

利用 TRV 过表达和沉默系统验证
植物油脂合成相关基因的功能

江悦, 谢桂兰, 陈放, 徐莺

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 为探究烟草脆裂病毒过表达和沉默系统进行油脂相关基因研究的可能性, 该研究克隆了拟南芥的 *WRI1* 和 *FAD2* 基因, 分别构建了 TRV 过表达和沉默载体. 利用瞬时侵染技术侵染本氏烟草, 取材料进行 RT-PCR 和脂肪酸含量检测. 结果显示在过表达 *WRI1* 基因的本氏烟草中, 侵染叶和非侵染叶的 *WRI1* 基因及其相关参与脂肪酸合成基因 *ACP1*、*KAS1* 和 *BCCP2* 等都有明显上调, 且脂肪酸含量检测结果显示分别增加 16% 和 28%. 在沉默 *FAD2* 基因的本氏烟草植株中, 发现多不饱和脂肪酸含量分别减少约 25% 和 24%. 因此, 利用 TRV 系统对油脂相关基因进行研究是可能的.

关键词: TRV; 本氏烟; *WRI1*; 脂肪酸; *FAD2*

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.066003

Plant lipid synthesis-related genes function verification
by TRV overexpression and silencing systems

JIANG Yue, XIE Gui-Lan, CHEN Fang, XU Ying

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to explore the possibility of tobacco rattle virus overexpression and silencing system for oil-related gene research, this study cloned *Arabidopsis thaliana* *WRI1* and *FAD2* genes, and constructed TRV overexpression and silencing vectors, respectively. The transient infection technique was used to infect *Nicotiana benthamiana*, and the material was collected for RT-PCR and fatty acid content detection. The results showed that the *WRI1* gene and related fatty acid synthesis genes *ACP1*, *KAS1*, and *BCCP2* in both infected and non-infected leaves were significantly up-regulated in *Nicotiana benthamiana* overexpressing the *WRI1* gene, and the fatty acid content test results showed that the levels of fatty acids increased 16% and 28%, respectively. In *Nicotiana benthamiana* plants that silenced the *FAD2* gene, the content of polyunsaturated fatty acids was found to be reduced by approximately 25% and 24%, respectively. Therefore, it is possible to use TRV system to study lipid related genes.

Keywords: TRV; *Nicotiana benthamiana*; *WRI1*; Fatty acid; *FAD2*

收稿日期: 2021-03-12
基金项目: 农业部转基因重大专项(2016ZX08010001-010)
作者简介: 江悦(1994—), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向为植物生理、基因功能与表达. E-mail: 931885167@qq.com
通讯作者: 徐莺. E-mail: xuying@scu.edu.cn

1 引 言

烟草脆裂病毒(Tobacco Rattle Virus, TRV)是一种双正链 RNA 病毒,其基因组由 RNA1 和 RNA2 两部分组成. RNA1 的大小和基因序列比较保守,主要包括依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)和移动蛋白(Movement Protein, MP),其可以使病毒粒子在宿主植物内复制和移动. RNA2 一般包含病毒衣壳蛋白(Coat Protein, CP)和一些非结构性基因, RNA2 基因组可以被修饰以携带外源基因,因此目的基因通常被克隆到 RNA2 上^[1]. 烟草脆裂病毒不仅能够侵染烟草,还能够侵染番茄果实、辣椒叶、矮牵牛花、耧斗菜、唐松草花、玫瑰花、草莓果实、加州罂粟、麻疯树、紫茉莉^[2]和菠菜^[3].

在植物油脂基因工程中,常用传统的转基因技术,即将特定外源基因稳定的在受体生物中表达^[4],但实验过程繁琐,周期较长,而利用烟草农杆菌介导的瞬时系统仅在被侵染叶片表达目的基因^[5]. TRV 作为一种植物病毒载体,具有复制快,感染强,对植株伤害小等优点,不仅能在侵染叶片

表达目的基因,在未侵染叶片也能检测出目的基因的表达^[6].

