

# 单子叶植物 RNA 干扰和过表达 Gateway 载体的构建

毕惠惠<sup>1,2</sup>, 王根平<sup>1,2</sup>, 王成社<sup>1</sup>, 夏兰琴<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>西北农林科技大学农学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 杨凌 712100; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:**基因枪和农杆菌介导的遗传转化是目前常用的两种单子叶植物遗传转化方法。载体的发展和改良是提高植物遗传转化效率的重要基础, RNA 干扰载体和过表达载体是目前通过遗传转化研究植物基因功能的主要工具。Gateway 克隆技术是一种基于 lambda 噬菌体特异位点重组特性的通用克隆技术, 该技术可以将大批目的基因方便、快捷地连接到受体载体上。本文利用 Gateway 技术结合传统酶切、连接方法, 构建了适用于单子叶植物基因枪和农杆菌转化的 RNA 干扰 Gateway 载体 pAHC-PSK-RNAi、pClean-G185-RNAi 和过表达 Gateway 载体 pAHC-PSK-OE 和 pClean-G185-OE, 为利用基因枪和农杆菌介导的遗传转化, 在小麦和水稻等单子叶植物中进行规模化基因功能研究奠定了基础。

**关键词:**单子叶植物; 遗传转化; RNA 干扰; 过表达; Gateway

## Construction of RNAi and Overexpression Vectors for Genetic Transformation of Monocotyledonous Plants Based on Gateway Technology

BI Hui-hui<sup>1,2</sup>, WANG Gen-ping<sup>1,2</sup>, WANG Cheng-she<sup>1</sup>, XIA Lan-qin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas/College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100;

<sup>2</sup>Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** Particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformations are the two most widely employed methods in plant genetic transformation. Vector system plays an important role in development of an efficient transgenic technology. At present, RNAi and overexpression vectors are widely used for gene function analysis. Gateway is an efficient and high throughput cloning technology, which based on the site-specific recombination characteristics of lambda phage. Using Gateway technology, large numbers of genes can be cloned into the desired vectors quickly and conveniently. In this study, the overexpression vectors pAHC-PSK-OE and pClean-G185-OE, and the RNAi vectors pAHC-PSK-RNAi and pClean-G185-RNAi for biolistic or *Agrobacterium*-mediated transformations were constructed using traditional enzyme digestion and ligation methods and gateway technology. These vectors are likely useful for high throughput gene function studies in monocotyledonous plants in the future.

**Key words:** Monocotyledonous plants; genetic transformation; RNAi; overexpression; gateway

Gateway 技术是由 Invitrogen 公司开发的进行基因克隆的一项新技术<sup>[1-2]</sup>, 该技术借助位点特异性重组, 可以方便快捷地把目的基因克隆到受体载体上, 克服了传统载体构建过程中需进行的多次酶切和连接反应的繁琐操作步骤及酶切位点的限制等缺

点, 已广泛用于基因的克隆和载体构建。Gateway 技术主要包括 3 个反应: 定向 TOPO 克隆反应、LR 反应、BP 反应。TOPO 反应可定向克隆平端 PCR 产物到入门载体 (Entry Vector)。由于入门载体 attL1 一侧具有 GTGG 4 个碱基的突出, 在目的基因 PCR

收稿日期: 2012-01-18      修回日期: 2012-04-09

基金项目: 转基因专项项目 (2011ZX08010-003)

作者简介: 毕惠惠, 硕士研究生, 研究方向为生物技术育种。

通信作者: 夏兰琴, 博士, 研究员, 研究方向为小麦分子生物学与基因工程。E-mail: xialq@mail.caas.net.cn

王成社, 教授, 博士, 研究方向为生物技术育种。E-mail: wangcs2008@126.com

设计引物时,在正向引物的 5'端需加上 CACC 4 个碱基。TOPO 反应时,在 Topoisomerase I 的作用下,突出的 GTGG 与 PCR 产物的 5'末端 CACC 退火结合,从而将外源基因或表达盒定向克隆到 TOPO 载体上。LR 反应用于将目的基因从入门载体重组到目的载体。入门载体目的基因两端具有 *attL1* 和 *attL2* 重组位点,目的载体上具有 *attR1* 和 *attR2* 重组位点,在 LR 重组酶的作用下,两个载体间发生定向重组,从而将目的基因连接到目的载体上。另外,Gateway 重组技术利用了 *ccdB* 致死基因。*CcdB* 蛋白干扰大肠杆菌 DNA 促旋酶,抑制大肠杆菌大部分菌株的生长(例如 DH5 $\alpha$  和 TOP10 菌株)。由于 *CcdB* 蛋白的致死作用,只有携带重组成功的目的载体的克隆才能生长,而入门载体或未重组的目的载体克隆由于带有 *ccdB* 致死基因而不能生长,极大地降低了高背景的缺点,减少筛选时间<sup>[3]</sup>。同时,结合抗生素筛选,转化产物重组率可高达 90% 以上。因此,利用 Gateway 技术可快速进行基因/表达盒的克隆和目的载体的构建,适用于规模化转基因平台的建设和利用。

