

# 水稻种子特异性谷蛋白 GluB1 启动子在水稻愈伤组织中驱动外源基因表达

赵艳\* 唐湧洲 史玉倩

(浙江工商大学 食品与生物工程学院, 杭州 310018; \*通讯联系人, E-mail: yanzhao9918@163.com)

## Rice Seed-specific Glutenin GluB1 Promoter Drives Exogenous Gene Expression in Rice Callus

ZHAO Yan\*, TANG Yongzhou, SHI Yuqian

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China; \*Corresponding author, E-mail: yanzhao9918@163.com)

**Abstract:** 【Objective】The promoter of rice glutelin B1(pGluB1) has been intensively used to study high seed-special expression of exotic genes, and as a model to understand regulation mechanism of seed-storage protein genes. Former researchers reported that pGluB1 expressed only in rice seed endosperm with no expression activity in other tissues such as root, stem, leaf, sheath and glume etc. The present study is aiming to overcome the shortcoming of time consuming for screening of seed-special expression promoters. 【Methods】The expression vector pCambia1302-pGluB1sig-CTBIN-NOS, in which a fusion gene of the cholera toxin B subunit and human proinsulin (*CTBIN*) was driven by the 2.3 kb promoter sequence of rice glutelin GluB1 with its signal peptide (*pGluB1sig*), was transformed into the rice calli from mature embryo via *Agrobacterium*-mediated method. The expression of fusion gene *CTBIN* at both transcription and translation level was tested by RT-PCR and Western-blotting assay. 【Results】Among the seven transgenic calli clones, six clones of the fusion gene *CTBIN* were expressed at transcription level. The selected four clones subjected to Western-blotting assay were all fatherly verified in their expression at translation level. Additionally, according to the molecular weight, we speculated that the signal peptide (24 aa) of GluB1 at N-terminus of the fusion protein CTBIN has been excised successfully from callus cells of all the test clones. 【Conclusion】The rice seed-specific expression promoter pGluB1 can drive an exotic gene expression in callus, and the seed protein body subcellular-targeted signal peptide could be excised from callus cells. The results lay a foundation of the quick detection of expression activity of plant seed-specific expression promoters in callus and exploiting the mechanism of protein subcellular sorting selection in callus cells.

**Key words:** glutelin B1 promoter; signal peptide; rice; mature embryo calli; expression activity

**摘要:** 【目的】水稻谷蛋白启动子 GluB1(GluB1 promoter, pGluB1)常用于外源基因在种子中特异性高效表达的研究,也是研究种子储藏蛋白基因表达调控机制的模型。前人研究表明, pGluB1 只在水稻胚乳中表达,而在根、茎、叶片、叶鞘、颖壳等组织中均无表达活性。研究的目的是为了克服种子特异表达启动子筛选周期长的缺点。

【方法】将由 pGluB1 驱动的霍乱毒素 B 亚单位和重组胰岛素原组成的融合基因(a fusion gene of the cholera toxin B subunit and human proinsulin, *CTBIN*)表达载体 pCambia1302-pGluB1sig-CTBIN-NOS 经农杆菌介导法转化水稻成熟胚愈伤组织。通过 RT-PCR 和蛋白质印迹杂交试验检测融合基因 *CTBIN* 在水稻愈伤组织中的转录和翻译表达。

【结果】获得的 7 个转基因愈伤克隆中,有 6 个克隆的融合基因 *CTBIN* 在转录水平上表达。选取其中 4 个克隆进一步进行蛋白质印迹杂交试验检测证实融合基因 *CTBIN* 均在翻译水平上表达,而且从分子量大小推断融合蛋白包含的谷蛋白 GluB1 的 N-端信号肽序列(24 个氨基酸残基)在所测的愈伤组织细胞中均被成功切除。【结论】水稻种子特异性启动子 pGluB1 在愈伤组织中具有驱动外源基因表达活性,种子蛋白体亚细胞定位信号肽序列可在愈伤组织细胞中被切除。这为在愈伤组织细胞中快速检测种子特异表达启动子活性和探索愈伤组织中蛋白质的亚细胞分拣机制奠定了基础。

**关键词:** 谷蛋白 B1 启动子; 信号肽; 水稻; 成熟胚愈伤组织; 表达活性

中图分类号: Q755; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)01-0028-07

收稿日期: 2018-03-28; 修改稿收到日期: 2018-07-04。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31772100); 浙江省一流学科建设经费资助项目(食品科学与工程 1110JYN6517001G)。

