

葡萄蔗糖转运蛋白在烟草中的反义表达及其对转基因烟草的影响*

张雅丽¹⁾ 孟庆勇²⁾ 曲桂芹¹⁾ 林希谨¹⁾ 卢江¹⁾ 罗云波^{1)**}

(¹⁾中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; ²⁾中国农业大学生物学院国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 将葡萄蔗糖转运蛋白 *VvSUC27* cDNA 以反义方向插入到含有 *CaMV 35s* 启动子的真核表达载体 pBI121 载体中, 然后转化到烟草(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) 植株中. 转反义 *VvSUC27* cDNA 的烟草植株在含有 20 g/L 蔗糖的培养基上能够正常生长发育, 但是通过切片观察, 发现其根部发育较弱, 且叶片叶绿体含量增加. 可溶性糖测定发现, 转基因烟草根部蔗糖含量只有野生型烟草的 51%. ¹⁴C 蔗糖吸收实验发现转基因烟草转运外界蔗糖的能力大大降低.

关键词 葡萄, 蔗糖转运蛋白, 反义, *VvSUC27*, 转基因, 烟草

学科分类号 Q78

葡萄是世界上最有经济价值的果树, 其果实可以用来鲜食、酿酒、制干以及制汁. 高品质的葡萄加工产品要求必须有优质的葡萄果实作为原材料, 而葡萄果实的含糖量又是其质量的关键指标之一. 植物中糖类物质通过叶片合成然后供给库端消耗或者储存起来, 当糖类物质在植物不同器官间转移时, 蔗糖是其主要的运输形式, 而细胞膜上穿膜的蔗糖转运蛋白是运输蔗糖的载体, 它调控着糖类物质在植物体内的分配以及在库端, 比如说果实中糖的积累. 所以, 蔗糖转运蛋白功能的行使对于植物的生长发育以及其生产能力都是至关重要的.

在高等植物中, 第一个蔗糖转运蛋白的 cDNA 是 1992 年由 Riesmeier 等^[1]从菠菜中克隆得到的. 从这之后, 又有许多蔗糖转运蛋白相继从不同植物以及不同器官克隆得到^[2], 但是, 它们大多数只是基因序列, 通过分析认为属于蔗糖转运蛋白家族, 而这些基因之中目前只有仅仅二十几个是经过功能验证并确认为蔗糖转运蛋白的编码基因^[3]. 为了研究葡萄果实中糖分的积累过程, Davies 等^[4]于 1999 年从葡萄果实中克隆得到了 3 个推测可能是葡萄蔗糖转运蛋白的基因(*VvSUC11*、*VvSUC12*、*VvSUC27*), 后来其中两个 (*VvSUC11*、*VvSUC12*) 在酵母中进行了功能的验证^[5], 而 *VvSUC27* 这个基因的功能至今没有人报道. 本实验室研究发现, *VvSUC27* 在葡萄的根、幼叶以及果实这样的库器

官中大量表达, 而在叶片中表达量很少, 这与 Davies 等^[4]发表的结果是一致的, 初步认为这个基因很可能是编码特异性存在于库组织中的蔗糖转运蛋白.

验证新基因功能的一种方法就是通过转反义基因到生物个体中, 导致生物个体与此基因同源的自身的基因受到干扰, 从而在表型上或者生理指标上表现出来^[6]. 本实验选择模式植物烟草做为反义 *VvSUC27* cDNA 的受体, 对于转基因烟草的表型及糖分含量进行了测定, 初步断定 *VvSUC27* 是一个编码蔗糖转运蛋白的基因.

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

葡萄品种: 赤霞株(*Cabernet sauvignon*). 烟草品种: 三生烟 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN). pBI121 载体、DH5 α 大肠杆菌菌株、农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) C58 都由本室保存. pGEX-T easy 载体购自 Promega 公司. 限制性内切

*国家自然科学基金资助项目 (30270934).

** 通讯联系人. Tel: 010-62737538, Fax: 010-62737465

E-mail: ybl@cau.edu.cn

收稿日期: 2006-03-03, 接受日期: 2006-04-20

酶 *Bam*H I, *Sac* I 购自 TaKaRa 公司. RNase、X-gal、氨苄青霉素、 β - 巯基乙醇、Taq DNA 聚合酶, dNTPs 购自鼎国生物技术公司. DNA 印迹试剂盒 购自 Roche (DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit). 引物、M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒由上海生工生物工程有限公司生产. Sucrose- 14 C 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司 (英国).

