

集胞藻*sbtA*基因具有提高水稻旗叶叶绿素含量及株高的功能

杨浩萌*, 薛哲勇, 赵乐, 漆小泉, 黄芳*

中国科学院植物研究所, 北京100093

摘要: SbtA是蓝藻特有的碳酸氢盐转运蛋白, 在蓝藻二氧化碳浓缩机制中起重要作用。本研究以水稻‘中花11’为材料, 采用农杆菌介导的转化方法将集胞藻的*sbtA*基因导入水稻胚性愈伤组织中, 再经诱导分化获得转基因幼苗。通过PCR、GFP荧光检测及Western blot检测筛选单拷贝插入的转基因阳性株系, 并对其表型进行比较分析。结果表明, 转基因水稻株高和旗叶的叶绿素含量显著提高, 与野生型相比分别增加了11.9%和27%。后一表型暗示*sbtA*基因可能在延缓灌浆期水稻旗叶衰老及改善水稻农艺性状方面具有潜在的应用价值。

关键词: 集胞藻; *sbtA*; 水稻; 叶绿素含量; 株高

Increased Chlorophyll Content and Plant Height of Transgenic Rice Expressing *sbtA* of *Synechocystis* sp. PCC 6803

YANG Hao-Meng*, XUE Zhe-Yong, ZHAO Le, QI Xiao-Quan, HUANG Fang*

Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: SbtA is a cyanobacterial protein involved in CO₂ concentrating mechanism (CCM). In this work, *sbtA* gene was cloned from *Synechocystis* sp. PCC6803 and introduced into rice (*Oryza sativa* subsp. *japonica* cv. ‘Zhonghua 11’) using *Agrobacterium*-mediated transformation. The transformants were verified by PCR and Western blot analysis. Transgenic seeds of rice were selected based on GFP reporter signal followed by phenotypic analysis of the progeny. Our results showed that the transgenic plants were 11.9% taller than wild type. The data also showed that chlorophyll (a+b) content in the flag leaf of transgenic plants was 27% higher than that of wild-type plants. The latter phenotype observed provides a new perspective of *sbtA* gene towards rice improvements.

Key words: *Synechocystis*; *sbtA*; *Oryza sativa*; chlorophyll content; plant height

水稻是最重要的粮食作物之一, 其生产状况与国计民生和社会稳定密切相关。在我国农业资源人均占有量较低、可耕地面积日益减少的情况下, 如何有效地提高单产水平是水稻育种与生产追求的主要目标(国家粮食安全中长期规划纲要(2008~2020年)(http://www.gov.cn/jrzq/2008-11/13/content_1148414.htm)。发掘新的重要基因资源及有利用价值的基因新功能, 对实现该目标具有重要意义(吴键等2011)。蓝藻是地球上唯一能够进行类似于植物光合作用的原核生物类群, 与叶绿体在进化上密切相关(Gray 1989)。蓝藻细胞所具有的二氧化碳浓缩机制(CO₂ concentrating mechanism, CCM), 能够显著提高碳素同化关键酶Rubisco所在羧化体区域的CO₂浓度, 克服该酶对CO₂的低亲和力, 促进羧化/加氧酶促反应向着羧化反应进行, 以获得最大光合同化速率(Badger和Price 2003; Price等2008)。新近有观点认为, 将蓝藻

CCM相关功能基因转入高等植物, 可能改善后者的光合生产力。有研究报道, 将相关的蓝藻基因转入高等植物拟南芥中, 能够提高转基因植株在低湿度条件下的生长(Lieman-Hurwitz等2003)。台湾学者尝试将该基因转入‘台农67’ (‘Tainoung 67’) 及‘Kitaake’水稻品种中, 导致了不同的表型(王逸非1999)。这些现象一方面说明该基因有一定的应用价值, 另一方面也暗示该基因的转入可能在不同种植物或品种间引起不同的性状。因此, 本研究利用蓝藻基因组序列信息(Kaneko等1996), 从光合作用研究的模式蓝藻——集胞藻6803中克隆*sbtA* (sodium-dependent bicarbonate transport A,

