

# OsVIP1 RNAi 转基因水稻植株的构建

娄丽娟 史雪 罗美中

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为进一步阐明农杆菌介导的遗传转化分子机制, 进而利用分子生物学方法提高农杆菌转化水稻效率, 以水稻品种中花 11 为遗传转化受体材料, 利用 RNAi 技术对水稻中拟南芥 AtVIP1 蛋白的同源蛋白进行了功能研究。通过同源性比对得到水稻中拟南芥 AtVIP1 蛋白的同源蛋白序列, 命名为 OsVIP1, 构建了该蛋白基因 2 个片段(R1 和 R2)的 RNAi 表达载体 pDS1301-2-R1 和 pDS1301-2-R2, 通过农杆菌介导的方法分别转化水稻中花 11。对转基因抗性愈伤进行统计, 结果表明, 由携带 pDS1301-2-R1 和 pDS1301-2-R2 载体转化的抗性愈伤的形成受到一定程度抑制。经 PCR 检测, 证明 2 个片段 R1 和 R2 均成功整合到再生水稻植株基因组中; 半定量 RT-PCR 分析显示部分 RNAi 转基因植株中 OsVIP1 基因表达被成功抑制。

**关键词** 水稻; OsVIP1; RNAi; 遗传转化; 转基因

**中图分类号** Q 813; S 511.503.53    **文献标识码** A    **文章编号** 1000-2421(2012)02-0152-07

农杆菌介导的水稻转化技术不仅为水稻遗传改良奠定了基础, 而且有力地促进了水稻分子生物学的研究。农杆菌介导的遗传转化过程是农杆菌和受体植株互作的过程。在这个过程中有农杆菌 Ti 质粒上 Vir 区蛋白的参与, 比如 VirE2 和 VirD2, 也有受体植物蛋白参与<sup>[1-2]</sup>。Tzfira 等<sup>[2-4]</sup>利用酵母双杂交的方法在拟南芥中发现了与 VirE2 互相作用的蛋白, 命名为 AtVIP1。AtVIP1 不仅在 T-DNA-复合物进入植物细胞核和细胞核内运动的过程中发挥重要作用, 而且在 T-DNA 与植物基因组整合过程中扮演重要角色<sup>[5]</sup>。

AtVIP1 属于拟南芥中 bZIP 家族的 IX 亚家族。bZIP 家族是拟南芥中转录因子的一族, 其特征是含有亮氨酸拉链结构域(每 7 个氨基酸中的第 7 位含有 1 个亮氨酸)和碱性结构域(在亮氨酸结构域的 N 末端, 大约 20 个氨基酸)。亮氨酸拉链结构域参与 bZIP 蛋白与 DNA 序列结合之前的二聚体化, 碱性结构域和特定的 DNA 序列相互作用, 从而调控相应基因的表达<sup>[6]</sup>。研究发现, AtVIP1 可以与 *Trxh8* 基因和 *MYB44* 基因(两者均是胁迫诱导表达型蛋白, 分别含有 6 个和 3 个 VREs)启动子区中 VREs 序列相互作用, 进而激活相应的启动子, 调节

防御基因的表达<sup>[7]</sup>。

近年来, 由于分子生物学技术的快速发展, 为人们提供了许多高效、快速研究基因功能的方法, 其中 RNAi 技术凭借其沉默基因表达的高效性、特异性和可传递性受到众多研究者的青睐。

水稻不仅是一种重要的粮食作物, 也是功能基因组研究的模式植物。到目前为止, 关于水稻农杆菌介导的遗传转化机制还不清楚。我们利用蛋白质序列同源性比对得到 1 个与拟南芥 VIP1 序列高度同源的水稻蛋白, 命名为 OsVIP1。本试验旨在利用 RNAi 技术沉默水稻中 OsVIP1 基因, 获得阳性转基因植株, 为后续的研究提供试验材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1) 水稻遗传转化受体。试验中所用的遗传转化受体水稻材料是粳稻品种中花 11(*Oryza sativa L.* ssp. *japonica* cv. *zhonghua 11*), 由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室提供。

