

# 小麦 *TaNADP-ME1* 基因重组植物表达载体构建 及对水稻的遗传转化

付振艳<sup>1</sup>, 刘 峰<sup>2</sup>, 苟小清<sup>1</sup>, 王晓军<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 石河子大学 农学院, 新疆 石河子 832000)

**摘要:** 小麦 *TaNADP-ME1* 基因对干旱、盐、低温等非生物胁迫作出响应。利用重组技术成功构建了 *TaNADP-ME1* 的植物表达载体 pCAME1, 农杆菌介导法成功转化水稻品种日本晴成熟胚诱导的愈伤组织, 通过潮霉素筛选获得了抗性愈伤, 分化和生根后获得转化植株, PCR 鉴定获得 20 株转基因水稻苗。结果为进一步确定 *TaNADP-ME1* 的基因功能奠定了基础。

**关键词:** *TaNADP-ME1*; 转化; 水稻

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)01-0025-03

## Construction of Plant Overexpression Vector of Wheat *TaNADP-ME1* Gene and Genetic Transformation into Rice

FU Zhen-yan<sup>1</sup>, LIU Feng<sup>2</sup>, GOU Xiao-qing<sup>1</sup>, WANG Xiao-jun<sup>1</sup>

(1. The Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; 2. Agricultural College of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** The wheat *TaNADP-ME1* gene was responsive to drought, salt and low temperature. In this research we successfully constructed the plant overexpression vector pCAME1 by recombinant technology, transformed the callus which was induced from the mature embryo of rice by agrobacterium-mediated method, acquired resistant callus by hygromycin and transformed plant by differentiation and regeneration on media. The 20 transgenic rice plants were acquired by PCR identification. This research laid a foundation for identification the function of *TaNADP-ME1* gene.

**Key words:** *TaNADP-ME1*; Transformation; Rice

植物 NADP 依赖的苹果酸酶 (NADP-ME) 是多功能酶, 主要涉及光合、脂肪酸的生物合成<sup>[1]</sup>、类黄酮、活性氧和木质素的合成<sup>[2]</sup>、耐盐胁迫<sup>[3]</sup>; 提高水分利用效率等<sup>[4]</sup>。我们前期克隆到的小麦 *TaNADP-ME1* 基因对干旱、盐、低温等非生物胁迫作出响应<sup>[5]</sup>, 序列分析表明 *TaNADP-ME1* 位于质体中, 包含 45 个氨基酸长度的信号肽序列。推测 *TaNADP-ME1* 基因可能在小麦对非生物胁迫的抗/耐性方面发挥重要作用, 因此, 本研究利用重组技术构建了 *TaNADP-ME1* 基因的植物表达载体 pCAME1, 并利用农杆菌转化方法将 *TaNADP-ME1* 基因导入日本晴, 获得了转 *TaNADP-ME1* 基因的转基因水稻, 为鉴定 *TaNADP-ME1* 的基因功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 水稻种子日本晴、植物表达载体 pCAM-BIA1300、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和农杆菌 EHA105 均由中科院新疆理化技术研究所植物资源化学研究室保存。胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、*Taq* DNA polymerase、*Xba* I、*Bam*HI 及 T<sub>4</sub> DNA Ligase 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。

1.1.2 培养基 诱导培养基和预培养培养基为 NB + 2, 4-D 2 mg/L, pH 值 5.8~6.0; 共培养培养基为 NB +

收稿日期: 2013-10-08

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, 河南安阳人, 副研究员, 博士, 主要从事植物抗旱改良和野生食用菌的开发利用研究。

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

2,4-D 2 mg/L + AS 100  $\mu$ mol/L, pH 值 5.2 ~ 5.6; 选择培养基为 NB + 2,4-D 2 mg/L + Carb 500 mg/L + Hyg 50 mg/L, pH 值 5.8 ~ 6.0; 分化培养基为 NB + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.4 mg/L, pH 值 5.8 ~ 6.0; 生根培养基为 1/2MS 盐 + MS 有机 + Hyg 50 mg/L, pH 值 5.8 ~ 6.0。

## 1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 利用 Primer premier 5 设计了构建表达载体的上下游引物,上游引物为 pCAME1-5 (5'-GCTCTAGAATGCTGTCCGCGCGC-3'),下游引物为 pCAME1-3 (5'-CGCGAGCTCTTAACGATAGCTCGGTAGAC-3'),并在上下游引物的 5'端分别引入了 *Xba* I 和 *Bam* H I 酶切位点。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 植物表达载体 pCAME1 的构建 用引物 pCAME1-5、pCAME1-3 扩增 *TaNADP-ME1* 基因,扩增体系为 50  $\mu$ L。回收 PCR 产物。*Taq* DNA polymerase 连接经 *Xba* I、*Bam* H I 双酶切的 PCR 产物和 pCambia1300,转化 DH5 $\alpha$ ,PCR 和酶切鉴定阳性克隆,测序检测有无移码、突变。冻融法转化农杆菌 EHA105。

1.2.3 获得转基因水稻 水稻成熟胚愈伤组织诱导与继代;水稻种子消毒参照文献[6],将消毒过的种子播种到诱导培养基,32  $^{\circ}$ C 光照培养 7 d。诱导培养基上继代 1 ~ 2 次后可用于转化。

