

BolSDG8 RNA 干扰载体构建和拟南芥的遗传转化

常诚, 姜玲, 阮颖 (湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要 拟南芥 *SDG8* 通过调控开花关键基因 *FLC* 位点上 H3K36 的甲基化水平促进其转录表达进而抑制植株早花。甘蓝 *BolSDG8* 是拟南芥 *SDG8* 的同源基因, 经比对, 选择一段约为 359 bp 的保守序列, 命名为 *BolSDG8-RNAi*, 通过构建 RNA 干扰载体, 并将其转化至野生型拟南芥 (Col-0) 中, 获得了稳定遗传的转基因植株。通过对 T₃ 代转基因植物的表型观察, 开花天数及莲座叶数目的统计分析, 发现 *BolSDG8* RNA 干扰转基因植株表现出与拟南芥 *sdg8-2* 突变体相似的生物学表型, 即植株弱小, 明显早花, 暗示 *BolSDG8* 与拟南芥 *SDG8* 在调控植物开花上具有相似的生物学功能, 为进一步深入研究甘蓝 *BolSDG8* 的生物学功能奠定基础。

关键词 *BolSDG8*; RNA 干扰; 拟南芥; 遗传转化

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)16-036-03

RNA Interference Vector Construction of *BolSDG8* and Genetic Transformation of *Arabidopsis thaliana*

CHANG Cheng, JIANG Ling, RUAN Ying (College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

Abstract *Arabidopsis SDG8* specifically regulates methylation of H3K36 on the flowering key gene *FLC*, to promote its transcriptional expression and inhibit early flowering in plants. *BolSDG8* of Brassica oleracea is a homologous gene of *SDG8* of *Arabidopsis thaliana*. By blasting, a conserved sequence of 359 bp named *BolSDG8-RNAi* was selected via construction of RNA interference vector and genetic transformation into wild-type *Arabidopsis* plants (Col-0), and obtained one transgenic plant with stable inheritance. Through phenotype observation of transgenic plants in T₃, and analysis of days to bolting and rosette leaves number, it was found that *BolSDG8* RNAi transgenic plants in *Arabidopsis* showed similar biological phenotypes to *sdg8-2* mutants, weak and significantly early flowering, laying a foundation for further study of biological function of *BolSDG8*.

Key words *BolSDG8*; RNA interference; *Arabidopsis thaliana*; Genetic transformation

开花是植物生长发育的重要环节, 植物的花期对于植物维持正常的生命周期具有重要意义。研究表明, 植物开花至少受到 5 条主要途径调控: 光周期途径、春化作用途径、GA 途径、自主途径和表观遗传调控途径。组蛋白甲基化修饰作为重要的表观遗传调控方式, 积极参与到植物开花调控网络中。拟南芥 *SDG8* (*SET DOMAIN GROUP 8*) 编码的组蛋白赖氨酸甲基转移酶是酵母 SET2 的同源物^[1-2], 包含约 1 806 个氨基酸序列, 其中含一个 CW (cysteine and tryptophan conserved) 结构域、一个 AWS (Associated With SET) 结构域、一个 SET 结构域和一个 Post SET 结构域^[3], 能特异性地催化组蛋白 H3 第 36 位赖氨酸 (H3K36) 发生双、三甲基化修饰。功能缺失的拟南芥 *sdg8* 突变体, 其植株表现为弱小、早花, 而究其早花原因, 是由于其 H3K36 的双、三甲基化水平显著降低, 开花关键基因 *FLC* 转录受到抑制, 进而使植株表现为早花。因此, 拟南芥 *SDG8* 介导的 H3K36 甲基化在抑制植物早花过程中起着重要作用。

甘蓝 *BolSDG8* 是拟南芥 *SDG8* 的同源基因。生物信息学分析表明, *BolSDG8* 全长 cDNA 为 5 088 bp, 编码 1 696 个氨基酸, 与拟南芥 *SDG8* 氨基酸序列的同源性达到 87%, 也包含一个 CW 结构域、一个 AWS 结构域、一个 SET 结构域和一个 Post SET 结构域。因此, 笔者通过构建 *BolSDG8* RNA 干扰载体和浸花法转化至野生型拟南芥 (Col-0), 检测来自甘蓝 *BolSDG8* 基因的片段能否有效沉默拟南芥 *SDG8* 的功能^[4], 进而研究甘蓝 *BolSDG8* 与拟南芥 *SDG8* 在调控植物开花上是否具有相似的生物学功能, 为深入研究 *BolSDG8* 的功能奠定

