

甜瓜 N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶基因 (*CmGnT*) RNA 干扰载体的构建

张瑞腾^{1, 2} 付秋实² 马太光¹ 郭秀霞¹ 李灵芝¹ 郭仰东³ 王怀松^{2*}
李海平^{1*}

(¹ 山西农业大学园艺学院, 山西太谷 030801; ² 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ³ 中国农业大学园艺学院, 北京 100193)

摘 要: 为探讨甜瓜 N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶基因 (*CmGnT*) 的功能, 选取甜瓜 *CmGnT* 基因保守序列, 利用特异性引物 PCR 扩增得到一段 238 bp 的干扰片段。利用 *Swa* I 单酶切将正向片段亚克隆到质粒载体 pFGC1008 的 35S 启动子与 GUS 之间, 利用 *Spe* I 单酶切将反向片段亚克隆到质粒载体 pFGC1008 的 GUS 与终止子之间, 构建了 RNAi 表达载体 pFGC1008-*CmGnT*。通过冻融法将其转入根癌农杆菌 C58 中, 菌液 PCR 验证表明 RNAi 表达载体 pFGC1008-*CmGnT* 构建成功并成功转入农杆菌。为进一步研究甜瓜 *CmGnT* 基因功能及甜瓜分子育种奠定重要基础。

关键词: 甜瓜; *CmGnT* 基因; RNA 干扰; 载体构建

糖基转移酶 (Glycosyltransferase, GT) 是一个庞大的酶家族, 到目前为止, 依据序列相似性和底物特异性, 糖基转移酶被划分为 101 个不同家族。糖基转移酶参与低聚糖和多糖的生物合成, 具有多种功能和生物活性, 其作用底物广泛, 同时糖基化还能产生级联效应, 因此糖基转移酶及糖基化修饰在调节植物次级代谢和激素平衡、增强植物抗病反应、提高植物耐盐耐旱、维持植物正常生长发育等方面有重要意义(孙延国, 2013)。前人的研究表明, 糖基转移酶参与花青素的生物合成 (Tohge et al., 2005)。烟草中反义表达糖基转移酶 TOGT 后, 烟草对 TMV 更加敏感, 抗性明显降低 (Chong et al., 2002)。在小麦中糖基转移酶 TaUGT1 和 TaUGT2 受

盐诱导上调表达 (林凡云 等, 2008)。杜氏盐藻寡糖基转移酶亚基 *STT3a* 基因的高表达可以增强其盐适应和鞭毛再生能力(王翠 等, 2010)。转化蔗糖-1-果糖基转移酶 *I-SST* 基因能提高烟草的耐旱性 (李慧娟 等, 2007)。

N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶 (GnT) 属于糖基转移酶 17 家族, 是一组与糖蛋白天冬酰胺连接型 (N-) 糖链合成有关的重要酶。GnT 的功能是催化 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 残基生成以 β 1, 4 键连接于 N-糖链 β -Man 上的平分型 GlcNAc。植物中关于 *GnT* 基因的研究报道较少。Strasser 等 (1999) 从烟草 cDNA 文库中获得了 *GnT I* 基因序列。随后在拟南芥和马铃薯等植物中也获得相关 *GnT* 基因。周凯等 (2011) 克隆了陆地棉 *GhGnT* 基因并研究了该基因的功能, 结果显示, *GhGnT* 基因受盐胁迫诱导表达量显著提高, 表明 *GhGnT* 基因对盐胁迫具有一定的抗性。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种新的基因调控机制 (Matzke et al., 2001)。RNAi 技术可以选择干扰特定基因, 高效、特异地阻断体内特定基因表达, 使同源互补序列的 mRNA 降解, 诱使细胞表现出特定基因缺失的表型, 具有

张瑞腾, 男, 硕士研究生, 主要从事蔬菜栽培生理和生物技术研究,
E-mail: rtzhang726@163.com

* 通讯作者 (Corresponding authors): 李海平, 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事蔬菜栽培生理和生物技术研究, E-mail: lih0205@163.com; 王怀松, 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事蔬菜遗传育种研究, E-mail: wanghuaisong@caas.cn

收稿日期: 2016-12-26; 接受日期: 2017-07-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471895, 31201642), 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-26-07), 中国农业科学院科技创新工程项目

