



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101948855 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 19

(21) 申请号 201010263299. 1

A01H 5/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 26

(71) 申请人 上海师范大学

地址 200234 上海市徐汇区桂林路 100 号

(72) 发明人 开国银 许辉 廖攀 张倩飞

黄志伟

(74) 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有

限公司 31227

代理人 杨杰民

(51) Int. Cl.

C12N 15/60 (2006. 01)

C12N 15/82 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 30/02 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页

(54) 发明名称

一种提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法

(57) 摘要

本发明涉及基因工程技术, 一种提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法。天然的水稻种子中 γ -氨基丁酸含量很低, 无法满足人类治疗和预防高血压疾病的保健要求。本发明包括以下步骤: 从水稻中克隆出 5. 3kbGt1 启动子序列和谷氨酸脱羧酶 GAD2 Δ C30 序列, 构建含 5. 3kbGt1 启动子序列和 GAD2 Δ C30 序列的植物表达载体, 遗传转化水稻获得转基因水稻植株, PCR 检测目的基因 5. 3kbGt1 启动子序列和 GAD2 Δ C30 序列的整合, RT-PCR 分析检测转基因水稻种子中 GAD2 Δ C30 蛋白的表达, 测定水稻种子中 γ -氨基丁酸含量。本发明方法可显著提高水稻种子中 γ -氨基丁酸含量, 具有遗传功能, 有利于保护人民的健康。

1. 一种提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法,包括以下步骤:

(1) 从越光水稻中克隆 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列;

(2) 把 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列连于表达调控序列,形成含有 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列的植物表达载体;

(3) 将含 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列的植物表达载体转化到根癌农杆菌,获得含有 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列植物表达载体的根癌农杆菌菌株;

(4) 将步骤(3)根癌农杆菌遗传转化水稻,获得 PCR 及 Western Blot 检测阳性的转基因水稻植株;

(5) 对步骤(4)获得的转基因水稻植株种子中 γ -氨基丁酸含量进行 HPLC 检测, γ -氨基丁酸含量显著提高,后代表型正常。

2. 根据权利要求 1 所述的提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法,其特征在于:步骤(1)从越光水稻中克隆的 *GAD2ΔC30* 序列是在 *GAD2* 基因的 cDNA 末端缺失 90bp,终止密码子 TAG 上游 90bp 的一段 cDNA 序列,编码氨基酸序列为缺失 C 末端 30 个氨基酸的序列。

3. 根据权利要求 1 所述的提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法,其特征在于:步骤(2)中 *5.3kbGt1* 启动子序列末端序列,距最末端一个碱基 600bp 处设计一条上游特异性引物及一条 *GAD2ΔC30* 序列的下游特异性引物,PCR 方法对所述转基因水稻进行分子检测结果扩增出 2013bp 大小的特异 DNA 片段的阳性转基因水稻植株。

4. 根据权利要求 1 所述的提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法,其特征在于:步骤(5)所述的 HPLC 法测定水稻种子中 γ -氨基丁酸含量的方法为:

(1) 色谱柱为 Hypersil ODS C_{18} 柱 125mm \times 4.0mm, $5\mu\text{m}$;

(2) 流动相 A 醋酸钠缓冲液的制备方法:取醋酸钠 2.72g,三乙胺 0.2mL,加水溶解,冰醋酸调节 pH 至 7.3,加水至 1000mL;

(3) 流动相 B 的制备方法:pH 值 7.2 的 1.35% 醋酸钠、乙腈、甲醇重量比为 100 : 175 : 225;

(4) 梯度洗脱 0 ~ 4min,流动相 B 的比例从 0.5% 增加至 26%,维持 6min 后,增加至 100%,维持 7min;

(5) 流速为 $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;

(6) 检测波长 338nm,柱温 40°C 。

一种提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术,具体地说是一种提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法。

背景技术

[0002] γ -氨基丁酸(γ -amino butyric acid,GABA)是广泛分布于动植物中的一种非蛋白质氨基酸,是生物体内的天然活性成分。 γ -氨基丁酸在动物体内是一种抑制性神经传递物质,能介导中枢神经系统的抑制性神经传导,系统地对脑血管进行调节。除脑和脊髓外,已在多种哺乳动物的近 30 种外周组织中发现 γ -氨基丁酸(GABA)的存在。现有技术表明 γ -氨基丁酸(GABA)是生物体内的生理活性成分,具有降血压、抗焦虑、改善脑机能、增强长期记忆力的功能。所以 γ -氨基丁酸(GABA)是一种很好的医疗药物及保健品的原料。高血压是危害人类健康的常见疾病,近十几年来发病率逐步升高。现有技术治疗高血压药物,效果都不理想。 γ -氨基丁酸对于治疗和预防高血压疾病具有独特的效果和巨大的应用潜力。

[0003] 水稻是农业生产中的重要粮食作物,也是人类赖以生存的主要食品。水稻种子中含有数量有限的 γ -氨基丁酸,不能满足人类的保健要求。发明提供一种有效提高水稻种子中 γ -氨基丁酸含量的方法,是非常有意义的。利用这种方法生产的产品,做为种子使用,具有遗传功能,可以提高 F_1 代稻谷中的 γ -氨基丁酸含量;做为食物,可以充分利用 γ -氨基丁酸(GABA)对人类的降血压、抗焦虑、改善脑机能、增强长期记忆能力的药理功效,促进人类健康,减轻心血管疾病的危害,延长人类寿命。