基础, 同时为培育适当早花早熟的甘蓝型油菜品种^[5] 提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料 拟南芥哥伦比亚生态型 Col-0 和突变体 *sdg8-2*; 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α ; 根癌农杆菌 GV3101; 载体 pMD-19 T vector 和 pFGC5941, 均由湖南农业大学植物发育与表观遗传调控实验室提供。

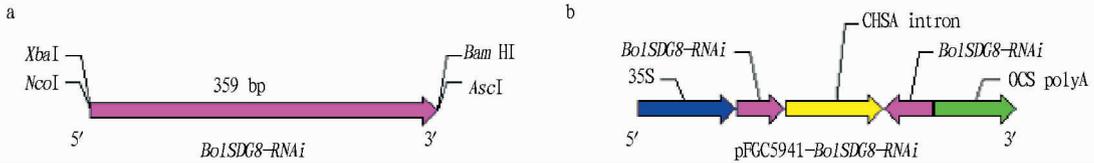
1.2 方法

1.2.1 甘蓝 *BolSDG8-RNAi* 的克隆。通过比对拟南芥 *SDG8* 与甘蓝 *BolSDG8* cDNA 序列, 选择一段约 359 bp 的保守序列, 命名为 *BolSDG8-RNAi*, 设计引物序列: *BolSDG8-RNAi* F: 5'-GGCGCGCC GGATCC AAGATTCCTTCCCCACTTTCGTCAT-3' (*AseI/BamHI*) *BolSDG8-RNAi* R: 5' -CCATGG TCTAGATTC-ATGACACTGAATGGGAATGAGG-3' (*NcoI/XbaI*)。

采用高保真酶 PCR 扩增后, 获得目的片段。对其回收并连接至 pMD19-T 载体, 命名为 pMD19-T-*BolSDG8-RNAi*, 经热激法转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 挑选阳性单菌落送至公司测序。

1.2.2 RNAi 干扰载体的构建。首先使用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切载体 pMD19-T-*BolSDG8-RNAi* 和 pFGC5941 (图 1), 将 *BolSDG8-RNAi* 反向插至查尔酮内含子与终止子之间, 获得载体 p-*BolSDG8-RNAi*; 然后使用 *Asc* I 和 *Nco* I 双酶切载体 pMD19-T-*BolSDG8-I* 和 p-*BolSDG8-RNAi*, 将目的片段正向插至 35 S 启动子与查尔酮内含子之间, 获得干扰载体 pFGC5941-*BolSDG8-RNAi*。

1.2.3 拟南芥的遗传转化。将 pFGC5941-*BolSDG8-RNAi* 转至农杆菌 GV3101 中, 挑选阳性克隆用于拟南芥的遗传转化。采用浸花法^[3] 将该质粒转至野生型拟南芥 (Col-0), 采用浓



注: a. 片段克隆; b. pFGC5941-*BolSDG8-RNAi* 干扰载体。

图 1 RNA 干扰载体构建

度 30 mg/ml PPT 喷施拟南芥幼苗进行筛选,对获得的抗性苗使用如下引物进行 PCR 检测,确认是否为转基因植株。

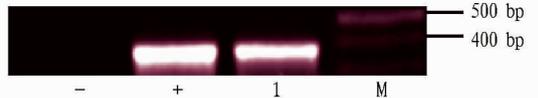
35S825 F: 5'-ATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTT-3'; Intron825 R: 5'-TGACTCCATCTTATTCCTCCGTTTC-3'。

1.2.4 转基因植株的表型观察与生物学统计。对生长于长日照条件下(16h/8h)的野生型拟南芥 Col-0、突变体 *sdg8-2* 和转基因植株分别进行开花天数和抽薹时莲座叶数目的统计,并拍照。

2 结果与分析

2.1 *BolSDG8-RNAi* 的克隆 通过比对,选择一段 359 bp

的保守序列作为 RNAi 干扰片段(图 2),克隆到 *BolSDG8-RNAi* 目的片段,并将其连接至 pMD19-T 载体上,经热激法转至大肠杆菌 DH5 α 中,挑选阳性单菌落送至公司测序,经比对,目的片段与预期片段大小完全一致(图 3)。