高效性、扩大性、特异性及可遗传性等特点 (Fire et al., 1998; Wagener & Garcia-Blanco, 2002; Lin et al., 2009)。利用 RNAi 技术的这些特点可以进行植物基因功能研究, 植物抗病、抗逆性研究, 改良植物性状, 培育新品种等。Lee 等 (2004) 利用 RNAi 技术发现 *OsMADS50* 基因是水稻重要的开花活化因子, 调控水稻开花。董小卫 (2010) 利用 RNAi 技术获得抗烟草普通花叶病毒 (TMV)、马铃薯 Y 病毒 (PVY) 和黄瓜花叶病毒 (CMV) 等 3 种病毒的烟苗, 且 RNAi 烟叶与普通烟叶的总糖、烟碱、总氮、钾和氯等主要化学成分基本一致。McGinnis 等 (2007) 利用 RNAi 技术将反向重复定位的短基因片段导入玉米愈伤组织中, 获得了稳定遗传的转基因系。巴德仁贵 (2012) 从甜瓜果实中克隆得到甜瓜 α -甘露糖苷酶基因 (α -man), 构建了 RNAi 表达载体 pART27- α -man, 结果表明, 转化 α -man 基因的甜瓜果实耐贮藏性及货架期明显延长。杨立清 (2015) 构建了甜瓜 *CMe-ERF1* 和 *CMe-ERF2* 基因 RNAi 表达载体 pART27-ERF1 和 pART27-ERF2, 结果表明, *CMe-ERF1* 和 *CMe-ERF2* 基因具有促进果实成熟的功能。

目前, 甜瓜 N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶基因 (*CmGnT*) 在甜瓜生长发育过程中的作用以及在育种上的应用价值还不清楚。本试验设计了 2 对特异性引物, 通过 PCR 扩增干扰片段, 利用单酶切连接技术, 将干扰片段导入目的载体, 构建了甜瓜 *CmGnT* 基因的 RNAi 表达载体, 并将其转入农杆菌 C58 中, 为后期进行甜瓜遗传转化, 研究 *CmGnT* 基因功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 载体和菌株 大肠杆菌菌株 DH5 α 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 质粒载体 pFGC1008、根癌农杆菌菌株 C58 为中国农业科学院蔬菜花卉研究所西甜瓜课题组实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶购自北京冰达生物科技有限公司, 连接酶、高保真酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司, *Taq* 酶购自北京艾德莱生物科技有限公司, 氯霉素、利福平购自上海生工生物工程技术有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自

北京酷来搏科技有限公司, 质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 其他试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基 LB 培养基: $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母提取物, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白胨, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂 (固体培养基添加)。

YEB 培养基: $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母提取物, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白胨, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛肉膏, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂 (固体培养基添加)。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据已克隆的甜瓜 *CmGnT* 基因序列 (NCBI 登录号: XM_008447934.2), 选取 238 bp 保守序列作为构建 RNAi 表达载体的 *CmGnT* 基因干扰片段, 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计含有 *Swa* I 酶切位点的特异性引物 GnT-RNAi-F1/R1 和含有 *Spe* I 酶切位点的特异性引物 GnT-RNAi-F2/R2。根据质粒载体 pFGC1008 序列设计 1 对含有目的基因片段的引物 PCR-F/R, 并将 pFGC1008 转入农杆菌用于对照验证。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5' -3')
GnT-RNAi-F1	CGCGCCCAATCGATGATTTAAATATGTGCTGGATGATGGGTGAA
GnT-RNAi-R1	CATGTTTCATCTGGGGATTTAAATCCCATAGTGGCCGTAAGAAG
GnT-RNAi-F2	TCCTCAGCTTAATTAAGTCTAGTCCCATAGTGGCCGTAAGAAG
GnT-RNAi-R2	AGCAGGACTCTAGGGACTAGTATGTGCTGGATGATGGGTGAA
PCR-F	CGCGCCCAATCGATGATTTAAAT
PCR-R	AGCAGGACTCTAGGGACTAGT

1.2.2 正、反向干扰片段的扩增及凝胶回收 以甜瓜 cDNA 为模板, GnT-RNAi-F1、GnT-RNAi-R1 为引物进行 PCR 扩增得到正向 *CmGnT* 基因干扰片段, 以 GnT-RNAi-F2、GnT-RNAi-R2 为引物进行 PCR 扩增得到 *CmGnT* 基因反向干扰片段。利用 *Taq* 酶进行 PCR 扩增, 反应程序: 预变性 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s; 变性 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, 退火 $59 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, 延伸 $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, 30 个循环; 彻底延伸 $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 Coolaber DNA 凝胶回收试剂盒回收正、反向干扰片段。

1.2.3 正向干扰片段连接 将质粒载体 pFGC1008 利用 *Swa* I 内切酶进行单酶切, 再利用连接酶将正向片段亚克隆到 pFGC1008 的 35S 启动子与 GUS 之间, 将获得的中间载体命名为 pFGC1008-CmGnT-F。

