

采用 RNA 干扰技术分析拟南芥 Ca^{2+} 泵基因 *ECA1* 的功能

朱炜^{1,2}, 黄丛林¹, 张秀海¹, 王永勤¹, 魏建民², 于荣³, 吴忠义^{1,*}

¹北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 北京 100097; ²内蒙古农业大学生物工程学院, 呼和浩特 010018; ³首都师范大学生命科学院, 北京 100037

摘要: 构建了含拟南芥 Ca^{2+} 泵基因 *ECA1* 特异片段反向重复结构的 RNA 干扰(RNAi)载体, 以根癌农杆菌介导转化拟南芥, 用卡那霉素筛选和 PCR 检测, 获得了 11 个 T_3 代纯合体转基因株系; 半定量 RT-PCR 方法检测 *ECA1* 在转基因株系中转录的结果表明, 其转录产物比野生型(WT)明显低, 且转基因株系之间差异明显, 表达水平有一个梯度关系; 在 1/2MS 培养基上转基因株系与野生型的差异不明显, 相对于野生型而言, 在相对低 Ca^{2+} (0.2 mmol·L⁻¹) 或相对高 Mn^{2+} (0.5 mmol·L⁻¹) 的培养基上的转基因株系生长受到不同程度的抑制, *ECA1* 转录量越低, 生长受到的抑制越大。据此认为: *ECA1* 对植物的生长发育和抵御逆境胁迫有作用。

关键词: Ca^{2+} 泵; RNA 干扰(RNAi); 转录后基因沉默

Analysis of *ECA1* Function by RNA Interference in *Arabidopsis thaliana*

ZHU Wei^{1,2}, HUANG Cong-Lin¹, ZHANG Xiu-Hai¹, WANG Yong-Qin¹, WEI Jian-Min², YU Rong³, WU Zhong-Yi^{1,*}

¹Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China;

²College of Biology Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; ³College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100037, China

Abstract: The RNA interference (RNAi) vector containing *ECA1* (endoplasmic reticulum-type calcium-transporting ATPase 1) gene-specific sequences in the sense and antisense orientations was constructed and transformed into *Arabidopsis thaliana* plant by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, and 11 homozygous transgenic lines were obtained through kanamycin screening and PCR assays. The transcriptional product of *ECA1* in transgenic lines was obviously reduced comparing with that of wild type (WT) by semi-quantity RT-PCR analysis. In addition, there were some remarkable differences in *ECA1* mRNA products between transgenic lines. But there was no significant difference between transgenic lines and wild type growing on 1/2MS medium. However, the growth of transgenic lines was inhibited on media containing low Ca^{2+} (0.2 mmol·L⁻¹) or high Mn^{2+} (0.5 mmol·L⁻¹) as comparison with that of wild type. The tolerances to low Ca^{2+} or high Mn^{2+} were consistent with the mRNA level of *ECA1*. Therefore, we propose that *ECA1* plays an important role in plant growth and stress tolerance.

Key words: calcium pump; RNAi; post-transcriptional gene silencing

Ca^{2+} 对植物的生长发育至关重要, 它不仅是细胞中的营养离子, 还是植物细胞中普遍存在的信号物质(Bush 1995)。 Ca^{2+} 作为营养成分, 是植物细胞壁的组成成分和一些酶类的活化剂(如 ATP 酶、琥珀酸脱氢酶等), 参与光合放氧, 可提高细胞膜的稳定性。 Ca^{2+} 作为胞内的第二信使, 它在植物转导各种逆境信号中起调控作用(Gilroy 和 Trewavas 2001)。

植物细胞中的 Ca^{2+} 浓度是受严格控制的, 植物对细胞内 Ca^{2+} 浓度的调节依赖于定位在不同细胞器和质膜上的 Ca^{2+} 通道(calcium channel)、 Ca^{2+} 泵(calcium pump)和 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反转运子(calcium pro-

ton antiporter)的活性(Sze 等 2000; Schumaker 和 Sze 1986; Subbaiah 和 Sachs 2000)。相比于 Ca^{2+} 通道而言, Ca^{2+} 泵和 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反转运子的作用很少受到重视, 但是 Ca^{2+} 泵和 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反转运子的作用不容忽视。有证据表明, Ca^{2+} 泵和 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反转运子可调控 Ca^{2+} 信号出现的幅度、频率和持续时间(Berridge 等 2000)。

