乙醇酸氧化酶基因诱导反义表达载体的构建与水稻的遗传转化

胥华伟，侯典云，施 江，史国安
(河南科技大学农学院，河南 洛阳 471003)

摘 要：通过 RT-PCR 扩增得到水稻叶片乙醇酸氧化酶 (Glycolate oxidase, *GLO*) 的全长 cDNA 并构建诱导反义表达载体 pER8-GLO，以根癌农杆菌介导法得到转基因水稻。以诱导剂 β-雌二醇 (β-estradiol) 诱导处理 12 d 后，转基因水稻的 *GLO* 活性降低超过 80%。在空气条件下，转基因植株的生长受到抑制；而高 CO_2 条件下的转基因植株与野生型植株表型没有显著差异，说明反义 GLO 植株具有典型的光呼吸突变体的特征。

关键词：水稻；*GLO*(乙醇酸氧化酶)；诱导反义表达；遗传转化
中图分类号：Q945.11；S511 **文献标识码**：A **文章编号**：1004-874X(2011)10-0001-03

乙醇酸氧化酶 (Glycolate oxidase, *GLO*) 是光呼吸中的关键酶[1]，催化乙醇酸氧化生成乙醛酸和过氧化氢[2]。利用甲基磺酸乙酯 (Ethyl methane sulfonate, EMS) 化学突变结合不同浓度 CO_2 筛选的方法，Somerville 等[3]从拟南芥中筛选到一系列光呼吸途径关键酶的突变体，这些突变体的典型表型就是在高 CO_2 条件下可以正常生长，而在空气条件下却很快表现出生长迟缓或者叶片萎黄等表型，这就是典型的光呼吸突变体表型，但却没有筛选到 *GLO* 的缺失突变体，Somerville 推测 *GLO* 可能还在别的代谢途径具有重要作用[3]。随着拟南芥和水稻基因组测序工作的完成，生物信息学分析表明在拟南芥和水稻中 *GLO* 都是由多基因所编码，这种基因的冗余性或许是化学突变法筛选突变体失败的原因。

过去对 *GLO* 的研究主要集中在分子结构和催化特性方面[4-5]，对其在光呼吸中的生理功能仍不清楚，甚至对其底物乙醇酸的来源仍有争议[3]，利用转基因技术可望进一步探索或解决这些问题。本研究构建了诱导反义表达载体 pER8-GLO，通过农杆菌介导的方法获得转基因水稻，并对其进行诱导，探求其在光呼吸中的作用机理。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试水稻为粳稻品种石狩白毛 (*Oryza sativa* L. cv Shishoubaimao)。可诱导表达载体 pER8 由旧金山州立大学贺正辉博士提供，该载体只有在施加诱导剂 β-雌二醇 (β-estradiol) 的条件下才会大量诱导目的基因的表达[6]。

根据预测的水稻 *GLO* 序列 (GenBank 登录号：AK098878) 设计 PCR 引物。上游引物 (GLO-F) 为 5'-GAGAGAACTAGTGCAGGGTTCACAAGGCAGGAGAAAA-3' (下划线处为 *Spe* I 的酶切位点)，下游引物 (GLO-R) 为 5'-GTGTCTCTCGAGCATGAACGACCCAGTTACGA-3' (下划线处为 *Xho* I 的酶切位点)。以潮霉素磷酸转移酶 (Hygromycin phosphotransferase, HPT) 基因片段上的引物进行转化植株的 PCR 鉴定。上游引物 (HPT-F) 为 5'-CTGAACTCACCGCGACGTCTGTC-3'，下游引物 (HPT-R) 为 5'-TAGCGCGTCTGCTGCTCCATACA-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。DNA 聚合酶、限制性内切酶等相关试剂均购自大连宝生物技术有限公司，诱导剂 β-雌二醇 (β-estradiol) 购自 Sigma 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 诱导反义 *GLO* 载体的构建及 *GLO* 序列测定 *GLO* 基因的 PCR 扩增、酶切、连接、转化等参照 Sambrook[7]进行。扩增所得 *GLO* 片段和 pER8 经 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切后进行连接，pER8 的结构[6]及载体构建过程如图 1 所示。经测序确认目的片段及连接方向的正确性，构建的诱导反义载体命名为 pER8-GLO。

