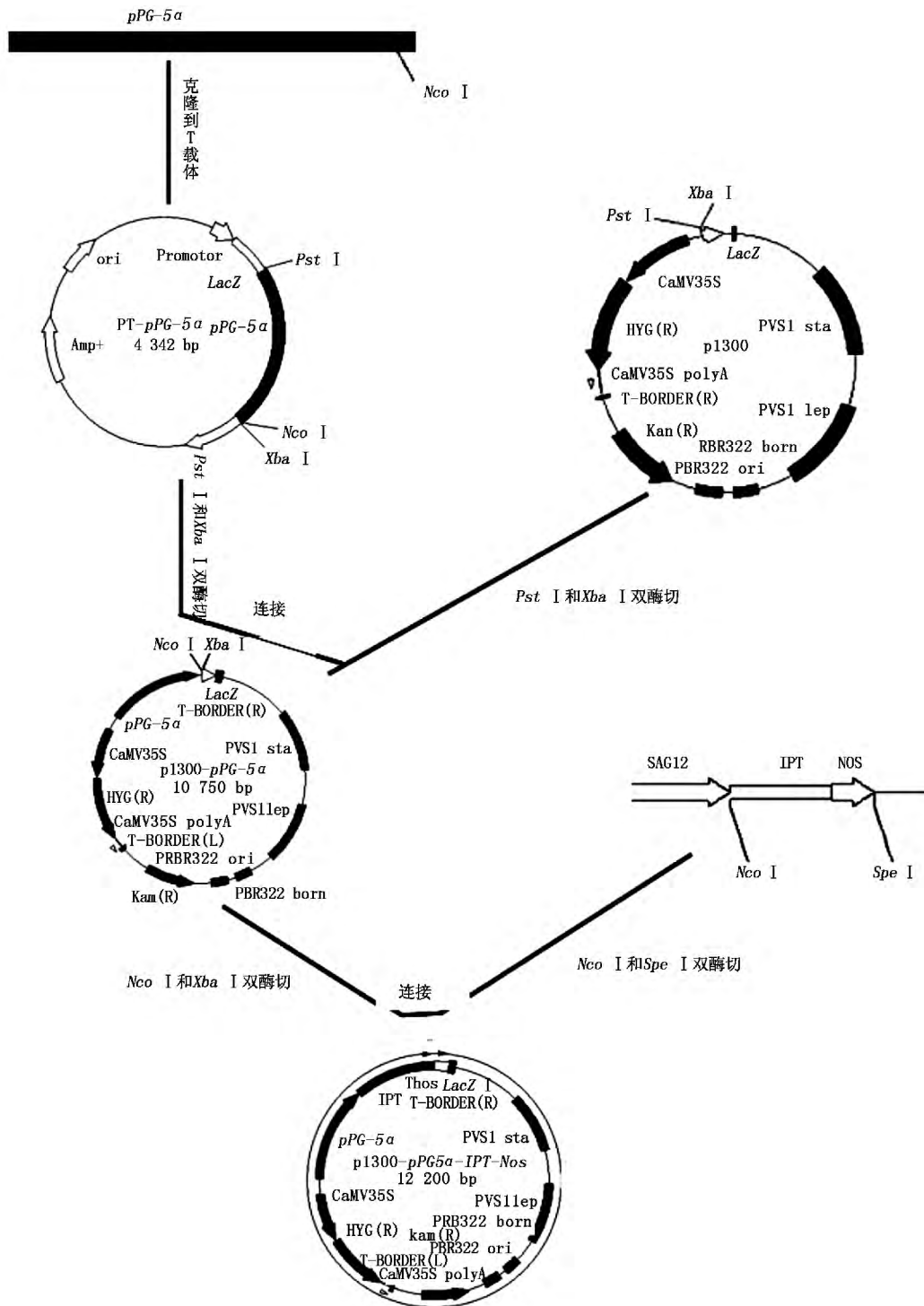


图1 p1300-pPG5 α -IPT-Nos 植物表达载体构建

Fig. 1 The construction of plant expression vector p1300-pPG5 α -IPT-Nos

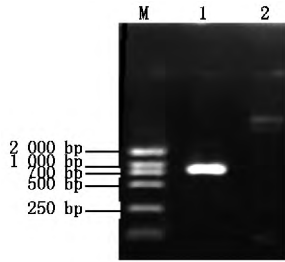
2.2 p1300-pPG-5 α 载体的构建

用Pst I和Xba I双酶切pMD pPG-5 α 质粒DNA后,获得了800 bp的核酸片段,将此片段与p1300相连接,并用EcoR I酶切鉴定,酶切结果显示PG-5 α 基因启动子已经插入到pCAMBIA 1300中(图4)。

2.3 p1300-pPG-5 α -IPT-Nos 双元载体的构建

用Nco I和Spe I双酶切pSG516,获得了约1.2 kb的IPT-Nos核酸片段,将此片段与p1300-pPG-5 α 相连接,获得重组子p1300-pPG-5 α -IPT-Nos,用IPT基因的特异引物对重组子进行PCR鉴定,获得了约750 bp的特异条带,用BamH I对阳性克隆进行

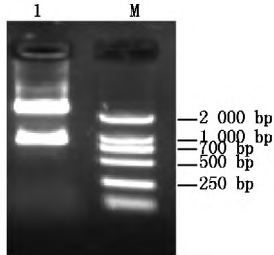
酶切鉴定,得到了大小约 750 bp 的核酸片段(图 5),说明 *IPT-Nos* 已经插入到 *p1300-pPG-5α* 载体中,测序结果进一步验证了 *p1300-pPG-5α-IPT-Nos* 载体构建成功(图 6)。



M. DNA Marker DL2000; 1. *pPG-5α*; 2. 阴性对照。
