

番茄中维生素 E 合成相关基因的 VIGS 载体构建及侵染

芦亮亮, 傅达奇, 刘海萍, 王晓辉, 罗云波, 朱本忠

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:以番茄为材料,采用 RT-PCR 技术从番茄果实中克隆了其体内维生素 E 合成相关基因—生育酚环化酶(*Tocopherol cyclase VTE1*)的部分序列,片段长 420 bp,序列分析表明,该基因片段与番茄中生育酚环化酶 cDNA 序列同源性为 95%,然后通过 *XhoI*、*KpnI* 2 个酶切位点连接 *VTE1* 片段和含 *PDS* 的 pTRV2 质粒,获得了重组载体 pTRV2-*PDS*-*VTE1*,将该重组载体转化农杆菌 GV3101,并侵染番茄。该研究为下一步分析基因沉默后的番茄中维生素 E 含量的变化提供试验材料;为今后通过转基因技术调节番茄果实的维生素 E 的合成奠定了基础。

关键词:番茄;维生素 E;VIGS;基因沉默;载体构建

中图分类号:S 641.2 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)16-0139-04

番茄是全世界栽培最为普遍的蔬菜之一,食用方便,和人类日常膳食息息相关,全世界番茄年产量近 1.23 亿 t。番茄果实中维生素 C(Vitamin C)含量丰富,每 100 g 番茄中含维生素 C 14 mg,为大家所熟知。但维生素 E(Vitamin E)却很低,每 100 g 番茄中含维生素 E 0.49 mg。维生素 E 是一种脂溶性维生素,是最主要的抗氧化剂之一,能促进性激素分泌,使男子精子活力和数量增加;使女子雌性激素浓度增高,提高生育能力,预防流产,对于人体具有重要作用,俗称生育酚。研究表明番茄中存在维生素 E 的生物合成途径,如果能深入研究其合成机理,找到合成关键控制点,然后通过转基因技术就能显著提高番茄的维生素 E 的含量,长期食用该类番茄,能有效提高人类健康水平。

目前番茄基因组测序工作已经完成,VIGS 技术的迅速发展等都为研究如何从分子水平鉴定番茄果实中的维生素 E 合成的关键基因奠定了基础。VIGS 即病毒诱导的基因沉默,是指携带目的基因片段的病毒侵染植物后,可诱导植物内源目的基因沉默,与对照相比,进而有效研究目的基因的功能。VIGS 技术具有方法简单、适用范围广以及获取结果迅速等优点,已成为研究功能基因组学以及特定基因功能的有效工具^[1]。

迄今为止,已有烟草脆裂病毒(TRV)^[2]、马铃薯 X 病毒(PVX)^[3]、番茄金色花叶病毒(TGMV)、苹果潜隐病毒(ALSV)等,这些载体都已在本杰明烟草植物中成功沉默八氢番茄红素脱氢酶基因(*PDS*)。其中烟草脆裂病毒(TRV)感染番茄后引起的病症十分轻微,不会掩盖目的基因沉默表型,因此,该试验选择 TRV 作为基因沉默载体。

由于 TRV 并不能诱导番茄植株 100% 沉默,所以给取样带来一定难处,而且维生素 E 合成相关基因的沉默不能带来表型和颜色上的变化,为了克服这一问题,构建 *VTE1* 和 *PDS* 基因(八氢番茄红素去饱和酶基因)的共沉默载体,而 *PDS* 沉默出现光漂白现象^[4],便于 *VTE1* 基因沉默取样,为该研究提供便利。所以该试验用 *PDS* 基因作为报告基因,在含有 *PDS* 基因的 TRV 载体中插入与维生素 E 合成相关的目的基因,构建沉默载体。

该试验以番茄为材料,克隆了番茄中维生素 E 合成相关基因 *VTE1* 的片段,构建了携带 *VTE1* 和 *PDS* 报告基因的重组 TRV2 病毒载体用于侵染番茄。旨在为下一步分析鉴定 *VTE1* 基因对番茄中的维生素 E 合成的影响奠定了基础,将来用 VIGS 技术鉴定番茄中维生素 E 合成相关基因并利用转基因控制其维生素 E 含量提供方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

