



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110283802 B

(45) 授权公告日 2021.04.23

(21) 申请号 201810225611.4

WO 2009099580 A2,2009.08.13

(22) 申请日 2018.03.19

CN 103509748 A,2014.01.15

(65) 同一申请的已公布的文献号

佚名.登录号:XP_003556783.1.《NCBI》.2015,

申请公布号 CN 110283802 A

I. V. Pokotylo等.Influence of 24-epibrassinolide on lipid signalling and metabolism in Brassica napus.《Plant Growth Regul》.2013,第73卷

(43) 申请公布日 2019.09.27

(73) 专利权人 中国科学院遗传与发育生物学研究所

张高阳.大豆磷脂酶 D 对大豆结瘤过程和种子油脂代谢的影响.《中国博士学位论文全文数据库 农业科技辑》.2017,(第12期),

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路1号院2号,中科院遗传与发育生物学研究所

(72) 发明人 张劲松 陈受宜 程彤 来永才
李炜 张万科 毕影东 马彪
林晴 何锶洁

Cristina A. Tan等.Cloning, Overexpression, Refolding, and Purification of the Nonspecific Phospholipase C from Bacillus cereus.《PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION》.1997,第10卷

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

Igor Pokotylo等.The plant non-specific phospholipase C gene family. Novel competitors in lipid signalling.《Progress in Lipid Research》.2012,第52卷

(51) Int.Cl.

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

审查员 马晓霞

(56) 对比文件

CN 106479994 A,2017.03.08

权利要求书2页 说明书9页

序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

大豆非特异磷脂酶GmNPC2及其编码基因在调控植物油脂代谢中的应用

高作物油脂含量,特别是对于提高种子总油脂含量具有重要的理论和现实意义,可用于培育高油脂大豆品种。

(57) 摘要

本发明公开了大豆非特异磷脂酶GmNPC2及其编码基因在调控植物油脂代谢中的应用。本发明提供的大豆非特异磷脂酶GmNPC2为如下A1) 或A2) 或A3):A1) 氨基酸序列为序列2的蛋白质;A2) 在序列2的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸残基得到的具有相同功能的由A1) 衍生的蛋白质;A3) 在A1) 或A2) 的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质。实验证明:大豆非特异磷脂酶GmNPC2及其编码基因对提

CN 110283802 B

1. 蛋白质在调控植物油脂含量和/或油脂代谢中的应用;所述蛋白质为如下A1)或A2):
 - A1) 氨基酸序列为序列2的蛋白质;
 - A2) 在A1)的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质。
2. 与权利要求1中所述蛋白质相关的生物材料在调控植物油脂含量和/或油脂代谢中的应用;所述生物材料为下述B1)至B14)中的任一种:
 - B1) 编码权利要求1中所述蛋白质的核酸分子;
 - B2) 含有B1)所述核酸分子的表达盒;
 - B3) 含有B1)所述核酸分子的重组载体;
 - B4) 含有B2)所述表达盒的重组载体;
 - B5) 含有B1)所述核酸分子的重组微生物;
 - B6) 含有B2)所述表达盒的重组微生物;
 - B7) 含有B3)所述重组载体的重组微生物;
 - B8) 含有B4)所述重组载体的重组微生物;
 - B9) 含有B1)所述核酸分子的转基因植物细胞系;
 - B10) 含有B2)所述表达盒的转基因植物细胞系;
 - B11) 含有B1)所述核酸分子的转基因植物组织;
 - B12) 含有B2)所述表达盒的转基因植物组织;
 - B13) 含有B1)所述核酸分子的转基因植物器官;
 - B14) 含有B2)所述表达盒的转基因植物器官。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:B1)所述核酸分子是序列表中序列1的cDNA分子或DNA分子。
4. 权利要求1中所述蛋白质或权利要求2或3中所述生物材料的下述任一应用:
 - C1) 在提高植物油脂含量中的应用;
 - C2) 在制备提高植物油脂含量产品中的应用;
 - C3) 在培育油脂含量增加植物中的应用;
 - C4) 在制备培育油脂含量增加植物产品中的应用。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于:所述植物为双子叶植物或单子叶植物。
6. 根据权利要求4或5所述的应用,其特征在于:所述油脂含量为所述植物种子中油脂含量。
7. 一种培育高油脂含量植物的方法,包括:提高目的植物中权利要求1中所述蛋白质的含量,得到与所述目的植物相比油脂含量增加的高油脂含量植物。
8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述高油脂含量植物为通过向所述目的植物中导入权利要求1中所述蛋白质的编码基因得到的与所述目的植物相比所述蛋白质的表达升高的植物。
9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:权利要求1中所述蛋白质的编码基因为权利要求3中B1)所述核酸分子。
10. 根据权利要求7-9中任一所述的方法,其特征在于:所述目的植物为双子叶植物或单子叶植物。
11. 根据权利要求7-9中任一所述的方法,其特征在于:所述油脂含量为所述植物种子

中油脂含量。

大豆非特异磷脂酶GmNPC2及其编码基因在调控植物油脂代谢中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及大豆非特异磷脂酶GmNPC2及其编码基因在调控植物油脂代谢中的应用。

背景技术

[0002] 人类饮食中71%的油脂来自于植物。在世界上的几种主要产油作物中,大豆总产油量约占30%,居世界植物油产量的第一位,棕榈油及油菜子油分别位居第二及第三(如表1所示)。

[0003] 表1、世界上主要的产油作物

种类	生产量(百万吨)	产油量所占百分比	相对顺序
大豆 (Soybean)	15.50	29.1	1
棕榈 (Palm)	8.52	16.0	2
油菜籽 (Rapeseed)	7.03	13.2	3
向日葵 (Sunflower)	7.00	13.1	4
棉花籽 (Cottonseed)	3.31	6.2	5
椰子 (Coconut)	2.71	5.1	6
花生 (Peanut)	2.69	5.0	7
橄榄 (Olive)	1.63	3.1	8

