

弓雪,姜敏,齐欣,等. 玉米 *ZmSUT4* 基因 RNAi 植物表达载体的构建[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):42-44.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.011

# 玉米 *ZmSUT4* 基因 RNAi 植物表达载体的构建

弓雪,姜敏,齐欣,李明,马骏,刘欣芳,王延波

(辽宁省农业科学院玉米研究所,辽宁沈阳 100161)

**摘要:**蔗糖转运蛋白(sucrose transporters, SUCs 或 SUTs)是蔗糖装载、卸载、分配的重要载体,*ZmSUT4* 是玉米低亲和、高转运能力 SUT4 亚族的唯一成员。以黄早四 *ZmSUT4* 全长 cDNA 序列为模板,设计带有限制性内切酶位点的特异性引物,PCR 扩增获得正向、反向 2 个片段,将反向、正向片段双酶切后依次插入 pGreen-HY104 植物表达载体中,从而构建由 35S 启动子调控的 *ZmSUT4* 基因 RNA 干扰(RNAi)的植物表达载体 HY104-A-S,然后通过冻融法将载体质粒转入含有 pSoup 质粒的农杆菌 EHA105 中。*ZmSUT4* 基因 RNAi 的植物表达载体的构建为研究 *ZmSUT4* 基因的功能奠定了基础。

**关键词:**玉米;*ZmSUT4* 基因;RNAi 植物表达;载体构建

**中图分类号:**S513.03;Q782 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)07-0042-03

玉米的籽粒产量主要取决于籽粒形成过程中成熟叶片(源)光合产物的生产、韧皮部的运输(流)以及在籽粒(库)中的积累。光合产物的分配运输是植物体内源、流、库相互协调的结果,源足、库大、流畅是高产的基础<sup>[1-2]</sup>。目前对源、库的特性研究较多,但是由于受研究方法和条件等限制,如对 DNA 序列了解的限制,对流的了解还相当不足。研究发现,随着种植密度增加,收获指数快速下降,表明在较高密度条件下,流对产量的限制作用在增加<sup>[3]</sup>。流包括韧皮部的装载、筛管中运输、韧皮部卸出和同化物的重新吸收。蔗糖作为高等植物光合同化物运输的主要形式,也是联系源库之间主要的糖类<sup>[4]</sup>。细胞膜上的蔗糖转运蛋白(sucrose transporters, SUCs 或 SUTs)承担着蔗糖从源细胞的外运、韧皮部的装载和卸载,以及向库细胞的装入功能,从而影响蔗糖的运输方向、速率和分配,其基因表达受多种环境因子的调控。*ZmSUT4* 是玉米体内唯一的高蔗糖转运能力 SUT4 亚族成员,在植物体内的蔗糖运输和分配过程中发挥着不可替代的重要作用。但是,关于玉米 SUT4 的研究才刚刚起步,李志鹏仅利用逆转录 PCR(RT-PCR)技术检测 *ZmSUT4* 在玉米籽粒灌浆期花柄、籽粒等库器官的表达情况,未构建 RNA 干扰载体,分析 *ZmSUT4* 表达被抑制对植株生长发育及相关基因表达的影响<sup>[5]</sup>。本研究利用 *ZmSUT4* 基因的全长 cDNA 序列,构建 *ZmSUT4* 基因 RNA 干扰载体,为进一步研究 *ZmSUT4* 基因的生理效应及作用机制奠定基础,也为研究其他 SUTs 基因的功能提供参考。

收稿日期:2016-01-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31401392);辽宁省博士启动基金(编号:201501112);国家转基因重大专项(2014ZX08003-004、2014ZX08003-003)。

作者简介:弓雪(1983—),女,辽宁建平人,博士,助理研究员,主要从事玉米分子育种及新品种选育工作。Tel:(024)31029981;E-mail:gx2114@163.com。

通信作者:王延波,博士,研究员,主要从事玉米遗传育种研究。Tel:(024)31028888;E-mail:lnwangyanbo@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

所用玉米材料为玉米优良自交系黄早四。

KAPA HiFi 高保真 DNA 聚合酶,购自美国 KAPA Biosystems 公司;T<sub>4</sub>-DNA 连接酶、限制性内切酶,购自 NEB 公司;植物总 RNA 提取试剂盒、Quantscript RT Kit(cDNA 第 1 链合成试剂盒)、质粒小提试剂盒以及琼脂糖凝胶回收试剂盒,购自北京 TIANGEN 公司;pEASY-T、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,购自北京金全生物技术有限公司;DNA marker DL2000,购自 TaKaRa 公司。引物合成和测序由上海立菲生物技术有限公司完成。*Taq* 酶、卡那霉素(Kan)、利福平(Rif)等试剂,购自生工生物工程(上海)股份有限公司。植物表达载体 pGreen-HY104 质粒及含有 pSoup 质粒的农杆菌 EHA105,均由国家玉米改良中心徐明良实验室提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 玉米 *ZmSUT4* 基因 cDNA 序列的获得** 利用植物总 RNA 提取试剂盒提取黄早四幼苗总 RNA,利用反转录试剂盒获得黄早四全长 cDNA 序列。

