

烟草 CHS 基因 RNA 干扰载体的构建及其遗传转化

李尊强^{1,2}, 杨爱国¹, 常爱霞¹, 张长静¹, 郑吉云^{1,2}, 冯全福^{1*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 烟草行业烟草基因资源利用重点实验室, 青岛 266101;

2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要: 类黄酮化合物是烟草香气形成的重要前体物质, 其形成需要多个调控基因的参与, 查尔酮合成酶基因 (CHS) 是类黄酮物质合成途径中的关键基因, 它的突变或沉默可能影响香气物质的形成。为了探讨 CHS 基因的下调表达对烟草香气的影响以及为选育优良的高香气品种提供技术, 采用 GATEWAY 技术经 BP 反应和 LR 反应将 CHS 基因片段重组到表达载体 pH7GWIG2(I) 上, 成功构建了具有反向重复序列的 CHS 基因的 RNAi 表达载体, 并通过农杆菌介导法转染烟草 ‘大白筋 599’, 以期研究 CHS 基因在烟叶香气物质方面的作用奠定基础。经过鉴定, 获得 24 株阳性转基因 ‘大白筋 599’。

关键词: 烟草; 查尔酮合成酶; CHS; 基因; RNAi 载体; 遗传转化

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119 (2013) 05-0078-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2013.05.016

Construction of RNAi Vectors of CHS Gene and its Transformation in Tobacco

LI Zunqiang^{1,2}, YANG Aiguo¹, CHANG Aixia¹, ZHANG Changjing¹, ZHENG Jiyun^{1,2}, FENG Quanfu^{1*}

(1. Key Laboratory for Tobacco Gene Resources, Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China;

2. Graduate School of CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: Flavonoid are important aroma precursors, which are controlled by many regulatory genes. Chalcone synthase gene (CHS), as one of the key gene of the flavonoid pathway, plays an important role in the synthesis of aroma precursors. The function missing or mutation of the CHS would affect the aroma formation. To explore the effects of CHS down regulatory expression and to provide technical information for breeding high aroma tobacco, we constructed the RNAi expression vectors by Gateway technology. Then the vectors were transformed into the ‘Dabaijin599’ by Agrobacterium-mediated method to form basis for further study in the aroma of CHS gene. Thirty of tobacco plants were obtained and 24 of them were identified as transgenic plants.

Keywords: tobacco; Chalcone synthase; CHS; gene; RNAi vectors; transformation

烟草香气是评价烟叶和卷烟制品内在质量的重要指标^[1-2]。作为烟草中主要的香气前体物质, 多酚在烟叶降解、转化过程中能产生令人愉悦的香气物质^[2-3]。类黄酮化合物是烟草中主要的多酚物质, 而查尔酮合成酶 (CHS) 是类黄酮化合物合成途径中的第一个关键酶, 它催化一分子香豆酰辅酶 A 和三分子丙二酰辅酶 A 反应产生类黄酮化合物的基本碳架结构-查尔酮^[4-5], 该产物进一步衍生转化生成各类黄酮化合物。CHS 基因在植物中广泛存在, 自从第一个 CHS 基因序列在荷兰芹被发现以来^[6],

人们已经从矮牵牛、拟南芥、烟草、百合等多植物中克隆到了 CHS 基因。它的沉默或突变可以直接或间接影响烟草的色素形成、防御病虫害侵染、防 UV 照射、根瘤形成、植物育性等生理活动^[7-9]。目前, CHS 基因转基因工程的应用研究主要集中在植物花色、育性及防御等方面^[9-11], 对于其在烟叶香气物质调控方面的研究未见报道。本研究利用 Gateway 技术^[12-13]构建了具有反向重复序列的 CHS 基因 RNAi 干扰载体, 并通过叶盘法转化得到转基因的 ‘大白筋 599’, 为研究烟草香气物质形成的分

基金项目: 国家烟草专卖局科技重点项目 “优质抗病烤烟新品种选育及育种技术研究” (110201002002)

