

文章编号: 1674-7054(2013)02-0146-07

水稻 *OsCERK2* 转基因植株的获得及初步分析

汪德锋^{1,3}, 陈 艳², 肖文芳^{1,3}, 符秀梅^{1,3}, 肖晓蓉^{1,3}, 黎秀琼², 庞金环², 陈银华^{1,3}

(1. 海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室 海南 海口 570228;

2. 中国科学院 微生物研究所 北京 100101; 3. 海南大学 农学院 海南 海口 570228)

摘 要: 以水稻粳稻品种日本晴为研究材料, 利用拟南芥 *CERK1* 的蛋白质序列检索, 在水稻基因组候选了与拟南芥 *CERK1* 同源的水稻基因 *OsCERK2*, 通过 RT-PCR 分离了该基因的全长 cDNA。生物信息学分析显示, *OsCERK2* 是一种含有信号肽的质膜蛋白, 胞外结构域含有 LysM 基序, 激酶结构域含有酪氨酸蛋白激酶结构域。构建了由 35S 启动子驱动该基因的过表达遗传转化载体和由玉米的泛素基因的启动子驱动的 RNA 干扰 (RNAi) 的遗传转化载体, 利用农杆菌介导的遗传转化技术, 将 *OsCERK2* 基因导入水稻, 得到 T_0 代转基因植株。对 T_0 代植株进行了 PCR 检测和半定量 RT-PCR 检测, 获得了 *OsCERK2* 有效表达的转基因植株。

关键词: 水稻 (*Oryza sativa*); *OsCERK2*; 基因分离; 载体构建; 遗传转化; RT-PCR

中图分类号: Q 812

文献标志码: A

在农业生产中, 由于水稻单一品种的大面积种植以及病原微生物致病性的进化, 许多水稻品种常常快速丧失对变异病原的抗性, 从而导致病害成灾, 如稻瘟病、纹枯病和白叶枯病已越来越成为影响水稻产量提高的重要制约因素。因此, 育种学家只有通过不断地更新水稻的抗病品种来满足生产需求。但是, 由于抗源有限和常规育种周期较长, 水稻的抗病性已经成为限制新品种培育的瓶颈。因此, 寻找有效的抗性基因资源是水稻抗病基因工程育种中非常重要的环节。近年来, 随着植物分子病理学学科的发展, 一系列的抗病基因被克隆。CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1) 是一种含有 LysM 基序的类受体蛋白激酶, 在免疫反应中起着非常重要的作用。几丁质是真菌细胞壁的组成成分, 被作为一种 PAMP (pathogen associated molecular pattern), 它能够被 CERK1 识别 (CERK1 是几丁质的受体)^[1]。在拟南芥中, CERK1 在几丁质诱导的免疫反应中起重要作用^[2]。AtCERK1 能参与免疫反应中细菌衍生肽聚糖的识别 (peptidoglycans, PGNs)^[3-4]。在水稻中, 同样存在 AtCERK1 的同源基因 *OsCERK1*^[5], 与 CEBiP (chitin elicitor binding protein) 协同调节几丁质的信号传导^[5]。CHEN 等^[6]的研究结果表明, *OsCERK1* 是在内质网中成熟的, 它通过囊泡运输途径运送到质膜, 其成熟和运输受 Hop/Stt1a-Hsp90 伴侣复合体的调节。虽说 AtCERK1 的作用在表达 AvrPtoB 蛋白的细菌与宿主植物中未能得到体现^[7-8], 但这并不能否定 AtCERK1 在植物免疫方面的功能。为了研究水稻免疫中是否存在类似 AtCERK1 的基因, 笔者根据 AtCERK1 的蛋白序列, 在水稻基因组数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 中候选 AtCERK1 的同源基因, 然后利用 RT-PCR 的方法进行克隆, 并构建植物表达载体, 再利用农杆菌介导的转化方法进行转化, 从而得到了转基因水稻植株, 为该基因功能的后续研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试水稻粳稻品种为日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* var. *Nippobare*), 由中国科学院微生物所提供。

收稿日期: 2013-04-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260345); 转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08009-41B)

作者简介: 汪德锋 (1987-), 男, 贵州思南人, 海南大学农学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 陈银华 (1976-), 男, 海南大学农学院教授, 硕士生导师。E-mail: yhchen@hainu.edu.cn

