

大豆花叶病毒 *HC-Pro* 基因保守序列克隆及其 RNAi 载体的构建

高 乐, 宋英培, 李 凯, 章红运, 沈颖超, 翟 锐, 智海剑

(作物遗传与种质创新国家重点实验室/南京农业大学 国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要:大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)病是全球最主要的大豆病害之一, 严重危害大豆的产量和品质。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)能够在 mRNA 水平特异性沉默同源靶基因, 为抗病毒作物的培育提供了新的途径。本研究对国内外 11 个不同 SMV 流行株系的 *HC-Pro* 基因进行了核苷酸序列比对, 并以 SC3 株系的 cDNA 为模板克隆出高度保守的 268 bp 的基因片段, 进而利用 GATEWAY 技术构建了适合农杆菌介导大豆转化的 RNAi 表达载体 pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi*。并对 BP 反应和 LR 反应的纯化产物进行了测序鉴定, 测得序列在 NCBI 上进行比对, 匹配度为 100%; 以 35S 启动子和终止子设计引物, 扩增得到 464 和 478 bp 两个片段, 说明 *HC-Proi* 基因与 pB7GWIWG2(II)重组形成反向重复结构, 载体构建成功。结果为利用 RNA 干扰技术改良大豆对大豆花叶病毒的抗性奠定了基础。

关键词:大豆花叶病毒; *HC-Pro* 基因; 克隆; RNAi; GATEWAY 技术; 载体构建

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2013)06-0744-06

Cloning of Conserved Sequence of *HC-Pro* Gene of Soybean Mosaic Virus and Construction of Its RNAi Vector

GAO Le, SONG Ying-pei, LI Kai, ZHANG Hong-yun, SHEN Ying-chao, ZHAI Rui, ZHI Hai-jian

(National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean, Ministry of Agriculture, P. R. China, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Soybean mosaic virus (SMV) is one of the major viral diseases in soybean, which severely affects the soybean production and quality. RNA interference (RNAi) can specifically silence the homologous target genes in mRNA level, which provides a new strategy for virus-resistant crop breeding. In this study, we made the nucleotide sequence alignment of *HC-Pro* genes from 11 popular strains of SMV in the world and cloned 268 bp the most conserved gene fragment using the cDNA of SC3 strain. Using the GATEWAY technology, the RNAi vector pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi* suitable for *agrobacterium*-mediated transformation of soybean was constructed. Identification of the sequence and the direction of *HC-Proi* in the vector through the primers of 35S promoter and terminator showed that the recombination of *HC-Pro* and pB7GWIWG2(II) formed the inverted repeat. It may lay the foundation for improvement of soybean resistance to SMV using RNA interference technology.

Key words: Soybean mosaic virus; *HC-Pro* gene; Cloning; RNAi; GATEWAY technology; Vector construction

大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)病是全球最主要的大豆病害之一, 分布十分广泛, 大豆种植区几乎都有发生。SMV 属于马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*), 大豆感染 SMV 后, 会造成叶片光合面积减少和光合能力降低, 植株矮化, 生长量下降, 籽粒出现褐斑, 造成大豆减产 15%~35%, 甚至绝收。传统的抗病育种依赖于高强度的抗侵染基因, 但由于 SMV 存在株系分化, 寄主对 SMV 各株系的抗性具有专化性, 且大豆花叶病毒在自然条件下也会发生变异, 因此传统方法培育的抗病品种抗谱较窄且抗性容易丧失。

转基因技术的发展使得培育具有广谱抗性的品种以避免品种抗性丧失成为可能。自从 1986 年

Powell 等^[1]利用转基因技术将 TMV 的 *CP* 基因导入烟草并且首次获得对 TMV 具有抗性的烟草以来, 许多科学家已通过该方法获得了不同类型的抗病材料。在大豆花叶病毒抗性品种培育方面, Wang 等^[2]和 Furutani 等^[3]分别利用农杆菌侵染法和基因枪法将大豆花叶病毒的 *CP* 基因导入到大豆中, 获得了高抗的植株。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是通过某些小双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)介导, 在 mRNA 水平沉默同源靶基因, 即序列特异性转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS), 这种沉默机制普遍存在于生物界中^[4-6]。RNAi 技术凭借其高安全性和高特异性等优点, 已

