

基于降低水稻谷蛋白多成员表达水平的干涉表达载体构建

赵丰兰, 段永波, 盛 玮, 薛建平

(淮北师范大学生命科学学院/资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000)

摘要: 通过水稻全基因组比对分析, 获得16个谷蛋白成员信息。序列比对获得其保守区域, 并选取其中129 bp构建RNAi干涉载体, 双酶切验证和测序结果表明干涉载体构建成功。

关键词: 水稻; 谷蛋白; RNAi 干涉载体; 保守区域

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)09-0028-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2015.09.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2015.09.011)

水稻为全球一半以上人口的主食, 对保障全球粮食安全极为重要。同时水稻种子也是目前认为最有潜力作为生物反应器生产重组药用蛋白的“工厂”之一^[1]。目前, 限制水稻种子特异表达体系在重组药用蛋白大规模应用的主要因子是目标基因表达量过低。外源基因表达受到转录、翻译或翻译后加工修饰等多层面的协同调控。已用于提高外源基因表达水平的策略包括使用强特异表达启动子、改善蛋白运输环境、提高翻译效率、特定细胞器储存等^[2-5], 都一定程度上提高了外源蛋白表达量。这些方法都是针对目的基因表达

过程的直接改造以提高表达水平, 该类体系已较成熟, 如果再想大幅提高外源蛋白的表达量难度较大。

外源基因在表达过程中涉及与内源相关蛋白对氨基酸和存储空间直接竞争^[6]。2003年, Tada等将转大豆球蛋白(glycinin)基因的常规水稻品种与日本晴的低谷蛋白水稻突变体(LGC-1)进行杂交, LGC-1后代中glycinin表达量比其亲本日本晴的杂交后代提高120%, 达到237 μg/g, 暗示突变体中谷蛋白含量的降低提供了更多的氨基酸和空间供glycinin合成^[7]。Kuroda等设计了一套包

收稿日期: 2015-07-11

基金项目: 安徽省教育厅省级高校自然科学基金重点项目(KJ2014A226)

作者简介: 赵丰兰(1979—), 女, 安徽寿县人, 讲师, 硕士, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: zhaofenglan1997@163.com

通讯作者: 薛建平(1966—), 男, 河南温县人, 教授, 博士, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: xuejp@163.com

高于24%虫酰肼悬浮剂, 3%阿维菌素·氯氰菊酯烟雾剂3个处理的防效均极显著高于常规药剂2.5%溴氰菊酯乳油。

2.2 速效性与持效性

3%阿维菌素(氯氰菊酯烟雾剂各处理药后3d的防效在80%左右, 高于或与常规药剂相当, 有很好的速效性。药后14(15)d, 防效均在80%以上, 高于或与对照药剂相当, 持效期在14d以上。

2.3 安全性

在整个试验期间, 未发现3%阿维菌素·氯氰菊酯烟雾剂对马尾松有药害现象, 松树生长正常。

3 小结与建议

从2a的试验结果可以看出, 3%阿维菌素·氯氰菊酯烟雾剂对马尾松毛虫有很好的防效效果, 表现出较好的速效性, 且对松树生长无影响。相比较

常规的施药方法, 使用烟雾剂防治马尾松毛虫施药效率可大大提高。田间应用该烟雾剂防治马尾松毛虫时, 建议使用剂量为1500 g/hm²或以上, 使用烟雾剂进行均匀喷雾可有效防治马尾松毛虫。

参考文献:

- [1] 张 磊. 马尾松毛虫防治要点[J]. 黑龙江科学, 2014(7): 96.
- [2] 覃玉梅. 森防工作中的马尾松毛虫防治技术分析[J]. 乡村科技, 2014(6): 7-8.
- [3] 唐朝强. 敌杀死乳油混滑石粉防治马尾松毛虫浅试[J]. 大众科技, 2014(3): 113-114.
- [4] 李巧文, 田 溪, 曹金石. 烟雾剂防治日光温室番茄灰霉病药效试验[J]. 甘肃农业科技, 2011(9): 27-28.
- [5] 秦天琳, 闫军民. 3种烟雾剂对日光温室番茄灰霉病的防效[J]. 甘肃农业科技, 2012(7): 39-41.