启动子是 RNA 聚合酶识别并与之结合从而起始基因转录的一段 DNA 序列,通常位于基因上游。在错综复杂的基因表达调控网络中,启动子控制的基因转录起始是关键枢纽<sup>[1]</sup>。根据表达方式,启动子分为组成型、时空特异型、诱导型三类,其中,时空特异型表达启动子包括发育阶段特异表达和器官组织特异表达两种<sup>[2]</sup>。种子生物反应器是应用种子特异表达启动子驱动重组蛋白基因在谷物种子中大量表达生产目标蛋白的新兴生物技术。水稻作为主粮作物,由于种子产量大,基因转化技术成熟,容易规模化种植且自花授粉特性,具有天然的生态安全优势,很快发展为表达药用重组蛋白和口服疫苗的优选种子生物反应器<sup>[3]</sup>。种子特异表达启动子的筛选和克隆是构建种子生物反应器的重要环节。谷蛋白是水稻种子的主要储藏蛋白,含量可达种子蛋白总量的 80%,水稻谷蛋白分为 GluA、GluB、GluC 和 GluD 四个亚类,约由 15 个基因编码<sup>[4]</sup>。研究表明,谷蛋白 GluB1 启动子(GluB1 promoter, pGluB1) (1.3 kb 和 2.3 kb)是水稻胚乳特异性高效表达启动子,在转基因水稻根、茎、叶片、叶鞘、颖壳等组织均不表达<sup>[5-7]</sup>,也是水稻种子生物反应器生产重组药用蛋白研究中的热点启动子<sup>[8-9]</sup>。如 pGluB1 驱动大豆球蛋白基因(*glycinin*)在水稻中的高表达,其表达量可达种子蛋白总量的 4%~5%<sup>[10]</sup>,而且与非转基因对照相比,转基因水稻种子除蛋白含量增加 20%,水分含量有所降低外,其他营养成分及生理功效指标均无明显变化,食用安全性好<sup>[11]</sup>。2.3 kb 的 pGluB1 驱动人工合成杂交肽 7Crp 基因转化水稻后,每粒大米能获得约 60  $\mu$ g 重组 7Crp 蛋白<sup>[12]</sup>。然而,试验周期长是谷物种子特异表达启动子筛选的主要缺点,启动子能否在种子中正常表达要等转基因植株成熟结实后才能检测,寻找快速鉴定种子特异启动子的表达方法对种子生物反应器的构建具有突破性意义。

水稻 GluB1 的启动子也是研究种子储藏蛋白表达调控机制的重要模型<sup>[4,8]</sup>。前人研究一致认为 pGluB1 属于胚乳特异性高效表达启动子<sup>[5-7,10,12]</sup>,未见其在其他组织表达的有关报道。但某些种子特异性启动子也能在花粉中表达,如 Chesnokov 等<sup>[13]</sup>报道烟草种子特异性未知蛋白(unknown seed protein, USP)基因和豆球蛋白 B4(*legumin B4*, *LegB4*)基因的启动子,在中波红斑效应紫外线辐射诱导条件下,可驱动绿色荧光蛋白(*gfp*)报告基因在烟草花粉粒中表达。Russell 等<sup>[14]</sup>发现种子特异表达的玉米淀粉粒结合淀粉合成酶基因 *ZmGBS* 和水稻

ADPG 焦磷酸化酶基因 *OsAGP* 的启动子能同时在玉米胚乳和花粉中特异表达。但迄今尚未见植物种子特异表达启动子在愈伤组织中表达的有关报道。愈伤组织是植物细胞的一种特殊的脱分化状态,其代谢较普通细胞旺盛,蛋白质和核酸合成更为迅速,并具有形成体细胞胚和完整植株的潜能。我们课题组将水稻 pGluB1 启动子及其信号肽序列(GluB1 promoter and its signal peptide, pGluB1sig)驱动人工合成的霍乱毒素 B 亚基与人胰岛素原的融合基因(*cholera toxin B subunit fused with human proinsulin*, *CTBIN*)构建农杆菌表达载体并成功转化水稻<sup>[15]</sup>。本研究通过 RT-PCR、蛋白质印迹杂交试验证明 *CTBIN* 融合基因在水稻愈伤组织中也能成功表达,报道水稻种子特异启动子 pGluB1 在水稻成熟胚愈伤组织中的表达活性,为应用愈伤组织快速筛选鉴定种子特异表达启动子提供了新线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

粳稻品种日本晴水稻种子由中国水稻研究所馈赠。含有载体 pCAMBIA1302-pGluB1sig-CTBIN-NOS 的农杆菌 LBA4404 由本实验室构建保存。T-DNA 区结构框架示于图 1,其中包括绿色荧光蛋白(modified green fluorescent protein, mGFP)报告基因表达框和潮霉素磷酸转移酶(*Hygromycin B phosphotransferase*, *hpt*)抗性筛选标记基因表达框。

