



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101445552 B

(45) 授权公告日 2012.06.27

(21) 申请号 200810163816.0

CN 1431309 A, 2003.07.23, 全文.

(22) 申请日 2008.12.18

审查员 贾涛

(73) 专利权人 杭州市农业科学研究院

地址 310024 浙江省杭州市西湖区转塘镇杭  
新路东1号

(72) 发明人 阮松林 马华升 王世恒 王淑珍  
童建新 忻雅 郑桂珍 来文国  
白宇杰 何俊平

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限  
公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

*C07K 14/415* (2006.01)

*C12N 15/29* (2006.01)

*A01H 5/00* (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1429269 A, 2003.07.09, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

水稻蛋白 OsOEE3-1 及其编码基因与应用

(57) 摘要

本发明提供公开了一种水稻耐盐蛋白 OsOEE3-1, 具有序列表中 SEQID NO. 1 所述的氨基酸序列。本发明蛋白在水稻幼苗中得到过量表达, 可以提高水稻幼苗耐高盐和高温能力。若将编码该蛋白的基因转化拟南芥、辣椒、茄子、草莓、一串红、非洲菊等蔬菜、花卉等植物, 有可能提高其耐高盐和高温性能, 有助于增加水稻或露地蔬菜、花卉在盐碱地上的产量, 提高我国滨海地区的盐碱地的利用; 克服设施条件下因土壤返盐或高温引起的连作障碍, 提高蔬菜、花卉等植物的产量和品质, 促进农业增效和农民增收。

1. 一种水稻蛋白基因在提高植物耐高盐和耐高温性能中的应用,所述的水稻蛋白基因的碱基序列如 SEQ ID NO. 2 所示,所述的植物为水稻或拟南芥。
2. 根据权利要求 1 所述的应用,包括以下步骤:
  - (1) 将所述的水稻蛋白基因连接到载体中,得到重组载体;
  - (2) 将重组载体通过农杆菌介导转化到植物中;
  - (3) 筛选得到具有耐高盐和耐高温性能的植株。
3. 根据权利要求 2 所述的应用,其特征在于:所述的载体为 Super1300 载体。

## 水稻蛋白 OsOEE3-1 及其编码基因与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及功能基因组学领域,尤其涉及一种水稻蛋白 OsOEE3-1 及其编码基因与应用。

### 背景技术

[0002] 土壤盐渍化对农业的威胁是一个全球性的问题。全世界共有 10 亿公顷的盐碱地,约占世界陆地面积 7.6%,我国盐碱地近 1 亿多公顷,农业耕地因盐渍化引起的减产、弃耕地就近 333.5 万公顷。近年来,我国设施农业的快速发展,特别是蔬菜和花卉大棚生产面积不断扩大,据统计,2005 年全国蔬菜、花卉、瓜果等作物设施栽培面积达 210 万公顷。设施农业的发展为农业生产结构调整和提高农业生产效益发挥了重要作用,但是随着设施栽培时间延长,土壤次生盐渍化的问题日益加剧,严重影响了设施栽培作物的产量和品质,效益也随之下降,从而影响设施农业的健康发展。解决设施栽培土壤盐渍化一般采取以下两种措施,一是用石膏和硫磺等化学方法或用排水和灌溉洗盐等物理方法改良土壤;二是通过常规育种或生物技术手段培育耐盐作物品种,而前者投入成本高。通过培育适宜在盐碱地区栽培和设施栽培的农作物抗盐新品种将不仅能有效解决设施栽培土壤盐渍化问题,而且还能通过有效利用部分盐渍化土地而大大地缓解我国土地资源匮乏的问题。