2) 菌株和载体。试验中所用的菌株包括: 大肠杆菌菌株 DH10B, 根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 (含有辅助质粒

pTiBo542),均由笔者所在的实验室保存;RNAi 干涉载体为 pDS1301,由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室王石平教授提供;pGEM-T-Easy 载体购自 Promega 公司。

## 1.2 方法

1)OsVIP1 特异性片段 R1 和 R2 的克隆。通过

蛋白质同源性比对得到水稻中和拟南芥 AtVIP1 高度同源的蛋白 OsVIP1 序列(NP\_001066224.1),根据其 mRNA(NM\_001072756.1)序列,选择两端的区段用于构建 RNAi 载体,分别命名为 R1 和 R2。利用 Primer 5.0 设计带有 RNAi 载体 pDS1301 载体上相应酶切位点的引物(表 1)。

表 1 PCR 所用引物的序列

Table 1 The sequences of the PCR primers used

名称 Name	序列 Sequence	备注 Note
R1-F	5'-GGACTAGTGGTACCATTGACCGCGTTGACTCC-3'	<i>Spe I</i> , <i>Kpn I</i>
R1-R	5'-CGAGCTCGATCCCATGGCCTTCTCGCGTAGT-3'	<i>Sac I</i> , <i>BamH I</i>
R2-F	5'-CCACTAGTGGTACCTGGTCAGTCCTAAAC-3'	<i>Spe I</i> , <i>Kpn I</i>
R2-R	5'-CGAGCTCGGATCCGTTACAAACGACCACCTTAC-3'	<i>Sac I</i> , <i>BamH I</i>
hyg-F	5'-AATTGCCGTCAACCAAGCTC-3'	Primer for hygromycin resistant gene
hyg-R	5'-TAGCGAGAGCCTGACCTATTGC-3'	Primer for hygromycin resistant gene
actin-F	5'-TGTATGCCAGTGGTCGTACCA-3'	Primer for RT-PCR internal control
actin-R	5'-CCAGCAAGGTCGAGACGAA-3'	Primer for RT-PCR internal control
VIP1-F	5'-TTCCGCCCTATTACACGCAA-3'	Primer for VIP1 RT-PCR
VIP1-R	5'-TGATGAGCTCTGCTGATGGCT-3'	Primer for VIP1 RT-PCR

以日本晴叶片 cDNA 为模板,以 R1-F/R1-R 和 R2-F/R2-R 为引物 PCR 扩增片段 R1 和 R2。PCR 体系如下:1 μL cDNA 模板、2 μL dNTP (2 mmol/L)、2 μL 10×DNA polymerase buffer、上下游引物(10 mmol/L)各 0.4 μL、0.3 μL rTaq DNA polymerase (5 U/μL)、13.9 μL ddH<sub>2</sub>O。反应程序:PCR 扩增条件为 95 °C, 4 min; 94 °C, 1 min; 57 °C, 1 min; 72 °C, 50 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物切胶回收并用 1% 的琼脂糖凝胶检测。

2)RNAi 载体的构建。<sup>①</sup>R1 和 R2 与 pGEM-T-Easy 载体的连接。将 PCR 产物切胶回收后与 pGEM-T-Easy 载体在 4 °C 下连接过夜,然后转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞。用 *BamH I* 和 *Kpn I* 酶切检测得到阳性 TA 克隆并将此质粒送上海桑尼公司测序,将序列完全正确的 TA 克隆分别命名为 T-R1 和 T-R2。通过 *BamH I*/*Kpn I* 和 *Sac I*/*Spe I* 两对酶切位点将同 1 个 RNAi 片段以正方向和反方向连接到 RNAi 表达载体 pDS1301 中在 CaMV35S 启动子控制下的一段 Intron 序列的两侧。<sup>②</sup>R1 和 R2 正方向连接到 RNAi 载体。用 *BamH I* 和 *Kpn I* 双酶切 T-R1、T-R2 和 RNAi 载体 pDS1301,切胶回收 R1、R2 和 pDS1301,然后将 pDS1301 分别和 R1、R2 在 4 °C 下连接过夜,转化

