

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101541966 B

(45) 授权公告日 2011. 07. 27

(21) 申请号 200880000430. 6
(22) 申请日 2008. 03. 10
(30) 优先权数据
10-2007-0024730 2007. 03. 13 KR
(85) PCT申请进入国家阶段日
2009. 01. 06
(86) PCT申请的申请数据
PCT/KR2008/001343 2008. 03. 10
(87) PCT申请的公布数据
W02008/111779 EN 2008. 09. 18
(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔
(72) 发明人 裴贞明 卢雪娥 申正燮 白敬喜
(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 丁香兰 谭辉
(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006. 01)
(56) 对比文件
高英 等. 扩张蛋白研究进展. 《农业生物技

术科学》. 2005, 第 21 卷 (第 7 期), 第 82-86 页.
Choi et al.. Expansins: expanding
importance in plant growth and. 《Physiologia
Plantarum》. 2006, 第 126 卷第 511-518 页.
You et al.. Identification of genes
possibly related to storage root induction
in sweetpotato. 《FEBS Letters》. 2003, 第 536
卷第 101-105 页.

审查员 唐华东

权利要求书 1 页 说明书 7 页
序列表 6 页 附图 7 页

(54) 发明名称
甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA 和使用所述反
义 DNA 增加贮藏根产量的方法

(57) 摘要
本发明公开了甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义
DNA、携带所述反义 DNA 的植物转化载体、和使用
所述反义 DNA 增加贮藏根产量的方法。使用所述
甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA 制备的转基因甘薯
的贮藏根产量增加到高达 1.5 倍。因此, 所述基因
在用于增加生物乙醇产量的高产性的转基因贮藏
根的生产中是有用的。

	贮藏根		枝条	
	数量	总重量(g)	数量	总重量(g)
野生型	4.75±0.98	188.71±24.62	2.5±0.58	118.13±19.02
反义-1	5.33±0.58	248.20±33.88	3.3±0.58	118.48±11.88
反义-4	8.85±1.50	224.45±30.55	2.8±0.75	118.48±11.02

1. 一种增加甘薯贮藏根产量的方法,所述方法包括:抑制甘薯的细胞中的甘薯扩张蛋白基因 IbExpansin 的表达。
2. 如权利要求 1 所述的方法,所述方法还包括向所述甘薯中引入来自甘薯扩张蛋白基因 IbExpansin 的 cDNA 的反义 DNA,其中所述反义 DNA 由 SEQ ID NO. :9 的核苷酸序列组成。
3. 如权利要求 1 所述的方法,所述方法还包括向二元载体插入所述扩张蛋白基因的 cDNA 的反义 DNA,并将所述二元载体引入所述甘薯,其中所述反义 DNA 由 SEQ ID NO. :9 的核苷酸序列组成。
4. 一种制备高产性的转基因甘薯的方法,所述方法包括:向甘薯中引入甘薯扩张蛋白基因的 cDNA 的反义 DNA,其中所述反义 DNA 由 SEQID NO. :9 的核苷酸序列组成。
5. PCR 引物对,其适合于扩增包含 SEQ ID NO. :9 的核苷酸序列的 DNA 片段,所述引物对以 SEQ ID NO. :10 和 SEQ ID NO. :11 所示的核苷酸序列表示。

甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA 和使用所述反义 DNA 增加贮藏根产量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及可用于生产高产性贮藏根的甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA。更具体来说,本发明涉及甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA、携带所述反义 DNA 的转化载体、和使用所述反义 DNA 增加贮藏根产量的方法。

背景技术

[0002] 自从 Cosgrove 及其同事 (McQueen-Mason 等人,1992, Plant Cell 4,1425-1433) 发现扩张蛋白以来,人们已经对其进行了深入研究。在早期的研究中,扩张蛋白被认为是至少部分介导植物细胞壁的 pH 依赖性伸展和细胞的生长的细胞壁松弛酶 (loosening enzyme) (Cosgrove,2000, Nature407,321-326)。其后,发现扩张蛋白以 α -形式或 β -形式存在 (Shcherban 等人,1995, PNAS 92,9245-9249)。

[0003] 最近,已经发现扩张蛋白除了参与调节细胞扩展外,还参与调节多种其它植物过程,所述过程包括形态发生 (Ruan 等人,2001, Plant Cell 13,47-60)、果实的软化 (Rose 等人,2000, Plant Physiology 123,1583-1592 ;Civello 等人,1999, Plant Physiology 121,1273-1280)、花粉管的生长 (Cosgrove 等人,1997, PNAS 94,6559-6564)、重力感应根 (gravirespondingroot) 的伸长 (Zhang 和 Hasenstein,2000, Plant Cell Physiology 41, 1305-1312)、和根部细胞的伸长 (Lee 等人,2003, Plant Physiology 131,985-997) (参见综述, Lee 等人,2001, Cur. Opin. Plant Biol. 4,527-532)。

[0004] 此外,已充分研究了扩张蛋白在水作稻 (flooded rice) 和番茄中的表达模式。已经发现,扩张蛋白在番茄的茎端分生组织 (shoot apical meristem) 中表达以使初始叶原基发生 (Reinhardt 等人,1998, Plant Cell 10, 1427-1437)。克隆了一种扩张蛋白基因 (Exp1) 并且通过携带有该基因的转化体发现,该基因在番茄果实的生长和成熟中发挥重要作用 (Brummell 等人,1999, Plant Cell,11:2203-2216)。扩张蛋白 mRNA 在细胞壁的生长速率或松弛程度刚要开始增加前累积,表明扩张蛋白基因的表达与细胞伸长相关 (Cho 和 Kende,1997a, Plant Cell 9,1661-1671 ;1997b, Plant Physiology 113,1137-1143 ;1998, Plant Journal 15,805-812)。观察到扩张蛋白在其中过表达的转基因稻类植株的子叶的长度与野生型相比进一步增加了 31%~97% (Choi 等人,2003 Plant Cell,15:1386-1398)。然而该转基因稻类植株由于雄性不育而不能够结种。

[0005] 另一方面,因为甘薯贮藏根含有大量的淀粉和多种无机营养物,其对人类是一种良好的能量来源,并且由于其具有高含量的纤维 (对机体有用的材料),因而是具有有益健康效果的高附加值作物。

[0006] 最近,由于通过植物发酵获得的生物乙醇作为替代性能源的来源而受到关注,甘薯贮藏根也被认为是一种有用的替代性能源作物。

[0007] 考虑到增强替代性能源的价格竞争力,增加替代性能源作物栽培的单位面积的生产力是非常重要的。

[0008] 此外,很少有关于贮藏根产量的分子机理的研究,这是因为贮藏根的材料不适合于分子研究,其原因如下:(1) 由于具有大量的多糖,不易提取 DNA 和 RNA;和(2) 由于贮藏根在地下生长,不易监测贮藏根的生长,因而限制了调节甘薯贮藏根发育的分子育种研究。

[0009] 因此,已经存在对调节甘薯贮藏根发育的分子育种的需要和对能够通过分子育种显著增加产量的转基因甘薯的需要。

发明内容

[0010] 因此,鉴于现有技术中所存在的上述问题而实现了本发明,并且本发明的一个目的是提供甘薯扩张蛋白(IbExpansin)cDNA 的反义 DNA,通过该反义 DNA 可以制备高产性的甘薯。

