

文章编号: 1005-0906(2013)06-0005-05

高粱 *EPSPS* 基因的克隆、修饰及在玉米中的功能验证

赵海铭, 宋伟彬, 赖锦盛

(中国农业大学 / 农业生物技术国家重点实验室 / 国家玉米改良中心, 北京 100193)

摘要: 针对草甘膦结合位点, 对高粱 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(*EPSPS*)基因进行 4 种定点修饰, 将修饰后的基因分别导入到玉米中。通过对转化体的抗性鉴定, 确定将高粱 *EPSPS* 基因 106 位的脯氨酸变为丝氨酸(P106S)能够赋予转基因玉米草甘膦抗性。在喷施 4 倍的草甘膦时抗性事件 CL38-1 不产生药害。Southern 杂交结果表明, 目标基因在该转化事件中稳定遗传, 转化其余 3 种 *EPSPS* 基因的植株对草甘膦没有足够的抗性。

关键词: 玉米; 转基因; *EPSPS*; 抗草甘膦

中图分类号: S513.035

文献标识码: A

Cloning and Site-directed Modification of *Sorghum bicolor* *EPSPS* Gene and Its Functional Validation in Maize

ZHAO Hai-ming, SONG Wei-bin, LAI Jin-sheng

(China Agricultural University, State Key Laboratory of Agrobiotechnology /
National Maize Improvement Center, Beijing 100193, China)

Abstract: According to the potential binding site of glyphosate, Sorghum 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(Sb*EPSPS*) and conducted four kinds of site-directed modification were cloned. These modified Sb*EPSPS* were introduced in maize using transgenic approach. We found that the transgenic maize with one amino acid substitution: proline(P106) to serine(S) of *EPSPS* gained glyphosate resistance. One of transgenic events CL38-1 showed glyphosate resistant after sprayed with 4-fold glyphosate. Southern blot analysis of transformant showed that the transgene inherited stably. Plants transformed with other three types of modified Sb*EPSPS* genes did not show enough glyphosate resistance.

Key words: Maize; Transgene; *EPSPS*; Glyphosate-resistant

N-(膦羧甲基)甘氨酸, 又名草甘膦, 是一种内吸传导型慢性广谱灭生性除草剂, 对一年及多年生杂草非常有效。1972 年, 美国贝尔德 D.D. 等发现了草甘膦的除草性质, 随后由孟山都公司开发生产, 到上世纪 80 年代已经成为世界除草剂的重要品种^[1]。草甘膦主要抑制植物体内 EPSP 合酶, 从而抑制莽草酸向芳香族氨基酸的转化, 使蛋白质的合成受到干扰导致植物死亡^[2]。在作物体内表达对草甘膦不敏

感的 EPSP 合酶可以培育出抗草甘膦作物。

从上世纪 80 年代, 人们便开始寻找对草甘膦不敏感的 *EPSPS* 基因^[3]。在被草甘膦长期污染的环境中能够找到具有草甘膦抗性的生物, 从而克隆抗性基因^[4]。对抗草甘膦 *EPSPS* 基因的研究发现, 往往是 1~2 个保守氨基酸的变化便能产生草甘膦抗性^[5], 随后便开始对作物的 *EPSPS* 基因进行修饰, 并获得了对草甘膦有较好耐受性的 *EPSPS* 基因^[6]。农杆菌来源的 *CP4 EPSPS* 基因是由于其 100 位的甘氨酸突变成了丙氨酸(G100A), 从而产生了草甘膦抗性, 而将大肠杆菌的 *EPSPS* 基因进行相同的修饰并不能获得预期的效果^[7]。将不同作物来源的 *EPSPS* 基因进行相同位点修饰后是否能够获得对草甘膦的抗性及其抗性的程度如何一直没有研究报道。

