

文章编号:1674-7054(2013)02-0133-05

Xa21 全生育期表达载体的构建

曹玉鑫,花 龙,赵天龙,李明容,夏志辉

(海南大学 农学院,海南 海口 570228)

摘 要: 利用 PCR 技术,以水稻品种明恢 63 基因组 DNA 与携 *Xa21* 完整基因组片段的载体 pDB*Xa21* 作为模板,分别克隆了 *RSuS1* 启动子 (RSP)、*Xa21* 的开放阅读框至终止子的片段,并构建了 RSP 驱动水稻广谱抗白叶枯病基因 *Xa21* 的转基因表达载体。实时荧光定量 PCR 技术证实,水稻蔗糖合酶基因 1 (rice sucrose synthase gene 1, *RSuS1*) 在水稻种子中低表达,在叶鞘与叶中全生育期高效表达。

关键词: *Xa21*; 蔗糖合酶基因启动子;白叶枯病;水稻;全生育期

中图分类号: Q 812

文献标志码: A

病虫害一直是制约水稻产量的重要因素,其中白叶枯病是主要病害之一。*Xa21* 是最早克隆的水稻白叶枯病抗性基因,对白叶枯病具有广谱抗性^[1],*Xa21* 介导的抗病反应受水稻的发育阶段控制。KAREN 等^[2]的研究表明,带有 *Xa21* 的水稻在 2 叶期只有 2% 的抗病能力(即感病),5 叶期有 75% 的抗病能力,9 叶期以后则完全抗病。PARK 等^[3]通过利用来源于玉米的 ubiquitin 启动子过量表达 *Xa21* 基因,获得了全生育期抗白叶枯病的转基因水稻。由于 ubiquitin 启动子是一个组成型表达启动子,该启动子驱动的 *Xa21* 转基因水稻的稻米中不可避免的含有 *Xa21* 蛋白,由此可能带来潜在食用安全隐患。为了消除这种隐患,笔者通过 realtime PCR 对在稻米中低表达的水稻蔗糖合酶基因 1 (rice sucrose synthase gene 1, *RSuS1*) 与 *Xa21* 的表达模式与表达量进行比较分析,评估水稻蔗糖合酶启动子表达 *Xa21* 基因创建全生育抗病水稻的可行性,并成功构建了水稻蔗糖合酶 1 启动子 (RSP) 驱动的 *Xa21* 转基因表达载体,期望为培育安全的全生育期抗白叶枯病转基因水稻打下基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料 水稻品种明恢 63 (Minghui63), IRBB21 (携 *Xa21* 的水稻常规品种), 由本实验室保存。

1.2 试剂、质粒和菌株 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株用于感受态细胞的制备, pMD-20T 载体购自 Takara 公司, 二元转化载体 pCambia1300 由本实验室保存, RT-PCR 的逆转录试剂盒为 Promega 公司产品。高 GC 含量 DNA 片段 PCR 扩增的 DNA 聚合酶 LA *Taq* 和高保真 PCR 扩增的 DNA 聚合酶 Probest 皆为大连宝生物工程有限公司产品。RNA 提取试剂盒为 Invitrogen 的 Trizol Reagent。DNA 回收试剂盒与 Realtime PCR 试剂 TranStart Green qPCR SupMix 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 引物 本实验引物如表 1 所示, 其中引物 *Xa21-BamH I* / *Xa21-Sal I* 用于 *Xa21* 基因开放阅读框及终止子的克隆; RSPF/RSPR 引物用于水稻蔗糖合酶基因启动子克隆(酶切位点用下划线标出); 其他 3 对引物 *RSuS1F/R*, *Xa21RTF/R*, *ActinF/R* 分别用于 Realtime PCR 定量检测 *RSuS1*, *Xa21*, *Actin1* 基因的表达。