作者简介: 李尊强, 男, 在读硕士, 研究方向为烟草遗传育种。E-mail: lizunqiangq@163.com。*通信作者, E-mail: quanff@163.com

收稿日期: 2012-10-15

修回日期: 2013-06-18

子机理及改善烟草遗传性状奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 RNA 超纯提取试剂盒购自原平皓生物科技有限公司, RNA 反转录试剂盒, 为大连宝生物工程有限公司产品, 凝胶回收试剂盒, 质粒小提试剂盒购自康为世纪生物技术有限公司。

1.1.2 植物材料和菌株 本实验于 2012 年进行, 供试材料为烟属普通烟草栽培品种 ‘大白筋 599’, 由中国农业科学院烟草研究所遗传育种研究中心提供。大肠杆菌感受态细胞 DH5a 和 BP clonase™ II Enzyme Mix 及 LR clonase™ II Enzyme Mix 购自

北京全式金生物技术有限公司, 根癌农杆菌菌株 LBA4404 为本实验室保存, 入门载体 pDONRTM201 和表达载体 pH7GWIWG2(I) 由 CSIRO Plant Industry (<http://www.pi.csiro.au/home.htm>) 赠。

1.2 方法

1.2.1 干扰片段的选择和含 attB 位点的引物设计 根据 NCBI 中 CHS 基因 (AF311783.1) 的序列信息在 NCBI 上进行 blast 比对, 查找 CHS 基因的保守区域, 在非保守区进行干扰片段的选择, 选择编码区 123~415 间长 293 bp 的序列作干扰片段, 根据干扰片段序列设计带有特异性结合位点 attB 部分序列的引物 (表 1)。

表 1 PCR 扩增所用引物
Table 1 Primers sequences for PCR

引物名称	引物序列	作用
Fi-chs	A A A A A G C A G G C T T C G T A T C A C T A A T A G C G A G C A T	一次 PCR 扩增干扰片段
Ri-chs	A G A A A G C T G G G T C G G G C A T G T C T A C A C C A C	一次 PCR 扩增干扰片段
attB1	G G G G A C A A G T T T G T A C A A A A A A G C A G G C T	二次 PCR 扩增
attB2	G G G G A C C A C T T T G T A C A A G A A A G C T G G G T	二次 PCR 扩增
HygF	C G A T T T G T G T A C G C C C G A C A G T C	转基因烟草检测
HygR	T C G T T A T G T T T A T C G G C A C T T T G	转基因烟草检测
Actin-F	C A A G G A A A T C A C C G C T T T G G	扩增内参基因
Actin-R	A A G G G A T G C G A G G A T G G A	扩增内参基因
ChsqF	C A T G T C T A G T G C T T G T G T G T T T	RT-qPCR 扩增
ChsqR	C A C C A G T A G T T C C C A A A C C T T C T T	RT-qPCR 扩增

注：引物方向是从 5' 到 3'。

1.2.2 烟草 CHS 基因干扰片段的克隆 取 ‘大白筋 599’ 幼嫩叶片提总 RNA, 并用 superscript III kit 进行反转录, 以反转录获得的 cDNA 为模板, 经两步 PCR 扩增获得 attB-PCR 产物 (两端含有特异性结合位点)。扩增条件为：第一阶段：94 °C 预变性 5 min；第二阶段：94 °C 变性 45 s, 52 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环；第三阶段：72 °C 延伸 10 min 后置于 4 °C 低温下保存备用。attB-PCR 产物即目的基因片段, 纯化回收目的片段, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳确定回收成功, -20 °C 保存备用。

1.2.3 烟草 CHS 基因 RNAi 载体的构建 BP 反应构建入门克隆：将纯化的 attB-PCR 产物在 BP clonase™ II enzyme mix 催化作用下重组到入门克隆 pDONR™201 上。反应体系为：TE buffer 6 μL,

