

果实特异性 RNAi 介导的 *Lcy* 基因沉默来增加番茄中番茄红素的含量 Fruit-specific RNAi-mediated *Lcy* Gene Silencing Enhances Content of Lycopene in Tomatoes

万 群, 张兴国*, 宋 明

WAN Qun, ZHANG Xing-Guo* and SONG Ming

重庆西南大学园艺园林学院, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400716

Key Laboratory in Olericulture of Chongqing, College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China

摘 要 根据 GenBank 中番茄的番茄红素 β -环化酶(*Lcy*)基因序列和八氢番茄红素去饱和酶基因(*Pds*)启动子序列设计特异引物从番茄基因组 DNA 中分别扩增出了 *Lcy* 基因的高度保守的长 302bp 的 DNA 片段和长 1790 的 *Pds* 启动子片段。根据 RNAi 的原理, 将 *Lcy* 基因的 DNA 片段以正反两个方向通过一段内含子序列连接在一起形成 RNAi 片段, 将该片段与 *Pds* 启动子一起插入到 pVCT2020 的表达载体中, 通过农杆菌介导的方法转化番茄, 获得转基因植株 5 棵, PCR 检测证实外源片段已成功导入番茄基因组中。收获转色期后 20d 左右的完全成熟的番茄果实提取番茄红素进行含量分析, 结果显示: 转基因番茄果实中番茄红素的含量极大的增加了。上述结果表明, 通过 RNAi 果实特异性的抑制类胡萝卜素代谢途径中生物合成酶基因的表达能够极大的增加番茄果实中番茄红素的含量。这为通过基因工程手段提高番茄果实中的营养价值提供了参考。

关键词 番茄, RNAi, 果实特异性启动子, *Lcy* 基因, *Pds* 启动子

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0429-05

Abstract Tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) are the principal dietary source of Lycopene which is one of carotenoid and is highly beneficial in preventing some diseases such as the cancer and the heart disease. Suppressing the expression of *Lcy* gene, the main gene regulating the transformation of the lycopene, is a convenient and effective way to enhance the content of lycopene. The primers were designed according to the gene sequence (U46919) and (X86452) in GenBank. The fruit-specific promoter—phytoene desaturase gene (*Pds*) promoter and the DNA segment of the *Lcy* gene were isolated from the genome DNA of tomatoes. The 3' end of *Lcy* DNA segment was connected together by an intron to inform the RNA interferential segment then which was inserted in the expression vector with the *Pds* promoter to inform the fruit-specific expression vector. The vector was transformed into the tomatoes through the *Agrobacterium tumefaciens*. Five transformants were obtained. And the PCR proved that the extra-gene was integrated into the tomato genome. The lycopene in the transgenic tomatoes fruit was increased significantly through analysing the contents of lycopene. These results shows that regulating biosynthetic enzyme in carotenoid pathway by RNAi can improve the lycopene content of plant-derived products.

Key words tomato, RNAi, fruit-specific promoter, *Lcy* gene, *Pds* promoter

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 果实是类胡萝卜素的来源之一, 其中尤以番茄红素 (lycopene) 为主, 番茄中番茄红素的含量最高, 其含

量可达 3~14mg/100g^[1]。近年来国内外许多研究和调查表明: 番茄红素可以猝灭活性氧类物质和清除自由基, 保护细胞内的脂类、脂蛋白、蛋白质和 DNA

等生物大分子免受氧化破坏^[2,3],因此具有抗癌、防癌、防止心血管疾病、保护皮肤等优越的生理功能。番茄红素在西方饮食中非常盛行,已被许多国家批准使用于食品、化妆品和药品^[4]。

