

Lilium pumilumu miR396a and miR396f Expression Vector Construction and the Transformation of *Agrobacterium*

Hong Liu, Wenhe Wang, Ke Zhang, Pingsheng Leng, Xiangfeng He*

Beijing University of Agriculture, Beijing

Email: *13283664005@163.com

Received: Nov. 10th, 2017; accepted: Nov. 22nd, 2017; published: Nov. 29th, 2017

Abstract

In order to further explore the gene function of miR396a and miR396f in *Lilium* and to cultivate disease-resistant lily, we first extracted total DNA from *Lilium pumilumu*, then amplified miR396a and miR396f precursor fragments using PCR technology. The miR396a and miR396f precursor fragments were digested with *Bam*HI and *Kpn*I, and then respectively constructed into UBI-pCANBIA1301 expression vector with Ubiquitin (Ubi) promoter. Finally, the constructed vector was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. This study will lay a foundation for the functional verification of miR396 family in *lilium* and the cultivation of disease-resistant lily.

Keywords

Lilium pumilumu, miR396, Vector Construction, *Agrobacterium* EHA105

山丹miR396a和miR396f表达载体构建及农杆菌的转化

刘红, 王文和, 张克, 冷平生, 何祥凤*

北京农学院, 北京

Email: *13283664005@163.com

收稿日期: 2017年11月10日; 录用日期: 2017年11月22日; 发布日期: 2017年11月29日

摘要

为进一步探索miR396a和miR396f在百合中的基因功能和培育具有抗病性的百合, 本试验首先从具有抗

*通讯作者。

性的山丹中提取了它的总DNA, 利用PCR技术扩增到了山丹miR396a和miR396f前体片段, 然后将获得的miR396a和miR396f前体片段通过BamHI酶和KpnI酶双酶切后, 分别构建到含有Ubiquitin (Ubi)启动子的UBI-pCANBIA1301表达载体中, 最后将构建好的载体转化到易侵染百合的农杆菌EHA105菌株中, 以期在miR396基因家族在百合中的功能验证和抗病百合的培育奠定基础。

关键词

山丹, miR396, 载体构建, 农杆菌EHA105

Copyright © 2017 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

百合(*Lilium* spp.)是百合科百合属的多年生草本球根花卉[1], 在观赏、食用、药用以及园林美化等方面都具有广泛的应用。随着近年来百合的栽种面积不断扩大, 百合病害的发生也随之加重[2]。但研究发现, 山丹百合对病害、低温胁迫、高温胁迫等方面都有着较强的抗性, 是培育抗性百合的优良品种[3]。

MicroRNA (miRNA)是一群大小约 21 nt 的单链 RNA, 它们在生物体中通过与靶标基因 mRNA 配对而实现对靶标基因 mRNA 的剪切, 或对其进行翻译抑制作用, 进而调控转录后靶标基因的表达量[4]。研究表明, miRNA 广泛存在于动植物中[5] [6], 可以同时控制多条代谢通路, 在应对逆境胁迫时有很大的作用。miR396 是在拟南芥中发现的一类 miRNA 小分子家族, 是植物中公认的一类保守的 miRNA [7]。miR396 家族调控它的靶标基因 GRF, 在叶片发育、根部发育以及花器官发育等多个方面都发挥着重要的作用, 参与盐、低温、干旱、病原菌的胁迫反应[8] [9] [10]。

本课题组在做山丹的转录组测序时, 发现在山丹中也存在着 miR396, 并得到了 miR396a 和 miR396f 前体序列, 我们推测, 山丹中的 miR396 和该品种的抗病性有着一定的关联。本试验旨在从山丹中扩增出 miR396a 和 miR396f 片段, 并构建 miR396a 和 miR396f 的表达载体, 转入适合侵染百合的 EHA105 根癌农杆菌中, 为后续验证 miR396 基因家族在百合中的功能和培育具有抗性的百合奠定基础。

2. 试验材料及方法

2.1. 试验材料

2.1.1. 植物材料

本试验所用到的山丹材料来源于内蒙古蒙草生态环境(集团)股份有限公司抗旱植物研究所。

2.1.2. miR396a 和 miR396f 前体序列

miR396a 和 miR396f 前体序列是本课题组在做山丹转录组测序得到的, 其中 miR396a 前体序列长度 210 bp, miR396f 前体序列长度为 504 bp, 具体序列见表 1。