DH10B 感受态细胞。通过 *BamH I* 和 *Kpn I* 进行双酶切检测选择正确的克隆,分别命名为 pDS1301-1-R1、pDS1301-1-R2。<sup>③</sup>R1 和 R2 反方向连接到 RNAi 载体。用 *Sac I* 和 *Spe I* 双酶切 T-R1、T-R2 和含有正方向片段的 RNAi 载体 pDS1301-1-R1、pDS1301-1-R2。切胶回收 R1、R2 和 pDS1301-1-R1、pDS1301-1-R2,然后将 pDS1301-1-R1 与 R1, pDS1301-1-R2 与 R2, 在 4 °C 下连接过夜,转化 DH10B 感受态细胞。分别用 *BamH I*/*Kpn I* 和 *Sac I*/*Spe I* 双酶切检测选择正确的克隆,将正确的克隆命名为 pDS1301-2-R1、pDS1301-2-R2。最后将 pDS1301-2-R1、pDS1301-2-R2 和 pDS1301 空载体转化根癌农杆菌 EHA105,用于水稻遗传转化。

3)农杆菌介导的水稻转化。农杆菌转化的受体是水稻品种中花 11。用含有 RNAi 载体 pDS1301-2-R1、pDS1301-2-R2 和 pDS1301 空载体的 EHA105 的菌液侵染中花 11 种子诱导得到的愈伤组织。农杆菌介导的水稻转化方法主要是依据 Hiei 等<sup>[8]</sup>的水稻转化方案并参照林拥军<sup>[9]</sup>的方法。

4)转基因中花 11 抗性愈伤统计。中花 11 愈伤经 EHA105 菌液侵染后,19 °C 避光共培养 2 d,水洗、避光 28 °C 下进行第 1 次筛选 15 d,避光 28 °C 下进行第 2 次筛选 15 d,长出亮黄色的抗性愈伤。每

个片段转化的愈伤共有 10 个培养皿(直径 9 cm), 每个培养皿上有 25 粒愈伤。分别统计对照组和试验组中长出抗性愈伤的中花 11 愈伤数及总的转基因愈伤数。

5) T<sub>0</sub>代转基因再生植株阳性检测。CTAB 法抽提转基因植株基因组 DNA, 作为 PCR 模板。通过扩增筛选标记 *hyg* 来检测转基因阳性植株, 所用引物见表 1。PCR 产物大小为 750 bp。PCR 扩增体系: 1.0 μL 基因组 DNA 模板、1.5 μL dNTP (2 mmol/L)、1.5 μL 10×DNA polymerase buffer、上下游引物(10 mmol/L)各 0.3 μL、0.3 μL *Taq* DNA polymerase (5 U/μL)、10.2 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序: 95 °C, 4 min; 94 °C, 40 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 40 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶检测。

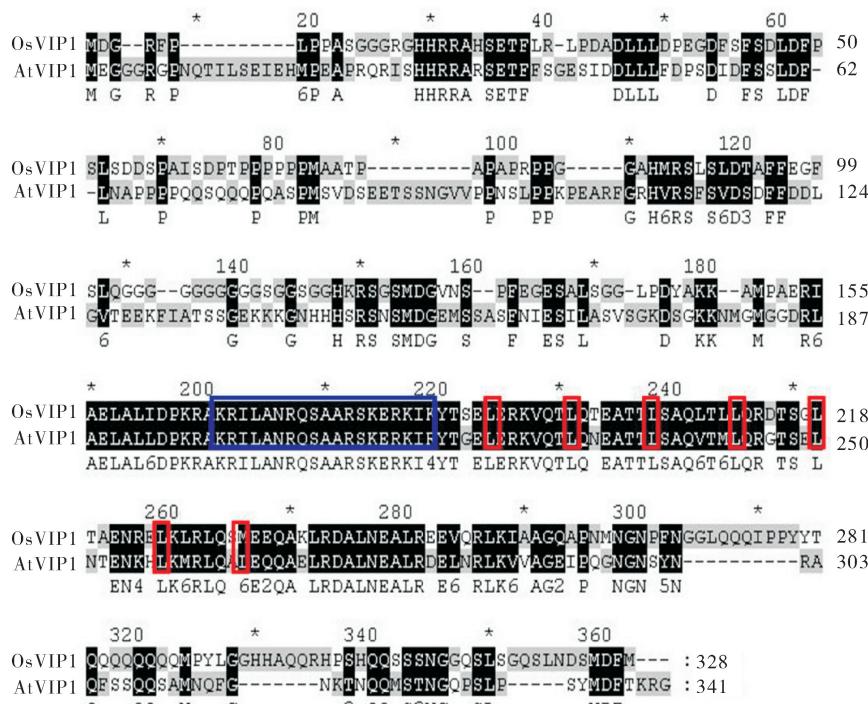
6) T<sub>0</sub>代转基因植株中 *OsVIP1* 基因表达量检测。采用 TRIZOL 法抽提转基因水稻叶片总 RNA。利用 TOYOBO 公司 First strand cDNA synthesis Kit 进行 RNA 反转录, 得到 cDNA。具体操作按照说明书进行。RT-PCR 试验中, 以 *β-actin* 作

