

何姗姗,赵婷婷,姜景彬,等. 番茄抗叶霉病相关基因片段克隆及 VIGS 重组载体的构建与鉴定[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):29-32.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.007

番茄抗叶霉病相关基因片段克隆 及 VIGS 重组载体的构建与鉴定

何姗姗, 赵婷婷, 姜景彬, 李景富, 许向阳

(东北农业大学园艺学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:以含有 *Cf-19* 基因的番茄抗叶霉病品种 CGN18423 为材料,运用 RT-PCR 技术克隆番茄抗叶霉病相关基因细胞色素 *P450 90A1-like* (*CYP 90A1-like*) 部分序列,片段长 295 bp;以番茄八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS) 基因作为阳性对照,片段长 349 bp。测序结果表明,序列与番茄同源性达 100%;实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 结果显示,在番茄感染叶霉病后,随时间延长 *CYP 90A1-like* 基因相对表达量呈上调趋势,说明该基因在番茄抗叶霉病过程中有重要作用;以烟草脆裂病毒 (TRV2) 为载体,成功构建 *CYP 90A1-like*、*PDS* 基因的病毒诱导基因沉默 (virus induced gene silencing, VIGS) 重组载体。构建的 pTRV2-*CYP 90A1-like*、pTRV2-*PDS* 重组载体将为进一步利用 VIGS 技术在番茄上研究 *CYP 90A1-like* 基因与番茄抗叶霉病的关系奠定试验基础。

关键词:番茄;细胞色素 *P450 90A1-like* 基因;八氢番茄红素脱氢酶 (PDS);病毒诱导的基因沉默 (VIGS)

中图分类号: S641.203 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0029-03

病毒诱导的基因沉默 (virus induced gene silencing, VIGS) 是指携带目标基因片段的重组载体在通过各种方法侵染植株后,可诱导植物内源基因下调表达或者不表达的现象。目前该技术广泛用于番茄^[1]、烟草^[2-3]、小麦^[4-5]、水稻^[6],在大麦^[7]、马铃薯^[8]等作物上的应用也有报道。研究表明,利用 VIGS 技术已经使得一些基因在番茄中被成功沉默,如 *NPR1*、*TGA1a*、*NbCA1*、*NTF6*、*MEK1*、*MEK2* 等多个抗病相关基因^[9-10]。VIGS 具有技术简单、研究周期短、侵染效率高、不需要遗传转化等优势,这种反向遗传学新技术已成为一种低成本、高通量地鉴定植物中各种基因功能的新技术,在植物功能基因组研究中发挥着重要作用^[11]。

1995 年, Kumagai 等利用人工构建的植物内源基因片段在本氏烟中首次将 *PDS* 基因进行沉默^[12]。八氢番茄红素脱氢酶 (PDS) 是影响类胡萝卜素合成的限速酶之一,常将该基因作为评价 VIGS 是否成功的参照基因^[4]。在番茄、柑橘等花或果实以类胡萝卜素为主要色素的植物中,随着类胡萝卜素含量增加, *PDS* 基因表达量呈上调趋势^[13]。若该基因被成功沉默,植株将会表现幼嫩叶片漂白的症状,表型变化易于观察辨别。

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 广泛存在于动物、植物、细菌、真菌等细胞内^[14],在植物体内参与植物激素等化合物的生物合成、代谢解毒以及抗病等重要生理活动。

Frear 等于 1969 年首先在棉花中发现细胞色素 P450^[15],随后在小麦^[16]、水稻和拟南芥^[17]等作物中也陆续分离出细胞色素 P450。细胞色素 P450 的研究主要集中于其在生物体内发挥的功能,它不仅参与植物体内的基础代谢,更重要的是参与植物的次生代谢,在代谢过程中可以产生很多重要的、可以抵抗病虫害以及环境胁迫的次生代谢产物^[17]。

