

甘蓝型油菜三种种子储藏蛋白和丙酮酸羧化酶基因片段的克隆及 hpRNA 表达载体的构建

汪承刚, 谢 妤, 李长春, 刘幼琪, 黄邦全*

(湖北大学生命科学学院植物遗传育种实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要:利用 PCR 从甘蓝型油菜 (*B. napus* L.) 华双 4 号基因组 DNA 中扩增出种子储藏蛋白 cruciferin、napin、oleosin 和丙酮酸羧化酶 (PEPC) 基因片段, 再以扩增出的片段为模板设计引物从一端扩增出 4 个相应的小片段, 然后将同一基因的大小两个片段反向连接, 插入到种子特异表达载体 2300 - nap 多克隆位点的 napin 启动子和 nos 终止子之间, 构建成可以在油菜种子中转录表达发夹 RNA (Hairpin RNA, hpRNA) 结构的植物表达载体。

关键词: 甘蓝型油菜; Cruciferin; Oleosin; Napin; 丙酮酸羧化酶 (PEPC); 发夹 RNA (hpRNA); 载体构建

中图分类号: S565. 403. 2 **文献标志码:** A

文章编号: 1007—9084 (2006) 03—0245—06

油脂和蛋白质分别约占成熟油菜种子总重量的 45% 和 25%, 而三种主要的储藏蛋白 cruciferin、napin、oleosin 约占种子总蛋白质的 80% ~ 90%^[1]。根据前人的研究, 油菜种子蛋白质含量与油脂含量呈高度的负相关^[2]。根据这一研究结果, 我们分别构建了三种主要油菜种子储藏蛋白 cruciferin、oleosin 和 napin 的 hpRNA 植物表达载体, 希望通过 RNAi 抑制油菜种子储藏蛋白的合成, 从而提高油菜种子含油量。20 世纪 80 年代末, 日本学者杉本博士发现大豆籽粒蛋白质含量与丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性密切相关^[3]。陈锦清等利用反义技术抑制油菜 PEPC 基因表达, 结果使油菜含油量显著提高^[4,5]。张银波等也构建了带有油菜 PEPC 基因的 RNAi 载体以抑制 PEPC 基因表达^[6]。由于陈锦清和张银波实验中的 RNA 干扰载体用的都是 35S 启动子, 考虑到丙酮酸羧化酶 (PEPC) 的普遍抑制可能具有潜在的负面影响, 我们构建了带有种子特异性 napin 启动子的 PEPC - hpRNA 载体, 尝试专一性抑制种子 PEPC 表达, 以期提高油菜种子的含油量。

1 材料与方法

1.1 材料

甘蓝型油菜 (*B. napus* L.) 华双 4 号由华中农业大学吴江生教授提供。大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 DH5 由本实验室保存, 克隆载体 pMD18 - T 购

自 TaKaRa 公司, 种子特异表达载体 2300 - nap 由本实验室构建^[7]。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、Ex - Taq 酶、4 种 dNTP 和 DNA 纯化试剂盒等均购自 TaKaRa 公司, DNA 分子量标记购自 Fermentas 公司, 其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 植物 DNA 的提取 参照李佳等^[8]修改后的 SDS 法从幼嫩的油菜叶片中提取。

1.2.2 PCR 扩增 根据 cruciferin^[9] (GenBank accession X14555. 1), oleosin (GenBank accession M63985. 1), napin^[10] (GenBank accession J02798) 和 PEPC^[11] (GenBank accession D26382. 2) 基因的序列设计 P₁ - P₂, P₃ - P₄, P₅ - P₆, P₇ - P₈ 四对引物: P₁: 5' TCGGCTCTCACTCTCTCTCTC TTTTCCT 3', P₂: 5' CTCCGTA GCTAGCTGGGCCACTG 3', P₃: 5' CAA TCTCGTTA TGT CCCGTCGTCTC 3', P₄: 5' TCCCACCACTA TTA GAGATCTTCACAT 3', P₅: 5' ATG GCGAACAAGCTCTTCTCTCGT 3', P₆: 5' GAGGGCCCA GGCATGGTCTTIC 3', P₇: 5' TC CAAAGAGAGATTCAAGCTGCA TTCC 3', P₈: 5' CATCGAGCAAAGCGCGCCACT 3'。