(本文责编: 陈 珩)

括抑制水稻内源蛋白合成和种子特异表达外源目标基因这 2 个表达框的植物表达载体, 结果发现内源蛋白含量降低的转基因水稻种子中绿色荧光蛋白 (GFP) 表达水平比抑制前显著增强^[8]。Kurokawa 等筛选到霍乱毒素 B 亚基表达量显著提高的转基因株系, 表明利用外源基因与相关内源基因的竞争关系可提高外源蛋白表达水平, 然而关于降低水稻种子内源蛋白含量如何增强外源基因表达尚不清楚^[9-10]。

另一方面, 水稻种子具有调节各种内源蛋白组成以保持其总蛋白含量于一定范围的动态平衡机制。Maruta 等利用 RNAi 技术降低水稻谷蛋白表达以改良水稻蒸煮品质, 结果检测到种子的其他内源储藏蛋白含量增加^[11]。Kim 等在抑制水稻 13 kDa 醇溶蛋白合成改进营养品质的研究中发现, 该醇溶蛋白显著降低的同时, 其他蛋白含量如 10 kDa 醇溶蛋白、谷蛋白和伴侣蛋白等增加^[12]。综合分析多个研究组的研究结果, 无论低内源蛋白突变体、RNAi 降低内源蛋白的水稻种子, 还是以二者作为受体表达外源蛋白的种子, 均与其野生型在总蛋白含量上无显著差异, 表现为各种内源蛋白或与外源蛋白之间的此消彼长, 说明水稻种子各种蛋白组分间存在一种动态平衡机制, 使得其总蛋白含量维持于一恒定范围^[11-14]。

因此, 以水稻中谷蛋白所有成员的保守区域为靶序列, 通过 RNAi 技术降低谷蛋白的含量, 可创制低谷蛋白的突变体, 为提高外源重组蛋白表达水平奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

日本晴水稻种子由安徽省农业科学院水稻研究所提供。

植物表达载体 pCAMBIA1390RNAi 骨架载体、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 为淮北师范大学生命科学学院资源植物生物学安徽省重点实验室课题组保存。

PCR 扩增试剂为生工生物工程 (上海) 股份有限公司产品, 限制性内切酶 SacI、StuI、BamHI、MluI、T4 DNA 连接酶均购自 New England BioLabs (NEB) 公司, 胶回收试剂盒购自 AxyGen Biosciences 公司, pMD18-T vector 购自 TaKaRa 生物工程 (大连) 有限公司, 卡那霉素、氨基青霉素钠盐和利福

平等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 引物和基因合成以及测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 水稻谷蛋白基因及其保守区域分析 通过 NCBI 软件分析水稻全基因组范围内谷蛋白分布情况, 并采用 Blast 程序对所获成员的保守区域进行分析。选定其中部分保守序列作为靶位点设计引物, 构建 RNAi 干涉表达载体 (表 1)。

表 1 RNAi 干涉表达载体构建所用引物序列

| 引物名称 | 序列 ^① |
|-------------|--|
| RNAi Glu-Uf | <u>gagctctttgataggtgc</u> aagcatt (/SacI) |
| RNAi Glu-Ur | <u>aggcctttcaataactcggcgacaac</u> (/StuI) |
| RNAi Glu-Df | <u>ggatccaagtattgagccgcctgtt</u> (/BamHI) |
| RNAi Glu-Dr | <u>acggcTaaactatccaacgttctgtaa</u> (/MluI) |

①下划线为限制性内切酶酶切位点。

1.2.2 靶片段的获得及载体构建 以日本晴基因组 DNA 为模板扩增正义和反义靶片段。PCR 扩增体系 (50 μ l) 如下: 5 μ l 10 \times PCR buffer, 4 μ l 25 mmol MgCl₂, 4 μ l 2.0 mmol dNTPs, 2 μ l 10 μ mol 上下游引物, 0.4 μ l 5 U/ μ l Taq DNA 聚合酶, 100 ng DNA 模板, ddH₂O 至 50 μ l。PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 进行 30 循环。PCR 产物连接至 pMD18-T vector, 挑取 PCR 阳性克隆送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.2.3 RTNFR-Fc 种子特异表达载体构建 以 SacI/StuI 对 pCAMBIA1390RNAi 骨架载体质粒进行双酶切和含有正义片段的 pMD18-T vector 载体, 回收片段后进行 T4DNA 酶重组连接; 提取所获阳性菌落质粒进行 *BamHI/MluI* 双酶切使载体线性化, 同理将反义片段连入表达载体。提取阳性克隆质粒以相应内切酶进行正义片段和反义片段的酶切验证, 鉴定正确的克隆送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

