(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 116445508 B
(45)授权公告日 2024.07.30

(21)申请号 202310501773.7

(22)申请日 2023.05.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116445508 A

(43)申请公布日 2023.07.18

(73)专利权人 南京农业大学
地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇国家农业科技园南京农业大学基地

(72)发明人 赵团结 万金璐 常芳国 吕文焕 王煜

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司 32218
专利代理师 徐冬涛 李晓峰

(51)Int.Cl.
*C12N 15/29*(2006.01)
*C07K 14/415*(2006.01)
*C12N 15/84*(2006.01)
*C12N 1/21*(2006.01)
*A01H 5/00*(2018.01)
*A01H 6/54*(2018.01)
*C12R 1/01*(2006.01)

(56)对比文件
US 2012246748 A1,2012.09.27
protein DETOXIFICATION 21 [Glycine max].NCBI Reference Sequence: XP_003553362.1.2021,全文.
protein DETOXIFICATION 21 [Glycine max].NCBI Reference Sequence: XP_003553362.1.2021,全文.
路普.棉花GPCR及MATE基因家族全基因组分析和非生物胁迫功能鉴定.中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊)农业科技辑.2019,第7-10页.

审查员 赵鹏

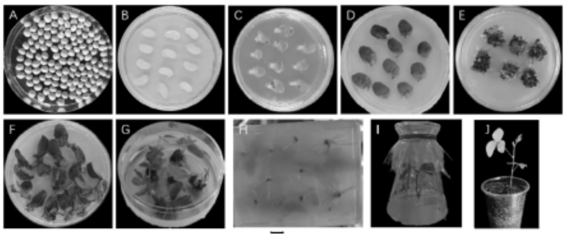
权利要求书1页 说明书10页
序列表（电子公布） 附图5页

(54)发明名称

大豆GmMATE109基因及其应用

(57)摘要

本发明公开了大豆GmMATE109基因及其应用,属于植物基因工程领域。所述大豆GmMATE109基因核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,其编码蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明构建了GmMATE109过表达载体,利用根癌农杆菌介导的遗传转化方法,将该基因转入受体大豆中并获得了稳定的过表达转基因大豆株系。在相同逆境处理下,发现该转基因大豆的耐旱性和耐盐性均比野生型大豆强,这说明大豆GmMATE109基因具有调控植物耐盐性和耐旱性的功能。本发明为培育耐逆植物品种奠定了基础,并且对于加速耐逆植物的育种进程以及提高育种效率有重要的理论意义和实践价值。




CN 116445508 B

1.核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的大豆*GmMATE109*基因、氨基酸序列如SEQ ID NO .2所示的蛋白或者含有核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的大豆*GmMATE109*基因的生物材料在提高大豆耐旱性和/或耐盐性或培育耐旱性和/或耐盐性提高的转基因大豆中的应用。

# 大豆GmMATE109基因及其应用

## 技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程、生物技术领域,尤其涉及大豆GmMATE109(Glycine max Multidrug and toxin extrusion)基因及其应用。

## 背景技术

[0002] 大豆(Glycine max L.),原产于中国,具有悠久的种植历史,在世界各地均有栽培。大豆是重要的农业产品,长期作为重要的粮食和油料作物,也是植物蛋白和油脂的主要来源,在我国国民经济中占有十分重要的地位。大豆作为我国的主要粮食和油料作物,在我国部分大豆种植区面临着盐害和干旱的威胁,高盐土壤会在一定程度上导致植物生理性干旱,从而盐害和干旱胁迫会并发出现,大豆受到盐或干旱胁迫时,其生长发育和生理生化等方面都会发生相应的变化体现在:光合作用速率降低、蛋白质油分减少,植株矮小、叶片脱水萎蔫或失绿、根系生长受到刺激、活性氧的积累,进而产生脂质过氧化作用,从而影响细胞的活性。因此通过基因工程手段,分离克隆与大豆抗逆响应相关的基因,获得具有耐旱耐盐性的转基因植株并探讨其对非生物逆境胁迫响应的调控机制,对于培育耐旱耐盐大豆新品种具有重要的研究和应用价值。

[0003] 植物在生长及适应环境的过程中会吸收很多有益或有害的物质,自身也会产生大量代谢物,植物对这些物质的转运是植物生长发育及适应环境的重要环节,有多种转运蛋白家族参与其中。最重要的次生代谢产物之一是脱落酸(ABA),这是一种植物激素,在植物生长和发育的各个方面发挥着重要作用,包括对非生物胁迫的反应。当植物暴露在干旱、盐等胁迫条件下时,ABA水平迅速增加,导致气孔关闭和各种胁迫转录因子(TF)的过度表达,以应对胁迫的发生。

[0004] 转运蛋白是生物体内物质转运的主要媒介,在植物维持自身内外环境稳定、抵御生物与非生物逆境、调节自身生长发育中扮演着重要的角色。转运蛋白对于ABA转运和反应很重要,已发现的参与植物内ABA转运的蛋白质属于多药及毒性化合物外排转运(Multidrug and toxic compound extrusion,MATE)蛋白家族,这是一个二级转运蛋白家族,具有跨膜转运底物的能力。Mate基因由非生物/生物胁迫相关元件组成,包括ABR、MBS、LTR,研究发现MATE基因可以通过参与ABA信号调控,来增强植物的抗逆性,在非生物胁迫相关反应中发挥了重要作用。在大豆的全基因组序列中,一共发现117个编码MATE转运蛋白的基因即GmMATE1-GmMATE117。这117个GmMATE基因在大豆染色体1至20上局部不均匀,检测到串联和段落重复,大多数的GmMATE基因表现出组织特异性。

[0005] 大豆Glyma.19G120300基因包含2个MATE结构域,命名为GmMATE109,本发明构建了GmMATE109(Glycine max Multidrug and toxin extrusion)的表达载体,利用基因克隆的方法克隆到GmMATE109的基因序列,以栽培大豆品种天隆一号为受体材料进行转化,获得了大豆转基因植株并对其功能进行研究,最终发现,当GmMATE109基因在受体栽培品种天隆一号中过量表达后,能够增强植物的耐旱性与耐盐性。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种大豆GmMATE109基因及其相关生物材料在调控植物耐逆性、进行基因功能验证方面的应用。

[0007] 为了实现本发明目的，首先我们根据GmMATE109基因序列及pTF101.1的酶切位点设计引物，通过同源重组技术将cDNA序列连接到pTF101.1载体上，并利用成熟的大豆遗传转化体系技术将目的基因转到受体栽培品种天隆一号中，对获得稳定的表达后代植株进行干旱和盐害胁迫等表型的鉴定。

[0008] 本发明提供了一种大豆GmMATE109基因，该大豆GmMATE109基因的核苷酸序列为如下(1)-(4)中的任意一种：

[0009] (1)如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列；

[0010] (2)由SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列经取代、缺失或添加一个或几个核苷酸而形成的具有同等功能的核苷酸序列；

[0011] (3)在严格杂交条件下与SEQ ID NO.1杂交的核苷酸序列；

[0012] (4)与(1)所述的核苷酸序列具有90％以上的同源性且具有同等功能的核苷酸序列。

[0013] 如上述大豆GmMATE109基因编码的蛋白也属于本发明的保护范围，该蛋白的氨基酸序列为如下(a)或(b)：

[0014] (a)如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列；

[0015] (b)由SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或几个氨基酸而形成的具有同等功能的序列。