目前,植物基因功能研究的方法主要有 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)、基因过表达和突变体方法。RNAi 现象是 Fire 等<sup>[4]</sup>在线虫中发现的。细胞内核酸酶可以将外源或内源的双链 RNA 特异降解为 21 ~ 25 个碱基的干扰性 RNA (small interference RNA, siRNA),这些 siRNA 与细胞内同源的靶 RNA 互补结合,引起特异性酶降解靶 RNA,从而抑制、下调基因表达。RNAi 具有特异、稳定、高效以及不改变基因组的遗传组成等特性,成为基因功能研究的重要手段<sup>[5]</sup>。表达载体体内转录法是被广泛采用的产生双链 RNA (dsRNA) 方法之一<sup>[6]</sup>,该技术是从靶基因中选取一段特异序列,分别以正向、反向方式插入表达载体启动子下游,同时在正反向片段之间连入一段间隔序列,提高双链 RNA 的稳定。然后将表达载体导入植物受体材料,在植物体内反向重复序列转录后形成发夹结构,即稳定的 dsRNA,从而诱导内源靶基因沉默。Smith 等<sup>[7]</sup>发现最有效的双链 RNA 构件是能转录的发夹 RNA (hairpin RNA, hpRNA)。

在植物遗传转化中,外源基因表达量不足往往是得不到理想转基因植株的重要原因<sup>[8-10]</sup>,由于启动子在决定基因表达方面起到关键作用。因此,选用强启动子可以增强外源基因的表达。绝大多数双子叶植物转化载体均采用花椰菜花

叶病毒 35S 启动子,而在单子叶植物转化载体中一般使用玉米 *Ubiquitin* 启动子和水稻 *Actin1* 启动子<sup>[11]</sup>。Christensen 等<sup>[12]</sup>利用 *Ubiquitin* 启动子构建了一系列单子叶植物表达载体,pAHC25 载体就是其中之一。该载体含有 *Ubi* 启动子控制下的 *gus* 表达盒和 *bar* 表达盒,为单子叶植物高效组成型表达载体。pAHC25 载体已经作为基础载体,广泛应用于许多单子叶植物基因枪介导的遗传转化中。在 pAHC25 载体基础上,本实验室构建了 pAHC-PSK 载体,将 *gus* 表达盒中的 *gus* 基因切掉,连入了 PSK 多克隆位点,从而更加便于目的基因的连接。此外,为提高植物农杆菌转化效率,Hellens 等<sup>[13]</sup>构建了 pGreen/pSoup 载体系统,大大降低了质粒的长度,提高了其复制的拷贝数,且适用范围较广。基于 pGreen/pSoup 载体系统,英国 John Innes Centre Phillip Vain 博士实验室构建了 pClean 系列载体。与原始的 pGreen/pSoup 载体系统相比,pClean 系列载体还具有以下特点:(1) pClean 载体在 RB 序列外的骨架序列上连有额外的 *vir* 基因来提高转化效率;(2) 载体具有最小的 T-DNA 序列。原始的 pClean 系列载体的 T-DNA 具有 777 个核苷酸(包括 728 个核苷酸的多克隆位点),而 pClean 系列载体的 T-DNA 只有 102 个核苷酸(包括 52 个核苷酸的多克隆位点);(3) 减少了 pClean 与 pSoup 载体间的序列同源性;(4) 有些 pClean 载体中具有两个 LB 序列,可以促进农杆菌对 LB 序列的正确识别以及减少 LB 序列的通读,从而减少载体骨架序列的转移;(5) pClean 载体将报告基因和选择标记基因构建在 LB 序列外面的载体骨架上,从而利用农杆菌转化中 T-DNA 的插入特性,可产生无选择标记的转基因植株<sup>[14]</sup>。因此,pClean 载体具有转移 T-DNA 效率高、方便多个 T-DNA 的转移以及可以产生无选择标记转基因植株等特点,在植物农杆菌转化中已得到国内外专家的普遍认可。

本文利用 pAHC-PSK 是本实验室由 pHAA25 载体改造而来的和 pClean 载体系列中 pClean-G185 作为基础载体,利用传统的酶切、连接方法和 Gateway 技术,分别构建了用于单子叶植物基因枪和农杆菌转化的 RNAi Gateway 载体 pAHC-PSK-RNAi、pClean-G185-RNAi 和过表达 Gateway 载体 pAHC-PSK-OE 和 pClean-G185-OE,目的是为利用基因枪和农杆菌介导的遗传转化在小麦

和水稻等单子叶植物中进行规模化基因功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pAHC-PSK 质粒、pClean-G185 质粒、pHMW 质粒均由本实验室保存, pEasy-T 克隆试剂盒及大肠杆菌感受态购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化有限公司; TaqDNA 聚合酶、dNTP 购自大连宝生物工程有限公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; 各种限制性内切酶购自 NEB 公司; ccdB 试剂盒、TOPO 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 其他各种试剂均为国产分析纯产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 用于基因枪转化的 RNAi 载体的构建

**1.2.1.1** 在 pAHC-PSK 载体中连入内含子 *Adh1* 片段  
*Adh1* 是玉米乙醇脱氢酶基因中的内含子片段。从 pHMW 质粒中扩增 *Adh1* 片段, 正向引物中加 *SpeI* 和 *EcoRV* 酶切位点, 反向引物中加 *SacI* 和 *HpaI* 酶切位点, 扩增产物为 *SpeI-EcoRV-Adh1-HpaI-SacI*。具体引物序列如下, F1: 5'-GactagtCgatateGAATCGATCTGG-GAGGCCAA-3'; R1: 5'-CgagctcggttaacAAACGGGAGTCT-GCCCCTAAG-3', 扩增片段经琼脂糖凝胶电泳、回收, 连到 pEasy-T1 克隆载体上, 经测序验证后, *Adh1* 片段用 *SpeI* 和 *SacI* 酶切, 然后与同样用 *SpeI* 和 *SacI* 酶切的 pAHC-PSK 质粒连接, 转化大肠杆菌, 经挑菌、摇菌、菌液 PCR 检测后, 送阳性菌液测序, 测序正确的菌液(含 pAHC-PSK-*Adh1* 质粒)加甘油后于 -20 °C 保存待用。

