



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101817879 A

(43) 申请公布日 2010.09.01

(21) 申请号 200910078200.8

(22) 申请日 2009.02.26

(71) 申请人 中国科学院遗传与发育生物学研究所

地址 100080 北京市海淀区中关村南一条3号

(72) 发明人 储成才 杨昭 吴耀荣

(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 任风华

(51) Int. Cl.

C07K 14/825 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称

金属硫蛋白及其编码基因与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种金属硫蛋白及其编码基因与应用。该蛋白质是序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；该蛋白可用于培育抗旱能力提高和 / 或锌含量提高的植物。本发明还公开了一种培育抗旱能力提高和 / 或锌含量提高的植物的方法，是将所述基因导入植物中，得到抗旱能力提高和 / 或锌含量提高的转基因植物。本发明的金属硫蛋白及其编码基因对农业生产具有重要的意义。

1. 一种蛋白质,是如下 a) 或 b) 的蛋白:
 - a) 序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;
 - b) 在序列表中序列 2 的氨基酸序列经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨基酸由 a) 衍生的蛋白质。
2. 权利要求 1 所述蛋白的编码基因。
3. 根据权利要求 2 所述的基因,其特征在于:所述基因是如下 1) 或 2) 或 3):
 - 1) 其核苷酸序列是序列表中序列 1;
 - 2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 片段杂交且编码金属硫蛋白的 DNA 分子;
 - 3) 与 1) 或 2) 的基因具有 90% 以上的同源性,且编码金属硫蛋白的 DNA 分子。
4. 含有权利要求 2 或 3 所述基因的重组表达载体。
5. 含有权利要求 2 或 3 所述基因的转基因细胞系或重组菌。
6. 一种培育抗旱能力提高和 / 或锌含量提高的植物的方法,是将权利要求 2 或 3 所述基因导入植物中,得到抗旱能力提高和 / 或锌含量提高的转基因植物。
7. 扩增权利要求 2 或 3 所述基因的全长及其任意片段的引物对。
8. 权利要求 1 所述蛋白、权利要求 2 或 3 所述基因、权利要求 4 所述重组表达载体、权利要求 5 所述转基因细胞系或重组菌在培育抗旱能力提高和 / 或锌含量提高的植物中的应用。

金属硫蛋白及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及金属硫蛋白及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 金属硫蛋白 (metallothioneins, MT) 是一类低分子量 (6000 ~ 7000Da)、高 Cys 含量, 具有金属结合能力的多肽, 广泛存在于生物界。它具有独特的氨基酸排列顺序, 即多肽的 N 端和 C 端具有两个富含 Cys 的金属结合结构域。Cys 残基与许多金属离子以硫醇键形式结合形成金属硫的四面体单位。由于 MT 特有的氨基酸组成与分子结构, 它在生物体内担负着重要的生理功能。目前对植物 MT 功能的研究还处于起步状态, 尚无十分明确的结论。一般认为 MT 在金属离子的储存和运输、重金属的解毒、维持金属离子浓度稳态等方面起重要作用。另外, MT 还与植物的生长发育、胚胎发生、果实成熟、衰老等过程有关。越来越多的研究表明 MT 是植物体内重要的氧自由基清除剂之一, 能提高植物的抗氧化能力。

[0003] 根据氨基酸尤其是 Cys 的排列方式, 可以把植物中的 MT 分为四类。I 型在根中表达量远远高于地上部分, II 型则刚好相反, 集中在叶中表达。III 型主要在成熟果实中表达。而 IV 型迄今为止只在种子中发现, 比如小麦胚芽和芝麻籽。水稻的 MT 家族包含 11 个成员, 分别属于四类。除了被各种金属离子诱导外, 其他一些刺激比如蔗糖饥饿、双氧水和盐胁迫也能提高水稻 MT 合成增加。初步研究表明, 水稻 MT 参与了重金属代谢、种子发育和抗氧化过程。

[0004] 水稻是一种重要的粮食作物, 是世界上约 1/3 人口的主要粮食来源。现今世界范围内水稻的发展受到水资源匮乏以及地区性、季节性干旱的严重限制, 增产潜力受到明显制约。中国作为发展中国家, 飞速发展的工业化和城市化进程加剧了水资源危机。另外, 由于农药的广泛使用, 大量的汞、镉、铅等重金属造成土壤污染日趋严重。旱灾及各种污染影响了水稻的质量和产量。因此, 对水稻抗旱、抗金属毒害等生理进行研究, 以期提高其抗旱等抗逆能力, 显得十分必要。

[0005] 作物抗旱等非生物逆境研究是植物研究领域最具挑战性的工作之一。选择合适的研究材料是关键的第一步。陆稻原产于巴西, 又称巴西旱稻。一般认为, 旱稻是由水稻演变而来的适于旱地栽培的“土地生态型”, 因而陆稻的抗旱性比水稻强。陆稻与水稻的亲缘性很近。比起远缘的双子叶植物比如拟南芥等, 从陆稻研究中得到的功能基因应用于水稻抗旱实践更具效果。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种金属硫蛋白及其编码基因与应用。

