

# 棉花肉桂醇脱氢酶基因 GhCAD6 的克隆及正义、反义与 RNAi 干扰载体的构建

倪志勇,马文静,吕萌,王娟,李波,范玲

(新疆农业科学院核技术生物技术研究所,新疆乌鲁木齐 830091)

**摘要:**肉桂醇脱氢酶(CAD)催化木质素单体合成的最后一步反应,将肉桂醛还原生成相应的肉桂醇。采用 PCR 方法从棉花中克隆了 GhCAD6 基因 1 569 bp 的基因组序列,序列分析表明 GhCAD6 基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成。为了研究 GhCAD6 基因的功能,构建由棉纤维组织特异性启动子 E6 驱动的 GhCAD6 基因正义、反义表达载体;同时克隆了 GhCAD6 基因的一段 417 bp 高度保守的 NBD 区序列,构建了 GhCAD6 基因的 RNAi 干扰载体,并将上述载体转入农杆菌菌株 LBA4404 中。为通过转基因技术深入研究 GhCAD6 基因在棉纤维发育和木质素代谢途径中的作用创造条件。

**关键词:**棉花;肉桂醇脱氢酶;表达载体;RNAi

**中图分类号:**Q785 **文献标识码:**A **文章编号:**1000 - 7091(2009)06 - 0020 - 07

## Molecular Cloning of GhCAD6 Gene and Construction of Its Sense, Anti-sense and RNAi Expression Vectors

NI Zhi-yong, MA Wen-jing, LU Meng, WANG Juan, LI Bo, FAN Ling

(Institute of Nuclear and Biological Technologies, Xinjiang Academy of Agriculture Sciences, Urumqi 830091, China)

**Abstract:** Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) (EC 1. 1. 1. 195) catalyses the final step in lignin precursor synthesis reducing the cinnamyl aldehydes to the corresponding alcohols in the presence of NADPH. In this paper, we report the molecular cloning a length of 1 569 bp sequence from genomic DNA of GhCAD6 by PCR. The genomic DNA of GhCAD6 contains five exons and four introns. To investigate the function of GhCAD6 gene, the sense and anti-sense expression vectors of GhCAD6 were constructed, in which the coding region of the gene was placed under the E6 promoter in either sense or anti-sense orientation. In addition, especial 417 bp fragments of GhCAD6 NBD were also cloned, and this fragment was inserted into plant vector to construct RNAi expression vector of GhCAD6. These constructed vectors were then transformed into *Agrobacterium* LBA4404. These constructed vectors provided an effective tool for the further study of GhCAD6 gene function.

**Key words:** *Gossypium hirsutum* L.; Cinnamyl alcohol dehydrogenase; Expression vectors; RNAi

RNA interference (RNAi) 即 RNA 干扰,是指由双链 RNA (Double-strand RNA, dsRNA) 引发的同源 mRNA 序列特异性降解,最终导致目标基因转录后沉默的现象 (Post-transcriptional gene silencing, PTGS)。RNAi 可以高效、特异地使目的基因转录后沉默或剔除目标基因的表达,获得功能丧失性突变个体用于基因功能研究,已成为研究基因功能的重要方法<sup>[1]</sup>。

在植物功能基因组研究中,利用含有内含子的正义和反义重复序列 (hpRNA 结构) 来沉默内源基因,是目前应用于转基因诱导基因沉默最高效的方法<sup>[2]</sup>。这种 RNA 干扰方法干扰效率高、作用持久、可稳定遗传给子代<sup>[3]</sup>,而且,由于表达载体含有选择性标记,易于对转基因后代进行筛选和检测。因此,构建 hpRNA 高效克隆和表达载体,用于特定基因功能鉴

收稿日期:2009 - 09 - 05

基金项目:国家自然科学基金项目(30660088);国家“863”项目(2006AA10Z184);新疆自治区高技术研究发展计划项目(200611101);农业部转基因重大专项课题(2009ZX08005-011B)

作者简介:倪志勇(1981 - ),男,黑龙江人,助理研究员,硕士,主要从事作物分子生物学研究。

通讯作者:范玲(1958 - ),女,山西人,研究员,博士,主要从事棉花纤维品质分子机理和分子改良的研究。

定及表达调控研究是 RNAi 技术应用研究的热点之一<sup>[4,5]</sup>。

肉桂醇脱氢酶 (CAD) 是木质素代谢途径中第一个被研究的酶,其催化木质素单体合成的最后一步反应,将三种肉桂醛还原生成相应的三种肉桂醇<sup>[6]</sup>。CAD 在调控木质素的含量和组分中发挥着重要的作用,目前已经从许多植物中克隆了 CAD 基因并通过转基因的方法对基因的功能进行了研究<sup>[7-10]</sup>。Halpin 等<sup>[7]</sup>报道在抑制 CAD 活性的转基因烟草中, CAD 的活性为正常活性的 10%,然而并没有改变烟草的发育及细胞中木质素的总量。反义 CAD 转基因苜蓿<sup>[9]</sup>和杨树<sup>[8]</sup>的木质素含量也未明显降低,仅特殊组分松柏醛 (Coniferyl aldehyde) 明显增加,这说明抑制 CAD 活性能够使木质素结构发生改变。抑制 CAD 活性后植物体仍可维持正常木质素水平,可能是抑制的程度不够或者存在其它酶的补偿作用,其原因有待进一步深入研究。

