

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00484

应用 RNA 沉默技术获取抗黄瓜花叶病毒(CMV)和烟草花叶病毒(TMV)转基因烟草

牛颜冰 王德富 姚敏 闫钊 由文鑫

山西农业大学生命科学学院, 山西太谷 030801

摘要: RNA 沉默是迄今最为有效的抗病毒策略, 利用该策略不但能获得免疫转基因植株, 且所得植株不易与其他病毒基因重组或异源包壳、生物安全性较高。将本实验室已构建的携带有烟草花叶病毒(TMV)部分移动蛋白基因(ΔMP)和黄瓜花叶病毒(CMV)部分复制酶基因(ΔRep)反向重复结构的植物表达载体 pBIN438-MP-Rep(i/r), 用农杆菌浸润法转化普通烟草品种 K326, 共得 196 株转化植株, 经卡那霉素筛选和 PCR 检测发现 128 株为阳性转基因植株; PCR-Southern 和 RT-PCR 分析表明外源基因已整合到烟草基因组并在转录水平上得到表达; ELISA 结果显示 20.3% 的转基因植株对 CMV 和 TMV 复合侵染表现免疫性。本结果为利用 RNA 沉默技术进行植物抗多种病毒育种提供重要数据, 为防治其他多种病毒复合侵染提供借鉴。

关键词: RNA 沉默; 黄瓜花叶病毒; 烟草花叶病毒; 双病毒抗性

Transgenic Tobacco Plants Resistant to Two Viruses via RNA Silencing

NIU Yan-Bing, WANG De-Fu, YAO Min, YAN Zhao, and YOU Wen-Xin

College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

Abstract: RNA silencing is a phenomenon of homologous RNA degradation induced by dsRNA, which is an effective strategy to obtain virus resistant plants so far. By means of this strategy, higher bio-security immune transgenic plants were obtained, avoiding recombining and transcapsidating with other virus genes. In this study, the recombinant plant expression vector pBIN438-MP-Rep(i/r) consisting the inverted repeat of TMV- ΔMP and CMV- ΔRep fusion fragment was transformed into tobacco cultivar K326 via *Agrobacterium*-mediated. The transformants were selected in the culture medium with 100 mg L⁻¹ Kan. One hundred and ninety-six transgenic plants were obtained, one hundred and twenty-eight of which were positive plants, and the resistance to CMV and TMV was tested at the degree of virus. PCR-Southern blot and RT-PCR analysis of the transgenic plants demonstrated that the exogenous DNA was integrated into the tobacco genomic DNA and was expressed in transcriptional level. Resistance assay indicated that about 20.3% transgenic plants were immune to the co-infection with TMV and CMV. This result will provide to crops an important reference for plant anti-viral breeding and for preventing the viral co-infection.

Keywords: RNA silencing; Cucumber mosaic virus; Tobacco mosaic virus; Dual-virus resistance

黄瓜花叶病毒(CMV)和烟草花叶病毒(TMV)是世界范围内分布最广、寄主最多、且极易传播的两种植物病毒, 它们单一或复合侵染均能引起农作物的严重病害, 后者的危害更为严重。因此寻求一种快捷、有效的病毒复合侵染防治策略显得尤为迫切和重要。利用病毒基因转化植物获取抗病毒植株是当前防治病毒病害的重要途径。已有研究将不同植物病毒的衣壳蛋白(CP)基因构建到不同表达盒中, 通过表达病毒衣壳蛋白而使转基因植株产生对多种

病毒的抗性^[1-3]。但这种方法获得高抗转基因植物的几率较小, 且该策略还存在异源重组等生态安全性问题^[4]。RNA 沉默是由双链 RNA(dsRNA)引发的一种细胞内 mRNA 特异降解现象, 即发生沉默的基因转录仍然正常进行, 而合成的 mRNA 在细胞质中发生了序列特异性降解, 导致基因不能正常表达成蛋白质^[5]。RNA 沉默技术的应用, 为我们提供了一条更为有效、安全的抗病毒新策略^[6]。可通过将同一病毒不同株系或不同病毒的有效核酸片段拼接, 构

本研究由国家自然科学基金项目(30571216)和山西省自然科学基金项目(20051071)资助。

第一作者联系方式: E-mail: niuniugood@yahoo.com.cn, Tel: 13835400019

Received(收稿日期): 2010-07-30; Accepted(接受日期): 2010-11-26.

