

拟南芥植物型 *PEPC* 基因人工小 RNA 表达载体的构建与遗传转化

冯都华^{1,2}, 王伏林², 陈锦清²

(¹浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004;
²浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所, 杭州 310021)

摘要:磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)是植物中具有多种生理功能的酶。为探索拟南芥中植物型 *PEPC* 基因对模式植物拟南芥脂肪酸含量以及抗逆性等方面的影响,笔者构建了同时敲除拟南芥 *Atppc1*、*Atppc2* 和 *Atppc3* 基因的人工小 RNA (amiRNA) 植物表达载体 pFGC-ami*Atppc123*, 经根癌农杆菌 EHA105 介导, 用花序浸染法转化拟南芥, 成功获得转基因植株。RT-PCR 半定量分析表明人工小 RNA 在转化植株中成功进行了超量表达。该试验为分析拟南芥脂肪酸含量以及抗逆性方面提供了基础材料。

关键词: PEPC; 拟南芥; amiRNA; 脂肪酸含量; 花序浸染

中图分类号: Q78

文献标志码: A

论文编号: 2011-0081

Construction of Plant-type Phosphoenolpyruvate Carboxylase (*PEPC*) Gene Artificial miRNA Expression Vector and Transformation in *Arabidopsis thaliana*

Feng Duhua^{1,2}, Wang Fulin², Chen Jinqing²

(¹College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang 321004;

²Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

Abstract: To investigate the functions of PEPC in lipid content, fatty acid composition and the response to environmental stress in C₃ plants, *Arabidopsis thaliana* plant-type *PEPC* genes (referred to as *Atppc1*, *Atppc2* and *Atppc3*) were silenced by the artificial miRNA (amiRNA) technique. The author constructed the plant expression vector named pFGC-ami*Atppc123* and transformed it into *Arabidopsis thaliana* via in floral dip method. Transgenic plants were confirmed by PCR. The amiRNA transcript levels were detected by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that amiRNA expression was drastically increased in transgenic plant compared with non-transgenic plants.

Key words: PEPC; *Arabidopsis thaliana*; amiRNA; lipid content; in floral dip

0 引言

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)催化 CO₂ 与磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的羧化反应, 最后生成草酰乙酸和无机磷酸。PEPC 是一种具有多种生理功能的细胞质酶, 广泛分布于高等植物、蓝藻和细菌中^[1-2]。研究

表明, 不同类型植物的 PEPC 具有不同功能, 在 C₄ 和 CAM 植物中, PEPC 负责光合作用中无机碳的初始同化; C₃ 植物的 PEPC 在促进 TCA 循环中间代谢物的回补、协调碳和氮的代谢等方面有重要作用, 被认为是控制 C₃ 植物蛋白质与油脂含量比的一个关键酶^[3-6]。还

基金项目: 国家自然科学基金项目“油料作物高油种质资源创制的机理及其应用”(30430450); “油菜籽脂肪酸生物合成的双重遗传调控”(30370910)。

第一作者简介: 冯都华, 男, 1986 年出生, 江西九江人, 硕士研究生, 研究方向: 拟南芥 PEPC 基因的功能鉴定。通信地址: 321004 浙江省金华市迎宾大道 688 号 浙江师范大学化学与生命科学学院, E-mail: fengduhua86@yahoo.com.cn。

通讯作者: 陈锦清, 男, 1953 年出生, 浙江瑞安人, 研究员, 主要从事植物基因工程及遗传育种研究。通信地址: 310021 浙江省杭州市石桥路 198 号 浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所, Tel: 0571-86404392, E-mail: j.q.chen28@163.com。

收稿日期: 2011-01-11, **修回日期:** 2011-04-18。

有研究表明, PEPC 可能与植物对环境胁迫的响应有关^[7-9]。

拟南芥含有 4 个 PEPC 基因, 分别为 *Atppc1*、*Atppc2*、*Atppc3* 和 *Atppc4*。其中 *Atppc1*、*Atppc2* 和 *Atppc3* 相互之间同源性较高, 属于植物型 PEPC 基因; 而 *Atppc4* 所编码的酶缺少磷酸化结构域, 为典型的细菌型 PEPC 基因^[10-11]。目前对拟南芥 PEPC 基因家族表达背景的了解较为清晰^[12], 研究还表明 *Atppc4* 在抵抗干旱和盐胁迫逆境时作用更大^[13], 而拟南芥 PEPC 基因家族各基因的具体功能仍然未知。

