

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.01196

DOF 转录因子 *AtDof1.7* RNA 干扰载体的构建及拟南芥的遗传转化

尹明智 官梅 肖钢 李梅 官春云*

湖南农业大学油料作物研究所 / 国家油料作物改良中心湖南分中心, 湖南长沙 410128

摘要: DOF (DNA binding with one finger) 转录因子是植物特有的转录因子家族, 含有一个独特的富含 Cys 残基的单锌指 DNA 结合区域, 在植物生长发育中参与多种生物学过程。本研究根据拟南芥 *AtDof1.7* 基因(GenBank 登录号为 AT1G51700)序列设计含有不同酶切位点的特异性扩增引物, 以拟南芥总 DNA 为模板, 扩增 *AtDof1.7* 基因片段, 将 *AtDof1.7* 基因正向反向分别插入表达载体的相应位置, 构建成 *AtDof1.7* 基因的 RNA 干扰载体 pADO1。利用改良的 floral-dip 方法将干扰载体 pADO1 成功转入野生型拟南芥, 经草甘膦抗性筛选和 PCR 检测获得 5 株阳性转基因植株。利用 RT-PCR 技术和气相色谱法分别分析了 *AtDof1.7* 基因的表达和种子脂肪酸组成, 结果表明, 5 株转基因植株中 *AtDof1.7* 基因的表达量不同程度低于野生型植株, 种子油酸含量明显上升, 亚麻酸含量明显下降, 说明 *AtDof1.7* 转录因子与拟南芥种子脂肪酸代谢途径有一定的关系, 为进一步研究其在脂肪酸代谢过程中的调控作用以及在油菜中研究该类转录因子的功能奠定了基础。

关键词: DOF 转录因子; *AtDof1.7*; 拟南芥; RNA 干扰载体; 脂肪酸代谢途径

RNAi Vector Construction of *AtDof1.7* Transcription Factors and Genetic Transformation into *Arabidopsis thaliana*

YIN Ming-Zhi, GUAN Mei, XIAO Gang, LI Xun, and GUAN Chun-Yun*

Oilseed Crops Institute / National Oil Crops Improvement Center, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: The DOF (DNA binding with one finger) transcription factors are members of a family of plant-specific transcription factors that have a highly conserved DNA-binding domain, namely Dof domain which contains a single C2C2-type zinc-finger-like motif and specifically recognizes an (A/T)AAAAG sequence as the recognition core. It suggests that the Dof transcription factors play diverse roles in specific biological processes in plants. Members of this protein family in plants are found to be involved in the gene regulation of many processes, but the roles in fatty acid metabolism are rarely reported. To investigate whether *AtDof1.7* Dof transcription factor can regulate fatty acid metabolism, on the basis of the sequence of *AtDof1.7* (GenBank accession No. AT1G51700), we designed the specific primer containing different enzyme sites. With the template of *Arabidopsis thaliana* DNA, the *AtDof1.7* gene fragment was isolated, which was inserted into the expression vector by forward and reverse ways respectively. The RNA interference vector of pADO1 containing *AtDof1.7* gene fragment was constructed. Using floral-dip method, pADO1 was successfully transformed into wide-type *Arabidopsis thaliana*. Glyphosate resistance screening and PCR detection showed that five positive transgenic plants were obtained. The result of RT-PCR showed that transgenic plants had lower expression level of *AtDof1.7* gene than the wild type. Fatty acid content was analyzed by gas chromatography which showed that the content of oleic acid increased and the content of linolenic acid decreased drastically in each transgenic plant compared with wide-type plants. These results indicated that *AtDof1.7* transcription factor has certain relation with fatty acid metabolic pathway in *Arabidopsis thaliana* seed which provides a good foundation for further study on the function of *AtDof1.7* transcription factor in fatty acid metabolic regulation.

Keywords: DOF transcription factors; *AtDof1.7*; *Arabidopsis thaliana*; RNA interference vector; Fatty acid metabolic pathway

本研究由国家重点基础研究计划(973 计划)项目(2006CB101600)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 官春云, E-mail: guancy2000@yahoo.com.cn

第一作者联系方式: E-mail: fengymz1983@hotmail.com, Tel: 15974188123

Received(收稿日期): 2010-12-24; Accepted(接受日期): 2011-03-26.

RNAi 技术在 RNA 水平抑制基因的表达, 为基因组研究进入后基因组时代提供了一种有力的工具。已有大量研究证实 RNAi 技术作为一项快速、高效、便于操作的技术, 可以特异性抑制特定基因的表达, 非常有效地鉴定特异基因的功能, 表现出优越的特性, 因而成为分析功能基因组的有效工具, 应用于大规模复杂的功能基因组学研究^[1-3]。

