

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*

李永春^{1, 2} 张宪银¹ 薛庆中^{1, *}

(¹浙江大学农学系, 浙江杭州 310029; ²山西农业大学, 山西太谷 030801)

摘要 以水稻品种“明恢 63”基因组 DNA 为模板, 用 PCR 方法克隆出水稻蔗糖合酶基因起始密码子以前(包括第一内含子)的上游序列 RSP1 及其不包括第一内含子的上游调控序列 RSP2。测序结果显示, 在重要的功能区段上, 克隆的序列与 Wang (1992) 等的报道基本一致。构建了由 RSP1 和 RSP2 驱动报告基因 *Gus* 的植物表达载体, 并用于农杆菌介导法水稻遗传转化。对水稻品种“秀水 11”转基因植株各部位的 GUS 组织化学分析表明: RSP1 和 RSP2 都可以驱动 *Gus* 基因在根、茎、叶及颖壳中高效特异表达, 但在胚和胚乳中不表达。作者认为, 水稻蔗糖合酶基因启动子应用于水稻分子育种有利于改善食用安全性。

关键词 水稻; 蔗糖合酶基因; 启动子; 组织特异性表达; 安全性
中图分类号: S511 **文献标识码**: A

Cloning and Specific Expression the Rice Sucrose Synthase Gene Promoter in Transgenic Rice Plants

LI Yong-Chun^{1, 2} ZHANG Xian-Yin¹ XUE Qing-Zhong¹

(¹Zhejiang University, Zhejiang Hangzhou 310029, China; ²Shanxi Agricultural University, Shanxi Taigu 030801, China)

Abstract According to the published 5' upstream sequence of the rice sucrose synthase gene, two pairs of specific primers, which involved RSP1 with an intron and RSP2 without intron, were designed and amplified by using PCR technique from genomic DNA template of an Indica rice variety 'Minghui 63'. There were no differences between the cloned sequences and the sequences published by Wang et al. 1992 in dominant functional regions. Both RSP1 and RSP2 link up with *Gus* gene respectively in the Agrobacterium binary vectors for the Agrobacterium mediated transform of a rice variety 'Xiushui 11'. Histochemical analysis of *Gus* activity in various tissues showed that the *Gus* gene driven by RSP1 or RSP2 gave strong expression in the roots, stems, leaves and seed coats, but did not in the embryo and endosperm tissues, based on which we suggested that the specific expression of the sucrose synthase gene is favorable to improving the comestible safe when using the promoter to rice molecular breeding.

Key words *Oryza sativa*; Sucrose Synthase gene; Promoter; Tissue specific expression; Safety

蔗糖合酶是植物淀粉合成途径中的关键酶, 在水稻中至少有 3 种同功酶 RSuS1、RSuS2 和 RSuS3^[1, 2]。其中, 与糖分运输有关的 RSuS1 基因已被克隆^[3], 由该基因启动子驱动的 *Gus* 基因在转基因烟草的韧皮部获得了高效特异的表达^[4]。本文报道由 RSuS1 基因上游调控序列驱动的 *Gus* 基因在转基因水稻各器官(特别是种子)中的表达特性,

并探讨了该启动子应用于水稻转基因育种的有效性和安全性。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以水稻品种“明恢 63”基因组 DNA 为模板克隆启动子, 水稻品种“秀水 11”为转基因受体材料。

* 基金项目: 国家 863 计划(101-01-01-3)、国家自然科学基金(3987042)和浙江省 8812 计划资助

作者简介: 李永春(1971-), 男, 讲师, 博士研究生, 研究方向: 水稻分子育种

* 通讯作者: E-mail: qzhxue@hotmail.com

Received on(收稿日期): 2002-01-24, Accepted on(接受日期): 2002-02-19

1.2 试剂 质粒和菌株

常用试剂为国产分析纯试剂; 内切酶、修饰酶和 DNA 聚合酶购自上海生工公司; 质粒 pBS SK (-) 购自 Strategene 生物工程技术有限公司 (以下简称生工公司), 二元载体 pCAMB IA 13-01 由澳大利亚 CAMB IA 研究中心提供; 大肠杆菌菌株为 DH₅α。

