



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101519660 B

(45) 授权公告日 2011.04.13

(21) 申请号 200910029257.9

(22) 申请日 2009.04.03

(73) 专利权人 安徽农业大学

地址 230036 安徽省合肥市长江西路 130 号

(72) 发明人 程备久 张建 江海洋 夏眠

朱苏文 汪洁明

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 何震花

(51) Int. Cl.

C12N 15/82(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1652681 A,2005.08.10,

CN 1886507 A,2006.12.27,

CN 1248292 A,2000.03.22,

Zhang,J.等 .EU735075.1.GenBank.2008,1,2.

陈秀花.转反义 Sbe 基因提高稻米直链淀粉含量的研究.《扬州大学博士学位论文》.2003,60.

陈忠正等.RNAi 沉默淀粉分支酶 sbe3 基因对水稻直链淀粉的影响.《食品科学》.2007,第 28 卷(第 7 期),291-295.

审查员 吕健

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

用 RNA 干涉提高水稻直链淀粉含量的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种生物技术领域的利用 RNA 干涉提高水稻中直链淀粉的含量的方法。本发明从水稻中克隆淀粉分支酶 RBE3 基因片段作为 RNA 干扰片段,以胚乳特异性启动子启动表达,构建了 RBE3 基因的 siRNA 表达载体,利用农杆菌介导的方法,获得了干涉 RBE3 基因的转基因水稻。RT-PCR 和 Southern 杂交检验目的基因的整合和表达情况,对转基因水稻植株胚乳直链淀粉含量碘显色法测定表明,转基因植株直链淀粉含量较非转基因株平均提高幅度为 140%,最高达到 238%,筛选后获得籽粒直链淀粉含量显著提高的转基因水稻植株。从而提供了一种提高水稻中直链淀粉含量的方法,为利用转基因水稻大规模生产直链淀粉奠定了基础。

1. 一种用 RNA 干涉提高水稻直链淀粉含量的方法，其特征在于：从水稻中克隆 RBE3 基因片段作为 RNA 干扰片段，以胚乳特异性启动子启动表达，构建含 RBE3 基因正反片段的表达载体，用根癌农杆菌介导，将 RBE3 基因的正反结构转入水稻中，RT-PCR 和 Southern 杂交检验目的基因的整合和表达情况，对转基因水稻植株胚乳直链淀粉含量采用碘显色法测定，筛选后获得籽粒直链淀粉含量显著提高的转基因水稻植株；包括以下主要步骤：

(1) 根据水稻淀粉合成关键酶 RBE3 基因的序列，通过序列比对，确定水稻直链淀粉酶基因的 RBE3 特异性 RNA 干涉序列，根据干涉序列设计引物，进行特异性扩增；

(2) 以胚乳特异性启动子启动表达，构建含 RBE3 特异性 RNA 干涉序列正反片段的植物表达载体；

(3) 转化含有 RBE3 特异性 RNA 干涉序列的载体，并将 RBE3 特异性 RNA 干涉序列整合到水稻基因组中；

(4) 通过 RT-PCR 和 Southern 杂交等分子检测方法鉴定转基因水稻；

(5) 利用碘显色法检测籽粒直链淀粉含量，筛选获得直链淀粉含量提高的转基因水稻；

在所述步骤 (1) 中，通过同源性搜索和序列比对，确定该 RBE3 特异性 RNA 干涉序列位于水稻基因组的 66197 ~ 66391 位置，长 195bp，包含 RBE3 基因的第 12 个外显子序列 135bp，并有 60bp 的内含子序列。

2. 根据权利要求 1 所述的用 RNA 干涉提高水稻直链淀粉含量的方法，其特征在于：在所述步骤 (2) 中，以高分子量麦谷蛋白 HMW 启动子作为胚乳特异性启动子，把 RBE3 特异性 RNA 干涉序列正反片段置于 HMW 启动子之后，特异性的在胚乳里抑制 RBE3 基因的表达。

3. 根据权利要求 2 所述的用 RNA 干涉提高水稻直链淀粉含量的方法，其特征在于：在所述步骤 (4) 中，所述的分子检测分别为以筛选标记 bar 基因的特异性引物的 PCR 扩增片段作探针，采用 Southern 杂交准确验证 RBE3 特异性 RNA 干涉序列整合到水稻基因组中及其拷贝数；和设计 RBE3 基因的 RT-PCR 专用引物和水稻 actin 基因的特异引物，然后转基因水稻和对照分别进行 RT-PCR，采用半定量 PCR 分析 RBE3 基因的表达差异。

