

文章编号: 1001-1498(2009)02-0243-06

复叶槭 *FtsZ* 基因的克隆、RNA 干扰载体的构建及其在烟草中瞬时表达*

车代弟, 王海峰, 王金刚, 龚束芳, 樊金萍

(东北农业大学园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 利用简并引物 RT-PCR, 克隆复叶槭 *FtsZ* 基因的 cDNA 序列, 利用马铃薯 X 组病毒载体 pGR107, 构建 RNA 干扰重组病毒载体 pVX-*AnFtsZi*, 并转化农杆菌 GV3101 (含辅助质粒 pJC Sa-rep) 侵染烟草。40 d 后, 检测烟草内源 *FtsZ* 基因的表达量。研究表明: 从复叶槭中克隆到的 569 bp *FtsZ* 基因 cDNA 片段, 具有 *FtsZ* 蛋白的核心功能序列 GGGTGSG, 构建的 hpRNA 型 RNA 干扰载体抑制了 *FtsZ* 基因的表达。为培育槭树类彩叶新品种奠定分子理论基础。

关键词: 复叶槭; *FtsZ*; RNA 干扰; 重组病毒载体

中图分类号: S792.35 文献标识码: A

Cloning of *FtsZ* Gene Fragments from *Acer negundo*, Constructing of RNA i Vectors and Its Transient Expression in Tobacco

CHE Dai-di, WANG Hai-feng, WANG Jin-gang, GONG Shu-fang, FAN Jin-ping

(Horticulture College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: This experiment was performed by applying degenerate primer RT-PCR, and *FtsZ* gene cDNA sequence was cloned from *Acer negundo* L. pGR107, X-group virus vector of potato was used and then RNA interference recombinant virus vector pVX-*AnFtsZi* was constructed. It was transformed to GV3101 (including auxiliary plasmid pJC Sa-rep) and infected *Nicotiana tabacum* L. The expression of endogenous *FtsZ* gene was examined 40 days later. Results indicated that 569 bp of *FtsZ* gene cDNA fragment was acquired from *Acer negundo* L. Sequencing showed that it contained *FtsZ* protein family function sequence GGGTGSG. The *FtsZ* gene expression was suppressed by the constructed RNA interference vector of hpRNA type. This experiment laid molecular theory foundation for new colourful leaves breeding of *Acer negundo* L.

Key words: *Acer negundo* L.; *FtsZ*; RNA i; recombinant virus vector

复叶槭 (*Acer negundo* L.) 属槭树科 (Aceraceae)、槭树属 (*Acer* L.) 落叶乔木, 喜光、耐旱、耐寒、耐烟尘, 是优良的园林绿化树种^[1]。在槭树育种方面, 国外已育出多种彩叶槭树品种, 而我国槭树观赏

资源的开发利用相对滞后^[2]。所以创新槭树类种质资源, 在园林绿化中有非常广阔的应用前景。彩叶叶性状是由于一些细胞失去叶绿体或者叶绿体机能受阻, 最终导致非绿色组织分布于绿色组织中而产

收稿日期: 2008-03-10; 修回日期: 2008-10-21

基金项目: 东北农业大学创新项目发展计划资助 (CXZ004)

作者简介: 车代弟 (1964—), 女, 博士、教授、博士生导师, 东北农业大学园艺学院副教授, 主要从事园林植物遗传育种与生物技术研究; E-mail: daidiche@yahoo.com.cn, 电话: 0451-55190563。

*感谢英国 Sainsbury 实验室 Baulcombe 教授惠赠的马铃薯 X 病毒植物表达载体 PGR107、农杆菌菌株 GV3101 (含辅助质粒 pJC Sa-rep), 及对本研究的支持和鼓励!

生的^[3]。*FtsZ*蛋白就是与叶绿体分裂密切相关的一类高度保守的蛋白家族^[4-5],一旦其表达被抑制,则明显地影响叶绿体的分裂,甚至在细胞中只观察到一个巨大的不分裂的丝状叶绿体^[6]。有研究推测,随着质体分裂相关基因表达逐渐减弱,类胡萝卜素生物合成代谢途径中的 *Zds*基因表达逐渐增强,叶绿素含量降低而类胡萝卜素含量增高,叶绿体逐渐转变成花叶绿体,叶色由绿转黄^[7]。利用 T-DNA 插入拟南芥 *FtsZ-1*基因,证实突变体虽然叶绿体分裂受到影响,但是可以正常的生长和产生种子^[8]。可见 *FtsZ*蛋白是进行彩叶园林树木育种的理想研究对象。

