

# $\beta$ -胡萝卜素加强的转基因水稻培育

杜丽缺 赵明超 林拥军 陈 浩

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/华中农业大学国家植物基因研究中心(武汉), 武汉 430070

**摘要** 为了使水稻种子积累维生素 A 的前体—— $\beta$ -胡萝卜素, 将人工合成的来源于欧文氏菌的八氢番茄红素脱氢酶基因(*crtI*)和来源于玉米的八氢番茄红素合酶基因(*psy*)导入水稻中, 且在水稻胚乳中特异性表达。结合 PCR 和 Southern blotting 的检测结果, 从 *psy/crtI* 转化植株中分离得到 1 个外源基因单拷贝插入且无选择标记(Marker-free)的纯合转基因家系 ky1-4。通过热不对称交错 PCR(Tail-PCR)分离得到 ky1-4 的 T-DNA 插入位点右边界的侧翼序列, 结合 Southern blotting 检测结果推测该插入位点位于水稻第 11 号染色体上。超高效液相色谱(UPLC)分析结果表明, *psy/crtI* 转化水稻植株种子中  $\beta$ -胡萝卜素含量为  $(1.99 \pm 0.11) \sim (4.41 \pm 0.30) \mu\text{g/g}$ , 其中 ky1-4 家系  $\beta$ -胡萝卜素的含量为  $(3.11 \pm 0.08) \mu\text{g/g}$ 。

**关键词** 水稻; 维生素 A; 八氢番茄红素合酶; 八氢番茄红素脱氢酶; 黄金米

**中图分类号** S 511; Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)05-0001-07

维生素 A 是人体必需的微量元素, 如果人体维生素 A 摄入量不足, 临床症状常表现为夜盲症、眼球干燥、角膜软化, 严重的甚至导致失明<sup>[1]</sup>。研究还发现, 维生素 A 缺乏导致人体免疫力降低<sup>[2]</sup>, 并伴随腹泻<sup>[3]</sup>、呼吸道疾病和麻疹等并发症<sup>[4-5]</sup>。据估算, 全球约有 1.24 亿儿童维生素 A 摄入量不足, 如果改善饮食条件每年可避免一百万至两百万儿童的死亡<sup>[5]</sup>。

人体自身不能合成维生素 A, 需要通过饮食补充。其中, 类胡萝卜素是维生素 A 的唯一前体, 且是人类饮食中重要的植物色素。根据结构的不同, 将其分为叶黄素和胡萝卜素两大类。胡萝卜素由植物合成, 但动物不能制造, 它包括  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\gamma$ -胡萝卜素等多异构体。其中  $\beta$ -胡萝卜素在人体内与维生素 A 共存在, 是主要的维生素 A 来源<sup>[6]</sup>。1 个分子的  $\beta$ -胡萝卜素经裂解形成 2 个分子的视黄酸<sup>[7]</sup>, 视黄酸是动物体内维生素 A 代谢途径中的中间产物。

在全球范围内, 水稻是重要的粮食作物之一。水稻籽粒中不能合成维生素 A, 因此维生素 A 缺乏问题主要发生在以水稻为主食的贫困人群中。研究发现在水稻未成熟的胚乳中, 含有合成维生素 A 早

期的中间产物牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸, 该产物在八氢番茄红素合成酶的作用下, 转化为胡萝卜素八氢番茄红素<sup>[8]</sup>。随着植物中类胡萝卜素生物合成途径逐步被阐明, 人们开始探索在植物中调节各种相关合成酶的表达从而调控类胡萝卜素的代谢途径。例如, 在油菜籽粒中超表达细菌八氢番茄红素合酶, 结果显示番茄红素、 $\alpha$ -胡萝卜素及  $\beta$ -胡萝卜素的含量显著增加<sup>[9]</sup>。在水稻胚乳中特异性表达类胡萝卜素, 八氢番茄红素合酶、八氢番茄红素脱氢酶和番茄红素环化酶(lycopene  $\beta$ -cyclase)共转化的植株中显示类胡萝卜素积累量达  $1.6 \mu\text{g/g}$ , 即 Golden rice 1<sup>[10]</sup>。随后又报道 Golden rice 2, 将玉米来源的八氢番茄红素合酶和细菌欧文氏菌来源的八氢番茄红素脱氢酶转化到水稻籽粒中, 且在胚乳特异性谷蛋白启动子的驱动下表达, 数据显示类胡萝卜素总量为  $37.0 \mu\text{g/g}$ , 比“Golden rice 1”中含量增加 23 倍, 且优先积累  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[11]</sup>。中国是个人口大国, 以水稻为主食, 因此提高水稻胚乳中  $\beta$ -胡萝卜素的积累含量迫切需要。本研究将玉米来源的八氢番茄红素合酶和细菌欧文氏菌来源的八氢番茄红素脱氢酶基因转化到水稻中, 且在水稻胚乳中特异性地表达, 使得水稻籽粒中可积累促进人体健康的  $\beta$ -胡