**1.2.1.2** 在 *SpeI* 和 *EcoRV* 酶切位点处连入正向 *ccdB*  
将本实验室构建的将 *ccdB* 反向连接的 pClean-G185-Ubi-*ccdB*-Nos6 载体, 用 *SpeI* 和 *EcoRV* 酶切, *ccdB* 片段经琼脂糖凝胶电泳后回收。将 1.2.1.1 中保存的菌液(含 pAHC-PSK-*Adh1* 质粒)用含氨苄青霉素抗性的 LB 培养基摇菌, 提取质粒, *SpeI* 和 *EcoRV* 酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后回收。然后将上述回收的 *ccdB* 片段和 pAHC-PSK-*Adh1* 质粒连接, 转化 *ccdB* 感受态(由于 *ccdB* 是一种致死基因, 转化有 *ccdB* 的一般的大肠杆菌感受态细胞不能存活), 经挑菌、摇菌、菌液 PCR 检测后送阳性菌液测序, 测序正确的菌液(含 pAHC-PSK-*ccdB-Adh1* 质粒)加甘油后于 -20 °C 保存待用。

**1.2.1.3** 在 *SacI* 和 *HpaI* 酶切位点处连入反向 *ccdB*  
从本实验室构建的 pClean-G185-Ubi-*ccdB*-Nos 载体, 用 *SacI* 和 *EcoRV* 酶切, 将 *ccdB* 片段切下来, 经琼脂糖凝胶电泳后回收。将 1.2.1.1 中保存的菌液(含 pAHC-PSK-*ccdB-Adh1* 质粒)用含氨苄青霉素和氯霉素抗性的 LB 培养基摇菌, 提取质粒, *SacI* 和 *HpaI* 酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后回收。然后将 *ccdB* 片段和 pAHC-PSK-*ccdB-Adh1* 质粒连接, 转化 *ccdB* 感受态, 经菌液 PCR 及测序验证后的菌液(含 pAHC-PSK-*ccdB-Adh1-ccdB* 质粒), 加甘油后于 -20 °C 保存。最终构建的载体命名为 pAHC-PSK-RNAi。载体构建过程如图 1。

**1.2.2** 用于基因枪转化的过表达载体的构建  
将本实验室构建的将 *ccdB* 正向连接的 pClean-G185-Ubi-*ccdB*-Nos 载体, 用 *SpeI* 和 *EcoRV* 将 *ccdB* 片段切下来, 经琼脂糖凝胶电泳后回收。将 pAHC-PSK 载体用 *SpeI* 和 *SmaI* 酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后回收。然后将酶切的 *ccdB* 片段和 pAHC-PSK 质粒连接, 转化 *ccdB* 感受态, 经挑菌、摇菌、菌液 PCR 及测序验证的菌液(含 pAHC-PSK-*ccdB* 质粒), 加甘油 -20 °C 保存。最终构建好的载体命名为 pAHC-PSK-OE。

**1.2.3** 用于农杆菌转化的 RNAi 载体的构建  
在 pHMW 载体中扩增 *Adh1* 片段, 在正向引物上加 *EcoRV* 酶切位点, 反向引物中加 *HpaI* 酶切位点, 扩增产物为 *EcoRV-Adh1-HpaI*, 具体引物序列如下, F: 5'-gatateGAATCGATCTGGGAGGCCAA-3'; R: 5'-gttaacAAACGGGAGTCTGCCCCTAAG-3', 扩增片段经琼脂糖凝胶电泳后回收, 连到 pEasy-T1 克隆载体上, 经测序验证后, 将 *Adh1* 片段连接到用 *SmaI* 酶切的 pAHC-PSK 质粒上, 转化大肠杆菌, 经菌液 PCR 及测序验证后的菌液(含 pAHC-PSK-*Adh1* 质粒)加甘油 -20 °C 保存待用。

在 pAHC-PSK-*Adh1* 质粒上扩增 *Ubi-Adh1-Nos* 表达盒, 所用引物为 F: 5'-CACCGATCGGTGCGGGCCTCT-TCG-3', R: 5'-TGCAAGCTTGAATTCCCCGATCTAGT-3', 扩增片段经测序验证后连接到 TOPO 载体上, 与已经构建好的 pClean-G185-*ccdB* 进行 LR 重组, 经转化大肠杆菌, 卡那霉素筛选后, 获得含有 pClean-G185-Ubi-*Adh1-Nos* 质粒的菌落。经菌液 PCR、测序验证后的菌液(含 pClean-G185-Ubi-*Adh1-Nos* 质粒), 加甘油 -20 °C 保存待用。然后在 pClean-G185-Ubi-*Adh1-Nos* 质粒的 *EcoRV* 位点连入正向 *ccdB*, 将检测正确的菌液(pClean-G185-Ubi-*ccdB-Adh1-Nos* 质粒)加

