

小麦 *TaNADP-ME2* 基因重组植物表达载体构建及对水稻的遗传转化

付振艳¹, 苟小清¹, 张正斌², 肖向文¹, 王晓军¹

(1. 中国科学院 新疆理化技术研究所 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所农业资源中心 河北 石家庄 050021)

摘要: 小麦 *TaNADP-ME2* 是一光反应基因, 并对干旱、盐、低温等非生物胁迫作出响应。构建 *TaNADP-ME2* 基因的重组植物表达载体, 并转化水稻获得转基因植株。利用重组技术构建植物表达载体, 冻融法转化农杆菌, 农杆菌介导方法转化水稻成熟胚诱导的愈伤组织, 潮霉素筛选和 PCR 鉴定转基因植株。成功构建了重组植物表达质粒 pSUE₂, 并将 pSUE₂ 转入农杆菌 EHA105, 潮霉素磷酸转移酶(*HPT*) 基因和 *TaNADP-ME2* 基因 PCR 鉴定获得 16 棵转基因阳性水稻植株。为进一步确定 *TaNADP-ME2* 基因的水分利用效率功能奠定了基础。

关键词: *TaNADP-ME2*; 农杆菌; 基因转化; 水稻

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)03-0058-04

The Construction of Plant Overexpression Vector of Wheat *TaNADP-ME2* Gene and Genetic Transformation of Rice

FU Zhen-yan¹, GOU Xiao-qing¹, ZHANG Zheng-bin², XIAO Xiang-wen¹, WANG Xiao-jun¹

(1. The Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; 2. Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetic & Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050021, China)

Abstract: The wheat *TaNADP-ME2* was not only responsive to light but also to drought, salt and low temperature. The recombinant plant overexpression vector was constructed, transformed into rice and acquired transgenic rice plant. The vector was constructed by recombinant technology. The agrobacterium was transformed by freeze-thaw method. The callus induced from the mature embryo of rice was transformed by agrobacterium-mediated method. The transgenic rice was identified by hygromycin and PCR method. The results revealed that recombinant plant overexpression vector pSUE₂ has been constructed successfully and transformed into EHA105. The 16 transgenic rice positive plants were acquired by the PCR detection from *HPT* and *TaNADP-ME2* gene. This research laid a foundation for identification the function of *TaNADP-ME2* gene in enhancing water use efficiency in drought tolerance.

Key words: *TaNADP-ME2*; Agrobacterium; Gene transformation; Rice

随着水资源日益短缺, 干旱成为限制我国小麦稳产高产的主要因素。如何在有限的水分条件下提高干旱胁迫下小麦的产量成为亟待解决的问题。高水分利用效率育种可以很好地将抗旱性和丰产性统一起来^[1]。培育转基因作物可有效改良作物的水分利用效率, 但目前克隆的水分利用效率基因较少, 主要有核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶基因^[2]、*ERECTA* 基因^[3-5]、*HARDY* 基因^[6]、*AQP* 基因^[7] 和

HVA 基因^[8]等。

植物 NADP 依赖的苹果酸酶(NADP-ME) 是多功能酶, 根据生理功能分光合型和非光合型^[9]。光合型分布在 C₄ 植物叶绿体和 CAM 植物胞质中, 参与光合作用中碳固定。非光合型与逆境相关, 表达受生物和非生物胁迫影响, 具有如下功能: 参与脂肪酸的生物合成^[10]; 在植物的防御反应中提供 NADPH 参与类黄酮、活性氧及木质素的生物合成^[11]; 参

收稿日期: 2013-03-21

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2011211B507)

作者简介: 付振艳(1981-), 女, 河南林州人, 副研究员, 博士, 主要从事植物抗旱遗传改良研究。

通讯作者: 王晓军(1962-), 男, 新疆阿克苏人, 研究员, 硕士, 主要从事生物化学研究。

与有机酸合成^[12];耐盐和渗透胁迫^[13-14];调控气孔大小,提高水分利用效率^[15]。由于 NADP-ME 具有许多重要功能,多种植物的 NADP-ME 基因已相继被报道^[13,16-21]。

