

孙伟清,张昌轮,袁 茜,等. 过表达转 *OsILP* 基因水稻株系的构建[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):17-20.

过表达转 *OsILP* 基因水稻株系的构建

孙伟清,张昌轮,袁 茜,梁建生,吕 冰

(扬州大学生物科学与技术学院,江苏扬州 225009)

摘要:采用 RT-PCR 和 TA 克隆技术,从水稻品种日本晴中扩增出类整合素候选基因(integrin-like protein, ILP) *OsILP* 的 cDNA 片段。经测序鉴定,克隆获得的目的片段长为 1 167 bp,包含完整的 CDS,编码 388 个氨基酸,预测分子量 43 ku。进而将该片段连接至表达载体 pTCK303 中,通过 PCR 鉴定与酶切验证,结果表明成功构建了 pTCK303-*OsILP* 过表达载体。并将表达载体质粒转化为农杆菌 EHA105,再通过农杆菌介导将其导入水稻日本晴的愈伤中,经遗传转化,阳性鉴定,获得了过表达转 *OsILP* 基因水稻株系。

关键词:水稻;类整合素蛋白;过表达;转基因株系

中图分类号: Q785;S336 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0017-04

水稻 *OsILP* 即 Os03g0199100、LOC_Os03g10240, 别称 UPF0496 protein 1,是由 1 167 个核苷酸序列编码 388 个氨基酸组成的未知功能蛋白,预测分子量 43 ku,属于 DUF677 家族(domain of unknown function 677)。DUFs 为具有保守结构域。但在 Pfam 等蛋白家族数据库中信息较少、功能尚待明确的一系列蛋白家族^[1]。其中,DUF677 (PF05055)家族是植物中存在的一个功能未知的蛋白家族。该家族中,除 *OsILP* 外,拟南芥 AT14A 也是其中之一。AT14A 是一个与动物整合素蛋白具有部分相似序列和功能的膜蛋白^[2-3],被命名为类整合素蛋白(integrin like protein, ILP)。

整合素是动物细胞黏附分子的重要成员,属于一类跨膜蛋白的超家族,是由 2 个跨膜糖蛋白亚基(α 亚基、 β 亚基)通过非共价键连接而成的异二聚体^[4]。从结构上看, α 亚基、 β 亚基都是由 1 个大的 *N*-胞外结构域、1 个短的跨膜结构域、1 个短的 *C*-胞内结构域组成^[5]。构成胞外结构域的氨基酸通过折叠和缠绕形成一个结合“口袋”,能识别并结合各种含有 RGD(Arg-Gly-Asp)短肽序列的胞外基质分子,并调节其与配体结合的特异性。跨膜结构域相对较小,但在进化上属高度保守的区域。在胞质一侧,整合素直接与包括 α -辅肌动蛋白在内的多种肌动蛋白结合蛋白相连^[6]。当细胞外因素刺激或细胞本身的生理功能发生变化时, α -辅肌动蛋白可通过其酪氨酸磷酸化、结合 Ca^{2+} 或其他信号分子而影响细胞骨架形态,调节细胞运动。整合素作为黏附受体的生物学功能是传导生化信号并改变细胞骨架的机械结构,从而构成了胞外基质(extracellular matrix, ECM)-质膜-细胞骨架连续体,成为动物细胞内外信号双向转导过程中的关键分子之一,在细胞的运动、增殖、分化、凋亡等方面起重要作用^[7-9]。

序列比对结果表明,*OsILP* 蛋白与拟南芥类整合素蛋白 AT14A 有 22.87% 的同源性,并且疏水氨基酸主要集中在 220~280 位氨基酸。预测蛋白结构(图 1)显示,其与动物整合素亚基的构成更类似,即含有胞外结构域、跨膜结构域、胞内结构域各 1 个,且具有不同物种间较保守的同源序列,因此推测其为水稻中的类整合素(*OsILP*),参与了细胞内外信号转导过程的调控。

