

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利说明书

(10) 申请公布号 CN 101607989 A

(43) 申请公布日 2009. 12. 23

(21) 申请号 CN200810115352. 6

(22) 申请日 2008. 06. 20

(71) 申请人 中国科学院遗传与发育生物学研究所

地址 100101 北京市朝阳区安外大屯路中国科学院遗传与发育生物学研究所

(72) 发明人 程祝宽 黄健 李明 唐丁

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅

(51) Int. CI

C07K14/415

C12N15/29

C12N15/63

C12N15/11

C12N5/10

C12N1/15

C12N1/19

C12N1/21

C12N15/82

A01H1/00

A01H5/00

权利要求说明书 说明书 幅图

(54) 发明名称

一种水稻矮化相关蛋白及其编码基
因与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种水稻矮化相关蛋白及其编码基因与应用。该蛋白，是如下 a)或 b)的蛋白：a)由序列表中序列 3 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；b)在序列表中序列 3 所示的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸且与水稻矮秆相关由 a)衍生的蛋白质。本发明同时还提供了编码该蛋白的基因，以及含有所述基因的重组表达载体、转基因细胞系或重组菌。利用所述基因可以培育株高降低的水稻。本发明的与水稻矮化相关的蛋白及其编码基因对缩短育种年限，提高育种效率、丰富水稻矮源具有极其重要的价值。

法律状态

法律状态公告日	法律状态信息	法律状态
---------	--------	------

权 利 要 求 说 明 书

1、一种蛋白，是如下 a)或 b)的蛋白：

a)由序列表中序列 3 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；

b)在序列表中序列 3 所示的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸且与水稻矮化相关由 a)衍生的蛋白质。

2、权利要求 1 所述蛋白的编码基因。

3、根据权利要求 2 所述的基因，其特征在于：所述编码基因是如下 1)至 5)任一所述的基因：

1)其核苷酸序列是序列表中序列 1 所示的 DNA 分子；

2)其核苷酸序列是序列表中序列 2 所示的 DNA 分子；

3)其编码序列是序列表中序列 2 自 5 末端第 137-1213 位所示的 DNA 分子；

4)在严格条件下可与序列表中序列 1 或 2 限定的 DNA 序列杂交且编码上述与水稻矮化相关蛋白的 DNA 分子；

5)与 1)或 2)或 3)的基因具有 90%以上的同源性，且编码上述与水稻矮化相关的 DNA 分子。

4、含有权利要求 2 或 3 所述基因的重组表达载体。

5、根据权利要求 4 所述的重组表达载体，其特征在于：所述重组表达载体为在 pCAMBIA1300 载体的多克隆位点插入权利要求 2 或 3 所述的基因获得的重组表达载体。

6、扩增权利要求 2 或 3 所述基因全长或任一片段的引物对。

7、含有权利要求 2 或 3 所述基因的转基因细胞系或重组菌。

8、一种培育株高降低的水稻的方法，是将含有权利要求 2 或 3 所述基因导入植物细胞中，获得株高降低的转基因水稻。

9、一种培育株高降低的水稻的方法，是将权利要求 8 中所述的株高降低的水稻与需要改良的高秆水稻品种杂交，然后再与亲本回交的方法获株高降低的水稻。

说明书

技术领域

本发明涉及一种水稻矮化相关蛋白及其编码基因与应用。

背景技术

赤霉素(GibberellinGA)是人们发现的第一种植物激素类物质,它是一类四环二萜羧酸化合物。至今已在植物和真菌中发现了126种赤霉素类物质,但仅有少数几种GAs(GA1, GA4, GA3和GA7)具有生理活性。GA是一类重要的植物激素,参与植物生长发育的各个过程如种子萌发,茎的伸长,叶片生长,花粉成熟和花的诱导和发育。植株的矮化是植物的重要特征,由于它抗倒伏性强,同时矮秆植物可以降低营养生长,将光合产物更多的运输到生殖器官,提高产量。因此,矮秆作物常被育种时选择利用,通过将矮秆基因引入小麦和水稻作物,培育出了粗壮、矮秆、抗倒伏的新品种,这在上世纪60-70年代曾带来了农业上的绿色革命。近年来,人们对植物矮化突变体研究时发现,植物的矮化多半是由于GA合成代谢途径或信号转导途径相关的基因突变引起。引起水稻绿色革命的矮秆基因semi-dwarf1(sd1)就是GA合成途径中编码GA2氧化酶的基因突变形成。

