

转基因马铃薯外源 CP 基因转录表达 与病毒在寄主体内复制关系

赵福宽

张鹤龄

哈斯阿古拉

刘纪麟

郑用璘

(北京农学院园艺系)

(内蒙古大学生物系·呼和浩特)

(华中农业大学·武汉)

第一作者简介 赵福

宽, 1962 年 10 月出生于内蒙古自治区察右中旗。

1996 年 6 月毕业于华中农业大学, 获农学博士学位。

1996 年 7 月以来在北京农学院园艺系任教, 副教授, 主要讲授“蔬菜育种学”、“种子学”和“生物技术概论”等课程。近年来在国际

学术会议及国内重要学术刊物上发表论文 10 余篇, 目前主持北京市市级科研课题 3 项。1998 年入选“北京市青年科技新星”和“北京市跨世纪优秀人才工程”。

摘要 以表达马铃薯卷叶病毒(PLRV)外壳蛋白(CP)基因的转基因马铃薯植株为供试材料, 在接种病毒后连续感染条件下提取转基因植株 RNA, 用克隆的病毒 CP 基因 cDNA 为探针进行 Northern 杂交分析, 用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定病毒含量, 结果表明转基因植株体内病毒积累量明显低于未转基因的对照植株, 转基因植株中外源 CP 基因的转录表达水平与病毒在寄主体内的复制呈负相关。

关键词 外壳蛋白基因 Northern 杂交 转基因马铃薯 抗病毒基因工程 酶联免疫吸附试验

马铃薯卷叶病毒(PLRV)是侵染马铃薯的主要病毒。1986 年, Beachy 研究小组^[1]首次将烟草花叶病毒(TMV)的外壳蛋白(CP)基因导入烟草, 培育出了抗 TMV 的烟草株系, 开创了植物抗病毒基因工程研究的新领域。近十年来, 人们用多种植物病毒和多种植物进行了 CP 基因介导的抗病毒基因工程研究。初步统计已有 30 多种病毒的外壳蛋白基因导入植物并获得了对病毒的抗性^[2, 6]。目前, 国内外均有将 PLRV 的

CP 基因导入马铃薯并获得抗病毒植株的报道, 但对 CP 基因介导抗病的机理仍不十分清楚。本文报道在接种病毒后系统感染条件下外源 CP 基因的转录表达与病毒复制的关系, 旨在揭示 CP 基因介导的转基因马铃薯抗病毒机理和进一步提高转基因工程植株的抗性, 以及寻求有效的抗病毒基因工程途径。

1 材料与方法

1.1 材料

转 PLRV CP 基因的马铃薯品种 Desiree 及 PLRV CP 基因 cDNA 探针来自内蒙古大学生物系植物病毒研究室。分子杂交试剂购自华美生物工程公司。酶联免疫吸附试验试剂盒由内蒙古大学生物系提供。

1.2 方法

1.2.1 植物 RNA 的提取及 Northern 杂交: 按 Theo C. Vorwoerd 等^[3](1989)的方法提取植物总 RNA。每样品取 30 μ g 植物 RNA, 加入 2 \times 15 \times 甲醛凝胶电泳缓冲液, 3.5 μ l 甲醛和 10 μ l 甲酰胺混合后 65 $^{\circ}$ C 温育 15min, 冰浴 10min, 然后在含有甲醛的 1% 琼脂糖凝胶上以 3.5V/cm 电压电泳 2h。电泳结束后, 切下含分子量标准参照物的凝胶条, 浸入溴化乙锭溶液(0.5 μ g/ml)中染色 45min, 在凝胶旁置一透明尺在紫外灯下照像, 测量照片上每一条带至加样孔的距离。然后参照 Sambrook^[4]的方法进行 Northern 转移。用 [α -³²P] dCTP 以切口平移法标记 PLRV 的 CP 基因 cDNA 用作分子杂交探针进行 Northern 杂交。杂交液配方为每 100ml 杂交液中含去离子甲酰胺 45ml, 50 \times Denhardt[†] s2ml, 20 \times SSC25ml, 0.5M Na₃PO₄ (pH6.5) 4ml, 10mg/ml 鱼精 DNA4ml, 25% 硫酸葡聚糖 20ml。杂交温度为 42 $^{\circ}$ C, 反应 20h。

1.2.2 酶联免疫吸附试验: 用碱性磷酸酯酶标记 PLRV-IgG 作为酶标抗体。供试马铃薯每株取 0.5g 叶片加 5ml 样品提取缓冲液(137mmol/L NaCl, 1.5mmol/L KH₂PO₄, 8.1mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O, 2.7mmol/L KCl 和 3.1mmol/L NaNO₃, pH7.4 并附加 0.2%

脱脂奶粉, 0.05% Tween20, 2% PVP(M44000)匀浆)。在每一块酶联板上均设有未转基因植株不接种病毒的阴性对照和未转基因植株接种病毒的阳性对照。显色后用 Titertek Multiskan(Flow laboratories)酶联仪, 以未接种病毒的健康马铃薯汁液为阴性对照清零, 测定出每一植株的 OD₄₀₅值^[5]。

