

应用重组 PCR 技术构建大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰表达载体

马建, 厉志, 刘艺苓, 王丕武

(吉林农业大学生物技术中心, 吉林 长春 130118)

摘要: RNA 干扰是近年来生物技术领域新兴的研究热点之一。在作物的研究中, RNA 干扰被认为在作物品质改良中具有重要的应用价值, 并已在水稻、小麦、玉米等作物中得到成功应用, 但在大豆的研究中尚鲜有报道。在研究植物 RNA 干扰的实验中, 构建相应的 RNA 干扰表达载体是常用手段, 但传统构建方法较费时费力。重组 PCR 是一种利用重叠延伸的方法进行高效和快速的体外基因片段拼接的 PCR 技术。研究将重组 PCR 技术应用于构建大豆脂肪氧化酶基因 *ihp* RNA 干扰表达载体, 一方面探索一条更简便、快捷、适应范围更广泛的大豆基因 RNA 干扰表达载体构建方法, 另一方面所构建的载体为进一步研究 RNA 干扰在大豆脂肪氧化酶改良中的应用奠定了基础。结果显示应用重组 PCR 技术构建大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰表达载体是可行的, 相比与常规方法此方法更简便、快捷、效率更高。

关键词: 重组 PCR; RNA 干扰; 脂肪氧化酶; 表达载体

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)04-0564-05

Use Recombinant PCR to Construct RNAi Expression Vector of Soyabean Lipoxigenase

MA Jian, LI Zhi, LIU Yi-ling, WANG Pi-wu

(Biology Center of Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: For the past few years RNAi was a newly rising territory in biotechnology. RNAi was believed to have huge potential in quality improvement of crops, and it had been successfully applied in quality improvement of rice, wheat and maize, while its application in soybean quality improvement was less documented. During the research of RNAi in plant, RNAi expression vector is always be used, and the commonly used method is time and labor consuming. Recombinant PCR is a high performance method of gene splicing by overlapping. In this research, we use recombinant PCR to construct RNAi expression vector of soybean lipoxigenase, in order to find a easier, faster and generally way to construct RNAi expression vector for soybean. Results showed that constructing RNAi expression vector of the lipoxigenase gene by recombinant PCR technology is feasible, and the method is more rapid, simple and convenient than common methods.

Key words: Recombinant PCR; RNAi; Lipoxigenase; Expression vector

RNAi 是指一些小的双链 RNA (double-stranded dsRNA) 高效、特异的阻断体内特定基因表达, 促使 mRNA 降解, 使细胞表现出特定基因缺陷表型的过程^[1]。近年来 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术蓬勃发展, 为作物品质改良提供了新方法, 已在水稻、小麦、大麦等多种作物的品质改良中得到成功应用^[2-4]。在研究植物 RNA 干扰的实验中, 构建相应的 RNA 干扰表达载体是常用手段, 目前, 利用基因工程进行植物遗传育种所用的 RNA 干扰构件, 通

常以 mRNA 为模板、通过 RT-PCR 得到目的基因的片断, 使之正反相连形成正义臂和反义臂, 或再在两臂间插入几百碱基的内含子以增强基因沉默效果, 在此过程中, 至少需要 3 次连接步骤, 较费时费力。而以基因组 DNA 为模板、通过两次 PCR 得到包含内含子的具有发夹结构的 RNAi 构件的方法需要比较目的基因的 DNA 序列 (内含子和外显子)、cDNA 序列 (只有外显子), 来选取片断^[5], 受限制比较多, 适用性有限。

收稿日期: 2008-05-14

基金项目: 教育部博士点基金资助项目 (20070193005)。

作者简介: 马建 (1979-), 男, 博士, 研究方向为大豆分子育种。E-mail: winter0106@163.com。

通讯作者: 王丕武, 教授, 博士。E-mail: peiwuw@yahoo.com.cn。

重组 PCR 是将 2 个或多个基因片段通过一个基因片段的 3'端与另一个基因片段的 5'端的互补,利用重叠延伸的方法进行高效和快速的体外基因片段拼接和突变的 PCR 技术^[6-10]。以大豆吉农 18 总 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板,克隆大豆 3 种脂肪氧化酶基因(Lox1、Lox2、Lox3)中同源性最高部分 357bp 外显子片段,以及一段长 230bp 的大豆 SSR 序列作为内含子,应用重组 PCR 技术构建了由 35S 启动子引导的大豆脂肪氧化酶基因 ihpRNA 表达载体 pCLoxRi,探索更简便、快捷、适应范围更广泛的植物 RNA 干扰表达一载体构建方法,为应用 RNA 干扰技术改良大豆品质奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆品种吉农 18,大肠杆菌 DH5α 菌株,质粒 pCAMBIA1301、PBI121 均由吉林农业大学生物技术中心提供。