我们前期已利用 RACE 方法从干旱处理的小麦中克隆到 *Ta*NADP-ME2 基因^[22-23],*Ta*NADP-ME2 是一光反应基因,且对干旱、盐、低温等不同胁迫作出响应,推测 *Ta*NADP-ME2 可能具有调控干旱胁迫下作物的光合和水分利用效率功能。本研究成功构建了 *Ta*NADP-ME2 基因的重组植物表达载体,利用农杆菌介导方法将 *Ta*NADP-ME2 转入了水稻品种日本晴,获得了转基因水稻植株,为进一步研究 *Ta*-NADP-ME2 的基因功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 水稻种子日本晴由中科院遗传发育所农业资源中心抗旱育种实验室保存。

1.1.2 菌株和载体 植物表达载体 Super1300、大肠杆菌 DH5 α 和农杆菌 EHA105 均由中科院遗传发育所农业资源中心抗旱育种实验室保存。

1.1.3 试剂与酶 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;高保真 *Taq* 酶、普通 *Taq* 酶、限制性内切酶 *Xba* I、*Kpn* I 及 *T*₄ 连接酶均购自大连宝生物公司;潮霉素购自默克公司;其他试剂购自上海生工生物工程有限公司或国产分析纯试剂。

1.1.4 培养基 诱导培养基 NB + 2 μ -D 2 mg/L, pH 值 5.8 ~ 6.0; 预培养培养基 NB + 2 μ -D 2 mg/L, pH 值 5.8 ~ 6.0; 共培养培养基 NB + 2 μ -D 2 mg/L + AS 100 μ mol/L, pH 值 5.2 ~ 5.6; 选择培养基 NB + 2 μ -D 2 mg/L + Carb 500 mg/L + Hyg 50 mg/L, pH 值 5.8 ~ 6.0; 分化培养基 NB + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.4 mg/L, pH 值 5.8 ~ 6.0; 生根培养基 1/2MS 盐 + MS 有机 + Hyg 50 mg/L, pH 值 5.8 ~ 6.0。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 *Ta*NADP-ME2 基因的开放阅读框,设计了构建植物表达载体的上游引物 pSUE₂-5 (5'-GCTCTAGAATGGCCGCGCGGTGT-3') 和下游引物 pSUE₂-3 (5'-CGGGGTACCT CACCTGTAG CTGCGG-3') 并在上下游引物的 5'端分别引入了 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切位点。同时为了方便检测转基因苗,我们也设计了用于扩增潮霉素磷酸转移酶 (*Hpt*) 基因的引物,引物为 Hpt-5 (5'-AGGGCGA AGAATCTCGTGCT-3') 和 Hpt-3 (5'-TCGCCTCGCTC

CAGTCAATG-3')。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 *Ta*NADP-ME2 基因植物表达载体构建 用引物 pSUE₂-5、pSUE₂-3 扩增 *Ta*NADP-ME2 开放阅读框,扩增体系为 50 μ L,包括 10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 2 μ L, ddH₂O 39.5 μ L, pSUE₂-5、pSUE₂-3 各 1 μ L,模板 1 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s 58 $^{\circ}$ C 退火 50 s 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 30 个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。回收 PCR 产物。用 *Xba* I、*Kpn* I 分别双酶切回收后的 PCR 产物和 Super1300 空载体, *T*₄ 连接酶连接并转化 DH5 α , PCR 和 *Xba* I、*Kpn* I 双酶切鉴定阳性克隆,获得重组表达载体 pSUE₂。

1.2.3 pSUE₂ 质粒转化农杆菌 EHA105 挑 EHA105 单菌落接种于含有 50 μ g/mL Rif 的 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 过夜活化。取过夜活化菌按 1:30 接种于 50 mL LB + 50 μ g/mL Rif 的培养基, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 5 ~ 6 h,至 OD₆₀₀ 为 0.5。冰浴 30 min, 4 $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 15 min 收集菌体。菌体重悬于 10 mL 20 mmol/L 的 CaCl₂ 中,冰浴 20 min, 4 $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。菌体悬浮于 1 mL 20 mmol/L CaCl₂ 溶液,用于转化。室温下融化 EHA105 感受态细胞,加入 1 μ g pSUE₂,冰浴 30 min,置液氮速冻 1 min, 37 $^{\circ}$ C 保温 3 min 后加入 1 mL LB 混匀,置 28 $^{\circ}$ C 培养 2 h, 5 000 r/min 离心 3 min 收集菌体,涂于含 50 μ g/mL 利福平、50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2 d,挑取单菌落进行鉴定。

