

柑橘 *CsERF1* 基因 RNAi 载体的构建及转化

张凌云^{1,3}, 贝学军^{2,3}, 钟广炎^{3*}

(1. 贵州师范大学 地理与环境科学学院, 贵州 贵阳 550001; 2. 西南大学 园林园艺学院, 重庆 400715; 3. 中国农业科学院 柑橘研究所, 重庆 400712)

摘要: 用 RT-PCR 克隆柑橘的 *CsERF1* 基因 cDNA 序列, 并连接到 TA 克隆载体 pMD-19T 上; 经限制性内切酶 2 次双酶切, *CsERF1* 基因的正、反向片段被分别插入到双元质粒 pFGC5941 查耳酮合成酶 A(*CHSA*)内含子的两端, 构成反向重复序列; 经菌液 PCR 和测序验证, 成功构建了 *CsERF1* 基因的 RNA 干扰载体; 通过农杆菌介导法转化柑橘, 已获得部分抗性芽。

关键词: 柑橘; *CsERF1* 基因; RNAi 载体; 遗传转化

中图分类号: S666 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)04-0385-06

Construction of the RNAi vector for *Citrus ERF1* gene

ZHANG Ling-yun^{1,2}, BEI Xue-jun^{2,3}, ZHONG Guang-yan^{3*}

(1. College of Geography and Environmental Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Southwest Agricultural University, Chongqing 400715, China; 3. The Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: *ERF1* (ethylene response factor 1) is a intranuclear transcription factor involved in the end of the ethylene signal transduction pathway. The sense and anti-sense cDNA sequences of *CsERF1* were amplified from *Citrus* by RT-PCR and cloned into pMD-19T respectively, resulting in plasmids containing sense and anti-sense fragment of *CsERF1* respectively. Plasmid containing sense *CsERF1* and pFGC5941 were digested by *XhoI* and *AseI*, and the sense fragment of *CsERF1* was inserted into binary vector pFGC5941 forming +*CsERF1*-pFGC5941, then the anti-sense fragment of *CsERF1* was subsequently cloned into +*CsERF1*-pFGC5941 by *SmaI* and *XbaI* digestion and ligation of +*CsERF1*-pFGC5941 and plasmid containing anti-sense *CsERF1*, resulting in RNAi vector of *CsERF1* with sense and antisense fragment flanking the intron of chalcone synthase a gene. Verified by PCR testing and sequencing, the RNAi vector of *CsERF1* was successfully constructed. Antibiotic resistant buds were regenerated via *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants which provides a way towards the elucidation of the function of *CsERF1*.

Key words: *Citrus*; *CsERF1* gene; RNAi vector; genetic into

高等植物在抵抗各种逆境的过程中, 转录因子作为基因表达水平的主要调控者扮演了重要的角色。乙烯应答因子1(ethylene response factor1, *ERF1*)是植物体内庞大的AP2/ERF类转录因子的家族成员之一^[1], 是细胞核内的信号转录因子。*ERF1*处于乙

烯信号转导通路的末端, 属于乙烯反应元件结合蛋白(ethylene response element binding proteins, EREBPs)基因家族^[2], 以转录级联参与了乙烯介导的基因表达^[3]。*ERF1*能与下游乙烯响应基因的GCC-box特异结合, 从而启动乙烯效应基因的表

收稿日期: 2011-03-31

基金项目: 重庆市科技攻关计划项目(CSTTC, 2007AA1018)

作者简介: 张凌云(1968—), 女, 四川泸州人, 博士, 副教授, 主要从事园林植物研究, zhanglinyun@yahoo.com.cn; *通信作者, gy_zhong@163.com