内参基因, 检测转基因水稻植株和对照中 *OsVIP1* 基因表达量。*β-actin* 和 *OsVIP1* 基因 RT-PCR 所用引物见表 1。首先通过调整 cDNA 模板量和 PCR 循环数将内参基因 *β-actin* 的表达量调到一致。然后按照同样的 PCR 反应体系和程序, 同时扩增 *β-actin* 和 *OsVIP1*。PCR 反应程序: 95 °C, 1 min; 94 °C, 20 s; 57 °C, 20 s; 72 °C, 20 s, 28 个循环; 72 °C 延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻中 VIP1 蛋白(*OsVIP1*)与拟南芥 VIP1 蛋白(*AtVIP1*)的同源性比对

为了研究水稻中农杆菌介导的遗传转化机制, 利用同源性比对获得了水稻中与拟南芥 VIP1 蛋白(*AtVIP1*)高度同源的蛋白, 序列编号为 NP\_001066224.1, 命名为 *OsVIP1*, 从 *AtVIP1* 和 *OsVIP1* 的序列比对可以看出(图 1), *AtVIP1* 和 *OsVIP1* 氨基酸序列的相似性达 47%, 表明 2 个蛋白同源性很高, 而且 bZIP 结构域非常保守。



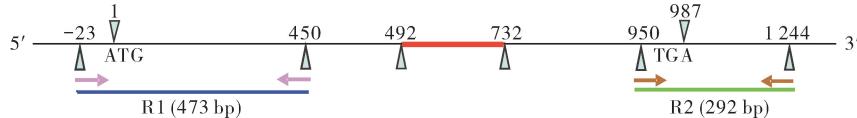
蓝色框: 核定位信号序列 Blue box; Nuclear location sequence; 红色框: bZIP 保守结构域的 7 个亮氨酸重复 Red boxes; seven leucine repeats of the basic bZIP motif; 黑色阴影框: 相同的氨基酸 Shade black boxes; the identical amino.

图 1 拟南芥 VIP1 蛋白(*AtVIP1*)和水稻 VIP1 蛋白(*OsVIP1*)序列同源性比较

Fig. 1 Alignment of *AtVIP1* and *OsVIP1* protein sequences

## 2.2 OsVIP1 中用于 RNAi 干涉的特异性片段 R1 和 R2 的克隆

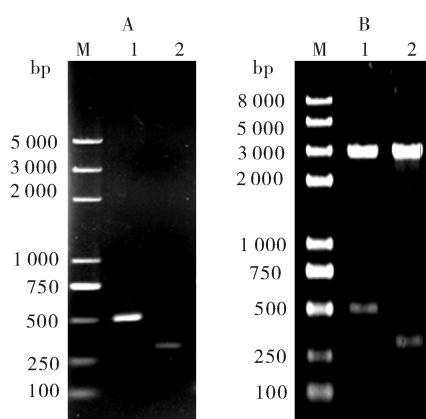
由于 OsVIP1 蛋白属于 bZIP 家族成员,因此设计 RNAi 引物时避开了其保守域所对应的 mRNA 区段,在 OsVIP1 的 cDNA 序列的 5' 端和 3' 端选择



粉色箭头:R1-F/R1-R 的位置 Pink arrows:Positions of R1-F/R1-R; 棕色箭头:R2-F/R2-R 的位置 Brown arrows:Positions of R2-F/R2-R; 蓝色线:R1 片段 Blue line;R1 fragment; 绿色线:R2 片段 Green line;R2 fragment; 红色线:bZIP 保守结构 Red line;bZIP domain.