[0005] 脂肪酸的合成是植物体中最重要的代谢途径之一,它存在于植物体的任何一个细胞中,是生长发育所必须的。它的阻断会导致细胞的死亡,因而至今为止还没有发现一个阻断脂肪酸合成的植物突变体。植物中脂肪酸的合成主要是在质体中进行,而动物及真菌的脂肪酸合成发生于胞质。因此植物需要存在一种不同于动物及真菌的机制——从质体运出脂肪酸到细胞的其它部位。因而在细胞中必定存在脂肪酸生产和运输的控制机制,但是迄今尚不清楚在脂肪酸的合成中质体内外是如何联系的。

[0006] 植物同其它真核生物在参与脂肪酸合成途径的酶上有很大差异。从乙酰CoA和丙二酰CoA合成16或18个碳原子的脂肪酸至少需要30个不同的酶催化的反应来完成这一过程,而在动物、真菌及一些细菌中,以上反应是由一个存在于胞质中的多酶复合体来完成的。植物中,参加脂肪酸合成的酶分别以可溶的形式独立存在于质体的胞质中。尽管植物中参与脂肪代谢的酶很容易被分离,但问题是这些酶是否在体内也可形成一个多酶复合体。

[0007] 脂肪酸合成途径中最重要的碳源是由ACCase合成的丙二酰CoA,在进入脂肪酸合成途径之前,丙二酰由CoA转移到酰基载体蛋白(ACP)上,从此脂肪酸合成都需要ACP的参与,直到形成16或18个碳原子的脂肪酸,并被用于合成甘油或被运出质体。ACP是一个分子量为9KD的酸性蛋白,它具有一个可以通过硫酸酯化结合乙酰基的基团。当丙二酰由CoA转移到ACP后,硫酸酯化的丙二酰由CoA进行一系列的聚合反应,接受乙酰ACP或乙酰CoA的乙酰基团。这一聚合反应是通过释放一个CO₂分子来形成一个C—C键,CO₂的释放使这一反应变得不

可逆,从而使聚合反应不断进行。

[0008] 磷脂是构成细胞脂双分子层的主要成分,是植物细胞膜的重要组成成分,同时也在信号传导中起重要作用。降解磷脂的酶称为磷脂酶。根据裂解酯键的位置的不同,磷脂酶可为磷脂酶A1、磷脂酶A2、磷脂酶C和磷脂酶D。而非特异磷脂酶C作用于一般磷脂,例如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)。拟南芥非特异磷脂酶C家族有6个成员,平均分子量约为60KD,包含514-538个氨基酸残基。具有磷脂酶结构域和3个未知功能结构域。在磷脂酶C2中含有信号肽。磷脂酶C成员的C-端具有较大多态性,可能与功能的分化相关。

发明内容

[0009] 本发明的一个目的是提供一个来源于大豆属大豆 (*Glycinemax* (L.) Merrill) 的非特异磷脂酶C蛋白质在调控植物油脂含量和/或油脂代谢中的应用;所述蛋白质名称为GmNPC2;为如下A1) 或A2) 或A3) :

[0010] A1) 氨基酸序列为序列2的蛋白质;

[0011] A2) 在序列2的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸残基得到的具有相同功能的由A1) 衍生的蛋白质;

[0012] A3) 在A1) 或A2) 的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质。

[0013] 为了使A1) 中的蛋白质便于纯化,可在由序列表中序列2所示的氨基酸序列组成的蛋白质的氨基末端或羧基末端连接上如下表所示的标签。

[0014] 表:标签的序列

标签	残基	序列
Poly-Arg	5-6 (通常为5个)	RRRRR
Poly-His	2-10 (通常为6个)	HHHHHH
FLAG	8	DYKDDDDK
Strep-tag II	8	WSHPQFEK
c-myc	10	EQKLISEEDL

[0016] 上述A2) 中的GmNPC2蛋白质,为与序列2所示蛋白质的氨基酸序列具有75%或75%以上同一性且具有相同功能的蛋白质。所述具有75%或75%以上同一性为具有75%、具有80%、具有85%、具有90%、具有95%、具有96%、具有97%、具有98%或具有99%的同一性。

[0017] 上述A2) 中的GmNPC2蛋白质可人工合成,也可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。

[0018] 上述A2) 中的GmNPC2蛋白质的编码基因可通过将序列1所示的DNA序列中缺失一个或几个氨基酸残基的密码子,和/或进行一个或几个碱基对的错义突变,和/或在其5'端和/或3'端连上上表所示的标签的编码序列得到。其中,序列1所示的DNA分子编码序列2所示的GmNPC2蛋白质。

[0019] 本发明还提供了与GmNPC2蛋白质相关的生物材料在调控植物油脂含量和/或油脂代谢中的应用;所述生物材料为下述B1) 至B14) 中的任一种:

[0020] B1) 编码GmNPC2蛋白质的核酸分子;

[0021] B2) 含有B1) 所述核酸分子的表达盒;

[0022] B3) 含有B1) 所述核酸分子的重载体;

