

DOI: 10.1360/yc-007-1018

应用 RNAi 技术培育抗 TMV 病毒转基因烟草

颜培强¹, 白先权², 万秀清¹, 郭兆奎¹, 李丽杰¹, 公海英¹, 储成才²

1. 黑龙江省烟草科学研究所, 牡丹江 157011;
2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

摘要: 利用烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因构建 RNAi 干涉载体, 通过叶盘法转化至烟草 K326 和龙江 911 两个栽培品种。对转基因株系的荧光定量 PCR 分析表明, 不同转基因株系的病毒 RNA 靶序列都得到一定程度的降解, 抗病性鉴定结果证实, 转基因 K326 和龙江 911 两个栽培品种的转基因材料分别有 83% 和 90% 转基因株系对 TMV 呈现免疫级抗性。

关键词: RNAi; 转基因烟草; TMV

Expression of TMV coat protein gene RNAi in transgenic tobacco plants confer immunity to tobacco mosaic virus infection

YAN Pei-Qiang¹, BAI Xian-Quan², WAN Xiu-Qing¹, GUO Zhao-Kui¹, LI Li-Jie¹, GONG Hai-Ying¹, CHU Cheng-Cai²

1. Heilongjiang Tobacco Research Institute, Mudanjiang 157011, China;
2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: RNAi technique has been proved as a powerful tool for plant breeding. In this paper, the coat protein of tobacco mosaic virus (TMV) was used for constructing the RNAi interference vector. The tobacco varieties K326 and Longjiang 911 were transformed via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, and transgenic plants were generated. The expression analysis with real-time PCR indicated that TMV RNA had been degraded varied in different transgenic lines. Field assay revealed that 83% and 90% transgenic plants showed immunity resistance to TMV in K326 and Longjiang 911 respectively.

Keywords: RNAi; transgenic tobacco; coat protein; TMV; disease resistance

烟草普通花叶病是我国烟区的主要病害。每年发病面积约 277.55 万亩, 减少产量 4432.29 万担, 造成经济损失 2.3457 亿元人民币。生产上尚无有效的防治药剂, 且主栽品种抗病性差、抗源狭窄, 存在大面积爆发流行的潜在危险。将病毒外壳蛋白和复制酶基因导入烟草可在一定程度上增强对 TMV 病毒的抗性, 但其抗性主要在病毒侵染初期, 可以推迟发病, 但难以持久、有效地控制烟草普通花叶病的

危害^[1]。近年来, 利用 RNAi 技术创制抗病毒转基因植株取得了很好的效果^[2,3], Waterhouse 等^[4]对马铃薯 Y 病毒(PVY)蛋白酶基因片段构建 IRS 载体进行烟草转化, 获得抗性植株。Wang 等^[5]以大麦黄矮病毒(BYDV-PAV)的多聚酶基因反向重复序列载体(hpBYDVpol)转化大麦, 获得对 BYDV 免疫级抗性的转基因植株。朱俊华等^[6]将马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因部分序列反向重复转化入烟草, 获得对 PVY

收稿日期: 2006-12-31; 修回日期: 2007-02-05

基金项目: 国家烟草专卖局科技项目(编号: 110200401008)[Supported by the Research Projects of State Tobacco Monopoly Administration (No.110200401008)]

作者简介: 颜培强(1977-), 男, 山东人, 硕士, 中级农艺师, 研究方向: 分子生物育种。Tel: 0453-6580213; E-mail: khldog@163.com

通讯作者: 郭兆奎(1964-), 男, 山东人, 博士, 高级农艺师, 研究方向: 基因工程。Tel: 0453-6580205; E-mail: guozhaokui@yahoo.com.cn

免疫烟草植株,但仍未有利用 RNAi 技术创制抗 TMV 烟草转基因植物的报道。为了创建高抗 TMV 烟草材料,我们通过 RNAi 方法将病毒外壳蛋白基因反向重复序列导入烟草,使其转录产生 RNA 的双链发卡环结构^[7],产生对侵入病毒的抗性机制^[8]。并将其转至在生产上广泛种植的两个烟草栽培品种 K326 和龙江 911。对转基因植株的抗病性鉴定筛选出了抗病性和农艺性状均较好的转基因株系,为抗 TMV 烟草转基因品种的培育奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 烟草材料

