

靶向 CMV 外壳蛋白基因的 RNA 干涉在番茄中转化及表达

潘永明¹, 张李华², 李春彦³, 周岩¹

(1. 牡丹江师范学院, 黑龙江 牡丹江 157012; 2. 密山市 8511 农场林业局 黑龙江 密山 158308;

3. 牡丹江医学院 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要:以 CMV(黄瓜花叶病毒)外壳蛋白基因为靶标基因, 针对 CMV 3 个常见株系(普通株系、黄化株系和坏死株系)外壳蛋白基因间高度同源序列设计引物, 经 RT-PCR 获得目的序列, 构建 RNA 干涉双元载体(其中目的序列反向重复插入)。以含双元载体的根癌农杆菌介导转化无菌番茄苗, 培育转基因番茄。人工接种 CMV 验证转基因番茄抗病毒能力, 荧光定量 PCR 分析转基因番茄中外源基因的表达效果。结果表明: RNA 干涉转基因番茄呈现不同程度的抗病毒能力; 对表现抗病毒能力的转基因番茄进行荧光定量 PCR 分析显示, 转基因番茄中靶标基因的转录 mRNA 存在一定程度的降解, 且抗病毒能力与降解程度成正相关。

关键词: RNA 干涉; 黄瓜花叶病毒; 基因转化; 基因表达

中图分类号: Q 946-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)06-0133-04

病毒引起的植物病害造成的损失相当严重, 不仅造成大幅度减产, 还可降低产品的品质和风味, 严重影响经济效益, 而且病毒不像其它病原生物, 目前生产上还没有有效的防治药剂。番茄病毒病是番茄上发生最普遍、最难防治、危害最严重的病害。黄瓜花叶病毒(CMV)和烟草花叶病毒(TMV)是番茄病毒病害的两大主要病原, 常常单独侵染或几种病毒复合侵染, 二者的寄主范围均十分广泛。发病后传播广、危害重, 已成为威胁番茄生产的主要病害之一^[1-2]。

为有效控制植物病毒的危害, 科研人员常采取传统的抗病毒育种、弱毒株系交叉保护、改进栽培技术、杀虫剂控制传毒介体等方法预防病毒的侵入。多年实践证明, 植物病毒病害一旦发生, 生产上尚无有效的防治药剂, 抗病毒育种及脱毒苗木的培育成为消除番茄病毒病威胁的主要策略^[3]。而基因工程中的 RNA 干涉技术在病毒病害防治中的应用受到广泛关注。

RNA 干涉(RNA interference, RNAi)是将特定基因某一片段的正义和反义序列所形成的双链 RNA(dsRNA)导入细胞后, 可使该基因的 mRNA 降解, 从而导致

该基因沉默^[4]。

为深入了解 RNA 干涉在植物病毒病害防治中应用的可行性及防治效果, 现以番茄无菌苗作为试验材料, 以黄瓜花叶病毒(CMV)做为 RNA 干涉的靶向基因, 以 CMV 3 个株系(普通株系、黄化株系和坏死株系)间同源序列为干涉的靶序列。依据 RNA 干涉机制设计试验方案, 借助根癌农杆菌基因工程的常规操作, 培育 RNA 干涉转基因番茄。目的在于揭示转基因番茄的获得性抗病毒能力与 RNA 干涉之间的内在关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄种子由牡丹江市种子公司购得; 大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 LBA 440 和 pCambia 2300 表达载体为牡丹江师范学院生命科学与技术学院贮备; CMV 病毒样品、RT-PCR 试剂盒、pUCCRNAi 载体及荧光定量分析试剂盒由黑龙江烟草科技研究所提供; 试验中使用的相关试剂从生物试剂公司购得。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 干涉双元载体的构建 NCBI 网站查找 CMV 3 个不同株系外壳蛋白基因序列(DQ914877. 1; GU453918. 1; L36525. 1)进行比对, 确定高度同源序列(CMV-cp), 然后设计引物, 引物间长度 396 bp。CMV-cp1: 5' AACTCGAG CGTAATCGTCGACGTC 3'; CMV-cp2: 5' AACTTCAGGGTAATCG 3'。从黑龙江省烟草科研所试验圃采集感染 CMV 的新鲜病叶, 提取植物总

第一作者简介: 潘永明(1968-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向为遗传育种。E-mail: swxlfx@126.com.