1.2 试剂及 Kit

pMD18-T Simple Vector、Tap DNA Polymerase、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase、dNTPmix、DNA 凝胶回收试剂盒、DNA Marker、mRNA 提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司,质粒小量纯化试剂盒购自 OMEGA 公司,其它生化试剂 Tris base、EDTA、EB、琼脂糖、酵母浸粉、胰蛋白胨为国产试剂。

1.3 重组 PCR 引物设计

依据 GenBanK 中大豆脂肪氧化酶基因序列,取同源性最高的片段(GenBanK:GMU50081,X06928,AY028297),根据重组 PCR 原理及实验需要引物如下(引物方向 5'—3'):

大豆脂肪氧化酶基因正义片段引物

P1:AATGTGTCAGTCGTTTAGAC/TCTAGA/G-AAGGGCTCACTGTAGTAG

P2:TGTTAGTTC/GGATCC/GAATGGCTCAACA-ACTGC

大豆脂肪氧化酶基因反义片段引物

P3:AAGTGCTTT/GAGCTC/GAATGGCTCAACA-ACTGC

P4:GACTTGATTTGACTGCTTGA/CTCGAG/GAA-GGGCTCACTGTAGTAG

内含子引物

P5:GGATCC/TGTTAGTTC/AAACCCACCCTCAA-

AAATAAAAA

P6:GAGCTC/AAGTGCTTT/AAATGCACCCATC-AATCACA

外引物

P7:AATGTGTCAGTCGTTTAGAC/TCTAGA

P8:GACTTGATTTGACTGCTTGA/CTCGAG

引物 P1、P4 包括 3 个部分:模版特异结合区、酶切位点区和二次 PCR 引物结合区,结构如(图 1)。

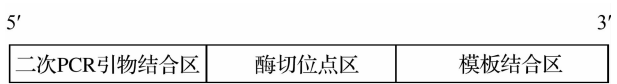


图 1 引物 P1、P4 结构

Fig. 1 The structure of primer 1 and 4

引物 P2、P3、P5、P6 包括 3 个部分:模版结合区、和重叠区,结构如(图 2)。

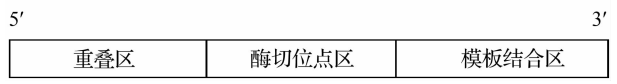


图 2 引物 P2、P3 结构

Fig. 2 The structure of primer 2 and 3

引物 P7、P8 分别为引物 P1、P4 的二次 PCR 引物特异结合区和酶切位点区:大豆脂肪氧化酶基因正义片段 P1 引物 5'端带有 XbaI 酶切位点,P2 引物 5'端带有 KpnI 酶切位点。反义片段 P3 引物 5'端带有 SacI 酶切位点,P4 引物 5'端带有 XhoI 酶切位点,目的片段长度 357bp。内含子 P5 引物 5'端带有 KpnI 酶切位点,P6 引物 5'端带有 SacI 酶切位点,内含子长度 230bp。

上述引物均以 Premier5.0 软件辅助设计,由北京三博远志公司合成。

1.4 模板制备

以大豆芽为材料,总 mRNA 的提取及 cDNA 第一链合成,参照 TaKaRa 公司 RNAiso Reagent 试剂盒操作说明进行。

以大豆叶片为材料,总 DNA 的提取,参照 TaKaRa 公司 Universal Genomic DNA Extraction KitVer:3.0 试剂盒操作说明进行。

1.5 PCR 反应体系及扩增程序

1.5.1 第一轮 PCR 体系及扩增程序 实验准备:将 P1、P2 引物原液各取 1.0 μL 混合,P3、P4 引物原液各取 1.0 μL 混合,将两管混合液加水至 20 μL,于 100℃水浴 5 min,取出迅速置于冰上冷却。

正义片段 PCR 体系:模板 cDNA 1.0 μL(<1 μg),10 × PCR Buffer 5.0 μL,P1、P2 引物混合液 1.0

μL ($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), dNTPmix $5.0\ \mu\text{L}$ ($2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), PrimeSTARTM HS DNA Polymerase $0.2\ \mu\text{L}$, ddH₂O $37.8\ \mu\text{L}$ 。

扩增程序: 94°C 变性 $10\ \text{s}$, 49.8°C 退火 $30\ \text{s}$, 72°C 延伸 $30\ \text{s}$, 共 30 个循环。