[0004] γ -氨基丁酸合成酶(GABA synthase),也称为谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD),是合成 γ -氨基丁酸的关键酶。水稻中有多种 GAD 基因, GAD2 是其中的一种。日本学者 Kazuhito Akama 研究发现,在水稻中过量表达 *OsGAD2DC*, *OsGAD2* 末端 30 个氨基酸缺失后,GABA 的含量提高了 100 倍;证明了氨基酸序列 C 末端的 30 个氨基酸会抑制其自身的活性。这种方法在的缺点是:虽然在一定程度上提高了水稻中 γ -氨基丁酸含量,但提高的是其在整个水稻植株中的含量;而且后代会出现矮化,白化,卷叶,不育等严重表型缺陷现象。RT-PCR 分析结果,和水稻植株的其它组织相比, GAD2 在成熟的种子中表达量低。

[0005] 本发明利用基因工程方法,将 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列共同转化水稻植株,不仅会使 *GAD2 Δ C30* 特异地在水稻种子中表达;而且水稻种子中的 γ -氨基丁酸(GABA)含量明显提高;其后代表型正常。

[0006] 经广泛查阅国内外出版物,检索国内外专利文献,未发现与本发明主题和技术方案完全相同专利和技术文献的报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法。本发明涉及

水稻种子特异性表达启动子的克隆、关键酶基因序列 *GAD2 Δ C30* 的克隆、载体构建、遗传转化、PCR 及 Western Blot 分子检测、 γ -氨基丁酸提取及含量测定,发明了提高水稻种子中 γ -氨基丁酸 GABA 含量的方法,为 γ -氨基丁酸大规模生产奠定了基础。

[0008] 本发明是通过以下技术方案实现的:

提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法,包括以下步骤:

- (1) 从越光水稻中克隆 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列;
- (2) 把 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列连于表达调控序列,形成含有 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列的植物表达载体;
- (3) 将含 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列的植物表达载体转化到根癌农杆菌,获得含有 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列植物表达载体的根癌农杆菌菌株;
- (4) 将步骤(3)根癌农杆菌遗传转化水稻,获得 PCR 及 Western Blot 检测阳性的转基因水稻植株;
- (5) 对步骤(4)获得的转基因水稻水稻种子中 γ -氨基丁酸含量进行 HPLC 检测, γ -氨基丁酸含量显著提高,后代表型正常。

[0009] 步骤(1)从越光水稻中克隆的 *GAD2 Δ C30* 序列是在 *GAD2* 基因的 cDNA 末端缺失 90bp,终止密码子 TAG 上游 90bp 的一段 cDNA 序列,编码氨基酸序列为缺失 C 末端 30 个氨基酸的序列。

[0010] 步骤(2)中 *5.3kbGt1* 启动子序列末端序列,距最末端一个碱基 600bp 处设计一条上游特异性引物及一条 *GAD2 Δ C30* 序列的下游特异性引物,PCR 方法对所述转基因水稻进行分子检测结果扩增出 2013bp 大小的特异 DNA 片段的阳性转基因水稻植株。

[0011] 步骤(5)所述的 HPLC 法测定水稻种子中 γ -氨基丁酸含量的方法为:

- (1) 色谱柱为 Hypersil ODS C_{18} 柱 125mm \times 4.0mm, $5\mu\text{m}$;
- (2) 流动相 A 醋酸钠缓冲液的制备方法:取醋酸钠 2.72g,三乙胺 0.2mL,加水溶解,冰醋酸调节 pH 至 7.3,加水至 1000mL;
- (3) 流动相 B 的制备方法:pH 值 7.2 的 1.35% 醋酸钠、乙腈、甲醇重量比为 100 : 175 : 225;
- (4) 梯度洗脱 0 ~ 4min,流动相 B 的比例从 0.5% 增加至 26%,维持 6min 后,增加至 100%,维持 7min;
- (5) 流速为 $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
- (6) 检测波长 338nm,柱温 40°C 。

[0012] 本发明的要点在于:

从日本优质水稻品种越光中克隆 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列,构建含上述 DNA 分子的植物表达载体,用根癌农杆菌介导,将 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列同时导入越光水稻细胞并再生出水稻植株。PCR 检测目的基因 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列的整合情况;Western Blot 检测转基因水稻种子中 *GAD2 Δ C30* 蛋白的表达情况,高效液相色谱测定转基因水稻中 GABA 的含量。

[0013] 本发明包括如下具体步骤:

- (1) 根据已有序列设计特异引物克隆越光水稻中 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列;

(2) 把 *5. 3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列可操作性地连于表达调控序列, 形成含有 *5. 3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列的植物表达载体;

(3) 将含 *5. 3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列的植物表达载体转化到根癌农杆菌, 获得含有 *5. 3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列植物表达载体的根癌农杆菌菌株;

(4) 利用所构建的根癌农杆菌遗传转化水稻, 获得经 PCR 及 Western Blot 检测为阳性的转基因水稻植株;

(5) 对获得的转基因水稻植株种子中 GABA 含量进行 HPLC 检测, 获得 GABA 含量显著提高, 且后代表型正常的转基因水稻植株。

[0014] 所述的 PCR 检测中, 根据 *5. 3kbGt1* 启动子序列末端序列, 距最末端一个碱基 600bp 处, 设计一条上游特异性引物, 下游特异性引物则位于 *GAD2 Δ C30* 序列上, PCR 方法对所述转基因水稻进行分子检测, 结果扩增出 2013bp 大小的特异 DNA 片段的为阳性转基因水稻植株。