烤烟品种(K326 和龙江 911)由黑龙江省烟草研究所育种室提供。

1.2 质粒、菌株和试剂

大肠杆菌 DH5 α , 农杆菌 LBA4404 本实验室保存。pUCCRNAi 干涉载体和植物双元表达载体由中国科学院遗传发育所储成才教授提供。RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant Mini Kit 为 QIAGEN 公司产品。RNA 反转录试剂盒(RNA PCR Kit), 限制性内切酶、DNA 聚合酶、连接酶、脱磷酶以及引物等均为大连 TaKaRa 公司产品。DNA 回收试剂盒为上海申能博彩公司产品。

1.3 TMV RNA 提取及表达载体的构建

黑龙江省烟草研究所试验场 TMV 病圃采集幼嫩病叶,提取 TMV 病毒 RNA,反转录合成 cDNA。根据已报道的 TMV 序列设计引物 TMV1:5'-AACTCGAGGTCTTACAGTATCACTACTC-3'; TMV2:5'-ACGTGCCTGCGGATGTATAT-3' 进行 PCR 扩增,扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 65 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min, PCR 片段插入 TaKaRa pMD18-T vector 测序。将含 TMV-*cp* 序列的 T 载体用 *Bam*H 和 *Xho* 酶切,反向重复插入干涉载体 pUCCRNAi 中,用 *Pst* 酶切此反向重复序列插入表达载体 pXQ35。

1.5 烟草转化

参照 Horsh 的叶盘法^[9],侵染烟草品种 K326 和龙江 911。

1.6 抗性苗的 PCR 鉴定

待抗性苗根系发育完全,成苗后移栽至温室,同时取叶片利用改良 CTAB 方法提取 DNA。在两个

反向重复 TMV-*cp* 干涉序列之间的连接区域的同一位置设计检测引物 RNAIR(5'-GAGTAGTACGGTC-CGTACC-3')和 RNAIF(5'-GGTACGGACCGTACTA-CTC-3'),方向相反,分别利用两个引物与 TMV1 引物对转基因植物 DNA 进行 PCR 扩增。

1.7 转化苗 TMV 病毒的干涉鉴定

RNeasy Plant Mini 提取试剂盒提取总 RNA,利用 TaKaRa RNA PCR Kit 试剂盒,以 TV1 引物反转录合成 mRNA cDNA 第一链。利用 OpticonTM 2 荧光定量 PCR 进行 TMV-*cp* mRNA 含量分析。样品包括 4 个阳性标准物(TMV-*cp* 基因的 TV1/TV2PCR 扩增产物稀释液,每 μ L 中含目标片段的拷贝数分别在 10^4 个, 10^3 个, 10^2 和 10^1)分别为 T1, T2, T3, T4。1 个阴性非转基因未感染 TMV 样品(S1), 1 个感染 TMV 病毒样品(S2), 1 个转 TMV-*cp* 基因样品(S3), 3 个 RNAi 转化材料(S4, S5, S6)。荧光定量 PCR 扩增中以 SYBR[®] Green I 为荧光染料,PCR 体系(25 μ L): 引物(10 pmol/ μ L)各 0.5 μ L, dNTPS(10 mmol/L)1 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, SYBR[®] Green I(10 \times) 0.15 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 64 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 循环 32 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.8 转化材料抗 TMV 病毒鉴定

田间采集各种典型感染 TMV 病毒的新鲜烟草叶片,加石英砂研磨,磨擦接种到各转化材料及相应的对照品种的幼嫩叶片上,接种 3 周后按“TMV 病害调查分级标准”调查 TMV 的发病情况。

2 结果与分析

2.1 TMV-*cp* 基因的 PCR 扩增与序列分析

为了获得较广谱的病毒抗性,我们扩增的 TMV 外壳蛋白 RNA TMV-H 长度为 634 bp,通过与不同来源的 TMV 外壳蛋白基因同源性比对发现,其与 Variant1(美国)、Fujian(中国)、Korea(韩国)TMV 具有 99% 的相似性。与 TMV 的 Egypt(埃及)相似性为 97%,与 MX(墨西哥)相似性为 90%;与 TMV 的番茄株系、坏死株系、黄化株系相似性分别为 74%、97%、98%。与侵染齿舌兰、辣椒、番茄、Tropical soda apple 等物种的一些病毒 RNA 外壳蛋白也有较高的相似性,见表 1。