图 2 OsVIP1 cDNA 序列中用于构建 RNAi 载体的区段

Fig. 2 Fragments of OsVIP1 cDNA sequence used to design the RNAi vector



A. M: DNA marker (100~5 000 bp); 1: R1 片段 R1 fragment; 2: R2 片段 R2 fragment; B. M: DNA marker (100~8 000 bp); 1: T-R1 的 *Sac* I / *Spe* I 酶切电泳图 T-R1 digested with *Sac* I / *Spe* I; 2: T-R2 的 *Sac* I / *Spe* I 酶切电泳图 T-R2 digested with *Sac* I / *Spe* I.

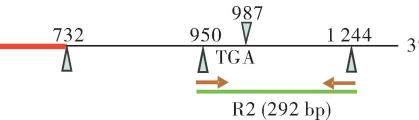
图 3 R1 和 R2 的 PCR 产物回收检测(A)和 TA 克隆的酶切检测(B)

Fig. 3 Detection of the PCR products of R1 and R2 (A) and enzyme digestion analysis of the TA clones (B)

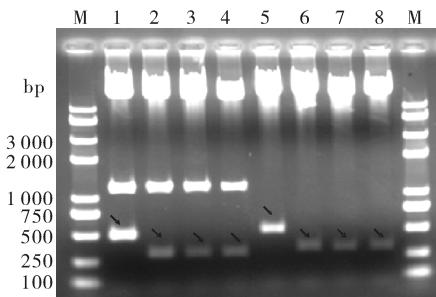
## 2.3 R1 和 R2 片段 RNAi 载体的构建

将片段 R1 和 R2 与 pGEM-T-Easy 连接,得到了 TA 克隆 T-R1 和 T-R2, *Sac* I 和 *Spe* I 双酶切验证结果如电泳图 3-B 所示,可以切出目标带 R1 和 R2,证明 TA 克隆构建成功。按照“本文 1.2”方法 2)中所述 RNAi 载体构建步骤,将 R1 以正向和反向与 RNAi 载体 pDS1301 连接,构建成植物表达载体 pDS1301-2-R1; 将 R2 以同样的操作构建成植物表达载体 pDS1301-2-R2。*Bam* H I / *Kpn* I 双酶切鉴定 pDS1301-2-R1 和 pDS1301-2-R2(图 4 中泳道

2 个区段作为沉默 OsVIP1 基因的特异 RNAi 片段,命名为 R1 和 R2。2 个片段在 OsVIP1 的 cDNA 中的具体位置如图 2 所示。以日本晴 cDNA 为模板,PCR 扩增得到片段 R1 和 R2(图 3-A)。



1~4)的结果表明,R1 和 R2 已经正向连接到载体 pDS1301; *Sac* I / *Spe* I 双酶切鉴定 pDS1301-2-R1 和 pDS1301-2-R2(图 4 中泳道 5~8)的结果表明,R1 和 R2 已经反向连接到载体 pDS1301。酶切分析表明 RNAi 载体构建成功。



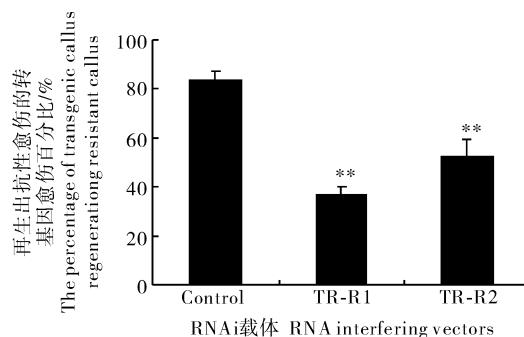
M:DNA marker (100~8 000 bp); 1,5: 分别为 pDS1301-2-R1 的 *Bam* H I / *Kpn* I 和 *Sac* I / *Spe* I 的酶切电泳图 pDS1301-2-R1 digested by *Bam* H I / *Kpn* I and *Sac* I / *Spe* I , respectively; 2~4,6~8: 分别为 pDS1301-2-R2 的 *Bam* H I / *Kpn* I 和 *Sac* I / *Spe* I 的酶切电泳图 pDS1301-2-R2 digested by *Bam* H I / *Kpn* I and *Sac* I / *Spe* I , respectively.