引物 P₁ - P₂, P₃ - P₄, P₅ - P₆, P₇ - P₈ 以甘蓝型油菜 (*B. napus* L.) 华双 4 号基因组 DNA 为模

收稿日期: 2005—12—28

基金项目: 湖北省科技厅国际合作重点项目 (2005CA020); 湖北省教育厅国际合作项目 (G200510001)

作者简介: 汪承刚 (1974—), 男, 河南信阳人, 硕士生, 主要从事油菜生物技术研究。

*通讯作者: Tel: 027 - 50865587; E - mail: huangbq@hubu.edu.cn

板分别扩增出 cruciferin, oleosin, napin 和 PEPC 基因片段。

1.2.3 Cruciferin, napin, Oleosin 和 PEPC 基因的克隆与测序 PCR 产物经琼脂糖凝胶纯化后, 连接克隆载体 pMD18-T, 连接物转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞, 重组子经鉴定后送上海英骏公司测序。Cruciferin, oleosin, napin 和 PEPC 基因重组子分别命名为 T-Cru, T-Ole, T-Nap, T-Pep。

1.2.4 Cruciferin, napin, oleosin 和 PEPC 基因的 hpRNA 表达载体的构建及酶切验证 将克隆在 T-Cru 中的 cruciferin 基因片段用 Pst 和 EcoR 双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳, 回收约 2kb 的 cruciferin 基因大片段 A (图 2); 从重组子 T-Cru 靠近多克隆 Pst 位点端设计 PCR 引物 P_1' 、 P_2' , 在引物两端分别添加 BamH 和 EcoR 的酶切位点, 将扩增出的基因小片段用 BamH 和 EcoR 双酶切, 电泳回收 0.6kb 的 cruciferin 基因小片段 B (图 3)。将带有不同酶切位点的 cruciferin 基因片段 A 和 B 与经 BamH 和 Pst 双酶切的质粒载体 2300-nap 进行三片段连接, 得到带有 napin 启动子的 cruciferin-hpRNA 载体。用同样的方法构建 oleosin, napin 和 PEPC 基因的 hpRNA 表达载体 (图 1)。从重组子 T-Ole, T-Nap 靠近多克隆 Pst 位点端设计引物 P_3' 、 P_4' 、 P_5' 、 P_6' , 在引物两端分别添加 BamH 和 EcoR 的酶切位点。PEPC 基因片段测序结果经 BLAST 分析比对表明, 克隆在重组子 T-Pep 中的 PEPC 基因片段靠近多克隆 BamH 位点端与所报道的油菜 PEPC 基因相应的序列同源程度较高, 而靠近多克隆 Pst 位点端与所报道的油菜 PEPC 基因相应的序列同源程度较低。为了达到较好的 RNA 干扰效果, 我们从重组子 T-Pep 靠近多克隆 BamH 位点端设计引物 P_7' 、 P_8' , 在引物两端分别添加 Pst 和 Hind 的酶切位点。最后通过 PCR、酶切和测序鉴定重组子。

P_1' - BamH : 5' ATAGGATCCAAAGGCTGA - GGCTGGTCGCA TCG 3', P_2' - EcoR : 5' ATAG - AATTCGGGGTGTGTAGCGATGGTGTCC 3', P_3' - BamH : 5' ATAGGATCCGGGTCCACGGGTAC - GGTCACG 3', P_4' - EcoR : 5' ATAGAA TTCG - CCGGTGGTICCTTCTTGTC 3', P_5' - BamH : 5' ATAGGATCCCGACGATTA TGCGAACAAGC 3', P_6' - EcoR : 5' ATAGAA TTCGGGGTCTCTCA TGT - CGTCTT 3', P_7' - Pst : 5' A TACTGCA GTTCCAA - AGAGAGATTCAGCTGCA TTC 3', P_8' - Hind : 5'