本实验室已从发育的棉花纤维中克隆了两个 CAD 基因,并研究了基因的表达模式和酶活性<sup>[11]</sup>。为了进一步研究 CAD 基因在棉花纤维发育中的作用,本研究克隆了 *GhCAD6* 基因的基因组序列,分析了基因的结构,构建由棉纤维组织特异性启动子 E6 驱动的 *GhCAD6* 基因正义、反义表达载体和 RNAi 干扰载体,并转入农杆菌菌株 LBA4404 中,为通过转基因技术深入研究 CAD 基因在棉纤维发育和木质素代谢途径中的作用创造条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

收集新鲜陆地棉品系徐州 142 (*Gossypium hirsutum* L. cv. Xuzhou 142) 叶片组织,液氮迅速冷冻,于 -80 保存备用。E6 启动子植物表达载体 pCAMBIA2300,含有 intron 的中间载体 pBluescript SK<sup>+</sup> (pB-SK) 与农杆菌 LBA4404 菌株由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室朱玉贤教授惠赠。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用 CTAB 法从新鲜幼嫩的叶片中提取 DNA<sup>[12]</sup>。

1.2.2 *GhCAD6* 基因的克隆和鉴定 根据 *GhCAD6* 基因 (基因登录号: EU281305) 的 cDNA 序列设计一对特异引物 CAD6iF: 5'-ATGGGAGCCTTGAACTGAGAGAACAAC-3' 和 CAD6iR: 5'-CTATTGATCAAGCTTGCTTCCAGCAACATC-3', 以陆地棉徐州 142 叶片基因组 DNA 为模板,扩增 *GhCAD6* 基因对应的基因组序列,分析其是否具有内含子。50  $\mu$ L 体系中含

DNA (100 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 10  $\times$ LA-PCR Buffer 5  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 2  $\mu$ L, 引物 (25  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L 和 LA-*Taq* 0.5  $\mu$ L (TaKaRa), ddH<sub>2</sub>O。PCR 程序为: 94 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 66 复性 45 s, 72 延伸 3 min, 共 40 个循环; 72 延伸 10 min。PCR 产物置 1.5% 琼脂糖中电泳,用紫外凝胶成像仪 (Bio-Rad) 观察结果。采用凝胶回收试剂盒 (TaKaRa) 回收目的片段,回收产物与 pMD18-T (TaKaRa) 载体连接后转化 *E. coli* DH5 感受态细胞 (Tiangen), 与 X-gal 和 IPTG 一同涂于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,过夜培养后,挑取白色克隆,经含有氨苄青霉素的液体培养基震荡培养 12 h 后,菌液 PCR 检测是否有插入片段,阳性克隆送上海美季公司测序。用 DNAMAN 软件对基因序列与 cDNA 序列进行比较,确定基因中内含子的长度及插入位点。

1.2.3 *GhCAD6* 基因正义和反义表达载体的构建及鉴定 根据 *GhCAD6* 基因的 cDNA 序列和 pCAMBIA2300 的多克隆位点,设计引物 nTSCAD6F: 5'-TTAGGATCCATGGGAGCCTTGAACTGAG-3' 和 nTSCAD6R: 5'-TATGACCTCCTATTGATCAAGCTTGCTTCCA-3' (下划线分别为 *Bam*H 和 *Sac* 酶切位点),扩增 *GhCAD6* 基因的正义序列。该引物在 *GhCAD6* ORF 的 N 端引入 *Bam*H 酶切位点, C 端引入 *Sac* 酶切位点。设计引物 nTASCAD6F: 5'-TTAGGATCCATGGGAGCCTTGAACTGAG-3' 和 nTASCAD6R: 5'-TAAGGATCCCTATTGATCAAGCTTGCTTCCAG-3' (下划线分别为 *Sac* 和 *Bam*H 酶切位点),扩增 *GhCAD6* 基因的反义序列。该引物在 *GhCAD6* ORF 的 N 端引入 *Sac* 酶切位点, C 端引入 *Bam*H 酶切位点。以 pMD18-T-CAD6 质粒为模板,用高保真酶 (TaKaRa) 扩增两端带有 *Bam*H 和 *Sac* 酶切位点的正义、反义基因。PCR 扩增体系与上述体系相同,扩增程序为: 94 预变性 4 min, 94 变性 30 s, 56 复性 45 s, 72 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 延伸 10 min。获得的 *GhCAD6* 正义和反义基因 PCR 产物,凝胶回收后,用 *Bam*H 和 *Sac* (*promega*) 酶切,连接到以相同酶切后回收的 pCAMBIA2300 载体上,获得 pCAMBIA2300-SCAD6 正义表达载体和 pCAMBIA2300-ASCAD6 反义表达载体。利用质粒小量提取试剂盒 (NCR) 提取 pCAMBIA2300-SCAD6 和 pCAMBIA2300-ASCAD6 重组质粒,用 *Bam*H 和 *Sac* 双酶切鉴定。