按正义片段 PCR 体系及程序以引物 P3、P4 混合物为引物, PCR 得到反义片段。

内含子扩增反应体系: 模板 DNA $1.0\ \mu\text{L}$ ($<1\ \mu\text{g}$), $10\times\text{PCR Buffer}$ $5.0\ \mu\text{L}$, P5、P6 引物各 $1.0\ \mu\text{L}$ ($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), dNTPmix $5.0\ \mu\text{L}$ ($2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), PrimeSTARTM HS DNA Polymerase $0.2\ \mu\text{L}$, ddH₂O $36.8\ \mu\text{L}$ 。

扩增程序: 94°C 变性 $10\ \text{s}$, 60°C 退火 $30\ \text{s}$, 72°C 延伸 $20\ \text{s}$, 共 30 个循环。

正义片段、反义片段及内含子片段 PCR 产物经电泳分离, 回收后与 pMD18—T 载体连接、转化大肠

杆菌 DH5 α 、挑取单克隆测序。

1.5.2 第二轮 PCR 体系及扩增程序 PCR 体系: 将第一轮 PCR 得到的正义片段、反义片段及内含子片段各取 $0.5\ \mu\text{L}$ 混合, 作为第二轮 PCR 反应的模板, $10\times\text{PCR Buffer}$ $5.0\ \mu\text{L}$, P7、P8 引物原液各 $1.0\ \mu\text{L}$, dNTPmix $5.0\ \mu\text{L}$, TaqDNA Polymerase $0.5\ \mu\text{L}$, ddH₂O $36.0\ \mu\text{L}$ 。

扩增程序: 94°C 预变性 $5\ \text{min}$, 94°C 变性 $1\ \text{min}$, 54°C 退火 $50\ \text{s}$, 72°C 延伸 $40\ \text{s}$, 共 40 个循环, 72°C 后延伸 $8\ \text{min}$ 。

1.6 大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰表达载体的构建

大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰表达载体的构建流程如图 3。

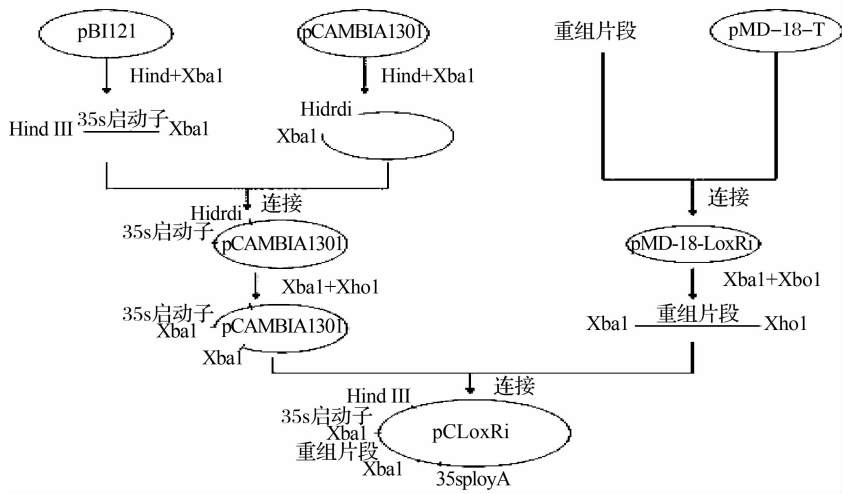


图3 大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰表达载体的构建流程
Fig. 3 The process of expression vector pCLoxRi

2 结果与分析

2.1 各组成片段电泳

正义、反义片段原长度 $357\ \text{bp}$, 添加重组重叠序列及酶切位点序列后, 长度分别为 $399\ \text{bp}$ 和 $398\ \text{bp}$ 。内含子序列原长度 $230\ \text{bp}$, 添加重组重叠序列及酶切位点序列后, 长度 $250\ \text{bp}$ 。PCR 扩增产物经电泳分离后, 切胶回收后分别与 pMD18—T 载体连接、转化大肠杆菌 DH5 α 、挑取单克隆测序。

