556~ 593
5 Rao P N, Wilson B A, Sunkara P S, et al. Inducer of DNA synthesis present during mitosis of mammalian cells lacking G1 and G2 phases. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75: 5 034~ 5 047
6 Draetta G. Cell cycle control in eukaryotes. TIBS, 1990, 15: 378~ 384
7 Matthias P, Ira H. Joining the complex: cyclin_dependent kinase inhibitory proetins and the cell cycle. Cell, 1994, 79: 181~ 184
8 Bates S, Bonetta L, MacAllan D. CDK6(PLSTIRE) and CDK4(PSK_J3) are a distinct subset of the cyclin_dependent kinases that associate with cyclin D1. Oncogene, 1994, 9: 71~ 79
9 Ewen E M, Sluss K H, Whitehouse L L, et al. TGF_β Inhibition of CDK4 synthesis is linked to cell cycle arrest. Cell, 1993, 74: 1 009~ 1 020
10 江 虹, 冯 洁, 王永潮. V79 和 V79_8 细胞周期及其调控因子差异比较. 解剖学报, 1998, 29(4): 387~ 389
11 江 虹, 冯 洁, 王永潮. $P21^{cip1}$基因对 V79_8 细胞周期的影响. 解剖学报, 1998, 29(3): 264~ 269
12 江 虹, 王永潮. 哺乳类细胞中周期蛋白依赖激酶抑制因子. 生理科学进展, 1996, 27: 107~ 112

(1998-01-12 收稿)

抑制衰老的嵌合基因在水稻中的转化

付永彩 ④ 丁月云 刘新仿 孙传清 ④ 曹守云
王东江 何锶洁 王象坤 ④ 李良材 田文忠 *
(中国科学院遗传研究所, 北京 100101; ④中国农业大学植物遗传育种系, 北京 100094. * 联系人)

摘要 利用基因枪法把带有特异衰老基因 SAG_{12}启动子的 IPT 基因导入水稻, 经 PCR、点杂交以及 Southern 杂交分析, 证明外源基因已整合到水稻基因组中. 通过 GUS 活性、细胞分裂素含量的分析以及 T_1 代转基因植株成熟期的形态观察, 证明此抑制衰老的自我调节系统在部分转基因水稻中表达, 叶片衰老受到明显的抑制.

关键词 **水稻 特异启动子 IPT 基因 抑制衰老 基因枪转化**

近年来, 水稻叶片早衰问题越来越受到人们的重视. 水稻的许多品种, 特别是杂交稻, 在灌浆期叶片过早衰老, 严重影响产量. 利用喷施外源激素和常规育种的手段可以改善叶片的早衰性, 但这往往又受到生产成本和基因资源的制约. 因此, 迫切要求探索一条新的途径来解决水稻早衰问题.

叶片的生长发育是受基因调控的, 到一定阶段"衰老基因"开始启动、表达, 叶片开始衰老. Lohman 等人[1]从拟南芥中分离出一系列的与衰老有关的基因, 其中 SAG_{12}是一个衰老特异性很强的基因, 编码半胱氨酸蛋白酶, 这是一个转录水平上的正调控基因, 当叶片进入衰老阶段, 此基因开始表达. 叶片衰老受植物激素的调节, ABA 和乙烯可促进衰老, 细胞分裂素和赤霉素则延迟衰老. 异戊烯基转移酶(IPT)是催化细胞分裂素生物合成的一个关键酶. Akiyoshi 等人[2]从根癌农杆菌中把编码此酶的基因分离出来. Gan 等人[3]把 SAG_{12}的特异启动子与 IPT 基因连接起来, 组成了一个抑制衰老的自我调节系统. 当转基因植物叶片开始衰老时, 启

动子开始启动, IPT 基因开始表达, 细胞分裂素含量增加; 而当细胞分裂素增加到一定浓度, 叶片衰老延迟, 启动子关闭, 这就使基因产物保持一定水平, 从而防止了细胞分裂素的过量产生而影响植株的正常生长发育. 本试验试图把此基因转入水稻, 并研究其表达情况.

自 1991 年首次利用基因枪法把外源基因导入水稻[4] 以来, 这个转化系统不断完善, 先后获得了许多水稻转基因植株[5~7], 而与抑制衰老有关的基因在水稻上的转化, 尚未见报道.