[0016] 含有上述的大豆GmMATE109基因的生物材料也属于本发明的保护范围，该生物材料为表达载体、表达盒、细胞系和宿主菌中的至少一种。

[0017] 本发明还提供了上述的大豆GmMATE109基因，上述的蛋白，或者上述的生物材料在提高植物耐逆性或培育耐逆性提高的转基因植物中的应用。所述的耐逆性包括耐旱性和/或耐盐性。

[0018] 本发明还提供了一种提高植物耐逆性的方法，在目标植物中过表达上述的大豆GmMATE109基因提高植物的耐逆性。优选的，在目标植物中过表达上述的大豆GmMATE109基因的过程为：构建如上述大豆GmMATE109基因的过表达载体，通过农杆菌介导法将所述的过表达载体转入到目标植物中得到耐逆性提高的转基因植株。

[0019] 上述提高植物耐逆性方法的详细步骤如下：

[0020] (1)扩增如上述的GmMATE109基因序列，将基因序列插入到表达载体；

[0021] (2)将步骤(1)获得的载体导入到农杆菌中，利用农杆菌转入到植物中得到转基因植株；

[0022] (3)鉴定步骤(2)获得的转基因植株得到阳性植株。

[0023] 上述的表达载体为pTF101.1，但不限于此。

[0024] 上述的农杆菌为根癌农杆菌EHA105或GV3101。

[0025] 上述的方法中，所述转基因植物的耐逆性高于所述受体植物体现在如下：在逆境胁迫下，转基因植物的萎蔫程度轻于受体植物，脯氨酸含量、过氧化氢酶含量、叶片相对含水量与叶绿素含量高于受体植物，丙二醛含量与叶片相对电导率低于受体植物。

[0026] 所述的植物为单子叶植物或双子叶植物。

[0027] 可以利用多种方法实现上述GmMATE109基因的过量表达,如通过对该基因启动子进行优化以达到过表达效果、植物病毒载体介导基因过表达以及农杆菌介导的转化等方法。本发明过量表达基因的方法并不限于以上几种方法,只要能过量表达GmMATE109基因即可。

[0028] 本发明在构建GmMATE109基因的植物表达载体时,在GmMATE109的转录起始核苷酸前可以使用任何一种增强或诱导型启动子。为了方便对转基因植株进行鉴定及筛选,可对所使用的载体进行加工,如加入植物可选择性标记或具有抗性的抗生素标记物,前者包括GUS基因、萤光素酶基因等,后者包括庆大霉素、卡那霉素等。被转化的植物受体既可以是单子叶植物,也可以是双子叶植物,包括但不限于大豆、拟南芥、烟草、玉米、水稻、小麦、黄瓜、番茄、杨树等。携带有本发明GmMATE109基因的表达载体可通过使用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植物细胞或组织,并将转化的植物组织培育成植株。

[0029] 本发明所述的室温一般为25±5℃。

[0030] 本发明的有益效果:

[0031] 本发明从大豆中发现了GmMATE109蛋白及其基因,将其导入受体大豆中,得到转基因大豆株系,在相同逆境处理下转基因植物,发现该转基因植物的耐旱性与耐盐性均比野生植株强,这说明GmMATE109基因可用于调节植物抗逆性。因此本发明提供了大豆GmMATE109基因在调控植物耐旱性与耐盐性中的作用,对培育植物耐旱、耐盐性品种具有重要的理论和现实意义。并以GmMATE109为例在创制过表达材料进行快速基因功能验证的可行性和高效性方面提供了坚实的依据,在植物分子设计育种领域应用前景良好。

## 附图说明

[0032] 图1为大豆子叶节遗传转化流程图;

[0033] 其中,A:种子挑选;B:共培养期;C-D:丛生芽诱导期;E-F:丛生芽伸长期;G-H:生根期;I-J:炼苗期。

[0034] 图2为转基因大豆阳性植株的筛选、鉴定;

[0035] 其中,A:$T_3$代纯合转基因大豆的分子鉴定结果,Maker:DNAmarker;WT:NO.1;阴性对照:水;1-9:转基因植株;B:Basta筛选鉴定;C:Bar试纸条检测。

[0036] 图3为$T_3$代GmMATE109过表达纯合株系中GmMATE109的表达水平。

[0037] 图4为转GmMATE109基因大豆在干旱胁迫下的表型鉴定图;

[0038] 其中,WT为野生型大豆天隆一号,OE-15与OE-16为$T_3$代两个转基因大豆株系。

[0039] 图5为干旱胁迫下转GmMATE109基因大豆生理生化指标测定示意图;

[0040] 其中,A:叶片相对含水量;B:叶片相对电导率;C、D:分别是正常生长、干旱处理下GmMATE109各株系的色素含量;E、F、G:分别是DAB、NBT、台盼蓝染色结果;H:丙二醛含量测定;I:脯氨酸含量测定;J:过氧化氢酶含量测定。

[0041] 图6为转GmMATE109基因大豆在盐胁迫下的表型鉴定图;

[0042] 其中,WT为野生型大豆天隆一号,OE-15与OE-16为$T_3$代两个转基因大豆株系。

[0043] 图7为盐胁迫下转GmMATE109基因大豆生理生化指标测定示意图;

[0044] 其中,A:叶片相对含水量;B:叶片相对电导率;C、D:分别是正常生长、盐处理下GmMATE109各株系的色素含量;E、F、G:分别是DAB、NBT、台盼蓝染色结果;H:丙二醛含量测定;I:脯氨酸含量测定;J:过氧化氢酶含量测定。

## 具体实施方式

[0045] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0046] 若未特别指明,本发明实施例中所用的实验材料、试剂和仪器等均可市售获得,若未具体指明,实施例中所用的技术手段均为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0047] 实施例1大豆GmMATE109编码基因的cDNA克隆和植物过表达载体的构建

[0048] 1、RNA的提取

[0049] 对种植于短日照条件下真叶展开的天隆一号栽培品种进行叶片取样,大豆总RNA的提取是通过北京TIANGEN公司的RNAsimple Total RNAKit总RNA提取试剂盒(DP419)。

[0050] 为避免RNA的降解和污染,所用操作环境要无菌、佩戴口罩。具体步骤如下:

[0051] 准备工作:所用的枪头、离心管等塑料用品均经过去RNA酶处理,镊子、小药匙、小研钵等在酒精中灼烧大约30min,实验中用到的移液枪等其它用品以及实验台都用70%酒精擦拭灭菌。

[0052] (1)将50-100mg大豆组织用液氮冷冻后,放入研钵中研磨,在研磨过程中注意保持组织处于冷冻状态。研磨成粉末状后,转入2ml离心管,加入1ml RL裂解液,然后用匀浆器将组织彻底打碎;

[0053] (2)匀浆后的组织室温放置5min,然后加入200μl氯仿,振摇15s使混匀,在室温放置2-3min,4℃,12,0000rpm离心10min,样品会分层:黄色的有机相,中间相和上层无色的水相,RNA主要在水相中,把水相转移到新管中;

[0054] (3)在得到的水相中加入等体积的异丙醇,混匀,室温放置2min;