- [0023] B4) 含有B2) 所述表达盒的重组载体;
- [0024] B5) 含有B1) 所述核酸分子的重组微生物;
- [0025] B6) 含有B2) 所述表达盒的重组微生物;
- [0026] B7) 含有B3) 所述重组载体的重组微生物;
- [0027] B8) 含有B4) 所述重组载体的重组微生物;
- [0028] B9) 含有B1) 所述核酸分子的转基因植物细胞系;
- [0029] B10) 含有B2) 所述表达盒的转基因植物细胞系;
- [0030] B11) 含有B1) 所述核酸分子的转基因植物组织;
- [0031] B12) 含有B2) 所述表达盒的转基因植物组织;
- [0032] B13) 含有B1) 所述核酸分子的转基因植物器官;
- [0033] B14) 含有B2) 所述表达盒的转基因植物器官。
- [0034] 上述应用中, B1) 所述核酸分子可为如下b1)、b2) 或b3):
- [0035] b1) 编码序列是序列表中序列1的cDNA分子或DNA分子;
- [0036] b2) 与b1) 限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性, 且编码GmNPC2蛋白质的cDNA分子或基因组DNA分子;
- [0037] b3) 在严格条件下与b1) 或b2) 限定的核苷酸序列杂交, 且编码GmNPC2蛋白质的cDNA分子或基因组DNA分子。
- [0038] 其中, 所述核酸分子可以是DNA, 如cDNA、基因组DNA或重组DNA; 所述核酸分子也可以是RNA, 如mRNA或hnRNA等。
- [0039] 本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法, 例如定向进化和点突变的方法, 对本发明的编码GmNPC2蛋白质的核苷酸序列进行突变。那些经过人工修饰的, 具有与本发明分离得到的GmNPC2蛋白质的核苷酸序列75%或者更高同一性的核苷酸, 只要编码GmNPC2蛋白质且具有GmNPC2蛋白质功能, 均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列。
- [0040] 这里使用的术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”包括与本发明的编码序列2所示的氨基酸序列组成的蛋白质的核苷酸序列具有75%或更高, 或85%或更高, 或90%或更高, 或95%或更高同一性的核苷酸序列。同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件, 两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示, 其可以用来评价相关序列之间的同一性。
- [0041] 上述应用中, 所述严格条件可为如下: 50℃, 在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交, 在50℃, 2×SSC, 0.1%SDS中漂洗; 还可为: 50℃, 在7%SDS、0.5M NaPO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交, 在50℃, 1×SSC, 0.1%SDS中漂洗; 还可为: 50℃, 在7%SDS、0.5M NaPO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交, 在50℃, 0.5×SSC, 0.1%SDS中漂洗; 还可为: 50℃, 在7%SDS、0.5M NaPO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交, 在50℃, 0.1×SSC, 0.1%SDS中漂洗; 还可为: 50℃, 在7%SDS、0.5M NaPO₄和1mM EDTA的混合溶液中杂交, 在65℃, 0.1×SSC, 0.1%SDS中漂洗; 也可为: 在6×SSC, 0.5%SDS的溶液中, 在65℃下杂交, 然后用2×SSC, 0.1%SDS和1×SSC, 0.1%SDS各洗膜一次; 也可为: 2×SSC, 0.1%SDS的溶液中, 在68℃下杂交并洗膜2次, 每次5min, 又于0.5×SSC, 0.1%SDS的溶液中, 在68℃下杂交并洗膜2次, 每次15min; 也可为: 0.1×SSPE(或0.1×SSC)、0.1%SDS的溶液中, 65℃

条件下杂交并洗膜。

[0042] 上述75%或75%以上同一性,可为80%、85%、90%或95%以上的同一性。

[0043] 上述应用中,B2)所述的含有编码GmNPC2蛋白质的核酸分子的表达盒(GmNPC2基因表达盒),是指能够在宿主细胞中表达GmNPC2蛋白质的DNA,该DNA不但可包括启动GmNPC2基因转录的启动子,还可包括终止GmNPC2基因转录的终止子。进一步,所述表达盒还可包括增强子序列。可用于本发明的启动子包括但不限于:组成型启动子,组织、器官和发育特异的启动子,和诱导型启动子。启动子的例子包括但不限于:花椰菜花叶病毒的组成型启动子35S;来自西红柿的创伤诱导型启动子,亮氨酸氨基肽酶("LAP",Chao等人(1999) *Plant Physiol* 120:979-992);来自烟草的化学诱导型启动子,发病机理相关1(PR1)(由水杨酸和BTH(苯并噻二唑-7-硫代羧酸S-甲酯)诱导);西红柿蛋白酶抑制剂II启动子(PIN2)或LAP启动子(均可用茉莉酮酸甲酯诱导);热休克启动子(美国专利5,187,267);四环素诱导型启动子(美国专利5,057,422);种子特异性启动子,如谷子种子特异性启动子pF128(CN101063139B(中国专利200710099169.7)),种子贮存蛋白质特异的启动子(例如,菜豆球蛋白、napin,oleosin和大豆beta conglycin的启动子(Beachy等人(1985) *EMBO J.* 4:3047-3053))。它们可单独使用或与其它植物启动子结合使用。此处引用的所有参考文献均全文引用。合适的转录终止子包括但不限于:农杆菌胭脂碱合成酶终止子(NOS终止子)、花椰菜花叶病毒CaMV 35S终止子、tml终止子、豌豆rbcS E9终止子和胭脂氨酸和章鱼氨酸合酶终止子(参见,例如:Odell等人(I^{985}) *Nature* 313:810;Rosenberg等人(1987) *Gene*, 56:125;Guerineau等人(1991) *Mol. Gen. Genet.*, 262:141;Proudfoot(1991) *Cell*, 64:671;Sanfacon等人 *Genes Dev.*, 5:141;Mogen等人(1990) *Plant Cell*, 2:1261;Munroe等人(1990) *Gene*, 91:151;Ballad等人(1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891;Joshi等人(1987) *Nucleic Acid Res.*, 15:9627)。

