

拟南芥 *At2g34610* 基因编辑和过表达载体的构建

赵一君, 李美玉, 王昕宇, 张 菡, 薛 明, 李桂民*

临沂大学生命科学学院, 山东 临沂

收稿日期: 2022年5月10日; 录用日期: 2022年7月6日; 发布日期: 2022年7月15日

摘 要

ABA参与的信号转导可调节植物生长发育的各个阶段, 如种子萌发、气孔关闭、根的发育和衰老等, 并调控植物对干旱、冷、热、盐渍等多种逆境的适应。研究ABA信号转导通路对了解植物生长发育的调节机制具有极其重要的意义。RT-PCR检测结果显示, *At2g34610*是ABA响应基因, 其表达受ABA诱导上调。为了研究*At2g34610*的功能, 我们分别构建了*At2g34610*过表达载体和多靶点的基因编辑载体, 这些载体可为创制目的基因过表达和突变体植株奠定基础, 进而可为探究*At2g34610*在ABA信号转导和调控拟南芥抗逆性中的作用及其分子机制提供理想的实验材料。

关键词

拟南芥, ABA, *At2g34610*, 基因编辑, 过表达

Construction of *Arabidopsis At2g34610* Gene Editing and Overexpression Vector

Yijun Zhao, Meiyu Li, Xinyu Wang, Han Zhang, Ming Xue, Guimin Li*

College of Life Science, Linyi University, Linyi Shandong

Received: May 10th, 2022; accepted: Jul. 6th, 2022; published: Jul. 15th, 2022

Abstract

The signal transduction involved in ABA regulates various stages of plant growth and development. RT-PCR detection results show that *At2g34610* is an ABA response gene, its expression is up-regulated by ABA induction. In order to study the function of *At2g34610*, we respectively constructed *At2g34610* overexpression vector and multi-targeted gene editing vector, these vectors can lay the foundation for creating the purpose of gene overexpression and mutant plants, and can be used to explore the role of *At2g34610* in ABA signal transduction and regulation of Arabidopsis resistance to stress and its molecular mechanism, providing ideal experimental materials.

*通讯作者。

文章引用: 赵一君, 李美玉, 王昕宇, 张菡, 薛明, 李桂民. 拟南芥 *At2g34610* 基因编辑和过表达载体的构建[J]. 植物学研究, 2022, 11(4): 486-493. DOI: 10.12677/br.2022.114057

ment, such as seed germination, stomatal closure, root development and senescence, and regulates plant adaptation to drought, cold, heat, salt and other stresses. The study of ABA signal transduction pathway is of great significance for understanding the regulation mechanism of plant growth and development. The results of RT-PCR showed that *At2g34610* was an ABA-responsive gene and its expression was up-regulated by ABA. In order to study the function of *At2g34610*, gene multi-target editing vector and overexpression vector were constructed respectively. The vector construction laid a foundation for the creation of target gene overexpression and mutant plants, which are ideal experimental materials for exploring the role and molecular mechanism of *At2g34610* in ABA signal transduction and regulation of stress resistance in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords

Arabidopsis thaliana, ABA, *At2g34610*, Gene-Editing, Overexpression

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

近年来生态环境恶化日益加剧,非生物胁迫已经成为影响植物生长发育的重要因素[1]。非生物胁迫是指不利于植物生存和生长发育甚至导致植物死亡的非生物环境条件,包括低温、高温、干旱等。植物在受到非生物胁迫时,其自身会产生抗逆性的生理响应机制,这种应激反应包括产生植物激素,如脱落酸(ABA)、乙烯,以此来抵抗外界不良环境。

