

烟草抗病毒相关 R 基因 RNAi 表达载体的构建

杨帆^{1,2}, 李凤霞¹, 孙玉合¹, 王鲁¹, 杨爱国¹, 苏振刚^{1,2},
李元元^{1,2}, 赵百英^{1,2}, 刘慧^{1,2}, 王元英^{1*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 烟草遗传改良与生物技术重点开放实验室, 青岛 266101;

2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要: RNA 干扰介导的基因沉默是植物抗病育种和大规模分析功能基因快速而有效的方法。构建烟草抗病毒病相关 R 基因的 RNAi 表达载体并导入烟草可获得抗病毒烟草材料, 并为大规模分析鉴定烟草功能基因提供新方法。本研究利用绒毛状烟草基因组测序获得的 R 基因序列设计引物, 通过 PCR 技术扩增出带有特异性结合位点 attB 的 R 基因部分序列。采用 GATEWAY 方法将目的基因的干扰片段插入到表达载体 pH7GW1WG2(I), 成功构建了烟草抗病毒病相关 R 基因的 RNAi 表达载体。

关键词: 烟草; 病毒病; R 基因; RNAi; GATEWAY 技术

中图分类号: TS413

文章编号: 1007-5119 (2012) 01-0023-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.01.005

Construction of Tobacco Virus Resistance-related R Genes RNAi Expression Vectors

YANG Fan^{1,2}, LI Fengxia¹, SUN Yuhe¹, WANG Lu¹, YANG Aiguo¹, SU Zhengang^{1,2},
LI Yuanyuan^{1,2}, ZHAO Baiying^{1,2}, LIU Hui^{1,2}, WANG Yuanying^{1*}

(1. Key Laboratory of Tobacco Genetic Improvement and Biotechnology, Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: Gene silencing mediated by RNA interference has been shown to be a highly rapid and effective method for breeding resistance to virus and analyzing plant functional genomics. Building of RNAi expression vector and being transformed into tobacco can obtain virus resistance tobacco materials and provide a new method for identification of tobacco functional genes in a large-scale. The partial sequence of R genes with specific binding site attB were amplified by PCR technology, primers were designed according to the sequences obtained from *Nicotiana tomentosiformis* sequencing. Using GATEWAY technology, the RNAi expression vector of R gene was constructed successfully by inserted the partial sequence of R genes into the vector of pH7GW1WG2(I).

Keywords: tobacco; virus; R gene; RNAi; GATEWAY technology

烟草病毒病是一类危害烟草的世界性病害, 早期发病损失可达 50%~70%, 甚至绝收, 烟草病毒病的防治已成为生产上迫切需要解决的问题。RNAi 即 RNA 干扰, 属于转录后水平的基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS), 是转录后产生的 mRNA 特异性的降解机制^[1]。RNAi 普遍存在于植物^[2-3]、动物^[4-6]和真菌^[7]等大多数真核生物中,

并且可能在生命进化的早期阶段就已经出现了^[8], 是生物体本身的一种 RNA 防御机制。目前, 将构建好的沉默载体转入植物体已经成为较为有效的植物抗病毒基因工程方法^[9-10], 即通过转录形成双链 RNA (dsRNA) 诱导 RNA 沉默来达到抗病毒的目的。

GATEWAY 是通过重组交换的基因克隆方法,

基金项目: 国家烟草专卖局重点科技项目“烟草 cDNA 文库构建及重要基因表达谱研究”(110200701021); “烟草突变体库创制与功能基因组学研究”(110200701022); “优质抗病烤烟新品种选育及育种技术研究”(110201002002)

作者简介: 杨帆, 男, 在读硕士, 研究方向为烟草抗病育种。E-mail: yangfanzai52@sina.com。*通信作者, E-mail: wuytob@126.com

收稿日期: 2011-09-14

修回日期: 2011-10-18

可以使目标序列通过一次性交换到克隆载体上并形成反向重复序列^[11]。本研究根据绒毛状烟草基因组测序获得的8个抗病毒病相关R基因的部分片段序列,采用GATEWAY技术,构建具有反向重复结构的发卡形RNAi表达载体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 RNA超纯提取试剂盒,PCR产物纯化回收试剂盒,卡那霉素(kanamycin),壮观霉素(奇霉素,spectinomycin)均购自北京全式金生物技术有限公司。RNA反转录试剂盒,Taq DNA聚合酶,MarkerDL500,均为TaKaRa公司产品。