研究发现 *WRI1* 是提高总油脂含量的关键基因^[7],而 *FAD2* 基因是单不饱和脂肪酸生成多不饱和脂肪酸的关键^[8]. 而多不饱和酸不利于储存,沉默 *FAD2* 基因可以减少多不饱和脂肪酸的含量^[9]. 本研究通过构建 TRV-*WRI1* 过表达载体和 TRV-*FAD2* 沉默载体,对侵染 7 天和 14 天的本氏烟草株系 *WRI1* 下游基因进行定量分析,并测定植株叶片的脂肪酸含量和种类,探讨利用 TRV 过表达系统进行油脂相关基因功能研究的可行性.

2 材料与方 法

2.1 材 料

2.1.1 植物材料 本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)种子为本实验室保存.

2.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌(*E. coli*)和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101 菌株于-80℃冰箱保存. 烟草脆裂病毒过表达及沉默载体菌株于-80℃冰箱保存.

2.1.3 PCR 引物 见表 1.

表 1 本文中所用 PCR 引物
Tab.1 PCR primers used in this article

引物名称	引物序列(5'-3')
TRV- <i>WRI1</i> -F	GCTCTAGAATGAAGAAGCGCTTAACCAC
TRV- <i>WRI1</i> -R	CATGCCATGGAAAAAATCAGACCAAATAGTTACAAG
<i>NbACP1</i>	CTGGCTCTTACTGACGATAAGG
<i>NbBCCP2</i>	CCTCCACTCAAATGTCCCATG
<i>NbPI-Pkb1</i>	TGAGCCATTATCGTCCTTGTTG
<i>NbSUS2</i>	TGGATGGGCAATTTCAGATGG
<i>NbKAS1</i>	GCAACCAAGTCTATGATAGGGC
TRV- <i>FAD2</i> -F	AAGGTTACCGAATTCTCTAGAATGCTCCTCTACTATGCCGCGACCA
TRV- <i>FAD2</i> -R	TGTCTTCGGGACATGCCCGGGTCACTGAAGGCGCTACGGTCTGT

2.2 方 法

2.2.1 *WRI1* 和 *FAD2* 基因序列克隆和载体构建

以拟南芥 RNA 经反转录的 cDNA 为模板,利用高保真酶 Primer STAR Max(TaKaRa, Japan)进行 *WRI1* 和 *FAD2* 基因的扩增,引物序列如表 1 所示. 利用 TaKaRa 公司的限制性核酸内切酶对 TRV 载体的 TRV2 质粒和 PCR 产物进行双酶切. 酶切反应结束后用核酸纯化回收试剂盒回收酶切产物,然后进行连接. 测序后转入农杆菌 GV3101.

2.2.2 农杆菌重悬液制备 将转入 TRV-*WRI1* 和 TRV-*FAD2* 的农杆菌接种到含有 Kana、Rif 抗性的培养基中,28℃,200 r/min 活化 24 h;取 1 mL 活化菌液加入 YEB 培养基,28℃,200 r/min,12 h,直至 OD₆₀₀≈0.8~1.0;5 000 r/min,常温离心富集农杆菌菌体;用重悬液(1 mol/L MgCl₂,1 mol/L MES,200 mmol/L AS)重悬菌体至 OD₆₀₀0.8~1.0,将 TRV2 菌液与 TRV1 菌液按照 1:1 体积混匀,室温避光静置 2~4 h.

2.2.3 侵染本氏烟草 选择 4~6 叶期的本氏烟

草,将农杆菌重悬液注射扩散到膨大叶的远轴侧。每株植物注射 2~3 片叶,将侵染后暗室培养 24 h 后,置于 25 ℃,16 h/8 h 光周期温室培养。

2.2.4 qRT-PCR 分析 利用天根生物 RNAPrep Pure Plant Kit 试剂盒提取本氏烟草总 RNA,PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa, Japan)试剂盒合成单链 cDNA. 使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂对 *WRI1* 下游基因进行 qRT-PCR 扩增,所用引物见表 1。