[0044] 可用现有的表达载体构建含有所述GmNPC2基因表达盒的重组载体。所述植物表达载体包括双元农杆菌载体和可用于植物微弹轰击的载体等。如pAHC25、pBin438、pCAMBIA1302、pCAMBIA2301、pCAMBIA1301、pCAMBIA1300、pBI121、pCAMBIA1391-Xa、PSN1301或pCAMBIA1391-Xb(CAMBIA公司)等。所述植物表达载体还可包含外源基因的3'端非翻译区域,即包含聚腺苷酸信号和任何其它参与mRNA加工或基因表达的DNA片段。所述聚腺苷酸信号可引导聚腺苷酸加入到mRNA前体的3'端,如农杆菌冠瘿瘤诱导(Ti)质粒基因(如胭脂碱合成酶基因Nos)、植物基因(如大豆贮存蛋白基因)3'端转录的非翻译区均具有类似功能。使用本发明的基因构建植物表达载体时,还可使用增强子,包括翻译增强子或转录增强子,这些增强子区域可以是ATG起始密码子或邻接区域起始密码子等,但必需与编码序列的阅读框相同,以保证整个序列的正确翻译。所述翻译控制信号和起始密码子的来源是广泛的,可以是天然的,也可以是合成的。翻译起始区域可以来自转录起始区域或结构基因。为了便于对转基因植物细胞或植物进行鉴定及筛选,可对所用植物表达载体进行加工,如加入可在植物中表达的编码可产生颜色变化的酶或发光化合物的基因(GUS基因、萤光素酶基因等)、抗生素的标记基因(如赋予对卡那霉素和相关抗生素抗性的nptII基因,赋予对除草剂膦丝菌素抗性的bar基因,赋予对抗生素潮霉素抗性的hph基因,和赋予对氨甲喋呤抗性的dhfr基因,赋予对草甘磷抗性的EPSPS基因)或是抗化学试剂标记基因等(如抗除莠剂基因)、提供代谢甘露糖能力的甘露糖-6-磷酸异构酶基因。从转基因植物的安全性考虑,可不

加任何选择性标记基因,直接以逆境筛选转化植株。

[0045] 上述应用中,所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。所述质粒具体可为表达载体pGWB411。

[0046] 所述重组载体具体可为pGWB411-GmNPC2,所述pGWB411-GmNPC2为将序列表中序列1所示的DNA分子同源重组到pGWB411载体的重组位点attL1和attL2之间,且保持pGWB411载体的其他序列不变得到的载体,所述pGWB411-GmNPC2能表达GmNPC2蛋白质。

[0047] 上述应用中,所述微生物可为酵母、细菌、藻或真菌。其中,细菌可为农杆菌,如农杆菌GV3101。

[0048] 上述应用中,所述转基因植物细胞系、转基因植物组织和转基因植物器官均不包括繁殖材料。

[0049] 本发明还提供了GmNPC2蛋白质或所述生物材料的下述任一应用:

[0050] C1) 在提高植物油脂含量中的应用;

[0051] C2) 在制备提高植物油脂含量产品中的应用;

[0052] C3) 在培育油脂含量增加植物中的应用;

[0053] C4) 在制备培育油脂含量增加植物产品中的应用;

[0054] C5) 在植物育种中的应用。

[0055] 本发明还提供了提高植物油脂含量产品,所述产品含有GmNPC2蛋白质或所述生物材料。

[0056] 所述产品可以GmNPC2蛋白质或所述生物材料作为其活性成分,也可以以GmNPC2蛋白质或所述生物材料与其他具有相同功能的物质一起作为其活性成分。

[0057] 本发明还提供了一种培育高油脂含量植物的方法,所述方法包括:提高目的植物中GmNPC2蛋白质的活性和/或含量,得到与所述目的植物相比油脂含量增加的高油脂含量植物。

[0058] 上述方法中,所述高油脂含量植物为通过向所述目的植物中导入GmNPC2蛋白质的编码基因得到的与所述目的植物相比所述蛋白质的表达升高的植物。

[0059] 所述GmNPC2蛋白质的编码基因为B1) 所述核酸分子。

[0060] 上述方法中,其中所述GmNPC2的编码基因可先进行如下修饰,再导入目的植物中,以达到更好的表达效果:

[0061] 1) 根据实际需要进行修饰和优化,以使基因高效表达;例如,可根据目的植物所偏爱的密码子,在保持本发明所述GmNPC2的编码基因的氨基酸序列的同时改变其密码子以符合植物偏爱性;优化过程中,最好能使优化后的编码序列中保持一定的GC含量,以最好地实现植物中导入基因的高水平表达,其中GC含量可为35%、多于45%、多于50%或多于约60%;

[0062] 2) 修饰邻近起始甲硫氨酸的基因序列,以使翻译有效起始;例如,利用在植物中已知的有效的序列进行修饰;

[0063] 3) 与各种植物表达的启动子连接,以利于其在植物中的表达;所述启动子可包括组成型、诱导型、时序调节、发育调节、化学调节、组织优选和组织特异性启动子;启动子的选择将随着表达时间和空间需要而变化,而且也取决于靶物种;例如组织或器官的特异性表达启动子,根据需要受体在发育的什么时期而定;尽管证明了来源于双子叶植物的许多

启动子在单子叶植物中是可起作用的,反之亦然,但是理想地,选择双子叶植物启动子用于双子叶植物中的表达,单子叶植物的启动子用于单子叶植物中的表达;

[0064] 4) 与适合的转录终止子连接,也可以提高本发明基因的表达效率;例如来源于CaMV的tml,来源于rbcS的E9;任何已知在植物中起作用的可得到的终止子都可以与本发明基因进行连接;

[0065] 5) 引入增强子序列,如内含子序列(例如来源于Adh1和bronzel)和病毒前导序列(例如来源于TMV,MCMV和AMV)。

[0066] 所述GmNPC2的编码基因可利用含有所述GmNPC2的编码基因的重组表达载体导入目的植物。所述重组表达载体具体可为所述pGWB411-GmNPC2。

[0067] 所述重组表达载体可通过使用Ti质粒,植物病毒载体,直接DNA转化,微注射,电穿孔等常规生物技术方法导入植物细胞(Weissbach,1998,Method for Plant Molecular Biology VIII,Academy Press,New York,pp.411-463;Geiserson and Corey,1998,Plant Molecular Biology (2nd Edition) .)。

[0068] 所述高油脂含量植物理解为不仅包含将所述GmNPC2的编码基因转化目的植物得到的第一代转基因植物,也包括其子代。对于转基因植物,可以在该物种中繁殖该基因,也可用常规育种技术将该基因转移进入相同物种的其它品种,特别包括商业品种中。所述抗冷植物包括种子、愈伤组织、完整植株和细胞。

