

拟南芥光敏色素 A 反义 RNA 载体的构建及转化

王海^{1,2,3}, 王小兰², 周玉萍², 段俊¹, 田长恩^{2*}

(1. 中国科学院 华南植物园, 广州 510650; 2. 广州大学 植物抗逆基因功能研究广州市重点实验室, 广州 510006; 3. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 光敏色素 A 是植物远红光信号的关键受体, 在植物光信号转导途径中起重要作用。一些具有重要功能的基因(如生长素反应因子 8, *auxin response factor 8*, *ARF8*)受到 PhyA 调控。本实验拟通过构建 *PhyA* 基因反义株系, 研究 PhyA 调控 *ARF8* 等重要功能基因表达的机理。以培养 7 d 的拟南芥幼苗为材料提取 RNA, 利用 RT-PCR 技术扩增出 *PhyA* 的全长 CDS, 将其反向插入表达载体 pMD1 得到反义表达载体 pMD1-*PhyA* CDSR, 并通过农杆菌介导转化拟南芥, 经卡那霉素抗性平板筛选和 PCR 鉴定得到 13 个 *PhyA* 转基因株系。pMD1-*PhyA* CDSR 及其转基因株系的获得为研究 PhyA 调控 *ARF8* 等基因表达的机理奠定了材料基础。

关键词: 光敏色素 A; 反义表达载体; 拟南芥; 生长素反应因子 8

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0669-04

Construction and transformation of antisense RNA expression vector of *Arabidopsis* phytochrome A gene

WANG Hai^{1,2,3}, WANG Xiao-Lan², ZHOU Yu-Ping²,
DUAN Jun¹, TIAN Chang-En^{2*}

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Guangzhou Key Laboratory for Functional Study on Plant Stress-Resistant Genes, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Phytochrome A (PhyA) is the specific photoreceptor which receives far-red light in plants. Many critical genes, including *auxin response factor 8* (*ARF8*), are regulated by PhyA. Therefore, it is necessary to construct the *PhyA*-antisense transgenic lines for revealing the mechanism underlying phyA-regulated genes expression. The *PhyA* CDS was amplified from *Arabidopsis* total RNA by RT-PCR method. Then, it was inserted reversely into pMD1 to get the antisense expression vector pMD1-*PhyA* CDSR. The transgenic lines were acquired by agrobacterium-mediated method. 13 transgenic lines have been acquired by Kmr screening and PCR analysis. The vector pMD1-*PhyA* CDSR and the transgenic lines will be useful to study how the genes, such as *ARF8*, are regulated by PhyA.

Key words: phytochrome A; antisense expression vector; *Arabidopsis*; auxin response factor 8

光是一个调控植物生长发育的重要外界因子, 参与大量植物基因的表达调控 (Lorrain 等, 2006)。高等植物具完善的光信号感受系统, 包括: 光敏色素 (phytochrome)、隐花色素 (cryptochrome)、向光素 (phototropin) 和 UV-B 受体等 (Schäfer & Wagy,

2006)。通过对光受体突变体的研究已证实光敏色素参与了种子萌发、幼苗光形态建成、避荫反应、成花诱导和生物钟等过程的调控 (Quail, 2002; Yanovsky & Kay, 2003; Franklin & Whitelam, 2004)。

光敏色素 A (phytochrome A, PhyA) 是拟南芥接受

收稿日期: 2008-01-28 修回日期: 2009-01-07

基金项目: 教育部留学归国人员科研启动基金([2004]527)[Supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, China(2004-527)]

作者简介: 王海(1981-), 男, 山东曲阜人, 硕士研究生, 从事植物光信号转导研究, (E-mail) wanghai_9773@qq.com.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: changentian@yahoo.com.cn)

