

新模式植物短柄二叶草 *SGT1* 和 *RAR1* 基因沉默和蛋白纯化载体构建

张岳平¹, 瞿华香²

(¹中南大学研究生院隆平分院, 长沙 410125 ²湖南农业大学农学院, 长沙 410128)

摘要: 短柄二叶草作为一种新型的模式植物, 已成为当前研究热点。其具有基因组小、生长周期短、生存环境简单和容易人工转化等重要生理和遗传特性, 被认为是一种潜力巨大的人类研究能源和粮食作物的重要模式植物。*SGT1* 和 *RAR1* 基因是高度保守的并与植物抗病功能紧密相关的重要基因。本文采用 Gateway 克隆技术构建了 *SGT1* 和 *RAR1* 的基因沉默表达载体。阳性克隆载体经 PCR 酶切和测序鉴定。为进一步研究 *SGT1* 和 *RAR1* 互作蛋白及其功能, 采用该克隆技术将基因 cDNA 全长克隆至串联亲和纯化蛋白表达载体 pEarleyGate205 中, 为纯化 *SGT1* 和 *RAR1* 及其互作蛋白提供了基础。正确的阳性克隆载体经农杆菌介导转化至短柄二叶草 Bd21 获得转化株, 以期进一步研究 *SGT1* 和 *RAR1* 基因及蛋白互作对于短柄二叶草抗病功能的影响。

关键词: 短柄二叶草; *SGT1* 和 *RAR1*; 基因沉默; Gateway 克隆; 串联亲和纯化

Construction of Effective High-Throughput Inducible RNA i and Tap-tag Vector for *SGT1* and *RAR1* Genes in the New Model Plant *Brachypodium distachyon*

ZHANG Yue-ping¹, QU Hua-xiang²

(¹Longping College of Graduate School, Central South University, Changsha 410125;

²Agriculture of College Hunan Agricultural university, Changsha 410128)

Abstract *Brachypodium distachyon*, which characters show a small genome size, a short lifecycle, simple cultivation condition and high transformation efficient is one of most popular model plants recently. The *SGT1* and *RAR1* genes are pretty important and well conserved genes related the plant resistant disease function. RNA interference (RNA i) is an excellent and major method to study the genes' function of plants nowadays. In this paper, we used the new powerful cloning system called Gateway Cloning to generate the high-throughput inducible RNA i gene silence vectors for these two important disease related genes in *Brachypodium distachyon*. Gateway Cloning system is a time-saving, easy to operating and high efficient molecular cloning technology. It concluded two steps which called BP reaction and LR reaction respectively. At the same time, we also used the Gateway Cloning to generate the protein TAP-tag fusion vectors which can be used for the study of the purification the *SGT1* and *RAR1* proteins and their interactive proteins in this new model plant *Brachypodium distachyon*. Finally we used the system *Agrobacterium* mediated transformation system (ATMT) to transform these RNA i and TAP-tag fusion vectors into *Brachypodium distachyon* genotype *Bd21*, and got the RNA i TAP-tag fusion plant transformants which can be used for further studying the function of these two genes related disease resistance in *Brachypodium distachyon* in future.

Key words *Brachypodium distachyon*; *SGT1* and *RAR1*; Gene silence; TAP; Gateway cloning

短柄二叶草 (*Brachypodium distachyon*) 属于早熟禾亚科, 广泛分布于地中海和中东地区, 作为一种新型

收稿日期: 2010-06-04 修回日期: 2010-08-15

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA10Z1A6-3); 国家“十一五”重大科技攻关项目 (2006BA520A01)

作者简介: 张岳平, 在读博士, 研究方向为植物与病原菌互作分子生物学。E-mail: zyp121715@163.com

©1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCcaccg-
catcagcg tggcgccac-3'(全长 *RAR1* 基因片段, 684bp)。下划
线部分为 attB 位点。扩增条件: 95℃ 3m in 预变性; 94℃
45s 58℃ 45s 68℃ 2m in 32个循环; 68℃ 10m in。

