

柑橘和拟南芥 *RIN4* 基因的过表达载体构建 及其对沙田柚的 DNA 转化^①

李 菊^{1,2}, 程春振^{1,2}, 张永艳²,
钟 云², 钟广炎², 陆智明¹

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 广东省农业科学院 果树研究所, 广州 510640

摘要: 用逆转录-cDNA 聚合酶链式扩增(RT-PCR)方法, 分别从克里曼丁橘和拟南芥中克隆出 *RIN4* 基因, 连接到表达载体 pFGC5941, 构建了柑橘 *CcRIN4* 和拟南芥 *AtRIN4* 基因的过表达载体, 并成功转入 EHA105 农杆菌. 通过农杆菌介导法将过表达载体转入沙田柚, 获得柑橘和拟南芥 *RIN4* 基因的转基因沙田柚植株各 6 株.

关键词: 克隆; 过表达载体; 转化; 沙田柚

中图分类号: S666.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)03-0016-06

拟南芥 *RIN4*(RPM1 interacting protein 4)基因是植株正常生长发育所必需的, 也是 PTI(PAMP-triggered immunity)的负调控因子^[1]. 大多数无毒因子有抑制 PTI 对 *RIN4* 作用的能力^[2-5]. *RIN4* 是无毒因子 AvrB, AvrRpm1 和 AvrRpt2 的靶蛋白^[1-2, 6], 而抗病蛋白(R 蛋白)RPM1 和 RPS2 实时监控无毒因子对 *RIN4* 蛋白的修饰作用^[1-2, 6-7]. 拟南芥 *RIN4* 基因过量表达不改变 RPM1 引起的抗病表型, 但会抑制 RPS2 的抗性和无毒因子 AvrRpt2 的功能^[6]. 番茄 *RIN4* 基因的过量表达会导致无毒因子 AvrRpt2 的功能抑制^[6], 而下调表达则会增强番茄对无毒因子 AvrPto 的抗性^[4]. 大豆 RPG1-B(类似拟南芥 R 蛋白 RPM1)对 AvrB 的抗病性也需要 *RIN4*-like 蛋白的参与^[8-9]. Lindqvist-Kreuze 等人^[10]利用基因芯片分析马铃薯感染晚疫病后的转录组变化, 发现马铃薯 *RIN4* 基因差异表达显著, 表明 *RIN4* 基因极可能与马铃薯晚疫病的抗性相关; 李春雨等人^[11]通过转录组测序比较了香蕉枯萎病易感品种和抗病品种在接种枯萎病菌 Foc TR4 后的转录组学变化, 发现抗病品种接种后绝大多数的 *R* 基因并没有象在易感品种中那样显著性上调表达, 但 *RIN4*/*RPM1* 例外, 推测 *RIN4*/*RPM1* 基因的差异表达可能与香蕉抗病性有关.

钟云^[12]发现一个柑橘 *RIN4* 基因在感染柑橘黄龙病(HLB)的椪柑叶片中上调表达 8.9 倍, 在感染了 HLB 的红橘根系中也上调表达, 认为该基因的上调表达可能与柑橘感染了黄龙病菌有关. 为探索该基因在抵御黄龙病侵染中的作用, 本研究从克里曼丁橘中克隆了 *RIN4* 基因, 构建过量表达载体并转入沙田柚. 同时, 鉴于拟南芥 *RIN4* 基因在抵御病原入侵过程中的重要作用, 我们也克隆获得了拟南芥 *RIN4* 基因, 构建相应的过量表达载体并转入沙田柚, 以期获得柑橘和拟南芥 *RIN4* 基因的转基因沙田柚植株, 为后续研究 *RIN4* 基因在柑橘与病原互作中的作用奠定基础.

① 收稿日期: 2014-03-03

基金项目: 国家国际科技合作项目(2012DFA30610); 广东省自然科学基金(S2013010015149); 广东省科技计划项目(2012A020200016, 2012B091100169, 2012B050700006); 广东省计算项目(2012B050700006).

作者简介: 李 菊(1989-), 女, 重庆巴南人, 硕士研究生, 主要从事果树分子生物学研究.

通信作者: 钟广炎, 研究员; 陆智明, 副教授.

