

用双顺反子基因表达的生物合成 β -胡萝卜素的融合多核苷酸以及用其生产 β -胡萝卜素的方法

专利名称：用双顺反子基因表达的生物合成 β -胡萝卜素的融合多核苷酸以及用其生产 β -胡萝卜素的方法

技术领域：

本发明涉及用多顺反子基因共表达的生物合成 β -胡萝卜素的融合多核苷酸以及用其生产 β -胡萝卜素的方法。更具体地，它涉及一种编码八氢番茄红素合酶、FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点 (IRES) 的连接序列和胡萝卜素去饱和酶的融合多核苷酸，以及用该方法生产胡萝卜素的方法。

背景技术：

随着分子生物学技术的发展，已经开发了多种基因工程方法以生产有用的代谢物质并且将所述物质修饰为有效形式。在实践中，已完成了许多有关植物代谢工程和植物分子农事的研究。所述植物代谢工程利用植物作为媒介，所述植物分子农事生产来自非植物的高附加值非植物可食用疫苗和来自植物用于药用等的重组蛋白。然而，存在各种技术困难并且研究结果也不成功。尤其为了调控代谢过程，可在一定条件下同时表达若干基因。目前，在本领域中刚开始尝试使用烟草报告子基因的模型研究。与原核生物相比，调控真核生物如植物和动物中的多顺反子基因表达较为困难。真核生物具有通过单顺反子 mRNA 机制从一个启动子只表达一个

基因的特性。通常，农杆菌 (*Agrobacterium*) 用于通过插入 T-DNA 来转化植物。在这种情况下，通常进行 (1) 在一个 T-DNA 中引入多个盒；(2) 农杆菌的共转化；(3) 转化体之间的有性杂交；和 (4) 将多顺反子基因插入到盒中，以同时引入和表达多顺反子基因。精确地，在一个 T-DNA 中引入多个盒的方法被普遍使用。不幸的是，用一个 T-DNA 载体很难表达两个以上的不包括选择性标记基因的目标基因，因为用于转化的盒的总数仅限于 3 或 4。此外，当进行所述农杆菌介导的共转化时，每个 T-DNA 均应具有不同的选择性标记以选择转化体。在这种情况下，所述选择性标记可为一种阻碍植物转化的限制性因素。因此，这种方法对应用领域进行了不利的限制。通过使用转化体之间的有性杂交堆积基因的方法可将每个个体的有用性状收集到一株植物中。然而，这种方法需要消耗很长时间并且难以精确控制结果。此外，在进行代谢工程研究之前已经尝试了将多顺反子基因引入盒并获得对抗应激或疾病的复合抗性的方法。在这种方法中，应用了蛋白表达的真核生物机制从而将真核细胞的特异识别位点引入目标基因之间。

发明内容

技术问题本发明的发明人已经尝试了开发遗传工程植物。发明人已经通过使用多顺反子基因表达技术生产了可表达具有生物活性的胡萝卜素的融合多核苷酸和含有该融合基因

的重组载体。通过使用所述融合多核苷酸和所述重组载体，发明人还在水稻中开发了生产营养 β -胡萝卜素的植物转化体，尽管天然条件下水稻根本不能表达类胡萝卜素，并且成功地完成了本发明。因此，鉴于上述问题进行了本发明，本发明的一个目标就是提供用于生物合成 β -胡萝卜素的融合多核苷酸及其应用。技术方案为达成本发明的一个目标，本发明提供一种表达八氢番茄红素合酶和胡萝卜素去饱和酶的融合多核苷酸来进行生物合成。为达成本发明的另一个目标，本发明提供一种用于植物转化的包含融合多核苷酸的重组载体。为达成本发明的另一个目标，本发明提供一种被所述重组载体转化的细胞。为达成本发明的另一个目标，本发明提供一种用所述重组载体转化的植物细胞或转化体来生物合成 β -胡萝卜素。为达成本发明的另一个目标，本发明提供一种通过使用用所述重组载体转化的植物细胞或者转化体生产胡萝卜素的方法来生物合成胡萝卜素。以下将更清楚地解释本发明。依照本发明的一个方面，可通过提供编码八氢番茄红素合酶、FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点 (IRES) 的连接序列和胡萝卜素去饱和酶的融合多核苷酸来达成上述和其他目标。优选地，本发明的融合多核苷酸可为 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :42 的 DNA 或 RNA。当所述多核苷酸为 RNA 时，胸腺嘧啶 (T) 可被替换为尿嘧啶 (U)。本发明的多核苷酸可通过任何现有技术公开的化学合成方