[0015] 上述高效液相色谱测定 GABA 含量的方法如下: 色谱柱为 Hypersil ODS C_{18} 柱 125mm×4.0mm, 5 μ m。流动相 A 为醋酸钠缓冲液, 制备方法是: 取醋酸钠 2.72g, 三乙胺 0.2mL, 加水至适量使其溶解, 用冰醋酸调节 pH 至 7.3 后, 加水至 1000mL。流动相 B 为 pH7.2 的 1.35% 醋酸钠: 乙腈: 甲醇 = 100 : 175 : 225, 均匀混合。梯度洗脱 0~4min, 流动相 B 的比例从 0.5% 增加至 26%, 维持 6min 后, 增加至 100%, 维持 7min; 流速为 1mL·min⁻¹; 检测波长 338nm, 柱温 40°C。

[0016] 本发明的 *5. 3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列共转化策略提高水稻种子 GABA 含量的方法, 采用基因工程方法, 将 *5. 3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列导入水稻中, 获得了 GABA 高产的转基因水稻植株。GABA 高产的转基因水稻植株的获得, 可以显著增加水稻种子中 γ -氨基丁酸的含量, 水稻种子中 γ -氨基丁酸的含量是非转化对照水稻种子的 8.3 倍。本发明对提高水稻种子中 γ -氨基丁酸含量, 具有重要意义。对于通过食用水稻种子, 增加人体内的 γ -氨基丁酸, 治疗和预防高血压疾病具有独特的效果和促进作用。

[0017] 本发明的优点是:

- 1、水稻种子中 γ -氨基丁酸的含量增加显著;
- 2、本发明水稻种子 γ -氨基丁酸的高含量性状, 具有遗传功能, 可以使 F₁ 代仍然具有 γ -氨基丁酸的高含量性状;
- 3、本发明水稻种子产品对治疗和预防人类高血压疾病有促进作用;
- 4、方法可靠, 便于实施, 实用性强。

具体实施方式

[0018] 下面结合具体实施例进一步阐述本发明, 这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的。

[0019] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 例如 Sambrook 等分子克隆: 实验室手册 New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 中所述的条件; 或按照制造厂商所建议的条件。

[0020] 本发明实施例选用日本优质水稻品种“越光”, 越光水稻具有病虫害发生率低, 成熟落黄好, 倒伏率很低, 穗层整齐, 米粒晶莹透亮的优点。

[0021] 实施例 1

水稻 *5. 3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列的克隆。

[0022] 1. 组织分离 (Isolation) :

将水稻种子剥去外壳,用 75%乙醇浸泡 1.5 min,倒掉酒精,再用 0.1% HgCl₂ 灭菌 10 min,无菌水冲洗 5—6 次,用无菌吸水纸吸干表面水分,接种于无激素的 MS (Murashige and Skoog, 1962) 固体培养基中,25°C、12h / 12h 光照培养,即可获得水稻无菌苗,两周后,切取叶片和茎段用于 RNA 提取。

[0023] 2. RNA 的分离 (RNA isolation) :

称取 0.8 g 所述的水稻无菌试管苗,用液氮速冻后,迅速用研钵研碎,加入盛有 1 mL TRIzol (TRIzol Reagents, GIBCO BRL, USA) 的 1.5 mL Eppendorf 管中,充分振荡后,于室温下放置 5 min,加 200ul 氯仿,用力振荡 20sec,室温放置 5 min 后,于 4°C、12,000g 离心 15 min。将约 500ul 上清液吸入干净的 1.5 mL Eppendorf 管中,加入等体积的异丙醇,颠倒混匀,室温下放置 10min 后,于 4°C、12,000g 离心 10 min;弃上清,加 1000ul 75%乙醇清洗,充分振荡后,于 4°C、8,000g 离心 5min;室温干燥 20min 后溶于 40ul RNAase-free 水中。用甲醛变性胶电泳鉴定总 RNA 质量,然后在分光光度计上测定 RNA 含量。

[0024] 3. 基因克隆 (Cloning of the genes) :**3.1 *5. 3kbGt1* 启动子序列的克隆 :**

根据 *5. 3kbGt1* 启动子的序列 (SEQ ID NO. 1) 设计上下游引物,并在上游和下游上分别引入限制性内切酶位点,以便构建表达载体。以越光水稻基因组 DNA 为模板,利用 PCR 扩增出 *5. 3kbGt1* 启动子的序列后进行测序。DNA 序列测定由上海生工生物工程技术有限公司采用 3730 自动测序仪完成。测序结果表明,所克隆的序列与 GENBANK 中所报道的水稻 *5. 3kbGt1* 启动子的序列 (SEQ ID NO. 1) 一致;

3.2 *GAD2 Δ C30* 序列的克隆 :**3.2.1 第一链 cDNA 的合成 :****3.2.2 水稻 *GAD2 Δ C30* 序列编码区的 PCR 扩增 :**

根据所述水稻 *GAD2* 基因的编码序列 (SEQ ID NO. 2) 分别设计扩增出其 cDNA 末端缺失 90bp (终止密码子 TAG 上游 90bp) 的编码框的上下游引物,并在上游和下游引物上分别引入限制性内切酶位点,以便构建表达载体。以所述的第一链 cDNA 为模板,经 PCR 扩增后进行测序。DNA 序列测定由上海生工生物工程技术有限公司采用 3730 自动测序仪完成。测序结果表明,所克隆的序列与 GENBANK 中所报道的水稻 *GAD2* (SEQ ID NO. 2) 编码序列去除 cDNA 末端 90bp 一致。