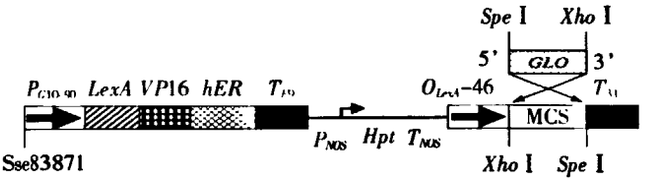


图 1 pER8 结构 (仅左右边界之间) 及诱导反义表达载体的构建

1.2.2 水稻的遗传转化 水稻的遗传转化参照 Hiei 等[8]方法并略作修改：由于 nos 启动子在单子叶植物中启动能力很弱，应避免过长时间的筛选，所以仅在两轮的筛选培养基中加入 50 mg/L 的潮霉素，每轮筛选时间为 2 周左右。

1.2.3 PCR 初步筛选转基因植株 水稻微量基因组 DNA 的提取采用 SDS 法。PCR 鉴定采用 20 μL 的体系，反应程序为 94℃预变性 3 min，94℃变性 1 min，55℃退火 40 s，72℃延伸 1 min，共 28 个循环，最后 72℃延伸 6 min 终止反应。

1.2.4 筛选 *GLO* 活性下调植株 经 PCR 初步鉴定为转基因植株后，将 T_0 代植株种植并收获种子。每个株系挑选 10 粒饱满种子，消毒后以木村 B 营养液培养至 3 叶期开

收稿日期：2011-04-15
基金项目：河南科技大学博士启动基金 (09001271)；河南科技大学校基金 (2009QN0007)；河南省教育厅自然科学研究计划项目 (2011B180020)
作者简介：胥华伟 (1978-)，男，博士，讲师，E-mail: xhwcyn@163.com
通讯作者：史国安 (1963-)，男，博士，教授，E-mail: gashi1963@163.com

万方数据

始诱导试验以筛选出酶活降低的植株。诱导剂 β-estradiol 以二甲基亚砜 (Dimethylsulfoxide, DMSO) 配成 40 mmol/L 的母液，-20℃储存。使用浓度为 5 μmol/L，每 3 d 将诱导剂和营养液一起更换，12 d 后称取上数第 2 和第 3 片叶子 0.15 g 测定 *GLO* 活性。

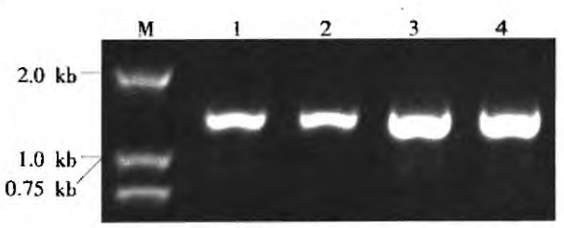
GLO 活性的测定参照彭新湘等[9]的方法，分别以每克鲜重每分钟和每毫克蛋白每分钟产生的 H_2O_2 的量来表示酶活性。参照 Zelitch[13]的方法测定蛋白质含量。

1.2.5 转基因植株在空气和高 CO_2 条件下的表型　以酶活降低的转基因植株为材料，以 5 μmol/L 的诱导剂浓度诱导处理 12 d，处理过程中观察其表型变化，第 12 d 取样测定 *GLO* 活性。在人工气候箱进行高 CO_2(1%)和诱导剂处理：将纯 CO_2 通入人工气候室，以转子流量计控制 CO_2 的流量，以 CO_2 分析仪监测 CO_2 浓度。培养条件为白天 30℃，300 μmol/(m²·s)光照 14 h，晚上 25℃，持续处理 12 d 观察表型变化并测定 *GLO* 活性。