[0007] 本发明所提供的金属硫蛋白, 命名为 OsMT1a, 来源于巴西旱稻, 是如下 a) 或 b) 的蛋白:

[0008] a) 序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

[0009] b) 在序列表中序列 2 的氨基酸序列经过取代和 / 或缺失和 / 或添加一个或几个氨

氨基酸由 a) 衍生的蛋白质。

[0010] 为了使 a) 的 OsMT1a 蛋白质便于纯化,可在由序列表中序列 2 所示的蛋白质的氨基末端或羧基末端连接上如表 1 所示的标签。

[0011] 表 1. 标签的序列

[0012]

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

[0013] 上述 b) 中的 OsMT1a 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。上述 b) 中的 OsMT1a 蛋白质的编码基因可通过将序列表中序列 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' 端连上表 1 所示的标签的编码序列得到。

[0014] 所述蛋白的编码基因也属于本发明的保护范围。

[0015] 所述蛋白的编码基因是如下 1) 或 2) 或 3) :

[0016] 1) 其核苷酸序列是序列表中序列 1 ;

[0017] 2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 片段杂交且编码金属硫蛋白的 DNA 分子 ;

[0018] 3) 与 1) 或 2) 的基因具有 90% 以上的同源性,且编码金属硫蛋白的 DNA 分子。

[0019] 所述步骤 3) 中的基因,与 1) 的基因最好有 95% 以上的同源性。

[0020] 上述严格条件可为在 $6\times\text{SSC}$, 0.5% SDS 的溶液中,在 68°C 下杂交,然后用 $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 和 $1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 各洗膜一次。

[0021] 扩增 OsMT1a 基因全长或任一片段的引物对也属于本发明的保护范围。

[0022] 含有上述 OsMT1a 基因的重组载体、转基因细胞系和重组菌也属于本发明的保护范围。

[0023] 可用现有的植物表达载体构建含有 OsMT1a 基因的重组表达载体。所述植物表达载体包括二元农杆菌载体和可用于植物微弹轰击的载体等,如 pCAMBIA3301、pCAMBIA1300、pBI121、pBin19、pCAMBIA2301、pCAMBIA1301-UbiN 或其它衍生植物表达载体。携带有本发明的 OsMT1a 基因的植物表达载体可通过 Ti 质粒、Ri 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、显微注射、电导、农杆菌介导等常规生物学方法转化到植物细胞或组织中。

[0024] 使用 OsMT1a 基因构建重组植物表达载体时,在其转录起始核苷酸前可加上任何一种增强型、组成型、组织特异型或诱导型启动子,如花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子、泛生素基因 Ubiquitin 启动子 (pUbi) 等,它们可单独使用或与其它植物启动子结合使

用;此外,使用本发明的 OsMT1a 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。

[0025] 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)、具有抗性的抗生素标记物(庆大霉素标记物、卡那霉素标记物等)或是抗化学试剂标记基因(如抗除草剂基因)等。

[0026] 本发明的另一个目的是提供一种培育抗旱能力提高和/或锌含量提高的植物的方法。

[0027] 本发明所提供的培育抗旱能力提高和/或锌含量提高的植物的方法,是将所述的 OsMT1a 基因导入植物中,得到抗旱能力提高和/或锌含量提高的转基因植物。

[0028] 所述植物可以为各种单子叶或双子叶植物,如棉花、小麦或者水稻等。

[0029] 本发明通过 SSH(抑制消减杂交)的方法从盐胁迫的巴西早稻中克隆得到一个 I 型的金属硫蛋白 OsMT1a。转 OsMT1a 基因酵母和水稻中的微量元素锌的累积提高,并且转 OsMT1a 基因水稻的抗氧化及耐逆性能提高。本发明的金属硫蛋白 OsMT1a 可用来培育抗旱能力提高和/或锌含量提高的植物,对农业生产具有重要的意义。

附图说明

[0030] 图 1 为 Northern 杂交分析日本晴中 OsMT1a 的表达。

[0031] 图 2 为金属处理的巴西早稻中 OsMT1a 的表达。

[0032] 图 3 为非生物胁迫处理的巴西早稻中 OsMT1a 的表达。

[0033] 图 4 为 300mM 甘露醇处理的野生型日本晴(WT)和转 OsMT1a 基因水稻表型变化及失水率测定。

[0034] 图 5 为 CAT、APX 和 POD 活性测定结果。

[0035] 图 6 为转 OsMT1a 基因株系中 Ossid 的表达。

具体实施方式

[0036] 下述实施例中如无特殊说明所用方法均为常规方法,所用试剂均可从商业途径获得。下述实施例中如无特殊说明所述百分含量均为质量百分含量。

[0037] 实施例 1、金属硫蛋白(OsMT1a)基因的应用

[0038] 1)OsMT1a 基因的克隆

[0039] 以盐处理和未处理的巴西早稻为材料,利用消减抑制杂交的方法,直接从早稻中分离了 94 个盐诱导基因。其中一个基因的 cDNA 全长 222bp,编码 74 个氨基酸,在 N 端和 C 端分别有六个半胱氨酸位于保守的位置,还有大约 40 氨基酸的 spacer 区,其中包含芳香族氨基酸酪氨酸和苯丙氨酸,这是 I 型植物 MT 蛋白的典型特征,将其命名为 OsMT1a。OsMT1a 蛋白与其他单子叶植物 I 型 MT 蛋白都有较高的相似性,比如玉米(73.7%),大麦(67.6%)。

