



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101082048 B

(45) 授权公告日 2010. 12. 15

(21) 申请号 200710102241. 7

(22) 申请日 2007. 05. 08

(30) 优先权数据

10-2006-0049596 2006. 06. 01 KR

(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 朴宣希 郭满燮

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

公司 11127

代理人 丁香兰 赵晓梅

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006. 01)

C12N 15/82 (2006. 01)

C07H 21/04 (2006. 01)

C07K 14/415 (2006. 01)

(56) 对比文件

Dongsu Choi 等. Regulation of Expansin

Gene Expression Affects Growth and

Development in Transgenic Rice Plants. The
Plant Cell 15. 2003, 151386-1398.

Soizic F. Rochange 等. Expression of a
heterologous expansin in transgenic tomato
plants. Planta 211. 2000, 211583-586.

龙程等. 膨胀素—一个引人注目的细
胞壁松弛酶候选者. 植物生理学通讯 33
3. 1997, 33(3), 208-212.

审查员 张鑫蕊

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 5 页

(54) 发明名称

甘薯扩展蛋白 cDNA 和使用该 cDNA 的高产转
基因植物

(57) 摘要

本发明涉及甘薯扩展蛋白 cDNA 和使用该
cDNA 的高产转基因植物, 具体地说, 本发明公开
了甘薯扩展蛋白 cDNA (IbExpansin), 携带有该
cDNA 的植物转化载体以及包含该载体的转基因
植物. 使用该 IbExpansin cDNA 制备的转基因拟南
芥生长超过野生型拟南芥, 借此增加了大小, 并将
种子产量提高到最高达 3 倍. 这样, 该基因能够
用于产生高产量的转基因植物, 以提高生物量和
/ 或种子产量。

1. 一种分离的 DNA 片段,其核苷酸序列如 SEQ ID NO. :1 所示。
2. 如权利要求 1 所述的分离的 DNA 片段,其中所述的 DNA 片段是来自甘薯 (*Ipomoea batatas* cv Jinhongmi) 扩展蛋白基因 (IbExpansin) 的 cDNA。
3. 一种用于转化植物的二元载体,其包含权利要求 1 所述的 DNA 片段。
4. 一种微生物,其包含权利要求 1 所述的 DNA 片段或权利要求 3 所述的载体。
5. 一种适合扩增 DNA 片段的 PCR 引物,所述 DNA 片段的核苷酸序列如 SEQ ID NO. :1 所示,所述引物由 SEQ ID NO :5 或 6 中所示的核苷酸序列所表示。
6. 甘薯扩展蛋白基因 (IbExpansin) 的 DNA 片段,其核苷酸序列如 SEQ ID NO. :11 所示。
7. 一种用于转化植物的二元载体,其包含权利要求 6 所述的甘薯扩展蛋白基因 (IbExpansin) 的 DNA 片段。
8. 一种微生物,其包含权利要求 6 所述的 DNA 片段或权利要求 7 所述的载体。
9. 一种由权利要求 6 所述的 DNA 片段翻译而来的分离的多肽,其氨基酸序列如 SEQ ID NO. :2 所示。
10. 一种用于提高生物量和 / 或种子产量的方法,其包括将权利要求 3 或 7 所述的载体引入到植物中。

甘薯扩展蛋白 cDNA 和使用该 cDNA 的高产转基因植物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于产生高产转基因植物的甘薯扩展蛋白 (expansin) cDNA。更具体地说, 本发明涉及甘薯扩展蛋白 cDNA, 携带该 cDNA 的转化载体, 以及制备具有提高的生物量和 / 或种子产量的转基因植物的方法。

背景技术

[0002] 自从 Cosgrove 及其合作者发现了扩展蛋白 (McQueen-Mason 等人, 1992, Plant Cell 4, 1425 ~ 1433), 人们对扩展蛋白已经进行了深入研究。在早期的研究中, 扩展蛋白被认为是细胞壁疏松酶, 其至少部分介导植物细胞壁的 pH 依赖性扩展以及细胞的生长 (Cosgrove, 2000, Nature 407, 321 ~ 326)。其后, 发现扩展蛋白是 α -形式或 β -形式 (Shcherban 等人, 1995, PNAS 92, 9245 ~ 9249)。

[0003] 最近, 已经发现扩展蛋白除了参与调节细胞扩展外, 还参与调节多种其他植物过程, 其包括形态发生 (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)、重力应答根 (graviresponding root) 的伸长 (Zhang 和 Hasenstein, 2000, Plant Cell Physiology 41, 1305 ~ 1312) 以及根部细胞的伸长 (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, 充分研究了扩展蛋白在受淹涝的水稻 (flooded rice) 和番茄中的表达模式。已经发现在番茄的芽的顶端分生组织中表达扩展蛋白以用于早期叶原基的发端 (Reinhardt 等人, 1998, Plant Cell 10, 1427 ~ 1437)。克隆了一种扩展蛋白基因 (Exp1) 并且发现该基因通过其转化体而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)。扩展蛋白 mRNA 在细胞壁的生长速率或疏松程度刚要开始提高时积聚, 这暗示扩展蛋白基因的表达与细胞的伸长相关 (Cho 和 Kende, 1997a, Plant Cell 9, 1661 ~ 1671; 1997b, Plant Physiology 113, 1137 ~ 1143; 1998, Plant Journal 15, 805-812)。已观察到在其中过表达扩展蛋白的转基因水稻植株与野生型相比进一步提高了子叶长度 31% ~ 97% (Choi 等人, 2003 Plant Cell, 15:1386 ~ 1398)。然而, 该转基因水稻植株因为雄性不育而不能够结种。

[0005] 提高谷粒的产量是非常重要的, 因为谷类植物的种子是大部分人的主食。因为淀粉通常占每颗谷粒的 60 重量% ~ 70 重量%, 所以科学家已经进行了大量努力以增加谷粒的淀粉含量, 借此提高谷粒的产量。

[0006] 已知腺苷二磷酸-葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-AGPase) 是别构酶, 其催化质体中淀粉合成的首要关键步骤 (即, 将葡萄糖-1-磷酸和 ATP 转化为 ADP-葡萄糖和 PPi) 并且对于别构调节非常敏感, 其中 3-磷酸甘油酸 (3PGA) 作为激活剂, Pi 作为抑制剂。已经将编码这种酶的基因用于增强谷粒中淀粉合成的研究中。通过加入对应于 6 个核苷酸的 2 个氨基酸残基 (酪氨酸和丝氨酸) 衍生自玉米 AGPase 的突变体 (Sh2-Rev6) 变得对 AGPase 的抑制剂