2.2.5 油脂成分测定 称取 0.1 g 侵染后的本氏烟草叶片或侵染后的系统叶叶片放入玻璃管中,加入 1 mL 新鲜配制的 5%硫酸甲醇溶液(v/v). 加入 300 μL 甲苯作为促溶剂,再加入 10 μL 2%的 BHT 溶液和 10 μg 十七烷酸甘油三酯溶液作为内参;各试剂加入结束后迅速震荡混匀,90~95 ℃水浴反应 1.5~2 h;取出玻璃管冷却至室温,加入 1.5 mL 新鲜配制的 0.9% NaCl 溶液,混匀. 再向玻璃管中加入 1 mL 正己烷萃取脂肪酸甲酯,震荡混匀,静置 5 min,取上清液于 2 mL 棕色玻璃瓶中;用气相色谱与质谱联用仪 GC-MS 2010 对提取的脂肪酸甲酯含量进行测量,分离柱为 HP-88. GC 条件为:火焰离子化检测器和加样器温度为 220 ℃. 炉温升温程序为:160 ℃,保持 1 min;然后每分钟升高 10 ℃,升到 200 ℃,保持 1 min;然后每分钟升温 5 ℃,升到 210 ℃,保持 1 min. 脂肪酸甲酯含量通过与内参的峰面积对比进行计算。

3 结果与分析

3.1 TRV-WRI1 过表达载体及 TRV-FAD2 沉默载体构建

用表 1 中设计的引物进行扩增,凝胶电泳检测

出 *WRI1* 大小约 1 300 bp,*FAD2* 大小约为 500 bp (图 1),片段大小与预期结果相符。

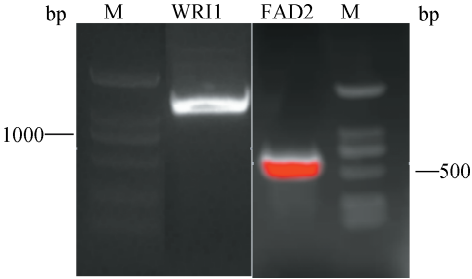


图 1 *WRI1* 和 *FAD2* 基因 PCR 产物电泳图
M: DL 2000 marker
Fig. 1 PCR product electrophoresis of *WRI1* and *FAD2* genes
M: DL 2000 marker

3.2 TRV-WRI1 过表达植株中下游基因表达量分析

用 TRV-*WRI1* 过表达载体的农杆菌侵染本氏烟草植株后,分别在侵染后第 6 d 和第 13 d 提取系统叶叶片的总 RNA,以烟草 *βactin* 为内参,利用 qRT-PCR 技术检测 *WRI1* 转录因子相关基因的表达量. 本研究对 *ACP1*,*KAS1*,*BCCP2*,*Pkb1* 和 *SUS2* 基因进行定量分析,实验结果表明,无论是在侵染叶还是系统叶中,过表达株系的这 5 个相关基因的表达量均显著高于对照组;第 6 天的侵染叶中 *ACP1* 基因增加量最为明显,与对照组相比增加来约 3 倍;侵染第 13 d 的系统叶中,*ACP1* 基因和 *SUS2* 基因表达量增加最明显,增加了约 1 倍和 1.5 倍. 总体而言,侵染叶中 *WRI1* 相关基因的相对增加幅度略高于系统叶中相关基因的相对增加幅度(图 2). TRV-*WRI1* 过表达后,在转录水平初步启动了植物中与脂肪酸合成相关基因的表达。