建植物表达载体导入植物, 获得同时抗多种病毒的转基因植株。Jan 等^[7]将完整的芜菁花叶病毒的衣壳蛋白基因(TuMV-CP)与番茄斑萎病毒的核基因片段[218 bp(3/4N)]拼接转化烟草, 获得同时抗芜菁花叶病毒和番茄斑萎病毒的转基因植株, 白庆荣等^[8]将非翻译的马铃薯 X 病毒的衣壳蛋白(PVX-CP)基因和非翻译的马铃薯 Y 病毒的衣壳蛋白(PVY-CP)基因组成嵌合基因转化烟草 NC89, 获得对 PVX 和 PVY 混合侵染表现免疫的转基因植株, 朱常香等^[9]将马铃薯 Y 病毒(PVY)、烟草花叶病毒(TMV)和黄瓜花叶病毒(CMV)部分 CP 基因拼接, 构建反向重复结构嵌合基因的植物表达载体转化烟草 NC89, 获得同时高抗 3 种病毒的转基因烟草。本研究以黄瓜花叶病毒和烟草花叶病毒危害严重的烟草为研究材料, 将已构建的含有 TMV 部分移动蛋白基因(ΔMP)和 CMV 部分复制酶基因(ΔRep)融合基因的反向重复结构的植物表达载体 pBIN438-MP-Rep(i/r)转化烟草, 获得同时抗 CMV 和 TMV 的转基因植株, 为保护烟草生产的可持续发展提供技术支持和理论依据, 并为利用 RNA 沉默技术进行植物多抗病毒育种提供重要数据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

黄瓜花叶病毒(CMV)和烟草花叶病毒(TMV)由浙江大学提供。植物转化受体普通烟草(*Nicotiana tabacum*)品种为 K326, 农杆菌 LBA4404 为本实验室保存。植物表达载体 pBIN438-MP-Rep(i/r)由本实验室构建^[10](图 1), 该质粒的 T-DNA 区段携有 D35S 启动子驱动的 MP-Rep-intron-Rep-MP 基因。

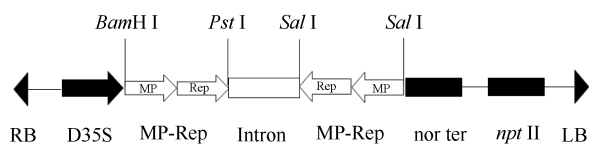


图 1 植物双价表达载体 pBIN438-MP-Rep-intron-Rep-MP T-DNA 区简图

Fig. 1 The schematic map of T-DNA region of pBIN438-MP-Rep(i/r)

限制性内切酶 *Sal* I、*Bam*HI 为 NEB 公司产品; TRIZOL 试剂为 Invitrogen 公司产品; DIG DNA Labeling and Detection Kit 和尼龙膜购自 Roche 公司; 一步法 RT-PCR 试剂盒、质粒小量制备试剂盒为天根生化科技有限公司产品; 胶回收试剂盒购于 Promega

公司; 乙酰丁香酮、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、PCR 引物合成、RNA 酶抑制剂、卡那霉素、链霉素、激素类为北京博迈德科技发展有限公司产品; 其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2 转基因植株的获得

采用冻融法将获得的植物双价表达载体 pBIN438-MP-Rep(i/r)导入农杆菌 LBA4404, 叶盘法转化普通烟草 K326, 通过卡那霉素抗性筛选再生植株。

1.3 转基因植株的 PCR 检测

采用 CTAB 法提取抗性植株和未转化植株叶片总 DNA 进行 PCR 扩增,同时以质粒(含目的基因)为阳性对照, 未转化植株 DNA 为阴性对照。其 PCR 程序为 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min; 53℃退火 1 min; 72℃延伸 1 min; 30 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存 1 h。反应结束后,进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 转基因植株的 PCR-Southern blot 分析

