

## Os WRKY10 基因特异性 dsRNA 干涉载体构建

窦彩虹, 陈应武 (河南科技大学林学院, 河南洛阳471003)

**摘要** [目的] 明确 Osdg 中 T-DNA 插入位点的基因是否为引起突变表型的基因。[方法] 采用 Os WRKY10 基因 5' 端、不含 WRKY 保守域的长 300 bp 的 cDNA 片段, 构建抑制 Os WRKY10 基因表达的特异性 dsRNA 干涉重组表达载体 pCam35SWnW。采用冻溶法将 pCam35SWnW 载体导入根癌农杆菌超毒力菌株 EHA105, 对其进行 PCR 检测。[结果] 该研究成功构建了重组表达载体 pCam35SWnW。采用相应限制性内切酶对重组表达载体进行酶切鉴定, 其中以 Xho 消解重组质粒, 可获得 1 kb 左右的 DNA 片段。在抑制基因表达方面, 发卡结构比反义结构更为有效。[结论] 该研究成功构建了抑制 Os WRKY10 表达的特异性 dsRNA 干涉载体, 可用于进一步的基因功能研究。

**关键词** Os WRKY10 基因; 特异性 dsRNA 干涉载体; 构建

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)07-02682-02

## Construction on Specific dsRNA Interference Vector of Os WRKY10 Gene

DOU Cai-hong et al (College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

**Abstract** [Objective] The research aimed to definitude whether the T-DNA insert locus gene in Osdg was the gene that caused mutant phenotype. [Method] cDNA fragment with the length of 300 bp on 5' end of Os WRKY10 gene without containing conserved domain WRKY was used to construct the specific dsRNA interference recombinant expression vector pCam35SWnW that could inhibit the expression of Os WRKY10 gene. pCam35SWnW vector was introduced into supervirulent strain EHA105 of Agrobacterium tumefaciens by freeze-thaw method and it was detected by PCR. [Result] The research successfully constructed the recombinant expression vector pCam35SWnW. The enzyme digestion of the recombinant expression vector was made by using the corresponding restriction endonuclease for identifying, in which the recombinant plasmid was digested by Xho and DNA fragment with the length of about 1 kb was obtained. For inhibiting the gene expression, hairpin structure was more effective than antisense structure. [Conclusion] The research successfully constructed the specific dsRNA interference vector that could inhibit the expression of Os WRKY10, which could be used in the further research of gene function.

**Key words** Os WRKY10 gene; Specific dsRNA interference vector; Construction

水稻 T-DNA 插入突变体 Osdg 生长发育缓慢、生育期延长、植株矮化、分蘖数减少、穗长缩短、千粒重下降、萌发速度减慢, 其插入位点侧翼序列编码一个 WRKY 类转录因子 (Os-WRKY10)。WRKY 是近年才发现的一类转录因子。该类蛋白有一长约 60 个氨基酸的 DNA 结合域, 即 WRKY 域。研究表明, WRKY 基因可能源自十几亿年前的真核细胞。在许多植物种类中, WRKY 基因对病原侵染、生物胁迫、非生物胁迫 (干旱、低温、创伤等) 做出应答<sup>[1-2]</sup>。此外, 该类基因也参与植物衰老、毛状体和种皮发育等<sup>[3-6]</sup>。RNA 干涉 (RNA Interference, RNAi) 是一种由 dsRNA 介导的基因沉默现象, 利用这一现象可特异性关闭目的基因表达。为了明确插入位点的基因是否为引起突变表型的基因, 笔者采用目的基因 5' 端、不含 WRKY 保守域、长 300 bp 的 cDNA 片段, 构建了抑制 Os WRKY10 基因表达的特异性 dsRNA 干涉重组表达载体 pCam35SWnW。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株及载体质粒** 大肠杆菌 (Escherichia coli) 菌株 DH5、根癌农杆菌 (Agrobacterium tumefaciens) 菌株 EHA105 及 pUC T、pUC-ubiIn、pCam35S 等载体。

**1.2 分子生物学试剂及仪器** 限制性核酸内切酶为 Promega 公司产品; T<sub>4</sub> DNA 连接酶、Klenow 酶、碱性磷酸酶 (AP)、Taq DNA 聚合酶、DNA 胶回收试剂盒等为 Sangon 公司产品; PCR 仪为 Perkin-Elmer 公司产品。

**1.3 特异性 dsRNA 干涉载体的构建** 采用引物 5'-TTT CCA CAC ATA AGC TAG CTC G-3' 和 5'-CCC TTC GTA CGT

GGT GAT-3, 通过 PCR 方法扩增, PCR 产物连接至 pUC-T 载体, 通过 Not I、EcoR I、BamH I 等限制性内切酶酶切, 经 DNA 片段回收、补平、去磷酸化后分步连接到 pUC-ubiIn 中内含子两侧, 得到 pUC-WFW 载体。pUC-WFW 再通过 EcoR I、Not I 等限制性内切酶酶切去掉基因保守区, 经去磷酸化、补平、DNA 片段回收后分步连接构成 pUC-WnW 载体。