1.2 *VvSUC27* cDNA 基因的获得

以 CTAB 法提取葡萄果实总 RNA, 通过凝胶电泳以及测取光吸收值 (*A*) 检验总 RNA 质量, 选择质量符合要求的总 RNA 进行 cDNA 第一链反转录合成, 根据 Davies 等^[4]发表的 *VvSUC27* cDNA 序列设计引物. SUC P1, 5' GGA GTT AGC CAA GCC TTC TTC A 3'; SUC P2, 5' TTA AGA CGA CGG CTG AGT CCT C 3'. 扩增反转录产物, 将得到的大小合适的 PCR 扩增片段克隆到 pGEX-T 载体中, 并测序验证克隆基因.

1.3 真核表达载体的构建

设计引物: SUCa P1, 5' ATA GAG CTC ATG GAG TTA GCC AAG CC 3'; SUCa P2, 5' TAT GGA TCC TTA AGA CGA CGG CTG AG 3'. 通过 PCR 及酶切的方法将葡萄蔗糖转运蛋白 *VvSUC27* cDNA 反向插入到真核表达载体 pBI121 中, 构建了反义真核表达载体 pBI121-*VvSUC27*.

1.4 转基因烟草的制备

1.4.1 转基因烟草的转化、栽培. 采用叶盘法转化烟草. 首先, 用锋利的刀片将生长旺盛的烟草叶缘切去, 将叶片切成 1 cm² 的小片, 弃中脉. 然后, 用农杆菌液 (农杆菌的转化方法参见《植物基因工程技术》, 活化菌液用 1/2MS 稀释, *A* 值约为 0.2 左右), 浸染 5 min, 无菌滤纸吸干多余的菌液. 烟草叶片经过预培养更有利于转化, 预培养基为 T1 (MS 基本成分 + 20 g/L 蔗糖), 在 T1 培养基上加滤纸一张, 将浸过农杆菌的叶片转至滤纸上, 25℃ 黑暗共培养 2 天. 共培养后的叶片转至 T2 (T1 + 2 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 500 mg/L Carb) 培养基上, 25℃ 光培养 24 h. 将叶片转至 T3 (T2 + 20 mg/L Kan) 培养基上, 25℃ 光照培养 15 天后, 在叶缘处可见愈伤组织和芽的分化. 叶片继续在 T3 中培养, 每隔 20 天继代一次, 约 2 个月后, 待小芽长至 3~5 cm, 转入生根培养基 T4 (T1 + 0.1 mg/L NAA + 500 mg/L Carb + 20 mg/L Kan). 在 T4 中培养约 20 天开始生根, 继续培养 40 天可形

成发达的根系, 将无菌苗的封口膜打开, 向瓶内加入少量的水 (软化培养基), 室温放置一段时间, 中间注意换水. 最后, 将烟草苗移栽至蛭石与营养土 (1:3) 的花盆中, 用透明塑料袋罩住以防止水分蒸发. 待植物移栽成活后, 从花盆中连土一并取出, 移入温室. 移栽温室的烟草约在 2 个月后进入盛花期, 待其结籽干燥后, 收集并密封保存.

1.4.2 转基因烟草阳性检测. DNA 印迹实验用 DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit 来完成. 探针模板为 *VvSUC27* cDNA 中间部分通过引物 (SUCi P1, CGA CAT CGG AAG GGT TTC; SUCi P2, GAA GAG AAG GAA AGG GAA CCA) 扩增出的一个 500 bp 的片段, 将此片段回收、纯化后利用试剂盒进行探针标记. 这一对引物也是通过 RT-PCR 方法检测转基因阳性烟草实验中所用的引物.

1.5 14 C 蔗糖吸收试验

实验方法基本参考文献[7], 但其中的标记物改为 sucrose- 14 C. 具体步骤: 将烟草植株在无糖培养基上培养到 6 周左右, 摘取新鲜烟草叶片, 用打孔器将烟草叶片打成 0.26 cm² 大小的圆形. 将叶片浸泡入预孵育液 (175 mmol/L mannitol, 0.5 mmol/L CaCl₂, 0.5 mmol/L K₂SO₄, 20 mmol/L MES, pH 5.8, 198 mOsmol) 中孵育 30 min. 取出叶片, 转移到含有 1 mmol/L sucrose 和 0.1 GBq/L sucrose- 14 C、其他成分同预孵育液的溶液中, 室温温和振荡. 分别于一定时间取叶片, 放入预孵育液中洗 3 min, 重复此步骤 3 次. 将叶片放入消化液 (65% 高氯酸 [质量比] 100 μ l 和 33% 过氧化氢 [质量比] 200 μ l) 于 55℃ 消化 16 h. 通过液闪计数仪器 (Packard Tricarb 1900TR, Packard instruments, Rungis, France) 计数同位素放射强度.

