

水稻谷蛋白启动子驱动下的 *ipt* 基因 在转基因烟草中的表达

申佩弘, 乔越美, 黄 胜, 武 波*

(广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005)

摘 要: 利用农杆菌系统介导, 采用叶盘转化法, 将在水稻谷蛋白启动子驱动下的外源 *ipt* 基因导入烟草植株中, 经过抗生素筛选、PCR 与测序分析检测出转基因植株。成熟的转基因烟草种子经过 ELISA 细胞分裂素试剂盒检测, 发现 iPA_s 含量为对照的 2.43 倍, 此外, 种子的重量也增加了 7.8%。

关键词: *ipt* 基因; 水稻谷蛋白启动子; 种子; iPA_s

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)01-0049-03

Ipt gene driven under a gluteline promoter of rice seed expressed in transgenic tobacco plants

SHEN Pei-hong, QIAO Yue-mei, HUANG Sheng, WU Bo

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530003, China)

Abstract: An *ipt* gene driven under the gluteline promoter of rice seed was introduced into tobacco plants by *A. tumefaciens* mediated transformation. After selected using antibiotics, PCR and sequencing analysis confirmed that *ipt* gene has integrated into the genomes of the tobacco plants. Cytokinin level in seeds was determined by ELISA kit. The result showed that the iPA_s level of transgenic seeds is about 2.43 fold than CK, at the same time, the weight of seed has increased by 7.8 percent.

Key words: *ipt* gene; rice gluteline promoter; iPA_s; seed weight

Ipt 基因是农杆菌 *A. tumefaciens* Ti 质粒上的一段序列, 编码异戊烯基转移酶, 该酶是调节、催化 CTKs 合成的第一步关键酶, 它能催化异戊烯基焦磷酸腺苷的分解, 产生异戊烯基单磷酸腺苷, 也就是所有细胞分裂素的前体。到目前为止, 该基因已被广泛克隆并应用于调控植物体内 CTKs 的含量, 或改良农作物品种(于晓红等, 2000), 利用不同启动子驱动 *ipt* 基因在植物中的表达也有过不少研究, 转基因株大多表现为细胞分裂素含量增加、叶片延缓衰老、外部形态发生变异、生理代谢受到影响等 (Anne 和 Jacques 等, 2002; Sa 等, 2002; Hans 和 Rhijn 等, 2001; 耿飒等, 2000)。

由于人口的增长, 自然资源的短缺, 如何培育出优良的农作物品种, 提高农业生产率已成为众多科学工作者研究的课题。植物基因工程便是一条方便而有效的途径, 我们采用了种子专一性表达启动子驱动 *ipt* 基因在模式植物烟草中的表达, 以研究能否使基因在种子中表达而提高种子重量。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

植物材料: 普通烟草 K326 种子, 普通水稻种子桂 99, 经常规方法消毒后, 播种于 MS 培养基上, 萌

收稿日期: 2003-01-08 修订日期: 2003-04-22

基金项目: 教育部高等学校青年骨干教师基金; 广西十百千人才工程专项经费(2000206)。

作者简介: 申佩弘(1977-), 女, 湖南邵东人, 硕士生, 分子遗传学方向。* 为通讯联系人

发待用。菌株及质粒: pBI 121 质粒, 根癌农杆菌 LBA 4404 菌株, 帮助质粒 pRK 2073, Ecoli 菌株 DH 5 α , 含有 *ipt* 基因的 pGEMT-easy 质粒(由北京大学生命科学院学院林忠平教授惠赠)。试剂盒: pGEM-T vector 试剂盒购于 Promega 公司, ELISA 检测试剂盒购于中国农业大学。主要酶类包括限制性内切酶、Taq 酶、连接酶, 均购于 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取 参考文献(王关林等, 1982)。

1.2.2 细菌质粒 DNA 的提取、转化、连接、酶切等均参照文献(Sambrook 等, 1982)。

1.2.3 启动子的 PCR 扩增 采用 SDS 法微量提取水稻总 DNA, 参照 GeneBank 上已报道的水稻谷蛋白启动子序列, 设计了一对引物, 上游引物为 5'-agccccgggtgagataaaggctcttgc-3', 下游引物为 5'-atagcttaggtcatataggagagagga-3', 两引物分别含有 SmaI 与 HindIII 酶切位点。94 °C 1 min, 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环后, 72 °C 延伸 3 min。PCR 扩增出 880 bp 左右的目的条带, 试剂盒回收后, 克隆到 pGEM-T vector 上。

