

采用花器喷雾法并基于 Cre/lox 系统定点整合 拟南芥 *Rps2* 基因的技术体系研究

李定红, 张艳梅, 周广灿, 雷 照, 孙小芹^①, 杭悦宇^①

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

Technology system research on site-specific integration of *Rps2* gene in *Arabidopsis thaliana* based on Cre/lox system by floral spraying method LI Dinghong, ZHANG Yanmei, ZHOU Guangcan, LEI Zhao, SUN Xiaoqin^①, HANG Yueyu^① (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2017, 26(1): 104–106

Abstract: To improve site-specific integration technology system, site-specific integration of *Rps2* target gene in *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. was carried out based on Cre/lox system by floral spraying method. The results show that 1 495 site-specific integration candidate plants are obtained by this method with a site-specific integration efficiency of about 0.076%. After PCR and histochemical staining experiment verification, the positive plants of precise integration account for 86.04%, in which, 63.34% positive plants are single copy transformed plants. The results of quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and hypersensitive reaction (HR) show that the site-specific integrated *Rps2* gene can be transcribed and expressed normally. It is suggested that this system can greatly improve the stability and efficiency of site-specific integration genetic transformation system in plants.

关键词: Cre/lox 系统; *Rps2* 基因; 定点整合; 拟南芥; 花器喷雾法

Key words: Cre/lox system; *Rps2* gene; site-specific integration; *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; floral spraying method

中图分类号: Q785; Q949.748.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2017)01-0104-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2017.01.14

定点整合是一种指导目的基因以精确单拷贝进入基因组预定位点的转基因技术,用于解决常规转基因技术带来的系列问题^[1-2]。在拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]中,已通过根外植体法转化实施了基因的定点整合^[3],但这一过程存在杂菌污染、分化困难和生长周期长等问题,且定点整合效率极低^[3],无法进行推广应用。花器喷雾法是一种不依赖于组织或细胞培养而直接在活体植株中进行转基因的方法,在拟南芥中通过该法获得的随机整合效率达 1.33%~2.41%^[4],是拟南芥最高效的转基因方法。

Rps2 基因是拟南芥的单拷贝抗病基因^[5],介导对携有 *avrRpt2* 基因的细菌病原物的抗病性;拟南芥 *rps2-101C* 生态型是 Col-0 生态型经 EMS 辐射筛选的突变体植株^[5],对 *avrRpt2* 基因无抗性。作者以 *rps2-101C* 生态型为转基因背景材料,通过花器喷雾法实施 Cre/lox 系统介导的 *Rps2* 基因的定点整合,以期对拟南芥的定点整合技术体系进行改进,并为加快植物基因功能和定向育种的研究提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pSDM3110^[3] 由荷兰莱顿大学的 Hooykaas 博士提供,该质粒包含 1 个 *lox* 位点和由 35S CaMV 启动子调控的 *Cre* 编码区形成的嵌合结构。农杆菌株系 GV3101、拟南芥 *rps2-101C* 生态型以及 3 种交换载体 p1301-*lox-npt II*、p1301-*lox-npt II-Rps2* 和 p1301-*lox-npt II-rps2*^[6] 由美国芝加哥大学 Bergelson 博士提供;p1301-*lox-npt II* 载体含有在 2 个 *lox* 位点间插入无启动子的 *npt II* 基因编码区和终止子的结构,p1301-*lox-npt II-Rps2* 和 p1301-*lox-npt II-rps2* 载体则是在 p1301-*lox-npt II* 载体的 *npt II* 基因终止子后分别插入 *Rps2* 抗病基因和 *rps2* 感病基因的全长序列。

1.2 方法

1.2.1 转化和筛选 采用电穿孔法^[7]将质粒 pSDM3110 转

收稿日期: 2016-09-08

基金项目: 江苏省科技计划项目(省属公益类科研院所能力提升)(BM2015019); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2010476); 江苏省植物迁地保护重点实验室开放基金项目(迁 201202); 江苏省中国科学院植物研究所青年基金项目(SQ201404)

