

利用 RNAi 技术抑制 马铃薯类受体激酶基因(*StRLK*) 表达的研究

朱云¹ 樊娜娜² 于耀华¹ 张柏顺² 杨煜² 晁祥建² 郭宝太¹ 金黎平³ 郭晓² 李广存^{1,2}

(1. 青岛农业大学 生命科学院, 山东 青岛 266109; 2. 山东省农业科学院 蔬菜研究所 国家蔬菜改良中心山东分中心, 山东省
设施蔬菜分子生物学重点实验室, 山东 济南 250100; 3 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 植物类受体蛋白激酶(Receptor-like protein kinase ,RLK) 是蛋白激酶的一个亚家族, 参与植物的信号转导, 在植物生长发育、抗病等过程中起重要作用。在前期研究中自二倍体马铃薯高抗青枯病基因型 ED13 中获得了类受体蛋白激酶基因 *StRLK*。利用 *StRLK* 基因的特异区段, 以 pUCCRNai 为中间克隆载体、pCHF1 为植物表达载体, 构建了该基因的 RNA 干扰载体 pCHF1-*StRLK*。进一步以 ED13 的茎段为外植体, 利用农杆菌介导法将 pCHF1-*StRLK* 导入 ED13 中, 获得了 5 株再生植株。用 CaMV35S 启动子特异引物对 5 株再生植株进行 PCR 扩增, 均得到大小约 500 bp 的特异性条带, 初步证明 pCHF1-*StRLK* 成功转入 ED13。以 ED13 为对照, 利用 *StRLK* 基因的特异引物对这 5 株再生植株进行半定量 RT-PCR 分析, 结果表明, 该基因的表达在 5 个转基因植株中均受到了不同程度的抑制, 说明导入的 pCHF1-*StRLK* 发挥了干扰活性, 且干扰效果与基因的插入位点有关, 为进一步研究 *StRLK* 基因的功能提供依据。

关键词: 二倍体马铃薯; *StRLK* 基因; 遗传转化; RNA 干扰

中图分类号: Q78; S532.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)04-0018-05

RNA Interference Analysis of Receptor-like Kinase Gene (*StRLK*) in Potato

ZHU Yun¹, FAN Na-na², YU Yao-hua¹, ZHANG Bai-shun², YANG Yu², CHAO Xiang-jian²,
GUO Bao-tai¹, JIN Li-ping³, GUO Xiao², LI Guang-cun^{1,2}

(1. Life Science College of Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. Vegetable Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, National Improvement Center for Vegetable, Shandong Branch, Molecular Biology Key Laboratory of Shandong Facility Vegetable, Jinan 250100, China; 3. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Plant receptor-like protein kinases (RLKs) are the subfamily of protein kinases and participate plant signal transduction. RLKs play an important role in growth, development and disease resistance in plants. In the previous study, we have obtained the potato receptor-like protein kinase gene (*StRLK*) from diploid potato genotype ED13 with high resistance to *Ralstonia solanacearum*. The specific fragment of *StRLK* was used to construct RNAi vector pCHF1-*StRLK* through the intermediate cloning vector pUCCRNai and plants expression vector pCHF1. Then the pCHF1-*StRLK* was transferred into ED13 via agrobacterium-mediated transformation using the stems of ED13 as explants, and finally five transgenic regeneration lines were obtained. The five lines were tested with polymerase chain reaction (PCR) using the specific primers of CaMV35S promoter, and the results showed that about 500bp PCR products were got in all of them, indicating that all of the five lines are transgenic lines. RT-PCR analysis of *StRLK* gene expression in the five transgenic lines were also performed using the *StRLK* specific primers with ED13 as control. The results showed that the *StRLK* gene expression were inhibited in different level in the five different lines, demonstrated that pCHF1-*StRLK* had played interference activity and the interference effect was related to gene insertion site in the potato genome, which would provide some references in the function study of *StRLK* gene.