[0040] 分别取日本晴植株根、叶、花以及幼苗部分,按文献(Chomczynski, P. and

Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.) 方法提取 RNA, 以 OsMT1a 全长 cDNA 为探针进行 Northern 杂交分析。

[0041] Northern 杂交结果如图 1 所示, 表明 OsMT1a 在水稻的根、花、叶、幼苗均有表达, 其中在根中表达量最高。

[0042] 图 1 中, “1”代表花、“2”代表叶、“3”代表幼苗、“4”代表根。

[0043] 巴西旱稻种子在 37℃ 浸种两天, 露白后铺在放有两层纱布的平皿上培养, 培养条件为 28℃, 持续光照强度为 2500lux, 光周期为 16/8h。培养两周后取幼苗进行处理。

[0044] 金属处理: 分别用 10 μM ZnCl₂、CuCl₂、MnCl₂ 和 FeCl₃ 溶液处理 24 小时。

[0045] 非生物胁迫处理: 分别用 150mM NaCl、7% PEG6000 和 10 μM ABA 溶液处理 24 小时。

[0046] 检测金属处理 1、6、12 和 24 小时和非生物胁迫处理 0、0.5、6 和 24 小时 OsMT1a 的表达。

[0047] 提取各个处理不同时间的巴西旱稻的总 RNA, 用 Promega 公司的 MMLV 逆转录酶反转录后利用实时定量荧光 PCR 技术, 根据厂家 (Bio-Rad) 提供的使用方法, 在 PCR 体系中加入 SYBR green I 荧光染料, 在荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 上检测 OsMT1a 的表达模式。用水稻 ACTIN1 基因表达水平做内参。扩增 OsMT1a 的引物分别为: 上游引物 5'-GAAGATGTCTTGCAGCTGTGGAT-3', 下游引物 5'-AGATGGTAGATGCAGGCAGGC-3'。

[0048] 同时, 以 OsMT1a 全长 cDNA 为探针进行 Northern 杂交分析。

[0049] 金属处理的实时定量荧光 PCR 结果如图 2 所示, 表明 10 μM 的 Zn 能诱导 OsMT1a 的表达上调, 同样浓度的 Mn、Fe、Cu 不能诱导 OsMT1a 的表达上调。

[0050] 图 2 中, A 为 10 μM Mn²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺ 处理 0 ~ 24 小时 OsMT1a 表达变化; B 为 10 μM Zn²⁺ 处理 0 ~ 24 小时 OsMT1a 表达变化。

[0051] 非生物胁迫处理的实时定量荧光 PCR 结果如图 3 所示, OsMT1a 受到渗透胁迫、盐胁迫以及 ABA 的诱导表达, 其中渗透胁迫的诱导最为明显。

[0052] 设计正反向引物, 利用 PCR 方法从水稻基因组 DNA 中扩增出 OsMT1a 基因, 并在正反向引物末端分别添加限制性酶 EcoRI 和 BamHI 的酶切位点。

[0053] 正向引物为 5'-GAATTCGAAGATGTCTTGCAGCTGTG-3';

[0054] 反向引物为 5'-GGATCCGCAGGCAGGCATCTTA-3'。

[0055] PCR 产物回收后连接入 pMD18-T (TAKARA, 大连) 中进行测序, 测序结果表明, PCR 产物的核苷酸序列如序列表中序列 1 所示, 编码序列表中序列 2 所示的蛋白。

[0056] 2) 培育抗旱和 / 或锌含量提高的水稻

[0057] 用 EcoRI 与 BamHI 双酶切 PCR 产物, 与同样双酶切的双元表达载体 pCAMBIA2300-pUbiquitin-OCS (购自 Cambia, 澳大利亚, <http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.html>) 连接, 得重组表达载体 pCAMBIA2300-pUbiquitin-OsMT1a-OCS。

[0058] 将载体 pCAMBIA2300-pUbiquitin-OsMT1a-OCS 通过农杆菌 AGL1 (购自 ATCC (American Type Culture Collection)) 导入到水稻日本晴愈伤组织中。转化筛选方法参考如下文献: 易自力, 曹守云, 王力, 何颀洁, 储成才, 唐祚舜, 周朴华, 田文忠 (2001) 提高农杆菌转化水稻频率的研究, *遗传学报*, 28 (4): 352-358)。获得抗性筛选阳性转 OsMT1a

基因水稻 T₀ 代株系共 10 株。

[0059] 分别取营养生长同一时期的野生型日本晴 (WT) 6 株和转 OsMT1a 基因植株 (L6 和 L7 各 6 株) 叶片及收割后去掉谷壳的种子进行金属含量测定, 实验重复 3 次, 对测定结果进行统计学分析。