[0011] 本发明的另外一个目的是提供使用 IbExpansin cDNA 的反义 DNA 通过抑制扩张蛋白的表达而增加贮藏根产量的方法。

[0012] 本发明的又一个目的是提供一种高产性的转基因甘薯,所述甘薯包含携带所述 IbExpansin cDNA 的反义 DNA 的载体。

[0013] 因此为了实现上述目的,本发明提供了增加贮藏根产量的方法,所述方法包括抑制扩张蛋白基因在植物的细胞中的表达。

[0014] 根据本发明的优选实施方式,所述方法还包括向所述植物引入来源于甘薯扩张蛋白基因(IbExpansin)的 cDNA 的反义 DNA。

[0015] 根据本发明的优选实施方式,所述方法还包括向二元载体中插入所述扩张蛋白基因的反义 DNA,并向所述植物引入该二元载体。

[0016] 所述反义 DNA 包含 SEQ ID NO. :9 的核苷酸序列。

[0017] 所述植物是甘薯。

[0018] 根据本发明的另外一个方面,本发明提供了制备高产性转基因甘薯的方法,所述方法包括向甘薯引入甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA。

[0019] 根据本发明的又一个方面,本发明提供了适合于扩增包含 SEQ ID NO. :9 的核苷酸序列的 DNA 片段的 PCR 引物,所述引物由 SEQ ID NO. :10 或 SEQ ID NO. :11 所示的核苷酸序列中的一条序列表示。

[0020] 本发明提供了可用于转化植物的 IbExpansin cDNA(来源于甘薯(Ipomoea batatas)的扩张蛋白 cDNA)的反义 DNA,并且获得的转基因植物能够通过抑制根的伸长生长从而加速贮藏根的生长。因此,本发明可用于生产高产性的转基因贮藏根。

附图说明

[0021] 通过下面的结合附图的详细说明,将更清楚地理解本发明的上述和其它目的、特征和其它优点,其中:

[0022] 图 1 是显示克隆全长甘薯扩张蛋白 cDNA 的初次 PCR(primary PCR)的结果的图;

[0023] 图 2 是显示将初次 PCR 的产物作为模板,克隆全长甘薯扩张蛋白 cDNA 的再次 PCR(secondary PCR)的结果的图;

[0024] 图 3 是显示根据本发明通过 PCR 克隆的全长甘薯扩张蛋白 cDNA 的图;

[0025] 图 4 显示甘薯扩张蛋白 cDNA 的氨基酸序列和其它植物扩张蛋白 cDNA 的氨基酸序

列的比较；

[0026] 图 5 显示甘薯扩张蛋白 cDNA 和其它植物扩张蛋白 cDNA 之间的氨基酸序列同源性；

[0027] 图 6 显示在检测甘薯扩张蛋白基因的表达模式中使用的甘薯组织；

[0028] 图 7 给出显示在甘薯中甘薯扩张蛋白基因的表达模式的 Northern 印迹分析的结果；

[0029] 图 8 显示在构建二元载体的各个处理阶段所获得的结果，所述二元载体用于将本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA 携带到甘薯中；

[0030] 图 9 是显示 pIbExpansin-anti 二元载体的结构的示意图，所述二元载体用于将本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA 携带到甘薯中；

[0031] 图 10 显示在甘薯中诱导的胚性愈伤组织 (embryogenic callus)，所述愈伤组织用于将本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA 转入甘薯；

[0032] 图 11 是显示用于检验在甘薯转化体中 IbExpansin cDNA 的反义 DNA 的插入的电泳结果的图，所述甘薯转化体表达本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA；

[0033] 图 12 是显示用于检验在甘薯转化体中 IbExpansin 的表达的电泳结果的图，所述甘薯转化体表达本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA；

[0034] 图 13 显示甘薯转化体和野生型甘薯在离体切割 10 天后根部生长的比较，所述甘薯转化体表达本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA；

[0035] 图 14 显示甘薯转化体和野生型甘薯在离体切割 10 天后在细胞水平上的根部生长的比较，所述甘薯转化体表达本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA；

[0036] 图 15 显示甘薯转化体和野生型甘薯的生长的比较，所述甘薯转化体表达本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA；和

[0037] 图 16 显示甘薯转化体和野生型甘薯的贮藏根产量的比较，所述甘薯转化体表达本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA。

具体实施方式

[0038] 下面将参考附图说明本发明的优选实施方式。

[0039] 首先，本发明的发明人取得了以下成功：克隆了甘薯扩张蛋白 (IbExpansin) 的 cDNA、使用所述 cDNA 的反义 DNA 构建了适合于植物转化的二元载体、和将所述载体转化到甘薯中。发现该转基因甘薯的贮藏根产量有显著的增加。

[0040] 因此，本发明提供了甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA，所述反义 DNA 包含 SEQ ID NO. :9 的核苷酸序列。

[0041] 所述 cDNA 的反义 DNA 具有 1,213bp (碱基对) 长度的核苷酸序列。

[0042] 另外，本发明提供了用于转化植物的二元载体 (pIbExpansin-anti)，所述二元载体携带甘薯 (*Ipomoea batatas*) 扩张蛋白 cDNA (IbExpansin) 的反义 DNA。

[0043] 所述植物转化载体是能够在植物中稳定表达感兴趣的外源基因的二元载体。

[0044] 在 pMBP1 载体中，本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA (IbExpansin) 的反义 DNA 位于 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子之间。本领域技术人员应该能够理解的是，可以使用任何其它的植物转化载体来代替 pMBP1 载体。

[0045] 另外本发明提供了在二元载体上携带本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA (IbExpansin) 的反义 DNA 的转基因甘薯。

[0046] 所述二元载体可使用农杆菌 (Agrobacterium) 或基因枪引入到植物中。在本发明的一个实施方式中, 使用基因枪法 (Sanford 等, 1993) 转化甘薯。

[0047] 除甘薯之外, 本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA (IbExpansin) 的反义 DNA 还可转入任何适于具有增加的贮藏根产量的植物贮藏根中。

[0048] 另外, 本发明提供了一对用于 PCR 扩增本发明的甘薯扩张蛋白 cDNA (IbExpansin) 的反义 DNA 的引物, 所述引物以 SEQ ID NO. :10 和 SEQ ID NO. :11 表示。

[0049] 另外, 本发明提供了通过利用扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA 抑制该扩张蛋白基因的表达而增加贮藏根产量的方法。

[0050] 另外, 本发明提供了增加贮藏根产量的方法, 所述方法通过将扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA 插入二元载体并将该二元载体引入到植物中来进行。

[0051] 如上所述, 扩张蛋白家族基因中的一些基因已被公开, 但在本发明之前的报告中没有任何地方提到扩张蛋白基因用于增加贮藏根产量的应用。根据本发明, 可将各种扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA 引入到植物中以增加它们的贮藏根产量。

[0052] 实施例 1: 甘薯扩张蛋白 cDNA 的克隆

[0053] 从甘薯的新鲜块根 (tuber) 分离总 RNA 并将其用于构建 EST (Expressed Sequence Tag, 表达序列标签) 文库。使用这一文库克隆 2,859 个 EST 并以 NCBI 登录号 BU690119 ~ BU692977 存储在国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (You 等人, 2003, FEBS Letters 536, 101-105)。其中发现 IbExpansin (NCBI 登录号 BU691452) 具有约为 1kb 的长度, 将其鉴定为缺少起始密码子 ATG 的部分 cDNA。为了获得全长 IbExpansin, 在 IbExpansin- 特异性引物 (SEQ ID NO. :3) 和 T3 载体引物存在的情况下, 以已经存在的早期甘薯贮藏根发育的 EST 文库作为模板进行 PCR。然而在预期的 5' 全长大小的位置没有可见条带 (图 1)。