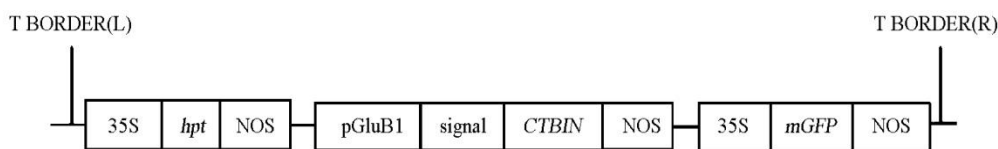
### 1.2 方法

#### 1.2.1 农杆菌介导法转化水稻愈伤组织

水稻成熟胚愈伤组织的诱导、继代培养和农杆菌介导转化参照文献[16]。本研究选用 NB 为基本培养基,愈伤组织的诱导及继代、筛选在 28℃ 黑暗条件下进行。挑选继代培养 3~5 d 的水稻胚性愈伤组织与含有载体 pCAMBIA1302-pGluB1sig-CTBIN-NOS 的农杆菌共培养 3 d 后,用无菌水冲洗 6 次,含有 250 mg/L 羧苄青霉素的无菌水浸泡杀菌 1 h,无菌滤纸上吹干,转移至筛选培养基(NB+2 mg/L 2,4-D+50 mg/L 潮霉素+250 mg/L 羧苄青霉素, pH 5.8)筛选两轮,每轮 14~20 d,挑选出抗性愈伤组织进行继代扩培和基因表达检测。

#### 1.2.2 抗性愈伤组织的 PCR 鉴定和报告基因 *gfp* 表达观察

使用卢江扬等的方法<sup>[17]</sup>提取水稻愈伤组织基因组 DNA,根据 *CTBIN* 基因序列设计引物对(正向



T BORDER(L)—左边界; T BORDER(R)—右边界; 35S—烟草花椰菜病毒 35S 启动子; *hpt*—潮霉素 B 磷酸转移酶基因; NOS—胭脂碱合成酶终止子; pGluB1—水稻 2.3 kb 谷蛋白 GluB1 启动子; signal—水稻谷蛋白 GluB1 信号肽序列; *CTBIN*—人工设计合成的胰岛素原与霍乱毒素 B 亚单位融合基因, C 端附加 KDEL ER 滞留信号基因序列; mGFP—修饰的绿色荧光蛋白基因。

T BORDER(L), The left boundary; T BORDER(R), The right boundary; 35S, Cauliflower mosaic virus 35S promoter; *hpt*, The hygromycin B phosphotransferase gene; NOS, Nopaline synthase terminator; pGluB1, Rice glutelin GluB1 promoter of 2.3 kb; signal, Rice glutelin GluB1 signal peptide gene sequence; *CTBIN*, Artificially designed and synthesized fusion gene sequence of cholera toxin B subunit and human proinsulin, with the KDEL ER retention signal gene sequence at the C terminus; mGFP, Modified green fluorescent protein gene.

图 1 表达载体 pCambia1302-pGluB1sig-CTBIN-NOS 的 T-DNA 结构

Fig. 1. Sketch map of T-DNA of pCambia1302-pGluB1sig-CTBIN-NOS vector.

引物 P1: 5'-TCTTCTCCTACACCGAGTCCCT-3'; 反向引物 P2: 5'-TCCTATTACAGCTCGTCCTTGC-3'; 扩增产物为 567 bp 片段, 由上海生工生物工程有限公司合成)对转基因愈伤组织克隆进行 PCR 鉴定。PCR 扩增程序如下: 95℃下预变性 5 min; 95℃下变性 30 s, 58℃下退火 30 s, 72℃下延伸 45 s, 30 个循环; 72℃下终延伸 10 min, 4℃下保存。