[0060] 测定方法如下:

[0061] 材料洗净后, 经过烘箱 80℃ 彻底干燥 24 小时后, 磨碎, 进行微波消解。每 200mg 加 9ml HNO₃、2ml H₂O₂ 在 180℃ 消解 20min, 冷却后开盖, 转移至 25mL 容量瓶中加超纯水定容, 摇匀。利用 Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) 电感耦合等离子体发射光谱 (Optima-2000DV, Perkin Elmer, USA) 进行相关重金属含量的测定。叶片及种子中金属含量的测定结果如表 1 所示。

[0062] 表 1. 叶片及种子中金属的含量

[0063]

株系		Mn	Fe	Zn	Cu
叶片	WT	382.67±41.80	76.69±2.05	13.00±0.40	5.39±0.12
	L6	463.20±37.99	77.37±4.17	18.90±0.80**	5.48±0.26
	L7	476.09±38.27	78.56±2.05	20.04±1.03**	5.82±0.15
种子	WT	16.99±0.29	6.01±0.82	9.79±0.16	2.03±0.06
	L6	20.60±1.95	6.73±0.38	14.14±0.62**	2.16±0.11
	L7	16.62±1.35	6.08±0.25	15.07±1.02**	2.28±0.11

[0064] 表 1 中金属含量的单位为 (μg/g 干重), ** 代表通过 t 检验得出转基因株系和野生型有显著性差异的置信概率为 99%。

[0065] 表 1 表明, 两个转 OsMT1a 基因株系 L6 和 L7 中, Mn 和 Zn 的积累都有所提高, 而 Zn 的提高是显著性的, 比野生型分别提高了 45.38% 和 54.15%。在种子中也有相同的趋势, Zn 的积累最为明显, L6 和 L7 分别比野生型提高 44.43% 和 53.93%。因此, OsMT1a 基因可用于提高作物中的微量元素锌的累积。

[0066] 将生长两周的野生型日本晴 (WT) 10 株和转 OsMT1a 基因 (L6 和 L7 各 10 株) 水稻幼苗转移至含有 300mM 甘露醇的 MS 培养基中培养 10 天, 观察对比表型变化, 实验重复 3 次。

[0067] 表型变化结果如图 4A 所示, 对水稻幼苗进行 300mM 甘露醇处理两周后, 可以看到野生型叶片极度卷曲、发黄、萎缩, 几近枯死; 而转 OsMT1a 基因 (L6 和 L7) 表现较好的生长状态, 叶片微卷、叶尖发黄, 主体仍颜色鲜绿。

[0068] 取在温室中于大小体积相等的花盆中生长两个月的野生型日本晴 (WT) 5 株和转 OsMT1a 基因 (L6 和 L7 各 5 株) 约 1cm 长样段迅速称取 0.5g 置于室内桌面, 室温下每隔 5-10 分钟称重一次, 直至一个小时。利用以下公式计算失水率, 实验重复 3 次:

[0069]

$$\text{失水率}(\%) = \frac{\text{初始鲜重} - \text{失水后重}}{\text{初始鲜重}} \times 100\%$$

[0070] 失水率结果如图 4B 所示, 转 OsMT1a 基因 (L6 和 L7) 的叶片一小时后失水率滞后

于野生型 3.75%。

[0071] 上述实验结果表明 OsMT1a 过表达株系比野生型具有更好的抗旱性。

[0072] 用 EcoRI 与 BamHI 双酶切 PCR 产物,与同样双酶切的 p181AINE 载体 (p181AINE 载体构建方法参照文献 Vernet, T., Dignard, D. and Thomas, D. V. (1987), A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region, Gene 52, 225-233; Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB (1992), Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. EMBO J 11:4705-4713; Daram P, Brunner S, Persson BL, Amrhein N, Bucher M. (1998), Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. Planta 206:225-233.) (中国科学院遗传与发育生物学研究所) 连接, 获得重组载体 p181AINE::OsMT1a, 将 p181AINE::OsMT1a 和 p181AINE 分别转化酵母 BY4741 (MATA his3 leu2 met15ura3) (购自 Euroscarf, 目录号 Y00000)。在 SD/Leu(-) 缺陷固体培养基上于 30℃ 生长 2-3 天, 长出的克隆为带 p181AINE-leu 标签的阳性克隆。再以 5' -GAAGATGTCTTGCAGCTGTGGAT-3' 和 5' -AGATGGTAGATGCAGGCAGGC-3' 为引物进行 PCR 扩增, 扩增出 253bp 的片段鉴定转 p181AINE::OsMT1a 阳性克隆。

[0073] 每升 SD/leu(-) 缺陷液体培养基: YNB 酵母氮源 (无氨基酸、硫酸铵) 1.7g、硫酸铵 5g、营养缺陷混合物 (Drop-out Mix) 1.4g、葡萄糖 20g、L-Trp、L-His 和 Uracil 各 20mg, 加水至 1L 灭菌。每升 SD/leu(-) 缺陷液体培养基中加入 20g 琼脂粉得到 SD/leu(-) 缺陷固体培养基。其中 YNB、Drop-out Mix、L-Trp、L-His、Uracil 均购自 sigma 公司, 货号分别为 Y1251、Y2001、T0254、H8000、U0750。