RNA 干扰技术^[9]的出现,使有效调控叶绿体发育过程成为了可能。目前,已有研究表明高等植物的一些参与生长发育的基因被成功地利用 RNA 干扰技术进行了功能抑制^[10-12]。但利用此技术进行园林树木叶色变化方面的研究尚未见报道。

本研究利用简并引物 RT-PCR,克隆复叶槭 *FtsZ* 基因的 cDNA 序列,构建复叶槭 *FtsZ* 基因 RNA 干扰载体,并在烟草中进行验证。为今后遗传转化培育木本彩叶新品种奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

2007年1月采集生长在东北农业大学校园内的复叶槭雄株枝条,在人工气候箱中水培,温度 23 ~ 28,相对湿度 60%,光照强度约 5 000 lx,每天 12 h 光照,28 d 后即可展叶,取长度约为 3 cm 的叶片,

液氮速冻后置于 -70 °C 冰箱中储存备用。实验所用马铃薯 X 组病毒载体 pGR107、农杆菌菌株 GV3101 由英国 Sainsbury 实验室 Baulcombe 教授惠赠^[13]。

1.2 方法

1.2.1 目标基因的克隆及序列分析 取水培后的复叶槭叶片,参照王玉成 SDS 法^[14],提取总 RNA。以 *FtsZ-1* (5'-AA (T/C) AA (T/C) GCIGTAA (T/C) (A/C) GATG-3') 和 *FtsZ-2* (5'-AC (A/G) TCIGC (A/G) A A (A/G) TCAC (A/G) TT-3') 为引物进行 RT-PCR, RT 反应参照 TaKaRa *BcaBEST*TM RNA PCR Kit Ver1.1 试剂盒说明书进行。PCR 程序: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s; 55 °C 45 s; 72 °C 1 min (30 个循环); 72 °C 10 min; 4 °C pause。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收,连接,转化大肠杆菌。鉴定阳性克隆后,命名为 *AnFtsZ-M*,送上海生工测序。然后利用 DNAMAN 5.0 分析其编码蛋白质的结构特点。

1.2.2 RNA 干扰重组病毒载体的构建与鉴定 通过比对,选择 *AnFtsZ-M* 中与烟草 (*Nicotina tabacum* L.) 同源性较高的,位于 +216 ~ +498 之间的序列,PCR 扩增正义、反义基因片段;以质粒 pCAMB A-1301 为模板 PCR 扩增间隔基因。具体引物序列见表 1。三段基因经酶切后,依次连接到 T 载体上。测序正确后,经 *Sma* 和 *Sal* 双酶切,克隆到同样双酶切的病毒载体 PVX 中,构建重组病毒载体 PVX-*AnFtsZi*。其具体构建流程及 PVX-*AnFtsZi* 的 T-DNA 区结构如图 1 所示。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	扩增片段
<i>FtsZ</i> 正-S	5'-AGCCCGGGTGTTTA TAACAGCC-3'	(<i>Sma</i>) 283
<i>FtsZ</i> 正-A	5'-TAGGGTACCATCA GCTA GAA GGAAAG-3'	(<i>Kpn</i>)
<i>FtsZ</i> 反-S	5'-AGCGACTAGTCA GCTA GAA GGAAAG-3'	(<i>Spe</i>) 283
<i>FtsZ</i> 反-A	5'-CAGGTCGACTGTTTA TAACAGCC-3'	(<i>Sal</i>)
Gus-S	5'-CCGACTAGTATGGTGA TCTGAG-3'	(<i>Spe</i>) 232
Gus-A	5'-CGGGGTACCAGTCGTCGGTCTG-3'	(<i>Kpn</i>)

注:下划线部分为酶切位点。

1.2.3 重组病毒载体向 GV3101 农杆菌导入及接种烟草 冻融法将质粒 PVX-*AnFtsZi* 转化农杆菌 GV3101 感受态细胞。转化后的菌液涂布于含 50 mg · L⁻¹ Genta, 50 mg · L⁻¹ Rif, 5 mg · L⁻¹ Tet 和 50 mg · L⁻¹ Kan 抗生素的 LB 选择平板上。培养后,挑取菌落,利用引物 *FtsZ*正-S 和 *FtsZ*反-A 进行 PCR 鉴定,筛选阳性转化子。