1.2 *OsCERK2* 基因的分离与生物信息学分析 利用拟南芥 *AtCERK1* 基因(NCBI 登录号: NM113058.3) 的蛋白质序列在水稻数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 进行 BlastP 检索, 选取同源性高的前几个进行 Motif Scan(<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN/>) 查找, 其中仅 *LOC_Os01g53840.1* 基因与 *AtCERK1* 基因共有 LysM 基序。在最初研究中, 将 *LOC_Os01g53840.1* 基因命名为 *OsCERK2*。提取水稻品种日本晴叶片的 RNA(RNA 提取参照 Trizol 的说明书), 反转录为 cDNA, 以此为模板进行 RT-PCR 克隆基因。扩增 *OsCERK2* 全长 cDNA 的引物序列为: *OsCERK2*-F: GGGGGTACCATGCCGCTCCCCGCGCCG(下划线为酶切位点 *Kpn* I), *OsCERK2*-R: GGGTTCGAATGGTGCAAGATCATTGCATT(下划线为酶切位点 *Csp*45 I), 扩增构建 *OsCERK2* RNAi 载体片段 P_{RNAi} 的引物序列为: P-F: GTCGACACTAGTTTGATGCGGCTAGAGGACTTG(下划线为酶切位点 *Spe* I), P-R: GGTACCGAGCTCCCGTGATTACTGCCTGCTTCA(下划线为酶切位点 *Sac* I)。PCR 产物在 $w = 0.8\%$ 的琼脂糖凝胶检测后, 回收目的片段并用 pUCm-T 克隆试剂盒克隆, 然后进行连接、质粒提取、酶切鉴定^[9] 检测正确的阳性重组克隆, 再由生工测序公司进行序列测定, 分析结果。利用生物信息学软件 ProtParam, SignalP, EuLoc 和 Pfam 分别分析新的候选蛋白 *OsCERK2* 的理化性质、信号肽、亚细胞定位和结构域。

1.3 *OsCERK2* 基因表达载体的构建

1.3.1 *OsCERK2* 基因过表达载体的构建 *OsCERK2* 的全长 cDNA 是用 *Kpn* I 和 *Csp*45 I 的酶切产物与经过同样酶切的质粒 pCambia1300(华美生物公司, CSB-PL200206) 相连接(见图 1A), 然后将连接产物转入大肠杆菌中得到转化子, 最后将提取质粒进行测序。其结果为 *OsCERK2* 的全长 cDNA 序列插入到质粒 pCambia1300 的 *Kpn* I 和 *Csp*45 I 位点间得到的载体, 被命名为 pCambia1300-*OsCERK2*, *OsCERK2* 基因, 它由 CAMV35s 启动子控制。

1.3.2 *OsCERK2* 基因 RNAi 载体的构建 用 *Spe* I 和 *Sac* I 酶切 P_{RNAi} 片段得到的酶切产物与经过同样酶切得到的 14 610 bp 的 pTCK303 载体^[11] 骨架连接(见图 1B), 使 P_{RNAi} 片段正向插入 pTCK303 载体的 *Spe* I 和 *Sac* I 位点间, 得到中间载体, 然后再用 *Sac* I 和 *Kpn* I 酶切 P_{RNAi} 片段, 得到的酶切产物与经过同样酶切得到的 14 612 bp 的中间载体骨架连接, 使该 PCR 产物反向插入中间载体的 *Sac* I 和 *Kpn* I 位点间, 得到重组载体, 最后经酶切鉴定后测序。

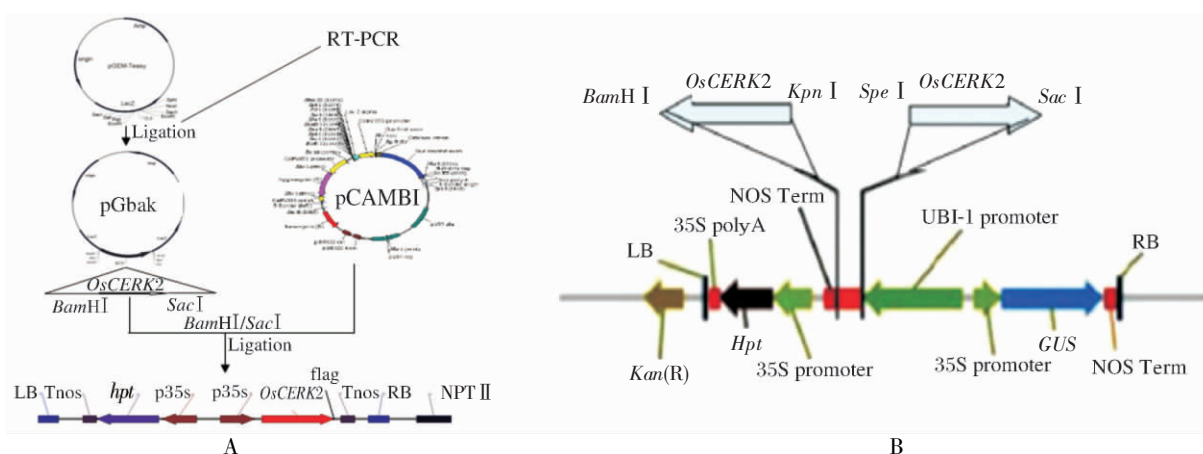


图1 植物表达载体的构建

A: 超量表达载体构建流程; B: RNAi 表达载体 T-DNA 区段结构图

Fig. 1 Construction of vectors

A: Constructing process of overexpressing vector; B: T-DNA structure in RNAi vector

1.4 农杆菌介导的水稻遗传转化 将构建完成的 pCambia1300-*OsCERK2* 和 pTCK-*OsCERK2* 分别转入农杆菌 LBA4404, 得到重组菌, 提取质粒, PCR 鉴定后用于水稻转化。水稻遗传转化方法和所用培养基参照文献[11-13]。