入门克隆 pDONR™201 1 μL, attB-PCR 产物 1 μL, BP clonase™ II Enzyme Mix 2 μL。具体步骤如下：attB-PCR 产物和 pDONR™201 混合反应物在 25 °C 条件下反应 2~3 h 然后加入 1 μL 的蛋白酶 K 37 °C 温育 10 min 终止 BP 反应 取 2 μL 反应物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5a, 在加有 Kana (50 mg/L) 的 LB 固体培养基上进行单菌落的筛选, 挑取单克隆提取质粒, 质粒 PCR 鉴定正确后送华大公司测序。

LR 反应构建 RNAi 表达载体 将经测序鉴定的入门载体质粒与 pH7GWIWG2(I) 重组整合。反应体系：TE buffer 6 μL, 表达载体 pH7GWIWG2(I) 1 μL, 入门载体质粒 1 μL, LR clonase™ II Enzyme Mix 2 μL (反应条件同 BP 反应)。取 2 μL 重组后的反应物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 在加有壮观霉

素 (50 mg/L) 的 LB 固体培养基上筛选, 挑取阳性克隆提取质粒, 质粒 PCR 和酶切鉴定正确后送华大公司测序。

1.2.4 烟草 CHS 基因 RNAi 载体的遗传转化 用电击法将构建好的 RNAi 载体质粒导入农杆菌 Agrol LBA4404 中, 然后在含有壮观霉素 (50 mg/L) 和 Rif (25 mg/L) 的 YEB 培养基上筛选转化菌株。将继代 20 d 的烟草‘大白筋 599’叶片剪成 1 cm×1 cm 大小, MS₀ 培养基中预培养 3 d。利用叶盘法经农杆菌介导转染预培养后的叶片, 黑暗条件下共培养 2~3 d、置加有潮霉素选择压的 S1、S2、S3 继代培养基中分化培养, 待幼苗健壮后接种到 R 生根培养基中。

1.2.5 转基因烟草的 PCR 鉴定 CATB 法提取 CHS 基因转化‘大白筋 599’烟草基因组 DNA。根据 RNAi 表达载体上的潮霉素 (Hyg) 序列设计特异性引物 (表 1) 进行 PCR 鉴定, 以非转基因‘大白筋 599’为阴性对照。

1.2.6 转基因烟草 CHS 基因的表达水平检测 取经 PCR 鉴定后的含 CHS 基因 RNAi 转基因烟草幼叶, 用植物总 RNA 提取试剂盒 (天根, 北京) 提取‘大白筋 599’鲜烟叶的总 RNA, 用 PrimerScript™ RT-PCR Kit (Takara, Japan) 将经 DNase I 酶处理的总 RNA 反转录成 cDNA 第一链。用 primer 5.0 设计 RT-qPCR 引物 (表 1), Actin 基因作为内参基因设计引物 (表 1)。以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 扩增, 设置非转基因烟草做对照, 每个 T₀ 代设置 3 个重复, 实时荧光定量 PCR 检测转基因‘大白筋 599’中 CHS 基因的相对表达量。CHS 基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (处理) - ΔCT (对照); CT: 荧光阈值。

2 结果

2.1 CHS 基因干扰片段的扩增

以烟草‘大白筋 599’cDNA 为模板, Fi-chs、Ri-chs 为扩增引物进行第一次 PCR 扩增, PCR 产物作为第二次 PCR 扩增的模板, 用高保真 Phusion DNA 聚合酶对 CHS 基因目的基因进行第二次扩

增。取 10 μL 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 扩增出 300 bp 左右的片段, 与预期结果相一致, 表明成功获得干扰片段。

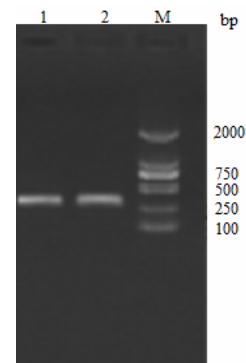


图 1 干扰片段的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of the interference fragment
注: M 为 DNA Marker DL2000; 1~2 为干扰片段扩增。