[0069] 本发明中,所述植物可为双子叶植物(如拟南芥)或单子叶植物。所述目的植物可为双子叶植物(如拟南芥)或单子叶植物。

[0070] 本发明中,所述油脂含量可为所述植物种子中总油脂含量。所述油脂含量具体可为利用正己烷从种子中提取的总油脂含量。

[0071] 本发明提供了一种与植物组织油脂含量相关的大豆非特异磷脂酶C2——GmNPC2及其编码基因,将其编码基因GmNPC2转入植物中后,种子中的总油脂含量显著提高。说明GmNPC2及其编码基因可以调控植物种子中总油脂含量。本发明的GmNPC2及其编码基因GmNPC2对提高和改良作物油脂成份,特别是对于提高大豆等油料植物籽粒中油脂成份,培育高油脂品种具有重要的理论和现实意义。

附图说明

[0072] 图1为中间载体pCR®8/GW/TOPO®-GmNPC2的构建示意图。

[0073] 图2为重组载体pGWB411-GmNPC2的部分结构示意图。

[0074] 图3为T₃代转GmNPC2纯合株系的分子鉴定。

[0075] 图4为T₃代转GmNPC2纯合株系种子总油脂含量检测结果。其中,*表示与野生型拟南芥相比具有显著差异,**表示与野生型拟南芥相比具有极显著差异。

具体实施方式

[0076] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂、仪器等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。下述实施例中,如无特殊

说明,序列表中各核苷酸序列的第1位均为相应DNA的5'末端核苷酸,末位均为相应DNA的3'末端核苷酸。

[0077] 下述实施例中的大豆材料:大豆黑农44(HN44)记载在如下文献中:满为群等,大豆新品种黑农44的选育及不同种植方式对其产量和品种的影响,黑龙江农业科学2004年5期,1-5。公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0078] 下述实施例中的表达载体pGWB411记载在如下文献中:Department of Molecular and Functional Genomics,Shimane University,Aatsue,Shimane 690-8504,Japan, E.mail:tnakagaw@life.shimane-u.ac.jp Isuyoshi Nakagawa,et al.,Gateway Vectors for Plant Transformation,Plant Biotechnology,2009,26,275-284。由Tsuyoshi Nakagawa博士提供,公众得到Tsuyoshi Nakagawa博士同意后可从中科院遗传与发育生物学研究所获得。

[0079] 下述实施例中的农杆菌GV3101记载在如下文献中:Lee CW等,Agrobacterium tumefaciens promotes tumor induction by modulating pathogen defense in Arabidopsis thaliana,Plant Cell,2009,21(9),2948-62。公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0080] 下述实施例中的哥伦比亚生态型拟南芥(Col-0)的种子来自于Arabidopsis Biological Resource Center(ABRC)。

[0081] 实施例1、与油脂代谢调控相关的大豆非特异磷脂酶GmNPC2可以调控拟南芥油脂代谢

[0082] 本实施例提供了一个来源于大豆黑农44(HN44)的蛋白质——大豆非特异磷脂酶GmNPC2,该蛋白质具有调控拟南芥油脂代谢的功能,GmNPC2的氨基酸序列为序列表中序列2,在大豆黑农44(HN44)中GmNPC2的编码基因为序列表中序列1。GmNPC2的功能分析如下:

[0083] 一、与油脂代谢调控相关的GmNPC2编码基因的克隆

[0084] 1、cDNA的制备

[0085] 提取黑农44(HN44)幼苗的总RNA,用逆转录酶将RNA反转录合成cDNA。

[0086] 2、引物的设计

[0087] 引物序列如下:

[0088] GmNPC2-F:GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCACCCAAAGAAGCCAT;

[0089] GmNPC2-R:GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGGGTTTGTGTTTGGAGATTTGGATG。

[0090] 3、PCR扩增

[0091] 以步骤1获得的cDNA为模板,以GmNPC2-F和GmNPC2-R为引物进行PCR扩增,得到约1.6Kb的PCR产物并对其进行测序。

[0092] 经过测序,该PCR产物大小为1593bp,含有序列表中序列1所示的核苷酸序列。

[0093] 二、转GmNPC2拟南芥的获得及鉴定

[0094] 1、植物表达载体构建

[0095] 基因克隆使用invitrogen公司提供的Gateway系统,载体3'-T突出端,用于直接连接Taq酶扩增的PCR产物。

[0096] 将上述步骤一得到的1593bp的PCR产物运用TA克隆的原理克隆与载体 pCR[®]8/GW/TOPO上 (pCR[®]8/GW/TOPO[®]TA Cloning Kit,Catalog number:K2500-20,Invitogen Corporation,Carlsbad,CA,USA载体示意图如图1) 连接,得到中间载体pCR[®]8/GW/TOPO[®]-gene。

[0097] 由于pCR[®]8/GW/TOPO载体和过表达载体pGWB411上均带有重组位点attL1和attL2,因此连接目的基因的中间载体可以与过表达载体pGWB411在重组酶的作用下进行LR重组反应,最终目的基因GmNPC2成功构建到过表达载体pGWB411上,得到重组载体。

[0098] 具体方法如下:1ul pCR[®]8/GW/TOPO[®]-gene,1ul pGWB411,1ul LR buffer,1ul LR Enzyme mix,1ul TE buffer PH8.0,25℃6h,加0.5ul蛋白酶K后,37℃,10min,得到重组载体(详细操作见公司提供的说明书或参照上述文献)。

[0099] 重组载体经过测序,该载体为将序列中序列1所示的DNA分子同源重组到载体pGWB411中,得到的载体,命名为pGWB411-GmNPC2(部分结构示意图如图2),pGWB411-GmNPC2能表达GmNPC2。

[0100] 2、重组农杆菌的获得

[0101] 将含有GmNPC2的重组载体pGWB411-GmNPC2导入农杆菌GV3101,得到重组农杆菌,并将其命名为GV3101/GmNPC2。将表达载体pGWB411导入农杆菌GV3101,将得到的重组菌作为对照菌。