[0054] 在预期的全长位置从琼脂糖凝胶切下凝胶块, 从所述凝胶块洗脱 DNA 片段, 并将所述 DNA 片段用作模板, 以由基因特异性嵌套引物 (SEQ ID NO. :4) 和 T3 引物组成的一套引物进行 PCR。作为结果, 获得了具有约 350bp 长度的 PCR 产物 (图 2)。

[0055] 将 PCR 产物插入 pGEM-T Easy 载体中进行测序分析, 并鉴定到 IbExpansin 的 5' 序列。

[0056] 在核苷酸序列的基础上, 合成了在其末端分别带有 BamHI 和 KpnI 限制位点的 5' 引物和 3' 引物。使用这些引物进行 RT-PCR 而获得全长 IbExpansin (图 3)。

[0057] 实施例 2: 全长 IbExpansin 核苷酸序列的测序和分析

[0058] 通过 PCR 克隆 1.2kb 的全长 cDNA 并插入到 pGEM-T Easy 载体中, 随后将其进行扩增。测序分析表明, IbExpansin 长 1,213bp 并且由 33bp 的 5'-UTR (untranslated region, 非翻译区)、717bp 的 ORF (open reading frame, 开放阅读框) 和 463bp 的 3'-UTR 组成。这一全长 IbExpansin cDNA 以登录号 DQ515800 在 NCBI 注册。由 238 个氨基酸残基构成的该 IbExpansin 氨基酸序列除 N-末端区域外高度保守 (图 4), 并且与番茄和胡椒的扩张蛋白氨基酸序列有高达 78% 的同源性 (图 5)。

[0059] 实施例 3: 组织的 Northern 印迹分析

[0060] 1. Northern 印迹

[0061] 利用处于不同发育阶段的各种组织通过 Northern 印迹检测 IbExpansin 的表达模式。

[0062] 为了分离总 RNA, 使用甘薯的处在不同发育阶段的根、茎、叶片和叶柄作为 RNA 的来源。也就是说, 从下列组织中分离总 RNA: 非贮藏根阶段的组织, 例如根 (FRN: 非贮藏根阶段的须根)、茎 (茎 -FRN)、叶片 (叶片 -FRN) 和叶柄 (叶柄 -FRN); 早期贮藏根阶段的组织, 例如根 (早期贮藏根阶段的须根, FRES); 贮藏根阶段的组织, 例如根 (SR)、茎 (茎 -SR)、叶片 (叶片 -SR) 和叶柄 (叶柄 -SR); 和晚期贮藏根阶段的组织, 例如根 (晚期贮藏根阶段的须根, FRLS) (图 6)。使用 4.4M 胍盐 -SDS 裂解缓冲液 (Chirgwin 等人, 1979)/5.7M CsCl 梯度法 (Glisin 等人, 1974) 进行总 RNA 的提取。将约 20 μ g 所提取的总 RNA 在 1% 的琼脂糖 - 甲醛凝胶上进行电泳并转移到 Tropilon-plus™ 尼龙膜 (Tropix, 美国) 上。

[0063] 通过 PCR 对 2.5ng 的携带有 1kb 扩张蛋白 EST 克隆的质粒进行扩增来得到探针, 所述 PCR 在最终体积为 10 μ l 的 PCR 混合物中进行, 所述 PCR 混合物含有 100 μ M 除 dCTP 之外的 dNTP 混合物、100 μ M dCTP- 生物素、各为 10 μ M 的载体 (pBluescript II)、引物 T3 (5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3'; SEQ ID NO. :7) 和 T7 (3'-CGGGATATCACTCAGCATAATG-5'; SEQ ID NO. :8)、1 $\times$ PCR 缓冲液、和 1 单位 Taq 聚合酶, 开始是在 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟, 之后是 35 个以下循环: 在 95 $^{\circ}$ C 变性 10 秒、在 65 $^{\circ}$ C 退火 30 秒、和在 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒。

[0064] 使用 QIAquick™ PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN, 德国) 纯化 PCR 扩增的生物素化探针并将其以约 100ng 的量加到膜上, 随后在 65 $^{\circ}$ C 杂交 18 小时。按以下方法洗涤膜: 在室温下, 用 2 $\times$ SSC/1% SDS 洗涤两次, 每次 5 分钟; 然后在室温下, 用 0.1 $\times$ SSC/1% SDS 洗涤两次, 每次 15 分钟; 最后在室温下, 用 1 $\times$ SSC 洗涤两次, 每次 5 分钟。使用 Southern-star™ 试剂盒 (Tropix, 美国) 进行探针检测。使用封闭缓冲液 (1 $\times$ PBS, 0.2% I-Block™ 试剂和 0.5% SDS) 处理印迹并使用碱性磷酸酶偶联的链霉亲和素进行标记, 随后使用 CDP-Star™ (即用型, Ready to Use) 处理。将膜暴露于 X 射线胶片 (Fujifilm, 日本) 10 分钟 ~ 1.5 小时。

[0065] 2. IbExpansin 的表达模式

[0066] 在 PCR 中使用生物素标记的甘薯 IbExpansin EST 克隆 (约 1kb), 并将其在 Northern 印迹中用做探针。

[0067] 在非贮藏根阶段的组织中检测到 IbExpansin 的表达, 所述组织包括 FRN、茎 -FRN、叶片 -FRN 和叶柄 -FRN, 其中 FRN 和叶柄 -FRN 具有最高的表达水平。然而在晚期贮藏根阶段的块根组织中检测到显著下降的 IbExpansin 的表达水平, 同时在贮藏根阶段的茎和叶片中检测到明显降低的 IbExpansin 的表达水平 (图 7)。这些表达模式强有力地提示 IbExpansin 与贮藏根发育的早期阶段中的根的伸长生长有关, 而且它的活性不促进贮藏根的发育。

[0068] 实施例 4: 二元载体的构建

[0069] 合成带有 KpnI 限制位点的 5' 引物 (SEQ ID NO. :10) 和带有 BamHI 限制位点的 3' 引物 (SEQ ID NO. :11) 以构建敲除二元载体。利用所述引物进行 PCR 以获得全长的 IbExpansin (NCBI 登录号: DQ515800) cDNA。将 PCR 产物插入 pGEM-T Easy 载体, 并以 BamHI 和 KpnI 消化 pGEM-T Easy 载体以从中切下 cDNA。将 cDNA 消化物在 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子之间以反义方向插入到 pMBP1 载体中, 以构建二元载体 pIbExpansin-anti (图 9)。