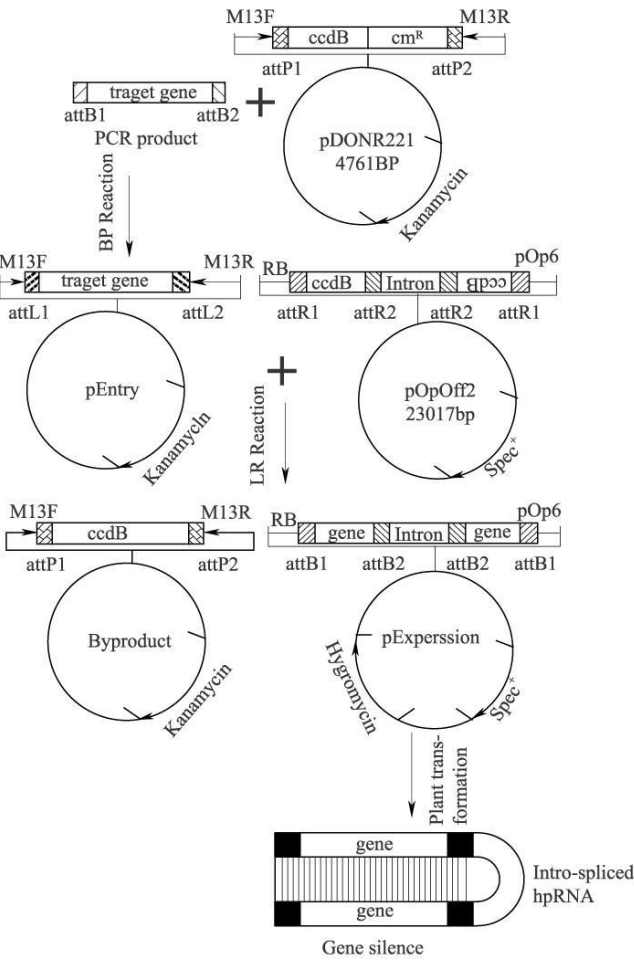


图 1 基因高通效沉默载体的构建示意图

Fig 1 Outline of the use of pOpOff2(HPH)
vector for the RNA gene silencing

Target genes with the attB1 and attB2 sites included into the PCR
primers This PCR product then is inserted into the pDONR221 vector by
recombination between attB1/attB2 and attP1/attP2 mediated through BP
Clonase to yield an intermediate clone The target gene fragment from the
intermediate clone is then inserted into the pOpOff2(HPH) vector through
recombination between attL1/attL2 and attR1/attR2 which mediated by
the LR Clonase Once the construct is expressed in plants through the
plant transformation a hairpin RNA (hpRNA) with the intron spliced out is
produced

1.5.2 TAP-tag 蛋白纯化载体的构建 载体构建
过程与基因沉默载体构建相似, 参见 1.4.2。此
pEarleyGate 205 为串联亲和纯化蛋白高效表达载
体^[12], 其载体图谱如下(图 2)。筛选阳性克隆时,
均用 LB 平板(kan⁺抗性)筛选。