2.1.3. 表达载体

本试验所用到的 UBI-pCANBIA1301 表达载体购自于北京信诺金达生物科技有限公司, 该载体的启动子为 Ubi 启动子, 标记基因为 GUS 基因, 抗性基因为卡那霉素抗性基因, 植物筛选标记基因为潮霉素抗性基因。UBI-pCANBIA1301 质粒图谱见图 1。

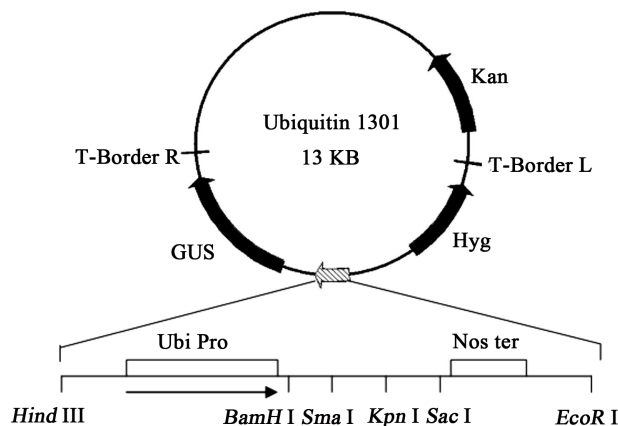


Figure 1. Plasmid profile of UBI-pCANBIA1301

图 1. UBI-pCANBIA1301 质粒图谱

Table 1. miR396a and miR396f precursor sequence

表 1. miR396a 和 miR396f 前体序列

基因名称	序列(5'~3')
miR396a 前体	ggtccttctgtatttccacagcttcttgaactgcacatccatccatggttctgagatctgaattgcagttcaataaagctgtgggaaattacgagcagag accaaagaagcagaattctaatacaccgctgtatgatcttccctgtaagtcaacaatttataatattttgatgctaaaataacaattttgtattcc
miR396f 前体	tgtccatacctctctatctccatggatccctcaagaatttgagcceaagaagatcagtcagaaactagattgtggtatataattttccacggcttctgaaactgtaccc taatctattctctctcatgcaatttcccttaacaaaaggaaaatggaatgaaaggaaagcagatcattcggcgacaattcaagaaagcagtggaataacatga cacatctctctcactcgcacatcccccagttgcaaaatgaggttgatgccaacaaattcttctttcaaaatgagccgaggttctctgctcttaattcaggttctgtg taattactgcttttaattcaagatatactgctttatactgaattttctgttgagattctgctctgtttaaaactgtgtacataaggtatattatcatgaattta gattacctcgaactggatgaaattgaactctgttttctc

2.1.4. 菌株

本试验所用到的农杆菌 EHA105 菌株来自于北京市农林科学院蔬菜花卉研究所西瓜课题组，大肠杆菌菌株 T1 购自于北京 TaKaRa 公司。

2.1.5. 试剂

DNA 提取试剂盒、PCR 所用的反应体系以及卡那霉素和氨苄青霉素均购自于北京 TaKaRa 公司，切胶回收试剂盒、酶切连接用到的试剂以及 BamHI 酶和 KpnI 酶均购自北京宝生物工程有限公司，琼脂糖凝胶回收试剂盒以及其他试剂则购北京自天根生化科技有限公司。

2.1.6. 培养基

LB 液体培养基和固体培养基均是参照已有实验配方自行配制而成[11]。

2.2. 试验方法

2.2.1. 山丹总 DNA 提取

在无菌工作台中，取新鲜的山丹无菌苗的叶片，立即置于液氮中速冻，然后用 DNA 提取试剂盒，提取山丹叶片的总 DNA。

2.2.2. miR396a 和 miR396f 前体引物合成

引物设计运用 DNAMAN，酶切位点确定运用 VectorNTISuite7，参照 UBI-pCambia1301 多克隆位点以及 miR396a 和 miR396f 前体的酶切位点，在基因片段的 5'端引入 BamHI 酶切位点，在 3'端引入 KpnI 酶切位点，并且在两端加保护碱基，交给华大基因合成引物，miR396a 前体的引物扩增目的片段长度为