让类胡萝卜素合成途径中的早期酶——八氢番茄红素合成酶(*Psy*)基因过量表达来增加番茄果实中番茄红素的含量是一种常规的方法,但该技术容易引起外源基因与内源基因的共抑制^[5],并且可能导致植株矮化^[6]。通过反义 RNA 技术抑制内源基因的表达也是基因工程调控的手段之一,但该技术不能完全抑制目的基因的表达^[7],因此所得到的抑制效果不是很理想。RNA 干涉(RNA interference)是由双链 RNA 引起的强烈、特异的基因沉默,植物的转基因研究表明^[8,15]:导入含有内含子的能转录成双链 RNA 的 DNA 片段的反向重复序列能够实现特异基因的完全沉默,因此 RNAi 现象被发现后,逐渐取代反义 RNA 成为基因沉默的主要手段,Ganga^[9]等采用 RNAi 技术结合果实特异性启动子抑制内源光形态建成调控(endogenous photomorphogenesis regulatory)基因(TDET1)的表达增加番茄果实的番茄红素获得了成功。但目前国内外还没有通过 RNAi 技术果实特异性的抑制番茄红素 β-环化酶(*Lcy*)基因的表达来增加番茄果实中番茄红素含量的报道。

本实验拟通过果实特异性的 RNAi 技术抑制类胡萝卜素代谢途径中 *Lcy* 基因的表达进而抑制番茄红素的降解来增加番茄果实中番茄红素的含量,研究 RNAi 抑制类胡萝卜素代谢途径中生物合成酶基因表达在提高番茄红素含量的中作用;本实验旨在探索一种高效、快速的提高番茄红素含量的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

纯系番茄品种由本实验室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 XL1-blue、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 LBA4404 均为本实验保存材料,克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa;植物表达载体 pVCT2020(用新霉素磷酸转移酶 II(*npt II*)基因替换掉 pCAMBIA1301 质粒载体中潮霉素磷酸转移酶(*hpt*)基因)由本实验室构建;其他相关试剂购自上海生物工程公司。

1.2 番茄 *Pds* 启动子及 *Lcy* 片段的克隆及序列测定

以生长良好的番茄植株的幼叶为材料,采用 CTAB 法提取番茄基因组 DNA。根据 GenBank 中番茄的 *Pds* 启动子序列(U46919)设计特异引物 P1:5'

GAG CAG GTA AAA GCT TCA ATG CCC TA 3';P2:5'GTG CAG AAC CAC TCC CTA TAT CTT CT 3'以番茄 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为:2.5 μL 10× Pfu buffer (Mg²⁺ 20mmol/L),0.5 μL dNTP (10mmol/L),1 μL 上游引物(10pmol/L),1 μL 下游引物(10pmol/L),0.2 μL Pfu DNA 聚合酶(5u/μL),模板 DNA 为 1 μL(100ng/μL),加 ddH₂O 到 25 μL。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3min,94℃ 变性 40s,54℃ 退火 40s,72℃ 延伸 2min 30s,30 个循环,最后 72℃ 延伸 8min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

根据 GenBank 中番茄的 *LcyB* 基因序列(X86452)和 *LcyE* 基因序列(Y14387)设计同源引物 P3:5'CTA TGG TGT TTG GGT GGA TG 3';P4:5'GTG CTC GAT GCA ACT GGC TTC TCT A 3'以番茄 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系同扩增 *Pds* 启动子一样,PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3min;94℃ 变性 40s,53℃ 退火 40s,72℃ 延伸 1min,30 个循环,最后 72℃ 延伸 8min,PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

回收目的片段,做 TA 克隆,PCR 鉴定阳性克隆,获得重组载体 pMD-*Lcy*、pMD-*Pds*,取阳性克隆送上海生工生物技术公司进行序列测定,同时设计特异引物从 pCAMBIA1301 表达载体的 GUS 基因分离内含子片段。

1.3 载体构建

Sal I 酶切 pMD-*Lcy* 后,用 Klenow 大片段补平粘性末端,再用 *BamH I* 酶切纯化后的补平产物,电泳回收 312 左右的 *Lcy* 小片段,将 *Lcy* 片段插入到 *Ecl136 II* + *BamH I* 酶切后的 pMD-*Lcy* 载体中,构建出不含内含子的 *Lcy* 片段正反向连接的重组载体质粒 pMD-sr*Lcy*。*BamH I* 将 pMD-sr*Lcy* 载体质粒酶切去磷酸化后,与 *BamH I* 和 *Bgl II* 酶切 PCR 获得的内含子产物后的小片段连接构建成 RNAi 的中间克隆载体 pMD-RNAi。然后从 pMD-RNAi 载体上切下 RNAi 片段,从 pMD-*Pds* 载体上切下 *Pds* 启动子同时插入到 pVCT2020 中,构建成果实特异性植物表达载体 pVCT-RNAi。热激法将该载体转化大肠杆菌感受态 XL1-blue,含 50mg/L 的氨苄青霉素的 LB 培养基上筛选阳性克隆,PCR 检测阳性克隆,提取阳性克隆的质粒进行酶切鉴定,冷冻法将鉴定正确的质粒转入农杆菌 LBA4404,-80℃ 储存备用。