法生产。本发明的另一个方面提供含有包含编码八氢番茄红素合酶的多核苷酸 FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点 (IRES) 的连接序列和编码胡萝卜素去饱和酶的多核苷酸的融合多核苷酸的重组载体。通常,胡萝卜素是通过图 2 所述的方法合成的。在一株植物中,类胡萝卜素的基本合成路径包括下列步骤利用八氢番茄红素合酶 (PSY) 将 2 分子的 GGPP (焦磷酸牛龙牛儿基牛龙牛儿酯 (geranylgeranylpyrophosphate)) 聚合成包含 40 个碳 (3 个共轭双键) 的八氢番茄红素; 利用八氢番茄红素去饱和酶 (PDS) 经过两步去饱和生成胡萝卜素 (7 个共轭双键); 然后使用胡萝卜素去饱和酶 (ZDS) 再经过两步去饱和反应; 最后经链孢红素 (9 个共轭双键) 生成番茄红素 (11 个共轭双键)。番茄红素是一种非环状类胡萝卜素的终产物并转化为两种环状胡萝卜素。一种胡萝卜素是使用番茄红素环化酶 (β -LCY) 经过两步反应从 γ -胡萝卜素合成的胡萝卜素。另一种胡萝卜素是使用番茄红素- ϵ -环化酶 (ϵ -LCY) 和 β -LCY 经过合作反应 (cooperative reaction) 分别从 γ -胡萝卜素和胡萝卜素合成的 α -胡萝卜素。然而由于水稻不表达类胡萝卜素生物合成的一种起始酶—八氢番茄红素合酶 (PSY), 因此根本不产生任何种类的胡萝卜素。因此, 本发明人构建了重组载体, 其含有一个启动子, 以及与所述启动子可操作地连接的编码八氢番茄红素合酶的多核苷酸、

FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点(IRES)的连接序列和编码胡萝卜素去饱和酶的多核苷酸。然后,发明人表达了该酶以使用所述重组载体从水稻中大规模生产胡萝卜素。

八氢番茄红素合酶为一种聚合 2 分子 GGPP(焦磷酸牛龙牛儿基牛龙牛儿酯)来产生八氢番茄红素的生物合成酶。在本发明中,公开的任何种类的八氢番茄红素合酶或任何种类的编码该酶的多核苷酸都可被使用。优选地,它们可源自胡椒、番茄、拟南芥(Arabidopsis)、土豆等,更优选地,八氢番茄红素合酶的多核苷酸可为 SEQ ID NO 5 或 SEQ ID NO 6 的核苷酸序列。FMDV(口蹄疫病毒)源的 2A 序列在翻译过程中通过内核糖体“跳跃”机制自加工 [Donnelly et al. ,1991, J. Gen. Virol. , 78, 13-21 ; Ryan et al. ,1991, J. Gen. Virol. , 72, 2727-2732]。优选地,所述 FMDV 源的 2A 序列可含有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列并且编码所述 FMDV 源的 2A 序列的多核苷酸可含有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列。本发明的氨基酸序列和核苷酸序列是对水稻优化的。所述内部核糖体进入位点(IRES)是一种在 mRNA 中间起始翻译的核苷酸序列。优选地,所述 IRES 可具有 SEQ ID NO 31 的核苷酸序列并对应源自 CrTMV (感染十字花科植物的烟草花叶病毒)的衣壳蛋白上游的 150bp。胡萝卜素去饱和酶(CrtI)是一种源自噬夏孢欧文菌(Erwinia aureovora)或菠萝泛菌(Pantoea ananatis)的去饱和酶并且起到两种去饱和酶 PDS 和 ZDS 的作用以将八

氢 番茄红素转化成番茄红素。在本发明中，现有技术公开的任何种类的胡萝卜素去饱和酶或 编码该酶的多核苷酸都可被使用。优选地，所述胡萝卜素去饱和酶可具有 SEQ ID NO:7 的 氨基酸序列并且所述多核苷酸可具有 SEQ ID NO 8 的核苷酸序列。在本发明中，含有八氢番茄红素合酶、FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点的连 接序列和胡萝卜素去饱和酶的融合蛋白可包括所述蛋白的功能等价物。这种功能等价物被 定义为一种具有与八氢番茄红素合酶、FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点的连接序列 和胡萝卜素去饱和酶基本相似的生理活性的多肽。所述“基本相似的生理活性”是以下的 生物活性通过聚合两分子的 GGPP(焦磷酸牛龙牛儿基牛龙牛儿酯)生成八氢番茄红素； 通过一种非蛋白水解机制自加工；以及进入内核糖体并通过 PDS 和 ZDS 将八氢番茄红素转 化成番茄红素。优选地，所述功能等价物可为一种多肽，其与分别对应八氢番茄红素合酶、FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点的连接序列和胡萝卜素去饱和酶的 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO 2 或 SEQ ID NO :31、SEQ ID NO 7 的氨基酸序列具有任意的序列同源性(同一性)。优 选地，所述序列同源性为至少 70 %，更优选至少 80 %，最优选至少 90 %。精确地，所述功能 等价物可包括一种具有 70%、71%、72%、73%、74%、 75%、 76%、 77%、 78%、 79%、 80%、 81 82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91

