



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103031303 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201210428205. 0

(22) 申请日 2012. 10. 31

(73) 专利权人 安徽省农业科学院水稻研究所
地址 230031 安徽省合肥市农科南路 40 号

(72) 发明人 杨剑波 魏鹏程 李娟 张银萍
李浩 宋丰顺 倪大虎 李莉
杨亚春

(74) 专利代理机构 北京律谱知识产权代理事务
所(普通合伙) 11457

代理人 黄云铎 王庆海

(56) 对比文件

WO 03079769 A1, 2003. 10. 02, 全文.

CN 101113453 A, 2008. 01. 30, 全文.

CN 101265472 A, 2008. 09. 17, 全文.

卢碧霞等. 水稻 rbcS 启动子的克隆及其在转基因水稻中的特异性表达. 《西北农林科技大学学报(自然科学版)》. 2007, 第 35 卷(第 01 期), 96-100, 105.

审查员 奚静

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010. 01)

C12N 15/84(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

A01H 5/00(2006. 01)

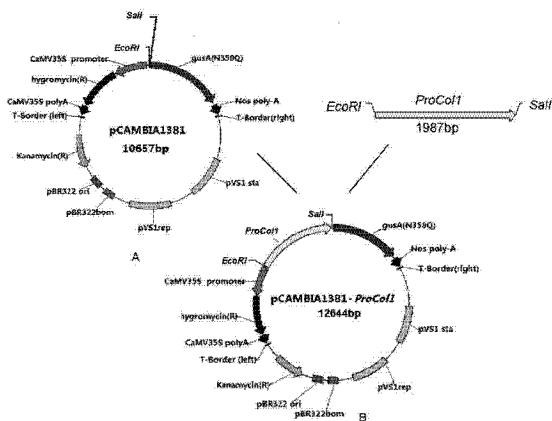
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种植物叶枕特异表达启动子 ProCol1 的鉴定和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种植物叶枕特异表达启动子 ProCol1 的鉴定和应用, 涉及植物基因工程领域, 特别是涉及一种水稻叶枕特异性表达的启动子, 含有该启动子的植物表达载体和转化子, 本发明还涉及上述启动子在植物转基因工程中的应用。发明人将含有该启动子 DNA 序列和 GUS 基因的植物表达载体经农杆菌介导的遗传转化方法, 获得转基因植株, 经染色鉴定, GUS 基因仅在水稻叶枕处特异表达, 因此推测本发明提供的启动子能够驱动外源基因在植物叶枕中特异表达, 可应用于定向改良作物农业性状, 提高作物产量, 培育高效高安全性的转基因植物新品种, 使用方便, 环境友好。



CN 103031303 B

1. 一种植物叶枕特异性表达启动子 ProCol1, 其特征在于, 其核苷酸序列如下所示:

-1938 TGC GGAAAAC GAGACAATCA CCCCTATCTC CCCTGATAGA ACGCAAACGG AGGAAAATACA
-1878 TAAGAATCCA TTCCATTGTA GATGAAAGGAC ATCACCAGAT CCATTGAGGA TGAAGGACAT
-1818 CACATGTTAG CACCTAATAA ACTCTTCATG GCAACACTTA CTACAACCAC AGCTTATGAG
-1758 GCCTGGCCAC TCCATAAGCT TCTTCATTTT ATTTAATTGC AGCTGCGTTT GTTAACATCA
-1698 CTTCTTTATC GCATCACAGC TTTGTCTCAA CATGCATGCA TGCATCCTTG TCACACTCAC
-1638 CATGCCACAT GCAAACCAAA TGAAAACGAT GGGTTAAGCT CACAGTAAAA TCAAAGTGCT
-1578 GCTTGTACAT ACACCTTTAA TATTGTACTA TCGGCCAAAA ATATATACTC TTTGTCTTAA
-1518 ATTAAAGCTA TTTTACCAC TTAAGTTATT TTAATATAAA GCTATTTCTC TACCTACTTA
-1458 CTTTATTTCA ACCAATCATA ACAACTCTTC ATTTAATTTT TTCACGTACT TTATCTCCCT
-1398 AAGTAATTAT AACATATATT CTTTCAATTA TTTTCACCTA GTTTTTATTT CATGTGAAAA
-1338 TTTTCATGAA TGCTTACATT TTGGGACGAG AGAATATTAG CTAGTATTGF CTTTTTTAAG
-1278 AGGATTTATG AAATTTTCAT AAAAAACATTG TTCCATATTT TTTCAATTAA AAGGGAAGAA
-1218 AATTTAGATA TTTCCAAAAA GGTATACATC AGATAAATTT GGTCCATGTT TCATTATAAA
-1158 AATTGATATC CTA CTCACAT ATATTTAATT TATCACATCT ACTATATGCA CTATAAAAAAT
-1098 TAACCAATTG TAGAAAATCT CAAGTTTATA AAATAGTACT CTAAAAATA GATCCAACCG
-1038 TACGATGATC ATCAATGGAA TTAGATAAAA CATGATTACA TATTCATCGT TTCTCGCCGT
-978 TCACACGTTT AGTCACAAGC CCGGACGTGA TTTAAAATTT CTCTTCACTG GTTAGTTCTT
-918 TTTTACTAC ACTTTTTTAG TGATTTTTTA TATGTTGGAT TAGAGGGAGA AAGGAAGGAA
-858 AATAACTATG CTTTTTAACA TATACTCACT TCGGTTTCAT AATTCTTATC ATTTGGATA
-798 ATGACATGGT TTTCAAATA TATCTTGAC TGTATTTTTT TATTGTAATA TATCTTTGAC
-738 TGTATTTTTT TATTGTAATA CAGTTATACT TTAAGTGTAG TACTCCCTC ATCTACTTTT
-678 TGATAGTCAT ATTTCATATT GGCACACAGA CCAAGGATAA GTAATTCATC ATCTATTTAA
-618 ACATGCTACT AGTCATTCCT CGTAAACAAG CGATTCATTA ATATTTACAT TTTTAAATAC
-558 CCATGTAGCC AATCATGTGT GGAAGAATGG AGAGTCACAC ATTAAATCCG AGAAAGTCAT
-498 TAAGATGATA GGTGTTGGA TTGAAATATG CCTATCAAAA ATAAATTTT CAGATTTGGA
-438 AATATGACTA TCAAAAATAG ATGGAGGAAA TACTTTGTAA GACAAGTCTA TATATTGTTC

-378 TAGTGACTTT AAAC TAAATA TTTTAAAAGT TATTAATAGT TAAAGTTATA AAAGTTTGAC
-318 CTTAATCTAC AGTAGAAGGC CACACGCCCA CACAGGCCAC ATCCCTCCTG TGGCTGCTGT
-258 TCATCCGACC ACACGGGATC CCACCTCCTC CACCGATCCC GTTCCGTTGA CTCCTGTTCCC
-198 GTCCCGCCCC GCCCCCACTC ATCTCCACTA ATCCCCTTCG CTAATCACCT CTGACTCCCT
-138 CTAATCCACC ATTTTAATTA AACCCCAATA ATTAACAAAC GCCTCACTCT CTTAATCCGC
-78 ATTAATTAAT TGATTAATAA AATCTAATCA CTCTCGCTAT CCCGTTCTAA TCCTAACCCC
-18 ACCCGTGTCT CCTACCTCAT CGACGGTATA AAGCGAGGCG ACGAACTGAC TCGACTCAAC
TCAACCC +49。

2. 根据权利要求 1 所述的植物叶枕特异性表达启动子 ProCol1, 其特征在于, 所述植物叶枕特异性表达启动子 ProCol1 包含于植物表达载体 pCAMBIA1381-ProCol1 中。

3. 根据权利要求 2 所述的植物叶枕特异性表达启动子 ProCol1, 其特征在于, 所述植物表达载体 pCAMBIA1381-ProCol1 及其宿主包含于转化子中。

4. 根据权利要求 3 所述的植物叶枕特异性表达启动子 ProCol1, 其特征在于, 所述的转化子为细胞系, 愈伤组织或转基因植株。

5. 根据权利要求 3 所述的植物叶枕特异性表达启动子 ProCol1, 其特征在于, 所述的宿主为根癌农杆菌。

一种植物叶枕特异表达启动子 *ProCol1* 的鉴定和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及植物基因工程领域,特别涉及一种植物叶枕特异性表达启动子,含有该启动子的植物表达载体,以及该启动子的转化子,本发明还涉及上述启动子在植物转基因工程中的应用。