1.4 番茄子叶的遗传转化

番茄遗传转化参考文献[10],稍作修改。将番茄种子用肥皂水清洗 2~3 次,尽量洗去表皮的粘附

物及绒毛,然后用 10% 的次氯酸钠消毒 30min,再用灭菌水漂洗 3 次。接种于 1/2 MS 培养基上,暗培养 2~3d,直到番茄种子发芽后,于 25℃,光照强度 1800lx,16h 光/8h 暗的光周期条件下培养直到子叶完全展开(大概 7d)。切取无菌苗的子叶于分化培养基(MS + 0.2mg/L IAA + 1mg/L 6-BA + 3% Sucrose)上预培养 2d,用液体 MS 培养基重悬农杆菌至 $OD_{600} = 0.5$,浸染预培养后的子叶 8~10min,灭菌滤纸吸干多余的菌液,接到分化培养基上,黑暗条件下共培养 2d,转入抑菌培养基(MS + 0.2mg/L IAA + 1mg/L 6-BA + 3% Sucrose + 300mg/L 羧苄青霉素 Cb)上培养 7d,然后转入选择培养基(MS + 0.2mg/L IAA + 1mg/L 6-BA + Sucrose + 300mg/L 羧苄青霉素 Cb + 50mg/L 的卡拉霉素 Kan)上进行抗性筛选,每 2 周继代 1 次,其间每次降低 Cb 的浓度。待抗性芽长到 2~3cm 后切下抗性芽,插入到生根培养基(MS + 0.4g/L IAA + 3% Sucrose + 50mg/L 的卡那霉素 Kan)上诱导生根,一个星期后便能长出根系,等根长到 3~4cm 后,将生根后的植株开瓶炼苗 3~5d,然后移栽到大棚中让其自然生长直到结果。

1.5 转基因植株的检测

PCR 检测:提取卡那霉素抗性植株及非转基因植株(阴性对照)的总 DNA,进行 PCR 检测。PCR 引物用 P3 单引物进行扩增,反应体系同扩增 *Lcy* 片段一样,反应条件只由 72℃ 延伸 1min 变为 72℃ 延伸 2min 外,其他条件不变。

1.6 番茄红素的测定

番茄红素的提取和测定参照 Ganga^[9,11]的方法,收获转色期 20d 后的完全红熟的番茄果实每株 2 个,研磨成糊以后,每株称取 10g 番茄糊,加入适量的氯仿在 35℃ 避光提取 4h,离心,转移下层液体至一新的 50mL 的离心管中,向番茄残渣中再加入适量氯仿重复抽提 3 次,最后用氯仿定容到 50mL。用 u-1800 紫外分光光度计在 502nm^[12]的波长下测定番茄红素含量,由于番茄红素标准品价格昂贵,且本身稳定性差,不宜长期保存,因此,本实验用苏丹红 I 代替番茄红素标准品制作标准曲线^[13]。

2 结果

2.1 番茄 *Pds* 启动子及 *Lcy* 片段的克隆及序列测定

根据所设计的特异引物从番茄基因组中分别获得了长 302bp 的 *Lcy* 片段(图 1)和长 1790bp 的 *Pds* 启动子片段(图 2),同时从 pCambia1301 载体中的 GUS 基因中分离了一段内含子片段。测序结果表明

所扩增的片段与 GenBank 中所发表的序列一样。

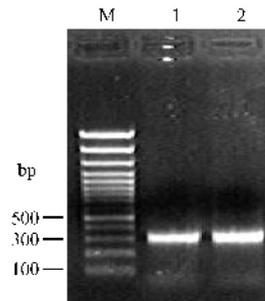


图 1 引物 P1 和 P2 扩增产物

Fig. 1 PCR product of primer P1 and P2

M :100bp DNA ladder plus ; 1 2 :PCR product of P166 and P167.