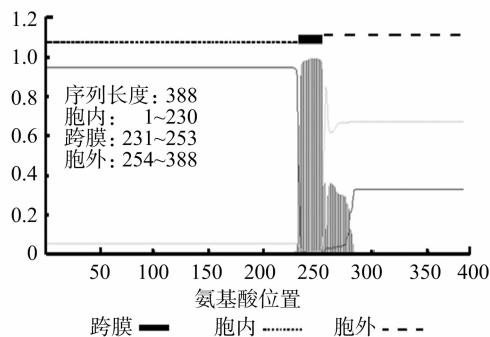


图1 UPF0496 protein 1 蛋白序列分析结果

本研究采用分子生物学技术克隆出 *OsILP*,并构建过表达载体,再通过农杆菌介导法转化水稻植株,获得过表达的转 *OsILP* 基因水稻株系,旨在为研究 *OsILP* 编码蛋白的表达、定位及生理功能,最终判断 *OsILP* 蛋白是否为水稻中的类整合素,以及研究其在细胞内外信号转导中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为粳稻品种日本晴(*Oryza sativa* subsp. *japonica* cv. Nipponbare)。克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。pTCK303 二元载体由中国科学院种康实验室惠赠。大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 等分子生物学试验常用菌种由笔者所在实验室保存。

1.2 *OsILP* 基因扩增与 T-A 克隆

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 公布的水稻基因及其登录号 NM_001055818 在 NCBI 数据库中搜索 *OsILP* 基因的编码序列,并结合表达载体(pTCK303)的多克隆酶切位点^[10](图

收稿日期:2013-11-11

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK2009185)。

作者简介:孙伟清(1987—),男,山东临沂人,硕士,主要从事植物逆境生理研究。E-mail:qdsqwlzc@163.com。

通信作者:吕 冰,博士,副教授,主要从事植物生理生化与分子生物学研究。E-mail:lubing@yzu.edu.cn。

2)设计特异引物(表1)。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,同时合成潮霉素(*Hyg*)抗性基因的引物。
1.2.2 *OsILP* 基因的 PCR 扩增 提取日本晴水稻 14 d 幼苗的总 RNA,以甲醛变性琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 微量分光光度计检测 RNA 质量,参照 TaKaRa 公司的 cDNA 第一链合成试剂盒说明书,采用 20 μL 反应体系反转录合成水稻 cDNA 第一链。

以第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增条件:95 ℃ 预变性 4 min;95 ℃ 变性 30 s,63 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,30 次循环;72 ℃ 后延伸 10 min。

1.2.3 *OsILP* 基因的 T-A 克隆与测序 纯化的目的基因片段与 pMD19-T 载体连接,并转化大肠杆菌 DH5α 感受态细

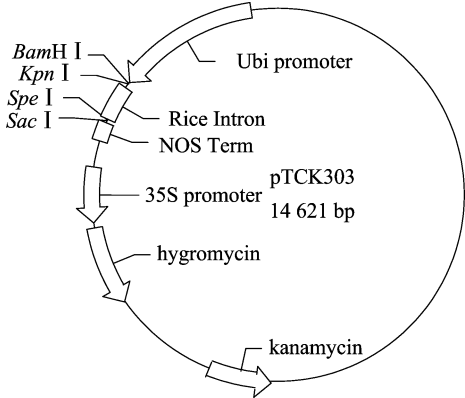


图2 pTCK303 载体过表达相关序列图示

表 1 目标基因的 PCR 扩增产物

基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
<i>OsILP</i>	F:GGATCCATGGGGAACAGCAGCA;R:ACTAGTTCAGCTAGGATGCCGGATGA	1 167
<i>Hyg</i>	F:CTTCTGCGGGCGATTGTG;R:TGACTGGAGCGAGGCGATG	300

胞。对所获得的白斑菌落通过菌液 PCR 扩增验证后,按照上海捷瑞生物工程有限公司质粒小提试剂盒说明书提取质粒,并送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序,以确定其是否为重组克隆载体 pMD19-T-*OsILP*。

1.3 过表达转 *OsILP* 基因载体的构建与农杆菌的获得

1.3.1 *OsILP* 基因过表达载体的构建 将上述重组克隆载体(pMD19-T-*OsILP*)质粒和空载体 pTCK303 质粒用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切,分别回收目标区域(1 200 bp 左右)片段和空载体酶切产物(约 14 kb)片段,用 T_4 -DNA 连接酶过夜连接后转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。