收稿日期: 2013-04-24

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08010-002)

杜丽缺, 硕士研究生, 研究方向: 水稻基因工程. E-mail: dulique@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 陈 浩, 博士, 副教授. 研究方向: 水稻基因工程. E-mail: hchen@mail.hzau.edu.cn

萝卜素。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 TOP10 和根癌农杆菌菌株 EHA105,均由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室保存和提供。

基因表达载体 pC1300dT(含有 2 个 T-DNA 区)是以 pCAMBIA1300(由澳大利亚 CAMBIA 实验室惠赠)为原始载体改造而成的。pC1300dT 载体含有 2 个 T-DNA 区,筛选标记潮霉素抗性基因(*hpt*)在一个 T-DNA 区,目的基因在另一个 T-DNA 区。当双 T 区载体侵染植物时,2 个 T-DNA 区独立转移,为后期 Marker-free 家系的筛选提供条件。

*psy* 和 *crtI* 2 个目的基因的大小分别为 2 765 和 2 760 bp,均由笔者所在实验室委托 Invitrogen

公司合成。2 个基因均在胚乳特异性谷蛋白启动子的驱动下表达<sup>[11]</sup>,并在 *nos* 终止子作用下终止基因的转录。基因合成时,在 *crtI* 基因两端加 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切位点,在 *psy* 基因两端加 *Hind* III 和 *Sal* I 酶切位点。转化受体为水稻粳品种空育 131,由华中农业大学生命科学技术学院何予卿教授提供。

### 1.2 表达载体 pC1300dT-*psy/crtI* 的构建

利用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切表达载体 pC1300dT 和 *psy* 基因,回收 *psy* 基因外源片段,纯化载体片段,连接 *psy* 基因外源片段和载体形成中间载体 pC1300dT-*psy*。利用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切 *crtI* 基因和 pC1300dT-*psy* 载体。最后获得连接 *psy* 基因和 *crtI* 基因的表达载体 pC1300dT-*psy/crtI*(图 1)。将构建好的 pC1300dT-*psy/crtI* 表达载体用电激法转化到农杆菌菌株 EHA105 中,−70 °C 保存。

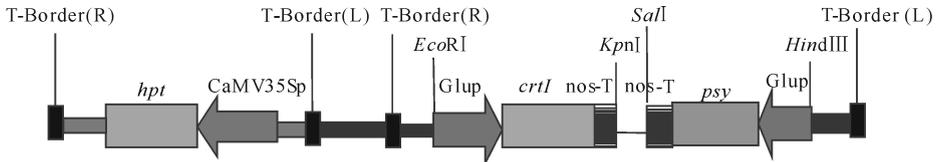


图 1 表达载体 pC1300dT-*psy/crtI* 的 T-DNA 区段结构

Fig. 1 Schematic graph of T-DNA region of pC1300dT-*psy/crtI* expression vector

### 1.3 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化

用农杆菌介导的遗传转化法将 *psy/crtI* 表达载体导入粳稻品种空育 131 中。农杆菌介导的遗传转化法参照林拥军等<sup>[12]</sup>报道的水稻转化方法。将获得的 T<sub>0</sub>代 *psy/crtI* 转化植株种植于小盆中,在温室中自然光照条件下生长至结实。

