

RNA 干扰技术抑制草莓 *FaEtr2* 基因表达的研究

宋春丽¹, 马俊莲¹, 唐霞¹, 张子德¹, 赵丛枝¹, 李静²

(1. 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071000; 2. 保定市保中食品有限公司, 河北 保定 071000)

摘要: 采用 RNA 干扰技术抑制草莓乙烯受体基因表达, 以延缓草莓成熟软化进程。以测序质粒为模板, PCR 扩增草莓 *FaEtr2* 基因片段。双酶切正、反义 PCR 产物及表达载体, 将酶切产物定向连接到 pBI121 载体上, 构建成该基因的 shRNA (Short hairpin RNA) 表达载体, 由此转录的 mRNA 因两端序列反向互补而成发夹式 RNA, 可应用于 RNA 干扰的研究。将构建好的载体转化根癌农杆菌 LBA4404, 用基因工程菌菌液浸染千代田草莓组培苗叶片, 用卡那霉素筛选抗性植株。PCR 检测和 GUS 组织化学染色检测到 4 个株系的转基因植株。

关键词: 草莓; *FaEtr2* 基因; RNA 干扰; 遗传转化

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)01-0028-03

Inhibition of Strawberry *FaEtr2* Gene Expression by RNA Interfering

SONG Chun-li¹, MA Jun-lian¹, TANG Xia¹, ZHANG Zi-de¹, ZHAO Cong-zhi¹, LI Jing²

(1. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China;

2. Zhongbao Food Co. Ltd., Baoding 071000, China)

Abstract: In order to delay the ripening and softening process of strawberry, RNA interference technology was used to inhibit strawberry ethylene receptor gene expression. Two pairs of primers containing restriction enzyme sites were designed and used to amplify sequenced plasmid. PCR products and the plasmid pBI121 were digested by the corresponding restricted enzymes respectively, and linked directionally. Then the shRNA expression vector can be designed. After transcription, the hairpin mRNA obtained due to the inverted-repeat DNA fragment. The constructed expression vector was transformed into *Agrobacterium* LBA4404 for the following-up genetic transformation research. Four strains of transgenic plants were detected by PCR and GUS histochemical staining.

Key words: Strawberry; *FaEtr2* gene; RNAi; Genetic transformation

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 是一种经济价值很高的果品, 但果实采后极易软化腐烂, 不耐贮藏, 造成很大的经济损失。传统的贮藏保鲜方法^[1]不能从根本上解决草莓贮藏保鲜问题。Livio 等^[2]从 Chandler 草莓中克隆得到草莓乙烯受体 *FaEtr2* 基因, 并证实属于系统 II 的乙烯受体 *FaEtr2* 基因在草莓成熟阶段大量表达, 可能与草莓成熟密切相关。Cancel 等^[3]认为 II 型乙烯受体有退化的组氨酸激酶结构域, 推断有少量乙烯就可能启动果实成熟相关的生理反应。因此, 抑制 *FaEtr2* 基因表达将有望延缓草莓成熟软化进程, 从而从根本上解决草莓采后软化问题。RNA 干扰技术是目前进行基因干涉、引起基因沉默的有效手段, 常被用于基因功能研

究^[4]。为此, 本研究采用 RNA 干扰技术抑制草莓乙烯受体 *FaEtr2* 基因表达, 为通过基因工程手段改善草莓果实贮藏性能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料 千代田草莓无菌苗叶片。

1.1.2 试剂 各种酶、试剂盒均购自保定赛尔克生物技术有限公司及大连宝生物公司。大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌菌株 LBA4404 及 pBI121 植物表达载体由河北农业大学食品科技学院食品生物技术实验室保存。引物合成由北京三博远志生物技术有限公司完成。

收稿日期: 2013-06-30

基金项目: 河北农业大学博士基金项目 (ND2009001)

作者简介: 宋春丽 (1975-), 女, 河北沧县人, 讲师, 博士, 主要从事果蔬生物技术研究。

通讯作者: 马俊莲 (1964-), 女, 山西太原人, 教授, 博士, 主要从事果蔬生物技术研究。

1.2 试验方法

1.2.1 正、反向片段的扩增 设计带酶切位点的引物,扩增正、反向片段。扩增正向片段的引物对为:5'-GGGATCCACATTCTTCGCCAG-3', 5'-TATCCCGGGCTGGATTATCCAT-3'(含 *Bam*H I/*Sma* I 酶切位点)。扩增反向片段的引物对为:5'-TGGATCCAGTGGTGATTCTGGTGAG-3'; 5'-CCACTATCCTTGTCTAGATTATCCA-3', (含 *Bam*H I/*Xba* I 酶切位点)。以测序质粒为模板,PCR 扩增目的片段。PCR 产物经电泳检测后,切下目的条带,用胶回收试剂盒回收。