携带 *PDS* 的 TRV 病毒载体(pTRV2-*PDS*)由傅达奇老师(中国农业大学食品科学与营养工程学院)提供;大肠杆菌(*Escherichia Coli*)DH5a 为北京全式金生

第一作者简介:芦亮亮(1987-),男,在读硕士,研究方向为食品工程。E-mail:rainbowmvp@qq.com。

责任作者:朱本忠(1975-),男,博士,副教授,研究方向为食品生物技术。E-mail:zbz@cau.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871741)。

收稿日期:2011-05-09

物技术有限公司产品;含 pTRV1 农杆菌 GV3101、含 pTRV2 质粒的农杆菌 GV3101 菌种由中国农业大学食品科学与营养工程学院食品生物技术实验室保存;侵染所用番茄品种为盆栽红;侵染液:100 mL 渗透液含 $MgCl_2$ 溶液(1 mol/L)1 mL, MES 溶液(1 mol/L)1 mL, AS 溶液(50 mmol/L)400 μ L, 调节 pH 至 5.6, 用蒸馏水定容至 100 mL。

1.2 目的基因片段的克隆

以市售普通番茄果实为材料,用百泰克公司试剂盒提取番茄总 RNA。根据番茄中维生素 E 的合成途径,找到最关键的基因 VTE1。根据 NCBI 数据库中公布的番茄 VTE1 的 cDNA 序列(NM_119430.4)设计引物,PCR 扩增片段长度 420 bp,其上游引物为 VTE1For 5'-GTCACTCTCGAGCCCAAAATAGTGTAAAGC-3';下游引物为 VTE1Rev:5'-GTCACTGGTACCAATTGCACCTTCAAATAC-3'。以总 RNA 为模板,使用 Promega 公司 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,为了后续载体构建方便,正义引物添加 XhoI,反义引物添加 KpnI 位点。25 μ L 扩增体系如下:17.5 μ L ddH₂O,2.5 μ L 10 \times buffer,1 μ L dNTP,1 μ L 正向引物、1 μ L 反向引物、1 μ L 反转录产物作为模板、1 μ L Taq 酶。扩增条件为:96 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后进行 35 个循环,每个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s后,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。取 PCR 扩增产物 5 μ L,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,用 DL 2 000 Marker 做参照,判断扩增产物的分子量大小,80 V 电泳 20 min,放入成像仪中观察。

1.3 目的基因片段与 T 载体连接并进行蓝白斑筛选

用百泰克公司琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,切胶回收 PCR 获得的目的基因片段。连接目的基因片段和 T 载体。把重组的质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态中,涂板过夜,蓝白斑筛选,挑取白色菌落,即含有阳性重组子的菌落。

1.4 目的片段与 pTRV2-PDS 连接

提取重组子中的质粒,用酶 KpnI 和酶 XhoI 对其双酶切,并进行对双酶切体系中的目的基因片段 VTE1 进行液体胶回收。同时用酶 KpnI 和酶 XhoI 把 pTRV2-PDS 双酶切。把经双酶切后的目的基因片段 VTE1 及 pTRV2-PDS 进行连接,转化大肠杆菌,经菌液 PCR 鉴定以及 XhoI 和酶 XhoI 双酶切鉴定为重组子后送至上海生工生物有限公司进行测序。

1.5 侵染液配制及番茄 VIGS 沉默植株的获得

把经过测序检验符合预想的基因沉默载体 pTRV2-PDS-VTE1 质粒转入农杆菌 GV3101 中。配制侵染液参照 Diego Orzaez^[5] 的方法,并加以改进。分别取含 pTRV1 的农杆菌、含 pTRV2 的农杆菌、含

pTRV2-PDS 的农杆菌以及含 pTRV2-PDS-VTE1 的农杆菌各 1 mL,分别接种于含有卡那霉素(50 μ g/mL)、庆大霉素(50 μ g/mL)和利福平(100 μ g/mL)抗生素的 20 mL YEB 培养基中,置于 28 $^{\circ}$ C 空气浴恒温振荡器中,200 r/min 培养 8~10 h。取出菌液,6 000 r/min 离心 5 min,弃上清,收集菌体沉淀,用渗透液重新悬浮菌体,使菌液浓度达到 OD₆₀₀=1.0,将含有 pTRV1 载体的悬浮农杆菌液按 1:1 的比例分别与含 pTRV2 的农杆菌、含 pTRV2-PDS 的农杆菌、含 pTRV2-PDS-VTE1 的农杆菌液混合。置于 28 $^{\circ}$ C 空气浴恒温振荡器中,20 r/min 培养 3 h,其中 pTRV1 载体起辅助作用。把配好的渗透液分别用喷枪喷入刚长出真叶的番茄叶片中,培育 15 d 左右即出现叶片变白的现象。其中被含 pTRV2、pTRV2-PDS 的渗透液侵染的番茄为对照组。