1.4 RNA 提取和 Realtime PCR 利用 Trizol 提取水稻品种 IRBB21 的幼苗期、分蘖盛期、成熟期不同部位的总 RNA, 然后反转录成 cDNA, 用表 1 的引物进行 Realtime PCR 定量分析。

1.5 *Xa21* 和蔗糖合酶 1 启动子的 PCR 扩增与测序 参照文献[4]的方法提取水稻基因组 DNA, 以本

收稿日期: 2013-04-25

基金项目: 国家自然科学基金(31071173); 海南省教育厅高校科研资助项目(Hjkj2012-12); 海南大学科研启动经费(KYQD1001)

作者简介: 曹玉鑫(1986-), 女, 山西阳泉人, 海南大学农学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 夏志辉(1978-), 男, 海南大学农学院副研究员, 博士, 硕导。E-mail: zhxia-111@163.com

实验室保存的携 *Xa21* 完整基因组片段的载体 pDB*Xa21* 为模板^[5], 分别用引物 RSP-*Kpn* I 和 RSP-*Bam*H I, *Xa21-Bam*H I 和 *Xa21-Sal* I 分离水稻蔗糖合酶 1 启动子(简写 RSP)与包括 *Xa21* 基因完整开放阅读框(ORF)和终止子的基因片段。回收 PCR 片段连接 pMD20-T 进行测序(分别命名为 T-RSP 与 T-*Xa21*), 每个样品挑取 3 个阳性独立克隆进行通读测序。

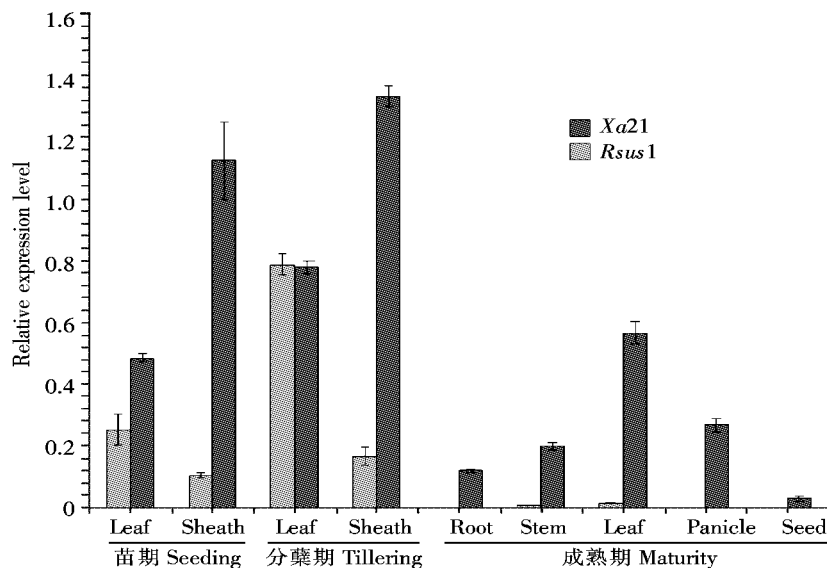
表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of primers in this study

primers	Sequence(5'—3')	Size /bp	Usage
<i>Xa21-Bam</i> H I	GGATCCGCACTTCTGCACGATGATATC	4 734	Fragment from <i>Xa21</i> ORF to terminator
<i>Xa21-Sal</i> I	ATGTCGACGTGAGTCAAGTAGAGACATG		
RSP- <i>Kpn</i> I	GGGTACCCTCCTTCATTTTCAGCAATG	1 743	<i>RSuS1</i> promoter
RSP- <i>Bam</i> H I	GGGATCCCAATGGTGGCAGAGACGAG		
RSuS 1F	TATTGGAAGTGAAGCACTG	201	Realtime PCR for <i>RSuS1</i>
RSuS 1R	AGGCATGAGCAATGGTACAC		
<i>Xa21</i> RTF	GGCCTGACAAATTGTTGCTTG	127	Realtime PCR for <i>Xa21</i>
<i>Xa21</i> RTR	ATTGCCAGCTCTTACGGT		
Actin1 F	GCGTGGACAAAGTTTTCAACCG	153	Realtime PCR for rice <i>Actin1</i>
Actin1R	TCTGCTACCCTCATCAGGCATC		

