

# Construction and Functional Identification of VIGS Vector of PDS Gene from *Amorphophallus konjac*

Zibu Wang<sup>1,2\*</sup>, Yanfen Huang<sup>1</sup>, Jianfeng Cao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Guizhou Normal College, Guiyang Guizhou

<sup>2</sup>Institute of Medicinal Plant Biotechnology, Guizhou Normal College, Guiyang Guizhou

Email: \*xjshz\_2008@sina.com

Received: Apr. 7<sup>th</sup>, 2018; accepted: Apr. 21<sup>st</sup>, 2018; published: Apr. 28<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

Phytoene desaturase (PDS) gene fragment is cloned from *Amorphophallus konjac* into tobacco rattle virus vector (TRV) to obtain p TRV-PDS. The construction is transformed into *Agrobacterium* CV3101 and then infected *N. benthamiana*. Silencing of the PDS gene in *N. benthamiana* can result in the white leaf due to photo-bleaching, indicating successful establishment of the VIGS system. The albino phenotype of plant leaves appeared, and the expression of PDS gene in *konjac* was down regulated and the gene expression was down regulated by 10%.

## Keywords

VIGS, Tobacco Rattle Virus Vector (TRV), Phytoene Desaturase (PDS)

# 魔芋PDS基因VIGS载体的构建及其功能鉴定

王自布<sup>1,2\*</sup>, 黄燕芬<sup>1</sup>, 曹剑峰<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>贵州师范学院, 贵州 贵阳

<sup>2</sup>贵州师范学院药用植物生物技术研究所, 贵州 贵阳

Email: \*xjshz\_2008@sina.com

收稿日期: 2018年4月7日; 录用日期: 2018年4月21日; 发布日期: 2018年4月28日

## 摘要

本文采用PCR技术从魔芋中克隆了番茄红素脱氢酶(PDS)基因部分序列, 该片段长度450 bp, 分析表明

\*通讯作者。

该基因片段与烟草中PDS序列同源率为77%。经过双酶切构建了p TRV-PDS的VIGS载体, 转入农杆菌浸染魔芋, 感染的组培苗魔芋植株叶片出现白化表型, 定量PCR结果表明魔芋PDS基因的mRNA丰度出现下调且下调了10%。

## 关键词

病毒诱导基因沉默(VIGS), 烟草脆裂病毒, 番茄红素脱氢酶

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

病毒诱导基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)技术是一种 RNA 介导的抗病毒防御反应机制, 目前在植物反向遗传学领域已经表现出巨大的潜力。与其它导致基因功能缺失的研究方法(如反义抑制、基因突变等)相比, VIGS 技术不仅优于传统的植物转基因技术, 方法简便, 高效耐用, 而且具有高通量特性[1]。而且病毒诱导的基因沉默具有研究周期短、不需要遗传转化、可在不同的遗传背景下生效以及能在不同的物种间进行基因功能的快速比较等优点, 在功能基因组学领域的研究中, 这些优越性已经使 VIGS 技术成为最具吸引力的首选技术手段。在 VIGS 中, 通常以八氢番茄红素去饱和酶(PDS)基因作为报告基因, 探索病毒载体在不同种植物上应用的可能性。最早 Kumagai 等[2]将八氢番茄红素脱氢酶(PDS)克隆到烟草花叶病毒(TMV)中, 浸染烟草后植株表现白化表型, 说明内源的 PDS 基因被沉默掉了, 因为已知 PDS 参与类胡萝卜素类物质的合成, 而缺乏类胡萝卜素的植物组织将产生白化症状。PDS 抑制表型容易观察, 因此 PDS 基因成为 VIGS 体系评价的参照基因。最近已经有报道在小麦中利用 VIGS (BSMV-VIGS)技术沉默六倍体小麦基因的研究[3], 在研究植物进化方向也有应用 VIGS 的报道, Oriane Hidalgo [4]利用 VIGS 技术研究罂粟家族的多元进化史。这些载体的开发和利用为单子叶植物的功能基因组研究提供了有效的工具。烟草脆裂病毒(TRV)是目前应用最广泛的 VIGS 载体, 它便于外源序列的插入和随后对植物的浸染, 具有病毒感染症状轻、沉默效率高等优点, 在拟南芥、烟草、番茄等多种植物上得到成功应用[5] [6]。