[0003] 近年来,随着模式植物拟南芥和水稻基因组测序完成,植物基因组学研究已转入到功能基因组学。目前一些研究功能基因组学的新方法和实验技术体系如 cDNA 微阵列、基因芯片、基因表达系统分析(serial analysis of gene expression, SAGE)、基因敲除(gene knockout)和 RNAi 分析均能有效分析大量基因的表达和功能模式,并在耐盐性相关功能基因资源发掘上取得了一定进展。一些与渗透调节相关基因已从不同植物种类中被成功克隆并转化应用,如脯氨酸合成相关基因 P5CS(Kishor PBK, Hong Z, Miao G H, Hu CAA, Verma DPS. Overexpression of P5CS increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol*, 1995, 108 :1387-1394) 和甜菜碱脱氢酶 BADH 基因(肖岗,张耕耘,刘凤华等,山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究,科学通报, 1995, 40(8) :741-745)。

[0004] 植物体内  $\text{Na}^+$  离子平衡是植物自身耐盐调节的重要机制。朱健康研究小组发现拟南芥 SOS 基因系列的调控信号是植物自身调节  $\text{Na}^+$  离子平衡的重要途径之一。2005 年,林鸿宣研究小组与美国栾升教授合作,成功克隆了水稻耐盐相关的数量性状基因 SKC1。该基因能控制水稻植株地上部钠离子和钾离子的含量,维持钠和钾离子平衡,使过量钠离子不在茎叶等部位积累,并使钠离子回流到根部,减轻钠离子毒害,同时增加营养元素钾离子,从而增加水稻耐盐性。

[0005] 众所周知,水稻的基因图谱已经绘制完成,也就是所大部分水稻基因序列是公开的,但是具体涉及到某个基因的功能是未知的,特别是某个基因编码的蛋白以及该蛋白的对水稻产生的功能影响也是未知的。直接鉴定某个基因的功能是非常困难的,现有手段往往是先分离出植物蛋白,检测该蛋白的氨基酸序列,然后再通过氨基酸序列来比对公用数

数据库中的某个基因序列,从而确定该基因的功能以及该基因的应用。

## 发明内容

[0006] 本发明提供了一种水稻蛋白,名称为 OsOEE3-1,它是一个受盐诱导表达方式的蛋白,有助于提高水稻耐高盐和耐高温性能。

[0007] 一种水稻蛋白,具有序列表中 SEQ ID NO. 1 所述的氨基酸序列。

[0008] 该蛋白能够上调超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、抗坏血酸过氧化物酶等抗氧化酶活性,清除因高盐或低温胁迫产生的过多的活性氧(超氧离子或过氧化氢),维持细胞体内活性氧水平在正常范围内,保护幼苗、植株免遭因高盐或高温引发的氧化损伤,提高植物抗逆能力。

[0009] 根据上述水稻蛋白 OsOEE3-1 的氨基酸序列,通过 NCBI 和 TIGER 数据库搜索,比对到编码水稻冷激蛋白的基因 OsOEE3-1(Oryza sativa Oxygen Evolving Enhancer protein 3-1),基因 OsOEE3-1 的基因号为 Os07g0544800 (ID 4343515),该基因的开放阅读框(ORF)为 654bp,具有序列表中 SEQ ID NO. 2 所述的核苷酸序列;mRNA 长度为 961bp,具有序列表中 SEQ ID NO. 3 所述的核苷酸序列。

[0010] 上述基因可以应用于提高植物耐高盐和耐高温的性能,具体操作如下:

[0011] (1) 将上述基因连接 Super1300 载体中;

[0012] (2) 将上述重组载体通过农杆菌介导转化到目标植物;

[0013] (3) 以潮霉素 B 为抗性标记,结合高盐(200mM NaCl 以上)和高温(46℃)处理为选择压进行筛选,得到具有耐高盐和耐高温性能的植物。

[0014] 本发明水稻蛋白可以提高水稻耐高盐和耐高温性能,将编码该蛋白的基因导入其它植物当中,如草莓、辣椒、茄子、一串红、非洲菊等,也有可能提高这些植物的耐高盐和耐高温性能。通过上述手段,一方面可以增加作物在盐碱地上的产量,提高我国滨海地区的盐碱地的利用;另一方面可以克服设施条件下蔬菜、花卉等植物因土壤返盐和夏季高温引起的生育障碍,提高其产量和品质,增加农民收入。