远红光的主要受体(Wang & Deng, 2003)。拟南芥 *PhyA* 基因的全长 CDS 为 3 369 bp, 编码 1 122 个氨基酸(NM_100828, Dehesh 等, 1993)。关于 *PhyA* 介导的光信号转导网络的研究取得较多突破性进展(王伟等, 1999), 发现了 *PhyA* 信号通路中的部分组分, 包括 FHY1, FHY3, FHY4, FIN2, SPA1, FIN219, PAT 1, EID1 等; 也发现部分与 *PhyA* 直接作用的转录因子, 如 HFR 等(Wang & Deng, 2003)。利用 *phyA* 无义突变体进行基因芯片的研究表明远红光影响了大量基因的表达(Tepperman 等, 2001)。生长素反应因子(auxin response factors, ARFs)是一类转录因子, 拟南芥共有 23 个 *ARF* 基因, 在生长素调控基因表达网络中起关键作用(Woodward & Bartel, 2005)。本研究发现拟南芥生长素反应因子 8(*auxin response factor 8, ARF8*)的表达受远红光影响(Tian 等, 2004), 推测其可能是 *PhyA* 信号转导与生长素信号转导网络交叉整合的一个关键组分, 证据尚不充分。研究一系列不同程度 *PhyA* 反义株系中 *ARF8* 的表达情况, 无疑可为揭示 *PhyA* 调控 *ARF8* 的表达提供进一步的证据。石东乔等(2001)证实转同一反义表达载体的不同植株的相关基因表达水平往往不同。本实验拟通过构建 *PhyA* 基因的反义表达载体, 转化野生型拟南芥植株, 以期得到 *PhyA* 表达水平不同的转基因株系, 为揭示 *PhyA* 调控 *ARF8* 等基因的表达机理提供材料基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

植物材料: 哥伦比亚生态型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种植于温室(23 °C), 持续光照培养。菌株和质粒: 根癌农杆菌 GV3101 由北京农业大学叶德教授惠赠, 大肠杆菌 DH5 α , 质粒 pMD1 由本实验室保存; 质粒 pMDT18simple 购于宝生物工程(大连)有限公司。酶与试剂: One Step RT-PCR Kit, 各种限制性内切酶及工具酶均购于宝生物工程(大连)有限公司; UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒, 质粒提取试剂盒, 胶回收试剂盒, PCR 产物纯化试剂盒及常规试剂均购于上海生工生物技术有限公司。

1.2 反义表达载体的构建

根据 <http://www.Arabidopsis.org/> 公布的 *PhyA* 序列和 pMD1 的多克隆位点设计分别加有 *SalI* 和 *BamHI* 酶切位点的特异引物, 利用 RT-PCR 扩增出全长 *PhyA* CDS, 然后连接到 pMDT18simple 上, 外

送广州拓谱基因技术有限公司测序。利用限制性内切酶 *SalI* 和 *BamHI* 双酶切扩增产物 *PhyA* CDS 和质粒 pMD1, 分别纯化, 然后用 T4 DNA 连接酶将扩增产物与线性化质粒连接得到反义表达载体 pMD1-*PhyA* CDSR(图 1), 最后采用冻融法(张学文等, 2001)将反义表达载体转入农杆菌 GV3101 中。