DOF (DNA binding with one finger) 转录因子是植物所特有的一类转录因子, 其含有一个独特的富含 Cys 残基的单锌指 DNA 结合区域, 命名为 DOF 结构域。通过特异地识别 T/AAAAG 核心序列, DOF 结构域与目的 DNA 相结合^[4-5]。目前, 在拟南芥、烟草、南瓜、大麦、小麦和水稻等植物中研究表明 DOF 转录因子在植物生长发育中参与多种生物学过程^[6-8]。有些 DOF 转录因子在种子发育期间调控储藏蛋白的表达, 如玉米的 *PBF* 基因 (prolamin box binding factor, *PBF*)、大麦中的 *BPBF* 和小麦中的 *WPBF*, 都能对种子储藏蛋白基因的转录进行时空调控^[9-12]; Imaizumi 等^[13]研究表明, 拟南芥 *CDF1* 转录因子能与 *FKF1* (FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1) 蛋白相互作用, 并与 *CONSTANS* (*CO*) 基因的启动子相结合调节 *CO* 基因的转录, 从而调节拟南芥的光周期开花; 大豆中的 *GmDof4* 和 *GmDof11* 能分别与乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, *ACCase*) 和长链乙酰 CoA 合成酶 (long-chain-fatty-acyl CoA) 基因的启动子区域相结合, 激活这 2 个基因的表达, 从而增加种子中油脂的含量, 结果表明这 2 个基因可以通过调控与脂肪酸生物合成途径相关基因的表达, 提高大豆种子中的油脂含量, 可为转基因大豆工程提供新的目标基因^[14]。Yanagisawa 等^[15]早期研究发现, *ZmDof1* 和 *ZmDof2* 特异性地作用于玉米 C_4 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, *PEPCase*) 的启动子, 参与光诱导和碳代谢的调控。后来研究发现 *ZmDof1* 在拟南芥中过量表达可促进与碳骨架合成有关酶表达的增加, 激活拟南芥的 *PEPCase* 和丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, *PK*) 基因的表达^[16-17]。潘丽峰^[18]将拟南芥 *AtDof1.7* 转录因子转化烟草, 也增强了 *PEPCase* 和 *PK* 的酶活性, 提高了烟草对氮素营养的利用率。磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 作为油脂和蛋白质生物合成的共同底物, 可在 *PEPCase* 催化下合成草酰乙酸进入蛋白质代谢; 同时也可经 *PK* 催

化形成丙酮酸, 进而形成乙酰-CoA, 而后在 *ACCase* 催化下合成丙二酰-CoA 进入脂肪代谢^[19], 这说明 *AtDof1.7* 转录因子有可能参与种子中蛋白质代谢与脂肪酸代谢之间复杂关系的调控。

植物 RNA 干扰技术主要是构建具有目的基因特定序列正、反向序列的表达载体, 将其转化到植物体内实现干扰作用。本研究利用种子特异性表达的 *NapinA* 启动子, 构建具有拟南芥 *AtDof1.7* 基因序列的种子特异性表达的 RNAi 载体, 并成功转入拟南芥, 为进一步揭示该基因的功能奠定基础, 也为在油菜中研究该类转录因子提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

哥伦比亚野生型 (*Arabidopsis thaliana* Col-0) 拟南芥、甘蓝型油菜湘油 15、大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 LBA4404、pFGC5941 表达载体均由湖南农业大学国家油料改良中心湖南分中心提供; T4-DNA 连接酶和 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; *Pfu* DNA 聚合酶和 A-Tailing 试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、质粒提取试剂盒、DNA 片段纯化/回收试剂盒均购自北京天根生化科技公司; Plant Total RNA 提取试剂盒购自安比奥公司; 限制性内切酶和 cDNA Synthesis 试剂盒购自 Fermentas; DNA Marker 购自北京索莱宝科技生物公司; 其他试剂为进口分装或国产分析纯。

1.2 植物总 DNA 的提取

以哥伦比亚野生型 (*Arabidopsis thaliana* Col-0) 拟南芥和甘蓝型油菜 XY15 为材料, 采用 CTAB 法分别提取其幼苗总 DNA, 用普通琼脂糖电泳检测所提 DNA, 核酸蛋白分析仪测定其浓度后备用。

1.3 *NapinA* 启动子序列的克隆

根据 NCBI 中公布的油菜 (*Brassica napus*) *NapinA* 基因启动子全长序列 (GenBank 登录号为 J02798) 设计引物扩增 *NapinA* 启动子片段, 并根据 pFGC5941 表达载体序列分别在引物的 5' 端引入 *EcoR* I 和 *Nco* I 的酶切位点, 其引物序列为 NA-F: 5'-GAATTCCAAGCTCTTCATCGGTGATGAT-3' (*EcoR* I), NA-R: 5'-CCATGGCATGAGTAGAGTG AAGCGATGAGT-3' (*Nco* I), 扩增长度为 1 120 bp。采用 *Pfu* 聚合酶进行扩增, 反应条件为 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 稳定 5 min, 4℃ 保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检

测正确后,用 A-Tailing 试剂盒加 A 尾与 pMD18-T 载体连接成 pMD18-T-NA 载体,热激法转化大肠杆菌 DH5 α ,重组子经检测正确后送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.4 *AtDof1.7* 基因片段的克隆

根据拟南芥 *AtDof1.7* 基因序列(GenBank 登录号为 AT1G51700)设计特异引物,并根据 pFGC5941 载体特点,在引物的 5'端分别加入 *Swa* I/*Bam* H I 和 *Nco* I/*Xba* I 位点,引物序列为 A1-F: 5'-ATTTAAATGGATCCTTCCGATCAAAGATTGTGTGC-3' (*Swa* I/*Bam* H I); A1-R: 5'-CCATGGTCTAGAGACCAAATTACCCTTCGCCTC-3' (*Nco* I/*Xba* I),扩增片段长度为 685 bp。PCR 反应采用 *Pfu* 聚合酶扩增,退火温度为 58℃,循环 28 次。将 PCR 产物经加 A 尾后与 pMD18-T 载体连接成 pMD18-T-*ADOF1* 载体,以热激法将此连接载体转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,挑取阳性克隆送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.5 种子特异性表达载体 pFGC5941.NA 的构建