1 材料与方法

1.1 材 料

试验所用克里曼丁橘(*Citrus clementina*)叶片采自广东省农业科学院果树研究所温室,拟南芥(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)由广东省农业科学院果树研究所柑桔研究室保存,遗传转化所用沙田柚 [*Citrus grandis* (L.) Osbeck cv‘Shatianyou’]果实购自广东梅龙柚果股份有限公司.

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA、总 RNA 提取及 cDNA 的合成

DNA 的提取使用植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(广州东盛生物科技有限公司),总 RNA 提取采用 Trizol 法^[13-14]. 所提取的 DNA 和 RNA 的质量用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测.

以总 RNA 作模板,用反转录试剂盒 PrimeScriptTMII 1st strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)合成 cDNA. 所得基因组 DNA 和 cDNA 均保存于-20℃,备用.

1.2.2 引物的设计与合成

从在线网站 Phytozome(<http://www.phytozome.net/>)和 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中分别下载克里曼丁橘 *RIN4*(*CcRIN4*, Ciclev10021726m CDS)和拟南芥 *RIN4*(*AtRIN4*, AT3G25070)基因的编码序列. 利用 Primer3(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)设计这 2 个基因的开放阅读框(Open reading frame, ORF)的特异扩增引物,并在正反向引物的 5'端分别添加 *Asc* I (GGCGCGCC)和 *Sma* I (CCCGGG)酶切位点及保护碱基, pFGC5941 载体引物 P1/P2 参照张凌云等人的序列^[15],转基因植株检测引物 35S 根据 pFGC5941 载体上 35S 启动子序列设计. 所有引物序列均由北京六合华大基因科技股份有限公司合成(表 1).

表 1 基因克隆及转基因植株检测所用引物

引物名	正向序列(A)	反向序列(S)
<i>CcRIN4</i>	5'-ttGGCGCGCCATGGCACAACGTTACATGTAC-3'	5'-tccCCCGGGTTATTTCTTGCCCCAAGGAC-3'
<i>AtRIN4</i>	5'-ttGGCGCGCCaaATGGCAGGTTTGAATGTAC-3'	5'-tccCCCGGGggaTCATTTTCCTCCAAAGCC-3'
P1/P2	5'-AGCAAGTGGATTGATGTGAC-3'	5'-GGTAAGGATCTGAGCTACAC-3'
35S	5'-TCATAAACCAAGGCAAGTAATAGAG-3'	5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCAT-3'

1.2.3 *RIN4* 基因的扩增及测序

分别以克里曼丁橘叶片 cDNA 和拟南芥 cDNA 为模板扩增柑橘 *CcRIN4* 和拟南芥 *AtRIN4* 基因,反应采用 20 μL 体系,其中,模板 cDNA 1 μL, 10×LA PCR 缓冲液 2 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1.5 μL, 正反扩增引物各 0.4 μL, LA DNA Taq 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL, 然后加双蒸水补足至 20 μL. *CcRIN4* 基因的 PCR 扩增程序为:首先在 94℃下预变性 5 min;然后在 94℃变性 30 s、60℃退火 35 s、72℃延伸 1 min 的条件下循环 35 次;最后在 72℃下延伸 7 min. *AtRIN4* 基因的扩增条件除退火温度为 59℃外其余反应条件不变. 扩增反应在 ABI 热循环仪上进行. 所得 PCR 产物交由北京六合华大基因科技股份有限公司测序.

1.2.4 *RIN4* 基因过量表达载体的构建及农杆菌转化

正确扩增的 *CcRIN4* 和 *AtRIN4* 基因目的片段与载体 pFGC5941 经 *Asc*I 和 *Sma*I 双酶切、电泳后从胶中回收、纯化. 用 DNA Ligase Kit(TaKaRa)连接目的基因和载体,转化 *Trans* 1-T1 大肠杆菌感受态细胞,在含有 Kan 的 LB 平板上培养. 阳性克隆经 PCR 确认后,进行液体培养,抽提质粒. 将所得质粒经目的基因特异引物和载体引物 P1/P2 双重 PCR 鉴定为阳性后,命名为 pFGC5941-*CcRIN4* 和 pFGC5941-*AtRIN4*. 将重组质粒用电击法转入根癌农杆菌 EHA105,在含有 Kan/Rif 的 LB 平板上培养,所得克隆经 PCR 鉴定为阳性后,命名为 pFGC5941-*CcRIN4*-105 和 pFGC5941-*AtRIN4*-105,准备用于沙田柚遗传转化.