注: M. Marker; 1. *BolSDG8-RNAi* PCR 扩增; +. 阳性对照; -. 阴性对照。

图 2 *BolSDG8-RNAi* 基因 PCR 电泳图谱

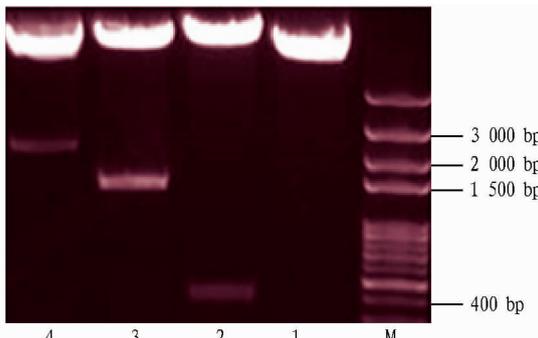


图 3 *BolSDG8-RNAi* 序列对比

2.2 *BolSDG8* 干扰载体构建 根据图 1 所示,将 *BolSDG8-RNAi* 正反插至 pFGC5941 载体上,经酶切验证,*BolSDG8* 干扰载体 pFGC5941-*BolSDG8-RNAi* 构建成功,酶切后的片段大小与预期相符(图 4)。

2.3 拟南芥的遗传转化 通过浸花法和 PPT 抗性筛选^[6],获得抗性苗(图 5)。通过改良的 CTAB 法提取抗性苗总 DNA,并进行分子检测,结果显示,抗性苗为转基因植株(图 6)。转化共计 42 株,分株收取种子。经检测共计 3 株完成转化,将转化苗命名为 *BolSDG8RNAi*。

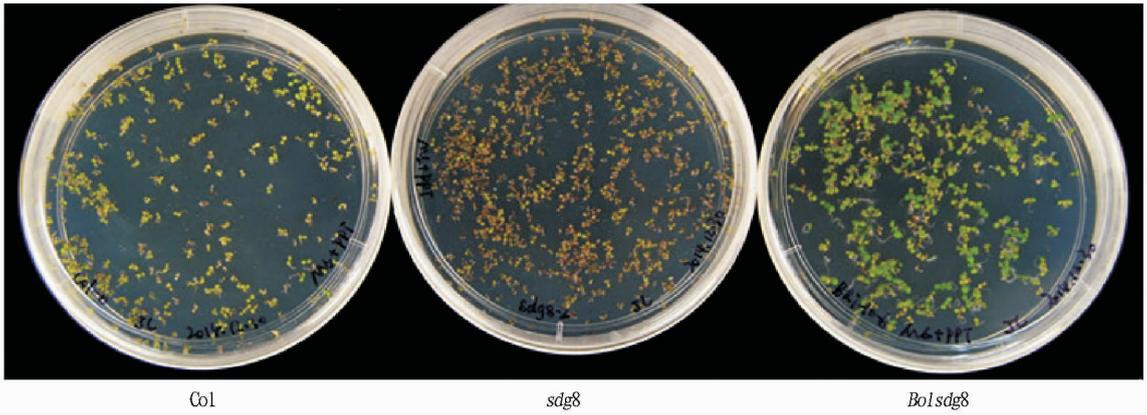
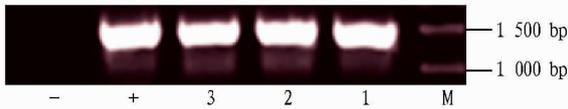
2.4 *BolSDG8RNAi* 转基因植株表型 在长日照条件下,观察生长 35 d 的 T₃ 代 *BolSDG8RNAi* 转基因拟南芥植株,与 Col-0 相比,*BolSDG8RNAi* 转基因植株长势弱小,明显早花,其整体生物学表型与 *sdg8-2* 突变体相似(图 7)。由图 8 可知,



注: M. Marker; 1. 未酶切质粒; 2. *Asc* I + *Nco* I 双酶切; 3. *Bam*HI 单酶切; 4. *Xba* I 单酶切。