通过克隆性 PCR 和限制酶消化确认插入 (图 8)。

[0070] 实施例 5 :在甘薯中引入胚性愈伤组织

[0071] 连同腋芽一起切下甘薯 (名为“Youlmi”) 的茎并在 MS 基础培养基 (Murashige 和 Skoog, 1962) 中以下述条件培养,所述条件是用于离体培养甘薯的 1,000lux (勒克斯) 的冷白色荧光灯和 16 小时光周期的条件。在解剖显微镜下除去嫩叶后,从所培养的茎移取高约 150 μm 且直径约 350 μm 的顶端分生组织,并且使培养基接触该顶端分生组织的切割表面 (Cantliffe 等人,1987 ;Liu 等人,1989)。为了诱导胚性愈伤组织,通过下述方法制备 MS 基础培养基 :向 MS 无机盐加入 100mg/L 的肌醇 (myoinositol)、0.4mg/L 的盐酸硫胺素 (thiamine-HCl)、30g/L 的蔗糖、和 4g/L 的固化剂 (Gelrite),将 pH 调节到 5.8,加入 1mg/L 的 2,4-D,并在陪替氏培养皿 (PetriDish) 中使用 (所获得的培养基称为 MS1D)。

[0072] 每间隔一个月在相同培养基上继代培养该愈伤组织 (图 10)。

[0073] 实施例 6 :使用基因枪对甘薯进行的转化和甘薯转化体的筛选

[0074] 将胚性愈伤组织切割成直径为 1mm ~ 2mm 的细胞团。将约 50 ~ 60 个愈伤组织团放置在盛有 MS1D 培养基的陪替氏培养皿的中央部分,并在培养一天后进行轰击。以氦气在 1,100PSi (Pounds per square inch,磅 / 平方英寸) 的真空条件下进行颗粒轰击。轰击根据 Sanford 等人的方法进行,所述方法包括在离愈伤组织团 6cm 的间距处,以包被有 DNA 的金颗粒轰击,其中使用 1.0 μg DNA 和 1,100PSi 压力的氦气。在黑暗中以 25°C 的温度培养两天后,在相同条件下进行再一次轰击。在黑暗中以 25°C 的温度培养一周后,将愈伤组织团在含有 100mg/L 卡那霉素的 MS1D 固体培养基 (选择培养基) 上于 25°C 的温度和约 2,000lux 继代培养 2 个月。为了促进在选择培养基上被胁迫的愈伤组织的恢复和新芽 (shoot) 的分化,将所选的分生组织团转移到含有 10mg/L 2iP (异戊烯腺嘌呤) 和 100mg/L 卡那霉素的 MS1D 固体培养基。在转移到选择培养基一个月后,将浅绿色的愈伤组织优先转移到 MS 基础培养基以诱发嫩芽,并转移到含 20mg/LNAA (萘乙酸) 的培养基以诱导根部发育。约每两周进行一次继代培养。

[0075] 开始发育出芽和根部的愈伤组织在 MS 基础培养基上再生成为植株。借助 QIAquick™ 植物 DNA miniprep 试剂盒 (QIAGEN, 德国) 从转化植株的叶片中分离 DNA。

[0076] 使用所分离的 DNA,利用引物 NPTII5' (GAGGCTATTCGGCTATGACTG-SEQ ID NO. :12) 和引物 NPTII3' (ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-SEQ ID NO. :13) 进行 PCR,开始是在 95°C 预变性 5 分钟,然后进行 30 个以下循环 :在 95°C 变性 30 秒、在 65°C 退火 30 秒和在 72°C 延伸 1 分钟。如此制得的 PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离以检测 700bp 条带 (图 11)。

[0077] 实施例 7 :转基因甘薯的表达分析

[0078] 借助 4.4M 胍盐 -SDS 裂解缓冲液 (Chirgwin 等人,1979) 和 5.7M CsCl 梯度法 (Glisin 等人,1974),从转化甘薯的叶片中分离 RNA。将含有总 RNA (6 μg) 和 dNTP Oligo dT 引物 (10pM) 的样品的总量调节到 13 μl ,在 68°C 变性 5 分钟,然后立即转移到冰上。在向各样品中加入 4 μl 的 5×RT- 缓冲液、1 μl 的核糖核酸酶 (RNase) 抑制剂 (RNasin)、1 μl 的 0.1M DTT (二硫苏糖醇)、和 200U/ μl 的逆转录酶 (Superscript III) 后,在 50°C 进行逆转录 80 分钟,接着立即在 70°C 变性 15 分钟。向各样品中加入 30 μl 的蒸馏水。用所获得的 cDNA 为模板进行 RT-PCR。使用 IbExpansin 基因特异性引物 (5'TTC CAG ATA AGG TGT GTG AAC 3',SEQ ID NO. :14 ;5' ACTGTC TCC ACA CTC AGC 3',SEQ ID NO. :15) 进行 PCR,开始

是在 95℃ 预变性 5 分钟, 然后进行 30 个以下循环: 在 95℃ 变性 30 秒、在 58℃ 退火 30 秒、和在 72℃ 延伸 1 分钟。为了构建内部相等载量对照 (internal equalloading control), 在与 IbExpansin 相同的条件下, 使用引物 tublin-1 (5' CAACTA CCA GCC ACC AAC TGT 3'; SEQ ID NO. :16) 和引物 tublin-2 (5' CAA GAT CCT CAC GAG CTT CAC 3'; SEQ ID NO. :17) 进行 PCR。如此制得的 PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离。发现第 1 号和第 4 号反义泳道是彻底的敲除, 而第 3 号反义泳道是敲减 (knock-down), 降低了表达水平 (图 12)。

[0079] 实施例 8: 转基因甘薯根部发育的分析

[0080] 在相同的日期在 MS 基础培养基中进行 IbExpansin- 反义第 1 号甘薯和野生型的切割。在切割 10 天后, 比较在转基因甘薯第 1 号和野生型之间的根部发育模式 (图 13 和图 14)。可肉眼观察到须根。发现转基因甘薯第 1 号的须根比野生型的须根 (直径细且长度为 5cm ~ 6cm) 的长度短 (2cm ~ 3cm) 且直径大 2 ~ 3 倍 (图 13)。

[0081] 切割根部的成熟区, 在 4℃ 在含有 2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛的 25mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 中固定 10 天, 使用缓冲液洗两次, 依次更换 50%、60%、70%、80%、90%、95%、和 100% 的乙醇以去除水分, 接着放在容纳有已经在一天前进行固化的树脂的囊体 (capsule) 中, 在依次替换树脂与乙醇的比例为 1 : 3、1 : 1、3 : 1 和 1 : 0 的混合物后, 再一次向囊体中的固化树脂上添加未稀释的树脂, 之后在 58℃ 固化。

[0082] 树脂硬化后, 分别以横向和纵向切割样品, 在显微镜下观察根部细胞的形状。发现与转化体相比, 野生型的细胞细而长, 相反, 与野生型相比, 转化体的细胞短而粗 (图 14)。另外, 在转化体的情况中, 在初生形成层中观察到细胞分化活跃地发生, 所以细胞分化在次生形成层中开始以使贮藏根发育。因此本发明的 IbExpansin cDNA 的反义 DNA 的表达可使贮藏根发育的启动提前。

[0083] 实施例 9: 转基因甘薯贮藏根发育的分析

[0084] 在同一天进行转基因甘薯第 1 号、第 4 号和野生型甘薯的切割。在切割 5 个月后, 相互比较它们的地上部 (aerial part) 和贮藏根的发育模式及产量 (图 15 和图 16)。对于地上部的生长, 野生型有数量较少的分枝并且它的第一分枝很长。另一方面, 发现转基因甘薯具有较多的分枝但它的分枝的长度基本相同, 并且其第一分枝比野生型的第一分枝短很多。在转基因甘薯和野生型甘薯之间的地上部总生物量未显示出差别。在转化体和野生型之间, 贮藏根的发育存在很大差别。在野生型中, 它的初生根中的一部分发育成贮藏根, 但在转化体中, 它的初生根中的大多数发育成贮藏根, 所以在总贮藏根数量上, 转化体比野生型优越 (多达 2 倍), 并且在总生物量上, 转化体也比野生型优越 (多达 1.5 倍)。贮藏根形成的位置存在差异, 即, 野生型的初生根生长到 5cm ~ 10cm 的长度, 然后发育成贮藏根, 但转化体的初生根在初生根发育的起始点即发育成贮藏根。

