

## 葡萄卷叶伴随病毒 2 号 *p24* 蛋白基因转化烟草的研究

李捷 程玉琴\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

**摘要** 以含有葡萄卷叶伴随病毒 2 号(*Grapevine leafroll-associated virus 2*, GLRaV-2) *p24* 蛋白基因的 T 载体(p-G2-*p24*)为模板,PCR 扩增该蛋白基因的全长序列及其 5'端长 300 bp 的正反向片段。将 *p24* 蛋白基因全长序列定向克隆到表达载体 pCsuper 1300+上,得到重组质粒 pCsuper1300-*p24*。将正反向片段先后插入具内含子的中间载体 pBSint 上,得到重组的中间载体 pBSint-*p24*-F-R。然后用 *Hind* III 和 *Sac* I 双酶切 pBSint-*p24*-F-R,将切下的带内含子的正反向串联片段定向克隆到植物表达载体 pCsuper 1300+上,得到含有发夹结构的 RNAi 重组质粒 pCsuper-*p24*-F-R。将 pCsuper1300-*p24* 和 pCsuper-*p24*-F-R 分别通过农杆菌浸润叶盘法转化本生烟。经过 RT-PCR 和 PCR 检测,分别获得了异源表达 *p24* 的 T<sub>0</sub> 和 T<sub>1</sub> 代阳性株系各 34 和 12 个,转化 pCsuper-*p24*-F-R 的 T<sub>0</sub> 和 T<sub>1</sub> 代阳性株系各 17 和 7 个。该结果可为 *p24* 功能研究及培育 RNAi 介导的抗病毒葡萄新种质提供试验材料。

**关键词** 葡萄; 异源表达; RNA 干扰; RNA 沉默抑制子

**中图分类号** S 663.1

**文章编号** 1007-4333(2013)06-0138-05

**文献标志码** A

## Research on transgenic tobacco expressing *p24* protein gene of *Grapevine leafroll-associated virus 2*

LI Jie, CHENG Yu-qin\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** The vector p-G2-*p24* contained *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) *p24* protein gene was used to amplify sense/anti-sense strands (300 bp in size) and full sequence of *p24* protein gene, respectively. PCR products of complete sequence of *p24* protein gene were digested with *Hind* III / *Sac* I and cloned to the expression vector pCsuper 1300 + to obtain recombinant vector pCsuper1300-*p24*. The positive sense and anti-sense strands were separately inserted into the middle vector pBSint which contains an intron, to produce pBSint-*p24*-F-R. The obtained recombinant middle vector pBSint-*p24*-F-R was digested with *Sal* I and *Sac* I, and the restricted products were cloned into the expression vector pCsuper 1300 + to construct the ihpRNA vector pCsuper-*p24*-F-R. The pCsuper1300-*p24* and pCsuper-*p24*-F-R were transformed into *Nicotiana benthamiana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, respectively. PCR and RT-PCR testing showed that 34 T<sub>0</sub> and 12 T<sub>1</sub> positive lines expressing *p24*, and 17 T<sub>0</sub> and 7 T<sub>1</sub> lines that transformed with the pCsuper1300-*p24*-F-R were obtained, respectively. These results could provide experimental materials for the function study of *p24* and creation of grapevine germplasms with resistance to viruses by RNAi technology.

**Key words** exogenous expression; RNA interference; RNA silencing suppressor

葡萄卷叶病(Grapevine leafroll disease, GLD)是在葡萄上发生最普遍、危害最严重的病毒病害之一,它严重影响葡萄产量和质量。葡萄卷叶伴随病

毒 3 号(*Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3)与 1 号(GLRaV-1)和 2 号(GLRaV-2)是与该病相关的 3 种主要病原物<sup>[1]</sup>,它们均属于长线

收稿日期: 2013-04-17

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-30-bc-1)