## 具体实施方式

[0015] 基因的获得

[0016] (1) 以杂交水稻耐盐组合汕优 10 号和盐敏感组合两优培九为材料,将它们的种子播在含 100mM NaCl 溶液浸湿滤纸培养皿中,置于 30℃ 培养箱中发芽,每天更换盐溶液,以保持盐浓度基本一致。待幼苗生长至 10d,分别收集汕优 10 号和两优培九幼苗的叶片。

[0017] (2) 用冷丙酮/三氯乙酸沉淀法(Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L J, Ghareyazie B, Bennett J. A proteomic approach to analyzing drought-and salt-responsiveness in rice. Field Crop Res, 2002, 76(2-3):199-219)快速提取叶总蛋白,具体操作如下:

[0018] 1) 水稻叶片用液氮研磨成细粉,分装入 1.5ml 离心管中,加入 1ml 蛋白提取液 I(含 10%三氯乙酸和 0.07% β-巯基乙醇的丙酮溶液)在 -20℃ 沉淀粗蛋白 1h,在 4℃、13000rpm 下离心 20min,取沉淀,弃上清;

[0019] 2) 然后往沉淀中加入 1ml 蛋白提取液 II(含 0.07% β-巯基乙醇的丙酮溶液),

在-20℃悬浮粗蛋白丸1h,在4℃、13000rpm下离心20min,取沉淀,弃上清,再重复用蛋白提取液II,在相同条件下悬浮提取3次后,真空抽干沉淀;

[0020] 3) 用裂解液(含7mol/L尿素、2mol/L硫脲、4% Chaps(Ameresco公司,美国)、50mmol/L DTT(Promega公司,美国)和0.5% pH3-10的40%两性电解质)溶解沉淀,裂解液用量为25 $\mu$ l裂解液/mg沉淀,然后在室温下放置1h,裂解期间不断涡旋5-6次。

[0021] (2) 根据Bradford法(Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72 :248-54)用考马斯亮兰G-250(Sigma公司)测定上述裂解液中的蛋白含量,上述裂解液中的蛋白用双向凝胶电泳(第一向采用17cm pH7-10的IPGs干胶条(Bio-Rad公司)聚焦,第二向采用变性/SDS-2D-PAGE分离)分离。

[0022] 第一向等电聚焦分四步进行,第一步,电压250V 15min;第二步,电压10000V 5h;第三步,电压10000V,60000Vh;第四步,电压500V直到结束。

[0023] 在第一向等电聚焦向第二向转换时,需要平衡胶条,分两步进行,第一步,在平衡液I(含6.0mol/L尿素、2% SDS(Promega公司,美国)、0.375mol/L pH 8.8 Tris-HCl(Promega公司,美国)、20%甘油和130mmol/L DTT(Promega公司,美国))中平衡10min;第二步,在平衡液II(含6.0mol/L尿素、2% SDS(Promega公司,美国)、0.375mol/L pH 8.8 Tris-HCl(Promega公司,美国)、20%甘油和135mmol/L碘乙酰胺)中平衡10min,然后转移到第二向SDS-2D-PAGE胶,跑胶采用恒流,每块胶的电流24mA,运行5-6h。

[0024] 用500ml固定液(40%甲醇和10%乙酸)固定30min,然后用500ml银氨染色液(含有3.6%氢氧化钠10.5ml、20%硝酸银9ml和5ml氨水)染色32-33min,用双蒸水冲洗4次,然后用500ml显色液(含有1%柠檬酸2.5ml和甲醛250 $\mu$ l)显色5-12min,最后用500ml 5%醋酸终止反应5min。