### 1.4 PCR 检测

分单株剪取 3~5 cm 水稻叶片组织,小量抽提水稻基因组 DNA。用引物 Hpt- F/R、CH-1-2F/R 和 CH-2-2F/R(表 1)分别扩增 *hpt* 基因、*psy* 基因和 *crtI* 基因的片段,预期的 PCR 产物大小为 750、901、820 bp。PCR 反应体系:模板 2 μL;10×Buffer 2 μL;dNTP(2 mmol/L) 2 μL;引物 F/R 各 0.2 μL;R-Taq(TaKaRa, 中国大连) 0.2 μL;补水到 20 μL。PCR 扩增条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 45 s,28 个循环;72 °C 7 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,筛选出 3 对引物扩增产物均为阳性的即为阳性苗。

### 1.5 Southern blotting 检测

利用 Southern blotting 检测确定 *psy/crtI* 转

化植株外源基因插入的拷贝数,采用 CTAB 法抽提水稻基因组总 DNA<sup>[13]</sup>。Southern blotting 的过程如下:取 8 μg 总 DNA,用过量的限制性内切酶 *EcoR* I 或 *Hind* III 在 37 °C 酶切 24 h。然后于 30 V 电泳 24 h。电泳结束后将凝胶上的总 DNA 片段印迹到尼龙膜上。用引物 ACH-2F/R(表 1)扩增 *crtI* 基因片段作杂交的探针。65 °C 预杂交 20 h;然后加入 P<sup>32</sup> 标记的探针,65 °C 杂交 20 h;用 2×SSC(加有 0.1% SDS)洗膜液室温冷洗 1 次,再 65 °C 热洗 1 次;压片、放射自显影。

### 1.6 利用 Tail-PCR 分离 Marker-free 家系的侧翼序列

根据 Liu 等<sup>[14]</sup>报道的热不对称交错 PCR 方法(Tail-PCR)分离 *psy/crtI* 转化植株 Marker-free 家系的侧翼序列。在 T 载体上设计 3 条特异引物和 1 条简并引物 AD8(表 1),进行 3 轮 PCR 扩增。将首轮 PCR 的产物稀释 40 倍作为模板进行第 2 轮 PCR 反应。将第 2 轮 PCR 产物稀释 10 倍作为模板进行第 3 轮 PCR 反应。最终的 PCR 产物取一部

表1 本研究涉及的所有引物

Table 1 All primers involved in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')	作用 Function
Hpt-F	AGAATCTCGTGCCTTCAGCTTCGA	<i>hpt</i> 基因片段扩增的左引物 Forward primer for <i>hpt</i> gene amplification
Hpt-R	TCAAGACCAATGCGGAGCATATAC	<i>hpt</i> 基因片段扩增的右引物 Reverse primer of <i>hpt</i> gene amplification
CH-1-2F	GTCCGAGCAGAAGGTCTA	<i>psy</i> 基因片段扩增的左引物 Forward primer for <i>psy</i> gene amplification
CH-1-2R	GAAGTTGTTGTAGTCGTTGG	<i>psy</i> 基因片段扩增的右引物 Reverse primer for <i>psy</i> gene amplification
CH-2-2F	CAACACTGACATTACTTCCA	<i>crtI</i> 基因片段扩增的左引物 Forward primer for <i>crtI</i> gene amplification
CH-2-2R	CACGGCTTCAATCTTGTT	<i>crtI</i> 基因片段扩增的右引物 Reverse primer for <i>crtI</i> gene amplification
Tail-R <sub>1</sub>	CAACTTAATCGCCTTGACGAC	Tail-PCR 中第1轮特异性引物 Specific primer for the first round of amplification in Tail-PCR
Tail-R <sub>2</sub>	CTGGCGTAATAGCGAAGAGGC	Tail-PCR 中第2轮特异性引物 Specific primer for the second round of amplification in Tail-PCR
Tail-R <sub>3</sub>	CAACAGTTGCGCAGCCTGAAT	Tail-PCR 中第3轮特异性引物 Specific primer for the third round of amplification in Tail-PCR
AD8	AGWGNAGWANCAWAGG <sup>1)</sup>	Tail-PCR 中简并引物 Arbitrary degenerate primers for Tail-PCR
ACH-2F	AATTCGTCTACAAGCTGCG	<i>crtI</i> 基因片段探针扩增的左引物 Forward primer for the probe amplification of the <i>crtI</i> gene
ACH-2R	GAAACCAGACGCCCACTCA	<i>crtI</i> 基因片段探针扩增的右引物 Reverse primer for <i>crtI</i> gene fragment probe