按《分子克隆试验指南》^[11]上的方法进行 Southern 杂交。以构建的反向重复片段中的 MP 基因为模板, 采用随机引物法合成探针, 地高辛进行标记。

1.5 转基因植株的 RT-PCR 分析

用 TRIZOL 试剂提取烟草叶片总 RNA, 并使用扩增级 DNase I (RNase free)对提取的总 RNA 进行处理以除去污染的 DNA。RT-PCR 程序为 50℃反转录 30 min; 94℃初变性 5 min; 94℃变性 1 min; 53℃退火 1 min; 72℃延伸 1 min; 30 个循环后 72℃再延伸 10 min, 4℃保存 1 h。反应结束后,进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 转基因植株的抗病性分析

待转基因植株长至 5~6 叶期时, 取感染 TMV 或 CMV 的烟草叶片分别按 1:10 (W/V)比例用磷酸缓冲液(PB, pH 7.4)研磨,进行汁液摩擦接种。采用 TMV 和 CMV 间隔接种和 2 种病毒同时混合接种。接种后, 每隔 7 d 观察并记录症状; 接种后 50 d, 用间接 ELISA 法^[11]检测烟草中的病毒含量。以非转基因植株为阴性对照, 通过症状观察和植株体内病毒含量来确定转基因植株抗病类型。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的获得

将构建的植物表达载体 pBIN438-MP-Rep(i/r)通过冻融法转入农杆菌 LBA4404, 采用叶盘法转化烟草 K326, 获转基因植株 196 株, 经卡那霉素筛选获 128 株抗性植株, 都能正常生长、开花和结籽(图 2)。

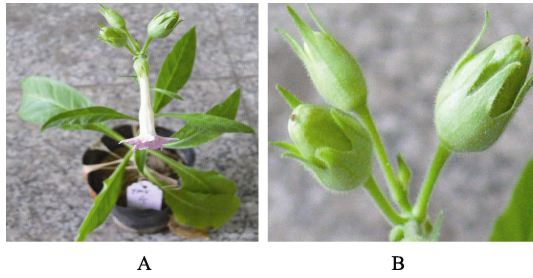


图 2 转基因烟草植株开花(A)和结籽(B)

Fig. 2 Flowering (A) and seed-setting (B) of transgenic tobacco plants

2.2 转基因植株的 PCR 检测

提取抗性植株叶片总 DNA 进行 PCR 扩增, 以未转化植株为阴性对照, 质粒含目的基因为阳性对照(本实验取目的基因 *pBIN438-MP-Rep(i/r)* 中大约 500 bp 长度的 *MP* 片段为检测对象)。扩增产物的电泳结果(图 3)表明, 抗性植株和质粒在 500 bp 附近均有特异条带, 而阴性对照植株却未扩增出相应的特异条带, 由此初步证实目的基因 *pBIN438-MP-Rep(i/r)* 已转入烟草中。

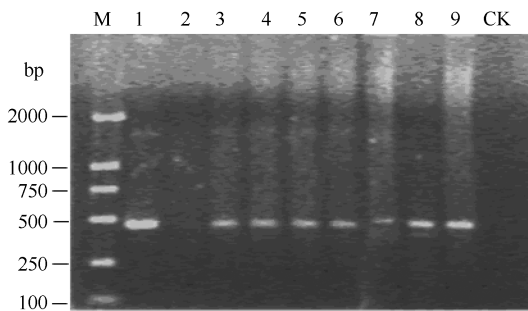


图 3 部分转基因烟草植株的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of transformed tobacco plants

M: 2 kb DNA marker; CK: 空白对照(水); 1: 质粒阳性对照;
2: 未转化植株; 3~9: 不同转基因植株。

M: 2 kb DNA marker; CK: blank (H_2O); 1: plasmid positive control;
2: non-transformed tobacco plant; 3~9: different transformed tobacco plants.

2.3 转基因植株 PCR-Southern blot 杂交分析

为进一步明确转基因植株整合的真实性, 对 PCR 阳性植株进行了 PCR-Southern 杂交(图 4), PCR 阳性植株都具有与阳性对照相同大小的 500 bp 的杂交带, 仍表现为阳性, 而阴性对照植株没有杂交出任何条带, 说明目的基因 *pBIN438-MP-Rep(i/r)* 确实已整合进烟草基因组中, 获得了转基因植株。但从图中还可看出部分转基因植株的杂交信号比阳性对照稍弱, 可能是二者 DNA 模板量不同, 导致所含目的片段浓度不同的缘故。