收稿日期: 2013-04-24

基金项目: 转基因生物新品种培育专项(2008ZX08004-004); 国家自然科学基金(31171574, 31101164); 现代农业产业技术体系(CARS-004); 南京农业大学青年科技创新基金(KJ2010002); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

第一作者简介: 高乐(1987-), 男, 在读博士, 主要从事转基因大豆抗病品种培育研究。E-mail: 2010101160@njau.edu.cn。

通讯作者: 智海剑(1957-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: zhj@njau.edu.cn。

成为抗病毒转基因植物研究中的热门^[7]。利用病毒自身的基因片段构建反向重复载体,通过转基因技术导入到植株体内,形成特异性的 dsRNA,降解入侵的病毒,从而获得抗病品种。该技术已在抗黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)^[8]、马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX)^[9]、苜蓿花叶病毒(alfalfa mosaic virus, AMV)^[10]、水稻黄斑驳病毒(rice yellow mottle virus, RYMV)^[11]等多种病毒转基因抗病品种培育方面取得了成功。以往通过转 SMV 基因方法培育 SMV 抗性大豆品种的研究均是构建外壳蛋白(coat protein, CP)基因的过量表达载体,单志慧等^[12]首次构建了大豆花叶病毒 CP 基因的干扰载体,为应用 RNA 干扰技术获得对 SMV 具有抗性的大豆品种进行了有益探索。

SMV 基因组是单链正义 RNA,全长约 10 000 个核苷酸^[13],共编码 9 个成熟功能蛋白^[14]。其中辅助组分-蛋白酶(helper component-proteinase, *HC-Pro*)是一种半胱氨酸蛋白酶,属于运动蛋白^[15]。*HC-Pro* 具有蚜传辅助因子活性,参与病毒复制和长距离运输,并且是转录后基因沉默抑制子,参与病毒生活史的各个环节,是 SMV 侵染大豆的关键蛋白之一。因此利用此基因保守区域片段构建 RNAi 载体,结合转基因技术培育转基因材料,有可能获得具有干扰大豆花叶病毒 *HC-Pro* 基因功能的广谱抗性大豆品种。

本研究对国内外 11 个不同 SMV 流行株系的 *HC-Pro* 基因进行核苷酸序列比对,并以 SC3 株系的 cDNA 为模板克隆高度保守的部分基因片段,进而利用 GATEWAY 技术快速构建 RNAi 载体 pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi*,以期利用 RNA 干扰技术培育抗大豆花叶病毒转基因品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 SMV 毒源 将本实验室保存的 SMV 株系 SC3 在南农 1138-2 上繁殖,14 d 后,采取发病的叶片进行总 RNA 提取。

1.1.2 质粒和菌株 Gateway 入门载体 pDONR221、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5a、DB3.1 菌株购自美国 Invitrogen 公司。Gateway 表达载体 pB7GWIWG2(II)、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 BP Clonase II、LR Clonase II 购自美国 Invitrogen 公司;供试 DNA 分子量标准、RNA 提取试剂盒、2 × *Taq* mix 聚合酶、凝胶 DNA 回收试

剂盒购自北京 TIANGEN 公司;PrimeScrip 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司;KOD FX 高保真聚合酶购自 TOYOBO 公司;质粒提取试剂盒购自 AXYGEN 公司;其他试剂均为国产超纯和分析纯。引物由上海 Invitrogen 公司合成,测序由北京华大基因公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取与 cDNA 的合成 2012 年 3 月在南京农业大学牌楼实验基地的防虫网室中播种感病品种南农 1138-2 于沙土盆中,当第一对真叶展平时,采用汁液摩擦接种法接种 SC3 株系。接种 14 d 后取幼嫩的感病叶片 100 mg,在液氮中充分研磨后,按 TIANGEN 试剂盒说明书提取总 RNA,产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测为阳性的样本按照 PrimeScrip 反转录试剂盒的说明书合成 cDNA 第一链。反应液中所用引物为 Oligo dT,在 65℃ 放置 5 min 后,冰上迅速冷却,然后加入逆转录酶 PrimeScrip 及其他试剂并且缓慢混匀后,于 42℃ 保持 30 ~ 60 min,95℃ 保温 5 min 使酶失活,置于冰上冷却。cDNA 保存于 -20℃ 备用。