图 4 pFGC5941-*BolSDG8-RNAi* 的质粒酶切

无论是莲座叶数目还是开花天数,*BolSDG8RNAi* 转基因植株

图5 *BolSDG8RNAi* 抗性平板筛选

注: M. Marker; 1~3. *BolSDG8RNAi* 抗性苗; +. 阳性对照; -. 阴性对照。

图6 *BolSDG8RNAi* 抗性苗 PCR 检测电泳图谱

明显少于 Col-0, 接近于 *sdg8-2*, 这进一步证实了 *BolSDG8RNAi* 转基因植株具有与拟南芥 *sdg8-2* 突变体相似的早花表型。

3 讨论

组蛋白赖氨酸甲基化修饰是一种重要的表观遗传学标记^[7], 也是参与开花调控的重要途径之一^[8]。其主要通过改

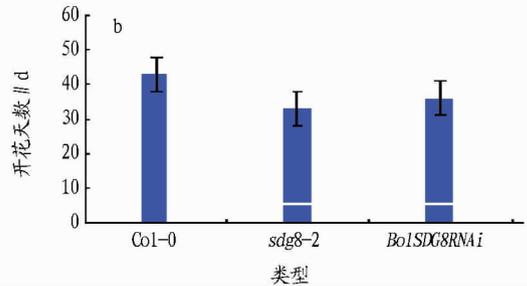
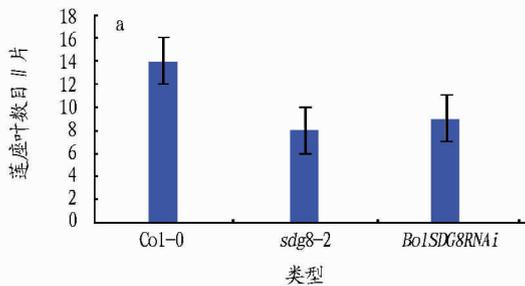
图7 生长 35 d 的 *sdg8-2*、*BolSDG8RNAi* 和 Col-0

图8 拟南芥莲座叶数目和开花天数

变染色质结构来影响基因的转录表达,使其在植物生长发育过程中起到了重要作用^[9]。组蛋白赖氨酸甲基化修饰是通过特异的组蛋白赖氨酸甲基转移酶催化实现的^[10]。组蛋白赖氨酸甲基转移酶(histone lysine methyltransferase, HLMT)是一类含有 SET 结构域的蛋白^[11],进化上保守的 SET 结构域包含约 130 个氨基酸序列,形成一个结状结构的酶催化中心。*AtSDG8* 是在拟南芥中发现的组蛋白赖氨酸甲基转移酶,能特异地催化组蛋白 H3K36 发生双、三甲基化,导致开花关键基因 *FLC* 表达水平下降,从而使植物早花^[12]。

AtSDG8 以 130 多个碱基对形成一个节状的酶催化中心^[13],即组蛋白甲基化转移酶,该转移酶通过催化组蛋白的甲基化来影响整个组蛋白结构,从而达到调控基因表达的目的^[14]。

在开花天数上,*sdg8* 相对于野生型 Col 开花时期更早,*BolSDG8RNAi* 相对 *sdg8* 较晚,但明显早于 Col,两者相对于 Col

都有明显的早花现象。在莲座叶数目上,*BolSDG8RNAi* 更接近于 *sdg8*,两者相对于 Col 在莲座叶数目上都较少。该试验结果基本符合试验预期,证明 *BolSDG8* 与 *sdg8* 不但具有高度相似的序列和结构,在调控开花的生理功能上也十分类似。

甘蓝型油菜是甘蓝与白菜杂交后自然加倍而成的异源四倍体,具有来源于甘蓝的一对染色体,通过甘蓝早花基因 *BolSDG8* 的研究,将为进一步研究甘蓝型油菜开花机制,以及为选育适当早花早熟的甘蓝型油菜新品种来适应“稻稻油”耕作制度提供理论参考。