1.5 基因组 DNA 提取 水稻叶片基因组 DNA 提取用 CTAB 快速法, 具体步骤见文献[14]。取 2 μ L 的

DNA 溶液,在 $w = 0.8\%$ 的琼脂糖凝胶电泳中检测其完整性。

1.6 转基因 T_0 植株的 PCR 鉴定 对上述获得的 30 株 T_0 代转 *OsCERK2* 水稻和野生型水稻进行分子鉴定,提取各种水稻的基因组 DNA,标记基因潮霉素(*hpt*)的 PCR 扩增引物的序列为: *hpt*-F: AGTCAATGAC-CGCTGTTATGC, *hpt*-R: CTGATCGAAAAGTTTCGACAGC。反应体系为 20 μ L,其中包括: 10 $\times$ PCR Buffer (含有 $MgCl_2$) 2 μ L, 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTP 0.3 μ L, 10 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 正反向引物各 0.5 μ L, 模板 1 μ L, *Taq* 聚合酶(5 U $\cdot$ μ L⁻¹) 0.2 μ L, 用双蒸水补足体积至 20 μ L。反应条件: 先 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 55 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 45 s, 29 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。以野生型水稻为阴性对照,质粒 pCAMBIA1300-*OsCERK2* 和 pTCK-*OsCERK2* 分别作为阳性对照。

1.7 转基因植株中 *OsCERK2* 基因的表达检测 RNA 的提取参照 Trizol(Invotrigen)的说明书,充分研磨叶片,加入 Trizol 充分裂解;加入氯仿充分抽提;取上层水相,加入异丙醇到水相沉淀 RNA;用 $\varphi = 75\%$ 的乙醇充分洗涤、沉淀 RNA;室温晾干或真空干燥 5 ~ 10 min;加适当的 RNase-free ddH₂O 溶解 RNA。

第 1 链 cDNA 的合成参照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit K1622 试剂盒(Thermo)说明书操作。

在 T_0 代转基因植株中,选取 4 个过表达株系和 2 个 RNAi 株系进行 *OsCERK2* 的表达检测。水稻甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPDH*)的表达量用于 RNA 样品的均一化评价,分析基因的表达量。扩增 *OsCERK2* 用引物: *OsCERK2*-F: TCAGGTATGGAGATGTATCAG; *OsCERK2*-R: AGGAGAGCAATAAGCAATCA。扩增 *GAPDH* 用引物: *GAPDH*-F: ACAGGGGAGTTGTGTTTTTC; *GAPDH*-R: CCCAACCAACCACCATGATA。其反应体系为 20 μ L,其中包括: 10 $\times$ PCR Buffer (含有 $MgCl_2$) 2 μ L, 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTP 0.3 μ L, 10 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 正反向引物各 0.5 μ L, 模板 1 μ L, *Taq* 聚合酶(2 U $\cdot$ μ L⁻¹) 0.4 μ L, 用双蒸水补足体积至 20 μ L。反应参数设置: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 54 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 30 s, 反应循环数 25 ~ 30 个; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

2 结果与分析

2.1 *OsCERK2* 基因的分离及其生物信息学分析

2.1.1 *OsCERK2* 基因的分离 以水稻品种日本晴叶片制备的 RNA 反转录成的 cDNA 作为模板进行 RT-PCR 反应,分别扩增 *OsCERK2* 的全长 cDNA 和用于 RNAi 载体构建的部分 *OsCERK2* 片段,反应完成后将 PCR 产物电泳检测。从图 2 可以看出,泳道 1 为基因全长扩增的产物,经测序为 2 139 bp, BlastN 比对测序结果表明,该扩增序列为 *OsCERK2* 的全长 cDNA 序列;泳道 2 ~ 6 为 RNAi 载体构建的部分片段的扩增产物,经测序 5 个产物均为 542 bp, BlastN 比对测序结果表明,各个产物都一样,该扩增序列图 3 中自 5' 末端第 1 508 ~ 2 049 位核苷酸,将其命名为 PRNAi。

2.1.2 生物信息学分析 利用软件 ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/) 在线预测 *OsCERK2* 蛋白的理化性质,分析得出编码蛋白包含 712 个氨基酸残基,相对分子质量为 76.852×10^3 ,理论等电点为 6.50,为酸性氨基酸,无稳定参数为 36.87,推测该蛋白为稳定蛋白。原子总数为 10 753,分子式为 C₃₄₂₀H₅₃₅₂N₉₁₈O₁₀₃₁S₃₂。用 SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) 在线分析 *OsCERK2* 的蛋白质序列信号肽,结果见图 4。从图 4 可以看出,*OsCERK2* 蛋白有信号肽,信号肽的剪切位点在第 30 个与第 31 个氨基酸位置之间,说明该蛋白能够在细胞内转运。利用由台湾国立中央大学开发的 EuLoc^[15] 预测 *OsCERK2* 亚细胞定位,预测结果表明,*OsCERK2* 是一种质膜蛋白,说明该蛋白可能参与感受信号或作为物质的“载体”。用 Pfam (http://pfam.janelia.org/) 在线分析 *OsCERK2* 的结构域如图 5 所示,在氨基酸 401 ~ 684 的区域存在 Protein tyrosine kinase 结构域,说明该蛋白能催化多种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化,从而在植物的生长和发育过程中起作用;在氨基酸 180 ~ 220 的区域存在 LsyM 基序,说明该蛋白可能参与肽聚糖、几丁质等物质的识别,也可能参与植物免疫。