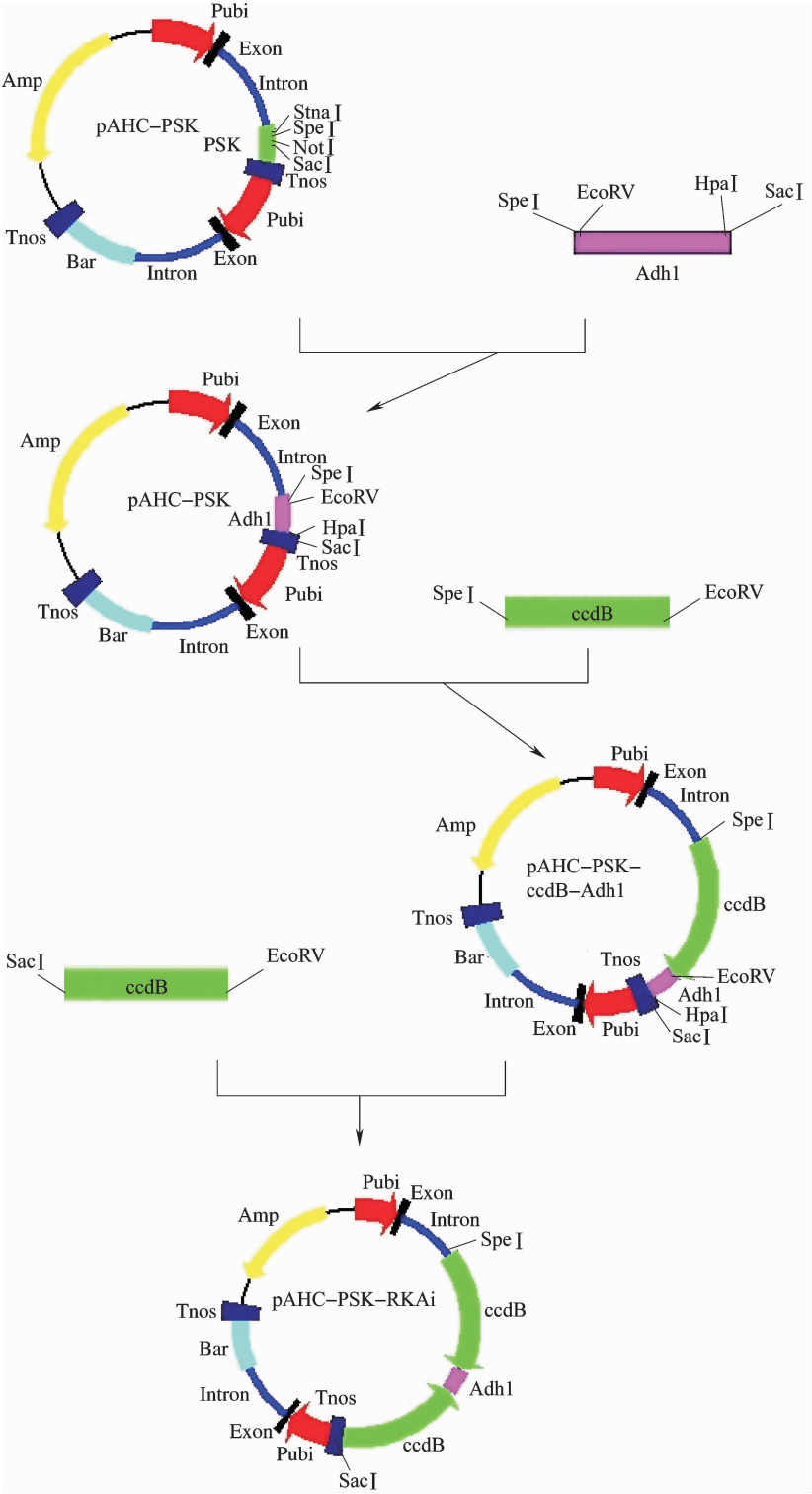


图 1 pAHC-PSK-RNAi 载体的构建过程

Fig. 1 Construction process of vector pAHC-PSK-RNAi for biolistic transformation

甘油后于 - 20 ℃ 保存。最后在 pClean-G185-Ubi-ccdB-Adh1-Nos 质粒的 *Hpa*I 和 *Sac*I 处进行双酶切，连入反向 *ccdB*。最终构建好的载体命名为 pClean-G185-RNAi。载体构建过程如图 2。

**1.2.4 用于农杆菌转化的过表达载体的构建** 将 1.2.3.2 中构建好的 pClean-G185-Ubi-Adh1-Nos 载体,用 *Eco*RV 和 *Hpa*I 酶切,然后与 *ccdB* 连接,具体步骤同上。构建好的载体命名为 pClean-G185-OE。



