

用 RNA 干涉对几个水稻 WD 结构域基因的功能研究

刘红美^{1,2}, 李晓瑜¹, 刘耀光¹

(1 广东省教育厅植物功能基因组与生物技术重点实验室, 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642;

2 贵阳医学院 医学生物技术教研室, 贵州 贵阳 550004)

摘要:为研究水稻中 WD 结构域基因的功能, 构建了 8 个 WD 结构域基因的 RNA 干涉转化载体并转化水稻品种. 其中 6 个基因获得了转化体, 3 个基因(代号为 E10, G04, 和 G05)的转化体出现表型变异. E10 和 G04 的转化植株表现为花柱数目增加, E10 转化植株的花柱基部还长出 1 条半透明物体; G05 的转化植株表现为花粉不育. 对转化植株的靶基因进行 RT-PCR 检测表明, 大部分转化植株的内源基因表达量降低或没有表达. 这些结果表明, 这些 WD 结构域基因的功能与生殖发育有关.

关键词:水稻; WD 结构域基因; RNA 干涉

中图分类号: Q943.2; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2007)03-0047-05

Functional Analysis of Several Rice WD Domain Genes by RNA Interference

LIU Hong-mei^{1,2}, LI Xiao-yu¹, LIU Yao-guang¹

(1 Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Biotechnology of Education Department, Guangdong Province, College of Life Sciences, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Department of Medical Biotechnology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: To study the functions of WD domain genes in rice, eight WD domain genes were selected from rice and used to prepare RNA interference constructs for transformation. Transgenic plants were obtained from six of the RNAi constructs and phenotypic variations were observed in the transgenic plants with three genes (coded as E10, G04, and G05). The transgenic plants of E10 and G04 exhibited increase of the number of stigmas, and a transparent unknown organ was arisen from the basis of the stigmas in the E10 transgenic plants. The transgenic plants of G05 showed male sterility. The expressions of the targeted genes in the transgenic plants were suppressed as assayed by RT-PCR. These results show that the WD domain gene's functions in rice have correlations with the development of reproductive organs.

Key words: rice; WD domain genes; RNA interference

水稻是重要的粮食作物, 现已成为禾本科作物的模式生物. 随着基因组测序工作的完成, 如何快而准地破译基因, 知道基因功能, 进而在生产实践中利用基因就成了研究者们的主要目标. 通过对模式植物拟南芥基因组序列进行基因预测, 发现存在着一类编码一组末端常为色氨酸(W)和天冬氨酸(D)结尾、长度约为 40 个氨基酸的串联重复序列(WD 结构

域)蛋白的超基因家族. 目前, 该基因家族只在真核生物中发现. 对果蝇、线虫、人类和拟南芥中的 WD 结构域基因的研究发现, WD 结构域基因家族在不同生物体中存在同源基因, 是生物体中的重要基因, 主要参与信号传导、转录调控、RNA 剪切、细胞周期转换、花发育等的基因调控^[1]. 目前已研究的植物 WD 结构域基因很少, 只有拟南芥的约 10 个这类基因有

收稿日期: 2007-03-14

作者简介: 刘红美(1975—), 女, 讲师, 博士; 通讯作者: 刘耀光(1954—), 男, 研究员, 博士, E-mail: ygliu@scau.edu.cn

基金项目: 国家 973 计划(2005CB12080)

功能研究的报道^[2]. 水稻基因组也预测有数百个 WD 结构域基因,但鲜有利用实验技术对这类基因的功能开展研究的报道. 因此,对水稻中的 WD 结构域基因进行功能鉴定是一项重要的工作.

诱导遗传突变是研究基因功能的重要手段. T-DNA 插入失活法、激活标签技术、化学和物理诱变、反义 RNA 技术已在基因功能研究中发挥了重要作用. 1998 年, RNA 干涉现象的发现和机制的揭示,使得 RNA 干涉技术成为了功能基因组研究中的有力工具. RNA 干涉(RNA interference, RNAi)就是指外源或内源的 dsRNA(double strands RNA)可以降解内源的同源 mRNA,从而使相应基因发生基因沉默的现象^[3]. RNA 干涉技术是将目的基因的序列在转基因个体内转录出互补 RNA,可形成双链 RNA(dsRNA),产生 RNA 干涉,使目的基因沉默. RNA 干涉技术适合于基因功能的大规模研究,这主要是因为:(1)RNA 干涉可以高效地获得特定基因表达沉默的突变体;(2)可同时沉默多个基因;(3)导入带可诱导调控元件的 DNA,如使用诱导型启动子等,使其在需要的时候转录出特定的 dsRNA,从而可以在细胞特定的发育时期观察基因敲除的效果^[4]. RNA 干涉的高效性和特异性,已在线虫^[3]、果蝇^[5]、小鼠^[6]、拟南芥^[7]等模式生物中得到了广泛应用,并取得了一系列成果. 为了研究水稻 WD 结构域基因的功能,本研究构建了 8 个水稻 WD 结构域基因的 RNA 干涉载体,以农杆菌介导转化水稻,获得了相关基因的沉默植株,为深入研究其功能奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 植物材料