1.3 启动子的克隆

参照李德葆等^[5]的方法提取水稻幼叶基因组 DNA 作为 PCR 模板, 据 Wang 等^[3]报道的水稻蔗糖合酶基因 5' 端序列, 设计两对 (3 条) 特异引物, 由上海生工公司合成:

引物 1 (上游):

5'-CTCCTTCA TTTTCA GTGCAA TGTG-3'

引物 2 (下游):

5'-GACTCAA TTTCA GGAA CTGCAA GAA-3'

引物 3 (下游):

5'-CCAA TGGTGGTCA GA GACGA G-3'。

设计引物组合 1 和 2 旨在扩增出蔗糖合酶 (RSuS1) 基因起始密码子之前 (包括第一内含子) 的序列 (RSP1, 2897bp), 引物 1 和 3 则扩增该基因不包括第一个内含子的上游序列 (RSP2, 1715bp)。PCR 反应按标准体系进行, 采用 TaKaRa 公司 pyrobest DNA 聚合酶, 反应参数为: 94 预变性 5 min; 94 1 min, 58 1 min, 72 4 min, 循环 30 次; 72 后延伸 10 min。PCR 产物 RSP1 和 RSP2 用低熔点琼脂糖回收纯化, 经酶切鉴定后平末端克隆于 pBS SK (-) 质粒 *Sma*I 位点得到质粒 pBS-RSP1 和 pBS-RSP2, 送生工公司测序。

1.4 表达载体的构建

农杆菌二元载体 pCAMB IA 1301 经 *Hind*III 和 *Nco*I 酶切, 分离大片段, 并用 *Klenow* 酶补平后自连得到去除 *Gus* 基因 35S 启动子的载体 pCAM-Gus; 用 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切质粒 pBS-RSP1、pBS-RSP2 和 pCAM-Gus 经琼脂糖凝胶电泳分离得到两个启动子片段 RSP1 和 RSP2 及表达载体片段, 启动子片段与载体连接得到两个植物表达载体 pCAM-RSP1-Gus 和 pCAM-RSP2-Gus (图 1)。

1.5 水稻遗传转化

将质粒 pCAM-RSP1-Gus、pCAM-RSP2-Gus 和 pCAM-35S-Gus 分别导入农杆菌 EHA 105 感受态细胞, 用于水稻品种“秀水 11”的遗传转化。转基因方法参照 Hiei 等^[6], 稍作修改。

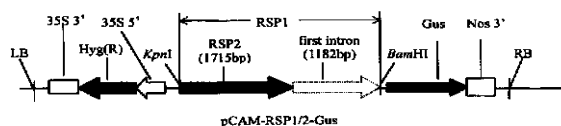


图 1 植物表达载体 pCAM-RSP1-Gus 和 pCAM-RSP2-Gus 示意图

Fig 1 Diagram of plant expression vectors pCAM-RSP1-Gus and pCAM-RSP2-Gus

1.6 转基因植株的 PCR 鉴定

提取再生植株叶片 DNA 作为 *Gus* 基因 PCR 检测的模板。反应参数为: 94 预变性 5 min; 94 1 min, 61 1 min, 72 1 min, 30 个循环; 72 后延伸 10 min。预期扩增到片段为 563 bp, 引物序列如下:

Gus1 5'-GGGA TCCA TCGCA GCGTAA TG-3'

Gus2 5'-GCCGA CA GCA GCA GTTTCA TC-3'