本研究分别构建 *CYP 90A1-like*、*PDS* 基因的 VIGS 载体并对载体进行鉴定,以证明其可靠性,为下一步分析基因沉默后的植株感病情况提供试验材料,以便进一步探讨该基因与番茄抗叶霉病之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

以番茄含有 *Cf-19* 基因的抗病品种 CGN18423 为试验材料,叶霉菌生理小种为 1.2.3.4. (笔者所在实验室提供)。番茄试验材料在东北农业大学园艺实验站温室内常规种植。在苗期,生长至四叶一心时取新鲜叶片用于基因片段克隆。分别采集感染叶霉菌 0、3、5、7、9、15、20 d 后的阳性植株与对照组植株叶片,用于实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)。以上材料采集后均立即用液氮冷冻,并在 -80℃ 保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄叶片总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成 按照笔者所在实验室改良的 Trizol 法进行总 RNA 提取,用超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量。利用 cDNA 第 1 链合成试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 进行反转录。

1.2.2 *CYP 90A1-like*、*PDS* 基因片段的克隆、测序 根据 GenBank 中公布的番茄 *CYP 90A1-like* 基因片段序列 (登录号: JZ1717738), 设计特异引物,引物序列见表 1。20 μL *CYP 90A1-like* 基因片段的 PCR 扩增体系为: 各 2 μL cDNA 和上、

收稿日期: 2015-06-06

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金 (编号: CARS-25-A-15); 国家自然科学基金 (编号: 31272171); 黑龙江省杰出青年科学基金 (编号: JC201204)。

作者简介: 何姗姗 (1990—), 女, 内蒙古呼伦贝尔人, 硕士研究生, 主要从事番茄分子生物育种方面的研究。E-mail: 13091715936@163.com。

通信作者: 许向阳, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事番茄育种研究。E-mail: xxy709@126.com。

下游引物,10 μL 6 × *Taq* MasterMix,4 μL ddH₂O。扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 40 s,58 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

电泳检测并进行胶回收后,基因片段分别与 pMD18 - T 载体连接,转化大肠杆菌。阳性菌落提取质粒后进行酶切验证、测序。

表 1 番茄 *CYP 90A1 - like*、*PDS* 基因片段的扩增引物

引物名称	引物序列(5' → 3')	
	上游	下游
<i>CYP 90A1 - like</i>	CGGAATTCGTGATAGACACGGGGTGTCTC	CGGGATCCACTGCGTACCAATTCAAGCGA
<i>PDS</i>	CGGAATTCGGCACTCAACTTTATAAAACC	CGGGATCCTTCAGTTCCTCTGTCAAACC

1.2.3 实时荧光定量 (qRT - PCR) 检测 *CYP 90A1 - like* 基因与抗叶霉病的相关性 分别采集幼嫩叶片,提取感染叶霉菌 0、3、5、7、9、15、20 d 的阳性植株与对照组植株的 RNA,以番茄肌动蛋白基因 *Actin* 为内参基因,每个样品重复 3 次,进行实时荧光定量 PCR,检测感病后 *CYP 90A1 - like* 基因的相对表达量。

1.2.4 载体的构建及鉴定 *CYP 90A1 - like* 基因采用限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切,连接到同样用 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切的 pTRV2 载体中,将双酶切之后的产物进行胶回收处理,转化大肠杆菌。

将菌液提取质粒 PCR 进行双酶切鉴定,筛选阳性克隆提取质粒进行测序验证,阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序,获得正确序列的载体质粒即为重组载体 pTRV2 - *CYP 90A1 - like*、pTRV2 - *PDS*。

2 结果与分析

2.1 番茄叶片总 RNA 提取质量分析

按照笔者所在实验室改良的 Trizol 法提取番茄叶片总 RNA,用超微量分光光度计检测结果显示,*D*_{260 nm}/*D*_{280 nm} 范围为 1.94 ~ 1.98。图 1 琼脂糖凝胶电泳结果显示,28S、18S 2 条带明亮、无拖带,且 28 S 条带亮度是 18 S 条带的 2 倍,表明 RNA 质量良好,可以用于后续反转录试验。