用 2 种方法分别验证重组质粒:一是进行菌落 PCR 验证;二是采用酶切验证。PCR 产物和酶切产物均用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2 过表达转 *OsILP* 基因农杆菌的获得 采用冻融法将重组质粒转化到农杆菌 EHA105 感受态细胞中,对抗生素筛选出的阳性菌落以目的基因 *OsILP* 为目标产物进行 PCR 鉴定。

1.4 过表达转 *OsILP* 基因水稻株系的获得与鉴定

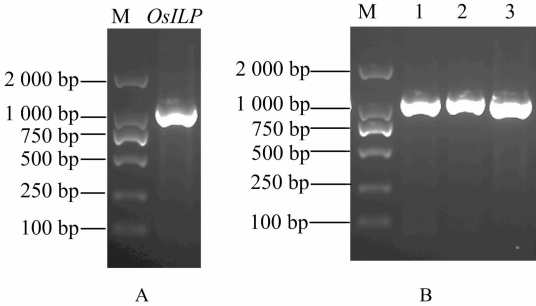
水稻转基因操作步骤参考刘巧泉等的方法^[11],略作改动。提取 T_0 代转化苗的叶片 DNA,以潮霉素抗性基因为目标产物进行 PCR 扩增,扩增条件:95 ℃ 预变性 4 min;95 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,30 次循环;72 ℃ 后延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 *OsILP* 基因的克隆

将从日本晴水稻中提取的总 RNA 反转录成 cDNA 第一链后,进行 *OsILP* 基因的 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的结果如图 3-A 所示,扩增产物大小为 1 200 bp 左右,符合目的片段 1 167 bp 预期。将回收并纯化后的目标片段进行 T-A 克隆,菌液 PCR 验证结果(图 3-B)表明,目的片段已转入 pMD19-T 载体。阳性菌液测序结果经 NCBI 序列比对,与 NCBI 上报道的 *OsILP* 基因序列 99% 匹配,只有

第 1 040 位上的碱基由“T”变成“C”,即由“GAT”变成“GAC”,密码子由“CUA”变成“CUG”,编码同一种氨基酸(亮氨酸),此为同义改变。上述结果表明重组克隆载体 pMD19-T-*OsILP* 已构建成功。



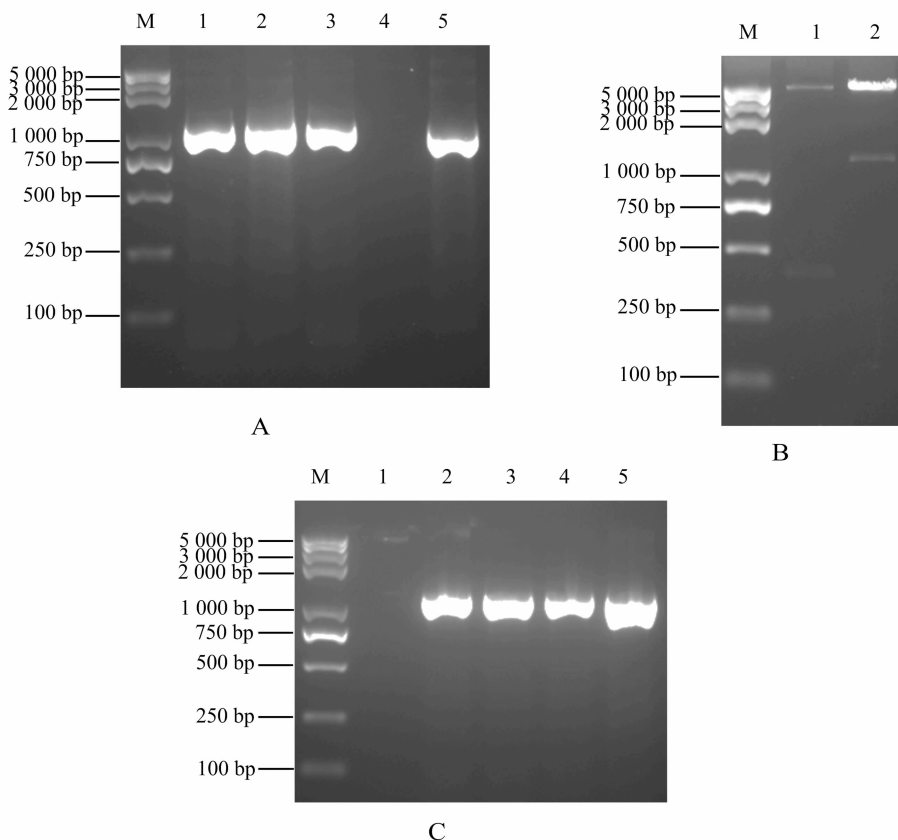
A—目的基因的扩增产物电泳图, *OsILP* 为目的基因, M 为 DL 2000 marker; B—重组载体 pMD19-T-ILP 菌落 PCR 证电泳图, 1~3 泳道为不同的单克隆菌株, M 为 DL2000 marker