1.2.2 *HC-Pro* 基因保守区间的确定及 PCR 扩增

在 NCBI 上搜索 SMV 株系的全基因组序列,利用 ClustalX 软件对国内外 11 个流行株系 G1 (Genebank 登录号 FJ640977)、G3 (Genebank 登录号 FJ640978)、G4 (Genebank 登录号 FJ640979)、G6H (Genebank 登录号 FJ640981)、G7A (Genebank 登录号 FJ640982)、WS32 (Genebank 登录号 FJ640954)、6607-1 (Genebank 登录号 JF833015)、6202-2 (Genebank 登录号 JF833014)、HH5 (Genebank 登录号 AJ310200)、SC3 (Genebank 登录号 JF833013)、SC6 (Genebank 登录号 HM590054) 进行核苷酸序列比对确定保守区域。根据 SC3 株系的序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计 *HC-Pro* 保守区间内的上、下游引物。引物序列如下(下划线所标注的为特异性重组序列 attB):

上游引物 attB1-*HC-F*:

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-
AGCCACTGATGCAGACAGGATG-3'

下游引物 attB2-*HC-R*:

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-
CACGTGCATGTTTGACACGCA-3'

在上述引物的作用下,采用 KOD FX 高保真酶以反转录后的 cDNA 为模板,进行 PCR 反应,反应体系为 50 μL,具体组成为:Buffer 25 μL, dNTPS 10 μL,上、下游引物各 1.5 μL, cDNA 1 μL, KOD FX 酶 1 μL,灭菌超纯水 10 μL。循环条件为:94℃ 预变

性 2 min; 98℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 30 s, 共 25 个循环; 最后 68℃ 延伸 5 min。对 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并采用 TIANGEN 凝胶 DNA 回收试剂盒对目标条带进行纯化回收, 然后送交上海 Invitrogen 公司进行测序分析。

1.2.3 Gateway 技术快速构建 RNAi 载体 入门载体 pDONR221、终端载体 pB7GWIWG2(II) 在大肠杆菌 DB 3.1 菌株中扩繁后提取质粒, -20℃ 保存备用。

BP 反应: 采用 10 μL 反应体系(冰浴条件下, 1.5 mL 灭菌离心管中进行操作): attB-PCR 产物(纯化、测序验证后) 4 μL, pDONR221 vector 1 μL, TE buffer (pH8.0) 3 μL, BP Clonase II enzyme mix 2 μL。轻柔地涡旋混匀后短暂离心, 25℃ 温浴 4 h 至过夜, 然后加入 1 μL Proteinase K solution, 37℃ 温浴 10 min。取 10 μL BP 连接产物通过热激法转化 DH5α 感受态细胞, 经过 45 ~ 60 min 复苏培养后(37℃, 225 r·min⁻¹), 低速短暂离心, 弃去部分上清并打散后均匀地涂布在含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素(kanamycin)的 LB 固体培养基上, 37℃ 倒置过夜。次日, 挑取单克隆在含有 kanamycin (50 mg·L⁻¹) 的 LB 液体培养基中扩繁 6 ~ 8 h (37℃, 225 r·min⁻¹), 然后进行菌液 PCR 反应, 鉴定 *HC-Proi* 基因是否与入门载体 pDONR221 发生了同源重组。反应体系为: 1 μL 菌液, attB1-HC-F 1 μL, attB2-HC-R 1 μL, 2 × Taq mix 聚合酶 12.5 μL, 灭菌超纯水 9.5 μL。循环条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。然后对 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将扩增片段大小与预期一致的阳性克隆的菌液进行测序验证。测序正确的克隆进行扩大培养, 之后按照 AXYGEN 试剂盒说明书提取质粒