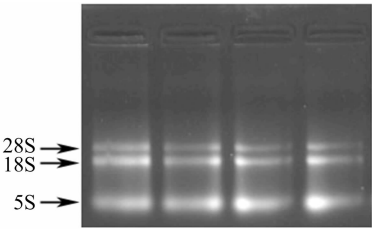
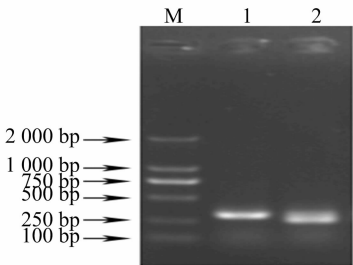


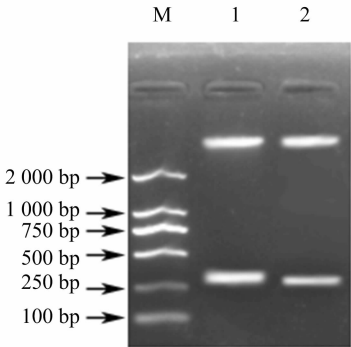
图 1 番茄叶片总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 番茄 *CYP 90A1 - like*、*PDS* 基因片段的克隆及测序结果 对基因片段 PCR 扩增结果进行电泳检测,图 2 琼脂糖凝胶电泳结果显示,条带清晰,与预期大小一致。通过双酶切,与载体连接、测序,图 3、表 2 序列分析结果显示:成功克隆出 *CYP 90A1 - like*、*PDS* 基因片段,可用于构建病毒载体。



M—DNA 标准分子量; 1、2—*PDS*、*CYP 90A1 - like* 基因片段 PCR 扩增产物

图 2 *PDS* 和 *CYP 90A1 - like* 基因片段的 PCR 扩增电泳结果



M—DNA 标准分子量; 1—pMD18-*PDS* *Eco*RI/*Bam*HI 限制性酶切结果; 2—pMD18-*CYP 90A1 - like* *Eco*RI/*Bam*HI 限制性酶切结果

图 3 pMD18-*PDS*、pMD18-*CYP 90A1 - like* 质粒双酶切验证

表 2 *PDS* 基因和 *CYP 90A1 - like* 基因片段测序结果

<i>PDS</i> 基因片段(5' → 3')	
GGCACTCAACTTTATAAAACCCTGACGAACTTTCAATGCAGTGCATTTTGATCGCATTGAACAGGTTTCTTCAGGAGAAACATGGTTCAAAAATGGCCTTTTATAGATGGTAATCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTTGAACACATTTGATGGAAGTGTCAAGAGCTTTTATACTGAGTGACGGTAGTGCAATC GAGGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCGCTCCAGTGGATATTTTCAAGCTTCTATTGCCTGAAGACTGGAAGAGATTCCATATTTCCAAAAAGTTGGAGAA GTTAGTCGGAGTACCTGTGATAAATGTACATATATGGTTTGACAGAAAACTGAAG	
细胞色素 <i>P450 90A1 - like</i> 基因片段(5' → 3')	
GTATGACTCATCGTGCTCTTCTTAGTAGTGATAGACACGGGGTGTCTCCGTGAGGAATTTTACAGCAAGGGTCATGATGGTGGAGGTAGTTTCTTAG CCAGCAACAAGCAACGCCAGTATAAAATCAACAATTTTCCTCATCGGAAAATCCTACTCCTTCAACTCCGTCTCCTTCGAACAATGCCTCCAAACATATC ATTCTTTTCGTTCTCCTCCGACTCGTTCTTTTCTCCGATCTCTCACTACCAATCCCAACGCCCTCCGTACTTTCGTTCTCGCTTGAAATTGGTACGCGATC	