第一作者: 李捷, 硕士研究生, E-mail: 13521815491@139.com

通讯作者: 程玉琴, 副教授, 主要从事植物病毒方面的研究, E-mail: chengyuqin@cau.edu.cn

形病毒科 (*Closteroviridae*)。其中 GLRaV-1 和 GLRaV-3 为该科卷叶病毒属 (*Ampelovirus*) 成员, GLRaV-2 为长线形病毒属 (*Closterovirus*) 成员。GLRaV-2 的基因组长度约为 16.5 kb, 具 9 个可读框 (open reading frame, ORF), 其中第 8 个 ORF 编码产物 p24 蛋白 (24-ku protein) 已鉴定为 RNA 沉默抑制子<sup>[2]</sup>。RNA 沉默抑制子对病毒侵染十分关键, 但目前对 *p24* 抑制植物 RNA 沉默的机制及其是否具有其他功能还不清楚。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是植物抗病毒侵染的一种重要防卫机制。主要通过 dsRNA 切割成大小 21~25 nt 的小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs), 然后 siRNAs 识别与之互补的 mRNA, 并导致其降解。而病毒则编码 RNA 沉默抑制子来抵制植物这种抗病毒反应<sup>[3]</sup>。对已建立起成熟遗传转化体系的作物而言, 依赖 RNA 沉默机制, 获取抗病毒转基因植物是防控植物病毒病害的最有效方法之一, 也是一条极具潜力的防治途径<sup>[4]</sup>。已有研究表明, 含有病毒 dsRNA 的转基因植物能以 100% 的效率诱导植物对该病毒产生免疫<sup>[5]</sup>。

本研究通过构建表达 GLRaV-2 *p24* 蛋白基因及其 ihpRNA 的载体, 并将其分别转入本生烟获得转基因植株, 旨在为 *p24* 蛋白基因的功能研究和利用 RNAi 介导的抗病毒葡萄育种提供试验材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

含有 GLRaV-2 *P24* 蛋白基因的载体 p-G2-p24<sup>[6]</sup>、中间载体 pBSint、植物表达载体 pCsuper 1300+、农杆菌菌株 *EHA105*、本生烟种子均为本实验室保存。T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶和核酸内切酶等为 TaKaRa 公司产品, PCR 产物回收试剂盒购自 Axygen 公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 pSuper1300-p24 构建

以 p-G2-p24 为模板, 扩增 *p24* 蛋白基因全长序列。上下游引物分别为 WF: 5'-CCCAAGCTT-ATGAGGGTTATAGTGTCTCC-3' 和 WR: 5'-CGAGCTCTTAACATTCGTCTTGGAGTT-3' (下

划线分别为 *Hind* III 和 *Sac* I 酶切位点)。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

用 *Sac* I / *Hind* III 双酶切表达载体 pCsuper1300+ 和 PCR 扩增产物, 连接后转化大肠杆菌 *DH5 $\alpha$*  感受态细胞, 提取质粒, 将 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组质粒, 送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

#### 1.2.2 pCsuper-p24-F-R 的构建

以 p-G2-p24 为模板, 扩增正反向片段 (位于 *p24* 蛋白基因 5' 端长约 300 bp 的部分序列)。上下游引物分别为 hpIF: 5'-CGAGCTC-ATGAGGGTTATAGTGTCTCC-3' / hpIR: 5'-CGC-GGATCCTTGGTAAGAGAGCGCATTTC-3' (下划线分别为 *Sac* I 和 *Bam* H I 酶切位点)、hpIIF: 5'-ACGCGTCGACATGAGGGTTATAGTGTCTCC-3' / hpIIR: 5'-CCCAAGCTTTTGGTAAGAGAGC-GCATTTC-3' (下划线分别为 *Sal* I 和 *Hind* III 酶切位点)。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。将回收的正向片段 PCR 产物用 *Sal* I / *Bam* H I 双酶切后, 定向克隆到含内含子的中间载体 pBSint 上, 得到重组质粒 pBSint-P24-F。然后将反向片段用 *Sac* I / *Hind* III 双酶切后, 定向克隆到 pBSint-P24-F 载体上, 得到重组质粒 pBSint-p24-F-R。

*Sal* I / *Sac* I 双酶切 pBSint-p24-F-R, 将酶切产物纯化回收后连接到经同样酶切后的 pCsuper 1300+ 上 (图 1), 将 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组质粒, 送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

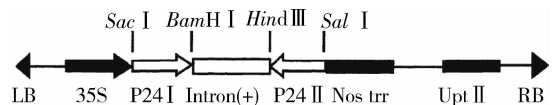


图 1 pCsuper-p24-F-R 构建示意图

Fig. 1 Construction strategy of pCsuper-p24-F-R

#### 1.2.3 烟草转化和转基因阳性株系鉴定

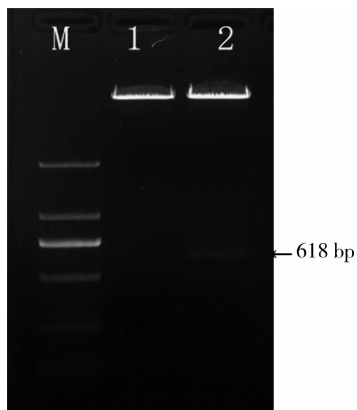
将重组质粒用冻融法导入农杆菌 *EHA105*, 然后用农杆菌浸润叶盘法转化本生烟。提取再生植株

