

水稻 *OsGLI-2* 基因反义表达载体的构建

黄丹莹^{1,2}, 叶能辉², 庄楚雄² (1. 揭阳职业技术学院, 广东揭阳 522000; 2. 华南农业大学生命科学学院, 广东广州 510642)

摘要 应用聚合酶链式反应技术(PCR)扩增水稻 *OsGLI-2* 基因反义片段及基因自身的启动子,并分别克隆到 pUC19 克隆载体上,得到含有 *OsGLI-2* 启动子 + *OsGLI-2* 反义片段的中间载体。对重组子进行 PCR 检测和酶切分析并测序,结果表明,长度分别为 417 和 2 199 bp。将 *OsGLI-2* 启动子 + *OsGLI-2* 反义片段克隆到植物表达载体 pCambia1380 多克隆位点,构建了该基因的植物反义表达载体 pCamGLI-2。

关键词 水稻; *GLI-2*; 启动子; 反义表达载体

中图分类号 Q782 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)36-12818-03

Construction of Plant Antisense Expression Vector for *OsGLI-2* Gene in Rice

HUANG Dan-ying^{1,2}, YE Neng-hui², ZHUANG Chu-xiong² (1. Jieyang Vocational & Technical College, Jieyang, Guangdong 522000; 2. College of Life Science, South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract *OsGLI-2* antisense fragment and its promoter were amplified by PCR technique and cloned into the same pUC19 clone vector. The recombinant clones were detected by both PCR technique and restriction enzymes. The *OsGLI-2* antisense fragment and promoter were sequenced. Results showed that the lengths of the both DNA fragments were 417 bp and 2199 bp, respectively. The *OsGLI-2* promoter + *OsGLI-2* antisense fragment from intermediate vector pUC19 was cut off and cloned into the multiple cloning sites of the plant expression vector pCambia1380, which can be used as antisense expression vector pCamGLI-2 for down-regulation of *OsGLI-2* gene.

Key words *Oryza sativa* L; *GLI-2*; Promoter; Antisense expression vector

角质层是覆盖在陆生植物暴露于地面部分的一种疏水的屏障,主要作用是防止水份的丢失,避免紫外线辐射,降低尘埃、花粉和污染物的沉积^[1]。角质层主要结构是蜡质, *GLI* 是有关植物蜡质生物合成的基因,研究表明,在玉米、拟南芥中该基因突变能引起角质层蜡质组成的相应改变^[2]; *GLI* 在水稻基因组中存在 11 个基因位点,命名为 *OsGLI-1-OsGLI-11*,已克隆了 3 个 *OsGLI* 基因^[3],但对于 *OsGLI* 基因家族在水稻中的生物学功能尚有很多不清楚。

反义 RNA 技术是一种调控基因表达的有效技术,已在植物基因工程研究中得到了广泛应用。通过互补的反义 RNA 附加到靶 RNA 链阻断分子的功能,从复制、转录和翻译水平上控制基因的表达和参与基因表达的调控,削弱相应内源目的基因的表达,即产生所谓“下降性调节”^[4]。笔者通过构建反义 RNA 载体,可用于之后的农杆菌介导转化水稻,观测 *OsGLI-2* 基因由于部分表达受到抑制而产生的表型变化,推测研究 *OsGLI-2* 基因的功能,在抗逆角度上对进一步研究和改善水稻的生物学性状具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。 粳稻品种中花 11(ZH11),在华南农业大学网室内栽培。取水稻叶片为材料经液氮速冻后,于 -70 °C 冰箱保存。

1.1.2 载体与菌株。 pUC19 质粒克隆载体、转化载体 pCAMBIA1380、大肠杆菌菌株 *E. Coli*. DH5 α ,均由华南农业大学遗传工程实验室收藏。

1.1.3 主要试剂与酶。 Amp、Kan、X-gal、IPTG、CTAB、SIG-MA 公司; DEPC 及 MOPS, AMRESCO 公司; 低熔点琼脂糖, BIO-RAD 公司; TRIzolTM, Invitrogen 公司; *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶及连接酶, Takara 公司; 其余试剂均为国产分析纯产品。