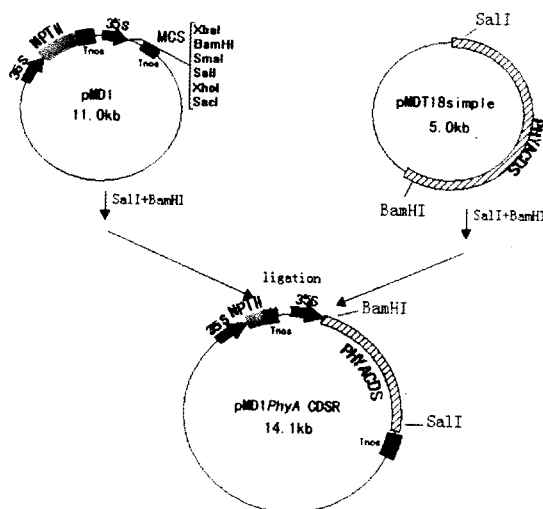


图 1 *PhyA* 反义表达载体的构建示意图

Fig. 1 Construction of the antisense expression vector of *PhyA* gene

1.3 转基因植株的筛选与鉴定

采用刘乐承等(2005)的方法转化拟南芥。收获的 T0 代种子经表面消毒接种到加有 Km50 mg/L + Cef200 mg/L(Km, Cef 分别表示卡那霉素和头孢霉素)的 1/2MS 培养基筛选阳性转化株系。提取转化株总 DNA 进行分子鉴定。方法: 植物材料液氮速冻后充分研磨, 加 500 μ L DNA 提取缓冲液(0.2 mol/L Tris-HCl pH9.0, 0.4 mol/L LiCl, 25 mmol/L EDTA, 1% SDS)混匀, 再加入 500 μ L 的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 涡漩 10 s, 12 000 r/min 室温离心 10 min, 取上相, 加入等体积(约 500 μ L)异丙醇, 颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀即为 DNA, 最后加入约 20 μ L 的 1/2TE 溶解 DNA。鉴定引物选用 35S F 和 PHYA F1。

1.4 引物及其说明

PhyA CDS 扩增引物为: PHYA F 5'-AT-AGTCGACATGTCAGGCTCTAGGCCGACT-CAG-3'(下划线为 *SalI*); PHYA R 5'-CGCG-GATCCACTACTTGTGGCTGCAGCGAGTT-3'(下划线为 *BamHI*)。内部鉴定引物为: PHYA F1 5'-TGCTGGTGCCTTACAATC-3'; PHYA R1

5'-CTGCGTCCCAAATACTTC-3'; *phyA*-t F
 5'-GCACAGCTGCCATTTGCAGTACAT-3';
phyA-t R 5'-CATGCAAACACTATCAGTGCT-
 CAAAC-3'; 35S F 5'-AACCCACTATCCTTCG-
 CAAGACC-3'.

2 结果与分析

2.1 *PhyA* CDS 的获得

以利用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取的拟南芥(7 d 苗)总 RNA 作模板,用引物 *PHYA* F 和 *PHYA* R 进行 RT-PCR 扩增,将扩增片段通过 TA 克隆插入 pMD18simple,进行测序验证,证实所得片段为预期的 *PhyA* 全长 CDS.

2.2 反义表达载体 pMD1-*PhyA* CDSR 的构建

对经测序证实的 *PhyA* CDS 和 pMD1 进行 *Sal*I 和 *Bam*HI 双酶切,分离纯化所需的酶切产物,用 T4 连接酶连接得到 pMD1-*PhyA* CDSR(图 1),转化大肠杆菌 DH5 α .从阳性大肠杆菌提取表达载体,采用 *Sal*I 和 *Bam*HI 对构建好的植物双元反义表达载体 pMD1-*PhyA* CDSR 进行双酶切鉴定,结果显示载体被切割成约 11 kb 和 3.3 kb 两条带,前者符合 pMD1 线性化质粒大小,后者符合 *PhyA* CDS 大小(图 2);同时用三对内部鉴定引物(35S F + *PHYA* F1; *phyA*-t F + *phyA*-t R; *PHYA* F1 + *PHYA* R1)均可以扩增出与理论值大小相符的条带(2 100 bp;515 bp;1 836 bp,图 3).上述结果均表明反义表达载体 pMD1-*PhyA* CDSR 构建成功.