1.2.4 菌液 PCR 验证 将正向克隆片段转入 DH5 α 大肠杆菌, 后经菌液 PCR 验证。

1.2.5 反向干扰片段连接 将中间载体 pFGC1008-CmGnT-F 利用 *Spe* I 内切酶进行单酶切, 再利用连接酶将反向片段亚克隆到 pFGC1008 的 GUS 与终止子之间, 将获得的最后载体命名为 pFGC1008-CmGnT。

1.2.6 质粒载体转农杆菌菌液 PCR 鉴定 将构建好的质粒载体 pFGC1008-CmGnT 转入农杆菌 C58 中, 然后进行菌液 PCR 验证, 菌液 PCR 反应程序同 1.2.2。验证正确后甘油保存于 -80 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

2.1 正、反向片段的扩增

经琼脂糖凝胶电泳检测, 获得正、反向片段, 其条带大小为 238 bp (图 1、2), 表明成功获得正、反向干扰片段。

2.2 干扰载体 pFGC1008-CmGnT 构建结果

正向片段经 *Swa* I 单酶切与载体 pFGC1008

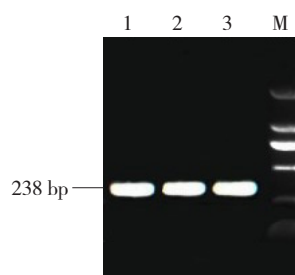


图 1 正向片段扩增结果

M: Marker D2000; 1~3: 正向片段的扩增。

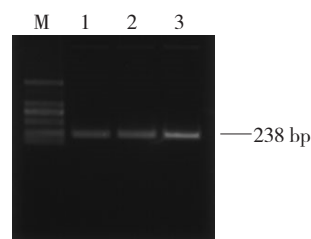


图 2 反向片段扩增结果

M: Marker D2000; 1~3: 反向片段的扩增。

连接, 获得中间载体 pFGC1008-CmGnT-F; 然后反向片段经 *Spe* I 单酶切与中间载体连接, 最后成功构建 RNA 干扰载体 pFGC1008-CmGnT (图 3)。将构建好的载体送公司测序结果正确, 表明干扰载体 pFGC1008-CmGnT 构建成功。

2.3 转化农杆菌鉴定

干扰载体 pFGC1008-CmGnT 转化农杆菌后,

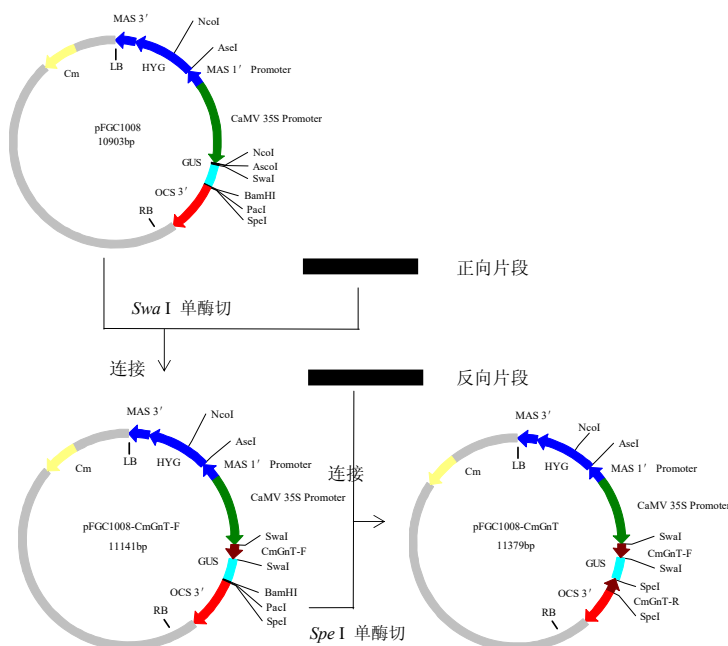


图 3 pFGC1008-CmGnT RNA 干扰载体构建示意图

彩色图版见《中国蔬菜》网站: www.cnveg.org。

选择单克隆进行菌液 PCR 检测, 检测结果经琼脂糖凝胶电泳验证, 结果如图 4 所示, 第 1 泳道为质粒载体 pFGC1008, 第 2 和 3 泳道为干扰载体 pFGC1008-*CmGnT* 转入农杆菌菌液 PCR 结果, 表明干扰载体构建成功, 同时表明 pFGC1008-*CmGnT* 载体已成功转入根癌农杆菌。