**1.2.2 干扰片段的选择及引物设计** 根据 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上已发表的玉米 *ZmSUT4* 基因的全长 cDNA 序列,选择该序列上的特异片段及表达载体 pGreen-HY104 的限制性内切酶酶切位点,并设计引物。分别在 5'端加上 *Pst* I - *Eco* R I、*Bam* H I - *Xho* I 酶切位点,引物序列为:F:5'-GCTGCAGAATTCGCTCTGGAACCTCTTTGTGGGT-3';R:5'-CGGATCCTCGAGCTCTGTAACCTTTATTTCATTGCT-3'。预期扩增片段长度为 219 bp。

**1.2.3 干扰片段的扩增** 以全长 cDNA 序列为模板进行 PCR 扩增。反应条件为:热启动;94℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,无非特异性条带,则直接进行后续试验。

**1.2.4 RNA 干扰(RNAi)植物表达载体的构建** 将 PCR 产

物连接到 T 载体,获得 T - ZmSUT4,将 T - ZmSUT4 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,于 37  $^{\circ}\text{C}$  暗培养 12 ~ 16 h,进行蓝白斑筛选;挑取白色单菌落,进行 PCR 检测,将含有目标克隆的单菌落于 37  $^{\circ}\text{C}$  摇菌过夜,送公司测序。提取包含正确序列 T 载体的质粒,用 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切表达载体 pGreen - HY104、T - ZmSUT4 质粒,回收酶切产物;用  $T_4$  - DNA 连接酶过夜连接,将干扰片段反向插入表达载体中,得到 HY104 - A,用其转化大肠杆菌,Kan 抗性筛选目标克隆,提取质粒验证;用 *Bam*H I、*Pst* I 酶切载体 HY104 - A、T - ZmSUT4,回收酶切产物,过夜连接得到 HY104 - A - S(图 1),转化大肠杆菌,Kan 抗性筛选目标克隆,提取质粒,用 *Eco*R I 进行验证。

#### 1.2.5 RNAi 植物表达载体转化农杆菌 EHA105 采用冻融

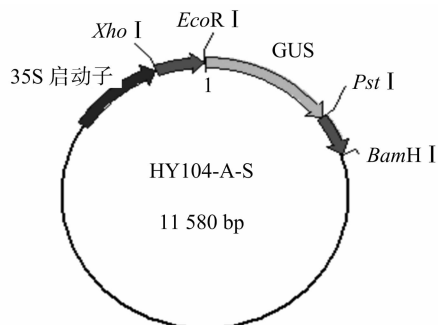


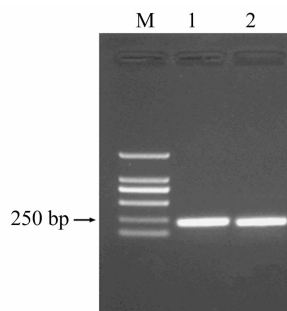
图1 RNAi 植物表达载体结构示意图

法<sup>[6]</sup>将构建好的 RNAi 植物表达载体 HY104-A-S 转化含有 pSoup 质粒的农杆菌 EHA105 感受态细胞,涂于含有 Rif (50  $\mu\text{g/mL}$ )、Kan (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 的 LB 固体培养基上,28  $^{\circ}\text{C}$  暗培养 2 d。挑取阳性菌落,进行菌落 PCR 鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 干扰片段的 PCR 扩增

以玉米 *ZmSUT4* 基因的 cDNA 序列为模板,利用携带酶切位点的特异引物进行 PCR 扩增,电泳检测扩增产物。由图 2 可知,本试验得到 219 bp 的片段。将该片段与 T 载体连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,菌落经 PCR 鉴定后,将阳性克隆送公司测序,测序结果与黄早四 cDNA 序列完全一致(图 3)。