RNA 和基因组 DNA,用 RT-PCR 和 PCR 进行阳性株系鉴定。检测所用引物分别为 WF/WR 和 hpIF/hpIR。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 5 min。同时选取部分 PCR 产物连接 T 载体后进行测序分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 pSuper1300-p24 的构建及鉴定

以 p-G2-p24 为模板,PCR 扩增 *p24* 蛋白基因全长序列,得到大小为 618 bp 的目的条带。将回收的 PCR 产物用 *Hind* III/*Sac* I 双酶切后,定向克隆到表达载体 pCsuper 1300+ 上。酶切验证显示有目的条带(图 2),随后的测序结果也表明载体构建正确。将重组质粒命名为 pCsuper1300-p24。



M 为 DNA 分子量 DL 2 000;泳道 1 为空载体对照,泳道 2 为酶切产物。

M: DNA marker DL 2 000; lane 1: negative control; lane 2: restricted product.

图 2 酶切验证 pSuper1300-p24

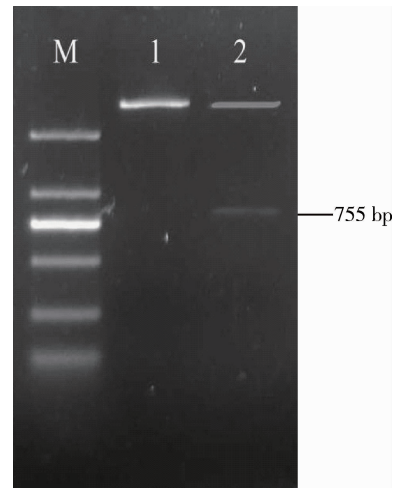
Fig. 2 Restriction analyses of recombinant vector pSuper1300-p24

### 2.2 RNAi 载体 pSuper-p24-F-R 的构建和鉴定

以 p-G2-p24 为模板,PCR 扩增 *p24* 蛋白基因大小为 300 bp 的正反向片段。将回收的 PCR 产物(正反向片段)分别用 *Sac* I/*Bam* H I 和 *Sal* I/*Hind* III 双酶切后,定向克隆到中间载体 pBSint,得到重组的中间质粒 pBSint-p24-F-R。

用 *Sal* I 和 *Sac* I 双酶切 pBSint-p24-F-R,将酶切产物定向克隆到 pCsuper 1300+ 上,得到重组质粒 pCsuper-p24-F-R。由于 *p24* 蛋白基因正反向片

段之间有一个 155 bp 的内含子,因此酶切验证显示在 755 bp 的位置有目的条带(图 3),与试验设计相符。随后的测序结果也证明载体构建正确。



M 为 DNA 分子量 DL 2 000;泳道 1 为空载体对照,泳道 2 为酶切产物。

M: DNA marker DL 2 000; lane 1: negative control; lane 2: restricted product.

图 3 酶切验证 pSuper-p24-F-R

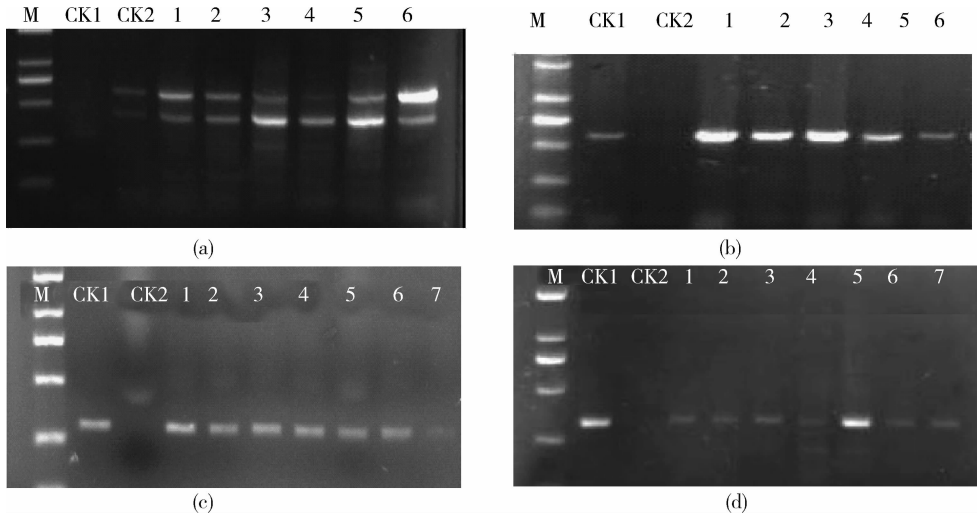
Fig. 3 Restriction analyses of recombinant vector pSuper-p24-F-R

