

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01051

## 转 *OsCDPK7* 基因水稻的培育与耐盐性分析

王镭, 才华, 柏锡, 李丽文, 李勇, 朱延明

东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

**摘要:** 以 4℃ 处理的水稻品种辽盐 241 植株叶片总 RNA 为模板, 用基因特异引物通过 RT-PCR 扩增出 1 700 bp 的 *OsCDPK7* 基因。该基因序列比已报道的基因序列(GenBank 登录号: AB042550)缺失了 26 个氨基酸, 而丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性中心和钙结合结构域完整, 具备钙依赖的蛋白激酶活性。构建了由组成型启动子 E12 调控的 *OsCDPK7* 基因植物表达载体, 利用农杆菌介导法转化水稻, 经 Km 筛选及 Southern 杂交验证, 获得 10 株转基因植株。耐盐性分析表明: *OsCDPK7* 基因的组成型表达提高了 T<sub>2</sub> 代转基因植株的耐盐性, 部分转基因水稻在 0.2 mol/L NaCl 培养基中能够萌发; 幼苗期水稻经 0.4 mol/L NaCl 浇灌 10 d, 去除胁迫后能恢复正常生长; 而对照在以上情况下均不能萌发和恢复。结果表明, 利用植物信号转导过程中的调控因子能够提高转基因作物的耐盐性。然而, 在不同耐性的转基因植株中, *OsCDPK7* 基因的表达有一定的差异。

**关键词:** *OsCDPK7* 基因; 转基因水稻; 耐盐性

## Cultivation of transgenic rice plants with *OsCDPK7* gene and its salt tolerance

WANG Lei, CAI Hua, BAI Xi, LI Li-Wen, LI Yong, ZHU Yan-Ming

College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** A 1 700 bp DNA fragment, *OsCDPK7* gene, was cloned with RT-PCR from liaoyan241 leaf treated under a low temperature of 4℃. Compared to the *OsCDPK7* gene reported before (GenBank accession No. AB042550), this fragment, lack of 26 amino acids, possesses the activity of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase because of a complete integration of the Ca<sup>2+</sup> binding structure domain and Ser/Thr protein kinase activity center. Plant expression vector was constructed, *OsCDPK7* gene was regulated by E12 promoter. *OsCDPK7* gene was transferred into rice via *Agrobacterium*-mediated method. After Km screening and Southern blot, 10 transgenic plants were obtained. The analysis on the salt tolerance showed that the expression of *OsCDPK7* gene composition enhanced the salt tolerance of T<sub>2</sub> transgenic plants, part of T<sub>2</sub> transgenic seeds could germinate in 0.2 mol/L NaCl medium, and T<sub>2</sub> transgenic young plants could rejuvenate after treatment with 0.4 mol/L NaCl for 10 days, while the controlled plants could not germinate and died in salt stress. This research finding proved that the regulation factor of the plant signal transduction could enhance the salt tolerance of transgenic plants, while *OsCDPK7* expression was different in the different tolerance transgenic plants.

**Keywords:** *OsCDPK7* gene; transgenic rice; tolerance

收稿日期: 2007-12-25; 修回日期: 2008-02-05

基金项目: 黑龙江省科技厅重大攻关项目(编号: GA06B103)[Supported by the Major Research Project of Science & Technology Department of Heilongjiang Province (No. GA06B103)]

作者简介: 王镭(1974-), 男, 黑龙江人, 博士研究生, 研究方向: 植物抗逆基因工程。E-mail: lw0256@163.com

通讯作者: 朱延明(1955-), 男, 山东人, 教授, 研究方向: 植物基因工程与分子生物学。E-mail: ymzhu2001@hotmail.com

陆生植物生存环境的局限性常常使植物受到干旱、高盐和低温的影响,这是造成植物渗透胁迫(亦称水分胁迫)的主要原因。这种胁迫影响植物的生长和发育,最终导致作物产量下降。如何提高作物对逆境的耐受性,增加作物产量,是农业生产亟待解决的问题。

细胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  水平在应答多种刺激时会发生改变,这些  $\text{Ca}^{2+}$  水平变化经常伴随蛋白磷酸化的改变,在植物中这一过程主要是由钙依赖/钙调素不依赖的蛋白激酶(Calcium-dependent and calmodulin-independent protein kinases, CDPKs)完成的<sup>[1]</sup>。在逆境下 CDPK 基因表达量的增加,可以促进蛋白质磷酸化产生,激活信号转导途径,最终产生响应蛋白,应答胁迫反应<sup>[2~5]</sup>。Urao等<sup>[6]</sup>从拟南芥中分离了编码 CDPK 的 2 个 cDNA 克隆(*cATCDPK1* 和 *cATCDPK2*), Northern blot 分析表明在干旱和高盐胁迫下,这两个基因的 mRNA 被迅速诱导。Saijo等<sup>[7]</sup>利用转基因水稻阐明了 *OsCDPK7* 的生理功能,认为植物对干旱、高盐和冷胁迫的忍耐程度与 *OsCDPK7* 的表达水平有关。以上研究表明,CDPKs 参与植物逆境胁迫及信号传导过程,并起到重要的作用。如果将 CDPK 基因转入作物,势必可以综合的提高转基因作物的耐盐性。本研究以水稻为受体材料,培育转 CDPK 基因的水稻,并对转基因水稻的耐盐性进行分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料

耐盐水稻辽盐 241(基因克隆材料)、五优稻 1 号(转基因受体材料)均由东北农业大学水稻研究室提供。

#### 1.1.2 菌株与质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 JM109、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404、中间载体 pCE12 由东北农业大学植物生物工程研究室提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 水稻 *OsCDPK7* 基因的克隆及植物表达载体的构建

将耐盐水稻辽盐 241 的幼苗经 4 低温处理 30 min。提取叶片总 RNA,反转录,以基因

(GenBank 登录号: AB042550)特异引物(P1: 5'-GGATCCAGAGGAGGAGGGATTAGGG-3'; R1: 5'-GGATCCAGGTATAGACGGGATCTCATTT-3')进行 PCR 扩增。将目的片段进行克隆、测序,并构建由 E12 启动子调控的 *OsCDPK7* 基因植物表达载体。

#### 1.2.2 *OsCDPK7* 基因对水稻的遗传转化

取水稻成熟种子去颖,消毒后接种在继代培养基上(含 3 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基),28 暗培养。2~3 周后选取致密的愈伤组织颗粒(直径 3~5 mm)用于侵染。28 暗光下共培养 3~4 d,愈伤组织用含 100 mg/L 阿莫西林克拉维酸钾液体培养基振荡培养 30 min 除菌,用无菌滤纸吸干表面水分,转移到筛选培养基培养,同时诱导再生植株,2 周继代 1 次。愈伤组织在筛选分化培养基上继代 2~3 次即开始分化。当抗性苗高 1~2 cm 后,将其移至生根培养基(含 1 mg/L IBA 的 MS 培养基)中,待其根系发达后进行驯化移栽。

#### 1.2.3 转 *OsCDPK7* 基因水稻植株 Southern 检测

采用 CTAB 法提取植物总 DNA。由于 *OsCDPK7* 基因来源于水稻, Southern 杂交便以筛选标记 *bar* 基因作为检测的靶基因。对水稻基因组 DNA 进行双酶切,参照 Roche 公司地高辛标记及检测试剂盒进行实验。

#### 1.2.4 转基因水稻 $T_1$ 代植株的筛选

$T_1$  代转基因水稻长到 4 叶 1 心期时,用除草剂(成分 Bialaphos)进行喷洒,7 d 后检测除草剂的抗性,并辅助 PCR 进行筛选。

#### 1.2.5 转基因水稻耐盐性分析

##### 1.2.5.1 转基因水稻种子萌发期耐盐性分析

将灭菌后的  $T_1$  代转基因植株种子及未转基因种子分别接种到含有 0.2 mol/L NaCl 的培养基上,(26±1) 暗培养 3 周,调查其发芽率及幼苗生长情况。

##### 1.2.5.2 转基因水稻苗期耐盐性分析

$T_2$  代转基因水稻长到四叶一心期时使用 0.4 mol/L NaCl 溶液进行浇灌处理,用长势相同的非转基因水稻植株作为对照,也进行相同的处理。处理期间使幼苗始终处于 0.4 mol/L NaCl 浓度之中,10 d 后去除盐胁迫,观察恢复情况。

另外,通过 Real-time PCR 分析耐盐水稻植株中 *OsCDPK7* 基因的表达差异。使用水稻  $\beta$ -actin(NM-

197297) 基因作为内参, 引物为: P2: 5'-CCATCGCCATTGCCACC-3', R2: 5'-CATCCCAACCATAACGCCTG-3'; *OsCDPK7* 基因的引物为 P3: 5'-TCAATCCTCGCCCAAAG-3'), R3: 5'-CCCAGCGATTTCTCTCTC-3'。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻 *OsCDPK7* 基因的克隆及植物表达载体的构建

