



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105073773 B

(45)授权公告日 2018.06.22

(21)申请号 201380074526.8

(22)申请日 2013.04.22

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105073773 A

(43)申请公布日 2015.11.18

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2013/074498 2013.04.22

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/172826 ZH 2014.10.30

(73)专利权人 创世纪种业有限公司
地址 518048 广东省深圳市福田区沙尾工
业区308栋东方明珠科技大厦4层

(72)发明人 何云蔚 王建胜 梁远金 陈淼

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限
公司 11285

代理人 屈静

(51)Int.Cl.
C07K 14/415(2006.01)
C12N 15/29(2006.01)
C12N 15/82(2006.01)

(56)对比文件
CN 1399512 A,2003.02.26,
WO 2006053246 A2,2006.05.18,
CN 1769463 A,2006.05.10,
CN 10202485A A,2011.04.06,
高峰.盐芥耐盐相关基因的克隆及功能分
析.《中国博士学位论文全文数据库 基础科学
辑》.2007,(第5期),摘要.

审查员 袁一方

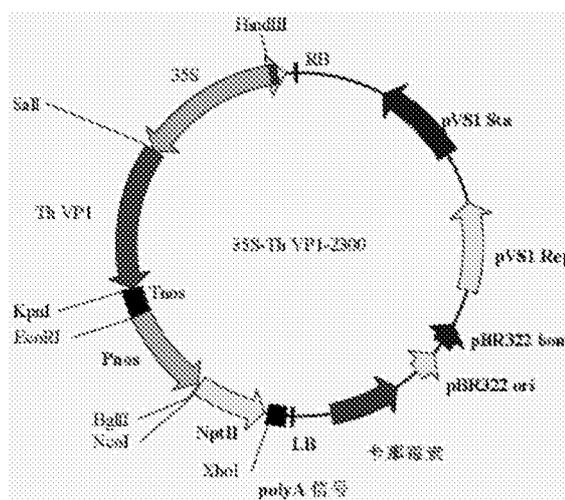
权利要求书1页 说明书13页 附图4页

(54)发明名称

一种小盐芥液泡膜焦磷酸酶VP1及其编码基
因与应用

(57)摘要

本发明公开了一种植物蛋白及其编码基因
与应用,尤其公开了来源于小盐芥的液泡膜焦磷
酸酶及其编码基因,以及其在培育耐盐性提高的
转基因植物中的应用。



1. 小盐芥的一个液泡膜焦磷酸酶,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 编码权利要求1所述液泡膜焦磷酸酶的基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。
3. 一种重组表达载体,其是通过将权利要求2所述的基因插入到一种表达载体而获得的,并且所述基因的核苷酸序列与所述表达载体的表达控制序列可操作地连接;所述表达载体是pCAMBIA2300。
4. 权利要求3所述的重组表达载体,其为附图2所示的35S-ThVP1-2300载体。
5. 一种重组细胞,其含有权利要求2所述的基因或者权利要求3或4所述的重组表达载体;所述重组细胞为重组农杆菌细胞。
6. 一种改善植物盐性的方法,包括:将权利要求2所述的基因或者权利要求3或4所述的重组表达载体导入植物或植物组织并使所述基因表达;所述植物是拟南芥。
7. 一种制备转基因植物的方法,包括:在有效产生植物的条件下培养含有权利要求2所述的基因或者权利要求3或4所述的重组表达载体的植物或植物组织。
8. 权利要求7所述的方法,其中所述植物是拟南芥。
9. 权利要求2所述的基因、权利要求3或4所述的重组表达载体或者权利要求5所述的重组细胞用于改善植物耐盐性以及用于植物育种的用途。
10. 权利要求9所述的用途,其中所述植物是拟南芥。

一种小盐芥液泡膜焦磷酸酶VP1及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及液泡膜焦磷酸酶及其编码基因与应用,特别是涉及一个来源于小盐芥的液泡膜焦磷酸酶VP1及其编码基因,以及其在培育耐盐性提高的转基因植物中的应用。

背景技术

[0002] 盐胁迫是世界农业生产最重要的非生物逆境危害之一,盐渍土壤通常以钠盐、钙盐或镁盐为主,成为影响植物生长、导致粮食和经济作物减产的主要因素。世界上盐碱土的面积约有4亿公顷,占灌溉农田的1/3。盐碱地在中国分布广泛,现有盐碱地面积约0.4亿公顷。随着我国人口增加,耕地减少,盐碱地资源的开发利用有着极其重要的现实意义。而植物抗盐碱、耐干旱能力的提高和适宜在盐碱地上生长并具有较高经济和生态价值的植物种或品系的选育,则是利用盐碱地经济、有效的措施。对绝大多数农作物来说,大多数植物对盐碱、干旱的耐受性差,只能生长在氯化钠含量为0.3%以下的土壤上,土壤中过量的Na⁺会对植物体的正常的生长代谢产生毒害作用。因此如何在盐渍环境下提高作物产量就成为全世界农业生产中十分重要的问题。

[0003] 植物的耐盐性是一个十分复杂的数量性状,其耐盐机制涉及从植株到器官、组织、生理生化直至分子的各个水平。各国的科学家也为此做了大量的工作,并取得了很多新进展,特别在利用高等模式植物拟南芥来研究植物的耐盐分子机理方面,使该领域的研究有了突破性的进展(Zhu JK.2002.Salt and drought stress signal transduction in plants.*Annu.Rev.Plant Biol.*53:1247-1273;Zhang ZL.2011.*Arabidopsis Floral Initiator SKB1 Confers High Salt Tolerance by Regulating Transcription and Pre-mRNA Splicing through Altering Histone H4R3 and Small Nuclear Ribonucleoprotein LSM4 Methylation.Plant Cell*,23:396-411)。高等植物细胞可有多种途径感受外界环境中物化参数的变化,从而将胞外的信号变为胞内信号,通过系列的信号传导最后将胁迫信号传递至细胞核内,激活转录因子,而激活转录因子再作用于功能基因,启动逆境应答基因的表达从而提高植物的耐逆性。尽管研究者已从不同侧面开展了大量研究,但由于其机制十分复杂,植物抗盐中的许多重要问题仍有待探索。例如,植物抗盐的关键因子仍未找到;植物耐盐的分子机制并不十分清楚。虽然许多研究机构通过现代生物技术,获得了各类具有一定耐盐、抗旱等抗逆能力的转基因植物,但还未达到产业化的标准。因此在提高植物抗逆性方面,还有许多工作需要做。

发明内容

[0004] 本发明人利用SSH(抑制差减杂交)与RACE(cDNA末端快速扩增)相结合的方法克隆了小盐芥的一个液泡膜焦磷酸酶(本文命名为VP1)的编码基因,并测定了其DNA序列。并且发现通过转基因技术将其导入植株后,可明显改善转基因植株的耐盐性,而且这些性状可稳定遗传。

[0005] 本发明第一方面提供小盐芥的一个液泡膜焦磷酸酶VP1的编码基因(本文命名为

ThVP1), 其序列为SEQ ID NO:2。

[0006] 本发明第二方面提供一种重组表达载体, 其含有本发明第一方面所述的基因, 其是通过所述基因插入到一种表达载体而获得的, 优选地, 所述表达载体是pCAMBIA2300; 并且所述基因的核苷酸序列与所述重组表达载体的表达控制序列可操作地连接; 优选地, 所述重组表达载体为附图2所示的35S-ThVP1-2300载体。

[0007] 本发明第三方面提供一种重组细胞, 其含有本发明第一方面所述的基因或者本发明第二方面所述的重组表达载体; 优选地, 所述重组细胞为重组农杆菌细胞。

[0008] 本发明第四方面提供一种改善植物耐盐性的方法, 包括: 将本发明第一方面所述基因或者本发明第二方面所述的重组表达载体导入植物或植物组织并使所述基因表达; 优选地, 所述植物是拟南芥。