[0025] 扫描后用PDQUEST(Bio-Rad公司)软件分析胶图匹配情况,结果发现在汕优10号幼苗叶片中一个高表达蛋白点,估测其等电点和分子量分别为pI 9.8和22KD左右。

[0026] (3) 在胶上切下该高表达蛋白点,加入8 $\mu$ l 10ng/ $\mu$ l胰蛋白酶(Trypsin, Roche, 美国)进行胶内消化,然后置于4℃冰箱放置40min使胶片完全吸收酶液,再补加10 $\mu$ l 25mM碳酸氢铵缓冲液(pH 8.0),于37℃温育12h,胶内蛋白质被酶解成肽段混合物。

[0027] (4) 在上述肽段混合物中加入30-50 $\mu$ l 5% TFA(Merk公司,德国)于40℃提取上述酶切肽段1小时一次,再用相同体积的50% CAN和2.5% TFA(Merk公司,德国)溶液于30℃提取1小时一次,最后用25 $\mu$ l CAN(Fischer公司,美国)超声提取一次,合并3次提取液。真空干燥,然后用4 $\mu$ l 0.5%三氟乙酸溶解,将0.6 $\mu$ l溶解物用基质辅助激光解吸离子化飞行质谱(MALDI-TOF-MS)分析,获得肽质量指纹(Peptide Mass Fingerprint, PMF)图谱,查询Mascot数据库,以较高分值(117)显著(比对分高于65)比对到水稻OsOEE3-1蛋白,匹配序列占总氨基酸序列37%。

[0028] 根据已有的水稻OsOEE3-1的氨基酸序列,通过NCBI和TIGER数据库搜索,比对到编码水稻放氧增强子蛋白基因,基因号为Os07g0544800(ID 4343515)。该基因的开放阅读框(ORF)为654bp, mRNA长度为961bp。

[0029] 基因克隆与转化

[0030] 以汕优10号幼苗(播后10天)总mRNA为模板,利用RT-PCR方法扩增到OsOEE3-1

基因的编码序列。

[0031] 具体操作如下:首先,将 mRNA 反转录成第一链 cDNA,所用反转录试剂盒为 TaKaRa 公司的 High Fidelity PrimerScript™ RT-PCR Kit,反应体系 20  $\mu$  l,依次加入 1  $\mu$  l 20M 随机引物、1  $\mu$  l 10mM dNTP、2  $\mu$  l 总 RNA 和 DEPC 水至 10  $\mu$  l,在 65°C 变性 5 分钟,迅速在冰上冷却 2 分钟,稍微离心,然后依次加入 4  $\mu$  l 5 $\times$ PrimerScript RT buffer、0.5  $\mu$  l RNase inhibitor、0.5  $\mu$  l PrimerScript RTase 和 5  $\mu$  l DEPC 水。轻微混合均匀,30°C 反应 10 分钟,42°C 反应 30 分钟,95°C 5 分钟使酶失活。为了去掉与 cDNA 互补的 RNA 链,加入 1  $\mu$  l RNase H 在 37°C 温育 20min,-20°C 保存。然后以第一链 cDNA 为模板扩增目的基因 OsOEE3-1,所用扩增配对引物:

[0032] OsOEE3-1-F,5' -TCTAGAATGGCACAGGCAATGGCGTC-3',

[0033] OsOEE3-1-R,5' -GGTACCCTAGCCTAGCTTGGCGAGGA-3',

[0034] PCR 反应体系为 50  $\mu$  l,依次加入 2 $\times$ PCR buffer 25  $\mu$  l、2.5mM dNTPs4  $\mu$  l、反转录产物 2  $\mu$  l、20  $\mu$  M 正向引物 (OsOEE3-1-F)1  $\mu$  l、20  $\mu$  M 反向引物 (OsOEE3-1-R)1  $\mu$  l、2.5U/ $\mu$  l Tag DNA 聚合酶 0.5  $\mu$  l,最后加水至 50  $\mu$  l。PCR 反应条件:预变性 94°C 3min,变性 98°C 10s,退火 55°C 15s,延伸 72°C 50s,30 个循环,最后延伸 72°C 10min,4°C 保存。