收稿 2013-01-05 修定 2013-02-27

资助 转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-121B)。

* 通讯作者(E-mail: yhmbjbj@ibcas.ac.cn, fhuang@ibcas.ac.cn; Tel: 010-62836546)。

slr1512)基因全长序列,采用农杆菌介导的遗传转化方法将该基因转入水稻品种‘中花11’中,并对转基因株系的表型进行分析,初步揭示了该基因具有提高水稻旗叶叶绿素含量及株高的新功能。

材料与amp;方法

1 实验材料

集胞藻6803 (*Synechocystis* sp. PCC 6803)、水稻‘中花11’ (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* cv. ‘Zhonghua 11’)种子、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株EHA105、大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 α 均为本实验室保存的材料。集胞藻培养基为BG11 (Allen 1968),液体培养条件及细胞收集方法按照文献(Zhang等2009)。水稻幼苗在温室中的培养条件为自然光照12 h·d⁻¹,白天30 /夜间25 。

2 实验方法

2.1 DNA提取及基因克隆

集胞藻基因组DNA提取参考Williams (1988)的方法。跟据Cyanobase数据库(<http://genome.kazusa.or.jp>)中集胞藻*sbtA*序列(*slr1512*),采用Primer 3.0软件设计用于基因扩增的上下游引物。提取对数生长期集胞藻的基因组DNA,以其为模板,用PCR扩增获得目的基因。扩增引物: F, 5'-ATG-GATTTTTTGTCCAATTTCTTGACG-3'; R, 5'-TTAACCTGCACCAAGGGTCTG-3'。PCR扩增使用rTaq酶及其反应体系(TaKaRa)。反应程序为: 94 4 min; 94 30 s, 50 30 s, 72 1 min, 30个循环; 72 10 min。将目的条带电泳回收后连接到pCR8/GW/TOPO载体(Invitrogen)上,转化大肠杆菌DH5 α 。将筛选到的阳性克隆进行测序(上海生工)验证,挑选正确的克隆载体pCR8/GW/TOPO-*sbtA*用于转化农杆菌。

2.2 表达载体构建及水稻遗传转化

采用Gateway技术中的LR ClonaseTM II Enzyme Mix试剂盒及方法(Invitrogen)构建表达载体。将克隆载体pCR8/GW/TOPO-*sbtA*的目的基因整合到表达载体pH7WG2D的重组位点,测序验证后得到重组表达载体pH7WG2D-*sbtA*。水稻遗传转化按照Toki等(2006)的方法进行。抗性愈伤组织在含50 mg·L⁻¹潮霉素和400 mg·L⁻¹羧苄青霉素的N₆培养基(Hiei等1994)上筛选。诱导分化并获得完

整植株后炼苗5~7 d,移至温室培养。

2.3 转基因再生植株的PCR检测

取温室培养的T₀代转基因水稻的新鲜叶片,提取基因组DNA (Murray和Thompson 1980)并通过PCR对外源基因进行分子检测。用于PCR扩增的特异性引物对为: F, 5'-CGGAAGATAATCG-GGTCAAA-3', R, 5'-GGCAGATGGGATACCT-GCTC-3', PCR扩增体系同2.1节,循环次数增加到35。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,EB染色后观察结果。

2.4 多克隆抗体的制备

集胞藻*sbtA*基因编码蛋白的抗体由上海艾比玛特生物医药有限公司制备。用SEALTM软件获得两个抗原决定簇多肽序列: 序列1, KRKRK-SAAASIEESFSKQPVAAGDYGDQTDY-PRTRQEYLSQQEPEDNRVKIWPIIEESLQGPAL-SAMLLGLALGIFTKPESVYEGFYDPLFRGLL-SILMLIMGMEAWSRIGELRKVA; 序列2, ESKISYEAWAGALYPFMDIPALVTAIVVANI-YLNKRKRKSAAASIEESFSKQPVAAGDYGDQTDY-PRTRQEYLSQQEPEDNRVKIWPIIEESLQGPALSAMLLGLALGIFTKPESVYEGFYDPLFRGLLSILMLIMGMEAWSRIGELRKVA。重组蛋白原核表达及纯化按照Zhou等(2008)的方法进行。获得的重组蛋白混合后免疫兔子,制备多克隆抗体,取抗血清经特异性验证,再用于样品的Western blot检测。