钙离子泵(Ca^{2+} -ATPase)属于 P-型 ATPase 家

收稿 2008-03-19 修定 2008-05-20

资助 国家自然科学基金(30400228、30600318)和北京市自然科学基金(5062012)。

* 通讯作者(E-mail: zwu22@126.com)。

族, 直接用 ATP 驱动离子转运。迄今为止, 植物中已发现数种 Ca^{2+} 泵, 主要分为两类: 内质网型(ER-type calcium ATPase, ECAs)和自我抑制型(autoinhibited calcium ATPase, ACAs) (Sze 等 2000)。ECA1 和 ACA2 两者都定位于内质网膜上(Harper 等 1998; Liang 等 1997), ACA2 可以运输 Ca^{2+} , ECA1 可运输 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 等二价阳离子(Wu 等 2002), 但他们是如何分工与合作的? 其生理功能还不清楚。

近年来已证明, RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术是比较有效的抑制基因表达的方法之一(Fire 等 1998)。本文以构建的拟南芥 Ca^{2+} 泵基因 *ECA1* 的 RNAi 载体, 通过根癌农杆菌转化拟南芥, 在转录水平上引起 Ca^{2+} 泵基因 *ECA1* 特异降解, 并以之研究 Ca^{2+} 泵基因的功能, 同时用 RNAi 转基因株系研究 *ECA1* 的功能。

材料与方法

野生型(WT)拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Columbia 生态型)种子、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101)、中间载体 PUC18、双元载体 pGreen0029、大肠杆菌 DH5 α 均来自北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心花卉实验室。

限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、去磷酸化

酶、EX Taq DNA 聚合酶均为 Takara 公司生产, 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)为 Amresco 公司生产, RNA 提取试剂盒为 Invitrogen 公司生产, 胶回收试剂盒由东胜创新公司生产, 其他试剂购自上海生工公司, 引物合成由上海生工公司完成, 测序由三博公司完成。

CTAB法提取拟南芥基因组DNA(王关林和方宏筠 2002)。设计针对钙泵基因 *ECA1* 特异引物 ECA1-UP (5' GTTGGATCCGTGATGGGACTAAG-GTTTC 3') 和 ECA1-LOW (5' ATTGGATCCGG-TATCTTCCTCGTGTTGT 3'), PCR 扩增得到 350 bp 外显子片段。先将此片段以正、反向分别连入 PUC18 载体, 并在正、反向片段之间连入绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因(725 bp), 然后用 *Bam*HI 和 *Pst*I 双酶切, 回收此片段(约 1 450 bp), 然后将此片段连入已经连有 35S 启动子、增强子、NOS 终止子的 pGreen0029 载体上, 构建成 RNAi 载体 pGreen0029-ECA1-Sense-GFP-ECA1-Antisense (E1-G-E1) (图 1)。将 E1-G-E1 转化 DH5 α 感受态细胞, 在卡那霉素平板上筛选抗性克隆, 用 *Bam*HI 和 *Pst*I 双酶切鉴定。然后用单引物 ECA1-UP 进行 PCR 扩增, 经鉴定确认, *ECA1*-Sense 和 *ECA1*-Anti Sense 插入方向正确后将样品送出测序, 并用于后续实验。

将构建好的载体 E1-G-E1 和辅助质粒 p-Soup

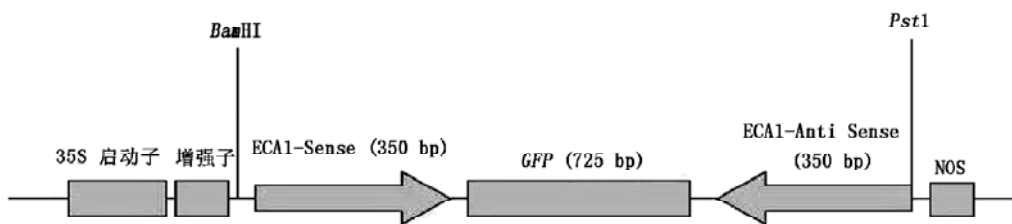


图 1 沉默 *ECA1* 的 RNAi 载体
Fig.1 RNAi vector for *ECA1* silence

同时转入根癌农杆菌 GV3101, 以空载体作对照, 在含 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 庆大霉素、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 四环素和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平的四抗平板上筛选阳性菌株, 挑单菌落, PCR 鉴定为阳性。