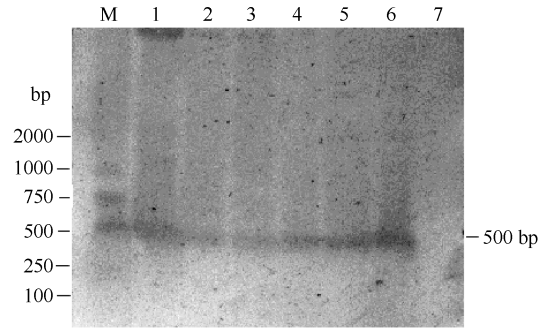


图 4 部分转基因植株的 PCR-Southern 杂交结果

Fig. 4 PCR-Southern analysis of transformed tobacco plants

M: 2 kb DNA marker; 1: 质粒阳性对照; 2~6: 不同转基因植株;
7: 未转化植株阴性对照。

M: 2 kb DNA marker; 1: plasmid positive control; 2~6: different transgenic plants; 7: non-transgenic negative control.

2.4 转基因植株 RT-PCR 分析

取经 PCR-Southern 杂交分析阳性的转基因植株, 以 TRIZOL 法提取总 RNA, 进行 RT-PCR 分析。从电泳结果(图 5)可以看出, 非转基因植株和空白对照都没有扩增出特异性条带, 而转基因植株扩增出大约 500 bp 的特异性条带, 表明插入的外源基因已在转录水平上得到表达。

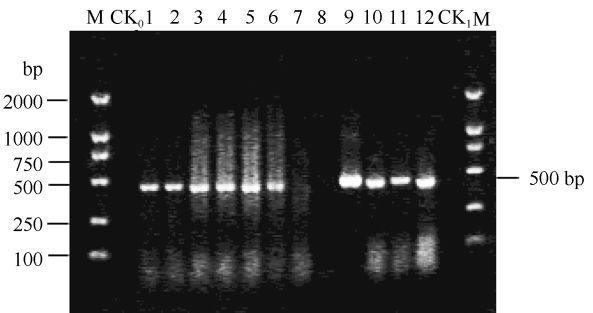


图 5 部分转基因烟草的 RT-PCR 检测结果

Fig. 5 RT-PCR detection of transformed tobacco

M: 2 kb DNA marker; CK₀: 空白对照(水); CK₁: 未转化植株;
1~6, 10~12: 不同转基因植株; 7~8: 阳性对照(7: 未加 RNA 模板;
8: 未加反转录酶); 9: 阳性对照(模板为 DNA)。

M: 2 kb DNA marker; CK₀: blank (H_2O); CK₁: non-transgenic plants; 1~6, 10~12: different transgenic plants; 7~8: negative control (7: no RNA template; 8: no reverse transcriptase);
9: positive control (using DNA as template).

2.5 转基因植株抗病性分析

对每一阳性的转化植株进行无性扩繁, 用 CMV、TMV 的病汁液对六叶期的无性扩繁苗攻毒。将其划分为 3 种抗病表现型即免疫型(植株在整个生育期未检测到病毒), 抗病型(植株前期无病毒, 但在接种后 50 d 检测到少量病毒)和感病型(植株与对照发病相似, 但稍轻)。

接种 CMV、TMV 病毒后 50 d, 转化植株的 ELISA 检测结果见表 1 (表 1 中仅列出了经 PCR-Southern 杂交和 RT-PCR 分析的部分转基因植株的 ELISA 检测结果)。所有的非转化烟草接种病毒后 25 d, 均表现病毒的典型症状, 后期植株下部叶片易干枯下垂, 植株严重矮化, ELISA 结果显示植株体内 2 种病毒含量明显高于阴性对照; 而转化植株间隔接种 2 种病毒后, 在 108 株转化植株中有 22 株表现为免疫型植株, 26 株为抗病型植株; 在 2 种病毒混合接种试验中, 84 株转化植株中有 16 株为免疫型植株, 19 株为抗病型植株; ELISA 检测显示, 免疫型植株体内 2 种病毒含量与阴性对照差异不显著; 在 2 种接种方式中, 免疫型植株的比例分别为 20.3% 和 19.0%。这表明所构建的包含 2 种病毒融合基因的反向重复结构转基因确实赋予转基因植株对 2 种病毒一定水平的抗性。

