

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102344927 B

(45) 授权公告日 2013.04.10

(21) 申请号 201010240106.0

(22) 申请日 2010.07.28

(73) 专利权人 中国科学院遗传与发育生物学研究所

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路1号院2号

(72) 发明人 周奕华 钱前 张保才

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 吴小明

Tanaka, T. et al..Os02g0614100[Oryza sativa Japonica Group].《GENBANK, NP_001047422.1》.2010, 全文.

李文丽. 水稻脆性突变体的鉴定和水稻早代稳定的遗传分析.《农业科技辑》.2005, 全文.

孔祥礼. 水稻若干细胞壁形状测性方法的简历及QTL定位研究.《农业科技辑》.2005, 全文.

李晨等. 栽培稻与普通野生稻BC1群体分子连锁图的构建和株高的QTL分析.《中国农业大学学报》.2001, 第6卷(第5期), 全文.

审查员 赵鹏

(51) Int. Cl.

C12N 15/29(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

C07K 14/415(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1488643 A, 2004.04.14, 全文.

Tanaka, T. et al..Oryza sativa Japonica Os02g0614100(Os02g0614100)mRNA, complete cds.《GENBANK, NM_001053957.1》.2010, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 10 页
序列表 3 页 附图 6 页

(54) 发明名称

水稻茎秆机械强度和粒重控制基因 BC14 及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种可控制水稻茎秆机械强度和粒重的基因,该基因的核苷酸序列选自:(1) 编码 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的核苷酸序列;或(2) 与(1)中的核苷酸序列能够在严谨条件下杂交,并同时编码具有控制水稻茎秆机械强度和粒重功能的功能类似物。本发明还提供了编码该蛋白质的基因,含有该基因的表达载体,和利用该表达载体改变植物茎秆机械强度和粒重的方法。

CN 102344927 B

1. 一种恢复水稻 (*Oryza sativa* ssp.) 突变体 brittle culm14(bc14) 的茎秆机械强度的方法,其特征在于包括下列步骤:

用表达载体转化植物细胞;和将转化的植物细胞培育成植株,

其中所述表达载体含有编码 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的核苷酸序列。

2. 按照权利要求 1 所述的方法,其中所述表达载体含有 SEQ ID NO:1 所示的 DNA 序列。

3. 一种恢复水稻 (*Oryza sativa* ssp.) 突变体 brittle culm14(bc14) 的籽粒重量的方法,其特征在于包括下列步骤:

用表达载体转化植物细胞;和将转化的植物细胞培育成植株,

其中所述表达载体含有编码 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的核苷酸序列。

4. 按照权利要求 3 所述的方法,其中所述表达载体含有 SEQ ID NO:1 所示的 DNA 序列。

5. 编码 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的核苷酸序列、SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、或含有编码 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的核苷酸序列的表达载体在控制水稻的茎秆机械强度和 / 或籽粒重量中的应用。

水稻茎秆机械强度和粒重控制基因 BC14 及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及植物基因工程领域,更具体地,本发明涉及水稻茎秆机械强度和粒重控制基因 BC14,该基因编码的蛋白质及其功能类似物,编码其的核苷酸序列,含有该核苷酸的载体和含有该载体的宿主细胞;另外,本发明还涉及控制植物茎秆机械强度和籽粒重量的方法。

背景技术

[0002] 植株茎秆的机械强度是植物、尤其是农作物重要的农艺性状。而茎秆的机械强度又与茎秆组织中相关细胞的细胞壁厚度直接有关,是组成植物细胞壁各种多聚物物理特性的综合体现。植物细胞壁是一种复杂的纤维网络结构,由不同的结构多糖、芳香族物质和蛋白质高度有序地组成 [1] (参考文献编号,以下同),其结构对保持细胞形态,维持植株直立生长的机械支撑力具有重要作用。植物细胞壁的生物合成是一个非常复杂的代谢过程,涉及纤维素、木质素和一些非纤维素成分的合成途径。因此,细胞壁中纤维素、木质素等主要成分的合成与分布以及沉积是影响植株茎秆支撑力的主要影响因素。对不同细胞壁突变体的研究是揭示与茎秆机械强度有关的细胞壁生物合成生理生化以及分子生物学机理的有效途径。

[0003] 植物茎秆机械强度首先与纤维素的合成与沉积密切相关。1996年 Pear 等人对 EST 随机测序,首先从棉花中克隆了植物纤维素合酶催化亚基 Cesa^[2]。而纤维素合酶在植物体中行使功能最直接的证据则来自于对拟南芥突变体 rsw 的研究^[3],该突变体侧根发育异常,且纤维素含量大幅降低,从中以图位克隆的方法分离到拟南芥中第一个纤维素合酶催化亚基基因 AtCesa1。生物信息学分析表明,Cesa 基因是一个庞大的基因家族,它的各成员之间具有极高的保守性^[4]。近年来的研究发现,任何一个目前已克隆的 Cesa 基因发生突变后,都会引起比较严重的表型,这暗示着植物基因组中存在着诸多 Cesa 基因在功能上并不冗余,它们可能分别在不同的发育时期和部位起作用,也可能共同参与了同一个复合体的形成,协同作用完成纤维素的合成、晶体化和沉积^[5],但分子机理还很不清楚。关于纤维素的沉积,尽管目前已发现一些蛋白在纤维素的沉积中起着至关重要的作用,例如拟南芥脆性纤维基因 FRA1 (Fragile feber 1) 编码的一个 kenesin-like 蛋白^[6];FRA2 编码的 Katanin-like 蛋白^[7] 以及 COBRA 蛋白^[8]。但作为细胞壁最主要的组份,纤维素是高度有序并与细胞壁的其他组份有机连接在一起的,目前人们所了解的只是“冰山的一角”。此外,还有大量的糖基转移酶 (GT) 参与了非纤维素多糖和蛋白多糖的合成与修饰。以拟南芥为例,预测具有 415 个 GT^[9],但只有极少数被证明具有生化活性和功能^[10-12]。

[0004] 植物茎秆机械强度也与细胞次生壁的木质化有关。在拟南芥的研究中,发现一些木质化异常的突变体。如 Jones 在 2001 年^[13] 对一不正常木质部突变体 irx4 研究证实,木质素代谢途径中的一个关键酶即肉桂酰辅酶 A 还原酶 (Cinnamoyl-CoA reductase, CCR)。由于 CCR 基因的突变,导致木质素合成途径提前终止,细胞壁中木质素含量较正常植株减少了 50%,从而导致茎秆支撑力度的下降。

[0005] 粒重是一个直接影响农作物产量的重要农艺性状,由籽粒大小和籽粒充实度两个因素决定,前者又决定于粒长、粒宽和粒厚三个要素。研究发现,水稻粒重是一个由多基因控制的复杂的数量性状,目前有较多 QTL 定位的报道,然而有关其形成的分子机制仍然知之甚少,相关的研究仅有少量零星的报道。2006 年 Fan 等在第三染色体着丝粒区附近精细定位了一个控制水稻籽粒长度和粒重的主效 QTL 基因 GS3,2009 年 Takano-Kai 等人克隆了该基因。GS3 编码一个跨膜蛋白,测序比较发现,与短粒水稻材料相比,所有的长粒水稻 GS3 编码区都存在一个由“C”到“A”的碱基突变,导致编码蛋白在 C 端产生一个 178 个氨基酸的缺失,因此 GS3 被认为是控制水稻谷粒长度的一个负调控因子^[14,15]。2007 年 Song 等通过图位克隆的方法在水稻第二染色体短臂端克隆了一个控制谷粒宽度和粒重的主效 QTL 基因 GW2,该基因编码一个新的 RING-type E3 ubiquitin ligase,与泛素化降解有关。GW2 功能的缺失引起颖壳横向细胞数目增加,导致颖壳明显加宽、粒重显著增加^[16]。随后另一个控制水稻籽粒宽度和粒重的主效 QTL 基因 GW5 也通过图位克隆的方法获得 (Shomura 等,2008^[17];Weng 等,2008^[18]),该基因位于水稻第五染色体。GW5 的缺失突变基因型也引起外颖横向细胞数目增加,并导致颖壳宽度和粒重的显著增加。GW5 编码一个新的核蛋白,酵母双杂实验显示,该蛋白能与多聚泛素互作,预示着该基因也可能通过泛素化降解途径调控水稻籽粒颖壳的细胞分裂来控制水稻籽粒的大小。通过图位克隆的方法,2008 年 Wang 等克隆了一个调控水稻籽粒充实度的基因 GIF1,该基因定位在第四染色体上,编码一个细胞壁蔗糖转化酶,对于籽粒早期灌浆充实过程中的碳素营养分配具有控制作用。该基因功能缺失导致籽粒灌浆充实度降低,垩白增加,粒重降低^[19]。

[0006] 综上所述,植物茎秆机械强度和粒重都是多基因控制的复杂性状,其机制目前仍不十分了解。

发明内容

[0007] 针对上述研究背景,本发明的一个目的是提供一种控制水稻茎秆机械强度和粒重的基因,所述基因的核苷酸序列选自:

[0008] (1) 编码 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列的核苷酸序列;或

[0009] (2) 与 (1) 中的核苷酸序列能够在严谨条件下杂交,并同时编码具有控制水稻茎秆机械强度和粒重功能的核苷酸序列。

[0010] 严谨杂交条件是指,将杂交膜置于预杂交液 (0.25mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.2, 7% SDS) 中,65℃ 预杂交 30 分钟;弃预杂交液,加入杂交液 (0.25mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.2, 7% SDS, 同位素标记的核苷酸片段),65℃ 杂交 16 小时;弃杂交液,加入洗膜液 I (20mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.2, 0.1% SDS),65℃ 洗膜 2 次,每次 10-15 分钟;加入洗膜液 II (10mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.2, 0.1% SDS),65℃ 洗膜 10-15 分钟。

[0011] 本发明的控制水稻茎秆机械强度和粒重的基因优选具有如图 6 和 SEQID NO :1 所示的 DNA 序列。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种由本发明的控制水稻茎秆机械强度和粒重的基因所编码的蛋白质,所述蛋白质优选地具有如图 7 和 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列。

[0013] 本发明的再一个目的是提供一种含有本发明的控制水稻茎秆机械强度和粒重的基因的植物表达载体。在一个实施方案中,所述表达载体是如图 4 所示的 BC14-BAC,该载体

可以表达由上述核酸序列编码的多肽。

[0014] 本发明的又一个目的是提供一种培育植物的方法,所述方法可使植物茎秆机械组织细胞壁的结构和成分发生改变,从而引起茎秆机械强度发生变化,同时所述方法还可使粒重发生改变,所述方法包括下列步骤:用本发明的表达载体转化植物细胞;和将转化的植物细胞培育成植株。

[0015] 本发明公开的 BC14 基因是一个具有控制水稻茎秆机械强度和粒重的新基因,该基因的克隆和功能的揭示,将了解水稻控制茎秆机械强度和籽粒的分子机制供了新的线索,对于提高水稻的产量水平和秸秆的合理利用将具有潜在的利用价值。

[0016] 关于序列表的说明

[0017] SEQ ID NO :1 是 BC14 基因的 CDS(氨基酸编码区 DNA 序列)序列;

[0018] SEQ ID NO :2 是 BC14 基因编码的氨基酸序列。

附图说明

[0019] 下面结合附图对理解本发明作进一步的详细描述,但并非对本发明作限定。

[0020] 图 1. 水稻 bc14 突变体的表型 (1) (野生型 (WT) 和 bc14 突变体 (bc14) 的茎秆 (A) 和叶片 (B) 的机械强度 (拉断力) 测定 (表型 1));

[0021] 图 2. 水稻 bc14 突变体的表型 (2) (突变体 bc14 与野生型 (WT) 的种子大小差异 (表型 2): 籽粒变小 (A)、千粒重 (千粒种子重量) 降低 (B));

[0022] 图 3. BC14 基因的图位克隆 (精细定位);

[0023] 图 4. BC14 基因功能互补转化载体 BC14-BAC 的载体图谱;

[0024] 图 5. BC14 基因的功能互补验证 (突变体 bc14、野生型 (WT) 与转基因互补系 (BC14-BAC) 的表型比较: 茎秆拉断力 (A)、叶片拉断力 (B)、千粒重 (C));

[0025] 图 6. BC14 基因的 CDS 序列 (氨基酸编码区 DNA 序列);

[0026] 图 7. BC14 基因编码的氨基酸序列;

[0027] 图 8. BC14 基因表达的 RNA 原位杂交分析;

[0028] 图 9. BC14 蛋白的 GUS 表达谱分析;

[0029] 图 10. BC14 蛋白的亚细胞定位;和

[0030] 图 11. BC14 蛋白的核苷酸糖基转运活性测定。

具体实施方式

[0031] 实施例 1: BC14 基因的克隆

[0032] 1. 水稻材料

[0033] 水稻 (*Oryza sativa* ssp.) 突变体 brittle culm14 (bc14), 是原始野生型材料粳稻品种“黄金晴”的自发突变体材料 (购自中国水稻所)。突变体与野生型相比, 其主要表现为: (1) 茎叶变脆。与野生型相比, 突变体茎秆和叶片的拉断力分别下降了约 70% 和 46% (图 1A, B)。(2) 籽粒变小、千粒重降低。突变体的籽粒与野生型相比明显偏小, 从而导致突变体种子的千粒重仅为野生型的一半 (图 2A, B)。

[0034] 2. 分析和定位群体

[0035] 纯合的 BC14 突变体和水稻品种 Kasalath (购自中国水稻所) 进行杂交, F₁ 代自

交, F₂ 群体共得到 192 株隐性脆秆个体, 并以此作为定位群体。在苗期每株取 2 克左右的嫩叶, 用来提取 DNA。

[0036] 3. 通过简单重复序列 (SSR, Simple Sequence Repeat), 序列标记位点 (STS, Sequence-tagged Sites), 和酶切扩增多态性序列 (CAPS, Cleaved amplified polymorphic sequence) 标记定位 BC 14 基因。

[0037] 采用改进的 CTAB 方法^[20] 从水稻叶片中提取用于基因定位的基因组 DNA。取大约 100mg 水稻叶片, 经液氮冷冻, 在直径 5cm 的小研钵中磨成粉状, 转移到 1.5ml 离心管里提取 DNA, 获得的 DNA 沉淀溶解于 100 μ l 超纯水中。每一个 SSR、STS 或 CAPS 反应用 1 μ l DNA 样品。

[0038] 4. BC14 基因的初步定位

[0039] 对由 50 个 F₂ 脆秆个体组成的小隐性定位群体, 选用水稻 12 条染色体上相距约 20cM 的多态性 SSR 引物进行连锁分析。结果表明第二染色体长臂端上的分子标记 RM262、RM525 与突变基因有明显的连锁关系, 交换率分别为 17% 和 23%, 分子标记基因型分析表明, BC14 定位于两者之间。在两标记之间进一步发掘多态性分子标记, 将 BC14 基因定位在 SSR 标记 RM3515 和 RM13617 之间约 815kb 基因组区间内。(引物序列见表 1)

[0040] 5. BC14 基因的精确定位

[0041] 利用初步定位的两个 SSR 标记 RM3515 和 RM13617 对剩余的 142 个 F₂ 脆性单株进行基因型鉴定, 分别发现 6 个和 11 个交换株。在两标记之间进一步开发了一系列新的具有多态性的分子标记 S1 ~ 5 (序列见表 1), 利用这些标记对 RM3515 和 RM13617 的全部交换单株进行基因型鉴定, 结果发现 S1 和 S2 具有与 RM3515 一致的 3 个交换株, 而 S3、S4 和 S5 分别具有 1 个、4 个和 4 个与 RM13617 一致的交换单株。最终将 BC14 基因精确定位在 STSR 标记 S2 和 S3 之间 57Kb 区间范围 (图 3)

[0042] 表 1 克隆 BC14 基因所用引物序列

[0043]

分子标记	正向引物序列	反向引物序列	分子标记类型
RM262	CATTCCGTCTCGGCTCAACT	CAGAGCAAGGTGGCTTGC	SSR
RM525	GGCCCGTCCAAGAAATATTG	CGGTGAGACAGAATCCTTACG	SSR
RM3515	GGAAGAAGATATGCCATGC	AGAGAGAATCAGAAACACCAAC	SSR
RM13617	ACCATATAGCGTGTATGCAACC	TGCACACATGTACACAGTACACC	SSR
S1	CTCGGGAAGCGGTGGGAT	TAGCTTGCCAATAGCGGC	STS
S2	ATGGGATTTCGCTAGACACC	CAGAGAAGAATACGAGTCCGAC	STS
S3	GGAAGTTCGGAAGCAGTGGA	GAAACGCTCGCTGCCTCA	STS
S4	TGTCTACGAAGACACGAAACAC	GAGAAGGCGGCAATAAGGTT	STS
S5	TAAAAGTGGAGTCATCCGTCC	GAGTCCAGATGTTCGCAAGG	STS

[0044] 6. BC14 基因的克隆、全长 cDNA 的获得和编码蛋白结构与功能预测

[0045] 对精确定位的 57kb 区段内的候选开放阅读框 (ORF) 进行了详细的调查, 发现该基因组范围内共包含 6 个 ORF。为了确定 BC14 基因, 我们对野生型和突变体的 6 个 ORF 进行了测序分析, 发现在 ORF3 的基因组序列中, 除了若干在内含子区的核苷酸多态性位点外, 在编码区 898 位存在从胞嘧啶核苷酸 (C) 到胸腺嘧啶核苷酸 (T) 的点突变, 该突变可