2　结果与分析

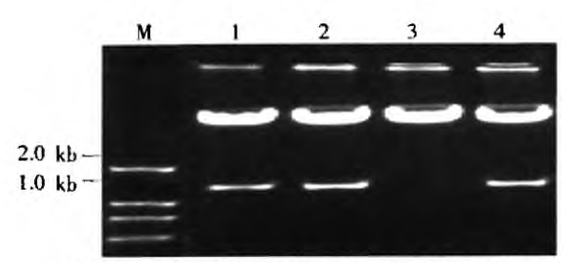
2.1　*GLO* 基因的克隆及载体的构建

以 RT-PCR 从水稻 cDNA 中扩增得到一条特异性条带，大小和预测一致，大约在 1 300 bp 左右，初步确定为目的片段 (图 2)。将目的片段回收，以 *Spe* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切目的片段和诱导表达载体 pER8 后进行连接，载体的结构及构建如图 2 所示。以 *Spe* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切确定目的片段已成功连接至 pER8 (图 3)，所构建的载体命名为 pER8-GLO。进一步的测序结果表明片段长度为 1 333 bp，与 AK098878 的核苷酸相似性为 100%，连接方向正确。



M：DNA Marker DL2000；1~4：RT-PCR 扩增产物

图 2　RT-PCR 扩增水稻 *GLO* 基因



M：DNA Marker DL2000；1~2，4：阳性克隆；3：假阳性克隆

图 3　诱导反义表达载体 pER8-GLO 的双酶切鉴定

2.2　农杆菌介导的遗传转化和诱导反义植株的再生

pER8 上驱动 *HPT* 基因表达的是 *nos* 启动子，这种启动子在单子叶植物中的启动能力很弱[10]，故试验中仅在筛选培养基中加入潮霉素，在随后的预分化和分化试验中没有加入潮霉素，相比从筛选到最终的生根壮苗都加入潮霉素的方法，结果可能造成较多的假阳性植株，但却可以有效克服 nos 启动子启动能力弱的特点，能够得到更多的再生植株。本试验在较短的时间内得到大量抗性植株，表明采用缩短潮霉素筛选时间的方法是切实可行的。

2.3　PCR 初步筛选转基因植株

共得到 127 株抗性植株，抽提基因组 DNA 以其为模板进行 *HPT* 基因部分序列的 PCR 扩增，能够扩增出大小约为 730 bp 的 DNA 片段 (结果未显示)，与预测吻合。初步证明目的片段已经整合到转化植株的基因组，共有 46 株能够扩增到 *HPT* 片段，阳性率为 36.2%，而以 35 S 为启动子的 RNA 干涉载体所进行的遗传转化中，在从筛选到分化都添加潮霉素的情况下，阳性植株几乎为 100% (数据未显示)，以 pER8-GLO 进行的转化试验在筛选时间缩短的情况下抗性植株的阳性率远远低于以 35S 为启动子的阳性率，和预测结果相一致。

2.4　GLO 活性下调植株的诱导筛选

虽然得到经 PCR 验证为阳性植株的水稻，但诱导剂是否能够启动植株体内反义 *GLO* 的表达，还需要进行进一步的验证。参考 Zuo 等[6]的处理浓度，以 5 μmol/L 来进行诱导筛选实验。以野生型植株同样以诱导剂处理作为对照 (CK)，结果表明在检测的 48 个株系中，有两个株系 (GLO-AS-26, GLO-AS-46) 的 *GLO* 活性大幅下降，其中 GLO-AS-26 的酶活最高可降低 90%以上，GLO-AS-46 的降低比例多介于 80%~90%之间，野生型植株的酶活性没有受到影响 (图 4)。