收稿日期: 2013-05-13

作者简介: 赵海铭(1982-), 男, 辽宁抚顺人, 博士, 主要从事玉米功能基因组研究。Tel: 13811510506

E-mail: haiming223@163.com

赖锦盛为本文通讯作者。E-mail: jilai@cau.edu.cn

本文对高粱 *EPSPS* 基因进行不同位点的修饰,其中 P106S 位点的修饰转化玉米后获得了优良的转化事件,而其他位点的修饰并没有获得足够抗性的转化事件,说明尽管 *EPSPS* 基因草甘膦结合位点的变化在赋予其草甘膦抗性中起着重要的作用,但 *EPSPS* 基因的来源也至关重要。

1 材料与方法

1.1 植物材料

使用的植物材料有高粱自交系 BTX623, 玉米自交系 HiIIA、HiIIB^[8]、B73 及郑 58。

1.2 实验方法

1.2.1 基因结构预测

根据水稻中对 *EPSPS* 基因的报道,在 <http://www.phytozome.net/orghum.php> 网站,通过同源比对确定高粱 *EPSPS* 基因序列,利用 Fgenesh 软件对该基因结构预测,获得高粱 *EPSPS* 基因 mRNA 及氨基酸序列。

1.2.2 *EPSPS* 基因的定点修饰

根据 *EPSPS* 基因在玉米、牛筋草、水稻及矮牵牛中的相关报道^[9,10],对高粱 *EPSPS* 基因进行 4 种点突变设计:T102I、P106S、P106L、G101A,序列合成及点突变委托上海生工生物工程有限公司完成,在合成时将 *EPSPS* 基因第 75 位的 C 变为 T,从而消除 SacI 酶切位点,方便后期酶切。

1.2.3 植物表达载体的构建

以玉米自交系 B73 基因组为模板扩增 Ubiquitin 启动子,启动子两端添加 PstI 酶切位点;以 pCAM-BIA3301 为模板扩增 35SpolyA 终止子序列,5'端添加 KpnI 酶切位点,3'端添加 SacI 酶切位点。合成的 *EPSPS* 基因 5'端添加 BamHI 酶切位点,3'端添加 KpnI 酶切位点。首先利用 PstI 酶切 Ubiquitin 启动子与 pUC19 进行两个片段的连接,获得 pUC19+Ubiquitin,然后利用 KpnI、SacI 双酶切 pUC19+Ubiquitin 和 35SpolyA,连接获得 pUC19+Ubiquitin+35SpolyA 的克隆;最后利用 BamHI、KpnI 双酶切 pUC19+Ubiquitin+35SpolyA 及合成的 *EPSPS* 基因进行连接,得到 pUC19+Ubiquitin+*EPSPS*+35SpolyA;HindIII 和 SacI 双酶切可以获得完整的表达元件,用于基因枪转化。

1.2.4 基因枪转化玉米

本研究采用基因枪共转化的方法,将目标基因转入受体材料中。首先,分别回收 4 种定点修饰的高粱 *EPSPS* 基因表达元件,将表达元件分别与 *bar* 基因混合(*EPSPS:bar*=3:1),金粉包埋后利用基因枪

轰击玉米 HiIIA × HiIIB 幼胚,经短暂恢复后,在 N₂ 盐培养基上诱导愈伤组织;然后将愈伤组织转移到含有双丙胺磷的 N₂ 盐培养基上进行筛选,经 2~3 轮的筛选获得抗性愈伤组织,对抗性愈伤组织进行再生,获得转基因植株。

1.2.5 转基因玉米的 PCR 检测

利用天根生化科技有限公司生产的 RNA 提取试剂盒提取转基因植株的总 RNA,反转录获得 cDNA,通过 PCR 进行检测,检测引物序列:F:5'-TGAGGGAGAGACCCATCGGC-3',R:5'-ACTGAA-TTAACGCCGAATTAATTCG-3',扩增片段长度为 1 184 bp。检测体系为 cDNA 模板 2 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,Taq 酶 0.2 μL,dNTP 1.6 μL,10 × Buffer 2 μL,ddH₂O 13.2 μL。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 45 s,59℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,共进行 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增后进行电泳检测,以受体材料为负对照,ddH₂O 为空白对照,质粒为阳性对照。