1.1.2 菌株与质粒 克隆的宿主菌E. coli DH5a菌株购自北京全式金生物技术有限公司,DB3.1菌株由中国农业科学院生物技术研究所惠赠。GATEWAY pDONR201TM载体与pH7 GWIWG2(I)载体由CSIRO Plant Industry (<http://www.pi.csiro.au/home.htm>)惠赠。BP clonaseTM和LR clonaseTM为美国Invitrogen公司产品。

1.2 方法

1.2.1 含attB位点的引物设计 将绒毛状烟草全基因组测序获得的580多个抗病相关基因在NCBI网站上进行blast比对分析、预测其功能,筛选出8条序列与抗病毒病相关R基因高度同源,采用primer 5.0引物设计软件对这8条序列设计引物,并分别在设计出的上游引物和下游引物的5'端连接特异性结合位点:attB1和attB2的后12个碱基序列,作为第一次PCR扩增的引物序列(表1)。二次PCR引物为attB1和attB2序列,attB1和attB2的序列分别为attB1:GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT;attB2:GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT。

1.2.2 抗病毒病相关R基因RNAi片段的克隆 2010年12月取普通红花烟草的幼嫩叶片提取RNA,TAKARA反转录试剂盒进行反转录。以含部分attB位点的引物对反转录产物cDNA进行PCR扩增,扩增条件为:94℃预变性5min,94℃变性45s,54℃退火30s,72℃延伸45s,35个循

表1 PCR扩增所用引物

Table 1 Primers sequences for PCR	
引物	引物序列组成(方向为5'to3')
R基因-1上游引物	AAAAAGCAGGCTctgatggccaactgggathtt
R基因-1下游引物	AGAAAGCTGGGTaaagcgagcactcgaaatta
R基因-2上游引物	AAAAAGCAGGCTccaggaagtcgaagaartg
R基因-2下游引物	AGAAAGCTGGGTaccaatgtaagctgttngc
R基因-3上游引物	AAAAAGCAGGCTttcgggtccattcacatha
R基因-3下游引物	AGAAAGCTGGGTtccgattcatatcagccrca
R基因-4上游引物	AAAAAGCAGGCTcatgggaagatctgggagt
R基因-4下游引物	AGAAAGCTGGGTcaagaggcaacccttaya
R基因-5上游引物	AAAAAGCAGGCTcaggggtacaagtctcna
R基因-5下游引物	AGAAAGCTGGGTtacaactcttcggccatcc
R基因-6上游引物	AAAAAGCAGGCTctttgggggaaagaagaarg
R基因-6下游引物	AGAAAGCTGGGTtgaaccactgccataacca
R基因-7上游引物	AAAAAGCAGGCTggtccagcttaccagtgat
R基因-7下游引物	AGAAAGCTGGGTgaacctccaaagaaagnc
R基因-8上游引物	AAAAAGCAGGCTatcaagatccgtggttng
R基因-8下游引物	AGAAAGCTGGGTaccgctctctcctcaaatrt

注:大写序列为特异性结合位点序列的后12个碱基,小写序列为软件Primer5.0设计的扩增引物。

环;最后72℃延伸10min。将获得的attB-PCR产物稀释10倍后作为模板,以attB1和attB2全长为引物进行二次PCR,扩增条件与第一次PCR相同。将第二次扩增获得attB-PCR产物(两端含有特异性结合位点attB1和attB2的R基因片段)纯化回收,保存备用。

1.2.3 相关R基因RNAi载体构建 将GATEWAY pDONRTM201载体与pH7 GWIWG2(I)载体转入到大肠杆菌DB3.1中进行扩繁增殖,提取质粒保存备用。

RNAi载体构建具体操作步骤如下:

BP反应构建入门载体:用BP ClonaseTM II enzyme mix(Invitrogen)催化纯化后的attB-PCR产物和pDONRTM201进行BP反应,反应物在25℃条件下反应1h,然后加入1μL的proteinase K酶(100μmol/L)溶液在37℃条件下温育10min。之后吸取1μL反应物转化大肠杆菌DH5a感受态细胞,在含有50mg/L卡那霉素(kanamycin)的LB固体培养基上过夜培养并筛选阳性克隆,挑取单菌落到同样含有50mg/L卡那霉素(kanamycin)的LB液体培养基中摇菌并提取质粒(入门载体),经PCR鉴定后送交TaKaRa公司测序。