92%, 93%, 94%, 95%, 96%、97%、98%、99%或 100%的序列同源性的多肽。所述功能等价物可通过部分添加、取代或删除八氢番茄红素合酶、FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点的连接序列和胡萝卜素去饱和酶的氨基酸序列来制备。优选地，所述氨基酸取代是一种保守性取代。例如，氨基酸的保守性取代可在脂肪族氨基酸(Gly、Ala、Pro)、疏水性氨基酸(Ile、Leu、Val)、芳香族氨基酸(Phe、Tyr、Trp)、酸性氨基酸(Asp、Glu)、碱性氨基酸(His、Lys、Arg、Gln、Asn)和含硫氨基酸(Cys、Met)中实现。此外，氨基酸的删除可包括部分删除八氢番茄红素合酶、FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点的连接序列和胡萝卜素去饱和酶的氨基酸序列的修饰。优选地，氨基酸的删除和取代可位于不直接受影响的区域。此外，氨基酸的添加可包括在八氢番茄红素合酶、FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点的连接序列和胡萝卜素去饱和酶的氨基酸序列的两端或者内部添加一个以上氨基酸的修饰。所述功能等价物还包括保持了骨架和生理活性但在化学结构上被部分修饰的多肽衍生物。例如，所述功能等价物包括一种用于改变其稳定性、储存性、挥发性、可溶性或纯度的结构修饰。

在本发明中，可通过使用现有技术公开的任何用于植物转化的基本载体构建含有编码八氢番茄红素合酶、FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点(IRES)的连接序列和胡萝卜素去

饱和酶的融合多核苷酸的重组载体。优选地，可使用二元载体或者共整合载体。多种二元载体被广泛用于植物转化且几乎所有二元载体都是商品化的。它们可从国际组织和大学研究机构如 CAMBIA(The Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture, GPO Box 3200, Canberra ACT2601, Australia)获得。二元载体的基本结构源自 Ti 质粒并用外源基因、启动子和终止子等在左边界和右边界进行了改造。在本发明中，所述重组载体可采用现有技术公开的可在植物中行使功能的任何启动子。编码八氢番茄红素合酶、FMDV 源 2A 序列或内部核糖体进入位点(IRES)的连接序列和胡萝卜素去饱和酶的融合多核苷酸可操作地连接于启动子的下游。所述启动子是一种在特定宿主细胞中调控其下游的基因表达的 DNA 序列。所述可操作的连接是一种当核酸结合时它们相互影响以行使功能或表达其的连接。所述重组载体还可包括任何用于转录调控的操作子序列，编码 mRNA 核糖体结合位点的正确序列和转录及翻译的终止子。优选地，所述启动子可选自水稻内胚乳特异的球蛋白(Glb)启动子、谷蛋白(GT、Glt 或 Glu)启动子、玉米泛素(Ubi)启动子、花椰菜花叶病病毒(CaMV) 35S 启动子、玄参花叶病病毒 35S 启动子、甘蔗杆菌病毒启动子、鸭跖草黄化斑驳病毒启动子、源自核酮糖-1, 5_双-磷酸羧化酶亚基(ssRUBISCO)的光诱导启动子、水稻胞质磷酸丙糖异构酶

(TPI) 启动子、源自拟南芥的腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (APRT) 启动子、水稻肌动蛋白 1 基因启动子、甘露碱合酶启动子和章鱼碱合酶启动子。更优选地，其可为水稻内胚乳特异的球蛋白 (Glb) 启动子。优选地，选择性标记基因可选自但不限于抗生素抗性基因、除草剂抗性基因、代谢相关基因、发光基因、绿色荧光蛋白 (GFP) 基因、葡糖苷酸酶 (GUS) 基因、 β -半乳糖苷酶 (GAL) 基因等。更优选地，其可选自除草剂抗性 Bar 基因、新霉素磷酸转移酶 (NPT II) 基因、潮霉素磷酸转移酶基因、草铵膦乙酰基转移酶 (phosphinothricine acetyltransferase) 基因或去氢叶酸还原酶基因等，并且最优选地，其可为除草剂抗性 Bar 基因。优选地，本发明用于植物转化的重组载体可为图 1 所示的 pGlb-PAC 载体或图 9 所示的 pGlb-PIC 载体。具体地，所述 pGlb-PAC 载体是通过使用 pMJ-103 载体 (从右边界到左边界由 SEQ ID:57 表示) 作为骨架构建，其中 attB1 序列、编码胡椒八氢番茄红素合酶的多核苷酸、FMDV 源 2A 序列的连接序列、编码细菌胡萝卜素去饱和酶的多核苷酸以及 attB2 序列被顺序连接到水稻内胚乳特异的球蛋白 (Glb) 启动子和土豆蛋白酶抑制剂 (KPin II) 的终止子之间。此外，通过将 FMDV 源的 2A 序列替换为内部核糖体进入位点而从 pGlb-PAC 载体构建 pGlb-PIC 载体。在这种情况下，通过使用 pSB11 载体 (Genbank AccessionNo. AB027256) - 一种含有壮观霉素抗性基因的超