使用 DMI3000 型荧光显微镜在蓝色滤光片下观察绿色荧光蛋白基因 *GFP* 在水稻愈伤组织中的表达情况。

### 1.2.3 RT-PCR 检测转基因水稻愈伤组织中 *CTBIN* 基因表达

取约 100 mg 转基因水稻愈伤组织, 用 Trizol 法提取总 RNA。根据 *CTBIN* 序列采用 Primer 5.0 设计 RT-PCR 特异性引物(正向引物 P3: 5'-CAACAA GACCCCGCACGC-3'; 反向引物 P4: 5'-GGAGCA GATGGAGGTGCAGC-3')。以水稻  $\beta$ -actin 作为内标设计特异引物(正向引物 P5: 5'-CCGTGAGAA GATGACCCAG-3'; 反向引物 P6: 5'-GGCGAAACC CTCGTAGATGG-3')。反转录实验, gDNA 去除和 cDNA 第 1 链合成按逆转录试剂盒(TOYOBO, Revertra Ace qPCR RTMaster Mix with gDNA Remover)说明书操作。以 cDNA 作为模板 PCR 分别扩增 *CTBIN* 和  $\beta$ -actin, 体系如下: Premix Taq 10  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, 正反引物各加 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。反应程序如下: 95℃下预变性 3 min; 95℃下变性 30 s, 60℃下退火 30 s, 72℃下延伸 40 s, 30 个循环; 72℃下终延伸 10 min, 4℃下保存。1%琼脂糖凝胶电泳, 拍照。

### 1.2.4 Western blot 检测转基因水稻愈伤组织 *CTBIN* 蛋白表达

水稻愈伤组织可溶性总蛋白提取方法参照

Jang 等<sup>[18]</sup>, 略有修改。选取几个生长较好的转基因水稻愈伤组织克隆 0.1~0.2 g 于研钵中, 液氮迅速研磨成粉, 加入 500  $\mu$ L 蛋白质提取液(10 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-Cl pH 6.8, 30 mmol/L NaCl, 2% 巯基乙醇, 2 mmol/L PMSF), 4℃下浸提 1 h, 离心得上清即为蛋白提取液, Bradford 法<sup>[19]</sup>进行蛋白质含量的测定。SDS-PAGE 电泳的分离胶为 15%, 浓缩胶 5%, 保证每泳道蛋白上样量一致, 均为 20  $\mu$ g。SDS-PAGE 电泳结束后, 用电转移法转移到 PVDF 膜, 进行 Western blot 杂交检测。一抗采用兔抗人胰岛素原抗体(1:500, 镇江博研生物科技有限公司); 二抗采用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:5000, Santa 公司), 采用 ECL 显色试剂盒(Invitrogen 公司)显色。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗性愈伤组织的筛选、继代培养

经农杆菌侵染的水稻愈伤组织共培养后, 转移至含有 50 mg/L 潮霉素的筛选培养基中筛选后, 部分愈伤组织褐化死亡, 抗性愈伤组织从褐化愈伤组织中长出(图 2-A)。选取颜色淡黄, 生长状态较好的愈伤组织在筛选培养基中继代培养, 每两周继代一次(图 2-B)。

### 2.2 抗性愈伤组织 PCR 鉴定和报告基因 *gfp* 表达检测

利用重组胰岛素原基因 *CTBIN* 的引物对获得的水稻抗性愈伤组织克隆的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 以质粒 pCambia1302-pGluB1sig-CTBIN-NOS 为阳性对照, 未转化愈伤组织为阴性对照, 进行 PCR(图 3)。鉴定的 7 个转基因愈伤克隆全部为阳性, 获得与预期片段大小相符的约 567 bp 目的基

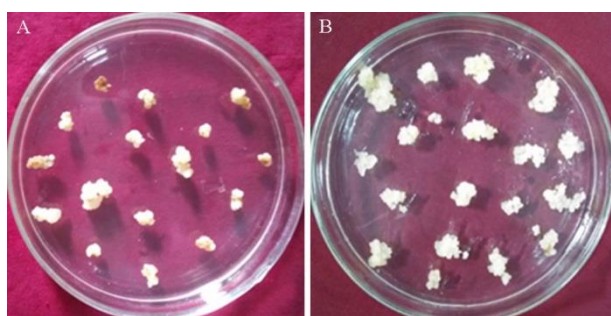
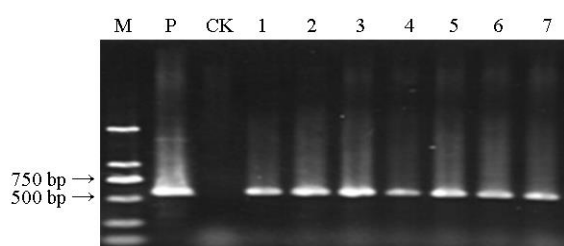


图2 筛选中的抗性愈伤组织(A)和继代中的抗性转基因愈伤组织(B)

Fig. 2. Resistant rice calli on screening medium(A) and resistant transgenic calli on subculture medium(B).



M-DL 2000 DNA 标记; P-质粒阳性对照; CK-非转基因愈伤组织阴性对照; 1~7 分别代表转基因水稻愈伤不同克隆。

M, DL2000 DNA marker; P, Plasmid(positive control); CK, Nontransgenic callus clone(negative control); 1-7, Number of different transgenic rice calli clones.