真叶期时,将含有目标载体 PVX-*AnFtsZi* 的农杆菌在 LB 培养基 [含 50 mg · L⁻¹ Kan, 50 mg · L⁻¹ Rif, 5 mg · L⁻¹ Tet, 10 mmol · L⁻¹ 2-N 吗啉基乙磺酸 (MES) 和 20 μmol · L⁻¹ 乙酰丁香酮 (AS)] 过夜振荡培养,之后扩大培养。离心富集菌体,等体积重悬 (10 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol · L⁻¹ MES 和 100 μmol · L⁻¹ AS)。室温静置 2 ~ 3 h 后,用无菌的牙

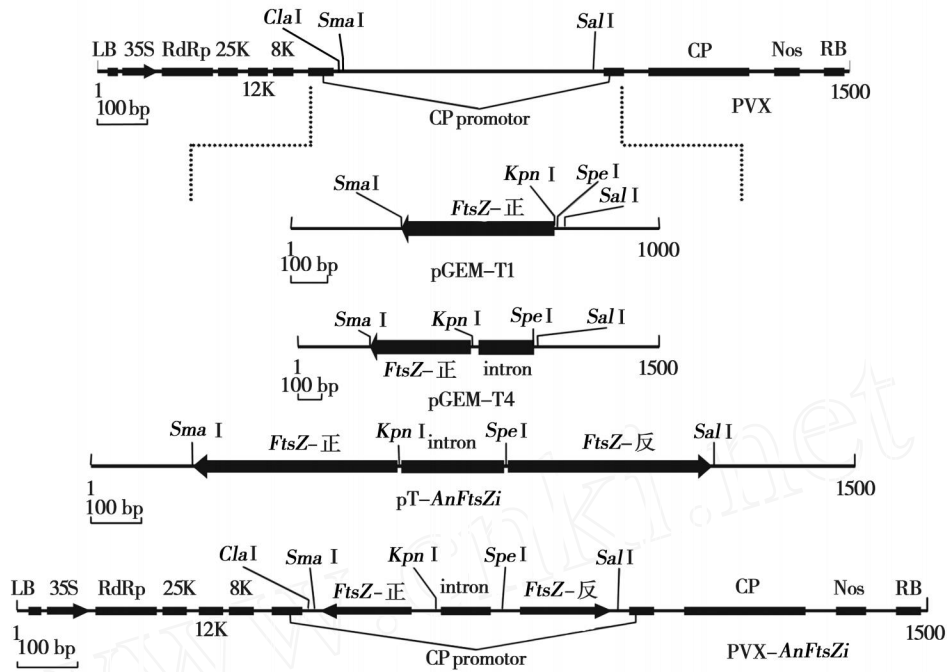


图 1 PVX-AnFtsZi 的构建流程

签沾取菌液轻轻刺伤叶片,同时以 PVX 空载体作为阴性对照。接种后的烟草在人工气候室中常规管理。

1.2.4 被感染烟草 *FtsZ* 基因表达量的检测 接种 40 d,选择低湿(约 35%)条件下培养的植株,调查被感染烟草叶片中 *FtsZ* 基因的转录水平。经过 30 个反应循环烟草的 *FtsZ* 和 GAPDH 的扩增产物,电泳后在凝胶成像系统拍照。

半定量 RT-PCR 中内参基因 GAPDH 引物的设计参照 Burton 等^[15]描述: GAPDH1 (5'-CAGGAACCCTGAA GATA TCCC-3'); GAPDH2 (5'-GCA GTTGGTACTCTGAA GGCC-3')。烟草内源 *FtsZ* 基因检测的引物: F₃ (5'-CAAACAAACA-GAGGGAGC-3'); F₄ (5'-CTTAGCAGAAT-CAAAA GGAG-3')。PCR 反应各管的循环数分别为 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33。

2 结果与分析

2.1 AnFtsZ-M 的克隆及序列分析

利用简并引物,自复叶槭中扩增出两条带(图 2),初步判定 500~600 bp 的为目的条带。测序后,发现此序列可以读通,长度为 569 bp,编码 189 个氨基酸。对其编码的氨基酸分析显示,该序列具有 *FtsZ* 蛋白家族的两个保守基序,即 *FTSZ* _ 1: VIGVGGGGSNAVNRM (PROSITE;