1.2.6 转基因玉米的 Southern 杂交检测

利用 CTAB 法大量提取新鲜幼嫩叶片的 DNA,在加入预冷异丙醇析出沉淀后,用毛细管将沉淀挑出可以保证 DNA 的完整性并减少杂质。分别用 HindIII、XbaI 酶切样品 DNA,酶切体系为 DNA 15~20 μg,内切酶 15 μL,10 × Buffer 30 μL,加水补至 300 μL,充分混匀后过夜酶切;通过乙醇沉淀将酶切体系浓缩为 50~80 μL,然后以 1.5 V/cm 电泳 12 h,电泳后按照传统的方法进行后续操作^[11]。杂交探针是以 F:5'-ACTGCCCACCCGTTCTGATC-3',R:5'-ACATCGAAGTAGTCGGGGAAG-3'为引物扩增的 DNA 片段,反应体系及条件同 1.2.5。

1.2.7 目标基因表达量检测

分别提取散粉期转基因植株的根、茎、叶、花丝、花粉、苞叶及授粉后 20 d 子粒的 RNA,通过反转录获得 cDNA,利用 real-time PCR 检测目标基因在不同组织的表达量,以非转基因为对照。*EPSPS* 基因检测引物序列:F:5'-TTGCTGTGTTGCCCTCTTT-3',R:5'-TGATGATGCAGTAGTCCGGC-3';内参基因 GAPDH 检测引物序列:F:5'-AGCAGGTCGAGCATCTTCG-3',R:5'-CTGTAGCCCCACTCGTTGTC-3'。PCR 反应体系为 2 × SYBR Green mix 12.5 μL,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,DyeII 0.5 μL,cDNA 2 μL,ddH₂O 8 μL。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 2 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 34 s,共进行 40 个循环;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 1 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 15 s。

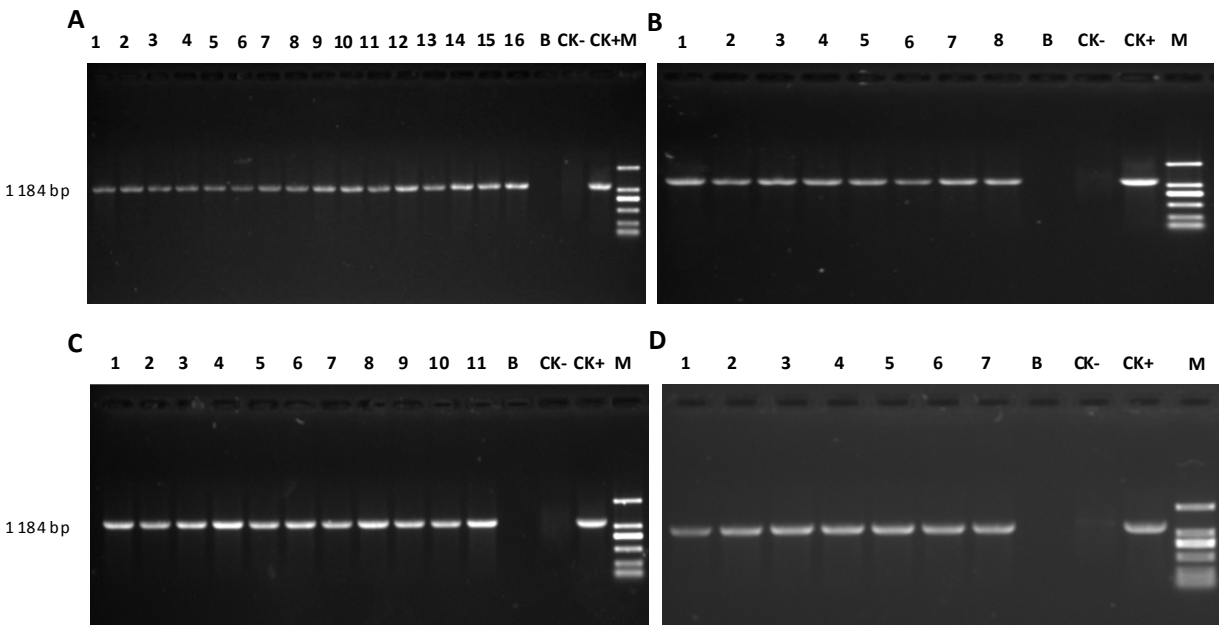
1.2.8 转基因玉米的草甘膦抗性测定

对生长至 4~5 片叶的转基因及对照玉米喷施农达,正常施药浓度为 200 mL 农达母液稀释为 40 L,喷施 667 m²,4 倍施药浓度为 800 mL 农达母液稀释为 40 L,喷施 667 m²。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的检测