1.2.4 转基因水稻植株的获得 水稻成熟胚愈伤组织诱导与继代: 去壳水稻种子,用 70% 酒精消毒 1 min,无菌水洗 3 次,用含 0.1% Tween20 的 2.5% NaClO 消毒 20 min,水洗 5 ~ 8 次。重复此步骤一次。将消毒种子点播到诱导培养基上, 32 $^{\circ}$ C 光照培养 1 周。诱导培养基上继代 2 周后用于转化。

农杆菌 EHA105 转化水稻愈伤: 挑取转 pSUE₂ 的 EHA105 单菌落,转入 LB 液体培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 4 000 r/min 离心收集菌体,用添加 100 μ mol/L 乙酰丁香酮的 AAM 培养基重悬,使 OD_{600nm} = 1.0 ~ 1.5。28 $^{\circ}$ C 暗处静置 1 h 后,转化在预培养基上培养 3 d 的胚性愈伤,置含有滤纸的共培养基上 22 $^{\circ}$ C 暗培养 3 d 后,用无菌水洗愈伤 3 ~ 5 次, 500 mg/L Carb 水浸泡 1 h 后置无菌滤纸上晾干,转移至筛选培养基筛选抗性愈伤。

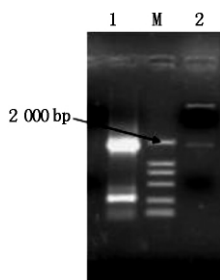
抗性愈伤的分化与生根: 将抗性愈伤移入分化培养基进行分化,待分化出绿芽后,移入生根培养基进行生根,根系粗壮后进行炼苗和盆栽。

1.2.5 转基因水稻的 PCR 鉴定 利用上海生工生物工程有限公司的植物基因组 DNA 抽提试剂盒(SK8232)提取转基因水稻 DNA。因所用的植物表达载体 Super1300 具有潮霉素抗性,所以利用潮霉素磷酸转移酶(*Hpt*)基因和 *TaNADP-ME2* 基因共同对 T_0 转基因苗进行鉴定。潮霉素磷酸转移酶基因 PCR 反应体系为 20 μ L,包括 10 \times PCR Buffer 2 μ L,dNTP(10 mmol/L) 0.8 μ L,ddH₂O 13 μ L,Hpt-5、Hpt-3 各 0.5 μ L,基因组 DNA 3 μ L,*Taq* 酶 0.2 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,56 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。*TaNADP-ME2* 基因的 PCR 反应体系为 20 μ L,反应条件为在 1.2.2 的基础上将循环数改为 40。

2 结果与分析

2.1 *TaNADP-ME2* 基因植物表达载体构建

TaNADP-ME2 基因的开放阅读框长度为 1 713 bp。本研究首先用 PCR 进行了鉴定,PCR 扩增出一条 1 700 bp 左右的条带(图 1),同时双酶切也出现一条 1 700 bp 左右的条带(图 1),进一步测序证明构建的植物表达载体没有移码突变,说明重组植物表达载体已构建成功,可用于水稻的遗传转化。



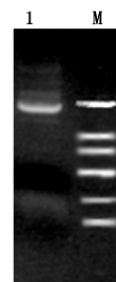
1. PCR 产物; M. DNA Marker; 2. pSUE₂/Xba I + Kpn I。
1. PCR product; M. DNA Marker; 2. pSUE₂/Xba I + Kpn I。

图 1 植物表达载体 pSUE₂ 构建

Fig.1 The construction of pSUE₂ overexpression vector

2.2 重组质粒 pSUE₂ 对水稻的遗传转化

PCR 筛选农杆菌结果显示,pSUE₂ 已成功转入 EHA105(图 2),说明可进一步用于遗传转化。EHA105 转化日本晴,经过筛选、分化、生根后,获得了一些转基因水稻苗。由于 *Hpt* 基因片段较小易于检测,首先利用 *Hpt* 的特异性引物对转基因水稻苗进行 PCR 初步筛选。结果 16 棵 T_0 转基因水稻苗扩增出 500 bp 左右的 *Hpt* 基因(图 3)。接着进一步用 *TaNADP-ME2* 基因的特异性引物对 16 个 T_0 转基因系进行扩增,结果显示,16 棵 T_0 转基因苗也扩增出了 1 700 bp 左右的 *TaNADP-ME2* 基因(图 4),这表明 *TaNADP-ME2* 基因已成功转入水稻(图 5)。