[0009] 本发明第五方面提供一种制备转基因植物的方法, 包括: 在有效产生植物的条件下培养含有本发明第一方面所述基因或者本发明第二方面所述重组表达载体的植物或植物组织; 优选地, 所述植物是拟南芥。

[0010] 本发明第六方面提供本发明第一方面所述的基因、本发明第二方面所述的重组表达载体或者本发明第三方面所述的重组细胞用于改善植物耐盐性以及用于植物育种的用途; 优选地, 所述植物是拟南芥。

[0011] 本发明第七方面提供由本发明第一方面所述基因编码的蛋白质, 其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

附图说明

[0012] 图1是ThVP1基因的植物表达载体(35S-ThVP1-2300)构建流程(图1a-1b)。

[0013] 图2是ThVP1基因的植物表达载体(35S-ThVP1-2300)的质粒图。

[0014] 图3是培养的供试植物拟南芥。

[0015] 图4是ThVP1转基因拟南芥的T₁代植株的耐盐实验结果, T1b7表现出明显的耐盐性, T1b10、T1b15的结果与其类似, 在此未示出。

[0016] 图5为利用反转录PCR对T₁代转基因烟草植株和非转基因对照植株中ThVP1基因的转录水平进行分子水平检测的结果。M为DNA Ladder Marker (DL2000), 1-4为不耐盐的对照拟南芥植株, 13为质粒PCR阳性对照(35S-ThVP1-2300质粒), 5-12为耐盐T₁代转基因拟南芥植株。

具体实施方式

[0017] 提供以下实施例, 以方便本领域技术人员更好地理解本发明。所述实施例仅出于示例性目的, 并非意在限制本发明的范围。

[0018] 下面实施例中提到的限制性内切酶均购自New England Biolabs公司

[0019] 实施例1. 盐胁迫下小盐芥SSH文库构建:

[0020] 具体方法为:

[0021] 按照Clontech公司的PCR-select™ cDNA Subtraction Kit试剂盒说明书所示的方法通过抑制差减杂交方法构建差减文库。实验中以生长过程中盐处理的小盐芥组织中提取的mRNA作为样本(tester), 以未处理的小盐芥组织中提取的mRNA作为对照(driver)。具

体步骤如下:

[0022] (1) 供试材料:

[0023] 小盐芥 (*Thellungiella halophila*, 购自中国内蒙古巴彦淖尔市乌兰布和沙漠绿色植物园盐生植物繁育中心) 播种到灭菌的蛭石上, 在22℃、光周期12小时光照/12小时黑暗 (光强3000-4000Lx) 条件下培养, 每周浇1/2MS培养基 (含有9.39mM KNO₃, 0.625mM KH₂PO₄, 10.3mM NH₄NO₃, 0.75mM MgSO₄, 1.5mM CaCl₂, 50μM KI, 100μM H₃BO₃, 100μM MnSO₄, 30μM ZnSO₄, 1μM Na₂MoO₄, 0.1μM CoCl₂, 100μM Na₂EDTA, 100μM FeSO₄) 一次。当苗株直径达到5-6cm时用于实验。

[0024] (2) 材料处理:

[0025] 将供试植株分为2组, 每组4盆, 每盆3株。第一组为对照组, 正常地用1/2MS浇灌; 第二组为盐处理组, 浇灌含有300mM NaCl的1/2MS溶液, 将两组植物在22℃、光周期12小时光照/12小时黑暗 (光强3000-4000Lx) 条件下培养10天, 然后及时收集两组植株 (用蒸馏水洗净根部), 用液氮迅速冷冻后, 于-70℃冰箱中保存。

[0026] (3) 总RNA提取:

[0027] 分别取对照组和盐处理组的小盐芥3.0g, 用植物RNA提取试剂盒 (购自Invitrogen) 提取总RNA。用HITACHI公司的紫外分光光度计U-2001测定总RNA在260nm和280nm的吸光度值, OD₂₆₀/OD₂₈₀比值为1.8-2.0, 表明总RNA纯度较高, 用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性, 28S条带的亮度约为18S条带的2倍, 表明RNA的完整性良好。使用Qiagen公司的Oligotex mRNA纯化试剂盒 (从总RNA中纯化polyA+RNA) 分离mRNA。

[0028] (4) 抑制差减杂交:

[0029] 按Clontech公司的PCR-selectTM cDNA Subtraction Kit试剂盒说明书所示的方法进行抑制差减杂交。先将Driver mRNA和Tester mRNA分别反转录, 得到双链cDNA, 再以2μg Tester cDNA和2μg Driver cDNA作为起始材料进行差减杂交。在37℃水浴下分别将Tester cDNA和Driver cDNA用Rsa I酶切1.5h, 然后将酶切后的Tester cDNA分成两等份, 连接上不同的接头, 而Driver cDNA不连接头。两种连有不同接头的Tester cDNA分别与过量的Driver cDNA混合, 进行第一次正向差减杂交。将两种第一次正向差减杂交的产物混合, 再与新变性的Driver cDNA进行第二次正向差减杂交, 通过两次抑制性PCR扩增富集差异表达基因的片段 (PCR进行前, 第二次正向差减杂交产物进行末端补平)。

[0030] (5) cDNA差减文库的构建与初步筛选、克隆、鉴定

[0031] 依照pGEM-T Easy试剂盒 (购自Promega) 的说明, 将所述第二次正向差减杂交cDNA片段的第二次抑制性PCR扩增产物 (使用QIAquick PCR Purification Kit纯化, 购自Qiagen) 与pGEM-T Easy载体连接, 其具体步骤如下: 在200μl PCR管中依次加入下列成分: 纯化的正向差减杂交cDNA片段的第二次抑制性PCR产物3μl、2×T4连接酶缓冲液5μl、pGEM-T Easy载体1μl、T4DNA连接酶1μl、于4℃连接过夜。然后取10μl连接反应产物, 加入到100μl感受态大肠杆菌JM109 (购自TAKARA) 中, 冰浴30min, 42℃热休克60秒, 冰浴2min, 另加250μl LB液体培养基 (含有1%胰蛋白胍 (Tryptone, 购自OXOID)、0.5%酵母提取物 (Yeast Extract, 购自OXOID) 和1%NaCl (购自国药)) 后置于37℃摇床中, 以225rpm振荡培养30min, 然后从中取200μl菌液接种于含50μg/ml氨苄青霉素、40μg/mL X-gal、24μg/mL IPTG (X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷) 和IPTG (异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷) 购自TAKARA)

的LB固体培养板上,37℃培育18小时。计数培养板中直径>1mm的清晰白色及蓝色菌落,随机挑取450个白色菌落(编号:Th-S001至Th-S450)。将所挑取的白色菌落接种于96孔细胞培养板(CORNING)中的含50μg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基,37℃培养过夜后加甘油至甘油终浓度为20%(体积比),于-80℃保存备用。对所培养的菌落克隆以巢式PCR引物Primer 1和Primer 2R(来自Clontech公司的PCR-select™ cDNA Subtraction Kit试剂盒)进行菌液PCR扩增验证,得到342个阳性克隆,然后将所有阳性克隆送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

[0032] (6) 差异克隆的cDNA测序分析:

[0033] 将DNA测序结果去除载体和不明确序列及冗余的cDNA后,共得到301个有效表达序列标签(Expressed sequence tag,EST)(unigene)。

[0034] 实施例2小盐芥液泡膜焦磷酸酶基因ThVP1的克隆

[0035] 将实施例1获得的有效克隆子之一Th-S351的测序结果去掉冗余DNA后,序列为SEQ ID NO:3,序列分析表明该序列编码的蛋白属于液泡膜焦磷酸酶。本文将SEQ ID NO:3序列对应的全长编码基因命名为ThVP1,其对应的蛋白命名为VP1。

[0036] SEQ ID NO:3:

[0037]

```

1      ACGCTGAATC ATCTTGTGCT GCACTCGTTG TTGCTTCTAT CTCGTCTTTT GGAATCAACC
61     ATGATTTTAC AGGCATGTTG TTCCCCTTGC TCATCAGTTC AATGGGGATC TTGGTTTGT
121    TGATCACCCAC TCTCTTTGCC ACCGACATCT CTGAGATCAA GGCAGTGAAA GAGATCGAGC
181    CGGCCCTCAA AAACCAGCTT ATTATCTCGA CGGTTATCAT GACTGTTGGA ATCGCTTTAG
241    TGTCGTGGAC TGGGTTGCCA TCTTCCTTCA CAATCTACAA CTTCGGGACA CAGAAAGTTG
301    TGAAAAGCTG GGAGCTATTC CTCTGTGTTG CTGTTGGTCT CTGGGCTGGA CTCAGCATCG
361    GCTTTGTTAC TGAATACTAT ACCAGCAATG CATAACAGCC TGTGCAAGAC GTGGCGGATT
421    CATGCAGAAC AGGAGCAGCA ACCAACGTAA TATTCGGACT TGCTCTTGGT TACAAATCCG
481    TGATAATTCC AATATTTGCG ATTGGTGTCA GTATATTTGT TAGCTTCAGC TTTGCTGCCA
541    TGT

```

[0038] ThVP1全长编码基因的克隆

[0039] 根据已经获得的SEQ ID NO:3序列,设计如下两条特异性引物,作为3' RACE的5'端特异性引物。

[0040] ThVP1 GSP1:SEQ ID NO:4:

[0041] CATGCAGAAC AGGAGCAGCA AC

[0042] ThVP1 GSP2:SEQ ID NO:5:

[0043] AATATTTGCG ATTGGTGTCA GTA

[0044] 实验步骤按试剂盒说明书操作(3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends试剂盒购自Invitrogen公司)。

[0045] 用SEQ ID NO:4与通用引物AUAP(试剂盒自带),以盐处理组小盐芥提取的mRNA反转录的cDNA为模板进行第一轮PCR扩增。具体步骤如下:

[0046] 50μl PCR反应体系:5μl 10×Ex Buffer、3μl 2.5mM的dNTP、2.0μl mRNA反转录的cDNA、1.0μl Ex Taq(购自TAKARA)、10μM的引物SEQ ID NO:4和AUAP各2.0μl、以及35μl双蒸

水。PCR反应条件:94℃预变性5min,33个循环(94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸1min),72℃延伸10min。

[0047] 所得的PCR产物用双蒸水稀释50倍后取2.0μl作为模板,用SEQ ID NO:5与通用引物AUAP进行第二轮PCR扩增,具体步骤如下:

[0048] 50μl PCR反应体系:5μl 10×Ex Buffer、3μl 2.5mM的dNTP、2.0μl稀释的第一轮PCR产物、1.0μl Ex Taq、10μM的引物SEQ ID NO:5和AUAP各2.0μl、以及35μl的双蒸水。PCR反应条件:94℃预变性5min,33个循环(94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸1min),72℃延伸10min。回收第二次PCR产物中片段约为1100bp的条带(Gel Extraction Kit购自OMEGA),并将其连接于pGEM-T Easy载体,然后转化到大肠杆菌JM109(具体方法同上)。随机挑取10个白色菌落接种于含有50μg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃培养过夜后加甘油至甘油终浓度为20%(体积比),-80℃保存备用。用SEQ ID NO:5与通用引物AUAP进行菌液PCR扩增,得到6个阳性克隆,将4个阳性克隆送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序,获得该基因的cDNA的3'端。

[0049] 根据已经获得的ThVP1基因的部分片段(SEQ ID NO:3),设计如下三条特异性引物,作为5' RACE的3'端特异性引物。

[0050] ThVP1 GSP3:SEQ ID NO:6:

[0051] GATGGCAACC CAGTCCACGA CA

[0052] ThVP1 GSP4:SEQ ID NO:7:

[0053] ATAAGCTGGT TTTTGAGGGC CG

[0054] ThVP1 GSP5:SEQ ID NO:8:

[0055] GTGGCAAAGA GAGTGGTGAT CA

[0056] 实验步骤按试剂盒说明书操作(5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends试剂盒购自Invitrogen公司)。

[0057] 用SEQ ID NO:7与通用引物AAP(试剂盒自带),以盐处理组小盐芥提取的mRNA反转录的cDNA(反转录引物SEQ ID NO:6)为模板进行第一轮PCR扩增,具体步骤如下:

[0058] 50μl PCR反应体系:5μl 10×Ex Buffer、3μl 2.5mM的dNTP、2.0μl mRNA反转录的cDNA、1.0μl Ex Taq(购自TAKARA)、10μM的引物SEQ ID NO:7和AAP各2.0μl、以及35μl的双蒸水。PCR反应条件:94℃预变性5min,33个循环(94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min),72℃延伸10min。

[0059] 所得的PCR产物用双蒸水稀释50倍后取2.0μl作为模板,用SEQ ID NO:8与引物AUAP进行第二轮PCR扩增,具体步骤如下:

[0060] 50μl PCR反应体系:5μl 10×Ex Buffer、3μl 2.5mM的dNTP、2.0μl稀释的第一轮PCR产物、1.0μl Ex Taq、10μM的引物SEQ ID NO:8和AUAP各2.0μl、以及35μl的双蒸水。PCR反应条件:94℃预变性5min,33个循环(94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸1min),72℃延伸10min。回收第二次PCR产物中片段约为1100bp的条带(Gel Extraction Kit购自OMEGA),并将其连接于pGEM-T Easy载体,然后转化到JM109(具体方法同上)。随机挑取10个白色菌落接种于含有50μg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃培养过夜后加甘油至甘油终浓度为20%(体积比),-80℃保存备用。用SEQ ID NO:8与引物AUAP进行菌液PCR扩增(反应体系及反应条件同上),得到7个阳性克隆,选取其中4个克隆送至英潍捷基(上海)贸易有限公

司测序,获得该基因的cDNA的5'端。所得的5' RACE产物克隆测序后,将其与3' RACE产物测序结果以及SEQ ID NO:3序列进行拼接。获得ThVP1全长cDNA序列SEQ ID NO:9:

[0061]

```

1      TTTTGTGTT GATAATTTTCG TTTAATTAAG AGAGAGAGAT GATGGCGAAG GCGTTGTTAC
61     CGGAATTTTG GACGGAGATT TTGGTGCCGG TGTGCGCCGT GGTGGGAATC GTGTTCTCGC
121    TTTTCCAGTG GTATGTTGTG TCTTGCGTGA AACTCACGGC CGACCGTGGC GGAGAGCACG
181    AAGGAGATGG GAAGAATGGA CACGACGATT ATCTGATCGA GGAAGAGGAA GGAGTTCACG
241    ATCAGAGCGT CGTGGCCAAG TGCCTGAGA TTCAGACCGC TATATCGGAA GGTGCAACCT
301    CATTTCTGTT CACCGAGTAC AAATATGTTG GTGTCTTCAT GGTTCCTTTT GCTGCCGTTA
361    TCTTTCTCTT CCTGGGATCA GTCCAAGGGT TCAGCACCAA GAGCCAGCCT TGCACCTTACG
421    ACAAGACAAG AACATGCAAG CCAGCTCTCG CAACTGCTGT CTTCAGTACC ATCTCCTTCC
481    TGCTCGGCGC AGTGACGTCA GTCCTCTCTG GCTTTCTCGG GATGAAGATT GCCACTTATG
541    CCAACGCTAG AACCACACTT GAAGCAAGGA GAGGTGTTGG GAAGGCTTTC ATCGTTGCAT
601    TCAGGTCTGG TGCTGTAATG GGTTCCTTTC TCGCAGCAA CGGTCTCTTG GTGCTTTACA
661    TTACCATCAA CCTCTTCAAG ATTTATTACG GCGATGACTG GGAAGGCCTT TTTGAGTCCA
721    TCACTGGTTA TGGTCTTGGT GGATCCTCCA TGGCGCTCTT TGGTAGAGTT GGTGGTGGAA
781    TCTACACCAA GGCTGCTGAT GTTGGTGCTG ACCTTGTGGG AAAAGTAGAA AGGAATATCC
841    CTGAAGACGA TCCCAGGAAT CCAGCTGTTA TTGCTGATAA TGTGGGTGAC AATGTTGGTG
901    ATATTGCTGG GATGGGCTCT GATCTCTTTG GCTCGTACGC TGAATCATCT TGTGCTGCAC
961    TCGTTGTTGC TTCTATCTCG TCTTTTGAA TCAACCATGA TTTACAGGC ATGTTGTTCC
1021   CGTTGCTCAT CAGTTCAATG GGGATCTTGG TTTGTTTGAT CACCACTCTC TTTGCCACCG
1081   ACATCTCTGA GATCAAGGCA GTGAAAGAGA TCGAGCCGGC CCTCAAAAAC CAGCTTATTA
1141   TCTCGACGGT TATCATGACT GTTGAATCG CTTTAGTGTC GTGGACTGGG TTGCCATCTT

