

丹参植株原位侵染 RNAi 毛状根体系的建立及其干扰效果

毛亚平¹ 马莹^{1,2} 卜俊玲¹ 曾雯¹ 郭娟¹ 陈敏¹ 黄璐琦¹

(1 中国中医科学院中药资源中心,北京,100700; 2 北京师范大学中药资源保护与利用北京市重点实验室,北京,100875)

摘要 目的:利用土培植物进行原位侵染获得 RNAi 型丹参毛状根,并对其干扰效果进行研究。方法:利用转化有目标基因 RNAi 载体的发根农杆菌对土壤中生长的丹参幼苗根茎部分进行侵染产生毛状根,经荧光显微镜鉴定阳性毛状根,并利用实时荧光定量 PCR 检测目标基因的表达情况。结果:在土培丹参根茎部分成功侵染产生毛状根,利用荧光显微镜进行检测显示目标基因 RNAi 型毛状根阳性转化率为 72.72%,RNAi 空载毛状根阳性转化率为 66.67%。实时荧光定量 PCR 结果表明 RNAi 型毛状根中目标基因表达受到抑制,表达量下降到空载型对照组的 8.61%,证明对土培植物直接进行侵染能够成功诱导 RNAi 毛状根。结论:采用原位侵染法诱导丹参根茎部位成功产生阳性 RNAi 型毛状根,侵染过程无需无菌操作,简单快捷,对植株生长无影响,能够用于功能基因的体内功能研究。

关键词 丹参;毛状根;原位侵染;RNAi

Study on Construction of RNAi Hairy Roots System of *Salvia Miltiorrhiza* Plants by In Situ Infection and Its Jamming Effects

Mao Yaping¹, Ma Ying^{1,2}, Bu Junling¹, Zeng Wen¹, Guo Juan¹, Chen Min¹, Huang Luqi¹

(1 TCM Resource Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 10070, China; 2 Beijing Key Laboratory of Protection and Application of Chinese Medical Resources, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract Objective: To study the jamming effects of RNAi hairy roots of *Salvia Miltiorrhiza* by in situ infection of soil cultivating plants. **Methods:** Hairy roots were induced by infection of *Agrobacterium rhizogenes* transformed with the RNAi vector of target gene into the roots of *Salvia Miltiorrhiza* which were planted in the soil. Positive hairy roots were identified by fluorescence microscope. The expression of target gene was detected by qRT-PCR analysis. **Results:** Hairy roots were induced from the roots of *Salvia Miltiorrhiza* successfully. GFP detection results showed that positive conversion rates of hairy root lines of target gene RNAi and empty vector were 72.72% and 66.7%, respectively. qRT-PCR analysis revealed that the expression of target gene in RNAi hairy roots was significantly decreased to 8.61% compared with empty vector, which indicated that RNAi hairy roots were successfully induced from the soil planted *Salvia Miltiorrhiza* by in situ infection. **Conclusion:** Positive target gene-RNAi *Salvia Miltiorrhiza* hairy roots were successfully induced from the soil planted *Salvia Miltiorrhiza* by in situ infection. As the infection required no sterile operation, it was not only simple and quick, but also would not affect plant growth and development. It can be applicable to functional characterization of gene in vivo.

Key Words *Salvia Miltiorrhiza*; Hairy root; In situ infection; RNAi

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.02.004

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge.)的干燥根及根茎,丹参中脂溶性的丹参酮类化合物(Tanshinones)具有抗血栓、抗肝纤维化、抗炎、抗菌以及抗肿瘤等生物活性^[1-3]。解析丹参酮生物合成途径,并利用代谢工程的手段来调节丹参酮的含量对中药资源的可持续利用和发展具有重大的意义。

药用植物活性成分生物合成途径解析成为近 5

年中药研究的热点领域之一,对候选基因进行功能研究是生物合成途径解析的关键。基因功能研究包括体外功能研究和体内功能研究,体外酶促反应是植物基因验证功能的重要手段之一,具有快捷、方便的优点,但体外酶促反应会受到底物不明确,底物量不足等因素限制。植物具有极其复杂的代谢网络导致其次生代谢物的积累会受到众多因素的影响,如催化合成产物的功能基因,代谢途径的转录因子,中