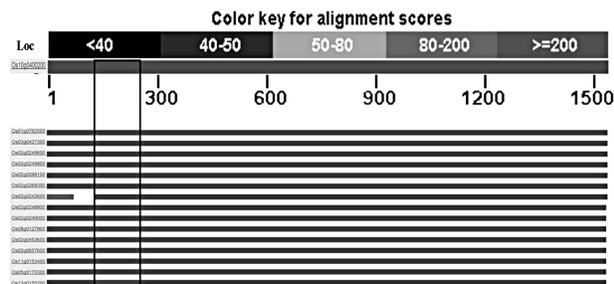
1.2.4 表达载体导入根癌农杆菌 将测序验证正确的重组质粒转入根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞。取 2 μ g 质粒 DNA 加入从 -70 $^{\circ}$ C 超低温冰箱取出的农杆菌感受态细胞, 混匀后冰浴 30 min; 转入液氮速冻 1 min; 加入 1 ml YEP 培养基 (不含抗生素), 30 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 4 h; 4 000 r/min 离心 1 min, 弃上清; 加 150 μ l YEP 培养基 (不含抗生素) 重悬, 将菌液涂布与含 50 μ g/ml Kan 和 10

$\mu\text{g/ml}$ Amp 的 YEP 固体平板; 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 至单菌落长出, 进行菌落 PCR 鉴定。

2 结果与分析

2.1 水稻中谷蛋白同源性分析

以谷蛋白基因 Os10g0400200 全长序列(1540 bp) 对水稻全基因组数据库进行搜索比对, 获得 16 个谷蛋白基因信息 (Os10g0400200、Os01g0762500、Os02g0249800、Os02g0249000、Os02g0249600、Os02g0268300、Os02g0268100、Os02g0248800、Os02g0242600、Os02g0453600、Os02g0249000、Os03g0427300、Os12g0155200、Os08g0127900、Os11g0153400、Os05g0170300)。通过 NCBI Blast 软件对这些基因进行全长比对, 结果表明其同源性极高 (图1)。选取其中部分保守区域作为靶位点, 序列为: ttgataggttgaagcatttgagccaattcgagtgtag-ggtctcaagctggcacaactgagttcttcgatgtctctaatgagttgttcaatg-accggagtattctgttgcgccgagttattgaa。以该区域为靶序列可能同时抑制所有谷蛋白基因的表达。

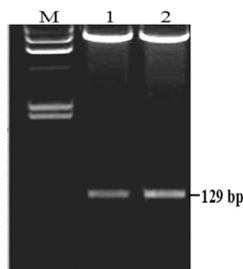


表中 ■ 表示所选取的靶序列。

图 1 水稻谷蛋白基因的同源性比对

2.2 表达载体构建

回收 PCR 片段后连入 T 载体, 分别酶切后与相应的酶线性化的载体进行连接, 对所获重组子进行正义片段和反义片段的酶切验证。酶切结果显示, 所获表达载体中含有 129 bp 的正义和反义片段(图2)。测序结果表明, 正义和反义片段已正



M 为 genomic DNA marker II; 1 为正义片段酶切结果; 2 为反义片段酶切结果。

图 2 重组子正义和反义片段的双酶切验证

确连入 pCAMBIA1390 RNAi 骨架载体。

2.3 重组子导入根癌农杆菌

提取测序正确克隆的质粒 DNA 转化根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞, 液氮速冻和恢复培养后涂于含卡那霉素和利福平的 YEP 平板。培养 2 d 后获得大量转化克隆(图3), 菌落 PCR 表明重组质粒已导入根癌农杆菌菌株 EHA105。



图 3 阳性农杆菌克隆

3 结论

谷蛋白是水稻种子中含量最高的储藏蛋白, 其含量占总蛋白的 80% 左右, 包括至少 12 个编码基因^[3]。通过敲除或降低谷蛋白表达, 对提高外源基因的表达水平很有意义和潜力。该研究通过水稻全基因组比对分析, 获得 16 个谷蛋白成员信息。序列比对获得其保守区域, 并选取其中 129 bp 构建 RNAi 干扰载体, 双酶切验证和测序结果表明干扰载体构建成功。

参考文献:

- [1] OU J Q, GUO Z B, SHI J N, *et al.* Transgenic rice endosperm as a bioreactor for molecular pharming [J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33: 585-594.
- [2] YANG L, SUZUKI K, HIROSE S, *et al.* Development of transgenic rice seed accumulating a major Japanese cedar pollen allergen (Cry j1) structurally disrupted for oral immunotherapy [J]. *Plant Biotechnol J.*, 2007, 5: 815-826.
- [3] GREENHAM T, ALTOSAAR I. Molecular strategies to engineer transgenic rice seed compartments for large-scale production of plant-made pharmaceuticals [J]. *Methods Mol. Biol.*, 2013, 956: 311-326.
- [4] BENCHABANE M, GOULET C, RIVARD D, *et al.* Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories [J]. *Plant Biotechnol J.*, 2008, 6(7): 633-648.
- [5] BOOTHE J, NYKIFORUK C, SHEN Y, *et al.* Seed-based expression systems for plant molecular farming [J]. *Plant Biotechnol J.*, 2010, (5): 588-606.
- [6] SHIGEMITSU T, OZAKI S, SAITO Y, *et al.* Production of human growth hormone in transgenic rice seeds: co-introduction of RNA interference cassette for suppressing the gene expression of endogenous storage pro-

