

禾谷类作物雄性不育及育性恢复表达载体的构建^{*}

张晓国² 刘玉乐¹ 杨清平² 田 波¹

(1 中国科学院微生物研究所 北京 100080) (2 武汉大学生命科学院 武汉 430072)

提 要 通过 PCR 反应扩增出了玉米花药特异启动子 CA 55, 将其分别与 Barnase 和 Barstar 基因融合, 构建成了植物雄性不育基因 CA 55BNNO S 和其育性恢复基因 CA 55BSNO S, 再将它们分别插入到 pCAMB IA 3300 中, 获得了应用于禾谷类作物的基因工程雄性不育及其育性恢复的表达载体。

关键词 雄性不育, 育性恢复, 表达载体, 禾谷类作物

CONSTRUCTION OF EXPRESSION VECTORS FOR CEREAL MALE STERILITY AND ITS FERTILITY RESTORATION

Zhang Xiaoguo² Liu Yule¹ Yang Qingping² Tian Bo¹

(1 Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences Beijing 100080)

(2 College of Life Sciences, Wuhan University Wuhan 430072)

Abstract The tapetum-promoter (CA 55) was amplified from the total DNA of *Zea mays* L. by polymerase chain reaction, and was fused with barnase (BN) and barstar (BS) genes, respectively. The male sterile gene CA 55BNNO S and its fertility restoration gene CA 55BSNO S were constructed. They were cloned into pCAMB IA 3300, respectively. The expression vectors for cereal male sterility and its fertility restoration were obtained.

Key words Male sterility, Fertility restoration, Expression vector, Cereal

1990 年 Mariani 等用花药特异表达基因 TA 29 启动子与 Barnase 基因融合成植物雄性不育基因, 经遗传转化首次获得了烟草基因工程雄性不育系^[1]。2 年后, 他们又用 TA 29 启动子与 Barstar 基因融合, 通过转基因获得了能使烟草基因工程雄性不育系育性得以恢复的基因工程雄性不育恢复系, 从而开创了通过基因工程进行植物杂种优势利用的新课题^[2]。由此, 国内外的研究者纷纷利用这一策略在烟草、油菜、花椰菜、莴苣等双子叶植物上成功地获得了转基因的雄性不育系^[3~ 7]。但是单子叶植物如重要的禾谷类作物乃是极少地报道获得基因工程雄性不育系, 这主要是因为植物花药特异启动子来源于烟草、拟南芥、矮牵牛、油菜以及蕃茄的居多。Shimamoto 研究了转基因植物启动子功能, 认为

收稿日: 1998-10-18, 修回日: 1998-12-30。第一作者: 男, 1963 年出生, 副教授(博士), 主要从事发育遗传学研究。

^{*} 国家“863”计划和武汉市晨光计划资助的课题。

来源于单子叶植物启动子难以在转基因的双子叶植物启动外源基因中表达,然而在转基因单子叶植物中启动它高效表达^[8]。因此,需要发掘和利用新的植物花药特异启动子。笔者应用的 CA 55 启动子是来源于玉米的花药绒毡层特异启动子,由此构建的植物雄性不育及育性恢复表达载体,它适合于应用基因工程创造禾谷类作物雄性不育系和其相应的恢复系。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

玉米(*Zea mays* L.) D 黄 17 来自中国农业科学院作物育种栽培研究所。常规菌种大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α JM 109 和 TG1 由中国科学院微生物研究所提供。pGEM 7Z- Φ BNNOS 和 pGEM 7ZBS 已由我们构建而成^[9]。质粒 pCAMB A 3300 由澳大利亚 CAMB A (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture) 的 Dr. Jefferson RA 提供。限制性内切酶及其他工具酶购自 Promega、Boehringer Mannheim、Gibco BRL, 华美等公司。WizardTM Plus Miniprep DNA 纯化系统购自 Promega 公司; α -³²P-dCTP 和 α -³⁵S-dATP 为 DuPont 公司产品; PCR 引物由中国科学院微生物研究所生物技术中心合成; 常用化学药品购自国内各公司或厂家。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用 Rogers 介绍的 CTAB 方法提取玉米基因组总 DNA^[10]。

1.3 花药特异启动子序列测定

参考 Pharmacia T₇ DNA 聚合酶序列分析试剂盒的操作指南进行。

1.4 花药特异启动子的扩增

引物设计参照世界专利文献 WO 92/13956 记载的碱基序列^[11], 所设计的引物 pCA 55-1 和 pCA 55-2 如下:

pCA 55-1: 5' CGGGTACCA TGGCTGCA GCTA GTTA GC3'