227 bp, 退火温度为 60℃, miR396f 前体的引物扩增目的片段长度为 489 bp, 退火温度为 60℃, 引物序列如下(大写字母部分为引入的酶切位点, 划线部分为引入的保护碱基):

miR396a 前体的正向引物: ataGGATCCggtcctctgtattcttc

miR396a 前体的反向引物: ggGGTACCggaatacaaaattgtaat

miR396f 前体的正向引物: ataGGATCCttcaagaatttgagccaaag

miR396f 前体的反向引物: ggGGTACCgagaaaacagaagtcaatt

2.2.3. 百合 miR396a 和 miR396f 前体克隆

以山丹总 DNA 为模板, 加入合成好的引物, 进行 PCR 反应。反应体系为 25 μ L, 其中模板 1 μ L、引物各 1 μ L、Mix 12.5 μ L、ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 20 s, 60℃ 20 s, 72℃ 30 s 共 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min; 4℃ 保存。

反应结束后, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶检测及回收, 电泳检测条带长度正确后, 进行下一步试验。

2.2.4. miR396a 和 miR396f 克隆载体构建

将切胶回收的 miR396a 和 miR396f 各取 5 μ L, 分别与 1 μ L T1 Simple cloning Vector 混合后, 25℃ 反应 5 min。结束后将此 4 μ L 产物加入到 100 μ L 的 T1 大肠杆菌感受态中, 用冻融法进行转化后, 加入 250 μ L 室温的 LB 培养基, 在 37℃ 的条件下摇晃培养 1 h。取 8 μ L 500 mM 的 IPTG 和 40 μ L X-gal 混合, 均匀的涂在固体 LB 平板上, 37℃ 放置 30 min。然后将培养了 1 h 的转化后的 T1 大肠杆菌离心后取沉淀, 涂在上一步制好的平板上, 置于 37℃ 下过夜培养 12 h, 进行蓝白斑筛选。

挑取白斑于 10 μ L 的 ddH₂O 中, 取其中 1 μ L 进行菌液 PCR 鉴定, 其余 9 μ L 加到具有抗性的 500 μ L LB 液体培养基(含有氨苄青霉素 50 mg/L)中, 小摇 6 h, 取 PCR 鉴定中电泳条带长度为目的条带长度的菌液, 进行测序鉴定 miR396a 和 miR396f 的单克隆载体构建成功。

2.2.5. miR396a 和 miR396f 表达载体构建

双酶切连接时, 先对 T1-miR396a 和 T1-miR396f 和 UBI-pCAMBIA1301 质粒进行双酶切。双酶切体系为 10 \times FastDigest Green Buffer 2 μ L, 质粒 10 μ L, FastDigest BamHI 1 μ L, FastDigest KpnI 1 μ L, 加 ddH₂O 到 20 μ L; 配制好双酶切体系后混匀, 37℃ 放置 30 min, 进行酶切反应, 酶切后回收载体及目的片段。

再按照连接体系加入酶切产物, 连接体系共 20 μ L, 其中 10 \times Reaction Buffer 2 μ L, 目的片段回收产物 10 μ L, UBI-pCAMBIA1301 回收产物 4 μ L, T4 DNA Ligase 1 μ L, ddH₂O 3 μ L, 22℃ 反应 60 min, 进行连接转化。取出感受态细胞 T1 放于解冻后加入连接产物, 用冻融法将连接好的载体转化到大肠杆菌中; 每管加 800 μ L 没有抗生素的 LB 液体培养基, 37℃ 振荡复苏, 离心 1 min 后涂布到抗性平板上; 平板放置于室温吹干, 倒置于 37℃ 培养箱培养菌落。然后各选取 8 个菌落进行菌落 PCR 鉴定, 确定条带大小是目的条带大小后, 再选取前两个送去公司进行测序验证, 验证结果正确, 说明 miR396a 和 miR396f 表达载体构建成功。