不敏感并且促进玉米粒中的淀粉合成,从而使种子重量提高了 11%~18% (Giroux 等人, 1996, PNAS 93, 5824 ~ 5829)。该玉米突变体 AGPase (Sh2r6hs) 已经降低了对抑制剂的敏感度,并且表现出其小亚基和大亚基间的更稳定结合。与野生型相比,使用 CaMV35S 启动子的转基因 Sh2r6hs 小麦系每株植物产生了平均多 38% 的种子重量 (Smidansky 等人, 2002, PNAS 99, 1724 ~ 1729)。与野生型相比,使用胚乳特异性启动子 (玉米泛素启动子) 的转基因 Sh2r6hs 水稻系产生了平均多 20% 的种子和植株重量 (Smidansky 等人, 2003, Planta, 216, 656-664)。

[0007] 因此,已经有对能够显著提高生物量或种子产量的转基因植物的需要。

发明内容

[0008] 因此,考虑到现有技术中所存在的上述问题,已经实现了本发明,并且本发明的目的是提供甘薯扩展蛋白 (IbExpansin) cDNA,使用该 cDNA 能够制备高产的转基因植物。

[0009] 本发明的另一个目的是提供携带 IbExpansin cDNA 的植物转化载体。

[0010] 本发明进一步的目的是提供包含携带有 IbExpansin cDNA 的载体的高产转基因植物。

[0011] 根据本发明的一个方面,提供了分离的 DNA 片段,其包含 SEQ ID NO. :1 的核苷酸序列。

[0012] 优选该 DNA 片段是从甘薯 (*Ipomoea batatas* cv Jinhongmi) 扩展蛋白基因 (IbExpansin) 合成的 cDNA。

[0013] 根据本发明的另一个方面,提供了用于转化植物的二元载体,其包含该 DNA 片段。

[0014] 根据本发明进一步的方面,同样提供了包含所述 DNA 片段或所述载体的微生物。

[0015] 在另外一个方面中,本发明提供了包含所述 DNA 片段或所述载体的转基因植物。

[0016] 在更进一步的方面中,本发明提供了适合扩增 DNA 片段的 PCR 引物,所述 DNA 片段包含 SEQ ID NO. :1 的核苷酸序列,所述引物由 SEQ ID NO. :5 或 6 中所示的核苷酸序列表示。

[0017] 在另外一个方面中,本发明提供了甘薯扩展蛋白基因 (IbExpansin) 的可读框 (ORF),其包含 SEQ ID NO. :11 的核苷酸序列,其范围是 SEQ ID NO. :1 的第 34 位核苷酸~第 750 位核苷酸。

[0018] 在更加进一步的方面中,本发明提供了用于转化植物的二元载体,其包含甘薯扩展蛋白基因 (IbExpansin) 的 ORF。

[0019] 在另外一个方面中,本发明提供了包含所述 ORF 或所述二元载体的微生物。

[0020] 在更加进一步的方面中,本发明提供了包含所述 ORF 或所述二元载体的转基因植物。

[0021] 在另外一个方面中,本发明提供了一种从所述 ORF 翻译而来的分离的多肽,其包含 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列。

[0022] 在最后一个方面中,本发明提供了用于提高种子产量和 / 或生物量的方法,其包括将扩展蛋白基因插入到二元载体中,并将该二元载体引入到植物中。

附图说明

[0023] 通过下面的详细描述并结合附图,将更清楚地理解本发明的上述和其他目的、特

征和其他优点,其中:

[0024] 图 1 是显示用于克隆全长甘薯扩展蛋白 cDNA 的初次 PCR(聚合酶链式反应)的结果的图;

[0025] 图 2 是显示用于克隆全长甘薯扩展蛋白 cDNA 的再次 PCR 的结果的图,其使用初次 PCR 的产物作为模板;

[0026] 图 3 是显示根据本发明通过 PCR 克隆的全长甘薯扩展蛋白 cDNA 的图;

[0027] 图 4 显示本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA 的氨基酸序列与其他植物扩展蛋白 cDNA 的氨基酸序列的比较;其中:

[0028] PcExpansin:‘欧洲酸樱桃 (*Prunus cerasus*)’

[0029] PpExpansin:‘桃 (*Prunus persica*)’

[0030] PaExpansin:‘欧洲甜樱桃 (*Prunus avium*)’

[0031] CaExpansin:‘辣椒 (*Capsicum annuum*)’

[0032] LeExpansin:‘番茄 (*Lycopersicon esculentum*)’

[0033] IbExpansin:‘甘薯 (*Ipomoea batatas*)’;

[0034] 图 5 显示在检测本发明的甘薯扩展蛋白基因的表达模式中所使用的甘薯组织;其中在 Northern 印迹分析中所使用的甘薯组织如下

[0035]

样品	描述
FRN	非贮藏根阶段的须根
茎-FRN	非贮藏根阶段的茎组织
叶-FRN	非贮藏根阶段的叶组织
叶柄-FRN	非贮藏根阶段的叶柄组织
FRES	早期贮藏根阶段的须根
FRLS	晚期贮藏根阶段的须根
SR	贮藏根(直径<1.5 cm)
茎-SR	贮藏根阶段的茎组织
叶-SR	贮藏根阶段的叶组织
叶柄-SR	贮藏根阶段的叶柄组织

[0036] 图 6 显示根据本发明的甘薯扩展蛋白基因(IbExpansin)的表达模式;其中,1:FRN;2:茎-FRN;3:叶-FRN;4:叶柄-FRN;5:FRLS;6:SR;7:茎-SR;8:叶-SR;9:叶柄-SR;

[0037] 图 7 显示在构建用于携带本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA 进入拟南芥(*Arabidopsis*)的二元载体的各种过程阶段所得到的结果;其中,a:KpnI/BamHI 消化;b:菌落 PCR;c:KpnI/BamHI 消化;

[0038] 图 8 是显示用于携带本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA 进入拟南芥的 pIbExpansin 二元载体的结构的示意图;

[0039] 图 9 显示本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA 在拟南芥转化体中的表达 ;其中,1 :大小标记物 ;2 :WT ;3 :Exp-1 ;4 :Exp-4 ;5 :Exp-22 ;

[0040] 图 10 显示表达本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA 的拟南芥转化体与野生型之间叶子生长的比较 ;其中,在 a 中,□ :宽度,长度 40mm ;

[0041] 图 11 显示表达本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA 的拟南芥转化体与野生型的种子 ;

[0042] 图 12 显示表达本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA 的拟南芥转化体与野生型之间种子中淀粉含量的比较 ;