```

[0062]

1201 CCTTCACAAT CTACAACCTC GGGACACAGA AAGTTGTGAA AAGCTGGGAG CTATTCCTCT
 1261 GTGTTGCTGT TGGTCTCTGG GCTGGACTCA GCATCGGCTT TGTTACTGAA TACTATAACCA
 1321 GCAATGCATA CAGCCCTGTG CAAGACGTGG CGGATTCATG CAGAACAGGA GCAGCAACCA
 1381 ACGTAATATT CGGACTTGCT CTTGGTTACA AATCCGTGAT AATTCCAATA TTTGCGATTG
 1441 GTGTCAGTAT ATTTGTTAGC TTCAGCTTTG CTGCCATGTA CGGTGTAGCA GTTGCTGCAC
 1501 TAGGGATGCT AAGTACCATC GCAACTGGTT TGGCAATTGA TGCTTATGGT CCAATCAGTG
 1561 ACAATGCTGG TGGTATTGCT GAGATGGCTG GAATGAGCCA CCGCATCCGA GAAAGAACCG
 1621 ACGCTCTTGA CGCCGCTGGA AACACCACTG CTGCTATCGG AAAGGGATTT GCGATAGGTT
 1681 CTGCTGCGCT AGTGTGCTG GCTCTGTTTGTGTGCATTTGT GAGCCGAGCA GGAATAGAGA
 1741 GAGTGGATGT GTTGACACCA AAGGTAGTGA TAGGGTTGCT TGTAGGGGCA ATGCTTCCAT
 1801 ATTGGTTCTC TGCAATGACG ATGAAGAGCG TGGGAAGTGC AGCTCTGAAG ATGGTGGAAG
 1861 AAGTGAGGAG GCAGTTCAAC ACCATCCCTG GACTCATGGA AGGTACAGCA AAACCAGACT
 1921 ATGCTACATG CGTCAAGATC TCCACTGATG CTTCCATCAA GGAAATGATT CCTCCCGGTT
 1981 GCCTTGTCAT GCTTACTCCT CTTATAGTCG GTTTCTTCTT CGGTGTTGAG ACCCTCTCTG
 2041 GTGTGCTCGC TGGCTCCCTC ATCTCCGGTG TTCAGATTGC GATATCTGCA TCCAACACTG
 2101 GTGGAGCCTG GGACAATGCC AAGAAGTACA TTGAGGCGGG AGCATCAGAG CACGCGAGGA
 2161 GCTTAGGGCC AAAAGGGTCA GAGCCACACA AGGCAGCAGT GATAGGTGAC ACAATAGGAG
 2221 ACCCCTTGAA GGATACATCA GGACCGTCCC TTAACATATT GATCAAGCTT ATGGCCGTTG
 2281 AGTCTCTTGT CTTTGCTCCT TCTTTGCGAC TCACGGTGGT TTCCTCTTCA ACATCTTCTC
 2341 GTGAAATAAG CTTTTTAACT CTATACAGTA TATATTTAGC CTACCGAAAG AAATAAAACA
 2401 GAAGAAGATA GAATTTTCTC ATCTTATTAA AGGCGGTGGC TGTTGTATA GAAATATTAG
 2461 AAGGTTTTCT CGATAATGAT TAGGGTCCAT ACAAGTAGAA TAACCGTATT ATACTAGTAG
 2521 AAGATAATTG TTTTTTGATG ATTGAAACCA AAAGAAAACA AATAAGAAGA TGATTGATTG
 2581 ATAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA

[0063] 根据SEQ ID NO:9序列设计一对引物如下:

[0064] SEQ ID NO:10:

[0065] ATGATGGCGAAGGCGTTGTTACC

[0066] SEQ ID NO:11:

[0067] TCACGAGAAGATGTTGAAGAGG

[0068] 通过SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11来克隆ThVP1全长编码基因。

[0069] 采用TaKaRa的PrimeSTAR HS DNA聚合酶,以盐处理组小盐芥提取的mRNA反转录的cDNA为模板进行PCR反应。50 μ l PCR反应体系:10 μ l 5 \times PS Buffer、3 μ l 2.5mM的dNTP、2.0 μ l cDNA、1.0 μ l PrimeSTAR、10 μ M的引物SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11各2.0 μ l、以及30 μ l的双蒸水。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5min,33个循环(94 $^{\circ}$ C变性30s,58 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸2min),72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0070] PCR扩增产物加A尾:PCR产物中加入2.5倍体积的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C放置10分钟,离心,去上清,晾干,然后用21 μ l双蒸水溶解,然后向其中加入2.5 μ l 10 \times Ex Buffer、0.5 μ l 5mM的dATP、1.0 μ l Ex Taq。反应条件:70 $^{\circ}$ C反应30分钟。将得到的约2300bp的DNA片段回收

(Omega回收试剂盒),并将其连接至pGEM T-easy载体上(得到ThVP1-pGEM重组载体),然后转化JM109(方法同上)。随机挑取10个白色菌落接种于含有50 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C培养过夜后加甘油至甘油终浓度为20%(体积比),-80 $^{\circ}$ C保存备用。用SEQ ID NO:10与SEQ ID NO:11进行菌液PCR扩增(反应体系及反应条件同上),得到7个阳性克隆,选取其中4个阳性克隆送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序,序列为SEQ ID NO:2,其编码的蛋白质的氨基酸序列为SEQ ID NO:1。

[0071] VP1蛋白的氨基酸序列:SEQ ID NO:1

```

1      MMAKALLPEF WTEILVPVCA
21     VVGIVFSLFQ WYVVSCVKLT
41     ADRGGEHEGD GKNGHDDYLI
61     EEEEGVHDQS VVAKCAEIQT
81     AISEGATSFL FTEYKYVGVF
101    MVFFAAVIFL FLGSVQGFST
121    KSQPCTYDKT RTCKPALATA
141    VFSTISFVLG AVTSVLSGFL
161    GMKIATYANA RTTLEARRGV
181    GKAFIVAFRS GAVMGFLLAA
201    NGLLVLYITI NLFKIYYGDD
221    WEGLFESITG YGLGGSSMAL
241    FGRVGGGIYT KAADVGADLV
[0072] 261    GKVERNIPED DPRNPAVIAD
281    NVGDNVGDIA GMGSDLFGSY
301    AESSCAALVV ASISSFGINH
321    DFTGMLFPLL ISSMGILVCL
341    ITTLFATDIS EIKAVKEIEP
361    ALKNQLIIST VIMTVGIALV
381    SWTGLPSSFT IYNFGTQKVV
401    KSWELFLCVA VGLWAGLSIG
421    FVTEYYTSNA YSPVQDVADS
441    CRTGAATNVI FGLALGYKSV
461    IIPIFAIGVS IFVSFSFAAM
481    YGVAVAALGM LSTIATGLAI
501    DAYGPISDNA GGIAEMAGMS