导致 ORF3 编码的第 330 位亮氨酸 (Leu) 突变为脯氨酸 (Pro)。为了进一步确认该位点是 bc14 的突变位点,而不是天然的核苷酸多态性位点,针对该位点所在的片段,在多个籼稻和粳稻品种中进行了测序分析,发现该位点在不同的籼稻和粳稻品种中相当保守。因而推测 ORF3 (LOC_0s02g40030) 是 BC14 的候选基因。

[0046] 通过与 KOME 中 BC14 的全长 cDNA 序列的比对,我们发现 BC14 基因组序列全长 4114bp,含有 10 个外显子和 9 个内含子(图 3B)。cDNA 全长 1041bp(图 6),编码 346 个氨基酸(图 7),预测分子量为 37183.9 道尔顿,而等电点 (pI) 为 9.6238。

[0047] 对 NCBI 非冗余蛋白质数据库的 Blast 分析发现 BC14 蛋白在植物中相对比较保守,与植物中的同源蛋白质间的一致性可以达到约 65%,而与动物中同源蛋白(如 HsUGTrel17、CeSQV-7 和 DmFRC) 间只有很低的保守性,一致性不超过 32%。然而,植物中还没有相关同源基因的功能分析报道。由于 BC14 基因在动物中的同源基因均为核苷酸糖基转运蛋白 (NST),这意味着 BC14 蛋白很可能也是转运核苷酸糖基的转运蛋白。各种生物信息学软件预测表明,BC14 属于 TPT 家族成员。而且核苷酸糖基转运蛋白是该 PF03151 蛋白家族的亚家族,这与氨基酸序列相似性分析结果相一致。

[0048] 实施例 2BC14 的功能互补及转基因研究

[0049] 为了验证 LOC_0s02g40030 (ORF3) 就是 BC14 基因,将水稻 BAC 克隆 0sJNBb0116L05(购自上海生命所)质粒分别用限制性内切酶 Hind III 和 Xba I 酶切释放出 BC14 的全部基因组片段,共 10748bp,包含起始密码子 ATG 上游的 4996 个碱基、编码区的 3675 个碱基和终止密码子 TAG 后的 2077 个碱基。将该基因组片段插入到双元载体 pCAMBIA1300(购自 CAMIA 公司,澳大利亚)中的 Hind III 和 Xba I 位点间,从而获得了用于转化的 BC14 基因功能互补转化载体 BC14-BAC(图 4)。质粒通过电击的方法转入农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 株系 EHA105(购自 CAMIA 公司,澳大利亚)中并转化突变体 bc14,其过程如下:

[0050] 1. 水稻幼胚培养. 将 bc14 突变体的幼胚脱壳,70%乙醇表面消毒 3min 后,用 0.1%氯化汞 5 分钟,10%次氯酸钠溶液浸泡 20 分钟,无菌水冲洗 3-4 次,点播于 NB 培养基上诱导愈伤组织,20 天左右从成熟胚盾片处长出的愈伤组织继代于 NB 培养基上,以后每 2 周继代一次,每次继代时都挑选色泽淡黄较致密的胚性愈伤组织。

[0051] 2. 农杆菌培养.-70℃保存的农杆菌菌株接种于含 50mg/L 卡那霉素和 25mg/L 利福平的 YEP 培养基上,26-28℃,150rpm 暗培养 16-18 小时活化菌种,YEP 固体培养基上划平板,于 26-28℃暗培养 1 天,挑取单菌落于 YEP 液体培养基中,26-28℃,150rpm 悬浮培养 16 小时,倒入 250ml 离心管中 4000rpm 离心收集农杆菌菌体,并用液体培养基悬浮菌体至 0. D₆₀₀ 为 0.8-1.0,用于各种水稻材料的转化。

[0052] 3. 水稻材料与农杆菌的共培养. 水稻愈伤组织在与农杆菌菌液感染前均需先在新鲜的继代培养基上培养 4 天后,才可用于转化。转化时先将经预培养 4 天的愈伤组织转移到 100ml 无菌三角锥形瓶中,然后将适量农杆菌悬浮液倒入(保证有足够的菌液把材料淹没)上述含有水稻材料的锥形瓶中,室温下放置 20 分钟,并不时晃动,然后将水稻材料取出,在无菌滤纸上吸去多余菌液,随即转移到铺有一层无菌滤纸的 NB-AS 固体培养基(加入 100 μM 乙酰丁香酮 AS 的 NB 培养基)(NB basic+10mg/L glucose+2mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)+500mg/l proline+500mg/l glutamine+300mg/l

casein hydrolysate+100mg/l Inositol+100uM AS+3g/lPhytigel, pH 5.8) 上,在 26℃条件下暗培养 2-3 天。共培养后,从固体共培养培养基上取出转化过的水稻材料,转入含有 50mg/L 潮霉素的选择培养基上进行筛选培养。

[0053] 4. 抗性愈伤组织的筛选及植株再生。第一轮选择 2 周后,转到第二轮选择培养基上继续筛选 2 周,然后选择生长旺盛的抗性愈伤组织转移到预分化培养基 (MS basic+16g/l sobitol+lg/l casein hydrolysate+100mg/lInositol+5mg/L ABA+2mg/L 6-KT+0.5mg/L NAA+250mg/l cefotaxime+30-50mg/l hygromycin 3g/l Phytigel, pH 5.8) 或 直接转移到分化培养基 (MS basic+16g/l sobitol+lg/l casein hydrolysate+100mg/l Inositol+2mg/L 6-KT+0.5mg/L NAA+250mg/l cefotaxime+30-50mg/l hygromycin 3g/l Phytigel, pH 5.8) 上分化 (16 小时光照 / 天),再生的小苗在 1/2MS 上生根壮苗,随后移入温室。共获得互补转化载体 BC14-BAC 的转基因株系 18 个,无论是茎秆和叶片的拉断力 (图 5A 和 5B),还是粒重 (图 5C),均完全恢复了野生型的表型。这一结果证明该基因具有调节水稻茎秆机械强度和粒重的作用。

[0054] 实施例 3 :BC14 的器官与组织表达特性研究

[0055] 1. BC14 基因的 mRNA 组织原位杂交分析

[0056] 利用带有 EcoR I 和 Kpn I 的限制性内切酶位点的引物从野生型的 cDNA 中扩增出 BC14 基因 cDNA 的 289-594bp 片段。所用引物序列如下 :

[0057] 正向 :5' -cggatccggtaccTTTACAAATAGCGAGCCATCC-3'

[0058] 反向 :5' -gtctagaattcCCCACGAGCATCAAACGAC-3'

[0059] 94℃预变性 5 分钟,94℃ 1 分钟,60℃ 1 分钟,72℃ 0.5 分钟,35 次循环,72℃延伸 10 分钟获得 PCR 产物,将 PCR 产物连接到 T-easy 载体 (购自 Promega),然后通过电击法将连接产物转化 DH10B 感受态细胞 (购自北京天庚生物科技有限公司),测序挑选序列完全正确的克隆。从远离 T7 或 SP6 启动子一侧的多克隆位点区域选择限制性内切酶 Pst I 把质粒线性化,取 1 μ g 线性化的质粒 DNA 作为制备正义或反义 RNA 探针的模板。采用 DIG Northern Starter Kit (2039672, Roche),按照使用说明,制备地高辛标记的 RNA 探针。制备好的 RNA 探针在 60℃ 100mM 碳酸盐缓冲液 (pH10.2) 中裂解 80min,水解后的探针使用浓度为 2 μ g/ml。

[0060] 水稻材料在 4%多聚甲醛中 4℃固定过夜。固定后的组织经脱水、透明、透蜡后包埋在石蜡 (Sigma) 中。用切片机 (RM2145, LEICA) 将包埋的组织切成 7-10 μ m,铺在预先用多聚-L-赖氨酸处理的载玻片上 (P0425, Sigma) 上展片,然后在 42℃烤片台上烘烤过夜。切片经二甲苯脱蜡和酒精梯度复水,0.125mg/ml 链蛋白酶 37℃处理 30min,重新固定后风干。将固定在载玻片上的切片用 2×SSC 漂洗 2min 后,70℃变性 30min,10 μ g/ml 蛋白酶 K 室温消化 30min,再加入 4%多聚甲醛后固定 10min。随后依次用 3×PBS、1×PBS 和三乙醇胺漂洗后,向三乙醇胺溶液中加入乙酸酐剧烈搅拌并再次将切片放入三乙醇胺溶液中孵育 5min,依次用 2×SSC、50%、70%和 100%乙醇中漂洗和脱水,并晾干。

[0061] 每张载玻片上滴加 60 μ l 的 RNA 探针,48℃杂交过夜。载片在 45℃下用 2×SSC (用 50% 甲酰胺溶液稀释) 漂洗 2 次,并依次用 2× 马来酸室温平衡 15 分钟、0.5× 马来酸 (含 0.3% Tween 20) 65℃孵育 1 小时、1× 马来酸 (含 0.3% Tween 20 和 1% 封闭液) 室温孵育 1 小时。向每张载片上加入 80 μ l 碱性磷酸酶偶联地高辛抗体 (购自 Roche 公司),37℃