背景技术

[0002] 启动子是 RNA 聚合酶能够识别并与之结合,从而起始基因转录的一段 DNA 序列,通常位于基因上游。一个典型的启动子包括 CAAT-box 和 TATA-box,它们分别是依赖 DNA 的 RNA 聚合酶的识别和结合位点,一般位于转录起始位点上游几十个碱基处,在核心启动子上游通常会有一些特殊的 DNA 序列,即顺式作用元件,转录因子与之结合从而激活或抑制基因的转录,一旦 RNA 聚合酶定位并结合在启动子上即可启动基因转录,因此启动子是基因表达调控的重要元件,它基本上决定一个基因是否表达、何时表达和何处表达。它与 RNA 聚合酶及其他蛋白辅助因子等反式作用因子的相互作用是启动子调控基因转录的实质。

[0003] 根据启动子的转录模式可将其分为 3 类:组成型启动子、组织或器官特异性启动子和诱导型启动子。最早广泛使用的生物转基因启动子是一些组成型启动子,如来源于 CaMV 的 35S 启动子、玉米 Ubiquitin 启动子和水稻的 Actin1 启动子。这类启动子的特点是在所有的组织中都启动基因表达。诱导型启动子能使基因对特定信号刺激(包括物理因素、化学因素和生物因素)做出响应,在没有诱导因子存在的条件下不表达或者只有非常低的表达,但一旦受到诱导因子的诱导,基因的表达量迅速并且大幅度增加。组织特异性启动子调控基因只在某些特定器官、组织或细胞中表达,研究较多的有根特异启动子、叶特异启动子、花特异启动子、种子特异性启动子等。在植物转基因工程中,大部分采用的是组成型启动子,由于这类启动子在所有的组织中都启动基因表达,具有持续性,不表现时空特异性,所以难以达到定向改造植物性状的目的,而且组成型启动子在时空上是持续表达,也造成植物成长资源的浪费。在生物转基因安全方面,组成型启动子的高表达量、强启动效应、对生物种类和组织的不加选择,以及其来源的不安全性,使采用该类启动子的转基因生物容易成为基因漂移、外源基因泛滥表达的源头,使人们非常担心转基因植物的安全性问题。因此,在基因工程中,定向、安全地改良植物某些性状的先决条件是提供基因特异性表达的启动子,构建高效表达的表达载体,使靶标基因精确地在目的组织内按需表达。

[0004] 水稻是世界上最重要的粮食作物之一,如何提高水稻产量一直是一个难以攻关的重要难题。水稻叶张角是影响产量的重要农艺性状,直立的叶片可显著提高植株密植度,提高单位土地面积上的净光合速率;同时增加光能吸收效率和氮营养储存,有利于籽粒灌浆,进而增加产量,因此培育叶角较小的品种是水稻育种学的一个重要目标。叶枕位于叶鞘与叶片交界处,具有调节叶片开张角度的作用,俗称叶关节,叶枕上着生一对爪状的叶耳,粗糙的绒毛覆盖在叶耳表面,紧挨着叶耳上面是一对直立薄片呈膜状的叶舌。叶枕的结构是维持水稻叶张角的重要因素之一,因此是水稻重要的功能组织。

[0005] 水稻叶枕发育是一个由多种激素(生长素,油菜素内酯等)的合成和信号途径

协同调控的近轴面和远轴面细胞分裂和延伸的平衡的过程叶枕发育的初期远轴面早于近轴面,但随着时间的推移,远轴面发育加快,导致叶倾角的增大。Jing Ling *et al* 研究发现基因 *ILAI* (Increased Leaf Angle1, a Raf-Like MAPKKK) 介导的信号途径调控叶枕部位机械组织的形成,是尚未报道过的调控水稻叶片夹角的新机制(*Cell Research* (2010) 20:935-947)。控制水稻叶角大小的另一个基因 *LC2* (leaf inclination2), 编码一个类VIN3 蛋白,通过调节叶枕细胞分裂来控制叶片角度,*LC2* 基因在叶片发育过程中主要在叶片和叶鞘连接处表达,并且表达受到脱落酸、赤霉素、生长素和油菜素内酯的诱导 (Shu-Qing Zhao *et al.* *Cell Research*, 2010, 20 (8): 935-947)。为了得到直立的水稻株型,许永汉等 (2010) 在由早籼品种“广陆矮 4 号”经 ^{60}Co γ 射线辐射诱变产生的水稻突变体库中找到一种无叶枕突变体 *Os1g1-3*, 经过遗传改良的 *Os1g1-3* 品系在合理密植的条件下能够显著提高水稻的产量,显示出该突变体材料在水稻育种实践中具有重要的应用价值。