[0085] 因此, 本发明的 IbExpansin cDNA 的反义 DNA 可用于生产高产性的转基因甘薯以有效地增加贮藏根的产量。

[0086] 虽然已结合了当前认为最实用和优选的实施方式来描述本发明, 但应该理解的是, 本发明不限于所公开的实施方式和附图, 相反, 本发明拟覆盖在所附权利要求书中的精神和范围之内各种修改和变化。

序列表

<110> 高丽大学校产学协力团

<120> 甘薯扩张蛋白 cDNA 的反义 DNA 和使用所述反义 DNA 增加贮藏根产量的方法

<130>P21-080201-P

<150>KR 10-2007-0024730

<151>2007-03-13

<160>17

<170>KopatentIn 1.71

<210>1

<211>1213

<212>DNA

<213> 甘薯

<400>1

cattcctcta ccaattcaac tgaagcaata acaatggcgg ttcttgagct tcttctggte	60
ggagtttcttg ccacgtttgc tccggtgcat ggctactggg gctggagcag cgctcgcgcc	120
accttctacg gcggcggtga tgcttctgga acaatgggcg gagcctgcgg gtatgggaac	180
ctgtatagct caggctatgg caccaacact gcggcactta gcaccgctct gttcaacaat	240
gggctcagct gcgggtcctg ttccagata aggtgtgtga acgaccggtc ctgcctccgc	300
ggcgtaata cgcacaccgc caccaatttc tgcccgcccg gcggctgggt cgagccccc	360
aaccacact ttgatctctc tcagcctgtt ttcttgagaa ttgcccagta cagagccgga	420
gttgttcccg ttgcttaccc acgggtgcct tgcaggagga gtggaggaat caggttcacc	480
attaacggcc atgctttctt caacctggta ctagtaacca acgtgggagg ctccggcgac	540
gtacacgccg tgtacatcaa aggatcaaga accgggtggc aaatgatgtc cagaaaactgg	600
ggccaaaact ggcagagcaa cgccaacctc aacggccaaa gcctctcatt ccgggtggte	660
accggcgaca gccgcagcgt cgtctcttac aacgccgctc ccccggtggt gtccttcggc	720
cagacctact ccggcgccca gtccgctag gccggaattc atcaaacc accatTTTTT	780
tccegccata tatatatgat ctccaaacct atacataact aaagcctaca ccatttttac	840
aagtttgaaa tgcaattaaa gtcattggga tgggaaaatg ttgatcaagt ttccggccgc	900
cctctctcac ttttttttct aaaagggtat gggtttgatc gaaagccctt ttggccatga	960
aaattggcca ttcaatcaac aagaattgaa gcagagtga agtggtagtt agttatatca	1020
agattgtgct accccatgac tagcttaatt agtactgcat tatttatgtg attattatta	1080

ttatgcagac aaaatgtgtc tgcataccta ccctgtggaa caacattaat ttttttttcc 1140
tcgtcttctt cgtcgtcgtt tgtaattagt atagcattaa ggttaaacag ctaatgctga 1200
gtgtggagac agt

<210>2

<211>238

<212>PRT

<213> 甘薯

<400>2

MAVLELLLVG VLATLSPVHG YGWSSARAT FYGGDASGT MGGACGYGNL YSSGYGTNTA 60
ALSTALFNNG LSCGSCFQIR CVNDRSCLRG VITVTATNTC PPGGWCEPPN PHFDLSQPVF 120
LRTAQYRAGV VPAVYRRVPC RRSGGTRFTI NGHAFNLVL VTNVGGSGDV HAVYIKGSRT 180
GWQMMSRNWG QNWQSNANLN GQSLSFRVVT GDSRSVVSYN AAPPGWSFGQ TYSGAQFR

<210>3

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>3

gggcagaaat tgggtggcggg tgaggtg

<210>4

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>4

acaggacccg cagctgaccc cattgttg

<210>5

<211>33

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>5

gtaggatccc attcctctac caattcaact gaa

<210>6

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>6

gatggtacca ctgtctccac actcagcatt

<210>7

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>7

aattaaccct cactaaaggg

<210>8

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>8

cgggatatca ctcagcataa tg

<210>9

<211>1213

<212>DNA

<213> 甘薯

<400>9

actgtctcca cactcagcat tagctgttta accttaatgc tataactaatt acaaacgacg	60
acgaagaaga cgaggaaaaa aaaattaatg ttgttccaca gggtaggtat gcagacacat	120
tttgtctgca taataataat aatcacataa ataatgcagt actaattaag ctagtcatgg	180
ggtagcacia tcttgatata actaactacc acttcaactc tgcttcaatt cttgttgatt	240
gaatggccaa ttttcatggc caaaagggtt ttcgatcaaa accaatccct tttagaaaaa	300
aaagtgagag agggcgcccg gaaacttgat caacattttc ccatcccat gactttaatt	360
gcatttcaaa cttgtaaaaa tgggttaggc tttagttatg tataggtttg gagatcatat	420
atatatggcg ggaaaaaat gggggtgttt gatgaattcc ggcctagcgg aactgggcgc	480
cggagtaggt ctggccgaag gaccagccgg ggggagcggc gttgtaggag acgacgctgc	540
ggctgtcgcc ggtgaccacc cggaatgaga ggctttggcc gttgaggttg gcgttgctct	600
gccagttttg gccccagttt ctggacatca tttgccacce ggttcttgat cctttgatgt	660
acacggcggtg tacgtcgccg gaggctccca cgttgggttac tagtaccagg ttgaagaaag	720
catggccgtt aatggtgaac ctgattcctc cactcctcct gcaaggcacc cgtcggtaag	780
caacgggaac aactccggct ctgtactggg caattctcaa gaaaacaggc tgagagagat	840
caaagtgtgg gttggggggc tcgcaccagc cgccgggcgg gcagaaattg gtggcggtga	900
cggtgattac gccgcggagg caggaccggt cgttcacaca ccttatcttg aaacaggacc	960
cgcagctgag ccattgttg aacagagcgg tgctaagtgc cgcagtgttg gtgccatagc	1020
ctgagctata caggttccca taccgcagg ctccgcccac tgttccagaa gcatcaccgc	1080
cgccgtagaa ggtggcgcca gcgctgctcc agccccagta gccatgcacc ggagacaacg	1140
tggcaagaac tccgaccaga agaagctcaa gaaccgccat tgttattgctt cagttgaat	1200
tggtagagga atg	