## 用 RNA 干涉提高水稻直链淀粉含量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物技术领域的提高水稻种子中直链淀粉含量的方法，尤其涉及一种用 RNA 干涉提高水稻种子中直链淀粉含量的方法。

### 背景技术

[0002] 淀粉是高等植物中碳水化合物的主要贮藏形式，也是粮食作物产品的最主要成分。植物的贮藏淀粉主要包含两种成分：直链淀粉和支链淀粉。直链淀粉和支链淀粉的比例决定着淀粉的用途，支链淀粉主要用于食品业，而直链淀粉在工业上有着广泛的用途，涉及食品、医疗、纺织、造纸、环保等 30 多个领域。直链淀粉，尤其是经过理化修饰后的直链淀粉功能进一步加强，如将直链淀粉进行溶解，与氢键结合，可形成刚性不透明胶体，这一特性用于糖果业，可以使糖果保持固定的形状和完整的造型；直链淀粉还用于食品业的增厚剂、固定剂、炸薯条中阻止过度吸油分的包衣剂；利用直链淀粉取代聚苯乙烯生产可降解塑料，这种塑料具有大量应用于包装工业、农用薄膜加工业和从根本上解决白色污染问题的潜能。

[0003] 植物淀粉的合成是淀粉合成酶经由一系列复杂的过程产生的。目前认为淀粉的生物合成主要涉及四类酶——ADPG 焦磷酸化酶、淀粉合成酶、淀粉分支酶和去分支酶。它们分别催化 ADP-葡萄糖的形成、葡聚糖链的延伸以及分支链的形成。直链淀粉是由颗粒结合型淀粉合成酶 I (granule-bound starch synthase I, GBSS I 或 WAXY) 直接催化的；而支链淀粉则是淀粉分支酶 (starch branching enzyme, SBE)、可溶性淀粉合成酶 (soluble starch synthase, SSS) 和淀粉去分支酶 (debranching enzyme, DBE) 共同作用的产物，其中 SBE 的一个同工型 RBE3 被认为在形成支链淀粉过程中起到最关键的作用。因此，利用基因工程手段改良淀粉品质的策略集中在调节淀粉合成过程中特定酶的含量或是几种酶之间的协调关系上。

[0004] 在禾谷类作物研究上，获得高水平的直链淀粉同时并不明显减少淀粉总含量的突破是 1952 年 Vineyard 和 Bear 发现了位于玉米第 5 条染色体上的 ae (amylose extender) 基因。遗传研究表明高直链淀粉主要是由 ae 基因控制的，ae 基因及其修饰基因的协同作用可使玉米淀粉中直链淀粉的含量提高到 50-80%。位于第五连锁群上的 ae 基因目前已被 SSR 连锁标记，已从高淀粉玉米中克隆了 ae 基因，该基因共有 23449bp，其在 Genebank 中的接受号为 AF072725。这些为该性状的转移和利用提供了重要的种质资源和基因资源，但由于该基因较大，不易操作，同时该基因表达伴随其它农艺性状变劣、籽粒产量低，应用受到限制。另外，由于高直链淀粉的遗传十分复杂，采用常规杂交、回交转育和轮回选择等育种方法，所需群体要足够大，且周期长、分析样品多，因此投入也较多。

[0005] 基因工程改变淀粉质量集中于 GBSS, SSS 和 SBE 三种酶的操作上，主要使用技术：

[0006] 1、正义和反义 RNA 转基因技术，即是通过导入某个酶基因的正义结构或反义

结构，影响细胞内酶的含量或活性，引起目的基因的过量表达或使其表达受抑制，从而达到对淀粉结构的控制。Visser 等人 (1991) 利用反义 RNA 技术，向马铃薯中导入反向连接的 GBSS 基因，导致 GBSS 基因含量和活性下降，进而导致马铃薯块茎中直链淀粉含量锐减（减少 70% -100%）。同样地利用反义 RNA 技术，在木薯 (Salehuzzman, 1993)、水稻等植物中，也获得了低（或无）直链淀粉的转化体。国际专利 WO9722703A2 报道了应用反义 RNA 技术将玉米 sbe2b 基因的全长 cDNA 转化玉米的研究，结果获得了籽粒淀粉中直链淀粉含量较高的转基因玉米。然而反义技术的应用存在一定的局限性，其对内源性基因表达的抑制较弱，往往产生过渡性的表型，会妨碍对目的基因功能的准确判断。其抑制效应遗传稳定性较差，不能稳定可靠地降低目的基因的表达。