[0006] 由于水稻叶张角由叶枕的发育状况决定,如果能获得调控基因在植物叶枕中特异性表达的启动子,使外源抗病基因或株型基因都只在叶枕部位表达,这对于改变水稻株型,提高水稻产量,防治叶枕瘟有着十分重要的作用。叶枕特异性启动子能指导外源叶片张角控制基因在叶枕处特异表达,在改变水稻叶片张角、改良植物株型的同时,提高张角控制基因的利用效率,避免该类基因(多为油菜素内酯信号传递响应基因)在水稻其他部分无效表达带来的能量浪费和对其他形态结构不必要的影响。因此分离克隆这样的启动子,对于植物转基因工程获得抗性品种具有十分重要和深远的意义。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种驱动外源基因在植物叶枕组织中特异性表达的启动子以及获得含有该启动子序列的转化子。

[0008] 一种植物叶枕特异性表达启动子 *ProCo11*, 其核苷酸序列如下所示:

[0009] -1938 TGC GAAAAC GAGACAATCA CCCCTATCTC CCCTGATAGA ACGCAAACGG AGGAAATACA
 [0010] -1878 TAAGAATCCA TTCCATTGTA GATGAAGGAC ATCACCAGAT CCATTGAGGA TGAAGGACAT
 [0011] -1818 CACATGTTAG CACCTAATAA ACTCTTCATG GCAACACTTA CTACAACCAC AGCTTATGAG
 [0012] -1758 GCCTGGCCAC TCCATAAGCT TCTTCATTTT ATTTAATTGC AGCTGCGTTT GTTAACATCA
 [0013] -1698 CTTCCTTATC GCATCACAGC TTTGTCTCAA CATGCATGCA TGCATCCTTG TCACACTCAC
 [0014] -1638 CATGCCACAT GCAAACCAA TGAAAACGAT GGGTTAAGCT CACAGTAAAA TCAAAGTGCT
 [0015] -1578 GCTTGTACAT ACACCTTTAA TATTGTACTA TCGGCCAAAA ATATATACTC TTTGTCTTAA
 [0016] -1518 ATTAAAGCTA TTTTACCAC TTAAGTTATT TTAATATAAA GCTATTTCTC TACCTACTTA
 [0017] -1458 CTTTATTTCA ACCAATCATA ACAACTCTC ATTTAATTTT TTCACGTACT TTATCTCCCT
 [0018] -1398 AAGTAATTAT AACATATATT CTTTCAATTA TTTTCACCTA GTTTTTATTT CATGTGAAAA
 [0019] -1338 TTTTCATGAA TGCTTACATT TTGGGACGAG AGAATATTAG CTAGTATTGT CTTTTTTAAG
 [0020] -1278 AGGATTTATG AAATTTTCAT AAAAACATTG TTCCATATTT TTTCAATTA AAGGGAAGAA
 [0021] -1218 AATTTAGATA TTTCCAAAAA GGTATACATC AGATAAATTT GGTCCATGTT TCATTATAAA
 [0022] -1158 AATTGATATC CTAATCACAT ATATTTAATT TATCACATCT ACTATATGCA CTATAAAAAAT
 [0023] -1098 TAACCAATTG TAGAAAATCT CAAGTTTATA AAATAGTACT CTTAAAAATA GATCCAACCG
 [0024] -1038 TACGATGATC ATCAATGGAA TTAGATAAAA CATGATTACA TATTCATCGT TTCTCGCCGT