[0043] 图 13 显示表达本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA 的拟南芥转化体与野生型之间种子中蛋白质含量的比较。

具体实施方式

[0044] 为了达到这些目的,本发明的发明人取得了以下成功 :克隆了甘薯扩展蛋白 cDNA (IbExpansin),构建了适合植物转化的携带有所述克隆的二元载体,并将该载体转化入拟南芥。发现该转基因拟南芥在生物量方面有了显著提高,并且特别是种子产量提高了 3 倍。

[0045] 因此,在一个方面,本发明提供了分离的 DNA 片段,其包含 SEQ ID NO. :1 的核苷酸序列。

[0046] 所述 cDNA 具有长 1,213bp 的核苷酸序列,其由 33bp 的 5' -UTR、717bp 的 ORF (可读框 ;SEQ ID NO. :11) 以及 463 bp 的 3' -UTR 构成。

[0047] 根据另一个方面,本发明提供了分离的多肽,其具有从所述 ORF 翻译而来的 SEQ ID NO. :2 的氨基酸序列。

[0048] 根据进一步的方面,本发明提供了用于转化植物的携带有所述甘薯 (*Ipomoea batatas* cv Jinhongmi) 扩展蛋白 cDNA (IbExpansin) 的二元载体 (pIbExpansin)。

[0049] 所述植物转化载体是二元载体,其能够在植物中稳定表达感兴趣的外源基因。

[0050] 在 pMBP1 载体中,本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA (IbExpansin) 定位在 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子之间。本领域技术人员应该理解,可以使用任何其他植物转化载体来代替 pMBP1 载体。

[0051] 根据更进一步的方面,本发明提供了在二元载体上携带有本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA (IbExpansin) 的转基因拟南芥。

[0052] 所述二元载体可以通过使用农杆菌 (*Agrobacterium*) 或基因枪而引入到植物中。在本发明的实施方式中,将浸花法 (floral dip) (Clough 和 Bent,1998, Plant J.) 用于转化拟南芥。

[0053] 除了拟南芥外,还可以将本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA (IbExpansin) 引入到任何适合具有提高的生物量或种子产量的植物中。

[0054] 根据另外一个方面,本发明提供了用于 PCR 扩增本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA (IbExpansin) 的一对引物,其分别由 SEQ ID NO. :5 和 SEQ ID NO. :6 所表示。

[0055] 进一步,本发明提供了提高种子产量和 / 或生物量的方法,其通过将扩展蛋白基因插入到二元载体并将该二元载体引入到植物中。如上所述,已公开了一些扩展蛋白家族基因,但是在本发明之前的报告中,没有任何地方提到扩展蛋白基因用于种子产量的提高

的应用。根据本发明,可将多种扩展蛋白基因引入到植物中以提高它们的生物量和 / 或种子产量。

[0056] 本发明针对甘薯 (*Ipomoea batatas*) 扩展蛋白 cDNA (IbExpansin), 如果使用该 cDNA 进行转化则使得植物能够提高生物量和 / 或种子产量。因此, 本发明能够有效地用于高产植物的产生。

[0057] 通过以下实施例能够得到对本发明的更好理解, 提供以下实施例是为了说明本发明, 而不能解释为对本发明的限制。

[0058] 实施例 1 : 甘薯扩展蛋白 cDNA 的克隆

[0059] 从甘薯的新鲜贮藏根分离总 RNA, 并将其用于构建 EST (表达序列标签) 文库。使用该文库, 克隆了 2,859 个 EST, 并保存在国家生物技术信息中心 (National Center for biotechnology Information, NCBI), 其 NCBI 登记号为 : NO. BU690119 ~ BU692977 (You 等人, 2003, FEBS Letters 536, 101 ~ 105)。其中, 发现 IbExpansin (NCBI 登记号 No. BU691452) 为大约 1kb 长, 并将其鉴定为缺少起始密码子 ATG 的部分 cDNA。为了得到全长 IbExpansin, 在存在 IbExpansin- 特异性引物 (SEQ ID NO. :3) 和 T3 载体引物的情况下, 使用先前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, 在所期望的 5' 全长大小的位置没有见到的条带 (图 1)。

[0060] 从在期望的全长位置的琼脂糖凝胶切下来的凝胶片中洗脱 DNA 片段, 并将所述 DNA 片段作为模板进行 PCR, 其利用一组基因特异性的嵌套引物 (SEQ ID NO. :4) 和 T3 引物。结果, 得到了具有大约 350bp 长度的 PCR 产物 (图 2)。

[0061] 将该 PCR 产物插入到 pGEM-T Easy 载体中, 以进行测序分析并鉴定 IbExpansin 的 5' 序列。

[0062] 以该核苷酸序列为基础, 合成了分别在其末端提供有 BamHI 和 KpnI 限制性位点的 5' 和 3' 引物。使用这些引物进行 RT-PCR 以获得全长 IbExpansin (图 3)。

[0063] 实施例 2 : 全长 IbExpansin 的核苷酸序列的测序和分析

[0064] 通过 PCR 克隆了 1.2kb 的全长 cDNA, 并将其插入到 pGEM-T Easy 载体中, 接着对所述载体进行扩增。测序分析揭示 IbExpansin 为 1,213bp 长, 并且由 33bp 的 5'-UTR、717bp 的 ORF 和 463bp 的 3'-UTR 构成。将该全长 IbExpansin cDNA 保存在 NCBI, 其登记号为 No. : DQ515800)。由 239 个氨基酸构成的 IbExpansin 氨基酸序列除了 N- 末端区域外都是高度保守的 (图 4), 并且与番茄和胡椒的扩展蛋白氨基酸序列具有高达 78% 的同源性 (表 1)。在表 1 中显示本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA 与其他植物扩展蛋白 cDNA 之间氨基酸序列的同源性。

[0065] 表 1 扩展蛋白氨基酸序列之间的同源性

[0066]

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

[0067] 实施例 3 :组织的 Northern 印迹分析

[0068] 1. Northern 印迹

[0069] 通过 Northern 印迹利用处于不同发育阶段的各种组织检测 *IbExpansin* 的表达模式。

[0070] 为了分离总 RNA,将处于各种发育阶段的甘薯的根、茎、叶和叶柄用作 RNA 源。即:从以下组织中分离总 RNA(图 5):处于非贮藏根阶段的组织,例如根(FRN:处于非贮藏根阶段的须根)、茎(茎-FRN)、叶(叶-FRN)和叶柄(叶柄-FRN);处于早期贮藏根阶段的组织,例如根(处于早期贮藏根阶段的须根, FRES);处于贮藏根阶段的组织,例如根(SR)、茎(茎-SR)、叶(叶-SR)和叶柄(叶柄-SR);和处于晚期贮藏根阶段的组织,例如根(处于晚期贮藏根阶段的须根, FRLS)。使用 4.4M 的胍盐-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。在 1%琼脂糖-甲醛凝胶上对大约 20 μg 所提取的总 RNA 进行电泳,并将其转移到 Tropilon-plus™ 尼龙膜(Tropix,美国)上。