[0074] 将 p181AINE::OsMT1a 阳性克隆与空载体 p181AINE 阳性克隆于 SD/Leu- 缺陷液体培养基中 30℃ 培养到指数生长期, 然后加入 1mM ZnCl₂ 溶液, 经过 10 小时处理后收菌、干燥后进行金属含量测定, 每个样品取三次独立重复实验的测定结果并进行统计学分析。金属含量的测定结果如表 2 所示。

[0075] 表 2. 酵母中金属的含量

[0076]

金属	处理前		1 mM ZnCl ₂ 处理 10 小时后	
	p181AINE	p181AINE::OsMT1a	p181AINE	p181AINE::OsMT1a
Mn	79.03 ± 1.42	79.80 ± 5.78	50.62 ± 1.29	64.6 ± 5.21
Fe	63.26 ± 8.25	66.27 ± 4.86	49.97 ± 1.2	59.83 ± 7.15
Zn	220.67 ± 22.56	263.03 ± 48.30	777.13 ± 74.3	1876.06 ± 188.33**
Cu	5.81 ± 0.33	5.00 ± 0.21	5.28 ± 0.28	4.50 ± 0.85

[0077] 表 2 中星号 ** 代表通过 t 检验得出转基因酵母和对照有显著性差异的置信概率为 99%, 表中金属含量的单位为 (μg/g 干重)。

[0078] 表 2 的结果表明, 过量表达 OsMT1a 的酵母细胞在非 Zn 处理的普通状态下, 能够比对照多吸收 19.2% 的 Zn; 而在 1mM Zn 处理条件下, 能比对照多积累 1.4 倍的 Zn, 显著地提

高对 Zn 的吸收。OsMT1a 蛋白可能参与了水稻体内 Zn 离子的代谢过程。

[0079] 3) 转 OsMT1a 基因植株抗氧化酶活测定

[0080] 生长两周的野生型日本晴 (WT) 10 株和转 OsMT1a 基因 (L6 和 L7 各 10 株) 水稻幼苗用 1mM 双氧水处理 5 小时, 分别取 0.5g 叶片, 加入预冷的酶提取液 (100mM Tris HCl (pH7.0), 20% 甘油, 1% PVP), 研磨至匀浆; 4°C, 10000g 离心 30 分钟; 上清为粗酶提取液。

[0081] 测定 APX 时, 在上述提取液中加 1mM AsA。

[0082] CAT、APX 和 POD 活性参照 Rahnema 和 Ebrahimzadeh (2005) 的方法测定 (Rahnema H and Ebrahimzadeh H (2005), The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings, Biol Plant 49, pp. 93-97.)。CAT 活性用 $\Delta A_{240} \text{mg}^{-1} \text{proteinmin}^{-1}$ 表示; APX 活性用 $\Delta A_{265} \text{mg}^{-1} \text{proteinmin}^{-1}$ 表示; POD 活性用 $\Delta A_{530} \text{mg}^{-1} \text{proteinmin}^{-1}$ 表示。不同波长下的吸光度变化用美卡西斯 OPTIZEN-2120UV 分光光度计连续测定。蛋白质含量测定参照 (Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.) 的方法。每个样品取三次独立重复实验的测定结果, 并进行统计学分析。

[0083] 1mM 双氧水处理 5 小时前后水稻叶片内抗氧化酶 CAT、POD 和 APX 的酶活变化如图 5 所示, 说明转 OsMT1a 基因植株的 CAT, POD, APX 酶活相比野生型都有不同程度的提高; L7 的 CAT 酶活比 WT 提高 81%, POD 酶活比 WT 提高 32%, APX 酶活比 WT 提高 17%。

[0084] 上述实验结果表明, 过表达 OsMT1a 能提高体内抗氧化系统的效率。

[0085] 图 5 中星号 * 和 ** 代表通过 t 检验得出转 OsMT1a 基因株系与野生型之间存在显著性差异的置信概率分别为 95% 和 99%。

[0086] 4) OsMT1a 提高植物抗逆性的机理

[0087] 为了获得准确的耐逆性机理信息, 选取了报道已知受到干旱胁迫诱导的三个锌指转录因子 ZF1 (Accession No. AF332876)、WRKY71 (Accession No. NM_001052629) (Takatsuji, H. (1999). Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. Plant Mol. Biol. 39, 1073-1078; Segal, D. J., Stege, J. T., and Barbas, C. F., III (2003). Zinc fingers and a green thumb: manipulating gene expression in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 6, 163-168) 和 Osziz (Accession No. AK108249) (Wu, Y. R., Wang, Q. Y., Ma, Y. M., and Chu, C. C. (2005). Isolation and expression analysis of salt up-regulated ESTs in upland rice using PCR-based subtractive suppression hybridization method. Plant Sci 168, 847-853.), 比较它们在野生型与转基因水稻中的表达量差别。