提取 T₀ 代转基因玉米叶片 RNA,通过 RT-PCR 检测目标基因表达情况。图 1 结果表明,4 个转化载体均有 mRNA 水平阳性的转化事件,其中 T102I、P106S 有 16 个阳性事件,P106S 有 8 个阳性事件,P106L 有 11 个阳性事件,G101A 有 7 个阳性事件。



注:A 为转 CL37 基因玉米 PCR 分析,1~16 分别为转基因玉米 CL37-1~CL37-16;
B 为转 CL38 基因玉米 PCR 分析,1~8 分别为转基因玉米 CL38-1~CL38-8;
C 为转 CL39 基因玉米 PCR 分析,1~11 分别为转基因玉米 CL39-1~CL39-11;
D 为转 CL40 基因玉米 PCR 分析,1~7 分别为转基因玉米 CL40-1~CL40-7;
B 为 ddH₂O(空白对照);CK- 为非转基因植株(阴性对照);CK+ 为质粒(阳性对照);M 为 DNA 标准分子量(DL2000)。
Note: A, PCR analysis of CL37 transgenic maize. 1-16, transgenic plants, CL37-1 - CL37-16 respectively;
B, PCR analysis of CL38 transgenic maize. 1-8, transgenic plants, CL38-1 - CL38-8 respectively;
C, PCR analysis of CL39 transgenic maize. 1-11, transgenic plants, CL39-1 - CL39-11 respectively;
D, PCR analysis of CL40 transgenic maize. 1-7, transgenic plants, CL40-1 - CL40-7 respectively;
B, blank H₂O control; CK-, negative non-transgenic plant control; CK+, positive plasmid DNA control; M, marker(DL2000).

图 1 转基因玉米的 RT-PCR 检测
Fig.1 RT-PCR analysis of transgenic maize

2.2 田间抗性鉴定

表 1 CL38-1 转化事件抗性表现

Table 1 The resistance comparison of CL38-1 event

处 理	株 高	花 期	单穗粒重(g)
Treatment	(cm)	(d)	Kernel weight
	Plant height	Flowering time	per spike
未喷施草甘膦	167.8 ± 2.9	68.3 ± 0.7	74.3 ± 3.7
喷施 4 倍草甘膦	167.3 ± 1.7	68.1 ± 0.4	74.3 ± 0.8

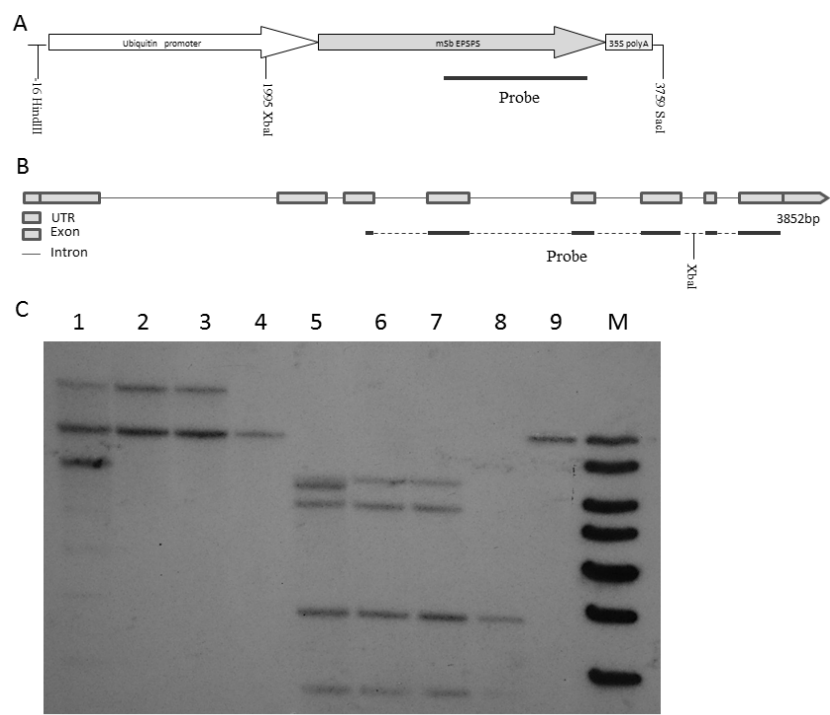
注:3 个重复,每个重复测定 9~10 株。
Note: Three repeats, 9-10 plants for each repeat.