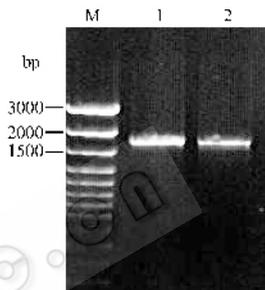


图 2 引物 P3 和 P3 扩增产物

Fig. 2 PCR product of primer P3 and P4

M :100bp DNA ladder plus ; 1 2 :PCR product of P164 and P165.

2.2 植物表达载体的构建

由于农杆菌浸染过程中 T-DNA 之间的片段较小更容易进入植物基因组中^[10],因此在构建载体时,本实验用 *Pds* 启动子和 RNAi 片段替换掉 pVCT-2020 载体中 GUS 基因及其 35S 启动子,减少了 T-DNA 中其它非目的基因的干扰。获得的植物表达载体质粒经 PCR 扩增和酶切能得到大小一致的目标片段,表明所构建的载体完全正确。

2.3 转基因植株的获得

在农杆菌浸染过程中,农杆菌太浓,在后来的培养中外植体容易褐化、坏死;农杆菌太稀获得的抗性植株的机会就减少,因此,应适当掌握农杆菌的浸染浓度。本实验结果认为用液体 MS 培养基重悬农杆菌是很必要的,可以降低农杆菌对外植体的毒害,增加外植体的成活率。选择培养后的番茄子叶外植体在抗性培养基上培养 2 周后部分外植体的伤口变褐变黄或是长出白色的愈伤组织,最后在选择培养中褐化、坏死了,部分外植体在选择培养中能长出致密的绿色愈伤组织,1 个月后能形成正常的绿芽,在含 Kan 的生根培养基中也能形成根系发达的植株。

2.4 转基因植株的检测

通过抗性筛选获得了 7 株转化再生植株,分别

提取这 7 株植株的 DNA 进行 PCR 检测, 其中 5 株扩增出了预期的和质粒(阳性对照)中扩增的一样的片段, 而阴性对照没有出现此带(图 3), 表明外源基因已经整合到了番茄基因组中。将 PCR 鉴定为转基因的植株炼苗后, 移栽到大棚中让其自然生长直到结果, 获得了转基因番茄果实(图 4)。

2.5 转基因植株的番茄红素分析

由于番茄红素不稳定, 见光易分解, 因此提取及测定过程都应尽量在避光条件下进行。以每 100g

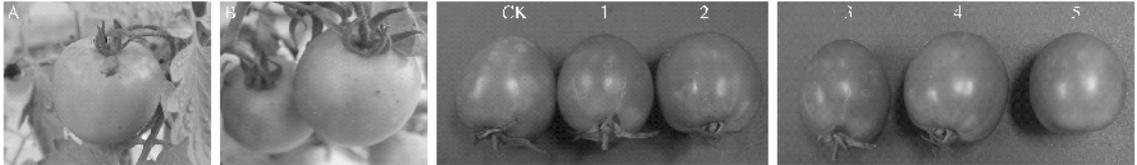


图 4 转基因番茄植株的表现

Fig. 4 The phenotypes of transgenic tomato plants

A: immature fruit from no-transgenic plants; B: immature fruits from no-transgenic plants; C: full-ripe fruit from no-transgenic plants; D: full-ripe fruit from transgenic plants.

鲜重番茄果实中番茄红素含量为纵坐标, 以转基因植物及非转基因植株为横坐标绘制坐标图(图 5)。测定结果表明所获得的 5 株转基因番茄果实的番茄红素测定都比非转基因番茄果实中番茄红素高, 其中 1 号转基因番茄果实中番茄红素含量增加最多, 比对照增加了 3.2 倍, 5 株番茄果实中番茄红素含量平均比对照增加了 2.80 倍。

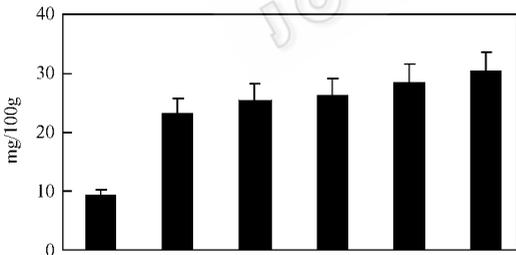


图 5 每 100g 鲜重番茄果实中的番茄红素含量

Fig. 5 The lycopene content

CK: negative control; 1~5: the lycopene content of transgenic plants.