[0007] 2、基因敲除技术和 DNA/RNA 嵌合分子介导的基因转变技术，但该方法一次只能研究一个基因，不能有效地对多基因家族进行敲除。一些在动植物发育过程中有关键作用的基因，如果在 DNA 水平采用基因敲除或突变进行可遗传的修饰，则会过早地基因沉默，产生致死表型，因而无法深入研究。

### 发明内容

[0008] 本发明所解决的技术问题是提供一种克服目前常规育种过程中难以提高水稻籽粒直链淀粉的含量，通过采用 RNA 干涉的方法提高水稻直链淀粉的含量，使其用 RNA 干涉方法抑制水稻淀粉合成关键酶 SBEII b 基因在种子胚乳中的表达，从而提高水稻种子中直链淀粉含量的方法。

[0009] 本发明是通过以下技术方案实现的：一种用 RNA 干涉提高水稻直链淀粉含量的方法，从水稻中克隆 RBE3 基因片段作为 RNA 干扰片段，以胚乳特异性启动子启动表达，构建含 RBE3 基因正反片段的表达载体，用根癌农杆菌介导，将 RBE3 基因的正反结构转入水稻中，RT-PCR 和 Southern 杂交检验目的基因的整合和表达情况，对转基因水稻植株胚乳直链淀粉含量采用碘显色法测定，筛选后获得籽粒直链淀粉含量显著提高的转基因水稻植株。

[0010] 具体包括以下主要步骤：

[0011] (1) 根据水稻淀粉合成关键酶 RBE3 基因的序列，通过序列比对，确定水稻直链淀粉酶基因的特异性 RNA 干涉序列，根据干涉序列设计引物，进行水稻淀粉合成关键酶 RBE3 基因的干涉片段的特异性扩增；

[0012] (2) 以胚乳特异性启动子启动表达，构建含 RBE3 基因正反片段的植物表达载体；

[0013] (3) 转化含有目的干涉片段的载体，并将目的干涉片段整合到水稻基因组中；

[0014] (4) 通过 RT-PCR 和 Southern 杂交等分子检测方法鉴定转基因水稻；

[0015] (5) 利用碘显色法检测籽粒直链淀粉含量，筛选获得直链淀粉含量提高的转基因水稻。

[0016] 在所述步骤 (1) 中，通过同源性搜索和序列比对，确定该 RNA 干涉特异片段位于水稻基因组的 66197 ~ 66391 位置，长 195bp，包含 RBE3 基因的第 12 个外显子 (135bp) 序列，并有 60bp 的内含子序列。

[0017] 在所述步骤 (2) 中，以高分子量麦谷蛋白 (HMW) 启动子作为胚乳特异性启动

子, 把 RBE3 基因正反片段置于特异启动子之后, 特异性的在胚乳里抑制 RBE3 基因的表达。

[0018] 在所述步骤 (4) 中, 所述的分子检测分别为以筛选标记 bar 基因的特异性引物的 PCR 扩增片段作探针, 采用 Southern 杂交准确验证目的干涉片段整合到水稻基因组中及其拷贝数; 和设计 RBE3 基因的 RT-PCR 专用引物和水稻 actin 基因的特异引物, 然后转基因水稻和对照分别进行 RT-PCR, 采用半定量 PCR 分析 RBE3 基因的表达差异。

[0019] 与已有技术相比, 本发明的有益效果体现在:

[0020] 1、本发明是利用 RNA 干涉技术进行水稻淀粉品质改良。这是 RNA 干涉技术首次在该领域进行研究与运用, 也是本发明的独创之处。RNA 干涉技术具有高效性、特异性、可遗传性、操作简单等特点, 这是传统的基因敲除技术和反义 RNA 技术所无法比拟的。

[0021] 2、在受体选择上, 传统的基因敲除技术和反义 RNA 技术所要研究的受体一般是完整的基因序列, 对于基因序列不明确的受体, 具有明显的局限性。而利用 RNA 干涉技术, 只需要知道与受体同源的基因片段, 就可对受体进行研究, 因此, 研究范围较为广泛。