1.2.4 *ipt* 基因的 PCR 扩增 根据 *ipt* 基因序列设计了如下引物, 上游引物为 5'-acagatctattcgattagatccatg-3', 其中含有 Bgl II 位点, 下游引物为 5'-acgagctctaatacatccgaacgga-3', 含有 SacI 酶切位点。并以林忠平教授提供的 pGEM-T easy 质粒为模板, 进行扩增, PCR 反应条件为 95 °C, 1min; 94 °C, 30 s, 50 °C, 30 s, 72 °C, 1 min, 循环数为 30; 1 min 30 s; 72 °C, 3 min。

1.2.5 普通烟草 K326 的遗传转化 将烟草种子用 0.1% 的升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 3 遍, 接种于 1/2 MS 培养基上, 3 周后取幼嫩的烟草无菌苗叶片, 用 10% NaClO 消毒 5 min 后, 无菌水清洗 2~3 遍, 切成 0.2~0.5 cm² 大小的方块, 在含目的基因的 LBA4404 菌液中感染 3~5 min, 无菌滤纸吸干, 接种于共培养基上, 25 °C 暗培养 4 d 后, 再将外植体转接于含有 50 mg/L 卡那霉素、100 mg/L 头孢霉素的分化培养基上进行筛选培养, 得到的 4 株抗性株移栽于大田中。

1.2.6 植物细胞分裂素的提取及 ELISA 检测 取 1 g 转 *ipt* 基因烟草的成熟种子(每株取 0.25 g), 在液氮中研磨成粉末, 加入 4mL 甲醇提取缓冲液, 混匀, 于 4 °C 下提取 4 h, 离心后取上清液, 经 C 18 处

理后的样品液冷冻干燥, 再用 2 mL 样品稀释液溶解。

2 结果

2.1 水稻谷蛋白启动子 PCR 扩增结果

经过测序分析, 与 GeneBank 上报道的相比较具有 99% 的同源性, 其登录号为(Y00687.1)。

2.2 通过 PCR 扩增出的 *ipt* 基因片断(740 bp)

经电泳回收后, 连接到 pGEM T-vector 上, 测序分析该序列与 GeneBank 上报道的 *ipt* 基因序列(登录号为 X53945)比较具有 100% 的同源性。

2.3 植物表达载体的构建

将载体 pBI 121 与克隆在 T-vector 上的启动子分别用 HindIII 与 Sma I 进行双酶切, 连接两外源片段, 此载体命名为 pBI 121-I。用 SmaI 与 SacI 两内切酶将 *ipt* 基因与 pBI 121-I 进行酶切, 连接后获得植物表达载体 pBI 121-II (图 1)

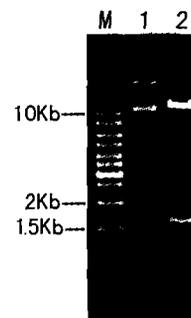


图 1 重组质粒 pBI 121-II 及其酶切电泳图
Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of the recombination plasmid pBI 121-II and its digestion by Sma I and Hind III

M. 1 kb marker; 1. 重组质粒 pBI 121-II; 2. 重组质粒 pBI 121-II 的 Sma I 和 Hind III 双酶切。

1. The recombination plasmid pBI 121-II; 2. The plasmid pBI 121-II digested by Sma I and Hind III.

2.4 转基因株的 PCR 检测及序列分析

CTAB 法微量提取烟草抗性株的总 DNA, 以水稻谷蛋白启动子上游引物 5'-agccccgggtgagataaaggctcttgc-3' 和 *ipt* 基因下游引物 5'-acgagctctaatacatccgaacgga-3' 对转基因抗性株与对照同时进行 PCR 扩增(图 2), 从 1、2、3、4 号株中都扩增出了 1.6 kb (gluteline promoter + *ipt*) 的带, 在对照中没有扩增出相应的带, 回收 1 号株的目的条带, 克隆到 pGEM-Tvector 上, 送至宝生物公司测序, 结果表明 *ipt* 基因已整合到烟草的基因组中。

2.5 成熟种子的重量及其 iPAs 含量分析

烟草成熟种子的重量如表 1, 转基因种子的平均千粒重为 0.082 g, 对照的平均千粒重为 0.076 g, 转基因种子重量比对照的增加了 7.8%, 经过统计学分析相差显著。