图 4 OsVIP1 RNAi 载体酶切检测

Fig. 4 Enzyme digestion of the RNAi constructs

## 2.4 转基因水稻中花 11 抗性愈伤统计

按照水稻粳稻品种的农杆菌转化步骤,将对照组和 RNAi 试验组分别侵染中花 11 胚性愈伤,在第 2 次筛选 2 周后统计长出抗性愈伤的中花 11 愈伤粒数。如图 5 所示,RNAi 试验组中花 11 再生抗性愈伤的比例明显低于对照组且差异达到极显著水平( $P < 0.01$ ),其中 pDS1301-2-R1 的转基因中花 11 再生抗性愈伤的比例最低。

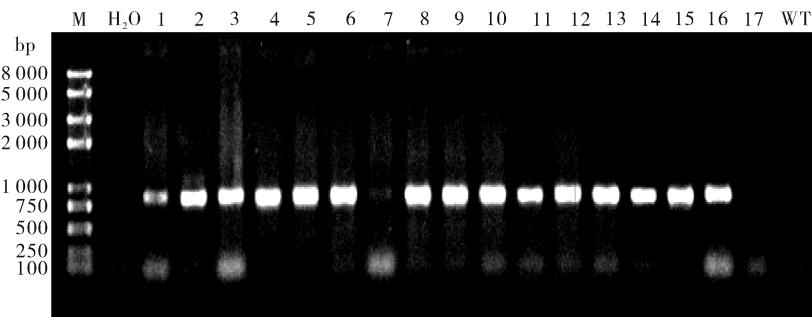


Control:转化RNAi空载体的中花11愈伤Zhonghua 11 callus transformed with the empty RNAi vector; TR-R1和TR-R2:分别转化pDS1301-2-R1和pDS1301-2-R2的中花11愈伤Zhonghua 11 callus transformed with pDS1301-2-R1 and pDS1301-2-R2 constructs, respectively;

\*\*:TR-R1和TR-R2转基因抗性愈伤比例与对照相比差异达到极显著水平( $P<0.01$ )The percentage differences of the transgenic resistant callus between TR-R1 and control, and TR-R2 and control reached the extreme significance ( $P<0.01$ ).

图5 RNAi转基因中花11再生抗性愈伤统计

Fig. 5 Statistics of the RNAi transgenic Zhonghua 11 resistant callus



M:DNA marker (100~8 000 bp); H<sub>2</sub>O:阴性对照 Negative control; WT:野生型 Wild type; 1~17:不同的T<sub>0</sub>代RNAi转基因植株 Different T<sub>0</sub> generation RNAi transgenic rice plants.

图6 部分T<sub>0</sub>代转基因水稻植株潮霉素筛选标记基因的PCR检测

Fig. 6 PCR detection of the selection marker gene *hyg* in some T<sub>0</sub> generation RNAi transgenic rice plants



A. Control:RNAi空载体的转基因水稻植株 Transgenic rice plants of empty RNAi vector; 1~6:片段R1 RNAi的不同转基因水稻植株 Different transgenic rice plants of R1 fragment RNAi vector;  $\beta$ -actin:内参基因 Internal control gene; B. Control:RNAi空载体的转基因水稻植株 Transgenic rice plants of empty RNAi vector; 1~7:片段R2 RNAi的不同转基因水稻植株 Different transgenic rice plants of R2 fragment RNAi vector;  $\beta$ -actin:内参基因 Internal control gene.