[0055] (4)将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中,12,000rpm离心40-60s,弃废液,将吸附柱CR3放回收集管中;

[0056] (5)向吸附柱CR3加入500μl去蛋白液RW1(事先加入乙醇),室温放置2min,12,000rpm离心40-60s,弃废液,将吸附柱CR3放回收集管中;

[0057] (6)向吸附柱CR3加入200μl去盐液RW2(事先加入乙醇),室温放置2min,12,000rpm离心40-60s,弃废液,将吸附柱CR3放回收集管中,然后12,000rpm离心2min;

[0058] (7)将吸附柱CR3放入一个新的1.5ml RNas-Free的离心管中,向吸附膜中间部位悬空滴加30-100μlRNas-FreeH20,室温放置2min,充分溶解;

[0059] (8)然后12,000rpm离心2min,得到RNA溶液,-70℃中保存;

[0060] (9)用Nanodrop ND-1000分析RNA浓度,用1%琼脂糖电泳或Agilent BioAnalyzer 2100进行质检。

[0061] 2、GmMATE109基因的克隆及载体构建

[0062] (1)将RNA利用反转录酶反转录出第一链cDNA,得到天隆一号的cDNA,作为PCR模板备用。

[0063] (2)根据在NCBI的大豆基因组序列中GmMATE109基因的编码序列及pTF101.1的酶

切位点设计引物,加pTF101.1载体同源臂的引物序列如下:

[0064] Primer-F:AGAACACGGGGGACTCTAGAATGGAGGGGCATCTAAAGCA

[0065] Primer-R:CCTGGGGGAGGACCTCTAGAGCTAACATATTTTCTTTGTG

[0066] (3)以天隆一号的cDNA为模板,用Primer-F和Primer-R为引物,进行PCR扩增,得到约1.5Kb的PCR产物,经过测序,该PCR产物为1488bp,其具有序列表中序列1所示的核苷酸,该核苷酸所示的基因为GmMATE109,该基因编码的蛋白命名为GmMATE109,该蛋白的氨基酸序列为序列表中的序列2。

[0067] PCR反应体系:

| | |
|---|---|
| Template | 2.0 μL |
| 2×Phanta Max Buffer | 25 μL |
| dNTP Mix（10mM） | 1.0 μL |
| Primer-F | 2.0 μL |
| Primer-R | 2.0 μL |
| Phanta Polymerase | 1.0 μL |
| $ddH_2O$ | 17.0 μL |
| Total | 50 μL |

[0068] PCR 反应程序:

| | |
|---|---|
| 95℃ | 3 min |
| 95℃ | 15 s |
| 57℃ | 15 s |
| 72℃ | 40s |
| 35 | cycles |
| 72℃ | 10 min |
| 4℃ | stop |

[0069] (4)利用同源重组的方法将上述PCR产物连接到pTF101.1上,构建名为pTF101.1-GmMATE109的重组质粒,pTF101.1载体是现有技术中已公开的载体,由中国农业科学院作物科学所刘斌研究员惠赠;将重组质粒转入大肠杆菌感受态DH5α中,利用载体上的引物序列对阳性克隆进行检测并将条带大小正确的菌液送公司测序;采用冻融法将测序正确的重组质粒导入农杆菌菌株EHA105中,利用50μg mL-1的卡那霉素和50μg mL-1的利福平进行筛选,经PCR检测大小正确的菌液与30%的甘油1:1(v:v)混合,保存于-80℃冰箱中。

[0070] 实施例2大豆GmMATE109基因的过表达株系的获得

[0071] 利用农杆菌介导的大豆遗传转化获得GmMATE109的过表达阳性植株。大豆遗传转化步骤参照Li等(2017)的方法,过程见图1,具体为:

[0072] (1)侵染液的准备

[0073] 将农杆菌菌液与含有卡那霉素和利福平的YEP液体培养基以1:1000的体积比例混

合，过夜培养至OD600为0.6-0.8，离心后向菌体中加入适量的CCM液体培养基，使菌体溶于CCM培养基，调节OD600至0.6-0.8后室温静置30分钟。

[0074] (2)种子挑选与消毒

[0075] 挑选种皮无破损、无皱缩、表面光滑且无病斑的天隆一号大豆种子，置于玻璃培养皿中，放入干燥器内，向干燥器正中间的锥形瓶内加入100mL次氯酸钠溶液。向干燥器的分液漏斗中加入15mL浓盐酸，使浓盐酸缓慢地滴入锥形瓶中，反应产生氯气对种子表面灭菌约2小时。

[0076] (3)种子的萌发

[0077] 将大豆种子种脐朝下种于萌发培养基GM中，25℃，黑暗过夜使种子充分吸胀。

[0078] (4)外植体的制备与侵染

[0079] 将大豆种子置于皿盖中，用手术刀从种子的胚根处沿着种脐将大豆的子叶与胚根一分为二，即分为2个外植体。将每个外植体的胚根切掉三分之二并去除胚芽后，将外植体侵泡在装有菌液的培养皿中，在摇床上慢摇30min。

[0080] (5)外植体与农杆菌的共培养

[0081] 用镊子去除侵染后的外植体的种皮，然后将外植体近轴面朝上置于CCM固体培养基上，25℃，暗培养5天。

[0082] (6)从生芽的诱导

[0083] 用手术刀切去伸长的胚根，留下约2-3mm。将外植体放入灭菌超纯水中浸泡30分钟，期间每隔5-10min轻轻摇晃一次罐子，共清洗2遍。接着以同样的方法用SI液体培养基清洗2遍后将外植体置于滤纸上吹干，随后以胚根朝下、近轴面朝上的方向将外植体插入SI固体培养基中，在25℃，16h光照，8h黑暗的组培间内培养2周。

[0084] (7)从生芽的伸长培养

[0085] 将外植体的子叶切掉一半，并去除表面的褐色干枯残体，切去粗壮的芽。在外植体的背部切去一小片组织后以外植体切口朝下的方向斜插入芽伸长培养基(SE)中，置于组培间内培养2周。2周后，将外植体的子叶全部切除，并轻轻刮去发黑的死芽。用手术刀在外植体的背面切出伤口后将其以切口朝下的方向斜插入新的SE固体培养基中，置于组培间内培养。每2周更换一次新的SE培养基，直至从生芽不再伸长。

[0086] (8)从生芽的生根培养

[0087] 当伸长的芽长达到4cm左右时，在超净台内用剪刀将其剪下，伤口蘸取1mg/mL的IBA溶液后移入生根培养基(RM)中，置于组培间内培养约2周后芽的底部会有主根长出，待有主根和侧根长出后便可移栽至土中。

[0088] (9)移栽与炼苗

[0089] 将长出根的组培苗从培养基中取出，清洗其根部残留的培养基后移至一次性塑料杯中。用口径一样的一次性塑料杯倒扣在苗上并固定好以保持塑料杯内的湿度。在杯子外壁看到有根长出时，将上面覆盖的塑料杯打开一个小口使组培苗慢慢适应环境，3天后将塑料杯去掉。经鉴定为阳性苗的植株转入花盆中，放到温室中培养。