微小 RNA (microRNA, 简称 miRNA) 的研究已成为目前的一大热点, 微小 RNA 是一类在真核生物中广泛存在的长度约为 20~23 个核苷酸的非编码小分子单链 RNA, 通过与靶 mRNA 互补配对, 导致 mRNA 的降解或翻译抑制, 从而在转录后水平对靶基因的表达进行负调控。Schwab 等^[14-16]设计了一种有效的使植物基因沉默的工具——人工小 RNA (Artificial miRNAs, amiRNA), 在拟南芥、水稻和小立碗蕨等植物的应用表明, amiRNA 能有效地抑制单个靶基因或多基因的表达。本试验利用拟南芥内源 miR319a 前体骨架, 构建了同时沉默拟南芥 3 个植物型 PEPC 基因的 amiRNA 表达载体, 转化野生型拟南芥, 该研究对探明拟南芥 PEPC 基因的功能具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株和载体

野生型拟南芥 (Col-0)、大肠杆菌 (DH5 α)、根癌农杆菌 (EHA105)、植物表达载体 pFGC5941 均由本实验室保存; pRS300 质粒由 Rebecca Schwab 提供;

pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司。

1.2 酶和主要试剂

pfu 高保真聚合酶、T4 DNA 连接酶、M-MLV 逆转录试剂盒购自 Promega; rTaq DNA 聚合酶、Trizol 试剂盒购自 TaKaRa (大连); Advantage 2 polymerase mix 购自 Clontech; 限制性内切酶、DNA 分子 Marker 购自 Fermentas; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、抗生素等购自上海生工, 引物由上海生工合成; 其他试剂为国产分析纯。

1.3 引物设计

根据拟南芥 *Atppc1* (AT1G53310.1)、*Atppc2* (AT2G42600.1) 和 *Atppc3* (AT3G14940.1) 的序列, 登录 WMD3 (Web MicroRNA Designer, <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>), 设计相应的 amiRNA 前体的扩增引物 I~IV (见表 1)。前端 A 引物和末端 B 引物采用 Schwab 给出的序列 (表 1)^[17]。

1.4 表达载体构建

参照 Schwab 的方法^[17], 使用所设计的 6 条引物和 *pfu* 高保真聚合酶, 以 pRS300 质粒为模板, 采用重叠 PCR 的方法克隆目标基因 amiRNA 的前体片段。该片段经电泳、切胶回收、3' 加 polyA 后, 再连接到 pGEM T-easy 载体上得到重组克隆, 命名为 pGEM-ami*Atppc123*, 用 *EcoR* I 酶切鉴定, 将阳性克隆送上海生工测序。Xho I 和 Xba I 双酶切 pGEM-ami*Atppc123* 和 pFGC5941, 分别回收目的片段和载体片段进行连接, 连接产物转至大肠杆菌, 抽提质粒, 用 Xho I 和 Xba I 双酶切鉴定, 表达载体命名为 pFGC-ami*Atppc123* (见图 1)。

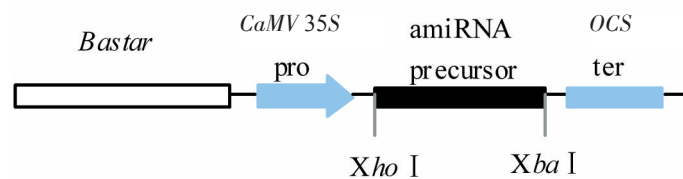


图 1 人工小 RNA 植物表达载体结构图

1.5 拟南芥的转化和筛选

利用冻融法将表达载体 pFGC-ami*Atppc123* 转入根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞, 将菌液涂布于含卡那霉素和利福平的 YEB 固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C, 培养 2 天, 参照 Clough^[18]的方法, 进行农杆菌培养, 利用花序浸染法转化野生型拟南芥。将 T₀ 代拟南芥种子播种在营养土上, 出苗后, 喷施除草剂 (草丁膦 3000 倍稀释液) 进行筛选。