*TaNADP-ME1* 基因转入水稻愈伤挑取含 pCAME1 的 EHA105 菌落,接入 LB 液体培养基,28  $^{\circ}$ C 过夜培养,离心收集菌体,用含 100  $\mu$ mol/L 乙酰丁香酮的 AAM 培养基重悬至 OD<sub>600 nm</sub> = 1.0 ~ 1.5。转化预培养 3 d 的胚性愈伤,在共培养基上 22  $^{\circ}$ C 暗培养 3 d,无菌水洗愈伤 3 ~ 5 次,500 mg/L Carb 水浸泡 1 h,置无菌滤纸上晾干,转移至筛选培养基上培养。

抗性愈伤的分化与生根:将获得的抗性愈伤转入分化培养基培养,待长出绿芽后,移入生根培养基生根,根系粗壮后进行炼苗和盆栽。

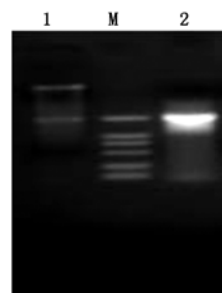
1.2.4 转基因水稻的分子鉴定 利用上海生工生物工程有限公司的植物基因组 DNA 抽提试剂盒 (SK8232) 提取转基因水稻的总 DNA。利用 PCR 检测 *TaNADP-ME1* 基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物表达载体 pCAME1 的构建

*TaNADP-ME1* 基因的开放阅读框长度为 1 944 bp,编码 647 个氨基酸。电泳结果表明,PCR 和双酶切

均出现一条 1 944 bp 的条带(图 1),同时测序表明构建的 pCAME1 无移码突变,这说明已构建成功重组植物表达载体 pCAME1,可进一步转化水稻。



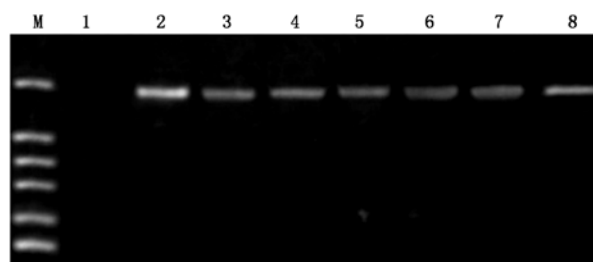
1. pCAME1/*Xba* I + *Bam* H I; M. DNA Marker; 2. PCR 产物。  
1. pCAME1/*Xba* I + *Bam* H I; M. DNA Marker; 2. PCR product.

图 1 植物表达载体 pCAME1 构建

Fig. 1 The construction of pCAME1 overexpression vector

### 2.2 重组质粒 pCAME1 对水稻的遗传转化

获得转 pCAME1 质粒的农杆菌 EHA105 后,将 EHA105 转化日本晴,经过筛选、分化、生根再筛选后,获得了一些转化苗。PCR 检测发现,20 棵 T<sub>0</sub> 转基因苗扩增出了 1 944 bp 的条带(图 2),这表明 *Ta-NADP-ME1* 基因已成功转入水稻(图 3)。



M. DNA Marker; 1. 非转基因阴性对照; 2. 阳性对照; 3 ~ 8. 转基因植株。  
M. DNA Marker; 1. Negative control; 2. Positive control; 3 ~ 8. Transgenic plants.

图 2 部分转基因苗的 *TaNADP-ME1* 基因 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of *TaNADP-ME1* gene in transgenic rice



图 3 转 *TaNADP-ME1* 基因的水稻苗

Fig. 3 Transgenic rice including *TaNADP-ME1* gene

## 3 讨论

在水稻的遗传转化试验中,多数文献将农杆菌和水稻愈伤在 26  $^{\circ}$ C 共培养<sup>[6-7]</sup>。但本试验发现,如果在没有滤纸的培养基上 26  $^{\circ}$ C 共培养,农杆菌会很快长满整个愈伤,以致后面洗农杆菌费时还难于洗净,从而影响转化效率。后来改用在 22  $^{\circ}$ C 且有滤纸的培养基上共培养,这样农杆菌的生长速度虽然变

慢,但洗菌容易,污染降低,转化效率提高。

在我国,小麦主要种植在北方干旱区,随着水资源的日益短缺,干旱已成为限制我国小麦高产的主要因素。寻找耐/抗旱基因培育转基因抗旱小麦是提高小麦抗旱性的重要手段。本研究获得的转 *Ta*-NADP-MEI 基因水稻植株,为进一步鉴定 *Ta*NADP-MEI 的基因功能奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Shearer H L, Turpin D H, Dennis D T. Characterization of NADP-dependent malic enzyme from developing castor oil seed endosperm [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 429(2): 134 – 144.
- [2] Casati P, Drincovich M S, Edwards G E, *et al.* Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense [J]. Photosynthesis Research, 1999, 61(2): 99 – 105.
- [3] 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(1 – 2): 49 – 58.
- [4] 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.
- [5] 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(7): 591 – 602.
- [6] Toki S, Hara N, Ono K, *et al.* Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice [J]. The Plant Journal, 2006, 47(6): 969 – 976.
- [7] Zhai W X, Li X B, Tian W Z, *et al.* Transforming resistance gene Xa21 of bacterial blight into five rice varieties from China by agrobacterium-mediated method [J]. Science in China, 2000, 30(2): 200 – 206.