孵育 2 小时,在含有 1%封闭液的 1× 马来酸溶液中漂洗 3 次,每次 1 小时。然后在含有 0.34mg/ml 氮蓝四唑盐 (nitroblue tetrazolium(购自 Sigma 公司)和 0.175mg/ml 5-溴 4-氯 -3-吲哚 - 磷酸甲苯胺盐 (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate toluidinium salt(购自 Sigma 公司)的漂洗液中温育 1-2 天。用 10mM Tris,1mM EDTA(pH 8.0) 终止显色反应,风干后用 50%甘油封片。在显微镜下观察并用 CCD 相机拍照。

[0062] 原位杂交实验发现 BC14 基因在幼嫩叶片 (图 8A)、幼茎 (图 8B,C)、幼根 (图 8D) 及细嫩茎秆 (图 8E) 等组织的维管束中或厚壁组织处在大量表达。作为实验负对照,其正义链探针在细嫩茎秆中没有检测到明显的杂交信号 (图 8F),证明 BC14 基因主要在水稻机械组织 (主要由厚壁细胞和维管束组成) 中表达。这与其可能参与细胞壁合成的功能预测相一致。

[0063] 2. BC14 基因融合 GUS 表达的转基因材料分析

[0064] 在 BC14-BAC 互补转化载体 (图 4) 的基础上构建 BC14 基因融合 GUS 表达载体。首先利用巢式 PCR 扩增在 TAG 终止密码子前引入 BamH I 酶切位点 (首先 BC14PstIF+BC14BmR 和 BC14BmF+BC14KpnIR 进行 PCR 扩增,将 PCR 产物混合后,再以 BC14PstIF+BC14KpnIR 进行 PCR 扩增)。将最终 PCR 产物连接到 pGEM Teasy 后通过载体上 T7 和 SP6 引物进行测序验证。然后通过 Pst I 和 Kpn I 双酶切将该片段替换 BC14-BAC 载体上的相应片段。将 GusA 基因用带 BamH I 酶切位点的 GusABmF 和 GusABmR 进行 PCR 扩增,连接到 pGEM Teasy 后经测序验证后,以 BamH I 酶切克隆到改造后的 BC14-BAC 载体上,形成 pBC14GUS 载体。将该质粒电击转化农杆菌 EHA105 感受态,挑选阳性克隆用于水稻转化。以上克隆相关的引物序列如下:

[0065] BC14PstIF 5' -TTTCTGCAGGATTTCTTCACC-3'

[0066] BC14BmF 5' -aaggatccTAGATACGGATGTCCAGTGG-3'

[0067] BC14BmR 5' -ctaggattcCTTCCCTTTGATCTTGCA-3'

[0068] BC14KpnIR 5' -ggtaccGGTTCAGTGGTTTATCCACCTT-3'

[0069] GusABmF 5' -GGATCCATGTTACGTCCTGTAGAAACCCC-3'

[0070] GusABmR 5' -GGATCCTTGTTTGCCTCCCTGCTGC-3'

[0071] 经抗性筛选获得转基因植株。T₀ 代转基因植株为野生型表型,说明 BC14-GUS 具有天然 BC14 基因的活性。然后取野生型表型的 T₁ 代转基因幼苗和成株的不同组织进行 GUS 组织化学显色反应。具体程序为:将水稻材料浸入到 GUS 显色液 (500ug/ml X-Gluc,10mM EDTA,100mMsodiumphosphate(pH7.0),0.5mM K₄Fe(CN)₆,0.5mM K₃Fe(CN)₆,0.1% Triton X-100) 中,在 37°C 适当显色后,依次用 30%、50%和 70%乙醇脱色,在体视镜 (Leica) 上用 CCD 相机拍照。对 GUS 显色后的水稻茎秆节间进行徒手切片,然后用 50%甘油封片后在普通光学显微镜 (Leica) 下观察并用 CCD 相机拍照。

[0072] GUS 显色发现,GUS 信号主要集中在叶片的叶枕部 (图 9A)、幼根的中央维管束 (图 9B) 及幼嫩叶片的维管束中 (图 9C)。同时对成株的幼嫩茎秆进行了 GUS 染色,发现有明显的信号,徒手切片观察发现在厚壁细胞和维管束中显色较深 (图 9D 和 E)。GUS 表达分析表明 BC14 基因在不同组织的主要的机械组织厚壁细胞和维管束中都有表达,与 RNA 原位杂交分析的结果相一致。

[0073] GUS 融合表达和 RNA 原位杂交实验分别从翻译水平和转录水平上都证明 BC14 基因

主要在机械组织表达。这与 bc14 突变体在次生壁的严重缺陷表型相一致,也说明 BC14 基因可能是次生壁合成相关的重要基因。

[0074] 实施例 4 :BC14 蛋白的亚细胞定位研究

[0075] 通过 PCR 引物 BC14Sa1F 和 BC14NcoR 扩增 BC14 基因的 cDNA,同时引入 Sa1I 和 Kpn I 酶切位点。将最终 PCR 产物连接到 pGEM Teasy 后通过载体上 T7 和 SP6 引物进行测序验证。然后通过 Sa1 I 和 Nco I 双酶切将 BC14 基因克隆到 GFP 瞬时表达载体 35SCGFP(购自 Clontech 公司)上。挑取阳性克隆经过酶切和测序验证后,形成 BC14-CGFP。然后通过类似的方法以 KpnI 和 SpeI 将 BC14 基因克隆到 35S-NGFP 瞬时表达载体(购自 Clontech 公司)上,形成 NGFP-BC14 载体。相关的引物序列如下:

[0076] BC14Sa1F 5' -tgtcgacATGGCGAAGGGAGGG-3'

[0077] BC14NcoR 5' -tccatggcCTTCCCTTTGATCTTGC-3'

[0078] BC14KpF 5' -tggatccATGGCGAAGGGAGGG-3'

[0079] BC14SpR 5' -tactagtCTACTTCCCTTTGATCTTGC-3'

[0080] 将构建好的 BC14-CGFP 和 NGFP-BC14 载体分别转化水稻原生质体,通过激光共聚焦显微观察研究 BC14 蛋白的亚细胞定位。具体程序为:将 37℃ 萌发的水稻种子播种在 PCR 板上于 28℃ 暗中培养 7-9 天。取出幼苗,用蓝吉列刀片顺脉方向连续拉,并浸在 0.6M mannitol 中平衡 10min。用 200 目筛子过滤后,将切碎的组织投入配制的酶液 [0.6M mannitol,10mM MES(pH 5.7),1.5% Cellulase RS,0.75% Macerozyme,0.1% BSA,1mM CaCl₂,5mM β-mercaptoethanol] 中,抽真空 5min,在 28℃ 摇床 (80rpm) 上裂解 4hr。经 200 目筛子过滤,将悬浊液装入 7ml 离心管中,以 600rpm 离心 3-5min 后弃掉上清,用 2ml W5 溶液 (154mM NaCl,125mM CaCl₂,5mM KCl,2mM MES(pH 5.7)) 和预冷的 2ml Mmg 溶液 (0.6M mannitol,15mM MgCl₂,4mM MES(pH 5.7)) 分别洗涤一次后,弃上清重加入 2ml Mmg 溶液,充分悬浮,冰浴 30min。然后 600rpm 离心收集原生质体沉淀。每 100ul 原生质体,依次加入 20ul 纯化的瞬时表达质粒,和 120ul 40% PEG,充分混匀,室温放置 20min。然后加入 1ml W5 溶液,混匀后转移到六孔培养板,再加入 1ml W5,在 28℃ 培养过夜。次日,提篮离心收集原生质体,即可用于激光共聚焦显微观察。

[0081] 激光共聚焦显微观察结果,BC14 蛋白 C 端和 N 端的 GFP 融合的 GFP 荧光信号都与标记高尔基体的 Man49-RFP 的 RFP 荧光信号高度重合(图 10),表明 BC14 蛋白定位在水稻高尔基体。

[0082] 实施例 5 :BC14 蛋白的体外表达和功能验证

[0083] 1. BC14 表达载体的构建:

[0084] 利用带有 Kpn I 和 Spe I 的限制性内切酶位点的引物从野生型的 cDNA 中扩增出 BC14 基因,同时引入 His 标签。所用引物序列如下:

[0085] 正向:5' -TGGTACcatgcatcatcaccatcaccacggcATGGCGAAGGGAGGG-3'

[0086] 反向:5' -TACTAGTCTACTTCCCTTTGATCTTGC-3'

[0087] 94℃ 预变性 5 分钟,94℃ 1 分钟,60℃ 1 分钟,72℃ 4 分钟,35 次循环,72℃ 延伸 10 分钟获得 PCR 产物,将 PCR 产物连接到 T-easy 载体(购自 Promega),然后通过电击法将连接产物转化 DH10B 感受态细胞,测序挑选序列完全正确的克隆。通过 Kpn I 和 Spe I 酶切插入到具相同酶切位点的酵母表达载体 pYES2(购自 Biovector 公司)中,测序验证其编码

