

NtAN9 基因的 RNAi 改变转基因烟草花色*

崔超军, 马 坤, 李嘉敏, 陈君宇, 张润钊, 祝钦洸

(华南农业大学 生命科学学院 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室
广东省植物功能基因组与生物技术重点实验室, 广州 510642)

摘要:植物谷胱甘肽转移酶(Glutathione S-transferase,GST)与花青素苷的转运和积累有关。为验证烟草中编码 GST 的 *NtAN9* 基因的功能是否与此相关,构建了一个 *NtAN9* 基因的含内含子的发夹干扰载体 pRNAi-*NtAN9*,并用农杆菌介导的叶盘转化法转入烟草中,获得了转基因阳性植株。对转基因烟草盛花期(阶段 IV)花的花青素苷含量测定和内源 *NtAN9* 基因的 qRT-PCR 分析,结果表明内源 *NtAN9* 基因的表达受到 RNAi 的抑制,表达水平大量下降,导致花青素苷的积累受阻含量大幅降低,花色由粉红变为白色。上述研究结果表明 *NtAN9* 基因的功能与花的呈色密切相关,为进一步研究烟草花青素苷的转运和积累奠定了基础。

关键词:烟草;*NtAN9* 基因;花青素苷转运;RNAi;花色

中图分类号:Q966

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2016)04-0145-05

花色是观赏植物的重要品质性状之一,其中主要呈色物质是类黄酮类的花青素苷(Anthocyanin)。花青素苷在细胞质中合成,然后再转运到细胞中央大液泡中呈色。花青素苷的合成和积累对于植物器官的色泽形成有重要影响。花青素苷的生物合成与积累过程主要有以转录因子为主的调节基因、编码合成途径关键酶的结构基因、合成途径下游的修饰基因、转运相关蛋白基因等参与^[1]。相比较于其他几类基因和蛋白的研究,花青素苷转运相关蛋白的研究还比较少。尽管目前已知参与植物花青素苷转运与积累的蛋白主要有 4 个大类^[2],即植物谷胱甘肽转移酶(Glutathione S-transferase,GST)、多药耐药抗性相关蛋白(Multidrug resistance-associated protein,MRP)、多药和有毒化合物排出家族(Multidrug and toxic compound extrusion,MATE)和同源于哺乳动物的胆红素易位酶同族体(Bilirubin translocase-homologue,BTL-homologue),但是人们对于转运相关蛋白在植物花青素苷转运与积累过程中的机制并不十分清楚。

GST 主要是由 φ 、 τ 、 θ 、 ζ 、 λ 等 5 大类组成的包含多个成员的超基因家族编码,在植物的初生代谢和次生代谢中,行使不同的功能^[3]。其中,与花青素转运相关的 GST 主要是属于 τ 和 φ 两大类型。首个克隆的花青素苷转运相关的基因是玉米(*Zea mays*)*Bronze2* 基因,编码 τ 类的 GSTIII 蛋白,其突变直接导致花青素苷不能在玉米种皮中积累^[4]。第二个克隆的花青素苷转运相关的基因是矮牵牛(*Petunia hybrida*)*PhAN9* 基因,编码 φ 类型的 GSTI 蛋白,与 *Bronze2* 基因同源,突变导致花青素苷不能在矮牵牛花瓣中积累^[5]。到目前为止,与花青素苷转运相关的 GST 基因已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[6]、紫苏(*Perilla frutescens*)^[7]、葡萄(*Vitis vinifera*)^[8]、仙客来(*Cyclamen persicum*)^[9]、香石竹(*Dianthus caryophyllus*)^[10]、荔枝(*Litchi chinensis*)^[11]等植物中得到克隆和功能研究。拟南芥 *AtTT19* 基因突变,导致该物种 *tt19* 突变体花青素苷不能积累。利用紫苏、葡萄、仙客来、香石竹和荔枝等相关 GST 基因,互补 *tt19* 突变体,都能恢复拟南芥花青素苷的积累。

烟草(*Nicotiana tabacum*)是研究花色分子调控的重要模式植物之一,探索烟草花朵中的花青素苷转运与积累机制对于理解包括花色在内的植物器官色泽形成机制有重要的意义。本研究从烟草花中分离了编码 GST 的基因 *NtAN9* (GenBank 登录号 KX356542);为研究其在花青素苷中的转运和积累中的作用,还用 RNAi 方法抑制内源 *NtAN9* 基因的表达,导致了烟草花青素苷积累受阻,烟草花色由粉红色变为了白色。本研究结果有助于