大豆脂肪氧化酶基因正义、反义片段及内含子片段 PCR 产物如图 4。

从图 4 可以看出目的片段条带明显, 位置正确, 测序结果显示同源性达 100% , 序列中包含设计的

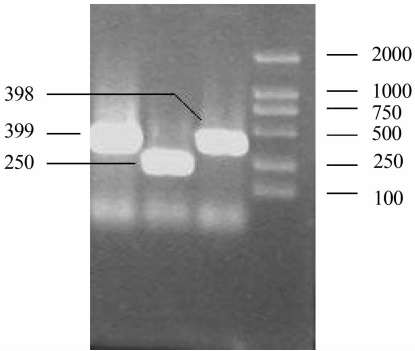


图4 大豆脂肪氧化酶基因正义反义及内含子 PCR 电泳结果
Fig. 4 The result of electrophoresis

酶切位点及重组互补区(测序由北京三博远志公司完成)。

酶切 PBI121 质粒 35S 启动子电泳结果(图 5)显示,从质粒 PBI121 上酶切下来的 35S 启动子位置正确,可用于下游试验。

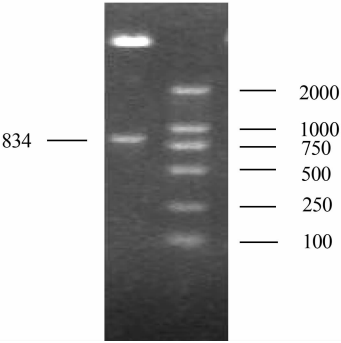


图 5 酶切 PBI121 质粒 35S 启动子电泳结果

Fig. 5 The result of 35S promoter

由正义、反义片段及内含子片段经重组 PCR 获得的 RNA 干扰片段总长度为 1047 bp,电泳结果如图 6。通过重组 PCR 获得了包括正义片段、反义片段及内含子片段在内的大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰构件,虽然 PCR 产物中还包含有非重组结构的 DNA,但这对后续试验无影响,因为只回收重组结构的 RNA 干扰构件用于表达载体的构建。

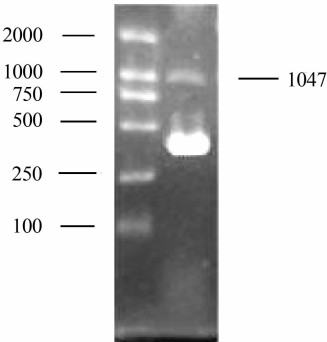


图 6 重组片段电泳结果

Fig. 6 The result of Recombinant PCR

2.2 大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰表达载体 pCLoxRi 的构建结果

回收 RNA 干扰结构基因片段,用 HindIII 和 XhoI 分别双酶切 RNA 干扰结构基因片段和植物表达载体 pCAMBIA1301,回收酶切后的片段,将 RNA 干扰结构片段连接植物表达载体 pCAMBIA1301,构建大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰植物表达载体 pCLoxRi。载体结构如图 7。

以 HindIII 和 XbaI 双酶切 35S 启动子应得到 834bp 的片段、以 XbaI 和 KpnI 双酶切正义片段应

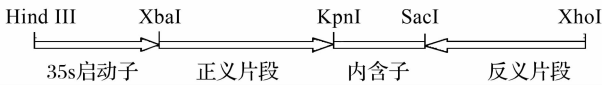


图 7 大豆脂肪氧化酶基因 ihpRNA 表达载体 pCLoxRi 结构

Fig. 7 The structure of pCLoxRi

得到 357bp 的片段、KpnI 和 SacI 双酶切内含子片段应得到 230bp 的片段、SacI

和 XhoI 双酶切反义片段应得到 357bp 的片段,所得电泳结果见图 8。

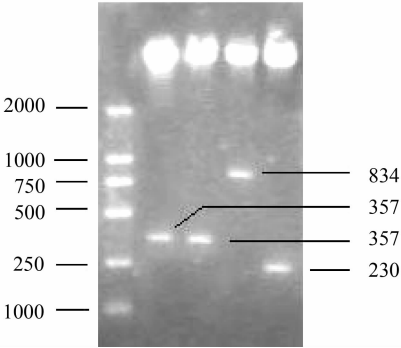


图 8 酶切 pCAMBIA1301—LoxRi 电泳结果

Fig. 8 The result of enzyme for pCLoxRi

图 8 表明,载体 pCAMBIA1301—LoxRi 包含包括 35S 启动子、正义片段、反义片段及内含子片段在内的大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰结构。

3 讨论与结论

RNA 干扰技术已在多种作物的品质改良中得到成功应用,但在大豆的品质改良中人们多采用传统的杂交回交方法^[11-12],周期较长、作用有限。将 RNA 干扰技术应用于大豆品质改良,具有重要的理论和实践意义。结果表明,构建的大豆脂肪氧化酶基因 RNA 干扰表达载体符合预期目标,应用重组 PCR 技术构建大豆基因 RNA 干扰表达载体是可行的,通过两轮 PCR 得到 RNA 干扰构件后,只需一步酶切—连接即将干扰构件连接于启动子后,构建成 RNA 干扰表达载体,同时,由于外引物的酶切位点可以根据不同载体相应调换,所以重组 PCR 构建的 RNA 干扰构件,可以连接于任何表达载体,其较传统构建方法更简便、适用性更广泛。应用重组 PCR 构建目的基因的 RNA 干扰结构关键是设计内引物,据文献报道内引物的长度不应少于 20 bp,如果重叠延伸获得的片段较长(>1 Kb)则应相应延长^[13-14],另外因为重组 PCR 需要进行两轮 PCR 反