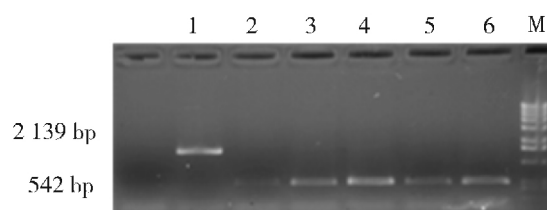


图 2 *OsCERK2* 的全长 cDNA 和部分 cDNA PCR 扩增
1: 全长 cDNA 的扩增; 2 ~ 6: 构建 RNAi 载体的片段 5 个重复; M: Marker

Fig. 2 Full-length cDNA and part of cDNA of *OsCERK2*
1: Full-length cDNA, 2—6: Five same fragments of constructing RNAi vector, M: Marker

ATGCCGCCCTCCCCGCCCGCCGCCCGCCGCCGCCGCCGGCTTCTCATCTCTCTCATCTTCTCTGCGCTCGCCTCCCCCGCGCGAAGTCGCC
GGTGATGACGCCGCCCGCCGGAATGTCACCGCCTCGCGCCGCTCCCTTGTCTCCGAGCTCTCGCGCGTCTGCACGGCGTTCTGCGC
GTTCCCGCGCGCGCGGAGGCCGGAACGCCTCCGTGCTGGAGTCCATGTTTCGACGCCGCGCGCGGGGACATCACGGCCGACGCG
GCCGCCAGCCCCGGGTACGCGTTCTGTCGCAAGAACTGCTCTGCTCGCCTCCCGCACATACCTCGCCAATACGACCTACACTGT
CCCCTCGCGCGCGCGCGGGCGACGGCGAACGCCACGGCGGCGCGACGTGGCTGCCGCGCGGTACGCGGGGTAGCCGTGCCGCC
GCCGGGCGGACCGGCTCTGCGGCCGCCGCGCCCCGGCGCCGTGGTGGCTCTCCACCTGCTCTGTGGCTGCTCATCCGGCCCCCTGGA
ACTATCTCTCAGCTACGTGCGCGTCGACGGAGACACGGTGCAATCGCTATCAAGTCGGTTCCGGGCCAGCATGGACGCCATCGA
GGCCGCCAATGGCATGGCCGGCCCTGATCTATAACCACGGGAAAGGTGTACTACATCCACTCAAACCTAGGTGAACAAATGTTT
AGCGATCATTTACTCCGGCAATTTGATCAATCAAACCTTCCTATTACACACGTTCTTGACAACCATATCCCGTGATATCTCCTTC
CTCTCTACTCTGTGCCAGCACCCGCACAAAATACATTCTCAGGTATGGAGATGTATCAGAACATCATTCCACAAAATTCCTTFA
TGGATGGGTTATTGGCAGCATGGGAGTTGCACTTGCTTTGATTGCTATTGCTCTCCTTGCACTTGTTCTGTGCAAGCTCTCCCAATA
CAATCCCCAAGCTCCAAATAACCAGGGAAAGAGCCCAGACCAGTCTATATCACACAAGTTTCAACTTCTTAAGAGTGGTAGTTTTT
GTTATGGTTCTGGAAGATACTTATGTTGCCAATTTGGAAATGTGAAACAATCAAGAACGGATGGCAGTATCATATGAATAACC
CCAAAAGGTGTTGTAGTGGACGTGTTTGATAGGGAGAAGCCCATTGTGTTTACCTATCAAGAAATACTTGCATCAACCGATTTCATT
TTCTGATGCAAATCTTCTGGGTATGTTACATATGGCTCTGTTTATTATGGTGTTCTTTCGAGACCAGGAGGTCGCTATAAAGAGAAT
GACAGCAACTAAACTAAAGAGTTTATAGTGGAGATGAAAGTTCTTTGTAAGGTCCATCATGCCAGTCTGGTAGAGTTGATTGGCT
ATGCAGCAAGCAAGGATGAACCTATACCTTATTTACGAGTACTCTCAAAAAGGTTCACTCAAGAAATCACCTTCATGATCCTCAAAGC
AAAGGTTACACATCATTGTCTTGATCTACAGGGTCCAAATTGCTCTTTGATGCGGCTAGAGGACTTGAATACATTCATGAGCATA
AAAGGATCATTATGTTTACAGGGACATCAAATCGAGTAACATCTTGCTCGATGAATCCTTCAGAGCAAAGATTTCAGATTTTGCTC
TTGCAAAACTGGTAGTGAAGTCAAAGTATGTCAGAGGCTTCTGTACAAAAAGTTGTGGGTACATTTGGTTACTTGGCCCTGAATAC
TTGCGCGATGGCTGGCAACTACGAAAAATGATGTTTATGCTTTTGGAGTAGTACTTTTTGAGTTAATATCTGAAAGGAGGCAAT
TACAAGGACTGATGGATTGAACGAAGGATCAAACCTCAGAAAGGCGTTCTTGGCATCAGTTATGTTGAGTGCATAAAGAATTGT
CGTAACTCAATGTATATGGGGAGCCTGAAAGACTGCATTGACCTAATCTAATGGACCTGTATCCACATGACTGTGTATACAAGA
TGCCCATGTAGCGAAACAGTGGCTGGAGGAAGATCCTGTTCTTCGGCCAGACATTGAAGCAGGCAGTAATCACGCTATCGCAA
TACTGCTGTCTCGATCGAGTGGGAAGCGACGCTAGCTGGGAACAGCCAAGTGTTCAGTGGCTCTGTGGCTGGGAGGTGA