通过 *Eco* R I 和 *Nco* I 分别双酶切 pMD18-T-NA 载体和 pFGC5941 表达载体,再将切出的 *NapinA* 片

段与切除了 CaMV35S 启动子的 pFGC5941 载体相应位点相连接,回收纯化后进行质粒 PCR 和双酶切检测,并命名为 pFGC5941.NA。

1.6 *AtDof1.7* 基因 RNA 干扰载体 pADOF1 的构建及鉴定

先以 *Bam* H I/*Xba* I 分别双酶切 pFGC5941.NA 载体和 pMD18-T-*ADOF1* 载体,将切下的 *AtDof1.7* 基因片段反向插入 pFGC5941.NA 载体的相应位点,构建成 pFGC5941.NA-*ADOF1*-1 载体。再用 *Swa* I/*Nco* I 分别双酶切 pFGC5941.NA-*ADOF1*-1 载体和 pMD18-T-*ADOF1* 载体,将切下的 *AtDof1.7* 基因片段正向插入 pFGC5941.NA-*ADOF1*-1 载体相应位点,构建成 pFGC5941.NA-*ADOF1* 载体,简称 pADOF1,即 *AtDof1.7* 基因的 RNA 干扰载体。回收纯化质粒后进行质粒 PCR 和酶切检测。由于在载体构建过程中引入 *Bam* H I 和 *Xba* I 酶切位点,因而可以通过用 *Bam* H I 和 *Xba* I 分别对构建好的干扰载体进行单酶切验证,其中 *Bam* H I 单酶切获得 1 350 bp 片段 (*CHSA* Intron),*Xba* I 单酶切获得 2 750 bp 左右片段 (*CHSA* Intron+ *AtDof1.7*)(图 1)。

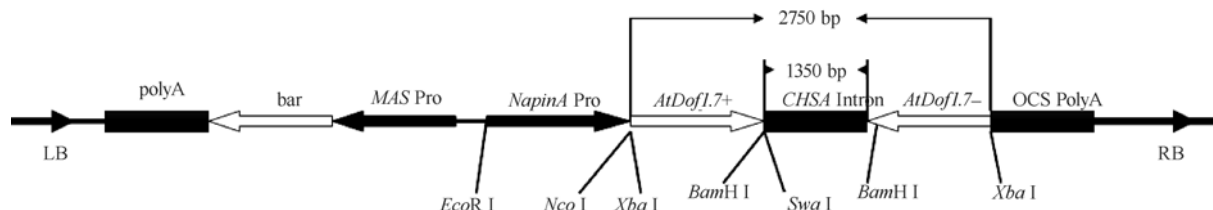


图 1 RNA 干扰载体 pADOF1 结构图

Fig. 1 Sketch map of pADOF1 vector

AtDof1.7+: 正向插入片段; *AtDof1.7* -: 反向插入片段。

AtDof1.7+: inserted positively; *AtDof1.7* -: inserted negatively.

1.7 拟南芥的遗传转化

采用冻融法将干扰载体 pADOF1 转入根癌农杆菌 LBA4404 中,提取纯化质粒后进行质粒 PCR 和 *Bam* H I 和 *Xba* I 分别单酶切方法鉴定正确后制备工程菌,然后参照 Martinez-Trujillo 等^[20]改良的 floral-dip 方法,将 pADOF1 载体转化入哥伦比亚野生型拟南芥中。

1.8 转基因拟南芥植株的筛选及分子检测

根据 pFGC5941 载体上具有筛选标记基因 *bar* 基因,先将收获的 T₀ 代籽粒播于含 1.0 mg L⁻¹ 的草丁膦(glufosinate, PPT)的 1/2MS 培养基中^[21],选择具有抗性的转基因植株,再按 CTAB 法提取转基因苗总 DNA 进行 PCR 检测。

首先根据 *NapinA* 启动子序列为油菜基因组特异序列,用引物 NA-F/NA-R 对转基因苗进行 PCR 检测;再根据 pADOF1 载体的结构特点,即:目的基因片段是正向反向插入到查尔酮合成酶内含子 (*CHSA* Intron)两侧,正向片段插在 *NapinA* 启动子与 *CHSA* Intron 之间,反向片段插在 *CHSA* Intron 与 polyA 信号序列之间,可以通过判断这两段序列 PCR 产物的大小来判断正反片段的正确插入与否,以及检测抗性苗是否为阳性转化苗。于是设计了 2 对引物分别用于检测干扰载体的正向片段和反向片段。正向片段检测引物序列为 ZF: 5'-GGAATTCC TCTCATCCCCTCCTATGCCAACC-3', ZR: 5'-TCC CCTCTGTCTACCTTCCCACAAG-3', 扩增片段为 1 193 bp; 反向片段检测引物序列为 FF: 5'-CACTCC

ACGGATAGAGAACTGACG-3', FR: 5'-CTCAGG CTGGTTACAACGTGCACGT-3', 扩增片段为 1 086 bp (图 2)。

1.9 RT-PCR 检测 *AtDof1.7* 基因的表达水平

为了检测 *AtDof1.7* 基因在转基因拟南芥中的转录表达水平, 以哥伦比亚野生型拟南芥和 5 株转基因植株的未成熟种子 cDNA 为模板进行半定量 RT-PCR 分析。按照安比奥公司(Ambiogen)植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 采用 Revert-Aid First Strand Synthesis Kit (Fermentas)合成 cDNA 第一链。以拟南芥 *Actin8* 基因为内参照基因^[22], PCR

扩增引物为 ACT8-F: 5'-GGTGATGGTGTGTCT-3'; ACT8-R: 5'-ACTGAGCACAATGTTAC-3', PCR 反应体系 25 μ L, 采用 BIOMETRA PCR 仪进行 PCR 反应, *Actin8* 基因的 PCR 扩增程序是 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 36 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。用 *AtDof1.7* 基因编码区特异引物 AD1-F: 5'-ACCGTCGCTGAGAAACC T-3'; AD1-R: 5'-CCCACCCATCTGCATATT-3', 进行 *AtDof1.7* 基因的半定量 RT-PCR 分析, PCR 扩增程序是 57 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 循环 36 次, 其他条件同 *Actin8* 基因。