PS01134)和 *FTSZ* _ 2: FA TAGMGGGTG/TGAA PV / N / A (PROSITE; PS01135),其中 *FTSZ* _ 2 的序列中还包括真核生物 *FtsZ* 蛋白的典型基序:GGGTGSG (PROSITE; PS00277) (图 3)。利用 DNAMAN 5.0,将该序列与 GeneBank 登录的烟草、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 等进行比对发现:核苷酸序列的同源性为 81.72%,推测的氨基酸序列同源性为 96.90% (图 4)。将 *AnFtsZ-M* 的氨基酸序列进行 Blastp,证实本序列是 *FtsZ* 蛋白 *FtsZ* _ type1 结构域的一部分。

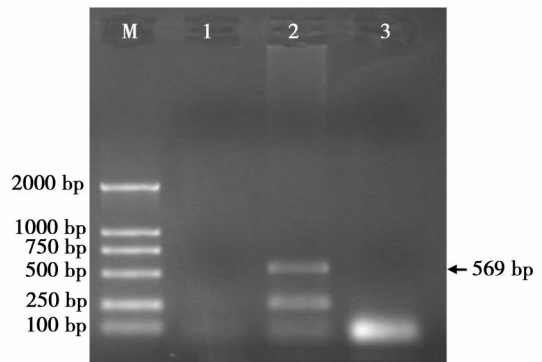


图 2 *AnFtsZ-M* 基因片段的 RT-PCR 扩增
M: DL2000 Maker; 1: 利用随机引物扩增; 2: 利用 oligo dT 扩增的 *AnFtsZ-M* 基因片段; 3: 阴性对照;

```

1      AACGCGGTGAACCGGATGATTGGAAGTGGTCTAAAGGGAGTTGATTTCTATGCCGTA AAC
1       N A V N R M I G S G L K G V D F Y A V N
61     ACAGATTCCCAAGCCCTTTTACAGTCTGCTGCGGAGAACCCACTTCAAATTTGGAGAGCTT
21     T D S Q A L L Q S A A E N P L Q I G E L
121    TGACTCGTGGACTAGGTACGGGTGGGAATCCACTTTTGGGAGAACAAGCTGCAGAGGAA
41     L T R G L G T G G N P L L G E Q A A E E
181    TCAAAAGAAGCCATTGCAGGGGCTCTTAAGGGTTCAGACCTTGTGTTTATAACAGCCGGT
61     S K E A I A G A L K G S D L V F I T A G
241    TGGGTGGAGGTACAGGGTCAGGTGCTGCACCAGTGGTTCACAGATAGCAAAAAGAAGCT
81      M G G G T G S G A A P V V A Q I A K E A
301    GGTTATTTGACTGTTGGCGTGGTTACCTATCCTTTTCAGCTTTGAAGGACGTA AACCGTCT
101    G Y L T V G V V T Y P F S F E G R K R S
361    TTGCAGGCATTGGAGGCTATTGAAAAGCTGCAAAAGAATGTGGATACTCTTATAGTGATT
121    L Q A L E A I E K L Q K N V D T L I V I
421    CCAAATGATCGTCTGCTTGATATTGCCGATGAGCAGACACCCCTACAGGATGCTTTTCCTT
141    P N D R L L D I A D E Q T P L Q D A F L
481    CTAGCTGATGATGTTCTACGCCAAGGGGTGCAAGGAATTCAGACATTATCACAATACCG
161    L A D D V L R Q G V Q G I S D I I T I P
541    GGACTGGTGAATGTCGATTTCCCGACGT
181    G L V N V D F A D