框的正确性,形成 pYES2-BC14 载体。

[0088] 2. BC14 蛋白的表达

[0089] 将构建好的 pYES2-BC14 质粒,利用质粒提取试剂盒(购自上海申能博彩生物科技有限公司)纯化好后,利用 PEG/LiAc 转化酵母菌株 23344c^[21] 中进行表达。挑含 pYES2-BC14 酵母单菌落到 SD-U 液体培养基中在 30℃ 摇床上 200rpm 培养至 OD₆₀₀ 为 3。然后 800g 离心 10min 收菌,用诱导培养基(加入了诱导剂 2% 半乳糖的缺尿嘧啶(uracil)的 SC 培养基)悬起,在 30℃ 以 200rpm 培养过夜。800g 离心 10min 收菌,用含溶壁酶(购自北京天庚生物科技有限公司)的原生质球缓冲液(spheroplastbuffer)悬起,于 37℃ 水浴 2h。然后 800g 离心 10min 收集原生质球。用冰浴的膜缓冲液悬起,然后用匀浆器裂解原生质球。依次用 1000g(10min)、8000g(20min)和 100000g(60min)离心,最终获得富含高尔基体囊泡的 P3 组分。以 Bradford 法确定组分的蛋白质浓度。

[0090] 3. BC14-GFP 融合蛋白的功能

[0091] 对 NCBI 非冗余蛋白质数据库的 Blast 分析发现,BC14 蛋白与动物中的一些核苷酸糖基转运蛋白(NST)具有一定的同源性,因此我们将在酵母细胞中表达的 BC14 蛋白进行体外核苷酸糖基转运活性分析,具体步骤如下:将 50 μg P3 组分蛋白和 0.3 μCi 放射性标记底物 Uridinediphosphate glucose[glucose-6-³H] 加入到 40 μl 反应缓冲液(0.8M Sorbitol,10mM Tris,2mM MgCl₂)中,然后置于 30℃ 水浴 8min。用 400 μl 冰浴的终止缓冲液终止反应后,过硝酸纤维素滤膜。并用 10 倍体积终止缓冲液洗滤膜。将滤膜转移到 2mL 管中,完全干燥后添加 1.8mL 闪烁液(Optiphase supermix,PE),并使用闪烁仪测定放射性活性。图 11 显示,与阴性对照比较,BC14 的确具有一定的 UDP-Glc 的转运活性,证明 BC14 为一种核苷酸糖基转运蛋白。

[0092] 参考文献

[0093] 1. Bacic, A., et al. *Edi: Priess, J. The biochemistry of plants*. New York, Academic Press, 14 :297-371

[0094] 2. Pear, J. R., et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93 :12637-12642

[0095] 3. Arioli, T., et al. *Science*. 279, 717-720.

[0096] 4. Richmond, T. A., et al. *Plant Physiol*. 2000, 124 :495-498.

[0097] 5. Taylor, N. G., et al. *Plant Cell*. 2000, 12 :2529-2540.

[0098] 6. Zhong, R., et al. *Plant Cell*. 2002, 14 :3101-3117.

[0099] 7. Burk, D. H., et al. *Plant Cell*. 2001, 13 :807-827.

[0100] 8. Roudier, F., et al. *Plant Cell*. 2005, 17 :1749-1763.

[0101] 9. Scheible, W. R., et al. *Curr Opin Plant Biol*. 2004, 7 :285-295.

[0102] 10. Sarria, R., et al. *Plant Physiol*. 2001, 127 :1595-1606.

[0103] 11. Faik, A., et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002, 99 :7797-7802.

[0104] 12. Madson, M., et al. *Plant Cell*. 2003, 15 :1662-1670.

[0105] 13. Jones, L., et al. *Plant J*. 2001, 26 :205-216

[0106] 14. Fan, C., et al. *Theor Appl Genet*. 2006, 112 :1164-1171

[0107] 15. Takano-Kai, N., et al. *Genetics*. 2009, 182 :1323-1334

[0108] 16. Song, X. J., et al. *Nat. Genet*. 2007, 39 :623-630

-
- [0109] 17Shomura, A. , et al. Nat. Genet. 2008, 40 :1023-1028
- [0110] 18Weng, J. F. , et al. Cell Research. 2008, 18 :1199-1209
- [0111] 19Wang, E. T. , et al. Nature Genetics. Nat. Genet. 40 :1370-74
- [0112] 20. Li X, et al. Nature. 2003, 422 (6932) :618-621
- [0113] 21. Fadi A. S, et al. Genetics. 2004, 166 :1727-1739

[0001]

序列表

<110> 中科院遗传发育所

<120> 水稻茎秆机械强度和粒重控制基因 BC14 及其应用

<130> IB103446

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1041

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 1

```

atggcgaagg gagggggggc gctgctgccg atgtccgcgg aggcggggaa gggcaacggg      60
ggcgggggcg gcggcggcga cgatgccgcg ctgttcaagg ggtccgcat gacgcggcgc      120
ggcgcggtcg ccgcgctctc ctacatggcc tgctccgtgt tgctagtgat gtttaacaaa      180
gcagcactgt cttcataāaa tttcccctgt gcaaatgtca ttacgctcct tcagatggtg      240
tgctcaacag gccttcttta tgttctgagg cggctaaaga taatttcatt tacaatage      300
gagccatccg tgccttctga tgcgttattc ttcgttccgt tcagaatact gttgcgtact      360
acacctcttt ctttgctta tttactctat atgttagctt caatggaatc tgtgcgtgga      420
gtcaatgttc cgatgtatac aacctgagg cgcacaacag tagtctttac aatgacaatg      480
gagtatttct tggcaaaaca gaagcatacg ccacctataa tcggcagcgt ggctttgatt      540
gtatttgag catttatcgc tggagctcga gacctgtcgt ttgatgctcg tgggtatgct      600
attgtctttg tggccaacat tacaacagct gtttaccttg ctactataaa cegtatagga      660
aatctagtg gtctaaatag cttcggcctg atgtggtgca acggacttgt ctgtgggcct      720
tcagtacttt ttctgacata tattcagggt gacctgaaga aggctataga atttcctac      780
ctctattccc ctgggtttca ggcggtgctg ctattctcat gcattgctagc ttttctgcta      840
aactaacta tcttctggaa tacaatcctg aattctgcac tcacacaatc gatgtgtggt      900
aatttgaagg atttcttcac cgtcggaaat ggctgggttc tgtttggtgg gcttcctttt      960
gatctgctta atgttatcgg gcaaggtctt ggctttcttg gctctggcct gtatgcctac     1020

```

[0002]

tgcaagatca aagggaagta g

1041

<210> 2

<211> 346

<212> PRT

<213> 水稻

<400> 2

Met Ala Lys Gly Gly Gly Ala Leu Leu Pro Met Ser Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Lys Gly Asn Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Asp Ala Ala Leu Phe
 20 25 30
 Lys Gly Ser Ala Met Thr Arg Arg Gly Ala Val Ala Ala Leu Ser Tyr
 35 40 45
 Met Ala Cys Ser Val Leu Leu Val Met Phe Asn Lys Ala Ala Leu Ser
 50 55 60
 Ser Tyr Asn Phe Pro Cys Ala Asn Val Ile Thr Leu Leu Gln Met Val
 65 70 75 80
 Cys Ser Thr Gly Leu Leu Tyr Val Leu Arg Arg Leu Lys Ile Ile Ser
 85 90 95
 Phe Thr Asn Ser Glu Pro Ser Val Pro Ser Asp Ala Leu Phe Phe Val
 100 105 110
 Pro Phe Arg Ile Leu Leu Arg Thr Thr Pro Leu Ser Leu Ala Tyr Leu
 115 120 125
 Leu Tyr Met Leu Ala Ser Met Glu Ser Val Arg Gly Val Asn Val Pro
 130 135 140
 Met Tyr Thr Thr Leu Arg Arg Thr Thr Val Val Phe Thr Met Thr Met
 145 150 155 160
 Glu Tyr Phe Leu Ala Lys Gln Lys His Thr Pro Pro Ile Ile Gly Ser
 165 170 175
 Val Ala Leu Ile Val Phe Gly Ala Phe Ile Ala Gly Ala Arg Asp Leu

[0003]