挑取阳性农杆菌接种于液体四抗培养基上, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、转速为 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下, 过夜培养至 OD₆₀₀ 达 0.8~1.5, 离心收集菌体, 用渗透培养

液重悬, OD₆₀₀ 达 1.0~1.5 为止。

将重悬后的农杆菌菌液倒在小烧杯里, 静置 1 h 后, 将刚开花的拟南芥的培养皿倒扣于其上, 保证莲座以上部分浸没于菌液中, 5 min 后取出, 装入黑色塑料袋中, 12 h 后取出, 4~5 d 后再侵染一次, 待种子成熟后, 收获种子(Clough 和 Bent 1998)。

将种子消毒后播种于含 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的MS培养基上,初步筛选出转基因苗。

CTAB法提取拟南芥基因组DNA,设计GFP特异引物GFP-up (5' AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA 3')和GFP-low (5' GCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCT 3'),转基因株系预期扩增出623 bp的片段。

对 T_0 代具有卡那霉素抗性的转基因株系进行PCR检测,分别收取PCR检测为阳性的转基因株系的种子(T_1);将单株转基因拟南芥种子消毒后播种在含 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的MS培养基上,由于基因分离,未转入外源基因的幼苗会死去,将存活的幼苗移栽在营养土中,种子成熟后,分别收取单株种子(T_2);再播种在含 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的MS培养基上,由于基因分离,未转入外源基因的幼苗会死去,将存活的幼苗移栽在营养土中,种子成熟后,分别收取单株种子(T_3);再播种在含 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的MS培养基上,如果其后代全部存活,即基因不发生分离,说明此 T_3 种子为转基因纯合体,若还有分离,则继续按上述方法筛选,直至获得纯合体。

按照Invitrogen公司的Trizol试剂盒提供的方法提取拟南芥叶片总RNA,经过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测确认无降解后,可进行反转录。分别以野生型和转基因纯合体株系的cDNA为模板,ECA1-UP和ECA1-LOW为引物,PCR扩增,预期得到350 bp的条带。以拟南芥延伸因子基因(*EF-1 α*)为内参设计引物EF-1 α -up (5' GTGACAATGGAAGTGAATGG 3')和EF-1 α -low (5' AGACGGAGGATAGCGTGAGG 3'),PCR扩增预期得到545 bp的条带。比较转基因植株和野生型*ECA1*的转录量。

在低 Ca^{2+} 处理时,将转基因株系 T_3 代纯合体和野生型播种于1/2MS培养基上,于23、16 h光照(光照强度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)和8 h黑暗条件下,培养5 d后转移到含 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 的培养基上生长10 d,拍照。实验重复3次。

在高 Mn^{2+} 处理时,将转基因株系 T_3 代纯合体和野生型播种于1/2MS培养基上,于23、16 h光照(光照强度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)和8 h黑暗条件下,培养5 d后转移到含 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnSO_4 的培养基上生长10 d,拍照。实验重复3次。

结果与讨论

1 PCR扩增*ECA1*特异目的片段

以拟南芥基因组DNA为模板,ECA1-UP和ECA1-LOW为引物,PCR扩增不含有内含子的特异片段E1,产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,可见350 bp的条带,与预计的片段大小相符(图2),测序验证确认正确后,用于构建RNAi载体。

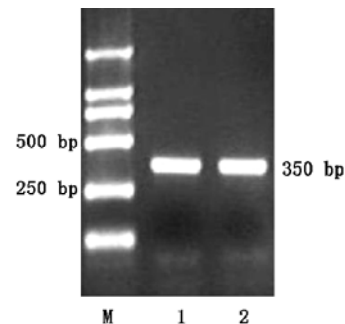


图2 PCR扩增产物E1电泳图谱

Fig.2 Electrophoretogram of PCR product of E1
M: DL2000 Marker; 1 and 2: E1.