图7 RT-PCR检测片段R1(A)和片段R2(B)T<sub>0</sub>代转基因水稻中OsVIP1基因表达量

Fig. 7 RT-PCR detection of the *OsVIP1* gene expression in R1 (A) and R2 (B) T<sub>0</sub> generation transgenic rice plants

## 2.5 T<sub>0</sub>代转基因水稻阳性植株检测

用PCR法对T<sub>0</sub>代转基因植株进行了阳性检测,对照组转基因水稻植株为20株,阳性植株为18株,阳性率为90%;片段R1的转基因水稻植株为40,阳性植株为35株,阳性率为87.5%;片段R2的转基因水稻植株为35,阳性植株为32株,阳性率为94.3%,证明RNAi表达载体已经整合进水稻中花11基因组中。部分检测结果如图6所示,第7泳道和17泳道没有扩增出潮霉素基因,应为假阳性植株。

## 2.6 T<sub>0</sub>代转基因水稻植株中OsVIP1基因表达量检测

利用RT-PCR对T<sub>0</sub>代RNAi转基因水稻植株的OsVIP1基因表达量进行了分析,结果如图7所示,在检测的6株片段R1的T<sub>0</sub>代转基因水稻植株中(图7-A),5株中OsVIP1基因的表达量明显低于对照中花11,表明在这5株片段R1 T<sub>0</sub>代RNAi转基因水稻植株中,OsVIP1基因的表达在一定程度上受到了干扰;在检测的7株片段R2的T<sub>0</sub>代转基

因水稻植株中(图 7-B),4 株中 *OsVIP1* 基因的表达量显著低于中花 11,同样表明在这 4 株片段 R2  $T_0$  代 RNAi 转基因水稻植株中,*OsVIP1* 基因的表达在一定程度上受到了干扰。

### 3 讨 论

农杆菌介导的植物遗传转化是一个非常复杂的生物学过程,涉及诸多蛋白的参与。对农杆菌和受体植物内参与此过程的各种蛋白因子的研究,有助于我们深入了解这一过程。目前为止,关于受体植物内参与此过程蛋白因子的研究远远没有对农杆菌中相关蛋白的研究深入<sup>[10-11]</sup>。研究者通过不同的研究方法证明,拟南芥 *AtVIP1* 在农杆菌转化过程中发挥重要作用,其反义 RNA 转烟草植株受农杆菌侵染的能力发生了变化,能抵抗瘤的形成,T-DNA 上基因的早期表达和 VirE2 向细胞核的输入均受阻<sup>[12]</sup>,而该基因在烟草中的超量表达,能显著提高农杆菌对烟草细胞的侵染能力从而提高转化效率<sup>[10]</sup>。由于水稻是单子叶植物,不是农杆菌的天然寄主,转化效率较低。农杆菌转化水稻受诸多因素的影响,如水稻的基因型、形成愈伤的外植体类型、培养基的成分、农杆菌菌株和双元质粒载体、可选择的标记基因、组织培养过程中的温度、pH 值等<sup>[13]</sup>。但水稻中是否存在类似拟南芥 *AtVIP1* 的作用途径还不清楚,因此,研究水稻中与 *AtVIP1* 同源的蛋白 *OsVIP1* 具有重要的意义,将为提高农杆菌转化水稻特别是籼稻的效率开拓新的思路。

本研究成功构建了水稻 *OsVIP1* 2 个片段的 RNAi 载体并利用农杆菌转化了中花 11,在第 2 次筛选 2 周时,RNAi 转基因中花 11 愈伤形成抗性愈伤的比例明显低于对照组。抗性愈伤的数目在一定程度上代表着农杆菌的早期转化效率,表明 *OsVIP1* RNAi 在水稻中所起的作用可能和 *AtVIP1* 反义 RNA 在烟草中所起的作用<sup>[12]</sup>类似,降低农杆菌侵染水稻愈伤的能力或影响 T-DNA 上基因的早期表达和 VirE2 向细胞核的输入,从而影响抗性愈伤的形成。对  $T_0$  代 RNAi 转基因水稻植株 RT-PCR 检测表明,内源 *OsVIP1* 基因的表达被 RNAi 不同程度干涉。

水稻 *OsVIP1* 属于含有 bZIP 保守结构域的转录因子,研究发现,植物中 bZIP 转录因子可以通过和特定的 DNA 序列结合,调控抗病途径中相关基因的表达。*PBZ1*(一病程相关蛋白)属于 PR-10 家