1 材料与方法

( ) 水稻品种. 8706 偏籼型品系, 具有早衰特性; HP121 光壳稻, 杂交稻的重要恢复系.

( ) 质粒. 由美国 Wisconsin 大学 Amasino Richard M 教授提供. PSG529: 含有特异启动子 SAG_{12}和 IPT(异戊烯基转移酶) 基因; PSG514: 含有特异启动子 SAG_{12}和标记基因 GUS (β_葡萄糖酸苷酶), 用来检测特异启动子的表达情况. 筛选基因均为 NPT ㊦(新霉素磷酸转移酶) 基因(图 1).

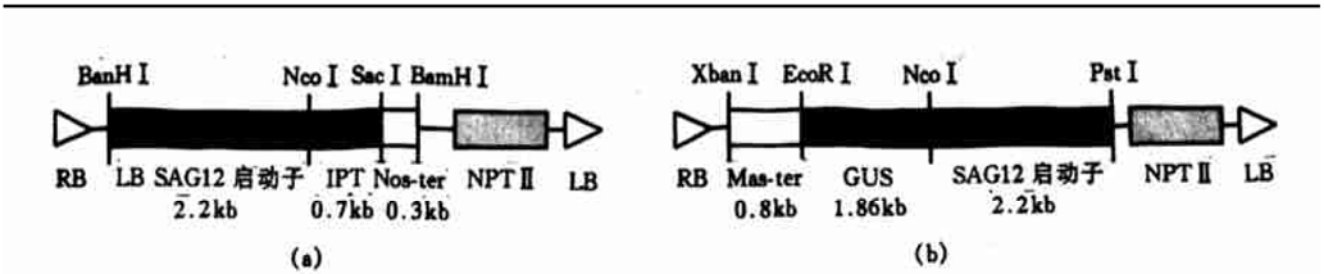

图 1 质粒 PSG529 的基因图谱(a) 和质粒 PSG514 的基因图谱(b)

( ) 培养基和基因枪转化. 基本与文献[7] 相同.

( ) 抗性愈伤组织的筛选及植株再生. 轰击后的 8706 愈伤组织先在含 G418(庆大霉素衍生物, 毒理机制与卡那霉素相同) 100 mg/L 的 NB 培养基中筛选 30 d, 再在含 G418 150 mg/L的 NB 培养基上筛选 21 d, 转入预分化培养基(G418 150 mg/L) 中光照培养 21 d, 然后在分化培养基(G418 100 mg/L) 中进行分化, 最后在含 G418 150 mg/L 的壮苗培养基上筛选 30 d 后移栽到温室土壤中. HP121 的筛选浓度在各个阶段均比 8706 低 20 mg/L.

( ) 抗性筛选基因 NPT ㊦的 PCR 扩增. PCR 扩增引物为 5′_TCGGCTATGAC-TGGGCA-CAACAGA_3′和 5′_AAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCG _3′, 扩增后进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳.

( ) 点杂交和 Southern 杂交. 基本按文献[8] 所述方法进行. 分别用 PSG514/Pst iv+Xba iv 4.8 kb 和 PSG529/BamH iv 3.2 kb 片段作为探针, 用相应的酶酶切水稻基因组.

( ) GUS 活性分析. 参考文献[9] 的方法, 用 F_4010(HITACHI) 型荧光分光光度计测 E365/455 值, 用考马斯亮蓝法(Bradford, 1976) 测定可溶性蛋白含量.

( ) 细胞分裂素含量的测定. 采用 ELISA 方法[10] 进行.

2 结果与分析

2.1 G418 抗性植株的获得与分子鉴定

表 1 列出了本实验转化的结果.