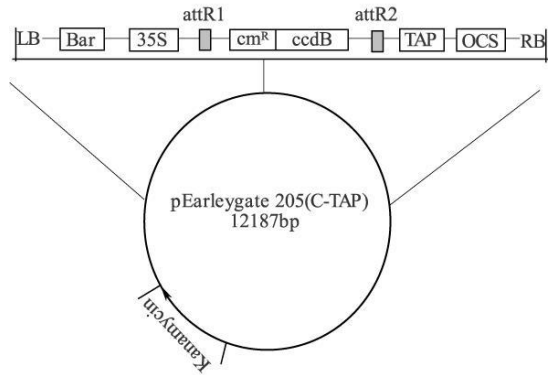


图 2 TAP-tag Gateway 克隆载体 pEarleygate205 图谱

Fig 2 Map of TAP-tag Gateway Cloning vector
pEarleygate 205

1.6 目标载体的鉴定

1.6.1 中间载体的鉴定 *SGT1* 和 *RAR1* 基因沉默
和蛋白纯化的中间载体 (pEntry-clone) 克隆首先经
过 PCR 扩增筛选, 筛选引物为 P13: 5'-AAACGACG-
GCCAGTCTTAA-3'; P14 5'-TGCCAGGAAACAGCT-
ATGA-3' (该筛选引物位于 pDONR221)。并进一步
对经 PCR 确认正确的克隆进行酶切和测序分析。
限制性内切酶分别为 Afl II 和 Ecor V。测序引物分
别为: M13 F: 5'-GTA AACGACG GCCAG-3', M13 R:
5'-CAGGAAA CAG CTATGAC-3'。

1.6.2 表达载体的鉴定 基因沉默表达载体由于
需确保得到正确的目的基因反向重复结构, 本文采
用单引物 PCR 筛选法, *SGT1* 用单引物 P15 5'-AG-
GACAAAGAGGATGGTGC-3'; *RAR1* 用单引物 P16
5'-CCATATTCA CCAGCGA CGA CAA-3' 进行筛选。蛋
白纯化载体由于不具有基因反向重复结构, 故筛选
引物设计为: P17 5'-CCGACAGTGGTCCCAAAGA-
3'; P18 5'-GGATGAAGGCGTTTCGTTG-3' (该筛选引
物位于 pEarleygate 205)。

1.7 表达载体的转化

表达载体采用农杆菌介导转化法 (*Agrobacteri-
um* mediated transformation system, ATMT) 转化至短
柄二叶草, 从而获得目的基因沉默和蛋白纯化转
化株。

2 结果与分析

2.1 短柄二叶草 *SGT1* 和 *RAR1* 基因的克隆

以生长 2 周的短柄二叶草幼苗叶片为材料提取
总 RNA, 以 RNA 为模板进行反转录 PCR 反应, 获得
总 cDNA。以反转录的 cDNA 为模板, 用引物 P1/P2
(*SGT1*) 和 P3/P4 (*RAR1*) 分别进行 PCR 扩增, 扩增
产物进行琼脂糖凝胶电泳, 得到如图 3 所示的 DNA

扩增条带。目的 DNA 条带用 DNA 凝胶纯化试剂盒进行回收,将回收的目的 DNA 片段分别克隆至 pGEM-T 载体上。测序反应后经 NCBI Blast alignment 分析,扩增的 cDNA 片段序列与短柄二叶草的 *SGT1* 和 *RAR1* 基因序列完全一致。

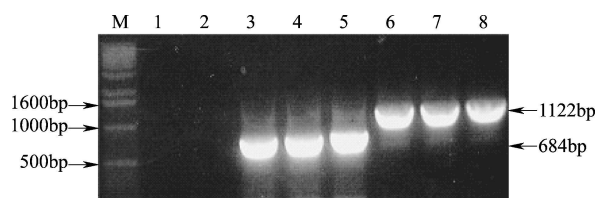


图 3 *SGT1* 和 *RAR1* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 3 The PCR result of *SGT1* and *RAR1* genes in *Brachypodium distachyon*

M: DNA marker; 1 阴性对照 1(H_2O); 2 阴性对照 2 (*Bd21* genome DNA); 3~5 *RAR1* cDNA PCR 产物; 6~8 *SGT1* cDNA PCR 产物

M: DNA marker; 1: Negative control 1(H_2O); 2 Negative control 2(*Bd21* genome DNA); 3-5 *RAR1* cDNA PCR product; 6-8 *SGT1* cDNA PCR product