2.2 RNAi 干扰载体的检测

2.2.1 入门载体的检测 挑取经卡那霉素 (kanamycin) 筛选得到的阳性单克隆提取质粒, 以其为模板, attB1 和 attB2 为扩增引物进行 PCR 检测, 电泳结果显示得到与 attB-PCR 产物大小一致的条带, 而对照未出现相应的扩增条带 (图 2)。华大测序结果显示, 扩增序列与目的片段完全一致, 表明入门载体构建成功。

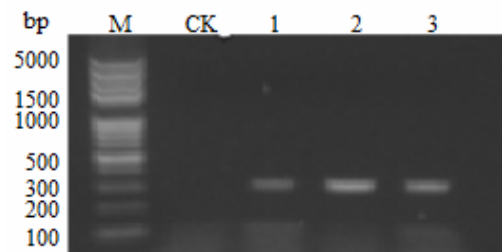


图 2 入门载体的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR detection of entry vectors
注: M 为 DNA 分子量标准 Marker DL100; CK 为未插入 CHS 基因片段的载体; 1~3 为插入 CHS 基因片段入门载体。

2.2.2 RNAi 表达载体的检测 经 LR 反应 表达载体 pH7GWIWG2(I) 上的 ccdB 序列被 CHS 基因干扰片段取代, 形成反向重复结构。重组后的表达载体上, 两个 hindIII 酶切位点之间相距 2000 bp 左右, 而两个 xbaI 酶切位点相距 1000 bp 左右。将经壮观霉素筛选的阳性单克隆提取质粒, 进行质粒 PCR 和酶切鉴定, 电泳图谱显示, xbaI 和 hindIII 分别酶切得到 1000、2000 bp 左右的片段 (图 3A), PCR 扩

增得到与预期长度一致的条带 (图 3B)。测得序列与目的序列比对结果进一步表明 CHS 基因 RNAi 干扰载体构建成功。

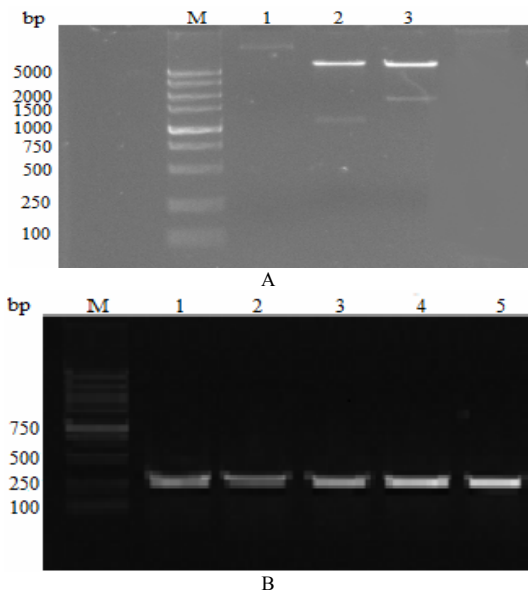


图 3 RNAi 载体构建过程中的酶切和 PCR 鉴定图谱

Fig. 3 The PCR detection and enzymatic digestion in construction of RNAi vector

注：A：M 为 DNA 分子量标准 Marker DL5000；1 为 pH7GW1WG2(I) 空载体；2 为 XbaI 酶切；3 为 hindIII 酶切；B：M 为 DNA 分子量标准 Marker DL5000；1-5 为 RNAi 表达载体的 PCR 扩增。

2.3 RNAi 载体的农杆菌转化及对转基因烟草‘大白筋 599’的分子鉴定

2.3.1 RNAi 的农杆菌转化 将筛选出的阳性单克隆置于 4 mL 加有 Rif (25 mg/L) 和壮观霉素 (50 mg/L) 的 YEB 液体培养基中过夜培养，设置未转化的 LBA4404 作阴性对照，以特异性引物进行菌液 PCR 鉴定 (图 4)，结果表明，转化 RNAi 载体的农杆菌扩出 300 bp 的条带，而非转化农杆菌无条带，证明成功得到转入 RNAi 载体的农杆菌菌株，载体的结构完整，可用于接下来的烟草转化。