1.6 烟草植株中可溶性糖含量的测定

将在含有 20 g/L 蔗糖的 MS 培养基上培养 6 周的烟草苗, 分别摘取根、茎、叶, 放在 105℃ 的烘箱 15 min, 然后在 75℃ 的烘箱中烘干过夜至恒重, 取出研碎. 并进行可溶性糖含量的测定^[8].

1.7 半定量 RT-PCR 检测转基因烟草植株中基因表达情况

为检测 *Nt-EF1a* 表达量, 设计引物: EFP1, GAT CCT TAA CCG CAA CAT TCT T; EFP2, CCT CAA GCC TGG TAT GGT TGT. 为检测 *NtSUT1* 表达量, 设计引物: NP1, AAA AGG GTC CAA ACC TCG A; NP2, TCG TCG ATT TCG

TGT TCG. 检测 *VvSUC27* 表达情况的引物为 SUCi P1 和 SUCi P2. RNA 模板提取自生长在含有 20 g/L 的蔗糖培养基上 6 周左右的转基因烟草和对照烟草的根、茎、叶.

1.8 数据统计分析

所有的数据均经过了 SAS (ver. 6.12, SAS Institute, Inc.)软件的 *t* 检验分析, 并以 $(\bar{x} \pm s)$ 方式表示.

2 结 果

2.1 *VvSUC27* cDNA 基因的获得

由于提取的葡萄果实总 RNA 质量的好坏直接影响到后面的反转录以及基因的扩增结果, 所以必

须选择质量符合要求的总 RNA. 如图 1a 中所示的总 RNA 凝胶电泳结果, 带型整齐, 无拖尾, 无 DNA 污染, 测量它们的吸光度值 A_{260}/A_{280} 都在 1.90~2.0 之间, A_{260}/A_{230} 在 1.8~2.2 之间, 认为这些总 RNA 完全可以继续后面的工作.

对葡萄果实总 RNA 反转录后, 以引物 SUC P1、SUC P2 对反转录产物进行扩增, 结果在 $t_m=63.0^{\circ}\text{C}$ 时, 在 1 500 bp 位置得到特异扩增条带 (图 1b), 将此条带回收克隆到 pGEX-T 载体中后, 经过测序, 与 *VvSUC27* cDNA 基因同源性的 99.6%, 其中, 在基因的 N 端高变异区有 4 个碱基的突变. 经过多个克隆的重复测序工作, 验证这 4 个碱基突变的确为葡萄种属间的差异.

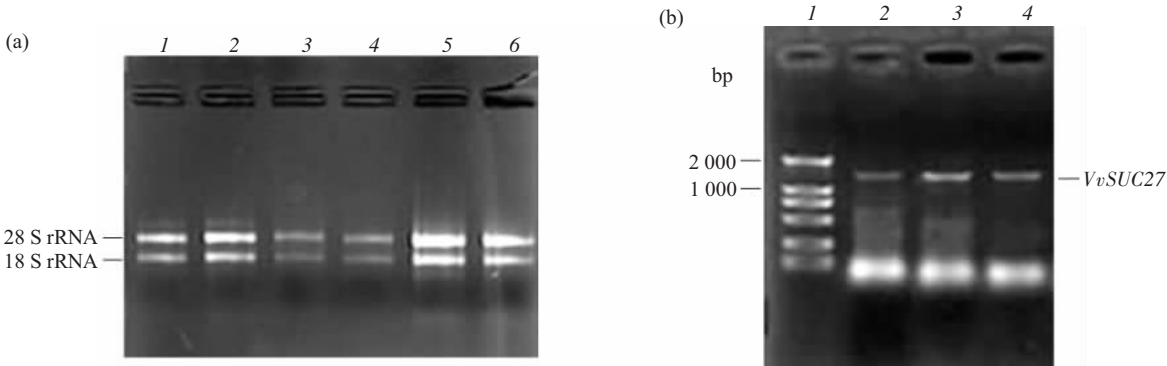


Fig. 1 Gel analysis of total RNA (a) and *VvSUC27* PCR amplification (b)
(a) Total RNA isolated from grape fruit. (b) 1: 1 kb ladder; 2: $t_m = 60.7^{\circ}\text{C}$; 3: $t_m = 61.9^{\circ}\text{C}$; 4: $t_m = 63.0^{\circ}\text{C}$.

2.2 真核表达载体的构建

通过 PCR 的方法扩增 *VvSUC27* cDNA 后酶切连接到真核表达载体 pBI121 中, 载体构建图谱见图 2a. 酶切图谱鉴定结果见图 2b, *Bam*H I + *Sac* I 酶切得到载体片段 (13 kb) 和 *VvSUC27* 片段

(1.5 kb), 证明插入片段大小正确; *Kpn* I + *Sac* I 酶切得到载体片段 (13 kb) 和部分 *VvSUC27* 片段 (1.2kb), 证明插入片段方向是正确的, 并且通过测序验证了载体中克隆基因序列的正确性.