采用 RT-PCR, 扩增出 1 700 bp 目的片段, 将其进行克隆并测序。将该序列与 GenBank 上的 *OsCDPK7* 基因 CDS 序列相比, 157~234 处缺失了 78 个核苷酸, 编码的蛋白序列缺失了 53~78 的 26 个氨基酸, 缺失部分位于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性中心(S\_TKc)和钙结合(EFh)结构域之外。在玉米中也存在类似的缺失, 推测该缺失是基因原有的缺失。但是也不排除是受其他因素影响造成的, 如: 逆境外界因素、microRNA 修饰调节等, 还有待进一步的研究确定。但是该基因产物具备钙依赖的蛋白激酶活性, 可以用于遗传转化水稻, 以提高水稻的耐盐性。

构建的植物表达载体 pCC7E12 由组成型启动子 E12 调控的 *OsCDPK7* 基因和 *bar* 筛选标记基因组成 (图 1)。

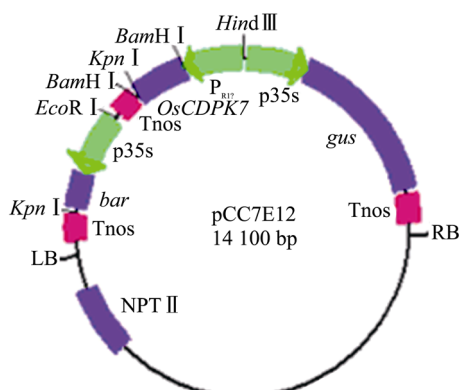


图 1 植物表达载体 pCC7E12

Fig. 1 Plant expression vector pCC7E12

### 2.2 水稻再生植株的获得与分子生物学检测

通过农杆菌介导的方法对水稻愈伤组织进行转化, 并在分化阶段利用卡那霉素进行筛选, 获得了大量的抗性植株。提取抗性幼苗基因组 DNA, 进行 PCR 检测(检测结果略), 对 PCR 阳性的植株进行

Southern blot。检测结果表明, *OsCDPK7* 基因已整合到水稻基因组中(图 2)。

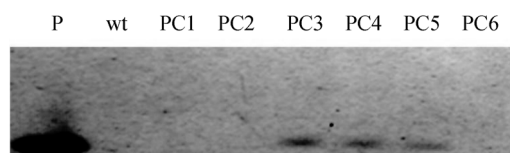


图 2 转 *OsCDPK7* 基因水稻植株 Southern blot 鉴定

P: pCC7E12 质粒 DNA; wt: 未转化对照植株; PC1~PC6: 转基因水稻植株。

Fig. 2 Southern blot of rice transformed with *OsCDPK7* gene

P: pCC7E12; wt: Wild-type plants; PC1 - PC6: Transgenic rice plants.

### 2.3 转基因水稻 T<sub>1</sub> 代植株的筛选

水稻 4 叶 1 心期幼苗经 Bialaphos 处理后, 转基因植株生长良好, 而对照逐渐枯萎死亡, 表明 T<sub>1</sub> 代转基因水稻在苗期具有除草剂抗性(图 3A)。PCR 分析结果与筛选结果基本一致(图 3B)。说明用除草剂筛选转基因植株是一个较为有效的方法。

### 2.4 转基因水稻的耐盐性分析

#### 2.4.1 转基因水稻萌发期的耐盐性分析

转基因植株种子在 0.2 mg/L NaCl 培养基上, 3 个转基因株系能正常发芽生长, 而对照植株不能发芽, 说明转基因株系在发芽期具有明显的耐盐性(图 4A)。

#### 2.4.2 转基因水稻幼苗期的耐盐性分析

转基因株系 T<sub>2</sub> 代幼苗在 0.4 mol/L NaCl 条件下, 叶子尖部发生部分萎蔫、卷曲现象, 颜色变白, 但是茎部仍然为绿色。处理 10 d, 移栽至无盐土壤中, 生长有所滞缓, 但是能再发出新叶, 恢复正常生长。对照植株在处理 10 d 后叶子全部变白, 卷曲, 死亡(图 4B)。检测了 10 株转基因植株, 只有 2 个株系是具有明显抗性的。从表型看, 这 2 个株系的耐盐程度还是有差异的。利用 Real-time PCR 检测 *OsCDPK7* 基因在以上 2 个株系中表达的差异, 如表 1。从 Real-time PCR 的结果看, 在这 2 个耐盐株系中 *OsCDPK* 基因的表达并不相同。由此推测 *OsCDPK* 基因表达量的差异可能会影响到植株对盐胁迫耐性的不同。然而, 耐盐差异的直接原因还需进一步的验证研究。