二元质粒一作为骨架生成 pMJ-103 载体。pMJ-103 载体是一种整合水稻内胚乳特异的球蛋白 (G1b) 启动子和土豆蛋白酶抑制剂 (KPin II) 终止子的通道载体, 并且在 35S 启动子的下游区域含有除草剂抗性 Bar 基因作为植物选择性标记。上述标准重组 DNA 和分子克隆技术在本领域内是广为人知的, 并在以下文献中被描述 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory :Cold Spring Harbor, NY 1989 ; Silhavy, T. J., Bennis, M. L and Enquist, L. W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory :Cold Spring Harbor, NY, 1984 ; 禾口 Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, published by Greene Publishing Assoc, and Wiley-interscience, 1987)。同时, 在本发明的一个实施方案中, 将本发明的重组载体转化到根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 中, 并将本发明的基因通过所述转化的根癌农杆菌引入植物细胞中。因此, 本发明提供一种被本发明的用于植物细胞转化的载体转化的细胞。所转化的细胞可为但不限于原核宿主细胞, 如农杆菌属 (*Agrobacterium* spp.)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、链霉菌 (*Streptomyces*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)

或葡萄球菌(*Staphylococcus*)；低等真核细胞如真菌(例如曲霉菌(*Aspergillus*)和酵母(例如毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)、粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*))；以及高等真核生物源细胞，包括昆虫细胞、植物细胞和哺乳细胞，优选根癌农杆菌或毛根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)。此外，本发明提供了一种被引入所述载体并产生胡萝卜素的转化的植物细胞。转化的植物细胞可通过现有技术公开的植物转化方法制备。例如，但不限于，通过使用农杆菌属、基因枪轰击、碳化硅晶须、超声处理、电穿孔和PEG(聚乙二醇)沉淀的转化。优选地，可使用农杆菌介导的转化(Horsch et al., *Science* 227 :1229-1231, 1985)。例如，现有技术公开了农杆菌介导的水稻转化(An et al., *EMBO J.*, 4 :227-288, 1985)。本发明的植物细胞可根据任何传统方法培育，包括肉汤培养的细胞、愈伤组织细胞、培养的原生质体以及分化后的植物组织或植物。精确地，可通过使用现有技术公开的标准技术将用所述重组载体转化的植物诱导为愈伤组织、在土壤中生根和分离(refine)，从而再分化为一株植物。所得植物可通过无性和有性生殖两种方法生产。所述无性生殖方法包括扦插、嫁接等，所述有性生殖方法包括播种。所述植物细胞在从母体植物的一部分中分离后在无菌条件下进行培养，然

后进行繁殖。此过程可通过现有技术公开的任何方法实现，包括组织片的肉汤培养、组织片的愈伤组织培养、原生质体培养等。这种培养条件和方法可由本领域技术人员确定。所述植物细胞的分化在可诱导所培养愈伤组织或原生质体分化的合适条件下进行。所得愈伤组织和原生质体可生成植物组织或植物。这种分化条件和方法可由本领域技术人员确定。

本发明的另一个方面提供用所述重组载体转化的重组植物或蘑菇来生成 β -胡萝卜素。

上述植物可包括整株植物、植物的一部分、愈伤组织、植物组织、植物细胞和植物种子。本发明的植物可包括单子叶植物和双子叶植物。所述单子叶植物不限于，但优选地为水稻、小麦、大麦、竹笋、玉米、芋头、芦笋、洋葱、大蒜、大葱、韭葱、野胡蒜、甘薯(yam)和生姜。所述双子叶植物不限于，但优选地为拟南芥、茄子、烟草、胡椒、番茄、牛蒡、茼蒿、莴苣、风铃草、菠菜、泰菜、番薯(sweet potato)、旱芹、胡萝卜、欧合叶子、西芹、白菜、卷心菜、小萝卜、西瓜、甜瓜、黄瓜、南瓜、葫芦、草莓、大豆、绿豆、四季豆、百脉根、土豆、浮萍、青紫苏、木豆、水仙、金盏花和青豆。本发明的另一个方面提供一种生产 β -胡萝卜素的方法，其包括下列步骤(a)将含有本发明的融合多