M. DNA Marker DL2000; 1. *pPG-5α*; 2. Negative control.

图 2 *PG-5α* 启动子的凝胶电泳图

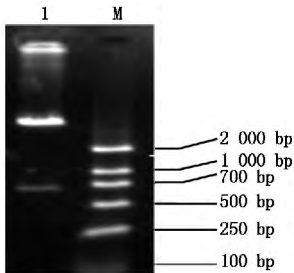
Fig. 2 Agrose gel electrophoresis of PCR product



1. 质粒经 *Pst* I / *Eco* R I 双酶切; M. DNA Marker DL2000。
1. Plasmid digested with *Pst* I / *Eco* R I; M. DNA Marker DL2000.

图 3 *pMD18-pPG-5α* 阳性克隆酶切鉴定

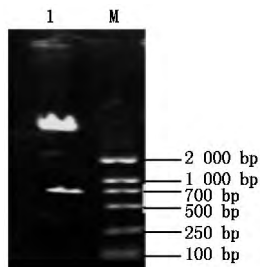
Fig. 3 Restriction identification of *pMD18-pPG-5α*



1. 质粒经 *Eco* R I 酶切; M. DNA Marker DL2000。
1. Plasmid digested with *Eco* R I; M. DNA Marker DL2000.

图 4 质粒 *p1300-pPG-5α* 酶切鉴定

Fig. 4 Restriction identification of *p1300-pPG-5α*



1. 质粒经 *Bam* H I 酶切; M. DNA Marker DL2000。
1. Plasmid digested with *Bam* H I; M. DNA Marker DL2000.