图3 目的基因 *OsILP* 的 PCR 扩增和重组载体 pMD19-T-ILP 的菌落 PCR 验证

2.2 pTCK303-*OsILP* 过表达载体的构建

利用位于载体 pMD19-T-*OsILP* 和表达载体 pTCK303 内含子两端的 *Bam*H I 和 *Spe* I 酶切位点,分别对提取的 2 个载体质粒进行双酶切,回收各自目的片段(1 167、14 kb),将两者用 T_4 -DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5α。对菌液进行 PCR 鉴定,结果见图 4-A。除阴性对照外,阳性对照和检测菌液均可以扩增出 1 167 bp 长的目的片段。进而提取质粒,对重组质粒进行双酶切鉴定(图 4-B),1 号泳道为空载体的酶切结果,在 400 bp 处可看到 1 条带,为内含子片段;2 号泳道为重组载体的酶切结果,在 1 200 bp 左右处出现 1 条带,说明目标片段(1 167 bp)已正确连接到 pTCK303 载体中。

将所构建的过表达载体 pTCK303-*OsILP* 导入农杆菌 EHA105 中,农杆菌菌液 PCR 检测如图 4-C 所示,1 号泳道为空载体阴性对照,2 号泳道为阳性对照,3~5 号泳道为不同的单克隆菌株,2~5 号泳道均扩增出目的片段,说明过表达载体 pTCK303-*OsILP* 已成功导入农杆菌 EHA105,可以进行下一步的愈伤转化。



A—重组载体 pTCK303-ILP 菌落PCR验证电泳图,泳道1~3为不同单克隆菌株,泳道4为阴性对照,泳道5为阳性对照, M为 DL 2000 plus marker; B—重组载体 pTCK303-ILP 质粒 *Bam*H I、*Spe* I 双酶切电泳图,泳道1为pTCK303空载体质粒,泳道2为重组载体 pTCK303-ILP 质粒, M为 DL2000 plus marker; C—重组载体 pTCK303-ILP 转农杆菌 EHA105 菌落 PCR 电泳图,泳道 1 为 pTCK303 空载体阴性对照,泳道 2 为重组 pTCK303-ILP 质粒阳性对照,泳道 3~5 分别为不同单克隆菌株, M为 DL 2000 plus marker

图4 pTCK303-ILP载体的构建及其农杆菌 EHA105 的转化

2.3 农杆菌介导的水稻遗传转化

以成熟胚愈伤组织为材料,与转过表达载体pTCK303 - *OsILP* 的农杆菌菌液共培养后,用含潮霉素、头孢霉素的培养基进行抗性筛选,得到抗性愈伤(图 5 - A),并对筛选出的抗性愈伤诱导生芽(图 5 - B),再将生芽植株转移至生根培养基培养生根(图 5 - C),获得再生抗性苗,然后移栽到盆钵(图 5 - D)。

2.4 T_0 代过表达转 *OsILP* 基因水稻植株的潮霉素抗性基因检测

提取再生苗叶片基因组 DNA,以潮霉素抗性基因为特异扩增对象进行 PCR 扩增。由图 6 可见,在检测的 9 株再生苗中有 6 株能扩增出预期长度的目标条带,即检测出了潮霉素抗性基因,证实带有嵌合基因的 T - DNA 区域已融合到水稻植株的基因组中,获得了阳性转基因植株。