2.5 转基因再生植株的Western blot检测

按照Cui等(2009)的方法提取抽穗期T₀代水稻叶片中的蛋白质。SDS-PAGE及Western blot分析参考Huang等(2004)进行。分离胶浓度12%, SbtA及热激蛋白HSP抗体(华大基因)浓度为1:500。采用ECL Plus Western Blotting检测试剂盒(GE Healthcare)进行检测。

2.6 转基因水稻幼芽GFP荧光检测及拷贝数分析

种子萌发、GFP荧光检测及外源基因拷贝数分析参考Toki等(2006)方法进行。选取PCR检测为阳性的T₁代转基因种子,置于含无菌水的滤纸上,在黑暗条件下于30 培养箱中萌发。待幼芽长约0.5 cm时,置于荧光体视显微镜(德国Leica MZ10F)下进行观察统计,激发光波长400 nm,发射光波长470 nm。

2.7 水稻旗叶绿素含量测定

参考Arnon (1949)方法测定水稻旗叶绿素含量。取灌浆期水稻旗叶中段, 沿叶脉方向剪成5 mm×10 mm的小片, 混匀后称取2 g, 在80%丙酮中研磨提取2次, 合并上清液, 用分光光度计(Smart-Spec™ Plus, Bio-Rad, 美国)进行测定。野生型及T₀代和T₁代转基因水稻各取3个独立株系, 每个株系培养30~50棵植株, 随机选取10株的旗叶, 剪碎混匀后分成3份(3次平行)。结果以3次重复平均值±标准差表示(n=9), 差异显著性用t-检验进行分析。

2.8 水稻农艺性状分析

选取生长一致的T₀代转基因株系3个, 测定灌浆期水稻的株高、分蘖数、旗叶长度等性状指标。在采收期调查抽穗率(抽穗率=抽穗数/分蘖数×100%)、穗长、穗粒数及百粒重等。每个株系取30株进行测定。实验重复3次。结果以3次重复的平均值±标准偏差(n=3, means±SD), 差异显著性用t-检验进行分析。

特异性引物, 以基因组DNA为模板, PCR扩增得到特异扩增产物。测序结果显示, 该序列与Cyanobase数据库中目标基因DNA序列完全一致, 预测的蛋白分子量为39.7 kDa。在NCBI蛋白数据库中进行搜索, 没有发现高等植物中存在*sbtA*的同源基因, 但在蓝藻中高度保守, 同源蛋白之间的序列相似性很高(图1)。与聚球藻(*Synechococcus elongates* PCC 7942, Synpcc7942_1475)、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* NIES-843, MAE62090)、鱼腥藻(*Anabaena* sp. PCC 7120, All2134)及原绿球藻(*Prochlorococcus marinus* MIT 9313, PMT1213)同源蛋白的序列相似性分别为91.2%、90.6%、89.3%及40%, 表明*sbtA*为蓝藻特有基因。

2 表达载体构建及遗传转化

农杆菌介导的转基因方法具有转化频率高, 再生植株可育率高, 可转移较大片段的外源DNA, 无需原生质体培养技术, 导入外源基因拷贝数低等优点(Chang等1994)。我们采用该方法成功地将*sbtA*导入水稻‘中花11’基因组中。图2为采用Gateway技术构建的目的基因表达载体, 携带有潮霉素(Hyg)抗性基因和GFP报告基因(EgfpER)为转基因植株筛选标记。从农杆菌侵染的270个水稻愈伤组织块中, 筛选到50个具有抗性。通过诱导发芽