应,为了保证扩增的忠实度,应使用保真性高的 DNA 聚合酶,如:PrimeSTARTM HS DNA Polymerase。

参考文献

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [2] 李加瑞, 赵伟, 李全梓, 等. Waxy 基因的 RNA 沉默使转基因小麦种子中直链淀粉含量下降 [J]. *遗传学报*, 2005, 32(8): 846-854. (Li J R, Zhao W, Li Q X, et al. RNA silencing of waxy gene results in low levels of amylose in the seeds of transgenic wheat [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(8): 846-854.)
- [3] Pinto Y M, Kok R A, Bandcombe D C, et al. Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 702-707.
- [4] Abbott D, Wang M B, Waterhouse P A. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2000, 1(6): 347-356.
- [5] Xiao Y H, Yin M H, Hou L, et al. Direct amplification of intron-containing hairpin RNA construct from genomic DNA [J]. *Bio-Techniques*, 2006, 41: 548-552.
- [6] Higuchi R. Recombinant PCR; In PCR Protocols: A guide to methods and applications [M] // Innis M A, Gelfand D H, White T A, et al. San Diego, California: Academic Press Inc, 1990: 177-183.
- [7] Higuchi R, Krummel B, Saiki R. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments; study of protein and DNA interaction [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 7351-7367.
- [8] Horton R M, Hunt H D, Ho S N, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension [J]. *Gene*, 1998, 77: 61-68.
- [9] Horton R M, Ho S N, Pullen J K, et al. Gene splicing by overlap extension [J]. *Methods Enzymol*, 1992, 217: 270-279.
- [10] Jayakumar A, Huang W Y, Raetz B, et al. Cloning and expression of the multifunctional human fatty acid synthase and its subdomains in *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1996, 93: 14509-14514.
- [11] 王丕武, 张君, 姚丹, 等. 高产中熟春大豆新品种“吉农 17 号”选育报告 [J]. *吉林农业大学学报*, 2007, 29(1): 25-27. (Wang P W, Zhang J, Yao D, et al. A Breeding report on the new soybean variety of Jinong17 [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2007, 29(1): 25-27.)
- [12] 王丕武, 张君, 姚丹, 等. 大豆新品种“吉农 13 号”的选育报告 [J]. *吉林农业大学学报*, 2004, 26(1): 13-15. (Wang P W, Zhang J, Yao D, et al. A breeding report on the new soybean variety of Jinong13 [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2004, 26(1): 13-15.)
- [13] 张梅, 司履生, 王一理. 应用重组 PCR 技术构建人单链白细胞介素 12 融合基因 [J]. *免疫学杂志*, 2001, 17(1): 22-26. (Zhang M, Si L S, Wang Y L. Construction of human single chain interleukin-12 fusion gene by recombinant PCR [J]. *Immunological Journal*, 2001, 17(1): 22-26.)
- [14] 李巍, 杜传书. 重组 PCR 构建 bcr-abl mRNA 竞争 RT-PCR 内标物 [J]. *中华医学遗传杂志*, 1998(3): 143-146. (Li W, Du C S. Construction of a competitor for bcr-abl cDNA by recombinant PCR [J]. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 1998(3): 143-146.)

学术交流的平台 科技致富的帮手

邮发代号 14-150 单月刊 每册定价 6.00 元 全年 72.00 元

欢迎订阅《北方园艺》(月刊)

《北方园艺》是全国自然科学(中文)核心期刊、中国农业核心期刊、全国优秀农业期刊、黑龙江省优秀科技期刊,内容丰富、栏目新颖、技术实用、信息全面。

国内外公开发行人,单月刊,每月 15 日出版,全国各地邮局均可订阅,邮发代号 14-150,或直接向编辑部汇款订阅,竭诚欢迎全国各地科研院所人员、大专院校师生,各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅,订阅者请在汇款单附言栏内写清订购份数,收件人姓名及详细地址、邮编。

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号 黑龙江省农业科学院《北方园艺》编辑部

邮编:150086 电话:0451-86674276 E-mail:bfyybjb@163.com