[0025] -978 TCACACGTTT AGTCACAAGC CCGGACGTGA TTTAAAATTT CTCTTCACTG GTTAGTTCTT
 [0026] -918 TTTTACTAC ACTTTTTTAG TGATTTTTTA TATGTTGGAT TAGAGGGAGA AAGGAAGGAA
 [0027] -858 AATAACTATG CTTTTTAACA TATACTCACT TCGGTTTCAT AATTCTTATC ATTTTGGATA
 [0028] -798 ATGACATGGT TTTCAAATA TATCTTTGAC TGTATTTTTC TATTGTAATA TATCTTTGAC
 [0029] -738 TGTATTTTTC TATTGTAATA CAGTTATACT TTAACGTAG TACTCCCTTC ATCTACTTTT
 [0030] -678 TGATAGTCAT ATTCATATT GGCACACAGA CCAAGGATAA GTAATTCATC ATCTATTTAA
 [0031] -618 ACATGCTACT AGTCATTCCT CGTAAACAAG CGATTCATT AATTATACAT TTTTAAATAC
 [0032] -558 CCATGTAGCC AATCATGTGT GGAAGAATGG AGAGTCACAC ATTAATCCG AGAAAGTCAT
 [0033] -498 TAAGATGATA GGTTGTTGGA TTGAAATATG CCTATCAAAA ATAAATTTTT CAGATTTGGA
 [0034] -438 AATATGACTA TCAAAAATAG ATGGAGGAAA TACTTTGTAA GACAAGTCTA TATATTGTTT
 [0035] -378 TAGTGACTTT AACTAAATA TTTTAAAAGT TATTAATAGT TAAAGTTATA AAAGTTTGAC
 [0036] -318 CTTAATCTAC AGTAGAAGGC CACACGCCCA CACAGGCCAC ATCCCTCCTG TGGCTGCTGT
 [0037] -258 TCATCCGACC ACACGGGATC CCACCTCCTC CACCGATCCC GTTCCGTTGA CTCCGTTCCC
 [0038] -198 GTCCCGCCCC GCCCCACTC ATCTCCACTA ATCCCTTCG CTAATCACCT CTGACTCCCT
 [0039] -138 CTAATCCACC ATTTTAATTA AACCCCAATA ATTAACAAAC CCCTCACTCT CTTAATCCGC
 [0040] -78 ATTAATTAAT TGATTAATAA AATCTAATCA CTCTCGCTAT CCCGTTCTAA TCCTAACCCC
 [0041] -18 ACCCGTGTCT CCTACCTCAT CGACGGTATA AAGCGAGGCG ACGAACTGAC TCGACTCAAC
 [0042] +49 TCAACCC +1

[0043] 所述的植物叶枕特异性表达启动子 *ProCo11* 包含于植物表达载体 pCAMBIA1381-*ProCo11* 中。

[0044] 所述的植物表达载体 pCAMBIA1381-*ProCo11* 及其宿主包含于转化子中。

[0045] 所述的转化子为细胞系,愈伤组织或转基因植株。

[0046] 所述的宿主为根癌农杆菌。

[0047] 所述的植物叶枕特异性表达启动子 *ProCo11* 应用于培育转基因植物中,具体如下:将植物叶枕特异性表达启动子 *ProCo11* 插入靶标基因前转化植物,使靶标基因在植物叶枕中特异性表达,从而达到株型改良或抗病育种。

[0048] 所述的转基因植物为水稻。

[0049] 本发明从日本晴水稻(*Oryza sativa* L cv. Nipponbare)中分离克隆得到一个基因(LOC_0s08g07760.1)启动子 *ProCo11* 序列,其结构包括转录起始位点在内的 1987 bp 的 DNA 序列(序列表 1, +1 位置处为转录起始位点),该序列经酶切后连接到植物双元表达载体 pCAMBIA1381 上,利用该重组质粒转化根癌农杆菌菌株 EHA105,然后用农杆菌介导的方法进行水稻的转化,得到转基因水稻植株。对获得的转基因水稻进行组织化学检测,发现转基因植株仅在叶枕处显蓝色,证明该 1987bp 启动子序列启动子具有驱动基因表达的活性,而且该启动子驱动的 *gus* 基因在水稻叶枕中特异表达。

[0050] 目前为止,关于在叶枕处特异表达的启动子的相关研究报道很少。本发明所述的启动子序列可在叶枕处特异表达,与植物双元表达载体连接后用于取代组成型启动子,并可以与所需的靶标基因链接,构建重组植物表达载体,经转化后可驱动靶标基因在叶枕组织中的特异表达,提高外源基因在植物叶枕中的表达量,增加转基因的效果,减轻外源基因由于过量表达而对作物农艺性状的影响。

[0051] 本发明启动子在植物基因工程中的应用潜力较大,尤其在开发改良作物农业性状和提高作物产量中优势更加明显。水稻叶张角是影响产量的重要农艺性状,直立的叶片可显著提高光合效率和植株密植度,进而增加产量。因为水稻叶张角由叶枕的发育状况决定,所以可通过目的基因在叶枕中的特异表达来改变水稻叶张角,改良水稻株型。因此,该启动子在转基因作物开发中,可应用于改善作物农业性状和提高作物产量的品种培育研究,由于其在叶枕组织特异性表达的特征,用其代替 35S 等组成型启动子,可培育出理想的生物安全性高的转基因植物品种。