### 2.3 转基因烟草 T<sub>0</sub> 代阳性株系鉴定

提取 T<sub>0</sub> 代再生烟草植株 DNA 和 RNA,用 WF/WR 和及 hpIF/hpIR 为引物,分别进行 PCR 和 RT-PCR 检测阳性株系。在转化 pCsuper-p24 和 pCsuper-p24-F-R 的再生植株中分别检测到目的条带(618 和 300 bp)(图 4),而野生型本生烟则不能扩出相应条带,PCR 产物的测序结果也表明是 *p24* 蛋白基因序列。经检测,获得转化 pCsuper-p24 和 pCsuper-p24-F-R 的 T<sub>0</sub> 代阳性株系分别为 34 和 17 个。

### 2.4 转基因烟草 T<sub>1</sub> 代阳性株系鉴定

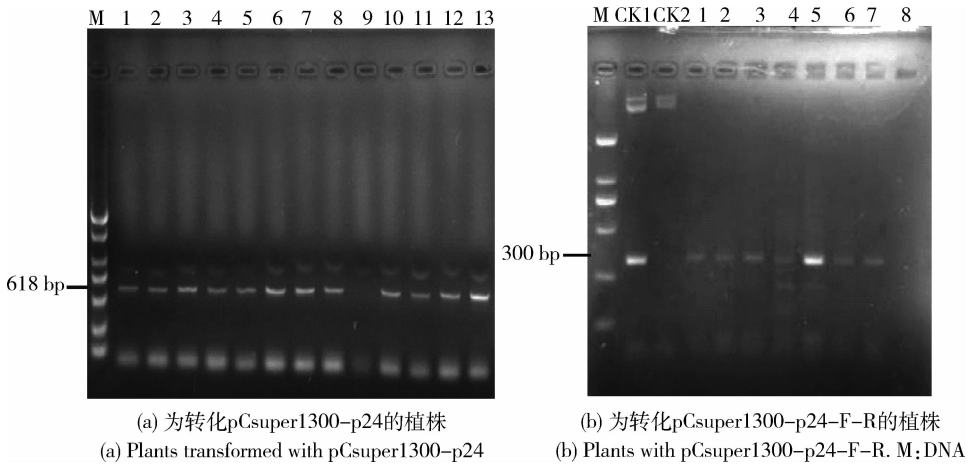
将上述经 PCR 和 RT-PCR 检测均为阳性的再生植株在温室种植,分单株收获 T<sub>1</sub> 代自交种子。播种 T<sub>1</sub> 代种子,然后提取 T<sub>1</sub> 代植株 RNA 进行 RT-PCR 检测,在检测为阳性的株系中有目的条带(618 和 300 bp)(图 5)。随后的测序结果也显示确实是 *p24* 蛋白基因序列。经鉴定,各有 12 个转化 pCsuper1300-p24 和 7 个转化 pCsuper1300-p24-F-R 的 T<sub>1</sub> 代株系为阳性。



(a)和(b)分别为转化 pSuper-p24 的再生植株 PCR 和 RT-PCR 检测；(c)和(d)分别为转化 pSuper-p24-F-R 的再生植株 PCR 和 RT-PCR 检测。M:DNA 分子量 DL 2 000;CK1:阴性对照;CK2:阳性对照;泳道 1-6:扩增产物。  
 (a) and (b);PCR and RT-PCR detection regenerated plants transformed with pSuper-p24; (c) and (d);PCR and RT-PCR detection regenerated plants transformed with pSuper-p24-F-R. M; DNA marker DL 2 000;CK1: negative control;CK2: positive control;lane 1-6;PCR products.