[0035] 将回收纯化的 OsOEE3-1 基因的 DNA 与 pMD19-T 载体进行连接反应,连接体系 10  $\mu$  l,各组分分别为 0.5  $\mu$  l pMD19-T 载体、4.5  $\mu$  l 纯化的 OsOEE3-1 基因的 DNA、5  $\mu$  l Solution I。在 14°C -16°C 下连接 8-12 小时,然后将连接产物转化到大肠杆菌 DH5  $\alpha$  感受态细胞中,将 OsOEE3-1 基因装入 pMD19-T 载体后经测序正确,用 TakaRa 公司生产的 EcoRI 和 HindIII 酶切,酶切体系 40  $\mu$  l,包括 4  $\mu$  l 10 $\times$ buffer、8  $\mu$  l 已插入 OsOEE3-1 基因的 pMD19-T 载体、1  $\mu$  l XbaI、1  $\mu$  l KpnI 和 26  $\mu$  l 水,在 37°C 水浴中温育 6h。

[0036] 用北京博大泰克生物技术公司生产的 Glassmilk kit 回收基因片段,操作如下:上述混合基因经凝胶电泳以后,从凝胶上切下所需 DNA 片段,放在 1.5ml 的 Eppendorf 管中。加入 3 倍体积的溶胶液,室温下放置 5min,期间轻摇 Eppendorf 管几次使胶完全溶化。加入 10  $\mu$  l 玻璃奶,颠倒混匀,冰浴下放置 10min。每隔 2-3min 混匀 1 次,12000rpm 离心 30s,吸弃上清。加入 250  $\mu$  l 漂洗液,用移液器吹打漂洗液,轻柔地将玻璃奶悬浮混匀,12000rpm 离心 30s,吸弃上清。重复漂洗 1 次。用枪头将剩余的漂洗液吸干净。然后,放置于 37°C 温箱干燥 15-20min。加入 20  $\mu$  l 的无菌蒸馏水,混匀,60°C 水浴 5min,12000rpm 离心 1min,回收上清液,即为纯化的基因 OsOEE3-1。

[0037] 将回收的基因片段连入 Super1300 载体中,操作如下:连接体系 10  $\mu$  l,包括 2  $\mu$  l Super1300 载体、6  $\mu$  l 纯化的 OsOEE3-1 基因的 DNA、1  $\mu$  l 10 $\times$ T4 连接酶 buffer 和 1  $\mu$  l T4 连接酶,在 4-10°C 下连接 12h,然后将连接产物转化到大肠杆菌 DH5  $\alpha$  感受态细胞中,提取质粒进行鉴定。

[0038] 基因片段连入 Super1300 载体后再转入 EHA105 农杆菌中,操作如下:取 200  $\mu$  l 农杆菌感受态细胞,加入 5-10  $\mu$  l 构建好的质粒 DNA,30°C 冰浴 30min,液氮中速冻 1min,37°C 水浴 5min,然后加入 1ml YEB 培养基 (1 升 YEB 培养基含 1g 酵母提取物、5g 牛肉浸膏、5g 蛋白胨、5g 蔗糖和 0.5g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, pH 7.0),28°C 恢复培养 4h;10000g 离心 30s,弃上清,加入 0.1ml YEB 培养基重新悬浮细胞,涂布于含有 100  $\mu$  g/ml 卡那霉素和 125  $\mu$  g/ml 利福平的 YEB 平板 (1 升 YEB 培养基含 1g 酵母提取物、5g 牛肉浸膏、5g 蛋白胨、5g 蔗糖、0.5g

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 和 12g 琼脂, pH 7.0) 上, 28℃ 培养约 48h。