[0071] 通过扩增从 2.5ng 的携带有 1kb 扩展蛋白 EST 克隆的质粒利用 PCR 得到了探针,其中所述 PCR 是在 PCR 混合物中进行的,所述 PCR 混合物含有 100 μM 除了 dCTP 之外的 dNTP 混合物、100 μM 的 dCTP-生物素、各为 10 μM 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×PCR 缓冲液和 1 单位的 Taq 聚合酶,终体积为 10 μl,开始时在 95℃ 预变性 5 分钟;接着进行 35 个循环:95℃ 变性 10 秒、65℃ 退火 30 秒;以及 72℃ 延伸 30 秒。

[0072] 使用 QIAquick™ PCR 纯化试剂盒(QIAGEN,德国)对 PCR 扩增的生物素标记的探针进行纯化,并将其以大约 100ng 的量加到膜上,接着在 65℃ 杂交 18 个小时。使用 2×SSC/1% SDS 在室温下对膜清洗两次,每次 5 分钟,接着使用 0.1×SSC/1% SDS 在室温下清洗两次,每次 15 分钟,最后使用 1×SSC 在室温下清洗两次,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×PBS、0.2% I-Block™ Reagent 和 0.5% SDS)对印迹进行处理,并使用偶联有碱性磷酸酶的链霉抗生物素蛋白进行标记,接着使用 CDP-Star™(Ready-to-Use)进行处理。将膜暴露到 X-光胶片(Fujifilm,日本),时间为 10 分钟~1.5 小时。

[0073] 2. *IbExpansin* 的表达模式

[0074] 在包括 FRN、茎-FRN、叶-FRN 和叶柄-FRN 的处于非贮藏根阶段的组织中对

IbExpansin 的表达进行检测,其中 FRN 和叶柄 -FRN 具有最高的水平。然而,在晚期贮藏根阶段的须根 (FRLS) 中检测到 IbExpansin 显著降低的表达水平,同时在处于贮藏根阶段的茎和叶中检测到显著低水平(图 6)。这些表达模式强烈暗示:IbExpansin 在处于活跃伸长生长的组织中活跃表达。

[0075] 实施例 4:二元载体的构建

[0076] BamHI 和 KpnI 限制性酶切位点在用于 PCR 扩增全长 IbExpansincDNA 的引物 (SEQ ID NO. :5 和 SEQ ID NO. :6) 中的存在使得利用 BamHI 和 KpnI 对 pGEM-T Easy 载体进行消化以从其切出 cDNA 成为可能。将 cDNA 插入到 pMBP1 载体中的 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子之间以构建二元载体 pIbExpansin(图 8)。通过菌落 PCR 和限制性酶消化对该插入进行确认(图 7)。

[0077] 实施例 5:将 pIbExpansin 转化入拟南芥中

[0078] 利用冻融法 (An, G.1987, Methods in Enzymology),将在实施例 4 中所构建的 pIbExpansin 载体引入到根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) C58C1 中。

[0079] 在 28℃对在载体上携带有感兴趣基因的农杆菌随着搅拌培养 2 天,接着在刚刚开花之前使之与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* cv. *columbia*) 的柱头接触以便转化该植物。

[0080] 实施例 6:对拟南芥转化体进行筛选和鉴定

[0081] 从实施例 5 中所制备的拟南芥转化体收集种子,并将其铺在含有 30mg/L 卡那霉素的组织培养 MS 平板上。将推定的转化体 (T1) 移植到土壤中,并用于培育 T2 植株,所述 T2 植株由于引入了单拷贝的 IbExpansin cDNA 而表现出对卡那霉素抗性的 3:1 的分离比例,并从 T2 植株中收集纯合的种子。定量分析从 T2 植株中随机选择的 3 个品系 (Exp-1、Exp-4 和 Exp-22) 的 IbExpansin 表达水平。

[0082] 为了测定被转化的拟南芥中 IbExpansin 的表达水平,借助 Tri-Reagent (Invitrogen, 美国) 从被转化的拟南芥的叶子中分离总 RNA 并将其在存在 SuperScript™ III (Invitrogen, 美国) 的情况下,利用寡聚 (dT) 进行反转录。将拟南芥的 eIF4A1 基因用作内参。同时使用 IbExpansin 特异性引物 (5'-GTAGGATCCCATTCCTCTACCAAT TCAACTGAA-3'; SEQ ID NO. :5; 5'-GATGGTACCACTGTCTCCACACTCAGCATT-3'; SEQ ID NO. :6) 和 eIF4A1 引物 (5'-GCTCTCCCGTGGTTTCAAGGACCAGATC-3'; SEQ ID NO. :9; 5'-GTCTGTGAGCC AATCAACCTTACGCCTG-3'; SEQ ID NO. :10) 进行 RT-PCR,所述 RT-PCR 开始时是在 94℃预变性 5 分钟;接着是进行 30 个循环:94℃变性 30 秒、58℃退火 30 秒以及 72℃延伸 1 分钟;之后是最终在 72℃延伸 7 分钟。通过琼脂糖凝胶电泳对这样所产生的 PCR 产物进行分离,以检测野生型带中未出现的 IbExpansin 转录体(图 9)。

[0083] 实施例 7:转基因拟南芥的生长分析

[0084] 在 IbExpansin 拟南芥转化体和野生型之间进行生长模式的比较。将 Exp-1、Exp-4 和 Exp-22 以及野生型播种到土壤中,并在花柄刚刚出现之前,对叶子的生长状态进行比较。在叶子数目方面,Exp-1、Exp-4 和 Exp-22 与野生型没有不同,但生长要超过野生型,因此它们的叶子在长度和宽度方面都大于野生型(图 10 和表 2)。

[0085] 表 2

[0086]

测定	WT	Exp-1	Exp-4	Exp-22
叶子长度	21.43 ± 0.87	28.66 ± 0.22	32.43 ± 0.58	32.36 ± 0.83
叶子宽度	7.91 ± 0.74	9.99 ± 0.33	10.87 ± 0.27	10.21 ± 0.18

