

携带黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的双元载体构建

律凤霞

(牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157012)

摘要:以黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因为目的基因,以大肠杆菌 DH5 α 为表达载体体外操作寄主菌,农杆菌 LBA 4404 为最终双元载体寄主菌。将 RT-PCR 获得的的目的基因片段连接到 pMD18-T simple Vectors 上,冻融法转化到大肠杆菌扩繁后,经限制性核酸内切酶酶切插入表达载体适宜酶切位点上,重组质粒 DNA 经冻融法转化到只含辅助质粒的根癌农杆菌中得到工程菌,完成含目的基因的双元载体构建,为培育抗 CMV 病毒的番茄品种打下基础。

关键词: 黄瓜花叶病毒; 外壳蛋白基因; 双元载体; 载体构建

中图分类号: S 436.421.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)12-0135-03

番茄病毒病是番茄的主要病害之一,发生普遍,危害严重。其中黄瓜花叶病毒(CMV)为番茄病毒病的第一大病原病毒。近年来,番茄栽培面积和产量都在不断的增加,番茄罹患病毒病常使生产遭受重大损失,我国南北各番茄产区均有发病,其发病率轻者为 30%左右,重病区高达 70%,严重时可使整个地区失收,成为威胁番茄生产的主要病害。实践证明:防治病毒病最有效的方法是通过培育抗病品种,抗病毒病育种成为消除番茄病毒病威胁的主要策略。我国的番茄抗病育种虽然起

步较晚,但也取得了显著成绩,无论理论上还是实践上都有明显进步。先后育成了一系列优良的抗病品种,而传统的育种艰苦费时,同时抗性基因常与不良农艺性状和低品质基因紧密连锁或产生基因多效性,从而大大限制了育种工作的进展。与之相比,基因工程育种具有明显的优越性,为培育抗病毒病的新品种开辟了途径。

该试验以黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV-cp)基因为目的基因,以大肠杆菌 DH5 α 为中间载体体外操作寄主菌,以农杆菌 LBA4404 为最终双元载体寄主菌。经反转录 PCR 获得目的基因,通过数次限制性内切酶酶切 DNA 连接酶连接完成目的基因向表达载体的定点插入,重组质粒经冻融法转化到只含辅助质粒的根癌农杆菌中得到工程菌,完成双元载体构建,为培育抗病病毒番茄品种打下基础。

作者简介: 律凤霞(1967),女,硕士,副教授,研究方向为分子生物学抗病育种。

基金项目: 牡丹江市科技局科技资助项目(G2009n2015)。

收稿日期: 2010-02-10

SRAP Examination of Genetic Diversity of the Wild *Playtcodon grandiflorus* and the Cultivation *Playtcodon grandiflorus*

WU Song-quan, YU Ya-bin, YAN Yi-zi, JIN Dong-chun, WU Ji-ri
(Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

Abstract: Sequence related amplified polymorphis(SRAP)molecular markers were used to detect the genetic diversity of 8 samples of the wild *Playtcodon grandiflorus* and 8 samples of the cultivation *Playtcodon grandiflorus*. The purpose of provide the basis for breedong of *Playtcodon grandiflorus*. The results showed that Twelve primer pairs produced 109 bands, veraged 9.1 bands per primenr pair, and produced 80 polymorphic bands, veraged 6.7 polymorphic bands per primenr pair, showed a higher rate of polymorphic (73.4%). The SRAP data obtained genetic similarity coefficient range 0.56~0.88, the results showed that the 16 samples of *Platycondon grandiflorum* DC. were clustered into the wild *Playtcondon grandiflorus* and the cultivation *Playtcondon grandiflorus*. two groups at genetic distance 0.56.

Key words: *Playtcondon grandiflorus*; genetic diversity; sequence related amplified polymorphis(SRAP)mark

1 材料与方法

1.1 试验材料

感染黄瓜花叶病毒病的鲜烟草叶片、大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 LBA4404、pC2300-35S-OCS 表达载体由黑龙江省烟草科学研究所中心实验室提供。pMD18-T simple vector 载体、DNA 提取试剂盒、限制性内切酶及 DNA 聚合酶、连接酶均为大连 TaKaRa 公司产品,其它药剂为市售分析纯试剂。

1.2 试验仪器

PTC200 热循环仪(美国 MJ 公司);紫外分析仪;Z-3000 紫外分光光度仪(日立);高速冷冻离心机(美国 BECKMAN);各种 TIP 头,离心管购自上海申能博彩公司。