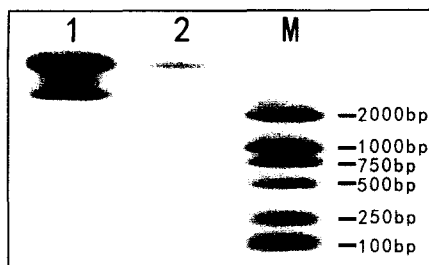


图 2 反义表达载体的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the constructed antisense expression vector through double restricted enzyme digestion

M:marker DL 2000 (下同); 1:pMD1-*PhyA* CDSR digested with *Bam*HI+*Sal*I; 2:pMD1 digested with *Bam*HI+*Sal*I

2.3 拟南芥转化及转基因植株的筛选与鉴定

通过冻融法将构建好的表达载体转化农杆菌 GV3101,对抗生素抗性筛选平板上长出的菌落用引

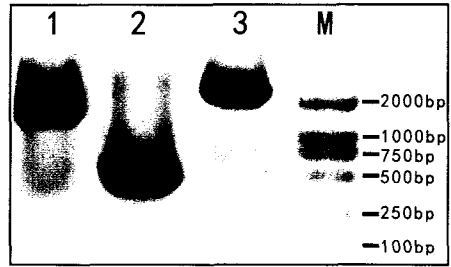


图 3 *PhyA* 反义表达载体的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR analysis for the constructed antisense expression vector

1:*PHYA*F1+*PHYA*R1; 2:*phyA*-tF+*phyA*-tR; 3:35S F+*PHYA* F1.

物 35SF + *PHYA* F1 进行 PCR,扩增出与理论值大小(2 100 bp)相符的条带(图 4),证明反义表达载体已成功转入农杆菌 GV3101.选取其中的 5 号菌落摇菌,通过花蕾浸泡法转化拟南芥.

将转化后获得的种子播种于含卡那霉素和头孢霉素的培养基上进行抗生素筛选,共获得 13 个转基因株系(图 6),移栽培养,四周后,剪取其中长势良好的 8 个 T0 代株系部分莲座叶(约 100mg)提取基因组 DNA,用引物 35S F + *PHYA* F1 进行 PCR 扩增,均扩增出了大小与理论值(2100 bp)相符的条带(图 5),说明目的基因已成功转入拟南芥.

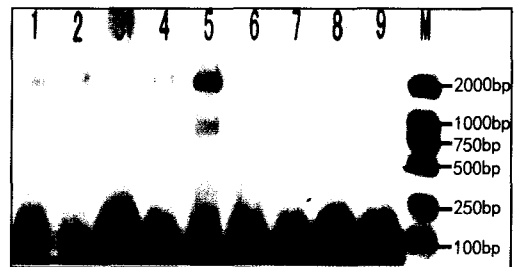


图 4 *PhyA* 反义表达载体转化农杆菌 GV3101 的菌落 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR analysis of *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformed with antisense expression vector (1-9:clones with Km^r)

3 讨论

20 世纪 80 年代初,人们在研究反义核酸对原核和真核基因表达调控的基础上,发明了反义技术(antisense technology)。反义技术是根据核酸杂交原理,通过在基因水平上设计表达特异反义 RNA 片段,选择性抑制特定基因复制、转录或翻译,从而抑制特定基因表达的一类基因沉默或表达下调技术(许本波



图5 T₀代转基因株系的PCR鉴定
Fig. 5 PCR analysis in T₀ transgenic plants
col, *Arabidopsis thaliana* Columbia; 1-8; Line1-Line 8



图6 转基因植株的抗生素筛选

Fig. 6 Screening for the transgenic plant with antibiotic resistance

等,2003;陈国庆等,2005)。反义技术包括反义寡核苷酸、反义RNA及核酶三大技术领域(柴晓杰等,2004)。在构建高效反义RNA基因时,可以选用全长cDNA也可以选用其中的一个片段(张学文等,2001)。本实验在扩增得到PhyA全长CDS并经测序与报道的序列一致的基础上,将PhyA的全长CDS反向插入表达载体pMD1,成功构建反义表达载体pMD1-PhyA CDSR。理论上讲,所得的该反义表达载体可以用来沉默或下调PhyA基因的表达。目前,转基因植物中PhyA的表达分析正在进行中。