1.2.4 *GhCAD6* 基因 RNAi 干扰载体的构建及鉴定 根据 *GhCAD6* 基因的核苷酸结合结构域 (NBD, Nucleotide-binding domain) 设计一对引物

nTSCAD6NBD: 5-TATCTCTAGATGTGCA GGGGTGACA GTTAC-3 和 nTSCAD6NBD: 5-TTTGGATCCCC-CAATAAACTCCCTGTAATCG-3 (下划线分别为 *Xba* 和 *Bam* H 酶切位点), 扩增 *GhCAD6* 基因的 NBD 区保守序列。采用上述 PCR 反应体系和程序, 以 pMD18-T-CAD6 质粒为模板, 用高保真酶 (TaKaRa) 扩增两端带有 *Xba* 和 *Bam*H 酶切位点的 *GhCAD6* 基因 NBD 区片段。获得的 PCR 产物, 凝胶回收后, 用 *Xba* 和 *Bam*H 酶切, 连接到以相同酶切后回收的 pCAMBIA2300 载体和 pBSK 载体上, 获得 pCAMBIA2300-CAD6NBD 和 pBSK-CAD6NBD 两个中间载体。然后用 *Kpn* 和 *Sac* 从 pBSK-CAD6NBD 中间载体上酶切内含子序列和 CAD6NBD 区序列, 连到以相同酶切回收的 pCAMBIA2300-CAD6NBD 中间载体上, 获得 pCAMBIA2300-CAD6RNAi 干扰表达载体。提取 pCAMBIA2300-CAD6NBD, pBSK-CAD6NBD 和 pCAMBIA2300-CAD6RNAi 重组质粒, 酶切鉴定载体的正确性。

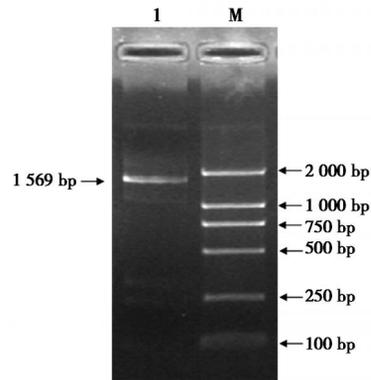
1.2.5 *GhCAD6* 基因正义、反义和 RNAi 表达载体的转化农杆菌 LBA4404 提取 *GhCAD6* 基因正义表达载体 pCAMBIA2300-SCAD6, 反义表达载体 pCAMBIA2300-ASCAD6 和 RNAi 干扰表达载体 pCAMBIA2300-CAD6RNAi 的质粒, 用冻融法将质粒转化农杆菌 LBA4404 感受态细胞。具体方法是: 在冰上融化 200  $\mu$ L 农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 加入 2  $\mu$ g 载体质粒 DNA, 混匀后冰浴 5 min, 然后置液氮速冻 8 min, 迅速于 37  $^{\circ}$ C 水浴中温育 5 min 后加入 800  $\mu$ L YEB 混匀, 置 28  $^{\circ}$ C, 250 r/min 摇床中预培养 4~5 h, 涂于含 50  $\mu$ g/mL 利福平、50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 YEB 固体平板上, 28  $^{\circ}$ C、黑暗条件下培养 24~48 h, 待转化子菌落长出后, 挑取单菌落摇菌, 做菌液 PCR 进行鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GhCAD6* 基因的克隆

根据 *GhCAD6* 基因的 cDNA 序列, 设计一对基因特异性引物, 经 PCR 扩增从棉花基因组中克隆到了 *GhCAD6* 基因的基因组序列 (图 1), *GhCAD6* 基因全长 1 569 bp, 编码区序列由 5 个外显子和 4 个内含子组成 (图 2)。5 个外显子的长度依次为 89, 114, 228, 440, 203 bp。第一个内含子的长度为 97 bp, 插入在第 30 个氨基酸精氨酸中, 第二个内含子长度为 116 bp, 插入在第 68 个氨基酸甘氨酸中, 第三个内含子长度为 168 bp, 插入在第 144 个氨基酸赖氨酸中, 第四个内含子长度为 114 bp, 插入在第 291 个氨基酸甘氨酸中。