图3 *OsCERK2* 全长 cDNA 序列

下划线为直线的序列为 *OsCERK2* 全长扩增引物序列; 下划线为波浪线的序列为扩增 RNAi 载体构建片段 PRNAi 的引物序列

Fig. 3 *OsCERK2* full-length cDNA sequence

Primer sequences of *OsCERK2* full-length amplication and fragment of constructing RNAi vector were marked by straight line and straight line, respectively

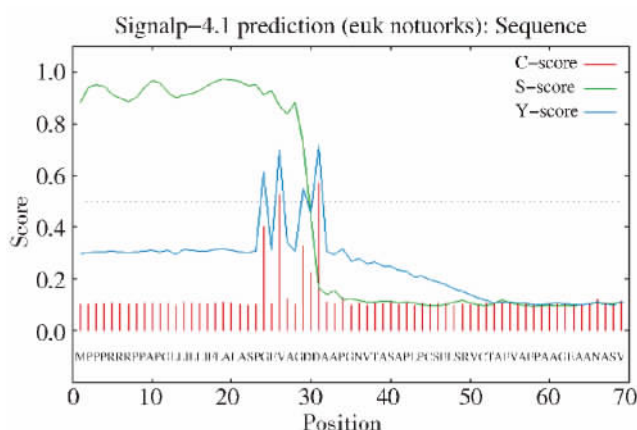


图4 OsCERK2 信号肽分析

Fig. 4 Singal peptide prediction in OsCERK2



图5 Pfam 分析 OsCERK2 的结构域

Fig. 5 Analysing domain of OsCERK2 by Pfam

2.2 过表达和 RNAi 载体的构建 构建好的过表达载体酶切鉴定结果见图 6。从载体上切下 1 条约 2 000 bp 的条带进行测序,结果表明 *OsCERK2* 的全长 cDNA 插入到质粒 pCambia1300 的 *Kpn*I 和 *Csp*45I 位

点间,过表达载体 pCAMBIA1300-*OsCERK2* 即成功构建,*OsCERK2* 基因置于 CAMV35s 启动子的控制下。

构建的 RNAi 载体酶切鉴定电泳检测结果见图 6。从构建的载体 pTCK303-*OsCERK2* 上切下 1 条 500 bp 的条带进行测序,结果表明,该重组载体为 P_{RNAi} 将插入 pTCK303 载体的 *Spe* I 和 *Sac* I 酶切位点间,且 P_{RNAi} 反向互补片段插入 pTCK303 载体的 *Sal* I 和 *Kpn* I 酶切位点间得到的载体,被命名为 pTCK-*OsCERK2*。该具有反向重复的重组表达载体的启动子为 ubiquitin。

2.3 农杆菌介导的水稻遗传转化 将消毒过的去皮种子接种到共培养基上 2~3 d 后种子开始萌发,10 d 后将种子盾片上的愈伤组织切下,转移到共培养基上,21 d 后可看到淡黄色的愈伤组织。挑选松脆、生长状况良好、颜色淡黄的胚性愈伤组织,剥碎后用含有表达载体的农杆菌感染,再接种到 NA 培养基上,25 °C 下暗培养 2~3 d 后,用无菌水和含有 500 mg · L⁻¹ 的头孢霉素 + 200 mg · L⁻¹ 的氨基青霉素的无菌水清洗愈伤组织数次,再将愈伤组织转移到选择培养基上进行抗性愈伤组织的筛选。25 °C 下暗培养 28 d 后,再转移到新鲜的培养基上增殖抗性愈伤组织。21 d 后,将生长状态良好的潮霉素抗性愈伤组织转移到预分化培养基上,在 25 °C 下培养 21 d 后,可产生白色致密的抗潮霉素的胚性愈伤组织,并将其转移到分化培养基上,在 25 °C 下光培养 7 d 后,可看到愈伤组织分化出生根的转花苗,并将其移至生根培养基上培养。待转化苗长到合适大小时,经炼苗后移至田间种植(见图 7)。

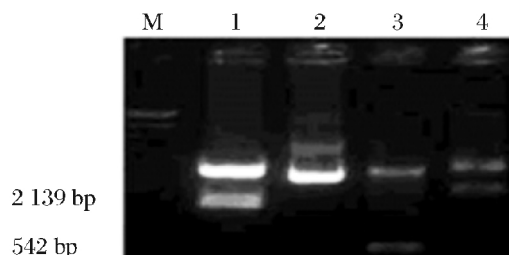


图 6 表达载体酶切检测

1: 过表达载体 pCAMBIA1300-*OsCERK2* 酶切; 2: 对照质粒 pCAMBIA1300-*OsCERK2*; 3: RNAi 载体 pTCK303-*OsCERK2* 酶切; 4: 对照质粒 pTCK303-*OsCERK2*

Fig. 6 Cleavage analysis of Expression vectors

1: Digestion of Overexpressing vector pCAM-BIA1300-*OsCERK2*; 2: Control Plasmid pCAM-BIA1300-*OsCERK2*; 3: Digestion of RNAi vector pTCK303-*OsCERK2*; 4: Control plasmid pTCK303-*OsCERK2*