随着分子生物学研究的进展, 几乎所有重要的基因或者基因片段都已经被克隆, 对其功能也有了一些了解。但是, 不同的基因的互作研究, 特别是在小经济作物中还只是刚刚开始起步。这些分子生物学研究尚未很好的与植物品质研究和改良结合起来, 对品质育种的指导意义还是十分有限, 魔芋中更是如此, 此技术的应用有望解决魔芋中品质改良因周期长而效率低下的育种瓶颈。本文根据已报道的烟草中 PDS 基因序列, 克隆得到魔芋中其部分基因 PDS 片段命名为 NbPDS。构建病毒载体(TRV)体系并利用携带目的基因的 TRV 重组载体病毒感染魔芋幼苗叶片, 分析并鉴定魔芋 PDS 基因的功能。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

本实验的研究材料为魔芋(*Amorphophallus konjac*)组培幼苗, TRV 载体 p TRV1、p TRV2 及农杆菌 GC3103 实验室保存。

## 2.2. 实验方法

### 2.2.1. 目的基因的克隆

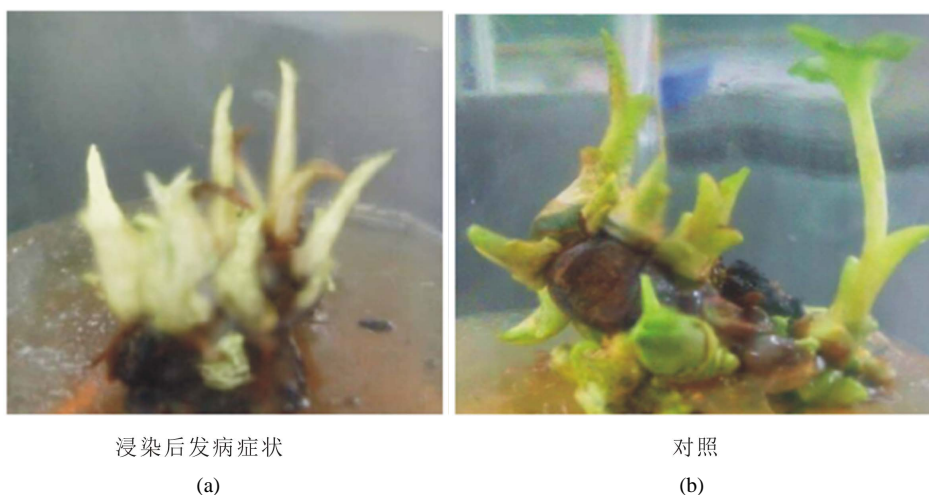
依据 RNA 试剂盒(天根)的方法提取魔芋总的 RNA, 再依据反转录试剂盒(天根)合成 cDNA 第一链。根据已报道的 NCBI 数据库中本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)的烟草八氢番茄红素脱氢酶 PDS 基因序列(登录号 ABE99707), 选取部分编码区片段为目标片段, 设计上游引物 F1(5'-CGATCCCGGATAGGGTGACAGATGA-3', 下画线为 BamH I 酶切位点)和下游引物 R1(5'-CGGAATTCACACACTGAGCAGCGCAACT-3', 下画线为 EcoR I 酶切位点), 引物由上海生工公司合成。以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增条件: PCR 反应体系为 E × Taq 0.2 μL、10 × Taq buffer 2 μL、Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 2 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL、DFR-1F/DFR-2F (10 μmol/L) 0.5 μL、DFR-1R/DFR-2R (10 μmol/L) 0.5 μL、cDNA 模版 2 μL、ddH<sub>2</sub>O 15.8 μL, 总体积为 25 μL。PCR 反应条件: 预变性 94℃ 3 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收和纯化。