3 讨论

早期的有关研究绝大多数是将不同植物病毒的衣壳蛋白(CP)基因构建到不同的表达盒中, 通过表达病毒衣壳蛋白而使转基因植株产生对多种病毒的

抗性^[1-3]。但该策略对病毒只表现出中高度抗性, 而不能完全抵抗病毒的侵染, 且在转基因植株细胞内表达的某一病毒的衣壳蛋白有可能与自然界其他病毒发生异源重组而导致危险性病毒的非正常传播^[4]。而本研究应用 RNA 沉默技术, 将 CMV- ΔRep 基因和 TMV- ΔMP 基因融合, 构建融合基因的反向重复结构的植物表达载体, 导入烟草, 获得了 20.3% 左右的高抗 CMV 和 TMV 的转基因植株, 其优点在于, 转基因不产生蛋白质, 从而消除了 CMV 和 TMV 与自然界其他病毒基因重组的可能, 大大提高了转基因植物的生物安全性。

RNA 沉默(RNA silencing)是发生在 RNA 水平的基于核酸序列特异性的相互作用来抑制基因表达的一种调控机制, 是植物固有的一种抗病毒侵染的普遍防卫反应^[12]。双链 RNA(dsRNA)可诱导该过程的起始, 构建能表达 dsRNA 的转基因植物是目前防治植物病毒病害的有效途径之一^[13-14]。有研究发现, 在含非发夹 RNA(hpRNA)结构外源基因的转基因植物, 产生基因沉默的几率一般低于 10%; 而转录后能形成 dsRNA 的转基因诱发基因沉默的几率可高达 60%~100%^[15-18]。本研究以构建的包含 CMV 和 TMV

表 1 部分转基因植株的 ELISA 检测结果
Table 1 ELISA detection for the transgenic plants by PCR-Southern and RT-PCR analysis

接种方式 Inoculation methods	材料 Material	TMV		CMV	
		病毒含量 Virus concentration (OD ₄₀₅ ±SD)	抗病表现型 Response	病毒含量 Virus concentration (OD ₄₀₅ ±SD)	抗病表现型 Response
CMV 和 TMV 间隔接种 Inoculation with TMV and CMV, in turn	P1-8	0.027±0.005 f	i	0.020±0.005 f	i
	P2-6	0.318±0.007 b	S	0.214±0.005 c	S
	P3-9	0.253±0.006 d	S	0.212±0.004 c	S
	P4-4	0.031±0.003 f	i	0.021±0.010 ef	i
	P5-3	0.313±0.009 c	S	0.228±0.005 b	S
	P5-6	0.052±0.006 e	R	0.056±0.005 d	R
	+CK	0.323±0.008 a	S	0.238±0.006 a	S
	-CK	0.028±0.004 f	—	0.027±0.003 e	—
CMV 和 TMV 混合接种 Inoculation with TMV and CMV, mixture	P9-6	0.034±0.003 e	i	0.025±0.005 e	i
	P11-2	0.226±0.005 b	S	0.205±0.010 c	S
	P13-5	0.218±0.006 c	S	0.237±0.004 a	S
	P7-8	0.045±0.008 d	R	0.043±0.005 d	R
	P15-7	0.230±0.010 ab	S	0.224±0.008 b	S
	P7-1	0.032±0.005 ef	i	0.029±0.008 e	i
	+CK	0.236±0.004 a	S	0.241±0.005 a	S
	-CK	0.026±0.004 f	—	0.024±0.006 e	—

Pm-n: different transgenic plants; +CK: non-transgenic plants inoculated with TMV and CMV; -CK: non-transgenic plants with no virus infection; i: immunity plants; S: susceptible plants; R: resistant plants. Values with different letters are significantly different at the 0.05 probability level.

病毒部分基因的融合基因的 hpRNA 结构植物表达载体进行转基因, 结果表明有 20.3% 的转基因植株高抗两种病毒的侵染。进一步证明 dsRNA 在基因沉默中的关键性, 同样可高水平地诱导多病毒的融合基因发生转录后基因沉默(PTGS), 进而达到同时抗多种相关病毒的能力。至于转反向重复结构的转基因植株其抗病效果能否在后代稳定遗传, 还有待进一步研究。笔者将进一步进行温室大规模试验, 为以后进入大田应用试验, 促使转基因表达 dsRNA 抗植物病毒技术产业化应用提供理论基础。