2.3.2 转基因烟草植株的分子鉴定 提取转基因‘大白筋 599’基因组 DNA，并以此为模板，用特异性设计的引物 HygF/HygR 检测 (图 5)，30 株转基因‘大白筋 599’的 DNA 中，能扩出 750 bp 条带的共有 24 个，转化效率达 80%，而非转基因烟草未能扩出条带，表明已成功将 RNAi 载体转入‘大白筋 599’中。

2.3.3 烟草 CHS 基因的相对表达分析 选择生长

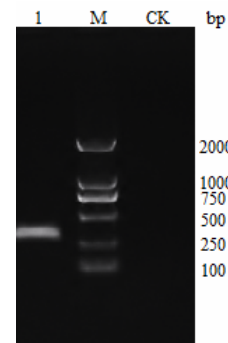


图 4 转 CHS RNAi 载体的农杆菌菌液 PCR 鉴定

Fig. 4 The PCR detection of CHS RNAi-expression vector transformed Agrobacterium LBA4404

注：M 为 DNA Marker DL2000；1 为转 CHS RNAi 载体的农杆菌菌液 PCR；CK 为阴性对照。

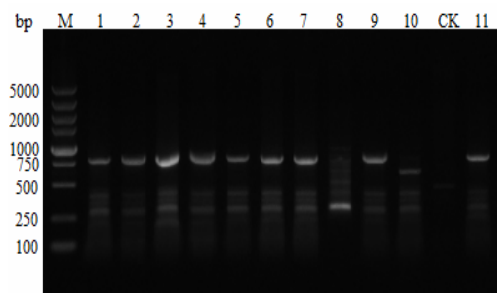


图 5 部分转基因烟草叶片的 PCR 鉴定

Fig. 5 The PCR detection for part transgenic tobacco leaves 注：M 为 DNA Marker DL5000；1~10、11 为转基因烟草叶片；CK 为野生型。

状况较一致非转基因烟草 (CK) 和上述所得转基因烟草叶片提取总 RNA 并反转录成 cDNA，进行实时荧光定量 PCR 扩增。软件分析荧光定量数据，归一化处理后生成柱形图 (图 6)。从图 6 可以看出转基因的‘大白筋 599’CHS 基因的表达量相对于对照组显著降低，各 T₀ 代间 CHS 基因的表达量存在着差异。表明，烟草 CHS 基因的 RNAi 干扰载体成功转入‘大白筋 599’中，并使 CHS 基因的表达量下调。

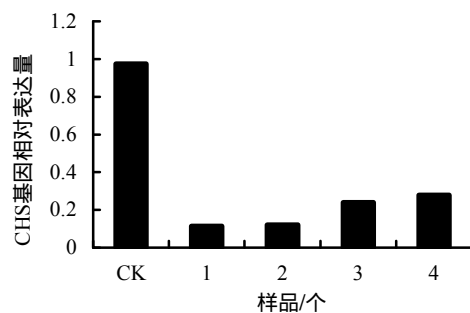


图 6 CHS 基因的相对表达量

Fig. 6 The relative expression of tobacco CHS gene

3 讨论

CHS 作为类黄酮类物质代谢途径的关键酶,它的活性直接影响下游代谢,最终对黄酮类物质的产量产生重大影响^[14],可以推知,对 CHS 基因进行调控可以用于类黄酮物质的代谢调控,为了证实这一推论并进一步研究 CHS 基因在烟草香气调控方面的作用,利用 Gateway 技术成功构建了烟草中 CHS 基因的 RNAi 干扰载体并获得转 CHS 基因烟草。干扰片段的大小、位置的选择对 RNAi 的效率及效果有重要影响^[15],一般情况下,目的基因非编码区或编码区的 90~1800 bp 的序列用做干扰片段,本研究选择了 293 bp 的特异性 CHS 基因片段作为干扰片段,这不仅有利于提高 CHS 基因干扰载体的构建效率,而且保证了干扰载体导入靶细胞后 RNA 干扰的有效进行,另外,也有利于提高外源基因在转基因植株后代中的遗传稳定性。采用的 Gateway 技术只需 BP 反应和 LR 反应两个反应,一旦成功将目的基因重组到入门载体上,就可以快捷、高效地通过 LR 反应将目的序列重组到表达载体上,此过程不需要传统方法中的酶切过程和连接反应。可使 RNAi 技术更加简便、有效的应用于基因功能验证。此外,表达载体 pH7GWIWG2(I)上的致死基因 ccdB 筛选机制的存在,保证了 ccdB 基因被完全替代的载体转化菌才能生存,大大提高了 RNAi 干扰载体构建的准确性。