	180	185	190
Ser Phe Asp Ala Arg Gly Tyr Ala Ile Val Phe Val Ala Asn Ile Thr			
	195	200	205
Thr Ala Val Tyr Leu Ala Thr Ile Asn Arg Ile Gly Lys Ser Ser Gly			
	210	215	220
Leu Asn Ser Phe Gly Leu Met Trp Cys Asn Gly Leu Val Cys Gly Pro			
225	230	235	240
Ser Val Leu Phe Leu Thr Tyr Ile Gln Gly Asp Leu Lys Lys Ala Ile			
	245	250	255
Glu Phe Pro Tyr Leu Tyr Ser Pro Gly Phe Gln Ala Val Leu Leu Phe			
	260	265	270
Ser Cys Met Leu Ala Phe Leu Leu Asn Tyr Thr Ile Phe Trp Asn Thr			
	275	280	285
Ile Leu Asn Ser Ala Leu Thr Gln Ser Met Cys Gly Asn Leu Lys Asp			
	290	295	300
Phe Phe Thr Val Gly Ile Gly Trp Val Leu Phe Gly Gly Leu Pro Phe			
305	310	315	320
Asp Leu Leu Asn Val Ile Gly Gln Gly Leu Gly Phe Leu Gly Ser Gly			
	325	330	335
Leu Tyr Ala Tyr Cys Lys Ile Lys Gly Lys			
	340	345	