```

521 HRIRERTDAL DAAGNTTAAI
 541 GKGFAIGSAA LVSLALFGAF
 561 VSRAGIERVD VLTPKVVIGL
 581 LVGAMLPYWF SAMTMKSVGS
 601 AALKMVEEVR RQFNTIPGLM
 621 EGTAKPDYAT CVKISTDASI
 [0073] 641 KEMIPPGCLV MLTPLIVGFF
 661 FGVETLSGVL AGSLISGVQI
 681 AISASNTGGA WDNAKKYIEA
 701 GASEHARSLG PKGSEPHKAA
 721 VIGDTIGDPL KDTSGPSLNI
 741 LIKLMAVESL VFAPSLRLTV
 761 VSSSTSSR

[0074] ThVP1基因的核苷酸序列SEQ ID NO:2

[0075]

1 ATGATGGCGA AGGCGTTGTT ACCGGAATTT TGGACGGAGA TTTTGGTGCC GGTGTGCGCC
 61 GTGGTGGGAA TCGTGTTC TCCTTTCCAG TGGTATGTTG TGTCTTGCGT GAAACTCAGC
 121 GCCGACCGTG GCGGAGAGCA CGAAGGAGAT GGAAGAATG GACACGACGA TTATCTGATC
 181 GAGGAAGAGG AAGGAGTTCA CGATCAGAGC GTCGTGGCCA AGTGCCTGA GATTCAGACC
 241 GCTATATCGG AAGGTGCAAC CTCATTTCTG TTCACCGAGT ACAAATATGT TGGTGTCTTC
 301 ATGGTTTTCT TTGCTGCCGT TATCTTTCTC TTCCTGGGAT CAGTCCAAGG GTTCAGCACC
 361 AAGAGCCAGC CTTGCACTTA CGACAAGACA AGAACATGCA AGCCAGCTCT CGCAACTGCT
 421 GTCTTCAGTA CCATCTCCTT CGTGCTCGGC GCAGTGACGT CAGTCTCTC TGGCTTTCTC
 481 GGGATGAAGA TTGCCACTTA TGCCAACGCT AGAACCACAC TTGAAGCAAG GAGAGGTGTT
 541 GGAAGGCTT TCATCGTTGC ATTCAGGTCT GGTGCTGTAA TGGGTTTCCT TCTCGCAGCA
 601 AACGGTCTCT TGGTGCTTTA CATTACCATC AACCTCTTCA AGATTTATTA CGGCGATGAC
 661 TGGGAAGGCC TTTTGTGAGC CATCACTGGT TATGGTCTTG GTGGATCCTC CATGGCGCTC
 721 TTTGGTAGAG TTGGTGGTGG AATCTACACC AAGGCTGCTG ATGTTGGTGC TGACCTTGTG
 781 GGAAAAGTAG AAAGGAATAT CCCTGAAGAC GATCCCAGGA ATCCAGCTGT TATTGCTGAT
 841 AATGTTGGTG ACAATGTTGG TGATATTGCT GGGATGGGCT CTGATCTCTT TGGCTCGTAC
 901 GCTGAATCAT CTTGTGCTGC ACTCGTTGTT GCTTCTATCT CGTCTTTTGG AATCAACCAT
 961 GATTTACAG GCATGTTGTT CCCGTTGCTC ATCAGTTCAA TGGGGATCTT GGTGTTGTTG
 1021 ATCACCCTC TCTTTGCCAC CGACATCTCT GAGATCAAGG CAGTGAAAGA GATCGAGCCG
 1081 GCCCTCAAAA ACCAGCTTAT TATCTCGACG GTTATCATGA CTGTTGGAAT CGCTTTAGTG
 1141 TCGTGGACTG GGTGCCATC TTCCTTACA ATCTACAAC TCGGGACACA GAAAGTTGTG
 1201 AAAAGCTGGG AGCTATTCCT CTGTGTTGCT GTTGGTCTCT GGGCTGGACT CAGCATCGGC
 1261 TTTGTTACTG AATACTATAC CAGCAATGCA TACAGCCCTG TGCAAGACGT GGCGGATTCA
 1321 TGCAGAACAG GAGCAGCAAC CAACGTAATA TTCGGACTTG CTCTTGTTA CAAATCCGTG
 1381 ATAATTCCAA TATTTGCGAT TGGTGTGAGT ATATTTGTTA GCTTCAGCTT TGCTGCCATG

[0076]

1441 TACGGTGTAG CAGTTGCTGC ACTAGGGATG CTAAGTACCA TCGCAACTGG TTTGGCAATT
 1501 GATGCTTATG GTCCAATCAG TGACAATGCT GGTGGTATTG CTGAGATGGC TGGAAATGAGC
 1561 CACCGCATCC GAGAAAGAAC CGACGCTCTT GACGCCGCTG GAAACACCAC TGCTGCTATC
 1621 GGAAAGGGAT TTGCGATAGG TTCTGCTGCG CTAGTGTTCG TGGCTCTGTT TGGTGCATTT
 1681 GTGAGCCGAG CAGGAATAGA GAGAGTGGAT GTGTTGACAC CAAAGGTAGT GATAGGGTTG
 1741 CTTGTAGGGG CAATGCTTCC ATATTGGTTC TCTGCAATGA CGATGAAGAG CGTGGGAAGT
 1801 GCAGCTCTGA AGATGGTGGG AGAAGTGAGG AGGCAGTTCA ACACCATCCC TGGACTCATG
 1861 GAAGGTACAG CAAAACCAGA CTATGCTACA TGCGTCAAGA TCTCCACTGA TGCTTCCATC
 1921 AAGGAAATGA TTCCTCCCGG TTGCCTTGTC ATGCTTACTC CTCTTATAGT CGGTTTCTTC
 1981 TTCGGTGTTG AGACCTCTC TGGTGTGCTC GCTGGCTCCC TCATCTCCGG TGTTTCAGATT
 2041 GCGATATCTG CATCCAACAC TGGTGGAGCC TGGGACAATG CCAAGAAGTA CATTGAGGCG
 2101 GGAGCATCAG AGCACGCGAG GAGCTTAGGG CAAAAGGGT CAGAGCCACA CAAGGCAGCA
 2161 GTGATAGGTG ACACAATAGG AGACCCCTTG AAGGATACAT CAGGACCGTC CCTTAACATA
 2221 TTGATCAAGC TTATGGCCGT TGAGTCTCTT GTCTTTGCTC CTTCTTTGCG ACTCACGGTG
 2281 GTTTCCTCTT CAACATCTTC TCGTGA

[0077] 实施例3 ThVP1基因的植物表达载体构建

[0078] 选择植物双元表达载体pCAMBIA2300 (购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司) 作为植物表达载体,用Pnos启动子替换NPTII基因含双增强子的35S启动子,以降低NPTII蛋白在植物中的表达。选择35S启动子及Tnos终止子分别作为ThVP1基因的启动子和终止子,具体构建路线见图1。

[0079] 使用引物SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,以植物表达载体pBI121 (购自北京华夏远洋科技有限公司) 为模板扩增Pnos,采用TaKaRa的PrimeSTAR HS DNA聚合酶。50 μ l PCR反应体系:10 μ l 5 \times PS Buffer、3 μ l 2.5mM的dNTP、1.0 μ l pBI121、1.0 μ l PrimeSTAR、10 μ M的引物SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13各2.0 μ l、以及31 μ l的双蒸水。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5min,33个循环(94 $^{\circ}$ C变性30s,56 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s),72 $^{\circ}$ C延伸10min。通过EcoRI、BglIII酶切将所得的PCR产物按试剂盒说明(Promega,T4连接酶试剂盒)连接到pCAMBIA2300获得pCAMBIA2300-1。

[0080] SEQ ID NO:12:

[0081] GCACGAATTCGGCGGGAAACGACAATCTGA

[0082] SEQ ID NO:13:

[0083] ATCCAGATCTAGATCCGGTGCAGATTATTTG

[0084] 用引物SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15以pBI121为模板扩增Tnos,采用TaKaRa的PrimeSTAR HS DNA聚合酶。50 μ l PCR反应体系:10 μ l 5 \times PS Buffer、3 μ l 2.5mM的dNTP、1.0 μ l pBI121、1.0 μ l PrimeSTAR、10 μ M的引物SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15各2.0 μ l、以及31 μ l的双蒸水。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5min,33个循环(94 $^{\circ}$ C变性30s,58 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s),72 $^{\circ}$ C延伸10min。通过KpnI、EcoRI酶切将所得的PCR产物连接(Promega T4连接酶试剂盒)到pCAMBIA2300-1获得pCAMBIA2300-2。

[0085] SEQ ID NO:14:

[0086] AAGGGTAACGAATTTCCCCGATCGTTCAAA

[0087] SEQ ID NO:15:

[0088] TCAGAATTCCCAGTGAATTCCCGATCTAGTA

[0089] 用引物SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17以pCAMBIA2300为模板扩增35S启动子。采用TaKaRa的PrimeSTAR HS DNA聚合酶。50 μ l PCR反应体系:10 μ l 5 \times PS Buffer、3 μ l 2.5mM的dNTP、1.0 μ l pCAMBIA2300、1.0 μ l PrimeSTAR、10 μ M的引物SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17各2.0 μ l、以及31 μ l双蒸水。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5min,33个循环(94 $^{\circ}$ C变性30s,58 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s),72 $^{\circ}$ C延伸10min。通过HindIII、SalI酶切将所得的PCR产物连接(连接方法同上)到pCAMBIA2300-2获得pCAMBIA2300-3。

[0090] SEQ ID NO:16:

[0091] ACTAAGCTTTAGAGCAGCTTGCCAACATGGTG

[0092] SEQ ID NO:17:

[0093] TGAGTCGACAGAGATAGATTTGTAGAGAGAGACT

[0094] 用引物SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19扩增ThVP1编码基因的全长序列(模板是实施例2所获得阳性ThVP1-pGEM质粒),采用TaKaRa的PrimeSTAR HS DNA聚合酶。50 μ l PCR反应体系:10 μ l 5 \times PS Buffer、3 μ l 2.5mM的dNTP、1.0 μ l ThVP1-pGEM、1.0 μ l PrimeSTAR、10 μ M的引物SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19各2.0 μ l、以及31 μ l双蒸水。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5min,33个循环(94 $^{\circ}$ C变性30s,58 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸2min),72 $^{\circ}$ C延伸10min。通过SalI、KpnI酶切将所得的PCR产物连接(连接方法同上)到pCAMBIA2300-3,获得植物表达载体35S-ThVP1-2300(图2)。

[0095] SEQ ID NO:18

[0096] ACTGTCGACATGATGGCGA AGGCGTTGTT AC

[0097] SEQ ID NO:19

[0098] ACTGGTACCTCACGAGAAG ATGTTGAAGA GG

[0099] 实施例4 35S-ThVP1-2300表达载体转化农杆菌

[0100] 农杆菌LBA4404(购自Biovector Science Lab, Inc)感受态细胞的制备:提前1-2天将农杆菌LBA4404在含50 μ g/ml利福平和50 μ g/ml链霉素的LB固体培养基上划单斑接种,28 $^{\circ}$ C培养1至2天。挑取单菌落接种于5ml含50 μ g/ml利福平和50 μ g/ml链霉素的LB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C下摇动培养过夜(约12-16小时)至OD₆₀₀值为0.4,形成种子菌液。取5ml培养活化后的菌液(1:20的比例)接种于100ml含50 μ g/ml利福平和50 μ g/ml链霉素的LB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C摇动培养2-2.5小时至OD₆₀₀=0.8。冰浴菌液10min,每隔3min摇匀一次,令所述细菌均匀进入休眠状态。于4 $^{\circ}$ C下4000g离心10min,弃上清液;加入一定量冰预冷的10%甘油(体积比)重悬浮菌体,4 $^{\circ}$ C下4000g离心10min,收集沉淀;用冰预冷的10%甘油(体积比)重复洗3-4次;然后加入适量冰预冷的10%甘油(体积比)重新悬浮细菌沉淀,即制得LBA4404感受态细胞,以40 μ l/管将其分装,于-70 $^{\circ}$ C保存备用。

[0101] 转化农杆菌:在冰上融化所述的感受态细胞,向40 μ l的感受态细胞中加入1 μ l实施例3获得的35S-ThVP1-2300的质粒,混匀后冰浴约10min。将感受态细胞和35S-ThVP1-2300质粒DNA的混合物用移液枪转移到冰预冷的电击杯(购自bio-rad)中,轻敲使悬浮液到达电击杯底部,注意不要有气泡。将所述电击杯放到电击室的滑道上,推动滑道将电击杯放至电

击室基座电极处。使用0.1cm规格的电击杯的时候, MicroPulser (购自bio-rad) 的程序设置为“Agr”, 电击一次。立即取出电击杯, 加入28℃预热的LB培养基。快速而轻柔的用移液枪将感受态细胞打匀。将悬浮液转入1.5ml的离心管, 在28℃以225rpm摇动培养1小时。取100-200μl的菌液涂布于相应的抗性筛选培养基平板上 (LB固体培养基, 含50μg/ml利福平、50μg/ml链霉素、50μg/ml卡那霉素), 28℃培养。筛选阳性转化克隆, 并将其菌液于-70℃保存备用。

[0102] 实施例5 受体材料拟南芥培养

[0103] 选择吸水性好, 土质松软的蛭石配合营养土 (1:1) 作为拟南芥种植土壤。直径9cm的花盆, 每盆播种20-30颗。播种以后在花盆上罩上薄膜, 给植株的生长提供一个湿润的环境。恒温22℃, 光照强度3500-4000lx, 光照周期为12小时黑暗、12小时光照培养, 每7天浇灌一次1/2MS, 培养30天后, 保留4-5棵植株, 光照周期调整为8小时黑暗、16小时光照培养, 待大部分植株都抽薹之后, 在花序基部剪掉整个主苔, 去其顶端优势, 约1周后在腋芽部位长出4-6个新生侧苔, 待侧苔花序形成花蕾并部分开花或形成1-2个角果时, 便可用于转化 (图3)。

[0104] 实施例6 拟南芥花浸转化:

[0105] 将实施例4获得的已转化表达载体的农杆菌菌液接种至含有10-50μg/ml卡那霉素 (kan) 的LB培养基中培养过夜, 第二天早上按1:50接种至含有抗生素的新的LB培养基中 (1L), 培养约8个小时, 农杆菌液OD600应当在1.0到1.2之间。室温5000rpm离心5分钟, 弃上清, 将农杆菌沉淀悬浮于一定体积的渗透培养基里 (1/2MS, 5%蔗糖; 用KOH调至pH5.7; 0.02% Silwet L-77), 使OD600在0.8左右。将实施例5所述用于转化的拟南芥的上部缓缓、螺旋式浸入接种培养基内, 轻轻顺时针晃动, 约2分钟, 用透明塑料罩盖严以保持湿度, 放入温室过夜。24小时后移去塑料透明罩, 用水浇透。之后2-3周, 保证植株水分充足。当植株停止开花, 第一个果荚成熟变黄时, 用纸袋套住, 当纸袋内的所有果荚变黄后, 停止浇水, 1-2周干燥后取回实验室, 进行转化子选择, 同时取未经转化处理的拟南芥果荚作为对照。

[0106] 实施例7 拟南芥阳性转化子的筛选:

[0107] 种子消毒: 先用70%乙醇浸泡10分钟, 在上述处理时要不时地使种子悬浮; 然后用无菌水洗四次, 在这步处理时最好也不时地使种子悬浮。处理后的种子均匀涂布在含50μg/ml卡那霉素的1/2MS固体筛选培养基表面上春化2天 (一块150mm直径的平皿最多播种1500棵), 恒温22℃, 光照强度3500-4000lx, 光照周期为12小时黑暗、12小时光照培养, 培养7-10天。根据生长状况判断是否为转基因种子。成功转入重组质粒的种子能够在抗性培养基上正常生长出4片以上真叶。非转基因种子不能正常生长, 仅能长出2片子叶, 根的生长也受到严重抑制, 一般萌发10天以后死亡。转基因种子在MS+kan平板上萌发2周以后, 将阳性植株转入土壤继续培养, 转基因拟南芥用SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19做PCR检测, 去除阴性植株, 收集阳性植株种子, 标号: T0b1-T0b27。

[0108] 实施例8 过表达ThVP1的转基因拟南芥T1代植株的种植

[0109] 选择吸水性好, 土质松软的蛭石配合营养土 (1:1) 作为拟南芥种植土壤。T0b1-T0b20每个转化子播种2盆, 对照拟南芥播种2盆, 每盆播种20-30颗种子。播种以后在花盆上罩上薄膜, 给植株的生长提供一个湿润的环境。恒温22℃, 光照强度3500-4000lx, 光照周期为12小时黑暗、12小时光照培养, 每7天浇灌一次1/2MS, 培养25天后, 转基因拟南芥用SEQ

ID NO:18和SEQ ID NO:19做PCR检测,去除阴性植株,保留12-14阳性棵苗,继续培养10天后,选取大小一致的转基因拟南芥、对照拟南芥做耐盐实验,每盆保留大小较一致的7-9棵苗。

[0110] 实施例9 过表达ThVP1的转基因拟南芥T1代植株的耐盐实验

[0111] 转基因拟南芥、对照拟南芥各一盆不作处理,正常浇灌1/2MS,转基因拟南芥、对照拟南芥各一盆浇灌含有150Mm NaCl的1/2MS,恒温22℃,光照强度3500-4000lx,12小时光培养/12小时暗培养循环。10天后观察实验结果:T1代转基因植株(T0代转基因植株的种子长成的植株)的耐盐性鉴定表明,T1b7、T1b10、T1b15三个株系表现出明显的耐盐性(见图4,以T1b7例,T1b10、T1b15的结果与其类似,在此未示出)。

[0112] 实施例10 在转录水平上验证ThVP1基因的表达

[0113] 实施例9中耐盐好的T1代转基因植株中随机选取8棵(分别属于上述三个耐盐株系),实施例9中对照植株随机选取4棵,各剪取盐处理14天的叶片0.05g,用植物RNA提取试剂盒(Invitrogen)提取总RNA。紫外分光光度测定总RNA在260nm和280nm的吸光度值,计算各个RNA浓度。依照Invitrogen反转录试剂盒SuperScript III Reverse Transcriptase所示方法进行反转录(1μg总RNA作为模板,反转录引物SEQ ID NO:11)。通过SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:20(SEQ ID NO:20:AGCACCAAGA GACCGTTTGC TG)扩增ThVP1,检测其转录情况。采用TaKaRa的PrimeSTAR HS DNA聚合酶,以上述反转录的cDNA为模板进行PCR反应。50μl PCR反应体系:10μl 5×PS Buffer、3μl 2.5mM的dNTP、2.0μl cDNA、1.0μl PrimeSTAR、10μM的引物SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:20各2.0μl以及30μl的双蒸水。PCR反应条件:94℃预变性5min,32个循环(94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸1min),72℃延伸10min。产物电泳结果如图5所示:M为DNA Ladder Marker(DL2000,购自深圳瑞真生物技术有限公司),1-4为不耐盐的对照拟南芥植株,13为质粒PCR阳性对照(35S-ThVP1-2300质粒),5-12为耐盐T1代转基因拟南芥植株。图中所示条带大小与阳性对照的大小一致(约为600bp)。结果表明,耐盐T1代转基因拟南芥植株中ThVP1的转录较强,不耐盐对照拟南芥植株中没有ThVP1的转录。