[0022] 3、在操作方法上, 反义 RNA 技术一般要构建的是含数千个碱基对的大片段, 操作起来较为困难, 而 RNA 干涉技术中所要构建的载体仅仅是含有几十到几百个碱基对的小片段, 操作简单、方便, 易于运用。另外, 一个基因可选择一到多个干涉片段, 可对这些片段或组合进行干涉效果的分析、优化, 以获得最有效的片段。

[0023] 4、在遗传稳定性上, 利用传统的反义 RNA 技术, 因全基因转化对受体影响大, 会导致受体产生较大变异, 且遗传稳定性较差, 难以得到优良的转基因作物, 但采用该技术转化的 RNA 干涉片段小, 对受体其它农艺性状影响小, 遗传稳定性高, 便于获得对目的基因干涉而其它农艺性状优良的转基因植株。

## 具体实施方式

[0024] 下面对本发明的实施方式予以具体说明。

[0025] 1、RBE3 基因特异性 RNAi 片段的获得

[0026] (1)、利用 CTAB 法进行水稻基因组 DNA 的提取。

[0027] 取 0.5g 水稻幼嫩叶片, 加入液氮粉碎, 加入 2mL 2% 65℃ 保温的 2×CTAB 抽提液, 混匀, 65℃ 保温 30 ~ 60min。加入等体积的氯仿 / 异戊醇 (24 : 1), 轻缓颠倒混匀, 10000r/min, 离心 5min。取上清, 加入 1/10 体积 (约 0.2mL) 的 65℃ 的 CTAB/NaCl 溶液, 颠倒混匀。用等体积的氯仿 / 异戊醇 (24 : 1) 抽提, 10000r/min, 离心 5min。取上清, 加入 (正好) 等体积的 CTAB 沉淀液, 颠倒混匀, 如沉淀可见, 继续做下步, 否则, 65℃ 保温 30min。4℃, 2700r/min, 离心 5min。去上清, 用高盐的 TE buffer 重悬 (0.25 ~ 0.5mL)。(可 65℃ 保温 30min, 至大部分溶解)。加入 0.6 体积的异丙醇沉淀核酸, 充分混匀, 4℃, 10000r/min, 离心 15min。去上清, 80% 乙醇洗涤沉淀, 干燥, 用尽可能少的 TE buffer 重悬 (0.025 ~ 0.05mL)。

[0028] (2)、RBE3 基因片段的 PCR 扩增。

[0029] 参考已发表的水稻淀粉分支酶基因 RBE3( 登录号 : D16201) 和水稻基因组的核

昔酸序列, 选择适于 RNAi 的 RBE3 基因片段用于载体的构建, 该片段位于水稻基因组的 66197 ~ 66391 位置, 长 195bp, 包含 RBE3 基因的第 12 个外显子 (135bp) 序列, 并有 60bp 的内含子序列。在引物的 5' 端分别添加了 BamH I 和 Sal I 酶切位点, 设计引物: 5' 端引物为 5' -GCGGATCCGGGAAGTAGCGATTAACGTGTT-3', 3' 端引物 RBE3i-R 为 5' -GCGTCGACATAGCTTTACCTTTGCCCTT-3'。反应体系 (50  $\mu$ L) 为 dNTP (10mM) 1.0  $\mu$ L, 引物 (10pmol/ $\mu$ L) 各 1.0  $\mu$ L, 水稻基因组 DNA 模板 (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L, 10 $\times$ pfu Buffer (+Mg<sup>2+</sup>) 5.0  $\mu$ L, pfu DNA polymase (5U/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L, 用灭菌双蒸水补足至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1min, 56 $^{\circ}$ C 退火 45sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30sec, 共 35 个循环; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