分进行电泳检测,如果结果为阳性则将 PCR 产物 TA 克隆到 pEASY-T3 载体上并测序。在 NCPGR (<http://redb.ncpgr.cn/modules/redbtools/blast.php>)网站上利用 Blastn 程序将测序结果与日本晴(Nipponbare)基因组序列进行比对。

### 1.7 *psy/crtI* 转化植株种子中 $\beta$ -胡萝卜素含量测定

利用皂化反应和正己烷萃取方法抽提水稻种子中的  $\beta$ -胡萝卜素,抽提方法参见文献[15]。 $\beta$ -胡萝卜素标样(5 mg, HPLC 纯度, CAS 号 144-68-3)购自 Sigma 公司,用石油醚(分析纯)溶解至 9.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。乙腈和甲醇都购自 Fisher 公司。操作过程参见文献[15-16],步骤如下:

1)测定  $\beta$ -胡萝卜素标样纯度。用 500 mL 的石油醚溶解标样,随后取 50  $\mu\text{L}$  溶解液至尖底玻璃离心管中,吹干,随后向尖底玻璃离心管中加入 1 mL 流动相(乙腈+甲醇( $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{甲醇}}=3:1$ ))、BHT、三乙胺)进行溶解,溶解液经有机相过滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ ,  $d=13$  mm)过滤,并注入 2 mL 棕色液相色谱瓶中,使用 Waters 公司的超高效液相色谱仪的紫外检测器检测标样的纯度。通过对  $\beta$ -胡萝卜素标样产生的全部峰进行积分,计算出总面积为 808 435,主

面积为 663 770,求得纯度为 82.1%。

2)测定光密度值。取  $\beta$ -胡萝卜素标样溶解液 2 mL 至 10 mL 容量瓶定容,用紫外-可见分光光度计在 450 nm 波长下测定光密度值,测得其值为 0.321 6。

3)计算标样初始质量浓度。 $\beta$ -胡萝卜素的吸光系数是 2 592( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ),测定波长 450 nm<sup>[17]</sup>,根据初始质量浓度公式求得  $\beta$ -胡萝卜素初始质量浓度为 6.203 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

$$\text{初始质量浓度}(\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{D \times 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} \times \text{稀释倍数}$$

式中, $D$ :光密度值; $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ :百分吸光系数。

4)计算标样校对质量浓度。校对质量浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )=初始质量浓度 $\times$ 纯度,将以上数值带入校对浓度公式中,求得  $\beta$ -胡萝卜素校对质量浓度为 5.093 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 1.8 $\beta$ -胡萝卜素标准曲线建立

从标样中依次吸取 100、300、500、800  $\mu\text{L}$ , 1、2、3 mL 各 3 个重复至尖底玻璃离心管中,吹干,加流动相进行溶解,通过滤膜过滤到 2 mL 棕色瓶中。

随后使用超高效液相色谱仪进行测定。根据峰面积与标准品质量浓度的线性关系,基于外标法<sup>[17]</sup>构建的回归方程对样品中 $\beta$ -胡萝卜素含量进行量化分析。以峰面积为纵坐标( $y$ ),标样含量为横坐标( $x$ ),在 UPLC 仪器上自动生成标准曲线: $y = 2.81e+007x + 2.44e+006$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 $T_0$ 代 *psy/crtI* 转化植株 PCR 检测