作者简介: 李定红(1991—),女,安徽滁州人,硕士研究生,主要从事植物分子遗传与进化方面的研究。

^①通信作者 E-mail: xiaoqinsun@cnbg.net; hangyueyu@cnbg.net

入农杆菌中;将拟南芥 *rps2-101C* 生态型在温室中栽培至开花,采用花器喷雾法^[4]进行转化;T0 代种子萌发后经 Basta (德国 AgroEvo 公司)喷洒进行筛选;保留 T1 代抗性植株并培养至开花,自交后代幼苗用 Basta 筛选,存活率约为 75% 的 T1 代植株即为单拷贝转化植株。pSDM3110 的 T-DNA 区域在基因组中的转入位置用 Vectorette II 试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司)通过锚定 PCR 确定,基于 T-DNA 基因组定位信息通过 3-引物 PCR^[8]鉴定转基因植株的杂合状态。

将筛选的转基因杂合体植株用花器喷雾法^[4]分别进行交换载体转化,以 p1301-*lox-npt II* 载体转化 *rps2-101C* 生态型为空白对照。获得的种子经卡那霉素筛选,自交 2 代后其子代表现 100% 卡那霉素抗性的植株即为转基因纯合体植株。

1.2.2 等位基因系的表型与遗传验证 针对交换载体和侧翼序列设计引物。由于定点整合后 *Bar* 和 *Cre* 间的 *npt II* 表达框被活化,因此,针对 2 个发生精确整合的 *lox* 位点两侧序列设计引物 A 和 B,分别扩增出 1.0 和 1.1 kb 的片段;若存在随机整合的转基因拷贝,引物 C 将扩增出 0.6 kb 的片段。

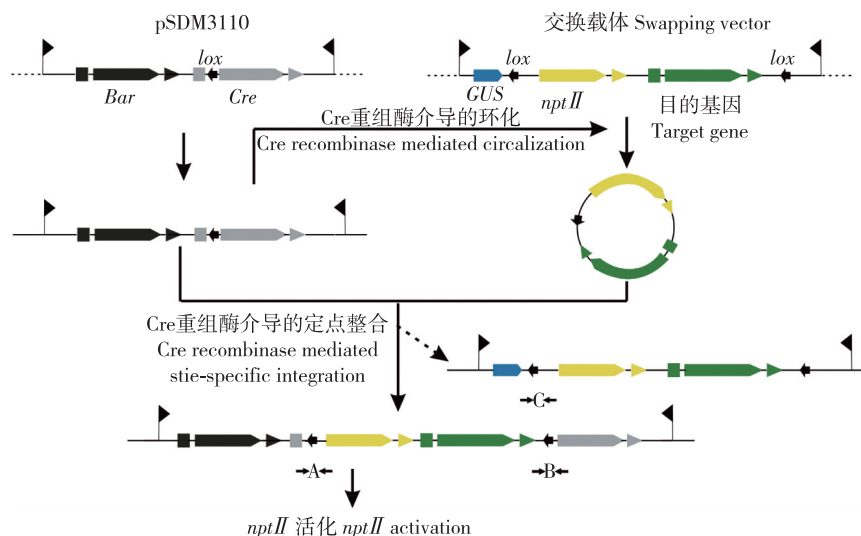
根据 Jefferson 等^[9]的方法,通过组织化学染色法测定 GUS(β -葡糖醛酸酶)在植株中的活性,从而检测转基因植株

中是否存在随机 T-DNA 整合。采用 EXPRESS Two-Step SYBR® GreenER™ 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)进行 qRT-PCR 检测;*Rps2* 引物结合于基因末端(位于 2 730 个碱基中的第 2119 位至第 2314 位),以 *EF1a* 为实验内参^[10]。采用丁香假单胞菌 DC3000;*avrRpt2* 接种拟南芥植株进行过敏反应测试;并根据植株感病症状参照文献[11]的标准进行过敏反应分级,抗病记为“2”、中度抗病记为“1”、感病记为“0”。