以梗稻品系石豨白毛和中花 11 的幼胚诱导愈伤组织作为外植体进行转化.

1.2 农杆菌菌株及质粒

农杆菌菌株为 EHA105. RNA 干涉所用载体 pYL RNAi 为华南农业大学植物功能基因组与生物技术重点实验室构建^[8],其中 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点用于第 1 次目的片段的连接, *Mlu* I 和 *Pst* I 酶切位点用于第 2 次目的片段连接.

1.3 试验方法

1.3.1 目标基因的选取 通过互联网 RGP 网站(<http://rgp.dna.affrc.go.jp>) RiceGAAS 分析系统查询和选取水稻基因组中的 WD 结构域基因.

1.3.2 基因片段的获得 在目标基因与其他基因

同源性较低的区段设计特异引物,进行 PCR 扩增获得目标基因片段. 8 个 WD 结构域基因 PCR 引物序列如下:

G04a: 5'-CGAGGGATCCAGGCGGTGGCGAAG-3';
G04b: 5'-ACCGACTCGAGCCAAACCACCCGA-3';
D20a: 5'-GGCCACCGCAGTGAAATAGGT-3'; D20b: 5'-TCCCAAAGCTTGACATCATGATCAGC-3';
G05a: 5'-GAAGTCCTCCTAGCACCATG-3'; G05b: 5'-GGAGCTCAACATGGACAACACTAC-3';
F08a: 5'-GGGCAAAAATGCGCGAGCTGCAG-3'; F08b: 5'-AGTCCCCGTCAAACCTCACCAAC-3';
B07a: 5'-AGGGTATGAAGCAGGGATC-CA-3'; B07b: 5'-TTCTGCGGAGTGGCATATCCTG-3';
P12a: 5'-ATCACGGATCCAGTATGTCAATAGTGC-3';
P12b: 5'-AGCACAAACTGTGCAACATGAC-3';
E10a: 5'-ATCTCTCTGTGCTGTAGGTGTA-3';
E10b: 5'-AGAAGTTCCATGTCCTGAGCAG-3';
D09a: 5'-GTCCTTTCCCTGTAGCGACTCG-3';
D09b: 5'-ACAGCTCAAGACGGCTATAAC-3'.

1.3.3 目的基因片段的 RNAi 载体构建 目的基因片段的 RNAi 载体的构建和检测按胡旭霞等^[8]所述方法进行.

1.3.4 农杆菌介导转化 农杆菌转化水稻的培养基、农杆菌培养及水稻愈伤组织的浸染、共培养及转化子的筛选和植株再生同文献^[9].

1.3.5 转化植株的 PCR 检测 提取各目标基因的 RNA 干涉转化植株的基因组 DNA,同时设置阴性对照及阳性对照,用潮霉素抗性基因 *HPT* 特异产物(5'-TCCGGAGCCTCCGCTCGAAGTAG-3', 5'-CTGAACCTCACCGCGACGTCTGTC-3')进行 PCR 检测.

1.3.6 转化植株表型观察 采用目测和立体解剖显微镜对转化植株进行表型观察. 花粉育性用 $w = 1\%$ 的 $I_2 - KI$ 溶液染色,并在显微镜下观察.

1.3.7 目的基因的 RNA 表达水平检测 采用反转录 PCR(RT-PCR)方法对目标基因 mRNA 水平进行检测.

2 结果与分析

2.1 水稻中 WD 结构域基因的分布和目标基因的选择

通过互联网 RGP 网站(网址 <http://rgp.dna.affrc.go.jp>)的 RiceGAAS 分析系统,用关键词(WD)查询,在水稻基因组中共找到 594 个基因编码至少含 1 个 WD 重复单元的蛋白,含 4 个或 4 个

以上重复单元的 WD 蛋白有 245 个,其中第 1、3 染色体分布较多,分别有 44 和 48 个. 根据结构特征,水稻的 WD 蛋白可分为 3 种类型:(1)只有数目不同的 WD 重复单元;(2)在 WD 重复单元之间插入有其他结构域序列;(3)除 WD 重复单元序列外,在其 N 末端或 C 末端有其他保守结构域序列. 本研

究选取了 8 个目标基因作 RNAi 分析. 这些基因的结构特征见表 1. 虽然根据 RiceGAAS 对这些基因的可能功能进行了预测,但它们的真实功能未知. 除了 G04 与拟南芥的已知功能基因 *FIE*^[10] 同源,其余的为新基因.