对 mRNA 水平为阳性的转化事件喷施 1 倍农达,抗性事件与郑 58 回交 3 代,然后利用 4 倍农达对抗性事件进一步鉴定。表 1 结果表明,转化 P106S 修饰的 *EPSPS* 基因获得的转化事件 CL38-1 在喷施 4 倍农达后,与未喷施植株相比株高、散粉期及产量无显著差异(表 1)。

2.3 抗性转化事件 CL38-1 拷贝数检测

通过 southern 杂交鉴定目标基因在 T₀、T₁、T₂ 代转基因玉米中整合的稳定性。图 2 结果表明,目标基因 T₀ 代时含有 3 个拷贝,而 T₁、T₂ 代只有两个拷贝,

且条带所在位置一致,说明目标基因从 T_0 到 T_1 代时丢失了一个拷贝,但剩余的拷贝已经稳定,由于高粱 *EPSPS* 基因与玉米的 *EPSPS* 基因有 98% 同源性,因此,阴性对照中也含有杂交条带。



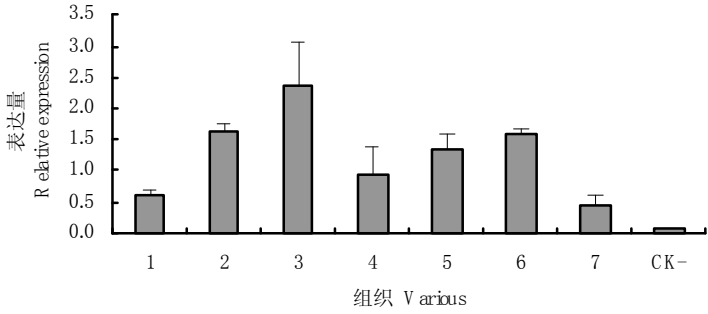
注:A 为探针在载体中位置示意图;B 为探针在玉米内源 *EPSPS* 基因中位置示意图;C 为 Southern 杂交结果。
1、5 为 CL38-1 T_0 代 DNA;2、6 为 CL38-1 T_1 代 DNA;3、7 为 CL38-1 T_2 代 DNA;4、8 为阴性对照(受体植株 DNA);9 为阳性对照(pHM+CL38 EPSPS);M 为 1 kb ladder。1~4 样品 DNA 为 HindIII 酶切;5~8 为 XbaI 酶切。
Note: A: Labeled probe position in vector. B: Labeled probe position in maize endogenous *EPSPS*. C: The result of Southern blot.
1 and 5, DNA from CL38-1 T_0 plant; 2 and 6, DNA from CL38-1 T_1 plant; 3 and 7, DNA from CL38 T_2 plants; 4 and 8, negative control (DNA from non-transgenic plant); 9, positive control (labeled probe hybridized with pHM+CL38 EPSPS); M, Marker (1kb ladder); lane 1-4 DNA was digested with HindIII; lane 5-8 DNA was digested with XbaI.