1.6 转基因植株的检测

CTAB 法小量提取抗性苗叶片 DNA, 根据表达载体上的 35S 启动子和 OCS 终止子序列设计引物: 35S-F 和 OCS-R (表 1), 对抗性苗进行 PCR 检测。

1.7 转基因植株人工小 RNA 的表达分析

Trizol 法一步提取拟南芥叶片总 RNA, 参照 Chen 的方法^[19], 设计目标 amiRNA 的茎环 RT 引物和 PCR 引物 (表 1)。参照 Varkonyi 的方法^[20], 进行 amiRNA 的逆

转录和PCR, RT反应体系10 μL, 包括5.5 μL RNA模板, 1 μL 茎环RT引物(1 μmol), 0.5 μL dNTPs(10 μmol), 0.5 μL 逆转录酶M-MLV, 2 μL 逆转录酶缓冲液和0.5 μL RNase抑制剂。在0.2 mL反应管中先加入模板、茎环RT引物和dNTPs, 混匀后65℃变性5 min, 迅速放到冰中冷却, 再加入其他组分。16℃ 30 min; 20℃ 30 s, 42℃ 30 s, 50℃ 1 s, 60个循环; 最后85℃反应5 min终止逆转录。取1 μL逆转录产物进行PCR反应, 反应体系20 μL, 含0.5 μL Advantage 2

polymerase mix, 2 μL 10×PCR buffer, 0.5 μL dNTPs, 0.5 μL 正向引物ami123-F和0.5 μL 反向引物ami123-R, 用水补足至20 μL。PCR反应程序: 94℃ 2 min; 94℃ 15 s, 65℃ 1 min, 分别进行25和30个循环; 最后72℃延伸2 min。同时按照M-MLV逆转录试剂盒说明书中的方法, 进行总RNA的逆转录, 使用ubiquitin-F和ubiquitin-R引物(表1), 扩增内参ubiquitin, PCR反应体系和反应程序同上, 进行25个循环。

表1 引物序列

名称	序列(5'→3')	
载体构建	I miR-s	gatatagataatgtaagcgcctctctctttgtatcc
	II miR-a	gaggcgcttacattatctctatcaagaagaatcaatga
	III miR*s	gaggagcttacattaactctatttcacaggtcgtgatag
	IV miR*	gaaatagagttaatgtaagctctctacatatatattcct
	A	ctgcaaggcgattaagtgggtaac
	B	gcggataacaatttcacacaggaacag
PCR 鉴定	35S-F	acctaacagaactcgccgta
	OCS-R	gtggcgctctatcatagatg
amiRNA 的表达	stemloop RT	gtcgtatccagtcagggtccgaggtattcgactgatacagcggcgct
	ami123-F	gcccgcgtatagataatgtaagc
	ami123-R	gcggcggtacctaatacattg
内参	ubiquitin-F	atgcagatctctgtaaac
	ubiquitin-R	tcaagcttcaactcctctt

2 结果与分析

2.1 植物表达载体pFGC-amiAtppc123的构建

登录WMD3网站, 将Atppc1~3基因在拟南芥cDNA数据库中进行BLAST, 设计出目标amiRNA片

段: 5' TATAGAGATAATGTAAGCGCC3', 该amiRNA的21碱基成熟片段与Atppc1~3的基因序列在相应位点存在配对(图2)。再根据amiRNA序列使用Oligo功能设计出扩增amiRNA前体片段的I~IV引物。以