Kpn I

pCA 55-2: 5' CGGAATTCTGGTA TGCA TCAA TA GA GCC3'

EcoR I

PCR 反应的总体为 50 μ L, 其中含有 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1% Triton-100, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μ mol/L 引物, 2.5 U Taq DNA 聚合酶, 约 50 ng 模板 DNA, pH 8.3。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 52 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 38 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 min。

1.5 花药特异启动子的克隆

用琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增产物的有无和大小, 选取扩增片段特异性强且大小正确的 PCR 产物, 用低熔点琼脂糖电泳回收, 接着将其用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切, 然后插入到 pGEM 7Z 上的相应位点即得 pGEM 7Z-CA 55。

1.6 含 CA55 启动子雄性不育表达载体的构建

先分别将 pGEM 7Z-CA 55 用 *Bam* H I, pGEM 7Z- Φ BNNOS 用 *Xho* I 酶切; 接着用 klenow 酶补平它们的粘性末端; 然后用酚 氯仿 异戊醇 (25:24:1) 抽提, 乙醇沉淀回

收线状 DNA; 再分别用 *Nco* I 对其进行酶切, 经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收线状 pGEM 7Z-CA 55 和 BNNOS DNA 片段; 最后用 *T₇* DNA 连接酶, 将它们连成环状, 即用 *Eco*R I 从 pGEM 7Z-CA 55BNNOS 上切下 CA 55BNNOS, 并将其插入到 pCAMB IA 3300 上的相应位点。

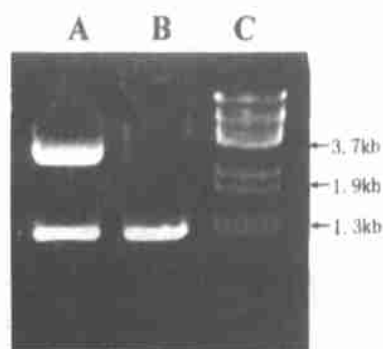
1.7 含 CA55 启动子雄性不育育性恢复表达载体的构建

含 CA 55 启动子雄性不育育性恢复表达载体的构建方法与方法“1.6”相似。只是将不育表达载体中的 Barnase 基因替换成 Barstar 基因即可。其过程是用 *Bsp*HI 和 *Bam*HI, 从 pGEM 7ZBS 上切下 BS, 将其插入到用 *Nco* I 和 *Bam*PH I 酶切除去 BN 的 pGEM 7Z-CA 55NOS 相应位点上, 即构建成 pGEM 7Z-CA 55BSNOS, 下面的过程与方法“1.6”相同。

2 结果与分析

2.1 CA55 启动子的获得

用引物 pCA 55-1 和 pCA 55-2, 经 PCR 扩增出了大小为 1.2 kb 的特异带, 即 CA 55。将其克隆在 pGEM 7Z 的多克隆位点上, 即得重组质粒 pGEM 7Z-CA 55。酶切鉴定 pGEM 7Z-CA 55 结果表明, 重组质粒 pGEM 7Z-CA 55 正确, 见图 1。



A. pGEM 7Z-CA 55+ *Eco*R I + *Kpn* I

B. CA 55 promoter amplified by PCR

C. DNA + *Bst*E II

图 1 CA55 PCR 扩增和 pGEM7Z-CA55 酶切鉴定

Fig 1 Amplification of CA 55 promoter by PCR and its identification of pGEM 7Z-CA 55 by enzyme digestion

又用 pCA 55-1 和 pCA 55-2 作为测序引物, 对已克隆的 CA 55 启动子 5' 端和 3' 端序列进行了测定。从测出的两端各约 100 个核苷酸序列分析表明, 所得的 CA 55 正是已知玉米花药绒毡层特异表达基因(世界专利文献号 WO 92/13956)的相应启动子^[11]。

2.2 含 CA55 启动子雄性不育表达载体的获得

为获得含 CA 55 启动子雄性不育表达载体, 首先必须获得含 CA 55 启动子的雄性不育基因 CA 55BNNOS, 然后将其插入到植物表达载体中, 这一过程见图 2。