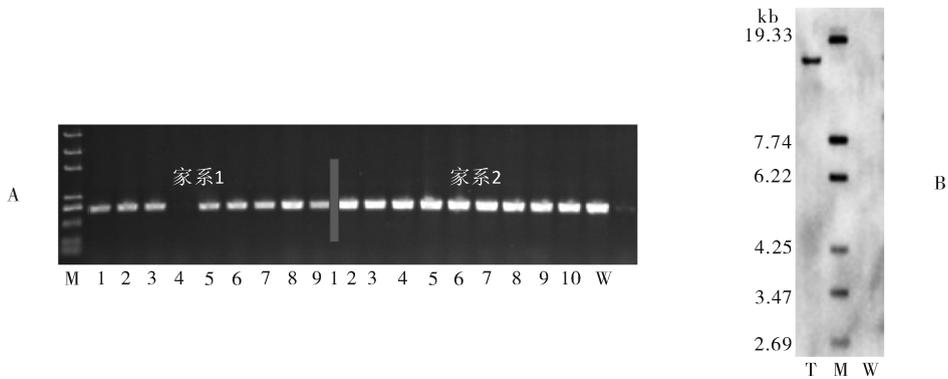
通过农杆菌介导的遗传转化方法,共获得 *psy/crtI*  $T_0$ 代独立转化植株 29 株。PCR 检测结果表明,Hpt-F/R引物扩增 *hpt* 基因检测获得阳性植株 29 株(阳性率 100%);CH-1-2F/R引物扩增 *psy* 基因获得阳性植株 23 株(阳性率 78%);CH-2-2F/R

扩增 *crtI* 基因获得阳性植株 18 株(阳性率为 62%)。最终,获得 17 株 3 种引物扩增都为阳性的转化苗。

### 2.2 纯合 Marker-free 家系筛选

将  $T_1$ 代 *psy/crtI* 转化植株每个家系分单株用 Hpt-F/R引物进行 PCR 检测,其中,ky1-4 植株 *hpt* 基因片段没扩增出带(图 2A),表明其 *hpt* 基因发生了分离。对 ky1-4 进一步 Southern blotting 分析(图 2B)表明,ky1-4 中存在目的基因且为单拷贝插入的 Marker-free 家系。

在海南取 ky1-4 的  $T_3$  家系 100 份样品,用 ACH-2-2F/R引物 PCR 扩增 *crtI* 基因片段。PCR 检测结果说明,ky1-4 的  $T_3$  代 100 份植株均为阳性。综上,证明 ky1-4 的  $T_3$  家系已经纯合。



A:用 Hpt-F/R 引物扩增 *hpt* 基因片段,片段大小为 750 bp,W 表示野生型空育 131 *Hpt* gene fragment was amplified by the Hpt-F/R primers,and the fragment size was 750 bp,wild-type Kongyu131 was noted W; B:用 *Hind*III 酶切水稻基因组,*crtI* 基因片段作为探针,T 表示 ky1-4,M 表示  $\lambda$ -*Eco*T14 DNA marker,W 表示野生型空育 131 Rice genome were digested by *Hind*III,the *crtI* gene fragment was as a probe,ky1-4 was noted by T, $\lambda$ -*Eco*T14 DNA marker was noted by M,wild-type kongyu131 was noted W.

图 2 *psy/crtI* 转化植株 Southern blotting 分析

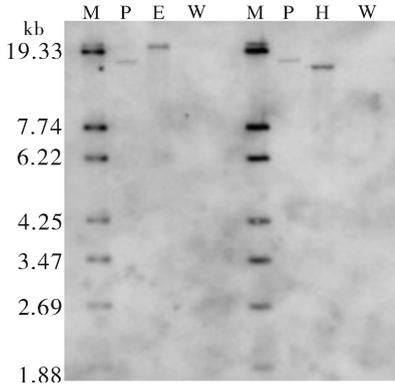
Fig. 2 Southern blotting analysis of *psy/crtI* transformed plants

### 2.3 ky1-4 侧翼序列分离

采用 TaiL-PCR 的方法分离 Marker-free 家系 ky1-4 的侧翼序列。测序结果出来后,在 NCPGR 网站 (<http://ncpgr.hzau.edu.cn/web/tools.jsp>) 上与粳稻日本晴(Nipponbare)的基因组序列进行比对,结果发现该侧翼序列在水稻 7 条染色体(1、2、6、8、10、11、12)都存在同源序列。

然后分别用 *Eco*R I 和 *Hind*III 酶切家系 ky1-4 基因组 DNA,进行 Southern blotting 分析,结果(图 3)表明,用 *Eco*R I 酶切出的条带大于 19 kb,已知阳性对照是 15.5 kb,用 *Hind*III 酶切出的条带小于 15.5 kb。然后把与右端侧翼序列同源性高的染色体序列从网站 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/>) 上下载下来。