核苷酸的重组载体引入到细胞中；(b)培养所述细胞或从所述细胞中分化的植物；和(c)从培养后的细胞或植物中分离胡萝卜素。以上清楚地描述了所述重组载体和细胞转化。用所述重组载体转化的细胞分化为一个完整细胞或细胞团如愈伤组织。然后，对其进行培养或者培育以表达整合到所述重组载体中的八氢番茄红素合酶和胡萝卜素去饱和酶。可通过现有技术中公开的任何常规方法，优选地通过使用有机溶剂的萃取方法，从培养的细胞或植物中纯化胡萝卜素。在本发明的一个实施方案中，分离胡椒八氢番茄红素合酶基因和细菌胡萝卜素去饱和酶基因以进行克隆并且通过使用密码子将编码 FMDV 源 2A 序列的核苷酸序列针对水稻进行优化。然后，构造本发明的融合多核苷酸。在本发明的另一个实施方案中，将重组序列(如 attB1 和 attB2)连接到所述融合多核苷酸上并且将其插入到 PD0NR201 载体中。然后用 pMJ-103 载体转化所述融合多肽以构建 pG1b-PAC 载体，其中 pMJ-103 载体由作为骨架的 pSB11 载体、水稻内胚芽特异的球蛋白(G1b)启动子和土豆蛋白酶抑制剂 II(PinII)终止子构成。将 pG1b-PAC 载体引入农杆菌以进行转化。在本发明的另一个实施方案中，将源自 CrTMV (感染十字花科植物的烟草花叶病毒)并对应衣壳蛋白上游的 150bp 的内部核糖体进入位点插入所述胡椒八氢番茄红素合酶基因和细菌胡萝卜素去饱和酶基因之间以构建所述融合多核苷酸。在本发

明的另一个实施方案中，将重组序列(如 attB1 和 attB2)连接到所述融合多核苷酸上并且将其插入 PD0NR201 载体中。然后，用 pMJ-103 载体转化所述融合多肽以构建 pGlb-PIC 载体，其中所述 pMJ-103 载体由作为骨架的 pSB11 载体、Glb 启动子和 PinII 终止子构成。将 pGlb-PIC 载体引入农杆菌以进行转化。在本发明的另一个实施方案中，使用由 pGlb-PAC 载体或 pGlb-PIC 载体转化的农杆菌转化水稻。然后，选择会向单个植物分化的水稻。肉眼观察到所述植物转化体表现出比完整植物的对照组更深的黄色。在本发明的另一个实施方案中，检查了所述植物转化体是否引入了所述融合多核苷酸以及是否合成了类胡萝卜素，并进一步测量了表达的 RNA 水平和蛋白水平。因此，证实了所述融合多核苷酸被正确插入所述转化体，并且在 RNA 和蛋白水平上活跃地表达，从而大量产生类胡萝卜素，尤其是胡萝卜素。有益效果

本发明提供在细胞转化体、重组载体、用所述重组载体转化的重组细胞和植物转化体内稳定表达八氢番茄红素合酶基因和细菌胡萝卜素去饱和酶基因的融合多核苷酸。本发明的融合多核苷酸可用于调控植物生产的胡萝卜素的生物合成代谢。此外，其还可用于有效增加一种有用的代谢物—— β -胡萝卜素的含量。

参考下面附图所示的某些示例性实施方案详细描述本发明

的上述和其他特性，所述示例性实施方案仅出于说明的目的，因此并非对本发明进行限制，并且其中图 1 是 pG1b-PAC 载体的示意图 (LB 左边界；RB 右边界；G1b 水稻内胚芽特异的球蛋白启动子；Psy 源自韩国胡椒栽培品种 NocKwang 的八氢番茄红素合酶基因；st2A 对水稻优化的 2A 序列；Tp 叶绿体靶向导肽；CrtI 细菌胡萝卜素去饱和酶基因；PinII 土豆蛋白酶抑制剂 II 终止子；P35S =CaMV 35S 启动子；Bar 草铵膦乙酰转移酶基因；NOS 胭脂碱合成酶终止子；和 MAR 基质附着区域)；图 2 是类胡萝卜素包括 β -胡萝卜素的一种植物代谢过程 (GGPS 焦磷酸牛龙牛儿基牛龙牛儿酯合酶；PSY 八氢番茄红素合酶；PDS 八氢番茄红素去饱和酶；ZDS ζ -胡萝卜素去饱和酶； β -LCY 番茄红素- β -环化酶； ϵ -LCY 番茄红素- ϵ -环化酶； β -CH β β -胡萝卜素羟化酶； ϵ -CH ϵ ϵ -胡萝卜素羟化酶；ZE 玉米黄质环氧酶；VDE 紫黄质去环氧酶；NXS 新黄质合酶；CCS 辣椒黄素-辣椒玉红素合酶)；图 3 是从水稻内胚芽收集的 T1、T2 和 T3-代成熟种子，所述内胚芽被多顺反子 pG1b-PAC 载体转化以产生 β -胡萝卜素并呈现黄色。图 4 是通过进行 PCR (A) 和 DNA 印迹(3)识别的植物的细胞转化 (M, 1kb 梯形 DNA 大小标记；PC, pG1b-PAC 质粒 DNA；NC, 非转基因对照水稻 (洛东 (Nakdong) 稻)；9、10、11、2-1、2-2、4-2、4-3, pG1b-PAC 水稻转化体)。图 5 是通过进行 RT-PCR 识别的本发明植物中