2 结果与分析

2.1 水稻蔗糖合酶基因 1 的表达谱分析 李永春等^[6]的研究表明, *RSuS1* 是一个种子中低表达, 在水稻根、茎、叶中高效表达的基因, 但该基因在水稻苗期的根、茎、叶中的表达情况仍然未知, 此外, 由于水稻主要病害大多发生在叶片与叶鞘, 因此, 还有必要检测水稻苗期的叶片和叶鞘中的蔗糖合酶基因的表达情况。笔者通过实时荧光定量 PCR 技术对水稻苗期、分蘖盛期、成熟期的叶片和叶鞘中 *RSuS1* 进行了定量分析, 结果表明(图 1), *RSuS1* 在水稻苗期、分蘖盛期的叶片与叶鞘中都能高效表达, 在苗期的叶片或叶鞘的表达量同分蘖盛期 *Xa21* 在叶片中的表达量相当, *Xa21* 在分蘖盛期对白叶枯病具有高度抗性。因此, 利用 *RSuS1* 启动子表达 *Xa21*, 水稻将有可能获得全生育期的抗病。

图 1 水稻蔗糖合酶基因 1 与 *Xa21* 在不同发育时期不同部位的相对表达量分析(*actin* 基因为内部参照)

Leaf: 叶; Sheath: 叶鞘; Root: 根; Stem: 茎; Panicle: 穗; Seed: 种子

Fig. 1 Relative expression level of *RSuS1* and *Xa21* in different tissue at different growth stage, gene *actin* 1 as control

2.2 水稻蔗糖合酶基因的启动子克隆与序列分析 连接蔗糖合酶基因 1 启动子 PCR 片段的 3 个独立阳性 T 载体克隆的测序结果表明,本研究克隆的启动子在 TATA 盒、CAAT 盒及转录起始位点等重要功能区与李永春等^[6]报道的序列一致;在 1 067 和 1 168 位置有 2 个碱基替换;在 1 507 有 1 个碱基插入;在 1 125 位置有 13 个碱基插入(图 2)。为了进一步验证差异序列的真实性,利用笔者得到的 RSP 序列在 NCBI 数据库进行 blast 分析,结果发现,本研究得到的启动子与李永春等^[6]报道的启动子存在差异的序列与品种 Carolina Gold 完全一致(NCBI Accession No: JQ733914.1),并且该序列已经广泛用于植物的表达载体 pCAM-RSs1(NCBI Accession No: JQ733910.1),说明本研究获得的启动子具有正常的功能,完全可以应用于水稻的基因工程育种。