附图说明

[0052] 图 1A 为 pCAMBIA1381 示意图;

[0053] 图 1B 为利用 *ProCo11* 启动子驱动 GUS 表达的载体 pCAMBIA1381-*ProCo11* 示意图。

[0054] 图 2 为利用 *ProCo11* 启动子驱动 *gus* 基因表达情况的分析。

[0055] 其中, A 为无启动子表达载体转基因水稻植株叶枕;

[0056] B 为 *CaMV35S* : *gus* 转基因水稻植株叶枕;

[0057] C 为 *ProCo11* : *gus* 转基因水稻植株叶枕;

[0058] D 为 *ProCo11* : *gus* 转基因水稻植株根;

[0059] E 为 *ProCo11* : *gus* 转基因水稻植株茎;

[0060] F 为 *ProCo11* : *gus* 转基因水稻植株叶。

具体实施方式

[0061] 现结合实施例对本发明作进一步的详细说明,下述实施例中的实验方法如无特别说明,均为常规方法。

[0062] 实施例 1、含有酶切位点的 *ProCo11* 启动子的获得

[0063] 步骤 1、引物的设计

[0064] 根据 NCBI 中提供的水稻品种日本晴 (*Oryza sativa* L cv. Nipponbare) 全基因组序列,依据水稻基因 (LOC_0s08g07760.1) 的上游 2100bp 序列设计扩增引物,并根据选用的载体及靶标基因的特点,设计引物的酶切位点,在本实施例中以水稻双元表达载体 pCAMBIA1381 (来自于 CAMBIA, 公开使用载体,安徽省农业科学院农业部转基因生物产品成分监督检验测试中心水稻组保存) 为例,靶标基因为 GUS 基因,具体设计的引物为:正向引物 5' 端带 EcoRI 酶切位点 (GAATTC),反向引物 5' 端带 SalI 酶切位点酶切位点 (GTCGAC),引物序列如下:

[0065] 正向引物 :5' -GAATTCGGGTTGAGTTGAGTCGAGTCAG-3'

[0066] 反向引物 :5' -GTCGACTGCGGAAAACGAGACAATCACC-3'

[0067] 由深圳华大基因公司合成。

[0068] 步骤 2、启动子 *ProCo11* 的获得

[0069] 以水稻品种日本晴 DNA 为模板,利用正向引物、正向引物扩增启动子 *ProCo11*。按常规 PCR 体系,扩增程序采用如下:

[0070] 95°C 预变性 5min ;95°C 变性 30s,58°C 退火 30s,72°C 延伸 2min30s,35 个循环 ;最后 72°C 延伸 10min。

[0071] 回收 PCR 扩增的目的片段, 目的片段长度 1987bp, 并连接到 PGEM-T-Easy 载体 (购自 Promega 公司, 按载体说明书中的比例混合) 上, 按照热激法转化大肠杆菌 XL-Blue 感受态细胞后, 经菌落 PCR 筛选获得阳性克隆后, 挑取单克隆摇菌液提质粒, 用 EcoRI 和 SalI 进行双酶切验证。经过鉴定的阳性克隆送交 Introgen 公司测序。验证正确的克隆即为所要获得的启动子 *ProCo11*, 其核酸序列如序列表 1 所示。

[0072] 实施例 2、植物表达载体的构建和农杆菌的转化

[0073] 将实施例 1 获得的 TA 克隆中提取质粒, 用 EcoRI 和 SalI 双酶切, 回收得到启动子 *ProCo11* 片段。同时回收 pCAMBIA1381 的 EcoRI 和 SalI 酶切片段, 将上述的两个片段用 T4 ligase (购于 TaKaRa 公司) 进行连接, 得到启动子 *ProCo11* 与 *gus* 基因融合的植物表达载体 pCAMBIA1381- *ProCo11* (图 1), 利用冻融法将表达载体转入根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 (安徽省农业科学院农业部转基因生物产品成分监督检验测试中心水稻组保存), 提取阳性质粒, 用 EcoRI 和 SalI 进行酶切验证, 并克隆待用。

[0074] 对照: 转 *CaMV35S::gus* 作为对照, 利用冻融法将表达载体 pCAMBIA1381 转入根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105, 操作步骤及验证同 pCAMBIA1381- *ProCo11* 的转化方法。