<210>10

<211>33

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>10

gatggtaccc attcctctac caattcaact gaa

<210>11

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>11

gatggatcca ctgtctccac actcagcatt

<210>12

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>12

gaggctattc ggctatgact g

<210>13

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>13

atcgggagcg gcgataccgt a

<210>14

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>14

ttccagataa ggtgtgtgaa c

<210>15

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>15

actgtctcca cactcagc

<210>16

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>16

caactaccag ccaccaactg t

<210>17

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>PCR 引物

<400>17

caagatcctc acgagcttca c

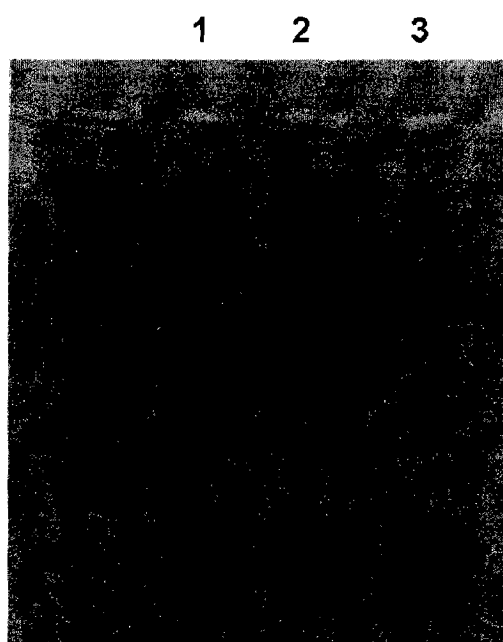


图 1

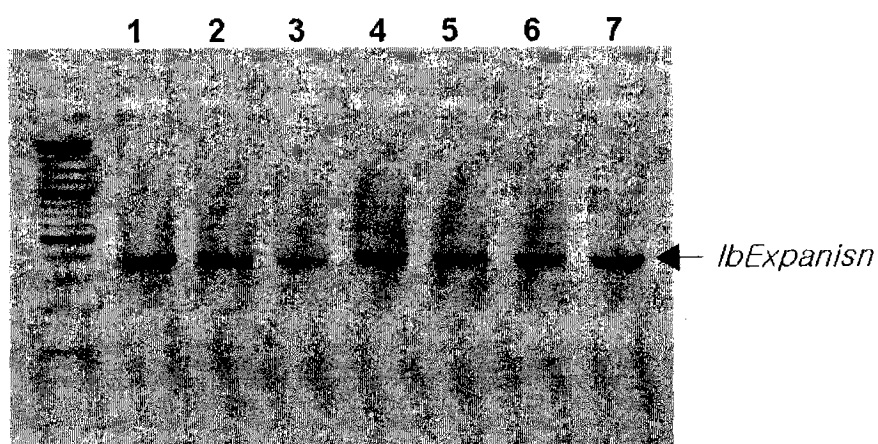


图 2

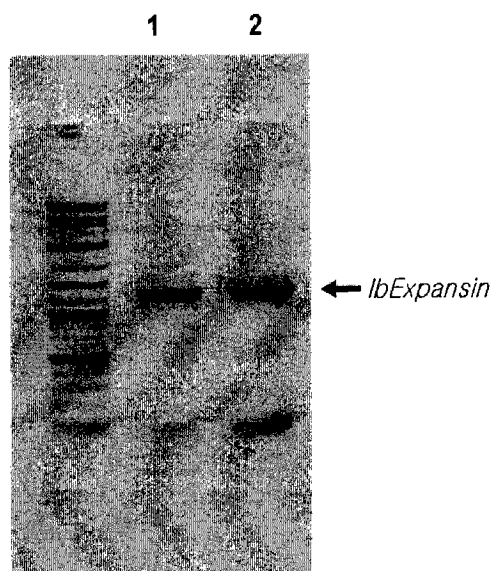


图 3

PcExpansin :	-----HNLALAYGFOVLGLAATSCNAYGGGGVMAAATFYGGGLASGTHGGACG :	51
PpExpansin :	-----HNLALAYGFOVLGLAATSCNAYGGGGVMAAATFYGGGLASGTHGGACG :	51
PaExpansin :	-----HNLALAYGFOVLGLAATSCNAYGGGGVMAAATFYGGGLASGTHGGACG :	51
CaExpansin :	-----HNLG-LLDGGISLQFSVQVGG--HDAATFYGGGLASGTHGGACG :	46
LeExpansin :	-----HALLA-LLDGGISLQFSVQVGG--HDAATFYGGGLASGTHGGACG :	46
lbExpansin :	HSSSTRSEATTHAVLE-LLAVGVATIESPVHGMG--GSSAATFYGGGLASGTHGGACG :	57

PcExpansin :	EGNLYSGYGTNTAALSTALENNGLGCGCYETFCVNDPFWCLPGATVVVIAIHFCEPDMA :	111
PpExpansin :	EGNLYSGYGTNTAALSTALENNGLGCGCYETFCVNDPFWCLPGATVVVIAIHFCEPDMA :	111
PaExpansin :	EGNLYSGYGTNTAALSTALENNGLGCGCYETFCVNDPFWCLPGATVVVIAIHFCEPDMA :	111
CaExpansin :	EGNLYSGYGTNTAALSTALENNGLSCGCFQILCVNADQCLPGATVVVIAIHFCEPDMA :	103
LeExpansin :	EGNLYSGYGTNTAALSTALENNGLSCGCFQILCVNADQCLPGATVVVIAIHFCEPDMA :	103
lbExpansin :	EGNLYSGYGTNTAALSTALENNGLSCGCFQILCVNADQCLPGATVVVIAIHFCEPDMA :	113

PcExpansin :	LPNNAGGCHPQTHEDLSQPVFQDLAQYKAGVVPVAYRRVPCRRGGIREFTINGHSYFM :	171
PpExpansin :	LPNNAGGCHPQTHEDLSQPVFQDLAQYKAGVVPVAYRRVPCRRGGIREFTINGHSYFM :	171
PaExpansin :	LPNNAGGCHPQTHEDLSQPVFQDLAQYKAGVVPVAYRRVPCRRGGIREFTINGHSYFM :	171
CaExpansin :	-----GGCHPQTHEDLSQPVFQDLAQYKAGVVPVAYRRVPCRRGGIREFTINGHSYFM :	158
LeExpansin :	-----GGCHPQTHEDLSQPVFQDLAQYKAGVVPVAYRRVPCRRGGIREFTINGHSYFM :	158
lbExpansin :	-----GGCHPQTHEDLSQPVFQDLAQYKAGVVPVAYRRVPCRRGGIREFTINGHSYFM :	168

PcExpansin :	LVLITNVGGAGDVHSVSVKGSRTQWMSRNHGQHWQSYLNGQSLSEFVTISDGRTVV :	231
PpExpansin :	LVLITNVGGAGDVHSVSVKGSRTQWMSRNHGQHWQSYLNGQSLSEFVTISDGRTVV :	231
PaExpansin :	LVLITNVGGAGDVHSVSVKGSRTQWMSRNHGQHWQSYLNGQSLSEFVTISDGRTVV :	231
CaExpansin :	LVLITNVGGAGDVHSVSVKGSRTQWMSRNHGQHWQSYLNGQSLSEFVTISDGRTVV :	218
LeExpansin :	LVLITNVGGAGDVHSVSVKGSRTQWMSRNHGQHWQSYLNGQSLSEFVTISDGRTVV :	218
lbExpansin :	LVLITNVGGAGDVHSVSVKGSRTQWMSRNHGQHWQSYLNGQSLSEFVTISDGRTVV :	228