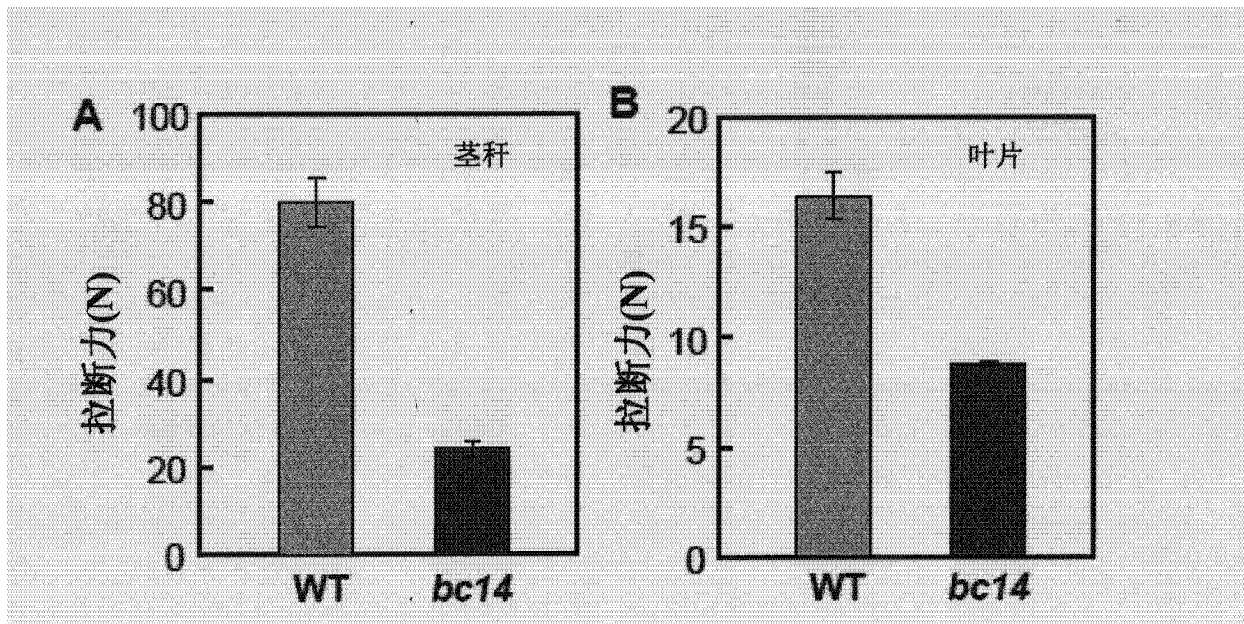


图 1

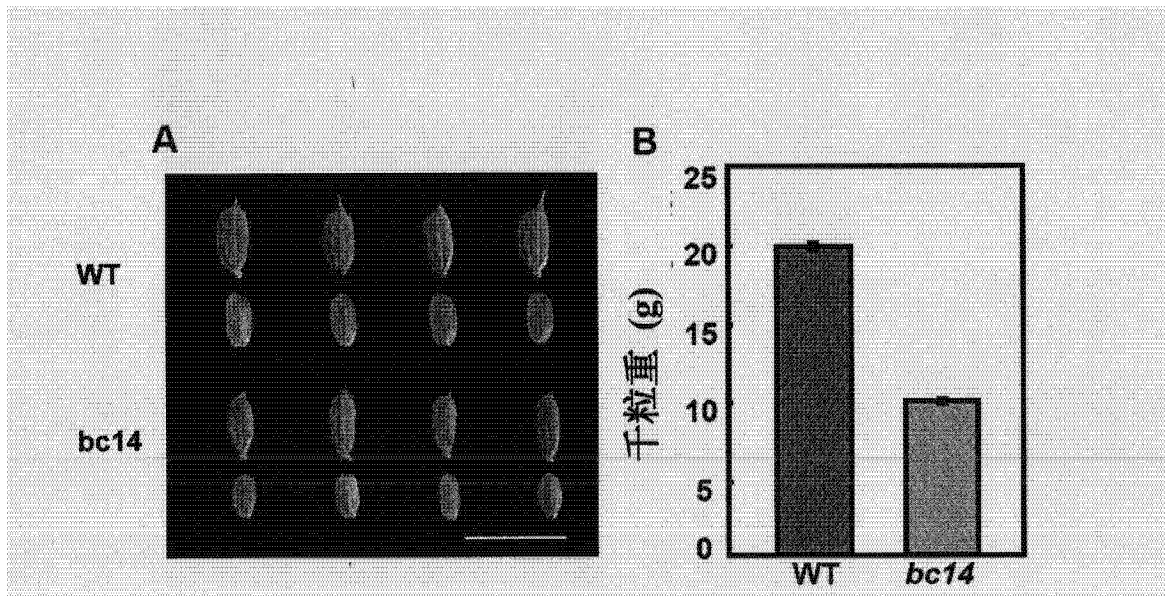


图 2

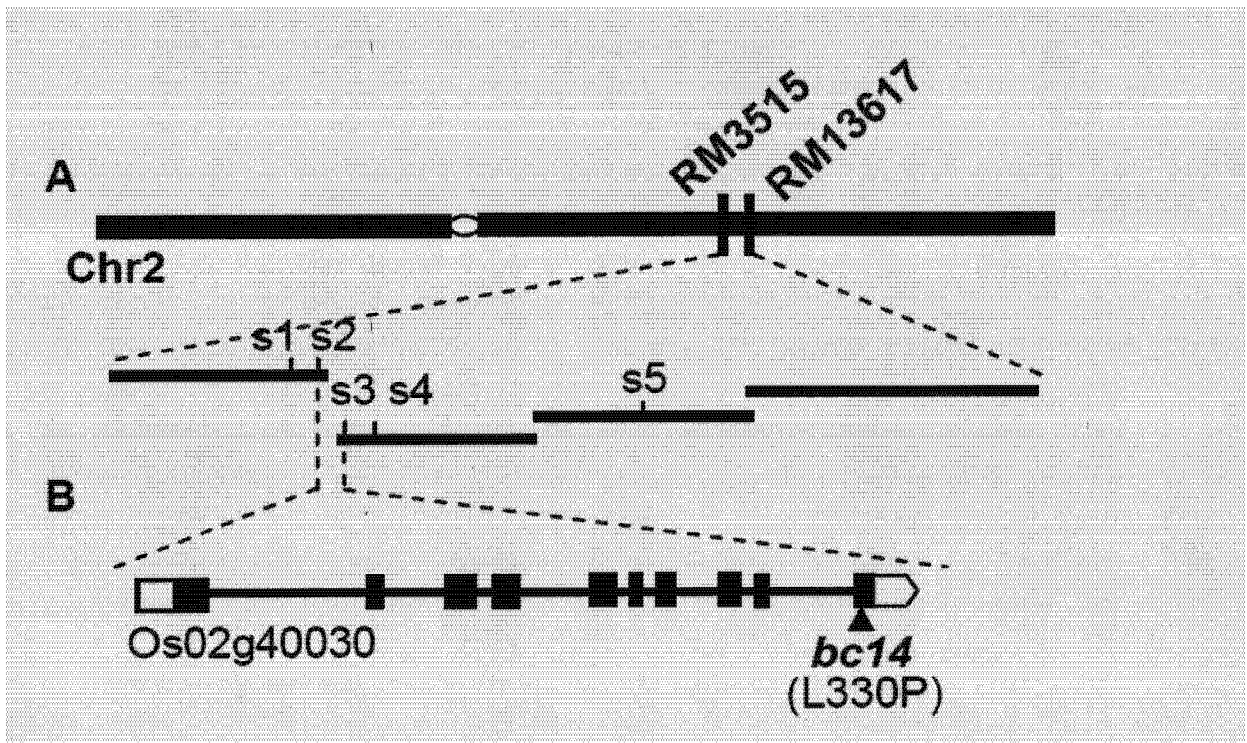


图 3

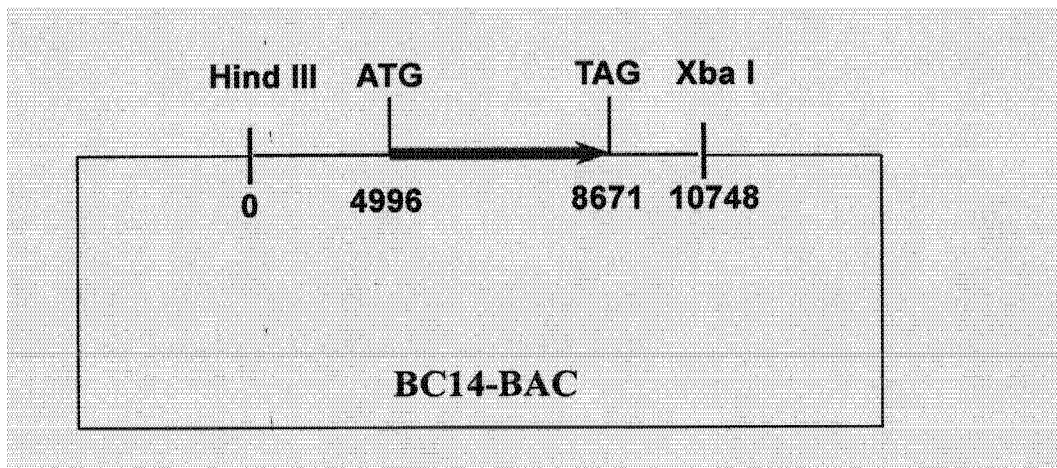


图 4

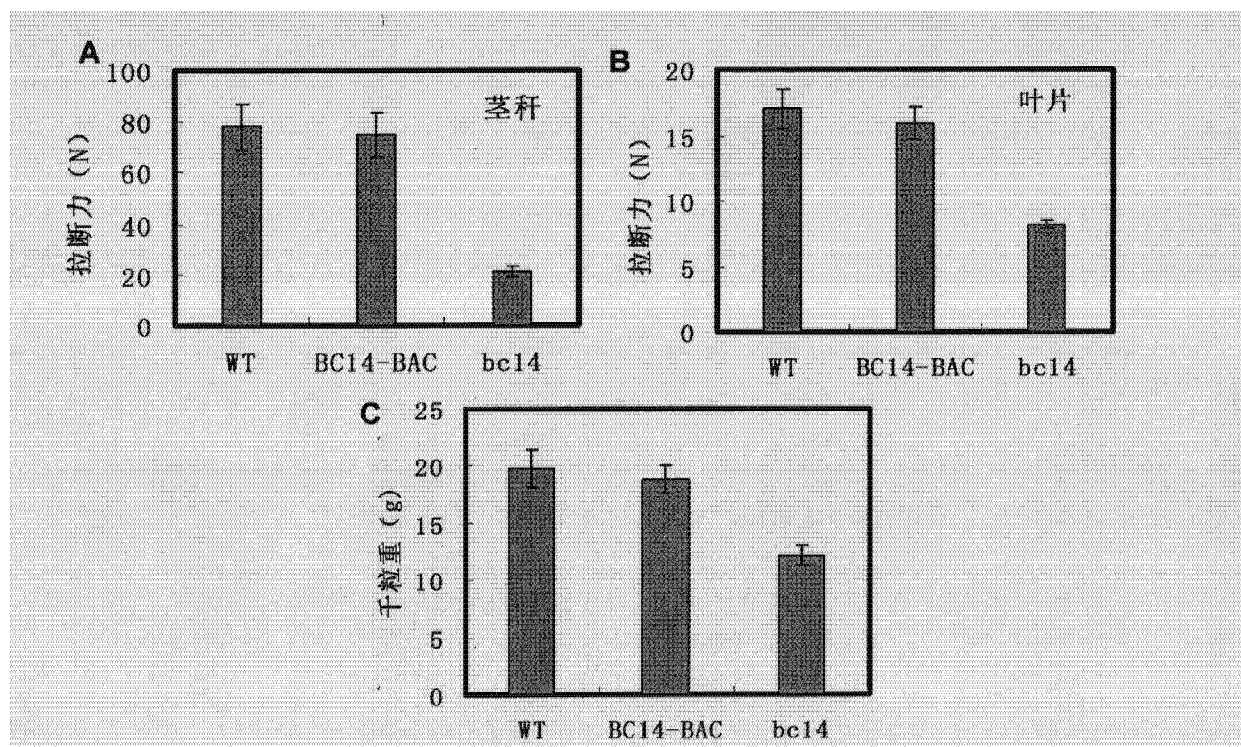


图 5

```
ATGGCGAAGGGAGGGGGGCGCTGCTGCCGATGTCCGCGGAGGCGGGGAAGGGCAACGGGGGCGGGGGCGGGCGGGCGACGAT
GCCCGCTGTTCAGGGGTCCGCCATGACGCGGCGCGGGCGGTGCGCGCTCTCCTACATGGCTGCTCCGTGTGCTAGTG
ATGTTTAAACAAAGCAGCACTGTCTTCATATAATTTCCCTGTGCAAAATGTCATTACGCTCCTTCAGATGGTGTGCTCAACAGGC
CTTCTTTATGTTCTGAGGCGGCTAAAGATAATTTCAATTACAATAGCGAGCCATCCGTGCCTTCTGATCGGTTATTCTTCGTT
CCGTTCAGAATACTGTTGCGTACTACACCTCTTTCTTTGGCTATTTACTCTATAATGTTAGCTTCAATGGAATCTGTGCGTGGA
GTCAATGTTCCGATGTATAACAACACTGAGGCGCACAACAGTAGCTTTACAATGACAATGGAGTATTTCTTGCCAAAACAGAAG
CATACGCCACCTATAATCGGCAGCGTGGCTTTGATTGTATTTGGAGCATTATCGCTGGAGCTCGAGACCTGTCGTTTGATGCT
CGTGGGTATGCTATTGTCTTTGTGGCCAACATTACAACAGCTGTTTACCTTGCTACTATAAACCCTATAGGAAAATCTAGTGGT
CTAAATAGCTTCGGCCTGATGTGGTGCAACGGAATTGCTGTGGGCCTTCAGTACTTTTCTGACATATATTCAGGGTGACCTG
AAGAAGGCTATAGAATTTCCCTACCTCTATTTCCCTGGGTTTCAGGCGGTGCTGCTATTCTCATGCATGCTAGCTTTTCTGCTA
AACTACACTATCTTCTGGAATACAATCCTGAATTCTGCACTCACACAATCGATGTGTGGTAATTGAAGGATTTCTTCACCGTC
GGAATGGCTGGGTTCTGTTGGTGGGCTTCCCTTTGATCTGCTTAATGTTATCGGGCAAGGCTTGGCTTTCTTGGCTCTGGC
TTGTATGCCTACTGCAAGATCAAAGGAAGTAG
```