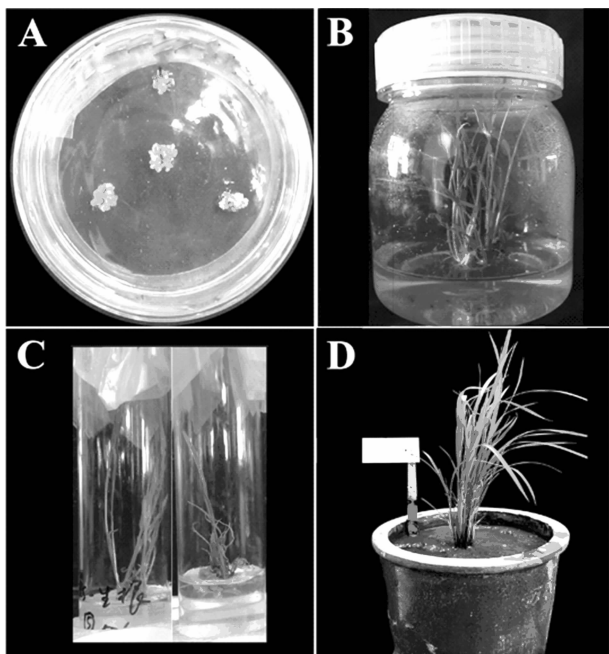
3 结论与讨论

采用反向遗传学技术,首先从水稻 cDNA 文库中扩增出了 *OsILP* 基因编码区全长序列。由于 *OsILP* 基因序列 GC 含量高达 60% 以上,使得引物的退火温度变高,普通 *Taq* 酶无法扩增出完整的目的基因全长,只能得到 500 ~ 800 bp 的片段。本研究采用 TaKaRa 公司的 LA *Taq* with GC Buffer I (编码 RR02AG),应用 LA PCR 原理研制出具有 3' → 5'

Exonuclease活性(Proof reading 活性)的耐热性 DNA 聚合酶。无论是扩增短链 DNA 还是长链 DNA,其效率都优于其他同类产品,尤其是在扩增大于 10 kb 的 DNA 片段上,其优势更加明显,而且保真性能强。当扩增具有复杂的二级结构(GC rich 等)的模板或重复序列的模板时,使用 GC Buffer 进行 PCR 扩增将非常有效。然而该酶虽能完整扩增出目的片段,但并不能保证测序结果与目的片段完全一致,多次试验结果均不理想,最好的试验结果是本研究中达到的 99% 匹配率,因是同义突变,没有改变氨基酸序列,编码蛋白与目标蛋白完全一致。

pTCK303 二元表达载体是构建 RNA 干扰载体,使基因沉默的常用载体^[10]。因其在内含子两端各自反向连入了 1 段目的基因,使之在转录后能形成双链 RNA(dsRNA)。dsRNA 首先与 Dicer 酶的 dsRNA 结合区结合,并降解成为 21 ~ 23 个核苷酸的小分子干扰 RNA(siRNA)。siRNA 在解旋酶的作用下解链形成的反义链 RNA 可指导生成一种核蛋白体复合物,也叫诱导沉默复合体(RISC),在解旋酶作用下,双链 RNA 解链形成单链,RISC 的内切酶及外切酶活性被激活,在 siRNA 序列的引导下,对靶 mRNA 进行剪切,从而降解特定 mRNA,从而使目标基因沉默^[12-15]。而本研究直接利用目的基因全长替换掉载体上的内含子片段,使之成为过表达载体。

将构建的过表达载体导入农杆菌 EHA105,再通过根癌



A—抗生素抗性筛选出的水稻愈伤组织；B—生芽培养基诱导生芽；C—生根培养基诱导生根；D—过表达转*OsILP*基因水稻植株移栽入盆

图5 转基因水稻愈伤组织的分化与再生



1—重组载体pTCK303-ILP质粒阳性对照；2—野生型水稻日本晴阴性对照；3~11—不同转基因植株；M—DL 2000 marker

图6 转基因植株T₀代潮霉素抗性基因的PCR鉴定

农杆菌介导的方法转化水稻愈伤。具体操作时鉴于农杆菌生长不容易控制,建议浸染后的愈伤组织一定要尽量吹干再移到共培养基,并且一定要在培养基里垫1层无菌滤纸,即使这样,在后面筛选培养基中仍须加一定浓度的头孢霉素,以防止农杆菌过度繁殖。初步筛选仅有小部分能正常生长出嫩黄色的新生愈伤组织。第2步筛选时,潮霉素浓度加倍,而头孢霉素的浓度相应降低,此时大部分愈伤组织都能正常生长,只是极个别愈伤仍会大量繁殖农杆菌,最后获得9株转基因再生苗。