[0025] 本实施例采用基因克隆方法从水稻中获得序列正确的水稻 *5. 3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列,通过基因与种子特异性表达启动子序列融合构建植物,表达载体遗传转化植物体代谢工程策略,提高水稻种子 GABA 含量提供了一个在水稻种子中特异性表达的启动子序列和一个缺失 cDNA 末端 90bp 的关键酶基因。

[0026] 实施例 2 :

含 *5. 3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列的植物表达载体的构建。

[0027] 1. 植物表达载体 pCAMBIA1304⁺-*5. 3kbGt1* 的构建 :

以 pBI121 和 pCAMBIA1304 为材料,构建植物表达载体 pCAMBIA1304⁺。具体地,

HindIII / EcoRI 双酶切 pBI121 和 pCAMBIA1304 ;回收 pBI121-GUS 表达盒及 pCAMBIA1304 大片段 ;连接转化,挑取单克隆菌落抽提质粒酶切验证。结果表明,植物表达载体 pCAMBIA1304⁺ 构建成功。以 pCAMBIA1304⁺ 为表达载体,将实施例 1 中 *5.3kbGt1* 启动子连于其上。将 Hind III / Xba I 双酶切 pMD18T-*5.3kbGt1* 和 pCAMBIA1304⁺ 回收 *5.3kbGt1* 和 pCAMBIA1304⁺ 大片段,连接转化,挑取单克隆,提取质粒做 PCR 检测和酶切验证。

[0028] 2. 植物表达载体 pCAMBIA1304⁺-*5.3kbGt1*-*GAD2ΔC30* 的构建 :

以上述 pCAMBIA1304⁺-*5.3kbGt1* 为基础,用实施例 1 中的 *GAD2ΔC30* 替换 pCAMBIA1304⁺-*5.3kbGt1* 上的基因。具体地将 BamH I / Sac I 双酶切 pCAMBIA1304⁺-*5.3kbGt1* 和 pMD18T-*GAD2ΔC30*, 回收 pCAMBIA1304⁺-*5.3kbGt1* 大片段和 *GAD2ΔC30* 序列小片段,连接转化,挑取单克隆,提取质粒做 PCR 检测和酶切验证。从而获得含 *5.3kbGt1* 和 *GAD2ΔC30* 的植物表达载体 pCAMBIA1304⁺-*5.3kbGt1*-*GAD2ΔC30*。

[0029] 本实施例将水稻种子中特异表达的启动子序列 *5.3kbGt1* 及 GABA 生物合成途径关键酶基因的修饰基因 *GAD2ΔC30* 可操作性地连于表达调控序列,形成含 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列的植物表达载体,该表达载体可用于通过代谢工程策略来提高水稻种子 GABA 含量。

[0030] 实施例 3

根癌农杆菌介导 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列遗传转化水稻获得转基因水稻植株。

[0031] 1. 含 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列植物表达载体根癌农杆菌工程菌的获得 :

将实施例 2 中含 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列的植物表达载体转入根癌农杆菌 EHA105,并进行 PCR 验证。结果表明,含 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列植物表达载体已成功构建到根癌农杆菌菌株。

[0032] 2. 根癌农杆菌介导 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列转化水稻 :

2. 1. 水稻愈伤组织的诱导 :

将水稻种子剥去外壳,用 75%乙醇浸泡 1.5 min,倒掉酒精,再用 0.1% HgCl₂ 灭菌 10 min,无菌水冲洗 5—6 次,用无菌吸水纸吸干表面水分,接种于 MS (Murashige and Skoog, 1962)+3mg/L 2, 4D 固体培养基中,25℃暗培养。10 天后,从水稻种子胚的周围生长出米黄色的愈伤组织 ;

2. 2. 农杆菌与水稻愈伤组织的共培养 :

将上述的米黄色的水稻愈伤组织,放入含活化好的根癌农杆菌工程菌的 MS 悬液中浸泡 15 min,轻轻摇动使愈伤组织与菌液充分接触 ;倒出悬液,用无菌吸水纸吸干表面余菌,转到共培养培养基 (MS+ AS100 μ mol / L) 中,暗培养 3d。以浸泡在不带有根癌农杆菌的 MS 液体培养基中的愈伤组织为对照 ;

2. 3. 抗性愈伤组织的筛选和植株再生 :

将所述的共培养 3 d 的水稻愈伤组织用无菌水冲洗 10 次后转入至 100ml 含 500mg / L Cef 的去离子水中,25℃,120rpm 振荡 2hr,弃去水,吸去愈伤组织表面过多的水分。转移愈伤组织至选择培养基 MS+3mg/L 2, 4D+250mg / L Cef 中,经过 4 周的选择培养,转移正常成活的愈伤组织至新的选择培养基中再培养 3 周,以便进一步筛选抗性愈伤,另外还能够使