1.1.4 培养基。 细菌培养基 LB、SOC。

1.1.5 主要设备。 普通电泳系统(Gibco BRL)、PCR 扩增仪 9600/9700(Pekin Elmer)、紫外分析仪(Beckman)、电激转化仪(BIO-RAD)、低温高速离心机(Eppendorf)、低温冷冻离心机(Beckman)、凝胶成像系统(BIO-RAD)。

1.1.6 PCR 引物合成和测序。 由上海英俊公司完成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和 DNA 连接片段获得。 在 DNASTar 软件分析 cDNA 序列的开放阅读框(ORF),在 DNASTar 和 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nih.gov>)进行同源性分析。根据 GenBank 中 *OsGLI-2* 基因序列,利用 Primer 5.0 软件分别设计克隆 *OsGLI-2* 基因自身启动子引物 FP2 和 RP2(表 1),预计目的片段 2119 bp; *OsGLI-2* 基因反向片段引物 FP1 和 RP1,预计目的片段 416 bp。

表 1 PCR 扩增引物

名称	序列	含酶切位点
FP1	AAAAGGTACCAACAGCCTGGAAGACCCTAG	<i>Kpn</i> I
RP1	AAAAGGATCCACGCTGATAGGGGCAACGTTG	<i>Bam</i> H I
FP2	AAAAGAATTCGCTGACTACCAACCAGTTGC	<i>Eco</i> R I
RP2	AAAAGGTACCTGCTTGCT TAGTTTGCTCTC	<i>Kpn</i> I

采用 TRIZOL 法^[5]提取水稻总 RNA,反转录获得水稻 cDNA,作为 *OsGLI-2* 基因片段的扩增模板。扩增体系按照 Takara 试剂盒要求进行。

OsGLI-2 基因反向片段 PCR 扩增反应,参数为 94 °C 变性 2 min 后,94 °C 30 s,57 °C 30 s,68 °C 1 min,5 个循环,再

基金项目 广东省揭阳市揭阳职业技术学院科研基金项目 (JYCKY0904)。

作者简介 黄丹莹(1979 -),女,广东揭阳人,讲师,硕士,从事植物生化与分子生物学研究

收稿日期 2014-11-13

进行 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 68 °C 2 min, 28 个循环, 最后 68 °C 延伸 10 min。

采用 CTAB 法^[6] 抽提水稻基因组 DNA, 作为启动子克隆扩增模板。启动子片断 PCR 扩增反应条件: 94 °C 变性 2 min 后, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 2 min, 反应 5 个循环, 再进行 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 68 °C 2 min, 反应 28 个循环, 最后 68 °C 延伸 10 min。

1.2.2 克隆载体的构建。 *OsGL1-2* 基因启动子 PCR 产物用凝胶试剂盒纯化回收, 随后用 *EcoRI/KpnI* 双酶切之后, 在连接酶作用下连接到克隆载体 pUC19 质粒上。热激法制备感受态细胞^[5]。将连接产物电激转化 *E. Coli*. DH5 α 感受态细胞, 电激后的菌体培养于 1 ml SOC 中 (200 r/min, 37 °C), 1 h 后取适量菌液均匀涂布在 LB 固体培养基 (含 Amp100 μ g/ μ l) 上进行蓝白斑筛选^[6]。挑取白色单菌落, 于 LB 液体培养基过夜培养, 碱裂解法抽提质粒 DNA 双酶切检测, 用 M13 系列通用引物对正确重组子进行测序。用引物 FP1 和 RP1 扩增的 *OsGL1-2* 基因反向片段, 用 *KpnI/BamHI* 双酶切后组装到带有启动子的 pUC19 克隆载体的下游, 检测方法同“1.2.1”。

1.2.3 *OsGL1-2* 反义表达载体组装及克隆。 用 *EcoR I/BamH I* 将启动子 + 反义片段从 pUC19 载体上切下, 与 pCAMBIA 1380 多克隆位点相连, 组装成反义表达载体 pCamGL1-2 (图 1)。电击转化 *E. Coli*. DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆用 *EcoR I/BamH I* 双酶切鉴定, 得到重组子。