### 2.2.2. VIGS 载体的构建

通过 PCR 反应扩增得到目的基因 PDS 片段。将此片段根据 pMD19-T 载体试剂盒(TaKaRa)操作说明书将目的基因片段 PDS 与 T 载体连接一起, 通过蓝白斑筛选得到阳性克隆后送华大基因公司测序确认片段序列。将含有正确插入片段的 T 载体用 BamH I 和 EcoR I 对 pMD19-T 载体进行酶切, 与经 BamH I 和 EcoR I 双酶切的 p TRV2 载体通过 T4-DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌, 经 PCR 以及用双酶切鉴定重组质粒, 将其命名为 p TRV2-DFR。然后通过冻融法转化农杆菌菌株 GV3101, 阳性克隆筛选, 保存菌种待用。

### 2.2.3. VIGS 浸染实验

VIGS 浸染实验参考侯巧明等[7]的 VIGS 部分的实验方法进行: 略有改动, 将质粒载体和空的质粒载体以及带有目的基因的农杆菌菌落取样 1 mL 接种到 20 ml LB 选择培养液中, 37℃ 水浴振荡培养 5 h 后, 置于 28℃ 下继续过夜震荡培养。5000 rpm 离心 10 min 收集农杆菌, 上清液倒掉, 再加入悬浮液直到其吸光度 OD 600 值为 1.5 左右, 不同之处在于静置时间根据情况改为 4 h 左右, 将等体积的质粒农杆菌 GV3101 悬浮液和 p 带有目的基因的质粒悬浮液混合均匀后, 再置于 28℃ 下震荡 2 h, 然后开始注射实验材料魔芋叶片。浸染后培养的幼苗正常管理, 大约 20 d 可以观察到基因沉默导致的表型变化(图 1)。



**Figure 1.** Phenotypic change of plant. (a) Plants after virus immersion; (b) Control  
**图1.** 植株表型变化。(a) 病毒浸染后的植株; (b) 对照

### 2.2.4. 基因表达检测

选取被农杆菌侵染 20 d 的魔芋叶片提取总 RNA, 提取 RNA 的方法以及合成 cDNA 的方法参考 1.2.1。使用实时荧光定量 PCR 检测 DFR 基因沉默的效果。内参基因 Actin (登录号: DN551593; F: 5'-ggaaaagtgcagagagacacg-3', R: 5'-tacagtgctggatcggtggt-3', 150bp)。实时荧光定量 PCR 检测引物 DFR(登录号 GU324979, DFR-F: 5'-atgtctgtgtacatgagaga-3' DFR-R: 5'-acgctagagatagcactcaa-3')。实时荧光定量 PCR 反应采用天根(TIANGEN)试剂(RealMasterMix (SYBR Green)), 每个反应重复 3 次, 反应体系 20  $\mu$ l, 含 cDNA 模板 1.6  $\mu$ l, 2.5  $\times$  RealMasterMix 8  $\mu$ l, 20  $\times$  SYBR solution 1  $\mu$ l, Primer F 0.4  $\mu$ l, Primer R 0.4  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 8.6  $\mu$ l。荧光定量 PCR 仪(Smart CyclerII 型, USA)上完成测定。扩增程序 50 $^{\circ}$ C 温育 2 min, (94 $^{\circ}$ C, 1 min $\rightarrow$ 退火温度, 30 s)  $\times$  1; (94 $^{\circ}$ C, 10 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C, 30 s)  $\times$  40。并按 Pfaffl M W [8]的方法计算基因的相对表达量。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 八氢番茄红素脱氢酶 PDS 基因的克隆

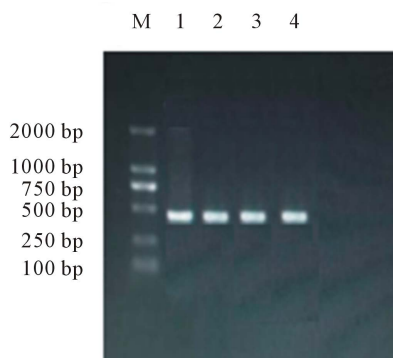
从魔芋叶片中利用 PCR 扩增得到 PDS 部分基因序列, 1% 的琼脂糖检测大约在 453 bp 出有扩增出目的条带(图 2), 将该扩增片段利用回收试剂盒(天根)回收并连接到 pMD19-T 载体种并测序。测序结果表明和目的基因片段大小一致 450 bp, 与已知的烟草 PDS 序列(登录号 ABE99707)同源性到达 77%。