2 结果与分析

2.1 番茄中维生素 E 合成相关基因生育酚环化酶基因片段的克隆

利用 RT-PCR 方法扩增生育酚环化酶 VTE1 基因的部分序列,琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,在 420 bp 左右扩增出清晰的扩增带(图 1),将该扩增片段回收并克隆入 pTRV2-PDS 载体。

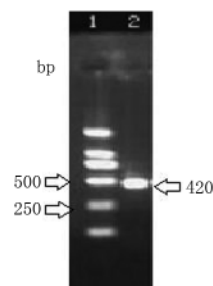


图 1 VTE1 基因部分序列 PCR 扩增结果
注:1:DL 2 000 Marker;2:pTRV2-PDS-VTE1。

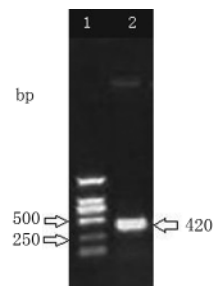


图 2 pTRV2-PDS-VTE1 菌液 PCR 扩增结果
注:1:DL 2 000 Marker;2:pTRV2 PDS VTE1。

2.2 重组 pTRV2-PDS-VTE1 载体的构建及农杆菌转化

将构建的重组质粒 pTRV2-PDS-VTE1 转化大肠杆菌,经菌液 PCR 进行初步鉴定为阳性的克隆(图 2),

然后摇菌,提取质粒后进行双酶切鉴定。结果表明,*KpnI*和*XhoI*双酶切出的片段 420 bp 左右,与预期大小一致。送样测序,测序结果表明,扩增的 pTRV2-*PDS-VTE1* 基因片段与 NCBI 数据库中的 *VTE1* 基因进行序列比较(图 3),结果表明,pTRV2-*PDS-VTE1* 基因片段与 *VTE1* 已知序列(NM_119430.4) 同源为 95%。表明基因沉默载体 pTRV2-*PDS-VTE1* 构建正确。