实验结果

1 *sbtA*基因克隆及序列分析

根据Cyanobase (<http://genome.kazusa.or.jp>)中集胞藻6803的*sbtA*基因(*slr1512*)序列, 设计并合成

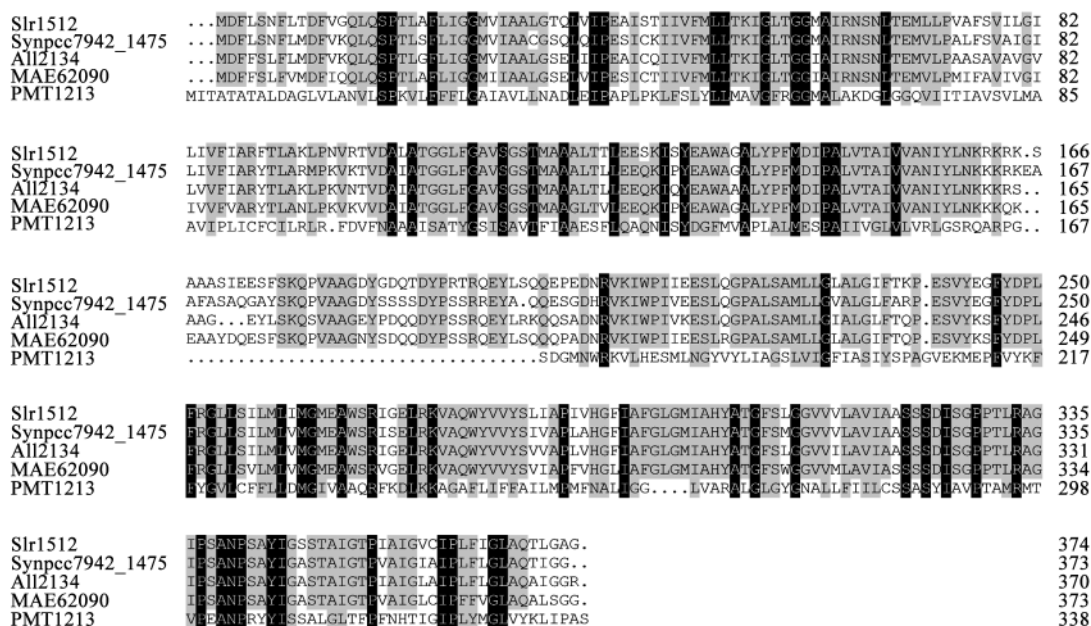


图1 蓝藻SbtA蛋白的氨基酸序列比对

Fig.1 Multiple sequence alignment of cyanobacterial SbtA proteins

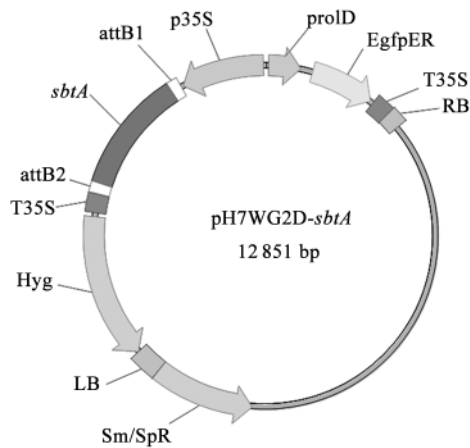


图2 转基因水稻表达载体的结构示意图
Fig.2 Schematic structure of expression vector for transgenic rice

和生根, 获得 T_0 代转基因再生植株25棵, 用于进一步的分子验证。

3 转基因植株的PCR和Western blot检测

提取经抗性筛选获得的25个 T_0 代转基因植株叶片中的基因组DNA, 并用基因特异性引物进行PCR, 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测分析。由图3-A可见, 转基因植株中有407 bp的特异性目的基因片段, 而野生型中没有, 表明 $sbtA$ 基因已整合到转基因株系的基因组中。为了进一步验证转基因的有效性, 我们选取了8株PCR检测阳性的转基因植株, 提取叶片中的总蛋白进行Western blot分析。结果显示, 在转基因株系sbtA-2~9中检测到分子量大小约为40 kDa的蛋白条带, 而在野生型中仅有微弱的本底条带, 与多克隆抗体的特异