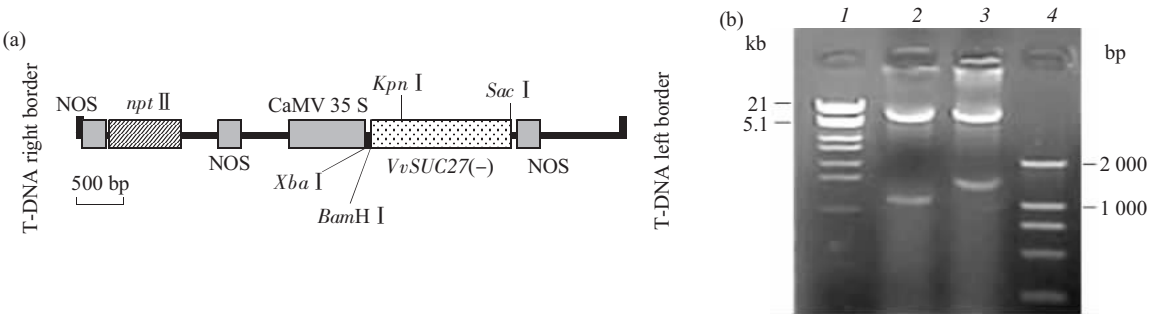


Fig. 2 Chimeric gene for the expression of *VvSUC27* in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants (a), and analysis of pBI121-*VvSUC27* plasmids by enzyme restriction (b)

1: λ /Hind III + *Eco*R I ladder; 2: pBI121-*VvSUC27/Kpn* I + *Sac* I; 3: pBI121-*VvSUC27/Bam*H I + *Sac* I; 4: 100 bp ladder.

2.3 转基因烟草的制备及检测

将带有反义 *VvSUC27* cDNA 的真核表达载体 pBI121-*VvSUC27* 通过农杆菌介导转化到烟草植株

中, 加卡那霉素抗性筛选, 得到分化生根的幼苗 24 株, 经 DNA 印迹 (图 3a) 及反转录 PCR (图 3b) 检测, 20 株为转基因阳性, 阳性率 83%。

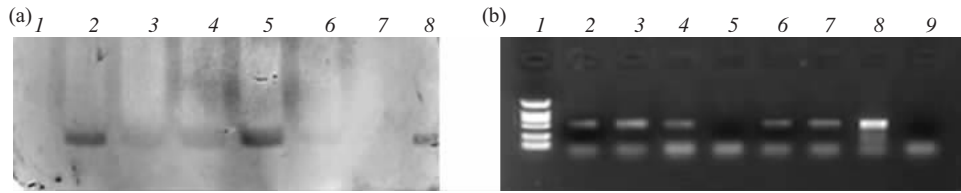


Fig. 3 Southern blot analysis of transgene (a) and identification by reverse-transcription PCR (b)
(a) 1~6: DNA isolated from transformed tobacco (1: F20; 2: F19; 3: F15; 4: F9; 5: F10; 6: F5); 7: DNA isolated from wild type tobacco as a negative control; 8: pBI121-*VvSUC27*/*Kpn* I + *Sac* I as a positive control. (b) 1: 100bp ladder; 2~7: RT-PCR of total RNA isolated from transformants (2: F5; 3: F9; 4: F10; 5: F16; 6: F18; 7: F19); 8: PCR of pBI121-*VvSUC27* as a positive control; 9: RT-PCR of total RNA isolated from wild type tobacco as a negative control.

2.4 ^{14}C 蔗糖吸收试验

为了检测转反义葡萄糖转运蛋白 *VvSUC27* 的烟草植株转运蔗糖的能力是否发生了改变, 实验对单位面积的转基因和野生烟草的叶片转运 ^{14}C 标记蔗糖的能力进行了测定. 实验选取转基因阳性烟草 F5、F10 及野生型(wild type)烟草在不含蔗糖的 MS 培养基上生长发育 6 周左右的新鲜叶片为材料, 吸收蔗糖时间分别为 0、10、30、60、90、120、180 min. 实验结果发现, 转基因烟草叶片对于体外蔗糖的吸收能力明显落后于野生型烟草 (图 4), 这说明, 我们所转入的反义 *VvSUC27* cDNA 对烟草叶片中的蔗糖转运蛋白的功能起到了抑制作用, 从而削弱了转基因烟草叶片对体外蔗糖的摄取能力。