所有内含子的左右边界均为 GT-AG 结构, 保证在 RNA 加工过程中内含子被正确识别和切除。



M. Marker DL2000; 1. 以基因组为模板的扩增产物。  
M. Marker DL2000; 1. The PCR product by genomic DNA.

图 1 *GhCAD6* 基因基因组序列的扩增

Fig. 1 Genome amplification of the *GhCAD6* gene

### 2.2 *GhCAD6* 基因正义、反义序列的扩增及正义、反义表达载体的构建

用前向带有 *Bam*H 和反向带有 *Sac* 酶切位点的 *GhCAD6* 基因正义序列引物和前向带有 *Sac* 和反向带有 *Bam*H 酶切位点的 *GhCAD6* 基因反义序列引物, 以 pMD18-T-CAD6 质粒为模板, 经 PCR 扩增获得两端带有 *Bam*H 和 *Sac* 酶切位点的 *GhCAD6* 基因正义和反义全长目的片段, 扩增产物大小均约为 1 074 bp, 与预期大小相符, 且无非特异扩增带, 如图 4。将目的片段回收纯化后, 用 *Bam*H 和 *Sac* 酶切, 连接到已相同酶切回收后的表达载体 pCAMBIA2300 载体上, 热激转化 *E. coli* DH5<sup>-</sup>, 获得 pCAMBIA2300-SCAD6 正义表达载体和 pCAMBIA2300-ASCAD6 反义表达载体 (图 3)。对两个重组质粒用 *Bam*H 和 *Sac* 双酶切, 均切出一条长约 1 074 bp 的条带 (图 5)。将阳性克隆测序, 序列比对结果正确, 说明 *GhCAD6* 基因正义和反义表达载体构建成功。

### 2.3 *GhCAD6* 基因 NBD 区序列的扩增及 RNAi 干扰载体的构建

PCR 扩增 *GhCAD6* 基因的 NBD 区保守序列, 扩增产物大小均约为 417 bp, 与预期大小相符, 且无非特异扩增带 (图 4), 将目的片段回收纯化后, 用 *Xba* 和 *Bam*H 酶切, 连接到以相同酶切回收的 pCAMBIA2300 载体和 pBSK 载体上, 热激转化 *E. coli* DH5<sup>-</sup>, 获得 pCAMBIA2300-CAD6NBD 和 pBSK-CAD6NBD 两个中间载体。对两个中间载体重组质粒用 *Xba* 和 *Bam*H 双酶切, 均切出一条长约 417 bp 的条带 (图 6, 7)。将阳性克隆测序, 序列比对结果正确, 说明 pCAMBIA2300-CAD6NBD 和 pBSK-CAD6NBD 两个中间载体构建成功。

```

1      ATGGGTAGCCCTTGAAACTGAGAGAACAACCACAGGATGGGCTGCCAGAGATCCCTTCAGGAGTATTGTCTCCTTACACT
1      H G S L E T E R T T T G W A A R D P S G V L S P Y T
79     TACACTCTTAGGTATTCTCTAAATTTTGTGTTTTGTTTTTAAATTTTGTTC AAGGTTCAATTTCTGGTTCGTACATGGT
27     Y T L R
157    GATTTGCTGTAATAATAATCGTGTITTCAGGAACACTGGTCTCGAGGATGTTTTCGTTAAGGTTATGTGCTGTGGAAT
31     N T G P E D V F V K V H C C G I
235    CTGCCACACTGATCTTCATCAAGCCAAAAATGATCTTGGCATGTCAAACCTACCCAATGGTTCCTGGGTACTACTACAA
47     C H T D L H Q A R N D L G N S N Y P H V P G
313    CTGTTTTCTTTATGTTTCCAAAGCCGTGTTTCTTATCTTCATGTTTCATGAGTCAATGAATTTCTTTTGGACTTTTTTGG
391    ATTGTGAATTTATTACTTTTTTCCAGGCATGAAGTGGTGGTGGAGGTTGGAAAGTTGGGTCAGATGTAACGAAGTTC
69     H E V V G E V L E V S D V S K F
469    AGAGTTGGTGATATTGTTGGTGTGGTGTGCTTGTGGATGTTGCAGAACTGCCGACCATGCCACTCAGACAATGAA
86     R V G D I V G V G C L V G C C R N C R P C D S D N E
547    CAATACGTCTCAAGAAGATCTGGTGTACAATGATGTTTACATGACGGCAAACCACCCAAGTGGCTTTGCTGGT
112    Q Y C L K K I W S Y N D V Y T D G K P T Q V S P H V A G
625    TCCATGGTCGTTGATCAAAAGTAGGAATCATAAACTATATGTGCTCTGCATGTTTATAGAGTAATGAAACAGGCCAAG
138    S H V V D Q K
703    ATAACTAGTTTCAGGGATTAATAATAGCATTGTTGACATGATAAACCGTATCAGACCCGAAAAAAGTGATACCAAAT
781    ACAAAAATGATGTGATGCTTTTTCCTATTAGGTTTGTGGTGAAAATCCAGAAAGGAATGGCACAGAACAGGTGGCA
145    F V V K I P E G H A P E Q V A
859    CCCTGTTATGTGACAGGGGTGACAGTTTACAGCCATTGAATCACTTTGGTTTAAATGGGGAGTGGGTTAAGGGGAGGA
160    P L L C A G V T V Y S P L N H F G L H G S G L R G G
937    ATATTGGGACTTGGAGGTGATAGGCACATGGGGGTGAAGATAGCCAAAGCAATGGGGCATCAGTAACAGTTATAAGC
186    I L G L G G V G H H G V K I A K A H G H V T V I S
1015   TCATCTGATAAGAAAAAGTGGAGGCTTTGGAGCATCTTGGTGTGATGACTACTTAGTCAGCTCCGACGCTGAAAGGG
212    S S D K K K V E A L E H L G A D D Y L V S S D A E G
1093   ATGCAAAAGGCTGCTGATTCACTTGTATATCAATTGACACTGTGCCTGTTTTTCCACCACTTGAGCCCTTACCTTCA
238    N Q K A A D S L D Y I I D T V P V F H P L E P Y L S
1171   TTGTTGAAATTCGACGGCAAGTTAATCTTGGACTGGTGTATTAACACCCCTTTCAGTTTGTTCCTCCATGGTCATG
264    L L K F D G K L I L T G V I N T P L Q F V S P H V H
1249   CTTGGTGAGTCTATTTCTTAACTTTGAACCTATATATAGATGCTTCTTTGTTGGCTGCTGGTTTTTTTTGGAGTGG
290    L
1327   AAGGCTAATCTCTGTTTTCCCTGCCCAAAATTTGTATAGGGAGAAAGTCGATTACAGGGAGTTTTATTGGGAGCATG
291    G R K S I T G S F I G S H
1405   AAGGAAACAGAGGAAATGCTTAACCTTCTGTAAAGGAGGAAAATTTGACCTCAATGATTGAGGTTGGTGAAGATGGATTAT
304    K E T E E H L N F C K E E N L T S H I E V V K H D Y
1483   ATCAACACAGCAATGGAGAGCTGGAGAAGAACGATGTTCCGATACAGATTGCTGCTGGATGTTGCTGGAAGCAAGCTT
330    I N T A H E R L E K N D V R Y R F V V D V A G S K L
1561   GATCAATAG
3356   D Q *

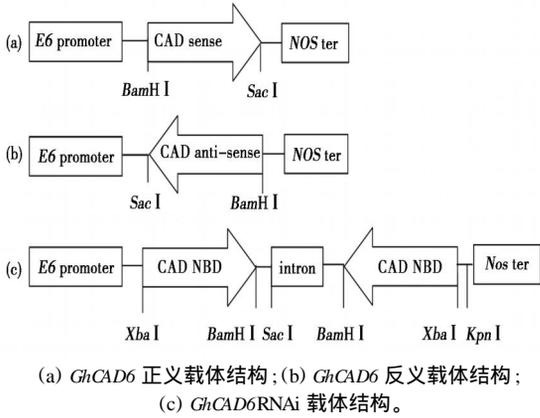
```