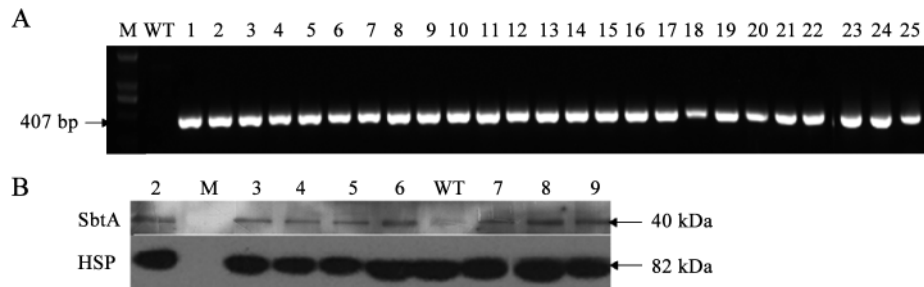


图3 转基因水稻植株的PCR和Western杂交分析

Fig.3 PCR and Western blot analysis of transgenic rice

A: PCR. M: 标准分子量; WT: 野生型; 1~25: 转基因株系。B: Western blot. M: 标准分子量; WT: 野生型; 2~9: 转基因株系。

性有关(图3-B)。由此可见, SbtA蛋白在转基因株系中得到了表达。

4 转基因植株GFP检测及外源基因拷贝数分析

为了考察转基因植株中外源基因的遗传稳定性, 我们将经Western blot验证的8个转基因株系进行自交, 获得 T_1 代转基因水稻种子。将种子萌发后获得的幼苗置于荧光体视显微镜下观察可见, 转基因水稻中有绿色荧光蛋白GFP信号, 而野生型中没有(图4), 表明GFP所在的T-DNA区已整合到转基因株系的 T_1 代基因组中。

外源基因的拷贝数常常会影响其遗传和表达的稳定性(Toki等2006)。我们从上述株系中各选取了200粒种子进行GFP荧光检测, 统计发出荧光种子所占的比例。由表1可以看出, 大部分转基因株系(sbtA-2、sbtA-3、sbtA-4、sbtA-5、sbtA-8)卡

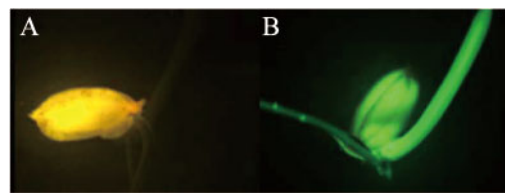


图4 水稻萌发种子的GFP荧光检测

Fig.4 GFP fluorescence detection of germinating seeds of rice

A: 野生型; B: 转基因株系。

方值(自由度 $df=1$) <3.84 的概率(P) >0.05 。说明性状分离比为3:1的假设与实际观察之间没有显著差异, 该外源基因多为单拷贝插入, 获得的转基因植株可以用于靶标基因功能研究。

5 转基因植株旗叶的叶绿素含量分析

为了分析 $sbtA$ 基因对水稻农艺性状的影响, 我

表1 转基因水稻中外源基因的拷贝数

Table 1 T-DNA copy numbers in transgenic rice

转基因株系	有荧光数	无荧光数	推测分离比	拷贝数	χ^2 *
sbtA-2	160	40	3:1	单拷贝	2.41
sbtA-3	151	49	3:1	单拷贝	0.01
sbtA-4	147	53	3:1	单拷贝	0.17
sbtA-5	146	54	3:1	单拷贝	0.33
sbtA-6	160	40	3:1	单拷贝	2.41
sbtA-7	170	30	3:1	未知	10.1
sbtA-8	150	50	3:1	单拷贝	0.01
sbtA-9	177	23	3:1	未知	18.7