族,在植物抵御生物和非生物逆境中都有着重要作用。有报道称水稻在受到病原菌侵害时 *PBZ1* 基因的表达量上升<sup>[14]</sup>。而农杆菌介导的转化过程中,本质上就是一种外来病原菌入侵植物的过程,因此,*OsVIP1* 可能和 *PBZ1* 信号通路调节相关。本试验中,同时检测了  $T_0$  代转基因植株中 *PBZ1* 基因的表达量,初步结果表明,在 *OsVIP1* 表达被抑制的 RNAi 植株中,*PBZ1* 基因的表达量也有相应的下降,该结果还有待于进一步的验证。

本研究通过 RNAi 技术沉默 *OsVIP1* 基因的表达并得到  $T_0$  代种子,为后续研究该基因功能奠定了一定的基础。

### 参 考 文 献

- [1] ZUPAN J, ZAMBRYSKI P. The *Agrobacterium* DNA transfer complex [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1997, 16: 279-295.
- [2] CITOVSKY V, DEVOS G, ZAMBRYSKI P. Single-stranded DNA binding protein encoded by the virE2 locus of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Science, 1988, 240: 501-504.
- [3] ZIEMIENOWICZ A, MERKLE T, SCHOUWACHER F, et al. Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins [J]. Plant Cell, 2001, 13: 369-383.
- [4] LI J, KRICEVSKY A, VAIDYA M, et al. Uncoupling of the functions of the *Arabidopsis* VIP1 protein in transient and stable plant genetic transformation by *Agrobacterium* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(16): 5733-5738.
- [5] TZFIRA T, RHEE Y, CHEN M H, et al. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls [J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54(1): 187-219.
- [6] 萨其拉,李文彬,孙如勇. G-box 和 G-box 结合蛋白在植物基因诱导表达中的转录调控[J]. 植物生理学通讯,2003,39(1):89-92.
- [7] PITASCHKE A, DJAMEI A, TEIGE M, et al. VIP1 response elements mediate mitogen-activated protein kinase 3-induced stress gene expression [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(43): 18414-18419.
- [8] HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, et al. Efficient transformation of rice(*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. The Plant Journal, 1994, 6(2): 271-282.
- [9] 林拥军. 农杆菌介导的水稻转基因研究[D]. 武汉:华中农业大学图书馆,2001.
- [10] TZFIRA T, CITOVSKY V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium* [J]. Trends Cell Biol, 2002, 12(3): 121-129.

- [11] GELVIN S B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool [J]. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(1):16-37.
- [12] TZFIRA T, VAIDYA M, CITOVSKY V. VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity [J]. *EMBO Journal*, 2001, 20(13):3596-3607.
- [13] CHENG M, LOWE B A, SPENCER T M, et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species [J]. *in vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2004, 40(1): 31-45.
- [14] LEE M W, QI M, YANG Y. A novel jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associate with fungal infection and host cell death [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2001, 14(4):527-535.

## Construction of *OsVIP1* RNAi transgenic rice plants

LOU Li-juan SHI Xue LUO Mei-zhong

*National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** In order to elucidate the molecular mechanism of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and improve the efficiency of *Agrobacterium*-mediated rice transformation by molecular biological methods, we studied the *OsVIP1* protein function with the RNA interfering technology using the rice variety Zhonghua 11 as the host for genetic transformation. A rice protein sequence homologous to AtVIP1, named *OsVIP1* was obtained by homologous searches. Two RNAi expression vectors, pDS1301-2-R1 and pDS1301-2-R2, were constructed with two fragments (R1 and R2) of the *OsVIP1* cDNA, respectively, and used to transform rice variety Zhonghua 11 callus through *Agrobacterium*. The statistical results showed that formation of the transgenic resistant callus of pDS1301-2-R1 and pDS1301-2-R2 vectors was inhibited to some extent. PCR experiments indicated that R1 and R2 fragments were successfully integrated into the transgenic rice genome. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that the *OsVIP1* gene expression was suppressed successfully in some RNAi transgenic rice plants.

**Key words** rice; *OsVIP1*; RNA interfering; transformation; transgene

(责任编辑:杨锦莲)