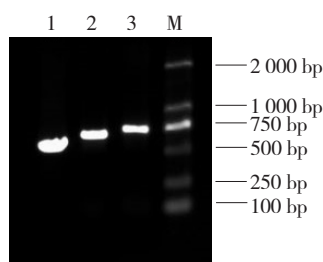


图 4 RNA 干扰载体转农杆菌验证

M: Marker D2000; 1: pFGC1008 载体; 2~3: 转农杆菌 PCR 结果。

3 讨论

植物中构建 RNAi 载体常用方法有简易 RNAi 载体构建法 (Higuchi et al., 2009)、Gateway 克隆技术 (Helliwell & Waterhouse, 2003) 和传统酶切连接 RNAi 载体构建法 (Wesley et al., 2001)。Helliwell 和 Waterhouse (2003) 认为基因沉默效果与双链 RNA 的长度有关, 片段太短 RNA 干扰效率较低。然而目的片段太长, 在复制过程中碱基错配几率变大, dsRNA 结构也不太稳定, 容易发生交叉沉默甚至是脱靶效应 (Wang et al., 2013)。RNA 干扰目的片段的选取是 RNAi 技术进行植物基因功能分析的关键, 大量研究表明, 干扰片段长度在 200~600 bp 之间, 基因沉默效率较高。因此, 本试验选取 *CmGnT* 基因保守序列且长度为 238 bp 作为 RNA 干扰片段, 通过特异性引物 PCR 扩增干扰片段, 利用单酶切连接方法成功构建了 RNAi 表达载体 pFGC1008-*CmGnT*。

糖基转移酶作为糖生物学的重要一部分, 在植物生理中起着各种重要的作用。Poppenberger 等 (2005) 证明在糖基转移酶基因 (*UGT73C5*) 表达沉默的转基因株系中, 未检测到 23-O- 油菜素内酯葡萄糖苷, 表明该基因可能糖基化调节油菜素内酯活性。Naoumkina 等 (2010) 将苜蓿中糖基转移酶 *UGT73F3* 基因沉默后, 根系生长受到严重影响。Von 等 (2011) 研究表明, 沉默糖基转移酶 *UGT76B1* 基因, 植株抵抗力下降, 加速

衰老。Wang 等 (2011) 研究了拟南芥糖基转移酶 *UGT76C2* 基因在细胞分裂素代谢中的作用和反应, 在 RNAi 转基因植株中细胞分裂素 N- 糖苷的含量明显下降, 而在过表达植株中显著上升。前人的研究表明, 糖基转移酶对植物的生长发育以及抗逆性起着重要作用。

目前关于甜瓜中糖基转移酶基因方面的研究未见报道。本试验成功构建了 RNAi 表达载体 pFGC1008-*CmGnT*, 并成功转入农杆菌, 进一步将利用农杆菌介导的方法将干扰载体 pFGC1008-*CmGnT* 导入甜瓜中, 来验证该基因是否与甜瓜的生长发育以及抗逆性相关。

参考文献

- 巴德仁贵. 2012. 甜瓜 α -甘露糖苷酶基因 cDNA 片段的克隆、RNAi 载体构建及转化 [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古大学.
- 董小卫. 2010. 利用木霉和 RNAi 技术提高烟草抗性和品质的研究 [博士学位论文]. 济南: 山东师范大学.
- 李慧娟, 尹海英, 张学成, 杨爱芳. 2007. 转蔗糖: 蔗糖-1-果糖基转移酶基因提高烟草的耐旱性. 山东大学学报, 42 (1): 1-6.
- 林凡云, 陆琼娟, 徐剑宏, 史建荣. 2008. 两个与盐和赤霉病菌胁迫相关的小麦糖基转移酶基因的克隆与表达. 遗传, 30 (12): 1608-1614.
- 孙延国. 2013. 拟南芥糖基转移酶基因耐逆作用研究 [硕士学位论文]. 济南: 山东大学.
- 王翠, 李杰, 柳丽平, 曾磊, 薛乐勋. 2010. 杜氏盐藻寡糖基转移酶亚基 STT3a 功能结构域的克隆与表达分析. 生物工程学报, 26 (6): 760-766.
- 杨立清. 2015. 甜瓜 *CMe-ERF1* 和 *CMe-ERF2* 基因的功能研究 [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古大学.
- 周凯, 宋丽艳, 王俊娟, 王德龙, 樊保香, 王帅, 叶武威. 2011. 陆地棉 (*G. hirsutum* L.) N-乙酰氨基葡萄糖转移酶基因 (*GhGnT*) 的克隆及耐盐性功能分析. 分子植物育种, 9 (3): 309-317.
- Chong J, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B, Saindrenan P. 2002. Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc: Phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. Plant Cell, 14 (5): 1093-1107.
- Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 391 (6669): 806-811.
- Helliwell C, Waterhouse P. 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. Methods, 30 (4): 289-295.
- Higuchi M, Yoshizumi T, Kuriyama T, Hara H, Akagi C, Shimada H,