LR 反应构建表达载体：用 LR ClonaseTM II enzyme mix (Invitrogen) 催化入门克隆与表达载体 pH 7 GWIWG2(I) 进行重组反应，反应条件与 BP 反应条件类似，25 °C 反应 1 h 后，加入 1 μL 的 proteinase K 酶 (100 μmol/L) 溶液并在 37 °C 条件下温育 10 min 终止反应。然后吸取 1 μL 的反应物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞，在含有 50 mg/L 壮观霉素 (spectinomycin) 的 LB 固体培养基上过夜培养并筛选目的阳性克隆，挑取单菌落到同样含有 50 mg/L 壮观霉素的 LB 液体培养基中摇菌并提取质粒 (目的载体)，经 PCR 鉴定后保存用于农杆菌转化反应。

2 结 果

2.1 RT-PCR 扩增 R 基因片段

以普通红花烟草 cDNA 为模板，在高保真 Taq DNA 聚合酶作用下，经过两次 PCR，扩增出两端携带特异性重组位点 attB 的相关抗病毒 R 基因片段 (图 1)。根据已知的 R 基因序列，8 个 R 基因的预期片段大小分别为 216、198、193、246、285、187、300、183 bp。8 个 R 基因的预期片段长度加上两端的特异性结合位点 attB 各 29 bp，和图中得到 8 个特异性电泳条带的大小相符，说明已经成功扩增到了 8 个 R 基因的目标片段。

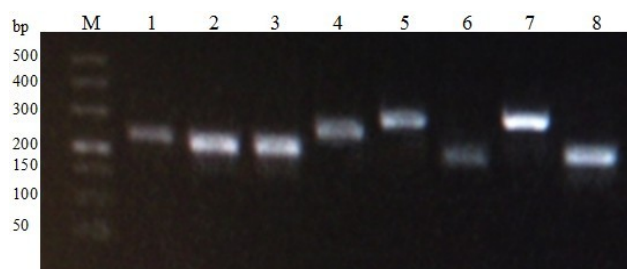


图 1 扩增得到的携带特异性重组位点的 8 个 R 基因片段

Fig.1 Partial sequence of R genes with specific banding site attB by PCR amplification

注：M (DNA 分子量标准 Marker DL 500)；1~8 (PCR 扩增得到的 R 基因片段)。

2.2 入门载体的检测

对经卡那霉素 (kanamycin) 筛选得到的入门克隆挑取单菌落后摇菌，提取质粒后以质粒为模板，以 attB 引物进行 PCR 检测，得到与 attB-PCR 产物

大小一致的电泳条带，而阴性对照则不能检测出条带 (图 2)。测序结果显示，除去测序产物两端的 attB 序列，中间扩增出的片段与绒毛状烟草基因组测序获得的 R 基因片段序列一致，即成功构建了 pDONR 201 入门载体。

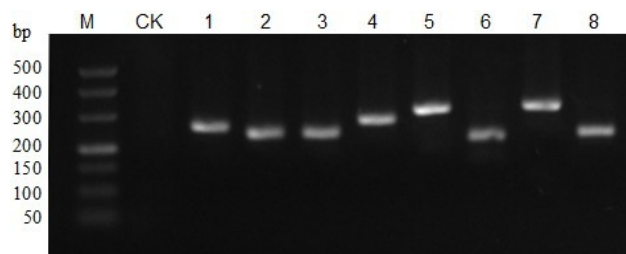


图 2 入门载体的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR detection of entry vectors

注：M (DNA 分子量标准 Marker DL 500)；CK (未插入 R 基因片段的载体)；1~8 (插入 R 基因片段入门载体的检测)。

2.3 表达载体的检测

在含有壮观霉素 (spectinomycin) 的培养基上筛选得到阳性克隆，以提取到的目的载体为模板加入 attB 引物进行 PCR 检测，同样得到与 attB-PCR 产物大小一致的电泳条带 (图 3)。对 PCR 产物测序结果显示，PCR 产物序列与绒毛状烟草基因组测序获得的 R 基因片段序列一致，说明成功构建了 R 基因 RNAi 的表达载体。

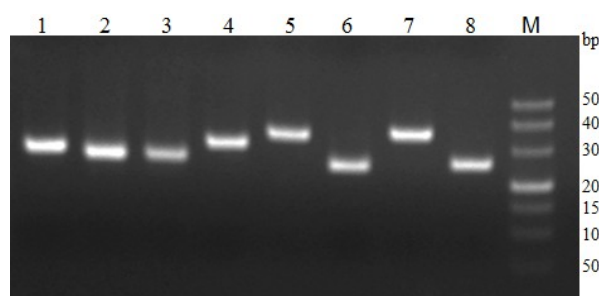


图 3 表达载体的 PCR 鉴定

Fig.3 PCR detection of expression vectors

注：M (DNA 分子量标准 Marker DL500)；1~8 (插入 R 基因片段表达载体的检测)。

3 讨 论

RNAi 技术是近几年生命科学界的热点之一，美国 Science 杂志曾 2 年将其评选为年度十大突破技术。RNAi 机制的进一步阐明，为深入了解植物与病毒之间的互作关系提供了有力的理论依据，也