目前有关GA合成及信号转导途径的研究比较多,而相比较而言,GA分解(代谢)相关基因研究相对滞后,但近来的研究表明,GA分解相关酶对维持植物体内GAs动态平衡非常重要。目前研究比较多的是催化活性GA分子失活的酶GA2 β 羟化酶(GA2 β -hydroxylase GA2ox),它催化C-2的 β 位发生羟基化,从而使活性GA分子失活。GA2氧化酶基因在植物基因组中一般也是以小基因家族形式存在的,在拟南芥中已经分离到8个GA2氧化酶基因。豌豆的sln是一个PsGA2氧化酶1基因的突变体,它的表型与GA过量处理的茎秆细长表型相似(Martin et, a1999; Lester et, a1999)。在拟南芥中两个GA2氧化酶基因(AtGA2ox7, AtGA2ox8)过量表达都引起植株矮化和晚花。Victor等(2003)报道,由于35S增强子的插入激活而

导致杨树中的 GA2 氧化酶基因的过量表达，进而引起杨树矮化，且这一矮化效应表现为显性。目前在水稻中已有 4 个 GA2 氧化酶基因被克隆 (OsGA2ox1, OsGA2ox2, OsGA2ox3, OsGA2ox4)，且四个基因在水稻中的都有不同表达模式，OsGA2 氧化酶 1 的过表达同样引起水稻植株的矮秆和花器官发育迟缓。

发明内容

本发明的目的是提供一种水稻矮化相关蛋白及其编码基因与应用。

本发明所提供的水稻矮化相关蛋白，命名为 OsGA20X5，来源于水稻，是如下 a)或 b)的蛋白：

a)由序列表中序列 3 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

b)在序列表中序列 3 所示的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸且与水稻矮化相关由 a)衍生的蛋白质。

其中，序列表中序列 3 由 358 个氨基酸残基组成。

为了使 a) 中的 0sGA20X5 便于纯化, 可在由序列表中序列 3 所示的氨基酸序列组成的蛋白质的氨基末端或羧基末端连接上如表 1 所示的标签。

表 1.标签的序列

标签
残基
序列
Poly-Arg
通常5个
RRRRR
Poly-His
通常为6个

个)	HHHHHH	FLAG	8
	DYKDDDDK	Strep-	
tag II	8	WSHPQFEK	c-
myc	10	EQKLISEEDL	

上述 b)中的 0sGA20X5 可人工合成，也可先合成其编码基因，再进行生物表达得到。上述 b)中的 0sGA20X5 的编码基因可通过将序列表中序列 2 的 5'末端第 137-1213 位所示的 DNA 序列中缺失一个或几个氨基酸残基的密码子，和/或进行一个或几个碱基对的错义突变，和/或在其 5'端和/或 3'端连上表 1 所示的标签的编码序列得到。

编码所述 0sGA20X5 的基因也属于本发明的保护范围。

0sGA20X5 编码基因是如下 1)至 5)任一所述的基因：

- 1)其核苷酸序列是序列表中序列 1 所示的 DNA 分子；
- 2)其核苷酸序列是序列表中序列 2 所示的 DNA 分子；
- 3)其编码序列是序列表中序列 2 自 5'末端第 137-1213位所示的 DNA 分子；
- 4)在严格条件下可与序列表中序列 1 或 2 限定的 DNA 序列杂交且编码上述与水稻矮化相关蛋白的 DNA 分子；
- 5)与 1)或 2)或 3)的基因具有 90%以上的同源性，且编码上述与水稻矮化相关蛋白的 DNA 分子。