图 4 再生植株 PCR 及 RT-PCR 检测

Fig. 4 PCR and RT-PCR detection of regenerated plants



(a)为转化 pCsuper1300-p24 的植株;(b)为转化 pCsuper1300-p24-F-R 的植株。M 为 DNA 分子量大小 DL 2 000;CK1 为阳性对照;CK2 为阴性对照。其他泳道为 PCR 产物。

(a) Plants transformed with pCsuper1300-p24; (b) Plants with pCsuper1300-p24-F-R. M; DNA marker DL 2 000; CK1, positive control,CK2,negative control;lanes 1-13 and lanes 1-8;PCR products.

图 5 T<sub>1</sub> 代转基因植株的 RT-PCR 检测

Fig. 5 RT-PCR detection of T<sub>1</sub> transgenic plants

### 3 讨论

在构建转基因载体时,在目标基因的正反向序列中间加入一段内含子序列,可以在植物中转录形成高效稳定的 ihpRNA 发夹结构,从而大大提高目标基因的沉默效率<sup>[7]</sup>。利用该技术,Soler 等将含有

柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*,CTV)编码的 3 个基因沉默抑制子基因片段的 ihpRNA 载体转入柑橘植株,获得的转基因植株表现出对该病毒的完全抗性(complete resistance)<sup>[8]</sup>。将黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*,CMV)CP 基因部分序列定向克隆到具内含子的载体上,然后将该 ihpRNA

载体转化烟草,有一个转基因株系也表现出对 CMV 的完全抗性<sup>[9]</sup>。Wang 等<sup>[10]</sup>将含有大麦黄矮病毒(*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) PAV 分离物多聚蛋白基因的 ihpRNA 载体转化大麦,发现有 9 个株系对 BYDV-PAV 近乎免疫。

与其他植物病毒病一样,GLD 也缺乏有效防治药剂,而且在葡萄上至今未发现有效的抗性基因、抗性品种。目前采取的主要防控措施是种植无病毒葡萄苗木,但田间介壳虫、粉蚧等又可将 GLRaVs 再次传播到新栽植的无病毒苗上,从而导致 GLD 的重新发生。因此通过转基因技术培育抗病毒葡萄新种质有望成为防控葡萄病毒病的有效途径。目前已有这方面的探索,Ling 等<sup>[11]</sup>报道了表达 GLRaV-2 CP 蛋白的本生烟表现出对 GLRaV-2 的抗性。本研究将表达 p24 及其 ihpRNA 的载体分别转化本生烟,所获得的阳性转基因苗株系可望为抗病毒葡萄植株培育和 p24 的功能研究提供试验材料。

### 参 考 文 献

- [1] Martin R R, Eastwell K C, Wagner A, et al. Survey for viruses of grapevine in Oregon and Washington[J]. *Plant Disease*, 2005, 89: 763-766
- [2] Moissiard G, Voinnet O. Viral suppression of RNA silencing in plants[J]. *Mol Plant Pathol*, 2004, 5: 71-82
- [3] Chiba M, Reed J C, Prokhnevsky A I, et al. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon[J]. *Virology*, 2006, 346: 7-14
- [4] Tepfer M. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants *Ann Rev[J]*. *Phytopathol*, 2002, 40: 467-496
- [5] Smith N, Singh S, Wang M B, et al. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs[J]. *Nature*, 2000, 407(6802): 319-320
- [6] 王萌, 费菲, 程玉琴, 等. 葡萄卷叶伴随病毒 2 号和 3 号辽宁分离物部分基因组的序列分析[J]. *植物病理学报*, 2009, 39(5): 449-457
- [7] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants[J]. *Plant J*, 2001, 27(6): 581-590
- [8] Soler N, Plomer M, Fagoaga C, et al. Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of *Citrus tristeza virus* confers complete resistance to the virus[J]. *Plant Biotechnol J*, 2012, 3(8): 28-34
- [9] Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M, et al. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15(8): 826-833
- [10] Wang M B, Abbott D C, Waterhouse P M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpinRNA gives immunity to barley yellow dwarf virus Mo1[J]. *Plant Pathol*, 2000, 1(6): 347-356
- [11] Ling K S, Zhu H Y, Gonsalves D. Resistance to *Grapevine leafroll associated virus-2* is conferred by post-transcriptional gene silencing in transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. *Transgenic Res*, 2008, 17(4): 733-740

责任编辑: 袁文业