PcExpansin :	SYNAAPAHSEFGQYSGQIFR :	252
PpExpansin :	SYNAAPAHSEFGQYSGQIFR :	252
PaExpansin :	SYNAAPAHSEFGQYSGQIFR :	252
CaExpansin :	SYNAAPSSHSEFGQYSGQIFR :	239
LeExpansin :	SYNAAPSSHSEFGQYSGQIFR :	239
lbExpansin :	SYNAAPSSHSEFGQYSGQIFR :	249

PcExpansin - '酸樱桃'
PpExpansin - '桃'
PaExpansin - '甜樱桃'
CaExpansin - '辣椒'
LeExpansin - '蕃茄'
lbExpansin - '甘薯'

图 4

扩张蛋白氨基酸序列之间的同源性

序列比较		同一性 (%)
		总体
<i>IbExpansin</i>	<i>LeExpansin</i>	78
	<i>CaExpansin</i>	79
	<i>PcExpansin</i>	73
	<i>PaExpansin</i>	73
	<i>PpExpansin</i>	73

图 5

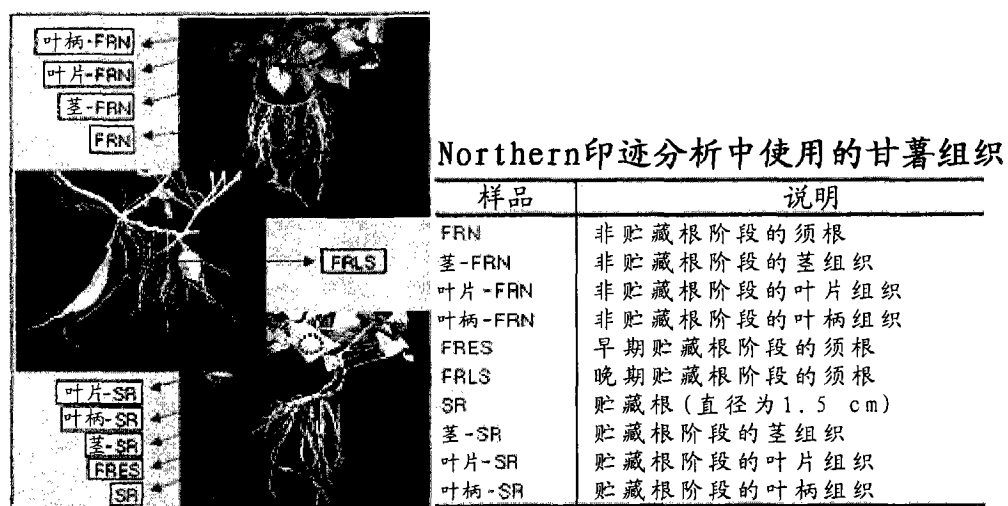


图 6

IbExpansin 的表达模式

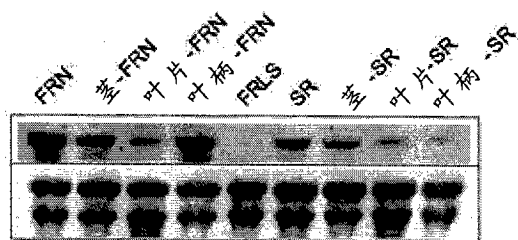