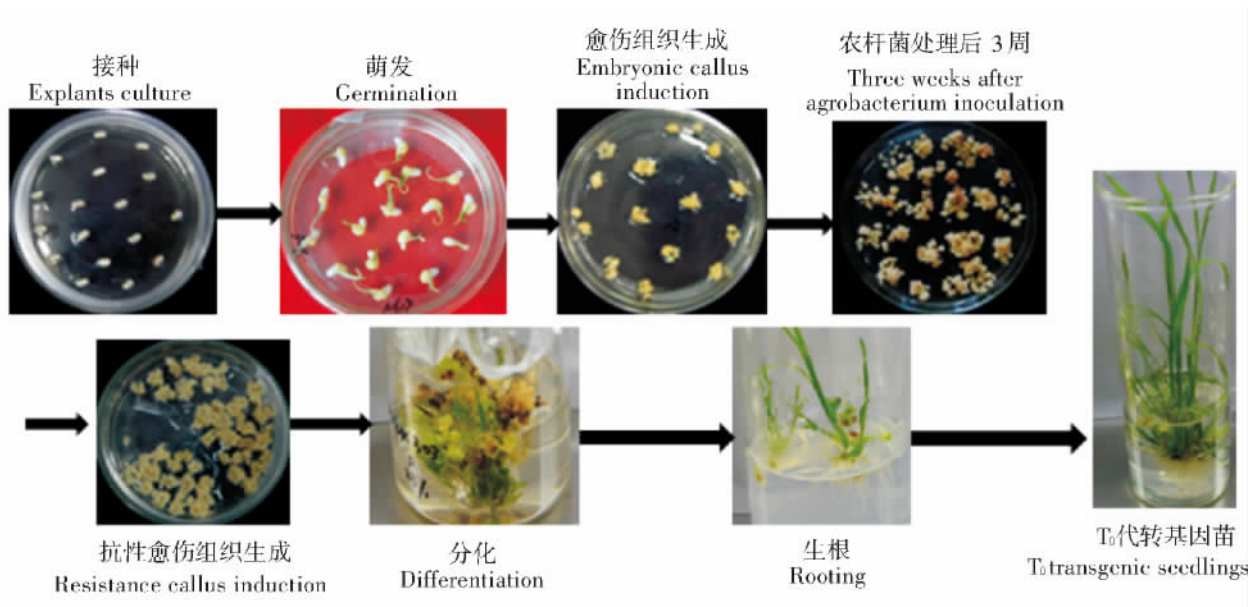


图 7 水稻遗传转化流程

Fig. 7 Genetic transformation of rice

2.4 基因组的提取和转基因 T₀ 代植株的 PCR 鉴定 由 CTAB 提取的基因组 DNA 电泳检测如图 8 所示,从图 8 可以看出,DNA 电泳条带非常集中,没有弥散及伴生次带,表明该总 DNA 完整性好,能满足实验要求。将其作为转基因植株 PCR 鉴定的模板,PCR 反应完成后,用电泳检测该产物(见图 9),从图 9 可以看出,1~29 号过表达转化系中有 3 个阴性植株(编号为 17,19,28),其余为阳性植株,30 和 31 号分别

为阳性对照和阴性对照; 32~61号 RNAi 转化系中, 49、50、61号为阴性株系, 其余为阳性株系。62和63号分别为阳性对照和阴性对照。从图9可以看出, 过表达和 RNAi 的转基因植株阳性率分别为 89.7% 和 90.0%, 两类转基因植株的阳性率基本一致, 说明农杆菌介导的遗传转化技术较稳定。

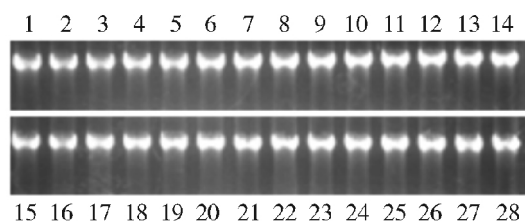


图8 基因组的琼脂糖电泳检测

编号1~14表示转基因过表达的株系; 编号15~28表示转基因 RNAi 的株系

Fig. 8 Detecting genome by agarose gel electrophoresis
1—14: Overexpressing lines; 15—28: RNAi lines

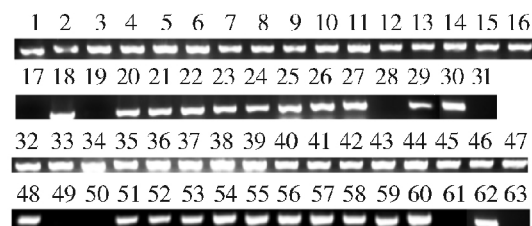


图9 转基因株系的 PCR 鉴定

1~29: 过表达的转化系; 30: 质粒 pCambia1300-*OsCERK2*; 32~61: RNAi 的转化系; 62: 质粒 pTCK303-*OsCERK2*; 31、63: 野生型日本晴

Fig. 9 PCR identification of transgenic lines
1—29: Overexpressing lines; 30: Plasmid pCambia1300-*OsCERK2*; 32—61: RNAi lines; 62: Plasmid pTCK303-*OsCERK2*; 31, 63: Wild-type Nipponbare