基金项目: 牡丹江市科技局科技资助项目(110200401008)。

收稿日期: 2010-12-27

RNA, 反转录(RT-PCR)合成 cDNA 第一链。随即以特异引物(CMV-cp1/CMV-cp2)继续进行 PCR 扩增获得靶序列, 经 DNA 连接酶与 pMD18-T Simple Vector (T 载体)连接成环, 并经冻融法转化到大肠杆菌感受态细胞扩繁并测序。测序结果与高度同源序列比对达 98% 一致(表 1)。将含靶序列的 T-载体用 *Bam*H I 和 *Xho* I 2 次双酶切, 分别正向插入 pUCCRNai 载体 *Bgl* II 与 *Xho*I 酶切位点间, 反向插入 pUCCRNai 载体 *Bam*H I 与 *Sal*I 酶切位点间。重组中间载体(pUCCRNai-CMV2)以 *Pst*I 单酶切后, 插入 pCAMBIA2300 表达载体的 *Pst*I 酶切位点, 经液氮冻融法转化到含辅助质粒的根癌农杆菌 LBA4404 感受态细胞中, 完成了 RNA 干涉双元载体工程菌的构建^[9]。

1.2.2 双元载体工程菌对番茄的遗传转化 叶盘法^[9]完成双元载体工程菌对番茄组培苗的侵染, 24 h 光照共培养后, 番茄叶盘转入 MS 选择培养基(吲哚乙酸 NAA 0.1 μg/mL + 玉米素 ZT 2 μg/mL + 头孢霉素 Cb 500 μg/mL + 卡那霉素 Km 50 μg/mL)中, 27℃光照培养诱导愈伤。30 d 左右转至 MS 继代选择培养基(NAA 0.1 μg/mL + ZT 2 μg/mL + Cb 250 μg/mL + Km 100 μg/mL)中继续培养, 分化叶芽生长到 1 cm 高左右, 选择未黄化的叶芽修整后转入 1/2MS 生根培养基(IAA 0.1 μg/mL + 6-BA 1.0 μg/mL + Cb 250 μg/mL)中诱导生根 20 d 左右长成小苗, 后期移栽花盆中温室培养^[7]。8 片叶期采中部叶片提取番茄 DNA, 以特异引物(CMV-cp1/CMV-cp2)和启动子引物(35S1/35S2)进行 PCR 检测, 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分离。

1.2.3 转基因材料对 CMV 抗性鉴定 将呈阳性的转化番茄人工接种 CMV, 同时以普通番茄做对照, 验证番茄抗病毒能力。接种 20 d 后调查发病情况。

1.2.4 转基因苗 RNAi 效果的荧光定量鉴定 将 1.2.1 获得的重组 T 载体质粒稀释, 得到 3 种起始拷贝数浓度已知的阳性标准液 (T₁: 10¹ cop/μL; T₂: 10² cop/μL; T₃: 10³ cop/μL), 病害调查结束, 选普通番茄对照 2 株 (CK1/CK2), 对 CMV 表现抗性的 RNAi 转化番茄 4 株 (S1、S2、S3、S4), 采集植株样品中部叶片分别提取总 RNA, 以特异引物反转录合成 mRNA cDNA 第一链。利用 OpticonTM2 荧光定量 PCR 仪对 6 个样品和 3 个标准液进行靶基因转录产物 mRNA 含量分析 (SYBR GreenI 为荧光染料), 比较靶标基因转录产物量的差异。

2 结果与分析

2.1 转基因番茄中靶标序列检测分析

选择培养基筛选的 4 株抗性番茄苗的叶片 DNA 以特异引物进行 PCR 检测, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离(图 1、2)。