2.3 *CYP 90A1 - like* 基因实时荧光定量 (qRT - PCR) 分析 提取感染叶霉菌 0、3、5、7、9、15、20 d 后阳性植株与对照

组植株的叶片 RNA,反转录成第 1 链 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 检测。结果表明:阳性植株的 *CYP 90A1 - like* 基因的

表达量相对于对照组有明显上升,且随感病时间的延长表达量呈上升趋势(图 4)。说明该基因与番茄抗叶霉病相关,并在抵抗叶霉病过程中有重要作用。

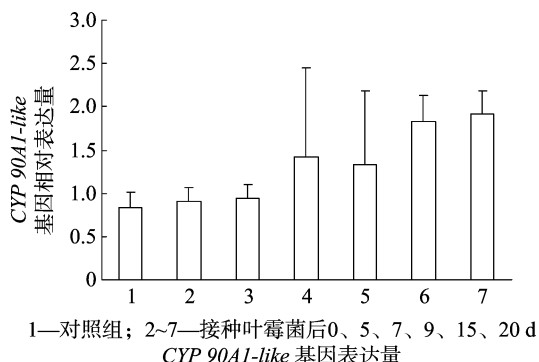


图 4 接种叶霉菌后 0、5、7、9、15、20 d *CYP 90A1-like* 基因表达量

2.4 基因的 VIGS 重组载体构建与鉴定结果

将基因片段连接大肠杆菌感受态,涂板过夜,提取质粒,与病毒载体用限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 进行双酶切, *T*₄ DNA 连接酶连接;然后将重组病毒载体质粒转化大肠杆菌,经菌液 PCR 以及双酶切鉴定与预期结果一致,为阳性克隆,详见图 5、图 6。

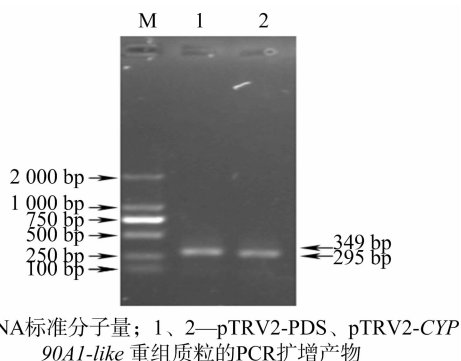


图 5 pTRV2-PDS、pTRV2-*CYP 90A1-like* 重组质粒的 PCR 扩增产物

图 5 pTRV2-PDS、pTRV2-*CYP 90A1-like* 重组质粒的 PCR 鉴定结果

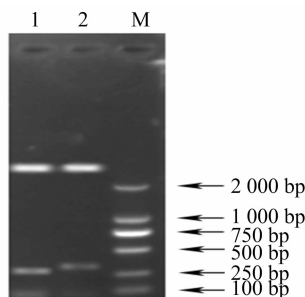


图 6 pTRV2-*CYP 90A1-like*、pTRV2-PDS 重组质粒的双酶切鉴定结果

图 6 pTRV2-*CYP 90A1-like*、pTRV2-PDS 重组质粒的双酶切鉴定结果

3 讨论与结论

番茄叶霉病在番茄中普遍存在,可迅速传播,对番茄果实产量及品质都会产生不利影响。因此,研究番茄抗叶霉病相关基因对于抗病品种改良等方面具有重要的经济价值和社会

效益。通过对抗病相关基因的研究也可以为抗病品种选育提供新的思路和途径,也可为其他园艺作物的研究提供借鉴。

番茄 *CYP 90A-like* 基因是参与抗叶霉病过程的关键基因,在抗叶霉病过程中起到关键作用,验证该基因的功能也具有十分重要的意义。传统研究植物基因功能的方法存在研究周期长、转化效率低等缺点^[11],而 VIGS 技术能够突破这些问题,使其成为研究植物基因功能优质、高效的新手段。烟草脆裂病毒 (TRV) 是 VIGS 中常用的病毒载体,利用 TRV 载体进行基因沉默时,可通过种子将沉默的表型遗传给后代,而且其沉默的表型可以维持 2 年^[18]。