的基因表达。图 6 是通过进行蛋白质印迹识别的本发明植物中的蛋白表达 (GF 胡椒的青果 RF:胡椒的红果); 图 7 是通过 HPLC 分析识别的本发明植物中的 β -胡萝卜素的产生 (L, 叶黄素; Z, 玉米黄质; B-C, β -胡萝卜素); 图 8 是由内部核糖体进入位点启动子的两个独立基因的共表达示意图; 图 9 是用于产生 β -胡萝卜素的含有多顺反子 PIC 基因的水稻内胚芽特异的 pGlb-PIC 载体的详细构建 (基因图谱) (LB 左边界; RB 右边界; Glb 水稻内胚芽特异的球蛋白启动子; Psy 源自韩国胡椒 Nockwang 的八氢番茄红素合酶基因; IRES 内部核糖体进入位点; Tp 叶绿体靶向导肽; CrtI 细菌胡萝卜素去饱和酶基因; PinII 土豆蛋白酶抑制剂 II 终止子; P35S =CaMV 35S 启动子; Bar 草铵膦乙酰转移酶基因; NOS 胭脂碱合成酶终止子; 和 MAR:基质附着区域); 图 10 是从水稻内胚芽收集的 T1 和 T2 代成熟种子, 所述内胚芽被本发明的多顺反子 pGlb-PIC 载体转化以产生 β -胡萝卜素并呈现黄色; 图 11 是通过进行凝胶电泳识别的水稻的基因插入 (M, 1kb 梯形 DNA 大小标记; PC, pGlb-PAC 质粒 DNA ; NC, 非转基因对照水稻 (洛东稻); 4、5、 β 、7、8 用 pGlb-PIC 载体转化的水稻 T1 代);

图 12 是通过使用水稻染色体 DNA 进行基因组 DNA 印迹识别的基因插入和基因拷贝数 (M, 1kb 梯形 DNA 大小标记; PC, pGlb-PAC 质粒 DNA; NC, 非转基因对照水稻 (洛东稻); 4-2、

5-1、6-1、7-1、8-2、8-3 用 pGlb-PIC 载体转化的水稻 T2 代); 图 13 是使用从用多顺反子 pGlb-PIC 载体转化的水稻种子中分离的总 RNA 进行 RT-PCR 后, 转录体的基因表达模式的比较(M, 1kb 梯形 DNA 大小标记; NC, 非转基因对照水稻(洛东稻)的成熟种子; 4、5、6、7、8:用 pGlb-PIC 载体转化的水稻种子); 图 14 是用多顺反子 pGlb-PIC 载体转化以产生 β -胡萝卜素并呈现黄色的水稻成熟种子(Glb 水稻内胚芽特异的球蛋白启动子; Tp 叶绿体靶向导肽基因; Psy 源自韩国 胡椒 NocKwang 的八氢番茄红素合酶基因; st2A 在水稻中优化的 2A 序列; IRES 内部核糖体进入位点; CrtI 细菌胡萝卜素去饱和酶基因; PinII 土豆蛋白酶抑制剂 II 终止子)。应理解, 附图不必是按比例尺缩放的, 而是表示对说明本发明基本原理的多种优选特性的某种程度的简化描述。本文公开的本发明的具体设计特性, 包括例如具体尺寸、方向、位置和形状, 可部分地由具体的计划应用和使用环境确定。

实施例以下, 将详细给出本发明的多种实施方案, 其中的实施例在附图中图示并在下面描述。尽管本发明连同示范实施方案一起被描述, 然而应理解这种描述并不意图将本发明限制为那些示范实施方案。相反, 本发明不仅意图涵盖示范实施方案, 还意图涵盖属于如所附权利要求定义的本发明的精神和范围内的各种替代、改造、等价或其他实施方案。

对水稻优化的 FMDV 源 2A 序列 (st2A 基因) 的合成已知 FMDV (口蹄疫病毒) 源 2A 序列在氨基酸的特定 C-末端处 (G | P) 自加工。在 FMDV 源 2A 序列内, SEQ ID NO 2 的氨基酸序列被用来设计对水稻优化的多核苷酸。精确地, 水稻密码子使用数据被用来确定 60bp 的最优核苷酸序列。在核苷酸序列的两个末端, 连接 3bp 核苷酸作为限制性内切酶 PstI 和 SmaI 的识别位点来设计 SEQ ID NO 3 的多核苷酸 (st2A-正义 ssDNA)。然后, 再设计与 SEQ ID NO :3 的多核苷酸互补的 SEQ ID NO :4 的多核苷酸 (st2A-反义 ssDNA)。从商业公司合成了上面设计的 SEQ ID NO :3 的多核苷酸和 SEQ ID NO :4 的多核苷酸。然后, 将这些序列从 65° C 缓慢退火至室温以转化为双链 DNA (dsDNA)。用限制性内切酶 PstI 和 SmaI 消化所述 dsDNA 并将其连接到经相同酶消化的质粒 pKS+载体 (stratagene) 中。从而构建了 pBS-st2A 载体。