3 讨论

番茄红素可以预防和调节多种疾病, 并且对人体没有任何毒副作用, 因此被认定为营养型保健食品。天然番茄果实中番茄红素的含量很低, 基本满足不了人的生理需要, 一个成年人一天需摄入 1~2kg 番茄或胡萝卜, 才能正常的调节人体的生理机能^[4]。通过常规育种增加番茄红素的含量费时又费力, 并且目的性不强, 而通过基因工程手段改造类胡萝卜素的合成途径来增加番茄红素含量是一个方便

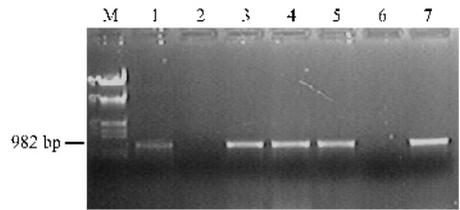


图 3 转基因番茄植株的 PCR 特异扩增检测

Fig. 3 PCR screening of transgenic tomato plants

M: λ DNA/EcoR I + Hind III marker; 1~5: transgenic tomato plants; 6: negative control; 7: positive control.

又快捷的方式。

目前通过基因工程增加番茄红素多是增加外源 *Psy* 基因^[6]和 *crt I*^[5]基因的表达来获得的, 但由于基因的共抑制、竞争前体物质牻牛儿焦磷酸 (GGPP) 和组成型启动子等原因, 番茄红素都没有增加。Fraser^[14]等将细菌的八氢番茄红素合成酶基因 (*crt B*) 在果实特异性启动子 (PG 启动子) 调控下转入番茄来增加番茄红素含量, 但还是存在共抑制, 番茄红素只有少量的增加, 而通过 RNAi 技术来增加番茄红素, 便可避免上述问题, 并且没有带入其他外源基因, 因此, 比一般的转基因产品更容易被公众接受。

RNAi 具有高度的特异性, 只引起与 dsRNA 同源的 mRNA 的降解, 在 21~23 个核苷酸中只要改变一个核苷酸, 就可以使该 siRNA 序列不对靶向 mRNA 起作用^[15]。由于番茄红素是由 β -环化酶和 ϵ -环化酶两条途径转化为其它的类胡萝卜素的, 因此为了完全阻止番茄红素的转化, 本实验分析了 *Lcy β* 和 *Lcy ϵ* 的基因序列, 找到这两个基因的完全保守区域确定为干扰的目标区域。很多研究结果充分证明内含子与基因表达调控有关, 而且起到提高基因表达水平的作用^[15, 16], 因此为了达到最大的干扰效果, 本实验根据植物的 RNA 依赖型 RNA 聚合酶 (RdRP) 介导的沉默机理设计 RNAi 载体的构建方案: 即通过一段内含子把 *Lcy* 基因 DNA 片段的 3' 端以正反两个方向连接起来, 并且内含子的方向与基因转录