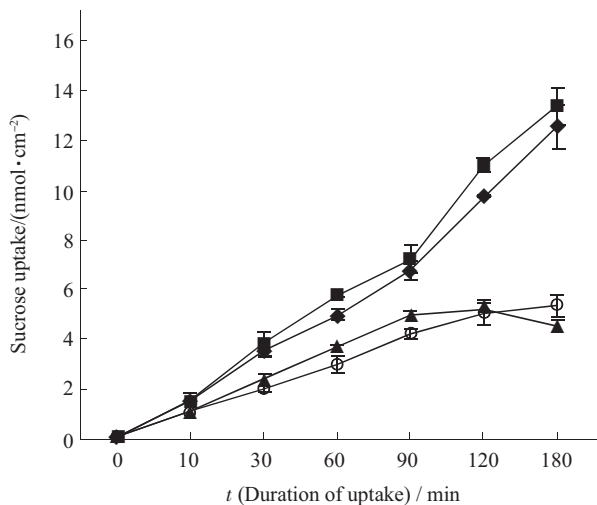


Fig. 4 Uptake rate of sucrose- ^{14}C by leaf discs of the plants transformed with the anti-*VvSUC27* cDNA (F5,F10) and wild type (WT1,WT2)

◆—◆: WT1; ■—■: WT2; ▲—▲: F5; ○—○: F10.

2.5 转基因烟草的表型

由于转基因烟草一代受到组织培养、农杆菌侵染、抗性加压筛选等因素的干扰, 很难下结论一个幼苗生长的状态是由于内部转基因的干扰导致, 还是外部其他原因所致. 所以, 本实验为了尽可能地减少外界其他因素的干扰, 保证实验结果的可靠性, 实验对象均为转基因烟草子一代, 同时播种在

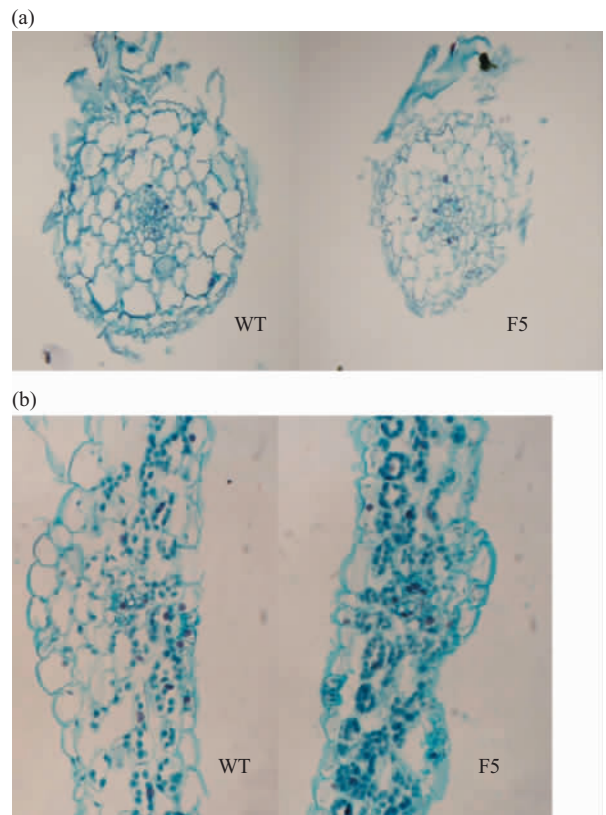


Fig. 5 Cross section of root (a) and leaf (b) of anti-*VvSUC27* transformant and wild type

MS培养基上，在相同培养条件下、相同培养时间时得到的结果。

实验发现，转基因烟草在整个种子萌发、生长发育的过程中，虽然与野生型烟草的差别不是很大，能够正常生长，但是培养在含蔗糖培养基上的转基因烟草的根部发育比较迟缓，叶片颜色较绿。通过组织切片观察(图 5)，发现同生长时期的转基因烟草的根部直径比野生型烟草的要小，根细胞较少，总体发育差，而转基因烟草叶片中叶绿体的个数远远多于野生型烟草，可推测其叶绿体的代谢活动更加旺盛些。

2.6 转基因烟草植株中可溶性糖含量的测定

为了进一步验证转基因烟草转运蔗糖能力的改变，实验将生长在含有蔗糖培养基上 6 周的转基因烟草的根、茎、叶分别进行了可溶性糖的测定(图 6)。转反义 *VvSUC27* 基因的烟草其根部的总糖

及蔗糖含量要明显低于野生型烟草，其中 F5 烟草根部总糖含量为野生型烟草的 76.9%，而蔗糖含量只有 50.3%，而转基因烟草的茎及叶中总糖含量与野生型烟草相比较并不低，甚至 F10 转基因烟草的叶片中总糖含量是野生型的 132%，蔗糖的含量是 162%。