[0090] 实施例2中所涉及的培养基：YEP液体培养基、GM萌发培养基、CCM液体培养基、CCM固体培养基、SI液体培养基、SI固体培养基、SE固体培养基、RM生根培养基均为本领域技术人员所公知的。

[0091] 实施例3转基因阳性株系的鉴定

[0092] 本发明所使用的大豆过表达载体中含有草铵膦抗性基因bar,因此使用草铵膦(basta,有效成分PPT)涂抹,bar试纸条检测和目的片段PCR扩增三种方法进行阳性苗的检测。

[0093] 草铵膦涂抹:用马克笔在新出的完全展开的叶片的一侧做标记,表示不做处理。在叶片的另一侧用毛笔涂抹250mg/L的Basta溶液。大约4天后观察叶片的生长状态,如果用Basta涂抹的半片叶子发黄和干枯,则这棵苗为假阳性,否则这棵苗为阳性苗。

[0094] bar试纸条检测:使用的是EnviroLogix公司生产的bar基因检测试剂盒,按照说明书进行操作。

[0095] 目的片段PCR扩增:提取转基因植株的DNA作为模板,使用35S:GmMATE109-F和35S:GmMATE109-R组成的引物对进行PCR扩增;

[0096] 35S:GmMATE109-F:CGCAGCAGGTCTCATCAAGA,

[0097] 35S:GmMATE109-R:ATCACCTGGCTCTCATTCCACACCC。

[0098] 如果PCR扩增产物中含有约905bp的DNA片段,则该PCR扩增产物对应的转基因大豆植株再次被鉴定为阳性转基因大豆植株,否则是野生型阴性植株。部分鉴定结果见图2。

[0099] 实施例4转基因阳性株系中GmMATE109的表达量分析

[0100] 在V3期取转基因株系及对照材料茎尖分生组织的RNA并反转为cDNA。将cDNA稀释10倍并以稀释液为模板进行荧光定量PCR检测。将对照材料天隆一号中GmMATE109的表达水平设为对照(值为1),使用大豆肌动蛋白编码基因GmActin为内参基因。GmMATE109表达量检测引物为qPCR-F:GTAACATGAAAAACGCAGAGGT;qPCR-R:CTTCCAAGCTCATTTGCTACTC。内参引物为Actin-F:ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC;Actin-R:GCTGGTCCTGGCTGTCTCC。每个样品进行三次生物学重复,相对表达量采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$的计算方法。采用t检验进行统计分析。实时荧光定量PCR检测结果显示,2个过表达株系中目的基因的表达量与对照差异均达到极显著水平(图3)。

[0101] 实施例5转基因植株的表型鉴定

[0102] 1、转GmMATE109基因大豆在干旱胁迫下的表型分析

[0103] 测定同期收获的$T_3$代转GmMATE109基因纯合株系及其野生型天隆一号的耐旱表型。选用相同的花盆,保证每盆的土重量相同,每盆8~10粒,25/23℃、16/8h(光照/黑暗)的温室中培养,生长2周大小,每盆保留长势一致的大豆幼苗4株可用来做处理。在大豆三叶期时,对大豆进行干旱胁迫处理。在处理的前一天,浇水控制每盆的含水量达到100%,然后开始处理第一天控水进行干旱处理,实验组不浇水,对照组正常浇水,实验组停止浇水9d,然后覆水恢复3d。每个株系同时处理30棵苗,实验重复三次,结果取平均值±标准差。

[0104] 结果显示(图4),在正常条件下,野生型和过表达植株表型无明显差异;干旱处理9d后,转基因株系植株仍能维持良好的生长状况,而野生型品种天隆一号则逐渐因为缺水出现植株萎缩的现象,叶片逐渐失绿枯黄;在覆水3d后,野生型多数植株不能恢复生长,两个过表达株系复水后基本恢复正常。

[0105] 2、转GmMATE109基因大豆在高盐胁迫下的表型分析

[0106] 测定同期收获的$T_3$代转GmMATE109基因纯合株系及其野生型天隆一号的耐盐表型。选择饱满的大豆种子播种于质量相等的蛭石基质的花盆中,每盆8~10粒,25/23℃、16/

8h(光照/黑暗)的温室中培养,生长2周大小,每盆保留长势一致的大豆幼苗4株可用来做处理。将两组材料放置于相同的实验条件下,待第一片三出复叶完全展开时,进行200mM等体积的NaCl溶液浇灌,对照组正常浇水,处理13d,每2天浇灌一次盐溶液。每个株系同时处理30棵苗,实验重复三次,结果取平均值±标准差。

[0107] 结果显示,盐处理7天时,转基因株系较野生型生长状况较好,叶片鲜绿,盐胁迫处理13天时,野生型叶片均表现明显萎蔫现象,转基因株系部分叶片出现萎蔫现象,生长状况好于野生型(图6)。

[0108] 3、$T_3$代转基因大豆胁迫处理后生理指标测定

[0109] (1)叶绿素含量测定

[0110] 选取大豆幼苗上大小相近的叶片,在容量为10ml的离心管中加入10ml按1:1体积比例配成的丙酮和无水乙醇混合提取液,取平整展开的新鲜叶片组织0.1g,剪碎后,立即置于含丙酮:乙醇体积比例为1:1的浸提液的10ml离心管中,25℃,110rpm摇床避光浸提6-8h,直至叶片发白后进行测量(勿超过12h)。以比例为1:1的丙酮和无水乙醇混合提取液作空白对照,吸取200μl上清,利用多功能酶标仪读取波长为663nm、645nm、470nm的OD值,每份样品设置三个重复,取平均值。

[0111] (2)叶片相对含水量

[0112] 分别取对照组和实验组的野生型植株和过表达株系的倒三叶的中间叶片(子叶节往上)中一片叶子测相对含水量,取出叶子放入保鲜袋中,立即称量叶片鲜重。常温下使用$ddH_2O$浸泡24小时,取出浸泡后的叶片用滤纸吸去表面水分后称量叶片饱和鲜重。迅速置于烘箱烘干至衡重,一周后至叶片重量不在改变称重并记录叶片干重值。叶片相对含水量计算公式为:叶片相对含水量=(鲜重-干重)/(饱和鲜重-干重×100%)

[0113] (3)叶片相对电导率

[0114] 采用电导仪,分别取对照组和实验组的野生型植株和过表达株系的第三片三出复叶(子叶节往上)中的一片叶子测定相对电导率。测量时,先将叶片用蒸馏水冲洗干净,并用滤纸吸干表面水分。随后将叶片剪成4个$1cm^2$大小的小方块(避开主叶脉),迅速放于50ml离心管中,然后向离心管中加入20ml蒸馏水,室温下浸泡24h摇匀后用电导仪测量每个样品叶片浸提液的电导率R1。然后将离心管置于沸水浴中加热45min,冷却至室温摇匀,再次测定浸提液的电导率R2。叶片相对电导率计算公式为:REC(%)=(R1/R2)×100%