**1.4 植物表达载体 pCam35SWnW 的构建及酶切鉴定** 将 pUC-WnW 载体以 BamH I、Sac I 酶切, 获得片段 WnW, 连接于 CaMV35S 启动子控制、带有 rbcS 终止子的载体, 即获得重组表达载体 pCam35SWnW。采用 Pst I、EcoR I、Xho I 等限制性内切酶对重组质粒进行酶切鉴定, 以确定重组质粒是否为所要构建的特异性 dsRNA 干涉重组表达载体。

**1.5 重组载体的农杆菌转化及 PCR 检测** 载体质粒的农杆菌转化采用直接导入法。取重组转化子菌液, PCR 检测。

## 2 结果与分析

**2.1 特异性 dsRNA 干涉载体的获得** 选用 Os WRKY10 基因 cDNA 5' 端、不含 WRKY 保守域、长约 300 bp 的片段作为反向重复双臂, 以玉米泛素基因 (Ubiquitin) 启动子内含子序列作为发卡环状处片段, 构建了反向重复发卡结构 (图 1), 即 pUC-WnW 载体。

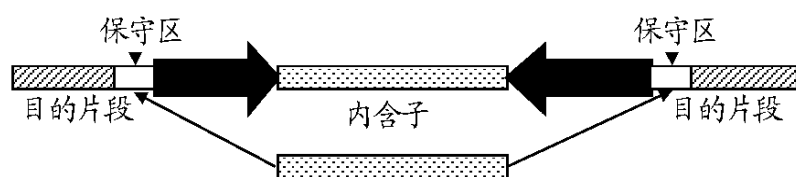


图1 特异性 dsRNA 干涉反向重复结构

Fig.1 Construction of specific dsRNA

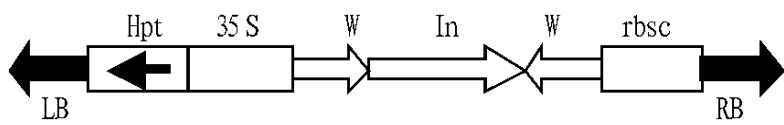
**2.2 重组表达载体 pCam35SWnW 的获得及酶切鉴定** 以 BamH I、Sac I 酶切 pUC-WnW 载体, 获得 DNA 片段 WnW, 连接于 CaMV35S 启动子控制、带有 rbcS 终止子的载体, 即获

基金项目 河南科技大学人才科学研究基金和国家自然科学基金项目 (30370139、30471122)。

作者简介 窦彩虹 (1975-), 女, 甘肃临洮人, 讲师, 从事植物病理方面的研究。

收稿日期 2008-02-18

得重组表达载体 pCam35SWnW (图2)。采用相应限制性内切酶对重组表达载体进行酶切鉴定,其中以 Xho 消解重组质粒,可获得1 kb 左右的DNA 片段(图3)。

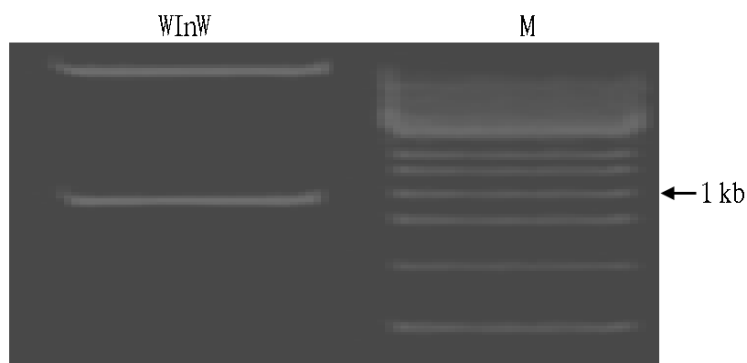


注:35 S 为 CaMV35 S 启动子;W 为 *Gs* WRKY10 cDNA 片段,In 为 ubiquitin 内含子;rbsc 为 rbsc 终止子。

Note:35 S, CaMV35 S promoter; W, *Gs* WRKY10 cDNA segment; In, ubiquitin intron; rbsc, rbsc terminator.

图2 植物表达载体 pCam35WnW 结构

Fig.2 Structure of plant expression vector pCam35SWnW



注:WnW 为 pCam35SWnW 的 Xho 酶产物;M 为 DNA marker。

Note: WnW, pCam35SWnW digested by Xho; M, marker.