表 1 TMV-H 的 NCBI 比对结果

Table 1 Homology analysis of TMV-H

株系或分离物 Strain	来源 Source	NCBI 编号 NCBI number	类型 Type of virus	相似性 Similarity(%)
1. 变种 I Variant I	美国 USA/烟草 Tobacco	V01408	TMV-cp(普通株系)	99
2. 福建 Fujian	中国 CHN/烟草 Tobacco	AF395127	TMV-cp(普通株系)	99
3. 普通株系 TMV-common	韩国 KOR/烟草 Tobacco	X68110	TMV-cp(普通株系)	99
4. 黄化株系 Yellow mosaic	中国 CHN/马铃薯 Potato	AF318218	TMV-cp(黄化株系)	98
5. 埃及 Egypt	埃及 EGY/烟草 Tobacco	AY686725	TMV-cp(普通株系)	97
6. 坏死株系 TMV-lethal necrosis	泰国 THA/烟草 Tobacco	AY633749	TMV-cp(坏死株系)	97
7. 番茄花叶病 Tomato mosaic virus	巴西 BRA/番茄 Tomato	AF411922	TMV-cp	97
8. 墨西哥株系 MEX	墨西哥 MEX/烟草 Tomato	DQ401152	TMV-cp	90
9. 番茄株系 TMV-TOM	韩国 KOR/番茄 Tobacco	AF103779	TMV-cp(番茄株系)	90
10. 辣椒轻微斑驳病毒 P1 株系 Pepper mild mottle virus P1	韩国 KOR/辣椒 Capsicum	AF103777	辣椒轻微斑驳病毒外壳蛋白 Pepper mild mottle virus coat protein	73
11. 热带苏打苹果 Tropical soda apple	美国 USA/热带苏打苹果 TSA	AY956381	TSA mosaic virus coat protein	66
12. 齿舌兰 TMV-O	美国 USA/齿舌兰 Odontoglossum	AF141927	齿舌兰环斑病毒外壳蛋白 Odontoglossum ring spot virus coat protein	60
13. DSMZ PV-120	德国 GER/烟草 Tobacco	TMI429097	烟草轻绿花叶病毒 TMGMV	60
14. 烟草环斑病毒 TRSV	中国 CHN/烟草 Tobacco	AY787756	烟草环斑病毒外壳蛋白基因 TRSV	26

2.2 植物表达载体的构建

将带有反向重复序列 *TMV-cp* 的 pUCCRNAi 载体和植物表达载体 pXQ35S 分别用 *Pst* 进行酶切, 连接, 获得重组质粒(图 1)。

2.3 转化烟草与抗性苗的 PCR 鉴定

将所获得的 29 株 K326 和 12 株龙江 911 抗性苗转至温室种植。分别应用 *TMV-cp* 干涉发卡环的中间位置设计不同方向引物 RNAIR 及 RNAIF 之一与 TV1 引物对抗性苗进行 PCR 鉴定, 两对引物的 PCR 产物分别为长度 849 bp、667 bp 片段, 抗性苗中 K326 和龙江 911 分别有 24 和 10 株阳性转基因植株, 证明转基因株系 *TMV-cp* 干涉全序列已成功插入植物基因组 DNA 中。

2.4 转化苗 TMV 病毒的干涉效果

从选择出的转基因植物实时 PCR 扩增曲线图、

标准曲线及拷贝数分析(图 2, 表 2)可见, 标准物的 *Ct* 值与拷贝数呈直线相关, 其标准曲线的方程为:

表 2 各样品的 *Ct* 值及拷贝数Table 2 Analysis of *Ct* value and copy numbers

样品 Sample	<i>Ct</i> 值 <i>Ct</i> value	拷贝数 Copy numbers
S1	0	0
S2	17.0	10533
S3	19.2	2592
S4	24.48	89
S5	28.5	7.36
S6	26.68	23
T1	16.9	10000
T2	21.8	1000
T3	24.2	100
T4	31.4	10