* 收稿日期:2016-06-11 网络出版时间:2016-07-07 16:32

资助项目:国家级大学生创新创业训练计划项目(No. 201610564006);广东省公益研究与能力建设项(No. 2016A020210084)

作者简介:崔超军,男,研究方向为植物基因工程,E-mail:chaojun_cui@163.com;通信作者:祝钦洸,助理研究员,E-mail:zhuql@scau.edu.cn

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20160707.1632.020.html

加深人们对花青素苷转运机制的解析和理解,并从花青素苷转运角度为花色分子育种工作提供了基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

研究材料为普通烟草栽培品种 K326 的野生型(WT)和无菌苗,由本实验室保存,在正常的自然条件下或温室条件(25 °C,光照周期为 16 h 光照:8 h 黑暗)下生长。

植物 RNAi 载体 pRNAi-35S 由本实验室构建并保存^[12]。大肠杆菌菌株主要为 TOP10F'(为 LacI^q 突变菌株,能使致死基因 *ccdB* 彻底不表达)和普通菌株 DH10B。

1.2 方法

1.2.1 烟草基因组 DNA 提取、RNA 分离及 cDNA 第一链合成 烟草嫩叶基因组 DNA(gDNA)用 SDS 方法快速提取。烟草花(阶段 IV)总 RNA 用 Invitrogen 的 Trizol 试剂提取,各样品用 1 μg 总 RNA 为模版,采用 Promega 的 M-MuLV 逆转录酶和 OligodT Primer 进行反转录,合成 cDNA 第一链,条件为:42 °C,40 min;50 °C,30 min;99 °C, min;5 °C,5 min。

1.2.2 *NtAN9* 基因 RNAi 载体的构建 设计引物 F-NtAN9-BamHI (5'-aataGGATCCTTGGTATACAACATGGTACTCC-3',下划线处为 BamHI 酶切位点)和 R-NtAN9-HindIII (5'-attaAAGCTTTCATTATCATAAGCTCCAACAC-3',下划线处为 HindIII 酶切位点),用于扩增 315 bp 的 *NtAN9* cDNA 片段作为干涉片段,用酶切、连接的方法克隆进入 pRNAi-35S 的多克隆位点(MCS1)的 BamH I 和 Hind III 之间,转化大肠杆菌菌株 TOP10F',用通用引物 P1(5'-gagagaACGCGTGGGACTCTTGACCATGGTA-3',下划线处为 Pst I 酶切位点)和 P2(5'-ctagaaCTGCAGCCTCAGATCTACCATGGTC-3',下划线处为 Mlu I 酶切位点)进行菌落 PCR 筛选,获得插入正义 *NtAN9* 基因片段的中间干涉载体。回收预期大小的 P1/P2 PCR 产物,再用 PstI 和 Mlu I 酶切后连入中间干涉载体的 MSC2 上的对应位点,转化普通大肠杆菌 DH10B,用通用引物 P3 (5'-CGTGTGTCTATGATGATGATGATAG-3')和 P4 (5'-AACTTTATTGCCAAATGTTTGAACG-3')进行菌落 PCR 筛选,对获得的阳性质粒进行 BamH I 和 Mlu I 双酶切检测,最终测序确定,获得 *NtAN9* 基因 RNAi 干涉载体 pRNAi- *NtAN9*。整个载体构建流程见图 1。

1.2.3 农杆菌介导的烟草叶盘转化

用电击法,把 RNA 干涉载体 pRNAi-Nt-AN9 质粒,转化进入农杆菌菌株 EHA105 中。参考 Zhu 等人^[13]报道的方法,进行烟草叶盘转化,其中植物筛选标记潮霉素(HPT)质量浓度为 10 mg · L⁻¹。对转基因苗的检测,采用基因组 DNA 的 PCR 方法,对 HPT 和载体上的正义片段同时进行检测。HPT 引物为 H1 (5'-CATCGCCTCGCTCCAGTCAATGACCG-3')/H2 (5'-GTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTG-3'),扩增 540 bp 的片段;用引物 P1/P2 扩增载体上的正义片段;参数如下:94 °C 预变性 4 min;35 个扩增循环(94 °C 变性 0.5 min,58 °C 退火 0.5 min,72 °C 延伸 0.5 min);72 °C 再延伸 5 min。