所述步骤 5)中的基因，与 1)或 2)或 3)的基因最好有 95%以上的同源性。

序列表中的序列 1 由 3301 个碱基组成，包含三个外显子，两个内含子，其编码序列为自 5 端第 1 位至 489 位，第 2535 位至 2877 位，第 3058 位至 3301 位脱氧核苷酸，同源比对结果显示该基因与拟南芥 GA2 氧化酶基因高度同源。OsGA20x5 基因的 cDNA 序列如序列表中序列 2 所示，序列表中序列 2 由 1421 个碱基组成，序列 2 自 5 末端第 137-1213 位为编码序列，编码序列表中序列 3 所示的蛋白。

上述严格条件可为在 6×SSC，0.5%SDS，5×Denhardt，100ug/ml 鲑鱼精 DNA 的溶液中，在 65℃ 下杂交，然后用 2×SSC，0.1%SDS 和 1×SSC，0.1%SDS 各洗膜一次。

扩增上述 OsGA20x5 基因全长或任一片段的引物对也属于本发明的保护范围。

含有上述水稻株高相关蛋白编码基因的重组载体、转基因细胞系和重组菌也属于本发明的保护范围。

可用现有的植物表达载体构建含有 OsGA20x5 基因的重组表达载体。所述植物表达载体包括双元农杆菌载体和可用于植物微弹轰击的载体等，如 pCAMBIA3301、pCAMBIA1300、pBI121、pBin19、pCAMBIA2301、pCAMBIA1301-UbiN 或其它衍生植物表达载体。携带有本发明的水稻株高相关蛋白编码基因 OsGA20x5 的植物表达载体可通过 Ti 质粒、Ri 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、显微注射、电导、农杆菌介导等常规生物学方法转化到植物细胞或组织中。所述植物包括但不限于水稻、小麦、高粱、谷子、玉米、甘蔗、牧草、烟草、油菜、大白菜、小白菜、甘蓝、番茄、黄瓜、甜瓜、西瓜、辣椒、棉花、苜蓿。被转化的宿主植物优选为水稻。

使用 OsGA20x5 基因构建重组植物表达载体时，在其转录起始核苷酸前可加上任何一种增强型、组成型、组织特异型或诱导型启动子，如花椰菜花叶病毒

(CAMV) 35S 启动子、泛生素基因 Ubiquitin 启动子 (pUbi) 等, 它们可单独使用或与其它植物启动子结合使用; 此外, 使用本发明的 OsGA20x5 基因构建植物表达载体时, 还可使用增强子, 包括翻译增强子或转录增强子, 这些增强子区域可以是 ATG 起始密码子或邻接区域起始密码子等, 但必需与编码序列的阅读框相同, 以保证整个序列的正确翻译。所述翻译控制信号和起始密码子的来源是广泛的, 可以是天然的, 也可以是合成的。翻译起始区域可以来自转录起始区域或结构基因。

为了便于对转基因植物细胞或植物进行鉴定及筛选, 可对所用植物表达载体进行加工, 如加入可在植物中表达可产生颜色变化的酶或发光化合物的基因 (GUS 基因、萤光素酶基因等)、具有抗性的抗生素标记物 (庆大霉素标记物、卡那霉素标记物等) 或是抗化学试剂标记基因 (如抗除草剂基因) 等。

本发明的另一个目的是提供一种利用 OsGA20x5 基因培育株高降低的水稻的方法。

本发明所提供的株高降低的水稻的方法, 是将含有 OsGA20x5 基因的重组表达载体导入植物细胞中, 获得株高降低的转基因水稻; 也可利用转 OsGA20x5 基因的株高降低的水稻, 通过经典杂交优化植株株高, 即通过转 OsGA20x5 基因的株高降低的水稻植株与需要改良的高秆品种杂交, 然后再与亲本回交的方法获得株高降低的水稻。