1.2.5 pFGC5941-*RIN4*-105 在沙田柚中的遗传转化

1.2.5.1 柑橘材料及侵染液的准备

沙田柚实生苗的获得及农杆菌侵染液的准备均参考贝学军的方法^[16].

1.2.5.2 农杆菌转染柑橘上胚轴及转基因植株的嫁接

沙田柚遗传转化参照贝学军^[16]、胡新喜等人^[17]的方法. 将沙田柚上胚轴斜切成 1~2 cm 的小段放入准备好的农杆菌侵染液(含有 100 μmol/L 乙酰丁香酮)中侵染 30 min 后用无菌滤纸吸干表面菌液, 转到 MS 培养基上, 于 28 ℃下暗培养 2 d 后取出, 用无菌水(含有 100 mg/L 头孢菌素)清洗 20 min, 再用无菌滤纸吸干表面水分, 放于含有 5 mg/L Basta 筛选培养基(含 5 mg/L 6-BA)上, 于 28 ℃下暗培养 14 d 后转移至 12 h 光/12 h 暗条件下继续培养^[18]. 10~15 d 后换板, 将 Basta 质量浓度调至 7.5 mg/L. 一个月后再换板, 将 Basta 质量浓度增至 10 mg/L 并维持在此质量浓度. 待抗性芽长出 4~6 片真叶时, 将上胚轴插于含有 10 mg/L Basta 的生根培养基(含 0.2% 活性炭、1.5 mg/L IBA 的 1/2 MS 培养基)中培养 10~15 d, 于叶片颜色深绿时嫁接.

1.2.5.3 转基因植株的鉴定

当嫁接成活的 Basta 抗性植株长出 5~8 片叶时, 采叶片提取 DNA, 用 35S 引物检测转基因植株.

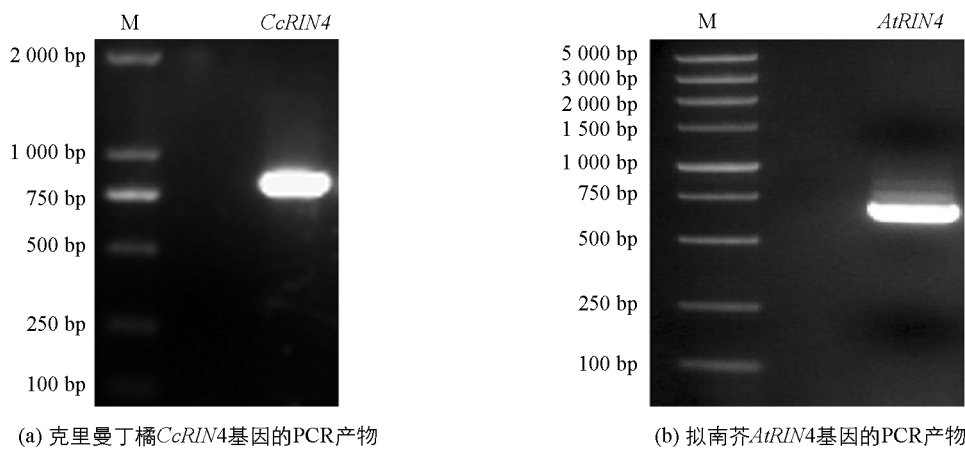
2 结果与分析

2.1 柑橘和拟南芥 *RIN4* 基因的扩增及序列分析

以克里曼丁橘叶片 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增出 *CcRIN4* 的片段大小约为 800 bp(图 1(a)), 测序结果为 795 bp, 与克里曼丁 *RIN4* 基因序列(Ciclev10021726m CDS)的一致性为 99.874%, 起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TAA.

以拟南芥叶片 cDNA 为模板, 扩增出一条大小约为 650 bp 的条带(图 1(b)), 测序结果显示其大小为 636 bp, 与拟南芥 *RIN4* 基因序列(AT3G25070)的一致性为 99.686%, 起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TAA.

经比对, 克里曼丁 *CcRIN4* 与拟南芥 *AtRIN4* 核苷酸序列的相似度为 38.24%, 克里曼丁 *CcRIN4* 推导的氨基酸序列与拟南芥 *AtRIN4* 的蛋白序列相似度为 40.45%.