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG)用下划线标注。

The start codon (ATG) and the stop codon (TAG) were underlined.

图2 GhCAD6 基因内含子、外显子的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide of intron and exon and deduced amino acid sequence of GhCAD6



(a) GhCAD6 正义载体结构; (b) GhCAD6 反义载体结构; (c) GhCAD6RNAi 载体结构。

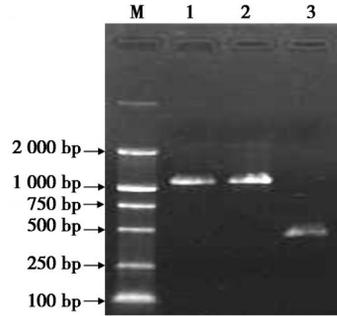
图3 GhCAD6 基因正义、反义和 RNAi 载体结构示意图

Fig. 3 Schematic diagram of the constructs used in this study to silence the endogenous GhCAD6 gene in

Gossypium hirsutum L.

用 Kpn 和 Sac 从 pBSK-CAD6NBD 中间载体上酶切内含子序列(大小 1 053 bp)和 CAD6NBD 区序列(大小 417 bp), 连到以相同酶切后回收的 pCAMBIA2300-CAD6NBD 中间载体上, 热激转化 E. coli DH5, 获得 pCAMBIA2300-CAD6RNAi 干扰表达载体(图 3)。对重组质粒用 Kpn 和 Sac 双酶

切, 切出一条长约 1 470 bp 的条带(图 8), 说明 pCAMBIA2300-CAD6RNAi 干扰载体构建成功。



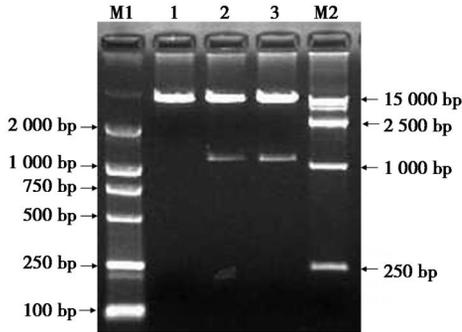
M. DL2000; 1. 正义基因; 2. 反义基因; 3. NBD 区基因。 M. DL2000; 1. Sense gene; 2. Anti-sense gene; 3. NBD gene.