[0030] 2、RBE3 基因 siRNA 表达载体的建立

[0031] (1)、RNAi (2RBE3i) 中间载体构建。

[0032] 将用 PCR 扩增得到并克隆于 pGM-T 载体上的 RBE3 干涉片段 RBE3i 用 BamH I 和 Sal I 酶切下来, 与用相同酶切的 pUCCRNAi 载体连接, 先用菌落 PCR 方法初步筛选重组子 (RNAi (RBE3i) 鉴定引物 5' 端引物 pUCC1 为 5' -GGACCGTACTACTCTATTCGTTTC-3', 3' 端引物为 RBE3i-R), 再用 Pst I 酶切验证, 得到重组质粒 RNAi (RBE3i); 接着用 Xho I 和 Bgl II 酶切重组质粒 RNAi (RBE3i), 再与 RBE3i 的 BamH I/Sal I 酶切片段进行连接反应, 形成约 600bp 的含内含子的反向重复结构, 先用菌落 PCR 方法初步筛选重组子 (RNAi (2RBE3i) 鉴定引物 5' 端引物为 RBE3i-F, 3' 端引物 pUCC2 为 5' -GAAACGAATAGAGTAGTACGGTCC-3'), 用 Pst I 酶切验证重组子, 构建成克隆载体 RNAi (2RBE3i)。

[0033] (2)、siRNA 表达载体 p1300 (2RBE3i) 的构建。

[0034] RNAi (2RBE3i) 载体用 Pst I 和 Sal I 酶切, 回收酶切产物中约 600bp 的 DNA 片段, 然后与用 Pst I 和 Sal I 酶切的 HMW  $\cdot$  GUS 载体进行连接, 用 Pst I 和 Sal I 酶切验证重组子, 构建成 HMW (2RBE3i) 载体。根据 HMW  $\cdot$  GUS 启动子至终止子的全序列设计引物, 在引物的 5' 端分别添加酶切位点 Sac I 和 Xba I, 5' 端引物 HMW-F 为 5' -CCGAGCTCGCAAATATGCAACATAATTTCC-3', 3' 端引物 HMW-R 为 5' -CCCTC TAGATGATCTTGAAAGATCTTT-3'。在 50  $\mu$ L 反应体系中有 dNTP (10mM) 1.0  $\mu$ L, 引物 (10pmol/ $\mu$ L) 各 1.0  $\mu$ L, DNA 模板 (HMW (2RBE3i) 质粒 1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L, 10 $\times$ pfu Buffer (+Mg<sup>2+</sup>) 5.0  $\mu$ L, pyrobrest DNA polymase (5U/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L, 用灭菌双蒸水补足至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1min, 61 $^{\circ}$ C 退火 45sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3min, 共 35 个循环; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。得到约 2.6kb 的目的基因 DNA 片段。将该目的片段纯化回收并克隆至 pGM-T, 测序正确后用 Sac I 和 Xba I 酶切下来, 与用 Sac I 和 Xba I 酶切的 pCAMBIA1300 进行连接反应, 得到 siRNA 表达载体 p1300 (2RBE3i), 使用 Sac I 和 Xba I 酶切验证重组子。

[0035] 本实施例利用载体构建常用的基因工程方法, 将 RBE3 基因片段正反向连接于马铃薯 GA20-氧化酶 intron 1 片段两侧, 以小麦 HMW 麦谷蛋白 Glu-1D-1 基因的启动子启动。构建的 p1300 (2RBE3i) 表达载体, 该表达载体可利用基因工程方法提高水稻直链淀粉含量。

[0036] 3、根癌农杆菌转化获得候选转基因水稻

[0037] (1)、表达载体导入农杆菌。

[0038] 挑取 LBA4404 或者 EHA105 单菌落接种 5ml 含利福平 100ug/ml 的 YEB 液体培养基中，28℃、200r/min 震荡培养 48 小时左右。取 2ml 菌液转入 50ml YEB 液体培养基，继续培养至 OD600 至 1.0 左右。转入无菌离心管，冰浴 30min。5000r/min 离心 5min，去上清。加入 2ml 新配制的 20mmol/L 预冷 CaCl<sub>2</sub> 重悬菌体。取灭菌后的离心管，每管在冰上分装 200ul。取 2ug 的 p1300 (2RBE3i) 质粒，加入到 200ul 的农杆菌感受态中。) 冰浴 5min，转入液氮中冷冻 1min，然后 37℃ 水浴 5min。加入 800ul 的 YEB 液体培养，28℃、200r/min 震荡培养 5 小时左右。吸取菌液 300ul 涂布在 YEB 固体培养基上 (含 100ug/ml 的利福平和卡那霉素)。挑取阳性克隆进行菌落 PCR 和提取质粒鉴定。