ABA 参与的信号转导可调节植物生长发育的各个阶段,如种子萌发、气孔关闭、根的发育和衰老等[2][3][4][5],并调控植物对干旱、冷、热、盐渍等多种逆境的适应[6][7][8],因此 ABA 是植物最重要的“抗逆激素”。ABA 信号转导通路是一个由多个受体蛋白和调控因子组成的复杂调控网络,其中最为主要的核心调控因子包括受体蛋白 PYR1/PYL/RCARs、A 类蛋白磷酸酶 PP2Cs、蛋白激酶 SnRK2s,以及 ABF/AREB/ABI5 类 bZIP 转录因子[9][10][11][12][13]等。2009 年, Ma [14]和 Park [15]研究小组分别利用酵母双杂交和筛选突变体等方法在拟南芥中确定出 ABA 的受体为 PYR/PYL/RCAR 蛋白,并证实了这种受体蛋白在 ABA 信号转导途径中起重要作用。近年来,大量参与 ABA 信号转导的功能组分得到鉴定,主要包括 ABA 受体蛋白、G 蛋白、G 蛋白耦联受体、蛋白磷酸酶、蛋白激酶、E3 泛素连接酶、钙离子结合蛋白等[16]。这都充分体现了 ABA 信号转导途径的复杂性以及此途径在调节植物生长发育过程中的重要性。因此进一步研究 ABA 信号转导途径的相关因子,有助于拓展对 ABA 信号转导机制的理解,也有利于通过分子生物学手段提高作物的耐逆性的研究。

拟南芥 *At2g34610* 是 ABA 的响应基因,可能在 ABA 信号转导途径中发挥作用,此外还有研究表明 *At2g34610* 在 100 mM 的 NaCl 处理下表达量显著提高[17],但目前关于该基因系统的功能研究尚未见报道。本研究拟构建 *At2g34610* 的基因编辑载体和过表达载体,可为进一步探究 *At2g34610* 在 ABA 信号转导和调控拟南芥抗逆性中的作用及分子机制奠定基础。在理论上可以丰富对 ABA 信号转导途径和抗逆性分子机制的认知,在实践中有可能为分子设计育种提供靶基因,用于作物抗逆性状的改良,服务农业生产。

2. 材料与方法

2.1. 材料

拟南芥野生型 Col-0。

2.2. 基因 *At2g34610* 对 ABA 响应的检测

ABA 处理野生型拟南芥 col 以检测目的基因 *At2g34610* 是否对 ABA 产生响应, 具体操作如下: 野生型拟南芥 col 种子消毒处理后, 放入 4℃ 冰箱春化 48 hr, 随后将种子种在 1/2MS 培养基中。培养一周后, 将幼苗分成两组, 实验组用 50 μM ABA 进行处理, 对照组用等量的甲醇处理, 放在摇床上摇动 4 小时(在此过程中要注意避光)。

从两组中分别取适量的拟南芥幼苗, 液氮研磨, 用全式金生物公司的 RNA 提取试剂盒(EasyPure Plant RNA Kit)提取 RNA, 然后用全式金反转录试剂盒做反转录, 反应体系如下: RNA 2 μl, Oligo (dT) 1 μl, 2x ES Reaction Mix 10 μl, Easyscript RT/RI Enzyme Mix 1 μl, RNase-free Water 补齐至 20 μl, 轻轻混匀, 42℃ 孵育 30 min, 85℃ 加热 5 s, 让 Easyscript RT/RI Enzyme 失活。再以 cDNA 为模板 PCR 扩增目的基因, 并同时扩增 Actin 作对照, 反应体系为: 2 × premix 5 μl, 正向引物 0.5 μl, 反向引物 0.5 μl, cDNA 2 μl, ddH₂O 2 μl, 总体积 10 μl, 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共设置 26 个循环。其中 *At2g34610* 正向引物序列为 CAACATATGACAGAAATGCCCTCGTAC, *At2g34610* 反向引物序列为(*At2g34610*-Sac I R): CAAGAGCTCAAATTTGTCGTTTGATATC。

2.3. 基因 *At2g34610* 的克隆

将 PUC-HA-*At2g34610* 的重组质粒和 pzp 质粒载体的分别用 Pst I、Sac I 进行双酶切。酶切产物经切胶回收后进行连接、转化。阳性克隆通过质粒 DNA 酶切鉴定。

2.4. *At2g34610* 过表达载体的构建

以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增拟南芥 *At2g34610* 的编码区, 扩增产物经 Nde I 和 Sac I 双酶切, 连接到载体 PUC-HA (含有 HA 标签)。连接产物转化感受态细胞, 菌液 PCR、质粒酶切检测阳性克隆。