按方法“1.5”, 我们获得了含雄性不育基因的重组质粒 pGEM 7Z-CA 55BNNOS, 酶切鉴定结果见图 3。从图中可以看到, 用 *Eco*R I 和 *Nco* I 双酶切 pGEM 7Z-CA 55BNNOS, 可以得到 600 bp 的 DNA 片段, 即 BNNOS 和 1.20 kb 的 DNA 片段, 即 CA 55 启动子。用 *Bam*HI、*Eco*R I 和 *Nco* I 三酶切, 结果表明也出现了 1.20 kb 的 CA 55 启动子。同时, 将 600 bp 的 BNNOS 分成了 2 个更小的 DNA 片段, 即 1 个 330 bp 的 BN 和 1 个 270 bp 的 NOS。由此, 证明 pGEM 7Z-CA 55BNNOS 重组质粒的正确性。

将获得的 1.8 kb 雄性不育基因 CA 55BNNOS 插入到 pCAMB I3300 上, 使载体上的抗除草剂膦化类黄酮 PPT 基因 Bar 与不育基因 CA 55BNNOS 紧密连锁, 这样就获得了

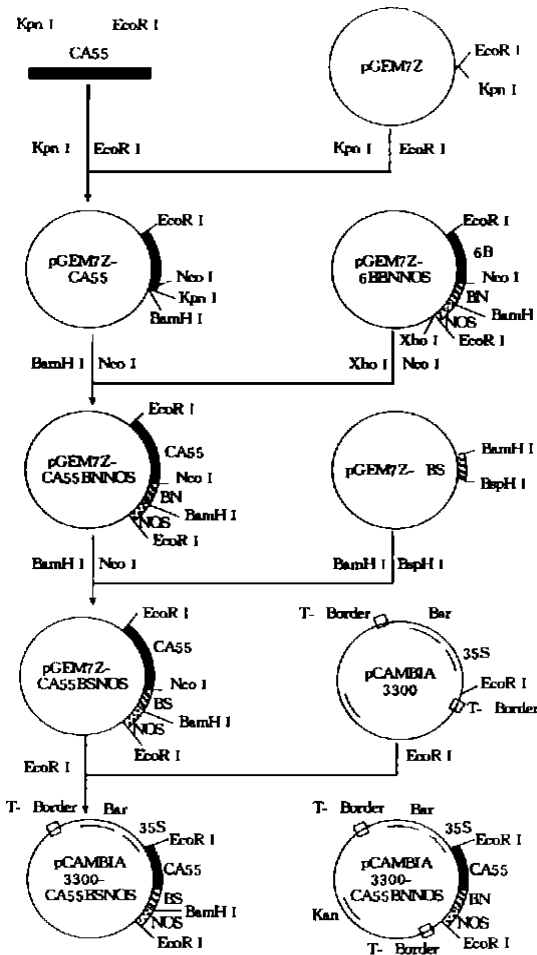


图 2 禾谷类作物雄性不育及其育性恢复表达载体构建流程图

Fig 2 Scheme of the expression vector construction for cereal male sterility and its fertility restoration

植物雄性不育表达载体。对这一表达载体进行酶切鉴定, 结果见图 4。从图 4 中可以看到有 1.8 kb 的雄性不育基因的存在, 表明表达载体构建正确。

2.3 含 CA55 启动子雄性不育育性恢复表达的获得

按照方法“1.5”, 我们获得了含雄性不育育性恢复基因的重质粒 pGEM 7Z-CA 55B SNO S 以及其相应的表达载体 pGEM B IA 3300-CA 55B SNO S。从图 3 中的酶切鉴定结果可以看到 pGEM 7Z-CA 55B SNO S 上含有约 1.84 kb 的 DNA 片段 CA 55B SNO S, 同样, 用 *Bam* H I、*Eco* R I 和 *Nco* I 或 *Bam* H I、*Eco* R I 和 *Bsp* H I 三酶切 pGEM 7Z-

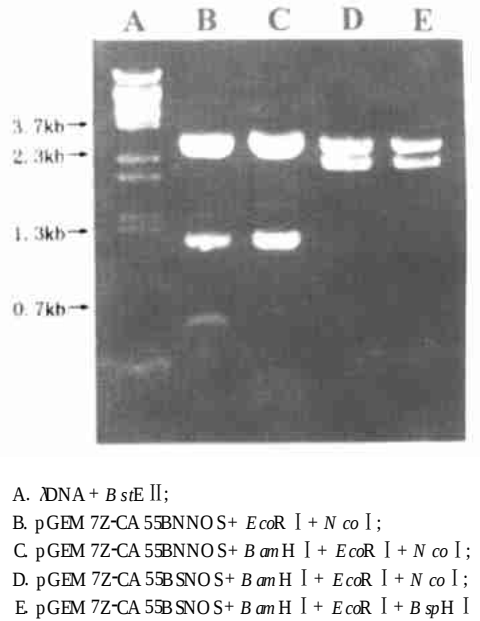
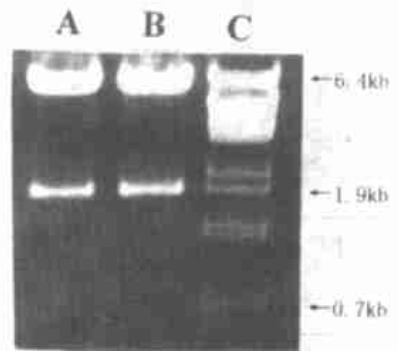