### 3.2. 重组病毒载体的构建及转化农杆菌

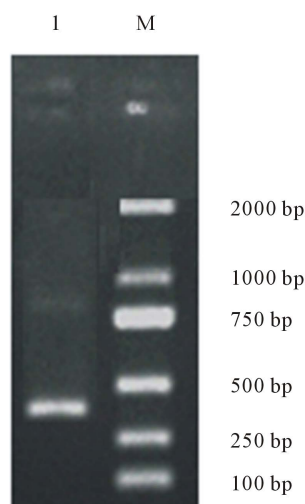
将成功构建的重组质粒 pTRV2-PDS 转化大肠杆菌 top 10, 提取质粒 pDNA 经 PCR 鉴定为阳性, 将质粒置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中经双酶切。酶切结果表明条带大小与目的基因片段一致, 约 453 bp 左右(图 3), 说明 pTRV2-PDS 构建成功。将成功构建的病毒载体 pTRV2-PDS 转化农杆菌 GV3101, 挑取阳性克隆提取质粒并送华大基因公司测序, 结果与已知的基因序列一致, 可以用于浸染植株叶片。

### 3.3. 基因沉默结果及功能鉴定

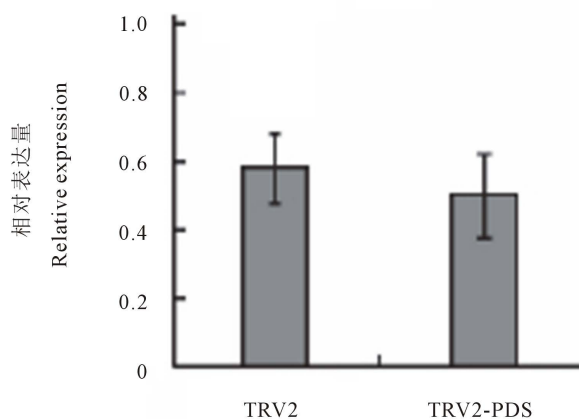
采用叶片注射法浸染魔芋叶片, 接种病毒 20 d 后观察发现, 浸染重组病毒 p TRV2-PDS 的植株新长出的叶片出现白化现象, 而且出现整棵植株叶片发育变慢, 而对照植株叶片没有此现象(见图 1)。株型变化推测成因可能是诱导的结果, 取浸染 20 d 的植株叶片进行实时荧光定量 PCR 技术检测, 发现 PDS 基因表达确实出现下调现象(图 4), VIGS 病毒诱导载体是否可以成功的沉默魔芋中的 PDS 基因还需进一步的实验验证。



**Figure 2.** PCR products. M. DL2000; 1~4. PCR products  
**图2.** PCR扩增产物。M. DL2000; 1~4. PCR产物



**Figure 3.** Restrictive enzymes digestion. M. DL2000; 1. Enzymes digestion products  
**图3.** 酶切图谱。M. DL2000; 1. 酶切产物



**Figure 4.** q RT-PCR analysis of PDS expression in the leaves. TRV2, plants infiltrated with p TRV2 as a control; p TRV2-PDS, plants infiltrated with p TRV2-PDS  
**图4.** 叶片中PDS 基因表达的q RT-PCR分析。图中的TRV2表示浸染TRV2的空白对照植株，p TRV2-PDS 表示浸染的植株

#### 4. 讨论

本研究利用 PCR 方法从魔芋中克隆了 PDS 基因的部分序列，该基因片段与 NCBI 数据库中本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 的烟草八氢番茄红素脱氢酶 PDS 基因序列(登录号 ABE99707) 同源性为 77%，原因可能是由于品种间存在多态性基因导致的[9]，这在吕山花的研究中也有所表现。将 PCR 得到的 PDS 基因片段连接入 pTRV2 载体，并转化入农杆菌 GV3103 中，本实验成功的构建了魔芋的 VIGS 体系，但是我们在用构建好的 VIGS 菌液(pTRV2-PDS 和 pTRV1 载体的农杆菌) 浸染不同植物，发现在天南星科植物魔芋中表现不佳。这可能是本实验中构建的 VIGS 体系具有种的差异性。这与孙威等[10]观点一致，尽管 VIGS 载体的应用一直是依赖于植物种的，但是近年来，众多新载体尤其是通用载体的研发[10]，必将不断地拓宽 VIGS 的应用范围。