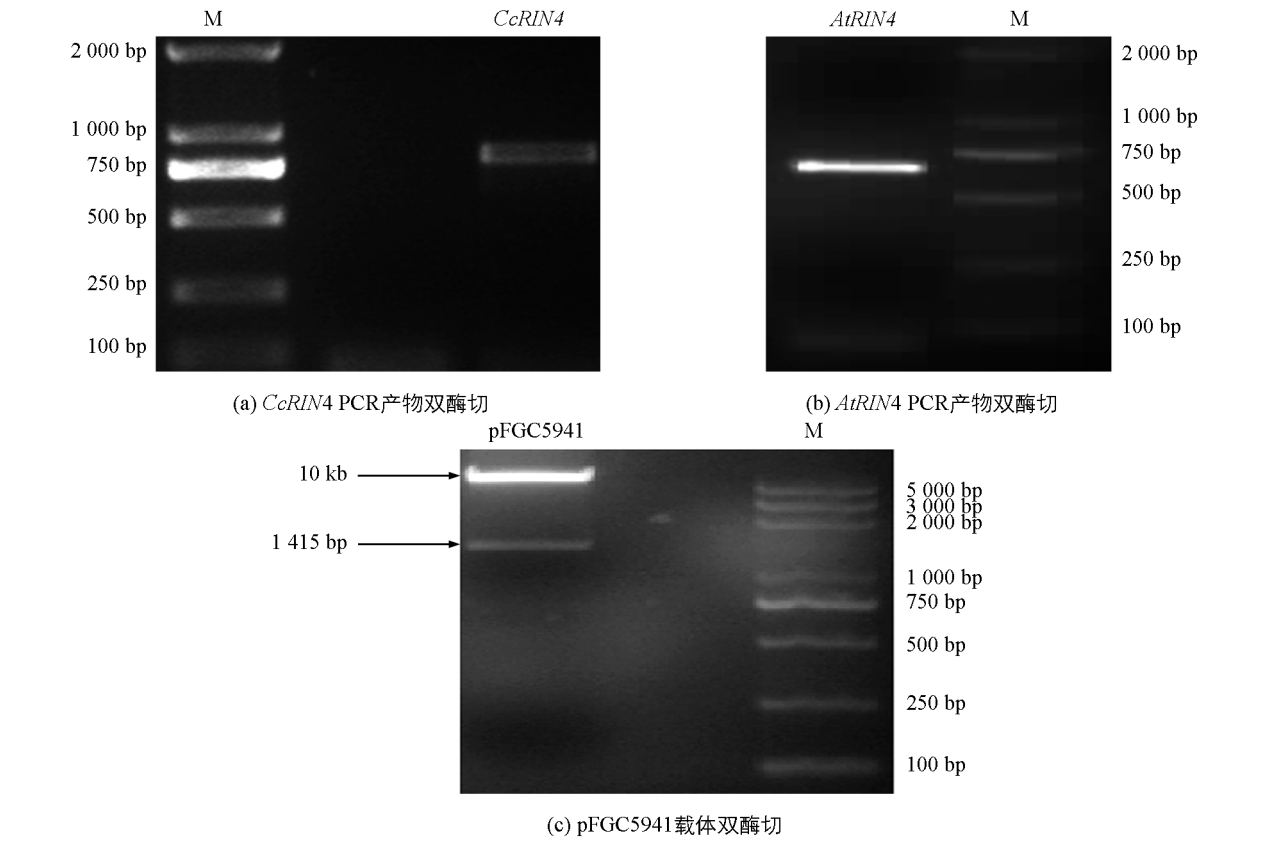


M 为 DL 2000 和 DL5000 DNA marker.