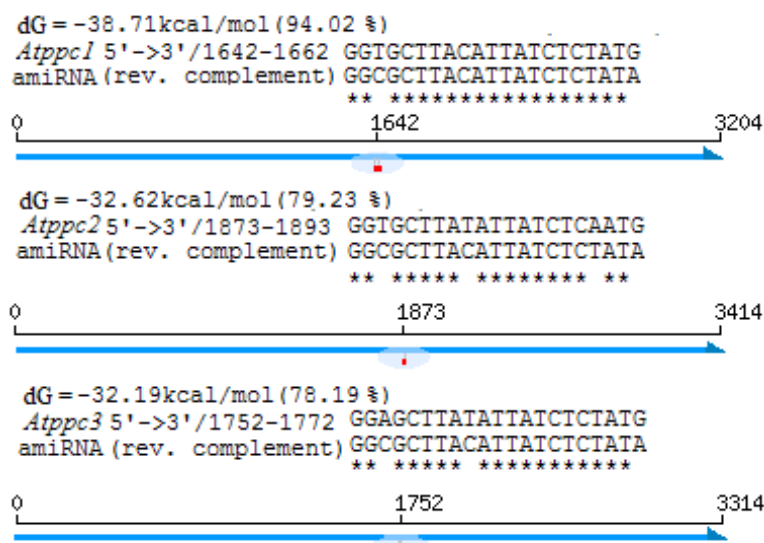
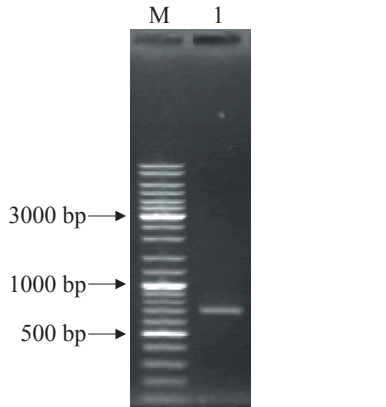
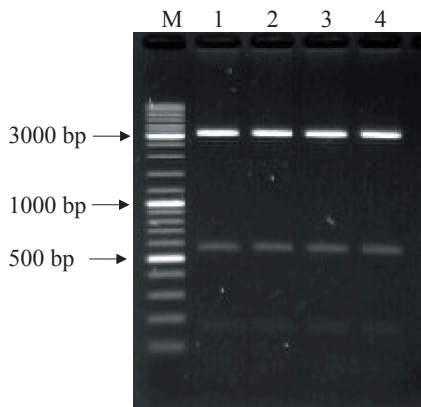


图2 人工小RNA片段与各目标基因的配对定位

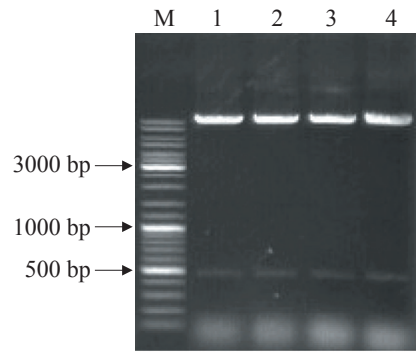
质粒 pRS300 为模板,通过巢式 PCR 扩增出 694 bp 大小的目标 amiRNA 的前体片段(图 3)。将目标基因 amiRNA 的前体片段克隆到 pGEM T-easy 载体上,得到重组克隆 pGEM-amiAtppc123, EcoR I 酶切结果符合 557 bp 的预期(图 4)。将阳性克隆送至上海生工公司测序,结果显示插入序列与设计序列一致。分别将载体 pGEM-amiAtppc123 和表达载体 pFGC-5941 用 Xho I 和 Xba I 双酶切,分别回收目的片段和载体片段



M: GeneRuler DNA Ladder Mix; 1: amiRNA 的前体片段
图3 PCR 扩增人工小 RNA 前体片段的电泳检测



M: GeneRuler DNA Ladder Mix;
1~4: EcoR I 酶切质粒 pGEM-amiAtppc123
图4 重组克隆 pGEM-amiAtppc123 的酶切鉴定



M: GeneRuler DNA Ladder Mix;
1~4: Xho I 和 Xba I 双酶切质粒 pFGC-amiAtppc123
图5 表达载体 pFGC-amiAtppc123 的酶切鉴定