图3 PCR鉴定水稻转基因愈伤组织克隆中的CTBIN基因  
Fig. 3. PCR analysis of CTBIN gene in rice transgenic callus clones.

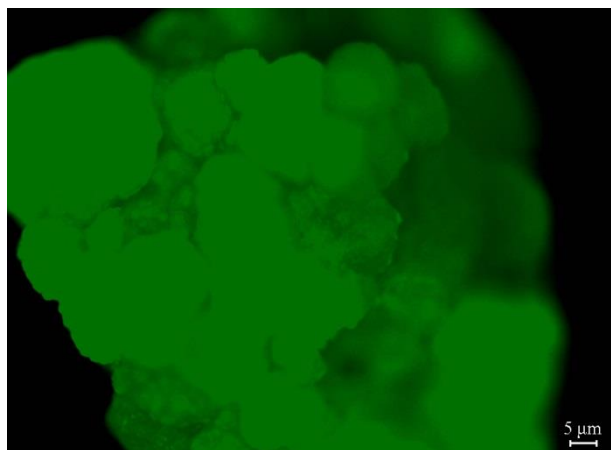


图4 绿色荧光蛋白基因 *gfp* 在水稻转基因愈伤组织中表达的荧光显微镜观察

Fig. 4. Fluorescence microscope detection of the *gfp* gene expression in rice transgenic calli.

因片段, 转基因阳性率为 100%。

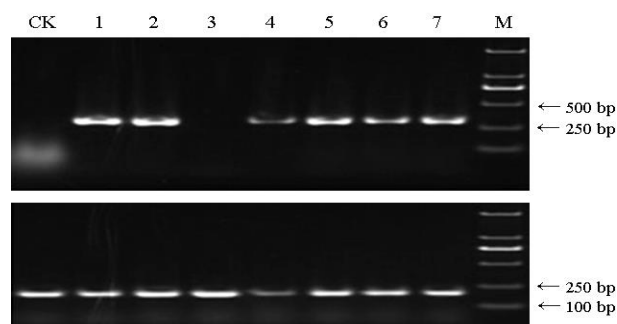
将抗性愈伤组织克隆在荧光显微镜下观察, 可见明显绿色荧光(图 4), 说明口服胰岛素原载体 pCambia1302-pGluB1sig-CTBIN-NOS 确实成功转化了水稻愈伤组织。

## 2.3 转基因水稻愈伤组织 CTBIN 基因转录表达的 RT-PCR 鉴定

提取上述 7 个转基因水稻愈伤克隆的总 RNA, 以水稻  $\beta$ -actin 为内参基因进行反转录实验, 检测 CTBIN 基因的转录表达, 结果见图 5。7 个克隆中均扩增出了内参基因  $\beta$ -actin 约为 200 bp 的条带, 说明 RT-PCR 实验系统正常。有 6 个克隆扩增出了目的基因 CTBIN 的 300 bp 预期片段, 说明转基因水稻愈伤组织细胞中的种子特异的 pGluB1 启动子成功驱动了外源 CTBIN 基因的转录表达。只有 3 号转基因克隆的 CTBIN 未检测到转录表达, 原因可能是该克隆中 CTBIN 基因整合位点特殊或序列不完整影响了基因表达。

## 2.4 Western blot 检测转基因水稻愈伤组织 CTBIN 基因的翻译表达

以非转基因水稻愈伤组织为对照, 提取 1、2、4、5 号转基因水稻愈伤组织克隆的细胞总蛋白, 以兔抗人胰岛素原抗体进行 Western blot 检测, 结果如图 6。检测的 4 个转基因水稻愈伤克隆均表达了特异性的目标蛋白条带, 分子量约 25 kD, 而对照中未出现杂交信号, 表明种子特异性谷蛋白 GluB1 启动子在水稻成熟胚愈伤组织中成功驱动了外源 CTBIN 基因的表达。理论上, 如果目标蛋白包括谷蛋白 GluB1 的 N-端信号肽序列(24 个氨基酸残基), 分子量约为 28 kD, 但检测到的目标蛋白分子量在 25 kD 左右, 相当于 CTB-人胰岛素原融合蛋白, 由此推测融合蛋白中的 N-端信号肽序列已被切除。

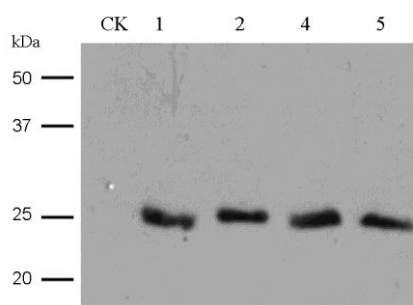


上图为目的基因 CTBIN 扩增条带, 下图为水稻内参基因  $\beta$ -actin 扩增条带。M-DL2000 DNA 标记; CK-非转基因愈伤克隆阴性对照; 1~7 代表转基因水稻愈伤不同克隆。

The upper part shows the amplified bands of purpose gene CTBIN, the lower part the amplified bands of rice inner control gene  $\beta$ -actin. M, DL2000 DNA marker; CK, Nontransgenic rice calli clone(negative control); 1-7, Number of different transgenic rice calli clones.