图 1 柑橘和拟南芥 *RIN4* 基因的 PCR 产物

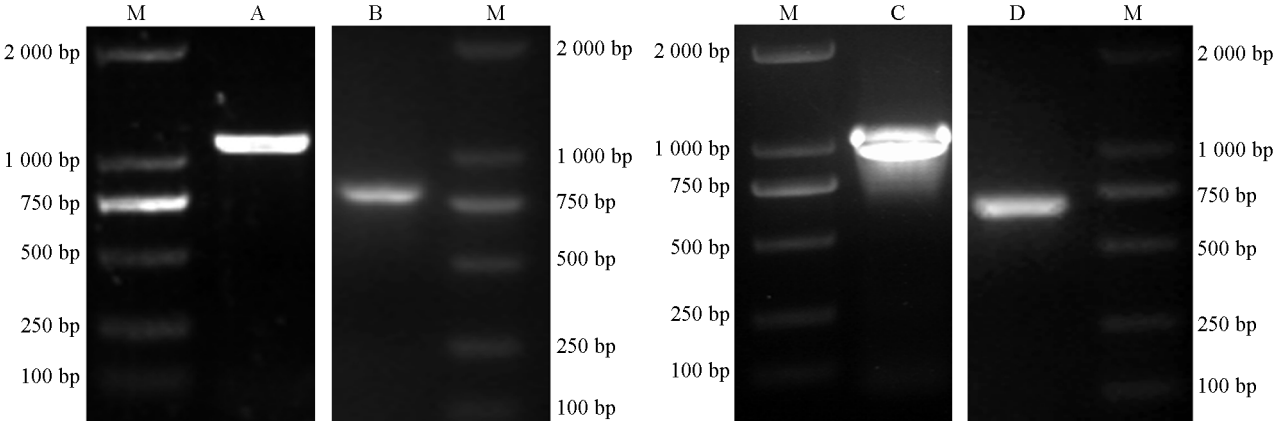
2.2 过量表达载体 pFGC5941-*RIN4* 的构建

用限制性内切酶 *Asc* I / *Sma* I 对目的片段和载体片段进行双酶切. *CcRIN4* 和 *AtRIN4* 基因的目的片段酶切前后几乎无差异(图 2(a)和(b)), 载体 pFGC5941 经酶切后得到 2 个片段, 包括大小约为 10 000 bp 的载体骨架序列和大小为 1 415 bp 的小片段(图 2(c)), 均符合预期大小. 将 *CcRIN4* 和 *AtRIN4* 基因目的序列和 pFGC5941 骨架序列回收后连接为重组质粒, 转化大肠杆菌, 获得了阳性克隆. 阳性克隆用 PCR 检测验证后进行菌液培养, 提取重组质粒, 再次进行 PCR 验证, 结果与预期符合(图 3), 表明过量表达载体 pFGC5941-*CcRIN4*和 pFGC5941-*AtRIN4* 已成功构建.



M 为 DL2000 DNA marker 和 D5000 Plus marker.

图 2 柑橘和拟南芥 *RIN4* 基因 PCR 产物及 pFGC5941 质粒的 *Asc* I/*Sma* I 双酶切图谱



M. DL2000 DNA marker; A, B. pFGC5941-*CcRIN4* 质粒分别经 P1/P2 和 *CcRIN4*A/S 扩增所得产物; C, D. pFGC5941-*AtRIN4* 质粒分别经 P1/P2 和 *AtRIN4*A/S 扩增所得产物.

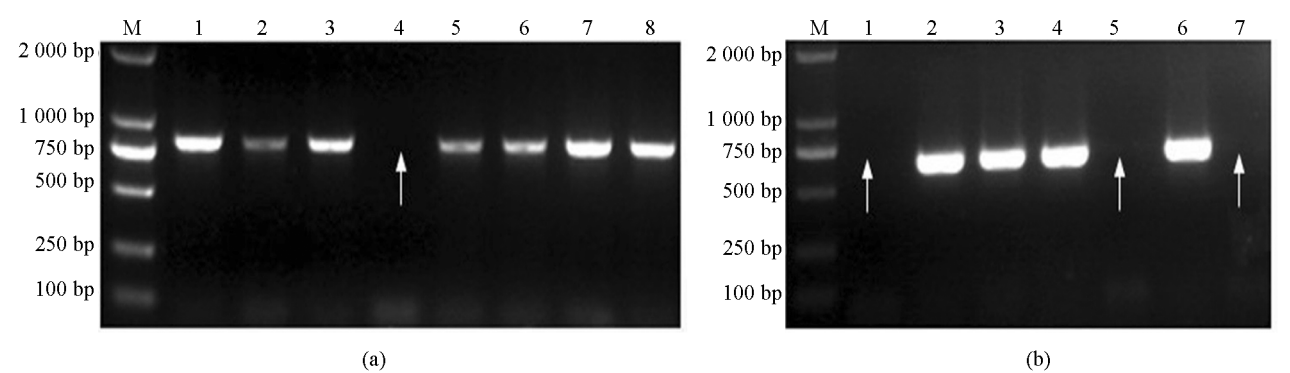
图 3 柑橘 pFGC5941-*CcRIN4* 和拟南芥 pFGC5941-*AtRIN4* 质粒 PCR 产物

2.3 根癌农杆菌工程菌的获得

将重组质粒 pFGC5941-*CcRIN4* 和 pFGC5941-*AtRIN4* 用电击法转入根癌农杆菌 EHA105, 分别获得过量表达 *CcRIN4* 和 *AtRIN4* 基因的农杆菌工程菌, 随机挑选 7~8 个菌斑进行菌液 PCR 检测, 其检测结果见图 4.