本研究通过对番茄 *CYP 90A1-like*、*PDS* 基因片段的克隆及序列分析,进行酶切鉴定,构建了 pTRV2-*CYP 90A1-like*、pTRV2-*PDS* 重组病毒载体。期望下一步在番茄上通过 VIGS 技术实现 *CYP 90A1-like* 基因沉默,研究该基因对番茄抗叶霉病的作用,从而进一步丰富和扩大 VIGS 技术在番茄中的应用范围,旨在为后续研究番茄抗叶霉病基因和相关基因的功能提供试验材料,为将来从分子层面调控番茄抗叶霉病提供科学依据。

参考文献:

- [1] 芦亮亮,傅达奇,刘海萍,等. 番茄中维生素 E 合成相关基因的 VIGS 载体构建及侵染[J]. 北方园艺,2011(16):139-142.
- [2] Lu R, Malcuit I, Moffett P, et al. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance[J]. The EMBO Journal,2003,22(21):5690-5699.
- [3] Vaistij F E, Jones L. Compromised virus-induced gene silencing in RDR6-deficient plants[J]. Plant Physiology,2009,149(3):1399-1407.
- [4] Bennypaul H S, Mutti J S, Rustgi S, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS) of genes expressed in root, leaf, and meiotic tissues of wheat[J]. Functional & Integrative Genomics,2012,12(1):143-156.
- [5] Cheng Y, Cui L, Lijie Y, et al. A high throughput barley stripe mosaic virus vector for virus induced gene silencing in monocots and dicots[J]. PLoS One,2011,6(10):e26468.
- [6] Purkayastha A, Mathur S, Verma V, et al. Virus-induced gene silencing in rice using a vector derived from a DNA virus[J]. Planta,2010,232(6):1531-1540.
- [7] Lacomme C, Hrubikova K, Hein I. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology,2003,34(4):543-553.
- [8] 崔艳红,贾芝琪,李颖,等. 利用 VIGS 技术研究马铃薯抗晚疫病基因 R3a 和 RB 的信号传导[J]. 园艺学报,2009,36(7):997-1004.
- [9] Liu Y, Michael S, Dinesh-Kumar S P. Virus-induced gene silencing in tomato[J]. Plant Journal,2002,31(6):777-786.
- [10] Wang C, Wang C X, Zheng Z. Optimisation of tobacco rattle virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*[J]. Functional Plant Biology,2006,33(4):347-355.
- [11] Gould B, Kramer E M. Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae)[J]. Plant Methods,2007,3(1):6-12.

蒋金龙, 范里, 谭文松. 基于脂类代谢的 DHFR-CHO 细胞培养过程开发与优化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 32-35.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.008

基于脂类代谢的 DHFR-CHO 细胞培养过程开发与优化

蒋金龙, 范里, 谭文松

(华东理工大学生物反应器国家重点实验室, 上海 200237)

摘要:通过对抗体高产(HP)、低产(LP)2个细胞培养过程进行研究发现,2个过程中脂类代谢差异明显。结果表明,HP中脂类干质量远大于LP过程,且其增速也较快,HP中最大脂类干质量达到 $(83.70 \pm 0.04) \times 10^{-9}$ mg/cell,是LP的2.35倍;进一步通过细胞磷脂尼罗红荧光染色检测细胞磷脂含量发现,HP、LP细胞培养过程中细胞磷脂差异显著;随后对3种重要磷脂——磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)的合成前体A(氯化胆碱)、B(乙醇胺)、C(丝氨酸)、D(胞苷)4种因子通过2水平全析因试验设计进行分析,发现组分A对细胞生长、抗体表达影响极显著($P < 0.01$);最后通过正交试验对培养基中组分A进行浓度优化,以找出基础培养基和流加培养基中组分A的最适浓度。结果发现,基础培养基中组分A最优浓度为95.38 mg/L,流加培养基中最优浓度为189 mg/L;最终活细胞密度对时间累积积分(IVCC)达到 79.16×10^9 cells · d/L,提高了74.29%;抗体产量为2.04 g/L,增加了1.83倍;抗体比生成速率为34.07 mg/(10^9 cells · d),提高了18.71%。基于脂类代谢分析,建立了高效经济的细胞培养过程,并为培养基的优化提供了依据,可为后续大规模单克隆抗体工业化生产奠定基础。