Nipponbare (430)	CACGGAATGCCCGATGCAAAAAAAGAAATGCTGTTAACAAATCA (478)
Li (430)	CACGGAATGCCCGATGCAAAAAAAGAAATGCTGTTAACAAATCA (479)
Minghui63 (430)	CACGGAATGCCCGATGCAAAAAAAGAAATGCTGTTAACAAATCA (479)
Carolina Gold (430)	CACGGAATGCCCGATGCAAAAAAAGAAATGCTGTTAACAAATCA (479)
Nipponbare (1039)	AAACAAGAAAAGCATCTGCTTTATTTCTCTTTTCTTTTCATCCCG (1088)
Li (1040)	AAACAAGAAAAGCATCTGCTTTATTTCTCTTTTCTTTTCATCCCG (1089)
Minghui63 (1040)	AAACAAGAAAAGCATCTGCTTTATTTCTCTTTTCTTTTCATCCCG (1089)
Carolina Gold (1040)	AAACAAGAAAAGCATCTGCTTTATTTCTCTTTTCTTTTCATCCCG (1089)
Nipponbare (1139)	CTATTATTCTACAGAGAAAAGATTGAAGCTTTTTTCTCCAAAGCTGAC (1188)
Li (1140)	CTATTATTCTACAGAGAAAAGATTGAAGCTTTTTTCTCCAAAGCTGAC (1189)
Minghui63 (1140)	CTATTATTCTACAGAGAAAAGATTGAAGCTTTTTTCTCCAAAGCTGAC (1189)
Carolina Gold (1140)	CTATTATTCTACAGAGAAAAGATTGAAGCTTTTTTCTCCAAAGCTGAC (1189)
Nipponbare (1109)	ATAGGATACTCCCTTCGCTA-----GGAAAAAACCACCCA (1245)
Li (1210)	ATAGGATACTCCCTTCGCTA-----GGAAAAAACCACCCA (1246)
Minghui63 (1210)	ATAGGATACTCCCTTCGCTAGTCCCTTCGCTAGGAAAAAACCACCCA (1259)
Carolina Gold (1210)	ATAGGATACTCCCTTCGCTAGTCCCTTCGCTAGGAAAAAACCACCCA (1259)
Nipponbare (1286)	TCCTACTCCTTCTCAGGTATGGTGAGATATTTTCATAGTATAAATAAATTTG (1335)
Li (1287)	TCCTACTCCTTCTCAGGTATGGTGAGATATTTTCATAGTATAAATAAATTTG (1336)
Minghui63 (1300)	TCCTACTCCTTCTCAGGTATGGTGAGATATTTTCATAGTATAAATAAATTTG (1349)
Carolina Gold (1300)	TCCTACTCCTTCTCAGGTATGGTGAGATATTTTCATAGTATAAATAAATTTG (1349)
Nipponbare (1386)	CGTTCGATCTATGTTGTTATATTAT-AGACGGAGATAGTAGATTCCGGTTA (1425)
Li (1387)	CGTTCGATCTAGGTTGTTATATTATGAGACGGAGAGAGTAGATTCCGGTTA (1426)
Minghui63 (1390)	CGTTCGATCTAGGTTGTTATATTATGAGACGGAGAGAGTAGATTCCGGTTA (1439)
Carolina Gold (1390)	CGTTCGATCTAGGTTGTTATATTATGAGACGGAGAGAGTAGATTCCGGTTA (1439)
Nipponbare (1486)	CCATCAGATTAATAAAA- CATATGTTTTGATTAAAAAATGGGGAATTTG (1524)
Li (1487)	CCATCAGATTAATAAAA- CATATGTTTTGATTAAAAAATGGGGAATTTG (1525)
Minghui63 (1490)	CCATCAGATTAATAAAAACATATGTTTTGATTAAAAAATGGGGAATTTG (1539)
Carolina Gold (1490)	CCATCAGATTAATAAAAACATATGTTTTGATTAAAAAATGGGGAATTTG (1539)

图 2 不同水稻品种蔗糖合酶基因 1 启动子的序列比较

Nipponbare: 水稻品种日本晴的蔗糖合酶 1 启动子序列(Accession No: AP004280.3); Li: 李永春等发表的蔗糖合酶 1 启动子序列^[6]; Minghui63: 笔者从水稻品种明恢 63 克隆的蔗糖合酶基因 1 启动子序列; Carolina Gold: 从水稻品种 Carolina Gold 中克隆的蔗糖合酶基因 1 启动子序列(NCBI Accession No: JQ733914.1)

Fig. 2 Comparison of DNA sequences of *RSuS1* promoter from different rice varieties

Nipponbare, Minghui63 and Carolina Gold represent *RSuS1* promoter from rice variety nipponbare(Accession No: AP004280.3), Minghui63 and Carolina Gold(NCBI Accession No: JQ733914.1), respectively. Li indicate *RSuS1* promoter cloned by Li^[6]