图5 RT-PCR 检测水稻转基因愈伤组织中 CTBIN 基因的转录表达

Fig. 5. Detection of transcriptional expression of CTBIN gene in transgenic rice calli by RT-PCR.



CK—非转基因愈伤克隆阴性对照; 1, 2, 4, 5—不同转基因愈伤克隆编号。

CK, Nontransgenic rice calli clone (negative control); 1, 2, 4 and 5, Number of different transgenic rice calli clones.

图 6 Western blot 检测水稻转基因愈伤组织中 *CTBIN* 基因的翻译表达

Fig. 6. Detection of translational expression of *CTBIN* gene in transgenic rice calli by Western blot.

### 3 讨论

水稻作为基因组研究的模式生物, 深入研究其基因表达的调控模式对理解植物的形态、发育和代谢调控等机理具有重要意义。*pGluB1* 是近年来水稻种子生物反应器的研究热点<sup>[6-12,20]</sup>, 迄今未见关于 *pGluB1* 在植物种子以外组织中表达的报道。本研究结果证明, *pGluB1* 启动子能驱动外源基因 *CTBIN* 在水稻成熟胚愈伤组织中转录和翻译, 而且融合蛋白包含的谷蛋白 *GluB1* 的 N-端信号肽序列(24 个氨基酸残基)在愈伤组织细胞中也被切除。

影响植物启动子表达的因素很多, 所有基因表达调控都是通过细胞内的反式作用因子和启动子上游各种顺式作用元件的相互作用来实现的。本研究采用的 2.3 kb *pGluB1* 启动子除了包含植物启动子表达所必需的基本上游启动子元件如 TATA-box (TATAAA)、核糖体结合位点(AGGAGG)外, 还包含与种子特异表达相关的顺式作用元件如 AACA (AACAAAC)、GCN4(TGAGTCA)、*Skn-1*(GTCAT)、ACGT、醇溶谷蛋白框(AAAG)、PROL(TGCAAAG)等基序。其中, AACA 基序的作用是抑制种子特异性基因在胚乳以外的其他组织表达<sup>[21]</sup>, GCN4 和其他几个基序联合控制基因的胚乳特异性表达活性和表达水平<sup>[22]</sup>。GCN4 基序是启动子种子特异性表达所必需的, 属于基本亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)转录因子家族成员及其同源蛋白的识别位点, 水稻种子特异的 bZIP 蛋白 RISBZ1 与 GCN4 基序作用可使启动子表达活性增加 100 倍以

上<sup>[23]</sup>。而 AACA 基序被 MYB 蛋白识别, 在种子以外的其他组织作为抑制下游基因表达的负调控元件。OSMYB5 蛋白在水稻多种组织中表达, 但在种子以外的组织中, OSMYB5 蛋白与 AACA 基序结合从而抑制水稻谷蛋白 B1 基因的表达<sup>[24]</sup>。然而, AACA 基序与 CaMV 35S 启动子核心序列融合成人工启动子驱动 *gus* 构建报告基因载体, 并与 *Osmby5* 基因表达载体共同转化水稻胚盾片愈伤组织来源的原生质体并进行瞬时表达测试, 发现 OSMYB5 未能对 AACA 基序产生作用<sup>[24]</sup>, 说明在水稻种子和愈伤组织来源的原生质体中反式作用因子与顺式作用元件的相互识别和作用存在差异。本研究中 *pGluB1* 成功驱动外源基因 *CTBIN* 在水稻成熟胚愈伤组织中表达的原因, 一方面可能是在愈伤组织中, 某些反式作用因子如 MYB 蛋白无法与负调控基序如 AACA 发生作用, 从而解除了对下游 *CTBIN* 基因的表达抑制。另一方面, 植物愈伤组织形成的体细胞胚与合子胚的发育大体相似, 只是在细胞分裂方式、排列方式及形态特征上存在一些差异<sup>[25]</sup>, 推测愈伤组织细胞的基因表达模式和种子基因表达模式可能具有一定的相似性。Chen 等<sup>[4]</sup>报道水稻 CCCH 型锌指蛋白 OsGZF1 在原生质体瞬时表达时, 降低 *pGluB1* 启动子的表达活性的调控机制与其在转基因水稻种子中的调节机制确实存在一致性。因此, 种子中特异表达的某些反式作用因子如 RISBZ1 也可能在愈伤组织中表达, 本研究中可能这类反式作用因子通过与 *pGluB1* 启动子元件作用从而参与了 *CTBIN* 基因的表达激活。由于水稻种子储藏蛋白的特异启动子元件在其他禾谷类作物如玉米、小麦种子储藏蛋白启动子序列中具有保守性, 因而调控机制也相似<sup>[4,26]</sup>。本研究发现为探索植物种子特异启动子在愈伤组织中的表达活性及其机制提供了基础线索, 也为应用愈伤组织初步快速筛选鉴定种子特异表达启动子提供了可能。