收稿日期: 2012-05-14

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-40-ES10); 国家科技支撑项目(2012BAD02B05); 山东省自然科学基金项目(Y2007D24; ZR2010CQ025); 人力资源和社会保障部留学回国人员科技活动项目择优资助项目

作者简介: 朱云(1987-), 女, 安徽马鞍山人, 在读硕士, 主要从事马铃薯抗病分子育种研究。樊娜娜为同等贡献作者。

通讯作者: 郭晓(1979-), 女, 山东新泰人, 助理研究员, 硕士, 主要从事马铃薯抗病育种研究。

Key words: Diploid potato; *StRLK* gene; Genetic transformation; RNA interference

马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 适应性强、产量高、营养丰富,是仅次于水稻、小麦和玉米的世界第四大粮食作物,然而病害却是影响其生产的主要因子。其中,由青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) comb. nov., 原名 *Pseudomonas solanacearum*) 引起的马铃薯青枯病是一种毁灭性土传病害^[1],严重威胁马铃薯的生产。目前尚无有效防治措施,选育抗性品种才是防治该病的根本途径。根据 Hawkes 的分类,已发现马铃薯有 235 个种,其中 7 个栽培种,228 个野生种,能结薯的种有 176 个^[2]。目前尚未在马铃薯栽培种中发现有效的青枯病抗源;马铃薯野生种多为二倍体,含有大量青枯病抗性基因及优良品质性状基因,从二倍体马铃薯野生种中克隆抗病基因并进行同源基因转化、培育抗病品种是一条重要而有效的途径。

类受体蛋白激酶 (Receptor-like protein kinase, *StRLK*) 属于蛋白激酶的一个亚家族^[3],大多数植物类受体激酶具有胞外 N 端信号肽 (SP)、胞外受体结构域 (ECLB)、跨膜结构域 (TM) 和蛋白激酶接触反应域 (PKC) 等的功能结构域^[4]。这些功能结构域组成了植物信号转导的通道,以便使植物细胞通过接受和反馈外界刺激的方式调节自身,适应生存。

类受体蛋白激酶可作为植物信号转导的一部分,在植物生长发育、抗病过程中起重要作用。研究表明,植物 RLKs 可以识别和接受病原信号物,激活胞内激酶域发生磷酸化反应,完成信号转导,进而刺激植物产生防御反应,从而起到抗病作用^[5]。虽然植物 RLKs 在抗病反应中起了重要作用,但其参与抗病防御反应的全过程尚未研究清楚,人们以水稻 *CRINKLY4* 的胞外域作为诱饵蛋白,寻找到 *CRINKLY4* 的胞外结合蛋白,这为类受体蛋白激酶研究提供了方向^[6]。*StRLK* 是自马铃薯中获得的类受体蛋白激酶基因,为了获得该基因的功能,有必要首先进行基因转化和表达研究。

本实验室以高抗青枯病二倍体基因型 ED13 为材料,利用抑制差减杂交 (SSH) 和 cDNA 宏阵列筛选相结合,得到了类受体蛋白激酶基因 *StRLK*,该基因与已发表 *RHG1* (EST 序列号 AF506516) 基因的核苷酸序列一致性达 74%,并初步判断在马铃薯的抗病反应过程中具有信号转导和转录因子的功能^[7]。本研究的目的是利用 *StRLK* 基因的特异区段构建该基因的 RNAi 植物表达载体 pCHF1-*StRLK*,并用农杆菌介导法将该 RNAi 植物表达载体

pCHF1-*StRLK* 转入 ED13 中并进行该基因的表达分析,为进一步研究该基因的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植株材料 二倍体马铃薯抗青枯病基因型 ED13 由中国农科院蔬菜花卉研究所马铃薯组提供,其遗传背景见文献^[8]。生化试剂购自 TaKaRa 公司,玉米素 (ZT)、激动素 (KT)、6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 等植物激素和相关酶试剂均购自 Sigma 公司。pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司,大肠杆菌菌株 DH5 α 、pUCCRNAi 质粒载体、pBI121 及 pCHF1 植物表达载体为本实验室保存。

1.1.2 DNA 引物 *StRLK* 基因、*Actin* 基因及 CaMV35S 启动子的特异引物由上海生工生物工程公司合成。引物序列分别为: *StRLK*-F: 5'-AGGGCTACATT-AGAAGATG-3', *StRLK*-R: 5'-CTATTCTCATCCTTGT-TGGC-3'; *Actin*-F: 5'-GATGGTGTGACCCACAC-3', *Actin*-R: 5'-ATTCCAGCAGCTTCCATTCC-3'; 35S-F: 5'-AGAGAGGCTTACGCAGCAGG-3'; 35S-R: 5'-GAT-AGCTGGGCAATGGAATCC-3'。