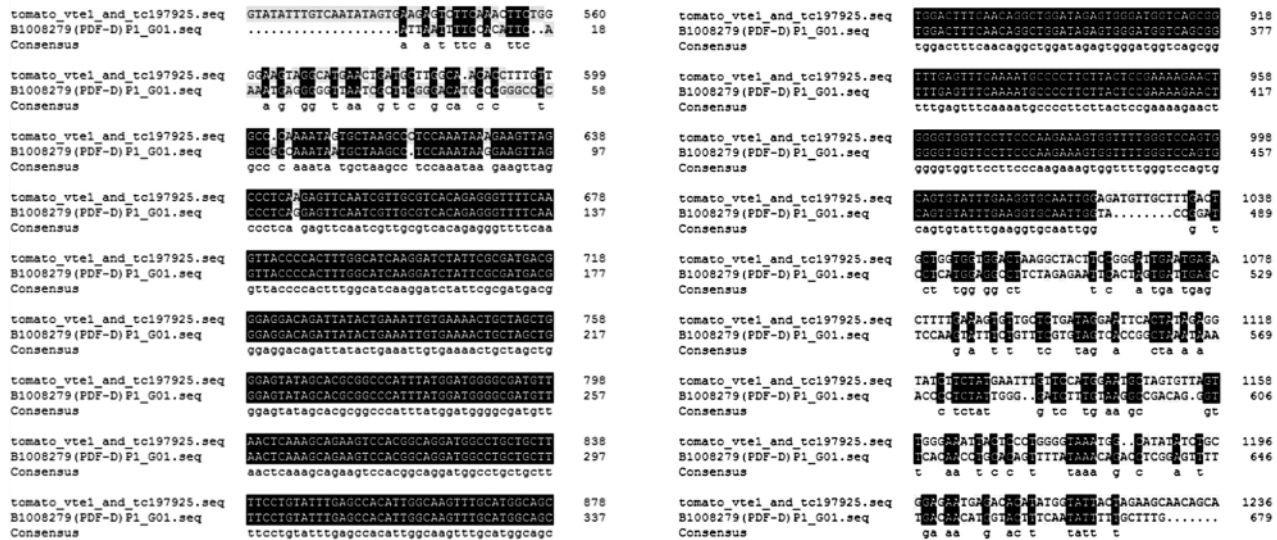


图 3 pTRV2-*PDS-VTE1* 基因片段与 NCBI 数据库中的 *VTE1* 基因进行序列比较

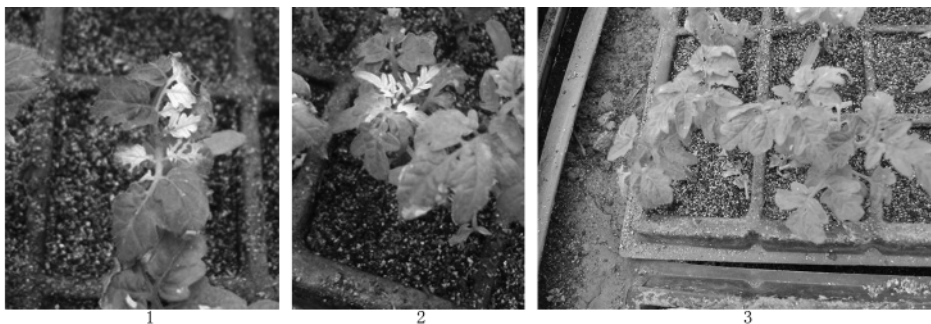


图 4 被感染的番茄植株已出现沉默现象

注:1. pTRV2-*PDS-VTE1* 基因沉默番茄;2. pTRV2-*PDS* 基因沉默番茄;3. pTRV2 对照番茄。

3 讨论

该研究利用 PCR 方法从番茄中克隆了 *VTE1* 基因的部分序列,该基因片段与已知番茄 *VTE1* 的 cDNA 序列同源性为 95%。这可能是由于不同种之间基因存在多态性引起的。将克隆的 *VTE1* 克隆入 pTRV2-*PDS* 载体,并转化入农杆菌。目前正在用这些携带有 pTRV2-*PDS-VTE1* 的农杆菌感染番茄,被感染的番茄植株已出现沉默现象。

pTRV2-*PDS-VTE1* 载体可沉默番茄中的 *VTE1* 基因,预计番茄植株内维生素 E 的合成会因此而大量减少。通过测定有沉默现象番茄和对照组番茄果实中的维生素 E 含量,即可证明 *VTE1* 基因对番茄植株合成维生素 E 的影响。为未来从分子层面调控番茄果实

pTRV2-*PDS-VTE1* 质粒已转化进上述农杆菌菌株中。

2.3 番茄 VIGS 沉默植株的获得

经过侵染液侵染的番茄,在继续生长 15 d 左右后,pTRV2-*PDS-VTE1* 试验组和 pTRV2-*PDS* 对照组的番茄相继出现部分叶片变白的现象,表明部分番茄已被 pTRV2-*PDS-VTE1* 基因和 pTRV2-*PDS* 基因沉默。pTRV2 对照组无番茄出现叶片变白的现象。

中的维生素 E 含量奠定了基础。

(该文章作者还有左进华,单位同第一作者。)

参考文献

- [1] Lu R, Martin-Hernandez A M, Peart J R, et al. Virus-induced gene silencing in plants[J]. Methods, 2003, 30: 296-303.
- [2] Liu Y, Schliff M, Dinesh-Kumar S P. Virus-induced gene silencing in tomato[J]. Plant Journal, 2002, 31: 777-786.
- [3] Chapman S N, Kavenagh T A, Baulcombe D C. Potato virus X as a vector for gene expression in plants[J]. Plant Journal, 1992, 2: 549-557.
- [4] Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, et al. Virus-induced gene silencing in tomato fruit[J]. Plant Journal, 2005, 43(2): 299-308.
- [5] Orzaez D, Mirabel S, Wieland W H, et al. Agroinjection of Tomato Fruits. A Tool for Rapid Functional Analysis of Transgenes Directly in Fruit[J]. Plantphysiol, 2006, 140(1): 2-11.