表 1 获得的转基因植株株系数及转化频率

品种	转化受体	质粒	轰击愈伤数	抗性愈伤组织数	NPT ㈦ PCR 阳性株系数	目的基因 Southern 杂交阳性株系数	转化频率/% (据 PCR 结果计算)
8706	成熟胚愈伤组织	PSG529	220	30	10	9	4.55
HP121	成熟胚愈伤组织	PSG529	140	6	5	3	3.57
8706	幼胚愈伤组织	PSG514	240	28	4	3	1.66
8706	成熟胚愈伤组织	PSG514	313	32	12	9	3.83

由于经过多轮的严格筛选, 所以大部分抗性植株对 NPT ㈦基因的 PCR 扩增都表现为阳性. 而目的基因的点杂交, 则有一些植株表现为阴性, Southern 杂交结果与点杂交结果相同(图片未全列出). 图 2 为 PSG529 转化 8706 的部分植株的 Southern 结果, 可见在 3.2kb 处有杂交带, 说明带有特异启动子的目的基因已整合到水稻基因组中. 图中还观察到有多条大于目的片段的杂交带.

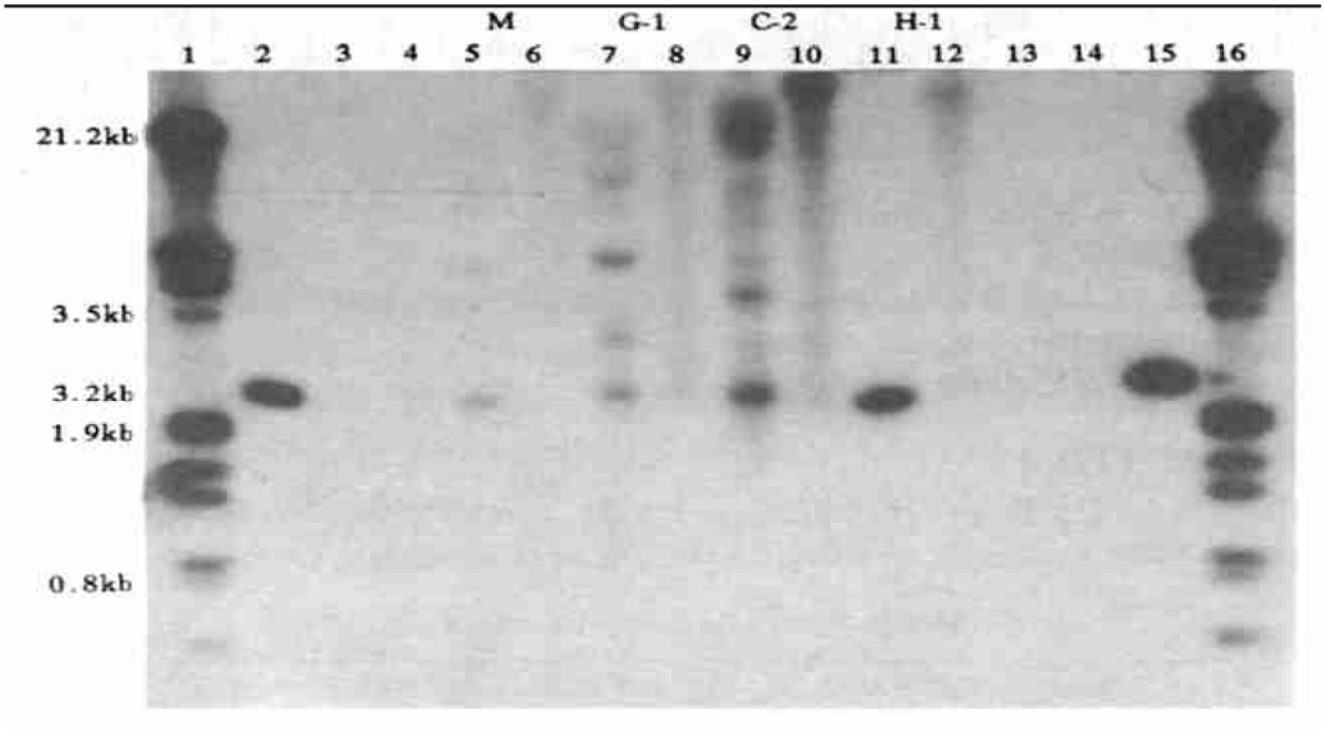

图 2 PSG529 转化 8706 部分转基因植株 Southern 杂交结果

1, 16 ——λEcoR iv+ Hind ㈣ 2, 15 ——PSG529; 3, 4, 13, 14 ——阴性对照; 5~ 12 ——转基因植株; 4, 6, 8, 10, 12, 14 ——基因组 DNA; 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 ——BamH iv酶切; M, G_1, C_2, H_1 ——转基因植株号