[0102] 3、转GmNPC2拟南芥的获得

[0103] 将重组农杆菌GV3101/GmNPC2培养至对数期,然后用抽真空法将其转化哥伦比亚生态型拟南芥(Co1-0)中。经培育后收获种子,将种子播于含卡那霉素(50mg/L)的MS筛选培养基上,收集T₁代转化植株的新鲜叶片,提取RNA,反转录得到cDNA,并以cDNA作为模板,采用GmNPC2-F和GmNPC2-R引物进行Real Time-PCR鉴定T₁代阳性植株。以野生型拟南芥(Co1-0)为对照,以拟南芥AtActin2基因为内标,所用引物为Primer-TF:5'-ATGCCAGAAGTCTTGTTC-3'和Primer-TR:5'-TGCTCATACGGTCAGCGATA-3'。取18棵T₁代阳性植株,待长至4-6叶时移到蛭石上生长,收获T₁代单株,各单株种子分别播种,用相同的MS筛选培养基继续筛选以观察T₂代的分离情况,如此重复数代直至获得遗传稳定的T₃代转GmNPC2纯合株系。将步骤2的对照菌转化Co1-0,得到对照植株。

[0104] 选取6个GmNPC2表达量不等的T₃代转GmNPC2纯合株系。提取苗期RNA,再次用上述Real Time-PCR方法鉴定纯系植株中GmNPC2的表达。结果如图3所示。从图中可以看出:T₃代转GmNPC2纯合株系OX-16、OX-22、OX-24、OX-43、OX-27和OX-52中均检测到GmNPC2的表达,其相对表达量分别约为0.61、0.28、0.17、0.14、0.12和0.11,而野生型拟南芥(Co1-0)与对照植株中均未能检测出GmNPC2的表达。说明本发明已将GmNPC2基因转入拟南芥中,且得到表达。

[0105] 选取上述T₃代转GmNPC2纯合株系OX-16、OX-22、OX-24、OX-43、OX-27和OX-52用于下述实验。

[0106] 三、转GmNPC2基因拟南芥种子中的总油脂含量分析

[0107] 分别测定野生型拟南芥(Co1-0)、T₃代转GmNPC2纯合株系OX-16、OX-22、OX-24、OX-43、OX-27和OX-52以及对照植株种子中的总油脂含量,将各株系的种子均在相同条件下进

行干燥,干燥后各株系的种子的含水量约为12%。种子总油脂含量测定方法如下:

[0108] 将种子研磨成粉,称取100mg到离心管中,平行称取四份。每份均按照如下方法提取脂类:①向含有种子粉末的离心管中加入500 μ l的正己烷,充分混匀,37 $^{\circ}$ C 12h,离心4000转/分钟3分钟,上清液即含有脂类的正己烷,将上清液吸入称量过的新离心管(将该离心管记为离心管A,将该管的重量记为M0)中;②向沉淀中再加500 μ l正己烷重复浸泡、离心,浸泡和离心条件同上,然后收集上清液到离心管A中;③将离心管A放入真空泵中,抽真空,使正己烷完全挥发,然后再次称取离心管A的重量(将其重量记为M1),计算提取的脂类重量,提取的脂类重量=M1-M0。计算四份种子粉末提取的脂类重量的平均值,然后依据该平均值计算总油脂含量,总油脂含量(%)的计算公式如下:总油脂含量(%)=提取的脂类重量的平均值/种子粉末重量 \times 100%,在该实验中种子粉末重量为100mg。每个株系取30个植株的种子,实验重复三次,结果取平均值 \pm 标准差。

[0109] 结果如图4所示。从图中可以看出:野生型拟南芥种子的总油脂含量约为38.1%(即占种子总重量的百分比),对照植株总油脂含量与野生型拟南芥无显著差异; T_3 代转GmNPC2纯合株系OX-16、OX-22、OX-24、OX-43、OX-27和OX-52种子的总油脂含量分别约为43.1%、42.2%、42.0%、43.0%、42.3%和43.2%。结果表明,6个 T_3 代转GmNPC2纯合株系种子中的总油脂含量均极显著或显著高于野生型拟南芥。