本发明克隆了 OsGA20x5 基因, 并且将构建的含有 OsGA20x5 基因的植物表达载体导入水稻中, 获得 OsGA20x5 基因过量表达的矮秆转基因植株, 且矮秆表型为显性; 而目前生产上所用的矮化基因都是隐性基因如 sd1 基因, 获得纯合的矮秆品种需要较长的时间。OsGA20x5 基因为育种工作提供新型矮源。本发明的与水稻矮化相关的蛋白及其编码基因对缩短育种年限, 提高育种效率、丰富水稻矮源具有极其重要的价值。

附图说明

图 1 为野生型武香粳 9983 和武香粳 9983 的显性矮秆突变体 DD1 的表型

A：左边为野生型武香粳 9983，右边为矮秆突变体 DD1；B：野生型武香粳 9983 与矮秆突变体 DD1 各节间对比，左边四个为野生型武香粳 9983 对应节间，右边四个为矮秆突变体 DD1 对应节间；

图 2 为矮秆突变体 DD1 和野生型武香粳 9983 中 OsGA20x5 基因的表达分析 A：半定量 PCR；B：Real-time PCR

图 3 为转空载体 pCAMBIA1300 的武香粳 9983 植株和 OsGA20X5 基因过表达植株的表型

左边为转空载体 pCAMBIA1300 的武香粳 9983 植株，右边为 OsGA20X5 基因过表达植株。

图 4 为野生型武香粳 9983，矮秆突变体 DD1 和 OsGA20X5 基因过表达植株中 OsGA20x5 基因的 Real-time PCR 表达分析。

图 5 为 OsGA20X5 基因在水稻不同组织中的表达特性

1：胚芽鞘；2：根；3：小苗；4：叶片；5：倒二茎；6：穗下茎；7：穗子。

<mode-for-invention><p>具体实施方式

以下实施例中的方法如无特殊说明均属常规方法。

实施例 1、水稻 OsGA20X5 基因的获得

a)水稻显性矮秆突变体 DD1 获得及其遗传分析

野生型武香粳 9983 由江苏省明天种业有限公司提供。

在以粳稻品种武香粳 9983 为转化亲本的转基因 T₀代植株中筛选到一株矮秆突变体，编号为 GN42 ，收获 T₀代种子，T₀代种子种植后长成 T₁代植株，观察并记录 T₁代植株的表型及分离比。结果表明突变体 T₁代从分蘖期开始呈现 1：3 的高矮分离，矮化性状与转基因抗性选择标记基因潮霉素基因共分离，说明这一矮秆性状是可遗传的。对 T₂代植株进行进一步的遗传分析，T₂代植株中高秆植株与矮秆植株的比例仍为 1：3，符合一对单基因控制性状的遗传表现，且该突变为—显性突变。选择纯合矮秆植株进行下一步的遗传分析。

将 GN42 自交后代纯合的矮秆突变体与龙特甫进行测交，所得 F1 表现为矮秆，初步说明矮秆突变性状为显性。其 F2 代群体在株高上出现明显的分离，分离出矮秆和正常株高 2 种类型，在调查的 522 株中，有 388 株表现为矮秆，134 株表现为正常株高，符合一对等位基因 3：1 的分离比例(表 1)，这一结果进一步表明该突变体的矮秆性状受一对显性基因控制，将该编号为 GN42 的水稻命名为水稻突变体 DD1 。

表 1 测交后代群体 (F2)的分离

表 1 中 $P<0.05$ ， $\chi^2=3.84$

野生型水稻品种武香粳 9983 为江苏武进农科所育成的优质粳稻品种，株高 90-95 厘米，显性矮秆突变体 DD1 是在以武香粳 9983 作为转基因受体的转基因后代中发