参考文献

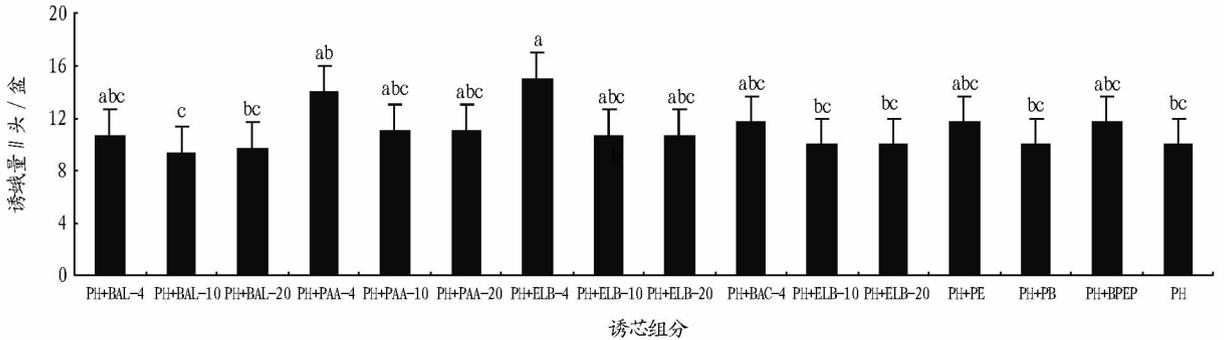
- [1] NG D W, WANG T, CHANDRASEKHARAN M B, et al. Plant SET domain-containing proteins: Structure, function and regulation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1769(5/6): 316-329.
- [2] ZHAO Z, YU Y, SHEN W H, et al. Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36 [J]. *Nature Publishing Group*, 2006, 7(12): 1256-1260.

(下转第 84 页)

出一些诱虫活性物质,杨树枝把的诱虫作用在于其释放的挥发性次生物质^[13-18]。

该研究发现所选取的 9 种植物源挥发物单剂无任何引诱活性。苯甲酸乙酯作为植物气味化合物的一个组分,对黏

虫性引诱剂具有协同作用,且引诱效果大于性信息素和苯甲酸乙酯两者之和。在一定范围内,增加植物源单剂剂量,引诱效果差异不显著。室内试验苯甲醛作为增效剂具有显著效果,田间试验显著性不差异。



注:PH. 黏虫性信息素;BAL. 苯甲醛;PAA. 苯乙醛;ELB. 苯甲酸乙酯;BAC. 乙酸苯甲酯;PE. 4 mg PAA + 4 mg ELB;PB. 4 mg PAA + 4 mg BAC; BPEP. 4 mg BAL + 4 mg PAA + 4 mg ELB + 4 mg BAC。柱上不同小写字母表示差异显著 (Duncan's 多重比较)。

图 2 不同剂量植物挥发物与性信息素混合的田间诱蛾量 (郑州)

总体上看,性引诱剂对黏虫雌蛾的引诱效果欠佳,绝对数量不大。其原因可能是:①人工合成性信息素组分缺少雌蛾释放的性信息素微量组分。②目前黏虫的监测主要采用灯光、糖酒醋液和雷达监测等方法^[19],性信息素的应用少、研究薄弱,该试验依据汪新文等^[6]研究分析配成的黏虫性信息素有可能不是最准确的。黏虫性信息素及其增效剂的研究、试验有待进一步开展。

参考文献

- [1] BUTENANDT A, BEEKMANN R, STAMM D, et al. Über den sexual lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori* Reidanstellung und konstitution[J]. Z Naturforsch B, 1959, 14: 283 - 284.
- [2] 苏建伟, 肖能文, 戈峰. 昆虫雌性信息素在害虫种群监测和大量诱捕中的应用与讨论[J]. 植物保护, 2005, 31(5): 78 - 82.
- [3] REDDY V P, GUERRERO A. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(5): 253 - 261.
- [4] LANDOLT P J, PHILLIPS T W. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects[J]. Annual Review of Entomology, 1997, 42: 371 - 391.
- [5] REDDY G V P, CUERRERO A. Behavioral responses of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, to green leaf volatiles of *Brassica oleracea* subsp. capitata[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 6025 - 6029.
- [6] 汪新文, 刘孟英. 利用超微量技术分析粘虫单腺体信息素的化学组成[J]. 昆虫学报, 1997, 40(2): 22 - 27.
- [7] 沈幼莲, 高扬, 杜永均. 植物气味化合物与斜纹夜蛾性信息素的协同作