*psy/crtI* 基因共 5 525 bp,估算出插入位点右端基因组序列大于 14 kb 处有 *Eco*R I 酶切位点,插入位点左端基因组序列大于 2.2 kb 小于 10 kb 处有 *Hind*III 酶切位点。根据以上结果推测,T-DNA 插入位点位于水稻 11 号染色体 18 750 363 bp 处,距离 LOC\_Os11g31890.1 基因 3 199 bp,距离 LOC\_Os11g31900.1 基因 762 bp。LOC\_Os11g31890.1 基因跨越水稻 11 号染色体 18 747 164 与 18 740 614 之间,预测为 NLI 互作用因子;LOC\_Os11g31900.1 基因跨越水稻 11 号染色体 18 753 286 与 18 751 125 之间,预测为酰基载体蛋白。



M:  $\lambda$ -EcoT14 DNA marker; P: 阳性对照 Positive control; E: EcoRI 酶切 EcoRI digested; W: 野生型空育 131 Wild-type Kongyul31; H: HindIII 酶切 HindIII digested.

图 3 Marker-free 家系 ky1-4 的 Southern blotting

Fig. 3 Southern blotting analysis of Marker-free line ky1-4

### 2.4 *psy/crtI* 转化植株种子中 $\beta$ -胡萝卜素含量的测定

*psy/crtI* 转化植株种子在去壳后颜色为金黄色, 与野生型亲本的种子形成鲜明对比, 表明转基因家系中积累了  $\beta$ -胡萝卜素。

利用 UPLC 进行分析(表 2)表明, 转基因家系糙米中  $\beta$ -胡萝卜素的含量为  $(1.99 \pm 0.11) \sim (4.41 \pm 0.30) \mu\text{g/g}$ , 其中 Marker-free 家系 ky1-4 糙米中  $\beta$ -胡萝卜素的含量为  $(3.11 \pm 0.08) \mu\text{g/g}$ 。对 *psy/crtI* 转化植株的主要农艺性状进行考察, 并与野生型品种空育 131 进行对比(表 2), 从单株(由于要筛选 Marker-free 家系, 因此分单株收种)农艺性状考察结果看出, Marker-free 家系 ky1-4 与野生型品种空育 131 主要农艺性状未发生明显变化, 尤其在结实率和单株产量方面。

表 2 转化植株中  $\beta$ -胡萝卜素含量和农艺性状考察

Table 2 Content of  $\beta$ -carotene of transformed plants and agronomic traits

编号 Number	$\beta$ -胡萝卜素/ ( $\mu\text{g/g}$ ) $\beta$ -carotene	株高/cm Plant height	有效穗数 Panicles per plant	每穗实粒数 Filled grains per panicle	千粒重/g 1 000-grains weight	结实率/% Seed setting rate	单株产量/g Yield per plant
ky1-4	$3.11 \pm 0.08$	78	35	39.71	22.22	0.68	30.89
ky2-5	$4.30 \pm 0.27$	71	20	43.45	23.58	0.74	20.49
ky2-8	$3.90 \pm 0.06$	73	23	41.04	21.68	0.68	20.47
ky5-1	$3.88 \pm 0.09$	78	44	39.41	21.91	0.76	38.00
ky6-4	$1.99 \pm 0.11$	84	24	40.79	21.26	0.69	20.81
ky7-11	$4.14 \pm 0.69$	79	26	42.19	21.93	0.71	24.06
ky8-1	$4.41 \pm 0.30$	67	32	26.81	20.20	0.65	17.33
ky9-2	$2.07 \pm 0.08$	71	25	34.52	21.38	0.57	18.45
ky9-6	$3.82 \pm 0.34$	73	35	37.00	22.34	0.69	28.93
ky16-1	$3.03 \pm 0.20$	78	28	38.11	23.05	0.69	24.59
ky17-11	$3.59 \pm 0.32$	72	18	36.67	23.21	0.69	15.32
ky17-14	$3.59 \pm 0.04$	86	22	34.55	21.67	0.60	16.47
ky131 <sup>1)</sup>	$0.00 \pm 0.03$	$72 \pm 0.20$	$34 \pm 0.03$	$37.02 \pm 0.07$	$23.01 \pm 0.41$	$0.72 \pm 0.14$	$28.95 \pm 0.22$

1) 数据为 9 株的平均值 Mean of nine plants.