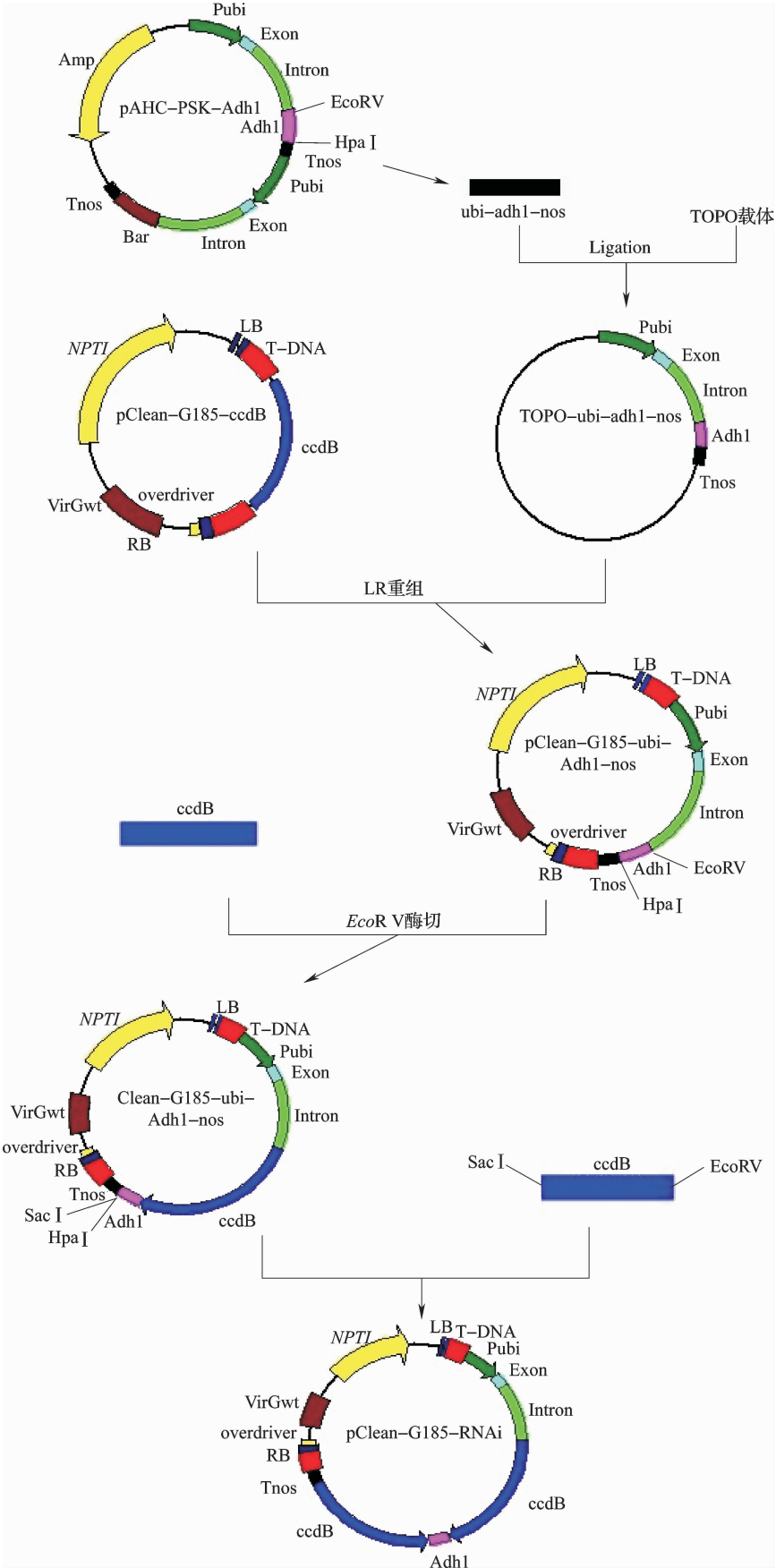


图 2 pClean-G185-RNAi 载体的构建过程

Fig. 2 Construction process of vector pClean-G185-RNAi for Agrobacterium-mediated transformation

2 结果与分析

2.1 用于基因枪转化的 RNAi Gateway 载体的构建与鉴定

2.1.1 *Adh1* 内含子片断的插入和鉴定 在 pAHC-PSK 载体的 *SpeI* 和 *SacI* 位点连入 *Adh1* 片段,菌液检测结果如图 3 所示,扩增出的 *Adh1* 片段

大约 150 bp。测序引物为扩增 *Adh1* 片段的引物 F1 和 R1,由于测序结果中前几十 bp 的序列往往不准确,所以取以正向引物 F1 测出的 *Adh1* 片段的后半段序列以及以反向引物 R1 测出的 *Adh1* 片段的前半段序列与已知的 *Adh1* 片段(两端加有酶切位点)比对,序列比对结果一致,说明 *Adh1* 片段已经正确插入 pAHC-PSK 载体中。

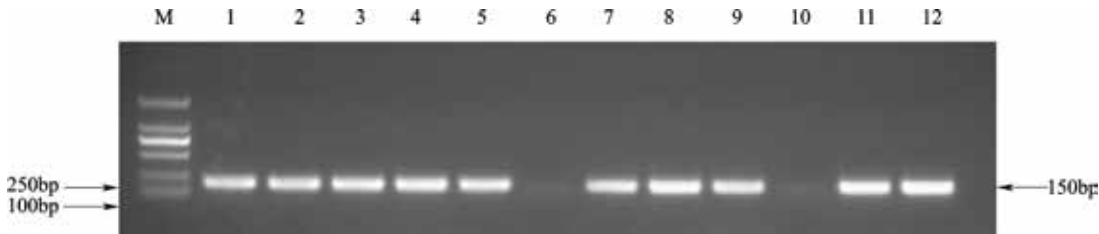


图 3 *Adh1* 片段 PCR 扩增结果  
Fig. 3 PCR results of *Adh1* fragment  
M:DL2000 DNA marker;1~12 泳道为 PCR 产物  
1-12:PCR products

2.1.2 正、反向 *ccdB* 的连接 在 pAHC-PSK-*Adh1* 载体的 *SpeI* 和 *EcoRV* 酶切位点进行双酶切连入正向 *ccdB*,用 *ccdB* 试剂盒提供的测序引物 P1 进行测序,测序结果表明正向 *ccdB* 连接成功。利用测序正确的菌液提取质粒,用 *SpeI* 和 *EcoRV* 酶切鉴定,结果可以切下大小约为 1808 bp 的片段(包括 *ccdB* 序列 1714 bp,及 LR 重组后的部分序列和 PSK 多克隆位点的部分序列),酶切结果如图 4 所示。对已构建好的 pAHC-PSK-*ccdB*-*Adh1* 载体用 *SacI* 和 *HpaI* 限制性内切酶酶切,然后与用 *SacI* 和 *EcoRV* 酶切下来的 *ccdB* 片段进行连接,转化大肠杆菌后菌液检测,所用的是从终止子 Tnos 和 *Adh1* 上设计的一对引物,扩增片段大约 2000 bp,琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 5 所示。