2.5 转基因植株中 *OsCERK2* 基因的表达检测 用半定量 RT-PCR 分析了转基因株系中 *OsCERK2* 的表达, 以水稻 *GAPDH* 作为内参, 反应完成后, 电泳检测。从图10可以看出, 过表达的株系 OE30、OE42、OE56、OE57 中, *OsCERK2* 的表达量较野生型强; 而 RNAi 株系 RNAi-54 和 RNAi-57 中, *OsCERK2* 的表达量比野生型弱。由此说明, 通过遗传转化得到的转基因植株中, *OsCERK2* 的表达量增加或被抑制, 也得到了有效的转基因植株, 可以用来分析该基因的功能。

3 讨论

2002年科学家发表了水稻全基因组框架序列图, 为今后克隆基因并研究其功能奠定了基础。在水稻遗传转化中, 农杆菌介导的遗传转化已成为一种常用技术, 在水稻抗病研究中具有重要作用。LIU等^[16]利用农杆菌介导遗传转化方法将 *LYP4* 和 *LYP6* 过表达载体导入水稻, 得到的 *LYP4* 和 *LYP6* 过表达转基因系对稻瘟病和水稻白叶枯病都表现出一定的抗性。ABBRUSCATO等^[17]利用农杆菌介导遗传转化方法, 将 *OsWR-KY22* 过表达载体导入水稻品种日本晴, 得到的过表达转基因系对稻瘟病表现出抗性。由此可见, 农杆菌介导的遗传转化可以得到抗病的转基因植株。

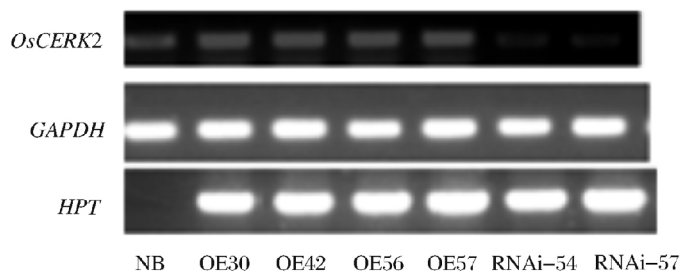


图10 转基因株系中 *OsCERK2* 的表达检测

NB 为野生型日本晴; OE30、OE42、OE56 和 OE57 为过表达株系; RNAi-54 和 RNAi-57 为 RNAi 株系; *GAPDH* 为内参; *HPT* 为标记基因潮霉素磷酸转移酶基因

Fig. 10 *OsCERK2* expression in transgenic plants
NB: Wild-type Nipponbare, OE30, OE42, OE56 and OE57: Four independent overexpressing homozygotes, RNAi-54 and RNAi-57: Two independent RNAi homozygotes, *GAPDH*: Internal control, *HPT*: Hygromycin phosphotransferase gene

AtCERK1 和 *OsCERK1* 在免疫反应中起重要作用, 它能够识别真菌的几丁质和细菌的肽聚糖, 从而诱发防御反应, 对病原菌表现出抗性。笔者利用生物信息学的方法, 在水稻基因组数据中查到了1个与两者同源性高的基因 *OsCERK2*, 三者都属于蛋白激酶酪氨酸蛋白激酶亚家族, 还含有 LysM 基序。蛋白激酶酪氨酸蛋白激酶亚家族的蛋白在植物生长发育过程中起重要作用, 含有 LysM 的蛋白在几丁质诱导的防御反应中起重要作用^[18]。笔者对 *OsCERK2* 转基因 T₀ 代植株进行了病害接种试验, 发现 *OsCERK2* 与水