达。目前,在拟南芥中已分离到6个 $ERF1$ 同源物,在番茄中也分离到1个同源物^[4]。 $ERF1$ 最早是利用烟草的 $EREBP1$ 的互补序列从拟南芥中克隆到的^[5],是 $EIN3$ 的直接目的基因^[6]。 $ERF1$ 是正转录调控因子,其过量表达只能部分活化乙烯反应^[7],表明 $ERF1$ 并非 $EIN3$ 唯一的靶基因。 $ERF1$ 基因可被乙烯或其他胁迫条件调控^[8]。 $ERF1$ 有可能是调控 $EIN3$ 下游的一个信号支路,除乙烯外,水杨酸、茉莉素和干旱等都可以诱导 ERF 的表达。据文献^[9]报道, $ERF1$ 可以协同调控2条信号途径中下游相关基因的表达,在植物抗逆反应中发挥重要的调控作用。RNA干涉(RNA interference, RNAi)现象最早是通过转基因研究在植物中发现的^[10-11],双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)衍生复合物能介导同源基因mRNA的降解^[12],现作为一种基因敲除技术已广泛应用于基因功能分析,是一种高效的诱导基因沉默的方法,其分子机理主要是诱导转录后基因沉默^[13]。目前,在植物中RNAi表达载体主要是通过构建发夹RNA(hairpin RNA, hpRNA)转基因来实现的^[14]。这种方法比转反义基因更有效^[15]。hpRNA由一个植物启动子、目的基因的反向重复序列和终止子组成。通常,在目的基因正反向重复序列之间插入一个内含子作为间隔序列(stuffer fragment),虽然目前还不能解释其作用机理,但有研究表明内含子作为间隔序列能有效提高沉默的效率^[16-17],并已在植物基因功能研究中得到广泛应用^[19]。目前,国内报道的苧麻 $CCoAOMT$ 基因干扰表达载体^[20]、茶树咖啡因合成酶基因干扰表达载体^[21]等均使用的是pFGC5941,吴昊等^[22]在构建水稻的RNAi载体时也用了pFGC5941的干扰功能区。试验中使用的质粒pFGC5941^[19](GeneBank登录号为AY310901),是美国俄亥俄州大学拟南芥生物资源中心在双元表达载体pCAMBIA1300的基础上构建的、适用于双子叶植物的RNAi载体(<http://www.chromdb.com>)。该载体目标基因正、反向片段插入位点之间间隔一段矮牵牛查耳酮合成酶A($CHSA$)基因的内含子序列, RNAi功能区由

CaMV 35S 启动子驱动,使用章鱼碱合成酶基因的终止子(OCS 3'),转基因植物的筛选标记为Basta抗性。笔者研究柑橘 $CsERF1$ 基因RNAi载体的构建及转化,旨在探明 $CsERF1$ 基因的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

奥林达伏令夏橙(*Citrus sinensis* Osbeck Valencia 'Olinda')果实于2008年5月20日采自重庆市忠县三峡建设公司生产园。挑选无病虫害斑的果实,剪去多余枝叶,保留约5 cm的果柄,静置待用。取样时用解剖刀、打孔器迅速将柑橘果实离层切成约直径6 mm、厚4 mm的小圆盘后立即放入液氮里,于-80℃冰箱保存备用。

大肠杆菌DH5 α 、根癌农杆菌LAB4404为中国农业科学院柑橘研究所种质资源室保存;pMDTM-19购自TaKaRa(大连)有限公司;双元质粒pFGC5941由湖南农业大学张学文教授惠赠。

反转录试剂盒为Toyobo Co., Ltd的First Strand cDNA Synthesis Kit, ReverTra Ace- α 。Taq DNA聚合酶购自TaKaRa(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA的提取及RT-PCR

参照叶庆亮等^[23]的方法提取RNA,用RQ1 Rnase-Free Dnase清除基因组DNA,按试剂盒说明进行反转录合成cDNA。

PCR扩增 $CsERF1$ 基因的正、反向片段:向PCR管中依次加入cDNA模板1 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μ L, 正、反义引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L, 双蒸水 17.25 μ L, 最后加入5 U/ μ L Taq DNA聚合酶0.15 μ L, 总反应体系为25 μ L。反应程序:94℃预变性5 min; 94℃变性40 s, 60℃退火40 s, 72℃延伸55 s, 循环36次; 72℃延伸5 min。

PCR产物设计长度为908 bp。取PCR扩增产物6 μ L在1.5%琼脂糖凝胶上1.5~2.0 V/cm电泳检测。

1.2.2 双酶切

限制性内切酶 *Xho*I、*Asc*I、*Sma*I 和 *Xba*I 购自 NEB 公司。双酶切按试剂说明操作。

1.2.3 引物设计

用 Primer Premier 5 软件进行引物设计和酶切位点分析。根据 TaKaRa 公司的保护碱基表选择保护碱基。扩增正向片段的正义引物、反义引物分别为 5'-ccgCTCGAGcggTTCTGTTGCCGCATCCTT-3'(*Xho*I) 和 5'-aGGCGCGCCtAAGGAATCCGGTGTTGA-3'(*Asc*I)。扩增反向片段的正义引物、反义引物分别为 5'-tccCCCGGGggaTTCTGTTGCCGCATCCTT-3' (*Sma*I) 和 5'-gcTCTAGAgcAAGGAATCCGGTGTTGA-3' (*Xba*I)。所有引物中,斜体部分表示 *CsERF1* 基因的特异序列,下划线部分表示括号里的酶切位点,小写字母表示添加的保护碱基。