[0039] (2)、农杆菌介导的水稻遗传转化。

[0040] 愈伤组织诱导采用中花 11 幼胚，取授粉 10d 左右的幼胚在诱导培养基上培养，诱导培养基 20d 左右；取诱导出的愈伤组织进行继代培养 30d 左右，继代培养基同诱导培养基；然后准备农杆菌与愈伤组织进行共培养，共培养温度 21℃，3d 固体共培养基：NB 基本培养基 +2，4-D 2.0mg/L + 肌醇 2.0g/L + AS 100 μ M/L (液体共培养不加 2，4-D 和琼脂粉)；然后无菌水洗菌，转入筛选培养基培养 40d：NB 基本培养基 +2，4-D 2.0mg/L + cef.500mg/L + Hyg 50mg/L (或 20mg/L PPT)；挑取筛选后的抗性愈伤光照培养 1 个月左右，分化培养基：NB 基本培养基 + NAA 0.25mg/L + 6-BA 2mg/L + KT 0.5mg/L + cef.500mg/L + Hyg 50mg/L (或 20mg/L PPT)；挑取分化小苗进行生根培养，生根培养基：NB 基本培养基 (N6 大量及蔗糖减半) + MET 1mg/L + NAA 1mg/L。N6 大量 + MS-Fe 盐 + B5 有机 + proline 500mg/L + glutamine 500mg/L + 水解酪蛋白 300mg/L + 蔗糖 30g/L + 琼脂粉 2.6g/L。

[0041] 本实施例采用农杆菌介导的遗传转化，利用水稻 10d 左右的幼胚诱导愈伤组织，通过共培养和 PPT 筛选，获得了抗性植株。该植株将进行分子鉴定和检测，为转基因提高水稻直链淀粉含量提供了材料。

[0042] 4、转基因水稻的鉴定

[0043] (1)、候选转基因抗性植株的分子检测

[0044] Southern 杂交检测

[0045] 取转基因抗性植株的幼叶，用 CTAB 法提取 DNA。按 bar 基因序列设计引物，5' 端引物 bar-F 为 5' -ATGAGCCCAGAAGACG-3'，3' 端引物 bar-R 为 5' -TCAGATCTCGGTGACGG-3'。用标准反应体系。扩增条件为：94℃ 预变性 5min；94℃ 变性 30sec、70℃ 退火 30sec、72℃ 延伸 1min，共 35 个循环；最后 72℃ 延伸 10min。PCR 检测呈阳性的植株再进行 Southern 杂交检测。Southern 杂交所用探针为用上述特异性引物 (bar-F 和 bar-R) 进行 PCR 扩增后回收的 bar 基因 (550bp)。探针标记、杂交和洗摸等均按 Promega 公司 Prime-a-Gene Labeling System 试剂盒提供的方法进行。通过 Southern 杂交条带是否出现判断是否是转基因水稻。

[0046] RT-PCR 检测候选转基因抗性植株

[0047] 分别提取野生型和转基因植株未成熟种子 (花后 2 周) 中的总 RNA，根据已发表的水稻 Actin1 基因序列 (登录号：AY212324) 设计引物，5' 端引物 Act-F 为 5' -CCCTTGTTGTGACAATGGA ACT-3'，3' 端引物 Act-R 为

5' -GACACGGAGCTCGTTGTAGAAGG-3' ; 根据水稻 RBE3 基因序列设计 RT-PCR 引物, 5' 端引物 RBE3-F 为 5' -ATGAGTTCGGACATCCTGAATGG-3' , 3' 端引物 RBE3-R 为 5' -CATTCCGCTGGAGCATAGACAAC-3' 。反转录试剂盒使用上海申能博彩生物科技有限公司 First-Strand cDNA Synthesis Kit。以 Actin1 基因作为内参, PCR 反应程序为 94℃ 预变性 2min ; 94℃ 变性 30s、60℃ 退火 30s、72℃ 延伸 30s, 共 25 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min, 用凝胶成像定量分析系统对扩增产物琼脂糖电泳谱带进行定量分析。经过 Southern 杂交分析和 RT-PCR 检测获得转基因水稻。转基因植株的分子检测。

[0048] (2)、转基因株的遗传分析。

[0049] 从所有水稻转基因株系中随机选取若干种子及对照未转化水稻中花 11 的种子, 在清水中萌发。待小苗长至 2-3cm 后, 换去清水, 改用 20mg/L PPT 水溶液浇灌筛选, 筛选出的抗性苗栽种于大田, 并观察检验其性状分离情况, 筛选出复合孟德尔遗传规律 3 : 1 分离的株系。