A TAAA GCTTGCTCAA GA GGCTCCAA GAACTACA T - AAAC 3'。

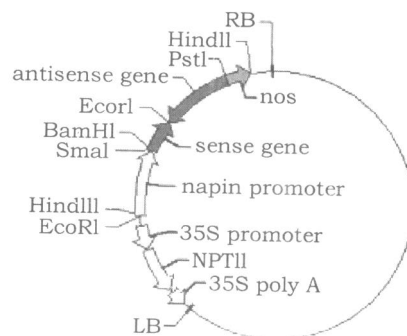


图 1 Cruciferin, napin, oleosin 和 PEPC 基因的 hpRNA 植物表达载体结构图

Fig 1 hpRNA vector targeting genes of *B. napus* cruciferin, napin, oleosin and PEPC

2 结果与分析

2.1 cruciferin, oleosin, napin 和 PEPC 基因片段的 PCR 扩增及序列分析

以甘蓝型油菜华双 4 号总 DNA 为模板, 经 P_1 、 P_2 引物扩增后, 产生的 cruciferin 基因片段 PCR 产物约为 2kb; 经 P_3 、 P_4 引物扩增后, 产生的 oleosin 基因片段 PCR 产物约为 2.1kb; 经 P_5 、 P_6 引物扩增后, 产生的 napin 基因片段 PCR 产物约为 0.6kb; 经 P_7 、 P_8 引物扩增后, 产生的 PEPC 基因片段 PCR 产物约为 1.5kb (图 2)。测序结果序列分析表明, 所克隆的 cruciferin 基因片段序列 (GenBank accession DQ328613) 和发表的 cruciferin 基因序列 (GenBank accession X14555.1) 相比较, 在第二个内含子区域内部缺失了一段 375 个碱基的序列, 在第三个外显子区域内部插入了一段 216 个碱基的额外序列, 如果不计算这两段额外序列, 我们所克隆的 cruciferin 基因片段序列和发表的基因组序列同源性为 99.18%; 所克隆的 napin 基因片段序列 (未在 GenBank 登陆) 和发表的 napin 基因序列 (GenBank accession J02798) 同源性为 97.72%; 克隆的 oleosin 基因片段序列 (GenBank accession DQ328612) 和发表的 oleosin 基因序列 (GenBank accession M63985.1) 相比较, 在内含子区域内部缺失了 175 个碱基的序列, 如果不计算这一段缺失序列, 我们克隆的 oleosin 基因片段序列和发表的 oleosin 基因组序列同源性为 99.58%; 1994 年 Yanai et al^[11] 发表的 PEPC 的基因序列 (GenBank accession D26382.2) 中包含一

段未知序列,我们所克隆的 PEPC 基因片段序列 (GenBank accession DQ328614)对应这一段未知序列的是 425 个碱基的序列。如果不计算这一段序列,我们克隆的 PEPC 基因片段序列和发表的基因

组序列同源性为 99.61%;结果表明我们克隆的确实是 cruciferin、oleosin、napin 和 PEPC 基因或其高度同源序列。

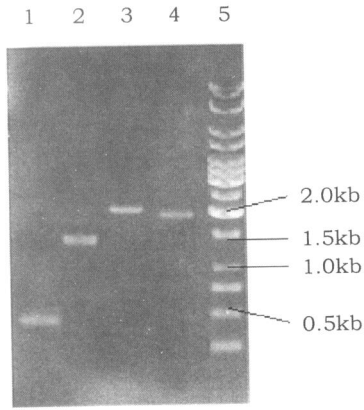


图 2 甘蓝型油菜华双 4 号 napin、oleosin、cruciferin 和 PEPC 基因大片段的 PCR 扩增

Fig 2 PCR - amplification of *B. napus* genes for napin, oleosin, cruciferin and PEPC

注: 1: napin 基因经 P_5 、 P_6 引物扩增产物; 2: PEPC 基因经 P_7 、 P_8 引物扩增产物; 3: oleosin 基因经 P_3 、 P_4 引物扩增产物; 4: cruciferin 基因经 P_1 、 P_2 引物扩增产物; 5: 1kb DNA Ladder