图 5 质粒 *p1300-pPG-5α-IPT-Nos* 酶切鉴定

Fig. 5 Restriction identification of *p1300-pPG-5α-IPT-Nos*

```
GCTCTTGCCAGCAGACAGGGCTTCCAGTCCTTTCGCTT
GATCGGGTCCAATGCTGTCTCAACTATCGACCGGAAGC
GGACGACCAACAGTGGAAAGAACTGAAAGGAACGACGC
GTCTCTACCTTGATGATCGGCCTCTGGTGAGGGTATCAT
CGCAGCCAAGCAAGCTCATCATAGGCTGATCGAGGAGGT
GTATAATCATGAGGCCAACGGCGGGCTTATTCTTGAGGG
AGGATCCACCTCGTTGCTCAACTGCATGGCGGAAACAG
CTATTGGAGTGCAGATTTTCGTTGGCATATTATTCGCCAC
AAGTTACCCGACCAAGAGACCTTCATGAAAGCGGCCAA
GGCCAGAGTTAAGCAGATGTTGCACCCCGCTGCAGGCCA
TTCTATTATTCAAGAGTTGGTTTATCTTTGGAATGAACCT
CGGCTGAGGCCATTCTGAAAGAGATCGATGGATATCGA
TATGCCATGTTGTTTGTAGCCGAAACCAGATCACGGCA
GATATGCTATTGCAGCTTGACGCAAATATGGAAGGTAAGT
TGATTAATGGGGATCGCNCAAGGAAATTTTCATTCCATG
GNGCGCCCAAACAGGGAAACAGAAAATTTCCCCCCCAA
GTAAACGCGACCCCGCTTTTCGACGGGAATTNNAAGGT
CATCCCGTTCCGGA AANGTAATTAAGGNTTACGCCCNCG
CCCTGGAANCTCCGAATTTCCCCNGAANCGTTTCNA
```

图 6 质粒 *p1300-pPG-5α-IPT-Nos* 测序结果

Fig. 6 The result of sequence of *p1300-pPG-5α-IPT-Nos*

2.4 水稻遗传转化

幼胚在诱导培养基上诱导 4 ~ 5 d 后长出颗粒状的愈伤,将其继代至新的培养基中,14 d 后愈伤直径为 0.5 ~ 1.0 cm,呈现淡黄色,半松散状颗粒。挑选新鲜愈伤组织与农杆菌进行共培养,然后将其转移到筛选培养基上,7 d 后愈伤组织逐渐变褐,随后在褐化的组织上长出乳白色、松散、生长相对旺盛的抗性愈伤。60 d 后,挑选生长良好、结构致密的抗性愈伤组织转移到预分化培养基中,待出现绿点后,将愈伤组织转移到分化培养基上进行分化,7 d 后就可见绿苗分化(图 7)。28 d 后,可将生根小苗移栽到土中。

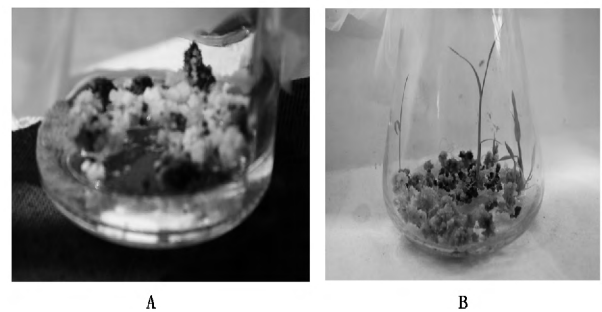
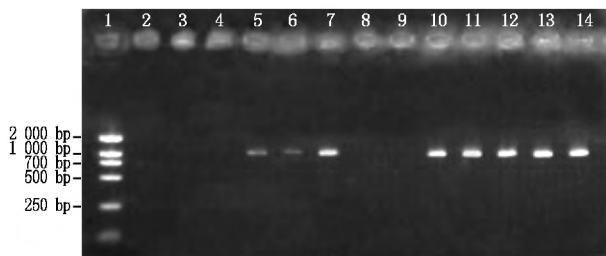


图 7 抗性愈伤预分化(A)和植株再生(B)

Fig. 7 Resistant calli in the pre-differential medium(A) and resistant seedlings(B)