[0087] 实施例 8 :转基因拟南芥的种子产量的分析

[0088] 对 IbExpansin 拟南芥转化体的种子大小进行测定,并与野生型进行比较。在这方面,使用 T3 代的纯合种子。如在光学显微镜下所观察到的,与野生型相比,Exp-1、Exp-4 和 Exp-22 全部在种子大小方面有提高(图 11)。

[0089] 实施例 9 :转基因拟南芥的种子中淀粉含量的分析

[0090] 对 IbExpansin 拟南芥转化体的种子中淀粉含量进行测定,并与野生型进行比较。在这方面,拟南芥转化体和野生型都采用了 T4 代纯合种子。在液氮中使用研杵和研钵将这些种子磨碎,并将 1g 每种磨碎的种子加入到在 150mL 锥形瓶中的 25ml 蒸馏水中。将蒸馏水中的样品随着搅拌煮沸 3 分钟,接着在灭菌器中于 135℃降解淀粉 1 小时。将水溶液置于室温以将温度降低到大约 60℃。在加入 100ml 蒸馏水后,使用淀粉化验试剂盒(SIGMA)根据制造商的程序对样品溶液的淀粉浓度进行分析。IbExpansin 拟南芥转化体具有在一颗 Exp-1 种子中 $1.55 \pm 0.13 \mu\text{g}$ 的淀粉含量,在一颗 Exp-4 种子中具有 $1.48 \pm 0.03 \mu\text{g}$ 的淀粉含量,在一颗 Exp-22 种子中具有 $1.54 \pm 0.06 \mu\text{g}$ 的淀粉含量,这都在重量上超过了野生型($0.98 \pm 0.06 \mu\text{g}$)(图 12 和表 3)。

[0091] 表 3

[0092]

淀粉	WT	Exp-1	Exp-4	Exp-22
$\mu\text{g}/\text{颗种子}$	0.98 ± 0.06	1.55 ± 0.13	1.48 ± 0.03	1.54 ± 0.06

[0093] 实施例 10 :转基因拟南芥的种子中蛋白质含量的分析

[0094] 对 IbExpansin 拟南芥转化体的种子中蛋白质含量进行测定,并与野生型进行比较。在这方面,使用 T3 代的纯合种子。将每种所述转化体和野生型的 T3 代的 100 个种子在蛋白质提取溶液(250mM 蔗糖、50mM Tris HCl (pH8.0)、2mM DTT、2mM EDTA 和蛋白质抑制剂混合物)中使用钻子和塑料棒磨碎,之后在 4℃于 12,000rpm 离心 10 分钟。将上清液转到新管中,并使用蛋白质化验试剂盒(BioRad)对上清液进行定量分析以得到每颗种子的蛋白质含量。发现所有的 IbExpansin 拟南芥转化体 Exp-4 和 Exp-22 均具有比野生型高的蛋白质含量。这通过将 $2 \mu\text{l}$ 的每种样品上样到 12%的 SDS/聚丙烯酰胺凝胶中,进行电泳并使用考马斯亮蓝显像而确认(图 13 和表 4)。

[0095] 表 4

[0096]

基因型	μg 蛋白质/颗种子
WT	3.18 ± 0.04
Exp-4-1	5.04 ± 0.16
Exp-4-4	5.01 ± 0.11
Exp-22-10	4.04 ± 0.18

[0097] 实施例 11 :转基因拟南芥的种子产量的分析

[0098] 检验 IbExpansin 拟南芥转化体 Exp-4 每 1000 颗种子的重量、每棵植株的长角果数目、每个长角果的种子数目、种子的总数目以及种子的总重量。其结果提供在图 12 和表 3 中。如该图和表所示,在每 1000 颗种子的重量、每棵植株的长角果数目、每个长角果的种子数目、种子的总数目以及种子的总重量方面,IbExpansin 拟南芥转化体均优于野生型。结果,测定的每棵 IbExpansin 拟南芥转化体植株的种子产量为 $444.27 \pm 0.62\text{mg}$,这比野生型的 $149.73 \pm 0.19\text{mg}$ 重 3 倍(表 5)。在表 5 中显示表达本发明的甘薯扩展蛋白 cDNA 的拟南芥转化体与野生型之间种子产量的比较。

[0099] 表 5 :转基因 IbExpansin- 拟南芥的种子产量

[0100]

基因型	种子重量 ¹	每个长角果 的种子数目	每棵植株的 长角果数目	种子的 总数目	种子的总 重量, mg
野生型	14.25 ± 1.16	52.8 ± 3.34	199 ± 48.7	$10,507.2 \pm 162.66$	149.73 ± 0.19
Exp-4	22.43 ± 1.49	58.6 ± 4.17	338 ± 99.1	$19,806.8 \pm 413.25$	444.27 ± 0.62

[0101] ¹ 以每 1,000 颗种子的 mg 数表示所产生的种子的重量。

[0102] 因此,本发明的 IbExpansin cDNA 能够用于提高植物的生物量,特别是能够用于提高农作物的种子产量。

[0103] 工业实用性

[0104] 正如目前为止所描述的,本发明提供了能够用于转化植物的 IbExpansin cDNA(获自 *Ipomoea batatas* cv Jinhongmi 的扩展蛋白 cDNA),所得到的转基因植物能够以比之前高的速度生长,并且大大提高了种子产量和/或生物量。因此,本发明能够用于高产转基因植物的产生。

[0105] 尽管为说明目的,已经公开了本发明的优选实施方式,但是本领域技术人员会理解:可以进行各种改进、增加和替换,而不离开所附权利要求中所公开的本发明的范围和精神。