Note: 1, PCR product of napin gene with primer P_5 and P_6 ; 2, PCR product of PEPC gene with primer P_7 and P_8 ; 3, PCR product of oleosin gene with primer P_3 and P_4 ; 4, PCR product of cruciferin gene with primer P_1 and P_2 ; 5, 1kb DNA Ladder

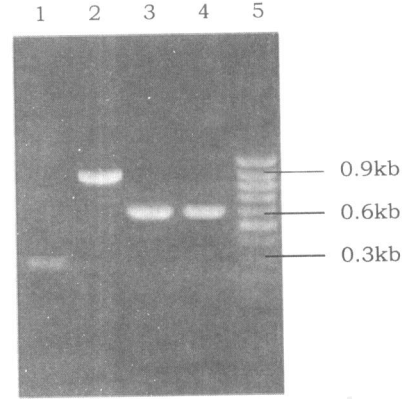


图 3 甘蓝型油菜华双 4 号 napin、oleosin、cruciferin 和 PEPC 基因小片段的 PCR 扩增

Fig 3 PCR - amplification of small fragments for genes of *B. napus* napin, oleosin, cruciferin and PEPC

注: 1: napin 基因经 P_5 、 P_6 引物扩增产物; 2: PEPC 基因经引物 P_7 、 P_8 扩增产物; 3: oleosin 基因经引物 P_3 、 P_4 扩增产物; 4: cruciferin 基因经引物 P_1 、 P_2 扩增产物; 5: 100bp DNA Ladder

Note: 1, PCR product of napin gene with primer P_5 and P_6 ; 2, PCR product of PEPC gene with primer P_7 and P_8 ; 3, PCR product of oleosin gene with primer P_3 and P_4 ; 4, PCR product of cruciferin gene with primer P_1 and P_2 ; 5, 100bp DNA Ladder

2.2 cruciferin、oleosin、napin 和 PEPC 基因的 hpRNA 表达载体的构建及验证

提取质粒 Hp - Cru - nap, 以 napin 启动子前端引物 PF (PF: 5' AAGCTTCTTCATCGGTGATTGAT 3') 和 P_2 引物经 PCR 扩增出约 1.8kb 特异条带, 与引物 PF 和 P_2 之间的 napin 启动子片段 (约 1.2kb) 和 cruciferin 基因片段 B (0.6kb) 长度之和相吻合; napin 启动子 5' 端有 EcoR 酶切位点, cruciferin 基因片段 B 3' 端有 EcoR 酶切位点, 质粒 Hp - Cru - nap 经 EcoR 酶切出约 1.8kb 片段, 与预期的 cruciferin - hpRNA 载体中两个 EcoR 酶切位点之间的间隔: napin 启动子片段 (约 1.2kb) 和 cruciferin 基因片段 B (0.6kb) 长度之和相吻合。对重组子 T - Cru 的测序结果进行限制性酶切位点分析, 发现距 pMD18 - T 载体多克隆位点上的 Pst 位点 1.0kb 处的 cruciferin 基因内也有一个 Hind 限制性酶切位点, napin 启动子片段内部 5' 端有 Hind 酶切位点, nos 终止子片段 3' 端有 Hind 酶切位点, 质粒 Hp - Cru - nap 经 Hind 完全酶切时, 得到 8.7kb,