2 RNAi载体E1-G-E1的构建

按照“材料与方法”中的载体构建方法构建RNAi载体E1-G-E1,将载体用*Bam*HI和*Pst*I双酶切,经1%琼脂糖凝胶电泳检测,可见大约1450和5500 bp两条带,与预计的片段大小相符(图3)。由于用单引物ECA1-UP进行PCR扩增可得到预期1450 bp的条带(图4,第2泳道),说明正反方向插入的片段大小正确,经过测序,序列正确,表明图4第2泳道的模板DNA符合图1所示

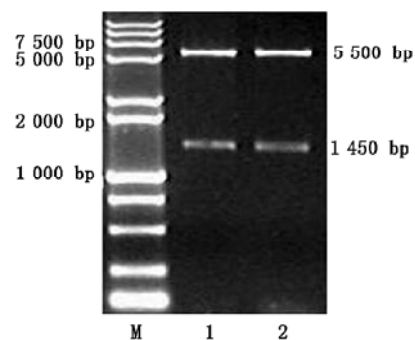


图3 E1-G-E1的酶切鉴定

Fig.3 Digestion of E1-G-E1 with restricted enzymes
M: DL2000+15000 Marker; 1 and 2: E1-G-E1经*Bam*HI/*Pst*I双酶切。

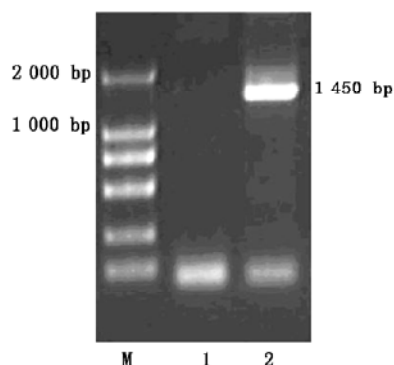


图4 E1-G-E1 反向重复结构的PCR 鉴定
Fig.4 Identification of inverted repeat structure
in E1-G-E1 by PCR
M : DL2000 Marker ; 1 和 2 : E1-G-E1。

RNAi 载体结构, 将此 DNA 导入农杆菌 GV3101, 用于拟南芥转化。

3 转基因株系 T_0 代 PCR 检测

农杆菌介导 E1-G-E1 转化拟南芥后, 收取的种子经过卡那霉素筛选得到 11 株 T_0 代转基因株系。分别以 11 个 T_0 代转基因株系基因组 DNA、1 个野生型叶片基因组 DNA、载体 E1-G-E1 DNA 为模板, GFP-up 和 GFP-low 为引物, PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 转基因株系和 E1-G-

E1 均可扩增出 623 bp 的条带, 而野生型植株未扩增出相应条带, 初步确定上述 11 个转基因株系为阳性株系(图 5)。这 11 株 T_0 代转基因株系后代种子可用于筛选转基因纯合体。

4 半定量 RT-PCR

分别以 11 个 T_3 代转基因纯合体株系和 1 个野生型的 cDNA 为模板, ECA1-UP 和 ECA1-LOW 为引物, PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可扩增出 350 bp 的条带(图 6-a)。电泳结果显示, 11 个 T_3 代转基因株系的 ECA1 基因的转录量比野生型有不同程度的减少。说明 RNAi 载体 E1-G-E1 在转录水平上对 ECA1 的干扰是有效的。其中 ECA1 转录产物减少量较多的分别为 E1-5、E1-8 和 E1-11, 转录产物减少量比较少的分别为 E1-2、E1-3、E1-6 和 E1-7, 介于两者之间的分别为 E1-1、E1-4、E1-9 和 E1-10。另外, 分别以 11 个 T_3 代转基因纯合体株系和一个野生型的 cDNA 为模板, EF-1 α -up 和 EF-1 α -low 为引物, PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可扩增出 545 bp 的条带(图 6-b)。