[0110] 上述实验表明,大豆GmNPC2对种子中总油脂的合成呈正调控作用,可提高拟南芥种子中的总油脂含量。

[0001] <110> 中国科学院遗传与发育生物学研究所
 [0002] <120> 大豆非特异磷脂酶GmNPC2及其编码基因在调控植物油脂代谢中的应用
 [0003] <210> 1
 [0004] <211> 1593
 [0005] <212> DNA
 [0006] <213> 大豆属大豆(Glycine max (L.) Merrill)
 [0007] <400> 1
 [0008] atggccaccc aaagaagcca tcattcccct atcttatttt cgtccctcat cttaacccctt 60
 [0009] ttcgttctct acttccaag atgccaccac gccattcca acaaccccat caaaaccgtc 120
 [0010] gtcgttttgg taatggaaaa tcgctccttc gaccacatgc tgggctggat gaagagacta 180
 [0011] aaccgggcca tcgatggcgt gaccgggtcg gagtccaatc cgctgtccgt gtccgaccca 240
 [0012] gactcgaagc ggttcttctt cagggaccgg gccatttcg tggaccggga ccctgggtcac 300
 [0013] tcgttccagg ccatccggga acagatttcc ggatcgaacg attcctcgcg cgaccgcctc 360
 [0014] cccatgaatg ggttcgtcca gcaggcctat tctatggaca atacctcca catgtccgag 420
 [0015] aatgtgatga acgggttoga ccctgacttg gtggctgtgt acaagacact cgttttctgag 480
 [0016] tttccgtgt ttgatagtg gtttgctcc gtgccggcct ccaccagcc caaccgccta 540
 [0017] ttcgtgcaact ctgccacctc cgggtggcgc acgagcaacg tggcggccaa gctcacggcg 600
 [0018] ggctaccgcg acaaacccat cttcgacagc ctccacgacg ccggccacga cttcggcatc 660
 [0019] tactaccaga acatcccggc caccctcttc taccgcaacc tcagaaaact aaagtacgtg 720
 [0020] ctcaagttcc acatctacga cgtgtcgttc aagcaacacg ccaagaagg gaagctccca 780
 [0021] agctacactg tgggtggagca gcggtacatg gacactaagc tgctccccgc gaacgacgac 840
 [0022] caccatcgc atgatgttta cgagggcag gtgttcgtga aggaggtgta cgagacgctg 900
 [0023] agggcgagcc cgcagtggaa cgaaacctg tttttgatca cgtacgatga gcatggaggg 960
 [0024] ttttatgacc acgtgccac gcccgcgct ggggttccga gccctgatgg gattgtgggc 1020
 [0025] cccgagcctt ttaacttac gtttaatagg ttgggagtga gggttccac tattgctatc 1080
 [0026] tctccttga ttgaaaagg tacagtgtt catgggcaa atgggtcacc atctcctaca 1140
 [0027] tcagaatatg aacactcacc cattccagct acagtgaaa agctcttcaa tttgccttca 1200
 [0028] tttctgacca atagagatgc ttgggcagga accttcgagg gcattgttca gaccaggaca 1260
 [0029] gaaccagga ctgattgccc ggagaaactt ccaactctg aaaagattag gaagggagag 1320
 [0030] cctaatgaag atgccaagct cagtgaattt cagcaggagt tgatccaact cgcagcgggtg 1380
 [0031] attaaaggag ataatatcct cactagtctc ccaggtacaa tagggaagga catgactgtt 1440
 [0032] aagcaaggga aatattacat ggatgatgca gttagaagt tctttgaagc aggtcgttat 1500
 [0033] gcaaggaaaa tgggagtga tgaagaacat atagttcaga tgaagccttc tttgactacg 1560
 [0034] agatcatcca aatctccaaa cacaaaccct tag 1593
 [0035] <210> 2
 [0036] <211> 530
 [0037] <212> PRT
 [0038] <213> 大豆属大豆(Glycine max (L.) Merrill)
 [0039] <400> 2
 [0040] Met Ala Thr Gln Arg Ser His His Ser Pro Ile Leu Phe Ser Ser Leu
 [0041] 1 5 10 15

[0042]	Ile Leu Thr Leu Phe Val Leu Tyr Phe Pro Arg Cys His His Ala Ile
[0043]	20 25 30
[0044]	Pro Asn Asn Pro Ile Lys Thr Val Val Val Leu Val Met Glu Asn Arg
[0045]	35 40 45
[0046]	Ser Phe Asp His Met Leu Gly Trp Met Lys Arg Leu Asn Pro Ala Ile
[0047]	50 55 60
[0048]	Asp Gly Val Thr Gly Ser Glu Ser Asn Pro Leu Ser Val Ser Asp Pro
[0049]	65 70 75 80
[0050]	Asp Ser Lys Arg Phe Phe Phe Arg Asp Arg Ala His Phe Val Asp Pro
[0051]	85 90 95
[0052]	Asp Pro Gly His Ser Phe Gln Ala Ile Arg Glu Gln Ile Phe Gly Ser
[0053]	100 105 110
[0054]	Asn Asp Ser Ser Leu Asp Pro Pro Pro Met Asn Gly Phe Val Gln Gln
[0055]	115 120 125
[0056]	Ala Tyr Ser Met Asp Asn Thr Ser His Met Ser Glu Asn Val Met Asn
[0057]	130 135 140
[0058]	Gly Phe Asp Pro Asp Leu Val Ala Val Tyr Lys Thr Leu Val Ser Glu
[0059]	145 150 155 160
[0060]	Phe Ala Val Phe Asp Arg Trp Phe Ala Ser Val Pro Ala Ser Thr Gln
[0061]	165 170 175
[0062]	Pro Asn Arg Leu Phe Val His Ser Ala Thr Ser Gly Gly Ala Thr Ser
[0063]	180 185 190
[0064]	Asn Val Ala Ala Lys Leu Thr Ala Gly Tyr Pro Gln Gln Thr Ile Phe
[0065]	195 200 205
[0066]	Asp Ser Leu His Asp Ala Gly His Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Gln Asn
[0067]	210 215 220
[0068]	Ile Pro Ala Thr Leu Phe Tyr Arg Asn Leu Arg Lys Leu Lys Tyr Val
[0069]	225 230 235 240
[0070]	Leu Lys Phe His Ile Tyr Asp Val Ser Phe Lys Gln His Ala Lys Glu
[0071]	245 250 255
[0072]	Gly Lys Leu Pro Ser Tyr Thr Val Val Glu Gln Arg Tyr Met Asp Thr
[0073]	260 265 270
[0074]	Lys Leu Leu Pro Ala Asn Asp Asp His Pro Ser His Asp Val Tyr Glu
[0075]	275 280 285
[0076]	Gly Gln Val Phe Val Lys Glu Val Tyr Glu Thr Leu Arg Ala Ser Pro
[0077]	290 295 300
[0078]	Gln Trp Asn Glu Thr Leu Phe Leu Ile Thr Tyr Asp Glu His Gly Gly
[0079]	305 310 315 320
[0080]	Phe Tyr Asp His Val Pro Thr Pro Ala Arg Gly Val Pro Ser Pro Asp
[0081]	325 330 335
[0082]	Gly Ile Val Gly Pro Glu Pro Phe Asn Phe Thr Phe Asn Arg Leu Gly
[0083]	340 345 350