2.2 PSG514 转基因植株 GUS 活性分析

在水稻灌浆期, 测定了 PSG514 转化 8706 转基因植株叶片的 GUS 活性(图 3), 转基因株系 b, c, d 的上部幼嫩叶片(D1, D2) 的 GUS 活性变化不大, 而从上数第 3 个叶片(D3) 的 GUS 活性明显上升, 这可能由于这个节位的叶片已进入衰老阶段, 特异启动子已经启动, GUS 基因得到表达. 但也有的转基因植株未表现出这种趋势(图 3 中未列出). 由此可以看出不同转基因植株在外源基因表达上的差异.

2.3 PSG529 转基因植株叶片细胞分裂素含量的分析

在水稻灌浆期, 测定了 PSG529 转化 8706 植株叶片的细胞分裂素(异戊烯基腺嘌呤) 含量

(图 4). 转基因植株 B, C, G 的下部衰老叶片细胞分裂素含量明显高于上部幼嫩叶片以及对照, 说明 IPT 基因在衰老叶片中已表达. 而转基因植株 F 则比较特殊, 此株系分化出 5 个植株, 均表现出植株矮小, 生长不正常, 细胞分裂素含量大幅度升高, 这也许是由于抑制衰老的嵌合基因非特异性表达而产生了过量的细胞分裂素, 从而破坏了植株的正常生长发育. 其他植株的细胞分裂素含量图 4 中未列出, 其中有一些植株与对照没有明显的差异.

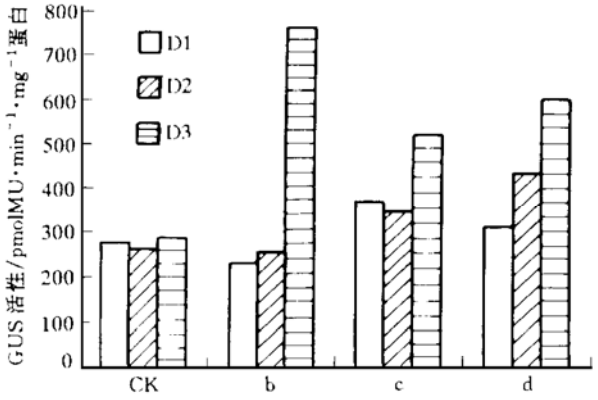

图 3 PSG514 转化 8706 转基因植株的 GUS 活性分析

CK ——未转化的植株; b, c, d ——转基因植株株系号; D1, D2, D3 ——分别是从上部数第 1、第 2、第 3 节位的叶片; MU ——4_甲基伞形酮

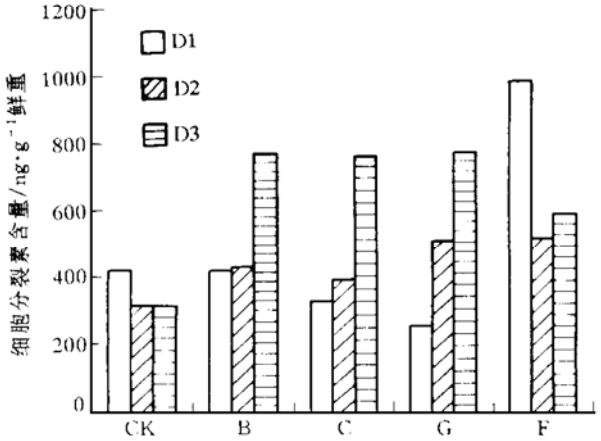

图 4 PSG529 转化 8706 转基因植株细胞分裂素含量分析

CK ——未转化的植株; B, C, G, F ——转基因植株株系号; 图示同图 3

2.4 转基因植株后代(T_1)分析

对转基因植株 T_1 代进行了 G418 抗性分析, 表 2 为部分转基因植株 T_1 代种子在 G418 150mg/L 的溶液中筛选 20 d 的实验结果, 抗性与非抗性植株的比例为 3∶1.