利用花蕾浸泡法将外源基因转入拟南芥是一种简便易行且高效的转化方法。本实验采用该方法进行转化,收获的T₀代种子经卡那霉素筛选阳性率达0.8%,共得到13个转基因株系,对其中8株进行了PCR鉴定,结果表明卡那霉素筛选假阳性比例为0。因此,卡那霉素抗性是拟南芥转基因植株筛选的一个很好选择。目前,在8个PCR鉴定的株系中已有3个株系得到T₁代种子。可以预期,在进一步筛选获得转基因纯合子的基础上,通过基因表达分析,筛选出不同表达水平的PhyA转基因株

系,将为研究PhyA调控包括ARF8在内的基因表达的机理奠定良好的材料基础。

参考文献:

- Chai XJ(柴晓杰), Wang PW(王丕武), Guan SY(关淑艳), et al. 2004. Antisense technology and its application in plant genetic engineering(反义技术及其在植物基因工程中的应用)[J]. *J Jilin Agric Uni* (吉林农业大学学报), 26(5): 515-518
- Chen GQ(陈国庆), Wang WY(王武源), Li ZC(李忠超), et al. 2005. Study on the improving of wheat quality by pollen tube pathway transgene(花粉管通道法转基因改良小麦品质的初步研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 25(3): 245-248
- Dehesh K, Franci C, Parks B M, et al. 1993. *Arabidopsis* HY8 locus encodes phytochrome A[J]. *Plant Cell*, 5(9): 1 081-1 088
- Franklin KA, Whitelam GC. 2004. Light signals, phytochromes and cross-talk with other environmental cues[J]. *J Exp Bot*, 55(395): 271-276
- Liu LC(刘乐承), Yu XL(余小林), Ye WZ(叶纨芝), et al. 2005. Construction of plant expression vector containing the antisense *BcMF3* and its genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* (*BcMF3* 反义基因植物表达载体的构建及其对拟南芥的遗传转化)[J]. *J Yangtze Univ*(长江大学学报), 2(11): 76-79
- Lorrain S, Genoud T, Fankhauser C. 2006. Let there be light in the nucleus[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 9(5): 509-514
- Quail PH. 2002. Phytochrome photosensory signalling networks [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(2): 85-93
- Schäfer E, Nagy F. 2006. Photomorphogenesis in Plants and Bacteria[M]. 3rd edition. Netherlands: Springer Netherlands, 407-437
- Shi DQ(石东乔), Chen ZH(陈正华). 2001. Antisense RNA and its application in botany research(反义RNA及其在植物学研究中的应用)[J]. *Hereditas*(遗传), 23(1): 73-76
- Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, et al. 2001. Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(16): 9 437-9 442
- Tian CE, Muto H, Higuchi K, et al. 2004. Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition [J]. *Plant J*, 40(3): 333-343
- Wang H, Deng XW. 2003. Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants[J]. *Trends Plant Sci*, 8(4): 172-178
- Wang W(王伟), Cui H(崔红). 1999. Specific photoperception of different phytochrome molecules(不同光敏色素分子的特异感光性)[J]. *Guihaia*(广西植物), 19(4): 381-385
- Woodward AW, Bartel B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction[J]. *Ann Bot (Lond)*, 95(5): 707-735
- Xu BB(许本波), Zhang XK(张学昆), Li JN(李加纳). 2003. Application of antisense RNA technique in crop genetic improvement(反义RNA技术在现代作物遗传改良中的应用)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 19(3): 84-88
- Yanovsky MJ, Kay SA. 2003. Living by the calendar: how plants know when to flower[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(4): 265-275
- Zhang XW(张学文), Luo ZM(罗泽民). 2001. Construction and transformation of an antisense RNA gene recombinant of *Arabidopsis homeobox* gene A21(拟南芥同源转换盒基因A21反义RNA基因重组体的构建及转化)[J]. *J Hunan Norm Univ (Nat Sci)*(湖南师范大学学报·自然科学版), 24(1): 62-77