图4 GhCAD6 正、反基因和 NBD 区的 PCR 扩增

Fig. 4 The PCR amplification of sense, anti-sense and NBD GhCAD6 gene

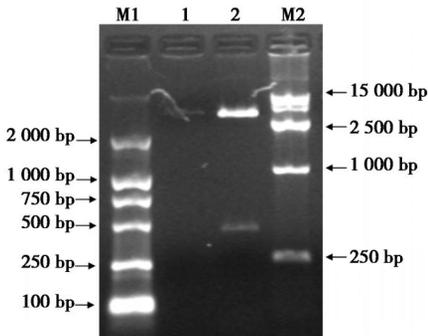
### 2.4 GhCAD6 基因正义、反义和 RNAi 表达载体的转化农杆菌 LBA4404 及鉴定

将构建好的正义表达载体 pCAMBIA2300-SCAD6, 反义表达载体 pCAMBIA2300-ASCAD6 和 RNAi 干扰表达载体 pCAMBIA2300-CAD6RNAi 通过冻融法导入农杆菌 LBA4404 中, 用利福平和卡那霉素进行筛选, 待转化子菌落长出后, 挑取单菌落摇



M1. DL2000; M2. DL15000; 1. *Bam*H 和 *Sac* 双酶切 pCambia2300; 2. *Bam*H 和 *Sac* 双酶切 pCambia2300-SCAD6; 3. *Bam*H 和 *Sac* 双酶切 pCambia2300-ASCAD6.  
M1. DL2000; M2. DL15000; 1. pCambia2300 digested by *Bam*H and *Sac*; 2. pCambia2300-SCAD6 digested by *Bam*H and *Sac*; 3. pCambia2300-ASCAD6 digested by *Bam*H and *Sac*.

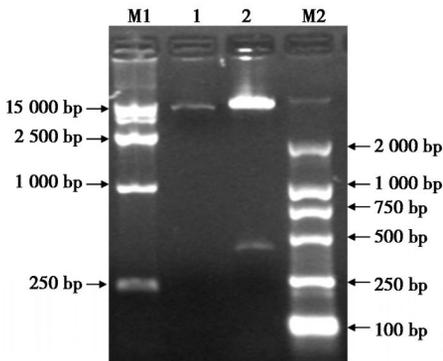
图5 重组质粒 pCambia2300-SCAD6 和 pCambia2300-ASCAD6 用 *Bam*H 和 *Sac* 双酶切结果  
Fig. 5 Identification of pCambia2300-SCAD6 and pCambia2300-ASCAD6 digested with *Bam*H and *Sac*



M1. DL2000; M2. DL15000; 1. *Xba*I 和 *Bam*H 双酶切 pBSK; 2. *Xba*I 和 *Bam*H 双酶切 pBSK-CAD6NBD.  
M1. DL2000; M2. DL15000; 1. pBSK digested by *Xba*I and *Bam*H; 2. pBSK-CAD6NBD digested by *Xba*I and *Bam*H.

图6 重组质粒 pBSK-CAD6NBD 经 *Xba*I 和 *Bam*H 双酶切结果

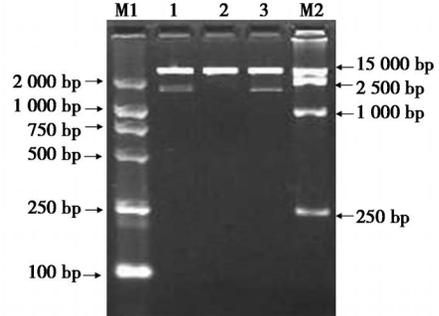
Fig. 6 Identification of pBSK-CAD6NBD digested with *Xba*I and *Bam*H



M1. DL1500; M2. DL20000; 1. *Xba*I 和 *Bam*H 双酶切 pCambia2300; 2. *Xba*I 和 *Bam*H 双酶切 pCambia2300-CAD6NBD.  
M1. DL1500; M2. DL20000; 1. pCambia2300 digested by *Xba*I and *Bam*H; 2. pCambia2300-CAD6NBD digested by *Xba*I and *Bam*H.