表 2 部分转基因植株 T_1 代对 G418 的抗性分析

转基因植株号	质粒	抗性植株数	非抗性植株数	抗∶非抗的预测值	X_c^2
8706C_1	PSG529	26	12	3∶1	$0.52 < X^2_{0.05,1} = 3.84$
8706G_2	PSG529	29	13	3∶1	$0.51 < X^2_{0.05,1} = 3.84$
8706p_1	PSG514	32	8	3∶1	$0.30 < X^2_{0.05,1} = 3.84$
8706a_2	PSG514	27	12	3∶1	$0.41 < X^2_{0.05,1} = 3.84$
8706CK		0	20	0∶1	$0 < X^2_{0.05,1} = 3.84$

同时, 把 PSG529 转化 8706 的部分 T_1 代种子在海南种植, 在水稻成熟期, 观察到有些植株叶片衰老受到明显抑制.

3 讨论

从分子生物学的角度来探讨植物叶片衰老问题, 已成为当前的研究热点. 人们试图利用基因工程的手段延迟植物叶片的衰老, 促进产量增加. 自从 Akiyoshi 分离出 IPT 基因以来, 先后有许多研究者, 把 IPT 基因连接上热、光、受伤诱导的启动子和组织特异性启动子, 转入植物, 延迟了叶片衰老, 但由于过量的细胞分裂素的产生, 使转基因植株的形态和生长发育表

现异常[11]. Gan 等人[3]构建的抑制衰老的自我调节系统解决了这个问题, 他把此基因转入烟草, 有效地延迟了叶片衰老, 而烟草的生长发育正常. 本试验利用基因枪法, 首次将此抑制衰老的嵌合基因转入水稻, 通过分子鉴定证明, 外源基因已整合到水稻基因组中; 通过 GUS 活性和细胞分裂素含量分析, 初步证明抑制衰老的自我调节系统在转基因水稻中得到表达. 从转基因植株 T_1 代的形态上观察到叶片衰老得到明显延迟. 这就有可能为解决水稻早衰问题提供一个有效的途径.

本实验 Southern 结果出现的大于目的片段的杂交带, 也许是外源基因在转化过程中发生了重排或缺失, 但至今还缺乏足够的实验给出确凿的证据. 由于基因枪法是把裸露的外源基因转入植物的, 因此易出现外源 DNA 的断裂、分离以及重排. 同时, 基因枪法易出现多拷贝现象.

试验表明, 外源基因在不同转基因植株中表达情况不同, 这可能与外源基因在转化植株中的整合位置、结构以及拷贝数有关. 许多因素的作用导致基因沉默或者表达效率的下降, 甚至使特异启动子丧失特异性. 而要进一步搞清这个问题, 应从 DNA 水平、RNA 水平以及蛋白质水平做更加深入细致的工作.

参 考 文 献

1 Lohman K N, Gan S, John M C, et al. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. Physiol Plant, 1994, 92: 322~ 3 289
2 Akiyoshi D E, Klee H, Gordon M, et al. T_DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 5 994~ 5 998
3 Gan S, Amasino R M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. Science, 1995, 270(22): 1 986~ 1 988
4 Christou P, Ford T L, Kofron M, et al. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Bio/Technology, 1991, 9: 957~ 962
5 Li L C, Qu R D, Kochko A, et al. An improved rice transformation system using the biolisticmethod. Plant Cell Reports, 1993, 12: 250~ 255
6 Qu R D, Kochko A, Tian W Z H, et al. Analysis of a large number of independent transgenic rice plant produced by the biolistic method. *In Vitro* Cell Dev Biol_Plant, 1996, 32: 233~ 240
7 郑宏红, 李良材, 田文忠, 等. 提高水稻基因枪转化效率的研究. 生物工程学报, 1996, 12(增): 111~ 115
8 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆, 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995
9 Jefferson R A, Kavanagh T A, Bervan M W, et al. GUS fusions: β_glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J, 1987, 6: 3 901~ 3 907
10 何钟佩. 农作物化学控制实验指导. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. 60~ 68
11 Gan S, Amasino R M. Making Sense of Senescence. Plant Physiol, 1997, 113: 313~ 319

(1998-02-09 收稿, 1998-04-24 收修改稿)