的方向一致构建 RNAi 干扰片段。

目前,报道的转基因实验中所用的启动子多为组成型启动子,如 CaMV35S,在它的调控下,外源基因在转基因植物中所有的发育阶段和所有的部位都能表达;对于需要组织特异性表达的基因来说,在该启动子调控下表达造成营养浪费而导致植株生长不良,Frays^[6]等将番茄 *Psyl* 基因在组成型启动子调控下转入番茄,结果幼果异常生长,植物矮化。因此,在生物工程研究中对于组织或器官特异性启动子的需求是很大的,目前也越来越受到研究人员的重视。目前对于番茄的 E4 基因^[17]、E8 基因^[18]、多聚半乳糖醛酸酶(PG)基因^[19]和 2A11 基因^[20]的果实特异性启动子有一定的研究,E4、E8 启动子番茄果实发育的后期的表达量降低直到没有作用^[21]。2A11^[22]和 PG 启动子在果实的早期就开始表达,为了使 *Lcy* 基因在番茄果实发育期间都被抑制,这就需要在果实发育期间都表达的启动子来调控 RNAi 片段的表达。因此本实验采用类胡萝卜素合成过程中自身所有的启动子来调控 RNAi 片段的表达便可以在番茄果实发育的整个过程中都能使 *Lcy* 基因沉默。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Cheng J (成坚), Zeng QX (曾庆孝). The chemical properties and physiological-function of lycopene. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业),1999, **26**(2):75-79.
- [2] Agoawal S, Rao AV. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipidol*,1998, **33**:981-984.
- [3] Rao AV, Agarwal S. Bioavailability and *in vivo* antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nature Cancer*,1998, **31**:199-203.
- [4] Han M (韩美清), Zhao Z (赵致). The research advance and applying foreground of lycopene. *Journal of Country Agriculture Biology*(山地农业生物学报),2003, **22**(5):456-461.
- [5] Romer S, Fraser PD, Kiano JW. Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plant. *Nature Biotechnology*,2000, **18**:666-669.
- [6] Fray RG, Wallace A, Fraser PD, *et al.* Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant Journal*,1995, **8**:693-701.
- [7] Tieman DM, Kausch KD, Serra DM. Field performance of transgenic tomato with reduced pectin methylesterase activity. *AM Soc Hort Sci*, 1995, **120**(5):765-768.
- [8] Smith NA, Singh SP, Wang MB, Peter AS, Allan GG. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*,2000, **407**(6802):319-320.
- [9] Ganga RD, Ageeth van T, Paul DF. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of TDET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology*,2005, **23**(7):890-895.
- [10] Wang GL (王关林), Fang HJ (方宏筠). *Plant Gene Engineering (the Second Edition)*. Beijing: Science Press (科学出版社), 2002, pp.295-401.
- [11] Hou CM (侯纯明), Liu DX (刘德志), Xie Y (谢颖), Li WZ (李文泽). The distilling and optimizing of lycopene. *Liaoning Chemical Industry*(辽宁化工),2004, **33**(8):440-442.
- [12] Wang YY (王燕燕), Di JS (邸进申), Zheng HJ (郑辉杰). The research advance of separate and analysis of lycopene. *China Food Additives*(中国食品添加剂),2002, **4**:16-20.
- [13] Zhu Y (朱艳), Wang JX (王见冬), Yuan QH (袁其明), Dong HR (东惠如). Substitution of Sudan I for lycopene standard sample. *Journal of Beijing University of Chemical Technology*(北京化工大学学报),2005, **32**(3):16-19.
- [14] Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *PNAS*,2002, **99**(2):1092-1097.
- [15] Westey SV, Helliwell CA, Smith NA, *et al.* Construct design for efficient effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal*,2001, **27**:581-590.
- [16] Wang GL (王关林), Fang HJ (方宏筠). *Plant Gene Engineering (the second edition)*. Beijing: Science Press (科学出版社),2002, pp.681-682.
- [17] Xu R, Goldman S, Coue S. Ethylene control of E4 transcription during tomato fruit ripening involves two cooperative cis elements. *Plant Mol Biol*,1996, **31**:1117-1127.
- [18] Deikman J, Xu R, Kneissl ML. Separation of cis elements responsive to ethylene, fruit development and ripening in the 5'-flanking region of the ripening-related E8 gene. *Plant Mol Biol*,1998, **37**:1001-1011.
- [19] Nicholass FJ, Smith CJS, Schuch W. High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions. *Plant Mol Biol*,1995, **28**:423-435.
- [20] Van MJ, Haaren J, Houck CM. A functional map of the fruit-specific promoter of the tomato 2A11 gene. *Plant Mol Biol*,1993, **21**:625-664.
- [21] Davulri GR, Tuinen AV, Fraser PD, *et al.* Manipulation of DET1 expression in tomato results in photomorphogenic phenotypes caused by post-transcriptional gene silencing. *Plant Journal*,2004, **40**:344-354.
- [22] Santino CG, Stanford GL, Conner TW. Developmental and transgenic analysis of two tomato fruit enhanced genes. *Plant Mol Biol*,1997, **33**:639-651.