图7 重组质粒 pCambia2300-CAD6NBD 经 *Xba*I 和 *Bam*H 双酶切结果

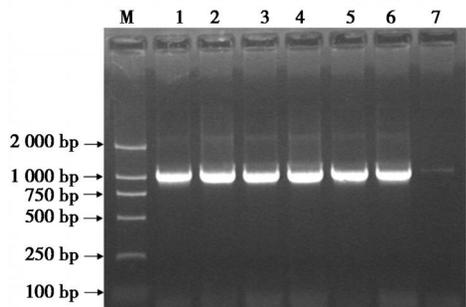
Fig. 7 Identification of pCambia2300-CAD6NBD digested with *Xba*I and *Bam*H



M1. DL2000; M2. DL15000; 1, 3. *Kpn*I 和 *Sac* 双酶切 pCambia2300-CAD6RNAi; 2. *Kpn*I 和 *Sac* 双酶切 pCambia2300-CAD6NBD.  
M1. DL2000; M2. DL15000; 1, 3. pCambia2300-CAD6RNAi digested by *Kpn*I and *Sac*I; 2. pCambia2300-CAD6NBD digested by *Kpn*I and *Sac*

图8 重组质粒 pCambia2300-CAD6RNAi 经 *Kpn*I 和 *Sac* 双酶切结果

Fig. 8 Identification of pCambia2300-CAD6RNAi digested with *Kpn*I and *Sac*



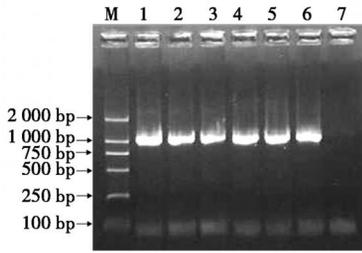
M. DL2000; 1 ~ 6. 转 pCambia2300-SCAD6 质粒 LBA4404 农杆菌 PCR 产物。  
M. DL2000; 1 - 6. PCR product of *Agrobacterium* LBA4404 transformed by pCambia2300-SCAD6.

图9 转 pCambia2300-SCAD6 农杆菌 PCR 检测  
Fig. 9 PCR detection of *Agrobacterium* transformed by pCambia2300-SCAD6

菌,采用上述三对引物进行农杆菌菌液 PCR 鉴定,经琼脂糖凝胶电泳检测,结果可见,能够从转化正义和反义表达载体的农杆菌菌液中获得大小为 1 074 bp 的目的片段(图 9, 10),能够从转化 RNAi 表达载体的农杆菌菌液中获得大小为 417 bp 的目的片段(图 11)。表明质粒载体已成功转入农杆菌 LBA4404 中,可直接用于后续的转基因工作。

### 3 讨论

根据基因沉默发生的时期,基因沉默分为转录水平的基因沉默(Transcriptional gene silencing, TGS)和转录后水平的基因沉默(Post-transcriptional gene silencing, PTGS)<sup>[13-15]</sup>。TGS 通常与 DNA 甲基化有关,表现为 mRNA 不能正常合成,造成基因失活。有研究表明,外源基因较内源基因更易甲基化,但外源基因甲基化不表达不一定影响内源基因的表达。PTGS 虽能合成 mRNA,但随后被降解而不能积累,并同时诱导与外源基因同源的內源性基因沉默<sup>[16]</sup>。

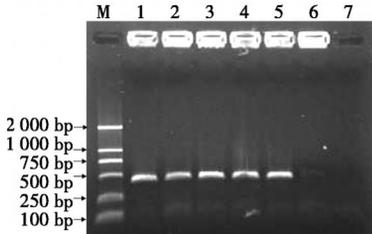


M. DL2000; 1 ~ 6. 转 pCambia2300-ASCAD6 质粒 LBA4404 农杆菌 PCR 产物。

M. DL2000; 1 ~ 6. PCR product of *Agrobacterium* LBA4404 transformed by pCambia2300-ASCAD6.

图 10 转 pCambia2300-ASCAD6 农杆菌 PCR 检测

Fig. 10 PCR detection of *Agrobacterium* transformed by pCambia2300-ASCAD6



M. DL2000; 1 ~ 6. 转 pCambia2300-RNAiCAD6 质粒 LBA4404 农杆菌 PCR 产物。

M. DL2000; 1 ~ 6. PCR product of *Agrobacterium* LBA4404 transformed by pCambia2300-RNAiCAD6

图 11 转 pCambia2300-RNAiCAD6 农杆菌 PCR 检测

Fig. 11 PCR detection of *Agrobacterium* transformed by pCambia2300-RNAiCAD6

最近一些试验表明,利用含有内含子的正义和反义重复序列(hpRNA 结构)来沉默内源基因,是目前应用于转基因诱导基因沉默最高效的方法。与正义 RNA 介导的共抑制、反义 RNA 介导的基因抑制相比, hpRNA 沉默效率要明显高于这两种传统方法。Wesley 等<sup>[17]</sup>的研究表明:用反义抑制和共抑制方法介导的 PTGS 的沉默效率在 0% ~ 30%,而 hpRNA 结构则能显著提高 RNA 沉默的效率,其沉默效率在 48% ~ 100%。