[0088] 提取生长两周的野生型日本晴 (WT) 和转 OsMT1a 基因 (L6 和 L7) 水稻幼苗的总 RNA, 反转录后进行 real-time PCR 分析。

[0089] 引物分别为:

[0090] ZF1: 上游引物 5' -TTGTGAATTGCGGTGGAAGC-3';

[0091] 下游引物 5' -GGCTTCTTGAAGGCGAGGG-3'。

[0092] WRKY71: 上游引物 5' -CGAGGAGTGCAAGCCCAAGAT-3';

[0093] 下游引物 5' -AATCCTTGGTCGGCGAGAGCT-3'。

[0094] Ossiz :上游引物 5' -GCACCATGGCGAGCCGAGAG-3' ;

[0095] 下游引物 5' -AGGATCCCGGGTGCTTCTACATCACAAGC-3'。

[0096] 转 OsMT1a 基因株系中三个锌指转录因子 Ossiz、ZF1、WRKY71 的相对表达量如图 6A 所示,在 OsMT1a 过表达植株中几个锌指转录因子基因表达上调 ;CCCH 家族的 Ossiz, C2H2 家族的 ZF1, WRKY 家族的 WRKY71 分别上调了约 10 倍、5 倍和 3 倍。

[0097] 选择 Ossiz 上调最明显的 OsMT1a 过表达植株进行 Northern 杂交。以 OsMT1a 和 Ossiz 全长 cDNA 为双探针进行 Northern 杂交分析。

[0098] 图 6B 所示是 Northern 检测转 OsMT1a 基因株系中 Ossiz 的表达结果。在过表达 OsMT1a 的植株中检测到了 Ossiz 的积累。这说明 Ossiz 位于 OsMT1a 的下游。而且 Ossiz 同 OsMT1a 一样,也能受到 Zn 的诱导。

[0099] 图 6C 所示是 $10 \mu\text{M}$ Zn^{2+} 处理 0 ~ 24 小时 Ossiz 表达变化。

[0100] 上述结果表明,金属硫蛋白 OsMT1a 一方面可能通过感应 Zn 浓度变化来响应外界胁迫,通过提高体内抗氧化系统的效率来清除自由基,并提高植物的抗旱功能。此外在对外界胁迫的应答过程中,OsMT1a 能够向一些锌指的转录因子,比如 Ossiz 直接或间接地提供 Zn 离子,协同作用来传导抗逆信号,调节下游基因表达,最终提高植物抗逆性。

[0101] 序列表

[0102] <110> 中国科学院遗传与发育生物学研究所

[0103] <120> 金属硫蛋白及其编码基因与应用

[0104] <130>CGGNARW92095

[0105] <160>2

[0106] <210>1

[0107] <211>222

[0108] <212>DNA

[0109] <213> 稻属陆稻 (*Oryza glaberrima*)

[0110] <400>1

[0111] atgtcttgca gctgtggatc tagctgcagc tgcggctcaa actgctcctg cggaaagaag 60

[0112] taccctgacc tggaagagaa gagcagcagc accaaggcca ccgtcgtgct gggtgtggcg 120

[0113] ccggagaaga aggcgcagca gtttgaggcg gccgcagagt ccggcgagac cgcccatggc 180

[0114] tgcagctgcg gttccagctg caggtgcaac ctttgcaact gt 222

[0115] <210>2

[0116] <211>74

[0117] <212>PRT

[0118] <213> 稻属陆稻 (*Oryza glaberrima*)

[0119] <400>2

[0120] Met Ser Cys Ser Cys Gly Ser Ser Cys Ser Cys Gly Ser Asn Cys Ser

[0121] 1 5 10 15

[0122] Cys Gly Lys Lys Tyr Pro Asp Leu Glu Glu Lys Ser Ser Ser Thr Lys

[0123] 20 25 30

[0124] Ala Thr Val Val Leu Gly Val Ala Pro Glu Lys Lys Ala Gln Gln Phe
[0125] 35 40 45
[0126] Glu Ala Ala Ala Glu Ser Gly Glu Thr Ala His Gly Cys Ser Cys Gly
[0127] 50 55 60
[0128] Ser Ser Cys Arg Cys Asn Pro Cys Asn Cys
[0129] 65 70