图 3 pGEM 7Z-CA 55BNNOS 和 pGEM 7Z-CA 55B SNO S 酶切鉴定

Fig 3 Identification of pGEM 7Z-CA 55BNNOS and pGEM 7Z-CA 55B SNO S by enzyme digestion



A. pCambia 3300-CA 55BNNOS + *Eco* R I
B. pCambia 3300-CA 55B SNO S + *Eco* R I
C. λ DNA + *Bst* E II

图 4 pCambia 3300-CA 55BNNOS 和 pCambia 3300-CA 55B SNO S 酶切鉴定

Fig 4 Identification of pCambia 3300-CA 55BNNOS and pCambia 3300-CA 55B SNO S by *Eco* R I

CA 5B SNO S 只有约 1.47 kb 的 CA 5B S 和 270 bp 的 NOS, pGEM 7Z-CA 5B SNO S 上 *Nco* I 和 *Bsp* H I 位点在构建过程中均消失, 故均不能切下 1.20 kb 的 DNA 片段 CA 5B。由此可见, pGEM 7Z-CA 5B SNO S 的构建正确。同样由图 4 可看到用 *Eco*R I 酶切 pCAMB IA 3300-CA 5B SNO S 也可以得到与 CA 5B NNO S 大小相似的 CA 5B SNO S DNA 片段, 重组质粒 pCAMB IA 3300-CA 5B SNO S 即为所建的带 CA 55 启动子植物雄性不育育性恢复表达载体。

3 讨论

我们在实验中获得的植物雄性不育及其育性恢复表达载体含有 CA 55 启动子。CA 55 启动子来源于单子叶植物玉米花药绒毡层特异表达基因 CA 55 的 5' 端上游调控区^[11]。它能启动外源基因在玉米花药绒毡层中特异表达。De Block 等 1997 年用 CA 55 启动子与 Barnase 基因融合, 构建成植物雄性不育基因, 转化小麦, 首次获得了基因工程雄性不育的单子叶植物^[11]。由此植物基因工程雄性不育由双子叶植物向单子叶植物, 尤其是禾谷类粮食作物延伸取得了突破。这一突破的取得主要归结于 CA 55 启动子的应用, 它是由 CA 55 启动子启动 Barnase 基因在小麦花药绒毡层中特异表达形成的, 这表明 CA 55 启动子在小麦中具有生物活性。Ellis 等的研究表明, 玉米乙醇脱氢酶基因 Adb1 启动子在转基因烟草中无活性^[12]; 但 Kyo zuka 等在转基因水稻的研究中发现 Adb1 启动子表现与在玉米中相同的活性^[13]。Yamaguchi 等在研究来源于水稻对 ABA 反应的基因 rat16 启动子也获得了相似的结果^[14]。因此, 我们推断 CA 55 启动子在水稻中也具有生物活性。因此, 我们构建的含 CA 55 启动子的植物雄性不育基因 CA 5B NNO S 及其育性恢复基因 CA 5B SNO S, 可以应用于小麦、水稻和玉米等禾谷类作物, 创造基因工程雄性不育系及其恢复系。