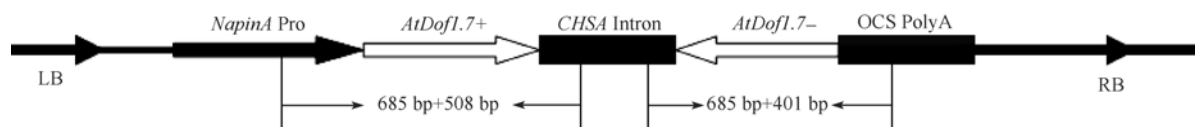


图 2 转基因植株 PCR 检测体系引物设计原理

Fig. 2 Primer design principle of PCR detection in transgenic plants

1.10 转基因拟南芥 T₁ 代种子脂肪酸分析

将转基因 T₁ 代和哥伦比亚野生型拟南芥同时种植于同一培养室中, 相同的试验管理, 收获的种子自然晾干, 参照 Stoutjesdijk 等^[23]的方法, 先取 10~15 粒种子, 磨碎后置于 2 mL 玻璃管中, 依次加入 1 mL 石油醚-乙醚 500 μ L 和 0.4 mol L⁻¹ 氢氧化钾-甲醇溶液 250 μ L, 室温反应 4 h 以上, 再加入适量蒸馏水, 静置片刻, 使其分层, 待取样检测, 每个样品测定 5 次, 求其平均值, 以提高测定值的准确性。采用 HP 6890N 气相色谱仪, 分别测定种子样本中棕榈酸(16:0)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2)、亚麻酸(18:3)、二十碳烯酸(20:1)含量。运用 SPSS 软件分析数据。

2 结果与分析

2.1 目的基因片段的克隆与分析

用引物 NA-F/NA-R 和 A1-F/A1-R 分别扩增 *NapinA* 启动子和 *AtDof1.7* 基因, 获得了 1 120 bp (图 3)和 685 bp (图 4)左右的条带, 扩增片段大小与预期结果一致。将目的基因片段切胶回收后连入 pMD18-T 载体, 热激法转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 选取阳性克隆送往生物公司测序, 测序结果表明扩增的 *NapinA* 启动子和 *AtDof1.7* 基因序列与网上公布的序列一致, 表明克隆结果正确, 可用于下一步实验。

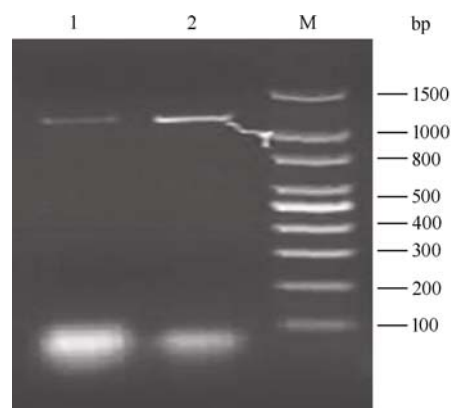


图 3 *NapinA* 启动子的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of *NapinA* promoter
M: DNA marker 100 bp; 1~2: *NapinA* 启动子 PCR 结果。
1~2: PCR products of *NapinA* promoter.

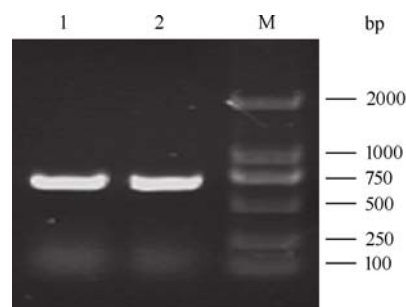


图 4 *AtDof1.7* 基因的 PCR 扩增

Fig. 4 PCR amplification of *AtDof1.7* gene
M: DNA marker DL2000; 1~2: *AtDof1.7* 基因 PCR 结果。
1~2: PCR products of *AtDof1.7* gene.

2.2 种子特异性表达载体 pFGC5941.NA 的验证
用引物 NA-F/NA-R 质粒 PCR 检测 pFGC5941.NA 载体得到大小为 1 120 bp 左右的片段(图 5); 用 *EcoR* I 和 *Nco* I 双酶切检测得到 1 120 bp 左右的小片段(图 6), 表明 pFGC5941.NA 载体已构建成功。

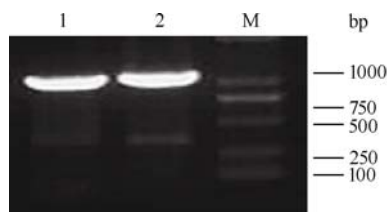


图 5 pFGC5941.NA 载体的 PCR 分析
Fig. 5 PCR analysis of pFGC5941.NA vector
M: DNA markers DL2000; 1~2: PCR 产物。
1~2: PCR products of pFGC5941.NA.

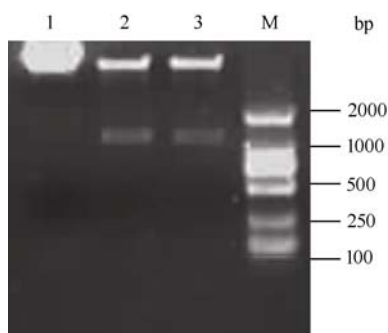


图 6 pFGC5941.NA 载体的酶切分析
Fig. 6 Restriction analysis of pFGC5941.NA vector
M: DNA markers DL2000; 1: 未酶切的质粒 pFGC5941.NA;
2~3: *EcoR* I 和 *Nco* I 双酶切。
1: undigested pFGC5941.NA vector; 2~3: digested by *EcoR* I and *Nco* I.