pDONR221-*HC-Proi*, -20℃ 保存备用用于 LR 反应。

LR 反应: 实验过程及鉴定方法与 BP 反应大致相同, 采用 10 μL 反应体系, 在冰浴条件下, 1.5 mL 灭菌离心管中加入重组质粒 pDONR221-*HC-Proi* 4 μL, 终端质粒 pB7GWIWG2(II) 2 μL, TE buffer (pH8.0) 2 μL, LR Clonase II enzyme mix 2 μL。将 LR 重组产物转入 DH5a 感受态细胞, 在含有 100 mg·L⁻¹ 壮观霉素(spectinomycin)的 LB 固体培养基上筛选阳性克隆。然后对单克隆扩繁并进行菌液 PCR 反应以及 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将扩增片段大小与预期一致的阳性克隆菌液进行测序验证。测序正确的单克隆进行扩繁, 提取质粒 pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi*(图 1), -20℃ 保存备用。

1.2.4 *HC-Proi* 插入方向的鉴定以及工程菌的获得 采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计表达质粒 pB7GWIWG2(II) 35S 启动子和终止子序列区间的引物:

35S-T; 5'-GCTCAACACATGAGCGAAAC-3'

35S-P; 5'-GACGCACAATCCCACTATCC-3'

引物 35S-T、35S-P 分别与引物 attB2-HC-R 组合对重组质粒 pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi* 进行质粒 PCR 反应以及 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 从而鉴定 *HC-Proi* 片段基因插入质粒的方向是否正确。将片段大小、测序结果、基因插入方向均正确的重组质粒采用冻融法转入到农杆菌 EHA105 感受态细胞中, 涂布于含有 25 mg·L⁻¹ 利福平(rifampicin)和 100 mg·L⁻¹ spectinomycin 的 YEB 固体培养基上, 28℃, 倒置 36 ~ 48 h。挑取单克隆在含有相应抗生素的 YEB 液体培养基中扩繁 24 ~ 36 h (28℃, 200 r·min⁻¹), 然后进行菌液 PCR 反应。阳性克隆的菌液加入适量的甘油保存于 -80℃ 冰箱。

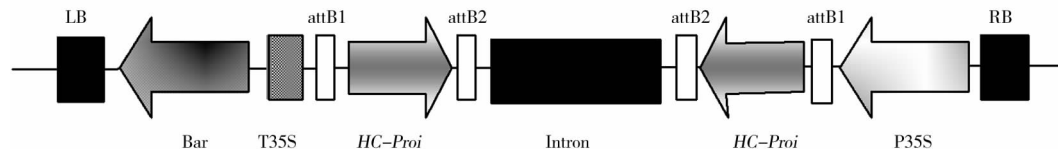


图 1 重组质粒 pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi* 结构图

Fig. 1 Construction map of recombinant plasmid pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi*

2 结果与分析

2.1 *HC-Proi* 基因的克隆

通过对国内外 11 个 SMV 流行株系 *HC-Pro* 基因核苷酸序列比对, 确定 *HC-Pro* 保守区间长度为 268 bp (2 043 ~ 2 310 bp) (图 2)。然后提取病叶总 RNA, 利用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测 (图 3)。

将 RNA 反转录成 cDNA 后, 采用含有 attB 特异性重组序列的引物以 cDNA 为模板进行扩增, 电泳检测扩增条带大小为 300 bp 左右, 与预期片段(包括 *HC-Proi* 基因和两端的 attB, 共计 326 bp) 长度相符 (图 4)。将产物纯化回收, 并进行测序, 测得序列在 NCBI 进行 BLAST, 结果显示所测序列与 SC3 序列匹配度为 100%。