[0106] 序列表

[0107] <110> 高丽大学校产学协力团

[0108] <120> 甘薯扩展蛋白 cDNA 和使用该 cDNA 的高产转基因植物

[0109] <130>FAI07KR0892-C

[0110]	<150>KR 10-2006-0049596	
[0111]	<151>2006-06-01	
[0112]	<160>11	
[0113]	<170>KopatentIn 1.71	
[0114]	<210>1	
[0115]	<211>1213	
[0116]	<212>DNA	
[0117]	<213>甘薯 (Ipomoea batatas)	
[0118]	<400>1	
[0119]	cattcctcta ccaattcaac tgaagcaata acaatggcgg ttcttgagct tcttctggtc	60
[0120]	ggagttcttg ccacgttgtc tccggtgcat ggctactggg gctggagcag cgctcgcgcc	120
[0121]	accttctacg gcggcggtga tgcttctgga acaatgggcg gagcctgcgg gtatgggaac	180
[0122]	ctgtatagct caggctatgg caccaacact gcggcactta gcaccgctct gttcaacaat	240
[0123]	gggctcagct gcgggtcctg ttccagata aggtgtgtga acgaccggtc ctgcctccgc	300
[0124]	ggcgtaatca ccgtcaccgc caccaatttc tgcccgcgcg gcggctgggtg cgagccccc	360
[0125]	aaccacact ttgatctctc tcagcctgtt ttcttgagaa ttgccagta cagagccgga	420
[0126]	gttgttcccg ttgcttaccg acgggtgcct tgcaggagga gtggaggaat caggttcacc	480
[0127]	attaacggcc atgttttctt caacctggta ctagtaacca acgtgggagg ctccggcgac	540
[0128]	gtacacgccg tgtacatcaa aggatcaaga accgggtggc aaatgatgtc cagaaactgg	600
[0129]	ggccaaaact ggcagagcaa cgccaacctc aacggccaaa gcctctcatt ccgggtggtc	660
[0130]	accggcgaca gccgcagcgt cgtctcctac aacgccgctc ccccggtgtg gtccttcggc	720
[0131]	cagacctact ccggcgccca gtcccgctag gccggaattc atcaaacacc cccatTTTTT	780
[0132]	tcccgccata tatatatgat ctccaaacct atacataact aaagcctaca ccattttttac	840
[0133]	aagtttgaaa tgcaattaaa gtcattggga tgggaaaatg ttgatcaagt ttccggccgc	900
[0134]	cctctctcac ttttttttct aaaagggtt ggttttgatc gaaagccctt ttggccatga	960
[0135]	aaattggcca ttcaatcaac aagaattgaa gcagagtga agtggtagtt agttatatca	1020
[0136]	agattgtgct acccatgac tagcttaatt agtactgcat ttttatgtg attattatta	1080
[0137]	ttatgcagac aaaatgtgtc tgcataccta ccctgtggaa caacattaat ttttttttcc	1140
[0138]	tcgtcttctt cgtcgtcgtt tgtaattagt atagcattaa ggttaaacag ctaatgctga	1200
[0139]	gtgtggagac agt	
[0140]	<210>2	
[0141]	<211>238	
[0142]	<212>PRT	
[0143]	<213>甘薯 (Ipomoea batatas)	
[0144]	<400>2	
[0145]	MAVLELLLVG VLATLSPVHG YWGWSSARAT FYGGGDASGT MGGACGYGNL YSSGYGTNTA	60
[0146]	ALSTALFNNG LSCGSCFQIR CVNDRSCLRG VITVTATNFC PPGGWCEPPN PHFDLSQPVF	120
[0147]	LRIAQYRAGV VPVAYRRVPC RRS GGIRFTI NGHAFNLVL VTNVGGSGDV HAVYIKSRT	180
[0148]	GWQMMSRNWG QNWQSNANLN GQSLSFRVVT GDSRSVVSYN AAPPGWSFGQ TYSGAQFR	

- [0149] <210>3
[0150] <211>28
[0151] <212>DNA
[0152] <213> 人工序列
[0153] <220>
[0154] <223>PCR 引物
[0155] <400>3
[0156] gggcagaaat tgggtggcggg tgacggtg
[0157] <210>4
[0158] <211>28
[0159] <212>DNA
[0160] <213> 人工序列
[0161] <220>
[0162] <223>PCR 引物
[0163] <400>4
[0164] acaggaccg cagctgaccc cattgttg
[0165] <210>5
[0166] <211>33
[0167] <212>DNA
[0168] <213> 人工序列
[0169] <220>
[0170] <223>PCR 引物
[0171] <400>5
[0172] gtaggatccc attcctctac caattcaact gaa
[0173] <210>6
[0174] <211>30
[0175] <212>DNA
[0176] <213> 人工序列
[0177] <220>
[0178] <223>PCR 引物
[0179] <400>6
[0180] gatggtacca ctgtctccac actcagcatt
[0181] <210>7
[0182] <211>20
[0183] <212>DNA
[0184] <213> 人工序列
[0185] <220>
[0186] <223>PCR 引物
[0187] <400>7

[0188]	aattaaccct cactaaaggg	
[0189]	<210>8	
[0190]	<211>22	
[0191]	<212>DNA	
[0192]	<213> 人工序列	
[0193]	<220>	
[0194]	<223>PCR 引物	
[0195]	<400>8	
[0196]	cgggatatca ctcagcataa tg	
[0197]	<210>9	
[0198]	<211>28	
[0199]	<212>DNA	
[0200]	<213> 人工序列	
[0201]	<220>	
[0202]	<223>PCR 引物	
[0203]	<400>9	
[0204]	gctctcccggt ggtttcaagg accagatc	
[0205]	<210>10	
[0206]	<211>28	
[0207]	<212>DNA	
[0208]	<213> 人工序列	
[0209]	<220>	
[0210]	<223>PCR 引物	
[0211]	<400>10	
[0212]	gtctgtgagc caatcaacct tacgcctg	
[0213]	<210>11	
[0214]	<211>717	
[0215]	<212>DNA	
[0216]	<213> 甘薯 (Ipomoea batatas)	
[0217]	<400>11	
[0218]	atggcggttc ttgagcttct tctggtcgga gttcttgcca cgttgtctcc ggtgcatggc	60
[0219]	tactggggct ggagcagcgc tcgcgccacc ttctacggcg gcggtgatgc ttctggaaca	120
[0220]	atgggcggag cctgcgggta tgggaacctg tatagctcag gctatggcac caacactgcg	180
[0221]	gcacttagca ccgctctgtt caacaatggg ctcagctgcg ggtcctgttt ccagataagg	240
[0222]	tgtgtgaacg accggtcctg cctccgcggc gtaatcacgc tcaccgccac caatttctgc	300
[0223]	ccgcccggcg gctggtgcga gcccccaac ccacactttg atctctctca gcctgttttc	360
[0224]	ttgagaattg ccagtagcag agccggagtt gttcccggtt cttaccgacg ggtgccttgc	420
[0225]	aggaggagtg gaggaatcag gttcaccatt aacggccatg ctttcttcaa cctggtacta	480
[0226]	gtaaccaacg tgggaggctc cggcgacgta cacgccgtgt acatcaaagg atcaagaacc	540

[0227]	gggtggcaaa tgatgtccag aaactggggc caaaactggc agagcaacgc caacctcaac	600
[0228]	ggccaaagcc tctcattccg ggtggtcacc ggcgacagcc gcagcgtcgt ctcctacaac	660
[0229]	gccgctcccc ccggctggtc ctteggecag acctactccg gcgcccagtt ccgctag	