- 用[J]. 昆虫学报, 2009, 52(12): 1290 - 1297.
- [8] 康乐. 植物对昆虫的化学防御[J]. 植物学通报, 1995, 12(4): 22 - 27.
- [9] 赵卓, 刘国东, 刘克文, 等. 昆虫与植物协同关系的研究概况[J]. 吉林师范大学学报: 自然科学版, 2004(3): 4 - 7.
- [10] 吴名全. 植物-植食性昆虫-天敌相互关系中化学物质的变化[J]. 宜春学院学报, 2003, 25(2): 71 - 74.
- [11] 杜永均, 严福顺. 植物挥发性次生物质在植食性昆虫-寄主植物和昆虫天敌关系中的作用机理[J]. 昆虫学报, 1994, 37(2): 233 - 249.
- [12] CHA D H, NOJIMA S, HESLER S P, et al. Identification and field evaluation of grape shoot volatiles attractive to female grape berry moth (*Paralobesia viteana*) [J]. J Chem Ecol, 2008, 34: 1180 - 1189.
- [13] MITCHELL E R, HU G, JOHANOWICZ D. Management of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in cabbage using collar as a trap crop [J]. Hort Science, 2000, 35(5): 875 - 879.
- [14] CARCAMO H A, DUNN R, DOSDALL L M, et al. Managing cabbage seedpod weevil in canola using a trap crop—A commercial field scale study in western Canada [J]. Crop Protection, 2007, 26: 1325 - 1334.
- [15] 郭予元. 棉铃虫的研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [16] 付新华, 雷朝亮, 王香萍, 等. 加拿大杨树树叶气味对棉铃虫的引诱作用[J]. 昆虫天敌, 2001, 23(1): 22 - 25.
- [17] 郭线茹, 原国辉, 郑启伟, 等. 黑杨萎蔫叶片萃取物对蛾类成虫诱集活性的研究[J]. 华北农学报, 2001, 16(4): 104 - 108.
- [18] DICKENS J C, SMITH J N, LING D M. Green leaf volatiles enhance sex attractant pheromone of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* [J]. Chemocology, 1993, 4: 175 - 177.
- [19] 江幸福, 张蕾, 程云霞, 等. 我国粘虫研究现状及发展趋势[J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(4): 881 - 889.

(上接第 38 页)

- [3] 杜婷婷, 黄秋花. 组蛋白赖氨酸甲基化在表观遗传调控中的作用[J]. 遗传, 2007(4): 387 - 392.
- [4] 李兰岚, 饶力群, 范适, 等. RNAi 技术及其在植物中的应用研究进展[J]. 湖南环境生物职业技术学院学报, 2005(4): 313 - 318.
- [5] SIMS III R J, NISHIOKA K, REINBERG D. Histone lysine methylation: A signature for chromatin function[J]. Trends in Genetics, 2003, 19(11): 629 - 639.
- [6] 姜玲, 谢青轩, 魏婷婷, 等. BraSDG8 RNA 干扰载体的构建及其对拟南芥的遗传转化[J]. 湖南农业科学, 2012(7): 21 - 23.
- [7] 夏志强, 何奕昆, 鲍时来, 等. 植物开花的组蛋白甲基化调控分子机理[J]. 植物学通报, 2007(3): 275 - 283.
- [8] 李红梅, 任艳, 魏艳丽, 等. 拟南芥开花时间的分子遗传调控[J]. 山东科学, 2007(1): 48 - 53.

- [9] 田筱青, 房静远. 组蛋白甲基化研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006(6): 511 - 516.
- [10] HE Y H. Control of the transition to flowering by chromatin modifications [J]. Mol Plml, 2009, 2(4): 554 - 564.
- [11] 宋江华, 曹家树. 植物 SET 蛋白[J]. 细胞生物学杂志, 2007(3): 384 - 388.
- [12] 谢青轩, 彭琦, 刘春林. 白菜型油菜 *BraSDG8* 基因的克隆与序列分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011(4): 372 - 375.
- [13] YU Y, BU Z Y, SHEN W S, et al. An update on histone lysine methylation in plants[J]. Progress in Natural Science, 2009, 19(4): 407 - 413.
- [14] STEINMETZ A, SHEN W H. Di- and tri- but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular and Cell Biology, 2008, 28: 1348 - 1360.