```

图 3 *AnFtsZ-M* 核苷酸序列和递推的氨基酸序列

注:下划线表示 *FtsZ* 蛋白的两个保守基序,黑体表示 *FtsZ* 核心功能位点—GTP结合位点

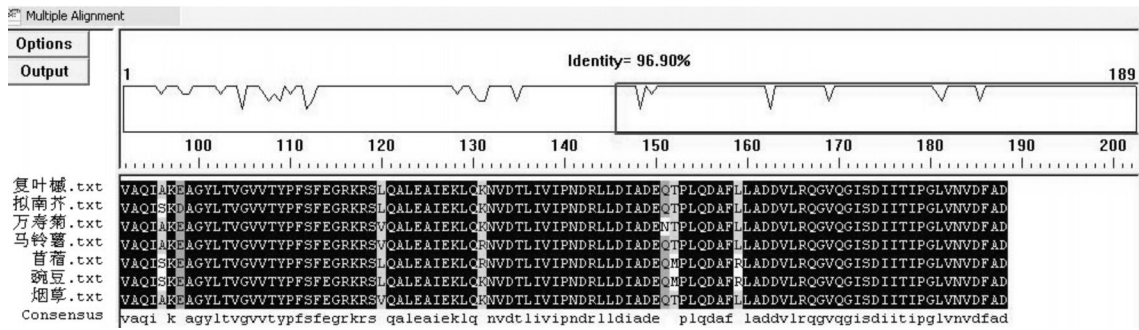


图 4 *AnFtsZ-M* 氨基酸序列同 GeneBank 登记的 *FtsZ* 氨基酸序列比对

2.2 重组病毒载体 PVX-*AnFtsZi* 的构建及酶切鉴定

根据表 1 的引物序列,以 *AnFtsZ-M* 为模板,扩增出带有相应酶切位点、片段长度同为 283 bp 的正、反义基因及 232 bp 的间隔基因。提取 PVX-*AnFtsZi* 阳性菌的质粒,分别用 *Sma* 和 *Sal* 双酶切,切成了两个片段,一个是载体片段,大小为 10 kb,一个是正、反义及间隔区基因的融合片段,大小为 800 bp 左右(图 8)。可见植物表达载体已经将融合基因整合进去,载体构建成功。载体转化农杆菌后,经 PCR 鉴定获得 PVX-*AnFtsZi* 阳性转化子。

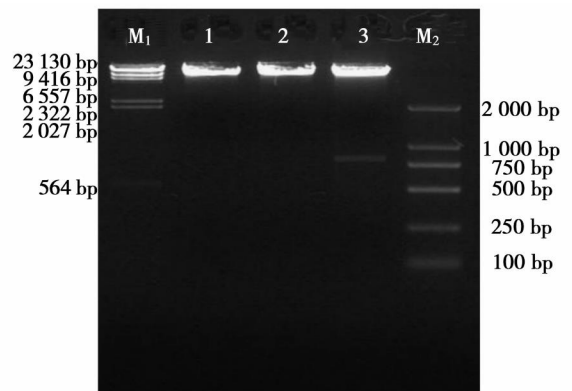


图 5 重组病毒载体 PVX-*AnFtsZi* 的酶切鉴定

M1: DNA / HindIII Marker; 1: *Sma* 单酶切; 2: *Sal* 单酶切; 3: *Sma* / *Sal* 双酶切; M2: DL2000 Marker

2.3 被感染烟草 *FtsZ* 基因表达水平分析

如图 6 所示:经过 20 个循环扩增(第三泳道), PCR 反应未达到平台期。在内参基因 *GAPDH* 扩增产物比较一致(图 6A; C),即样品总模板浓度一致

的条件下,对照植株中检测到明显的目标条带(图 6B),而感染植株目标条带微弱(图 6D),转录水平受到了抑制。半定量 RT-PCR 结果表明, *PVX-AnFtsZi* 感染烟草的 *FtsZ* mRNA 表达量下降。