2.7 转基因烟草植株中基因的表达情况

转反义 *VvSUC27* 基因的烟草表现出吸收外界蔗糖能力降低、植株中蔗糖含量降低，那么，烟草的蔗糖转运蛋白基因 *NtSUT1* 的表达情况是否发生了改变？我们通过半定量 RT-PCR 实验对此基因做了检测。检测的样品为在含有蔗糖的 MS 培养基上生长发育 6 周左右烟草(F5 和野生烟草)的根、茎、叶，结果见图 7。

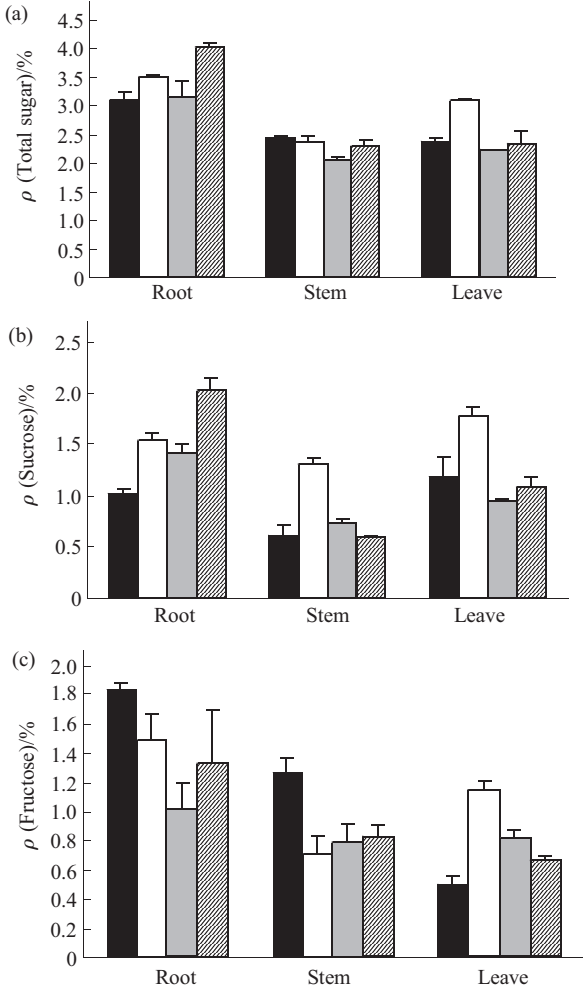


Fig. 6 Sugar content in roots, stems and leaves from tobacco plants transformed with anti-*VvSUC27* (F5, F10 and F19) compared with control (WT)

(a) Total sugar. (b) Sucrose. (c) Fructose. ■: F5; □: F10; ▒: F19; ▨: WT.

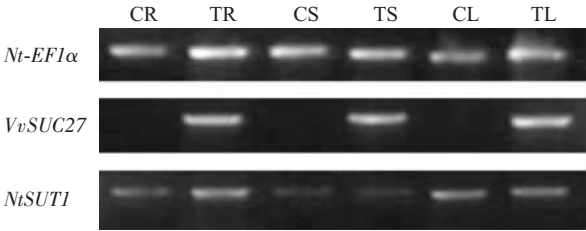


Fig. 7 Transcript levels of genes in transformed tobaccos

CR: Roots of control tobacco; TR: Roots of transformant(F5); CS: Stems of control tobacco; TS: Stems of transformant (F5); CL: Leaves of control tobacco; TL: Leaves of transformant(F5).

Nt-EF1a 为管家基因，从图 7 可见所检测的样品表达量是基本一样的，从而确定样品模板量一致。由于 *VvSUC27* 在转基因烟草中是由 35S 启动子启动的，所以在转基因烟草的根、茎、叶中的表达量基本一样。对照组没有检测到 *VvSUC27* 的表达。*NtSUT1* 主要在烟草叶片中大量表达，在根、茎中的表达较少^[9]，本实验结果对这些结果是支持的。不过，转基因烟草 *NtSUT1* 的表达情况与阴性烟草相比较，并没有发现明显的改变，在根、茎、叶中的表达情况基本上是一样的。

3 讨 论

通过将未知基因反义转入生物体中干扰生物体本身的同源基因，导致生物体某种功能的改变，来实现对未知基因功能的预测，这种方法是后基因组时代对大量 EST 基因序列功能验证的一种重要手段。植物的蔗糖转运蛋白是一类具有 12 个穿膜区的蛋白质，在 12 个穿膜区域中，氨基酸是极为保守的，其中的疏水氨基酸几乎完全不变，而 N 端与