2.5 再生植株 PCR 检测

以再生植株叶片 DNA 为模板,PCR 扩增出 900 bp 片段,与阳性对照一致(图 8)。在 48 株再生植株中,有 39 株 PCR 检测呈阳性,阳性率为 81.3%,说明 *IPT* 基因已成功地整合到植物染色体上。



1. Marker DL2000; 2. 阴性对照; 3~13. 再生植株; 14. 阳性对照。

1. Marker DL2000; 2. Negative control; 3~13. Regenerative seedlings; 14. Positive control.

图8 部分再生植株的 PCR 检测结果

Fig.8 Agrose gel electrophoresis of PCR product

3 讨论

禾本科植物特别是水稻种子灌浆速度以及最终籽粒重受细胞分裂素水平的影响,当前生产实践中推广的多数水稻品种,由于其灌浆期细胞分裂素含量低、并且峰值出现时间晚,因此灌浆速度慢、成熟种子的千粒质量低^[2]。为了解决此问题,在农艺生产实践中常常采用外施细胞分裂素类等植物生长调节剂方法来增加水稻的籽粒重及产量,但其效果受诸多因素影响,因此有时并不理想。

筛选和培育籽粒细胞分裂素含量高、灌浆速度快的水稻新品种是解决此问题的主要途径之一。但传统的育种方法所需周期长,而且培育出新品种常常存在抗病性差、品质低劣的缺陷,而利用基因工程手段,将外源基因转入到水稻后将有望在提高水稻产量同时并不附带其他不利的农艺性状。IPT 基因编码蛋白是细胞分裂素合成途径中的一个限速酶,研究发现,外源 IPT 基因在烟草中组成型表达之后,转基因烟草的细胞分裂素的含量与对照相比增加 300 多倍^[6]。本研究将 IPT 基因和水稻种子中特异表达启动子 *pPG-5α* 相连接,构建了植物双元表达载体,并进行遗传转化,获得了转基因株系,我们将进一步筛选 IPT 基因高效表达的株系,并对其种子的生长发育进

行比较研究。我们还将以生产实践中推广的水稻品种为材料,进行转 *pPG-5α-IPT-Nos* 的研究,为筛选优质的转基因水稻新品系奠定基础。

参考文献:

- [1] 李宗霖,周 燮. 植物激素及其免疫检测技术 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1997: 129.
- [2] Yang J C, Peng S B, Visperas R M *et al.* Grain filling pattern and cytokinin content in the grain and roots of rice plants [J]. *Plant Growth Regulation*, 2000, 30(3): 261 - 270.
- [3] Dietrich J T, Kaminek M, Blevins D G *et al.* Changes in cytokinins and cytokinin oxidase activity in developing maize kernels and the effects of exogenous cytokinin on kernel development [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1995, 33(3): 327 - 336.
- [4] Wang Z L, Cao W X, Dai T B *et al.* Effects of exogenous hormones on floret development and grain set in wheat [J]. *Plant Growth Regulation*, 2001, 35(3): 225 - 231.
- [5] Kaminek. Progress in cytokinin research [J]. *Trends in Biotech*, 1992, 10: 159 - 164.
- [6] Ma Q H, Lin Z B, Fu D Z *et al.* Increase seed cytokinin levels in transgenic tobacco influence embryo and seedling development [J]. *Functional Plant Biology*, 2002, 29(9): 1107 - 1113.
- [7] Clark M S. 植物分子生物学实验手册 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1998: 6 - 7.
- [8] J 萨姆布鲁克, E F 费里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1999: 19 - 22.
- [9] 张文惠, 林 涛, 张红心, 等. 红树林耐盐相关基因转化水稻的研究 [J]. *西北植物学报*, 2006, 26(6): 1105 - 1109.
- [10] 张红心, 苏勇波, 杨晓坡, 等. *OsCHX* 基因克隆及转基因植株获得 [J]. *厦门大学学报*, 2008, 46(2): 168 - 172.