为科技工作者在培育抗病毒品种方面提供一条简捷、高效的技术手段。随着烟草基因组测序工作的完成以及许多农作物 ESP 资料库的建立,为利用反向遗传学研究基因功能奠定了坚实的基础,同时也为 RNAi 技术提供了更大的发展空间。只要将某个植物 R 基因或病毒基因的片段通过载体或者病毒转入目标植株或宿主体内,就可以使目标植株或宿主的同源基因发生降解而沉默,利用该方法可以在较短时间内鉴定出大量基因的功能。将 GATEWAY 技术应用到可以大规模筛选基因功能的 RNAi 原理中,避免了传统克隆技术中限制性酶切和连接的过程,使基因转入到目标载体的过程更加简捷、实用,为从反向遗传学的角度研究基因功能提供了技术支持和理论指导。

关于几种不同 RNA 干扰载体构建获得基因表达受抑制转基因植株的比例, Wesley 等^[12]经过评价认为,两个反向重复序列中间含有一个内含子所形成的 ihpRNA 结构的 RNA 干扰载体沉默效果最好,效率平均高达 90%以上。本研究使用 GATEWAY 的载体 pH 7 GWIWG2(I)具有两对方向完全相反的 attR 结合位点,两对 attR 结合位点中间有一段 1 047 bp 大小的内含子片段,这样的结构保证了基因片段可以按照完全相反的方向插入目的载体,并且在转录后形成发卡 RNA 结构(hpRNA)。此外,pH 7 GWIWG2(I)载体中 ccdB 是致死基因,只有目标基因完全取代两个 ccdB 在目的载体中的位置,转化菌才能存活,以上两种机制保证了 LR 反应得到的表达载体的准确性。RNA 干扰技术中,在干涉片段的选择上具有很大的可塑性,一般认为从 90~1800 bp 之间^[13]。本研究中扩增的 8 个 R 基因序列长度从 183 bp 到 285 bp 不等(不包含两端各 29 bp 的 attB 序列),这样大小的干扰片段既可以保证转基因植株的沉默效果,也避免了载体外源片段过大时构建载体的难度,同时对遗传转化和外源基因在转基因植株中的稳定遗传都是有利的。关于绒毛状

烟草基因组测序获得抗病毒病相关 R 基因的具体功能,将在利用该沉默载体进行遗传转化之后进一步分析研究。

参考文献

- [1] Herve Vaucheret, Christophe Beclin, Mathilde Fagard. Post-transcriptional gene silencing in plants [J]. *Journal of Cell Science* 2001, 114(17): 3083-3091.
- [2] Cogni C, Irelan J, Schumacher M, et al. Transgene silencing of the *ai-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation [J]. *EMBO J*, 1996, 15(12):3153-3163.
- [3] Waterhouse P M, Graham M W, WANG M B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and anti-sense RNA [J]. *BMC Plant Biology*, 1998, 95 (23): 13959-13964.
- [4] Lohmann J U, End I, Bosch T C G. Silencing of developmental genes in *Hydra* [J]. *Developmental Biology*, 1999, 214(1): 211-214.
- [5] Wargelins A, Ellingsen S, Fjose A. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1999, 263(1): 156-161.
- [6] Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development [J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(2): 70-75.
- [7] Cogni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Nature*, 1999, 399: 166-169.
- [8] Sharp P A. RNA interference-2001 [J]. *Genes Development*, 2001, 15(5): 485-490.
- [9] Tenno T, Goda N, Tateishi Y, et al. High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling [J]. *Protein Engineering Design Selection*, 2004, 17 (4) : 305-314.
- [10] Ohsugi T, Kumasaka T, Urano T. Construction of a full-length human T cell leukemia virus type I genome from MT-2 cells containing multiple defective proviruses using overlap in polymerase chain reaction [J]. *Analytical Biochemistry*, 2004, 329 (2): 281-288.
- [11] 牛颜冰,青玲,周雪平. RNA 沉默机制及其抗病毒应用 [J]. *热带作物学报*, 2009, 30 (4) : 505-508.
- [12] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. *The Plant Journal*, 2001, 27 (6): 581-590.
- [13] Sayaka H, Shin-ichiro O, Eri A, et al. The effects of spacer sequences on silencing efficiency of plant RNAi vectors [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26 (5): 651-659.