2.5. *At2g34610* 基因编辑载体的构建

1) CRISPR/Cas9 系统中的目的片段扩增

登录 CCTop (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>)网站, 输入 *At2g34610* 基因序列进行搜索, 选取 3 个评分高、不易脱靶的靶位点: GGGTTTCGACAACGTACGA (GGG), TTGTGCATCCCTTCTCATCG (CGG), AATACACAGCCGCGATGAGA (AGG)。根据靶位点设计扩增 sgRNA 表达盒的引物, 序列如下:

表达盒 1 引物

Pps-GGL: TTCAGAggtctcTctcgACTAGTATGGAATCGGCAGCAAAGG

gRTAT2G34610-1+: GGGTTTCGACAACGTACGAgttttagagctagaat

AtU6-26AT2G34610-1-: TCGTACGTTGTCGAAACCCcaatcactacttcgactc

Pgs-GG2: AGCGTGggtctcGtcaggTCCATCCACTCCAAGCTC

表达盒 2 引物

Pps-GG2: TTCAGAggtctcTctgacacTGAATCGGCAGCAAAGG

gRTAT2G34610-2+: TGTGCATCCCTTCTCATCGgttttagagctagaat

AtU6-1AT2G34610-2-: CGATGAGAAGGGATGCACACaatcactactctct

Pgs-GG3: AGCGTGggtctcGtcttcacTCCATCCACTCCAAGCTC

表达盒 3

Pps-GG3: TTCAGAggtctcTaagactTGAATCGGCAGCAAAGG

gRTAT2G34610-3+: ATACACAGCCGCGATGAGAgtttagactagaat

AtU6-29AT2G34610-3-: TCTCATCGCGGCTGTGTATCaatctcttagtcgact

Pgs-GGR: AGCGTGggtctcGaccgACGCGTATCCATCCACTCCAAGCTC

通过四引物 PCR 扩增 sgRNA 的表达盒, 质粒 pUC-sgRNA-AtU6-26、pUC-sgRNA-AtU6-1、pUC-sgRNA-AtU6-29 稀释 100 倍作为模板使用, 中间引物稀释 20 倍, 两端引物则为常规浓度使用。四引物 PCR 反应体系如下: 5 × HF Buffer 10 μl, 10 mM dNTP 1 μl, 四种引物各 1 μl, 模板 DNA 1 μl, phusion E 高保真 DNA 聚合酶 0.5 μl, ddH₂O 33.5 μl, 总体积 50 μl。反应条件为: 反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共设置 30 个循环。PCR 产物切胶回收, 用 Nanodrop 测回收 DNA 的浓度。

2) 目的片段与 pHEE 载体连接

通过 Golden Gate 的方法, 利用 2,000,000 U/ml 的高浓度的 T4 DNA 连接酶, 将目的片段与载体连接, 目的片段与载体浓度的比例大约为 1:1。连接反应体系如下: 三个回收 DNA 片段(~100 ng/μl)各 2 μl, pHEE (~100 ng/μl) 2 μl, 10 × T4 DNA Ligase Buffer (NEB) 1.5 μl, T4 DNA Ligase (HC) 1 μl, Bsa I 1 μl, ddH₂O 3.5 μl。反应条件为: 37°C 5 hr, 50°C 5 min, 80°C 10 min。

3) 连接产物转化, Kana 抗性筛选。

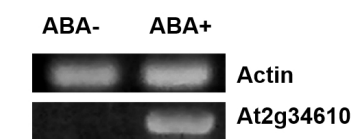
4) CRISPR/Cas9 质粒检测

从抗性板中, 挑取 3 个菌落液体培养。菌液 PCR 检测阳性克隆(引物为 PB-L: GCGCGCgGTctcGCTCGACTAGTATGG, PB-R GCGCGCggtctcTACCGACGCGTATCC)。提取质粒, 用 Mlu I 和 Spe I 双酶切检测, 确认载体连接成功。

3. 结果与分析

3.1. *At2g34610* 对 ABA 响应的检测

将拟南芥幼苗分成两组, 实验组用 50 μM 的 ABA 处理, 对照组用等量的甲醇处理。提取 RNA, 通过半定量 RT-PCR 的方法检测目的基因表达情况, 结果如下(图 1):