2.3 表达载体的构建 用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam*H I, 分别对 T-RSP 重组质粒和 pCAMBIA1300 载体质粒进行双酶切, 分别回收约 1.7 kb 的 RSP 片段和约 9 kb 的 pCAMBIA1300 载体片段(如图 3A), 连接后转化 DH5 α 感受态, 提取阳性克隆 pCAMBIA1300-RSP 重组质粒, 用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam*H I 进行双酶切验证, 酶切片段约为 1.7 kb, 与理论值一致(如图 3B), 说明重组载体 pCAMBIA1300-RSP 构建成功。

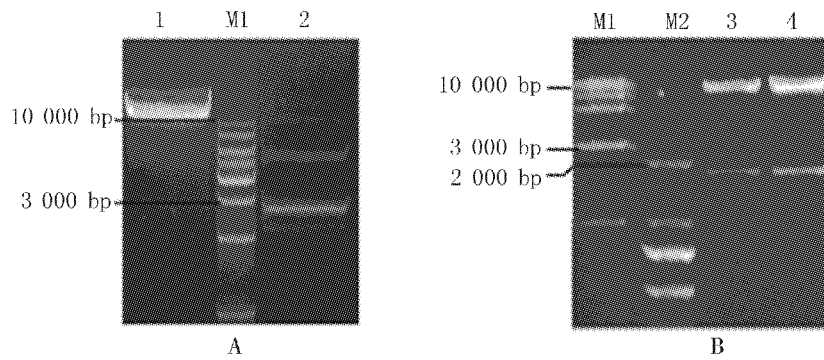


图3 载体 pCambia1300-RSP 酶切鉴定

A: T-RSP 质粒和 pCambia1 300 质粒的 *Kpn* I 与 *Bam*H I 双酶切;
 B: pCambia1 300-RSP 重组质粒 *Kpn* I 与 *Bam*H I 双酶切鉴定;
 M1: 1 kb marker; M2: DL2000 marker; 1: 载体 pCambia1 300; 2: T-RSP 载体; 3, 4: pCambia1300-RSP 候选重组载体

Fig. 3 Identification of plasmid pCambia1 300-RSP by enzyme digestion

A: T-RSP plasmid and pCambia1 300 plasmid digested by enzyme *Kpn* I and *Bam*H I ; B: pCambia1 300-RSP plasmid digested by enzyme *Kpn* I and *Bam*H I ; M1: 1kb marker; M2: DL2000 marker; 1: Vector pCambia1 300; 2: Vector T-RSP; 3, 4: pCambia1 300-RSP candidate vector

用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I , 分别对 T-*Xa*21 重组质粒和 pCambia1300-RSP 重组质粒进行双酶切, 分别回收约 4 700 bp 的 *Xa*21 片段和 10 700 bp 的 pCambia1300-RSP 片段(图 4A), 连接后转化 DH5 α 感受态, 提取阳性克隆 pCambia1300-RSP-*Xa*21 重组质粒, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切验证, 酶切片段约 4 700 bp 和 11 000 bp, 与理论值一致(图 4B), 说明重组载体 pCambia1300-RSP-*Xa*21 构建正确, 载体具体结构如图 5 所示。