M—分子量标记 2 000 bp; 1~2—PCR产物  
图2 *ZmSUT4* 基因干扰片段的 PCR 扩增结果

Sequence ID: lc||Query\_44413 Length: 1836 Number of Matches: 1

Range 1: 1565 to 1783 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
405 bits(219)	3e-117	219/219(100%)	0/219(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTCTGGAAACTCTTTGTGGGTTGGAGAAAGACACGCTGGGAGCTCTTGAATGCTGTGTGC	60		
Sbjct 1585	GTCTGGAAACTCTTTGTGGGTTGGAGAAAGACACGCTGGGAGCTCTTGAATGCTGTGTGC	1624		
Query 61	TCITTGGTGGTTTGCCCGTTGAGCTATTTTTGCGTTGTCTCCAAATCTTTTGTGTTC	120		
Sbjct 1625	TCITTGGTGGTTTGCCCGTTGAGCTATTTTTGCGTTGTCTCCAAATCTTTTGTGTTC	1684		
Query 121	AATTCAACTCGAatgatgtacgccacgtatgcattgatgtatttgtatgtatgtGGATCA	180		
Sbjct 1685	AATTCAACTCGAATGTATGTACGCCACGTATGCATGTATGTATTGTATGTATGTGGATCA	1744		
Query 181	TTTGTAGAGAGCTTAAGCAATGAATAAAAGTTACAGGAG	219		
Sbjct 1745	TTTGTAGAGAGCTTAAGCAATGAATAAAAGTTACAGGAG	1783		

Query—干扰片段; Sbjct—黄早四全长 cDNA 序列; 序列两侧数字表示碱基位置

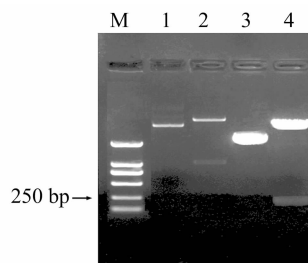
图3 *ZmSUT4* 干扰片段与已知 *ZmSUT4* cDNA 相应序列比对结果

## 2.2 RNAi 表达载体的构建

提取 T - ZmSUT4、pGreen - HY104 载体的质粒,用 *Xho* I、*Eco*R I 对 2 种质粒进行双酶切,结果见图 4,胶回收连接后转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,Kan 抗性筛选目标克隆,对菌落进行 PCR 鉴定。提取正确克隆的质粒 HY104 - A,利用 *Bam*H I、*Pst* I 酶切载体 HY104 - A、T - ZmSUT4,结果见图 5。回收酶切产物,连接后得到 HY104 - A - S,转化大肠杆菌,Kan 抗性筛选目标克隆,提取质粒验证,利用 *Eco*R I 酶切该质粒,预测应得到约 1 000 bp 的小片段。图 6 电泳结果与预期一致,表明植物表达载体 HY104 - A - S 构建正确。

### 2.3 表达载体转化根瘤农杆菌

分别以阳性对照质粒 HY104 - A - S 和含有表达载体的农杆菌菌落为模板,利用特异性引物进行 PCR 扩增。经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定表明:含有表达载体的农杆菌菌液所得条带正确(图 7),表明 HY104 - A - S 载体质粒已转入含 pSoup 质粒农杆菌 EHA105 中。

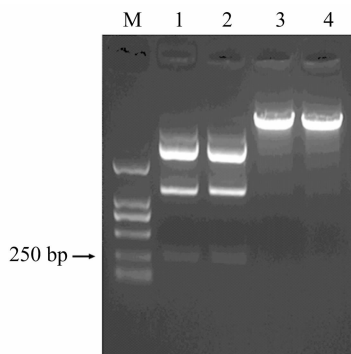


M—分子量标记 2 000 bp marker; 1—pGreen-HY104质粒;  
2—pGreen-HY104质粒酶切产物; 3—T-ZmSUT4质粒;  
4—T-ZmSUT4质粒酶切产物

图4 *Xho* I、*Eco*RI 双酶切 pGreen-HY104、T-ZmSUT4  
载体质粒电泳结果

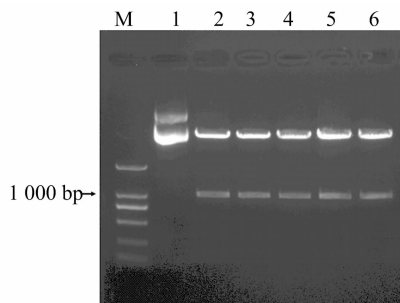
### 3 讨论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指内源或外源的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)高效特异性降解与



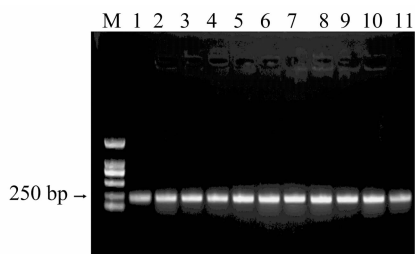
M—分子量标记 2 000 bp; 1~2—T-ZmSUT4 质粒酶切产物;  
3~4—HY104-A 质粒酶切产物