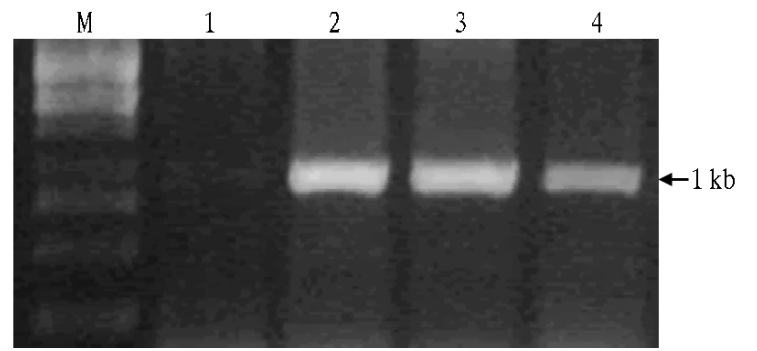
图3 重组表达载体的酶切鉴定

Fig.3 Enzyme digestion of recomlined expression vector

**2.3 重组表达载体 pCam35SWnW 的农杆菌转化及 PCR 检测** 采用冻溶法将 pCam35SWnW 载体导入根癌农杆菌超毒力菌株 EHA105,以特异引物对获得的转化子进行菌体 PCR 检测。电泳结果如图4 所示。

### 3 讨论

为了明确 *Gsdg* 中 T-DNA 插入位点的基因是否为引起突



注:M 为 DNA marker;1 为空白对照;2~4 为质粒。

Note: M, marker;1, ddH<sub>2</sub>O;2-4, plasmid.

图4 表达载体的 PCR 检测

Fig.4 PCR amplification on expression vector

变表型的基因,采用最新基因功能研究手段——RNA 干扰技术。研究表明,在抑制基因表达方面,发卡结构较反义结构更为有效。WRKY 是一个具有共同保守功能域的庞大基因家族。为了抑制目的基因且避免在干扰过程中可能产生的相互干扰,选取目的基因5'端、不含 WRKY 保守域、长约 300 bp 的 cDNA 片段,构建了抑制 *Gs* WRKY10 表达的特异性 dsRNA 干扰载体,用于进一步的基因功能研究。

### 参考文献

- [1] LKER B, SOMSICHI E. WRKY transcription factors: from DNA binding to towards biological function[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7:491 - 498.
- [2] 仇玉萍,荆邵娟,付坚,等. 13 个水稻 WRKY 基因的克隆及其表达谱分析[J]. 科学通报, 2004, 49(18): 1860 - 1869.
- [3] CHEN W, PROVART NJ, GLAZEBROOK J, et al. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative function in response to environmental stresses[J]. Plant Cell, 2002, 14:559 - 574.
- [4] HINDERHOFER K, ZENIGRAF U. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence[J]. Planta, 2001, 213:469 - 473.
- [5] ROBAIZEK S, SOMSICHI E. Targets of A WRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense[J]. Genes Dev, 2002, 16:1139 - 1149.
- [6] GUO Y, CAI Z, GANS. Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence[J]. Plant Cell Environ, 2004, 27:521 - 549.

sy]cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) [J]. Nat Prod Rep, 2002, 19:390 - 412.

- [4] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning, a laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [5] BRUSHABER K R, O'TOOLE G A, ESCALANTE SEMERENA J C. CobD, a novel enzyme with L-threonine-O<sup>3</sup>-phosphate decarboxylase activity, is responsible for the synthesis of (R)-1-Amino-2-propanol-O<sup>2</sup>-Phosphate, a proposed rewriter node in cobalamin biosynthesis in Salmonella typhimurium LT2[J]. J Biol Chem, 1998, 273(5):2684 - 2691.
- [6] KECK B, RENZ P. Salmonella typhimurium forms adenylobarbitate and 2-methyladenylobarbitate, but no detectable cobalamin during strictly anaerobic growth[J]. Arch Microbiol, 2000, 173:76 - 77.
- [7] OTOOLE G A, ESCALANTE SEMERENA J C. Purification and characterization of the bifunctional CobU enzyme of Salmonella typhimurium LT2, evidence for a CobU-GMP internode[J]. J Biol Chem, 1995, 270:23560 - 23569.
- [8] KECK B, MUNDER M, RENZ P. Biosynthesis of cobalamin in Salmonella typhimurium: transformation of riboflavin into the 5,6-dimethylbenzimidazole moiety [J]. Arch Microbiol, 1998, 171(1):66 - 68.

(上接第2678 页)

*S. typhimurium* de novo 合成钴胺素中 cobD 合成的是 (R)-AP-P,那么, cobU 的 AdoChi 激酶活性就变得没有必要了;如果前人的假设是正确的,即 Cob 领域的最终产物是 AdoChi-P 而不是 AdoChi,那么 cobD 基因的发现将为今后进一步研究复杂的合成途径和培养条件之间的关系奠定基础。关于这个假设是否正确,目前还处于研究阶段<sup>[8]</sup>。但是这些为探索维生素 B<sub>12</sub> 高生产的关键点具有意义。

### 参考文献

- [1] 罗伟,郝常明. 维生素 B<sub>2</sub> 的研究及其进展[J]. 中国食品添加剂, 2002 (13):15 - 16.
- [2] 张玉明,王雷,王云山,等. 维生素 B<sub>2</sub> 的生物合成研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(9):71 - 72.
- [3] WARREN MJ, RAUX E, SCHUBERT HL, et al. The biosynthesis of adeno-