表 1 用于 RNAi 的水稻 WD 结构域基因
Tab. 1 The rice WD domain genes selected for RNAi

基因代号 gene codes	BAC/PAC 上的预测基因 ¹⁾ predicted gene in BAC/PAC	结构 ²⁾ structure	功能预测 predicted function
E10	P0028E10. 19(1)	Zf - C3HC4 + WD (2)	未知
G05	P0592G05. 21(1)	WD (5)	信号传导
F08	P0044F08. 14(1)	WD (10)	P66(逆境蛋白)
D09	B1112D09. 07(1)	DENN + WD (8)	气孔胞质分裂缺陷
D20	OSJNBa0038D20. 27(3)	WD (10) + D1_heme	信号传导
P12	OSJNBa0009P12. 23 (4)	WD (12)	未知
B07	P0613B07. 07 (7)	WD (6)	信号传导
G04	OJ1613G04. 11 (8)	WD (5)	FIE(不依赖受精的胚乳发育) ^[10]

1)括号内数字为所在染色体;2)括号内数字为 WD 重复数
2.2 目标基因片段的获得和 RNAi 载体的构建

目标基因片段是以水稻中花 11 基因组 DNA 作模板,目标基因 PCR 引物特异扩增的产物. 电泳结果表明 8 个目标基因都获得了特异的扩增产物,大小范围为 200 ~ 1200 bp(图 1). 目的基因片段的 RNAi 载体的构建按胡旭霞等^[8]所述方法进行,分 2 轮连接,将目的片段以相反方向插入到 2 个克隆位点. 构建好的 RNAi 载体质粒的命名为在其基因代号后加 Ri.

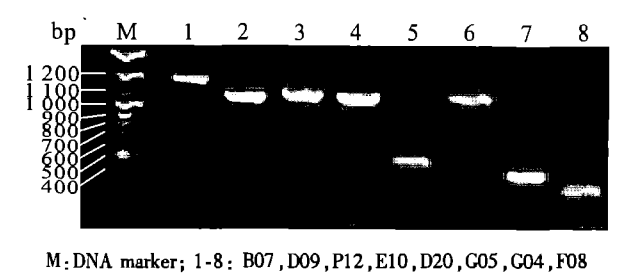


图 1 PCR 扩增的目标基因片段
Fig. 1 PCR-amplified fragments of target genes

2.3 RNAi 载体质粒的检测

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 RNAi 载体质粒可切出第 1 轮插入的片段,*Mlu* I 和 *Pst* I 双酶切可切出第 2 轮插入的片段,*Bam*H I 单酶切可切出插入的 2 个片段以及之间的间隔区. 酶切鉴定结果表明本试验所装载的 8 个 RNAi 载体质粒结构正确,可用来转化水稻. 图 2 列出了其中 4 个目标基因的 RNAi 质粒的酶切电泳图.



图 2 RNAi 质粒的酶切检测
Fig. 2 Restriction analysis of RNAi constructs

2.4 水稻转化和检测

将 8 个 RNAi 质粒进行了农杆菌介导的水稻转化. P12Ri 和 B07Ri 经分别转化中花 11 和石豨白毛,虽然都筛选出抗性愈伤组织,但没有分化出苗. 其他 6 个基因获得转化体植株(表 2). 用 PCR 检测

表 2 RNAi 载体转化结果 Tab. 2 Results of transformation with the RNAi constructs			
RNAi 载体 constructs	转化的水稻品种 rice varieties transformed	转化体数 no. of transgenic plants	表型变异 mutant phenotype
E10Ri	石豨白毛	30	雌器官变异
D20Ri	中花 11、石豨白毛	40	无
D09Ri	石豨白毛	15	无
G04Ri	中花 11	4	雌器官变异
F08Ri	中花 11	10	无
G05Ri	中花 11	6	雄性不育