图 6

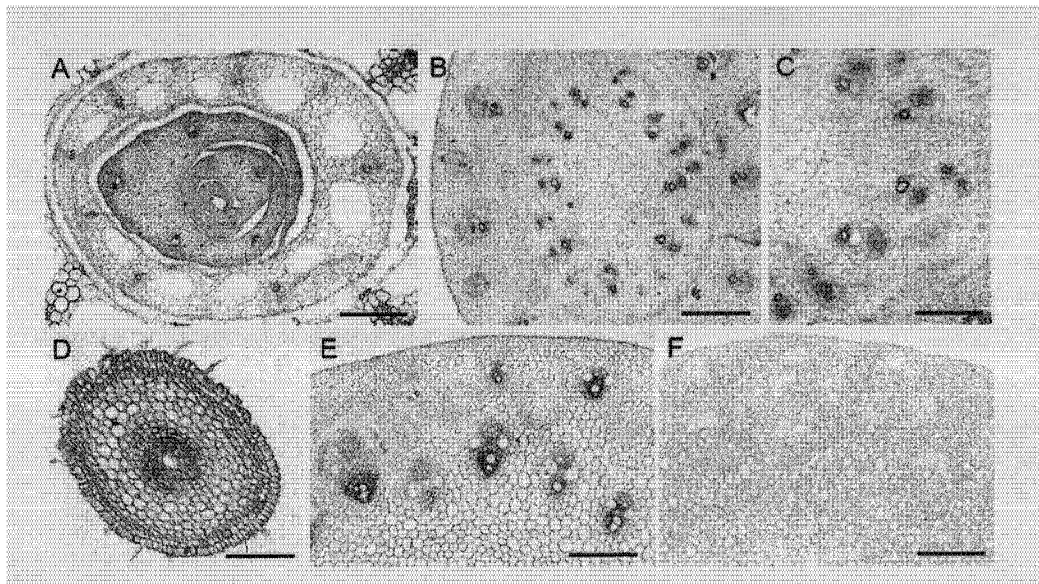


图 7

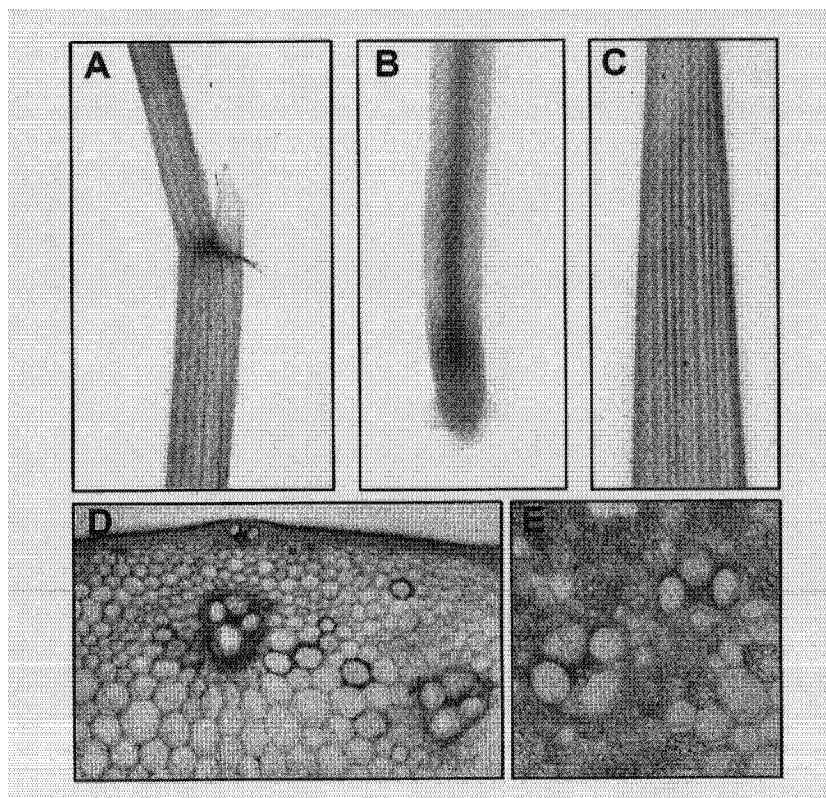


图 8

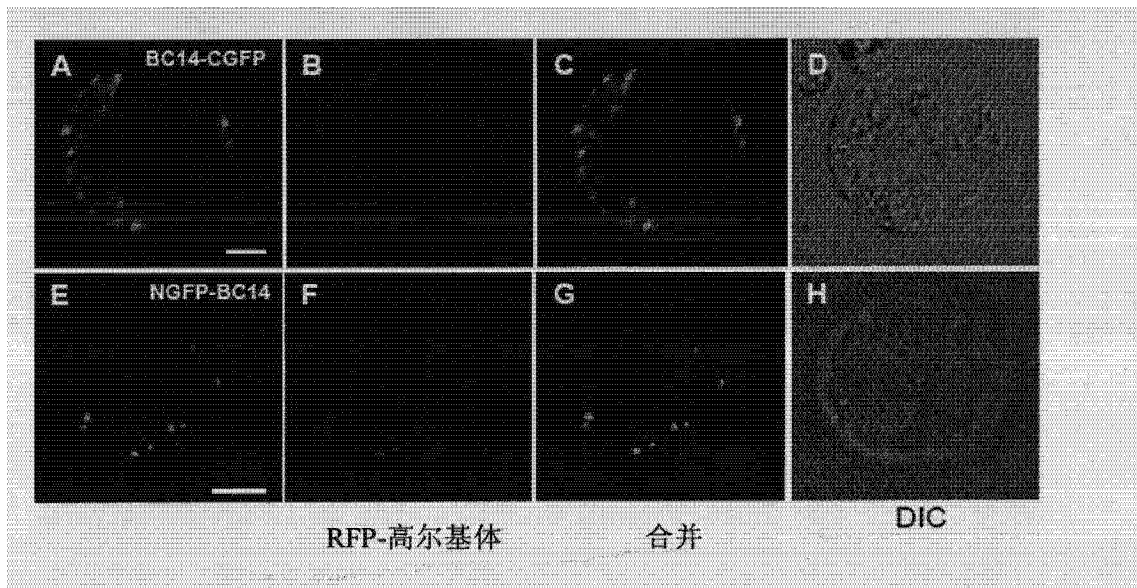


图 9

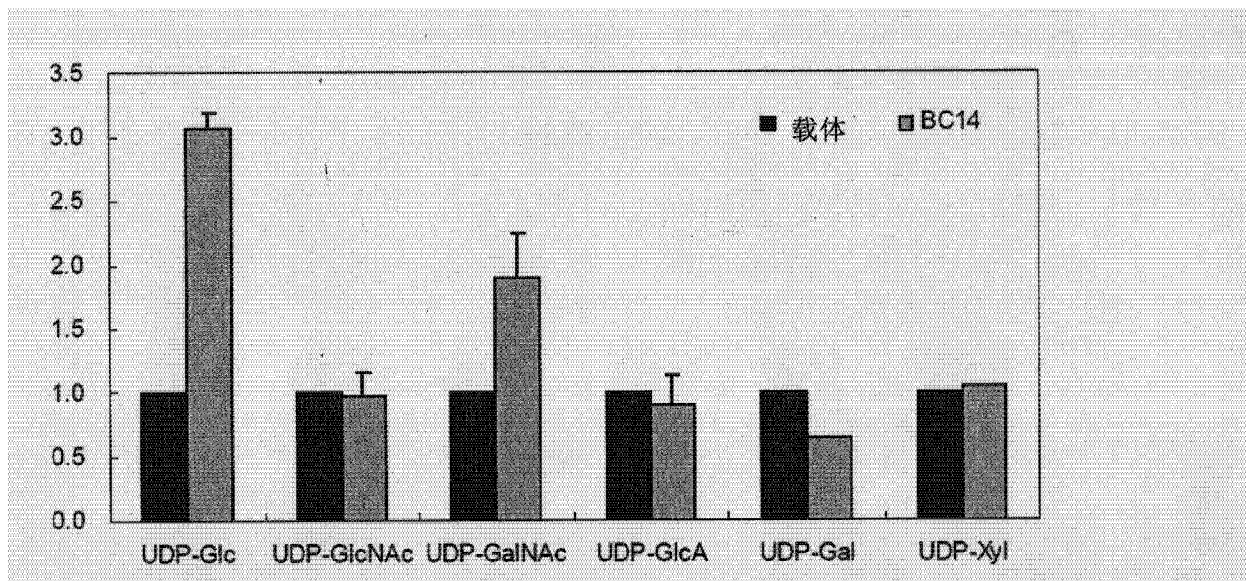


图 10

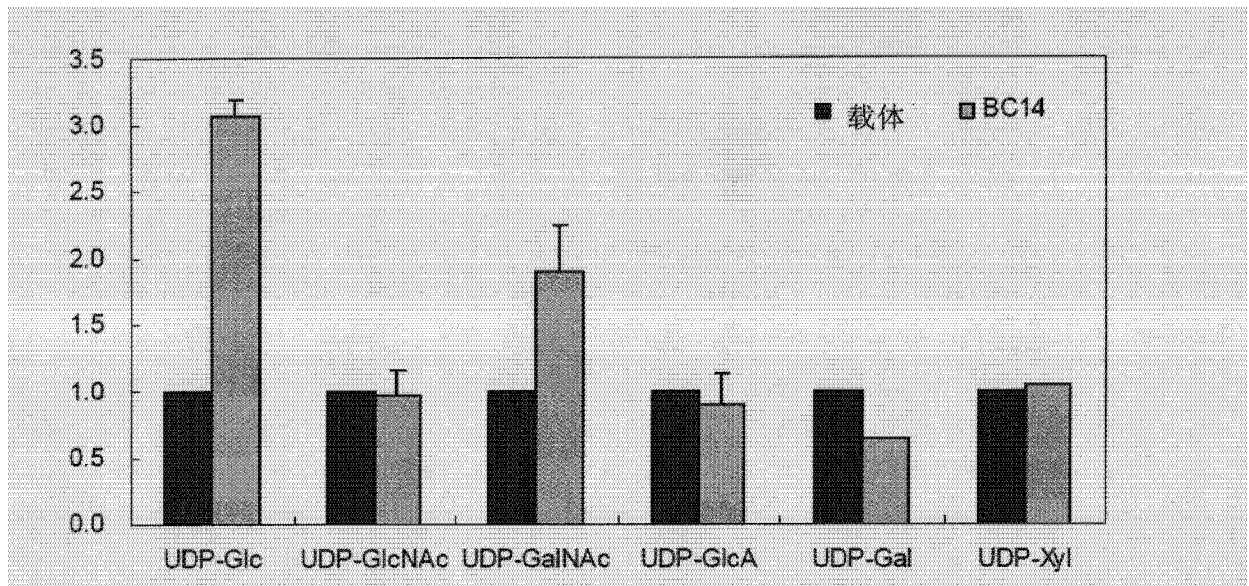


图 11