* $\chi^2 < 3.84, P > 0.05 (df=1)$ 。

们测定了T₀代和T₁代转基因植株灌浆期旗叶的叶绿素含量。结果表明, T₀代3个转基因株系(sbtA-2、sbtA-3和sbtA-4)的总叶绿素(a+b)含量分别为2.7、2.3及1.9 mg·g⁻¹ (FW), 比野生型至少提高了27% (P<0.05); 转基因水稻T₁代3个株系平均总叶绿素含量为2.1 mg·g⁻¹ (FW), 是野生型的1.4倍 (P<0.01) (图5)。对叶绿素a/b的分析结果表明, 该比值在野生型和转基因株系中分别为2.5和2.8, 但二者之间的差异并不显著(P>0.05)。

6 转基因植株的农艺性状分析

检测转基因T₀代植株灌浆期的株高、旗叶长

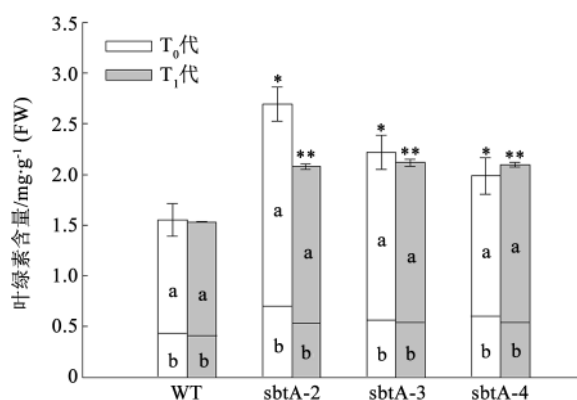


图5 转基因水稻旗叶的叶绿素(a, b)含量

Fig.5 Chlorophyll (a, b) content in flag leaf of transgenic rice
*差异显著(P<0.05); **差异极显著(P<0.01)。

度、分蘖数以及采收期的抽穗率、穗长、穗粒数及百粒重, 结果表明, 转基因株系的株高均高于野生型, 其他农艺性状无显著变化; 3个株系平均株高分别为89、86及89 cm, 平均比野生型提高11.9% (P<0.01) (图6, 表2)。

讨 论

前人在蓝藻中的研究发现, *sbtA*基因的编码产物可能作为Na⁺/HCO₃⁻同向转运蛋白在蓝藻二氧化碳浓缩机制中起重要作用(Shibata等2002; Zhang等2004)。但是, 作为外源基因*sbtA*在高等植物拟南芥及水稻中引起的表型变化有所不同(Lieman-Hurwitz等2003; 王逸非1999)。因此, 在不同受体材料或品种中的功能验证很有必要。本研究首先通过PCR扩增获得集胞藻*sbtA*基因全长序列, 然后采用Gateway技术构建了含有*sbtA*目的基因的重组表达载体, 并通过农杆菌介导的遗传转化, 将该基因导入转化效率较高的水稻品种‘中花11’基因组中, 获得了一系列单拷贝插入的转基因株系(图2~4, 表1)。利用这些实验材料, 我们对野生型和转基因株系与农艺性状相关的表型进行了比较分析。结果表明, 将*sbtA*基因转入水稻引起了农艺性状相关表型的变化。特别明显的是, 与相同发育时期的野生型对照相比, T₀代和T₁代转基因株系灌

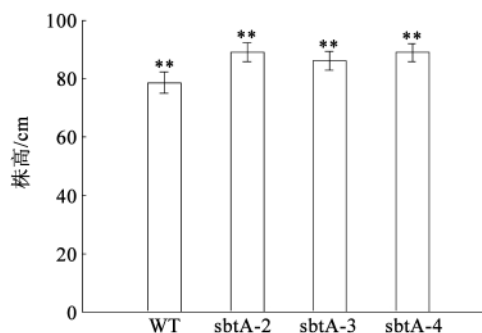


图6 转基因水稻的株高分析

Fig.6 Plant height of transgenic rice
**差异极显著(P<0.01)。

表2 转基因水稻的农艺性状

Table 2 Agronomic traits of transgenic rice

水稻类型	分蘖数	抽穗率	旗叶长度/cm	穗长/cm	穗粒数	百粒重/g
野生型	5.7±1.5	76%	25.6±3.1	18.5±1.9	71.4±7.9	2.5±0.06
转 <i>sbtA</i> 基因	6.2±1.9	77%	26.3±3.9	20.0±2.2	74.1±6.5	2.5±0.05