5 1/2MS 培养基上转基因株系的生长

将转基因株系 T_3 代纯合体 E1-1 (图 7-a)、E1-2 (图 7-b)、E1-5 (图 7-c) 和 E1-8 (图 7-d) 分别播

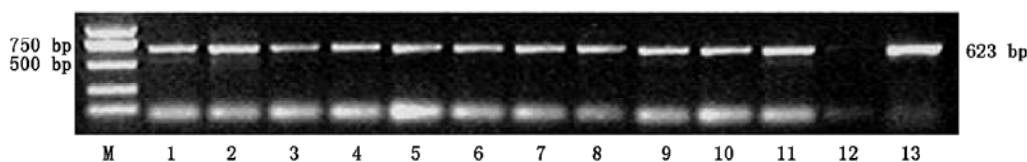


图5 转基因株系 T_0 的 PCR 检测
Fig.5 Detection of transgenic lines (T_0) by PCR
M : DL2000 Marker ; 1~11 : 转基因株系 E1-1~E1-11 ; 12 : 野生型植株 ; 13 : E1-G-E1。

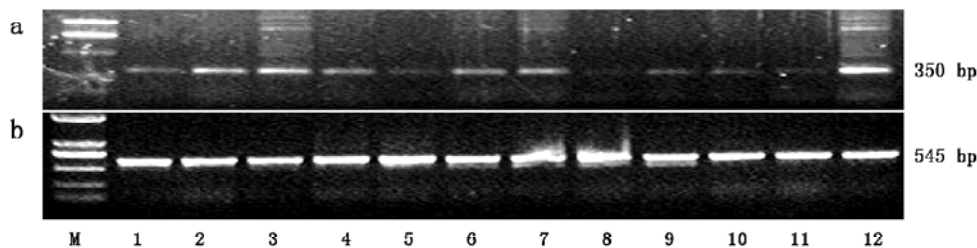


图6 RNAi 载体 E1-G-E1 诱导 ECA1 基因沉默的半定量 RT-PCR 分析
Fig.6 Semi-quantity RT-PCR analysis of E1-G-E1 induced ECA1 silencing
M : DL2000 Marker ; 1~11 : 转基因株系 E1-1~E1-11 ; 12 : 野生型对照。a : 用引物 ECA1-UP 和 ECA1-LOW RT-PCR 扩增得到 350 bp 条带 ; b : 用引物 EF-1 α -up 和 EF-1 α -low RT-PCR 扩增得到 545 bp 条带。

种在含 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 和 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MnSO}_4$ 的 1/2MS 培养基上, 以野生型植株为对照, 10 d 后, 转基因株系与野生型植株根长区别不明显。