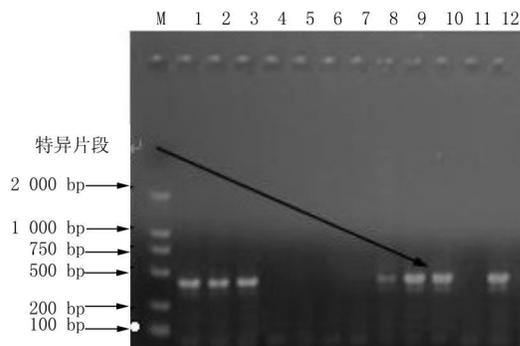


图 1 转化番茄特异引物 (CMV-cp1/CMV-cp2) PCR 检测

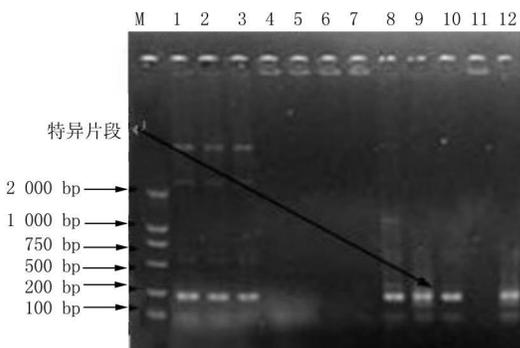


图 2 转化番茄启动子引物 (35S1/35S2) PCR 检测

注: M; DNA Marker; 1~3; 阳性对照; 4~6; 阴性对照; 7~12; 样品。

由图 1、2 可知, 3 个阳性对照和 3 个阴性对照表现正常, 说明试验无污染或其它干扰。图 1 中 6 个被测样品中 4 个泳道出现近 400 bp 特异条带, 初步确定该 4 株为转基因番茄。图 2 中 6 个被测样品中同样 4 个泳道出现近 200 bp 特异条带, 2 次 PCR 检测阳性对应样品结果一致, 进一步证实该 4 株为转基因番茄。

2.2 转 RNAi 基因番茄中干涉效果的验证

人工接种病毒 20 d 后病害调查结果(表 1)显示, 试验中获得的 4 株转基因番茄中有 2 株表现为高度抗病, 并持续到调查后期 2 株表现为感病, 感病程度存在一定差异; 2 株阴性对照均表现为高度感病; 初步证实转基因番茄在抗 CMV 能力上与对照番茄比较有显著提高。

表 1 番茄试验植株人工接种 CMV 后病害调查

编号	PCR	抗性级别	抗性评价
1	阳性+	0	Rh
2	阳性+	0	Rh
3	阳性+	1	S
4	阴性+	2	S
CK(2株)	阴性-	4	Sh

注: 表中 Sh 表示高度感病 S 表示一般感病; Rh 表示高度抗病。

2.3 转基因番茄 RNAi 效果的荧光定量分析

由图 3 可知, 3 个标准物的 *C_t* 值(达到阈值的循环数)与起始拷贝数呈线性相关, 相关标准曲线方程为: $Y = 0.98x + 9.56$ 。由图 4 可知, 3 个标准样和 6 个样品的荧光 PCR 扩增, 参照方程, 以 *C_t* 值计算待测样品的

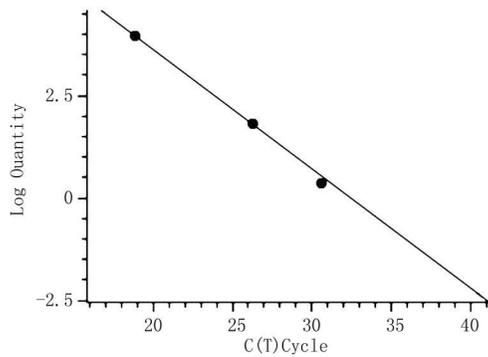


图3 各待测样品实时荧光 PCR 标准曲线

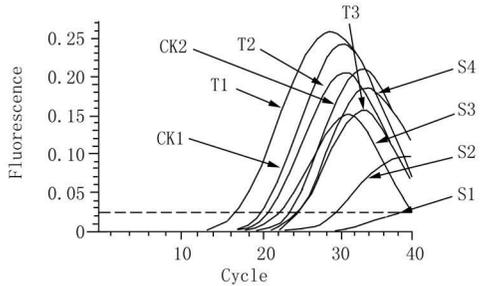


图4 各待测样品实时荧光 PCR 扩增曲线

表2 各待测样品目的基因 mRNA 起始拷贝数

样品代号	C _T 值	起始拷贝数
Sample(CK1)	18.852	7 652.3428
Sample(CK2)	19.151	6 827.5118
Blank	None	N/A
Sample1(S1)	34.182	16.0120
Blank	None	N/A
Sample2(S2)	24.381	176.3268
Sample3(S3)	20.908	1 185.3844
Standard(T1)	25.592	100.0000
Sample4(S4)	21.117	2 010.8650
Standard(T2)	23.310	1 000.0000
Standard(T3)	18.012	10 000.0000