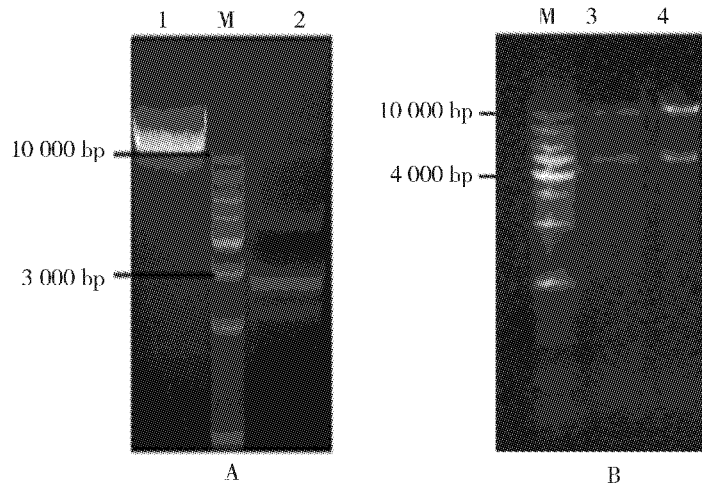


图4 转基因载体 pCambia1 300-RSP-*Xa*21 的鉴定

A: T-*Xa*21 质粒和 pCambia1 300-RSP 质粒的 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切;
 B: pCambia1 300-RSP-*Xa*21 重组质粒 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定;
 M: 1kb marker; 1: 载体 pCambia1 300-RSP; 2: T-*Xa*21 载体; 3, 4: pCambia1300-RSP-*Xa*21 重组候选载体

Fig. 4 Identification of plasmid pCambia1 300-RSP-*Xa*21 by enzyme digestion

A: T-*Xa*21 plasmid and pCambia1 300-RSP plasmid digested by enzyme *Bam*H I and *Sal* I ; B: pCambia1300-RSP-*Xa*21 plasmid digested by enzyme *Bam*H I and *Sal* I ; M: 1kb marker, 1: Vector pCambia1 300-RSP; 2: Vector T-*Xa*21; 3, 4: pCambia1 300-RSP-*Xa*21 candidate vector

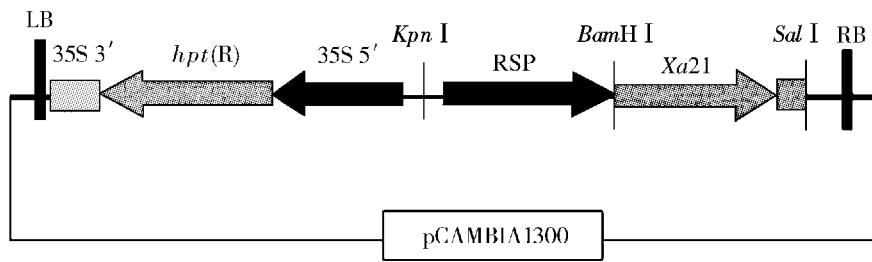


图5 全生育期表达 *Xa21* 的安全转基因载体 pCambia1300-RSP-*Xa21* 结构图

RB:右边界;*hpt*:潮霉素磷酸转移酶基因;

RSP:蔗糖合酶基因1的启动子;LB:左边界

Fig. 5 Diagram of plant expression vectors pCambia1300-RSP-*Xa21*

RB: Right border of T-DNA; *hpt*: Hygromycin phosphotransferase gene; RSP: Promoter of

RSuS1; LB: Left border of T-DNA

3 讨论

随着各种转基因作物的相继问世和种植面积的不不断扩大,转基因食品的安全性引起人们的广泛关注^[7]。目标基因编码的蛋白是否让食用者产生过敏性(或毒性)反应,是评价转基因作物是否安全的重要指标,从食用安全性角度考虑,转基因育种要尽量避免外源基因在作物食用部分的表达。稻米是人们的主要食粮,利用在稻米中低表达的启动子是解决转基因水稻食用安全性的出路之一。

水稻的大多数病虫害主要发生在根、叶鞘、茎、叶与颖壳上,已经有人通过转基因的方法证实在水稻蔗糖合酶基因1启动子可以驱动目标基因在根、茎、叶中高效表达^[6,8]。笔者研究发现,蔗糖合酶基因在水稻的叶鞘、叶全生育期高效表达,在苗期的叶片或叶鞘的表达量同分蘖盛期 *Xa21* 在叶片中的表达量相当,*Xa21* 在分蘖盛期对白叶枯病具有高度抗性,因此,利用蔗糖合酶基因启动子表达 *Xa21* 将获得全生育期抗白叶枯病的转基因水稻。