[0039] 经鉴定正确后(挑取阳性克隆作为模板, 用菌落 PCR 方法进行鉴定), 通过农杆菌介导转化模式植物水稻, 操作如下: 接种含有目的质粒的农杆菌菌落于 10ml YEB 培养基(含 0.1% 酵母提取物、0.5% 牛肉浸膏、0.5% 蛋白胨、0.5% 蔗糖、0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、1.2% 琼脂、100 μg/ml 卡那霉素和 125 μg/ml 利福平) 中 28℃、200rpm 震荡培养过夜, 转化前一天按 1 : 50 接种于 200ml 含相同抗生素的 YEB 培养液中扩大培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8。取菌液, 按 1%~2% 的比例, 转入新配制的无抗生素的 YEB 液体培养基中, 6 小时后, 菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.2~0.5 时即可用于转化。

[0040] 取粳稻品种爱知旭 (*Oryza sativa* L cv Aichi Asahi) 幼胚, 用 70% 酒精浸泡 1min, 然后用 0.1% 升汞溶液灭菌 30min, 再用无菌水冲洗 3 次, 置无菌滤纸上吸干, 接种于诱导培养基 (NB 培养基外加 2mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D) 上诱导愈伤组织 11~13d 后继代, 继代后 4d 用于共培养。愈伤组织在含有 100mol · L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮和含目的基因质粒的农杆菌的液体培养基中培养 20min, 用滤纸吸去多余的菌液后, 转到含乙酰丁香酮的固体培养基上 26℃ 暗培养 2d, 经共培养的愈伤组织转移到选择培养基 (NB 培养基外加 2mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D、50mg · L<sup>-1</sup> 潮霉素 B 和 300mg · L<sup>-1</sup> 头孢噻肟) 上。10d 后挑选成活的愈伤组织进行复筛, 抗性愈伤转移到分化培养基 (NB 培养基外加 2mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D、3mg · L<sup>-1</sup> 6-BA、0.5mg · L<sup>-1</sup> NAA、4mg · L<sup>-1</sup> KT、50mg · L<sup>-1</sup> 潮霉素 B 和 300mg · L<sup>-1</sup> 头孢噻肟) 上诱导出苗。培养温度 26℃, 每天光照 15h。抗性植株转到含 1/2N6 大量元素 (1415mg · L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>、231.5mg · L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>、83mg · L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O、92.5mg · L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、200mg · L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、200mg · L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 和 2.2mg · L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O) 的无激素培养基上使其生根。当试管苗长到约 8cm 高并有发达的根系时, 即可移栽入土。单株收获 T1 代种子。繁殖并鉴定至 T3 代, 获得纯合的转基因 52 个株系。

[0041] 通过农杆菌介导浸花法转化模式植物拟南芥, 操作如下: 接种含有目的基因质粒的农杆菌菌落于 10ml YEB 培养基(含 0.1% 酵母提取物、0.5% 牛肉浸膏、0.5% 蛋白胨、0.5% 蔗糖、0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、1.2% 琼脂、100 μg/ml 卡那霉素和 125 μg/ml 利福平) 中 28℃、200rpm 震荡培养过夜, 转化前一天按 1 : 50 接种于 200ml 含相同抗生素的 YEB 培养液中扩大培养至 OD<sub>600</sub> 为 1.2~1.6, 约 6h, 5000g 离心 15min 集菌, 重悬于渗透缓冲液, 使 OD<sub>600</sub> 为 0.8, 200ml 重悬液可使用 3 次。转化所用浸泡液含有 0.5×MS 大量元素、0.5×MS 微量元素、0.5mg/L VB5、5% 蔗糖、44nM 6-BA (Sigma 公司, 美国) 和 0.03% Silwet L-77 (LEHLE SEEDS 公司, 美国)。将 200ml 含目的农杆菌的渗透转化液置于一容器中, 翻转种有拟南芥的花盆, 使植株浸入含有待转化农杆菌的渗透缓冲液中, 浸 5 分钟, 缓慢取出花盆, 侧放于托盘中, 盖上黑塑料布避光 24 小时, 第二天取下塑料布, 直立放置花盆。