2.2 中间载体 (pEntry 载体) 构建

以连接到 pEGM-T 载体上的目的基因序列为模板,采用引物 P2/P3 和 P4/P5 进行 PCR 扩增。获得 600bp 和 700bp 目的片段。用此目的 DNA 片段 (两端分别含 attB1 和 attB2 位点) 直接与入门克隆 pDONR221 进行 BP 反应,反应过程参照 1.4.2。反应体系 1 μ l 电转化至 *X-b1* 37 $^{\circ}C$ 过夜培养。Gateway 克隆的优势是操作简单且重组准确率较高,但因为随机插入等引起的假阳性也时有发生。中间载体是进行下一步 LR 反应的基础,确保其真实可信是应用 Gateway 克隆技术的关键。关于中间克隆载体的鉴定,大多认为只需确认基因片段存在于载体中即可,采用的是 PCR 扩增目的基因片段的方法,此法虽说简单,但是并不能鉴定排除随机插入等非正确重组克隆。本文将技术加以改良,提出了一种新的更为准确可信的鉴定方法。PCR 不去单纯扩增目的基因片段,而是将引物设计在供体 pDONR221 载体上,根据目的基因与 pDONR221 载体中的 *ccdB* 基因和 *am^R* 基因重组后中间载体的片段大小改变而真正确保得到正确的阳性克隆。如图 4(a) 所示,以位于 pDONR221 载体上的筛选引物 P13 和 P14 PCR 扩增后, pDONR221 模板出现如第一条泳道 2500bp 大小片段;而经成功的重组反应后,用于构建 *SGT1* 和 *RAR1* 基因沉默的中间载体模板分别出现 1200bp 和 1100bp 大小片段,

差异十分明显。蛋白纯化中间载体经 P13 和 P14 引物 PCR 扩增后,也出现了如图 4(b) 所示的预期条带。

对于 PCR 鉴定的阳性中间载体克隆进一步进行酶切鉴定。以 pDONR221 为对照,分别对 *SGT1* 和 *RAR1* 中间载体采用 *Afl* II 和 *Eco* V 双酶切反应,结果如图 5 所示。第一泳道上的 pDONR221 载体经 *Afl* II 和 *Eco* V 双酶切后,出现两个片段相近约 2300bp 的片段,在图上显示为一条带。重组后的中间载体分别同样切下一条 2300bp 大小的条带和另外一条包含目的基因的条带。这进一步证明 BP 反应重组成功。

经 PCR 和酶切验证后的中间克隆载体最终需要通过测序验证 PCR 扩增序列的准确率,以确保获得完全正确的中间克隆,为后续的 LR 反应奠定基础。本文的中间克隆通过采用测序引物 M13F 和 M13R 测序分析,所得序列结果通过 NCBI blast alignment 比对分析,序列与目的基因序列完全一致。

2.3 表达载体 (pExpression 载体) 构建

经过 BP 反应的正确的中间载体可直接用于与含有 attR 位点的目标克隆载体 pOpOfl (HPH) 或 pEarleygate 205 直接进行 LR 反应,以获得重组后的表达载体克隆。LR 反应后表达载体克隆的鉴定仍然需要经过 PCR 筛选和酶切分析确认。

本文所用的基因沉默目标载体 pOpOfl (HPH) 是植物构建基因沉默表达质粒中十分重要而高效的载体^[13]。由于需要构建为基因反向互补的结构,为确保得到正确的基因沉默表达载体,本文在进行 PCR 筛选克隆时,采用目的基因单引物筛选法,以鉴定真正的阳性克隆,筛选引物如 1.6.2 所述。图 6(a) 表明,用位于目的基因上的单引物进行 PCR 扩增后,未经 LR 重组的 pOpOfl (HPH) 载体为模板不能得到任何 PCR 目的条带,而重组成功后的表达载体为模板出现了清晰的目的条带。这充分证明目的基因已经重组至 pOpOfl (HPH) 载体,且出现了基因反向互补的发夹结构,为基因沉默提供了基础。

由于该载体大至 21.3kb 所含常规酶切位点很多,故用常规酶切质粒的方法不太适用于该载体的酶切鉴定。本文采用酶切 PCR 产物的方法,用以进一步鉴定。结果表明,PCR 产物经 *Kpn* I 酶切后的条带与预期一致见图 6(b)。