2.8kb, 1.3kb 三个片段, 与预期的 cruciferin - hpRNA 载体中三个 Hind 酶切位点之间的三个间隔相吻合: 2300 质粒载体骨架 (8.7kb); 1.2kb 的 napin 启动子片段, 0.6kb 的 cruciferin 基因片段 B, 1.0kb 的 cruciferin 基因片段 A 一部分 (合计 2.8kb); 1.0kb 的 cruciferin 基因片段 A 另一部分, 0.3kb nos 终止子片段 (合计 1.3kb)。由此可判断重组质粒 Hp - Cru - nap 即为 napin 启动子的 cruciferin 基因的 hpRNA 表达载体。同理分别对质粒 Hp - Ole - nap, Hp - Nap - nap, Hp - Pep - nap 进行验证。提取质粒 Hp - Ole - nap, 以 PF 和 P_4 为引物经 PCR 扩增出约 1.8kb 特异条带, 与引物 PF 和 P_4 之间的 napin 启动子片段 (约 1.2kb) 和 oleosin 基因片段 B (0.6kb) 长度之和相吻合; 质粒 Hp - Ole - nap 经 EcoR 酶切出约 1.8kb 片段, 与预期的 oleosin - hpRNA 载体中两个 EcoR 酶切位点之间的间隔: napin 启动子片段 (约 1.2kb) 和 oleosin 基因片段 B (0.6kb) 长度之和相吻合。质粒 Hp - Ole - nap 经 Hind 酶切出 4.2kb 片段, 与预期的 oleosin - hpR-

NA载体中两个 Hind 酶切位点之间的间隔相吻合: napin启动子片段 (约 1.2kb), Oleosin基因片段 B (0.6kb), Oleosin基因片段 A (2.1kb) 和 nos终止子片段 (0.3kb), 合计 4.2kb。由此可判断重组质粒 Hp - Ole - nap 即为带 napin启动子的 oleosin基因的 hpRNA表达载体。提取质粒 Hp - Nap - nap, 以 PF和 P₆' 为引物经 PCR扩增出约 1.5kb 特异条带, 与引物 PF和 P₆' 之间的 napin启动子片段 (约 1.2kb) 和 napin基因片段 B (0.3kb) 长度之和相吻合; 质粒 Hp - Nap - nap 经 EcoR 酶切出约 1.5kb 片段, 与预期的 napin - hpRNA 载体中两个 EcoR 酶切位点之间的间隔: napin启动子片段 (约 1.2kb) 和 napin基因片段 B (0.3kb) 长度之和相吻合; 质粒 Hp - Nap - nap 经 Hind 酶切出 2.3kb 片段与预期的 napin - hpRNA 载体中两个 Hind 酶切位点之间的间隔相吻合: napin启动子片段 (约 1.2kb), napin基因片段 B (0.3kb), napin基因片段 A (0.5kb) 和 nos终止子片段 (0.3kb), 合计 2.3kb。由此可判断重组质粒 Hp - Nap - nap 即为带 napin启动子的 napin基因的 hpRNA表达载体。提取质粒 Hp - Pep - nap, 以 PF和 P₈ 为引物经 PCR扩增出约 2.7kb 特异条带, 与引物 PF和 P₈ 之间的 napin启动子片段 (约 1.2kb) 和 PEPC基因片段 A (1.5kb) 长度之和相吻合; 质粒 Hp - Pep - nap 经 Hind 完全酶切时, 可得到 8.7kb、2.7kb、1.2kb 三个片段, 与预期的 PEPC - hpRNA 载体中三个 Hind 酶切位点之间的三个间隔: 2300 质粒载体骨架 (8.7kb)、1.2kb 的 napin启动子片段和 1.5kb 的 PEPC基因片段 A (合计 2.7kb)、0.9kb 的 PEPC基因片段 B 和 0.3kb nos终止子片段 (合计 1.2kb) 相吻合。由此可判断重组质粒 Hp - Pep - nap 即为带 napin启动子的 PEPC基因的 hpRNA表达载体 (图 4)。测序结果也表明上述四个 hpRNA 载体中存在反向重复序列, 证明我们的 hpRNA 载体构建是成功的。

3 讨论

根据前人的研究, 油菜种子蛋白质含量与油脂含量呈高度负相关^[2]。油菜种子中有三种主要的储藏蛋白, 其中 cruciferin 约占种子总蛋白质的 40%~50%, napin 约占种子总蛋白质的 20%, Oleosin 约占种子总蛋白质的 20%^[3]。1994 年, 日本的 Kohno - Murase 利用反义技术抑制油菜 napin 基因表达, 在获得的转化植株的种子中 Napin 蛋白含量显著降低, 其中一些转化植株中 Napin 基因被完全