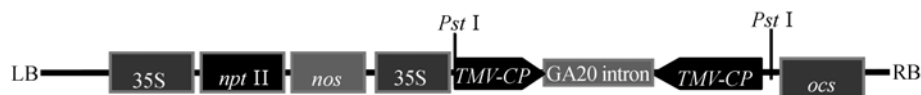


图 1 植物 RNAi 表达载体模式图

Fig. 1 The diagram of Tobacco Mosaic Virus RNAi vector

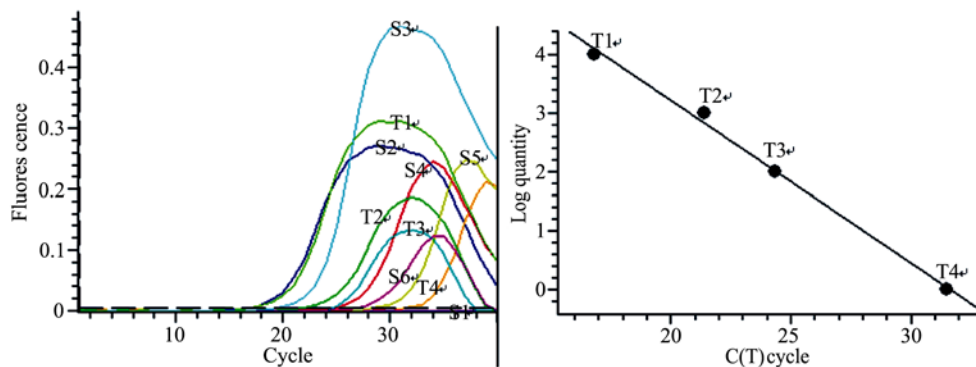


图 2 转基因植株的实时 PCR 扩增曲线图及标准曲线图
Fig. 2 The real-time PCR curve of samples and standard curve

$y = -0.29x + 3.44$; 偏相关系数为 $r^2 = 0.981$, 可通过 C_t 值估测待测样品的 DNA 拷贝数, 同时各转基因植株的实时 PCR 扩增曲线图可以看出, 转基因植株的 C_t 值、拷贝数存在显著差异, 其中以 S2 植株 (RNA 提取自田间采集的感病新鲜烟草叶片) 的拷贝数最高。其次为 S3 转 *TMV-cp* 基因植株, 而 3 个 RNAi 转化材料 (S4, S5, S6) 最低, 与转 *TMV-cp* 基因植株相比存在显著差异, 说明其 mRNA 存在不同程度的降解。



图 3 RNAi 转化材料 (S4, S5, S6) 与对照材料 (S2) TMV 接种抗病性比较

Fig. 3 TMV resistance comparison between RNAi transgenic materials (S4, S5, S6) and CK (S2)

2.5 转化材料抗 TMV 病实验

通过对转基因植株的 TMV 病毒接种后病情鉴定发现, K326 转基因植株的 TMV 病情指数为 4.2, 最高病级 1 级, 83% 以上的转基因植株对 TMV 免疫, 而对照 K326 的 TMV 病情指数为 69.5, 最高病级 4 级, 表现为对 TMV 感病。龙江 911 转基因植株 TMV 病情指数为 3.3, 最高病级 1 级, 90% 以上的转基因

植株对 TMV 免疫, 龙江 911 对照 TMV 病情指数为 44, 最高病级 3 级, 对 TMV 有一定的耐受性。从接种鉴定结果可见, 与对照相比各转化材料的抗病性有显著提高 (图 3)。

3 讨论

3.1 RNA 干扰效率的检测

用于验证 RNA 干扰方法主要是 Northern 杂交技术, 通过杂交信号强弱来观察 RNA 降解情况, 但是却无法对干扰效率进行测定, 同时 Northern 杂交的灵敏度也相对较低, 一般只能检测到 10^5 拷贝的 RNA 分子。随着荧光定量 PCR 技术在 mRNA 转录分析领域的应用, 在一定程度上代替了 Northern 杂交技术。荧光定量 PCR 技术则可以检测到 1~2 个拷贝的 RNA 分子, 同时可以定量模板中目标片段的拷贝数。本试验应用荧光定量 PCR 技术, 以 *TMV-cp* 基因的 PCR 扩增产物为标准物, 以转 *TMV-cp* 基因烟草及田间感染 TMV 病毒植株及未感染 TMV 病毒的植株为对照, 对部分转化材料进行了 *TMV-cp* 的 RNA 定量检测。从实验结果上可以看出, 与对照相比, 转化植株中 *TMV-cp* 的病毒外壳蛋白 RNA 显著降低, 但仍有未被降解的 RNA 分子存在, 说明 dsRNA 的降解是一个动态过程。实时荧光定量 RT-PCR 用于检测基因的表达, 可以直接以拷贝数表示。比较直观, 操作简便。并可以动态的 (拷贝数) 分析不同时期 TMV 在烟株内的变化情况。