[0115] (4)脯氨酸含量测定

[0116] 采用南京建成生物有限公司的脯氨酸测试盒检测野生型和转基因大豆在处理前后脯氨酸含量的变化,具体操作步骤见试剂盒。

[0117] (5)丙二醛含量测定

[0118] 采用南京建成生物有限公司的丙二醛测试盒检测野生型和转基因大豆在处理前后丙二醛含量的变化,具体操作步骤见试剂盒。

[0119] (6)过氧化氢酶含量测定

[0120] 采用南京建成生物有限公司的过氧化氢酶测试盒检测野生型和转基因大豆在处理前后过氧化氢酶含量的变化,具体操作步骤见试剂盒。

[0121] (7)台盼蓝、DAB,NBT染色

[0122] 台盼蓝:选取处理前后大豆幼苗上大小相近的叶片,选取的叶片分别放入终浓度

为0.4%的台盼蓝工作液中避光静置放置12h,接下来将染色的叶片完全浸入乙酸、100%乙醇混合液(3:1),95℃水浴30min,每10min上下颠倒一次脱色液,以便叶片脱色完全。最后将脱色完全的叶片进行拍照记录,每个处理重复三次实验。

[0123] DAB与NBT染色:选取处理前后大豆植幼苗上大小相近的叶片,染色液按照DAB与NBT底物染色试剂盒说明进行配制,此时将选取的叶片浸入DAB与NBT染色液中12h,接下来将染色的叶片完全浸入甘油:100%酒精混合液(3:7,v:v),95℃水浴30min,每10min上下颠倒一次脱色液,以便叶片脱色完全。最后将脱色完全的叶片进行拍照记录,每个处理重复三次实验。

[0124] 结果表明(图5和图7),在干旱胁迫和盐胁迫处理后,转基因株系比野生型植株的叶片相对含水量下降幅度低,且转基因株系的叶片相对电导率显著低于野生型,叶绿素含量显著高于野生型。观察大豆幼苗受到干旱胁迫和盐胁迫后的叶片染色情况,在干旱和盐胁迫处理下,相比于野生型大豆幼苗,转基因株系大豆幼苗叶片染色程度更低。同时检测了转基因株系和野生型的脯氨酸(Pro)、丙二醛(MDA)含量,过氧化氢酶(CAT)含量。结果由图所示,在干旱胁迫和盐胁迫处理后,Pro和CAT含量在转基因株系中显著高于野生型,野生型中MDA含量均高于转基因株系。

[0125] 上述过表达GmMATE109转基因大豆植株脯氨酸含量、MDA含量和CAT含量的测定结果表明,同野生型大豆植株相比,过表达GmMATE109转基因大豆植株的耐旱性和耐盐性显著提高。本发明运用分子生物学及基因工程技术的验证,首次证明蛋白质GmMATE109及其编码基因可用来调控植物抗逆性,尤其是提高植物耐旱性、耐盐性。这为分子设计育种提供了一个完善的思路,对作物品种的改良具有很好的实践意义。

[0126] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

[0127] SEQ ID NO.1

[0128] ATGGAGGGGCATCTAAAGCAGAAGCTGTTGAGAAACAAAGAGAGAAGAACATCATCAGAGCAAGAAGAAGAGGAGCTATCATTAGTGAAGAGGGTGTGGAATGAGAGCCAGGTGATGTGGATAGTGGCGGCACCAGCCATATTCACTAGGTTCTCCACCTTCGGAATCAGTGTCATAAGCCAAGCCTTTGTTGGCCATATTGGCTCTAAGGAATTGGCTGCATATGCTCTCGTTTTCACCGTTCTCGTTAGGTTCGCCAATGGTGTTCTCTTAGGAATGGCGAGTGCGTTGTCAACACTTTGTGGACAAGCATATGGTGCAAAAGAATATGGCATGATGGGAGTGTATCTTCAAAGATCATGGATAGTTTTGTTCCTAACTGCAGTCTGTCTTCTTCCGGTGTTCATCTTCACAAGCCCAATTTTGATGCTCTTGGGCCAAGATGAGAGCATAGCACAAGTGGCAGGAAACATTGCTCTTTGGTCAATTCCTGTCATGTTTGCCTCCATTGTCTCGTTCACTTGTCAGACATTCCTTCAATCTCAAAGCAAGAATGTCATCATTGCGTTCTTGGCAGCATTTTCGATAGTCATTCACGTGTTTCTATCGTGGCTTTTGACAATGAAGTTCCAGTTTGGGATTCCTGGTGCAATGATTTCAGCAGGCTTGGCATACTGGATTCCCAACATTGGTCAACTCATATTT

[0129] GTCACCTGTGGTTGGTGTTCTGATACATGGGAAGGTTTCTCATTTTTGGCATTCAAAGA

[0130] CCTCTGGCCTGTTGTCAAGATGTCCCTTTCAGCTGGTGCTATGTTATGTCTTGAGCTCTG

[0131] GTACAACACAATATTGGTTCTTTTGACTGGTAACATGAAAAACGCAGAGGTTGAAATT

[0132] GATGCTCTATCCATATGTCTCAACATCAATGGATGGGAAATGATGATATCACTTGGTTT

[0133] CATGGCTGCAGCAAGTGTTCGAGTAGCAAATGAGCTTGGAAGAGGAAGTGCCAAAGCT

[0134] GCAAAGTTCTCTATTATTGTGTCAGTGCTCACATCATTGGCCATTGGATTCCTTCTGTTC

[0135] TTATTCTTCTTATTTTTAGAGAAAGACTTGCATATATATTTACCTCAAATAAAGATGTG

[0136] GCCTTTGCTGTTGGGGATTTGTCACCTTTGTTATCAGTCTCTATATTACTAAACAGTGTT

[0137] CAACCTGTACTCTCAGGAGTGGCTATAGGAGCAGGGTGGCAAAGCATTGTAGCATATG

[0138] TGAATATGGGGTGTTATTACGCCATTGGTATTCCTGTAGGTATTGTACTTGGCAACGTT

[0139] CTCGATTTGCAAGTCAAGGGAATATGGATTGGAATGTTGTTTGGAACGTTGATTCAAAC

[0140] TATAGTGCTAATTGTAATCACCTATAAAACTAATTGGGATGAGCAGGTTACCATTGCTC

[0141] AGAAGCGTATTAGCAGGTGGTCGAAGGTGGACAATGCTGATCAAGAAAATGAAGCAC

[0142] AAAGAAAATATGTTAGCTAA

[0143] SEQ ID NO.2

[0144] MEGHLKQKLLRNKERRTSSEQEEEELSLVKRVWNESQVMWIVAAPAIFTRFSTFGISVISQA

[0145] FVGHIGSKELAAYALVFTVLVRFANGVLLGMASALSTLCGQAYGAKEYGMMGVYLQRS

[0146] WIVLFLTAVCLLPVFIFTSPILMLLGQDESIAQVAGNIALWSIPVMFASIVSFTCQTFLQSQSK

[0147] NVIIAFLAAFSIVIHVFLSWLLTMKFQFGIPGAMISAGLAYWIPNIGQLIFVTCGWCSDTWEG

[0148] FSFLAFKDLWPVVKMSLSAGAMLCLELWYNTILVLLTGNMKNAEVEIDALSICLNINGWE

[0149] MMISLGFMAAASVRVANELGRGSAKAAKFSIIVSVLTSLAIGFLLFLFFLFFRERLAYIFTSN

[0150] KDVAFAVGDLSPLLSVSILLNSVQPVLSGVAIGAGWQSIVAYVNMGCYYAIGIPVGIVLGN

[0151] VLDLQVKGIWIGMLFGTLIQTIVLIVITYKTNWDEQVTIAQKRISRWSKVDNADQENEAQRKYVS*

[0152] 参考文献

[0153] 1.Li,S.,Cong,Y.,Liu,Y.,Wang,T.,Shuai,Q.,Chen,N.,et al.(2017).Optimization of Agrobacterium-Mediated Transformation in Soybean.Frontiers in Plant Science 8.doi:10.3389/fpls.2017.00246.