具有抗性的愈伤组织得到增殖。经过两次选择培养后,转移那些生长旺盛的愈伤组织至预分化培养基(MS+1.0mg/L 6-BA+2.0mg / L NAA+5.0mg / L ABA)中,25℃,暗培养3周。从预分化培养基中转移愈伤组织至分化培养基 MS+2.0mg/L 6-BA+1.0mg / L IAA+1.0mg / L NAA 中,25℃,每天约14hr 光照培养 2000lux。3周后看到从愈伤组织上生长出再生苗,将这些小苗连同其愈伤转移至生根培养基(1 / 2 MS)中,让其生根,直至小苗长到三角瓶顶部。打开三角瓶的封口膜,让无菌苗适应外界环境1—2天;小心地将无菌苗从三角瓶中取出,立即用自来水洗去根部的培养基。将每株无菌苗分开转移到含有1/2MS培养液约5cm直径大小的塑料培养皿中,放置培养室中,90%的湿度,20℃,每天14hr 光照 4000 lux 培养7-10天;转移无菌苗至泥土中进行正常生长。

[0033] 3. 转基因水稻植株的PCR检测:

根据 *5.3kbGt1* 启动子序列末端序列,距最末端一个碱基600bp处设计一条上游特异性引物,和已有的 *GAD2ΔC30* 序列的下游引物配对,用PCR方法对所述转基因水稻进行分子检测。结果表明,利用此对特异引物,扩增出2013bp大小的特异DNA片段。而以非转化普通水稻基因组DNA为模板时,没有扩增出任何片段。这说明 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列已经整合到水稻基因组中。

[0034] 本实施例将所述的植物表达载体转化根癌农杆菌,获得用于转化水稻的含 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2ΔC30* 序列的植物表达载体的根癌农杆菌菌株,利用所构建的根癌农杆菌菌株转化水稻细胞,获得经PCR检测的转基因水稻。

[0035] 实施例4

利用Western blot 检测 *GAD2ΔC30* 蛋白在转基因水稻植株中的表达。

[0036] 1. 蛋白的提取:

1.1 取 KH_2PO_4 0.2 g/L, Na_2HPO_4 1.15 g/L, KCl 0.2 g/L, NaCl 8 g/L 混合均匀,配制1*PBS溶液;取50mg新鲜转基因水稻叶片,加入100ul 1*PBS,放入1.5ml Eppendorf管中研磨;

1.2 13000rpm, 4° C 离心20分钟;

1.3 将上清液收集于一新管中,备用;以上过程在冰上进行。

[0037] 2. 蛋白定量:参考Bradford法(Bradford,1976)。取2ul蛋白样品,加入1ml Bradford试剂,混匀后,分光光度计测 OD_{595} ;蛋白含量计算:1 OD_{595} = 28.57mg。

[0038] 3. SDS-PAGE 分离蛋白:SDS-PAGE 的制备参考《分子克隆》(Sambrook等,1989);

3.1 加样前,将样品置于含50mmol/L DTT的加样缓冲液(2*加样缓冲液:甘油2.4g, 1M Tris-HCl pH6.8 1ml;溴酚兰0.01%, H_2O 定容至20ml),煮沸10分钟放置冰上,冷却后上样;

3.2 室温100V电压下聚丙烯酰胺凝胶电泳,直到指示剂溴酚兰前沿达到凝胶底部。

[0039] 4. 蛋白质向硝酸纤维膜上转移:

4.1 转移之前,用转移缓冲液(39 mmol 甘氨酸,48 mmol Tris Base,0.037% SDS,20% 甲醇)平衡凝胶和硝酸纤维膜30分钟;

4.2 室温下用半干式电转仪转移1h,凝胶两侧各垫3层Whatman滤纸。

[0040] 5. 硝酸纤维膜上蛋白的检测:

5.1 将硝酸纤维膜浸在封闭液中,37° C 缓慢摇动,封闭60分钟:(封闭液:取5g脱

脂奶粉溶于 100ml 1*PBS (含 0.5g 叠氮钠);

- 5.2 再将滤膜浸泡在洗涤缓冲液中, 37° C 洗涤两次, 每次 15 分钟;
- 5.3 加入第一抗体抗水稻 GAD2 的抗体, 37° C 温育 30 分钟;
- 5.4 同步骤 5.2, 洗涤三次;
- 5.5 加入第二抗体抗兔 IgG, 37° C 温育 30 分钟; 同步骤 5.2, 洗涤两次;
- 5.6 加入底物显色观察蛋白条带。

[0041] 实施例 5

利用 HPLC 测定转基因水稻种子中 GABA 含量。

[0042] 5.1. 样品制备:

准确称取 5 g 转基因水稻种子样品于 250mL 三角瓶中, 加入乙醇-水 (体积比为 60 : 40) 溶液 30 mL 于 70°C 水浴中回流两次 (每次 30 min), 合并提取液并浓缩至一定体积, 经 0.45 μm 滤膜过滤后 -20°C 保存。

[0043] 5.2. 色谱条件及系统适用性以及标准溶液的配制:

色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈ 柱 (125mm × 4.0mm, 5 μm); 流动相 A 为醋酸钠缓冲液 (取醋酸钠 2.72g, 三乙胺 0.2mL, 加水至适量使溶解, 用冰醋酸调节 pH 至 7.3 后, 加水至 1000mL); 流动相 B 为 1.35% 醋酸钠 (pH7.2)-乙腈-甲醇 (100 : 175 : 225); 梯度洗脱 0 ~ 4min, 流动相 B 的比例从 0.5 % 增加至 26 %, 维持 6min 后, 增加至 100%, 维持 7min; 流速为 1mL · min⁻¹; 检测波长 338nm, 柱温 40°C;

取 GABA 标准品约 10.5mg, 精密称定, 置 25mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液;