参考文献:

- [1] SONG W Y, WANG G L, CHEN L L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21* [J]. *Science*, 1995, 270:1804-1806.
- [2] CENTURY K S, LAGMAN R A, ADKISSON M, et al. Developmental control of *Xa21*-mediated disease resistance in rice [J]. *plant Journal*, 1999, 20(2): 231-236.
- [3] PARK C J, LEE S W, CHERN M, et al. Ectopic expression of rice *Xa21* overcomes developmentally controlled resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Plant Science*, 2010, 179(5): 466-471.
- [4] 夏志辉,董军美,罗越华. 利用限制性内切酶 *Xcm* I 构建 T 载体 [J]. *热带生物学报*, 2010, 1(3): 206-209.
- [5] 夏志辉,李晓兵,陈彩艳,等. 无选择标记和载体骨干序列的 *Xa21* 转基因水稻的获得 [J]. *生物工程学报*, 2006, 22(2): 204-210.
- [6] 李永春,张宪银,薛庆中. 蔗糖合酶基因启动子克隆及其转基因水稻植物中特异性表达 [J]. *作物学报*, 2002, 28(5): 586-590.
- [7] MORRIS S H, ADLEY C C. Irish public perceptions and attitudes to modern biotechnology: an overview with a focus on GM foods [J]. *Trends Biotechnology*, 2001, 19(2): 43-48.
- [8] SHI Y, WANG M, POWELL K, VAN DAMME E, et al. Use of the rice sucrose synthase-1 promoter to direct phloem-specific expression of β -glucuronidase and snowdrop lectin genes in transgenic tobacco plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1994, 45(5): 623-631.

Research on the Preparation and Property of PLL-grafted Starch Copolymer as Gene Carriers

ZHAO Tianqin, DU Jie, JIN Chunyang, CAO Feng, PAN Yanpeng, CAO Xianying
(College of Material and Engineer, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Poly-L-lysine-Starch (PLL-S) copolymer was prepared by reductive amination reaction. The PLL-S copolymer were characterized by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy, and the molecular weights of the PLL-S were examined by gel chromatography, with a laser particle size analyzer to detect its potential. We examined the ability of the PLL to DNA-binding and degradation of the ability of anti-DNase I using agarose gel electrophoresis. The cytotoxicity of PLL decorated with starch modified was analyzed through MTT method in 293T cells. We assayed the PLL-S transfecting plasmid DNA of capability. The results showed that the prepared PLL-S graft ratio was 2.8%, a number average molecular weight was 60 629, potentials was 23.7 mV. PLL-S copolymer was capable of binding to DNA, and protected DNA from the destruction of the DNase I. The cytotoxicity of the copolymer was low enough to achieve evaluation level of one or more standard. transfection efficiency of the PLL-S copolymer was as high as $(48 \pm 3.2)\%$. We judged that PLL-S copolymer prepared can be used as gene carriers in biomedical application by studying its performance.

Key words: PLL; soluble starch; gene carrier

(上接第 137 页)

Construction of Vector Expressing *Xa21* during Whole Growth Stage

CAO Yuxin, HUA Long, ZHAO Tianlong, LI Mingrong, XIA Zhihui
(College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In this study, the results of realtime PCR of rice sucrose synthase gene 1 (*RSuS1*) showed that *RSuS1* was highly expressed in sheath and leaf during whole growth stage. The promoter of *RSuS1* was amplified from genomic DNA template of an indica rice variety "Minghui 63", then the DNA fragment of *Xa21* including open reading frame and terminator was amplified from vector pDB*Xa21* carrying completely genomic *Xa21* fragment. In order to breed transgenic rice with resistance to bacterial leaf blight during whole growth stage and without risk of comestible safety, we constructed an expression vector that *Xa21* was driven by RSP.

Key words: *Xa21*; promoter of rice sucrose synthase gene 1; bacterial leaf blight; rice; whole growth stage