2.3 RNAi 载体 pADOF1 的构建与验证

用 *Bam*H I 和 *Xba* I 分别单酶切 pADOF1 载体得到预期大小的小片段泳带(图 7), 其中 *Bam*H I 单酶切获得 1 350 bp 片段, *Xba* I 单酶切获得 2 750 bp 左右片段, 表明 pADOF1 干扰载体构建成功。

2.4 转基因拟南芥再生植株的获得及鉴定

2.4.1 转基因植株 PCR 检测体系引物的验证
为确定转基因植株 PCR 检测体系中所设计的 ZF/ZR 和 FF/FR 2 对检测引物是否合理。用这 2 对引物, 分别以干扰载体 pADOF1 和 pFGC5941 为模板, 进行 PCR 验证。以 ZF/ZR 为引物, 以干扰载体 pADOF1 和 pFGC5941 为模板分别获得约 1 193 bp 和 508 bp 大小的泳带; 以 FF/FR 为引物, 则分别获得 1 086 bp 和 401 bp 大小的泳带(图 8)。两对引物进行 PCR 验证都得到预期的结果, 说明可以采用这两对引物对

转基因植株进行 PCR 检测, 也进一步的说明所构建的干扰载体 pADOF1 是正确的。

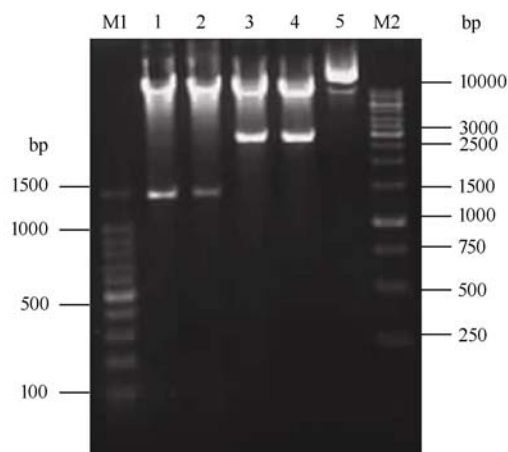


图 7 pADOF1 RNA 干扰载体的酶切验证
Fig. 7 Restriction analysis of pADOF1 RNA interference vector
M1: DNA marker 100 bp; M2: DNA marker B032; 1~2: *Bam*H I 单酶切; 3~4: *Xba* I 单酶切; 5: 未酶切的 pADOF1 载体。
1~2: digested by *Bam*H I; 3~4: digested by *Xba* I; 5: undigested pADOF1 vector.

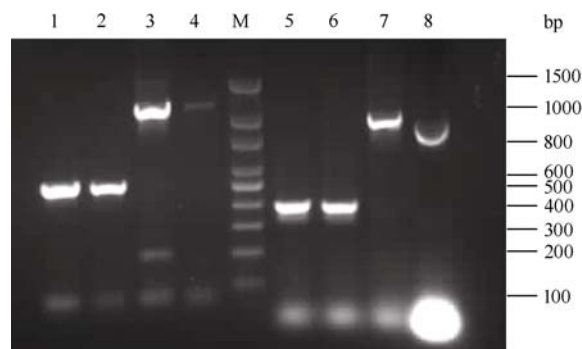


图 8 转基因植株 PCR 检测体系引物的验证
Fig. 8 Primer detection of transgenic plants PCR
M: DNA marker 100 bp; 1~4: 引物 ZF/ZR 扩增结果; 5~8: 引物 FF/FR 扩增结果。
1~4: PCR products by ZF/ZR primer; 5~8: PCR products by FF/FR primer.

2.4.2 转基因油菜再生植株的获得及检测 将通过改良的 floral-dip 法遗传转化获得的 T_0 代籽粒播于含 0.7 mg L^{-1} 的草丁膦(glufosinate, PPT)的 1/2MS 培养基中, 选择长势较好的 5 株抗性苗按 CTAB 法提取总 DNA 进行分子鉴定。先用 *Napina* 基因引物 NA-F/NA-R 进行 PCR 检测(图 9), 获得了 1 120 bp 左右大小的泳带, 与预期结果一致; 同时分别用引物 ZF/ZR 和 FF/FR 进行 PCR 扩增验证, 也都扩增得到预期的结果(图 10), 说明筛选到的 5 株抗性苗全为阳性转基因植株。

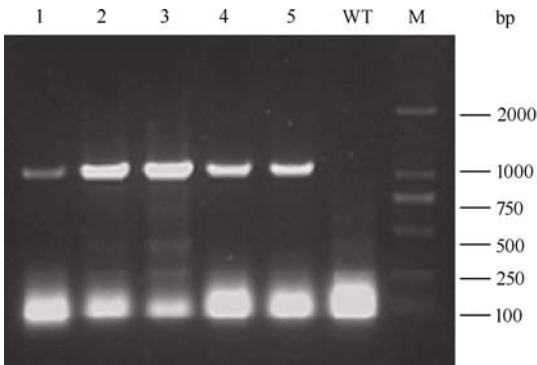


图 9 转基因拟南芥的 *NapinA* 基因检测
Fig. 9 Detection of *NapinA* gene in transgenic *Arabidopsis*
M: DNA marker DL2000; 1~5: 转基因拟南芥 *NapinA* 基因检测;
WT: 哥伦比亚野生型拟南芥。
1~5: detection of *NapinA* gene; WT: wild-type *Arabidopsis* Col-0.

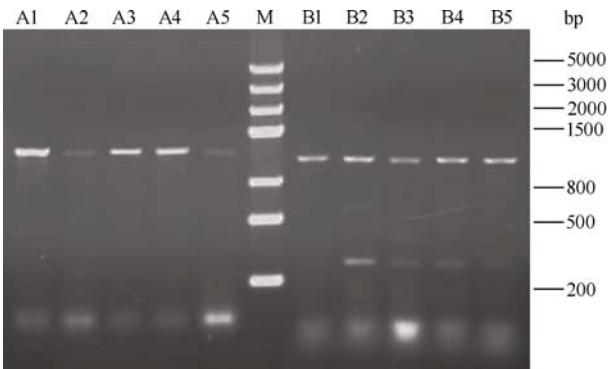


图 10 转基因拟南芥的 PCR 检测
Fig. 10 PCR detection of transgenic *Arabidopsis*
M: DNA marker III; A1~A5: 引物 ZF/ZR 检测; B1~B5: 引物
FF/FR 检测。
A1~A5: detection by ZF/ZR primer; B1~B5: detection by FF/FR
primer.