基金项目:国家自然科学基金项目(81573532,81202871,81403049);中央本级重大增减支项目(2060302)——名贵中药资源可持续利用能力建设项目;湖南省高校湖湘中药资源保护与利用 2011 协同创新中心

作者简介:毛亚平(1994.06—),女,硕士研究生,研究方向:分子生药学,E-mail:maoyapinggzx@163.com

通信作者:郭娟(1983.03—),女,研究生,副研究员,研究方向:分子生药学,Tel:(010)64014411-2956,E-mail:guojuanzy@163.com;陈敏(1961.03—),女,本科,研究员,研究方向:中药资源及分子生药学,E-mail:cm315keke@163.com

间产物转运酶和植物自身受到来自外界化学和生物刺激等,都会影响代谢产物的合成和积累。因此,为了更加明确基因在植物代谢网络中发挥的功能和作用,其催化功能在植物体外由原核、真核表达及体外酶促等手段经过验证后还需要在植物体内对基因的功能进行研究。

利用叶盘法产生 RNAi (RNA Interference) 毛状根是药用植物基因功能研究的重要方法之一,该方法主要利用转化有目标基因 RNAi 载体的发根农杆菌侵染外植体,产生 RNAi 型毛状根。该系统具有生长速度快,周期短,稳定遗传,不需要外源植物激素等优点,是基因体内验证研究的常用方法。Cheng 等^[4]利用该技术对丹参酮生物合成途径的萜类合酶基因 SmCPS 进行干扰后发现丹参酮 IIA 等有效成分的含量显著降低。Ma 等^[5]构建了丹参 CYP76AH1 的 RNAi 毛状根体系,CYP76AH1-RNAi 型毛状根系中底物次丹参酮二烯含量的显著上升和产物铁锈醇含量的显著下降揭示了 CYP76AH1 在丹参植物体内的催化功能,下游途径中 4 个主要丹参酮类化合物含量的显著下降验证了 CYP76AH1 在丹参酮类化合物生物合成途径中的关键作用。研究表明,利用叶盘法进行 RNAi 毛状根诱导能够有效抑制目标基因的表达,导致代谢产物发生变化,从而验证基因在植物体内的功能。

然而叶盘法诱导需要经历预培养、共培养、选择培养、愈伤形成等过程,诱导周期长并且毛状根的遗传转化需要在无菌的环境中进行,具有一定的风险。而对土培植物直接进行侵染诱导出毛状根相比之下更为简便,通过在组织上划出伤口,将发根农杆菌直接接种在伤口处,共培养一段时间后,在植株接种部位能够诱导产生毛状根。该方法已经成功应用在乌拉尔甘草和桑树等药用植物研究中^[6-7]。本研究拟在重要药用植物丹参中建立原位毛状根侵染诱导体系,以丹参酮生物合成途径重要修饰酶基因 CYP76AH1 为目的基因^[8],构建 RNAi 载体,转化发根农杆菌,侵染土培丹参植株的根茎部位,得到既含有丹参自身主根、须根,又含有目的基因 RNAi 片段转基因毛状根的复合型丹参植株,利用绿色荧光蛋白筛选转化毛状根以用于基因表达和代谢物谱分析。通过建立丹参毛状根的原位侵染诱导的方法,为丹参酮下游基因功能研究提供新方法。

1 材料

1.1 药物 植物材料唇形科鼠尾草属植物紫花丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)。实验材料为发根农杆菌

(*Agrobacterium rhizogenes*) 诱导此丹参生成的毛状根。菌株和载体发根农杆菌 C58C1 为本实验室保存菌种,植物 RNAi 表达载体 pK7WIWG2D 为本实验室保存载体,pK7GWIWG2D-AH1 为实验室前期构建载体^[5]。

1.2 试剂与仪器 PrimeScript™-RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), SYBRPremix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)(由大连宝生物工程有限公司生产);RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司生产);所用引物均由生工生物工程(上海)有限公司生产合成。实验仪器 LightCycler® 480II 高通量实时荧光定量 PCR 系统(Roche Applied Science);680X 凝胶成像分析系统(基因有限公司);Axio Scope A1 荧光显微镜(Zeiss)。