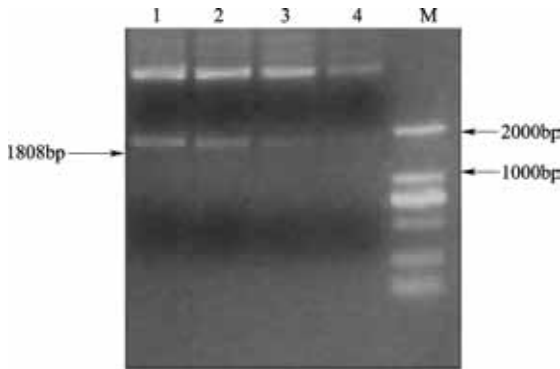


图 4 pAHC-PSK-*Adh1* 载体用 *SpeI* 和 *EcoRV* 双酶切结果  
Fig. 4 Detection of pAHC-PSK-*Adh1* vector digested by *SpeI* and *EcoRV*  
M:DL2000 DNA marker;1~4 泳道为酶切产物  
1-4:Enzyme-digested Products

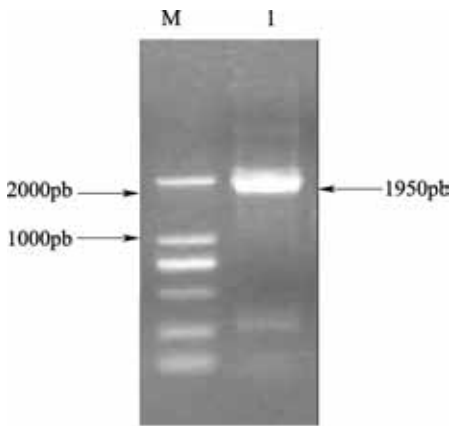


图 5 菌液 PCR 检测 pAHC-PSK-RNAi 载体中的反向 *ccdB* 结果  
Fig. 5 PCR amplification of reverse *ccdB* in vector pAHC-PSK-RNAi  
M:DL2000 DNA marker;1 泳道为菌液 PCR 结果  
1:PCR product

2.2 用于基因枪转化的过表达 Gateway 载体的鉴定

将 pAHC-PSK 载体通过双酶切连入正向 *ccdB*,转化大肠杆菌后用从终止子 Tnos 和 *Adh1* 上设计的一对引物进行菌液 PCR,结果扩增片段大约 2000 bp,琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 6 所示。送阳性菌液测序,测序引物为 *ccdB* 试剂盒自带的测序引物 P1,测序验证结果正确。

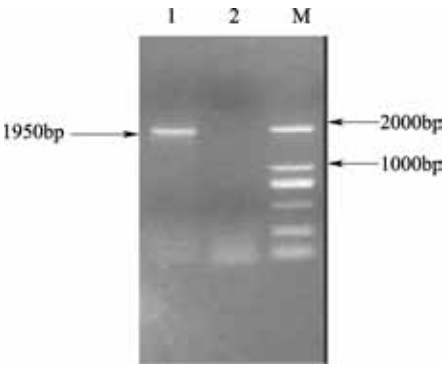


图 6 菌液 PCR 检测过表达载体 pAHC-PSK-OE 载体中的 *ccdB* 结果

Fig. 6 PCR amplification of *ccdB* in overexpression vector pAHC-PSK-OE

M:DL2000 DNA marker;1~2 泳道为菌液 PCR 结果  
1-2:PCR products

2.3 用于农杆菌转化的 RNAi Gateway 载体的鉴定

该载体的构建过程如 1.2.3 方法中所述,利用菌液 PCR、测序、酶切来确保中间载体的正确性。由于方法与上文构建用于基因枪转化的 RNAi 载体的方法相似,中间载体的构建过程在此不再一一列出。最终,构建好的载体的菌液用从终止子 *Tnos* 和 *Adh1* 上设计的一对引物进行菌液 PCR 检测,结果如图 7 所示。测序验证结果正确。

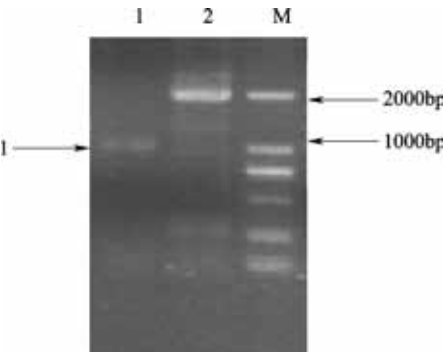


图 7 pClean-G185-RNAi PCR 扩增结果

Fig. 7 PCR results of vector pClean-G185-RNAi

M:DL2000 DNA marker;1~2 泳道为菌液 PCR 结果  
1-2:PCR products

2.4 用于农杆菌转化的过表达 Gateway 载体的鉴定

构建好的过表达载体 pClean-G185-OE 的酶切鉴定结果如图 8,所用限制性内切酶为 *SpeI* 和 *EcoRV*,酶切片段大小约 1700 bp,与预期结果相符。