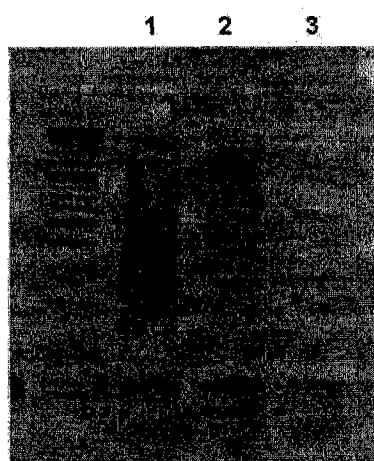


图 1

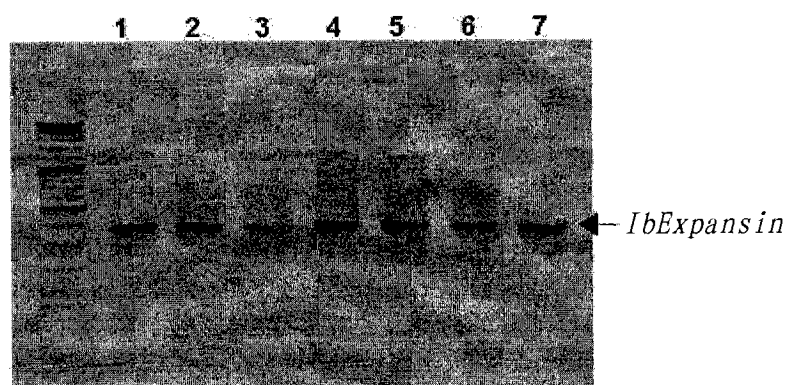


图 2

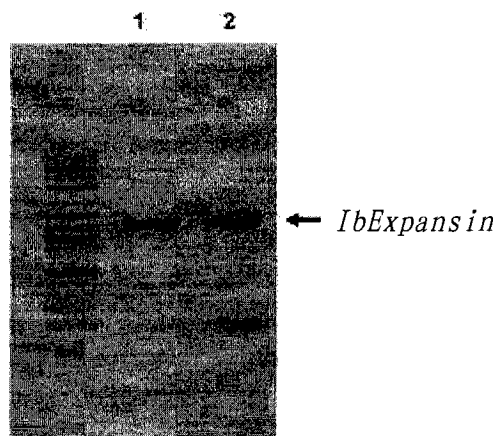


图 3

```

PcExpansin: -----DHALAYGFCLVGLDPAISCHLAAGDQDPAHAAATEYGGDEASGTHGGACC : 51
PpExpansin: -----DHALAYGFCLVGLDPAISCHLAAGDQDPAHAAATEYGGDEASGTHGGACC : 51
PaExpansin: -----DHALAYGFCLVGLDPAISCHLAAGDQDPAHAAATEYGGDEASGTHGGACC : 51
CaExpansin: -----DHALDGLLHIGLSLQPSVQSEH--YHDAATEYGGDEASGTHGGACC : 46
LeExpansin: -----DHALDGLLHIGLSLQPSVQSEH--YHDAATEYGGDEASGTHGGACC : 46
IbExpansin: -----HSSTASTETDHALDGLLHIGVLTETQVQDPAHAAATEYGGDEASGTHGGACC : 57

PcExpansin: -----YGHLYSPYGTHTAALSTALFHHGSGGSCQETECVETFECLDPAHVAATRECPHRA : 111
PpExpansin: -----YGHLYSPYGTHTAALSTALFHHGSGGSCQETECVETFECLDPAHVAATRECPHRA : 111
PaExpansin: -----YGHLYSPYGTHTAALSTALFHHGSGGSCQETECVETFECLDPAHVAATRECPHRA : 111
CaExpansin: -----YGHLYSPYGTHTAALSTALFHHGSGGSCQETECVETFECLDPAHVAATRECPHRA : 103
LeExpansin: -----YGHLYSPYGTHTAALSTALFHHGSGGSCQETECVETFECLDPAHVAATRECPHRA : 103
IbExpansin: -----YGHLYSPYGTHTAALSTALFHHGSGGSCQETECVETFECLDPAHVAATRECPHRA : 113

PcExpansin: -----LPHHALLGCHRFPHHDLSDPVFQHLAQVHAGVVPVATRPFCRHGGDFETIGHSTYTH : 171
PpExpansin: -----LPHHALLGCHRFPHHDLSDPVFQHLAQVHAGVVPVATRPFCRHGGDFETIGHSTYTH : 171
PaExpansin: -----LPHHALLGCHRFPHHDLSDPVFQHLAQVHAGVVPVATRPFCRHGGDFETIGHSTYTH : 171
CaExpansin: -----LPHHALLGCHRFPHHDLSDPVFQHLAQVHAGVVPVATRPFCRHGGDFETIGHSTYTH : 150
LeExpansin: -----LPHHALLGCHRFPHHDLSDPVFQHLAQVHAGVVPVATRPFCRHGGDFETIGHSTYTH : 150
IbExpansin: -----LPHHALLGCHRFPHHDLSDPVFQHLAQVHAGVVPVATRPFCRHGGDFETIGHSTYTH : 168

PcExpansin: -----AVLTIRVGLGQVIGSYKGSRTQVHNSRRHGQNHQSSALNGSLSPFVTSQDRTVQ : 231
PpExpansin: -----AVLTIRVGLGQVIGSYKGSRTQVHNSRRHGQNHQSSALNGSLSPFVTSQDRTVQ : 231
PaExpansin: -----AVLTIRVGLGQVIGSYKGSRTQVHNSRRHGQNHQSSALNGSLSPFVTSQDRTVQ : 231
CaExpansin: -----AVLTIRVGLGQVIGSYKGSRTQVHNSRRHGQNHQSSALNGSLSPFVTSQDRTVQ : 216
LeExpansin: -----AVLTIRVGLGQVIGSYKGSRTQVHNSRRHGQNHQSSALNGSLSPFVTSQDRTVQ : 216
IbExpansin: -----AVLTIRVGLGQVIGSYKGSRTQVHNSRRHGQNHQSSALNGSLSPFVTSQDRTVQ : 220

PcExpansin: -----SYHAALPQSEGGITYSGDDE : 242
PpExpansin: -----SYHAALPQSEGGITYSGDDE : 242
PaExpansin: -----SYHAALPQSEGGITYSGDDE : 242
CaExpansin: -----SYHAALPQSEGGITYSGDDE : 239
LeExpansin: -----SYHAALPQSEGGITYSGDDE : 239
IbExpansin: -----SYHAALPQSEGGITYSGDDE : 249