3.2 荧光定量 PCR 中实验误差控制

由于荧光定量 PCR 技术非常灵敏, 试验中应尽量避免样品间操作方法的差异、模板背景的差异以

及加样误差等。为了减少实验中加样误差,我们将各样品稀释 5 倍,通过加大体系中模板体积来减少误差,实践证明是一个行之有效的手段。另外,也可以利用样品的内源基因(烟草硝酸还原酶基因)PCR 扩增的 C_t 值对背景误差进行扣除,提高检测结果的准确性^[10]。

实验中的标准物可选择干扰载体质粒,也可是 RT-PCR 反应液的稀释物。由于质粒易于保存,较为稳定,但缺点是与样品背景差异较大,为环状 DNA,同时过大(大于 10 kb),为了达到一定的拷贝数相比之下就需要加入更多的模板,加大了模板中杂质对 PCR 反应的影响几率。RT-PCR 反应液的稀释物缺点是不稳定,在反复冻融过程中易降解,优点是样品背景基本一致。降解问题可以通过将样品分装解决。

3.3 RNAi 转化材料的抗病性鉴定

试验中对所有获得的转基因植株进行了抗病性鉴定,接种后对照表现出各种典型 TMV 症状,而转基因植株对 TMV 病毒 80%以上都能达到免疫水平。通过 TMV 株系的同源性比对结果发现, TMV-H 与来源于不同地区的 TMV 普通株系的同源性达 90%以上。TMV-H 与其它 TMV 株系间有一定的差异,与 TMV 的坏死株系、黄化株系、番茄株系的同源性分别为 97%、98%、74%。由于干涉序列转录后的 mRNA 最终被降解形成许多不同 ss-siRNA, 这些 ss-siRNA 能否引导对与 TMV-H 同源性较高的其它株系病毒 RNA 外壳蛋白序列的降解,还需要进一步接种鉴定。

虽然 RNA 沉默在机制等方面还有许多未知等待人们的研究,但可以肯定的是此项技术正被人们广泛接受和应用,并将在抗病毒转基因植物的培育上有着广泛的应用前景。

参考文献(References):

- [1] Malyshenko SI, Kondakova OA, Nazarova JV. Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing nonfunctional viral transport proteins. *J Gen Virol*, 1993, 74: 1149–1156.
- [2] Bass BL. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*, 2000, 101: 235–238.
- [3] Sharp PA. RNA interference. *Genes Dev*, 2001, 15: 485–490.
- [4] Waterhouse PM, Garham MW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 13959–13964.
- [5] Wang MB, Abbott DC, Waterhouse PM. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol Plant Pathol*, 2000, 1(6): 347–356.
- [6] ZHU Jun-Hua, ZHU Chang-Xiang, WEN Fu-Jiang, SONG Yun-Zhi. Comparison of resistance to Potato virus Y mediated by direct and inverted repeats of the coat protein gene segments in transgenic tobacco plants. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34(2): 133–140.
朱俊华, 朱常香, 温孚江, 宋云枝. 正向和反向重复 RNA 介导的抗马铃薯 Y 病毒基因工程比较研究. *植物病理学报*, 2004, 34(2): 133–140.
- [7] Sasaya T, Torrance L, Cowan G. Aphid transmission studies using helper component proteins of potato virus Y expressed from a vector derived from potato virus X. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1115–1119.
- [8] Cecilia VR, Mariana DV, Estenban HH. RNA-mediated virus resistance. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13: 167–172.
- [9] Horsh RB. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, 217: 1229–1231.
- [10] GUO Zhao-Kui, YAN Pei-Qiang, WAN Xiu-Qing, LI Li-Jie, YANG Qian. Study on the Genetic modified Tobacco real-time PCR quantity detecting methods. *China Biotechnology*, 2004, 25(1): 76–80.
郭兆奎, 颜培强, 万秀清, 李丽杰, 杨谦. 转基因烟草荧光定量检测方法研究. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(1): 76–80.