1.2.4 TA 的克隆及质粒重组

将 RT-PCR 扩增获得的 *CsERF1* 基因的正、反向片段经 *T4* 连接酶 16 °C 连接过夜,次日转化大肠杆菌感受态,分别克隆到 pMDTM-19 载体,在含 Amp 的 LB 培养基上 37 °C 培养过夜,次日进行蓝、白筛选,挑取白色菌落进行 PCR 检测。

分别提取 pFGC5941 和 *CsERF1* 基因 pMT-19T 正向片段质粒,用 *Xho*I/*Asc*I 进行双酶切,割胶回收 pFGC5941 载体骨架和目的基因的正向片段,用 *T4* 连接酶进行连接,重组子转化感受态大肠杆菌,在含卡那霉素的 LB 培养基上进行培养。

菌液 PCR 检测合格的重组子经扩增、提取质粒后,用于连接反向片段。用 *Sma*I/*Xba*I 分别双酶切连接了正向片段的 pFGC5941 和 pMT-19T 反向片段质粒,割胶回收重组子+*CsERF1*-pFGC5941 载体骨架和 *CsERF1* 基因的反向片段,用 *T4* 连接酶连接后转化感受态大肠杆菌,用含卡那霉素的 LB 培养基进行培养。随机挑选阳性克隆进行扩增,使用含载体序列的引物 P1 与正向片段反义引物组合和反向片段正义引物与含载体序列的 P2 组合进行菌液 PCR 检测,得到的重组质粒即为 *CsERF1* 基因的 RNAi 载体。

1.2.5 重组质粒验证

在重组质粒 pFGC5941-*CsERF1* 中,目标基因正、反向片段插入位点之间由长约 1 353 kb 的 *CHSA* 内含子隔开。正向片段插入位于 *CHSA* 内含子前的 *Xho*I/*Asc*I 位点之间,反向片段插入位于 *CHSA* 内含子后的 *Xba*I/*Sma*I 位点之间。为了检测目的基因的正、反向片段是否正确插入载体的预定区域,根据 pFGC5941 载体序列设计了 1 对特异引物 P₁(5'-A GCAAGTGGATTGATGTGAC-3') 和 P₂(5'-GGTAA GGATCTGAGCTACAC -3'),用于 PCR 检测及测序反应,其位置和方向如图 1、图 2 所示。

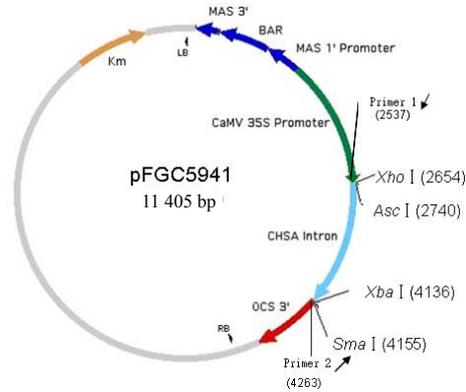


图 1 质粒 pFGC5941 的结构简图 Fig.1 Schematic diagram of plasmid pFGC5941

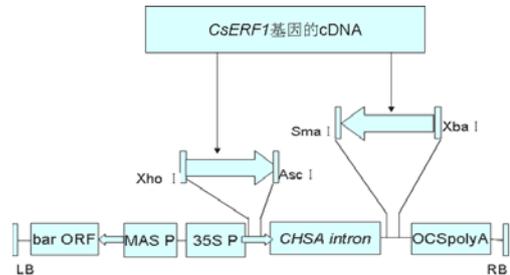


图 2 *CsERF1* 基因的 pFGC5941 RNAi 载体 T-DNA 区域及反向重复片段插入位点 Fig.2 T-DNA region and *CsERF1* gene insertion sites in RNAi vector pFGC5941