抑制, 但是转化植株种子中含油量并没有明显提高, 因为随着转化植株的种子中 Napin 蛋白的减少, cruciferin 蛋白质显著增加了^[12]。为此, 我们分别构建了三种主要油菜种子贮存蛋白 cruciferin, oleosin 和 napin 的 hpRNA 植物表达载体。如果一种贮存蛋白基因的抑制导致另外的种子贮存蛋白代偿性增加, 我们可以通过杂交获得两种或三种贮藏蛋白基因同时被抑制的植株以实现种子含油量的提高。

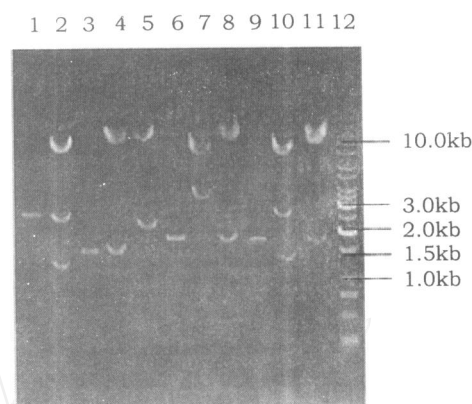


图 4 Cruciferin, oleosin, napin 和 PEPC 的 hpRNA 表达载体的酶切及 PCR 检测电泳图谱
Fig 4 Enzyme digestion and PCR detection of hpRNA i expression vectors for genes of cruciferin, napin, oleosin and PEPC

注: 1: 质粒 Hp - Pep - nap 以 PF 和 P₈ 为引物扩增产物, 2: 质粒 Hp - Pep - nap 被 Hind 酶切, 3: 质粒 Hp - Nap - nap 以 PF 和 P₆ 为引物扩增产物, 4: 质粒 Hp - Nap - nap 被 EcoR 酶切, 5: 质粒 Hp - Nap - nap 被 Hind 酶切, 6: 质粒 Hp - Ole - nap 以 PF 和 P₄ 为引物扩增产物, 7: Hp - Ole - nap 被 Hind 酶切, 8: 质粒 Hp - Ole - nap 被 EcoR 酶切, 9: 质粒 Hp - Cru - nap 以 PF 和 P₂ 为引物扩增产物, 10: 质粒 Hp - Cru - nap 被 Hind 酶切, 11: 质粒 Hp - Cru - nap 被 EcoR 酶切, 12: 1kb DNA Ladder

Note: 1, PCR product of plasmid Hp - Pep - nap with primer PF and P₈; 2, Hind digestion of plasmid - Hp - Pep - nap; 3, PCR product of plasmid Hp - Nap - nap with primer PF and P₆; 4, EcoR digestion of plasmid Hp - Nap - nap; 5, Hind digestion of plasmid Hp - Nap - nap; 6, PCR product of plasmid Hp - Ole - nap with primer PF and P₄; 7, Hind digestion of plasmid Hp - Ole - nap; 8, EcoR digestion of plasmid Hp - Ole - nap; 9, PCR product of plasmid Hp - Cru - nap with primer PF and P₂; 10, Hind digestion of plasmid Hp - Cru - nap; 11, EcoR digestion of plasmid Hp - Cru - nap; 12, 1kb DNA Ladder

陈锦清等利用反义技术抑制油菜 PEPC 基因表达, 获得的转基因植株 T₁ 代种子平均含油量比对照显著提高^[5]。考虑到 PEPC 是所有蛋白质合成都需要的一个关键酶, 35S 又是一个组成型表达的启动子, 我们构建了带有种子特异性 napin 启动子的 PEPC - hpRNA 载体, 希望只在种子里面抑制 PEPC 表达从而提高油菜种子含油量。