1.7 转基因水稻植株不同部位的 GUS 活性检测

经 PCR 鉴定的阳性转基因植株移栽于大田, 共 3 个处理: X₁₁-RSP1-Gus、X₁₁-RSP2-Gus 和 X₁₁-35S-Gus (X₁₁ 为“秀水 11”, *Gus* 基因分别由 RSP1、RSP2 和 35S 启动子驱动)。开花后第 20 天, 每个处理选 15 株不同愈伤来源的植株进行 *Gus* 组织化学分析。

采用半粒种法分析种子中 *Gus* 活性: 剪取经叶片 *Gus* 活性鉴定为阳性的稻穗, 每穗取 20 粒种子, 用 70% 的乙醇 (5 min) 和 0.1% 的升汞 (12 min) 杀菌; 无菌条件下, 横、纵切各 10 粒种子, 种子的一半做 *Gus* 活性分析, 另一半 (横切种子为含胚的部分) 在含 2 μmol/L KT 和 0.5 μmol/L NAA 的 N₆ 培养基上 28 光照培养至得到 T₁ 代幼芽和根系, 并对其进行 *Gus* 活性检测; 比较两半种子的鉴定结果, 综合分析 T₀ 代种子中的 *Gus* 活性, 以未转基因“秀水 11”为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 克隆的启动子序列分析

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 Wang 等^[3]报道的序列一致; 在 -375、-348、-290、-267、+571、+604 和 +689 的位置有 7 个碱基变异 (用黑框标出); 在 -1218、-276、-185 和 +657 四个位置相应碱基之前各有一个碱基插入 (用三角框标出); 在 +587 和 +588 的位置缺

失两个碱基(图 2)。

2.2 转基因植株的获得及其 PCR 鉴定

通过农杆菌介导转化水稻品种“秀水 11”的愈

伤组织, 最后得到 157 株再生植株, 其中 132 株经 PCR 检测可扩增出约 563 bp 的特异带(图 3), 表明 *Gus* 基因已整合到相应植株的基因组中。



图 2 水稻蔗糖合酶基因启动子的克隆序列与 Wang 等报道^[3]序列比较

Fig 2 Comparing the cloned rice sucrose synthase promoter sequence with that of reported^[3] sequence. The boxes indicate the substituted bases, the triangles indicate the inserted bases, the underlined sequence indicates the first intron.

推断的转录起始位点和起始密码子位点都用着重号“.”标出。

Bases boxed are those different to the reported sequence, if the substitutes are not show, it represents that the bases are lost; bases in the triangles are those inserted; the sequence underlined by '----' is the first intron of the *RSUS1* gene; the putative transcription and the expression initiation sites are indicated by the markers '·' under corresponding bases

2.3 转基因植株的 *Gus* 组织化学分析

Gus 活性检测表明: 启动子序列 RSP1 和 RSP2 都可以驱动 *Gus* 基因在“秀水 11”的根、茎、叶、叶鞘和颖壳中有效表达(图 4); 质粒 pCAM-RSP1-*Gus* 与 pCAM-RSP2-*Gus* 的转基因植株间, *Gus* 活性无明显差异; 启动子序列 RSP1/2 驱动 *Gus* 基因

的表达强度, 以茎秆和根系中最强(达到了与 35S 启动子相当的水平), 叶片中次之, 颖壳中较弱。

对转基因水稻种子中 *Gus* 活性的分析表明: 所有被检测的 pCAM-RSP1-*Gus* 和 pCAM-RSP2-*Gus* 转基因种子在胚和胚乳组织中均未被染色, 种皮层只在胚的对侧有极小范围染色, 而大部分 pCAM-



图3 转基因植株中Gus基因的PCR检测

Fig 3 PCR analysis of Gus in putative transgenic plantlets
 M, DNA marker; P, 以PCAM-RSP1-Gus质粒为阳性对照; CK1, 以水为模板的阴性对照; CK2, 以未转基因植株为阴性对照; 1-6, 转基因植株
 M, DNA marker; P, PCAM-RSP1-Gus plasmid as positive control; CK1, the template is water as negative control; CK2, non-transformed plantlet as negative control; 1-6, putative transgenic plantlets