2.2.6. UBI-pCANBIA1301-396a 和 UBI-pCANBIA1301-396f 质粒转化农杆菌

首先制备农杆菌感受态, 并提取构建好的质粒载体。活化待转化的农杆菌和含有表达载体质粒的大肠杆菌, 当农杆菌菌液 OD₆₀₀ 约为 0.6 的时候, 用常规的感受态制备方法进行农杆菌感受态制备[12]。当大肠杆菌菌液 OD₆₀₀ 约为 0.6 的时候, 用质粒提取试剂盒对含有 UBI-pCANBIA1301-396a 质粒和 UBI-pCANBIA1301-396f 质粒的大肠杆菌进行质粒提取。

最后进行 UBI-pCANBIA1301-396a 质粒和 UBI-pCANBIA1301-396f 质粒转化农杆菌 EHA105 的感受

态。取 5 μ L 提取好的载体质粒 DNA, 加入到刚解冻的 200 μ L 农杆菌 EHA105 的感受态中, 用冻融法进行转化, 然后在其中加入 1 ml 常温的 LB 液体培养基(含利福平 50 mg/L), 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 8 h; 取 100 μ L 涂于具有抗性的 LB 平板(含利福平 50 mg/L 和卡那霉素 50 mg/L), 28 $^{\circ}$ C 培养 28 h。挑取单菌落于 1 ml 具有抗性的液体 LB 培养基(含利福平 50 mg/L 和卡那霉素 50 mg/L), 小摇 6 h; 取小摇后的菌液做菌液 PCR 进行检测验证, 将确认转化成功的菌液加入到 5 ml 的液体 LB 培养基(含利福平 50 mg/L 和卡那霉素 50 mg/L)中, 进行过夜摇菌, 当菌液的 OD600 约为 0.6 的时候, 保存于-80 $^{\circ}$ C, 以备后续试验所用。

3. 结果分析

3.1. 百合 miR396a 和 miR396f 前体克隆

以山丹总 DNA 为模板, 进行 miR396a 和 miR396f 前体目的片段扩增, 分别得到 227 bp 和 489 bp 大小的片段, 和目的条带大小一致, 如图 2。

3.2. miR396a 和 miR396f 表达载体构建

对含有 miR396a 和 miR396f 表达载体的大肠杆菌, 各选 8 个菌落, 以抗性菌落为模板进行菌落 PCR 鉴定, 电泳显示的 PCR 条带长度和目的条带长度一致, 如图 3。

3.3. 表达载体转化农杆菌 EHA105

用构建好的 UBI-pCAMBIA1301-396 和 UBI-pCAMBIA1301-396f 载体, 转化农杆菌 EHA105, 转化后进行抗性菌落筛选和菌液 PCR 验证, 确认目的基因转化正确, 如图 4。

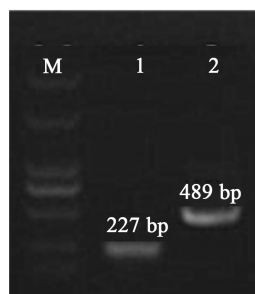


Figure 2. Electrophoretic map of the purpose gene. Lane M: DNA Maker of DL2000 (From top to bottom respectively 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp); Lane 1: miR396aprecursor fragments; 2: miR396fprecursor fragments

图 2. 目的基因扩增电泳图。泳道 M: DL2000 的 Maker (从上到下分别为 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp); 泳道 1: miR396a 前体片段; 泳道 2: miR396f 前体片段

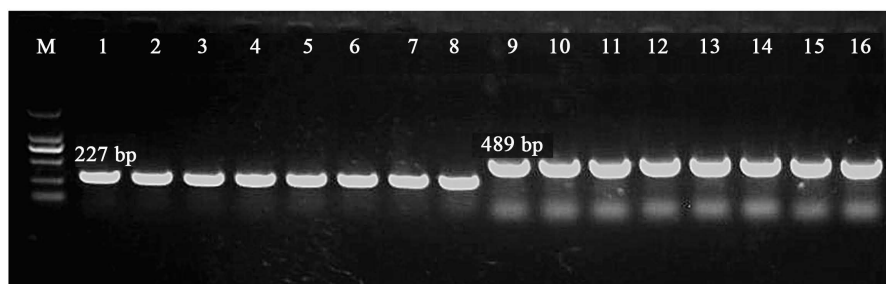


Figure 3. Colony PCR for rapid identification of positive clones. Lane M: DNA Maker of DL2000 (From top to bottom respectively 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp); Line 1 - 8: T1-miR396a colony PCR; 9 - 16: T1-miR396f colony PCR