2.5 转基因植株的 RT-PCR 分析

半定量 RT-PCR 分析结果显示 *AtDof1.7* 在 5 个转基因拟南芥 T_1 代植株中都能正常转录表达, 但表达量不同程度地低于未转化的植株, 说明在转基因

拟南芥中该基因的表达受到了抑制(图 11)。

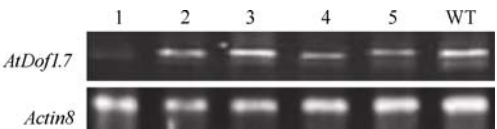


图 11 *AtDof1.7* 基因的半定量 RT-PCR 检测
Fig. 11 Semi-quantitative RT-PCR detection of *AtDof1.7* gene
1~5: 转基因拟南芥; WT: 哥伦比亚野生型拟南芥。
1~5: transgenic plants; WT: wild-type *Arabidopsis* Col-0.

2.6 转基因植株 T_1 代种子脂肪酸的测定

与未转化的野生型拟南芥相比, 转基因拟南芥种子脂肪酸各组分比例发生改变, 其中变化最明显的是油酸(C18:1)和亚麻酸(C18:3), 油酸含量极显著高于野生型, 亚麻酸含量极显著低于野生型(表 1)。这说明通过 RNAi 技术干扰内源 *AtDof1.7* 基因, 拟南芥种子脂肪酸各组分的相对含量发生了改变, *AtDof1.7* 转录因子与脂肪酸代谢有一定的关系。

3 讨论

本研究选用的是美国俄亥俄州立大学拟南芥生物资源中心(*Arabidopsis* biological resource center, ABRC)构建的双子叶植物 RNAi 载体 pFGC5941, 它具有 1 352 bp 的豌豆查耳酮合成酶基因内含子(*CHS* Intron)序列。这个载体最大优点在于只需要一对引物和连接一次 T 载体就可以完成表达载体构建。设计特异引物, 并在引物 5'两端各引入两个限制性酶切位点, 如本实验中上游引物包含 *Swa* I/*Bam* H I 的酶切位点, 下游引物含 *Xba* I/*Nco* I 的酶切位点。在载体构建过程中要注意先通过 *Bam* H I/*Xba* I 两个酶切位点将反向片段插入相应位点, 再通过 *Swa* I/*Nco* I 两个酶切位点将正向片段插入表达载体相应位点; 若先插入正向片段, 那么当通过 *Bam* H I/

表 1 转基因拟南芥种子脂肪酸组成
Table 1 Composition of the major fatty acid of transgenic *Arabidopsis* seeds

| 植株 Plant | 棕榈酸 Palmitic (16:0) | 硬脂酸 Stearic (18:0) | 油酸 Oleic (18:1) | 亚油酸 Linoleic (18:2) | 亚麻酸 Linolenic (18:3) | 二十碳烯酸 Eicosenoic (20:1) | 其他 Other |
|-------------|------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|
| TP1 | 9.30±0.35 | 5.12±0.94 | 23.70±0.60 a | 31.90±0.53 | 11.05±0.48 a | 15.64±0.72 | 3.19±1.41 |
| TP2 | 9.61±0.40 | 5.47±0.80 | 23.74±0.55 a | 32.30±0.44 | 10.64±0.54 a | 15.21±0.59 | 3.02±0.92 |
| TP3 | 9.20±0.54 | 4.61±0.57 | 23.43±0.31 a | 32.20±0.87 | 10.80±0.30 a | 15.36±0.87 | 4.20±1.49 |
| TP4 | 9.21±0.39 | 5.11±0.87 | 23.60±0.67 a | 32.01±0.60 | 10.85±0.18 a | 15.60±0.43 | 3.45±1.80 |
| TP5 | 9.62±0.19 | 5.57±0.30 | 24.27±0.55 a | 31.93±0.69 | 10.94±0.46 a | 15.50±0.30 | 2.17±0.46 |
| WT | 9.83±0.81 | 5.51±1.40 | 15.92±0.93 | 32.04±0.80 | 17.48±0.41 | 15.13±1.00 | 4.00±1.26 |

TP: 转基因植株; WT: 野生型拟南芥。每一个值都是 5 次重复的平均值。数值=平均值±标准差, a 表示同种物质与野生型相比 $P<0.01$, 即差异达到极显著水平。

TP: transgenic plants; WT: wild-type *Arabidopsis* Col-0. Each value is the mean of five replicates. Values are Mean ± SD. “a” represent significant difference at $P<0.01$ compared with wild-type *Arabidopsis* Col-0 values for the same compound.

Xba I 两个酶切位点插入反向片段时,就会把之前插入的正向片段切出,导致载体构建失败。Wesley 等^[24]评价了使用几种不同结构的 RNAi 载体转基因后植株的相应基因被抑制的比例,发现由 1 个内含子连接 2 个反向重复序列形成 ihpRNA (intron-spliced hpRNA)结构的 RNAi 载体效果较好,基因表达受抑制的平均比例高达 90%以上。本研究将 *AtDof1.7* 基因片段以正反 2 个方向插入表达载体 pFGC5941 中,2 个片段用 1 个 *CHSA* Intron 连接,构建了一个能够表达 ihpRNA 结构的 RNAi 表达载体 pADO1。同时本实验为了特异性地研究 *AtDof1.7* 转录因子在拟南芥种子中的作用,将 pFGC5941 载体中原有的 CaMV35S 启动子置换成种子特异性表达的 *NapinA* 启动子,并取得了较好的结果。通过 PCR 反应检测 *NapinA* 启动子和 *AtDof1.7* 基因正反向插入片段的方法,来检测目的片段是否已经成功地插入拟南芥基因组中。检测结果表明,目的片段已成功导入拟南芥基因组中,获得的 5 株抗性植株都是阳性转化植株。*AtDof1.7* 基因的 RT-PCR 分析表明,*AtDof1.7* 基因转录水平比野生型植株有了一定的降低。证明 RNAi 表达载体构建成功,以及以构建双链 RNAi 表达载体来沉默 *AtDof1.7* 基因是可行的。