35S-Gus 转基因种子的各部位均被染成蓝色(图 4-D)。

半粒种法对 T₁ 代幼苗和根系中 Gus 活性的进一步分析显示: pCAM-RSP1-Gus 和 pCAM-RSP2-Gus 转基因 T₀ 代种子的胚和胚乳均未被染色, 但其对应的 T₁ 代幼苗和根系大部分都能被染色; 而 pCAM-35S-Gus 转基因植株中, T₁ 代幼苗和根系的与其相应 T₀ 代种子胚乳和胚的染色结果一致。可见, 启动子序列 RSP1 和 RSP2 驱动的 Gus 基因在转基因水稻种子的胚和胚乳中确实没有表达。

3 讨论

本研究中克隆的启动子序列和 Wang 等^[3]报道的序列间有一定差异, 包括 7 个变异碱基、4 个插入碱基和 2 个缺失碱基。其变异原因可能有二: 一

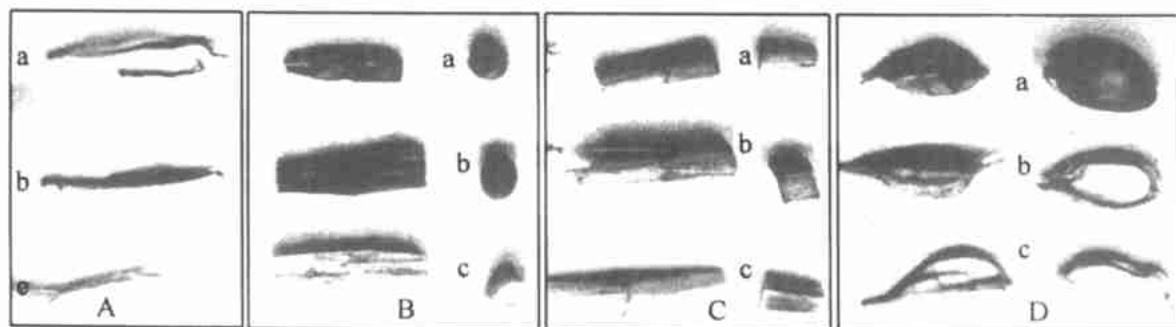


图4 转基因植株不同器官的GUS组织化学分析

Fig 4 Histochemical analysis of GUS in different organs of transgenic rice plants
 A, 根系; B, 茎秆; C, 叶片; D, 种子。a, Gus 基因由 35S 启动子驱动; b, Gus 基因由蔗糖合酶基因 RSP1 的启动子驱动; c, 未转基因水稻植株
 A, roots; B, stems; C, leaves; D, seeds. a and b represent the Gus gene is driven by 35S and RSP1 promoter respectively; c, non-transformed plants as negative control

是水稻亚种间基因组 DNA 可能存在差异, Wang 等^[3]报道的是粳稻的序列, 而本研究所用的是籼稻; 二是启动子克隆和测序过程中也可能产生极小的误差。比如, 在- 1219 到- 1230 区段 12 个连续的腺嘌呤间多了一个碱基, 而在+ 576 到+ 587 区段 12 个连续的胸腺嘧啶间缺失了两个碱基。

在分析水稻种子中 Gus 基因的表达特性时采用了半粒法, 综合了 T₀ 代种子胚及胚乳与每粒种子对应 T₁ 代幼芽及根系中 GUS 组织化学分析的结果, 排除了 T₀ 代种子胚和胚乳中由于 Gus 基因的分离而导致的假阴性。