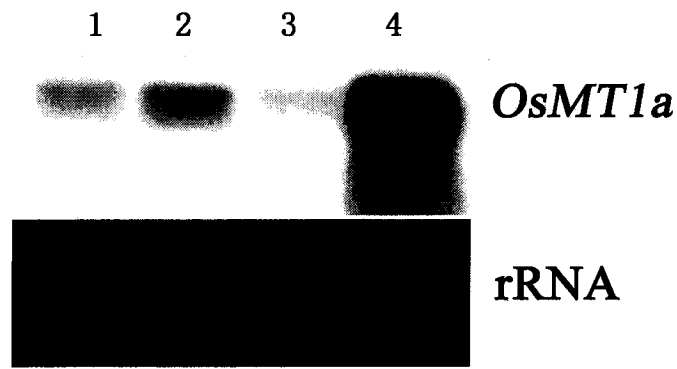
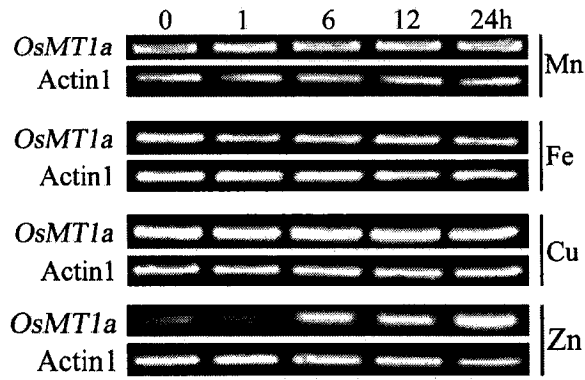