[0075] 实施例 3、利用启动子 *ProCo11* 驱动 GUS 报告基因在水稻中表达

[0076] 步骤 1: 农杆菌介导的水稻遗传转化

[0077] 成熟种子去掉颖壳后, 用 70% 酒精浸泡种子 1min, 倒掉酒精后用含有 1 滴 Tween 20 的 50% 次氯酸钠 (原液有效氯浓度大于 4%) 溶液浸泡种子 40 min (150 r/min)。然后用无菌水清洗种子至溶液澄清, 无次氯酸钠味道, 用无菌水浸泡种子过夜。用解剖刀沿种子的糊粉层将胚剥下, 将胚接种于愈伤诱导培养基上。30℃ 暗培养 11 天后将愈伤与胚乳及胚芽分离, 将去芽的状态良好、分裂旺盛的初级愈伤组织进行预培养 3-5 天后用于农杆菌转化。农杆菌介导的遗传转化、转化子筛选及转基因植株再生等参照标准文献 (Yongbo Duan, Chenguang Zhai, *et al.* An efficient and high-throughput protocol for *Agrobacterium* mediated transformation based on phosphomannose isomerase positive selection in Japonica rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Cell Report, 2012. DOI 10.1007/s00299-012-1275-3.) 等的方法。

[0078] 通过农杆菌介导的遗传转化、转化子筛选和转基因植株再生等过程, 获得 35 株 *ProCo11::gus* 转基因水稻和 48 株 *CaMV35S::gus* 转基因水稻植株。

[0079] 步骤 2、GUS 组织化学染色

[0080] 参照 Jefferson (Jefferson RA *et al.* GUS fusion: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant [J]. EMBO J., 1987, 6:3901-3907) 等的方法, 将需要染色的组织抽真空, 然后浸入染色液中, 37℃ 染色 24 小时。脱色时在 37℃ 条件下用 95% 乙醇处理, 至阴性对照材料呈白色。

[0081] 通过 GUS 组织染色, 检测启动子 *ProCo11* 在水稻转基因植株中对 GUS 的启动活性。结果显示, *ProCo11::gus* 转基因水稻植株根 (图 2D)、茎 (图 2E) 和叶片 (图 2F) 中, 均未检测到 *gus* 基因的活性, 而在 *ProCo11::gus* 转基因水稻植株的叶枕经染色脱色后呈现蓝色。相对而言, 无启动子表达载体转基因水稻植株叶枕经染色脱色后呈现出白色 (图 2A), *CaMV35S::gus* 转基因植株的叶枕部位的蓝色较弱 (图 2C)。结果说明, 特异性启动子