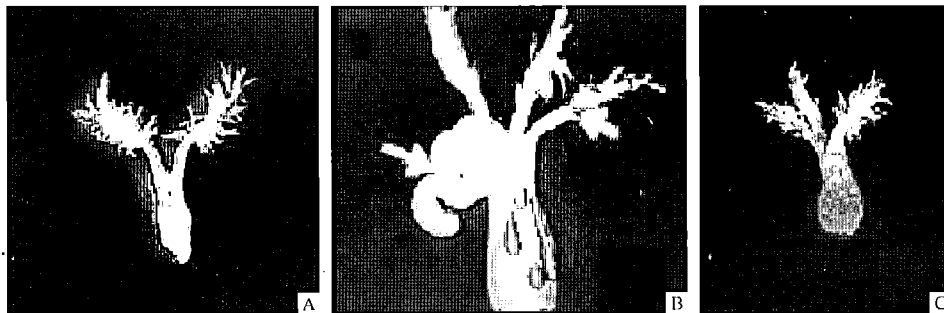
各转化植株的选择标记基因 *HPT*, 表明全部为阳性 (结果未显示)。

2.5 转化植株表型变异

对 T_0 转化植株进行了表型观察。E10Ri 转化植株出现了雌性器官变异, 表现为花柱 (柱头) 数目增加, 且花柱基部长出一条卷曲状的半透明物体 (图 3B)。而 G04Ri 转化植株的雌性器官表现为其中 1 条花柱开裂成为 2 个柱头 (图 3C)。G05 转化植株表现为花粉不育 (图 4B), 导致小穗完全不结实或结实率很低。其他 3 个基因的转化体没有明显变异。

2.6 靶基因的表达抑制

为了鉴定转化导入的 RNAi 结构是否产生 RNA 干涉效果, 对转化植株的内源靶基因表达水平进行 RT-PCR 检测。对非转化体各种器官的 RT-PCR 检测表明, 所有基因 (表 1) 都是组成型表达的 (结果未显示)。从转化植株的幼叶抽提 RNA 进行检测显示, 所有内源靶基因在不同的转化植株中的表达水平均有不同程度的下降。其中 2 个基因 (E10 和 D20) 在转化植株的表达沉默情况如图 5 所示。说明本试验的 RNA 干涉载体转化有效地引发了 RNA 干涉效应。



A: 未转化植株; B: E10Ri 转化植株; C: G04Ri 转化植株

A: untransformed plant; B: transgenic plant with E10Ri; C: transgenic plants with G04Ri

图 3 转化植株的花器官突变

Fig. 3 Abnormal phenotypes of the female organs in transgenic plants

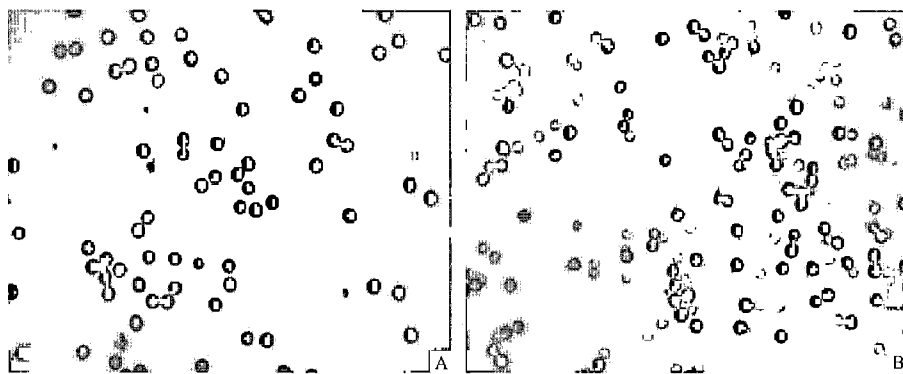
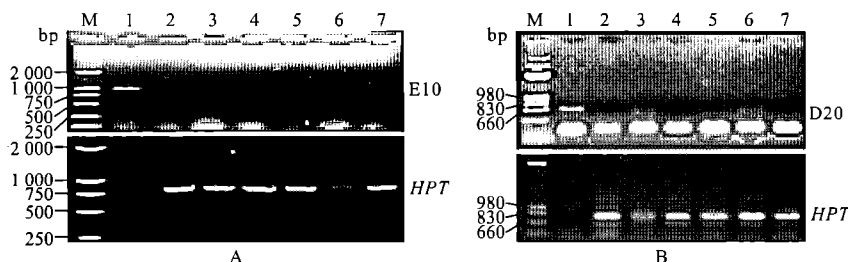


图 4 非转化植株的可育花粉 (A) 和 G05Ri 转化植株的部分败育花粉 (B)