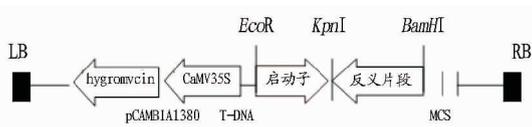


图 1 *OsGL1-2* 反义表达载体 pCamGL1-2 构建

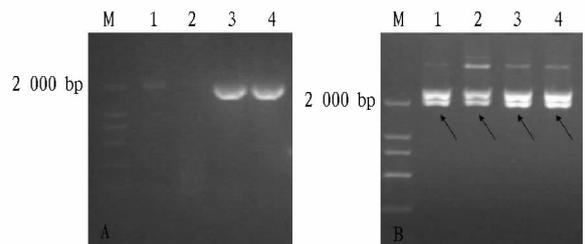
2 结果与分析

2.1 *OsGL1-2* 反义片段和启动子的克隆

2.1.1 *OsGL1-2* 启动子 PCR 扩增和克隆检测。 PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 得到约 2.1 kb、特异性强的单一扩增带, 结果 (图 2A) 与预期一致。扩增产物回收后与载体连接转化到 *E. Coli*. DH5 α 中, 筛选出 4 个阳性克隆, 经 *EcoRI* 和 *KpnI* 双酶切检测, 得到 1 条约 2.1 kb 的插入片段, 说明该目的基因已插入到载体上, 其片段大小与预期大小一致 (图 2B)。

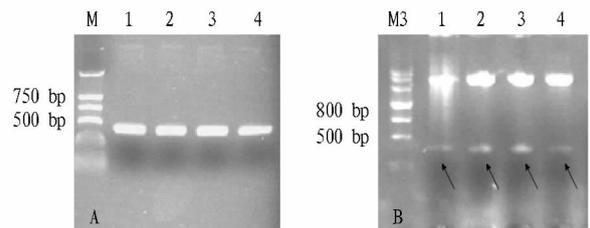
2.1.2 *OsGL1-2* 反义片段 PCR 扩增和克隆检测。 PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 得到约 0.4 kb、特异性强的单一扩增带, 结果 (图 3A) 与预期大小一致。扩增产物回收后与载体连接转化到 *E. Coli*. DH5 α 中, 筛选出 4 个阳性克隆, 经 *KpnI* 和 *BamHI* 双酶切检测, 得到 1 条约 0.4 kb 的插入片段, 说明该目的基因已插入到载体上, 其片段大小与预期大小一致 (图 3B)。

2.2 *OsGL1-2* 反义表达载体的构建 用 *EcoR I/BamH I* 将 *OsGL1-2* 启动子 + 反义片段从中间载体上切下, 与 CAMBIA



注: A. 启动子 PCR 扩增, B. 启动子克隆酶切鉴定; M 为分子量标记; A 图 3、4 为启动子扩增条带; 图 B1、2、3、4 为阳性克隆。

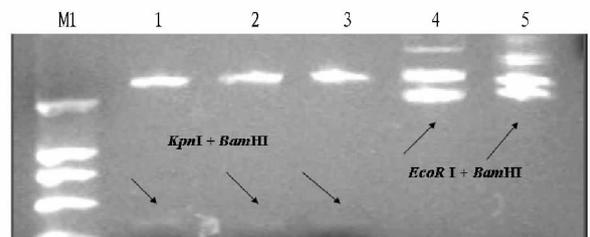
图 2 *OsGL1* 启动子克隆



注: A. 反义片段序列 PCR 扩增; B. 反义片段克隆酶切鉴定; M、M3 为分子量标记; A 图 1、2、3、4 为启动子扩增条带, B 图 1、2、3、4 为阳性克隆。

图 3 *OsGL1-2* 反义片段克隆

1380 多克隆位点相连, 组装成反义表达载体 pCamGL1-2。获得在 *E. coli* 中稳定复制的重组子, 用 *Kpn I/BamH I* 和 *EcoR I/BamH I* 双酶切鉴定 (图 4), 获得约 0.4 kb 和 2.5 kb 的目的片段, 说明插入正确。



注: M1. 分子量标记; 1、2、3、4、5 为阳性克隆。

图 4 表达载体 pCamGL1-2 的酶切检测

2.3 *OsGL1-2* 启动子和 *OsGL1-2* 反义片段的 DNA 序列分析 *OsGL1-2* 启动子和 *OsGL1-2* 反义片段的 DNA 序列经过 DNA 全自动测序仪分析, 测定得到 *OsGL1-2* 反义片段为 421 bp, 与已发表的基因序列分别有 4 个核苷酸的差异, 同源性均为 99% (图 5); 启动子片段序列全长 2 119 bp, 测序表明扩增的序列无变异。