1.2.4 烟草花青素苷含量测定 采用 Zhu 等人^[13]报道的方法测定烟草盛花期(阶段 IV)花青素苷含量。

1.2.5 烟草 *NtAN9* 基因的 qRT-PCR 分析 利用 Primer 5.0 软件,设计 *NtAN9* 基因干涉片段外侧 cDNA 序列的 qRT-PCR 引物 qRT-F-NtAN9(5'-GCCATTTGGACAGGTTCC-3')和 qRT-R-NtAN9(5'-TTGAAGTTGT-

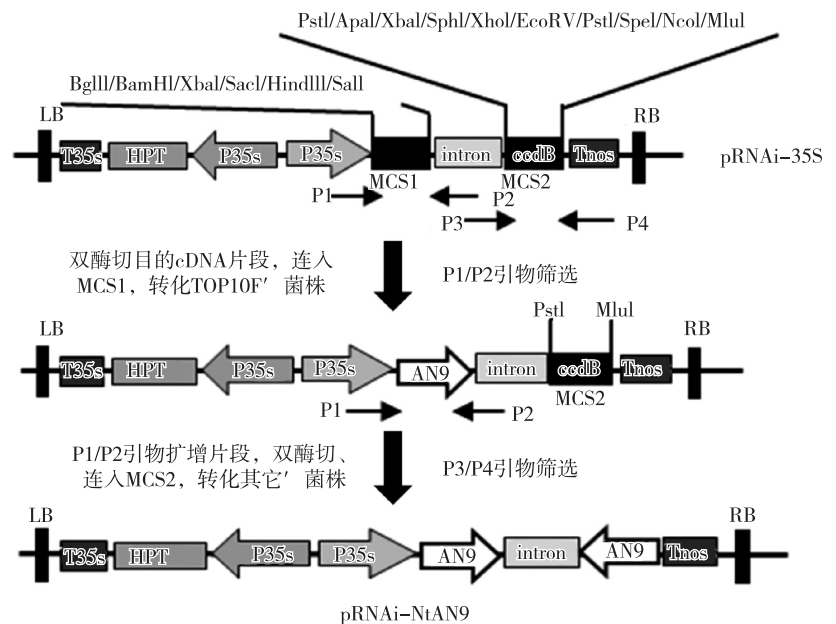


图 1 RNAi 载体构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram for construction of the RNAi vector

TGGATTCCAC-3'),以 *NtGAPDH* 基因作为内参,引物为 F-GAPDH(5'-CTGCTCACTTGAAGGGTGGT-3')和 R-GAPDH (5'-GGGAGCAAGGCAATTT GTGG-3')。以 WT 和转基因烟草盛花期(阶段 IV)的花 cDNA 为模板,采用宝生 SYBR Green Master Mix 试剂盒的反应体系和反应程序,在 BioRad IQ5 real-time PCR 仪上完成 qRT-PCR。反应程序为:95 °C 预变性 15 s,58 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 15 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达,每个样品重复 3 次。

2 结果和分析

2.1 *NtAN9* 基因 RNA 干扰载体 pRNAi-NtAN9 的构建

如图 1 所示,干扰载体 pRNAi-35S 具有 2 个 MCS 区。在 MCS2 里含有 1 个 *ccdB* 致死基因,因此目标基因正义片段连入 MCS1 时,需要在特殊的大肠杆菌菌株 TOP10F' 中进行克隆。而当在 MCS2 中插入反义片段时,需要转化普通大肠杆菌菌株,这样未插入片段的背景质粒在 *ccdB* 基因作用下就会致死;最终保留的是插入反义片段,即具有发夹 RNA 结构的正确干扰载体。当 315 bp 的正义 *NtAN9* 片段插入 MCS1 后,随机挑选 12 个在 TOP10F' 中重组的单菌落,用 P1/P2 引物 PCR 检测,获得 5 个片段大小正确的阳性克隆(图 2a);直接纯化 P1/P2 扩增的产物,酶切连入 MCS2 中,转化普通大肠杆菌 DH10B 后,用通用引物 P3/P4 筛选 12 个随机挑选的重组单菌落,结果表明有 10 个阳性克隆(图 2b),与正义片段的连接相比反义片段的连接具有更高的阳性率。提取阳性克隆的质粒,用 BamH I 和 Mlu I 双酶切检测重组质粒,显示能切除预期大小约 800 bp 左右的包含内含子的 RNA 发夹结构(图 2c),说明 pRNAi-NtAN9 载体构建正确。