```

图 4

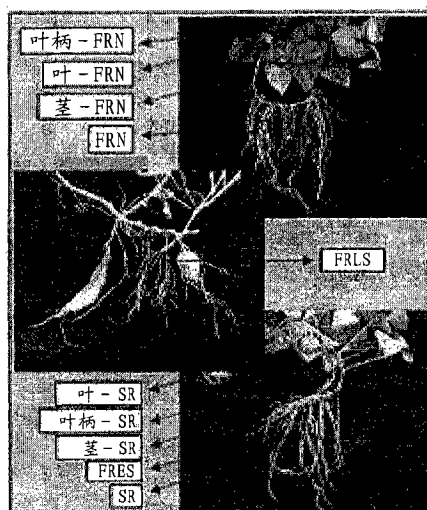


图 5

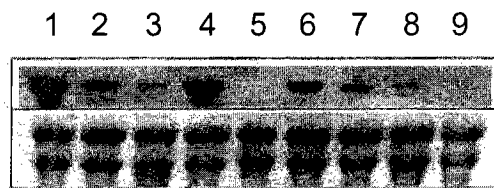


图 6

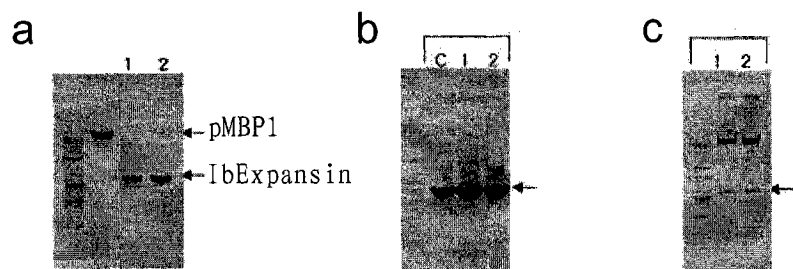


图 7

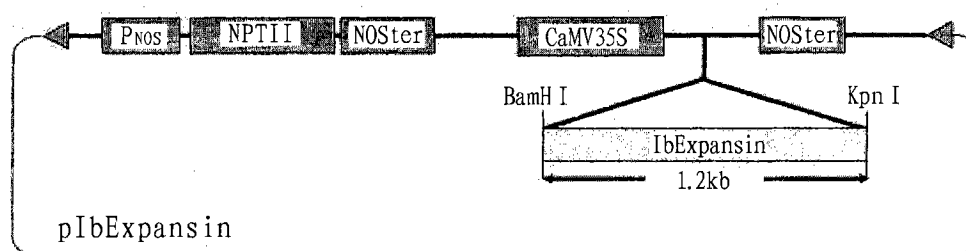


图 8

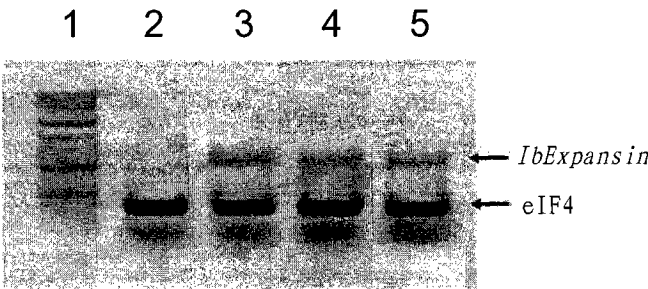


图 9

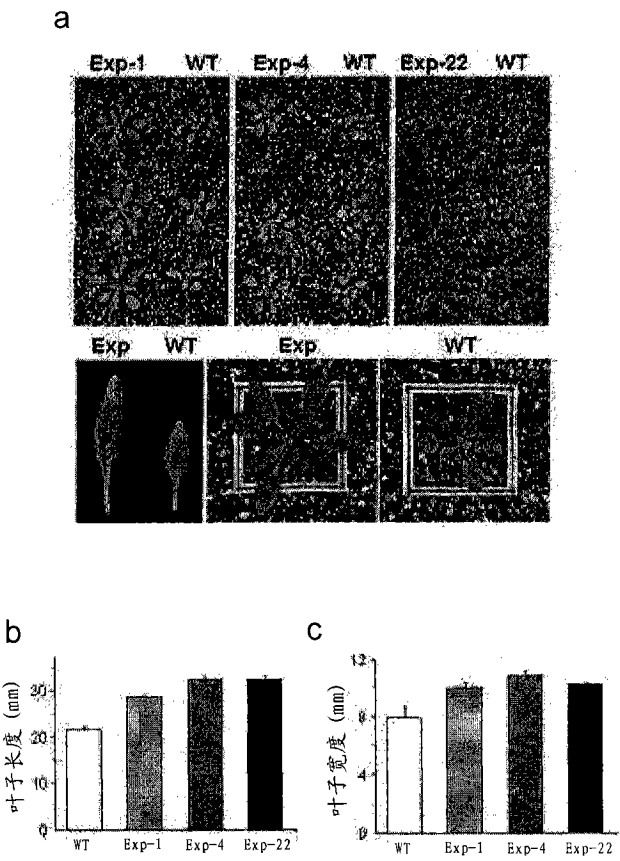


图 10

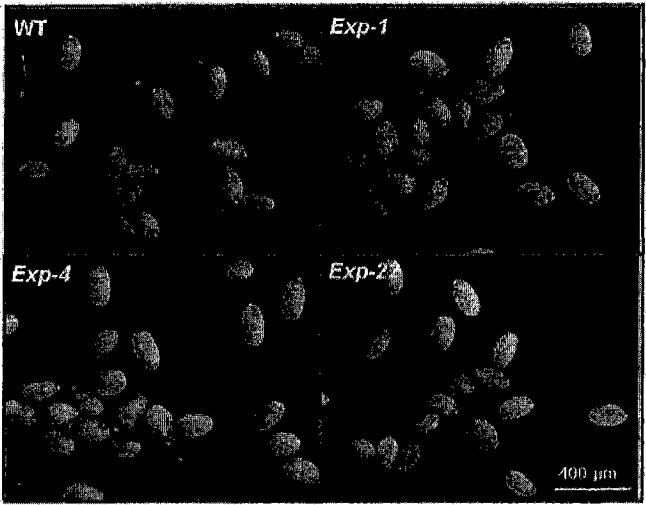


图 11

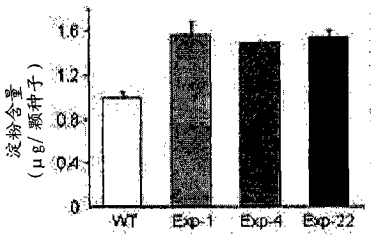


图 12



图 13