表 1 成熟种子的千粒重

Table 1 The weight of tobacco seed (g/1000 grains)

| 处理 Treatment | 1号 | 2号 | 3号 | 4号 | 平均重 Average weight |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|-----------------------|
| 阴性对照 CK | 0.0795 | 0.0800 | 0.0760 | 0.0720 | 0.0760 |
| 转基因株 Trans-genic seeds | 0.0835 | 0.0760 | 0.0820 | 0.0865 | 0.0820 |

经过 ELISA 检测, 每克对照种子的 iPAs 含量为 166.7 pmol, 每克转基因种子的 iPAs 含量为 405.03 pmol, 转基因种子的 iPAs 含量与对照相比增加了 2.43 倍。

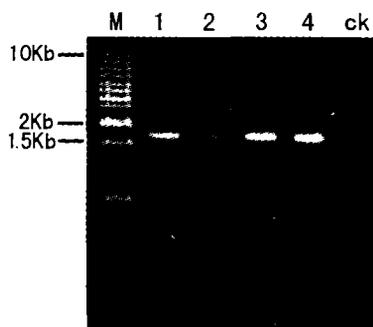


图 2 转基因烟草基因组的 PCR 检测

Fig. 2 PCR analysis of genome of transgenic tobacco

M. 1 kb marker; 1, 2, 3, 4. 转基因株 PCR 检测的

“启动子+*ipt* 基因”片段; CK. 阴性对照。

1, 2, 3, 4. “启动子+*ipt* 基因” amplified by PCR from transgenic tobacco, CK. Negative control.

3 讨 论

在对阳性株进行检测时, 单采用 *ipt* 基因的引物对植物总 DNA 进行 PCR 扩增时, 在对照中也有相应的 740 bp 的条带出现, 而用水稻谷蛋白上游引物与 *ipt* 基因的下游引物进行 PCR 检测时, 对照中没有相应的 1.62 kb (启动子+*ipt* 基因) 的电泳带出现, 进一步测序证明外源基因已导入烟草植株中。在此研究进行的同时, 我们还研究了 *ipt* 基因分别在椰菜花叶病毒启动子 (CAMV35S) 与水稻醇溶蛋

白启动子驱动下的表达, 发现 *ipt* 基因在组成形启动子 35 s 驱动下的表达使烟草外形发生变异, 叶片卷缩, 分枝较多 (未在此文中做说明), 结果与文献 (Faiss 等, 1997) 报道的相同。而该基因在种子特异性表达启动子 (水稻醇溶蛋白启动子) 驱动下的表达使得烟草种子的 iPAs 含量提高了 4.73 倍, 种子的重量增加了 12.8% (另文发表)。这些实验结果表明利用组织特异性表达启动子驱动 *ipt* 基因在植物中的表达以提高种子重量是可行的, 也为下一步如何利用该基因提高一些具有经济价值的农作物的产量提供了可靠的依据。

参考文献:

- 王关林, 方宏筠. 1982. 植物基因工程原理与技术.
- Anne Guivarc'h, Jacques Rembur, Marc Goetz, *et al.* 2002. Local expression of the *ipt* gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation [J]. *Journal of Experimental Botany*, **53**(369): 621-629.
- Faiss M, Zalubilova J, Strnad M, *et al.* 1997. Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants [J]. *Plant J*, **12**(2): 401-415.
- Geng S (耿 飒), Ma M (麻 密), Li GF (李国风). 2000. Effects on fertility in transgenic tobacco by localized expression of *ipt* gene (*ipt* 基因定位表达对转基因烟草育性的影响) [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **42**(2): 217-220.
- Hans J A van Rhijn, J Brian Power, Michael R Davey, *et al.* 2001. Effects of PSAG 12-*ipt* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce [J]. *Plant Physiol*, **127**: 505-516.
- Sa G, Mi M, He-Chun Y, Guo-Feng L. 2002. Anther-specific expression of *ipt* gene in transgenic tobacco and its effect on plant development [J]. *Transgenic Res*, **11**(3): 269-78.
- Sambrook J, *et al.* 1982. *Molecular Cloning: A laboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 13.
- Yu XH (于晓红), Zhu YQ (朱勇清), Chen XY (陈晓亚), *et al.* 2000. Alterations of root and fiber in transgenic cotton plants with chimeric *ph/p-ipt* gene expression (种子特异表达 *ipt* 转基因棉花根和纤维的改变) [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **42**(1): 59-63.