T₀代转基因植株的鉴定主要是以载体上的潮霉素基因为扩增对象,初步鉴定获得了6个过表达的转基因水稻植株,这为研究*OsILP*蛋白的表达、定位及生理功能,最终判断其是否即为水稻中的类整合素,以及研究*OsILP*在细胞内外信号转导中的作用奠定了基础。

4 研究展望

生物信息学研究表明,*OsILP*的表达情况与生物胁迫、非生物胁迫、种子萌发均有关系。不仅如此,基因芯片数据库结果还显示,*OsILP*在水稻不同器官组织中的表达情况也各不

相同,尤其在胚乳等贮藏器官中*OsILP*的表达量相对较高,而在叶片等营养器官中表达量相对较低。因此,*OsILP*的功能可能与水稻抗逆、种子萌发、籽粒胚乳发育密切相关。

*OsILP*是用拟南芥类整合素基因*ATI4A*序列在水稻数据库中BLAST寻找的基因,两者的编码蛋白同属DUF677家族。笔者所在实验室已有研究表明,*ATI4A*作为拟南芥中的类整合素,介导了细胞壁-质膜-细胞骨架连续体,在细胞的内外信号转导方面起着重要作用^[3]。从结构上来看,水稻*OsILP*含有胞外结构域、跨膜结构域、胞内结构域各1个,其分子结构与动物整合素更为类似。结构相似提示功能可能一致,*OsILP*是否为水稻中的类整合素及其与水稻种子发育、萌发及响应逆境胁迫的关系,还须进一步验证。

参考文献:

- [1] Bateman A, Coggill P, Finn R D. DUFs: families in search of function [J]. Acta Crystallographica Section F - Structural Biology and Crystallization Communications, 2010, 66(10): 1148 - 1152.
- [2] Nagpal P, Quatrano R S. Isolation and characterization of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* with partial sequence similarity to integrins [J]. Gene, 1999, 230(1): 33 - 40.
- [3] Lu B, Wang J, Zhang Y, et al. ATI4A mediates the cell wall - plasma membrane - cytoskeleton continuum in *Arabidopsis thaliana* cells [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(11): 4061 - 4069.
- [4] Hynes R O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines [J]. Cell, 2002, 110(6): 673 - 687.
- [5] Wegener K L, Partridge A W, Han J, et al. Structural basis of integrin activation by talin [J]. Cell, 2007, 128(1): 171 - 182.
- [6] Triplett J W, Pavalko F M. Disruption of alpha - actinin - integrin interactions at focal adhesions renders osteoblasts susceptible to apoptosis [J]. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2006, 291(5): C909 - C921.
- [7] Qin J, Vinogradova O, Plow E F. Integrin bidirectional signaling: a molecular view [J]. PLOS Biology, 2004, 2(6): 726 - 729.
- [8] Harburger D S, Calderwood D A. Integrin signalling at a glance [J]. Journal of Cell Science, 2009, 122(2): 159 - 163.
- [9] Legate K R, Wickström S A, Fässler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside - in signaling [J]. Genes & Development, 2009, 23(4): 397 - 418.
- [10] Wang Z, Chen C B, Xu Y Y, et al. A practical vector for efficient knockdown of gene expression in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 22(4): 409 - 417.
- [11] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立 [J]. 植物生理学报, 1998, 24(3): 259 - 271.
- [12] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double - stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806 - 811.
- [13] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. Nature, 2001, 409(6818): 363 - 366.
- [14] Sontheimer E J. Assembly and function of RNA silencing complexes [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005, 6(2): 127 - 138.
- [15] Zamore P D. RNA interference: listening to the sound of silence [J]. Nature Structural Biology, 2001, 8(9): 746 - 750.