胡椒 PSY 基因和细菌 CrtI 基因的分离 (2-1) 胡椒 PSY 基因的分离为克隆源自韩国胡椒—辣椒栽培品种 NocKwang 的 SEQ ID NO 6 的八氢番茄红素合酶基因 (PSY), 从胡椒根中提取总 RNA。具体地, 每个样品取约 1g 在液氮下的混合碗中进行超声处理, 再转移到 2mL 试管中, 用 500 μ L 的 RNA 提取缓冲液 (pH 5.5 的 50mM 乙酸钠、150mM LiCl、5mM EDTA、0.5% SDS) 和 500 μ L 苯酚萃取。将所述混合物在 65° C 下加热 10 分钟, 然后用旋转振荡器在室温下搅拌 15 分钟。然后, 以 10000rpm

在 4° C 下离心 10 分钟, 将上清液收集到一个新试管中, 再加入 500 μ L 的氯仿。再次萃取此上清液, 再离心以收集上清液。然后加入 0.6 倍体积的 8M 氯化锂 (LiCl), 在 -20° C 下反应 2 小时以上。将反应产物在 4° C 下以 12000rpm 离心 20 分钟以沉淀 RNA 沉淀, 并用 4M LiCl 和 80% EtOH 洗涤一次。将所述 RNA 沉淀溶解到 50 μ L 的蒸馏水中。通过在使用前用 UV 分光光度计在 A 260/A 280 下测量光密度来对所述 RNA 洗出液进行定量。将此 RNA 用作模板并加入对胡椒 PSY 基因特异的引物对 SEQ ID NO :9 (Psy-Fw 引物) 和 SEQ ID NO 10 (Psy-Rv 引物)。然后, 通过进行反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增所述胡椒 PSY 基因。具体地, 大约 2 μ g 的总 RNA 与 50 μ M 的寡聚 dT 引物在以下条件下反应 55° C 20 分钟, 99° C 5 分钟, 并在冰上冷却。然后, 用 1 μ L 的核糖核酸酶 H 与 10xRT 缓冲液 (25mM MgCl₂、0.1M DTT, RNase OUT、Superscript RT) 在 37° C 下处理 20 分钟来合成 cDNA。将所合成的 cDNA 用作模板并加入每种引物各 10pmol。然后, 用 10xTaq 聚合酶缓冲液 (250 μ M MgCl₂、0.005M dNTP、1 单位 Ex-Taq 聚合酶 (Takara)) 与其反应以将总体积调节到 20 μ L, 反应条件为在 94° C 3 分钟、94° C 30 秒、60° C 30 秒、72° C 1 分钟, 重复反应 30 个循环, 然后为 75° C 5 分钟。将上面扩增的 PCR 产物连接到用于 PCR 克隆的 pCR2.1 载体 (Invitrogen) 中, 从而构建了 PCR2.1-Psy 载体。

(2-2)细菌 CrtI 基因的分离为克隆源自噬夏孢欧文菌 20D3 的 SEQ ID NO :8 的胡萝卜素去饱和酶基因 (CrtI), 从 KACC (韩国农用微生物保存中心) 获得细菌 ATCC 19321 菌株。通过使用常规分子克隆 方法提取细菌基因组 DNA。将此基因组 DNA 用作模板并加入对细菌 CrtI 基因特异的引物对 SEQ ID NO 11 (CrtI-Fw 引物) 和 SEQ ID NO 12 (CrtI-Rv 引物) 各 10pmol。然后, 将其与 10xTaq 聚合酶缓冲液 (250 μ M MgCl₂, 100 μ M dNTP、1 单位 Ex-Taq 聚合酶 (Takara)) 混合 以将总体积调节到 20 μ L, 反应条件为在 94° C 3 分钟、94° C 30 秒、60° C 30 秒、72° C 1 分 钟, 重复反应 30 个循环, 然后为 75° C 5 分钟。结果分离到细菌 CrtI 基因。然后, 将上面扩增的 PCR 产物克隆到 pGEM-T easy 载体 (Promega) 中, 构建了 pGEM-CrtI 载体。用于 β -胡萝卜素生产的 PAC 基因的制备 [2] (3-1) 八氢, 番茄红素合因禾 II 2A 序列 I 的连接为制备 β -胡萝卜素诱导的 PSY 和 CrtI 基因的多顺反子 PAC 基因, 首先将限制性 内切酶 HindIII 和 PstI 的识别位点连接到 PSY 基因的末端。具体地, 将在实施例 2_1 中制 备的 pCR2. I-Psy 载体用作模板并加入引物对 SEQ ID NO 13 (5H_Psy 引物) 和 SEQ ID NO: 14 (3P-Psy 引物) 各 10pmol。然后, 将其与 10xTaq 聚合酶缓冲液 (250 μ M MgCl₂ 0.05M dNTP、1 单位 Ex-Taq 聚合酶 (Takara)) 反应以 将总体积调节到 50 μ L, 反应条件为在 94° C 3 分钟、