G1	2043	GCCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTAGTCAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
G3	2043	GCCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTAGTCAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
G4	2043	ACCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTGGTAAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
G6H	2043	ACCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTGGTAAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
G7A	2043	ACCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTGGTAAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
WS32	2043	ACCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTGGTAAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
6607-1	2043	ACCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTGGTAAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
6202-2	2043	ACCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTGGTAAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
HH5	2043	ACCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTGGTAAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
SC3	2043	ACCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTGGTAAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
SC6	2043	ACCAGCCACTGATGCAGACAGGATGTACATAGCTAAAGAAGGATTTTGGTATCTTAAACATTTCTTGGCAATGTTGGTAAATGTAATGAAGATGAAGCCA	2143
G1	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
G3	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
G4	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
G6H	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
G7A	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
WS32	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
6607-1	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
6202-2	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
HH5	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
SC3	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
SC6	2144	AGGACTTCACGAACATGGTGAAGGATGTTATTGTGCCAAGGCTAGGAAAGTGGCCGACAATGTTAGATGTAGCAACAGCTGCATACATGTTAACAGTTTTT	2244
G1	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310
G3	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310
G4	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310
G6H	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310
G7A	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310
WS32	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310
6607-1	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310
6202-2	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310
HH5	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310
SC3	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310
SC6	2245	CACCCCGAAACAGGAATGCTGAGCTTCCACGATTTTGGTTGACCATGCGTGTCAAACCATGCAT	2310

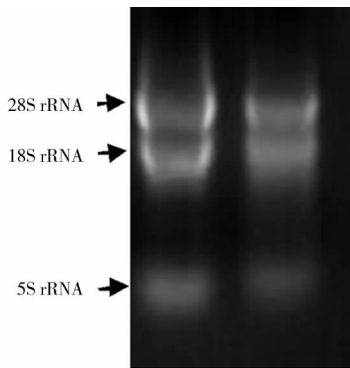
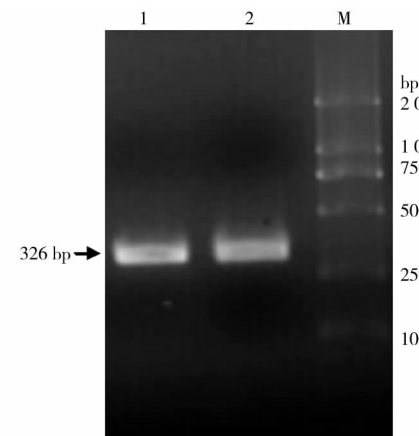
图 2 克隆的 *HC-Pro* 基因保守序列(2 043 ~ 2 310 bp)Fig. 2 Conserved sequence of cloned *HC-Pro* gene(2 043 ~ 2 310 bp)

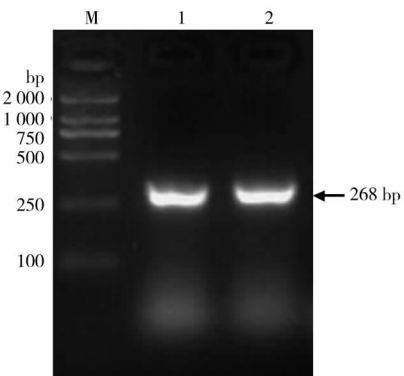
图 3 大豆叶片总 RNA 提取

Fig. 3 Total RNAs extracted from soybean leaf

1, 2: attB-*HC-Proi* 扩增片段; M: DL2000 分子量标准。1, 2: Amplification fragment of attB-*HC-Proi*; M: Molecular marker of DL2000.图 4 attB-*HC-Proi* PCR 扩增图Fig. 4 PCR amplification of attB-*HC-Proi* gene

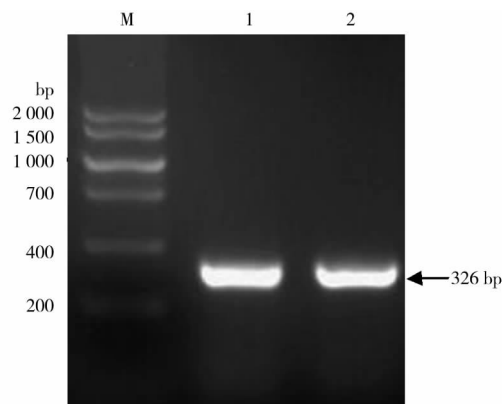
2.2 BP 入门克隆和 LR 表达载体的鉴定

BP 反应结束后,将 BP 产物 pDONR221-*HC-Proi* 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含有 kanamycin 的 LB 平板上挑取单克隆,进行菌液 PCR 反应。电泳检测显示,利用不含 attB 的引物扩增得到 268 bp 的条带(经过 BP 反应后,attB 变成 attL),与预期大小相符(图 5)。测序完成后,将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,结果显示所测序列与 SC3 序列匹配度为 100%。