1.3 方法

1.3.1 土培丹参原位毛状根诱导 取播种后 40 ~ 60 d 的丹参幼苗,利用注射器针头在主根上部和根茎处轻划形成伤口,用注射器分别吸取含有野生型发根农杆菌、转化有 RNAi 空载体 pK7WIWG2D 和 pK7GWIWG2D-AH1 表达载体的发根农杆菌菌液侵染损伤部位后浸润 1 ~ 2 h^[9],在损伤部位周围放置 1 层大小足以覆盖至花盆边缘的锡箔纸,防止毛状根与丹参自身主根、须根混杂,在锡箔纸上方盖好土壤,进行毛状根诱导和培养。

1.3.2 毛状根荧光显微鉴定 将伤口处长出的毛状根尖切下 1 cm 左右大小制片后,于倒置荧光显微镜蓝色激发光源下观察,按照公式计算转化率。

1.3.3 测定干扰毛状根基因表达量 利用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取丹参毛状根总 RNA。NANO Drop 核酸定量仪测定 RNA 浓度后,反转录成总 cDNA。利用软件 Primer 5.0 设计 qRT-PCR 引物,以 cDNA 为模板,以野生型、空载型为对照,利用实时荧光定量 PCR 检测 RNAi 毛状根中 CYP76AH1 基因的相对表达量。见表 1。

表 1 PCR 扩增所用引物

引物名称	引物序列	作用
qRT-AH1-F	TCGTGGATGAGTCGGCAAT	qRT-PCR 扩增
qRT-AH1-R	TGAGTATCTGAGTTCCCT	

2 结果

2.1 CYP76AH1-RNAi 型毛状根产生 前期研究表明,pK7GWIWG2D-AH1 载体能够成功抑制 RNAi 毛

状根中 CYP76AH1 的表达,并对代谢产物的积累产生影响^[5]。本研究中利用转化有 pK7GWIWG2D-AH1 载体的发根农杆菌直接侵染土培丹参的根以及根茎部位,经过诱导培养,约 15 d 后在主根上部和根茎伤口处生长出透明毛状根,植株被侵染过后其生长并没有受到影响。毛状根在主根上部和根茎伤口部位发出,主要在锡箔纸的上层贴近生长,约 30 d 后即获得大量的 CYP76AH1-RNAi 型毛状根。见图 1。



图 1 既含有自身主根、须根又含有 CYP76AH1-RNAi 型毛状根的复合丹参植株

注: A 和 B 分别为转入 pK7GWIWG2D-AH1 载体和转入 pK7GWIWG2D-空载体发根农杆菌侵染产生的复合丹参植株

2.2 毛状根诱导率检测 取被侵染丹参的锡箔纸以上部分的毛状根于倒置荧光显微镜下检测,可以观察到转化 RNAi 空载体(图 2A,2B)与目的基因 CYP76AH1 干扰载体(图 2C,2D)的丹参毛状根在蓝色(450~490 nm)激发光下会发射出稳定的绿色荧光(520 nm),而利用野生型发根农杆菌 C58C1 侵染产生的毛状根(图 2E,2F)仅在自然光下可见,在蓝色激发光下无荧光。通过 GFP 检测对其阳性转化率进行统计以及计算,显示 CYP76AH1-RNAi 型毛状根阳性转化率为 72.72%,空载型毛状根阳性转化率为 66.67%。