CMV 外壳蛋白基因 mRNA 起始拷贝数(表2)。

由图4和表2可知,各样品的 C_t 值、mRNA 起始拷贝数存在显著差异。其中2个对照样品 CK1、CK2 的 C_t 值最小,分别为 18.9 和 19.2, mRNA 起始拷贝数值最高,达到 7 652.3 和 6 827.5;说明其在较大浓度的 mRNA 起始拷贝数下经少数循环很快达到固定阈值;4个 RNAi 转基因材料(S1、S2、S3、S4) C_t 值明显大于对照, mRNA 起始拷贝数都明显较低,分别为 16.0、176.3、1 185.3 和 2 010.9,与对照相比,差异极显著。说明 RNAi 转基因材料在较大的 C_t 循环次数下, mRNA 起始拷贝数依然远远低于对照,说明 mRNA 明显减少。验证了 RNAi 转基因番茄对 CMV 的高度抗性源于 RNA 干扰作用,即 CMV 外壳蛋白基因转录产物 mRNA 的有效降解。

3 讨论与结论

RNA 干扰引起的抗病性是近年来发现的一种新的

植物抗病毒基因工程,目前已被证明是 RNA 沉默(即 RNA 干扰)的结果。RNAi 是动物和植物界普遍存在的一种防御反应,可高度特异地抑制同源基因的表达。多数研究表明, RNA 介导的抗病性的产生与转基因在植物体内的整合方式(特别是反向重复)有密切的关系,而与转基因的拷贝数关系不大^[8]。它具有抗病程度高、抗性持久及较高生物安全性等优点,但同时也存在抗病谱窄的缺点^[9]。引发 RNA 沉默的来源有多种,很多研究表明引发 RNAi 的片段并不需要完整的基因,只需要基因的部分序列^[10]。试验中将 396 bp 的 CMV-cp 序列整个反向重复构建到载体并转化进番茄基因组中,抗病性接种鉴定表明转化材料对 CMV 病毒具有显著的抗性。

试验中所设计的干扰片段是经过网上 Blast 序列比对,选同源性高的序列作为靶序列,从理论上讲,转化材料应该对 CMV 不同株系同时表现抗性,试验获得并确认的 4 株转基因番茄,对人工接种的 CMV 抗性程度差异显著,荧光定量 PCR 分析表明具有高度抗性的转基因番茄在 RNA 干扰表达效果上也存在一定差异,其产生原因需要通过分子生物学手段进一步验证其外源基因整合完整性、具体整合位点及其它相关遗传特性^[11]。

RNA 干扰技术已经引起人们的广泛关注,其机制和应用研究都成为目前的研究热点。可以肯定的是 RNA 干扰技术正在被人们广泛接受和应用,在动物、植物及微生物等领域有着广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 陈瑞泰. 世界烟草病害形势[J]. 中国烟草, 1989(3): 5-11.
- [2] 孔凡玉, 朱贤朝, 石金开. 我国烟草侵染性病害发生趋势原因及防治对策[J]. 中国烟草, 1995(1): 31-34.
- [3] Kim M, Canio W, Wessler S et al. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato[J]. Science, 2001, 293: 287-289.
- [4] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391: 806-811.
- [5] 律凤霞, 郭兆奎, 颜增强, 等. TMV 复制酶基因靶向的 RNA 干扰载体构建[J]. 植物研究, 2008(3): 310-314.
- [6] Horsch R B, Fry J E, Hofmann N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. Science, 1985, 227: 1229-1231.
- [7] 潘永明. 根癌农杆菌介导外源基因转化番茄体系优化[J]. 北方园艺, 2010, 18: 142-144.
- [8] Smith N, Singh S, Wang M B et al. Total silencing by intron-spliced hairpin RNA[J]. Nature, 2000, 407(6802): 319-320.
- [9] 韩蓓, 王秀敏, 顾学范. 双链 RNA 干扰技术(RNAi)在不同生物中应用的研究进展[J]. 遗传, 2002, 24(2): 200-202.
- [10] 律凤霞, 潘永明, 郭兆奎. 外源 RNA 干扰基因在烟草中的转化及表达[J]. 西北植物学报, 2009(10): 1962-1966.
- [11] Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region[J]. Nucleic Acids Res., 2004, 32: 691-699.