植物 RNA 干扰的表型观察以及相关基因的功能分析,常常依赖于完整的个体,因此 RNA 干扰在植物功能基因组学中的应用必须通过构建植物表达载体,并进而获得转基因植物来实现<sup>[18]</sup>。Neil 等<sup>[19]</sup>的载体构建是在启动子后先连接正义片段,而 Chuang 和 Meyerowitz<sup>[3]</sup>则是采取了先连接反义片段的做法,所获得的 RNA 干扰的结果有所不同。Chuang 和 Meyerowitz 的 RNA 干扰的比率即使在没有采用内含子的情况下,依然达到很高的比率,而且他们采用的是相同的启动子,这也许与要干扰的目的基因本身有关,但也无法排除启动子后首先连接反义片段的形式对于 RNA 干扰的效果更好。这一问题还需进一步试验证实。本研究构建的 RNAi 干扰

载体结构与 Neil 等的相同。

构建植物 RNA 干扰的表达载体时,应当考虑到启动子影响。众所周知,启动子强弱对于外源基因的表达水平有重要的影响。虽然 CaMV 35S 启动子是应用较为广泛的启动子,但由于木质素是构成细胞支架的主要成分之一,若过早或异位表达,极有可能破坏植物中原有的结构,从而影响整个植物的正常生理活动。因此本研究选择棉纤维组织特异性启动子 E6 控制目的片段的转录,使 CAD 基因仅在棉纤维中失活,进而研究 CAD 基因在棉纤维发育和木质素代谢途径中的作用。

RNAi 载体构建过程中,干扰片段的长度和在靶基因中的位置将影响 RNAi 的效率和效果<sup>[16]</sup>。Hammond 等<sup>[20]</sup>认为干扰片段在 300 ~ 500 bp 之间干扰效果好,太长或太短干扰效果都不太好。一般认为靶基因序列应选择基因编码区片段。理论上,选择保守序列片段有可能同时沉默一族基因,选择非保守序列则会提高沉默单个基因的效率。为了保证沉默基因的效率,本研究选用 CAD 基因家族同源性较高的一段 417 bp 的 NBD 区序列作为干扰片段,通过沉默整个 CAD 家族基因来研究其在棉纤维发育和木质素代谢途径中的作用。目前,本研究构建的植物表达载体转化棉花的试验正在进行。

参考文献:

- [1] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(19): 806 - 811.
- [2] Smith N A, Singh S P, Wang M B, et al. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs[J]. Nature, 2000, 407: 319 - 320.
- [3] 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: 4985 - 4990.
- [4] 康国章,肖向红,王永华,等. 小麦淀粉 *GBSSH* 基因的克隆、反义和 RNAi 载体的构建[J]. 华北农学报, 2008, 23(1): 7 - 11.
- [5] 朱红林,沙爱华,符秀梅,等. 转录调控基因 *GmLECI* 的 cDNA 克隆及其植物表达载体的构建[J]. 华北农学报, 2009, 24(1): 64 - 68.
- [6] Mansell R L, Gross G G, Stockigt J, et al. Purification and properties of cinnamyl alcohol dehydrogenase from higher plants involved in lignin biosynthesis [J]. Phytochemistry, 1974, 13: 2427 - 2435.
- [7] Halpin C, Knight M E, Foxon G A, et al. Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase[J]. Plant J, 1994, 6: 339 - 350.
- [8] Baucher M, Chabbert B, Platte G, et al. Red xylem and higher

- lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar[J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 1479 - 1490.
- [9] Baucher M, Bernard-Vailh  M A, Chabbert B, *et al.* Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility[J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 437 - 447.
- [10] Ralph J, MacKay J J, Hatfield R D, *et al.* Abnormal lignin in a loblolly pine mutant[J]. *Science*, 1997, 277: 235 - 239.
- [11] Fan L, Shi W J, Hu W R, *et al.* Molecular and biochemical evidence for phenylpropanoid synthesis and presence of wall-linked phenolics in cotton fibers[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, received.
- [12] Paterson A H, Lan Der E S, Hewitt J D. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 122 - 127.
- [13] Mette M F, Aufsatz W, van der Winden J, *et al.* Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA[J]. *EMBO J*, 2000, 19: 5194 - 5520.
- [14] Sijen T, Vijn I, Rebocho A, *et al.* Transcriptional and post-transcriptional gene silencing are mechanistically related[J]. *Curr Biol*, 2001, 11: 436 - 444.
- [15] Chan S W-L, Zilberman D, Xie Z, *et al.* RNA silencing genes control de novo DNA methylation[J]. *Science*, 2004, 303: 1336.
- [16] 黄冰艳, 吉万全, 郭蔼光, 等. 转录后基因沉默 (PTGS) 及其在作物遗传改良中的应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(5): 1 - 5.
- [17] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, *et al.* Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants[J]. *Plant J*, 2001, 27: 581 - 590.
- [18] 王雷, 种康, 许智宏. 植物功能基因组学研究的有效工具 - RNAi 技术[J]. *植物生理学通讯*, 2003, 39(6): 705 - 710.
- [19] Neil A S, Surinder P S, Wang M B, *et al.* Total silencing by intron spliced hairpin RNAs[J]. *Nature*, 2001, 407: 319 - 320.
- [20] Hammond S M, Bernstern E, Beach D. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. *Nature*, 2000, 404(16): 293 - 296.