1.2.6 柑橘的遗传转化

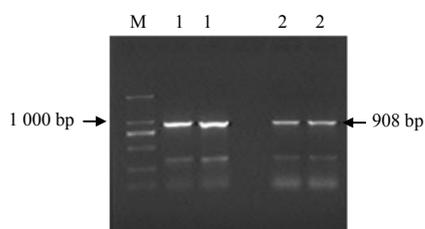
借鉴谢玉明等^[24]的方法,采用柳橙的上胚轴(切割成 1 cm 长的茎段)为转化受体材料。用扩增测序结果正确的克隆提取质粒,转化感受态农杆菌,使用含 Kan 的 YEB 培养基进行筛选,随机挑选阳性菌落扩增,分别使用含载体序列的引物 P1、正向片段反义引物组合和反向片段正义引物、含载体序列的 P2

引物组合,进行菌液 PCR 检测,将能扩出预期片段的农杆菌与准备好的植物材料进行柑橘遗传转化,在 Mt+10 mg/L Basta 培养基上进行筛选。

2 结果与分析

2.1 目的基因的正、反向片段 TA 克隆

经序列比对,将保留酶切位点的单克隆进一步扩增。图 3 显示了 *CsERF1* 基因正、反向克隆菌液的 PCR 检测结果。由图 3 可见,用 *CsERF1* 基因的正、反向片段引物分别扩增出了与预期 908 bp 相符的片段。



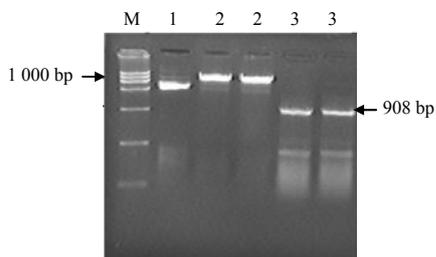
M DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1 *CsERF1* 基因的正向片段; 2 *CsERF1* 基因的反向片段。

图 3 *CsERF1* 基因正、反向片段 TA 克隆菌液的 PCR 检测结果

Fig.3 PCR testing of clone with sense fragment and anti-sense fragment of *CsERF1* gene

2.2 插入正向片段

图 4 显示了质粒 pFGC5941 及目的基因正向片段质粒(*XhoI/AscI*)的双酶切结果。结果显示, pFGC5941(泳道 2)经 *XhoI* 和 *AscI* 双酶切,形成一条线性质粒 DNA 条带,在琼脂糖凝胶上的移动慢



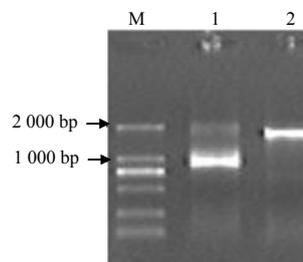
M DL15000 DNA 相对分子质量标准; 1 未经酶切的 pFGC5941; 2 经 *XhoI/AscI* 双酶切的 pFGC5941; 3 经 *XhoI/AscI* 双酶切的 *CsERF1* 正向片段 TA 克隆质粒。

图 4 pFGC5941 和 *CsERF1* 正向片段的双酶切结果

Fig.4 Digestion of pFGC5941(lane 2) and sense fragment of *CsERF1*(lane 3) by *XhoI* and *AscI*

于环状质粒(泳道 1); *CsERF1* 正向片段 TA 克隆质粒被 *XhoI* 和 *AscI* 双酶切后,被切割成约 2 000 bp 的 pMT-19T 骨架和 908 bp 的目标片段(泳道 3)。

随机挑选阳性克隆进行扩增,分别使用含 pFGC5941 载体序列的引物 P2、正向片段正义引物组合和正向片段的正、反义引物进行菌液 PCR 鉴定。图 5 显示,前者扩增出大于目的基因的约 1 000 bp 的片段(泳道 2),后者扩增出与目的基因长度一致的片段(泳道 1)。2 种引物组合的 PCR 扩增结果初步证明: *CsERF1* 正向片段已成功连接至 pFGC5941 的 *CHSA* 内含子上游。



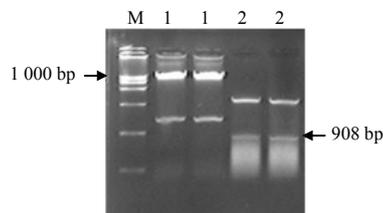
M DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1 正向片段的正、反义引物组合; 2 P2 和正向片段正义引物组合。