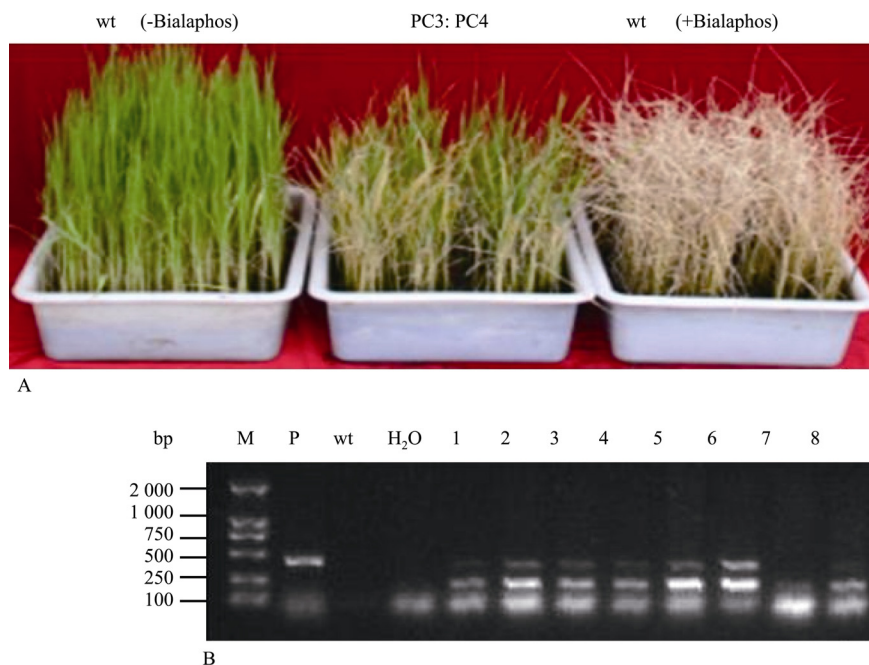
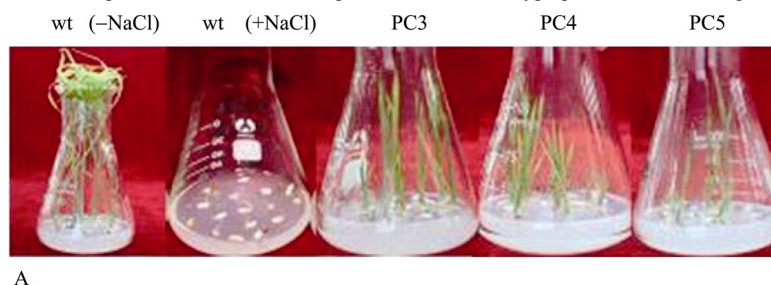


图 3 转基因水稻  $T_1$  代植株抗除草剂筛选及 PCR 检测

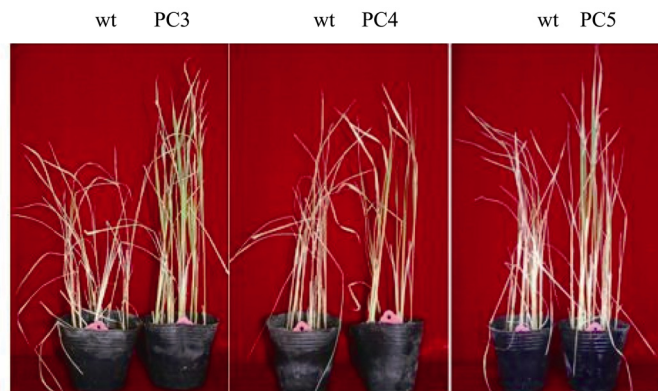
A:  $T_1$  代转基因植株幼苗抗除草剂筛选; B:  $T_1$  代转基因植株 PCR 检测。PC3/PC4: 转基因株系; -Bialaphos: 不添加除草剂 Bialaphos; + Bialaphos: 添加除草剂 Bialaphos; M: DNA 分子量标准; P: pCC7E12 质粒 DNA; wt: 未转化对照植株; 1-8: 转基因水稻  $T_1$  代植株。

Fig. 3 Bialaphos screening and PCR analysis of  $T_1$  transgenic rice

A: Bialaphos screening of  $T_1$  transgenic young plants; B: PCR analysis of  $T_1$  transgenic plants. PC3/PC4: Transformed lines; -Bialaphos: Has not Bialaphos; + Bialaphos: Has Bialaphos; M: DNA maker; P: pCC7E12; wt: wild-type plant; 1-8:  $T_1$  transgenic plants.