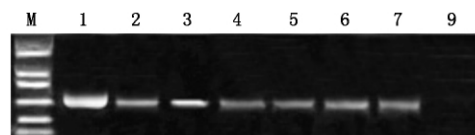


1. PCR 产物; M. DNA Marker。

1. PCR product; M. DNA Marker.

图 2 PCR 鉴定转化成功的农杆菌

Fig.2 PCR detection transformed-agrobacterium

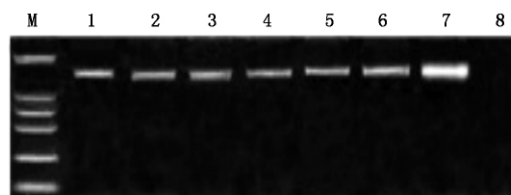


M. DNA Marker; 1. 阳性对照; 2~7. 阳性转基因苗; 9. 阴性对照。

M. DNA Marker; 1. Positive control; 2~7. Transgenic rice; 9. Negative control.

图 3 部分转基因苗的 *Hpt* 基因 PCR 检测

Fig.3 PCR detection of *Hpt* gene in transgenic rice



M. DNA Marker; 1~6. 阳性转基因苗; 7. 阳性对照; 8. 阴性对照。

M. DNA Marker; 1~6. Transgenic rice; 7. Positive control; 8. Negative control.

图 4 部分转基因苗的 *TaNADP-ME2* 基因 PCR 检测

Fig.4 PCR detection of *TaNADP-ME2* gene in transgenic rice



图 5 转 *TaNADP-ME2* 基因的部分水稻苗

Fig.5 Transgenic rice including *TaNADP-ME2* gene

3 讨论

3.1 共培养温度对转化的影响

温度对愈伤和农杆菌的生长速度均有影响,因此,选择转化时的共培养温度就很重要。本试验转化时首先用 26 $^{\circ}$ C 共培养,共培养 2 d 农杆菌就会长满整个愈伤,结果洗菌时间长还难以洗净,而且在筛选培养基上农杆菌仍继续生长,导致转化率低。随后我们改为 22 $^{\circ}$ C 共培养,并在共培养基上放有滤纸,3 d 后农杆菌仅长满了愈伤边缘,不仅洗菌容易节省时间,而且转化率高。这可能是因为在 22 $^{\circ}$ C 虽然农杆菌生长速度慢,但侵染率高,而且筛选培养基中的 Carb 能抑制住少量残留的农杆菌,污染减少,

结果提高了转化率。

3.2 潮霉素和潮霉素磷酸转移酶(*Hpt*) 基因在转基因水稻筛选和检测中的应用

潮霉素磷酸转移酶(*Hpt*) 基因因选择效率高、对转化细胞毒性小、转基因植株育性好等优点,成为水稻等单子叶植物广泛使用的选择标记基因^[24]。本研究选用了带 *Hpt* 选择标记基因的超表达载体 Super1300,便于对转基因苗筛选和检测。由于较高的非转基因苗增加后期分子生物学鉴定的工作量和成本,因此对转基因群体的筛选不仅存在抗性愈伤组织的筛选阶段,还存在抗性愈伤组织的分化与生根阶段。但在抗性愈伤组织的分化阶段引入筛选压力可能会造成分化率降低、幼苗生长缓慢甚至死亡等。为避免这种情况,本试验中我们采用在生根培养基里添加 50 mg/L 的潮霉素,减少了假阳性苗的再生率,提高了筛选效率。

Hpt 基因因分子量小,易于扩增,常被用作报告基因检测转基因植物。本研究用 *Hpt* 基因和 *Ta*NADP-ME2 基因对抗性苗进行了分子检测,结果 *Hpt* 基因检测阳性的植株也能扩增出 *Ta*NADP-ME2 基因,进一步说明 *Hpt* 基因在转基因植物分子检测中的重要性。

致谢:在水稻的遗传转化试验中,得到了石河子大学刘峰副教授的大力支持,再次特别感谢!