亚细胞定位靶向表达是植物生物反应器中提高重组蛋白表达量的有效手段。Jang 等<sup>[18]</sup>报道, 水稻叶绿体靶向运输信号肽序列(Target peptide, Tp)能介导外源 GFP 重组蛋白在水稻愈伤组织的非绿质体中高水平积累并正确加工, 将 N-端 Tp 序列切除。本研究的 Western blot 检测结果表明(图 6), 从分子量上看, *pGluB1* 驱动融合基因 *CTBIN* 在愈伤组织中表达时, 融合蛋白 N-端融合的谷蛋白 *GluB1* 信号肽序列(*GluB1* signal peptide, GSp)能被成功切除。在水稻种子胚乳细胞中, 谷蛋白前体在内质网腔合成, 然后通过内膜系统分拣输送到蛋白储存囊

泡, 形成 PB-I 和 PB-II, 谷蛋白的信号肽序列在起源于高尔基器的 PB-II 中由特异的天冬酰胺内肽酶切除。由 pGluB1 驱动并在 N-端添加 GSp 和 C-端添加 KDEL 内质网滞留信号的重组 7Crp 多肽在水稻种子特异表达时, 却主要在起源于内质网的 PB-I 中大量积累<sup>[20]</sup>。在成熟胚愈伤组织中表达的重组 CTBIN 蛋白是否也被分选输送到囊泡中储存积累? 其 N-端 GSp 的加工切除机制是否与种子中相似? 植物愈伤组织细胞内是否可形成类似于种子蛋白体的重组蛋白亚细胞储存机构? 这些基本科学问题的探寻有望为植物愈伤组织细胞生物反应器的研究和应用开辟新思路, 本研究结果为此提供了重要线索。