ProCo11 能够驱动 *gus* 基因在水稻叶枕中特异性高水平的表达。

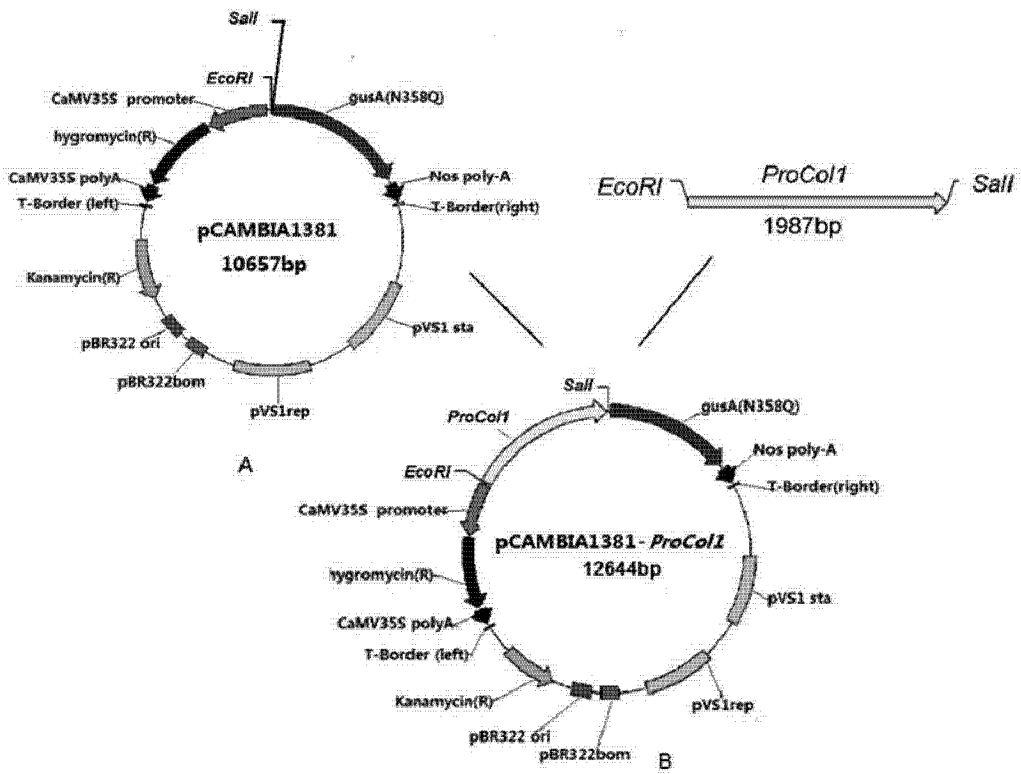


图 1

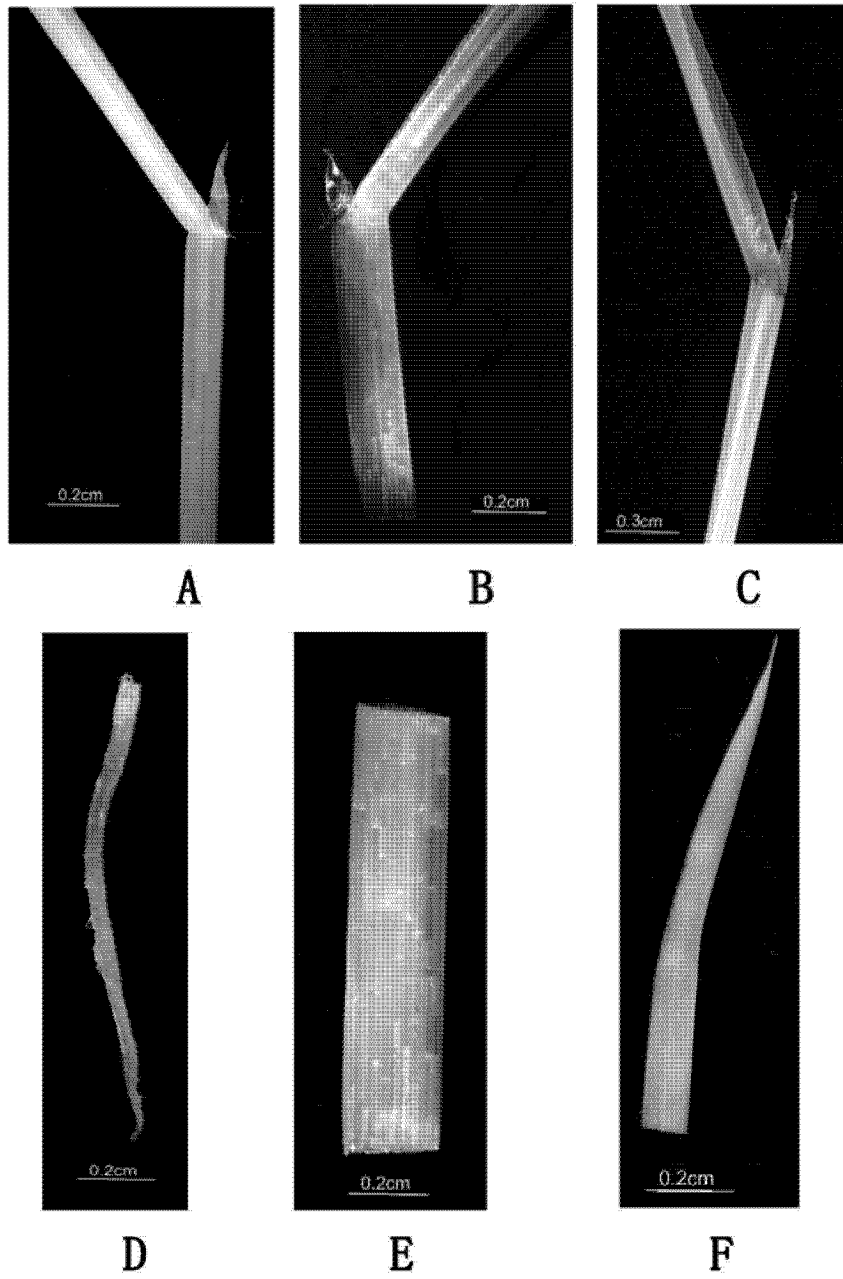


图 2