3 讨论

3.1 克隆载体和表达载体的选择 pUC19 是一种常用的高拷贝克隆载体, 含有 *LacZ* 基因, 重组 pUC19 的克隆转化细胞在含有 IPTG 和 X-Gal 的培养基上培养时, 可通过蓝/白斑筛选, 判断载体中是否有 DNA 片段的插入, 适于 DNA 片段的克隆、测序、对外源基因进行表达等。该研究首次采用 pUC19 为骨架构建中间载体。选用的植物表达载体 pCAMBIA1380 质粒是二元载体, 含有潮霉素抗性基因和细菌卡那霉素抗性基因, 能分别在细菌和植物中复制, 适合在植物中表达。

```

a c g c t g a t a g g g g c a a c g t t g g t g g g g a g c c c c g g c g g t g g c g c g g c a g c a g c t g c t g c t c c c a a g c c t g a a g c a a g c
g t g g g a c c c a c g c g g g t g g g c c a t c g c a c t g c t g c t g c a t g t g t t g g t c g c t g a g c c g c t c t t t a c t t g g g c c c a c c g g g c
c c t g c a c c g g g c c c c a c t c t t c a g c c g t a c c a c g c c g c t c a c c a c c a c g c c t c g c a c c a c c c t t g a c a g c t g g a t
t t g g a c g c c a c t g g a g a g c c t g c t g c t g a c g g t g g t g a t a g g g t c c c a c t c g c a g g g g c c t t t c t g a t g g g g t a g g g
t c c g t g g g c c t g g t c t a t g g a c a c g t c c t t t t g t t g a c t t c t t g a g g t c c a t g g g c t a c a g t a a c g t g g a g g t g a t a t c c c c t a
g g g t c t t c c a g g c t g t t c

```

图5 *OsGL1* 反义片段测序结果

3.2 合适的启动子选择 在植物反义表达载体中广泛应用组成型启动子,如 CaMV35S 启动子、Ubiquitin 启动子等。组成型启动子控制下外源基因在植物所有部位和所有发育阶段都会表达,但外源基因在受体植物内持续、高效表达,不但造成浪费,往往还会导致基因表达的时空特异性改变。目前,特异表达启动子的研究和应用越来越受到人们的重视,自身的启动子可以与基因表达保持同步,能在植物中特异性地表达外源基因,提高反义抑制的效率^[7]。该研究将克隆自水稻 *OsGL1-2* 基因以相反的方向插入到其特异启动子下游,目的是使细胞合成特异性的与其目标基因的转录物互补的反义 RNA,使基因表达受到抑制。

3.3 反义片段长度的选择 反义 RNA 链的长度对抑制基因的效果有很大影响。在植物中,覆盖整个 cDNA 的反义 RNA 能够有效地抑制基因表达。然而,如果受抑制的基因是与发育有关的重要基因,完全的抑制会致死。反义 RNA 只与靶 mRNA 的一小部分 (< 100 碱基) 结合即可达到调节作用,说明反义 RNA 在发挥作用时并不要求序列的完全互

补。反义片段的长度对抑制基因的效果没有固定的规则,覆盖全长或部分正义基因都能够达到调节作用。该研究只采用约 0.4 kb 的反义序列,抑制基因表达的效果有待进一步做遗传转化试验。