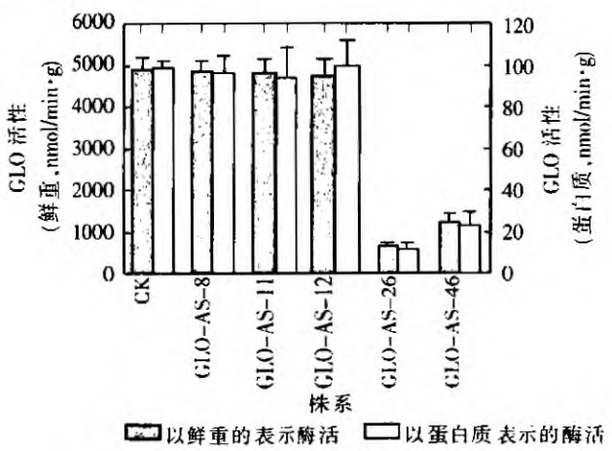
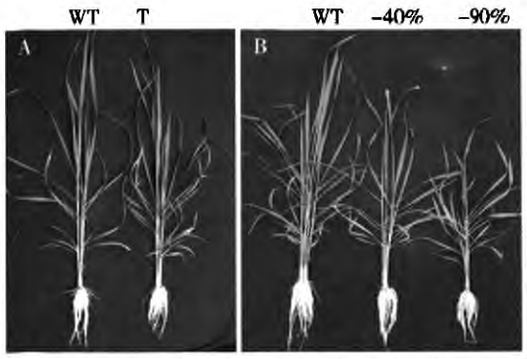


图 4　T_1 代植株的诱导筛选实验

2.5　转基因植株在空气和高 CO_2 下的表型

空气条件下，未诱导处理时，转基因植株的表型和野生型没有明显差异 (图 5A)，当以 5 μmol/L 的诱导剂处理 12 d 后，转基因植株的生长受到明显抑制，野生型植株的生长未受影响(图 5B)，说明本诱导系统可以严格控制目的基因的表达，只有施加诱导剂后才会高效特异诱导反义 *GLO* 的表达并使酶活性下降，以 1%的 CO_2 诱导处理 12 d 的野生型植株的 *GLO* 活性和空气中的无显著差异，而转基因植株的 *GLO* 活性下降超过 90%，但却没有明显表型 (数据未列出)，说明高 CO_2 可有效阻止转基因植株生长受

万方数据



A:未加诱导剂;B:施加诱导剂;WT:野生型植株;T:转基因植株;-40%和-90%:GLO 活性降低 40%和 90%

图 5 转基因植株的表型

到抑制，由转基因植株在空气和高 CO_2 下表型的差异可以看出转基因植株表现出典型的光呼吸突变体表型。

3 结论与讨论

在许多应用中，相对于组成型启动子，诱导型启动子往往具有更大的优势和潜力[9]，特别是有某些基因的表达对于细胞的基本功能或细胞的发育是必需的，那么组成型表达的反义 RNA 技术及 RNAi 技术就有可能产生不利的甚至是致死的后果，从而无法对转基因植株进行进一步的研究[11]。考虑到 *GLO* 突变体可能是典型的光呼吸突变体，即 *GLO* 突变体只能在高 CO_2 的条件下生长，故采用诱导表达系统 pER8，在没有添加诱导剂处理时，可以严格控制反义片段的表达，只有经过诱导剂处理才可以高效特异地诱导反义片段的表达[6]。