为了使被测品可做高灵敏度荧光检测, 本法采用邻苯二甲醛 (OPA) 柱前衍生测定的方法, 而且 OPA 本身不干扰分离与检测, 不必除去过量试剂, 色谱图基线比较平稳, 其灵敏度比茚三酮法高出 10 倍。按上述的色谱条件洗脱, GABA 的出峰时间为 6.24min, 峰型良好。

[0044] 5.3. 标准曲线的制作

将所述对照品溶液分别取 1ul, 3ul, 5ul, 8ul, 10ul, 在上述色谱条件下进样, 记录图谱及色谱参数, 分别以峰面积 (Y) 对标准品浓度 (x) 进行回归分析, 制作标准曲线。

[0045] 5.4. 样品 GABA 含量的测定

将 5.1 中 -20°C 保存的样品各取 10ul 加样检测, 记录各组分峰面积, 代入线性回归方程, 计算即得样品 GABA 含量。

[0046] 在本发明中共转 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列显著提高水稻种子中 GABA 含量。共转 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列的水稻种子中 GABA 平均含量是非转化普通种子的 8.3 倍, 且后代表型正常。

[0047] 本实施例采用 HPLC 法测定了转基因水稻种子中 GABA 含量。采用共转化 *5.3kbGt1* 启动子序列和 *GAD2 Δ C30* 序列的代谢工程策略获得了 GABA 高产的水稻植株, 为提高水稻种子中 GABA 含量提供了一种理想方法。

[0048] 上述实施例仅为本发明的优选例, 并不用来限制本发明, 凡在本发明的原则之内, 所做的任何修改和变化, 均在本发明的保护范围之内。

[0049] 本发明涉及的序列及记号分列如下:

SEQ ID NO. 1 的信息

- <110> 上海师范大学
 <120> 一种提高水稻种子 γ -氨基丁酸含量的方法
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 5391
 <212> DNA
 <213> 水稻 (*Oryza sativa*)
 <400> 1

```

tctccgggtc atcgataggt ggggcccacc tattggcccc ttcttcctcc ttagccggt 60
cagcaaccgc cgccgcctgc cccaaccacc gacattatth tagttatatt ggtggtcga 120
atthgtctat aacgaccgtc aacactccac acgaaccggc cgagcgcctc gaacatcgtg 180
ggcgcgcgcc cactgccacc gccgtcgacc ggcacgagcg ccttgacatg gacgatgggc 240
tcggacgtga accggaacga cctatgcagg agcggctccc tcagtgcac accggtggcg 300
gcatcgtcgt cggctgccgt gaagtagtag acggtctgca caacgatggc gatgthctgg 360
tcgaggttgg agaggtagta gagaccaccc thctctccg ccgctggcac caccagggtt 420
ggtaccctc gthtactcc aagctccacg gggcggtctt cthccccg caatcactgg 480
ccagcctgcc caagaggata aaagtgagag aaagagagga ggaagggaga tgaggggaaa 540
gagggaggtg atgacatgga thactgatat gtagggttca cgtgggttcc acgctgactc 600
agccgccacg tcggataaaa ccgggatcaa agctaccgaa tgacctaaag tgaacagtht 660
tgthaaattg gggatgtcat gtatccggtt thgtggttga tggacgattt thtaactcga 720
tgacaaattg agcgcctgc ggtgtactth thcttccgc cctgtgtgga ggcccaaa 780
thcagccat thccaacctg gactgacat gggggccatt ccaaagcctt gcacagtht 840
acctctacc cgcgcctccg thctctccg cthccccaaa cgatgccgc thcgcctccg 900
ththccgth thctcgccct cctctccg cgcgcgccgc ccccccgct ccgcccctc 960
ctccagatec acgcccacct cctcgccgc ggcctcctc aagactthct thcctctc 1020
gccgcgcct acgcgtctc caccaccgc accgccacgg acgcccgcac thcgcgc 1080
thcccgctc gccacgcgt cgcgtctc thctcgctc cggcctccgc thacaacgc 1140
gccatccgag cactctccct thcgcacgac ggcgaccgcc atggccacgg cgtcgtccg 1200
cgctgcctc cgctctaccg cgcctctc cgctccggga ccgcgcccc cgaccactc 1260
acgthccgt thctgtcaa ggcctgcgc cgcctgcgg agtggggata cggcgacgc 1320
gccctcgcgc acgthctccg cctcgccct gactccgacg ththctggt gaacgcggc 1380
acgcactth thctgacctg cgggcccacg gaggacgcac gcaggctgt thcaccgaag 1440
cctgtgaggg actthgtgth gtggaacacg thgatcggag ggtacgtgc ggggggaa 1500
ccagcggagg cgctggagct gthctggagg atggtggcag aggatgcag ggtgaggc 1560
gatgaggthc cgatgatgc ggtgtgthc ggggtgtggc agatgcgtga cthggagct 1620
gggagcgcgc thcatgggt thctggatag gacggagth gthgactgt gagctgatg 1680
aatgcgtga thgatatgth thcaagth ggcagthtag agatggcaaa gthctgtgth 1740
gagaggatcg agcacaggac agthgtctct thgacgacga thctcgtgg gththccaag 1800