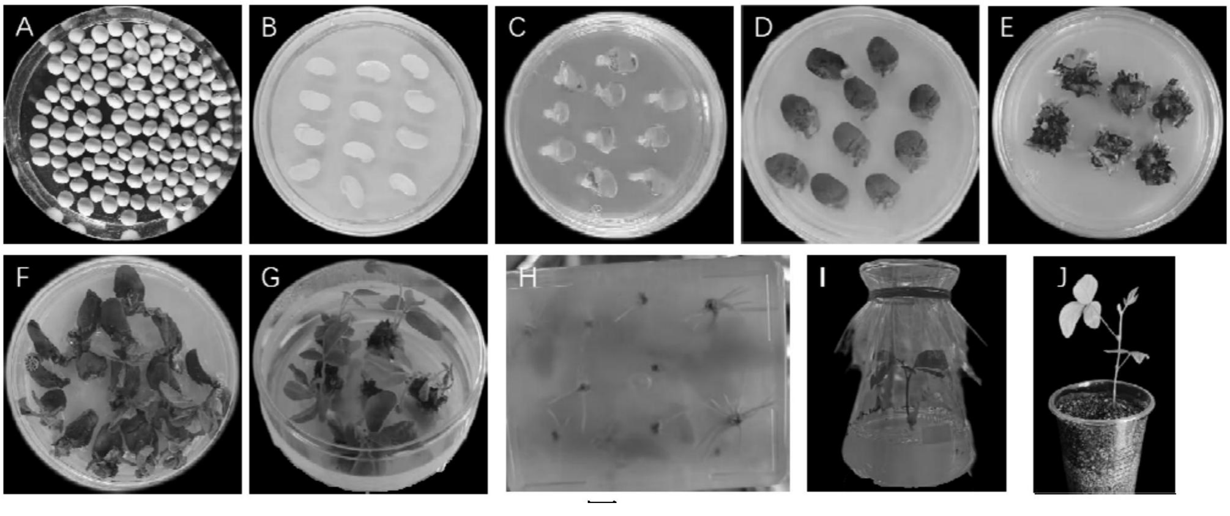

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J

图1

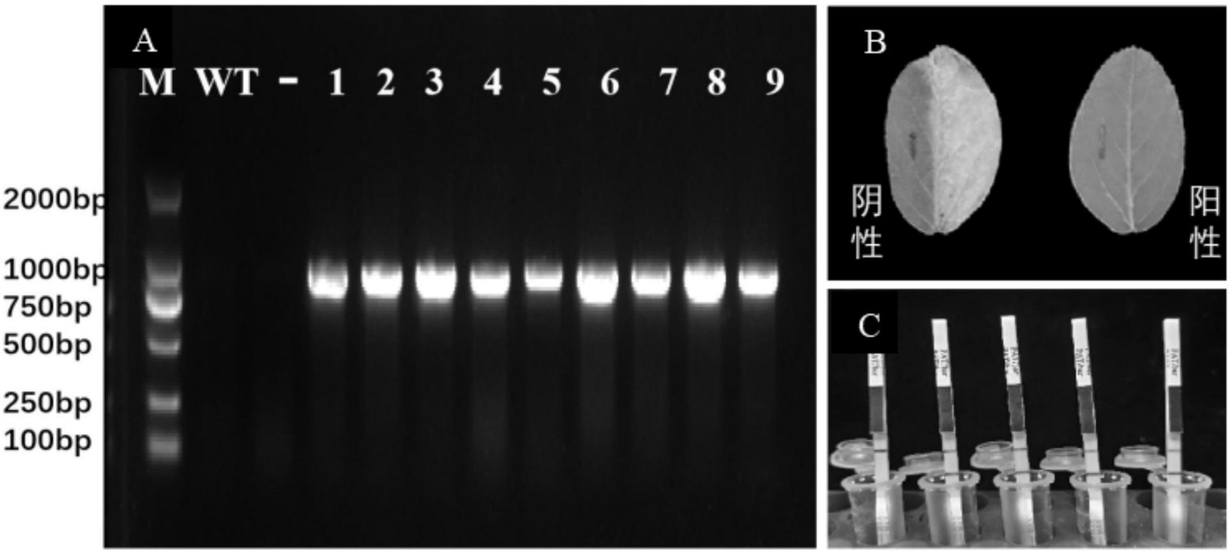

A
M WT - 1 2 3 4 5 6 7 8 9
2000bp
1000bp
750bp
500bp
250bp
100bp
B
阴性
阳性
C

图2

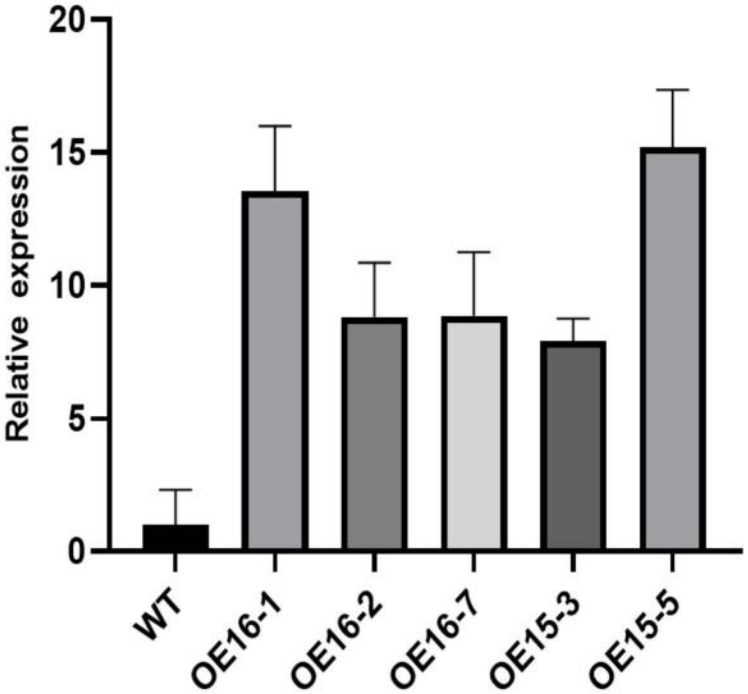

Relative expression
0
5
10
15
20
WT
OE16-1
OE16-2
OE16-7
OE15-3
OE15-5

图3

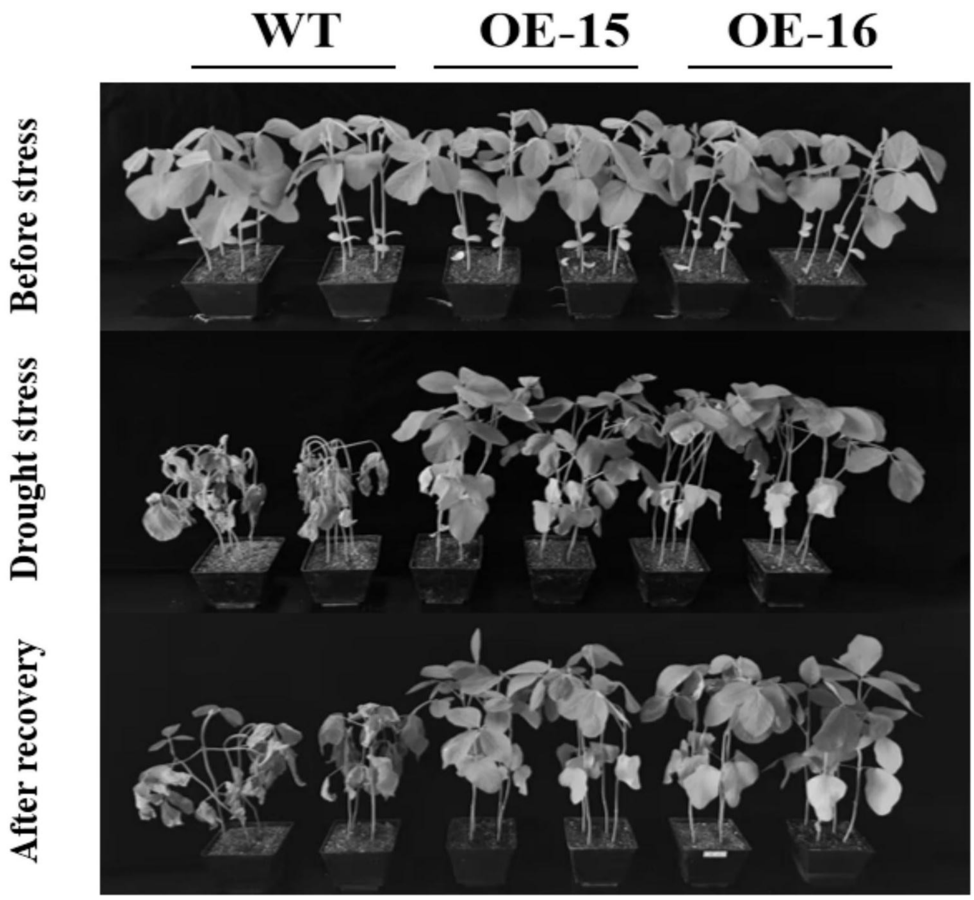

WT
OE-15
OE-16
Before stress
Drought stress
After recovery

图4

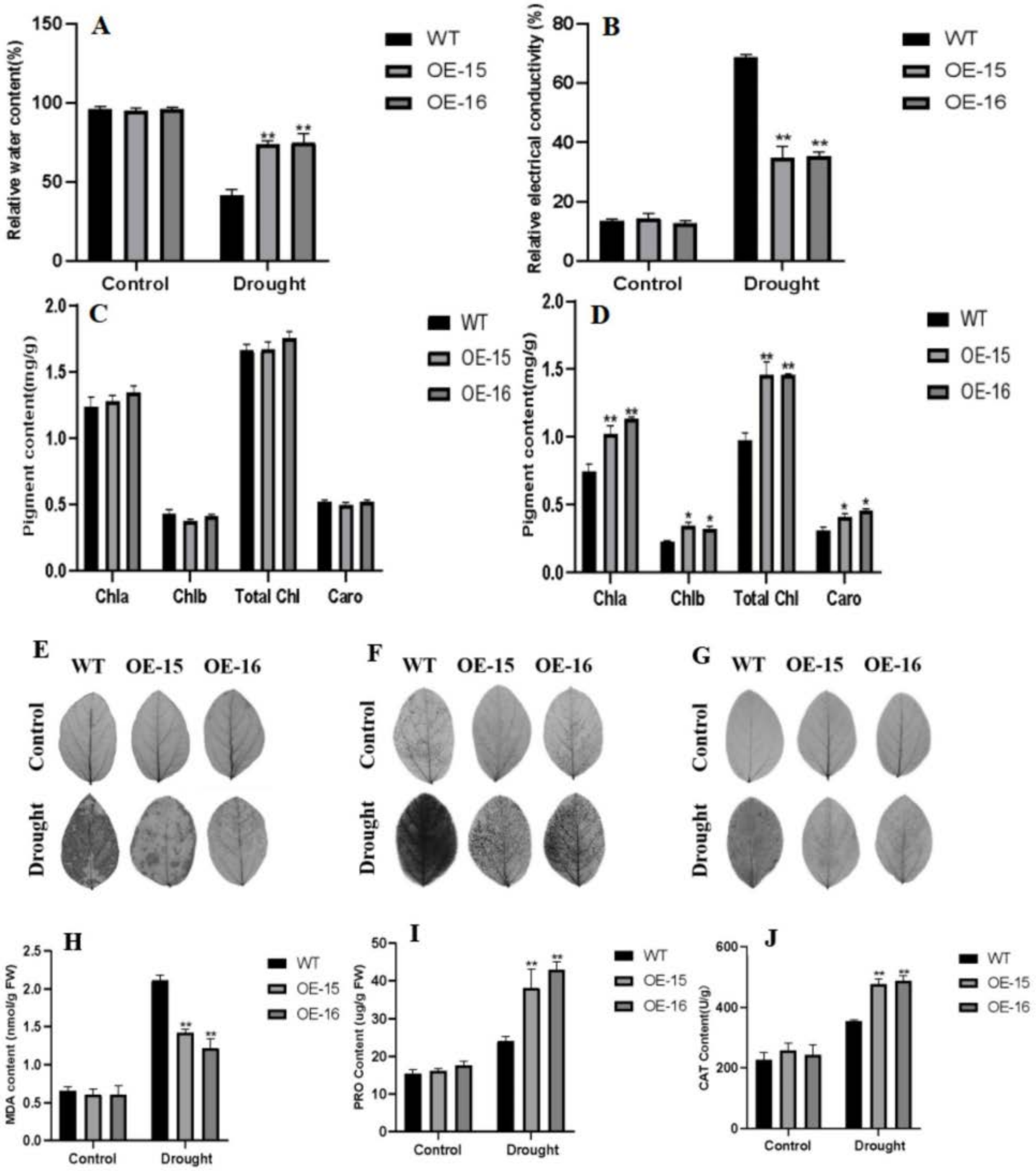

A
Relative water content(%)
150
100
50
0
Control
Drought
WT
OE-15
OE-16
**
B
Relative electrical conductivity (%)
80
60
40
20
0
Control
Drought
WT
OE-15
OE-16
**
C
Pigment content(mg/g)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Chla
Chlb
Total Chl
Caro
WT
OE-15
OE-16
D
Pigment content(mg/g)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Chla
Chlb
Total Chl
Caro
WT
OE-15
OE-16
**
*
E
WT
OE-15
OE-16
Control
Drought
F
WT
OE-15
OE-16
Control
Drought
G
WT
OE-15
OE-16
Control
Drought
H
MDA content (nmol/g FW)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
Drought
WT
OE-15
OE-16
**
I
PRO Content (ug/g FW)
50
40
30
20
10
0
Control
Drought
WT
OE-15
OE-16
**
J
CAT Content(U/g)
600
400
200
0
Control
Drought
WT
OE-15
OE-16
**