94° C 30 秒、60° C 30 秒、72° C 1 分钟，重复反应 30 个循环，然后为 75° C 下 5 分钟。结果，用限制性内切酶 HindIII 和 PstI 消化所得 PCR 产物，然后克隆到经相同酶消化的质粒 pBS-st2A(见实施例 1)中 st2A 序列的 5'-上游区域。从而构建了 pBS-Psy-st2A 载体。(3-2) TP 序列的克隆所述细菌 CrtI 基因需与一个可将 PSY 酶移向 β -胡萝卜素(合成位点叶绿体、淀粉体等)的额外导肽(Tp)连接，尽管植物源 PSY 基因天然具有 Tp 信号。因此，将 rbcS-Tp(150bp)基因——一种从 rbcS (核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基)基因分离的水稻 Tp-按照下述方式克隆到 CrtI 基因的 5'-上游区域。将含有水稻 rbcS 基因的 pSK-RTG 载体用作模板(Jang et al., 1999, Mol. Breeding, 5 :453-461)并加入在 Tp 序列的两端含有限制性内切酶 PstI 和 NcoI 的识别位点的引物对 SEQ ID NO :15(5P-Tp 引物)和 SEQ ID NO :16 (3Nc_Tp 引物)。然后，在 94° C 10 秒、60° C 10 秒、72° C 10 秒、72° C 1 分钟 的条件下简单进行 PCR 反应。结果，用限制性内切酶 PstI 和 NcoI 消化上面扩增的 160bp PCR 产物，然后克隆到 经相同酶消化的 PGEM-T easy 载体中。从而构建了 pGEM_Tp 载体。(3-3) TP 序列和 CrtI 基因的连接为将 CrtI 基因克隆到 Tp 序列的上游区域，在 CrtI 基因的两端连接限制性内切酶 NcoI 和 ApaI 的识别位点并且将其连接到 pGEM-CrtI 载体中。将 pGEM-CrtI 载体用作模板 并加入引物对 SEQ ID

NO :17 (5Nc-CrtI 引物)和 SEQ ID NO 18 (3Ap-CrtI 引物)。

然后, 在与 CrtI 基因扩增的条件相同的条件下进行 PCR 反应。用限制性内切酶 NcoI 和 ApaI 消化 1.5kb 的所述 PCR 产物, 然后将其克隆到经相同酶消化的 pGEM-Tp 载体中 Tp 序列的 3'-下游区域。从而构建了 pGEM-Tp-CrtI 载体。(3-4)

氮黼浦铺細、2A 麻”禾口古膀卜縣細歸_连接将 pGEM-Tp-CrtI 载体包含的 Tp-CrtI 基因插入到 pBS_Psy-st2A 载体包含的 Psy-st2 基因的 3' _下游区域, 并使两个基因的编码框一致。

首先, 在 Tp-CrtI 基因的两端引入限制性内切酶 SmaI 和 XbaI 的识别位点。将所述 Tp-CrtI 基因克隆到 pBS-Psy-st2A 载体中。具体地, 将 pGEM-Tp-CrtI 载体用做模板并加入引物对 SEQ ID NO 19 (5Sm-TpCrtI 引物)与 SEQ ID NO:20 (3Xb-TpCrtI 引物)。然后, 在与 CrtI 基因扩增的条件相同的条件下进行 PCR 反应。用限制性内切酶 SmaI 和 XbaI 消化 1.642kb 的所述 PCR 产物, 然后将其克隆到经相同酶消化后的 pBS-Psy-st2A 载体中 Psy-st2A 序列的 3'-下游区域。从而构建了 pBS-Psy-st2A-Tp-CrtI, 即 pBS-PAC 载体。

最终, 通过再一次对总核苷酸序列进行测序分析 将最终的 PAC 融合基因鉴定为具有 2,952bp 的总核苷酸序列 (SEQ ID NO :1)。用于水稻转化的重组载体的构建和农杆菌转化(4-1)

用于水稻转化的重组载体的构建为构建用于水稻转化以诱导水稻胚乳特异性表达的重组载体, 将在实施例 3 中 制备

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/858001047021006112>