```

ttcggattga tgggcgatgc acgtaaagtg tttgatgaga tgcctgaaag ggatgtgttc 1860
 ccatggaatg cactcatgac cggttatgtg cagtgtaagc agtgcaagga ggccctttcc 1920
 ttgtttcatg agatgcagga agcaagtgtg gtgcctgatg agatcacaat ggtcaatctt 1980
 ctaactgctt gttcgcagct cggagcatta gaaatgggga tgtgggttca ccggtacatt 2040
 gagaaacatc gccttgtatt tagtgttgcg cttggcacat ctctcattga catgtacgct 2100
 aagtgtggaa acattgagaa agctatccac attttcaaag aaattcccga gaaaaatgca 2160
 ctcacatgga cagcaatgat atgtggtcta gcaaatcatg gacatgccaa tgaggccata 2220
 gagcacttcc ggacaatgat agagcttggga cagaagccag atgagattac gtttataggt 2280
 gttctttcag catgctgtca tgctggtttg gtgaaagaag gtcgggaatt tttctctctg 2340
 atggagacaa aatatcatct tgagaggaaa atgaaacatt attcatgtat gatagactta 2400
 ctaggcaggg caggccattt agacgaagca gagcagctag taaacactat gcctatggaa 2460
 cctgatgcag tagtttgggg tgctatcttc tttgcttgta ggatgcaagg taatatctct 2520
 cttggagaaa aggcagcaat gaaattggta gaaattgatc ctagtgatag tggaatctat 2580
 gtgctactgg ctaatatgta tgcagaagcg aacatgagga agaaggctga caaagtcagg 2640
 gctatgatga gacatttggg agtggagaaa gttcctgggt gtagctgcat tgagttgaat 2700
 ggtgtgtgttc atgaatttat cgtgaaggac aagtcacata tggatagtca tgctatttat 2760
 gactgcttgc atgagatcac cctacaaata aagcatactg cagatttgcct tagcatttct 2820
 gcggctgggtg cgggtgtagtg ttctgttggc tggaacagct ggctgagctg tgcaagatga 2880
 tatgtgcagt tgtgatgcac aattcacaga tgcaggaact cgatcatgct gatttgtgct 2940
 ggtttgccag gccatgttct gagaagggtta tacttcatgt tgattactat ctgaggcatt 3000
 ccccgagaat tttctggteg ttcttttgca gcttgatgtc aatggaaaca atatgttcca 3060
 ctacatattg caaagttctt gtatgctctt tactcaacce tcacgtgcgg agcacttctt 3120
 gggtaagtgt ggttctcatg ctctgttttg cctcctccat ttctcctccg ttgcatttaa 3180
 agtcacatcc cctcctcag gttttctcca ttagctctct gtagtccttg ctgtactctc 3240
 cttggtatte catgctgtcc tactacttgc ttcateccct tctacatttt gttctggttt 3300
 ttggcctgca tttcggatca tgatgtatgt gatttccaat ctgctgcaat atgaatggag 3360
 actctgtgct aaccatcaac aacatgaaat gcttatgagg cctttgctga gcagccaate 3420
 ttgcctgtgt ttatgtcttc acaggccgaa ttctctgtt ttgtttttca cctcaatat 3480
 ttggaaacat ctatctaggt tgtttgtgtc caggcctata aatcatacat gatgttgtcg 3540
 tattggatgt gaatgtggtg gcgtgttcag tgccttggat ttgagtttga tgagagtgc 3600
 ttctgggtca ccactacca ttatcgatgc tctcttcag cataaggtaa aagtcttccc 3660
 tgtttacgtt attttaccce ctatggttgc ttgggttgggt tttttcctga ttgcttatgc 3720
 catggaaggt catttgatat gttgaacttg aattaactgt agaattgtat acatgttcca 3780
 tttgtgttgt acttcttct tttctattag tagcctcaga tgagtgtgaa aaaaacagat 3840
 tatataactt gccctataaa tcatttgaaa aaaatattgt acagtgagaa attgatatat 3900
 agtgaatfff taagagcatg ttttctaaa gaagtatata ttttctatgt acaaaggcca 3960
 ttgaagtaat tntagataga ggataatgta gactttttgg acttacactg ctacctttaa 4020
 gtaacaatca tgagcaatag tgttgcaatg atatttaggc tgcattcgtt tactctcttg 4080
 atttccatga gcacgcttcc caaactgtta aactctgtgt tttttgccaa aaaaaaatgt 4140

ataggaaagt tgcttttaaa aaatcatatc aatccatttt ttaagttata gctaataactt 4200
 aattaatcat gcgctaataa gtcactctgt ttttcgtact agagagattg ttttgaacca 4260
 gcactcaaga acacagcctt aaccagcca aataatgcta caacctacca gtccacacct 4320
 cttgtaaagc atttgttgca tggaaaagct aagatgacag caacctgttc aggaaaacaa 4380
 ctgacaaggt catagggaga gggagctttt ggaaaggtgc cgtgcagttc aaacaattag 4440
 ttagcagtag ggtgttggtt tttgctcaca gcaataagaa gttaatcatg gtgtaggcaa 4500
 cccaaataaa acacaaaat atgcacaagg cagtttgttg tattctgtag tacagacaaa 4560
 actaaaagta atgaaagaag atgtggtgtt agaaaaggaa acaatatcat gagtaatgtg 4620
 tgagcattat gggaccacga aataaaaaga acattttgat gagtcgtgta tcctcgatga 4680
 gcctcaaaag ttctctcacc ccgataaga aacccttaag caatgtgcaa agtttgcatt 4740
 ctccactgac ataatgcaaa ataagatata atcgatgaca tagcaactca tgcatcatat 4800
 catgcctctc tcaacctatt cattcctact catctacata agtatcttca gctaaatggt 4860
 agaacataaa ccataagtc acgtttgatg agtattagc gtgacacatg acaaatcaca 4920
 gactcaagca agataaagca aatgatgtg tacataaaac tccagagcta tatgtcatat 4980
 tgcaaaaaga ggagagctta taagacaagg catgactcac aaaaattcat ttgcctttcg 5040
 tgtcaaaaag aggagggtt tacattatcc atgtcatatt gcaaaaagaa gagagaaaga 5100
 acaacacaat gctgcgtaa ttatacatat ctgtatgtcc atcattattc atccacctt 5160
 cgtgtaccac acttcatata tcatgagtea cttcatgtct ggacattaac aaactctatc 5220
 ttaacattta gatgcaagag ctttatctc actataaatg cacgatgatt tctcattggt 5280
 tctcaaaaa agcattcagt tcattagtec tacaacaaca tggcatccat aatcgcccc 5340
 atagttttct tcacagtttg cttgttctc ttgtgcgatg gctccctagc c 5391