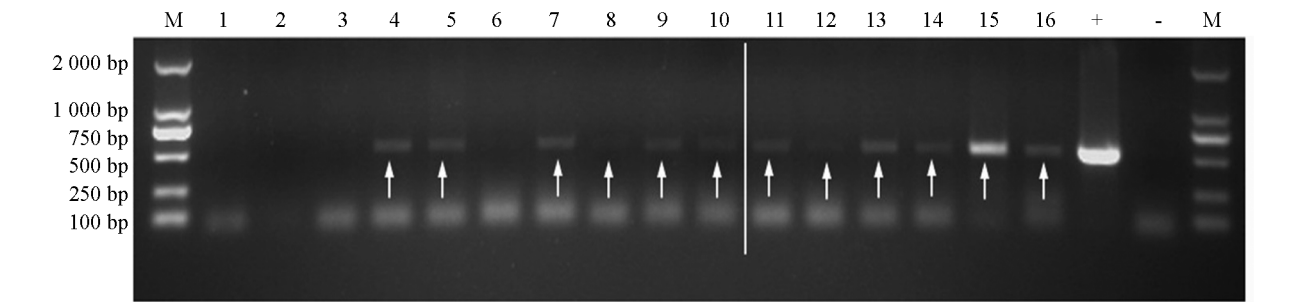
2.4 沙田柚转基因植株的鉴定

将带有抗性芽的上胚轴嫁接到沙田柚后, 成活 16 株, 待其长出 5~8 片真叶时取叶片提取 DNA, 用 35S 检测引物进行 PCR 检测, 共发现 12 株为阳性, 转 *CcRIN4* 基因和转 *AtRIN4* 基因的沙田柚各 6 株(图 5).



M 为 DL2000 DNA marker; (a) 为 pFGC5941-*CcRIN4* 农杆菌菌液检测, 1—8 为 pFGC5941-*CcRIN4* 单克隆菌液 PCR 检测; (b) 为 pFGC5941-*AtRIN4* 农杆菌菌液检测, 1—7 为 pFGC5941-*AtRIN4* 单克隆菌液 PCR 检测; 有主带的泳道表示菌液检测为阳性, 箭头所在泳道表示菌液为假阳性.

图 4 柑橘 pFGC5941-*CcRIN4* 和拟南芥 pFGC5941-*CcRIN4* 农杆菌菌液 PCR 检测结果



M 为 DL2000 DNA marker; 1—16 为嫁接抗性芽后成活的 16 株沙田柚, 其中 1—10 为转 *AtRIN4* 基因的沙田柚植株, 11—16 为转 *CcRIN4* 基因的沙田柚植株; 箭头标示之处表示用 35S 引物检测呈阳性的沙田柚植株, 未标箭头表示用 35S 引物检测呈阴性的沙田柚植株; + 表示阳性对照, - 表示阴性对照; 3 次独立的 PCR 验证表明试验的重复性良好.

图 5 转基因沙田柚 PCR 检测

3 结 论

本研究成功构建了柑橘和拟南芥 *RIN4* 基因的过量表达载体, 通过根癌农杆菌介导的遗传转化, 将其整合到沙田柚基因组中, PCR 检测结果表明获得转 *CcRIN4* 基因和转 *AtRIN4* 基因的沙田柚各 6 株, 为后续研究柑橘和拟南芥 *RIN4* 基因在柑橘与病原互作过程中的作用(如黄龙病、溃疡病等细菌性病害)奠定了材料基础.

参考文献:

[1] MACKEY D, HOLT III B F, WIIG A, et al. *RIN4* Interacts with *Pseudomonas Syringae* Type III Effector Molecules and is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2002, 108(6): 743—754.

[2] AXTELL M J, STASKAWICZ B J. Initiation of RPS2-Specified Disease Resistance in *Arabidopsis* is Coupled to the Avr-Rpt2-Directed Elimination of *RIN4* [J]. *Cell*, 2003, 112(3): 369—377.