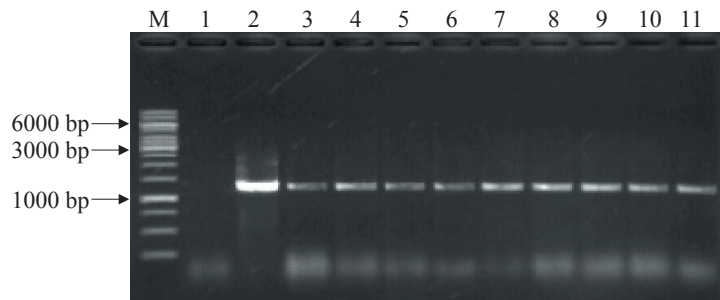
进行连接,得到表达载体 pFGC-amiAtppc123,重组质粒用 Xho I 和 Xba I 双酶切检测,得到的小片段也符合 464 bp 的预期(图 5),表明成功获得了拟南芥植物型 PEPC 基因 amiRNA 的植物表达载体。

2.2 转基因植株的获得

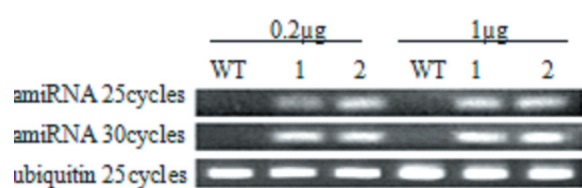
利用花序浸染法转化拟南芥,将 T₀代拟南芥转基因种子播种在营养土上,喷施除草剂后,大部分植株发黄枯死,而少数植株可以正常生长,具备抗除草剂特性。3 周后,用 CTAB 法小量提取正常生长植株的叶片 DNA,以野生型拟南芥为阴性对照,质粒为阳性对照,使用 35S-F 和 OCS-R 引物进行 PCR 检测,转基因拟南芥得到了 1 条约 1200 bp 的特异条带,表明已获得转基因拟南芥植株(图 6)。

2.3 人工小 RNA 在转基因拟南芥中的表达

Trizol 法提取野生型和 2 个转基因株系拟南芥叶片总 RNA,以茎环 RT 引物进行 amiRNA 的逆转录,以引物 ami123-F 和 ami123-R 进行 PCR 扩增,对转基因植株 amiRNA 的表达进行半定量检测。PCR 反应进行 25 个循环和 30 个循环后,用 3%TAE 进行电泳。同时以随机引物和 Oligod(T)₁₈ 引物进行总 RNA 的逆转录,以引物 ubiquitin-F 和 ubiquitin-R 扩增内参 ubiquitin, PCR 反应进行 25 个循环后,用 3%TAE 进行电泳(图



M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: 野生型对照; 2: 质粒 pFGC-amiAtppc123; 3~11: 转基因植株
图6 部分转化植株的 PCR 检测



WT:野生型植株;1~2:转基因株系

图7 人工小RNA的RT-PCR检测

7)。结果显示,当对照和转基因株系的总RNA模板量都为0.2 µg时,对照没有出现目的带,转基因株系1和2分别出现目的带;而在相同体系下,当对照和转基因株系的总RNA模板量都为1 µg时,出现了相似的结果,说明本试验构建的amiRNA在转基因拟南芥株系中超量表达。

3 结论与讨论

由于PEPC在植物光合作用、蛋白质/脂类代谢以及逆境胁迫过程中的重要作用,利用基因工程技术手段调控植物PEPC基因的表达已成为热点。作为研究方法的一种补充,本试验利用人工小RNA技术构建的真核表达载体pFGC-amiAtppc123,在转入拟南芥后,amiRNA进行了超量表达。转基因拟南芥的表型变化、各基因的表达水平、PEPC酶活性、脂肪酸含量与成分、干旱及盐碱胁迫等方面有待后续研究。

PEPC基因在植物中多以基因家族存在,使用传统的反义RNA技术或RNA干扰技术敲除一个基因,其他的同源基因可能会大量表达,进行补偿作用,从而减弱沉默效果;而如果构建RNAi串联的表达载体以同时干扰几个基因,则需要多次酶切和连接步骤;相对地,笔者采用的amiRNA技术是利用植物内源的microRNA骨架序列进行片段替换产生的,该方法需时短、操作简单,其成熟片段序列专一和特异结合靶目标的优点,使它可以有效地作用于单基因或具有相似功能的多基因家族,而不影响其他非靶基因的表达。