C端为高变异区. 最保守的穿膜区为第 1、2 和 11 穿膜区^[10]. *VvSUC27* 基因与许多已经验证功能的蔗糖转运蛋白基因都有很高的同源性, 其中与烟草蔗糖转运蛋白 *NtSUT1* 的同源性为 72%, 而有报道发现同源性仅为 51% 的序列就能够引发基因的转录后沉默现象^[11], 而生物体是否会发生基因沉默以及发生基因沉默的表型强弱受到多种因素的影响, 目前也是各国生物技术研究的热点领域. 本实验之所以选择烟草做为受体植物, 是因为烟草的转基因技术已经非常成熟, 且生长发育迅速, 能够快速得到子代转基因植株.

由于本实验构建的表达载体是由 *CaMV 35S* 来做启动子的, 也就是说, 反义 *VvSUC27* 在这个启动子的作用下会在转基因烟草中进行泛身性的表达, 包括根、茎、叶. 从 ¹⁴C 蔗糖吸收实验我们已经证明了转基因烟草叶片吸收外界蔗糖的能力大大降低了, 同样道理, 我们完全可以推测转基因烟草根部吸收外界培养基中蔗糖的能力一样会受到干扰. 测定烟草植株中可溶性糖含量的实验发现, 转基因烟草根部的糖含量降低, 尤其是蔗糖只有野生型的 50.3%, 我们认为, 导致转基因烟草根部糖含量降低的原因就是因为转基因烟草根部的蔗糖转运蛋白在功能上受到了抑制, 从而无法正常吸收培养基中的蔗糖分子, 导致其根部发育较为迟缓.

蔗糖做为植物体内碳同化物的主要运输形式, 还调节着植物的一系列新陈代谢, 比如光合作用以及碳源的储存. 当植物中的蔗糖浓度升高后, 它将做为一种信号直接调节许多基因的表达. 一般来说, 蔗糖含量的升高会抑制植物叶片的光合作用. 相反, 当植物中蔗糖含量降低后就会促进植物叶片的光合作用^[12]. 野生型烟草的根部可以正常吸收 MS 培养基中的蔗糖来提供植物的生长和发育, 而转 *VvSUC27* 的烟草根部不能正常地吸收培养基中的蔗糖, 它势必要加强叶片的光合作用来提供植株生长所需要的糖类物质, 这也就是组织切片实验(2.5)中发现转基因烟草叶片中叶绿体大量增多的原因, 也正是由于转基因烟草叶片加强了光合作用, 合成了更多的碳水化合物, 提供了植物生长发育的能量来源, 才促使转基因烟草能够同野生型烟草一样正常生长, 同时也正是由于转基因烟草叶片光合作用的增加, 我们在检测其叶片中糖含量时, 发现 F10 转基因烟草的叶片中糖含量甚至要比野生型的高.

本实验借助半定量 RT-PCR 的方法对转基因烟草 F5 及阴性烟草的根、茎、叶中 mRNA 表达水平

进行了测定. 测定的结果发现, 转基因烟草的根、茎、叶中烟草蔗糖转运蛋白 *NtSUT1* 的表达情况与阴性烟草相比较, 并没有发现明显的改变, 表达情况基本上是一样的. 然而依据各转基因烟草的含糖量的测定以及切片所显示的结果仍然可以得到如下实验推测: 所出现的表型可能是由于葡萄同源反义 RNA 的引入导致了烟草该家族基因表达的关闭. 正如我们所知道的, 基因沉默分为转录水平的基因沉默 (transcriptional gene silencing, TGS) 和转录后水平的基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[13,14]. 对于本实验而言, 反义载体所驱动的反义 RNA 链为葡萄的糖转运蛋白编码区的互补链, 因此所进行的是转录后的基因沉默. 对于反义 RNA 所诱导的基因沉默是存在两种解释方式的: 其一, 导入的反义 RNA 在恰当的位置与靶序列进行互补, 并形成了可以诱发 RNAi 的双链 RNA (并不是所有的双链 RNA 都会引起干涉效应); 其二, 当反义 RNA 与靶 mRNA 的某些区域形成双链结构时, 只是导致了该 mRNA 翻译的关闭或降低其表达水平或阻止该 mRNA 的出核, 而无法进一步形成蛋白质产物^[15]. 对于本实验, 由于 *VvSUC27* 作为葡萄的蔗糖转运蛋白基因与许多已经验证功能的蔗糖转运蛋白基因都有很高的同源性, 而且其与烟草蔗糖转运蛋白 *NtSUT1* 的同源性达到了 72%, 因此反义的葡萄 *VvSUC27* 基因转录产物就足以引发烟草蔗糖转运蛋白基因的转录后沉默. 综上所述, 虽然在半定量 RT-PCR 的结果在各实验组中没有显著差异, 但仍然可以认为导入的反义 RNA 只是起到了关闭烟草 *NtSUT1* 翻译的效果, 而没有引起其转录水平的显著变化.