RNAi 是一种高效的特异性强的基因阻断技术, 可以阻断体内特定基因表达, 诱使细胞表现出特定基因缺失的表型。植物中常用的 RNAi 技术按介导方法包括正义 RNA 介导的共抑制、反义 RNA 介导的基因抑制、RNA 介导的病毒沉默 (VIGS) 和 hpRNA 介导的基因沉默^[13~16]。目前构建 hpRNA 高效克隆和表达载体用于特定基因表达调控是 RNAi 技术应用研究的热点之一^[17,18]。Stoutjesdijk 等在拟南芥 FAD2 基因的 hpRNA 介导的基因沉默研究中证明, 基因抑制效果可在子代稳定传递^[19], 首次明确了 RNAi 技术在作物改良, 尤其是种子品质性状改良方面的应用潜力。

本文首先根据已发表的序列设计引物从油菜基因组 DNA 中扩出 cruciferin, napin, oleosin 和 PEPC 基因片段, 从 cruciferin, napin, oleosin 和 PEPC 基因片段一端扩增出一个小片段, 将同一基因的大小两个片段反向连接, 插入到本实验室构建的质粒载体 2300 - nap 的多克隆位点的 napin 启动子和 nos 终止子之间, 构建可转录表达出发夹 RNA (Hairpin RNA, hpRNA) 结构的植物表达载体。为今后油菜及其它油料作物 RNA 干扰 (RNAi) 以提高含油量的基因工程的开展提供了技术支持。

参考文献:

- [1] Murphy D J, Cummins I, Kang A S. Synthesis of the major oil - body membrane protein in developing rapeseed (*Brassica napus*) embryos. Integration with storage - lipid and storage - protein synthesis and implications for the mechanism of oil - body formation[J]. Biochem J, 1989, 258 (1): 285—293.
- [2] Grami B, Baker R J, Stefansson B R. Genetics of protein and oil content in summer rape. Heritability, number of effective factors and correlations[J]. Can J Plant Sci, 1977, 57: 937—943.
- [3] Sugimoto T, Tanaka K, Morita M, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase level in soybean seed highly correlates to its contents of protein and lipid[J]. Agric Bio Chem, 1989, 53 (3): 885—887.
- [4] 陈锦清, 黄锐之, 郎春秀, 等. 油菜 PEP 基因的克隆及 PEP 反义基因的构建[J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 1999, 25 (4): 365—367.
- [5] 陈锦清, 郎春秀, 胡张华, 等. 反义 PEP 基因调控油菜籽蛋白质 油脂含量比率的研究[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7 (4): 316—320.
- [6] 张银波, 江木兰, 胡小加. 油菜 PEPase 基因的克隆及其对应 RNAi 载体的构建[J]. 中国油料作物学报, 2005, 27 (1): 1—4.
- [7] 汪承刚, 张菊红, 谢 妤, 等. 甘蓝型油菜依赖焦磷酸的磷酸果糖激酶 PFK 基因片段克隆及 hpRNA i 载体构建[J]. 分子植物育种, 2006, 4 (2): 199—204.
- [8] 李 佳, 沈斌章, 韩继祥, 等. 一种有效提取油菜叶片总 DNA 的方法[J]. 华中农业大学学报, 1994, 13: 521—523.
- [9] Ryan A J, Royal C L, Hutchinson J, et al. Genomic sequence of a 12S seed storage protein from oilseed rape (*Brassica napus* cv. jet-neuf) [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17 (9): 3584.
- [10] Josefsson L G, Lenman M, Ericson M L, et al. Structure of a gene encoding the 1.7 S storage protein, napin, from *Brassica napus* [J]. J Biol Chem, 1987, 262 (25): 12196—12201.
- [11] Yanai Y, Okumura S, Shinada H. Structure of *Brassica napus* phosphoenolpyruvate carboxylase genes: missing introns causing polymorphisms among gene family members Biosci Biotechnol [J]. Biochem, 1994, 58 (5): 950—953.
- [12] Kohno - Murase J, Murase M, Ichikawa H, et al. Effects of an antisense napin gene on seed storage compounds in transgenic *Brassica napus* seeds [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26: 1115—1124.
- [13] Waterhouse P M, Smith N A, Wang M B. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger [J]. Trends Plant Sci, 1999, 4: 452—457.
- [14] Waterhouse P M, Wang M B, Lough T. Gene silencing as an adaptive defense against viruses [J]. Nature, 2001, 411: 834—842.
- [15] Matzke M A, Matzke A J, Pruss G J, et al. RNA - based silencing strategies in plants [J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 2: 221—227.
- [16] Vance V, Vaucheret H. RNA silencing in plants: defense and counterdefense [J]. Science, 2001, 292: 2277—2280.
- [17] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A. Construct design for efficient, effective and high - throughput gene silencing in plants [J]. The Plant J, 2001, 27 (6): 581—590.
- [18] 肖 玲, 卢长明. 以油菜脂肪酸延长酶基因 *fael* 为靶标 RNAi 载体的构建 [J]. 中国油料作物学报, 2004, 26 (4): 6—11.
- [19] Stoutjesdijk P A, Singh S P, Liu Q, et al. hpRNA - mediated targeting of the *Arabidopsis* FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing [J]. Plant Physiol, 2002, 129 (4): 1723—1731.