1.2 方法

1.2.1 RNAi 载体 pCHF1-*StRLK* 的构建 CTAB 法提取 ED13 基因组 DNA,并以此为模板,利用 *StRLK* 基因的特异引物进行 PCR 扩增,回收扩增产物,连接到 pMD18-T 载体上,命名为 pMD18-*StRLK*,并测序确认。用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切 pMD18-*StRLK*,得到约 285 bp 的小片段,回收后与经同样双酶切的中间质粒载体 pUCCRNAi 的大片段连接,转化大肠杆菌获得重组质粒,命名为 pUC-1-*StRLK*。

用 *Xho* I 和 *Bgl* II 双酶切 pUC-1-*StRLK*,回收大片段,并与用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切 pMD18-*StRLK* 回收的小片段连接,转化大肠杆菌获得重组质粒,命名为 pUC-2-*StRLK*。用 *Pst* I 酶切 pUC-2-*StRLK*,回收约 780 bp 目的片段,与经同样内切酶 *Pst* I 消化后且去磷酸化的植物表达载体 pCHF1 相连,获得 *StRLK* 基因的植物干扰表达载体 pCHF1-*StRLK*。

1.2.2 马铃薯茎段的转化 pCHF1-*StRLK* 转化农杆菌 LBA4404 后获得工程菌株,然后用于体 keHOU 马铃薯茎段外植体的遗传转化。参照已报道的方法^[9]进行转化,具体操作为:无菌条件下,将 R₃B (MS 培养基基础上添加 2.0 mg/L NAA 与 2.0 mg/L 6-BA 调 pH 值 5.8) 培养基倒入灭菌的培养皿中,稍

凝固后铺上两层灭菌的滤纸,再加入 PACM(MS 培养基基础上添加 1.0 mg/L KT、1.5 mg/L 2,4-D 和 0.2% 的酪蛋白水解物调 pH 值 6.5) 培养基。

取培养 25 ~ 30 d 的健壮马铃薯苗的茎段置于滤纸上 (25 ± 1) °C、16/8 h 光暗交替条件下培养,光照强度为 2 000 ~ 3 000 lx; 预培养 2 d 后,将茎段浸入 OD₆₀₀ 为 0.5 的农杆菌菌液中侵染 10 min,再转回 R₃B 培养基 28°C 暗培养 2 d; 将茎段外植体接种到含有 50 mg/L 的庆大霉素(Gen)、1.0 mg/L 玉米素(ZT) 和 150 mg/L 特美汀(Tim) 的 MS 培养基上,每 2 周继代 1 次。待不定芽长至 2 ~ 3 cm 时,剪下接种到含有 50 mg/L 的庆大霉素的 MS 培养基上,选取生根的植株扩繁后进行 PCR 检测。

1.2.3 抗性植株的 PCR 鉴定 CTAB 法提取庆大霉素抗性生根的再生苗叶片的基因组 DNA,以 ED13 的基因组 DNA 为对照,利用 CaMV35S 启动子特异引物进行 PCR 扩增。PCR 程序为: 95°C 预变性 3 min; 94°C 30 s, 61°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 最后 72°C 5 min, 4°C 保存,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 抗性植株的 RT-PCR 分析 取 50 ~ 100 mg 的植物组织,液氮研磨,TRIzol 法提取 RNA 后,用 *StRLK* 基因的特异引物进行 PCR 检测,确证所提取的总 RNA 中无 DNA 污染后,参照 Fementas 试剂盒

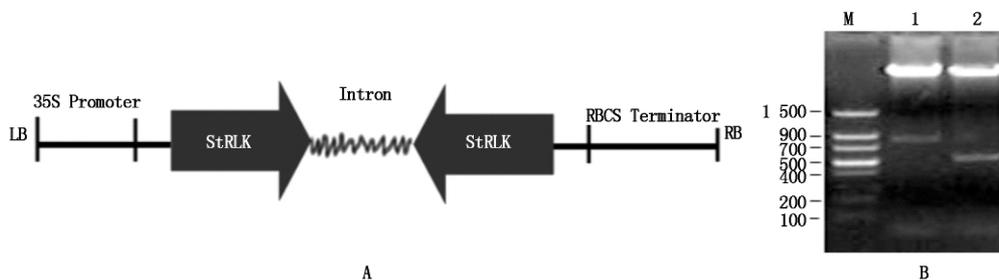
说明书,合成 cDNA,并用 *Actin* 引物对合成的 cDNA 进行平衡调节,使转基因植株和对照植株的 cDNA 经 PCR 扩增后,在 1.2% 的琼脂糖凝胶上的条带亮度趋于一致,再用 *StRLK* 基因的特异引物扩增检测。