本实验表明在烟草中导入葡萄的反义 *VvSUC27* 后, 诱发了烟草转运蔗糖分子的能力有所降低. 在表型发生了变化的同时, 各个器官间糖的分配也发生了改变. 从而初步断定了 *VvSUC27* 是一个编码葡萄蔗糖转运蛋白的基因. 为了进一步阐明 *VvSUC27* 编码的蔗糖转运蛋白的生理生化特性, 目前本实验室正在展开 *VvSUC27* 在缺陷型酵母中的表达工作.

参 考 文 献

- 1 Riesmeier J W, Willmitzer L, Frommer W B. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. EMBO J, 1992, 11 (13): 4705~4713
- 2 Lalonde S, Boles E, Hellmann H, et al. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. The Plant Cell, 1999, 11 (4):

- 707~726
- 3 Lemoine R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1465**(1~2): 246~262
 - 4 Davies C, Wolf T, Robinson S P. Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Science*, 1999, **147**: 93~100
 - 5 Manning K, Davies C, Bowen H C, *et al.* Functional characterization of two ripening-related sucrose transporters from grape berries. *Annals of Botany*, 2001, **87** (1): 125~129
 - 6 Riesmeier J W, Willmitzer L, Frommer W B. Antisense repression of the sucrose transporter affects assimilate partitioning in transgenic potato plants. *EMBO J*, 1994, **13** (1): 1~7
 - 7 Leterrier M, Atanassova R, Laquitaine L, *et al.* Expression of a putative grapevine hexose transporter in tobacco alters morphogenesis and assimilate partitioning. *Journal of Experimental Botany*, 2003, **54** (385): 1193~1204
 - 8 Zhou Y M, Yang C P, Wang S J, *et al.* The effect of exogenous sugar solution and high concentration of CO₂ on the contents of sugar and protein of *Betula platyphylla* leaves. *Journal of Forestry Research*, 2003, **14** (1): 61~63
 - 9 Bürkle L, Hibberd J M, Quick W P, *et al.* The H⁺-sucrose co-transporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol*, 1998, **118** (1): 59~68
 - 10 Williams L E, Lemoine R, Sauer N. Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science*, 2000, **5** (7): 283~290
 - 11 Mol J N M, Van Blokland R, De Lange P, *et al.* Post-transcriptional inhibition of gene expression: sense and antisense genes. In: Paszkowski J, ed. *Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants*. The Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994, 309~334
 - 12 Jang J C, Sheen J. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell*, 1994, **6** (11): 1665~1679
 - 13 Lee R C, Hammell C M, Ambros V. Interacting endogenous and exogenous RNAi pathways in *Caenorhabditis elegans*. *RNA*, 2006, **12** (4): 589~597
 - 14 Sigova A, Rhind N, Zamore P D. A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes & Dev.*, 2004, **18** (19): 2359~2367
 - 15 Wang Q, Carmichael G G. Effects of length and location on the cellular response to double-stranded RNA. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68** (3): 432~452

The Antisense Expression of a Putative Grape Sucrose Transporter in Tobacco and Effects on Growth of The Transformants*

ZHANG Ya-Li¹⁾, MENG Qing-Yong²⁾, QU Gui-Qin¹⁾, LIN Xi-Jin¹⁾, LU Jiang¹⁾, LUO Yun-Bo^{1)**}

¹⁾Laboratory of Fruit Biology, College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

²⁾The State Key Laboratory for Agrobiotechnology, College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract A cDNA (*VvSUC27*) of grape sucrose transporter was inserted into an expression vector pBI121 in the anti-sense orientation under the control of the cauliflower mosaic virus 35 S promoter, and subsequently transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun). The plantlets of the transformed anti-sense *VvSUC27* cDNA tobacco were grown normally on MS media containing 20g/L sucrose, but it was found that roots of the transformants developed slowly and the leaves have more chloroplasts when observed under slice. Sucrose content in the roots of the transformants was only 51% of the controls. The capability of sucrose uptaking and transporting into leaves among the transformed tobaccos was greatly decreased.

Key words grapevine, sucrose transporter, anti-sense, *VvSUC27*, transgene, tobacco

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30270934).

**Corresponding author . Tel: 86-10-62737538, Fax: 86-10-62737465, E-mail: ybl@cau.edu.cn

Received: March 3, 2006 Accepted: April 20, 2006