图 3. 菌落 PCR 快速鉴定阳性克隆。泳道 M: DL2000 的 Maker (从上到下分别为 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp); 泳道 1~8: T1-miR396a 的菌落 PCR 条带; 泳道 9~16: T1-miR396f 的菌落 PCR 条带

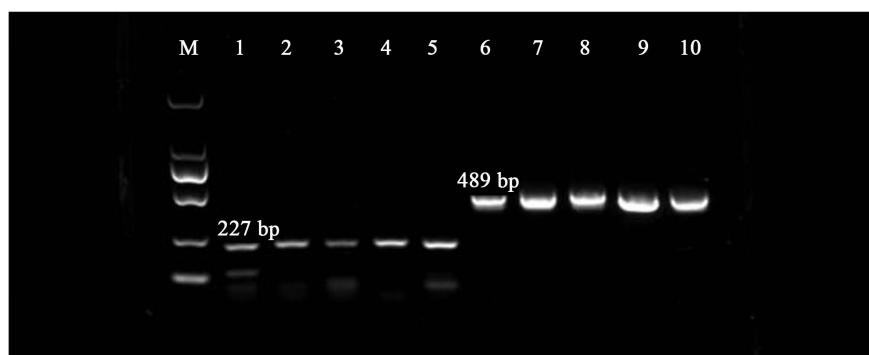


Figure 4. Recombinant UBI-pCambia1301-396a/f *Agrobacterium* colony PCR identification. Lane M: DNA Maker of DL2000 (From top to bottom respectively 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp); Line 1 - 5: UBI-pCambia1301-396a colony PCR; 6 - 10: UBI-pCambia1301-396f colony PCR

图 4. 重组载体 UBI-pCambia1301-396a/f 农杆菌菌落 PCR 鉴定。泳道 M: DL2000 的 Maker (从上到下分别为 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp); 泳道 1~5: UBI-pCambia1301-396a 的菌落 PCR 条带; 泳道 6~10: UBI-pCambia1301-396f 的菌落 PCR 条带

4. 讨论

构建表达载体时,选择合适的植物表达载体,对于目的基因在植株中的稳定遗传和高效表达有着至关重要的作用,表达载体中不同类型的启动子,对于外源基因的启动作用也有着很大的差异。启动子也称作顺式作用元件,选择合适的启动子,可以启动外源基因在受体植株中高效地转录和表达。玉米 Ubiquitin 基因是编码含有 76 个高度保守的氨基酸的玉米的泛素蛋白,Beer 等人研究表明,在单子叶植物中,这个基因的 Ubiquitin 启动子有着较强的启动表达作用,并且可以同时多种细胞功能起到调控作用[13],而且当植物处于胁迫条件的时候,Ubiquitin (Ubi)启动子的表达作用会增强[14]。因为本试验旨在为培育有抗逆性的百合奠定基础,而百合又属于单子叶植物,为使转入目的基因的百合,在逆境胁迫时,高效表达目的基因,从而使百合表现抗性,所以本试验选取具有 Ubi 启动子的 UBI-pCambia1301 载体作为 miR396a 和 miR396f 的表达载体。

在遗传转化试验中常常用到的农杆菌可分为章鱼碱型、农杆菌型和胭脂碱型三种类型,不同类型的农杆菌由于染色体背景不同,侵染能力也有很大的差别,不同的物种最适的农杆菌类型也不同[15]。在百合遗传转化中,常用到的农杆菌为 GV3101、AGL0 和 EHA105 菌株,EHA105 菌株是一种超毒性菌株,张倩等人研究发现 EHA105 农杆菌菌株侵染百合的能力要优于 GV3101 和 AGL0 菌株[16],所以本试验选取 EHA105 菌株作为侵染菌株。

miR396 基因家族的靶标基因是 GRFs 基因[17],GRF 基因是一类植物特有的调控因子,它具有两个高度保守的结构域[18],而且 GRF 基因在其他很多植物中都有研究报道,例如拟南芥、水稻、杨树、番茄、落叶松等植物,它在植物的根部发育、抗逆、花器官发育和叶片发育等多方面都有着调控作用[19],所以在百合中很有可能也存在着 GRF 基因,所以构建 miR396a/f 对于后续培育抗百合枯萎病新品种百合有着深远的意义。