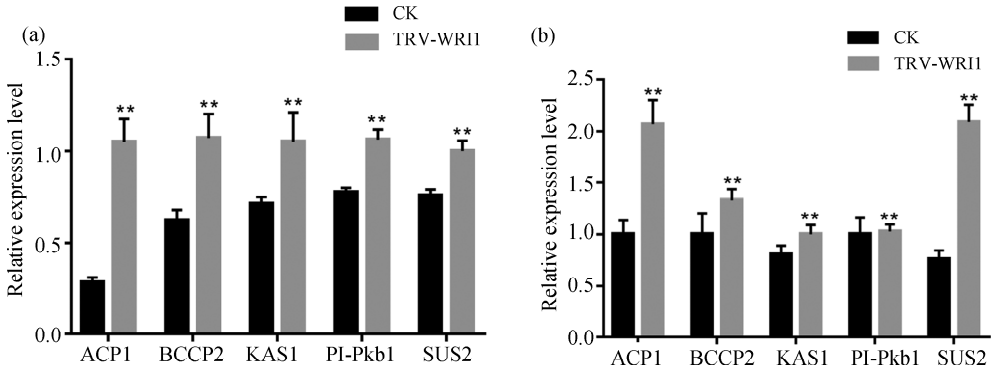


图 2 TRV-*WRI1* 过表达植株叶片中 *WRI1* 下游基因表达分析
(a) 侵染后第 6 d 侵染叶叶片中 *WRI1* 下游基因的表达水平;(b) 侵染后第 13 d 系统叶叶片中 *WRI1* 下游基因的表达水平
Fig. 2 Analysis of downstream gene expression of *WRI1* in leaves of TRV-*WRI1* overexpressed plants
(a) The downstream gene expression level of *WRI1* in infiltrated leaves at 6 pi; (b) the downstream gene expression level of *WRI1* in systemic leaves at 13 pi

3.3 TRV-WRI1 过表达植株中油脂含量和成分的测定

为进一步探究 *WRI1* 基因对植物油脂含量积累的影响,本研究将 TRV-*WRI1* 和 TRV 空载 (CK) 侵染本氏烟草, 分别在第 7 d 和第 14 d 取侵染叶叶片、系统叶叶片, 测定油脂的成分和含量. 结果显示, 在侵染后第 7 d, 实验组中的软脂酸含量和大部分硬脂酸含量显著增加. 以每克植物叶片中的油脂含量来分析, 实验组中的总油脂含量比对照组约增加 16%. 侵染 14 d 后与对照组相比, 实验组中的部分硬脂酸含量显著增加, 总油脂含量比对照组约增加 28%(图 3).

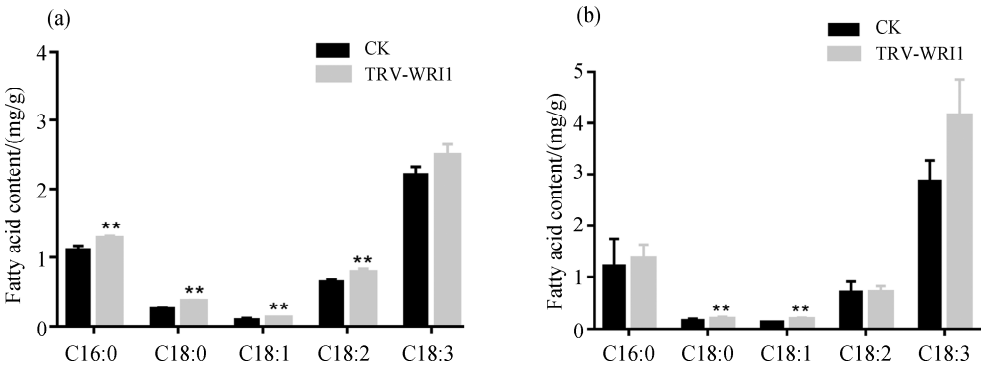


图 3 TRV-*WRI1* 过表达植株叶片中脂肪酸分析
(a) 侵染后第 7 d 侵染叶叶片中脂肪酸的表达; (b) 侵染后第 14 d 系统叶叶片中脂肪酸的表达
Fig. 3 analysis of fatty acids in leaves of TRV-*WRI1* overexpressed plants
(a) The expression of fatty acids in infiltrated leaves at 7pi; (b) the expression of fatty acids in systemic leaves at 14pi