1.3 试验方法

1.3.1 CMV-cp 基因的获得与克隆 NCBI 网站查询 CMV 外壳蛋白基因序列(选序列号为 S70105 的基因),根据该序列设计引物对 CMV-cp1: 5' aactcgagtcggaaacctct3' (在 5' 端添加 *Xho*I 的酶切位点以便后续操作)。CMV-cp2: 5' aagcttggtaccactggattt3', 引物间长度为 1 360 bp。用 RNA 提取试剂盒提取感染黄瓜花叶病毒的鲜烟草叶片总 RNA, 反转录制备 cDNA 第一链, RT-PCR 反应条件: 30 $^{\circ}$ C 10 min \rightarrow 52 $^{\circ}$ C 20 min \rightarrow 99 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow 5 $^{\circ}$ C 5 min。以 RT-PCR 产物为模板, 以 CMV-cp 引物进行 PCR 反应, 获得目的 DNA 序列, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min (94 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1.5 min) 35 次循环 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后提纯, 连接到 pMD 18-T Simple Vector, 质粒经冻融法转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞扩繁, 用含 80 mg/L 氨苄霉素的 LB 选择培养基筛选呈阳性菌落(重组质粒命名: pMD18-T-CTV-cp) 提取重组子质粒的 DNA。经特异引物 PCR 验证及测序验证后备用。

1.3.2 构建 pC2300-35S-OCS-CMV 表达载体 将带有

目的基因的 pMD18-T-CMV-cp 质粒和表达载体 pC2300-35S-OCS 质粒分别用 *Bam*HI 和 *Sal*I 进行双酶切, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, pMD18-T-CMV-cp 酶切产物回收小片段(约 1.4 KB)。pC2300-35S-OCS 酶切产物回收大片段(约 9.7 KB), 2 个回收片段经 DNA 连接酶连接, 获得重组质粒 pC2300-35S-OCS-CMV-cp, 重组质粒的 DNA 经 *Pst*I 单酶切验证后, 质粒经冻融法转化至大肠杆菌, 提取扩繁质粒 DNA 备用。

1.3.3 构建含目的基因的双元载体 将重组表达载体 pC2300-35S-OCS-CMV-cp 质粒的 DNA, 经液氮冻融法转化到只含辅助质粒的根癌农杆菌 LBA 4404 中, 用含 100 mg/L 卡那霉素的 YEB 选择培养基筛选抗性菌落, 提取表现卡那霉素抗性的农杆菌质粒 DNA, 经特异引物对 PCR 和 *Pst*I 酶切 2 种验证, 确定特异条带存在后, 菌液经液氮速冻-70 $^{\circ}$ C 保存备用, 完成双元载体系统的构建。

2 结果与分析

2.1 CMV-cp 基因序列克隆产物 PCR 验证及测序

经 RT-PCR 获得 CMV-cp 基因序列后连接到 pMD18-T Simple Vector 载体, 并经大肠杆菌扩繁, 用事先设计的引物对 CMV-cp1/CMV-cp2 对克隆菌液进行 PCR 反应, 产物经琼脂糖凝胶电泳分离验证, 特异片段长度约 1 400 bp(图 1), 证实连接正确。

选 3 号泳道菌液送测序公司测序, 所得序列与 No: S70105 核酸序列达 89% 同源, 符合原始设计。

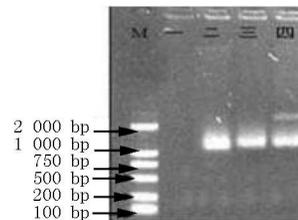


图 1 pMD18-T-CMV-cp PCR 产物电泳

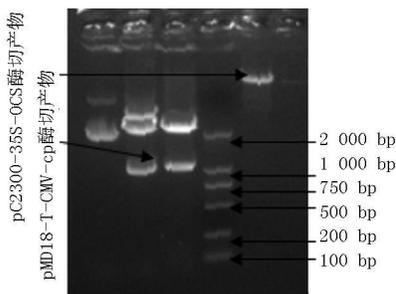


图 2 pMD18-T-CMV-cp 和 pC2300-35S-OCS 双酶切产物电泳图

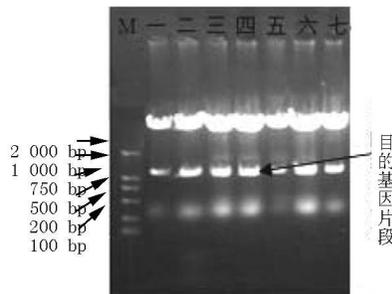


图 3 pC2300-35S-OCS-CMV-cp 表达载体工程菌酶切产物电泳

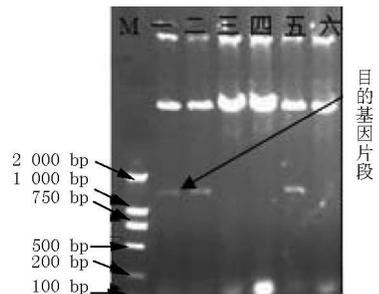


图 4 农杆菌双元载体工程菌酶切产物电泳

2.2 含目的基因的载体的鉴定

含目的基因的 pMD18-T-CMV-cp 和表达载体 pC2300-35S-OCS 经 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶切产物电泳(图 2)。

连接产物 pC2300-35S-OCS-CMV-cp 转化至大肠杆菌, 提取质粒 DNA 经 *Pst*I 单酶切, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 电泳条带与连接前长度基本相同(图 3), 证实片段长度正确, 说明目的基因片段已成功连接到表达载体适宜位点, 完成了表达载体构建。