图 5 +*CsERF1*-pFGC5941 的菌液 PCR 检验结果

Fig.5 PCR testing of clone for recombinant +*CsPRP4*-pFGC5941

2.3 插入反向片段

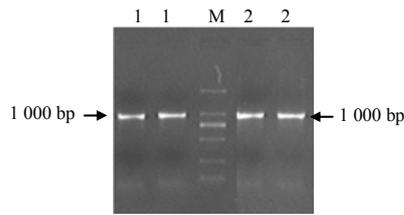
重组子+*CsERF1*-pFGC5941 与反向片段的 TA 克隆载体经 *SmaI/XbaI* 双酶切后的载体骨架和反向片段见图 6。2 组引物分别扩增出 1 000 bp 与目的基因相近的片段(图 7),符合预期长度。



M DL15000 DNA 相对分子质量标准; 1 经 *SmaI/XbaI* 双酶切的 +*CsERF1*-pFGC5941; 2 经 *SmaI/XbaI* 双酶切的 *CsERF1* 反向片段 TA 克隆质粒。

图 6 重组子+*CsERF1*-pFGC5941 及 *CsERF1* 反向片段的 *SmaI/XbaI* 双酶切结果

Fig.6 Double digestion of recombinant +*CsERF1*-pFGC5941 (lane 1) and anti-sense fragment of *CsERF1* (lane 2) by *SmaI* and *XbaI*



M DL 2 000 DNA 相对分子质量标准 ;1 P1 与正向片段反义引物组合 ; 2 P2 与反向片段正义引物组合。

图 7 pFGC5941-*CsERF1* RNAi 载体菌液的 PCR 检验结果

Fig.7 PCR testing of clone for RNAi vector pFGC5941-*CsERF1*

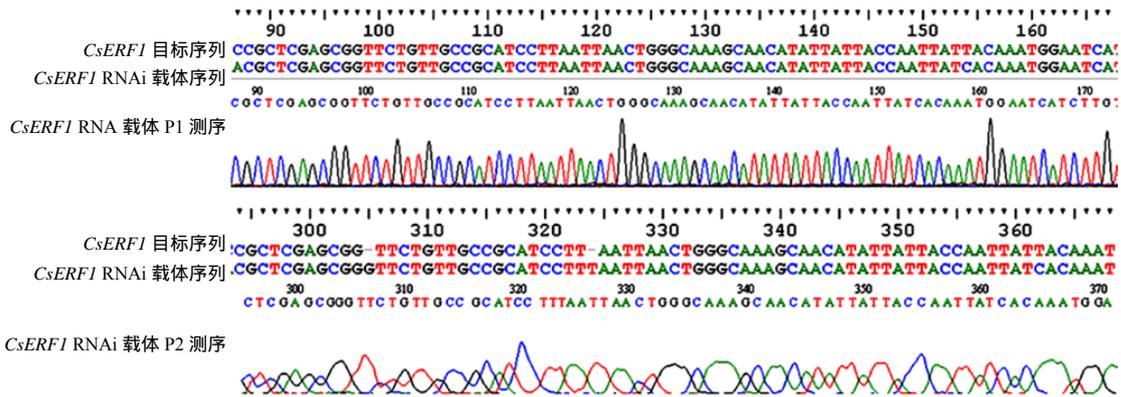


图 8 pFGC5941-*CsERF1* 的 P1、P2 引物部分测序结果

Fig.8 Sequencing of pFGC5941-*CsERF1*(partial display)

2.5 根癌农杆菌介导的柑橘遗传转化

经过近 50 d 的培养,最终成功诱导出可用于温室嫁接的 Basta 抗性芽(图 9)。参照普通甜橙抗性芽茎尖嫁接方法^[25],将部分长到 1 cm 的芽嫁接到砧砧上,于温室中继续培养。转基因的表达和沉默效果有待检验。



图 9 Basta 抗性芽

Fig.9 Basta-resistant bud

3 结论与讨论

采用 RT-PCR 方法扩增柑橘 *CsERF1* 基因的 cDNA 片段,并连接到 TA 克隆载体。二元载体 pFGC5941 和目的基因的克隆经限制性内切酶 2 次

2.4 *CsERF1* 基因 RNAi 载体的测序验证

P1、P2 引物双向测序结果(图 8)表明,正、反向片段已连接,*CsERF1* 基因的带发夹结构和反向重复序列的 RNAi 载体构建成功,并将其命名为 pFGC5941-*CsERF1*。