浆期旗叶的叶绿素含量(a+b)均有提高(图5), 暗示该外源基因可能在延缓灌浆期水稻旗叶衰老方面有一定作用。由于旗叶是灌浆期稻穗的主要光合作用叶片, 我们推测该外源基因的这一功能, 可能也与转基因株系所表现的株高增加的性状有关(图6, 表2)。进一步利用已获得的目的蛋白专一性抗体对T₂代纯合转基因株系中该蛋白的细胞定位、时空表达谱及相关生理生化指标进行系统分析, 将有助于阐明*sbtA*基因引起上述农艺性状变化的分子基础, 为该基因在水稻分子育种中的应用提供重要的理论依据。

参考文献

- 吴键, 刘学, 王永红(2011). 植物重要功能基因研究进展及其应用. 生命科学, 23 (2): 168~178
- 王逸非(1999). 表现二氧化碳浓缩机制相关基因于蝴蝶兰与水稻以促进其光合作用与生长[学位论文]. 嘉义: 国立嘉义大学
- Allen MM (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. J Phycol, 4: 1~4
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 24 (1): 1~15
- Badger MR, Price GD (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. J Exp Bot, 54 (383): 609~622
- Chang SS, Park SK, Kim BC, Kang BJ, Kim DU, Nam HG (1994). Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta. Plant J, 5: 551~558
- Cui SX, Hu J, Yang B, Shi L, Huang F, Tsai SN, Ngai SM, He YK, Zhang JH (2009). Proteomic characterization of *Phragmites communis* in ecotypes of swamp and desert dune. Proteomics, 9 (16): 3950~3967
- Gray MW (1989). The evolutionary origins of organelles. Trends Genet, 5 (9): 294~299
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J, 6 (2): 271~282
- Huang F, Hedman E, Funk C, Kieselbach T, Schroder WP, Norling B (2004). Isolation of outer membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its proteomic characterization. Mol Cell Proteomics, 3 (6): 586~595
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S et al (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res, 3 (3): 109~136
- Lieman-Hurwitz J, Rachmilevitch S, Mittler R, Marcus Y, Kaplan A (2003). Enhanced photosynthesis and growth of transgenic plants that express *ictB*, a gene involved in HCO₃⁻ accumulation in cyanobacteria. Plant Biotechnol J, 1 (1): 43~50
- Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res, 8 (19): 4321~4325
- Price GD, Badger MR, Woodger FJ, Long BM (2008). Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. J Exp Bot, 59 (7): 1441~1461
- Shibata M, Katoh H, Sonoda M, Ohkawa H, Shimoyama M, Fukuzawa H, Kaplan A, Ogawa T (2002). Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: function and phylogenetic analysis. J Biol Chem, 277 (21): 18658~18664
- Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H (2006). Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. Plant J, 47 (6): 969~976
- Williams JGK (1988). Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. Methods Enzymol, 167: 766~778
- Zhang LF, Yang HM, Cui SX, Hu J, Wang J, Kuang TY, Norling B, Huang F (2009). Proteomic analysis of plasma membranes of cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to high pH stress. J Proteome Res, 8 (6): 2892~2902
- Zhang PP, Batchikova N, Jansen T, Appel J, Ogawa T, Aro EM (2004). Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/Sll1735 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Cell, 16 (12): 3326~3340
- Zhou J, Zhou JX, Yang HM, Yan CS, Huang F (2008). Characterization of a sodium-regulated glutaminase from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Sci China C Life Sci, 51 (12): 1066~1075