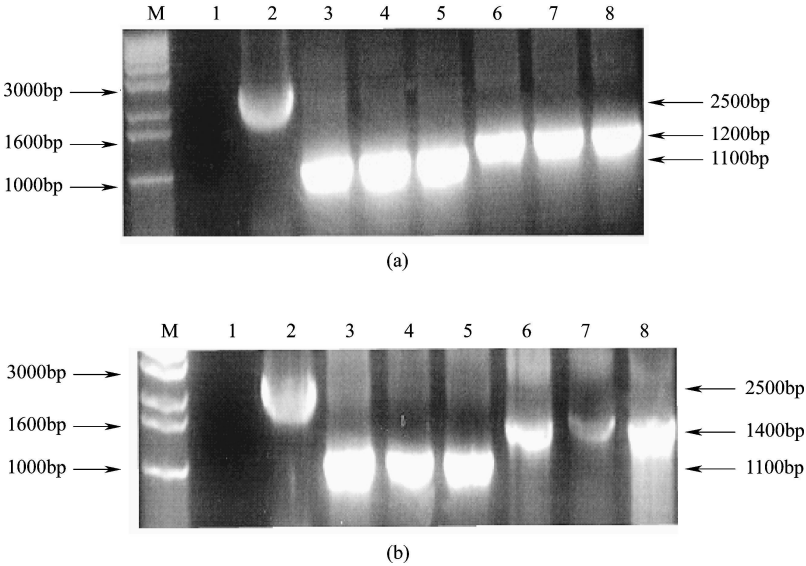


图 4 中间载体 pEntry-clone 的 PCR 鉴定

Fig 4 The PCR screening result of the pEntry-clone for the RNA i and TAP-tag constructs

(a) 为 RNA i 中间载体 PCR 鉴定。M: DNA marker; 1: 阴性对照 (H_2O); 2: 阳性对照 (pDONR221); 3~5 *RAR1* RNA i 中间载体; 6~8 *SGT1* RNA i 中间载体。(b) 为 TAP-tag 中间载体 PCR 鉴定。M: DNA marker; 1: 阴性对照 (H_2O); 2: 阳性对照 (pDONR221); 3~5 *RAR1* TAP-tag 中间载体; 6~8 *SGT1* TAP-tag 中间载体

(a) Identify of pEntry-clone for RNA i constructs M: DNA marker; 1: Negative control; 2: Positive control (pDONR221 DNA); 3-5 *RAR1* RNA i pEntry-clone PCR product; 6-8 *SGT1* RNA i pEntry-clone PCR product (b) Identify of pEntry-clone for TAP-tag constructs M: DNA marker; 1: Negative control; 2: Positive control (pDONR221 DNA); 3-5 *RAR1* TAP-tag pEntry-clone PCR product; 6-8 *SGT1* TAP-tag pEntry-clone PCR product

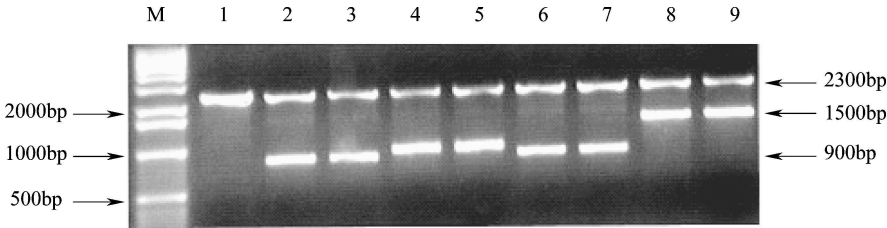


图 5 中间克隆载体的 Afl II 和 EcoR V 双酶切结果

Fig 5 The pEntry-clone double digest results through Afl II and EcoR V

M: DNA marker; 1: Afl II 和 EcoR V 双酶切的 pDONR221; 2~3 Afl II 和 EcoR V 双酶切的 *RAR1* pEntry-clone (RNA i); 4~5 Afl II 和 EcoR V 双酶切的 *RAR1* pEntry-clone (TAP-tag); 6~7 Afl II 和 EcoR V 双酶切的 *SGT1* pEntry-clone (RNA i); 8~9 Afl II 和 EcoR V 双酶切的 *SGT1* pEntry-clone (TAP-tag)