[3] COAKER G, FALICK A, STASKAWICZ B. Activation of a Phytopathogenic Bacterial Effector Protein by a Eukaryotic Cyclophilin [J]. *Science*, 2005, 308(5721): 548—550.

[4] LUO Y, CALDWELL K, WROBLEWSKI T, et al. Proteolysis of a Negative Regulator of Innate Immunity is Dependent on Resistance Genes in Tomato and *Nicotiana Benthamiana* and Induced by Multiple Bacterial Effectors [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(8): 2458—2472.

[5] WILTON M, SUBRAMANIAM R, ELMORE J, et al. The Type III Effector HopF2_{Pto} Targets *Arabidopsis RIN4* Protein to Promote *Pseudomonas Syringae* Virulence [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(5): 2349—2354.

[6] MACKEY D, BELKHADIR Y, ALONSO J M, et al. *Arabidopsis RIN4* is a Target of the Type III Virulence Effector

- AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance [J]. *Cell*, 2003, 112(3): 379–389.
- [7] KIM M G, DA CUNHA L, MCFALL A J, et al. Two *Pseudomonas Syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2005, 121(5): 749–759.
- [8] SELOTE D, KACHROO A. RIN4-Like Proteins Mediate Resistance Protein-Derived Soybean Defense Against *Pseudomonas Syringae* [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, 5(11): 1453–1456.
- [9] SELOTE D, KACHROO A. RPG1-B-Derived Resistance to AvrB-Expressing *Pseudomonas Syringae* Requires RIN4-Like Proteins in Soybean [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(3): 1199–1211.
- [10] LINDQVIST-KREUZE H, CARBAJULCA D, GONZALEZ-ESCOBEDO G, et al. Comparison of Transcript Profiles in Late Blight-Challenged *Solanum Cajamarquense* and B3C1 Potato Clones [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(4): 513–530.
- [11] LI C Y, DENG G M, YANG J, et al. Transcriptome Profiling of Resistant and Susceptible Cavendish Banana Roots Following Inoculation with *Fusarium Oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 374.
- [12] 钟 云. *Candidatus liberibacter asiaticus* 诱导的柑橘转录组学及蛋白组学研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [13] 于庆涛, 周常勇, 杨 帆. 从感染叶片中提取柑橘衰退病毒总核酸 3 种方法的比较 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2007, 29(12): 54–57.
- [14] 阳佳位, 王 森, 程春振, 等. 利用重叠延伸 PCR 定点突变衰退病 P23 基因 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2009, 31(12): 43–47.
- [15] 张凌云. 乙烯诱导柑橘果实脱落的转录基因组学研究及乙烯诱导基因的克隆和鉴定 [D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [16] 贝学军. 伏令夏橙伤害诱导蛋白基因功能解析 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [17] 胡新喜, 敖小平, 邓子牛, 等. 沙田柚遗传转化再生体系的建立 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(7): 177–180.
- [18] MARUTANI-HERT M, BOWMAN K D, MCCOLLUM G T, et al. A Dark Incubation Period is Important for *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Mature Internode Explants of Sweet Orange, Grapefruit, Citron, and a Citrange Rootstock [J]. *PloS One*, 2012, 7(10): e47426.

Construction of Over-Expression Vectors for *RIN4* Gene from *Citrus* and *Arabidopsis* and Their Transformation Into Shatianyou Pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck)

LI Ju^{1,2}, CHENG Chun-zhen^{1,2}, ZHANG Yong-yan²,
ZHONG Yun², ZHONG Guang-yan², LU Zhi-ming¹

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

Abstract: The open reading frames of *CcRIN4* and *AtRIN4* genes were cloned from *Citrus clementina* and *Arabidopsis thaliana* by RT-PCR, and ligated into the binary vector pFGC5941, respectively. The over-expression vectors were transformed into *Agrobacterium* strain EHA105. Six *CcRIN4* and six *AtRIN4* transgenic plants were obtained by co-culturing the vector carrying EHA105 and Shatianyou (*C. grandis*) epicotyl segments. The transgenic plants obtained in this study will serve as materials in future studies on the role of *RIN4* gene in citrus-microbe interactions.

Key words: cloning; over-expression vector; transformation; *Citrus grandis* (L.) Osbeck ‘Shatianyou’