关键词:脂类;细胞生长;DHFR-CHO;单克隆抗体;中国仓鼠卵巢细胞

中图分类号: S188;Q952.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0032-04

随着单克隆抗体药物市场的迅速发展,以及对单克隆药物要求越来越高,对于利用动物细胞培养技术生产单克隆抗体药物来说既是机遇又是挑战。如何在保证细胞高密度培养的同时生产出高产量、高质量的单克隆抗体,将成为细胞培养技术的重点研究课题。作为细胞培养的关键技术环节,培养过程和培养基的开发、优化尤为关键^[1-2]。脂类作为细胞膜、线粒体膜等构成的生物膜系统的主要组成部分,对于保证细

胞及亚细胞结构的完整性和生物活性有着极其重要的作用,细胞正常运转和存活的先决条件就是这些亚细胞结构具有独立的空[3]。抗体的合成、分泌需要线粒体提供合成原材料和能量,内质网提供合成场所和相关酶,分泌则与高尔基体有关[4]。Sakai等在研究脂对产hIFN- γ 的CHO细胞在无血清培养基中产量的影响时发现,加入磷脂酸(磷脂合成前体)使重组蛋白hIFN- γ 产量提高了2.4倍^[5-7]。

为此笔者通过检测抗体产量差异显著的高产(HP)、低产(LP)细胞培养过程中细胞脂类、细胞磷脂含量,进一步通过对几种关键磷脂前体[A(氯化胆碱)、B(乙醇胺)、C(丝氨酸)、D(胞苷)]的2水平因子设计析因试验,发现磷脂合成前体组分A对细胞生长、抗体表达有显著影响。最后分别在基础培养基、流加培养基中设计4个添加浓度梯度进行正交试验,考察了基础培养基、流加培养中组分A浓度对细胞生长、

收稿日期:2015-06-09

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:21406066)。

作者简介:蒋金龙(1990—),男,江西樟树人,硕士,研究方向为动物细胞培养和组织工程。E-mail:j593571310@126.com。

通信作者:谭文松,博士,教授,研究方向为动物细胞与组织工程。Tel:(021)64250948;E-mail:wstan@ecust.edu.cn。

- [12] Kumagai M H, Donson J, Della-Cioppa G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(5): 1679-1683.
- [13] Sun Z, Cunningham Jr F X, Gantt E. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95(19): 11482-11488.
- [14] 戴素明, 周程爱, 谢丙炎, 等. 细胞色素 P450 表达在植物防御反应中的作用[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2004(增刊1): 184-187.
- [15] Frear D S, Swanson H R, Tanaka F S. N-demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas: isolation and characterization

- of a microsomal mixed function oxidase from cotton[J]. Phytochemistry, 1969, 8(11): 2157-2169.
- [16] Murphy P J, West C A. The role of mixed function oxidases in kaurene metabolism in *Echinocystis macrocarpa* Greene endosperm[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1969, 133(2): 395-407.
- [17] Nelson D R, Schuler M A, Paquette S M, et al. Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot[J]. Plant Physiology, 2004, 135(2): 756-772.
- [18] Senthil-Kumar M, Mysore K S. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato[J]. Plant Biotechnol J, 2011, 9(7): 797-806.