6 转基因株系对钙的反应

将转基因株系 T_3 代纯合体 E1-1 (图 8-a)、E1-2 (图 8-b)、E1-5 (图 8-c) 和 E1-8 (图 8-d) 分别播种

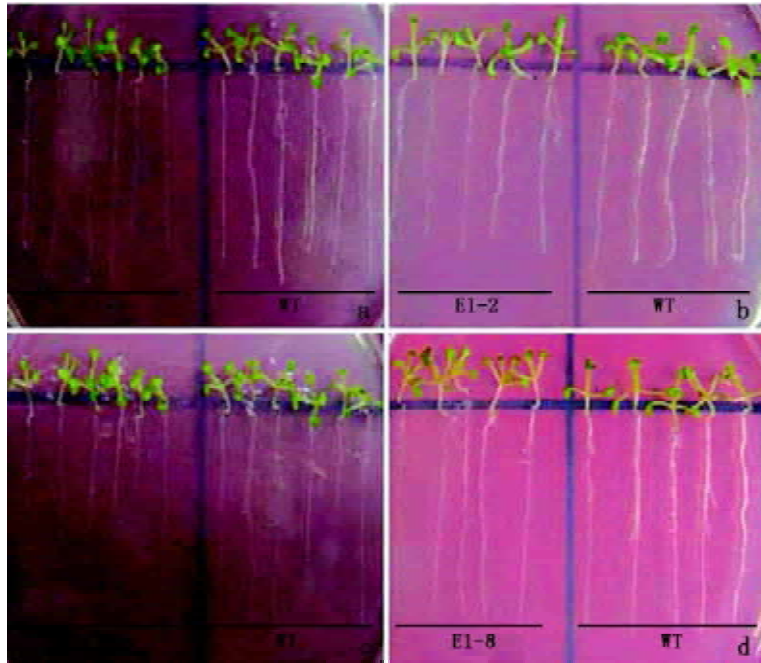


图7 1/2MS 培养基上的转基因株系和野生型株系生长比较

Fig.7 Comparison on growth of transgenic and nontransgenic plants grown in 1/2MS

a : E1-1 ; b : E1-2 ; c : E1-5 ; d : E1-8。

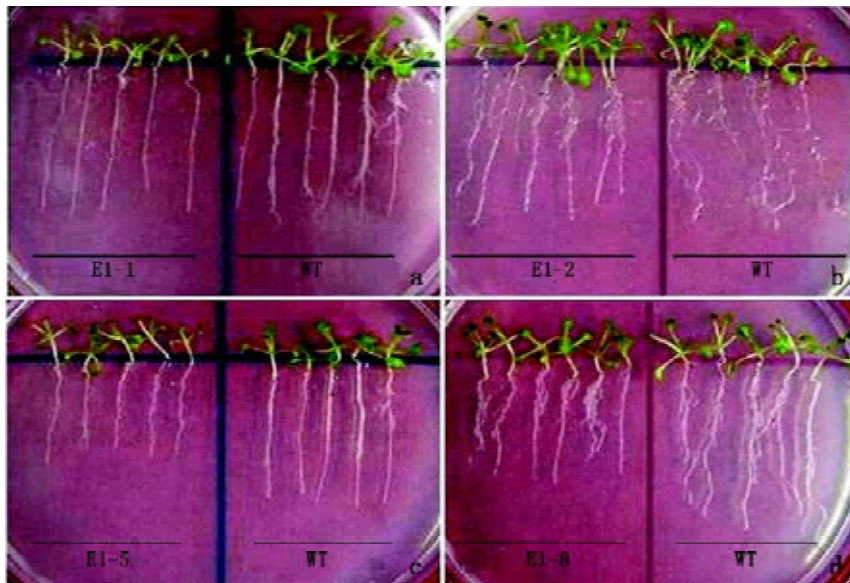


图8 仅含 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 的 1/2MS 培养基上转基因株系与野生型植株生长比较

Fig.8 Comparison on growth of transgenic and nontransgenic plants grown in 1/2MS contained only $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$

a : E1-1 ; b : E1-2 ; c : E1-5 ; d : E1-8。

在 1/2MS ($1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$) 培养基上, 以野生型植株为对照, 5 d 后转移到含 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 的培养基上, 生长 10 d 后, 转基因株系 E1-5 和 E1-8 的根长比野生型植株稍微短一些, 而转基因株系 E1-1 和 E1-2 的根长与野生型植株无明显差别。

7 转基因株系对锰的反应

将转基因株系 T_3 代纯合体 E1-1、E1-2、E1-5 和 E1-8 分别播种在 1/2MS ($0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MnSO}_4$) 培养基上, 以野生型植株为对照, 5 d 后转移到含 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MnSO}_4$ 的 1/2MS 培养基上, 生长 10 d 后, 转基因株系 E1-1 (图 9-a)、E1-5 (图 9-c) 和 E1-8 (图 9-d) 比野生型植株叶片变黄程度大, 而且随着培养时间的延长, 转基因株系叶片逐渐枯萎, 野生型植株的叶片虽然也出现黄化, 但未枯萎; 而转基因株系 E1-2 (图 9-b) 的叶片与野生