ABA-为对照组, 经 ABA+为实验组。

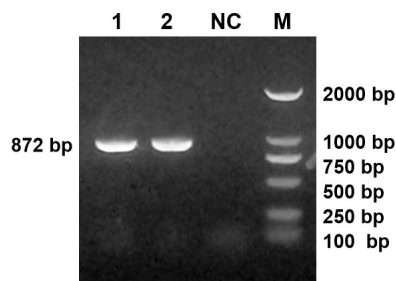
Figure 1. ABA response assay of *At2g34610*

图 1. *At2g34610* 对 ABA 响应的检测

结果表明: Actin 在对照组和实验组中表达条带的信号强弱无差异, 而 *At2g34610* 基因在经过 ABA 处理后其信号强度显著高于对照组, 这表明 *At2g34610* 基因受到 ABA 诱导后表达量明显提高。

3.2. 基因 *At2g34610* 的克隆

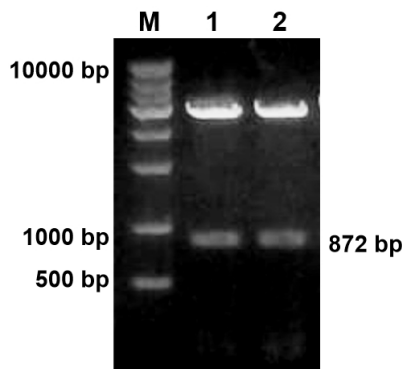
PCR 扩增获得的 *At2g34610* 基因片段, 酶切后连接到 pUC-HA。连接产物转化后获得的克隆, 经菌液 PCR 和酶切检测, 结果如下(图 2, 图 3):



M 为 DL2000 DNA marker; 1, 2 泳道为两个克隆的 PCR 产物; NC 阴性对照。

Figure 2. PCR detection of bacterial fluid

图 2. 菌液 PCR 检测



M 为 1 kb ladder; 1, 2 泳道为两个重组质粒的酶切产物。

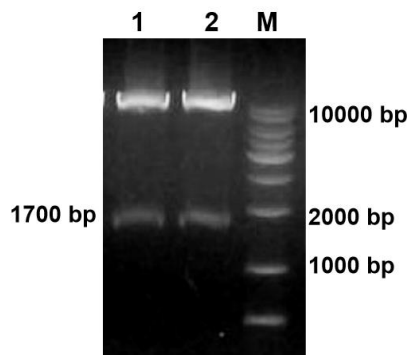
Figure 3. Enzyme digestion test

图 3. 酶切检测

结果显示, PCR 扩增得到一条长约 800~900 bp 的特异性条带, 酶切后释放的小带也是 800~900 bp 左右, 与预期 872 bp 的条带吻合, 说明克隆成功。

3.3. *At2g34610* 过表达载体的构建

将克隆载体进行双酶切, 获得的目的基因片段连接到双元表达载体 PZP, 连接产物转化后获得的克隆, 经酶切检测, 结果(见图 4)显示:



M 为 1 kb ladder, 1, 2 泳道为两个重组质粒的酶切产物。

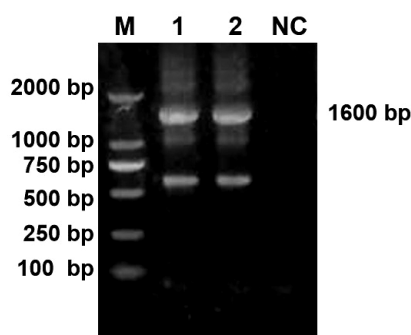
Figure 4. Enzymolysis identification of PZP-HA-*At2g34610* carrier

图 4. PZP-HA-*At2g34610* 载体酶切检测

结果表明, PZP-HA-*At2g34610* 载体酶切后释放出的小带约 1700 bp 左右, 与目的基因 + 35 S 启动子序列的大小吻合, 说明过表达载体构建成功。

3.4. *At2g34610* 基因编辑载体的构建

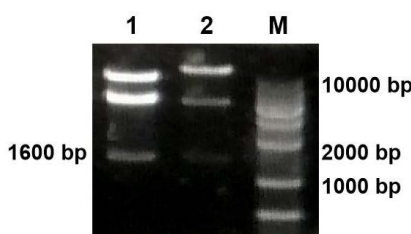
通过四引物 PCR 获得的 3 个表达盒, 经 Golden gate 方法连接到 pHEE 编辑载体上。将转化后获得的克隆进行菌液 PCR 检测和酶切检测, 结果(见图 5, 图 6)显示:



M 为 DL2000 DNA marker; 1, 2 泳道为两个克隆的 PCR 产物; NC 阴性对照。

Figure 5. PCR detection of gene editing vector

图 5. 基因编辑载体的 PCR 检测



M 为 1 kb ladder, 1, 2 泳道为两个重组质粒的酶切产物。

Figure 6. Enzyme digestion detection of gene editing vector

图 6. 基因编辑载体的酶切检测

结果表明, PCR 扩增得到一条长约 1600 bp 的条带, 酶切后释放出的小带也是 1600 bp 左右, 与 3 个表达盒的长度吻合, 说明编辑载体构建成功。

4. 讨论

ABA 是调控植物生长发育的重要激素之一, 可参与植物不同的生理过程, 如抑制种子萌发[2], 促进胚的成熟[3], 诱导植物叶片衰老与脱落等[4]。同时, ABA 对气孔的运动也有一定的调节作用[5]。ABA 还可增强植物对非生物胁迫的耐受性和环境胁迫的响应, 帮助植物抵抗各种逆境, 如低温, 干旱, 盐度, 重金属, 紫外线等[6] [7] [8]。ABA 信号转导途径是一个复杂的调控网络, 目前仍然有很多 ABA 响应基因功能未知。本研究证明拟南芥 *At2g34610* 是一个 ABA 响应基因, 其表达受到 ABA 的诱导。生物信息学分析显示 *At2g34610* 是一种碱性蛋白, 有跨膜信号, 说明可能是一种跨膜蛋白。但其在 ABA 信号转导途径和植物生命活动中的功能如何, 尚需要深入研究。

构建目的基因过表达和突变体植株是研究植物基因功能的基础。CRISPR/Cas9 基因编辑系统可完成单个碱基的替换、增加或缺失, 单基因功能域大片段缺失、多个基因同时敲除等[18] [19], 因其具有操作

简单, 特异性高和灵活性好等特点, 近年来已被越来越多的实验室用来创制突变体。本研究使用的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体, 理论上最多可插入 8 个 sgRNA 的表达盒。针对 *At2g34610*, 本研究构建了一个插入 3 个 sgRNA 的表达盒、可同时表达 3 种 sgRNA 的编辑载体, 可实现对基因不同靶位点的同时编辑, 提高了基因编辑的效率。

本研究使用的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体的 T-DNA 中还插入了一个早花基因(FT), 可使转基因植株出现早开花的表型。早花的表型不仅有利于筛选, 还缩短了植株幼年期的时间, 从而可缩短获得已编辑的非转基因纯合突变体的进程。研究表明, T1 基因使植物开花早, 使得总的获取突变体的时间可减少至少 10 天[20]。因此本研究构建的基因编辑载体, 对于后续尽快获得纯合编辑突变体、缩短实验周期具有重要的意义。

5. 结论

本研究构建了拟南芥 *At2g34610* 基因过表达载体和多靶点的基因编辑载体, 为创制目的基因过表达和突变体植株奠定了基础, 进而可为探究该基因在 ABA 信号转导和调控拟南芥抗逆性中的作用及其分子机制提供理想的实验材料。