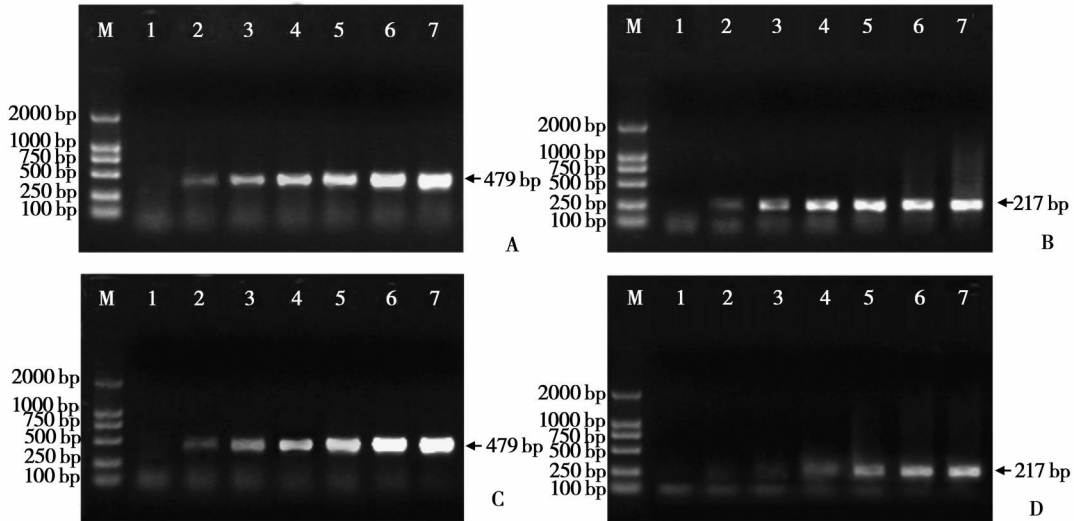


图 6 半定量 PCR 检测被侵染烟草 *FtsZ* 基因表达的差异

2.4 被感染烟草 *FtsZ* 基因叶绿体形态分析

如图 7 所示:对照烟草叶片表皮细胞叶绿体数目较多,经统计每个细胞中平均含有 21.2 个叶绿体,而且叶绿体形态大小均匀。而转化后烟草叶片表皮细胞

胞中叶绿体数目平均为 8.65 个,明显低于对照烟草,并且在 60 倍镜下观察,转化后的烟草叶片中叶绿体的形态明显大于对照植株,说明 *PVX-AnFtsZi* 感染烟草的 *FtsZ* 对烟草叶绿体的发育有明显的抑制。

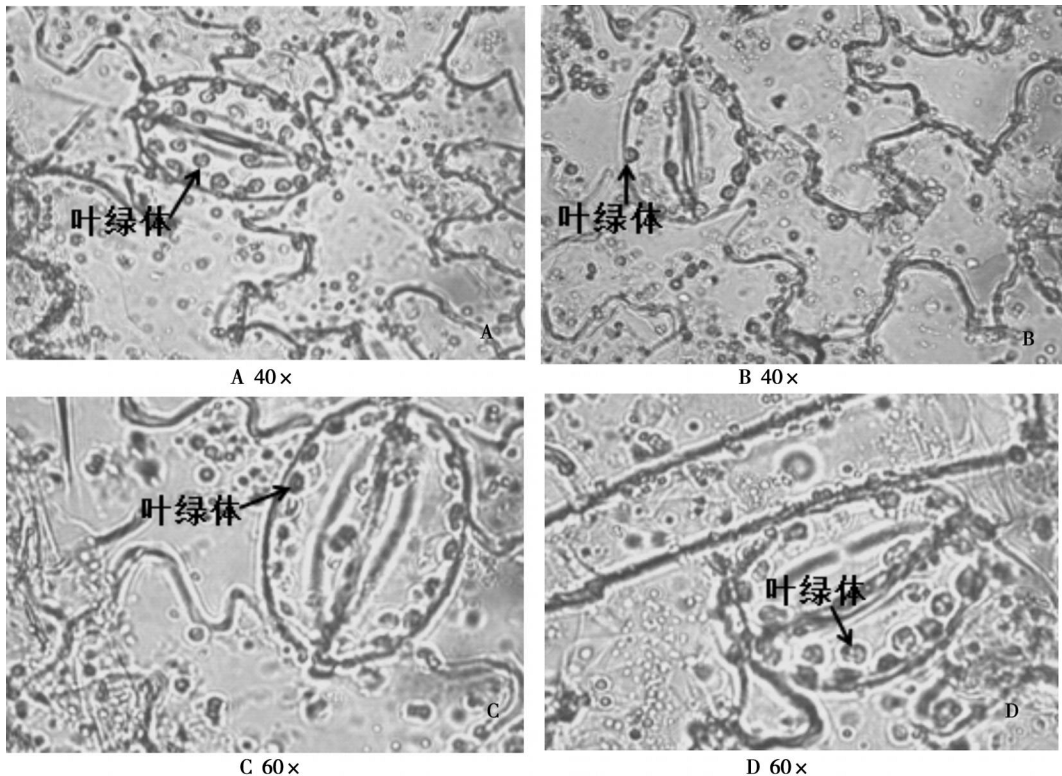


图 7 光学显微镜对烟草叶片表皮细胞叶绿体形态观察(A、C为对照,B、D为转化后)

3 讨论

质体分裂基因 *FtsZ* 对叶绿体的分裂起关键作用。对其调控可以影响叶绿体的发育^[6], 改变叶片中叶绿体的分布形态, 但又不严重影响植株正常生长发育^[8], 所以本研究以质体分裂基因 *FtsZ* 为研究对象, 探索园林植物叶色育种的理想目标基因。