型叶片都略变黄, 但是差异不明显。

总之, RNAi 技术已被证实具有快速、特异、高效研究基因功能的特点 (Chuang 和 Meyerowitz 2000)。本文采用 RNAi 技术获得 *ECA1* 表达受到干扰的转基因株系, 其耐受相对较低 Ca^{2+} ($0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$) 和相对较高 Mn^{2+} ($0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MnSO}_4$) 胁迫的能力降低。这与 Wu 等 (2002) 以 *ECA1* 的 T-DNA 插入突变体得到的结果一致。说明 RNAi 技术用于研究钙离子泵功能是有有效而可行的。从半定量 RT-PCR 结果可以看出, 11 个转基因株系 *ECA1* 的转录物比野生型植株均有不同程度的下降, 且转基因株系之间差异明显, 基本上呈现出梯度关系。这一方面表明 RNAi 转基因株系的 *ECA1* 在转录水平上确实受到不同程度的干扰; 另一方面说明, RNAi 转基因株系间基因沉默效果存在差异。

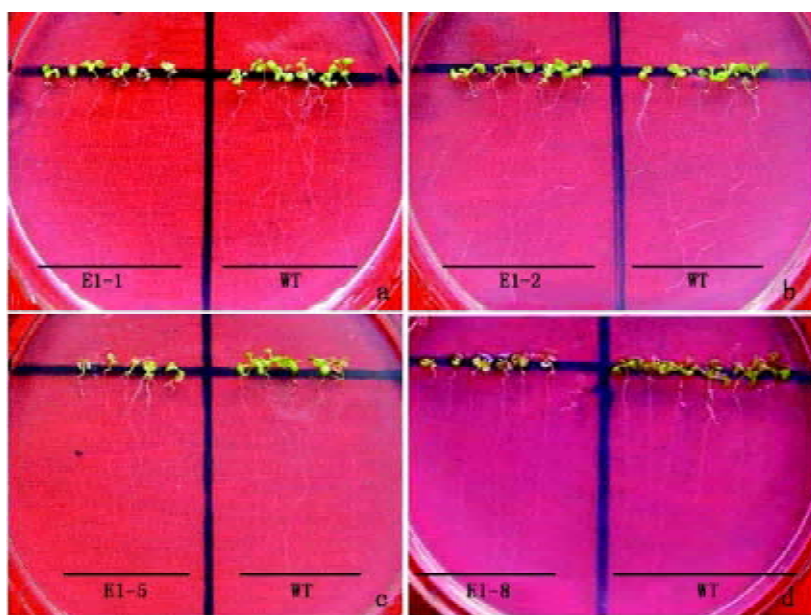


图9 添加 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MnSO}_4$ 的 1/2MS 培养基上转基因株系与野生型植株生长比较

Fig.9 Comparison on growth of transgenic and nontransgenic plants grown in 1/2MS supplemented with $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MnSO}_4$
a : E1-1 ; b : E1-2 ; c : E1-5 ; d : E1-8.

参考文献

王关林, 方宏筠 (2002). 植物基因工程. 第 2 版. 北京: 科学出版社
Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000). The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 11~21
Bush DS (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46:

95~122

Chuang CF, Meyerowitz EM (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 4985~4990
Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16: 735~743

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806~811
- Gilroy S, Trewavas A (2001). Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 307~314
- Harper JF, Hong B, Hwang I, Guo HQ, Stoddard R, Huang JF, Palmgren MG, Sze H (1998). A novel calmodulin-regulated Ca^{2+} -ATPase (*ACA2*) from *Arabidopsis* with an N-terminal auto-inhibitory domain. *J Biol Chem*, 273: 1099~1106
- Liang F, Cunningham KW, Harper JF, Sze H (1997). ECA1 complements yeast mutants defective in Ca^{2+} pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca^{2+} -ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 8579~8584
- Schumaker KS, Sze H (1986). Calcium transport into the vacuole of oat roots. Characterization of $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity. *J Biol Chem*, 261: 12172~12178
- Subbaiah CC, Sachs MM (2000). Maize *cap1* encodes a novel SERCA-type calcium-ATPase with a calmodulin-binding domain. *J Biol Chem*, 275: 21678~21687
- Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC, Harper JF (2000). Diversity and regulation of plant Ca^{2+} pumps: insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51: 433~462
- Wu Z, Liang F, Hong B, Young JC, Sussman MR, Harper JF, Sze H (2002). An endoplasmic reticulum-bound $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn^{2+} stress. *Plant Physiol*, 130: 128~137