2 结果与分析

2.1 类受体激酶基因(*StRLK*) RNAi 植物表达载体的构建

以 pUCCRNAi 为中间载体,利用同尾酶分别消化 pUCCRNAi,将 *StRLK* 基因的 RNAi 片段反向插入到 pUCCRNAi 的 2 个酶切位点,继而将该反向互补的 RNAi 片段自 pUCCRNAi 载体上切下,并连接到植物表达载体 pCHF1 上,构建了 *StRLK* 基因的 RNA 干扰载体 pCHF1-*StRLK*(图 1-A),反向插入的 *StRLK* 基因片段大小约为 285 bp,在两个反向互补 *StRLK* 基因片段之间的 intron 片段来自于马铃薯,大小为 199 bp,此结构易于形成发卡结构,发挥 RNA 干扰活性。

将获得的 RNA 干扰载体 pCHF1-*StRLK* 阳性克隆大量提取质粒,分别选用 *Pst* I 和 *Bam*H I 单酶切,酶切获得的小片段大小分别约为 850 bp 和 570 bp,与预期大小一致(图 1-B),即获得了目的重组载体。将该植物表达载体转入农杆菌 LBA4404,以用于马铃薯的遗传转化。



M. Marker; 1. pCHF1-*StRLK*/*Pst* I; 2. pCHF1-*StRLK*/*Bam*H I.

图 1 pCHF1-*StRLK* 载体的结构图(A) 及其酶切图谱(B)

Fig. 1 Structure map of pCHF1-*StRLK* vector(A) and its restriction enzyme digestion pattern(B)

2.2 二倍体马铃薯基因型 ED13 茎段外植体的遗传转化

利用含有 pCHF1-*StRLK* 的农杆菌 LBA4404 侵染马铃薯高抗青枯病基因型 ED13 的茎段外植体,经 50 mg/L 的庆大霉素初步筛选后,获得了 5 株抗性植株(图 2-A)。利用 CaMV35S 启动子的特异引物,以 ED13 基因组 DNA 为对照,对抗性再生植株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,结果表明,除对照 ED13 外,其他 5 株再生植株均扩增出了约 500 bp 的片段,与预期结果一致(图 2-B),证明转基因再生植株中均含有外源的 CaMV35S 启动子,也初步证明

了外源基因已被成功转入到受体基因型 ED13 中。

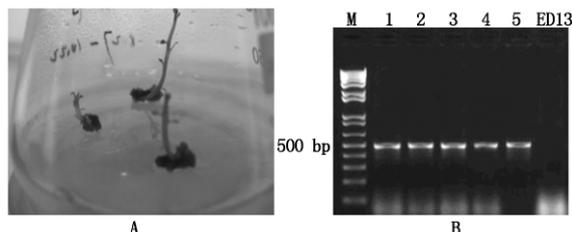
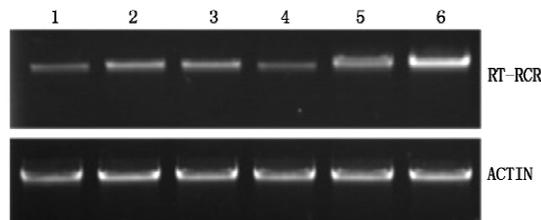


图 2 转基因植株再生苗(A) 和再生苗的 PCR 检测(B)

Fig. 2 Transgenic regeneration buds(A) and its PCR identification(B)