Fig. 4 Fertile pollens of untransformed plant (A) and partial-sterile pollens of transgenic plants with G05Ri (B)



M: DNA marker; 1: 非转化植株; 2-7: 转化植株; 下部小图的 *HPT* 是抗潮霉素标记基因作为表达水平内参; A: E10 靶基因的 RT-PCR 检测; B: D20 靶基因的 RT-PCR 检测

M: DNA marker; 1: untransformed plant; 2-7: transgenic plants; *HPT*: hygromycin-resistant marker gene as a expression control; A: RT-PCR assay of E10; B: RT-PCR assay of D20

图 5 转化植株的靶基因表达的 RT-PCR 检测

Fig. 5 RT-PCR analysis of the expression of the target genes in transgenic plants

3 讨论

虽然水稻基因组中有大量的 WD 结构域基因,但对它们的功能研究尚未展开。RNA 干涉技术是研究植物基因功能的有效工具。为研究水稻中 WD 结构域基因的功能,本研究选取 8 个 WD 结构域基因为目标,试图以 RNA 干涉技术研究它们的功能。其中代号为 P12 和 B07 的 2 个基因对 2 个水稻受体材料的转化试验中虽然获得抗潮霉素愈伤组织,但都不能再分化成苗。重复转化这 2 个载体还是不能从抗潮霉素愈伤组织获得转化体。这暗示这 2 个基因可能是水稻再分化必须的关键基因,转化不能获得分化苗可能是 RNA 干涉效应抑制了它们的表达,从而影响了细胞的再分化。用基因沉默技术(反义 RNA, RNAi)对这类影响再分化的关键基因进行研究时,需要利用条件诱导型启动子的控制表达才能达到目的。E10 基因获得的变异大多集中在花的雌性器官,表明该基因可能参与水稻花雌性器官的发育调控。G05 基因转化植株表现为雄性不育,表明该基因对水稻生殖发育有重要作用。拟南芥中的 *FIE* 基因为不依赖受精的胚乳发育的相关基因,在发生功能缺失时,植株表现为未授粉时胚乳发育,授粉后,胚发生败育^[10]。本研究获得的一个水稻 *FIE* 同源基因(G04)的 RNAi 转化植株,出现雌性器官的发育异常,说明该基因参与花器官的发育。有 3 个 WD 结构域基因的 RNAi 转化体没有观察到明显的表型变异,虽然 RT-PCR 检测表明靶基因的表达受到了抑制。这可能是这些基因的功能是冗余的。这些基因详细的功能分析有待进一步展开。

RNA 干涉技术已广泛地应用于线虫、果蝇、人类等生物的基因功能研究中。近年来在拟南芥、烟草、水稻等植物也越来越多地应用该技术研究基因的功能^[11]。本试验获得的转化植株中,大部分产生了有效的 RNA 干涉效果,说明该技术是研究植物基因功能的有效技术。

参考文献:

- [1] NEER E J, SCHMIDT C J, NAMBUDRIPAD R, et al. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins[J]. *Nature*, 1994, 371: 297-300.
- [2] NOCKER V S, LUDWIG P. The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function[J]. *BMC Genomics*, 2003, 4: 1-11.
- [3] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *C. elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [4] WESLEY S V, HELLIWELL C A, SMITH N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. *Plant J*, 2001, 27: 581-590.
- [5] BOUTROS M, KIGER A K, ARMKNECHT S, et al. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in drosophila cells[J]. *Science*, 2004, 303(6): 832-835.
- [6] CULLEN L M, ARNDT G M. Genome-wide screening for gene function using RNAi in mammalian cells[J]. *Immunol Cell Biol*, 2005, 83(3): 217-223.
- [7] CHUANG C F, MEYEROWITZ E M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 4985-4990.
- [8] 胡旭霞, 刘耀光. 植物 RNA 干涉载体的构建及其在水稻基因表达沉默中的应用[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(5): 621-626.
- [9] 姜大刚, 付晓, 柳忠玉, 等. TAC 载体介导温敏不育水稻的遗传转化[J]. *华南农业大学学报*, 2005, 26(3): 52-55.
- [10] OHAD N, YADEGARI R, MARGOSSIAN L. Mutation in *FIE*, a WD polycomb group gene allow endosperm development without fertilization [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 407-415.
- [11] 王雷, 种康, 许智宏. 植物功能基因组学研究的有效工具: RNAi 技术[J]. *植物生理与分子生物学*, 2003, 39(6): 705-710.

【责任编辑 李晓卉】