同时,在人工小RNA载体的构建和转化过程中,应注意以下问题:首先,由于成熟的amiRNA片段序列与沉默效率高度相关,经过4轮PCR得到的人工小RNA前体,在克隆至T载体后,需重复测序验证,以保证所设计的amiRNA序列已正确替换pRS300的原有序列;其次,理论上的结合效率是基于amiRNA与靶mRNA两者结合位点序列推测得到的,由于mRNA的实际高级结构难以预测,所选amiRNA片段可能无法接近靶位点,因而对同一靶基因或基因家族选择2~3个amiRNA序列是比较保险的方法,这部分的工作也在进行中;最后,在应用花序浸染法转化拟南芥时,用

1/2MS+5%蔗糖溶液稀释农杆菌菌体,将加入的表面活性剂(Silwet L-77)终浓度由0.05%降低为0.02%,可以减少浸染后拟南芥花序发黄致死的毒性现象,提高转化效率。

参考文献

- [1] Lepiniec L, Vidal J, Chollet R, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution[J]. Plant Science, 1994,99(2):111-124.
- [2] Toh H, Kawamura T, Izui K. Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase[J]. Plant Cell Environ, 1994,17(1):31-43.
- [3] Gonzalez Mc Echevarra C, Vidal J, Cejudo F J. Isolation and characterisation of a wheat phosphoenolpyruvate carboxylase gene. Modelling of the encoded protein[J]. Plant Science, 2002,162(2): 233-238.
- [4] Blonde J D, Plaxton W C. Structural and kinetic properties of high and low molecular mass phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the endosperm of developing castor oilseeds[J]. J Biol Chem, 2003,278(14):11867-11873.
- [5] 陈锦清,郎春秀,胡张华,等.反义pep基因调控油菜籽粒蛋白质/油脂含量比率的研究[J]. 农业生物技术学报, 1999,7(4):316-320.
- [6] Nimmo H G. The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants[J]. Trends Plant Sci, 2000,5(2):75-80.
- [7] Fontaine V, Cabane M, Dizengremel P. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in Pinus halepensis needles submitted to ozone and water stress[J]. Physiol Plant, 2003,117(4): z445-452.
- [8] Jeanneau M, Gerentes D, Foueillassar X., et al. Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the Zm-A sr1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC [J]. Biochimie, 2002, 84 (11): 1127-1135.
- [9] Chen M, Tang Y, Zhang J, et al. RNA interference-based suppression of phosphoenolpyruvate carboxylase results in susceptibility of rapeseed to osmotic stress[J]. J Integr Plant Biol, 2010,52(6):585-592.
- [10] Sullivan S, Jenkins G I, Nimmo H. G. Roots, cycles and leaves. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene family in soybean[J]. Plant Physiol, 2004,135(4):2078-2087.
- [11] Gennidakis S, Rao S, Greenham K, et al. Bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides interact in the hetero-oligomeric Class-2 PEPC complex of developing castor oil seeds[J]. Plant J, 2007,52(5):839-849.
- [12] Sanchez R, Cejudo F J. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from Arabidopsis and rice[J]. Plant Physiol, 2003,132(2):949-957.
- [13] Sanchez R, Flores A, Cejudo F J. Arabidopsis phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress [J]. Planta, 2006,223(5):901-909.
- [14] Schwab R, Ossowski S, Riestter M, et al. Highly specific gene

- silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2006,18(5):1121-1133.
- [15] Warthmann N, Chen H, Ossowski S, et al. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice[J]. *PLoS One*,2008,3(3): e1829.
- [16] Khraiweh B, Ossowski S, Weigel D, et al. Specific gene silencing by artificial MicroRNAs in *Physcomitrella patens*: an alternative to targeted gene knockouts[J]. *Plant Physiol*,2008,148(2):684-693.
- [17] Schwab R, Ossowski S, Warthmann N, et al. Directed gene silencing with artificial microRNAs[J]. *Methods Mol Biol*,592: 71-88.
- [18] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J*,1998,16(6):735-743.
- [19] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*,2005,33 (20):179.
- [20] Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, et al. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs[J]. *Plant Methods*,2007,3(1):12.