稻的抗病性有关。因此推测 *OsCERK2* 可能也在水稻的免疫反应中起作用。生物信息学分析的结果为进一步研究该基因在水稻生长发育和免疫反应等功能指出了方向。转基因植株的获得为深入研究该基因在水稻生长发育中的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] AYAKO M ,PREMKUMAR A ,TOMONORI S ,et al. *CERK1* a LysM receptor kinase is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis* [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. 2007 ,104: 19613.
- [2] WAN Jinrong ,ZHANG Xuecheng ,DAVID N ,et al. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell 2008 20: 471 – 481.
- [3] GIMENEZ-IBANEZ S ,NTOUKAKIS V ,RATHJEN J P ,et al. The LysM receptor kinase *CERK1* mediates bacterial perception in *Arabidopsis* [J]. Plant Signaling & Behavior 2009 4(6) : 539 – 541.
- [4] WILLMANN R ,LAJUNEN H M ,ERBS G ,et al. *Arabidopsis* lysin-motif proteins *LYM1* *LYM3* *CERK1* mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. 2011 ,108: 49.
- [5] SHIMIZU T ,NAKANO T ,TAKAMIZAWA D ,et al. Two LysM receptor molecules *CEBiP* and *OsCERK1* cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice [J]. The Plant Journal 2010 64: 204 – 214.
- [6] CHEN L ,HAMADA S ,FUJIWARA M ,et al. The Hop/Sti1-Hsp90 chaperone complex facilitates the maturation and transport of a PAMP receptor in rice innate immunity [J]. Cell Host & Microbe 2010(7) : 185 – 196.
- [7] GIMENEZ-IBANEZ S ,HANN D R ,NTOUKAKIS V ,et al. *AvrPtoB* targets the lysM receptor kinase *CERK1* to promote bacterial virulence on plants [J]. Current Biology 2009 ,19: 423 – 429.
- [8] ZENG L ,VELÁSQUEZ A C ,MUNKVOLD K R ,et al. A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by *AvrPtoB* [J]. The Plant Journal 2012 69: 92 – 103.
- [9] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社 2002.
- [10] WANG Z ,CHEN C ,XU Y ,et al. A practical vector for efficient knockdown of gene expression in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Molecular Biology Reporter 2004 22: 409 – 417.
- [11] 高立宏 ,路云侠 ,柴娜 ,等. 水稻转座子 Pong RNAi 载体的构建和农杆菌介导的遗传转化 [J]. 东北师大学报: 自然科学版 2011 43(2) : 117 – 123.
- [12] 刘巧泉 ,张景云 ,王宗阳 ,等. 根瘤农杆菌介导的水稻高转化系统建立 [J]. 植物生理学报 ,1998 24(3) : 259 – 271.
- [13] 翟文学 ,李晓兵 ,田文忠 ,等. 由农杆菌介导将白叶枯病抗性基因 *Xa21* 转入我国 5 个水稻品种 [J]. 中国科学(C 辑) , 2000 30(2) : 200 – 206.
- [14] 张凤娟 ,张满良 ,朱水芳 ,等. 一种改进的水稻总 DNA 的快速提取方法 [J]. 植物检疫 2004 18(18) : 330 – 332.
- [15] CHANG T H ,WU L C ,LEE T Y ,et al. EuLoc: a web-server for accurately predict protein subcellular localization in eukaryotes by incorporating various features of sequence segments into the general form of Chou's PseAAC [J]. J. Comput. Aided Mol. Des. 2013 27: 91 – 103.
- [16] LIU B ,LI J F ,AO Y ,et al. Lysin motif-containing proteins *LYP4* and *LYP6* play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity [J]. The Plant Cell 2012 24(8) : 3404 – 3419.
- [17] ABBRUSCATO P ,NEPUSZ T ,MIZZI L ,et al. *OsWRKY22* a monocot *WRKY* gene ,plays a role in the resistance response to blast [J]. Molecular Plant Pathology 2012 ,13(8) : 828 – 841.
- [18] GUST A A ,WILLMANN R ,DESAKI Y ,et al. Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity [J]. Trends in Plant Science 2012 ,17(8) : 495 – 502.

(下转第 159 页)

Survival Competitiveness Between Common Wild Rice and the F_1 Hybrids of Its Cross with *bar* Transgenic Rice

QIAO Jian , XU Lixin , YU Huanhui , LI Houqi , YUAN Qianhua

(College of Agronomy , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: Yacheng , Wanning and Dongfang populations of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff) were crossed with *bar* transgenic rice B2 (male parent) to produce F_1 hybrids (“Bar-wild hybrids”) . The growth competition between the common wild rice and the Bar-wild hybrids was analyzed by comparing their performance in seed viability , growth characteristics , seed set , regeneration ability and other key agronomic traits under field conditions. The Bar-wild hybrids generally had a higher germination rate than the common wild rice. The Bar-wild hybrids were not much different in flag leaf area and tiller number from the common wild rice in monoculture but had higher relative competitiveness ability than the common wild rice in mixed culture. The Bar-wild hybrids generally had a high seed set percentage but had a lower ratooning rate (regeneration of the stubbles) than the common wild rice.

Key words: transgenic rice; *bar*; common wild rice; F_1 hybrids; survival competitiveness

(上接第 152 页)

Obtaining and the Preliminary Analysis of Rice *OsCERK2* Transgenic Plants

WANG Defeng^{1 3} , CHEN Yan² , XIAO Wenfang^{1 3} , FU Xiumei^{1 3} , XIAO Xiaorong^{1 3} ,
LI Xiuqiong² , PANG Jinhuan² , CHEN Yinhua^{1 3}

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources , Hainan University , Haikou 570228 , China ;

2. Institute Of Microbiology Chinese Academy of Sciences , Beijing 10010 , China;

3. Agriculture College of Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: In this study , *Oryza sativa* ssp. *japonica* var. Nipponbare used as material , the Arabidopsis *CERK1* was used to retrieve its homologous genes in the rice genome and a rice homologous gene *CERK2* , *OsCERK2* was obtained , which cDNA of *OsCERK2* was isolated by RT-PCR. Bioinformatics analysis showed that *OsCERK2* was a plasma membrane protein including a signal peptide , its extracellular domain included an LysM domain , its kinase domain included a protein tyrosine kinase domain. Overexpression vector driven by 35S promoter and RNA interference (RNAi) vector driven by maize ubiquitin promoter were constructed. The *OsCERK2* gene was then transferred into rice by Agrobacterium-mediated transformation. T_0 transgenic plants were obtained from each vector. Amplifying T_0 transgenic plants by PCR and RT-PCR showed transgenic plants with efficient expression were gained. The results would lay a foundation on further studying functions of *OsCERK2*.

Key words: *Oryza sativa*; *OsCERK2*; gene isolation; vector construction; Genetic transformation; RT-PCR