1.2.2 RNAi 植物表达载体的构建 分别用 *Bam*H I/*Sma* I,*Xba* I/*Bam*H I 和 *Xba* I/*Sma* I 双酶切正、反向 PCR 回收产物及载体 pBI121。电泳检测酶切产物,回收目的片段定向连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含有卡那霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 固体培养基上筛选阳性菌落,碱法提取质粒,酶切鉴定阳性克隆,重组质粒记为 pBI121-*ETR2*-RNAi。

1.2.3 RNAi 植物表达载体向农杆菌中的转化 采用冻融法将构建好的表达载体转化到农杆菌 LBA4404 感受态细胞,在含有 Kan (100 μ g/mL) 和 rif (50 μ g/mL) 的 YEB 固体培养基上筛选转化子。挑取阳性菌落,用特异性引物进行 PCR 扩增验证转化子。

1.2.4 pBI121-*ETR2*-RNAi 表达载体对草莓的遗传转化 用含表达载体的农杆菌菌液浸染预培养的千代田草莓组培苗叶片,无菌滤纸吸干多余菌液,将叶片接种在不含抗生素的再生培养基上,叶片与农杆菌共培养 3 d 后,转入含头孢霉素的杀菌培养基上培养 3 d,最后转入含卡那霉素的筛选培养基上培养。35 d 后,对抗性不定芽进行 PCR 检测和 GUS 染色检测。

2 结果与分析

2.1 正、反义片段的 PCR 扩增

以测序质粒为模板,PCR 扩增正向片段和反向片段。根据引物在序列上的位置,推断正、反向片段分别为 550,500 bp 左右。电泳检测 PCR 产物,泳带与预期大小一致,表明正、反向片段扩增正确(图 1)。

2.2 RNAi 植物表达载体酶切鉴定

用相应的限制性内切酶分别双酶切正反向片段及 pBI121 载体,回收目的片段定向连接,连接产物转化大肠杆菌,提取阳性克隆的质粒,酶切鉴定。若重组质粒构建正确,则被 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切,小片段长度约为 1.0 kb,包括正、反向片段;被 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,小片段长度约为 2.6 kb,包括正

向片段、GusA 和终止子;被 *Hind* III 和 *Sma* I 双酶切,小片段长度约为 1.9 kb,包括启动子和正、反向片段;被 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切,小片段约为 1.3 kb,包括启动子和反向片段。琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,结果与预期一致,说明 *FaEtr2* 基因的 RNAi 植物表达载体构建成功(图 2)。

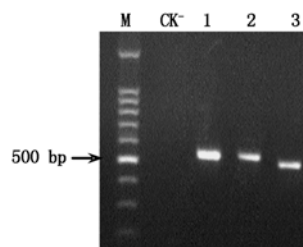


图 1 PCR 产物电泳图谱
Fig. 1 Agrose gel electrophoretogram of PCR products

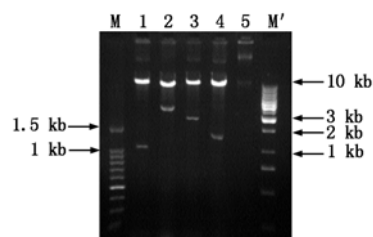


图 2 RNA 干扰表达载体酶切检测
Fig. 2 Detection of the RNAi expression vector digested by enzymatic

图 3 农杆菌中 RNA 干扰表达载体菌液 PCR 电泳图
Fig. 3 Agrose gel electrophoretogram of RNAi-expression vector transformed *Agrobacterium fumeifeciens* LBA4404

图 3 农杆菌中 RNA 干扰表达载体菌液 PCR 电泳图
Fig. 3 Agrose gel electrophoretogram of RNAi-expression vector transformed *Agrobacterium fumeifeciens* LBA4404

图 3 农杆菌中 RNA 干扰表达载体菌液 PCR 电泳图
Fig. 3 Agrose gel electrophoretogram of RNAi-expression vector transformed *Agrobacterium fumeifeciens* LBA4404

2.3 农杆菌中表达载体的菌液 PCR 鉴定

挑取阳性单菌落在含有 Kan (100 μ g/mL) 和 rif (50 μ g/mL) 的 YEB 液体培养基中培养,用特异性引物进行菌液 PCR 扩增,检测阳性克隆,同时以未

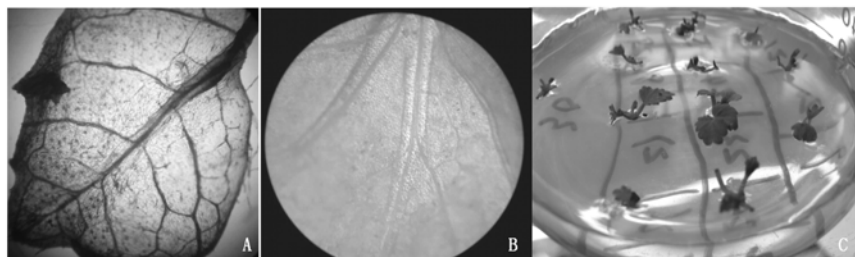
转化的质粒和未转化的农杆菌为模板做对照 PCR。若转化的农杆菌菌液中含有 pBI121-*ETR2*-RNAi 重组质粒,则 PCR 检测应得到略大于 500 bp 扩增片段。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,结果与预期一致(图 3)。表明 pBI121-*ETR2*-RNAi 重组质粒已转入农杆菌 LBA4404。