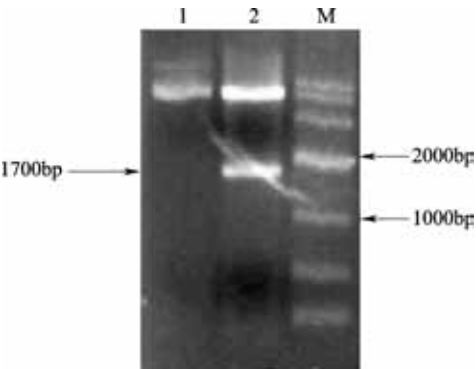


图 8 pClean-G185-OE 酶切鉴定

Fig. 8 Detection of vector pClean-G185-OE digested by *SpeI* and *EcoRV*

M:DL2000 DNA marker;1:pClean-G185-OE;  
2:pClean-G185-OE 酶切结果  
1:pClean-G185-OE;2:Enzyme-digested Product

3 讨论

植物遗传转化是通过基因工程进行植物分子生物学研究和作物遗传改良的重要基础。在过去十几年来中,新型载体的改良和使用使植物转化技术取得了突破性进展。1980 年,通过对农杆菌 Ti 质粒的改良,即除掉 Ti 质粒上的毒性基因,选用无毒的理想基因,促进了用于植物农杆菌转化的双元载体发展,并在水稻和玉米农杆菌介导的遗传转化中获得成功<sup>[14]</sup>。此外,用于基因枪转化的载体也在不断得到改良。随着高通量测序技术和转基因技术的发展,以及对载体快速构建的需求,建立一种快速、便捷适用于基因枪和农杆菌转化的载体具有重要意义。

高通量测序技术的快速发展为植物基因组和转录组测序提供了可能。目前,水稻、玉米等重要单子叶植物的基因组和转录组测序工作已经完成。如何规模化确定基因/序列的功能,进而发现并利用控制特定性状的重要基因来进行品种改良,是作物功能基因组学研究的核心问题。植物功能基因组学研究的方法主要有以测序为基础的基因序列表达分析(serial analysis of gene expression,SAGE)方法、cDNA 微阵列或基因芯片法以及反向遗传学的转座子突变(主要是 T-DNA 插入技术及 *Ac/Ds* 转座子插入突变)、RNA 介导基因沉默等。近年来,又相继发展了基于 EMS 化学诱变的定向诱导基因组局部突变技术(targeting induced local lesions in genomes,Tilling)<sup>[15-16]</sup>以及病毒诱导基因沉默(virus induced gene

silencing, VIGS) 技术<sup>[17-18]</sup>。其中, SAGE 及基因芯片技术借助于发达的生物信息学可以高效、大规模地研究基因的功能。但相比较而言, 反向遗传学的方法更适合于研究特定基因的功能。由于 T-DNA 插入技术、Ac/Ds 转座子插入突变以及 RNAi 技术需要借助于植物遗传转化技术, 因此, 单子叶植物遗传转化技术的发展, 可为重要农作物功能基因组学研究提供了工具。目前, 国内外已经建立了水稻、玉米和小麦等单子叶植物成熟的基因枪和农杆菌介导的遗传转化方法。由于小麦具有复杂的六倍体基因组, 而且是最晚一个建立起遗传转化体系的重要农作物。目前, 广泛使用的仍然是基因枪转化法。但自从 Cheng 等<sup>[19]</sup>首先建立了小麦农杆菌介导的遗传转化体系以来, 人们普遍认为农杆菌介导的遗传转化是一种更好的转化方法, 该方法具有以下优点: (1) 具有能够转移大片段 DNA 而产生较小重排的能力; (2) 转移的基因具有低拷贝少沉默的特点; (3) 在谷类作物中, 基因具有倾向于整合到基因组转录活性区以及在后代中转基因稳定表达的特点<sup>[20]</sup>。因此, 在小麦的基因工程改良中已经得到普遍重视。

载体的构建是通过遗传转化进行基因功能鉴定的前提。传统的酶切、连接进行载体构建方法不便于大规模基因功能的研究, 不仅繁琐、费时费力, 而且有时难以找到合适的酶切位点, 降低了载体构建效率。Gateway 技术利用位点特异性重组, 只需将目的基因亚克隆到入门载体上, 就可以利用重组技术将目的基因连接到目的载体上。徐化学等<sup>[21]</sup>应用 Gateway 技术体系替代传统载体构建方法, 构建了水稻基因 *OsDAD1* 的 RNAi 载体, 证明了 Gateway 技术的可行性。梅文倩等<sup>[22]</sup>利用 Gateway 技术将 16 个拟南芥转录因子的 ORF 克隆到植物表达载体 pPTV 和酵母表达载体 pYTV 中, 酵母融合表达实验和 Western-blot 检测进一步证明了该克隆途径的可行性。郭姗姗等<sup>[23]</sup>成功构建了基于 Gateway 克隆技术的植物表达载体 p1104D, 并通过载体重组基因的选择性测试、载体重组效率测试以及 *gus* 报告基因瞬间表达试验, 证明了改造后的载体可以实现目标基因的表达。为了验证小麦穗发芽抗性相关 *Vp1* 基因的功能, 高东尧等<sup>[24]</sup>利用 Gateway 克隆技术构建了含有双 35S 启动子的高效植物表达载体, 并转化拟南芥突变体 *abi3-4*, 获得了转基因植株。阎淑滑等<sup>[25]</sup>构建了以木糖异构酶基因 *xy1A* 为选择标记的 Gateway 系统植物表达载体。另外, 由于遗传转