SEQ ID NO. 2 的信息

<210> 2

<211> 1503

<212> DNA

<213> 水稻 (*Oryza sativa*)

<400> 2

atggttctga cgcacgtcga ggcggtggag gagggcagcg aggcggcggc cgccgtgttc 60
 gcgtcgaggt acgtgcagga cccggtgccg aggtacgagc tcggcgagag gtcgataatc 120
 aaggacgccg cgtaccagat cgtccacgac gagctcctcc tggacagcag cccgcgcctg 180
 aacctgcegt ccttcgtcac cacctggatg gagcccagat gcgacaggt catcctcgag 240
 gccatcaaca agaactacgc cgacatggac gagtaccocg tcaccaccga gtccagaac 300
 cgggtcgtga acatcatagc gaggtgttc aatgcgccgg tggcgacgg cgagaaggcg 360
 gtcggggtgg gcacggtggg gtcgtcggag gccataatgc tggccgggt ggcgttcaag 420
 cggcgggtggc agaaccggcg gaaggcggcg gggaaagccc acgacaagcc caacatcgtg 480
 acgggggcca acgtgcaggt gtgctgggag aagttcgcgc gctacttcca ggtggagetc 540
 aaggaggtga agctgaccga aggctgttac gtgatggacc cctcaagc cgtggacatg 600
 gtcgacgaga acaccatctg cgtcgcgcc atcctcggct ccaccctcac cggcgagttc 660
 gaggacgtca ggcgcctcaa cgacctctc gccgccaaga acaagcggac gggttgggac 720

acgccgatcc acgtcgacgc ggcgagcggc gggttcatcg cgccgttcat ctacccggag 780
ctggagtggg acttccggct gccgctgggtg aagagcatca acgtcagcgg ccacaagtac 840
gggctcgtct acgccggcgt cgggtgggtc atctggcgca acaaggagga cctccccgag 900
gagtcattct tccacatcaa ctacctgggc gccgaccagc caaccttcac gtcacttc 960
tccaaagggt ccagtcagat tattgcgcaa tattaccagt ttcttcgact cggatttgag 1020
gggtacaaga gcgtgatgaa gaactgcatg gagagcgcga ggacgctccg ggagggcctg 1080
gagaagacgg ggcggttcac catcatctcc aaggaggagg gcgtgccgct ggtggccttc 1140
acgttcaagg acggcgcccg cgcgcaggcc ttcaggctgt cgtcgggcct gcgccgtac 1200
gggtggatcg tgccggcgta cacgatgccg gcggcgctgg agcacatgac ggtcgtccgc 1260
gtcgtcgtcc gggaagactt cggccggccg ctcgccgagc ggttcctgtc ccacgtcagg 1320
atggccctgg acgagatgga cctcgccgcc agggcccccg tgcccagggt gcagctcacc 1380
atcgagctcg gccccgccg gaccgcccgc gaggaggcct cgatcagggt ggtcaagagc 1440
gaggccgtgc ccgtgcgcaa gagcgtcccg ctcgtcgccg gcaaaaccaa gggcgtttgc 1500
tag 1503

专利名称(译)	一种提高水稻种子γ-氨基丁酸含量的方法		
公开(公告)号	CN101948855A	公开(公告)日	2011-01-19
申请号	CN201010263299.1	申请日	2010-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	开国银 许辉 廖攀 张倩飞 黄志伟		
发明人	开国银 许辉 廖攀 张倩飞 黄志伟		
IPC分类号	C12N15/60 C12N15/82 C12Q1/68 G01N33/53 G01N30/02 A01H5/00		
代理人(译)	杨杰民		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及基因工程技术，一种提高水稻种子γ-氨基丁酸含量的方法。天然的水稻种子中γ-氨基丁酸含量很低，无法满足人类治疗和预防高血压疾病的保健要求。本发明包括以下步骤：从水稻中克隆出5.3kbGt1启动子序列和谷氨酸脱羧酶GAD2ΔC30序列，构建含5.3kbGt1启动子序列和GAD2ΔC30序列的植物表达载体，遗传转化水稻获得转基因水稻植株，PCR检测目的基因5.3kbGt1启动子序列和GAD2ΔC30序列的整合，RT-PCR分析检测转基因水稻种子中GAD2ΔC30蛋白的表达，测定水稻种子中γ-氨基丁酸含量。本发明方法可显著提高水稻种子中γ-氨基丁酸含量，具有遗传功能，有利于保护人民的健康。