致 谢

该试验可以顺利的完成,感谢北京农学院研究生科研创新项目(项目号 5056516006/020)的支持。感谢我的师姐们对我提供的指导和帮助,感谢崔霞霞、张奋强等同学为我提供试验材料和帮助,感谢我的师弟师妹对我的试验提供的帮助,感谢内蒙古蒙草生态环境(集团)股份有限公司抗旱植物研究所为我提供山丹试验材料。

参考文献 (References)

- [1] 包满珠. 花卉学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 265-267.
- [2] 朱茂山, 关天舒. 百合主要病害及其防治关键技术[J]. 辽宁农业科学, 2007(6): 41-43.
- [3] 刘冬云. 野生山丹种质资源遗传多样性及利用研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [4] 李诚, 李俊杰, 薛春胜, 等. 百合枯萎病病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 1996, 26(2): 192-193.
- [5] Lee, R.C., Feinbatm, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin. *Cell*, **75**, 843-845. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- [6] Reinhart, B.J., Slack, F., Basson, M., Pasquinelli, A., Bettinger, J., Rotgvie, A., Horvitz, H.R. and Rtktn, G. (2000) The 21-Nucleotide let-7 RNA Regulates Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **403**, 901-906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
- [7] Jones-Rhoades, M.W., Bartal, D.P. and Bartel, B. (2006) MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 19-53. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218>
- [8] 鲍茂林. 拟南芥 MIR396 家族对靶基因的调控及对根发育的影响[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [9] Bao, M., Bian, H., Zha, Y., *et al.* (2014) miR396a-Mediated Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor bHLH74 Repression Acts as a Regulator for Root Growth in Arabidopsis Seedlings. *Plant and Cell Physiology*, **7**, 1343-1353. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu058>
- [10] Liu, H.H., Tian, X., Li, Y.J., *et al.* (2008) Microarray-Based Analysis of Stress-Regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, **14**, 836-843. <https://doi.org/10.1261/rna.895308>
- [11] 黄伟华. 拟南芥 26S 蛋白酶途径和转录延伸因子 Elongator 调控叶片近轴面-远轴面极性建成的研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 中国科学院上海生命科学研究院, 2007.
- [12] 王学全, 沈晓, 何赟绵, 任天年, 吴梧桐, 奚涛. 个奶农杆菌 EHA105 和 LBA4404 冻融法转化条件的优化研究[J]. 药物生物技术, 2011, 18(5): 382-386.
- [13] Beers, E.P., Moreno, T.N. and Callis, J. (1992) Subcellular Localization of Ubiquitinated Proteins in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 15432-15439.
- [14] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (2001) Molecular Cloning. *A Laboratory Manual*, **49**, 411.
- [15] 马春业. 农杆菌介导 miR396 基因对大麦愈伤组织的遗传转化[D]: [硕士学位论文]. 广州: 华中农业大学植物科学技术学院, 2016.
- [16] 张倩. 麝香百合胚性愈伤诱导及农杆菌介导的遗传转化体系的优化[D]: [硕士学位论文]. 广州: 华中农业大学, 2013.
- [17] Kim, V.N., Han, J. and Siomi, M.C. (2009) Biogenesis of small RNAs in Animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 126-139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>
- [18] 肖霞. 落叶松 miR396 对体细胞胚发育的调控及 GRF 基因的表达研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [19] 宋琳琳. 基因枪和农杆菌介导 MiR396 基因对小麦品种的遗传转化[D]: [硕士学位论文]. 广州: 华中农业大学植物科学技术学院, 2016.

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: 2168-5665, 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: br@hanspub.org