化的目的是使目的基因在特定组织、特定时间高水平表达, 因此, 载体构建不仅需要快捷方便, 还需要通过一些策略对基因表达进行优化。目前这方面的应用主要集中在以下几方面: (1) 利用特异性的强启动子, 包括组织器官特异性启动子和诱导特异性启动子; (2) 通过  $\Omega$  元件、Kozak 序列等一些非翻译序列来增强目的基因的翻译效率; (3) 利用内含子增加基因的表达, 例如, 玉米乙醇脱氢酶基因 *Adh1* 的第 1 个内含子、玉米 *Ubiquitin* 基因的第 1 个内含子; (4) 利用核基质结合区和定点整合技术使外源基因能够整合在基因组的转录活跃区, 促进基因的转录和翻译<sup>[8]</sup>。

本文利用传统的酶切和连接方法, 结合 Gateway 技术, 构建了用于单子叶植物基因枪和农杆菌转化的 RNAi Gateway 载体 pAHC-PSK-RNAi、pClean-G185-RNAi 和过表达 Gateway 载体 pAHC-PSK-OE 和 pClean-G185-OE, 为利用基因枪和农杆菌介导的遗传转化, 在小麦和水稻等单子叶植物中进行规模化基因功能研究奠定了基础。利用构建好的 Gateway 表达载体, 仅需两步亚克隆, 即可将外源基因/片断快速构建到用于基因枪和农杆菌介导的遗传转化目的载体上: (1) 创建入门克隆, 通过 PCR 或传统的克隆方法将目的基因/片断克隆到入门载体; (2) 混合包含目的基因/片断的入门克隆和本研究中所获得的 Gateway 载体以及 LR Clonase 酶, 完成表达载体的构建。与经典克隆和亚克隆需要多个酶切和连接步骤相比, 该方法不需要多克隆位点, 而且只需两步生化反应便能快速完成操作, 是进行规模化基因功能鉴定的快速、有效工具。

## 参考文献

- [1] Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination [J]. *Annu Rev Biochem*, 1989, 58: 913-941
- [2] Hartley J L, Temple G F, Brasch M A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination [J]. *Genome Res*, 2000, 10: 1788-1795.
- [3] Philippe B, Martine C. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes [J]. *J Mol Biol*, 1992, 226(3): 735-745
- [4] 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
- [5] 朱龙付, 张献龙. RNAi 及其在植物遗传改良中的应用 [J]. *华中农业大学学报*, 2004, 23(4): 472-477
- [6] 张恭, 刘立峰, 马崎英. RNA 干扰及其植物抗病毒应用 [J]. *中国农学通报*, 2007, 23(1): 42-45
- [7] Smith N A, Singh S P, Wang M B, et al. Total silencing by intron spliced hairpin RNAs [J]. *Nature*, 2000, 407: 319-320
- [8] 抗艳红, 季静, 胡军, 等. 农杆菌介导类胡萝卜素合成酶基因



- LycB 转化水稻的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 605-611
- [9] 李桂琴, 齐靖, 高志华, 等. 鸭梨多酚氧化酶基因反义表达载体的构建及农杆菌介导的遗传转化[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(5): 635-639
- [10] 于娅, 刘莉莎, 赵永钦, 等. 影响花椰菜农杆菌介导转化因素的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 320-325
- [11] 侯丙凯, 夏光敏, 陈正华. 植物基因工程表达载体的改进和优化策略[J]. 遗传, 2001, 23(5): 492-497
- [12] Christensen A H, Quail P H. Ubiquitin promoter-based vectors for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants[J]. Transgen Res, 1996, 5: 213-218
- [13] Hellens R P, Edwards E A, Leyland N R, et al. pGreen: a versatile and flexible binary vector for Agrobacterium-mediated transformation[J]. Plant Mol Biol, 2000, 42: 819-832
- [14] Thole V, Worland B, Snape J W, et al. The pCLEAN dual binary vector system for Agrobacterium-mediated plant transformation[J]. Plant Physiol, 2007, 145: 1211-1219.
- [15] 潘娜, 郭会君, 赵世荣, 等. TILLING 技术在作物突变研究中的应用现状与前景[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 581-587.
- [16] Till B J, Reynolds S H, Greene E A, et al. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING[J]. Genome Res, 2003, 13: 524-530
- [17] 张凤启, 黄永娟, 杨甜甜, 等. EMS 诱变甘蓝型油菜 M<sub>2</sub> 代群体的表型突变研究[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 760-765
- [18] Wang E, Wagner G J. Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing[J]. Planta, 2003, 216: 686-691
- [19] Cheng M, Fry J E, Pang S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by Agrobacterium tumefaciens[J]. Plant Physiol, 1997, 115: 971-980
- [20] Xia L Q, Ma Y Z, He Y, et al. GM wheat development in China: current status and challenges to commercialization[J]. J Exp Bot, 2011, First published online: December 15, 2011
- [21] 徐化学, 熊建华, 傅彬英. 应用 Gateway 技术构建水稻 *OsDAD1* 基因的 RNA 干涉载体[J]. 分子植物育种, 2007, 5(1): 133-136.
- [22] 梅文倩, 宋文强, 潘怡, 等. 利用 Gateway 克隆技术大规模克隆拟南芥转录因子[J]. 分子植物育种, 2004, 2(3): 358-364.
- [23] 郭姗姗, 张蒙, 单卫星. 基于 Gateway 技术的植物表达载体的构建[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(11): 161-166.
- [24] 高东尧, 夏兰琴, 徐兆师, 等. 小麦 *WVP-1* 基因表达载体的 Gateway 技术构建及其遗传转化[J]. 麦类作物报, 2009, 29(2): 189-194
- [25] 阎淑滑, 周波, 赵霞, 等. 以木糖异构酶基因 *xylA* 为选择标记的 Gateway 系统植物表达载体的构建[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(1): 35-38.