[0050] 5、转基因水稻的直链淀粉含量测定

[0051] 种子的胚乳部分用于直链淀粉含量的测定, 每株随机选取 30 粒透明度变化的种子, 并随机分为三组, 对照组未转化水稻中花 11 的种子也随机选取 30 粒并随机分为三组。采用碘显色法, 样品中直链淀粉的测定: 样品粉碎过 60 目筛, 用乙醚脱脂, 称取脱脂样品 0.1g 左右 (精确至 1mg), 置于 50ml 容量瓶中。加 0.5mol/L KOH 溶液 10ml, 在沸水浴中加热 10min, 取出, 以蒸馏水定容至 50ml 若有泡沫采用乙醇消除, 静置。吸取样品液 2.5ml 两份 (即样品测定液和空白液), 均加蒸馏水 30ml, 以 0.1mol/L HCl 溶液调至 pH 3.5 左右, 样品中加入碘试剂 0.5ml, 空白液不加碘试剂, 然后均定容至 50ml。静置 20min, 以样品空白液为对照, 用 1cm 比色杯, 分别测得各自的吸光度, 并由回归方程得到相应的直链淀粉含量, 取平均值作为该株的胚乳直链淀粉含量。结果是转基因植株直链淀粉含量较非转基因株平均提高幅度为 140%, 最高达到 238%, 筛选后即可获得籽粒直链淀粉含量显著提高的转基因水稻植株。

[0052] 本发明从水稻中克隆淀粉分支酶 RBE3 基因的 195bp 特异片段作为 RNA 干扰片段, 以高分子量麦谷蛋白启动子作为胚乳特异性启动子, 反向重复连接于植物表达载体 pCAMBIA1300 中, 构建了 RBE3 基因的 siRNA 表达载体, 利用农杆菌介导的方法转化水稻未成熟胚诱导出的愈伤组织, 获得了干涉 RBE3 基因的转基因水稻。通过 PCR 和 Southern 杂交鉴定后, 对其半定量 RT-PCR 检测表明 RBE3 基因的表达量明显低于对照。对转基因水稻植株胚乳直链淀粉含量碘显色法测定表明, 转基因植株直链淀粉含量较非转基因株平均提高幅度为 140%, 最高达到 238%。从而提供了一种提高水稻中直链淀粉含量的方法, 为利用转基因水稻大规模生产直链淀粉奠定了基础。

[0053] 序列表

[0054] <110> 安徽农业大学

[0055] <120> 用 RNA 干涉提高水稻直链淀粉含量的方法

[0056] <130> ahnydx20090331

[0057] <160> 1

[0058] <170> PatentIn version 3.3

[0059] <210> 1



[0060]	<211>589	
[0061]	<212>DNA	
[0062]	<213> 前序列	
[0063]	<220>	
[0064]	<221> 所克隆的 RBE3 基因片段正向序列	
[0065]	<222> (1)..(195)	
[0066]	<220>	
[0067]	<221>PUCRNAi 载体中的 GA20 内含子	
[0068]	<222> (196)..(394)	
[0069]	<220>	
[0070]	<221> 所克隆的 RBE3 基因片段反向序列	
[0071]	<222> (395)..(589)	
[0072]	<400>1	
[0073]	gggaagtage gattaacgtg ttccttactt cccaattccc atagttgaaa aggegagaat	60
[0074]	cccacatcca atgatggccg cgtgaaccac tatgaaagta atgcgtatct gtaccatcaa	120
[0075]	aaccgtcaa cccatctagg gtattatttg acgcatggct gcaaaaggaa aaaaaagggg	180
[0076]	caaaggtaaa gctatgtacg gaccgtacta ctctattcgt tcaatatat ttattgttt	240
[0077]	cagctgactg caagattcaa aaatttcttt attattttaa atttgtgtc actcaaaacc	300
[0078]	agataaaciaa tttgatatag aggcactata tatatacata ttctcgatta tatatgtaaa	360
[0079]	tgagttaacc ttttttcca cttaaattat atagtatcga aatggaaacg gggaaaaaaaa	420
[0080]	aggaaaacgt cggtagcag ttattatgg gatctacceca acttgccaaa actaccatgt	480
[0081]	ctatgcgtaa tgaaagtatc accaagtgcg ccggtagtaa cctacaccct aagageggaa	540
[0082]	aagttgatac cctaacctcct tcattccttg tgcaattage gatgaaggg	589