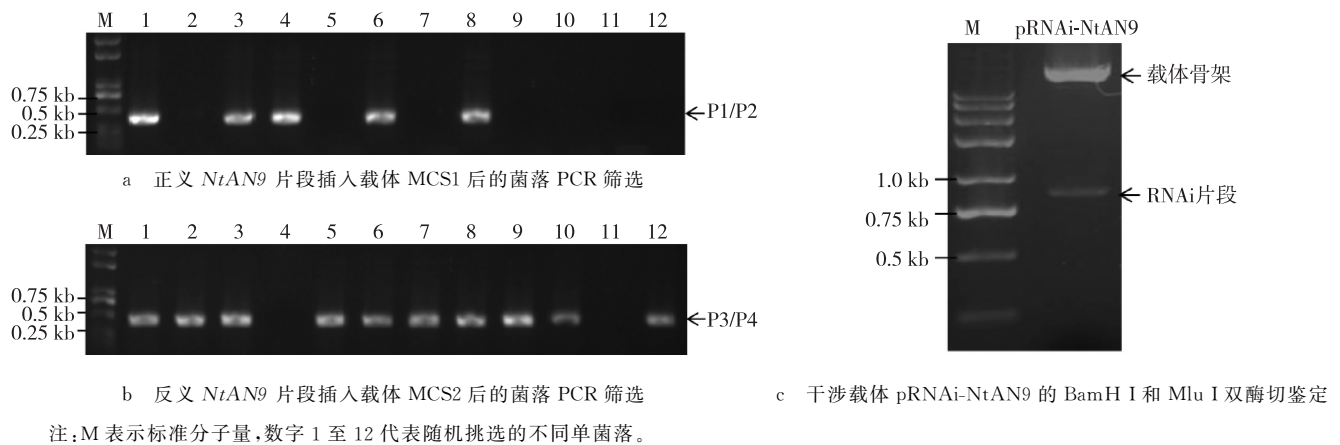


图 2 干扰载体 pRNAi-NtAN9 的菌落 PCR 筛选与鉴定

Fig. 2 Colony PCR and identification of restriction enzyme for pRNAi-NtAN9

2.2 转基因烟草的 PCR 检测

把含有 pRNAi-NtAN9 质粒的农杆菌 EHA105,按农杆菌介导的叶盘法转化烟草 K326 的无菌苗叶盘,在 HPT 抗性筛选下,最终获得抗性转化苗。提取抗性苗幼叶 gDNA,用 HPT 引物和 P1/P2 通用引物分别进行 PCR 检测,均能分别扩出与对照质粒 pRNAi-NtAN9 一致的预期大小的目标条带(图 3a,b),表明 pRNAi-NtAN9 已转入烟草中。

2.3 转基因烟草的花色改变

把烟草 WT 和 RNAi-NtAN9 转基因苗移栽后,在开花期进行比较与观察,发现 WT 的烟草花朵在阶段 III 时就开始积累花青素苷,到盛花期(阶段 VI)时花青素苷大量积累,花瓣呈粉红色;而对应的转基因干扰烟草不同株系,花瓣在阶段 III 时均无颜色变化,而到盛花期(阶段 VI)时花瓣几乎为白色(图 4a,b 中 #1 株系),或呈很淡的粉色(图 4a,b 中 #