由于油菜籽脂肪酸组成在应用上的重要性及其在遗传上的复杂性,因而改良油菜籽脂肪酸组成一直是油菜研究热点。学者们不仅对主要脂肪酸组分进行了 QTL 定位^[25-29],而且克隆分析了与脂肪酸代谢途径相关的多个关键酶的编码基因^[30-32]。目前,通过调控脂肪酸代谢途径中的单一步骤的关键酶,来改良种子脂肪酸组成已经取得了一定进展^[33-34],但关于这些关键酶的调控因子还不是很清楚。找出这些调控因子加以利用将是改良种子脂肪酸组成的一种新的有效途径。本研究将构建好的 *AtDof1.7* 基因的种子特异性表达的 RNA 干扰载体导入拟南芥,使转基因拟南芥种子中脂肪酸各组分的相对含量发生了变化,油酸的含量极显著高于野生型,亚麻酸的含量极显著低于野生型,说明 *AtDof1.7* 转录因子与脂肪酸代谢途径有一定的关系。在脂肪酸代谢途径中,以油酸为前体物可分为两条途径,一是碳链的延长,油酸在 *Fae1* 的作用下随着碳原子的增加,分别形成廿碳烯酸和芥酸;另一途径是脂肪酸不饱和程度的增加(也就是双价的增多),即油酸在 *Fad2* 和 *Fad3* 减饱和酶作用下,形成亚油酸和亚麻酸^[29,35]。*AtDof1.7* 转录因子可能参与这个代谢过程中关键酶

的转录调控,从而调节脂肪酸的含量。

与双低油菜籽油相比“高油酸、低亚麻酸”(high oleic-low linolenic acid, HOLL)的菜油在食用油营养健康和食品工业的应用上都具有更高的竞争力。一方面,高油酸油可降低血液中低密度脂蛋白胆固醇的含量,并且在阻止动脉血管硬化中,单不饱和脂肪酸的油酸比多不饱和脂肪酸更具有优越性;另一方面,亚麻酸的含量高会降低菜油的氧化稳定性,不耐储存和易产生难闻的气味,而高亚麻酸能提高菜油的稳定性^[36-37]。此外,HOLL 菜油的价格也比普通双低品种的菜油价格高 40%左右。因此,在双低的基础上,进一步改良油菜籽品质,培育出“高油酸、低亚麻酸”油菜品种成为油菜育种首要目标。Cargill 公司早已育成油酸含量超过 85%、亚麻酸含量为 2%~3%的杂交种,而我国在这方面的研究才刚刚起步^[38]。本研究通过干扰抑制 *AtDof1.7* 基因的表达,明显提高了油酸含量,降低了亚麻酸含量,这将为在油菜中研究 DOF 类转录因子的功能以及创造“高油酸、低亚麻酸”优质油菜种质资源提供新的参考。

4 结论

构建了 *AtDof1.7* 基因的种子特异性表达的 RNA 干扰载体,成功将其转入拟南芥基因组中,获得 5 株阳性转基因植株。转基因植株中 *AtDof1.7* 基因的表达受到了抑制,种子脂肪酸各组分相对含量发生了变化,说明 *AtDof1.7* 转录因子与拟南芥种子脂肪酸代谢途径有关。

References

- [1] Ashrafi K, Chang F Y, Watts J L, Fraser A G, Kamath R S, Ahringer J, Ruvkun G. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*, 2003, 421: 268–272
- [2] Chuang C F, Meyerowitz E M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 4985–4990
- [3] Prasanth S G, Prasanth K V, Stillman B. *Orc6* involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science*, 2002, 297: 1026–1031
- [4] Yanagisawa S. A novel DNA binding domain that may form a single zinc finger motif. *Nucl Acid Res*, 1995, 23: 3403–3410
- [5] Yanagisawa S. The Dof family of plant transcription factor. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 555–560
- [6] Lijavetzky D, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J. Genome-wide

- comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* *Dof* gene families. *BMC Evol Biol*, 2003, 3: 17
- [7] Shigyo M, Tabei N, Yoneyama T, Yanagisawa S. Evolutionary processes during the formation of the plant-specific *Dof* transcription factor family. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 179–185
- [8] Tsujimoto-Inui Y, Naito Y, Sakurai N, Suzuki H, Sasaki R, Takahashi H, Ohtsuki N, Nakano T, Yanagisawa S, Shibata D, Uchimiya H, Shinshi H, Suzuki K. Functional genomics of the DOF transcription factor family genes in suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol*, 2009, 26: 15–28
- [9] Mena M, Vicente-Carbajosa J, Schmidt R J, Carbonero P. An endosperm-specific *dof* protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. *Plant J*, 1998, 16: 53–62
- [10] Vicente-Carbajosa J, Moose S P, Parsons R L, Schmidt K J. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interact with the basic leucine zipper transcriptional activator *opaque2*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7685–7690
- [11] Mena M, Cejudo F J, Isabel-Lamonedá I, Carbonero P. A role for the DOF transcription factor *BPBF* in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone. *Plant Physiol*, 2002, 130: 111–119
- [12] Isabel-LaMoneda I, Díaz I, Martínez M, Mena M, Carbonero P. SAD: a new DOF protein from barley that activates transcription of a cathepsin B-like thiol protease gene in the aleurone of germinating seeds. *Plant J*, 2003, 33: 329–340
- [13] Imaizumi T, Schultz T F, Harmon F G, Ho L A, Kay S A. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Science*, 2005, 309: 293–297
- [14] Wang H W, Zhang B, Hao Y J, Huang J, Tian A G, Liao Y, Zhang J S, Chen S Y. The soybean *Dof*-type transcription factor genes, *GmDof4* and *GmDof11*, enhance lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant J*, 2007, 52: 716–729
- [15] Yanagisawa S, Sheen J. Involvement of maize *Dof* zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell*, 1998, 10: 75–89
- [16] Yanagisawa S. *Dof1* and *Dof2* transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J*, 2000, 21: 281–288
- [17] Yanagisawa S, Akiyama A, Kisaka H, Uchimiya H, Miwa T. Metabolic engineering with *Dof1* transcription factor in plants: improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 7833–7838
- [18] Pan L-F(潘丽峰). Improvement of Tobacco Nitrogen Utilization Rate by Increasing Expression of *Dof1*. MS Dissertation of Kunming University of Science and Technology, 2007 (in Chinese with English abstract)
- [19] Chen J-Q(陈锦清), Lang C-X(郎春秀), Hu Z-H(胡张华), Liu Z-H(刘智宏), Huang R-Z(黄锐之). Antisense *PEP* gene regulates to ratio of protein and lipid content in *Brassica napus* seeds. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 1999, 7(4): 316–320 (in Chinese with English abstract)
- [20] Martinez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce J L, Herrera-Estrella L. Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral-dip method. *Plant Mol Biol Rep*, 2004, 22: 63–70
- [21] Du P-F(杜培粉), Wu L-T(伍林涛), Yao Y-T(姚远颀), Yin F(尹峰), Ruan Y(阮颖), Liu C-L(刘春林). Construction of the RNAi vector of *AtTPSO3* gene and *Arabidopsis* transformation. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2009, 7(3): 451–455 (in Chinese with English abstract)
- [22] Li M(李明), Jiang S-L(姜世玲), Wang Y-Q(王幼群), Liu G-Q(刘国琴). Post-transcriptional silencing signal of gene can be fast two-way transfer in grafted *Arabidopsis*. *Sci Bull* (科学通报), 2006, 52: 142–147 (in Chinese)
- [23] Stoutjesdijk P A, Singh S P, Hurlstone C J, Waterhouse P A, Green A G. hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* *FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1723–1731
- [24] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, Wang M B, Rouse D T, Liu Q, Gooding P S, Singh S P, Abbott D, Stoutjesdijk P K, Robinson S P, Gleave A P, Green A G, Waterhouse P M. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J*, 2001, 27: 581–590
- [25] Fourmann M, Barret P, Renard M, Pelletier G, Delourme R, Brunel D. The two genes homologous to *Arabidopsis* *Fae1* co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 852–858
- [26] Gupta A, Mukhopadhyay A, Arumugam N, Sodhi Y S, Pental D, Pradhan A K. Molecular tagging of erucic acid trait in oilseed mustard (*Brassica juncea*) by QTL mapping and single nucleotide polymorphisms in *Fae1* gene. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 743–749
- [27] Burns M J, Barnes S R, Bowman J G, Clarke M H E, Werner C P, Kearsey M J. QTL analysis of an intervarietal set of substitution lines in *Brassica napus*: seed oil content and fatty acid composition. *Heredity*, 2003, 90: 39–48
- [28] Liu X-P(刘雪平), Tu J-X(涂金星), Liu Z-W(刘志文), Chen

- B-Y(陈宝元), Fu T-D(傅廷栋). Construction of a molecular marker linkage map and its use for QTL analysis of erucic acid content in *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(3): 275–282 (in Chinese with English abstract)
- [29] Hu X Y, Sullivan-Gilbert M, Gupta M, Thompson S A. Mapping of the loci controlling oleic and linolenic acid contents and development of *fad2* and *fad3* allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 497–507
- [30] Scheffler J A, Sharpe A G, Schmidt H, Sperling P, Parkin I A P, Lühs W, Lydiat D J, Heinz E. Desaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 583–591
- [31] Barret P, Delourme R, Renard M, Domergue F, Lessire R, Del-seny M, Roscoe T J. A rapeseed *FAEI* gene is linked to the *EI* locus associated with variation in the content of erucic acid. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 177–186
- [32] Tanhuanpaa P, Vilkki J, Vihinen M. Mapping and cloning of *FAD2* gene to develop allele-specific PCR for oleic acid in spring turnip rape (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*). *Mol Breed*, 1998, 4: 543–550
- [33] Stoutjesdijkl P A, Hurlestone C, Singh S P, Green A G. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous *D12*-desaturases. *Biochem Soc Transact*, 2000, 28: 938–940
- [34] Peng Q, Hu Y, Wei R, Zhang Y, Guan C Y, Ruan Y, Liu C L. Simultaneous silencing of *FAD2* and *FAEI* genes affects both oleic acid and erucic acid contents in *Brassica napus* seeds. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 317–325
- [35] Schwartzbeck J L, Jung S, Abbott A G, Mosley E, Lewis S, Pries G L, Powell G L. Endoplasmic oleoyl-PC desaturase references the second double bond. *Phytochemistry*, 2001, 57: 643–652
- [36] Maher L, Burton W, Salisbury P, Debonte L, Deng X M. High oleic, low linolenic (HOLL) specialty canola development in Australia. The 12th International Rapeseed Congress, 2007. pp 22–24
- [37] Carré P, Evrard J, Judde A, Labalette F, Mazette S. Technological performances of low linolenic / high oleic rapeseed oils for food and non-food application. The 12th International Rapeseed Congress, 2007. pp 152–159
- [38] Tu J-X(涂金星), Zhang D-X(张冬晓), Zhang Y(张毅), Fu T-D(傅廷栋). Discussion on some standards of variety registration and breeding goals of *Brassica napus* in China. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2007, 29(3): 350–352 (in Chinese with English abstract)