番茄 EST-SSR 标记 PCR 反应体系的优化

韩明利^{1,2}, 侯丽霞¹, 崔娜², 王施慧¹, 于志海², 郭彩杰²

(1. 山东省农业科学院 蔬菜研究所, 山东省设施蔬菜生物学重点实验室, 国家蔬菜改良中心山东分中心, 山东 济南 250100;

2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:应用 $L_{16}(4^4)$ 正交实验优化番茄 EST-SSR 标记 PCR 反应体系。结果表明:20 μ L 体系中各反应物最适浓度为:DNA 模板 45 ng/20 μ L, 引物 0.75 μ mol/L, Mg^{2+} 2.0 mmol/L, dNTPs 0.4 mmol/L, *Taq* DNA 酶 0.5 U/20 μ L, 且 Mg^{2+} 对该标记反应体系影响最大。利用 5 对 EST-SSR 引物及 P_1 、 P_2 基因组 DNA 验证优化体系的可靠性, 为该标记在番茄基因组分子标记辅助育种提供了试验依据。

关键词:番茄; EST-SSR; 体系优化; PCR

中图分类号: S 641.2; Q 789 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)16-0142-03

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.) 是世界上最重要的蔬菜作物之一, 已成为对茄科的模式植物^[1]。随着生物技术和番茄基因组测序工作的进行, 低成本高效率分子标记如 SRAP、EST-SSR、SNP 等被迅速开发并在品种改良中得到应用^[2]。

EST-SSR 标记从 EST 序列中开发 SSR 位点。大量 EST 序列收集于核酸公共数据库中, 尤其是番茄 EST 序列, 到 2011 年 1 月 NCBI(美国国家生物信息中心) 序列总数达 298 289 条 (Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest), 为开发 SSR 标记提供了快捷、有效和

廉价的途径^[3]。EST-SSR 标记在物种间具有高通用性, 通常都代表某种基因功能, 可反映出转录区的差异, 因其本身是功能基因的一部分序列, 所以它为功能基因提供了“绝对”标记。该标记技术已在烟草、水稻、大豆、鹰嘴豆等植物中有相应的报道^[4-5], 但在番茄研究中鲜有报道。

1 材料与方法

1.1 试验材料

E-95F₈(♀)、中华巨粉 8 号(♂) 及 F₂ 代番茄群体均由山东农业科学院蔬菜研究所提供。快捷型植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根公司; Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; 引物合成及其他常规试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司; 50 bp maker 购自 Fermentas 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 提取操作依据试剂盒说明, 紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳进行浓度和纯度检测。

第一作者简介: 韩明利(1985-), 女, 山西吕梁人, 在读硕士, 现从事发育分子生物学研究工作。E-mail: hemerry@163.com。

责任作者: 侯丽霞(1970-), 女, 博士, 研究员, 现主要从事番茄育种与分子生物学研究工作。E-mail: houlx2006@126.com。

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2006AA100108-3-1); 山东省农业良种工程资助项目(2010LZ006-01)。

收稿日期: 2011-04-13

Construction and Identification VIGS Vector about Vitamin E Biosynthesis Gene of Tomato

LU Liang-liang, FU Da-qi, LIU Hai-ping, WANG Xiao-hui, LUO Yun-bo, ZHU Ben-zhong, ZUO Jin-hua
(College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: Tomato was used as test material, using RT-PCR to clone part sequence of vitamin E biosynthesis gene's (*tocopherol cyclase VTE1*) from the tomato fruit. Fragment length was 420 bp. Sequence analysis showed that gene homology of this fragment and *VTE1* was 95%. Then *Xho*I, *Kpn*I restriction sites connected *VTE1* with *pTRV2-PDS* plasmid. The recombinant vector *pTRV2-PDS-VTE1* was obtained. And the recombinant vector was transformed into *Agrobacterium*. The study provided the experimental material for using VIGS technology to further analysis *VTE1*'s role in vitamin E biosynthesis in tomato. On this basis, laid the foundation for using transgenic technology to control vitamin E biosynthesis in tomato fruit in the future.

Key words: tomato; vitamin E; VIGS; gene silencing; vector construction