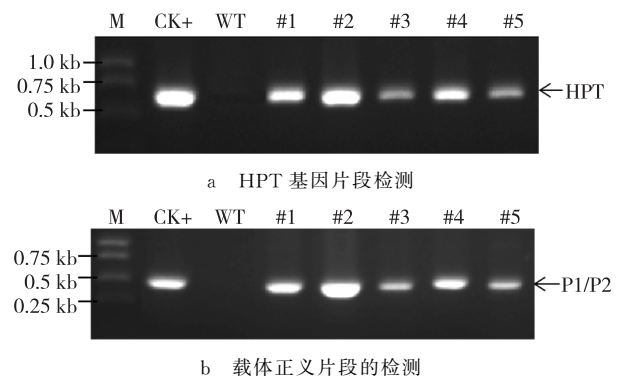


图 3 转基因烟草基因组 PCR 检测

Fig. 3 Detection of transgenic tobacco by PCR

2 株系)。

进一步提取 WT 和转基因烟草盛花期花朵的花青素苷, 对比分析表明, 相对于 WT 而言, RNAi-*NtAN9* 的转基因烟草花青素苷的含量大幅下降, 最低的含量 (#1 株系) 只有 WT 对照的 3% (图 4c), 转基因烟草均表现出花青素苷积累受阻, 花色变淡或变白。对应花朵的 qRT-PCR 分析也表明, 转基因烟草的内源 *NtAN9* 基因的转录水平均受到不同程度的抑制, 表达量急剧下降 (图 4d), 内源 *NtAN9* 基因的表达越低, 对应的花青素苷含量越低, 花色越淡。上述结果表明, *NtAN9* 基因参与了烟草花青素苷的转运与积累。

3 讨论

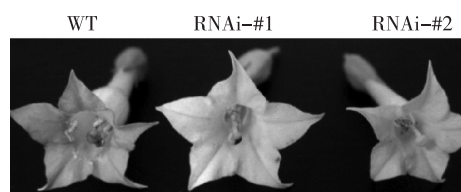
尽管花青素苷的生物合成与修饰主要在细胞质内的多酶复合体上完成, 但从该物质的合成到最终呈色还需要被相关的转运蛋白运输与积累到细胞的中央大液泡中^[3]。在与花青素苷转运相关的蛋白中, GST 蛋白本身可能直接和花青素苷结合, 充当花青素苷的运输载体, 对于花色或植物其他器官色泽的显现具有十分重要的作用^[2]。

烟草 *NtAN9* 基因是矮牵牛花青素苷转运相关蛋白基因 *PhAN9* 的直系同源基因。Alfenito 等人^[5]利用转座子标签的方法, 从矮牵牛白花突变体中克隆了该基因, 并用基因枪的方法把 *PhAN9* 基因导入白花突变体花瓣中, 实现了花青素苷的积累, 证明 *PhAN9* 基因与花瓣中花青素苷的积累紧密相关。RNAi 方法为寻求 GST 与花青素苷转运积累相关证据提供了便捷和直接的途径。为了进一步确定该基因功能是否与花青素积累直接相关, 本研究采用 RNAi 方法直接对烟草内源的 *NtAN9* 基因进行 RNA 干涉。结果表明, 转基因干涉烟草内源 *NtAN9* 基因表达量急剧下降, 导致相应花青素苷的积累受阻, 花色变浅变白。这一表型与大多数花青素转运相关 GST 基因突变的表型相似, 均表现为花青素苷不能积累, 花色和叶色变白^[2,4-11], 说明 *NtAN9* 基因编码的 GST 蛋白参与了花青素苷的积累过程。

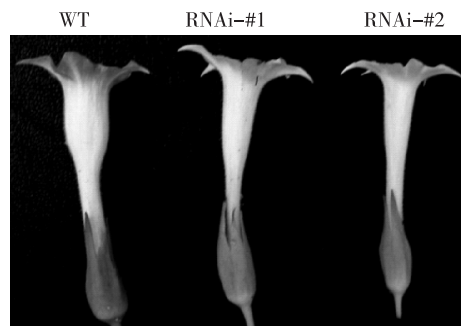
由于 RNAi 是转录水平上的调控, 故对目标基因的表达并不能达到完全抑制, 从而不同株系间的表型并不完全一致。如 #1 株系的内源 *NtAN9* 基因抑制较彻底, 花色表现为几乎白色, 而 #2 株系的内源 *NtAN9* 基因抑制较弱, 花色表现为很淡的粉红色。相比较于 RNAi, CRISPR/Cas9 基因组编辑技术具有更大的优势, 能够直接进行基因组上的编辑工作, 获得对应基因的完全突变体, 更有利于基因功能的研究。下一步工作中, 笔者将利用本实验室开发的高效、多靶点植物 CRISPR/Cas9 载体系统^[14], 进行烟草 *NtAN9* 基因的敲除, 更加深入全面的研究这一基因的功能。

参考文献:

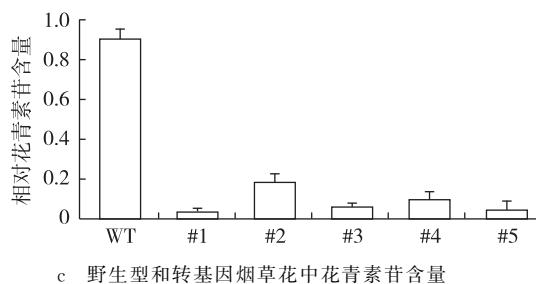
- [1] 戴思兰, 洪艳. 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种[J]. 中国农业科学, 2016, 49(3): 529-542.
Dai S L, Hong Y. Molecular breeding for flower colors modification on ornamental plants based on the mechanism