M: DNA marker; 1: pDONR221 digest by Afl II and EcoR V; 2-3 *RAR1* RNA i pEntry-clone digest by Afl II and EcoR V; 4-5 *RAR1* TAP-tag pEntry-clone digest by Afl II and EcoR V; 6-7 *SGT1* RNA i pEntry-clone digest by Afl II and EcoR V; 8-9 *SGT1* TAP-tag pEntry-clone digest by Afl II and EcoR V

用于构建蛋白纯化的目的载体 pEarleygate 205 图谱如图 2 所示。PCR 扩增结果如图 7 (a), 引物设计原理依然不是单纯去扩增目的基因而是根据重组后 PCR 条带大小差异去判断, 与中间载体的筛选原理一致。酶切表达载体结构如图 7 (b) 所示, 经 Xho I 和 Spe I 双酶切 pEarleygate 205 质粒出现两条大小分别约为 1.1kb 和 2500bp 的目的条带; 而 LR 重组

成功后的表达载体经 Xho I 和 Spe I 双酶切后, 在出现 1.1kb 目的条带的同时, 出现了包含目的基因的条带, 大小正确。表明表达载体构建成功。表达载体采用农杆菌介导转化法 (*Agrobacterium* mediated transformation system, ATMT) 转化至短柄二叶草, 从而获得目的基因沉默和蛋白纯化转化株。

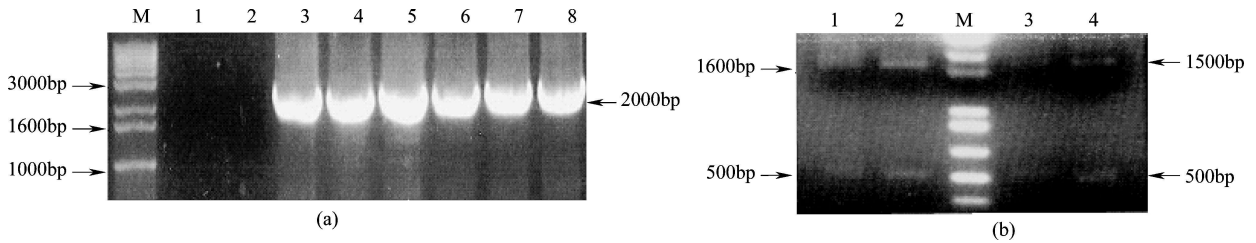


图 6 RNAi表达载体的 PCR筛选 (a)和酶切 PCR产物鉴定 (b)

Fig 6 The identification of the RNAi Expression clone through the PCR screening and the digest by the *kpnI*

(a) M: DNA marker; 1 阴性对照 1(H_2O); 2 阴性对照 2(pOpOfl(HH)); 3~5 *RARI* 基因沉默表达载体 PCR 片段; 6~8 *SGT1* 基因沉默表达载体 PCR 片段。(b) 1~2 *RARI* 基因沉默表达载体 PCR 产物 *KpnI* 酶切结果;

M: DNA marker; 3~4 *SGT1* 基因沉默表达载体 PCR 产物 *KpnI* 酶切结果

(a) M: DNA marker; 1 Negative control 1(H_2O); 2 Negative control 2(pOpOfl(HH)); 3-5 *RARI* pExpression clone (RNAi) PCR fragment; 6-8 *SGT1* pExpression clone (RNAi) PCR fragment (b) 1-2 *RARI* PCR product digest by *KpnI* (RNAi); M: DNA marker; 3-4 *SGT1* PCR product digest by *KpnI* (RNAi)