现的，矮秆表型与转基因抗性选择标记基因潮霉素连锁，矮秆突变体 DD1 植株株高 45-50 厘米。图 1A 左边为野生型水稻品种武香粳 9983，右边为显性矮秆突变体 DD1；图 1B 为野生型与突变体 DD1 各茎节的对比图，图中可看出与对照相比，突变体 DD1 各个节间均明显缩短。突变体 DD1 与野生型除了在株高上有显著差别外，生育期，产量均无明显差异。

b)水稻 OsGA20X5 编码基因的获得

矮秆表型与 T-DNA 共分离，因此，采用了 Tail-PCR 技术以获得 T-DNA 插入位置的旁侧序列。

TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR) 叫热不对称交错 PCR，这一技术能有效地分离与已知 DNA 序列邻近的未知序列，TAIL-PCR 技术简单易行，反应高效灵敏，产物的特异性高，重复性好，能够在较短的时间内获得目标片段，已经成为分子生物学研究中的一种实用技术。经改良过的 TAIL-PCR 能成功地从突变体中克隆到外源插入基因的旁侧序列，从而为基因克隆提供了有效的新方法。

以水稻突变体 DD1 的基因组 DNA 为模板，根据已知插入序列设计巢式引物 DDT-1、DDT-2 和 DDT-3 进行 PCR 反应，DDT-1、DDT-2 和 DDT-3 的引物序列如下：

DDT-1 : 5'-TACACAAATCGCCCGCAGAA- 3',

DDT-2 : 5'-CCGAGGGCAAAGAAATAGAG- 3',

DDT-3 : 5'-TCCTATAGGGTTTCGCTCAT- 3'。

另外设计三条随机引物 AD-1、AD-2 和 AD-3，AD-1、AD-2 和 AD-3 的引物序列如下：

AD- 15'-AGTGNAGAANCAAAGG- 3',

AD- 25'-TCGTNCGNACNTAGGA- 3',

AD- 35'-NTCGASTWTSGWGTT- 3',

反应体系 25 μ l 反应程序参照 (Liu Y G等,

Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-

DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The plant journal* 1995

457-463), 三轮巢式 PCR 后, 产物经 1% 琼脂糖凝胶分离, 采用 OMEGA 胶回收试

剂盒回收特异条带, 按照 TAKARA PMD18-T 试剂盒推荐程序进行 T-A 克隆, 反应

体系如下:

DNA 片段 4.6 μ l (20ng/ μ l) 载体 0.4 μ l 连接 buffer 5 μ l 总体积 10 μ l 16 度水浴
连接 30 分钟, 转化 DH5a 感受态, 于含有氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆,
挑取阳性克隆进行测序。测序结果表明 T-DNA 插入位置位于一个基因的启动子上

游, 该基因的核苷酸序列如序列表中序列 1 所示, 将其命名为 OsGA20x5 ,
OsGA20x5 基因包含三个外显子, 两个内含子, 其编码序列为自 5' 端第 1 位至 489
位, 第 2535 位至 2877 位, 第 3058 位至 3301 位脱氧核苷酸, 同源比对结果显示该
基因与拟南芥 GA2 氧化酶基因高度同源。OsGA20x5 基因的 cDNA 序列如序列表中
序列 2 所示, 序列表中序列 2 由 1421 个碱基组成, 序列 2 自 5' 末端第 137-1213 位
为编码序列, 编码序列表中序列 3 所示的蛋白。

由于 T-DNA 区含有一个 35S 的增强子, 因此, 矮化表型可能是由于 OsGA20x5 基
因过量表达引起, 因此对 OsGA20x5 基因进行表达分析。突变体 DD1 和野生型的
叶片总 RNA 提取采用 QIAGEN 公司 RNA 提取试剂盒, 以 oligo d 为引物, 按
promega 公司的反转录试剂盒所述方法反转录成 cDNA , 以 OsGA20x5 基因编码区
特异引物 RTGA2-174-F 和 RTGA2-174-R 进行半定量 PCR 和 Real-time PCR 以

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/478065060040006106>