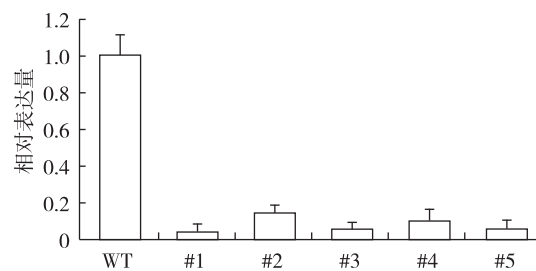
a *NtAN9* 基因 RNA 干涉的白花表型(顶部)



b *NtAN9* 基因 RNA 干涉的白花表型(侧面)



c 野生型和转基因烟草花中花青素苷含量



d 野生型和转基因烟草花中 *NtAN9* 基因的表达水平

图 4 *NtAN9* 基因的 RNAi 导致烟草花色变白

Fig. 4 RNA interference of *NtAN9* alters flower color from pink to white in transgenic tobacco

of anthocyanins biosynthesis and coloration [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(3): 529-542.

[2] Zhao J. Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom [J]. Trends Plant Science, 2015, 20 (9): 576-585.

[3] Moons A. *Osgstu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathi-

- one S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots [J]. *FEBS Letters*, 2003, 553(3): 427-432.
- [4] Marrs K A, Alfenito M R, Lloyd A M, et al. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2* [J]. *Nature*, 1995, 375 (6530): 397-400.
- [5] Alfenito M R, Souer E, Goodman C D, et al. Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases [J]. *Plant Cell*, 1998, 10 (7): 1135-1149.
- [6] Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A. *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2004, 37(1): 104-114.
- [7] Yamazaki M, Shibata M, Nishiyama Y, et al. Differential gene expression profiles of red and green forms of *Perilla frutescens* leading to comprehensive identification of anthocyanin biosynthetic genes [J]. *FEBS J*, 2008, 275 (13): 3494-3502.
- [8] Conn S, Curtin C, Bézier A, et al. Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(13): 3621-3634.
- [9] Kitamura S, Akita Y, Ishizaka H, et al. Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in cyclamen [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(6): 636-642.
- [10] Sasaki N, Nishizaki Y, Uchida Y, et al. Identification of the glutathione S-transferase gene responsible for flower color intensity in carnations [J]. *Plant Biotechnology*, 2012, 29 (3): 223-227.
- [11] Hu B, Zhao J, Lai B, et al. *LcGST4* is an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in *Litchi chinensis* Sonn [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(4): 831-843.
- [12] 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.
- Hu X X, Liu Y G. The construction of RNAi vectors and the use for gene silencing in rice [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4(5): 621-626.
- [13] Zhu Q, Sui S, Lei X, et al. Ectopic expression of the coleus R2R3 MYB-type proanthocyanidin regulator gene *SsMYB3* alters the flower color in transgenic tobacco [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139392.
- [14] Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1274-1284.

RNAi of *NtAN9* Changing Flower Color of Transgenic Tobacco

CUI Chaojun, MA Kun, LI Jiamin, CHEN Junyu, ZHANG Runzhao, ZHU Qinlong

(College of Life Sciences, South China Agricultural University, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Biotechnology, Education Department of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The function of plant glutathione s-transferase (GST) is related to anthocyanin transport and accumulation. To identify the function of a tobacco GST gene, *NtAN9*, the intron-containing RNAi vector of *NtAN9* gene was constructed, and then was transferred into tobacco by agrobacterium-mediated transformation of leaf discs. The analytic results for anthocyanin content and qRT-PCR of *NtAN9* gene in transgenic tobacco flower at developmental stage IV showed that the transcription level of *NtAN9* was decreased heavily and the accumulation of anthocyanin was blocked by RNAi of *NtAN9*, which led to color-changing flower from pink to white. Overall, the function of *NtAN9* gene was directly related to flower coloration, and these results have laid a foundation for the further study on anthocyanin transport and accumulation.

Key words: common tobacco; *NtAN9* gene; anthocyanin transport; RNAi; flower color

(责任编辑 方 兴)