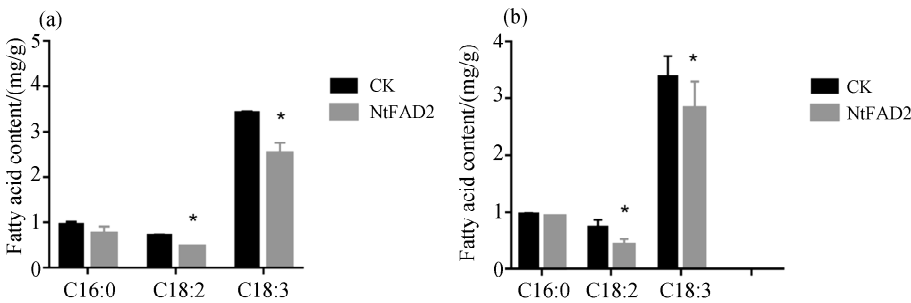


图 4 TRV-*FDA2* 沉默植株叶片中脂肪酸分析
(a) 侵染后第 7 d 侵染叶叶片中脂肪酸的表达; (b) 侵染后第 14 d 系统叶叶片中脂肪酸的表达
Fig. 4 Analysis of fatty acids in leaves of TRV-*FDA2* silencing plants
(a) The expression of fatty acids in infiltrated leaves at 7 pi; (b) the expression of fatty acids in systemic leaves at 14 pi

4 讨论

植物中油脂的积累受多因素的调控过程^[10], 比如脂肪酸的合成受乙酰-CoA 羧化酶、脂肪酸合酶复合体等多个酶基因的调节, *WRI1* 基因主要参与调控植物

种子油脂合成^[11-12]. 利用 TRV 过表达系统, 在本氏烟中过表达 *WRI1* 基因, 随着侵染后时间

3.4 TRV-FDA2 沉默植株中油脂含量的成分和测定

为进一步探究 *FAD2* 基因对植物油脂含量积累的影响,本研究将 TRV-*FDA2* 和 TRV 空载 (CK) 侵染本氏烟草, 分别在第 7 d 和第 14 d 取侵染叶叶片、系统叶叶片, 测定油脂的成分和含量. 结果显示, 在侵染后第 7 d 和第 14 d, 实验组中的多不饱和脂肪酸含量显著减少. 以每克植物叶片中的油脂含量来分析, 实验组中的多不饱和脂肪酸含量比对照组减少约 25%. 在侵染后第 14 d, 与对照组相比, 实验组中的多不饱和脂肪酸含量显著减少, 相比对照组减少约 24%(图 4).

的延长, 外源基因短期内在本氏烟中大量表达, 在侵染后的第 6 d 和第 13 d 对 *WRI1* 的下游靶基因进行定量分析, 实验结果表明, *WRI1* 的过表达启动了其下游靶基因的表达, 过表达植株中下游靶基因的含量显著高于对照组. 从 qRT-PCR 结果可知, 系统叶中 *WRI1* 下游基因的总增加水平没有侵染叶中的高, 特别是与对照组相比, 系统叶中的 *BCCP1*、*KAS1* 和 *Pt-Pkβ1* 基因的上升相对值

没有侵染叶中的高。

对其脂肪酸含量进行测定,总的侵染叶片脂肪酸含量第 7 d 的增加 16%,第 14 d 系统叶增加 28%。与对照组相比,侵染叶中的软脂酸、硬脂酸和大部分不饱和硬脂酸均呈显著性增加,而系统叶中的软脂酸和部分不饱和硬脂酸的含量仅呈上升趋势,并没有出现显著性的差异。Yang 等^[13]在二穗短柄草中过表达 *BdWRI1* 诱导了糖酵解和脂肪酸生物合成相关基因的转录,使 8 w 龄叶片中的油脂含量增加了 32.5 倍,促进了叶片中脂肪酸的合成和标记的积累,然而,*BdWRI1* 的过表达也导致了游离脂肪酸含量的增加,具有细胞毒性作用,导致细胞死亡。同时,利用 TRV 病毒载体沉默 *FDA2* 基因,脂肪酸测量结果显示,在第 7 d 和第 14 d,与对照组相比,多不饱和脂肪酸分别下降了 25%和 24%,且饱和脂肪酸含量差异不显著,本实验成功利用病毒载体沉默 *FDA2* 基因。