本实验还发现采用农杆菌叶片注射法浸染魔芋叶片，接种病毒 20 d 植株新长出的叶片出现植株叶片白化，生长缓慢现象，而对照植株叶片没有此现象。侯巧明等[7]在病毒诱导的基因沉默技术实验教学中



指出：待注射农杆菌液的浓度，OD600 值为 1.0 左右是比较合适的，太高则病毒毒性太大，植株病毒感染症状重，太低则达不到诱导效果。而本文中所用 OD600 值为 1.5，可能是浓度太高所致。

本研究使用 VIGS 法，使魔芋 PDS 基因的表达下调，通过 qRT-PCR 法检测到 DFR 基因表达出现下调且基因表达下调了 10%，该基因下调后，植株表型发生变化。但是下调未达到显著性变化，VIGS 病毒诱导载体是否可以成功的沉默魔芋中的 PDS 基因还需进一步的实验验证。

## 5. 结论

本实验构建的 VIGS 病毒诱导体系可应用于魔芋基因功能的分析，根据前人研究结果 VIGS 在逆境抗性相关基因中的应用[11] [12]，结合本实验结果可以推测其在魔芋逆境胁迫研究中也具有一定的积极意义。

## 基金项目

贵州省科学技术厅项目：黔科合 J 字[2013]2246 号；黔高教发[2017]158 号；贵州省 2017 年一流大学重点建设项目师资团队建设子项目；贵州师范学院自然科学基金(2015BS005)。

## 参考文献

- [1] 姚丹青, 张微微, 原丽华, 潘俊松, 何欢乐, 蔡润. VIGS: 植物功能基因组学研究的革命[J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 155-161.
- [2] Kumagai, M.H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L.K. (1995) Cytoplasmic Inhibition of Carotenoid Biosynthesis with Virus-Derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 1679-1683. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1679>
- [3] Scofield, S.R. and Brandt, A.S. (2012) Virus-Induced Gene Silencing in Hexaploid Wheat Using Barley Stripe Mosaic Virus Vectors. *Methods in Molecular Biology*, **894**, 93-112. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-882-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-882-5_7)
- [4] Hidalgo, O., Bartholmes, C. and Gleissberg, S. (2012) Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) in *Cysticapnos vesicaria*, a Zygomorphic-Flowered Papaveraceae (Ranunculales, Basal Eudicots). *Annals of Botany*, **109**, 911-920. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs008>
- [5] Liu, Y.L., Schiff, M.D. and Dinesh-Kumar, S.P. (2002) Virus-Induced Gene Silencing in Tomato. *The Plant Journal*, **31**, 777-786. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01394.x>
- [6] 杨迎伍, 李正国, 宋红丽, 等. VIGS 技术在植物基因功能研究中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 379-383.
- [7] 侯巧明, 张立, 贺新强, 丁琦. 病毒诱导的基因沉默技术实验教学设计和实践[J]. 实验技术与管理, 2015, 32(9): 191-193.
- [8] Pfaffl, M.W. (2001) A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- [9] 吕山花, 樊颖伦, 吕福堂, 刘立科, 孙亚梅, 马姗姗. 大豆 GmPDS 基因的克隆及 VIGS 表达载体构建和鉴定[J]. 生物技术通报, 2010(4): 122-124.
- [10] 孙威, 许奕, 许桂莺, 孙佩光, 宋顺, 常胜合. 病毒诱导的基因沉默及其在植物研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2015, 31(10): 105-110.
- [11] Liou, M.R., Huang, Y.W., Hu, C.C., et al. (2014) A Dual Gene-Silencing Vector System for Monocot and Dicot Plants. *Plant Biotechnology Journal*, **12**, 330-343. <https://doi.org/10.1111/pbi.12140>
- [12] Manmathan, H., Shaner, D., Snelling, J., Tisserat, N. and Lapitan, N. (2013) Virus-Induced Gene Silencing of Arabidopsis Thaliana Gene Homologues in Wheat Identifies Genes Conferring Improved Drought Tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 1381-1392. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert003>

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2164-5507，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[hjas@hanspub.org](mailto:hjas@hanspub.org)