4 结论

应用 RNA 沉默技术, 以农杆菌浸润法将烟草花叶病毒部分移动蛋白基因(ΔMP)和黄瓜花叶病毒部分复制酶基因(ΔRep)融合后构建的反向重复结构的植物表达载体转化烟草, 获得了同时抗 CMV 和 TMV 病毒复合侵染的转基因植株。

References

- [1] Prins M, Haan P D, Luyten R, Veller M V, Grinsven M Q V, Goldbach R. Broad resistance to tospovirus in transgenic tobacco plants expressing three-tospoviral gene sequence. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, 8: 85–91
- [2] Kaniewski W, Lawson C, Sammons B, Haley L, Hart J, Delannay X, Tumer N E. Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. *Bio/Technol*, 1990, 8: 750–754
- [3] Fuchs M, McFerson J R, Tricoli D M, McMaster J R, Deng R Z, Boeshore M L, Reynolds J F, Russell P F, Quemada H D, Gonsalves D. Cantaloupe line CZW-30 containing coat protein genes of cucumber mosaic virus, zucchini yellow mosaic virus, and watermelon mosaic virus-2 is resistance to these three virus in the field. *Mol Breed*, 1997, 3: 279–290
- [4] Zhou X-P(周雪平), Li D-B(李德葆). Genetically engineering resistance to viruses and environmental risk assessment of releases of transgenic plants. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*, 2000, 12(1): 4–6 (in Chinese with English abstract)
- [5] Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806–811
- [6] Zhu J H, Zhu X P, Wen F J, Bai Q R, Zhu C X, Song Y Z. Effect of cDNA fragments in different length derived from potato virus Y coat protein gene on the induction of RNA-mediated virus resistance. *Sci China (Ser C: Life Sci)*, 2004, 47: 382–388
- [7] Jan F J, Fagoaga C, Pang S Z, Gonsalves D. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *J General Virol*, 2000, 81: 2103–2109
- [8] Bai Q-R(白庆荣), Zhu J-H(朱俊华), Liu X-L(刘晓玲), Zhu C-X(朱常香), Song Y-Z(宋云枝), Wen F-J(温孚江). Production of transgenic tobacco plants resistant to two viruses via RNA-mediated virus resistance. *Acta Phytopathol Sin (植物病理学报)*, 2005, 35(2): 148–154 (in Chinese with English abstract)
- [9] Zhu C-X(朱常香), Song Y-Z(宋云枝), Wen F-J(温孚江). Constructing transgenic tobacco for multiple-resistance against potato virus Y, cucumber mosaic virus and tobacco mosaic virus. *Sci Agric Sin (中国农业科学)*, 2008, 41(4): 1040–1047 (in Chinese with English abstract)
- [10] Niu Y-B(牛颜冰), Lei X-F(雷霄飞), Shen L-Y(申林炎), Wang D-F(王德富), Yao M(姚敏), Guo P-Y(郭平毅). Rapid construction of RNA silencing virus resistance vector containing TMV and CMV virus-derived genes. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2009, 29(2): 76–80 (in Chinese with English abstract)
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, eds. Huang P-T(黄培堂) trans. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edn) (分子克隆实验指南, 第 3 版)*. Beijing: Science Press, 2002, pp 492–512 (in Chinese)
- [12] Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet*, 2001, 17: 449–459
- [13] Tenllado F, Llave C, Díaz-Ruiz J R. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Res*, 2004, 102: 85–96
- [14] Missiou A, Kalantidis K, Boutla A, Tzortzakaki S, Tabler M, Tsagris M. Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Mol Breed*, 2004, 14: 185–197
- [15] Smith N A, Singh S P, Wang M B, Stoutjesdijk P, Green A, Waterhouse P M. Gene expression: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 2000, 407: 319–320
- [16] Zamore P D. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, 2002, 296: 1265–1269
- [17] Helliwell C A, Waterhouse P M. Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods Enzymol*, 2005, 392: 24–35
- [18] Chi S-Q(迟胜起), Song Y-Z(宋云枝), Zhu C-X(朱常香), Zheng C-C(郑成超), Liu X-L(刘晓玲), Wen F-J(温孚江). Effect of matrix attachment regions on the RNA-mediated resistance induced by PVYN-CP gene. *Acta Phytopathol Sin (植物病理学报)*, 2005, 35(4): 345–351 (in Chinese with English abstract)