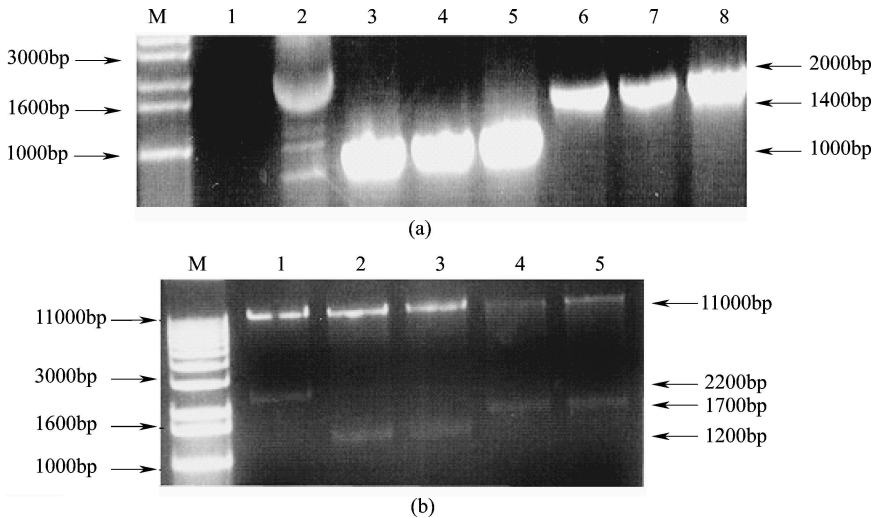


图 7 TAP-tag表达载体克隆的 PCR筛选 (a)和酶切 (b)鉴定

Fig 7 The identification of the TAP-tag pExpression clone through the screening PCR and the double digest by the *XhoI* and *SpeI*

(a) M: DNA marker; 1 阴性对照 1(H_2O); 2 阳性对照 2(pEarleygate 205); 3~5 *RARI* 蛋白纯化表达载体 PCR 片段; 6~8 *SGT1* 基因蛋白纯化表达载体 PCR 片段。(b) M: DNA marker; 1 *XhoI*和 *SpeI*双酶切 pEarleygate 205质粒;

2~3 *XhoI*和 *SpeI*双酶切 *RARI* 基因蛋白纯化表达载体; 4~5 *XhoI*和 *SpeI*双酶切 *SGT1* 基因蛋白纯化表达载体。

(a) M: DNA marker; 1 Negative control 1(H_2O); 2 Positive control 2(pEarleygate 205); 3-5 *RARI* pExpression clone (TAP-tag) PCR fragment; 6-8 *SGT1* pExpression clone (TAP-tag) PCR fragment (b) M: DNA marker;

1 pEarleygate 205 digest by *XhoI* and *SpeI* (RNAi); 2-3 *RARI* pExpression clone (TAP-tag) digest *XhoI* and *SpeI*;

4-5 *SGT1* pExpression clone (TAP-tag) digest *XhoI* and *SpeI*

3 讨论

随着短柄二叶草全基因组序列的最新测序成功, 如何以其作为模式研究各种重要基因的功能成了亟待解决的问题。以往的化学物理诱导突变、T-DNA 插入突变、DNA 转座子等方法研究基因功能往往费时且效率较低。当前, 基因沉默已为研究植物基因表达调控及鉴定基因功能提供了新的契机^[11]。

如何构建植物基因高效沉默系统表达载体成为关键。本文采用 Gateway 克隆体系, 详细阐述了各个反应的过程以及各个阶段正确克隆的筛选和鉴定的方法, 提出了相对科学和完整的确认克隆成功与否的评判体系, 并最终成功构建了与抗病性紧密相关的 *SGT1* 和 *RARI* 基因的高效沉默系统表达和蛋白纯化载体。对于进一步探讨短柄二叶草抗病关联基因 *SGT1* 和 *RARI* 功能具有重大意义, 同时也为研究