2.3 转基因再生植株中类受体激酶基因 (*StRLK*) 的表达检测

为进一步验证 *StRLK* 基因在所获得再生植株中的表达是否受到抑制, 首先提取转基因再生植株和对照植株 ED13 的总 RNA, 并反转录成 cDNA 后, 利用看家基因 *Actin* 的特异引物进行调节, 使转基因再生植株和对照植株 ED13 的 cDNA 量趋于一致 (图 3)。以 ED13 为对照, 利用 *StRLK* 基因的特异引物检测经平衡调节后的转基因再生植株的 cDNA, 结果表明 5 个转基因植株的 RT-PCR 的扩增带亮度与对照相比, 均有不同程度的减弱 (图 3), 说明 *StRLK* 基因在 5 个转基因再生植株中的表达受到不同程度的抑制, 其中 1 号和 4 号转基因植株中 *StRLK* 基因的表达受到的抑制较强, 2 号和 3 号受到的抑制次之, 5 号受到的抑制最弱。同时进一步证明了这 5 个再生植株确为转基因植株。



1~5. 转基因植株; 6. 对照 ED13。

1-5. Transgenic plants; 6. ED13 control.

图 3 类受体激酶基因 (*StRLK*) 在转基因植株中的表达检测

Fig. 3 RT-PCR test of *StRLK* gene in transgenic plants

3 讨论

3.1 马铃薯类受体蛋白激酶

与动物中的受体激酶类似, 植物中的蛋白激酶是一类定位在质膜上, 包含胞外结构域、跨膜结构域和胞内激酶域的膜蛋白^[10]。植物中的类受体激酶 (RLKs) 可分为具有 S-结构域型、富含亮氨酸重复序列和亮氨酸序列型、类表皮生长因子和类肿瘤坏死因子受体型、类凝集素或 PR5 等类型^[11]。类受体蛋白激酶在植物体内起着重要的信号转导作用, 几乎参与了所有的细胞代谢过程, 在植物的抗病过程中起重要作用。例如, 番茄类受体激酶基因 *Bti9* 及其相关基因与抗假单孢菌有关^[12]; 对易感白粉病的大麦接种牛生长激素 (Bhg) 后, 大麦中富含半胱氨酸的类蛋白激酶 *HvCRKs* 的表达量会快速积累, 表明 *HvCRKs* 蛋白对 Bhg 具有抗性作用^[13]。本实验室前期通过半定量 RT-PCR 方法研究了马铃薯类受体蛋白激酶在生物和非生物胁迫下的诱导表达, 发现 *StRLK* 基因受青枯病菌的诱导, 却不受茉莉酸 (JA) 的调节, 推测该激酶可能是作为受体参与了信

号识别和抗青枯病的反应^[7]。

3.2 马铃薯类受体激酶基因在转基因植株中的表达分析

RNA 干扰技术是一种验证基因功能的快速、高效的途径, 并已取得大量进展^[14-15]。自 1998 年 Fire 等发现双链 RNA (dsRNA) 能够沉默与其高度同源的基因表达后, RNAi 现象陆续在真菌、果蝇、拟南芥等多种真核生物中被发现^[16]。例如, 通过采用 RNAi 技术沉默内源 *Sbe 1* 和 *Sbe 2*, 获得了高直链淀粉含量的马铃薯材料^[17]; 采用 RNAi 技术敲除 ATP/ADP 的运输基因, 获得了马铃薯高产量的蛋白重组反应器^[18]。RNA 干扰具有高效性、特异性、位置效应等特点^[19], Holen 等^[20] 根据 TF (tissue factor) 不同的位置各合成了 4 组双链 RNA 来检测不同位置的双链 RNA 对基因沉默效率的影响, 结果表明双链 RNA 对 mRNA 的结合部位有碱基偏好性。*StRLK* 基因在本试验所获得的 5 个转基因植株中的表达受到不同程度的抑制 (图 3), 可能是由于 pCHF1-*StRLK* 在这 5 个转基因植株基因组中的插入位点不同所致。近来研究表明在 RNA 干扰过程中, siRNA 和 mRNA 特异结合能够使得靶基因沉默, 但 siRNA 还可以与非靶基因结合而导致非靶基因沉默而产生 RNAi 脱靶效应^[21], 脱靶效应是影响 RNAi 效率的重要原因之一, 还会引起转基因生物潜在的或者未知的毒性基因表达^[22], 这一发现为 RNAi 技术抑制效率的提高提供了研究方向, 也为本试验中 5 个转基因植株的表达程度不同提供了参考, 可以推断抑制效率的不同也可能是由于脱靶效应而导致了 RNA 干扰效率大大减小。鉴于 *StRLK* 基因在转基因再生植株中受抑制效果, 有必要进一步构建该基因不同区段的 RNAi 表达载体, 并进行遗传转化以获得更好的干扰效果。总之, 本研究通过 RNA 干扰技术获得了转基因植株, 并进行了该基因在转基因植株中的表达分析, 为今后利用该基因提供了依据。