## 3 讨 论

Golden rice 2 研发成功以后, 研究者一直担心知识产权问题会成为阻碍 Golden rice 2 应用的主要潜在问题之一。随着先正达公司将 Goden rice 2 的发明权捐献给了“黄金水稻”人道主义委员会<sup>[18]</sup>, 以及涉及 Golden rice 2 专利的所有者也同意放弃其专利权, 发展中国家可以无偿使用 Golden rice 2 的技术。中国属于发展中国家, 在很多人群中存在维生素 A 缺乏现象, 尤其在贫困地区儿童中

最为普遍<sup>[19]</sup>, 因此发展 Golden rice 2 具有深远意义。

本研究采用了 Golden rice 2 中所使用的 *psy* 基因和 *crtI* 基因, 将其转化到水稻种子中。与 Golden rice 2 不同之处在于: (1) 本研究采用改造过的双 T 区的 Ti 载体作为转化载体, 标记基因在一个 T 区, 目的基因在另一个 T 区, 即后期可以获得无选择标记的转基因植物后代。在 Golden rice 2 中, 磷酸甘露糖异构酶基因 (phosphomannose isomerase, *pmi*) 被作为选择标记与目标基因一同

转入水稻<sup>[11]</sup>。由于 *pmi* 基因和目的基因紧密连锁,该标记基因不能在 Golden rice 2 中去除。虽然理论上讲 *pmi* 筛选标记是安全的,但是无选择标记的转基因水稻显然潜在的风险更小。(2)本研究所使用的转化受体品种空育 131 是我国目前种植面积最大的常规水稻品种<sup>[20]</sup>,以其为受体获得的转基因水稻品种,在通过国家安全评价程序后不需要另外进行转育工作可直接推向市场。

*psy/crtI* 转化植株种子中  $\beta$ -胡萝卜素含量积累有限的原因可能是:(1)转化受体不同,可能产生不同的生物背景,进而影响蛋白的表达;(2)位置效应,转化的 *psy/crtI* 基因插入基因组的不同位置,有可能产生不同的效果<sup>[21]</sup>;(3)植株生长环境不同,可能影响  $\beta$ -胡萝卜素的积累<sup>[22]</sup>。

虽然本研究中 *psy/crtI* 转化植株种子中  $\beta$ -胡萝卜素的积累量比报道的 Golden rice 2 中积累量低,但对于解决人群中维生素 A 缺乏现象仍然具有重要意义。据分析 1 mg 的  $\beta$ -胡萝卜素在人体内可以转换为 435  $\mu\text{g}$  的视黄醇。中国目前维生素 A 推荐的日摄入量为 700  $\mu\text{g}$ <sup>[23]</sup>,因此 50 g 的 Golden rice 2 可提供 6~8 岁儿童维生素 A 推荐摄入量的一半以上。本研究所筛选到的 *ky1-4* 纯合家系,其  $\beta$ -胡萝卜素含量为 3.11  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,按维生素 A 推荐摄入量的 60%推算,每天需食用 *ky1-4* 大米 385.8 g。考虑到 *ky1-4* 家系为单拷贝整合、遗传稳定、主要农艺性状无显著变化、插入位点位于基因间区,我们认为该家系具有较强的商业化潜力。