其他相关基因提供借鉴。

本文利用 Gateway 克隆技术构建的基因沉默和串联亲和纯化二元表达载体,能直接用于农杆菌介导的植物转化,更为开启高通量 RNAi 技术研究植物基因功能之门提供了方法。实验具体操作中,通过 BP 反应得到正确的中间载体 (pEntry-clone) 是该技术的关键。在 10 μ l 的 BP 反应体系中,经纯化后的含 attB 位点的 PCR 产物量应略多于供体载体 (pDONR221) 以促进载体高效重组,但最好不要超过 250 ng 反应时间视克隆基因大小有所变化,一般 1~2h 即可。LR 反应可采用中间载体 (pEntry-clone) 和目的载体 (pEarleygate205) 质粒直接反应,方便省时,反应体系中两载体的量以保持 1:1 为宜,反应时间以 16h 左右为宜。中间载体除需 PCR 和酶切鉴定外,必须测序验证。RNAi 基因表达载体筛选时,注意其正确的基因插入方向并确保互补发夹机构的形成。基因沉默载体构建不需考虑基因的开放阅读框 (ORF),只需克隆基因序列即可,在引物设计时比较简单。而蛋白纯化载体则需考虑 ORF 的正确阅读,以保证融合蛋白的正确高效表达;在引物设计时应考虑周密,本文为 C 端融合 TAP 标签表达载体,引物设计应包含基因起始密码子,不含终止密码子,attB 位点也应严格参考本文提供引物序列方式。

关于正确的中间和表达载体的鉴定是成功运用该克隆体系的关键,本文提出 PCR 鉴定时,筛选引物设计在母体载体上而非基因上,这样更有利于确保重组克隆的正确率,从而排除了随机插入等的假阳性克隆。对于构建基因沉默表达载体时,由于需要验证基因的反向互补结构,为确认克隆的正确(目的基因的大小和方向),提出用基因上的单引物去进行 PCR 验证,这样便在扩增目的基因片段的同时又保证了基因在载体上反向互补方向的正确。酶切与测序是在 PCR 基础上更进一步确认克隆的正确性,酶切应选择合适的酶切位点,当载体很大,又

无合适酶切位点时,应考虑酶切 PCR 产物以简化实验过程。测序反应根据目的基因大小选择合适的测序引物,一般在供体 pDONR221 上应选择合适引物(如 M13F 和 M13R)。

* Xu JR 博士 (Purdue University) 给予实验技术指导 and 提供相关试验材料,特此致谢。

参考文献

- [1] The International *Brachypodium* Initiative. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* [J]. *Nature* 2010 463: 763-769
- [2] John D, Luis A, J Glyn J, et al. Agrobacterium-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertion mutagenesis [J]. *Plant Biotechnol J* 2008 6: 236-245
- [3] Vogel J, Hill T, Hiegl efficiency Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3 [J]. *Plant Cell Rep* 2008 27: 471-478
- [4] Gu Y, Ma Y, Huo N, et al. A BAC-based physical map of *Brachypodium distachyon* and its comparative analysis with rice and wheat [J]. *BMC Genomics* 2009 10: 496
- [5] Dapper J, Mur L, A J, Jenkins G, et al. *Brachypodium distachyon*, a new model system for functional genomics in grasses [J]. *Plant Physiol* 2001, 127: 1539-1555
- [6] Azevedo C, Sadanandom A, Kitagawa K, et al. The *RARI* interactor *SGT1*, an essential component of R gene-triggered disease resistance [J]. *Science* 2002, 295: 2073-2076
- [7] Azevedo C, Betsuyaku S, Peart J, et al. Role of *SGT1* in resistance protein accumulation in plant immunity [J]. *EMBO J* 2006 25: 2007-2016
- [8] Bhaskar P, Raasch J A, Kramer L C, et al. *Sgt1*, but not *Rad1*, is essential for the RB-mediated broad spectrum resistance to potato late blight [J]. *BMC Plant Biol* 2008 8: 811-826
- [9] Shirasu K, Schuker-Lefert P. Complex formation, promiscuity and multifunctionality: protein interactions in disease resistance pathways [J]. *Trends Plant Sci* 2003 8: 252-258
- [10] Muskett P, Parker J. Role of *SGT1* in the regulation of plant R gene signalling [J]. *Microbes Infect* 2003, 5: 969-976
- [11] Simi H, Simi M C. The road to reading the RNA-interference code [J]. *Nature* 2009, 457: 396-404
- [12] Earley K W, Haag J R, Pontes O, et al. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics [J]. *The Plant Journal* 2006, 45: 616-629
- [13] Wiepolska A, Townley H, Moore I, et al. A high-throughput inducible RNAi vector for plants [J]. *Plant Biotechnology Journal* 2005 3: 583-590