图 1

A



B

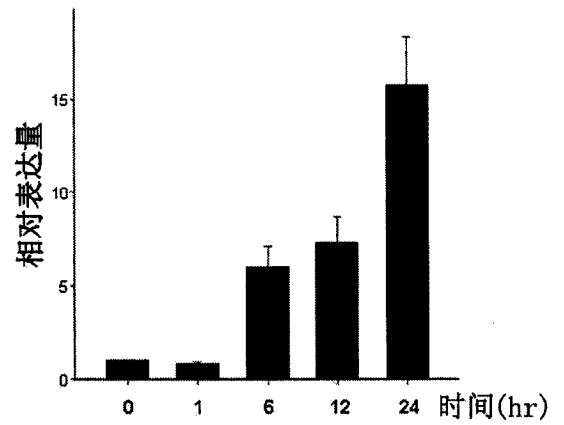


图 2

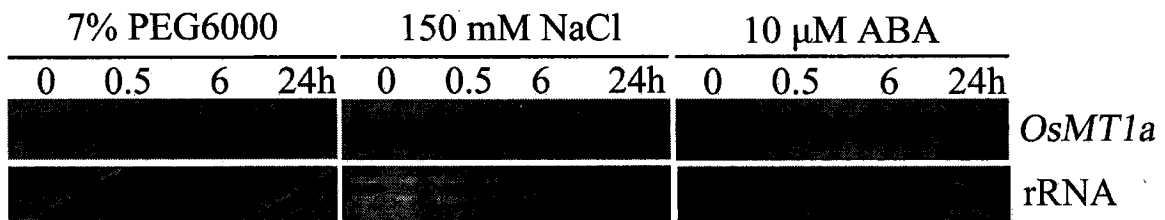


图 3

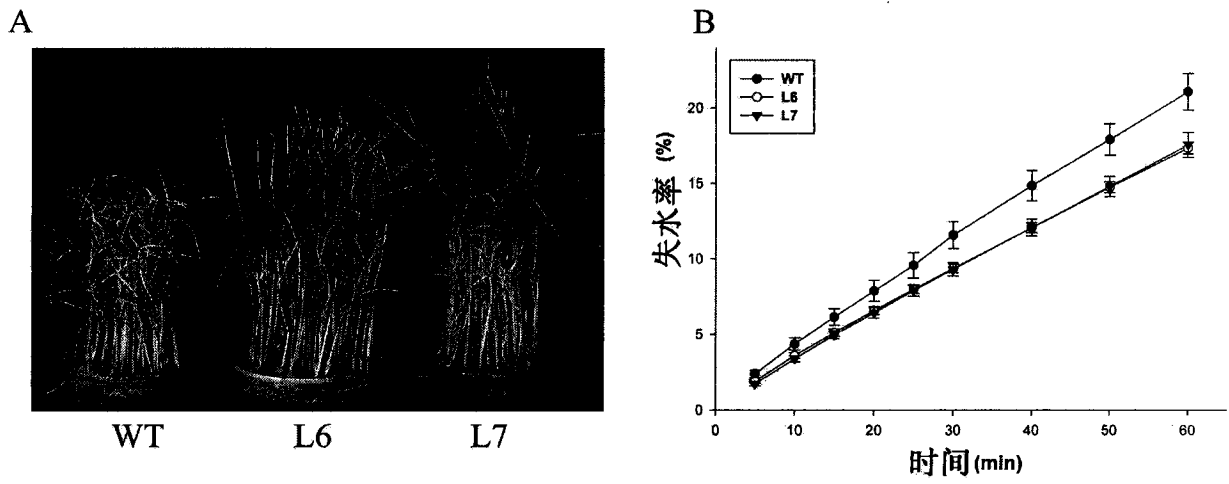


图 4

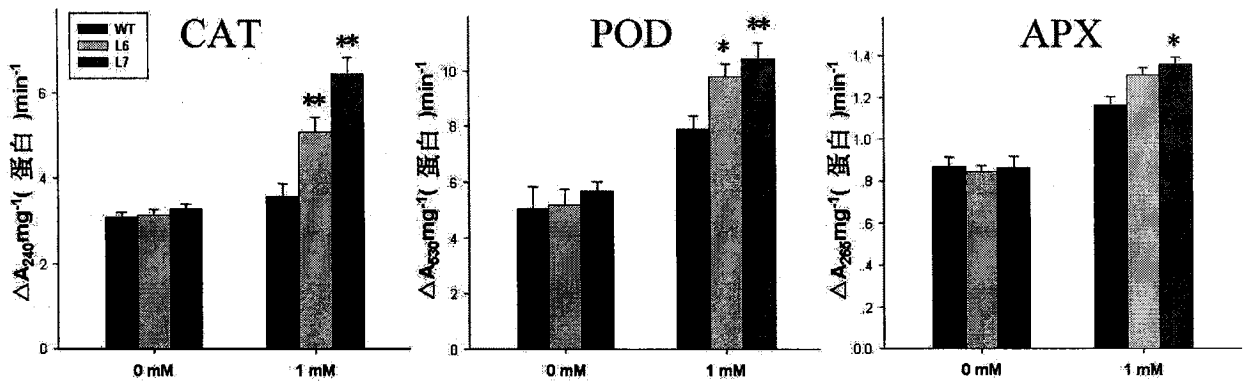


图 5

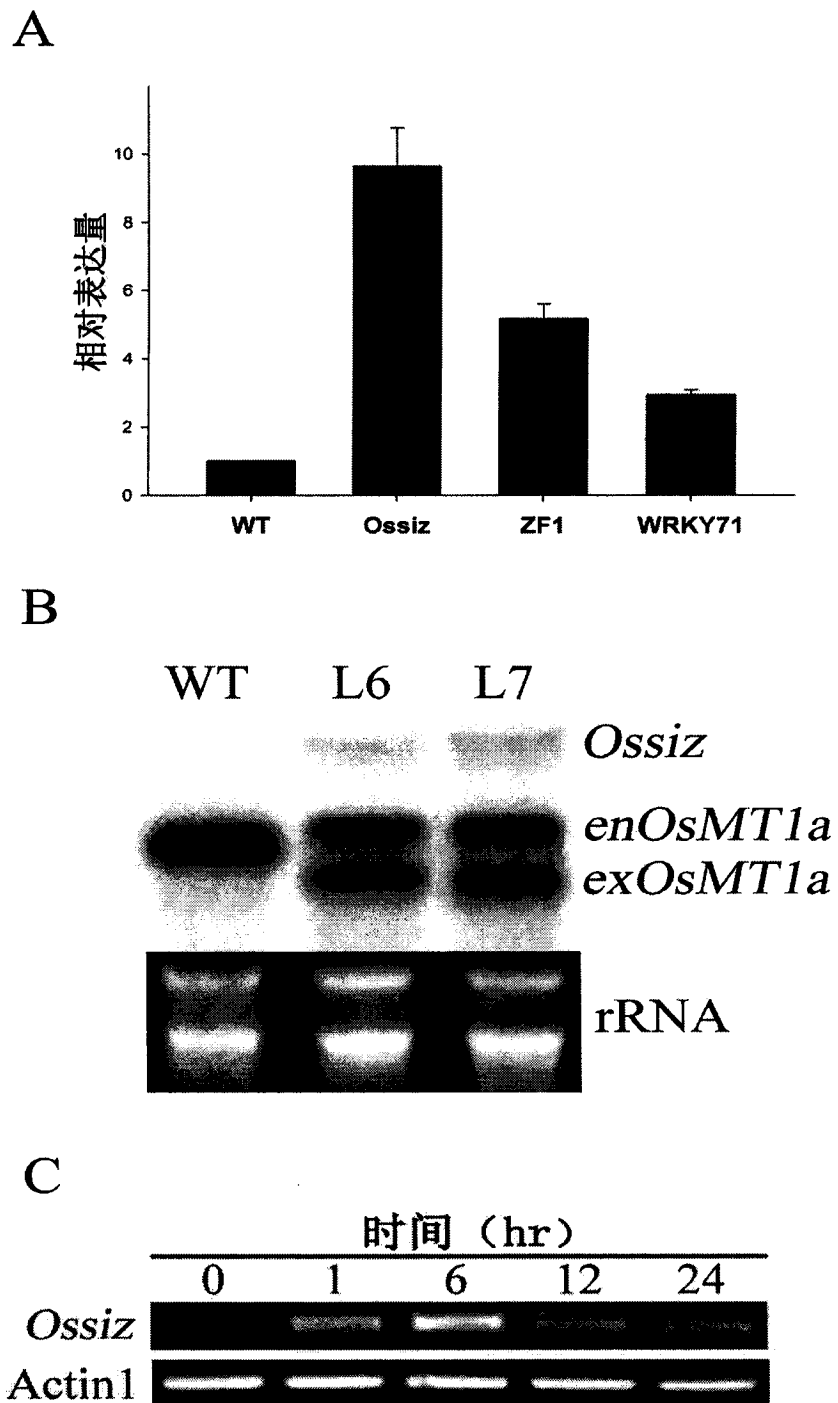


图 6