2.4 转化植株的 GUS 组织化学染色及 PCR 检测结果

待抗性芽生长至 1~2 cm 高时,取抗性芽的叶片用 GUS 染色液进行染色,结果表明,100 个株系的

千代田草莓抗性芽中有 5 个株系的抗性芽叶片与 GUS 染色液反应,叶片显示蓝色(图 4)。GUS 阳性率为 5%。而对照叶片不能与 GUS 反应液反应显示蓝色。

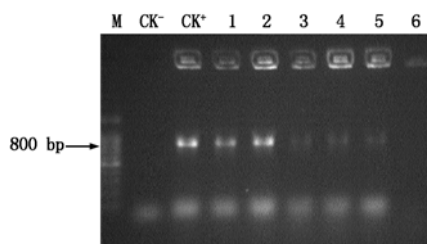
对 GUS 染色呈阳性的 5 个株系提取基因组 DNA 进行 PCR 检测,也均为阳性。初步证明草莓乙烯受体 *FaEtr2*-RNAi 基因已转入千代田草莓组培苗内(图 5)。PCR 扩增产物的 Southern 杂交检测正在进行之中。



A. 转基因植株叶片;B. 非转基因植株叶片;C. 转基因植株。
A. Transgenic plant leaf;B. Untransformed plant leaf;C. Transgenic plant.

图 4 转化植株的 GUS 检测

Fig. 4 Detection of transformed plant by GUS staining



M. 100 bp ladder Marker;CK⁻. 阴性对照;CK⁺. 阳性对照;
1~5. 转化植株;6. 未转化植株。
M. 100 bp ladder Marker;CK⁻. Negative control;CK⁺. PCR product
of the plasmid;1~5. Transgenic plant;6. Untransformed plant.

图 5 pBI121-RNAi 载体转化草莓
植株 PCR 检测电泳图谱

Fig. 5 PCR detection of transformed plants

3 讨论

草莓新鲜果实易软化,不耐贮运,极大地影响了其经济价值^[4]。通过调控果实成熟有关的基因表达,可以抑制或延缓草莓的成熟软化进程,减少采后损失。*FaEtr2* 基因在草莓果实成熟阶段大量表达,可能与草莓的成熟密切相关。RNA 干扰是近年来兴起的引起基因沉默的新方法,已经成为调控植物基因表达的有力工具^[5-10]。本研究采用 RNA 干扰技术抑制与草莓成熟有关的 *FaEtr2* 基因表达,获得 RNA 干扰 *FaEtr2* 植株,对研究乙烯对草莓成熟的影响、草莓乙烯信号转导及 *FaEtr2* 在信号转导中的作用模式有着重要的作用,为利用基因工程手段改善草莓果实的贮运性能奠定基础。

参考文献:

- [1] 赵英虎,阎小艳,高莉,等. 丁香乙醇提取液对草莓保鲜效果的影响[J]. 山西农业科学,2012,40(6):677-681.
- [2] Livio T, Anna P, Giorgio C. Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries; Does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits[J]. Journal of Experimental Botany,2005,56(418):2037-2046.
- [3] Cancel J D, Larsen P B. Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology,2002,129:1557-1567.
- [4] 江 舸,金由辛. RNA 干扰[J]. 生命科学,2003,15(1):1-6.
- [5] Pandolfini T, Molesini B, Avesani M, et al. Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the rolC promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection[EB/OL]. Http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/7. 2003.3
- [6] Thomas H, Gregor K, Wilfried S. RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) by agroinfiltration; a rapid assay for gene function analysis[J]. The Plant Journal,2006,48(5):818-826.
- [7] 朱 云,樊娜娜,于耀华,等. 利用 RNAi 技术抑制马铃薯类受体激酶基因(*SrRLK*)表达的研究[J]. 华北农学报,2012,27(4):18-22.
- [8] 王平安,吴刘记,杨艳坤,等. 转基因植物抗病毒策略及其风险分析[J]. 河南农业科学,2011,40(2):19-24.
- [9] 李 臻,张贵林,王庆国,等. 抗水稻黑条矮缩病 RNA 干扰载体的构建及遗传转化[J]. 华北农学报,2012,27(4):144-148.
- [10] 郭 强,褚 栋,范仲学. 凋亡抑制蛋白基因 dsRNA 转基因烟草表达载体的构建[J]. 天津农业科学,2013,19(1):6-10.