2 结果

本实验在接种病毒后续发感染条件下提取转基因株系的 RNA, 以 PLRV 的 CP 基因 cDNA 为探针进行 Northern 分子杂交, 以非转基因株系为对照, 试图阐明接种病毒后, 在系统侵染情况下外源 CP 基因在转录水平上的表达与病毒在寄主体内复制的关系。结果表明所检测的转 PLRV CP 基因马铃薯株系均转录出 CP RNA, 其中 D₉₅₁₁ 株系 CP RNA 表达水平最高, D₉₅₀₇ 和 D₉₅₂₀ 两个株系的 CP RNA 表达水平较低, 而 D₉₅₁₂ 株系具有中等强度的 CP RNA 表达, 对照株系 D₉₅₂₁ 无 CP RNA, 只能检测到很强的与病毒基因组 RNA 杂交信号, Northern 分子杂交结果还显示转基因马铃薯株系 D₉₅₀₇ 和 D₉₅₂₀ 能检测到病毒基因组 RNA, 而 CP RNA 表达水平相对较高的株系 D₉₅₁₁ 和 D₉₅₁₂ 未能检测到病毒基因组 RNA (表)。进一步分析表明外源 CP 基因转录表达的号强度与转基因株系内病毒基因组 RNA 信号强度呈负相关趋势。这说明转基因株系中外源 CP 基因的转录表达水平与病毒在寄主体内的复制量呈负相关。用酶联免疫吸附试验检测供试转基因株系的病毒增殖量, 结果表明转基因株系的病毒滴度明显低于对照株系。且转基因株系的病毒滴度与 Northern 杂交检测到的病毒基因组 RNA 信号强度呈正相关趋势, 这进一步证实了 Northern 杂交结果的可靠性。

Northern 杂交及酶联免疫吸附试验结果表

株系号	转基因马铃薯株系的 CP RNA 相对表达强度	转基因马铃薯株系的 PLRV 基因组 RNA 与 CP 基因探针杂交信号强度	病毒滴度 (O. D ₄₀₅ 值)
D ₉₅₀₇	+	++	0.263
D ₉₅₁₁	+++	—	0.026
D ₉₅₁₂	++	—	0.024
D ₉₅₂₀	+	++	0.192
D ₉₅₂₁	—	+++	0.401

* D₉₅₀₇~D₉₅₂₀: 转 PLRV CP 基因马铃薯 Desiree; D₉₅₂₁: Desiree 品种的非转基因对照株系; 杂交信号表示+++强, ++中等, +弱, —无杂交。

3 讨论

以前曾认为转 CP 基因植物的抗病性源于 CP 基因的翻译表达, 然而, 也有一些研究结果显示转 CP 基因植物的抗性与 CP 积累无关。Presting 等^[6] 构建了三种不同的 PLRV CP 基因植物表达载体并用以转化马铃薯, 一种表达载体中含有野生型 PLRV CP 基因, 另一种表达载体中含有经修饰的 PLRV CP 基因以增

加 CP 的表达, 第三种是不带 CP 基因的空载体, 对这三种转基因植株的抗性研究表明, 导入修饰 CP 基因的植株与导入野生型 CP 基因的植株相比并没有提高抗性。用缺失翻译起始位点 ATG 的 PLRV CP 基因进行转化的结果显示即使缺失 ATG, 转基因植株也有较强的抗病效果, 说明抗病毒作用可能发生在 RNA 水平上, 本实验室曾用 Western blot 分析了 Desiree 转基因植株叶片可溶性 PLRV 外壳蛋白, 但未能检测出 PLRV 外壳蛋白, 综合以上所述, 目前的研究结果表明 CP 基因介导的抗病性并不完全是由 CP 基因的翻译产物决定的, CP RNA 在介导抗病方面可能起着不可低估的作用。Barker 等(1993)研究了 PLRV CP 基因在转基因烟草中的整合、转录与抗病毒复制的关系, 结果表明转基因植株抗病毒复制的程度与 CP 基因转录表达水平有关。以前关于转基因植物中外源基因转录表达与抗病关系的研究一般都是在未接种病毒的情况下检测外源基因转录产物, 然后再接种病毒研究抗性。我们选择经病毒系统侵染的转基因植物作为供试材料主要是考虑到转基因植物中表达的外源 CP RNA 与病毒 RNA 之间可能发生相互作用, 在病毒系统侵染的马铃薯植株中能够更确切地反映出这种相互作用的效应。本实验以病毒系统侵染的转基因马铃薯为材料对 PLRV CP 基因的转录与病毒在寄主体内复制关系的研究结果与 Barker 对 PLRV CP 基因的研究结果相一致, 并且支持 CP 基因介导的抗性发生在 RNA 水平上的观点, 我们认为 CP RNA 介导抗病的可能机制是与病毒 RNA 复制的模板副链 RNA 结合, 从而干扰病毒基因组 RNA 的复制, 或者是 CP RNA 与病毒基因组 RNA 竞争结合蛋白转译因子, 使病毒基因组 RNA 的转译过程不能正常进行。

参考文献

1 Karen — Beth G.Scholthof, Herman B.Scholthof, and Andrew O. Jackson Control of Plant virus diseases by Pathogen—derived resistance in transgenic plants, plant physiology, 1993, 102; 7
2 Theo C. Worwood et al. A small scale procedure of the rapid isolation of plants RNAs. Nucleic Acids Research, 1989. Vol. 17, No. 6, 2362
3 萨姆布鲁克, J. 弗里奇, E. F. 曼尼阿蒂斯, T. (1989) 金冬雁, 黎孟枫等译《分子克隆—实验指南》。1992, 第二版, 科学出版社。
4 张鹤龄等, 应用酶联免疫吸附试验鉴定马铃薯卷叶病毒, 病毒学报 1987, 3(3): 289~293
5 Gernot G. Presting, Oney, P. Smith, and Charles R. Brown Resistance to potato leafroll virus in potato plants transformed with the coat protein gene or with vector control constructs. Phytopathology, 1995, 85: 436~442
6 莽克强, 植物基因工程进展, 生物工程进展, 1993, 13(5) 1 (邮编 102206)