山豆根组培快繁技术优化的研究

姚绍嫦¹, 凌征柱¹, 蓝祖栽¹, 马小军^{1,2}

(1. 广西药用植物园 广西 南宁 530023; 2. 中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)

摘要:以药用植物山豆根为材料,通过探讨不同部位、基本培养基、6-BA 浓度和继代代数对有效繁殖系数和成苗质量的影响,以优化山豆根的组培快繁技术。结果表明:顶芽茎段为诱导的最佳部位;改良 B5 低氮盐,为最适基本培养基;6-BA 2.0 mg/L 对芽分化和苗的质量较优;较为合适的继代代数为 10~15 代。

关键词:山豆根;试管苗;有效繁殖系数;成苗质量

中图分类号:S 793.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)06-0136-04

山豆根为豆科灌木状植物越南槐 (*Sophora tonkinensis* Gagnep.) 的干燥根及根茎,为传统中药,主产于广西^[1],具有清热解毒、消肿利咽等功效^[2]。传统用于治疗火毒蕴结、咽喉肿痛、牙龈发炎等。近代临床还常用其治疗湿热黄疸、湿热带下以及钩端螺旋体病、心率失常、膀胱癌、喉癌、恶性葡萄胎等症^[3]。其有效成分为苦参碱和氧化苦参碱^[4]。山豆根分布范围很窄,零星

生长于石山岩缝之中,目前掠夺性的采挖已经使野生资源濒临枯竭^[5]。自然繁育完全依靠种子,然而开花结荚期病虫害严重和种子成熟时自然脱落的特性常造成种子产量非常低,生产上无法实现大面积栽培。植物组织培养技术为山豆根的快速繁育提供了一条实用而高效的途径。课题组从 2005 年起开展山豆根的组织培养研究,虽然再生系统已经初步建立^[6],但是繁殖系数低和成苗质量不好是制约其实现工厂化育苗的瓶颈。

试管苗的繁殖速度和成苗质量受多种因素的影响,如基因型、外植体部位、年龄、来源、取材季节、培养基和培养条件以及培养代数等,应通过具体试验来摸索每种植物最快最好的繁殖方法^[6]。该试验在原有的研究基础上,进一步探讨不同部位、基本培养基、6-BA 浓度和继

第一作者简介:姚绍嫦(1980),女,广西容县人,硕士,助理研究员,现主要从事药用植物组织培养方面的研究工作。E-mail: yaoshaochang@163.com。

基金项目:国家科技重大专项资助项目(2009ZX09308-002);国家发改委中药材扶持资金资助项目(发改运行[2007]2706号)。

收稿日期:2011-01-17

Transform and Expression of RNA Interferential Targeting CMV-Coat Protein Gene in Tomato

PAN Yong-ming¹, ZHANG Li-hua², LI Chun-yan³, ZHOU Yan¹

(1. Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, Heilongjiang 157012; 2. Mishan 8511 Farm Forestry Bureau, Mishan, Heilongjiang 158308; 3. Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011)

Abstract: The coat protein gene of cucumber mosaic virus (CMV) was targeted for RNA interference in this paper. The partial sequence of CMV coat protein gene cDNA was obtained by the RT-PCR with the primers which designed according to the high homologous sequences of three CMV three strains. The target sequences were prepared by PCR and inverted repeat in plasmid to build the RNA interference binary vector. The tomato were genetic modified via binary vector of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The resistance to CMV of transgenic tomato was identified by artificial inoculation. The expression of RNA interference effect of the transgenic tomato were evaluated by realtime PCR analysis. The results showed that RNAi-transgenic tomato showed ability of different levels of anti-virus, the quantitative PCR analysis for transgenic tomatoes antiviral capacity showed that the transgenic tomatoes target gene transcription mRNA exist a certain degree of degradation, and the degree of degradation was positive correlation to antiviral capacity.

Key words: RNA interference; cucumber mosaic virus; gene transformation; gene expression