图5

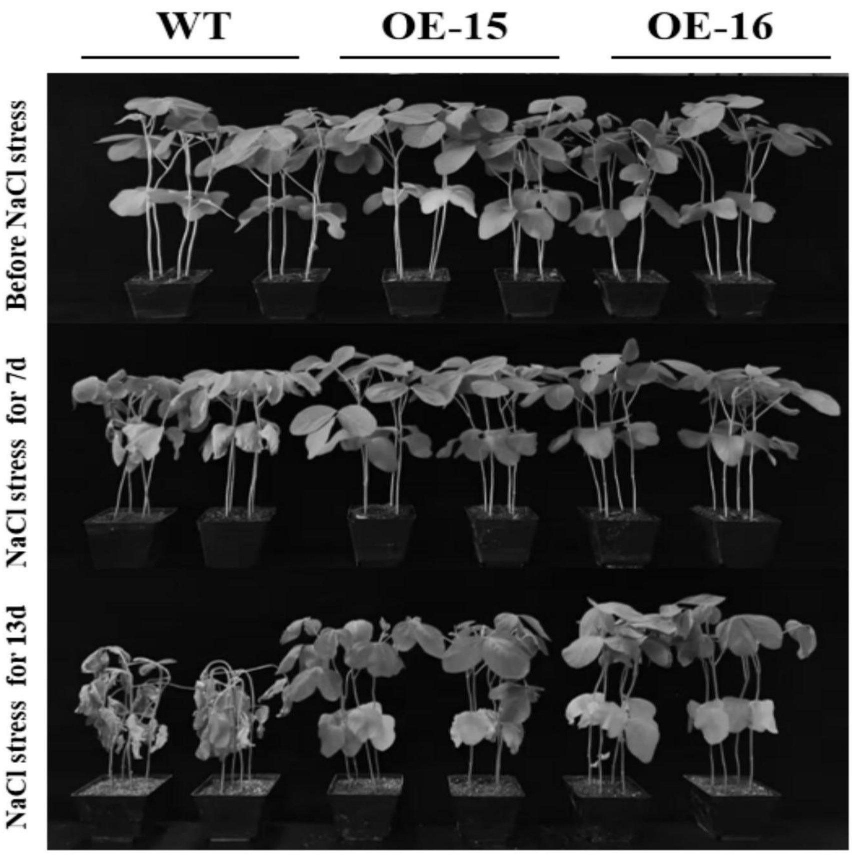
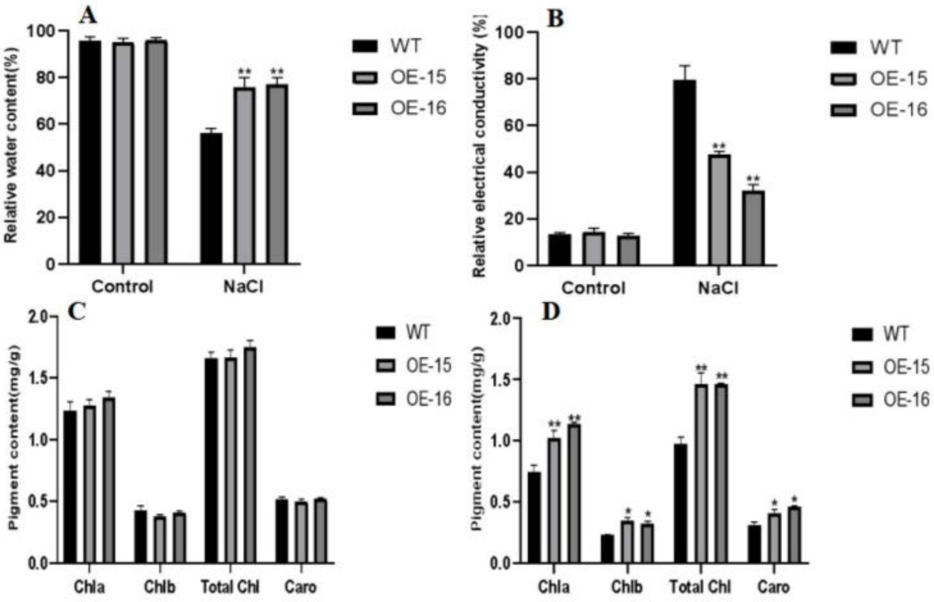

WT
OE-15
OE-16
Before NaCl stress
NaCl stress for 7d
NaCl stress for 13d

图6


A
Relative water content(%)
Control
NaCl
WT
OE-15
OE-16
B
Relative electrical conductivity (%)
C
Pigment content(mg/g)
Chla
Chlb
Total Chl
Caro
D

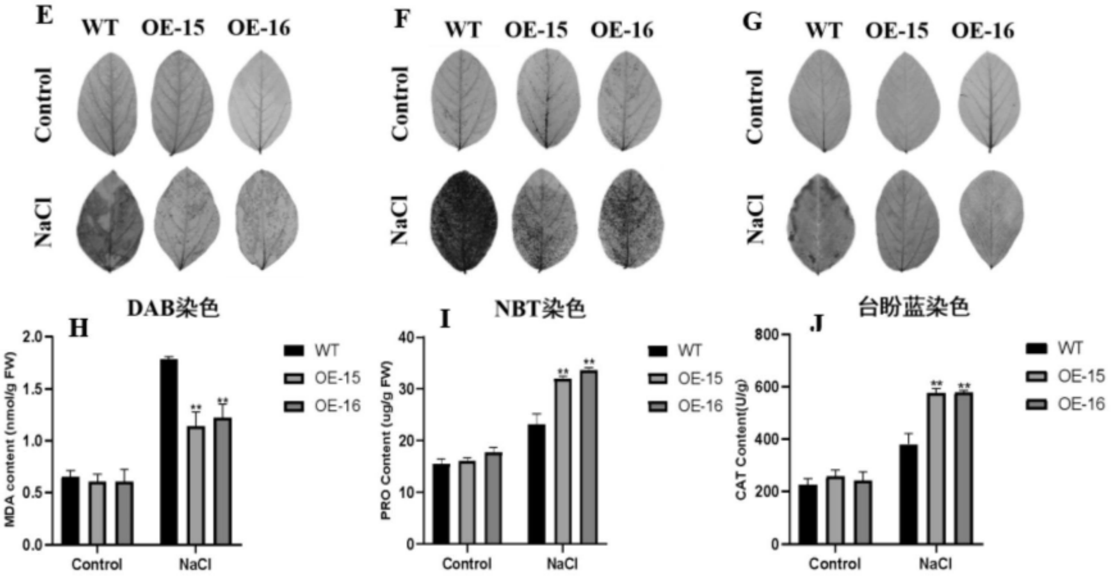

E
WT OE-15 OE-16
Control
NaCl
DAB染色
F
WT OE-15 OE-16
Control
NaCl
NBT染色
G
WT OE-15 OE-16
Control
NaCl
台盼蓝染色
H
MDA content (nmol/g FW)
Control
NaCl
WT
OE-15
OE-16
I
PRO Content (ug/g FW)
Control
NaCl
WT
OE-15
OE-16
J
CAT Content(U/g)
Control
NaCl
WT
OE-15
OE-16

图7