双酶切,将目的基因片段按正、反向插入到 pFGC5941 的 *CHSA* 内含子的两端,构成反向重复序列,即 RNA 干涉载体。通过菌液 PCR、酶切检验和测序,证实正、反向基因片段均已正确插入到载体中。

邓晶等^[20]构建苧麻 *CCoAOMT* 基因干扰表达载体转化烟草后,转基因烟草的木质素含量有一定程度的下降,说明具有干扰效果。本试验中采用了与之相似的策略,其干扰效果有待检验;因为目的基因片段太短不能形成发夹结构,pFGC5941 的间隔序列长达 1 352 bp。本试验设计的 *CsETRI* 基因片段的长度为 908 bp,有完整的开放阅读框,所以,构建 RNAi 载体的中间产物+*CsERF1*-pFGC5941 也可用于基因的过量表达研究。

参考文献:

[1] Riechmann J L, Meyerowitz E M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors[J]. *Biol Chem*, 1998, 379: 633-646.

[2] Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding factor (ERF domain)

- in plants [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 26857–26861.
- [3] Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Science*, 2003, 301: 653–657.
- [4] Giovannoni J, Yen H, Shelton B, et al. Genetic mapping of ripening and ethylene-related loci in tomato [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 1005–1013.
- [5] Ohme-Takagi M, Ahinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element [J]. *PNAS*, 1995, 7: 173–182.
- [6] Solano R, Stepanova A, Chao Q, et al. Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ethylene-insensitive 3 and ethylene response factor 1 [J]. *Genes Dev*, 1998, 12: 3703–3714.
- [7] Klee H J. Ethylene signal transduction moving beyond *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135: 660–667.
- [8] Fujimoto S Y, Ohra M, Usui A. *Arabidopsis* ethylene-response element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression [J]. *The Plant Cell*, 2000, 12: 393–404.
- [9] Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez Serrano J J, et al. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 165–178.
- [10] 李文正, 张海文, 王俊英, 等. ERF 转录因子及其在烟草抗逆性改良中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2006(4): 30–34.
- [11] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *petunia* results in reversible co-suppression of homologous gene in trans [J]. *The Plant Cell*, 1990, 2: 279–289.
- [12] Bass B L. Double-stranded RNA as a template for gene silencing [J]. *Cell*, 2000, 101: 235–238.
- [13] Makoto K. RNA interference in crop plants [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(2): 139–143.
- [14] Waterhouse P M, Helliwell C A. Exploring plant genomes by RNA induced gene silencing [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 4: 29–38.
- [15] Chuang C F, Meyerowitz E M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(9): 4985–4990.
- [16] Waterhouse P M, Wang M B, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses [J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 834–842.
- [17] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. *Plant*, 2001, 27(6): 581–590.
- [18] Ma Z L, Yang H Y, Wang R, et al. Construct hairpin RNA to fight against rice dwarf virus [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(3): 332–336.
- [19] Kerschen A, Napoli C A, Jorgensen R A et al. Effectiveness of RNA interference in transgenic plants [J]. *FEBS Lett*, 2004, 566(1/3): 223–228.
- [20] 邓晶, 刘峰, 郭清泉, 等. 苜蓿 *CCoAOMT* 基因干扰表达载体构建及对烟草的转化 [J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2008, 34(2): 132–135.
- [21] 张广辉, 梁月荣, 陆建良, 等. 茶树咖啡因合成酶基因 RNA 干扰表达载体构建 [J]. *茶叶科学*, 2006, 26(4): 243–248.
- [22] 彭昊, 翟英, 张芊, 等. 水稻高效 RNA 干扰体系的建立及其功能分析 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39(9): 1729–1735.
- [23] 叶庆亮, 彭爱红, 曹立, 等. 柑橘类果树组织总 RNA 优异且通用的提取方法 [J]. *江西农业大学学报*, 2007, 29(5): 732–739.
- [24] 谢玉明, 郭琛, 张家银, 等. 农杆菌介导 *phyB* 基因转化枳壳研究 [J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2008, 134(1): 68–72.
- [25] 谢玉明, 邓子牛, 郭琛. 农杆菌介导甜橙遗传转化的初步研究 [J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2005, 31(6): 627–630.

责任编辑: 王赛群