A



B

图 4 转基因水稻  $T_1$  代种子及  $T_2$  代幼苗的耐盐性分析

A:  $T_1$  代转基因植株种子耐盐性检测; B:  $T_2$  代转基因植株幼苗耐盐性检测。wt: 未转化对照植株; PC3~PC5: 转基因株系 - NaCl: 不添加 NaCl; NaCl: 添加 NaCl。

Fig. 4 Analysis NaCl tolerance of  $T_1$  transgenic seeds and young plants

A: NaCl tolerance of  $T_1$  transgenic seeds; B: NaCl tolerance of  $T_2$  transgenic young plants. wt: Untransformed wild-type plant; PC3-PC5: Transformed lines; - NaCl: Has not NaCl; + NaCl: Has NaCl.



表 1 转 *OsCDPK7* 基因 T<sub>2</sub> 代耐盐水稻植株的 Real-time PCR 检测  
Table 1 Real-time PCR of NaCl tolerance of T<sub>2</sub> generation transgenic rices

样品 Sample	基因 Genes	CT	ΔCT (CT <sub>ck</sub> - CT <sub>x</sub> )	ΔΔCT- (ΔCT <sub>x</sub> -ΔCT <sub>内参</sub> )	2 <sup>-ΔΔCT</sup>
H <sub>2</sub> O	<i>OsCDPK7</i>	—	—	—	—
H <sub>2</sub> O	<i>β-actin</i>	—	—	—	—
CK	<i>OsCDPK7</i>	23.67	—	0	1
CK	<i>β-actin</i>	24.87	—	0	1
<i>OsCDPK7</i> -3	<i>OsCDPK7-1</i>	20.30	3.37	2.05	2 <sup>2.05</sup>
<i>OsCDPK7</i> -3	<i>β-actin</i>	23.49	1.32	—	—
<i>OsCDPK7</i> -4	<i>OsCDPK7-2</i>	22.39	1.28	0.04	2 <sup>0.04</sup>
<i>OsCDPK7</i> -4	<i>actin</i>	23.53	1.24	—	—

### 3 讨论

有研究表明, *OsCDPK7* 的过量表达加强了盐、干旱胁迫应答基因的诱导<sup>[8]</sup>, 这说明CDPKs可能在抗干旱和耐盐胁迫信号中起着正调节作用, 促进植物胁迫应答基因的表达。本研究结果说明, 利用植物信号转导过程中的调控因子能够提高转基因作物的耐盐性, 相对于一个功能基因要有较好的效果, 并且*OsCDPK7* 的表达量可能与植株的耐盐性具有一定的关系。如果使用强的启动子, 使*OsCDPK7* 基因能够高效表达, 也许可以有效的提高耐盐性。因此, 可以将作物耐盐基因工程的研究重点转移到信号传导中的调节因子上来, 如蛋白激酶和转录因子等, 通过加强调控因子的作用, 提高作物对环境胁迫的耐性。

然而, *OsCDPK7* 与环境逆境的应答关系及其机理并不是很清楚, *OsCDPK7* 蛋白激活下游哪些基因的表达来应答盐胁迫信号还需要通过酵母双杂交或基因芯片等相应技术做进一步研究, 以明确*OsCDPK7* 在信号转导过程中的关键作用。

### 参考文献(References):

[1] Sheen J. Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinas and stress signal transduction in plants. *Sciences*, 1996, 274: 1089–1092.

[2] Pestenaacz A, Erdei L. Calcium dependent protein kinas in maize and sorghum induced by polyethylene glycol. *Physiol Plant*, 1996, 97: 36430–36439. [\[DOI\]](#)

[3] LIU Guan-Shan, CHEN Jia. Roles of calcium dependent protein kinas (CDPKs) in plant calcium signal transduction. *Chinese Bulletin of Botany*, 2003, 20(2): 160–167. 刘贯山, 陈珈. 钙依赖蛋白激酶(CDPKs)在植物钙信号转导中的作用. *植物学通报*, 2003, 20(2): 160–167.

[4] Lino B, Carrillo-Rayas MT, Chagolla A, Gonzalez de la Vara LE. Purification and characterization of a calcium-dependent protein kinas from beetroot plasma membranes. *Planta*, 2006, 225(1): 255–268. [\[DOI\]](#)

[5] Subbaiah CC, Bush DS, Sachs MM. Mitochondrial contribution to the anoxic Ca<sup>2+</sup> signal in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiol*, 1998, 118(3): 759–771. [\[DOI\]](#)

[6] Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K. Two genes that encode Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 1994, 244: 331–340. [\[DOI\]](#)

[7] Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, Shimamoto K, Izui K. Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J*, 2000, 23: 319. [\[DOI\]](#)

[8] Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, Shimamoto K, Izui K. Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J*, 2000, 23(3): 319–327. [\[DOI\]](#)