基金项目

本研究受到山东省自然科学基金项目(ZR2020MC089)和山东省高等学校大学生创新创业项目(S202010452039)资助。

参考文献

- [1] 毋若楠, 王红, 杨成成, 王争艳, 武永军. 拟南芥 lncRNA-At5NC056820 过表达载体构建及其转基因植株的抗旱性研究[J]. 西北植物学报, 2017, 37(10): 1904-1909.
- [2] Rodríguez-Gacio, M.C., Matilla-Vázquez, M.A. and Matilla, A.J. (2009) Seed Dormancy and ABA Signaling: The Breakthrough Goes on. *Plant Signaling & Behavior*, **4**, 1035-1048. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9902>
- [3] Karssen, C., Brinkhorst-Van der Swan, D., Breeckland, A. and Koornneef, M. (1983) Induction of Dormancy during Seed Development by Endogenous Abscisic Acid: Studies on Abscisic Acid Deficient Genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, **157**, 158-165. <https://doi.org/10.1007/BF00393650>
- [4] Sah, S.K., Reddy, K.R. and Li, J. (2016) Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, **7**, Article No. 571. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- [5] Kim, T.H., Böhmer, M., Hu, H.H., Nishimura, N. and Schroeder, J.I. (2010) Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 561-591. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112226>
- [6] Xing, W. and Rajashekar, C. (2001) Glycine Betaine Involvement in Freezing Tolerance and Water Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, **46**, 21-28. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00078-8)
- [7] Nayyar, H. and Walia, D. (2004) Genotypic Variation in Wheat in Response to Water Stress and Abscisic Acid-Induced Accumulation of Osmolytes in Developing Grains. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **190**, 39-45. <https://doi.org/10.1046/j.0931-2250.2003.00072.x>
- [8] Ton, J., Flors, V. and Mauch-Mani, B. (2009) The Multifaceted Role of ABA in Disease Resistance. *Trends in Plant Science*, **14**, 310-317. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.006>
- [9] Tian, H., Chen, S., Yang, W., Wang, T., Zheng, K., Wang, Y., Cheng, Y., Zhang, N., Liu, S., Li, D., Liu, B. and Wang, S. (2017) A Novel Family of Transcription Factors Conserved in Angiosperms Is Required for ABA Signalling. *Plant, Cell & Environment*, **40**, 2958-2971. <https://doi.org/10.1111/pce.13058>
- [10] Dong, T., Park, Y. and Hwang, I. (2015) Abscisic Acid: Biosynthesis, inactivation, Homeostasis and Signalling. *Essays in Biochemistry*, **58**, 29-48. <https://doi.org/10.1042/bse0580029>
- [11] Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Abscisic Acid Dependent Multisite Phosphorylation Regulates the Activity of a Transcription Activator AREB1. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 1988-1993.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0505667103>
- [12] Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D. and Schroeder, J.I. (2010) Early Abscisic acid Signal Transduction Mechanism: Newly Discovered Components and Newly Emerging Questions. *Genes & Development*, **24**, 1695-1708. <https://doi.org/10.1101/gad.1953910>
- [13] Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. and Giraudat, J. (2001) The ABI1 and ABI2 Protein Phosphatases 2C Act in a Negative Feedback Regulatory Loop of the Abscisic Acid Signalling Pathway. *The Plant Journal*, **25**, 295-303. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00965.x>
- [14] Yue, M., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yi, Y., Christmann, A. and Grill, E. (2009) Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science*, **324**, 1064-1068. <https://doi.org/10.1126/science.1172408>
- [15] Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., *et al.* (2009) Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science*, **324**, 1068-1071. <https://doi.org/10.1126/science.1173041>
- [16] 易文凯, 王佳, 杨辉, 田云, 卢向阳. 植物 ABA 受体及其介导的信号转导通路[J]. 植物学报, 2012, 47(5): 515-524.
- [17] Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P. and Howell, S.H. (2007) Salt Stress Responses in Arabidopsis Utilize a Signal Transduction Pathway Related to Endoplasmic Reticulum Stress Signaling. *The Plant Journal*, **51**, 897-909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03195.x>
- [18] Lowder, L.G., Zhang, D., Baltes, N.J., Voytas, D.F., Zhang, Y., Zhang, D., Tang, X., Zheng, X., Hsieh, T.F. and Qi, Y.P. (2015) A CRISPR/Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation. *Plant Physiology*, **169**, 971-985. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00636>
- [19] Zhou, H., Liu, B., Weeks, D.P., Spalding, M.H. and Yang, B. (2014) Large Chromosomal Deletions and Heritable Small Genetic Changes Induced by CRISPR/Cas9 in Rice. *Nucleic Acids Research*, **42**, 10903-10914. <https://doi.org/10.1093/nar/gku806>
- [20] Cheng, Y., Zhang, N., Hussain, S., Ahmed, S., Yang, W. and Wang, S. (2019) Integration of a FT Expression Cassette into CRISPR/Cas9 Construct Enables Fast Generation and Easy Identification of Transgene-Free Mutants in Arabidopsis. *PLOS ONE*, **14**, e0218583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218583>