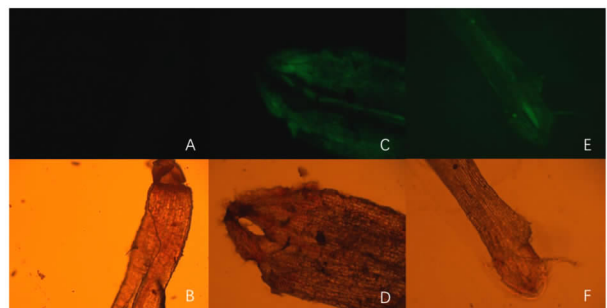


图 2 倒置荧光显微镜下鉴定阳性毛状根

注: A、B:野生型毛状根;C、D: CYP76AH1 RNAi 型毛状根;E、F:空载型转基因毛状根。A、C、E:蓝色激发光下视野;B、D、F:自然光下视野图

2.3 CYP76AH1-RNAi 型毛状根基因表达量检测 选择生长状况大致相同的丹参野生型、空载型和 CYP76AH1-RNAi 型毛状根提取总 RNA,反转录成 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR 分析。见图 3。

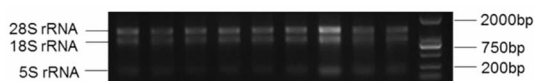


图 3 丹参毛状根总 RNA 提取电泳图

对实时荧光定量 PCR 结果进行归一化处理后进行差异显著性分析,分析结果显示野生型和空载型毛状根之间没有显著性差异,CYP76AH1-RNAi 型毛状根中目标基因 CYP76AH1 表达量显著下降至空载型毛状根的 8.61%,证明原位侵染法诱导丹参毛状根体系构建成功,其干扰效果明显。见图 4。

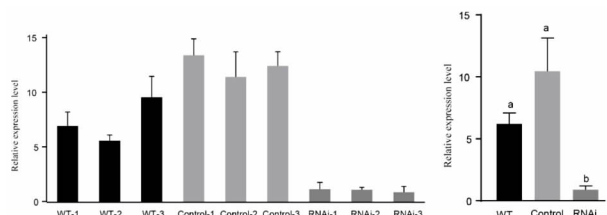


图 4 野生型、空载型及 RNAi 型毛状根目的基因表达量差异性分析

3 讨论

RNAi 技术通过抑制目的基因的表达,导致代谢物积累发生改变,从而验证目的基因在植物复杂代谢网络中的作用。在本研究中利用原位侵染法以发根农杆菌侵染土培丹参植株产生毛状根,以丹参酮生物合成途径中第一个 P450 基因 CYP76AH1 为目的基因进行方法研究。实时荧光定量 PCR 分析结果显示,CYP76AH1-RNAi 型丹参毛状根中 CYP76AH1 基因表达量显著低于野生型、空载型毛状根,说明该体系对目标基因具有较好的干扰效果,可以用于丹参酮生物合成途径其他基因的功能研究。

目前发根农杆菌介导的转化方法有 3 种。外植体接种法严格要求无菌环境且耗时较长,原生质体共培养法则要求原生质体具有较高的再生率,植物体原位侵染法最为省时简便^[10]。在土培植物上采用原位侵染法诱导产生毛状根,在植株自身生长的自然环境下即可利用发根农杆菌进行侵染操作,不要求严格的无菌环境下,侵染过后植株生长情况正常,1 个月左右便能产生足够的毛状根用于基因表达和代谢物分析,诱导产生的毛状根具有较高的阳性转化率并且能有效地对目标基因进行干扰。整个体系建立的过程省时、简单且便于操作、侵染过程无需无菌操作,极大地提高了实验效率。基于以上优点,直接侵染法作为一种构建 RNAi 型毛状根体系的有效方法,可应用到根系药用植物例如人参、三七

(下接第 263 页)