2 结果和分析

2.1 定点整合体系的构建

基于 Cre/lox 系统的拟南芥 *Rps2* 基因的定点整合基本流程见图 1。由图 1 可见,携带 *lox* 靶序列的拟南芥转基因植株被分别转入交换载体 (p1301-*lox-npt II*、p1301-*lox-npt II-Rps2* 和 p1301-*lox-npt II-rps2*) 中,在交换载体上位于 2 个 *lox* 位点间的序列在 Cre 重组酶作用下被环化,随之被定点整合到基因组中预先转入的 *lox* 表达框。定点整合阻断了 *Cre* 编码区转录使之终止表达,而交换载体中 *npt II* 基因受 35S 启动子调控恢复正常表达,用于定点整合植株的筛选。



→A←, →B←, →C←: 分别表示引物 A、B 和 C 的结合位点 Representing binding sites of primer A, B and C, respectively; ◀: 表示 *lox* 位点,箭头方向指示 *lox* 位点的方向 Representing *lox* site, the arrow's direction indicating the direction of *lox* site; ▶, ◀: 分别表示 T-DNA 的左、右边界 Representing left and right borders of T-DNA, respectively; □ ◻ ▷: 分别表示基因编码区及其启动子和终止子 Representing gene coding region and its promoter and terminator, respectively.

图 1 由 Cre/lox 介导的拟南芥 *Rps2* 基因的定点整合基本流程图

Fig. 1 Basic flow chart of site-specific integration of *Rps2* gene mediated by Cre/lox in *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

2.2 转基因杂合体植株的筛选

经 Basta 筛选,共获得 3 个转 *lox* 靶序列的单拷贝植株系;T-DNA 基因组定位显示这 3 个转基因株系的基因组转入位点不同,分别为第 III 号染色体的 4 289 059 位点、第 II 号染色体的 13 898 787 位点和第 V 号染色体的 18 136 204 位点,分别被

命名为 P、Y 和 G 株系。

2.3 定点整合植株的筛选及验证

经卡那霉素筛选,共获得 1 495 株定点整合候选植株,定点整合率约 0.076%。在空白对照中,载体 p1301-*lox-npt II* 转化 *rps2-101C* 生态型未获得卡那霉素抗性苗,说明确实是由交

换载体中的 *lox* 结构与预先转入基因组中的 *lox* 发生整合而产生了卡那霉素抗性苗。

PCR 实验结果表明:在 1 495 株定点整合候选植株中, 86.04% 的植株采用引物 A 和 B 分别扩增出 1.0 和 1.1 kb 的片段, 但用引物 C 无扩增产物, 表明这些植株是经精确的定点整合产生的。同时, 经组织化学染色, 约 63.34% 的候选植株未呈现蓝色, 表明没有发生额外的随机整合。

qRT-PCR 检测结果表明:与转化 p1301-*lox-npt II* 载体的株系相比, 转化 p1301-*lox-npt II-Rps2* 和 p1301-*lox-npt II-rps2* 载体的株系转录水平更高 ($P < 0.05$)。此外, 过敏反应实验(表 1)结果表明:转化 p1301-*lox-npt II-Rps2* 载体的株系过敏反应比其他 2 个株系更明显 ($P < 0.01$), 从而证实定点转入的 *Rps2* 基因可正常转录和表达。

表 1 拟南芥 *Rps2* 基因定点整合株系的过敏反应(HR)结果($\bar{X} \pm SE$)
Table 1 Result of hypersensitive reaction (HR) of site-specific integration lines of *Rps2* gene in *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. ($\bar{X} \pm SE$)