早在 1948 年，前苏联学者就发现了 *GLO*，但对其生理功能的研究极为缺乏[4-5]，这主要是由于缺乏相应的突变体。日本学者 Yamaguchi 等[12]曾将南瓜 *GLO* 的 cDNA 导入烟草，希望得到 *GLO* 活性提高的转基因植株，却意外得到 *GLO* 活性降低的转基因植株，这可能是由于共抑制而引起的，而 *GLO* 活性对于调控植物的光抑制具有“阀值”效应，即只有当 *GLO* 活性降低超过 60%时植株才会表现出明显的光抑制，其暗适应下光系统Ⅱ最大光化学量子产量 (Maximal quantum yield of photosystem Ⅱ photochemistry, Fv/Fm) 才开始下降。此外，对 *GLO* 生理功能的研究更多的是基于外施抑制剂的结果[13-15]，由于外源抑制剂的局限性，很难深入研究 *GLO* 在光呼吸中的生理功能。本研究利用诱导反义技术得到反义 *GLO* 水稻，可通过施加诱导剂达到调控水稻 *GLO* 活性的目的。结果表明，空气条件下，随着 *GLO* 活性的降低，反义 *GLO* 植株的生长受到严重抑制；而在高 CO_2 下，反义 *GLO* 水稻与野生型水稻的表型没有显著差异，表明反义 *GLO* 水稻具有典型的光呼吸突变体的特征。诱导反义 *GLO* 水稻的获得，为研究 *GLO* 的生理功能提供了很好的研究材料。利用转基因水稻可以研究 *GLO* 下调后植株的光呼吸以及光合等生理指标的变化，也可以应用各种分子生物学手段来研究 *GLO* 下调对植物体内各种代谢途径的影响；此外，大量的试验证据表明 *GLO* 在植物抗逆中也可能发挥着重要作用[16]，利用 *GLO* 下调的转基因植株可以进一步验证和研究 *GLO* 在抗逆中的作用，为进一步阐明光呼吸的生理功能奠定基础。

参考文献:

[1] Esquivel M G,Ferreira R B,Teixeira A R.Protein degradation in C_3 and C_4 plant with particular reference to ribulose bisphosphate carboxylase and glycolate oxidase [J].J Exp Bot, 1998,49(322):807-816.

[2] Richardson K E,Tolbert N E.Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase[J].J Biol Chem,1961,236(5): 1280-1284.

[3] Somerville C R.An early Arabidopsis demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration [J].Plant Physiol,2001,125 (1): 20-24.

[4] 王炜军,彭新湘,李明启.植物乙醇酸氧化酶研究进展[J].华南农业大学学报,1999,20(3):117-122.

[5] 徐杰.乙醇酸氧化酶研究进展[J].华南师范大学学报(自然科学版) ,2002(3):106-111.

[6] Zuo J,Niu Q W,Chua N H.An estrogen receptor -based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants[J].Plant J,2000,24(2):265-273.

[7] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T.Molecular Cloning. A Laboratory Manual[M].New York:Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[8] Hiei Y,Komari T,Kubo T.Transformation of rice mediated by Agrobacterium tumefaciens[J].Plant Mol Bio,1997,35:205-218.

[9] 彭新湘,李明启.乙醇酸氧化酶活性的测定.现代植物生理学实验指南[M].北京:科学出版社,1999: 92-93.

[10] Tuerck J A,Fromm M E.Elements of the maize A1 promoter required for transactivation by the anthocyanin B/C1 or phlobaphene P regulatory genes[J].Plant Cell,1994(11):1655-63.

[11] Guo H S,Fei J F,Xie Q,et al.A chemical-regulated inducible RNAi system in plants[J].Plant J,2003,34:383-392.

[12] Yamaguchi K,Nishimura M.Reduction to threshold levels of glycolate oxidase activities in transgenic tobacco enhances photoinhibition during irradiation [J].Plant Cell Physiol,2000,41 (12):397-1406.

[13] Zelitch I.Alpha-Hydroxysulfonates as inhibitors of the enzymatic oxidation of glycolic and lactic acids [J].J Bio Chem,1957,224: 251-260.

[14] Zelitch I.Increased of net photosynthetic carbon dioxide uptake caused by the inhibition of glycolate oxidase [J].Plant Physiol, 1966,41(10):1623-1631.

[15] Zelitch I.The effect of glycidate, an inhibitor of glycolate synthesis, on photorespiration and net photosynthesis [J].Arch Biochem Biophys,1974,163(1): 367-377.

[16] Wingler A,Lea P J,Quick W P,et al.Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection [J].Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,2000,355:1517-1529.

万方数据