- the Chinese “Thunder of God Vine” is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice[J]. Cancer Research, 2006, 66(9):4758-4765.
- [4] Astry B, Venkatesha S H, Laurence A, et al. Celastrol, a Chinese herbal compound, controls autoimmune inflammation by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells in the target organ[J]. Clinical Immunology, 2015, 157(2):228-238.
- [5] Lu L, Li F, Wang X. Novel anti-inflammatory and neuroprotective agents for Parkinson's disease[J]. Cns & Neurological Disorders Drug Targets, 2010, 9(9):232-240.
- [6] Junli L, Jaemin L, Mario Andres S H, et al. Treatment of obesity with celastrol[J]. Cell, 2015, 161(5):999-1011.
- [7] Corson T W, Crews C M. Molecular understanding and modern application of traditional medicines; triumphs and trials[J]. Cell, 2007, 130(5):769-74.
- [8] Harayama S, Kok M, Neidle E L. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases[J]. Annual Review of Microbiology, 1992, 46(46):565-601.
- [9] Guo J, Ma X, Cai Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones[J]. New Phytologist, 2016, 210(2):525-534.
- [10] Zhao Q, Cui M Y, Levsh O, et al. Two CYP82D Enzymes Function as Flavone Hydroxylases in the Biosynthesis of Root-Specific 4'-Deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis* [J]. Molecular Plant, 2017, 11(1):135-148.
- [11] Porter TD. Electron Transfer Pathways in Cholesterol Synthesis[J]. Lipids, 2015, 50(10):927-936.
- [12] Rasbery JM, Shan H, Leclair RJ, et al. Arabidopsis thaliana squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(23):17002-17013.
- [13] Laranjeira S, Amorim-Silva V, Esteban A, et al. Arabidopsis Squalene Epoxidase 3 (SQE3) Complements SQE1 and Is Important for Embryo Development and Bulk Squalene Epoxidase Activity[J]. 分子植物:英文版, 2015, 8(7):1090-1102.
- [14] 周家伟, 刘雨佳, 胡添源, 等. 雷公藤 PTEN 基因全长克隆及表达分析[J]. 中草药, 2017, 48(7):1391-1396.
- [15] 胡添源, 苏平, 张逸风, 等. 雷公藤单萜合酶基因 TwMS 的克隆及蛋白表达分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7):1312-1318.
- [16] Geyter ND, Gholami A, Goormachtig S, et al. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(6):349-359.
- [17] Misra RC, Ghosh S. Methyl jasmonate-elicited transcriptional responses and pentacyclic triterpene biosynthesis in sweet basil[J]. Plant Physiology, 2014, 164(2):1028-1044.

(2017-12-05 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 258 页)

等植物次生代谢产物生物合成途径功能基因的挖掘和功能研究中。

参考文献

- [1] Husna B, On T, Zhu YZ. Effects of purified *Salvia miltiorrhiza* extract on cardiac vascular smooth muscle hypoxic cells[J]. J Pharmacol Sci, 2007, 104(3):202-211.
- [2] Gao HW, Sun W, Zhao JP, et al. Tanshinones and diethyl blechnics with anti-inflammatory and anti-cancer activities from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) [J]. Sci Rep, 2016(6):33720.
- [3] Parajuli D R, Zhao Y Z, Jin H, et al. Anti-fibrotic effect of PF2401-SF, a standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza*, in thioacetamide-induced experimental rats liver fibrosis[J]. Arch Pharm Res, 2015, 38(4):549-555.
- [4] Cheng Q, Su P, Hu Y, et al. RNA interference-mediated repression of SmCPS (copalyl diphosphate synthase) expression in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* causes a decrease of tanshinones and sheds light on the functional role of SmCPS[J]. Biotechnol Lett, 2014, 36(2):363-369.
- [5] Ma Y, Ma XH, Meng FY, et al. RNA interference targeting CYP76AH1 in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* reveals its key role in the biosynthetic pathway of tanshinones[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(2):155-160.
- [6] 郭生虎, 王敬东, 马洪爱. 乌拉尔甘草毛状根的诱导及培养体系的建立[J]. 西北农业学报, 2012, 21(12):138-141.
- [7] 孔卫青, 杨金宏, 卢从德. 发根农杆菌诱导桑树毛状根体系的建立[J]. 西北植物学报, 2010, 30(11):2317-2320.
- [8] Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of mitratriene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(29):12108-12113.
- [9] Hatlestad GJ, Sunnadeniya RM, Akhavan NA, et al. The beet R locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production[J]. Nat Genet, 2012, 44(7):816-820.
- [10] 胡亚忱, 曲德业. 发根农杆菌诱导植物毛状根的发生及次生代谢物生产的研究进展[J]. 吉林师范大学学报:自然科学版, 2005, 26(1):31-32, 35.

(2017-12-05 收稿 责任编辑:张文婷)