[0084]	Val Arg Val Pro Thr Ile Ala Ile Ser Pro Trp Ile Glu Lys Gly Thr
[0085]	355 360 365
[0086]	Val Val His Gly Pro Asn Gly Ser Pro Ser Pro Thr Ser Glu Tyr Glu
[0087]	370 375 380
[0088]	His Ser Ser Ile Pro Ala Thr Val Lys Lys Leu Phe Asn Leu Pro Ser
[0089]	385 390 395 400
[0090]	Phe Leu Thr Asn Arg Asp Ala Trp Ala Gly Thr Phe Glu Gly Ile Val
[0091]	405 410 415
[0092]	Gln Thr Arg Thr Glu Pro Arg Thr Asp Cys Pro Glu Lys Leu Pro Thr
[0093]	420 425 430
[0094]	Pro Glu Lys Ile Arg Lys Gly Glu Pro Asn Glu Asp Ala Lys Leu Ser
[0095]	435 440 445
[0096]	Glu Phe Gln Gln Glu Leu Ile Gln Leu Ala Ala Val Ile Lys Gly Asp
[0097]	450 455 460
[0098]	Asn Ile Leu Thr Ser Phe Pro Gly Thr Ile Gly Lys Asp Met Thr Val
[0099]	465 470 475 480
[0100]	Lys Gln Gly Lys Tyr Tyr Met Asp Asp Ala Val Arg Ser Phe Phe Glu
[0101]	485 490 495
[0102]	Ala Gly Arg Tyr Ala Arg Lys Met Gly Val Asn Glu Glu His Ile Val
[0103]	500 505 510
[0104]	Gln Met Lys Pro Ser Leu Thr Thr Arg Ser Ser Lys Ser Pro Asn Thr
[0105]	515 520 525
[0106]	Asn Pro
[0107]	530

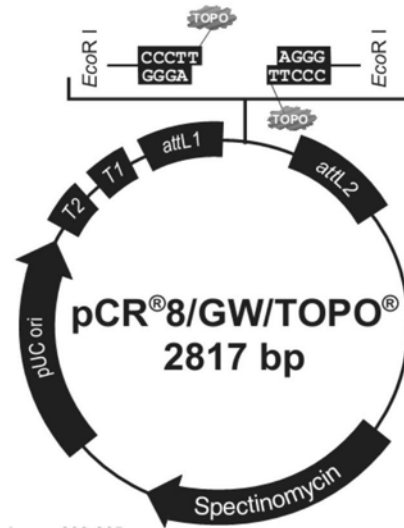


图1

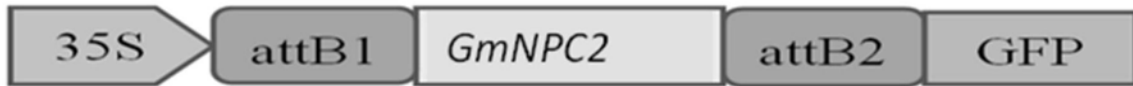


图2

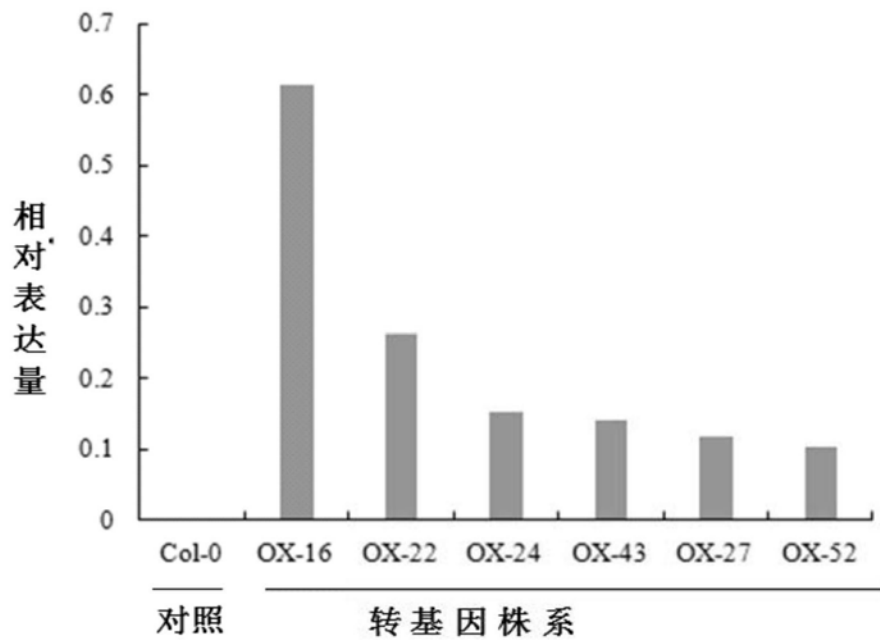


图3

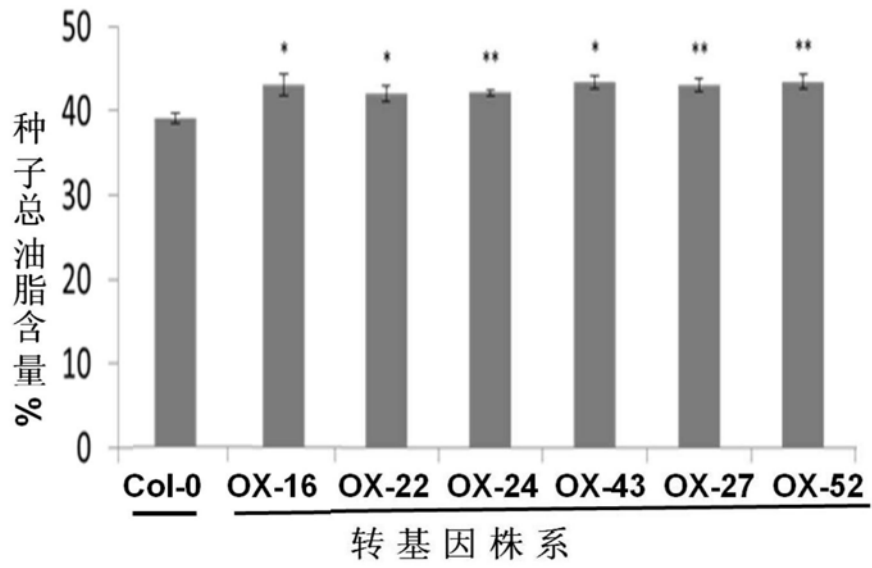


图4