图 2 转基因玉米 CL38-1 的 Southern 杂交检测
Fig.2 Southern blotting analysis of transgenic maize CL38-1

2.4 CL38-1 转化事件不同组织表达量检测

通过 real-time PCR 对转化事件不同组织目标基因表达量进行检测。图 3 结果表明,目标基因在各

个组织中均有表达,但不同组织表达量差异较大,在叶片中表达量最高,在种子中表达量最低(图 3)。



注:1~7 分别为 CL38-1 转化事件的根、茎、叶、花丝、花粉、苞叶及种子;CK- 为非转基因植株叶片。
Note: 1-7 were root, stem, leaf, silk, pollen, husk and seed of CL38-1 event, respectively; CK-, negative control(RNA from non-transgenic plant).

图 3 转基因玉米 CL38-1 不同组织目标基因表达量分析
Fig.3 Expression analysis of various tissues in CL38-1 event

3 结论与讨论

从抗草甘膦微生物中克隆抗性基因需要进行微生物的筛选工作,筛选到抗性微生物后还需进行文库构建及克隆筛选等大量工作^[12]。通过同源克隆的方法快速克隆未报道物种的 *EPSPS* 基因,并对草甘膦结合位点进行修饰,转基因验证修饰后 *EPSPS* 基因的功能,有利于快速地克隆到优良的抗性基因。孟山都通过对玉米 *EPSPS* 基因 T102I 及 P106S 的修饰,获得了优良的转化事件 GA21,并实现了产业化。本文通过对高粱 *EPSPS* 基因进行相应的修饰,转化玉米后并没有得到抗性事件,其中 P106S 的修饰取得了很好的效果。G101A 虽然也获得了有一定抗性的转化事件,但并不能满足生产要求,说明不同物种来源 *EPSPS* 基因经过相同位点修饰后抗性效果存在差异,在进行相关研究时需要尝试进行多种修饰。

高粱 *EPSPS* 基因在已有的文献中并没有报道,通过高粱基因组数据库确定了高粱 *EPSPS* 基因全长,将该基因的草甘膦结合位点进行修饰后,构建了植物表达载体,利用基因枪转化到玉米中,通过田间鉴定筛选到一个抗性显著的转化事件,对该转化事件不同世代检测确定目标基因在基因组中整合已经稳定,说明该转化事件已基本达到培育抗草甘膦玉米的需求。

参考文献:

- [1] Troutman B C, King J W, Frans R E. Wild Garlic(*Allium vineale*) control with glyphosate[J]. Weed Science, 1981, 29: 717-722.
- [2] Steinrücken H C, Amrhein N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase[J]. Bio-

chemical and Biophysical Research Communications, 1980, 94 (30): 1207-1212.

- [3] Comai L. Inhibition resistant 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate synthetase, production and use[J]. United States Patent, 1985, US4535060.
- [4] Barry G F, Kishore G M, Padgett S R, et al. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases[J]. United States Patent, 1994, US5633435.
- [5] Padgett S R, Re D B, Gasser C S, et al. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(33): 22364-22369.
- [6] Spencer M, Mumm R, Gwyn J. Glyphosate resistant maize lines [J]. United States Patent, 2000, US6040497.
- [7] Funke T, Han H, Healy-Fried M L, et al. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops [J]. PNAS, 2006, 103(35): 13010-13015.
- [8] Armstrong C L, Green C E, Phillips R L. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response[J]. Maize Genetics Cooperation News Letter, 1991, 65: 92-93.
- [9] Baerson S R, Rodriguez D J, Tran M, et al. Glyphosate-resistant Goosegrass identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase[J]. Plant Physiology, 2002, 129: 1265-1275.
- [10] Zhou M, Xu H L, Wei X L, et al. Identification of a glyphosate-resistant mutant of rice 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase using a directed evolution strategy[J]. Plant Physiology, 2006, 140: 184-195.
- [11] Sambrook J, Russell D W, Huang P T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Science Press, Beijing China, 2001.
- [12] Tian Y S, Xiong A S, Xu J, et al. Isolation from *Ochrobactrum anthropi* of a novel class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase with high tolerance to glyphosate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(17): 6001-6005.

(责任编辑:朴红梅)