载体 Vector	各株系的 HR 分级		
	P 株系 P line	Y 株系 Y line	G 株系 G line
p1301- <i>lox-npt II</i>	0.67±0.07	0.37±0.05	0.25±0.02
p1301- <i>lox-npt II-Rps2</i>	1.91±0.09	1.87±0.05	2.01±0.05
p1301- <i>lox-npt II-rps2</i>	0.14±0.01	0.56±0.06	0.78±0.07

3 讨论和结论

虽然植物定点整合技术可解决常规转基因技术中转入基因表达易变的问题, 但基于细胞或组织培养体系的植物定点整合技术体系的转化效率通常很低, 如拟南芥根外植体法的定点整合率仅 0.000 1%~0.001%^[3], 水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 基因枪法仅获得 1 株定点整合植株^[12], 烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) PEG 法的定点整合率仅 0.000 12%^[2] 等。作者通过花器喷雾法并基于 Cre/*lox* 系统对拟南芥定点整合技术体系进行了改进, 其定点整合率达 0.076%, 较 Vergunst 等^[3] 报道的定点整合率高 2 至 3 个数量级, 极大地提高了定点整合的效率, 且操作流程简单易行, 可改善定点整合技术效率低的现状。

Vergunst 等^[3] 在利用根外植体法进行拟南芥定点整合的过程中观察到少量幼苗叶片发生脱绿现象, 表现出卡那霉素敏感症状。本研究也观察到极少量幼苗具有叶片脱绿现象, 推测可能是在幼苗生长过程中, 一些以杂合状态存在的 Cre 基因编码的重组酶又将 *npt II* 基因切除下来, 从而使部分细胞丧失卡那霉素抗性, 因此, 作者仅保留了子代具有完全卡那霉素

抗性的候选植株用于进一步分析。

利用改进的 Cre/*lox* 定点整合体系, 成功介导 *Rps2* 基因准确插入拟南芥基因组的预定位点, 定点整合效率大幅提高, 定点整合的 *Rps2* 基因正常转录和表达, 因此, 应用本体系可极大提高植物定点整合遗传转化体系的稳定性和转化效率。

参考文献:

- [1] FUKUSHIGE S, SAUER B. Genomic targeting with a positive-selection *lox* integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89: 7905-7909.
- [2] DAY C D, LEE E, KOBAYASHI J, et al. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced [J]. Genes and Development, 2000, 14: 2869-2880.
- [3] VERGUNST A C, JANSEN L E T, HOOYKAAS P J J. Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase [J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26: 2729-2734.
- [4] CHUNG M H, CHEN M K, PAN S M. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants [J]. Transgenic Research, 2000, 9: 471-476.
- [5] MINDRINOS M, KATAGIRI F, YU G L, et al. The *A. thaliana* disease resistance gene *Rps2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats [J]. Cell, 1994, 78: 1089-1099.
- [6] MACQUEEN A, SUN X Q, BERGELSON J. Genetic architecture and pleiotropy shape costs of *Rps2*-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature Plants, 2016, 2: 1-8.
- [7] MATTANOVICH D, HIMMLER G, REGNER F, et al. Stopping the DNA polymerase activity at a specific site with a dideoxyoligonucleotide: selective labelling of single stranded circular DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17: 8384.
- [8] GHERBI H, GALLEGRO M E, JALUT N, et al. Homologous recombination in *planta* is stimulated in the absence of Rad50 [J]. EMBO Reports, 2001, 2: 287-291.
- [9] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. The EMBO Journal, 1987, 6: 3901-3907.
- [10] HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. Genome Research, 1996, 6: 986-994.
- [11] GAO L P, ROUX F, BERGELSON J. Quantitative fitness effects of infection in a gene-for-gene system [J]. New Phytologist, 2009, 184: 485-494.
- [12] SRIVASTAVA V, OW D W. Biolistic mediated site-specific integration in rice [J]. Molecular Breeding, 2001, 8: 345-350.

(责任编辑: 郭严冬)