第四轮豌豆全国区试定西点结果总结

墨金萍, 连荣芳, 肖 贵, 王梅春

(甘肃省定西市农业科学研究院, 甘肃 定西 743000)

摘要: 综合分析第四轮豌豆全国区试定西点参试品种(系)的生育期、主要农艺性状及产量表明, WD04-02、WD04-01均属于中、早熟半无叶豌豆品种, 田间长势整齐, 百粒重适中, 中后期无白粉病发生或发生较轻, 折合产量分别为1 890.95、1 850.93 kg/hm², 居参试品种(系)第1、2位, 比较适宜在定西市及同类地区种植推广。WD04-06、WD04-07适宜水肥条件较好的地域种植, WD04-1不适当当地生产条件, 建议淘汰。

关键词: 豌豆; 区域试验; 产量; 定西

中图分类号: S643.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)09-0031-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2015.09.012

豌豆属于泛域性豆科作物, 具有耐瘠、抗旱、适应性强、蛋白质含量高的特点, 能种植大麦、小麦的地方, 均能种植豌豆^[1], 我国豌豆种植面积 460 多万 hm², 定西市豌豆常年种植面积 3.0 万 hm²^[2]。国家春播豌豆品种区试是为了鉴定各单位选育和引进的春豌豆品种(系)及筛选的地方品种在不同条件下的适应性、生产力与商品性, 从中筛选出符合出口和加工需要的春豌豆品种, 为春豌豆品种鉴定、推广提供科学依据。定西试点于 2012—2014 年承担第四轮豌豆全国区试, 现将结

果总结如下。

1 材料与方 法

1.1 供试品种

参试的 11 个品种(系)均为半无叶豌豆, 采用匿名制管理, 品种(系)代号为 WD04-01、WD04-02、WD04-03、WD04-04、WD04-05、WD04-06、WD04-07、WD04-08、WD04-09、WD04-10、WD04-11。

1.2 试验方法

试验设在定西市农业科学研究院旱地试验地,

收稿日期: 2015-04-23

基金项目: 国家现代农业产业技术体系“食用豆定西综合试验站(CARS-09-Z22)”部分内容

作者简介: 墨金萍(1969—), 女, 江苏徐州人, 高级农艺师, 主要从事豆类新品种选育工作。E-mail: gsdxmjp@163.com

通讯作者: 王梅春(1961—), 女, 甘肃天水人, 研究员, 主要从事豆类新品种选育工作。E-mail: dxwmc@126.com

- teins[J]. *Plant Cell Rep.*, 2012, 31: 539-549.
- [7] TADA Y, UTSUMI S, TAKAIWA F. Foreign gene products can be enhanced by introduction into low storage protein mutants[J]. *Plant Biotechnol J.*, 2003, 1: 411-422.
- [8] KURODA M, KIMIZU M, MIKAMI C. A simple set of plasmids for the production of transgenic plants [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010, 74 (11): 2 348-2 351.
- [9] TOKUHARA D, YUKI Y, NOCHI T, *et al.* Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine[J]. *PNAS*, 2010, 107: 8 794-8 799.
- [10] KUROKAWA S, KURODA M, MEJIMA M, *et al.* RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to a change in localization of overexpressed cholera toxin B-subunit and the allergen protein RAG2 in rice seeds[J]. *Plant Cell Rep.*, 2014, 33: 75-87.
- [11] MARUTA Y, UEKI J, SATO H, *et al.* Transgenic rice with reduced glutelin content by transformation with glutelin A antisense gene[J]. *Mol. Breed*, 2001, 8: 273-284.
- [12] KIM H J, LEE J Y, YOON U H, *et al.* Effects of reduced prolamin on seed storage protein composition and the nutritional quality of rice[J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14: 17 073-17 084.
- [13] KUSABA M, MIYAHARA K, IIDA S, *et al.* Low glutelin content1: A dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 1 455-1 467.
- [14] KAWAKATSU T, HIROSE S, YASUDA H, *et al.* Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation[J]. *Plant Physiol.*, 2010, 154: 1 842-1 854.

(本文责编: 金 苹)