[0042] 制备 MS 筛选平板 (MS 培养基外加 80g/ml 潮霉素和 50g/ml 氨基青霉素), 转化收获的 T1 代种子经消毒后播种于筛选平板, 每 15cm 的平板上可以筛选 100 μg 左右的拟南芥种子。4℃ 春化 3 天, 平放在生长箱中培养 (22℃ 恒温, 24h 光照), 7~10 天后挑选在筛选培养基上根系和地上部生长正常的阳性植株, 移入正常 MS 培养基缓苗 3~5 天后移植入土壤, 单株收获 T2 代种子。繁殖并鉴定至 T3 代, 获得纯合的转基因 60 个株系。基因功能鉴定

[0043] (1) 耐高盐性能鉴定

[0044] 取 T3 代纯合转基因株系和野生型 (粳稻品种爱知旭) 种子, 均匀放在两层用蒸馏水润湿的发芽纸上, 在 25℃ 光照条件下培养 10d, 观察幼苗生长情况。然后将转基因株系

和野生型的水稻幼苗分别移入含 200mMNaCl 或正常清水的发芽盒内,置于相同光温条件的培养箱中培养。培养 5d 后,观察转基因株系与野生型幼苗在高盐胁迫下的表型。结果发现在 200mM NaCl 处理下,野生型水稻幼苗叶片出现白化表型,严重时幼苗白化死亡,而转 OsOEE3-1 基因株系叶片仍保持绿色。叶片最大光化学效率测定 (Fv/Fm) 结果表明,在 200mM NaCl 下,野生型幼苗地上部最大光化学效率显著降低,而转 OsOEE3-1 基因株系幼苗地上部最大光化学效率未出现明显变化,说明 OsOEE3-1 基因在水稻中超量表达可以提高水稻幼苗耐盐性。

[0045] T3 代纯合转基因株系和野生型 (ecotype Columbia) 拟南芥种子用 1%次氯酸钠消毒,在 4℃冰箱中春化 3 天,然后置于温度 22℃、湿度 50%、连续 24h 光照的培养箱中培养。培养 7d 后,观察幼苗生长情况。待幼苗子叶完全展开后,将转基因株系和野生型幼苗移入含 200mM NaCl 和正常的 MS 固体培养基 (含 1× 大量元素、1× 微量元素、1× 铁盐、3% 蔗糖和 0.8% 琼脂) 上,然后置于相同光温条件 (22℃、湿度 50%、连续 24h 光照) 的培养箱中培养。培养 12-15d 后,观察转基因株系与野生型幼苗在高盐胁迫下的表型。结果发现在 200mM NaCl 下,野生型幼苗全部白化死亡,转 OsOEE3-1 基因株系幼苗叶片仍保持绿色,说明 OsOEE3-1 基因超量表达可以缓解拟南芥盐害。

[0046] (2) 耐高温性能鉴定

[0047] 取 T3 代纯合转基因株系和野生型 (粳稻品种爱知旭) 种子,均匀放在两层用蒸馏水润湿的发芽纸上,在 25℃光照条件下培养 10d,观察幼苗生长情况。然后将转基因株系和野生型的水稻幼苗移入 46℃高温培养箱,处理 12h 后,再放回到 25℃光照条件下培养,4-5d 后野生型幼苗叶片出现黄化,严重时幼苗叶片局部开始白化死亡,而转 OsOEE3-1 基因株系叶片仍保持正常绿色。叶片最大光化学效率测定 (Fv/Fm) 结果表明,野生型幼苗地上部最大光化学效率显著降低,而转 OsOEE3-1 基因株系幼苗地上部最大光化学效率未出现明显变化,说明 OsOEE3-1 基因在水稻中超量表达可以提高水稻幼苗耐高温性能。