图 7

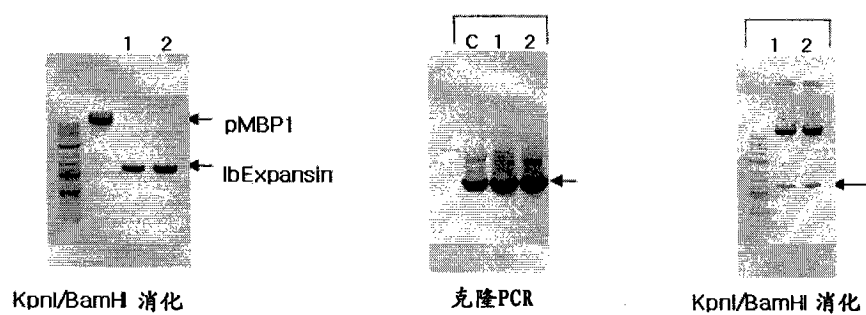


图 8

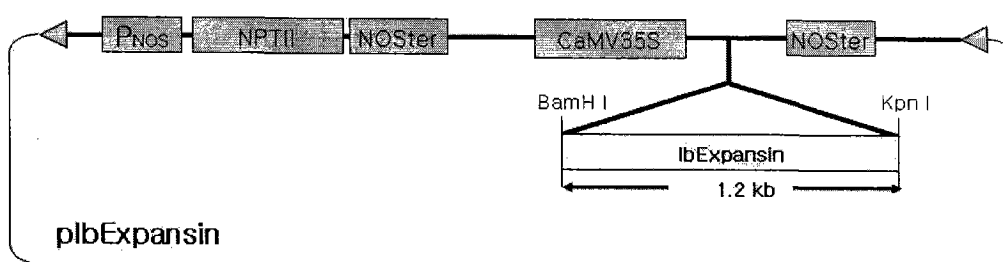


图 9

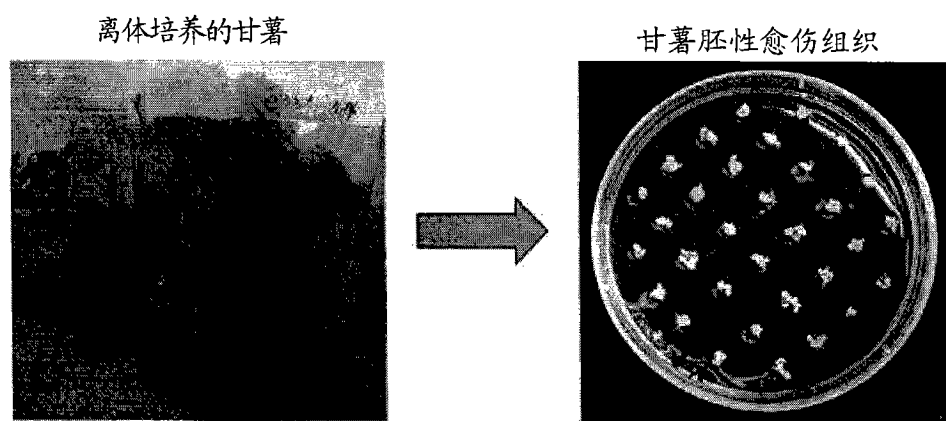


图 10

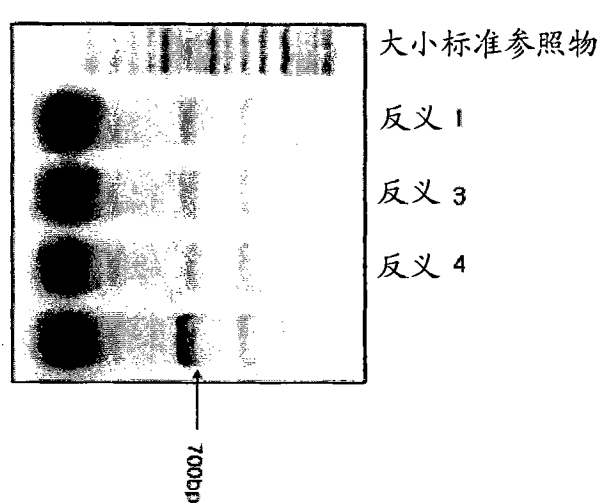


图 11

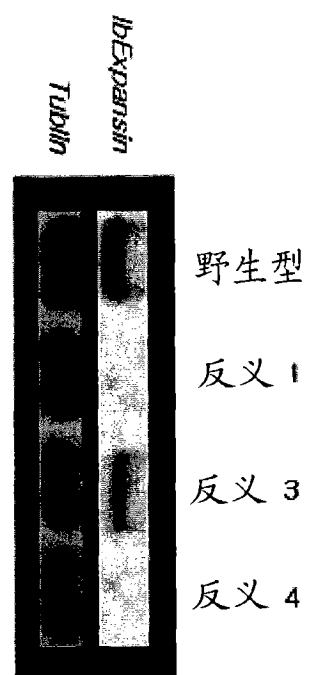


图 12

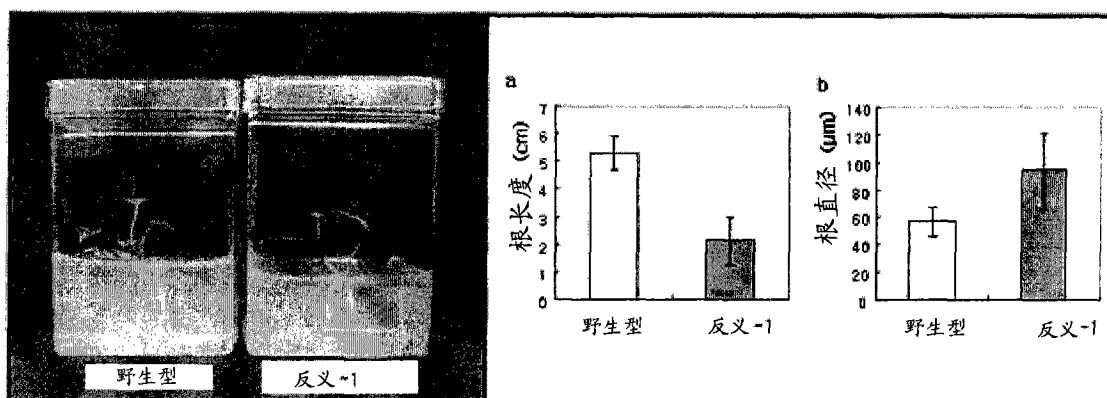


图 13

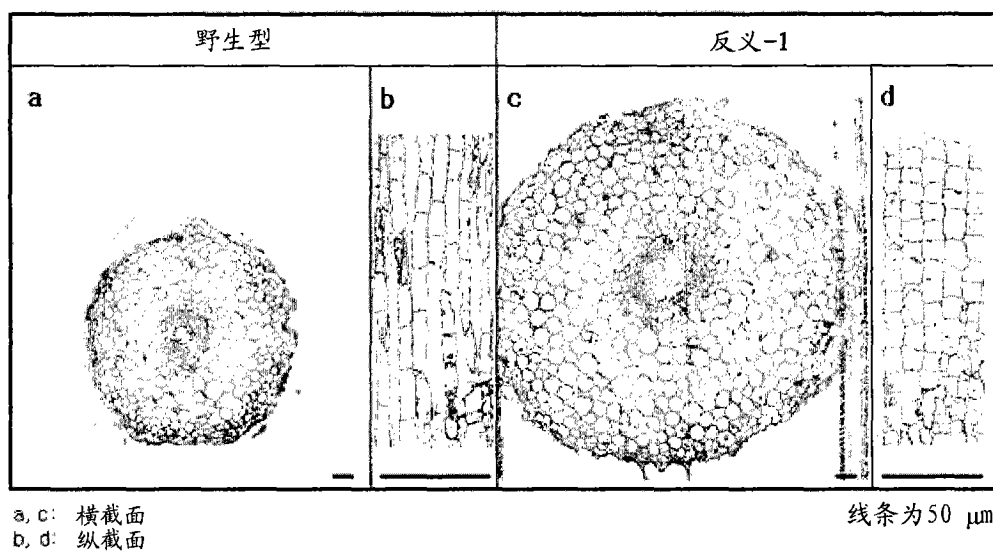


图 14

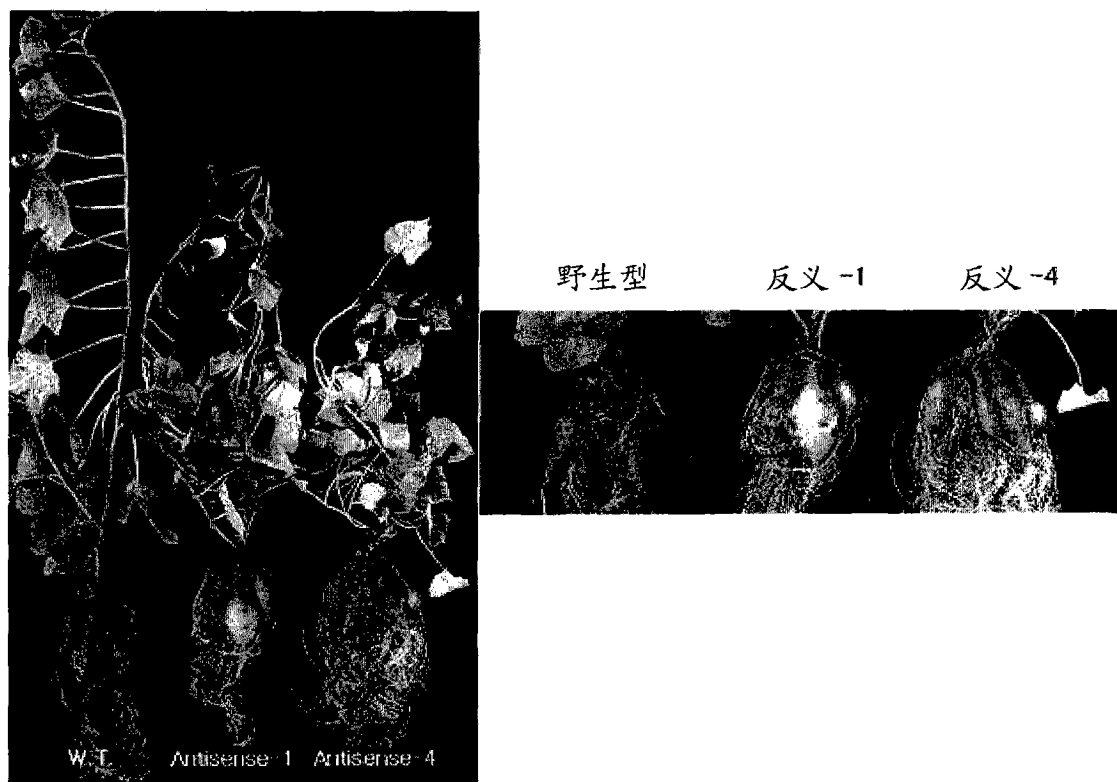


图 15

	贮藏根		枝条	
	数量	总重量(g)	数量	总重量(g)
野生型	4.75 ± 0.96	163.71 ± 24.62	2.5 ± 0.58	118.13 ± 19.02
反义-1	5.33 ± 0.58	248.20 ± 33.93	3.3 ± 0.58	118.48 ± 11.66
反义-4	8.25 ± 1.50	224.45 ± 30.55	2.8 ± 0.75	118.48 ± 11.02

图 16