pCAMB IA 3300 是由位于澳大利亚的分子生物学应用于农业的国际研究中心(简称为 CAMB IA) 的科学家构建的, 大小为 8.4 kb 植物表达载体, 其上含有来自 pBR322 和 pV S1 的复制子。因此它在大肠杆菌中极高拷贝地复制, 易于获得大量质粒 DNA, 以便用于基因枪的转化。而且, pCAMB IA 3300 上还含有 T-DNA, 可以借助农杆菌进行植物的遗传转化。在 T-DNA 的中间装配有用于克隆外源基因的多克隆位点。我们很方便地将构建好的植物雄性不育基因 CA 5B NNO S 和其育性恢复基因 CA 5B SNO S 插入 pCAMB IA 3300 中, 通过兰白斑筛选重组质粒。此外, 其上还带有抗卡那霉素(Kan)和除草剂膦类黄酮(PPT)供筛选的标记基因。pCAMB IA 3300 上的 T-DNA 是来源于农杆菌 A 281 中的质粒 pTBo524 上的毒性区, 它能诱导更广泛的植物更早地产生出更大的冠瘿瘤^[15]。Ishida 等借助这一毒性区, 用农杆菌介导, 成功地转化了玉米^[16]; Hiei 等同样借此转化了粳稻, 转化效率均在 12~8% 以上, 最高达 28.6%^[17]。Rashid 等用此转化籼稻, 转化效率高达 22%, 几乎相等于农杆菌转化双子叶植物^[18]。肖含和黄大年从 CAMB IA 引进这种质粒, 通过农杆菌介导, 转化籼稻品种 Basmati1 悬浮细胞, 转化效率为 5%~10%^[19]。因此, 本实验构建的禾谷类作物雄性不育及其育性恢复表达载体具有很好的应用潜力, 用以转化禾谷类作物, 可望获得雄性不育及其育性恢复系, 进行杂种优势利用。

参 考 文 献

- 1 Mariani C, Beuckeleer M D, Truetner J *et al* Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene *Nature*, 1996, **347**: 737~ 741
- 2 Mariani C, Gossele V, Beuckeleer N D *et al* A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants *Nature*, 1992, **357**: 384~ 387
- 3 李胜国, 刘玉乐, 朱峰等 基因工程雄性不育烟草的获得 植物学报, 1995, **37**: 659~ 660
- 4 钟蓉, 刘玉乐, 朱峰等 TA 29-Barnase 基因导致油菜雄性不育的研究 植物学报, 1996, **38**(7): 582~ 585
- 5 Dennis M, Delbume R, Gourret J P *et al* Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassica napus* *Plant Physiology*, 1993, **101**: 1 295~ 1 304
- 6 Peng R W, Zhou X R, Fan R X *et al* Obtaining male sterile and fertility restorer lines of oilseed rape by biotechnology. In: Xu Z H, Chen Z H eds *Plant Biotechnology for Sustainable Development of Agriculture* Beijing: China Forestry Publishing House, 1996 227~ 234
- 7 Reynaerts A, Van de W H, De Sutter G *et al* Engineered genes for fertility control and their application in hybrid seed production *Sci Horti*, 1993, **55**: 125~ 129
- 8 Shimamoto K Gene expression in transgenic monocots *Biotechnology*, 1994, **5**: 158~ 162
- 9 张晓国, 刘玉乐, 康良仪等 水稻雄性不育及其育性恢复表达载体构建 作物学报, 1998, **24**(5): 629~ 634
- 10 Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin S B, Schilperoort R A eds *Plant Mol Biol Manual* Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1988 A 6: 1~ 10
- 11 De Block M, Debrouwer D, Moens T. The development of a nuclear male sterility system in wheat-expression of the barnase gene under the control of tapetum specific promoters *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 125~ 131
- 12 Ellis J G, Lewellyn D J, Dennis E S *et al* Maize Adb1 promoter sequences control anaerobic regulation, addition of upstream promoter elements from constitutive gene is necessary for expression in tobacco *EMBO J*, 1987, **6**: 11~ 16
- 13 Kyozuka J, Fujimoto H, Izawa T *et al* Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize Adb1 promoter in transgenic rice plants and their progeny. *Mol Gen Genet*, 1991, **228**: 40~ 48
- 14 Yamaguchi S K, Mino M, Mundy J *et al* Analysis of an ABA-responsive rice gene promoter in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*, 1990, **15**: 905~ 912
- 15 Hood E E, Georgia L H, Robert T F *et al* The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J Bact*, 1986, **168**(3): 1 291~ 1 301
- 16 Ishida Y, Saito H, Ohta S *et al* High efficiency transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens* *Nat Biotechnol*, 1996, **14**: 745~ 750
- 17 Hiei Y, Ohta S, Komari T *et al* Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant J*, 1994, **6**(2): 271~ 282
- 18 Rashid H, Yokoi S, Toriyama K *et al* Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice *Plant Cell Rep*, 1996, **15**: 727~ 730
- 19 肖晗, 黄大年 农杆菌介导的籼稻转化研究 中国水稻科学, 1997, **11**(3): 154