**Cloning and hpRNA vector construction for genes
of cruciferin, napin, oleosin and PEPC in *Brassica napus* L.**

WANG Cheng - gang, XIE Yu, LI Chang - chun, LU You - qi, HUANG Bang - quan

(Lab of Plant Genetics and Breeding, College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: Three major storage proteins, i.e., cruciferin, oleosin and napin amount to 80% ~ 90% of the total seed protein in *Brassica napus*. Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) plays an important role in controlling the ratio of protein/lipid content in rapeseed. Gene fragments for cruciferin, napin, oleosin and PEPC were PCR - amplified from *B. napus* genomic DNA and used as templates to amplify four smaller fragments. The larger and the smaller fragments of the same gene were ligated in opposite orientations into a seed specific expression vector 2300 - nap to produce hpRNAi vectors. Sequence analyses indicated that the fragments cloned were indeed genes for cruciferin, napin, oleosin and PEPC. These hpRNA vectors will be useful in the attempt to increase oil content in rapeseed by inhibiting the seed protein synthesis.

Key words: *Brassica napus* L.; Cruciferin; Oleosin; Napin; PEPC; Construction of hpRNA vector

第二届国际生物熏蒸学术讨论会在美国召开

第二届国际生物熏蒸学术讨论会于 2006 年 6 月 25 - 29 日在美国爱德荷大学举行,来自 17 个国家的 85 位专家学者参加了研讨。油料所张春雷博士是参会的唯一一位中国代表,并展示了海报《油菜硫甙组分与抑菌活性研究》。

本次会议的主题是生物熏蒸——未来的病虫害防治策略。

芸薹属植物如油菜、芥菜、西兰花、花椰菜、马萝卜等含较高的植物次生代谢物硫甙,当这些作物的组织受损时,硫甙降解产生一系列具有生物活性的物质,其中最重要的一类是异硫氰酸(盐)(ITCs),ITCs 对许多有机体包括线虫、细菌、真菌和昆虫都具有很强的杀生作用。种植芸薹属植物作绿肥或用菜籽饼粕改良土壤,或其它作物轮作倒茬,防治土传病原真菌、农业害虫及杂草,可大大减少对化学合成农药的用量,具有巨大的应用潜力。由于利用芸薹属植物进行生物防治与利用化学农药对土壤进行熏蒸消毒具有相同之处,因而叫做生物熏蒸。

本次学术研讨会共进行了 6 场大会报告,两场海报展示。与会的各国专家围绕以下 6 个议题开展了深入的研讨。

1. 硫甙/芥子酶生物化学
2. 绿肥与害虫控制
3. 线虫和昆虫的控制
4. 病原体控制
5. 残败组织与饼粕—生物杀虫剂
6. 商业化应用与技术移植

各国的研究热点及主要进展集中在土壤中硫甙降解的条件、硫甙的低成本工业化制备,硫甙降解产物的分离提取、增强硫甙及降解产物生防效果的途径和方法等。一些国家开始培育速生的、高硫甙的油菜或芥菜应用于生物熏蒸,油菜饼粕的丸粒化应用等。

(中国农科院油料所刘丹)