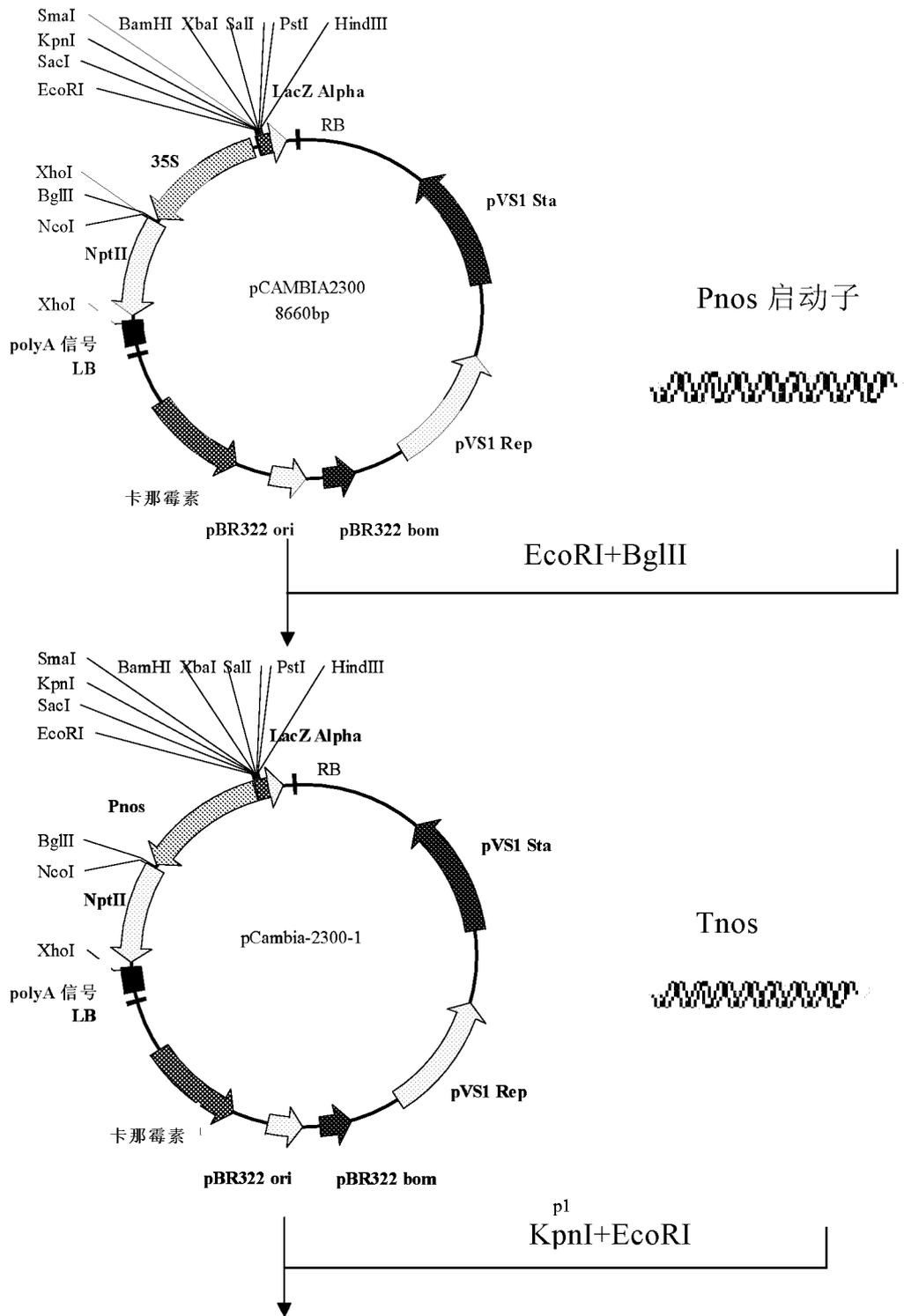


图1a

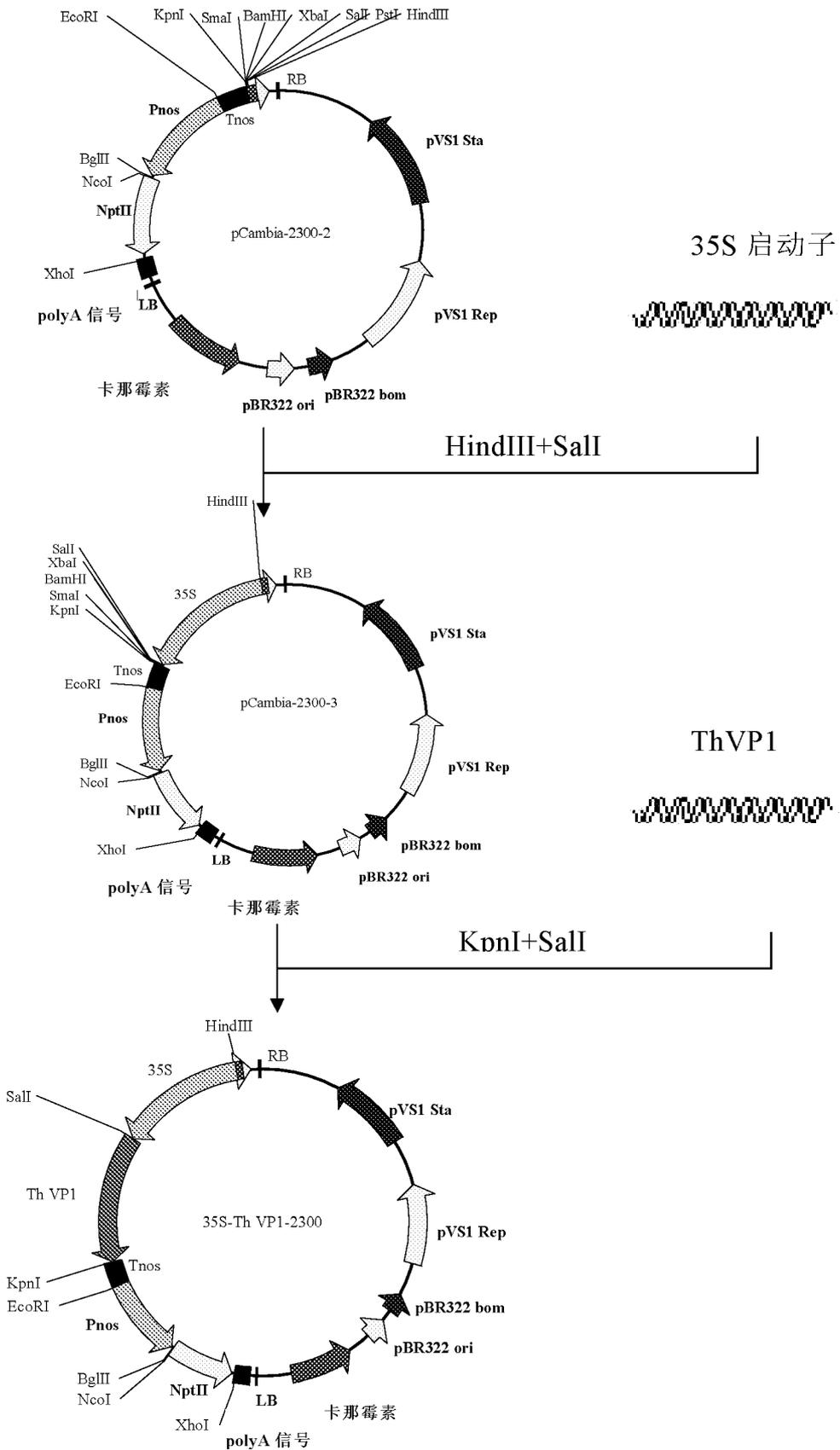


图1b

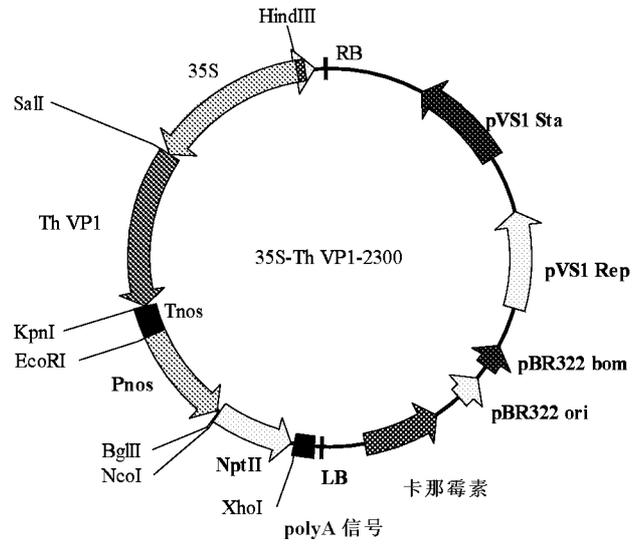


图2



图3

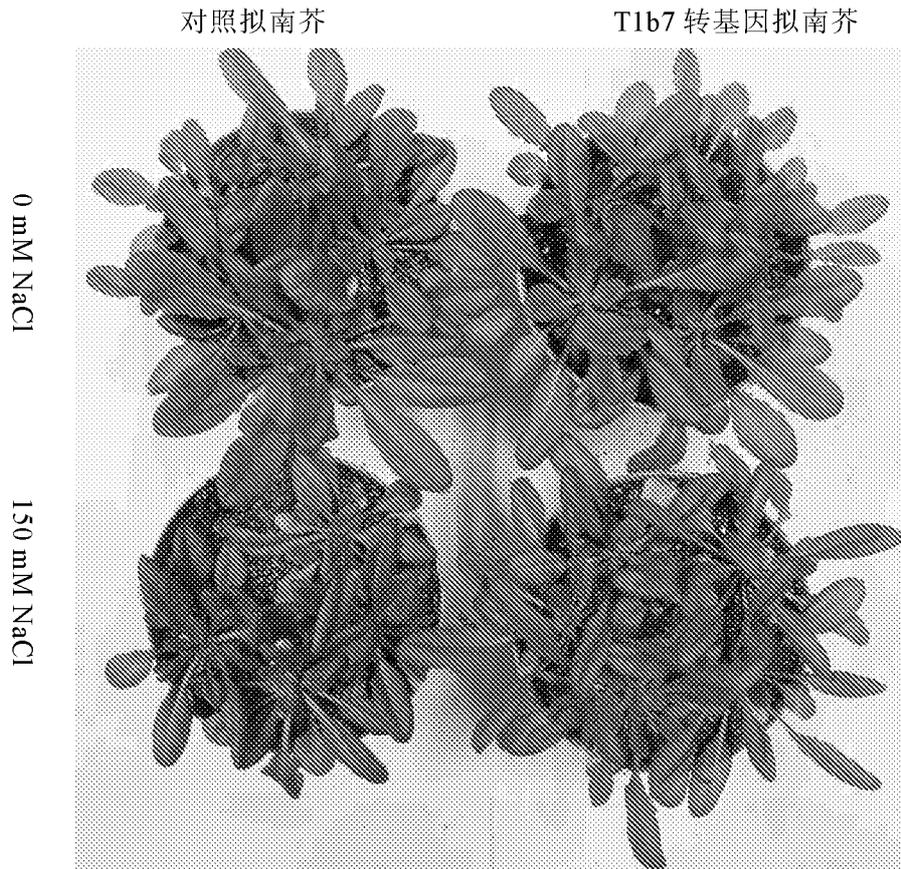


图4

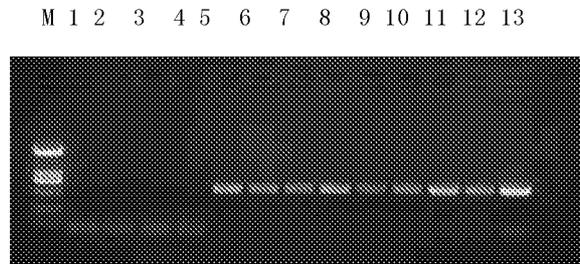


图5