[0048] 取 T3 代纯合转基因株系和野生型拟南芥种子,播在塑料土盆中,在 22℃温室内培养,取生长到 4 周的转基因株系和野生型幼苗,在 45℃低温培养箱中处理 8h,再放回到 22℃温室内培养,3-4d 后野生型幼苗叶片出现失水卷曲,严重时幼苗叶片开始白化,而转 OsOEE3-1 基因株系叶片仍保持正常绿色说明 OsOEE3-1 基因在拟南芥中超量表达可以提高拟南芥幼苗耐高温性能。

[0049] SEQUENCE LISTING

[0050] <110> 杭州市农业科学研究院

[0051] <120> 水稻蛋白 OsOEE3-1 及其编码基因与应用

[0052] <130>

[0053] <160>3

[0054] <170>PatentIn version 3.3

[0055] <210>1

[0056] <211>217

[0057] <212>PRT

[0058] <213> 水稻

[0059] <400>1



[0099]	aaggagtcgg cccaggacat catcaacctc aagccgctca tcgagaagaa gcagtggccg	420
[0100]	ttcgtcaggg acgacctccg cctcagggcc tcctacctgc gctacgacct caaaaccgtc	480
[0101]	atcaactcca agcccaagga cgagaagaag ggcctcaagg acctcaccgg caagctcttc	540
[0102]	gccaccattg acgggcttga ccatgcagcc aagatcaaga gccccgaaga ggccggagaag	600
[0103]	tactacacgt tgaccaaate tgctcttggc gatgtcctcg ccaagctagg ctag	654
[0104]	<210>3	
[0105]	<211>960	
[0106]	<212>RNA	
[0107]	<213> 水稻	
[0108]	<400>3	
[0109]	aucugaagag agaaaauuc agcuuauagu caggugaggu cugagcugag guugagagau	60
[0110]	ggcacaggca auggcgucca ugaccgggcu gucgcagggc gugcagcugc cggccgggccc	120
[0111]	caggcgcgcc ggccggcaggu ccaggcucgc cgucgucagg gccgacgccg ccgccgccga	180
[0112]	cguccagacc ggcccgcgcg ccgugcucgg ccucgucgcc accgggaucg ccggcggcgc	240
[0113]	ccucgcgcag gcggcgcucg ccgaggccgc caagcccauc aagcucggcc ccccgccacc	300
[0114]	gccuccggu ggacuccug ggacgcugaa cucggaccag gcgagggaca cggaccugcc	360
[0115]	gcugagggaa agguucuacc ugcagccgcu gccgccggcg gaggcggcgg cgagggcgaa	420
[0116]	ggagucggcc caggacauca ucaaccucaa gccgcucauc gagaagaagc aguggccguu	480
[0117]	cgucagggac gaccuccgcc ucagggccuc cuaccugcgc uacgaccuca aaaccgucau	540
[0118]	caacuccaag cccaaggacg agaagaaggg ccucaaggac cucaccggca agcucuucgc	600
[0119]	caccuugac gggcuugacc augcagccaa gaucaagagc cccgaagagg cggagaagua	660
[0120]	cuacacguug accaaaucug cucuuggcga uguccugcc aagcuaggcu aggauccgca	720
[0121]	uaaugccau augggguuuc gguguuuuuu uguuuuguca uauggaaccg gcaauguacc	780
[0122]	cuccauguug auauuguauc agcaagcacu uacgaugeau ucaaucuuga guuguuguug	840
[0123]	acggcuaaa cuccaagcag gcgcgauuau cagaaaaca gggagaaauc caaaaguucu	900
[0124]	gaacaaauc aucgcauuu ucauucauu ucagaagcau cauuucacau cacaaguuuu	960