- Matsui M. 2009. Simple construction of plant RNAi vectors using long oligonucleotides. *Journal of Plant Research*, 122 (4): 477–482.
- Lee S, Kim J, Han J J, Han M J, An G. 2004. Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS-LIKE 20 (SOC1/AGL20)* ortholog in rice. *Plant Journal*, 38 (5): 754–764.
- Lin W, Zhang J, Zhang J, Liu X, Fei Z, Li X, Davidovic L, Tang Z, Shen L, Deng Y, Yang A, Han H, Zhang X, Yao L. 2009. RNAi-mediated inhibition of MSP58 decreases tumor growth, migration and invasion in a human glioma cell line. *Cellular and Molecular Medicine*, 13 (11–12): 4608–4622.
- Matzke M, Matzke A J, Kooter J M. 2001. RNA: guiding gene silencing. *Science*, 293 (5532): 1080–1083.
- McGinnis K, Murphy N, Carlson A R, Akula A, Akula C, Basinger H, Carlson M, Hermanson P, Kovacevic N, McGill M A, Seshadri V, Yoyokie J, Cone K, Kaeppler H F, Kaeppler S M, Springer N M. 2007. Assessing the efficiency of RNA interference for maize functional genomics. *Plant Physio*, 143 (4): 1441–1451.
- Naoumkina M A, Modolo L V, Huhman D V, Urbanczyk-Wochniak E, Tang Y, Sumner L W, Dixon R A. 2010. Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 22 (3): 850–866.
- Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, George G L, Vaistij F E, Hiranuma S, Seto H, Takatsuto S, Adam G, Yoshida S, Bowles D J. 2005. The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (42): 15253–15258.
- Strasser R, Mucha J, Schwihla H, Altmann F, Glossl J, Steinkellner H. 1999. Molecular cloning and characterization of cDNA coding for β 1, 2 N-acetylglucosaminyltransferase I (GlcNAc-T I) from *Nicotiana tabacum*. *Glycobiology*, 9 (8): 779–785.
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai M Y, Yano M, Nakajima J, Awazu-hara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe D B, Kitayama M, Noji M, Yamazaki M, Saito K. 2005. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant Journal*, 42 (2): 218–235.
- Von S P V, Zhang W, Kanawati B, Geist B, Faus-Kessler T, Schmitt-Kopplin P, Schäffner A R. 2011. The *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *Plant Cell*, 23 (11): 4124–4415.
- Wagener E J, Garcia-Blanco M A. 2002. RNAi-mediated PTB depletion leads to enhanced exon definition. *Molecular Cell*, 10 (4): 943–949.
- Wang J, Ma X M, Kojima M, Sakakibara H, Hou B K. 2011. N-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 52 (12): 2200–2213.
- Wang L, Zheng J, Luo Y, Xu T, Zhang Q, Zhang L, Xu M, Wan J, Wang M B, Zhang C, Fan Y. 2013. Construction of a genome-wide RNAi mutant library in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 11 (8): 997–1005.
- 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 A, Robinson S P, Gleave A P, Green A G, Waterhouse P M. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal*, 27 (6): 581–590.

Construction of RNA Interference Vector of *CmGnT* Gene in Melon

ZHANG Rui-teng^{1, 2}, FU Qiu-shi², MA Tai-guang¹, GUO Xiu-xia¹, LI Ling-zhi¹, GUO Yang-dong³, WANG Huai-song^{2*}, LI Hai-ping^{1*}

(¹College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China; ²Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ³College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to explore the functions of *CmGnT* gene, the paper selected conserved sequence of *CmGnT* gene in melon, and amplified the interference fragment (238 bp) by PCR with the specific primers. The forward fragment was subcloned into the plasmid vector pFGC1008 between the 35S promoter and GUS by *Swa* I single digestion, and the reverse fragment was subcloned into the plasmid vector pFGC1008 between the GUS and the terminator by *Spe* I single digestion, and the RNAi expression vector pFGC1008-*CmGnT* was constructed. The recombinant plasmid pFGC1008-*CmGnT* was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* (C58) by freeze-thaw method, and the results of PCR confirmed that the vector (pFGC1008-*CmGnT*) was successfully constructed and transferred to C58. This study has laid an important basis for further exploring the function of *CmGnT* gene and molecular breeding of melon.

Key words: Melon; *CmGnT* gene; RNA interference; Vector construction