本研究构建 RNA 干扰载体属于 hpRNA 型结构。该载体由 CAMV35S 组成型强启动子诱导, 包括正义臂和反义臂, 两臂之间有插入一段间隔基因(内含子)。转录后, 两段序列会自身退火, 形成 dsRNA 结构, 进而引发 RNA 干扰效应。而插入中间的内含子会随着转录后的修饰而被剪切掉, 它的存在可以使反向重复序列的单链 RNA 在空间上更加接近, 更易配对形成双链, 增强转基因沉默效率^[16]。但是, 内含子的长短和内含子的插入方向是否影响干扰片段的转录进而影响干扰效果还不是很清楚。

重组病毒侵染烟草后, 会快速复制产生大量的 dsRNA, 而 dsRNA 将被切割成若干 21~23nt 的 siRNA_s。理论上只要复叶槭的这段基因可以产生一个, 与烟草靶基因完全匹配的 siRNA_s, 就可以在烟草中产生沉默的现象^[9]。本研究的结果与其一致。利用这种反向遗传学的方法可以快速的验证从木本植物中得到的未知基因, 避免了繁琐的遗传转化过程, 而且转基因植株表型的变化也会更加显著。但是也有报道指出, siRNA 除正义链上 3 端的两个碱基在序列识别上不起作用外, 其它碱基中任何一个改变都可能引起 RNAi 效应失效^[17]。如何保证序列同源但是亲缘关系较远(如复叶槭和烟草)的基因, 在剪切过程中形成匹配 siRNA, 引起 RNAi 效应, 在木本类植物中还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈有民. 园林树木学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1990: 537 - 542
- [2] 于晓南, 张启翔. 彩叶植物多彩形成的研究进展 [J]. 园艺学报, 1998, 27: 533 - 538
- [3] 陈金水. 园林植物遗传育种学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2000: 34 - 40
- [4] Hirota Y. Thermo sensitive mutant of *E. coli* affected in the process of DNA synthesis and cell division [J]. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 1968, 33: 667 - 670
- [5] Osteryoung KW, Vierling E. Conserved cell and organelle division [J]. Nature, 1995, 376: 473 - 474
- [6] Strepp R, Scholz S, Kruse S, *et al*. Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein *FtsZ*, an ancestral tubulin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 4368 - 4373
- [7] 董淑洁, 王东, 孔冬冬, 等. 烟草 *FtsZ* 基因表达对质体发生的影响 [J]. 自然科学进展, 2002, 3(12): 303 - 305
- [8] David W Y, Deena K K, Bradley J S, *et al*. Effects of Mutations in *Arabidopsis FtsZ1* on Plastid Division, *FtsZ* Ring Formation and Positioning, and *FtsZ* Filament Morphology *in vivo* [J]. Plant and Cell Physiology, 2007, 48(6): 775 - 791
- [9] Fire A, Xu SQ, Montgomery M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806 - 811
- [10] Chuang C F, Meyerowitz E M. Specific and heritable genetic interference by double - stranded RNA in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(9): 4985 - 4990
- [11] Smith N A, Singh S P, Wang M B. Total silencing by intron spliced hairpin RNAs [J]. Nature, 2000, 407(6802): 319 - 320
- [12] Stoutjesdijk P A, Singh S P, Liu Q, *et al*. HprRNA mediated targeting of the *Arabidopsis FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing [J]. Plant Physiol, 2002, 29, 1723 - 1731
- [13] Baulcombe D C. Fast forward genetics based on virus - induced gene silencing [J]. Plant Biology, 1999, 2: 109 - 113
- [14] 王玉成, 薄海侠, 杨传平, 胡杨桢柳总. RNA 提取方法的建立 [J]. 东北林业大学学报, 2003, 31(5): 99 - 100
- [15] Burton R A, Gibeault D M, Bacic A, *et al*. Virus-induced silencing of a plant cellulose-synthase gene [J]. Plant Cell, 2000, 2: 691 - 705
- [16] Wesley S V, Liu Q, Wielopolska A, *et al*. Custom knock-out with hairpin RNA mediated gene silencing [J]. Methods Mol Bio, 2003, 236: 237 - 286
- [17] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21 - and 22 - nucleotide RNAs [J]. Genes Dev, 2001, 15: 188 - 200