## 参 考 文 献

- [1] SOMMER A. Nutritional blindness[M]. New York: Oxford University Press,1982.
- [2] ROSS A,STEPHENSEN C. Vitamin A and retinoids in antiviral responses[J]. The FASEB Journal,1996,10: 979-985.
- [3] SOMMER A. Vitamin A prophylaxis[J]. Archives of Disease in Childhood,1997,77: 191-194.
- [4] GRANT J. The state of the world's children[J]. Indian Journal of Pediatrics,1985,52: 3-10.
- [5] WES J K, HOWARD G, SOMMER A. Vitamin A and infection: public health implications[J]. Annual Review of Nutrition,1989,9: 63-86.
- [6] YEUM K, RUSSELL R. Carotenoid bioavailability and bioconversion[J]. Annual Review of Nutrition,2002,22: 483-504.
- [7] MARTIN C, BUTELLI E, PETRONI K, et al. How can research on plants contribute to promoting human health[J]. The Plant Cell Online,2011,23: 1685-1699.
- [8] BURKHARDT P, BEYER P, WUNN J, et al. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis[J]. The Plant Journal,1997,11: 1071-1078.
- [9] SHEWMAKER C, SHEEHY J, DALEY M, et al. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects[J]. The Plant Journal,2002,20: 401-412.
- [10] YE X, AL-BABILI S, KLOTI A, et al. Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm[J]. Science,2000,287: 303-305.
- [11] PAINE J, SHIPTON C, CHAGGAR S, et al. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content[J]. Nature Biotechnology,2005,23: 482-487.
- [12] 林拥军,陈浩,曹应龙,等.农杆菌介导的牡丹江 8 号高效转基因体系的建立[J].作物学报,2002,28(3):294-300.
- [13] MURRAY M, THOMPSON W. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research,1980,8: 4321-4326.
- [14] LIU Y, WHITTIER R. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking[J]. Genomics,1995,25: 674-681.
- [15] 周毅,付志远,李青,等.高油和普通玉米自交系类胡萝卜素和生育酚含量的比较分析[J].作物学报,2009,35: 2073-2084.
- [16] KIMURA M, RODRIGUEZ-AMAYA D. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids[J]. Food Chemistry,2002,78: 389-398.
- [17] KURILICH A, JUVIK J. Simultaneous quantification of carotenoids and tocopherols in corn kernel extracts by HPLC[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,1999,22: 2925-2934.
- [18] ENSERINK M. Tough lessons from golden rice[J]. Science,2008,320: 468-471.
- [19] 林良明,刘玉琳,马官福,等.中国六岁以下儿童维生素 A 缺乏情况调查[J].中华预防医学杂志,2002,36(5): 315-319.
- [20] 孙淑红.从空育 131 的试种成功看寒地粳稻种质资源的创新[J].中国农学通报,2005,21(2):134-135.
- [21] AL-BABILI S, BEYER P. Golden Rice-five years on the road-five years to go[J]. Trends in Plant Science,2005,10: 565-573.
- [22] RABBANI S, BEYER P, LINTIG J, et al. Induced  $\beta$ -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil* [J]. Plant Physiology,1998,116: 1239-1248.

[23] TANG G, HU Y, YIN S, et al.  $\beta$ -carotene in Golden Rice is as good as  $\beta$ -carotene in oil at providing vitamin A to children[J].

The American Journal of Clinical Nutrition, 2012, 96: 658-664.

## Cultivation of transgenic rice with enhanced $\beta$ -carotene content

DU Li-que ZHAO Ming-chao LIN Yong-jun CHEN Hao

*National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement /  
National Center of Plant Gene Research (Wuhan),  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** To improve the  $\beta$ -carotene content of rice endosperm, the synthesized phytoene synthase gene(*psy*) from maize and phytoene dehydrogenase gene(*crtI*) from *Erwinia uredovora* are transformed into rice under the control of rice endosperm-specific glutellin promoter. A single-copy inserted and marker-free *psy/crtI* homozygous transgenic line ky1-4 was selected by combining PCR screening with Southern blotting analysis. The flanking genomic sequence next to the right border of the T-DNA insertion site was determined by thermal asymmetric interlaced PCR (Tail-PCR). In the assistance of Southern blotting analysis, the insertion of ky1-4 was located on rice chromosome 11. The quantitative analysis by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) showed that  $\beta$ -carotene contents in seeds of different transformed lines ranged from  $(1.99 \pm 0.11) \mu\text{g/g}$  to  $(4.41 \pm 0.30) \mu\text{g/g}$ , and that of ky1-4 was  $(3.11 \pm 0.08) \mu\text{g/g}$ .

**Key words** *Oryza sativa*; vitamin A; phytoene synthase; phytoene dehydrogenase; Golden rice

(责任编辑:张志钰)