参考文献

- [1] POST-BEITENMILLER D. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*,1996,47:405-430.
- [2] BIANCHI A, BIANCHI G, AVATO P, et al. Biosynthetic pathways of epicuticular wax of maize as assessed by mutation, light, plant age and inhibitor studies [J]. *Maydica*, 1985, 30: 179-198
- [3] ISLAM M A, DU H, NING J, et al. Characterization of Glossy 1 - homologue genes in rice involved in leaf wax accumulation and drought resistance [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 70: 443-456
- [4] 张学文, 罗泽民. 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]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2001, 24(1): 79-81.
- [5] MASON H S, LAM D M K, AMTZEN C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 11745-11749.
- [6] J·萨姆布鲁克, D·W·拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 等, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 吴晓梅, 朴学成, 陈明训, 等. 白菜型油菜 B rDAD1 基因的克隆及其植物反义载体的构建 [J]. *河南农业科学*, 2010(5): 35-39.
- [8] a new type of modulation fluorometer [J]. *Photosynthesis Research*, 1986, 10(1): 51-62.
- [9] 冯建灿, 胡秀丽, 毛训甲. 叶绿素荧光动力学在研究植物逆境生理中的应用 [J]. *经济林研究*, 2002, 20(4): 14-18.
- [10] 邹琦. 植物生理生化实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [11] 林植芳. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系 [J]. *植物学报*, 1984, 26(6): 605-619.
- [12] 许大全, 张玉忠, 张荣铤. 植物光合作用的光抑制 [J]. *植物生理学通讯*, 1992, 28(4): 237-243.
- [13] 马双艳, 姜远茂, 彭福田, 等. 干旱胁迫对苹果叶片中甜菜碱和丙二醛及脯氨酸含量的影响 [J]. *落叶果树*, 2003(5): 1-4.
- [14] METHA S K, GAUR J P. Heavy metal induced praline accumulation and its role in a ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris* [J]. *New Phytol*, 1999, 143: 253-259.
- [15] 张义贤, 张丽萍. 重金属对大麦幼苗膜脂过氧化及脯氨酸和可溶性糖含量的影响 [J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(4): 857-860.
- [16] 卢从明, 张其德, 匡廷云. 水分胁迫对小麦叶绿体激发能分配和光系统 II 原初光能转换效率的影响 [J]. *生物物理学报*, 1995, 11(1): 82-86.
- [17] 张秋英, 李发东, 刘孟雨, 等. 不同水分条件下小麦旗叶叶绿素 a 荧光参数与籽粒灌浆速率 [J]. *华北农学报*, 2003, 18(1): 26-28.
- [18] 党承林. 植物群落的冗余结构——对生态系统稳定性的一种解释 [J]. *生态学报*, 1999, 18(6): 665-671.
- [19] 李德全, 郭清福, 张以勤, 等. 冬小麦抗旱生理特性的研究 [J]. *作物学报*, 1993, 19(2): 125-131.
- [20] 宋志荣. 干旱胁迫对辣椒生理机制的影响 [J]. *西南农业学报*, 2003, 16(2): 53-55.
- [21] 蒋明义, 杨文英, 徐江, 等. 渗透胁迫下水稻幼苗中叶绿素降解的活性氧损伤作用 [J]. *植物学报*, 1994, 36(4): 289-295.

(上接第 12806 页)

解,还可能是 Pro 自身氧化的因素^[18]。由此可知,还不能把单纯的 Pro 含量作为植物抗旱性的评价指标。

理化指标与光合特性的相关分析表明,单播方式下叶片 Pro 含量与 PSII 反应中心内原初光能转化效率之间的显著相关关系存在于抗旱性弱的 B 品种,而不存在于抗旱性强的 A 品种。在混播方式下,由于受水分竞争的压力,这种相关关系被打破。可以看出单一种植时耐旱性越强的品种对于旱逆境的反应越不敏感,对干旱的防御机制也越健全。另外,MDA 含量与 PSII 反应中心内原初光能转化效率之间无论品种和种植方式的改变其相关均不显著,与前人研究^[2]存在差异。这可能也因此说明植物抵御干旱是一个非常复杂的机制,是植物体内各物质相互共同作用的结果。

参考文献

- [1] 王忠. 植物生理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 422-438.
- [2] 梁新华, 徐兆楨, 许兴, 等. 小麦抗旱生理研究现状与思考 [J]. *甘肃农业科技*, 2001(2): 24-27.
- [3] DONALD C M. Competitive plants, communal plants and yield in wheat crops [C] // EVANSI T PEACOCK WJ. *Wheat science-today and tomorrow*. Cambridge University Press, 1981: 223-247.
- [4] DONALD C M. The convergent evolution of annual seed crops in agriculture [J]. *Advances in Agronomy*, 1983, 36: 97-143.
- [5] SCHREIBER U, SCHLIWA U, BILGRER W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with