植物转基因育种所用的启动子可分为组成型和

特异型两大类。组成型启动子驱动的外源基因在转基因植物的所有时期和组织中都表达, 这不仅造成了能量的浪费, 而且会带来转基因植物的安全性问题^[7-10]。因此, 特异性启动子的研究和应用日益受到育种工作者的重视^[11-16]。本研究用转基因的方法证明水稻蔗糖合酶基因启动子可驱动 Gus 基因在转基因水稻的根、茎和叶中高效特异表达, 这与 Shi 等^[4]在转基因烟草中的研究结果一致。

随着各种转基因作物的相继问世和种植面积的不断扩大, 转基因食品安全性已成为公众关注的焦点之一^[7-9]。一般认为, 转基因食品可能存在的不安全因素主要有两方面: 一是标记基因(如抗生素

抗性基因)的水平转移可能导致病原微生物产生抗药性;二是转基因(包括标记基因)本身的编码蛋白可能使食用者产生过敏性(或毒性)反应^[7, 8]。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。本研究表明,水稻蔗糖合酶(RSuS1)基因启动子驱动的*Gus*基因在转基因水稻种子胚乳和胚中都不表达,在种皮中也只有极小范围的表达,该部位在精制过程中可被去除。可见,水稻蔗糖合酶(RSuS1)基因启动子用于水稻转基因育种具有较高的食用安全性。我们已将由该启动子驱动的*Bt*基因(*CryIAC*)用农杆菌介导法导入“秀水11”等水稻品种,并获得大量的转基因植株,目前正在进行转基因植株的抗虫性评价。

References

- [1] Huang J-W, Chen J-T, Yu W-P *et al*. Complete structures of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expressions. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 1996, 60(2): 233~239
- [2] Wang A-Y, Kao M-H, Yang W-H, *et al*. Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes. *Plant & Cell Physiology*, 1999, 40(8): 800~807
- [3] Wang M-B, Boulter D, Gatehouse J A. A complete sequence of the rice sucrose synthase-1 (*RSs1*) gene. *Plant Molecular Biology*, 1992, 19: 881~885
- [4] Shi Y, Wang M-B, Powell K S, *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 Exp Bot*, 1994, 45: 623~631
- [5] Li D-B (李德葆), Zhou X-P (周雪平), Xu J-P (许建平) *et al*. 基因工程操作技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. 53~56
- [6] Hiei Y, Ohta S, Komari T, *et al*. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6(2): 271~282
- [7] Jia S-R (贾士荣). Environment and food biosafety assessment of transgenic plants. *Advance of Biotechnology (生物工程进展)*, 1997, 17(6): 37~42
- [8] Dixon B. Battle over GM foods. *Current Biology*, 2000, 10(16): 580
- [9] Morris S H, Adley C C. Irish public perceptions and attitudes to modern biotechnology: an overview with a focus on GM foods. *Trends in Biotechnology*, 2001, 19(2): 43~48
- [10] Smith N. Seeds of opportunity an assessment of the benefits, safety and oversight of plant genomics and agricultural biotechnology. Committee Print, 2000. 106~111
- [11] Sudhakar D, Fu X, Stoger E, *et al*. Expression and immunolocalisation of the snowdrop lectin, GNA in transgenic rice plants. *Transgenic Research*, 1998, 7(5): 371~378
- [12] Rao K V, Rathore K S, Hodges T K, *et al*. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant Journal*, 1998, 15(4): 469~477
- [13] Datta K, Vasquez A, Tu J, *et al*. Constitutive and tissue specific differential expression of the *cryIA (b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pests. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 20~30
- [14] Ito H, Hiraga S, Tsugawa H, *et al*. Xylem-specific expression of wound-inducible rice peroxidase genes in transgenic plants. *Plant Science*, 2000, 155(1): 85~100
- [15] Yokoi S, Tsuchiya T, Toriyama K, *et al*. Tapetum specific expression of the *Osg6B* promoter beta glucuronidase gene in transgenic rice. *Plant Cell Reports*, 1997, 16(6): 363~367
- [16] Zuo J, Chua N-H. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11: 146~151