## 参考文献:

- [1] de Los Reyes B G, Mohanty B, Yun S J, Park M R, Lee D Y. Upstream regulatory architecture of rice genes: Summarizing the baseline towards genus-wide comparative analysis of regulatory networks and allele mining. *Rice*, 2015, 8(1): 14.
- [2] Ye R, Zhou F, Lin Y. Two novel positive cis-regulatory elements involved in green tissue-specific promoter activity in rice (*Oryza sativa* L. ssp.). *Plant Cell Rep*, 2012, 31(7): 1159-1172.
- [3] Fumio T, Yuhya W, Shimpei H. An overview on the strategies to exploit rice endosperm as production platform for biopharmaceuticals. *Plant Sci*, 2017, 263: 201-209.
- [4] Chen Y, Sun A, Wang M, Zhu Z, Ouwerkerk P B F. Functions of the CCCH type zinc finger protein OsGZF1 in regulation of the seed storage protein GluB-1 from rice. *Plant Mol Biol*, 2014, 84: 621-634.
- [5] Qu L Q, Takaiwa F. Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. *Plant Biotech J*, 2004, 2(2): 113-125.
- [6] 张宪银, 薛庆中. 水稻胚乳特异性启动子 Gt1 的克隆及其功能验证. *作物学报*, 2002, 28(1): 110-114.  
Zhang X Y, Xue Q Z. Cloning of a rice endosperm specific promoter Gt1 and its functional verification. *Acta Agron Sin*, 2002, 28(1): 110-114. (in Chinese with English abstract).
- [7] 刘峰, 赵伊英, 郑金贵. 籼稻胚乳特异性启动子 Gt1 的克隆及其功能验证. *长江大学学报: 自然科学版*, 2010, 7(2): 44-48.  
Liu F, Zhao Y Y, Zheng J G. Isolation of endosperm-specific promoter Gt1 from indica rice and verification of its function in transgenic rice. *J Yangtze Univ: Nat Sci Ed*, 2010, 7(2): 44-48. (in Chinese with English abstract).
- [8] Takaiwa F, Yang L, Wakasa Y, Ozawa K. Compensatory rebalancing of rice prolamins by production of recombinant prolamins/bioactive peptide fusion proteins within ER-derived protein bodies. *Plant Cell Rep*, 2018, 37: 209-223.
- [9] Takaiwa F, Takagi H, Hirose S, Wakasa Y. Endosperm tissue is good production platform for artificial recombinant proteins in transgenic rice. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5: 84-92.
- [10] Katsube T, Kurisaka N, Ogawa M, Maruyama N, Ohtsuka R, Utsumi S, Takaiwa F. Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelins in rice. *Plant Physiol*, 1999, 120(4): 1063-1074.
- [11] Momma K, Hashimoto W, Ozawa S, Kawai S, Katsube T, Takaiwa F, Kito M, Utsumi S, Murata K. Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: analyses of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice. *Biosci, Biotechnol & Biochem*, 1999, 63(2): 314-318.
- [12] Takagi H, Saito S, Yang L, Nagasaka S, Nishizawa N, Takaiwa F. Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3(5): 521-533.
- [13] Chesnokov Y V, Manteuffel R. Dose effect of UV-B irradiation on pollen tube growth and seed-specific promoter activities in irradiated pollen grains of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Sex Plant Reprod*, 2000, 12(6): 361-364.
- [14] Russell D A, Fromm M E. Tissue-specific expression in transgenic maize of four endosperm promoters from maize and rice. *Transgenic Res*, 1997, 6(2): 157-168.
- [15] 唐湧洲, 俞越, 赵艳. 种子蛋白体靶向表达口服重组胰岛素原载体构建及转化水稻. *中国水稻科学*, 2015, 29(5): 481-489.  
Tang Y Z, Yu Y, Zhao Y. Construction of seed protein body targeted expression vector and transformation rice for oral recombinant proinsulin. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29(5): 481-489. (in Chinese with English abstract)
- [16] 陈惠, 赵原, 种康. 一种改进的水稻成熟胚愈伤组织高效基因转化系统. *植物学通报*, 2008, 25(3): 322-331.  
Chen H, Zhao Y, Zhong K. Improved high efficient system for rice transformation using mature embryo-derived calli. *Chin Bull Bot*, 2008, 25(3): 322-331. (in Chinese with English abstract)
- [17] 卢江扬, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法. *中国水稻科学*, 1992, 6(1): 47-48.  
Lu J Y, Zheng K L. A simple method for isolation of rice DNA. *Chin J Rice Sci*, 1992, 6(1): 47-48. (in Chinese with English abstract)
- [18] Jang I C, Nahm B H, Kim J K. Subcellular targeting of green fluorescent protein to plastids in transgenic rice plants provides a high-level expression system. *Mol Breeding*, 1999, 5(5): 453-461.
- [19] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248-254.



- [20] Takaiwa F, Hirose S, Takagi H, Yang L, Wakasa Y. Deposition of a recombinant peptide in ER-derived protein bodies by retention with cysteine-rich prolamins in transgenic rice seed. *Planta*, 2009, 229(5): 1147-1158.
- [21] Jiang S Y, Vanitha J, Bai Y, Ramachandran S. Identification and molecular characterization of tissue-preferred rice genes and their upstream regularly sequences on a genome-wide level. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 331-345.
- [22] Wu C, Washida H, Onodera Y, Harada K, Takaiwa F. Quantitative nature of the prolamins-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: Minimal *cis*-element requirements for endosperm-specific gene expression. *Plant J*, 2000, 23(3): 415-421.
- [23] Onodera Y, Suzuki A, Wu C Y, Washida H, Takaiwa F. A rice functional transcriptional activator, RISBZ1, responsible for endosperm-specific expression of storage protein genes through GCN4 motif. *J Biol Chem*, 2001, 276(17): 14139-14152.
- [24] Suzuki A, Wu C Y, Washida H, Takaiwa H. Rice MYB protein OSMYB5 specifically binds to the AACA motif conserved among promoters of genes for storage protein glutelin. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(5): 555-559.
- [25] 张东向. 禾本科植物愈伤组织的形成分化和体细胞胚胎发生. 齐齐哈尔大学学报: 自然科学版, 2002, 18(4): 112-115.  
Zhang D X. Differentiation and somatic embryo genesis of forming gallus of Gramineae. *J Qiqihar Univ: Nat Sci Ed*, 2002, 18(4): 112-115. (in Chinese with English abstract)
- [26] Duan M, Sun S S. Profiling the expression of genes controlling rice grain quality. *Plant Mol Biol*, 2005, 59(1): 165-178.