实时荧光定量结果显示,与对照(CK)组相比,转 RNAi 表达载体烟草叶片中 CHS 基因表达量明显低于对照组,说明 CHS 基因的沉默效果较好。各 T₀ 代间 CHS 基因的表达量存在着差异,这可能是转基因位置效应或基因组环境差异造成的^[16]。通过对 CHS 基因表达的人为调控,总体上影响烟叶类黄酮化合物含量的变化,在一定程度上将揭示烟叶主要致香物质的合成代谢机制,对 CHS 基因在此方面的功能验证工作正在进一步分析研究。

4 结论

利用 GATEWAY 技术成功构建了具有反向重复序列的 CHS 基因的 RNAi 表达载体,并通过农杆

菌介导法转染烟草‘大白筋 599’,RT-PCR 鉴定,最终获得 24 株转基因烟草植株,阳性率为 80%。

参考文献

- [1] 史宏志,刘国顺. 烟草香味学[M]. 北京:中国农业出版社,1998:45-50.
- [2] 周昆,周清明,胡晓兰. 烤烟香气物质研究进展[J]. 中国烟草科学,2008,29(2):58-61.
- [3] 何承刚,曾旭波. 烤烟香气物质的影响因素及其代谢研究进展[J]. 中国烟草科学,2005,26(2):40-43.
- [4] Holton T A, Cornish E C. Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis[J]. Plant Cell, 1995, 7: 1071-1083.
- [5] Austin M B, Noel J P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases[J]. Natural Product Reports, 2003, 20(1): 79-110.
- [6] Reimold U, Kröger M, Kreuzaler F, et al. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme[J]. EMBO J, 1983, 2: 1801-1805.
- [7] Jenkins G I, Long J C, Wade H K, et al. UV and blue light Arabidopsis[J]. New Phytologist. 2001, 151: 121-131.
- [8] Hemleben V, Angela Dressel, Bernhard Epping, et al. Characterization and structural features of a chalcone synthase mutation in a white-flowering line of *Matthiola incana* R.Br.(Brassicaceae)[J]. Plant Mol Biol, 2004, 55: 455.
- [9] 廖靖军,安成才,吴思,等. 查尔酮合酶基因在植物防御反应中的调控作用[J]. 北京大学学报:自然科学版, 2000, 36(4): 566-575.
- [10] 夏玉凤,耿晓娜,王万双,等. 转查尔酮合酶基因对烟草花色及花器官的影响[J]. 生物技术通报, 2010, 1(6): 93-98.
- [11] Chen J C, Jiang C Z, Gookin T E, et al. Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence[J]. Plant Mol Biol, 2004, 55: 521-530.
- [12] Hartley J L, Temple G F, Brasch M A. DNA cloning using in vitro site-specific combination [J]. Genome Research, 2000, 10: 1788-1795.
- [13] Earley K W, Haag J R, Pontes O, et al. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics[J]. Plant, 2006, 45: 616-629.
- [14] 李成磊,张晓伟,吴琦,等. 甜荞查尔酮合酶基因 Chs 的克隆及序列分析[J]. 广西植物, 2011, 31(3): 383-387.
- [15] 曾晓珊,戴良英,刘雄伦,等. dsRNA 介导植物基因沉默及其应用[J]. 生命科学, 2007, 19(2): 132-138.
- [16] 金危危,覃瑞,宋运淳. 植物转基因位置依赖性沉默与位置效应[J]. 生物技术通报, 2011(3): 9-13.