2.3 双元载体的鉴定

提取重组表达载体 pC2300-35S-OCS-CMV-cp 质粒 DNA, 冻融法转化至农杆菌 LBA4404, 经 100 mg/L 卡那霉素选择培养基筛选, 提取质粒 DNA 经 *Pst*I 酶切, 产物电泳条带与连接前长度基本相同(图 4), 说明所获工程菌是含有目的基因片段的双元载体, 证实双元载体构建完成。

3 讨论

抗病毒基因工程育种具有目的基因来源不受物种限制、缩短育种年限、经济、抗病性稳定等优点, 是一条极具潜力的防治植物病毒病害的途径。目前研究策略有二大类: 一类是病毒来源基因介导的抗性, 应用较多的基因有外壳蛋白基因、复制酶基因、移动蛋白基因和其它一些序列; 另一类是非病毒来源的基因介导的抗性, 有来自动植物的抗性基因、植物抗体基因、核糖钝化蛋白基因等。

黄瓜花叶病毒(CMV)是一种危害严重、传播广泛的蚜传病毒, 能侵染单子叶和双子叶植物的 85 科 365 属中的 800 多种植物, 素有植物界“流感”、“癌症”之称。Stamova 等研究发现, 野生番茄(*L. chilense*)的 CMV 抗性是由显性单基因控制的, 该基因定位于番茄的第 12 号染色体上。1981 年, 我国科学家首先提出将病毒的 sat RNA 用于植物病毒病防治。1987 年, Harrison 等首次将 CMV 的 sat RNA 的 cDNA 转入番茄, 获得了世界

上第 1 株抗 CMV 的转基因番茄。周北雁等把从大田 CMV 主流病毒株系中克隆得到的 CMV-cp 基因导入番茄, 经连续选择后得到了纯合转基因番茄株系。人工接种试验表明, 该株系田间表现和农艺性状良好, 并且抗 CMV 性状可稳定遗传。

所以针对植物病毒病开发、创造更多不同类型的抗性基因和抗性机制, 已成为我国农业生产中亟待解决的课题。随着转基因制品安全性研究的深入, 应用生物技术提高番茄抗病性在番茄病毒病害防治中必将发挥极为重要作用。从病毒抗性角度, 根据侵染番茄的病毒株系的变化规律, 兼顾水平抗性和垂直抗性, 结合常规育种手段和生物技术方法创造尽可能多的抗性机制, 兼抗多种病毒是防治番茄病毒病的发展趋势。

参考文献

- [1] 杨荣昌, 龙明生, 徐鹤林等. 表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的转基因番茄对 CMV 的抗性[J]. 江苏农业科学, 1995(11): 40-44.
- [2] 崔连民, 张福进, 朱常香等. 黄瓜花叶病毒山东分离物外壳蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 山东农业科学, 2005(4): 3-6.
- [3] 律凤霞, 郭兆奎, 颜培强等. TMV 复制酶基因靶向的 RNA 干涉载体构建[J]. 植物研究, 2008(3): 310-314.
- [4] 徐启江, 王傲雪, 迟玉明. 获得 CMV 番茄抗源材料研究进展[J]. 北方园艺, 1998(5): 1-2.
- [5] 刘士勇, 刘守伟. 番茄抗病基因工程育种研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2006(1): 102-104.
- [6] Galon A, Antiguns Y, Roshier A, et al. A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication[J]. J Gen Virol, 1992, 73: 2183-2187.
- [7] 周北雁, 李毅, 陈章良. 北京大学的抗病毒转基因作物[J]. 生物技术通报, 1999(3): 42-45.
- [8] 郭兴启, 温孚江. 转基因植物中 RNA 介导的病毒抗性研究进展[J]. 生命科学, 2000, 12(4): 166-169.
- [9] Stamova BS, Chetelat RT. Theor Appl Genet[J]. 2000, 101: 527-537.
- [10] 徐香玲, 石锐. 利用发根农杆菌介导二元载体向番茄导入 TMV、CMV 外壳蛋白基因的研究[J]. 植物研究, 1994(14): 416-417.

Construction of Binary Vector of Cucumber Mosaic Virus Coat Proteingene

LV Feng-xia

(Mudanjiang Normal University College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012)

Abstract: The coat protein gene of cucumber mosaic virus was as target gene; and the *E. coli* DH5 α was as the host bacteria of the intermediate vector for vitro operation; and the *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 was as the host bacteria of the final binary vector in this paper. The target gene was connected to the pMD18-T simple Vector after RT-PCR, than the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* by freeze-thaw method, which was insert into expression vector restriction sites after digested with restriction endonuclease. The new recombinant plasmid DNA was transformed into the *Agrobacterium bacteria* which contain only helper plasmid by the freeze-thaw method. Than the construction of binary vector of target gene was completed.

Key words: Cucumber Mosaic Virus; coat protein gene; binary vector; construction