参考文献:

- [1] 张正斌,徐萍,周晓果等.作物水分利用效率的遗传改良研究进展[J].中国农业科学,2006,39(2):289-294.
- [2] Zhu Y L, Lin K R, Huang Y H, et al. A cDNA from *Tomatillo* (*Lycopersicon pennellii*) encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase [J]. Plant Physiology, 1998, 116: 1603.
- [3] Torii K U, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. The *Arabidopsis ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats [J]. The Plant Cell, 1996, 8: 735-746.
- [4] Jorda L, Molina A. *ERECTA* receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina* [J]. Plant Journal, 2005, 43(2): 165-180.
- [5] Masle J, Gilmore S R, Farquhar G D. The *ERECTA* gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis* [J]. Nature, 2005, 436: 866-870.
- [6] Karaba A, Dixit S, Greco R, et al. Improvement of water use efficiency in rice by expression of *HARDY*, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104: 15270-15275.
- [7] Sade N, Gebretsadik M, Seligmann R, et al. The role of tobacco aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity and yield production under salt stress [J]. Plant Physiology, 2010, 152: 245-254.
- [8] Sivamani E, Bahieldin A, Wraith J M, et al. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene [J]. Plant Science, 2000, 155: 1-9.
- [9] Drincovich M F, Casati P, Andreo C S. NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways [J]. FEBS Letters, 2001, 490: 1-6.
- [10] Shearer H L, Turpin D H, Dennis D T. Characterization of NADP-dependent malic enzyme in plant defense [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 429: 134-144.
- [11] Casati P, Drincovich M S, Edwards G E, et al. Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense [J]. Photosynthesis Research, 1999, 61: 99-105.
- [12] Gerrard Wheeler M C, Arias C L, Tronconi M A, et al. *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzyme isoforms: high degree of identity but clearly distinct properties [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 67: 231-242.
- [13] Liu S K, Cheng Y X, Zhang X X, et al. Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64: 49-58.
- [14] Cheng Y X, Mei L. A cytosolic NADP-malic enzyme gene from rice (*Oryza sativa* L.) confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29: 1129-1134.
- [15] Laporte M M, Shen B, Tarczynski M C. Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(369): 699-705.
- [16] Detarsio E, Maurino V G, Alvarez C E, et al. Maize cytosolic NADP-malic enzyme (*ZmCytNADP-ME*): a phylogenetically distant isoform specifically expressed in embryo and emerging roots [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 68: 355-367.
- [17] Müller G L, Drincovich M F, Andreo C S, et al. Nicotiana tabacum NADP-malic enzyme: cloning, characterization and analysis of biological role [J]. Plant and Cell Physiology, 2008, 49: 469-480.
- [18] Gerrard Wheeler M C, Tronconi M A, Drincovich M F, et al. A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology, 2005, 139: 39-51.
- [19] Saigo M, Bologna F P, Maurino V G, et al. Maize recombinant non-C4 NADP-malic enzyme: A novel dimeric malic enzyme with high specific activity [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55: 97-107.
- [20] Chi W, Yang J H, Wu N H, et al. Four rice genes encoding NADP-malic enzyme exhibit distinct expression profiles [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2004, 68: 1865-1874.
- [21] Ferreyra M L F, Andreo C S, Podestá F E. Purification and physical and kinetic characterization of a photosynthetic NADP-dependent malic enzyme from the CAM plant *Aptenia cordifolia* [J]. Plant Science, 2003, 164: 95-102.
- [22] Fu Z Y, Zhang Z B, Hu X J, et al. Cloning, identification, expression analysis and phylogenetic relevance of two NADP-dependent malic enzyme genes from hexaploid wheat [J]. Comptes Rendus Biologies, 2009, 332: 591-602.
- [23] Fu Z Y, Zhang Z B, Liu Z H, et al. Effects of different abiotic stresses on hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) NADP-dependent malic enzyme (*NADP-ME*) [J]. Biologia Plantarum, 2011, 55: 196-200.
- [24] 殷奎德, 张兴梅, 郑桂萍等.一种快速检测转基因水稻潮霉素抗性标记的方法 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2010, 22(1): 45-48.