图5 *Bam*HI、*Pst*II 双酶切 T-ZmSUT4、HY104-A 载体质粒电泳结果



M—分子量标记 2 000 bp; 1—HY104-A-S 质粒;  
2~5—HY104-A-S 质粒酶切产物

图6 *Eco*RI 酶切 HY104-A-S 载体质粒电泳结果



M—分子量标记 2 000 bp marker; 1—HY104-A-S 质粒为模板;  
2~11—含有表达载体的农杆菌菌落为模板

图7 农杆菌中 HY104-A-S 表达载体菌落 PCR 鉴定结果

其高度同源的 mRNA,有效地阻断目的基因的表达,从而获得功能缺失的突变体,因此该技术可作为研究基因组功能、创造分子育种新材料的有效手段。目前,RNA 干扰技术已在玉米、水稻、大麦、小麦、大豆和马铃薯等作物中成功应用<sup>[7-13]</sup>。Wesley 等研究发现,双链 RNA 的长度影响目的基因的沉默效率,干扰片段长度在 98 ~ 853 bp 之间时基因沉默效率较高<sup>[14-15]</sup>。此外,在插入的正向与反向干扰片段之间应有适当长度的间隔序列,以便 RNAi 表达载体在转入玉米后形成含有发夹结构的 dsRNA,进而干扰 *ZmSUT4* 基因的表达。

Chincinska 等利用 RNA 干扰技术研究发现,与野生型植株相比,马铃薯 StSUT4-RNAi 植株源叶中蔗糖输出增加,促使蔗糖、淀粉在块茎等库器官大量积累,进而引起块茎产量增加<sup>[16-17]</sup>。本研究成功构建了玉米 *ZmSUT4* 基因的 RNAi 植物表达载体,不但为探究 *ZmSUT4* 基因表达在源库互作中的

功能奠定了基础,还为进一步研究蔗糖运输、分配的调节机制提供理论依据,也为利用转基因技术调节蔗糖的运输、分配,从而提高玉米籽粒产量提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 王文静. 不同穗型冬小麦籽粒灌浆期源库强度及其与淀粉积累的关系[J]. 作物学报,2004,30(9):916-921.
- [2] 王玲玲,杜吉到,郑殿峰,等. 大豆源库流关系的研究进展[J]. 大豆科学,2009,28(1):167-171.
- [3] 关义新,凌碧莹,林葆,等. 高产春玉米群体库及源库流的综合调控[J]. 沈阳农业大学学报,2000,31(6):537-540.
- [4] Saint Pierre C, Peterson C J, Ross A S, et al. Winter wheat genotypes under different levels of nitrogen and water stress; changes in grain protein 40 composition[J]. Journal of Cereal Science,2008,47(3):407-416.
- [5] 李志鹏. 玉米蔗糖转运载体(*ZmSUT2* 和 *ZmSUT4*) 的基因克隆及其功能鉴定[D]. 北京:北京师范大学,2006:45-50.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 19-22.
- [7] Cigan A M, Unger - Wallace E, Haug - Collet K. Transcriptional gene silencing as a tool for uncovering gene function in maize[J]. The Plant Journal,2005,43(6):929-940.
- [8] Miki D, Itoh R, Shimamoto K. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice[J]. Plant Physiology,2005,138(4):1903-1913.
- [9] Gil - Humanes J, Pistón F, Hernando A, et al. Silencing of  $\gamma$  - gliadins by RNA interference (RNAi) in bread wheat[J]. Journal of Cereal Science,2008,48:565-568.
- [10] Kasai M, Kanazawa A. RNA silencing as a tool to uncover gene function and engineer novel traits in soybean[J]. Breeding Science, 2012,61(5):468-479.
- [11] 周晓雯,付三雄,陈瑶松,等. 甘蓝型油菜 *CRABSCLAW* 基因克隆及其 RNA 干扰载体的构建[J]. 江苏农业学报,2015,31(4):737-742.
- [12] 杨玛丽,赵统敏,余文贵,等. 转基因 RNAi 技术在番茄研究中的应用[J]. 江苏农业学报,2015,31(1):217-221.
- [13] 杨玛丽,张保龙,郭佳茹,等. RNAi 和 GroEL 介导的双价转基因番茄对 TYLCV 的抗性[J]. 江苏农业学报,2014,30(5):1102-1108.
- [14] Wesley S V, Liu Q, Wielopolska A, et al. Custom knock - outs with hairpin RNA - mediated gene silencing[J]. Methods in Molecular Biology,2003,236:273-286.
- [15] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high - throughput gene silencing in plants[J]. The Plant Journal,2001,27(6):581-590.
- [16] Chincinska I A, Liesche J, Krügel U, et al. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response[J]. Plant Physiology,2008,146(2):515-528.
- [17] Chincinska I, Gier K, Krügel U, et al. Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian - regulated genes and ethylene production[J]. Frontiers in Plant Science, 2013,4(2):26.