参考文献:

- [1] Martin C, French E R. Bacterial wilt of potato [M]. Peru Lima: Technical Information Bulletin 13 CIP, 1985; 16-18.
- [2] Hawkes J G. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources hard cover [M]. London: Belhaven Press, 1990.
- [3] 牛吉山. 植物和小麦蛋白激酶的研究现状 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(1): 143-150.
- [4] 闫锋, 祝传书, 庞保平. 植物类受体蛋白激酶的研究进展 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(4): 851-858.
- [5] Schwessinger B, Roux M, Kadota Y, et al. Phosphoryla-

- tion-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase *BAKI* [J]. *PLoS Genet* 2011, 7(4): 1–17.
- [6] 姚清国, 李晓芹, 周二鹏, 等. 水稻类受体激酶 CRINKLY4 胞外结合蛋白的研究 [J]. *湖北农业科学* 2011, 50(14): 2982–2984.
- [7] Li G C, Jin L P, Wang X W, et al. Gene transcription analysis during interaction between potato and *Ralstonia solanacearum* [J]. *Russian Journal of Plant Physiology* 2010, 57(5): 685–695.
- [8] Qu D Y. Use of unreduced gametes of potato (*Solanum tuberosum* L.) for true potato seed production through 4x-2x crosses [M]. Wageningen: Plant Breeding, 1996, 104: 38–46.
- [9] 晁祥健, 杨煜, 金黎平, 等. 二倍体马铃薯高效再生体系的建立 [J]. *园艺学报* 2009, 36(1): 109–114.
- [10] Hubbard S R, Miller W T. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling [J]. *Curr Opin Cell Biol* 2007, 19(2): 117–123.
- [11] 石翠翠, 高雷更, 惠颖, 等. 植物类受体蛋白激酶的研究进展 [J]. *河北师范大学学报: 自然科学版*, 2010, 34(2): 216–219.
- [12] Zeng L, Velásquez A C, Munkvold K R, et al. A tomato *LysM* receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB [J]. *The Plant Journal* 2011, 69(1): 92–103.
- [13] Rayapuram C, Jensen M K, Maiser F. Regulation of basal resistance by a powdery mildew-induced cysteine-rich receptor-like protein kinase in barley [J]. *Mol Plant Pathol* 2011, 13(2): 135–147.
- [14] Papon N, Vansin A, Gantet P. Histidine-containing phototransfer domain extinction by RNA interference turns off a cytokinin signaling circuitry in *Catharanthus roseus* suspension cells [J]. *FEBS Lett* 2004, 558: 85–88.
- [15] Koga A, Ishibashi T, Kimura S. Characterization of T-DNA insertion mutants and RNAi silenced plants of *Arabidopsis thaliana* UV-damaged DNA binding protein 2 (AtUV-DDB2) [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006(4): 227–240.
- [16] 王永佳, 陈永胜, 李国瑞. RNAi 在植物中的作用机理及其应用研究进展 [J]. *内蒙古民族大学学报: 自然科学版* 2010, 25: 55–58.
- [17] 郭志鸿, 张金文, 王蒂, 等. 用 RNA 干扰技术创造高直链淀粉马铃薯材料 [J]. *中国农业科学* 2008, 41(2): 494–501.
- [18] Tremblay R, Diao H, Hüner N, et al. The development of a high-yield recombinant protein bioreactor through RNAi-induced knockdown of ATP/ADP transporter in *Solanum tuberosum* [J]. *J Biotechnol* 2011, 156(1): 59–66.
- [19] 张森浩, 严学兵, 王成章, 等. RNA 干扰及其在植物中的研究进展 [J]. *草业科学* 2011, 28(5): 823–830.
- [20] Holeu T, Amarzguioui M, Wiig M T, et al. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor [J]. *Nucleic Acid Research* 2002, 30(8): 1757–1766.
- [21] 赵德尧. siRNA 特异性及脱靶效应的研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学 2010.
- [22] Jackson A L, Linsley P S. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application [J]. *Nat Rev Drug Discov* 2010, 9(1): 57–67.