病毒载体瞬时侵染植物表达目的基因相比于稳定表达系统在时间上大大缩短,本实验中,仅第 6 d 就检测到了目的基因的表达,本氏烟中脂肪酸含量得到增加。但是病毒载体的承载容量有限,不能包装大片段的外源 DNA 基因,复制稳定性差,外源基因无法在植物细胞中稳定遗传^[14-15];同时 TRV 病毒载体侵染的物种也有局限性,但是可以通过开发更多的病毒载体来解决这一问题。后续研究可以同时在烟草叶片上利用 TRV 病毒载体,过表达 *WRI1* 和沉默 *FAD2* 基因,达到提高油脂总量和减少不饱和脂肪酸比例目的。

参考文献:

- [1] 程维舜,徐秋芳,黎飞,等. 适于烟草脆裂病毒诱导的本氏烟基因沉默分析的对照载体构建[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2012, 38: 10.
- [2] Kim H, Onodera Y, Masuta C. Application of Cucumber mosaic virus to efficient induction and long-term maintenance of virus-induced gene silencing in spinach [J]. Plant Biotechnol (Tokyo), 2020, 37: 83.
- [3] Koike S T, Tian T, Liu H Y. First report of Tobacco rattle virus in Spinach in California [J]. Plant

Dis, 2010, 94: 125.

- [4] 夏晗,王兴军,李孟军,等. 利用基因工程改良植物脂肪酸和提高植物含油量的研究进展[J]. 生物工学报, 2010, 26: 735.
- [5] Ratcliff F, Martin-Hernandez A M, Baulcombe D C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing [J]. Plant J, 2001, 25: 237.
- [6] Fei W, Yang S, Hu J, et al. Research advances of WRINKLED1 (*WRI1*) in plants [J]. Funct Plant Biol, 2020, 47: 185.
- [7] Li Q, Shao J, Tang S, et al. Wrinkled1 accelerates flowering and regulates lipid homeostasis between oil accumulation and membrane lipid anabolism in *Brassica napus* [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 1015.
- [8] 曹国强. *FDA2* 基因 RNAi 及其对脂肪酸组成的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [9] Yuan M, Zhu J, Gong L. Mutagenesis of *FAD2* genes in peanut with CRISPR/Cas9 based gene editing [J]. BMC Biotechnol, 2019, 19: 24.
- [10] Baud S, Wuillème S, To A, et al. Role of WRINKLED1 in the transcriptional regulation of glycolytic and fatty acid biosynthetic genes in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2009, 60: 933.
- [11] Ivarson E, Leiva-Eriksson N, Ahlman A, et al. Effects of overexpression of *WRI1* and hemoglobin genes on the seed oil content of *Lepidium campestre* [J]. Front Plant Sci, 2017, 7: 2032.
- [12] Yang Y, Munz J, Cass C, et al. Ectopic expression of WRINKLED1 affects fatty acid homeostasis in *Brachypodium distachyon* vegetative tissues [J]. Plant Physiol, 2015, 169: 1836.
- [13] 高俊山. 植物转基因技术和方法概述[J]. 安徽农业科学, 2003(5): 802.
- [14] Ding X S, Mannas S W, Bishop B A, et al. An improved Brome mosaic virus silencing vector: greater insert stability and more extensive VIGS [J]. Plant Physiol, 2018, 176: 496.
- [15] Chen C C, Chen T C, Raja J A, et al. A effectiveness and stability of heterologous proteins expressed in plants by Turnip mosaic virus vector at five different insertion sites [J]. Virus Res, 2007, 130: 210.

引用本文格式:

中文: 江悦, 谢桂兰, 陈放, 等. 利用 TRV 过表达和沉默系统验证植物油脂合成相关基因的功能[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 066003.

英文: Jiang Y, Xie G L, Chen F, et al. Plant lipid synthesis-related genes function verification by TRV overexpression and silencing systems [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2021, 58: 066003.