M: DL2000 分子量标准; 1, 2: *HC-Proi* 扩增片段。M: Molecular marker of DL2000; 1, 2: Amplification fragment of *HC-Proi*.图 5 pDONR221-*HC-Proi* 菌液 PCR 扩增图Fig. 5 PCR amplification of pDONR221-*HC-Proi* in bacteria liquid

将 BP 产物 pDONR221-*HC-Proi* 与表达载体 pB7GWIWG2(II)按说明书要求进行混合,经过 LR 反应后,转化 DH5 α 感受态细胞,在含有 spectinomycin

cin 的 LB 固体培养基上筛选阳性克隆,并进行菌液 PCR 反应。结果显示,利用引物 attB1-HC-F 和 attB2-HC-R 扩增得到 326 bp 的条带(经过 LR 反应后,attL 变回 attB),与预期大小吻合(图 6)。经测序验证,与 SC3 序列匹配度达到 100%。说明 *HC-Proi* 基因在载体构建过程中未发生变异,并已经取代了 *ccdB* 的位置并与表达载体 pB7GWIWG2(II) 成功组合。



M: DNA Marker V 分子量标准; 1, 2: attB-HC-Proi 扩增片段。

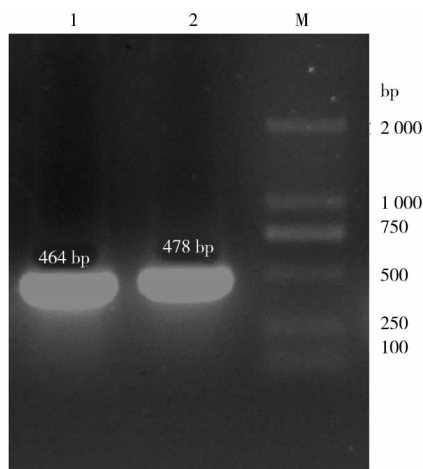
M: Molecular marker of DNA Marker V; 1, 2: Amplification fragment of attB-HC-Proi.

图 6 pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi* 菌液 PCR 扩增图

Fig. 6 PCR amplification of pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi* in bacteria liquid

2.3 *HC-Proi* 基因在重组表达载体中插入的方向鉴定和农杆菌转化

以重组表达载体的质粒为模板,用 35S-T 和 attB2-HC-R、35S-P 和 attB2-HC-R 两对引物对其进



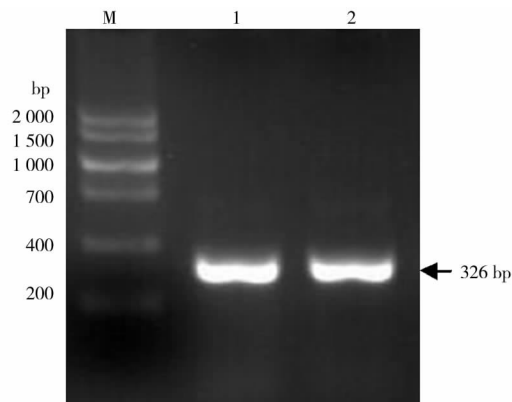
1: 35S-T 和 attB2-HC-R 扩增片段; 2: 35S-P 和 attB2-HC-R 扩增片段; M: DL2000 分子量标准。

1: Amplification fragment of 35S-T and attB2-HC-R; 2: Amplification fragment of 35S-P and attB2-HC-R; M: Molecular marker of DL2000.

图 7 重组 RNAi 载体的鉴定

Fig. 7 Identification of recombinant RNAi vector

行 PCR 扩增。电泳结果显示,两对引物分别扩增出长度为 464 bp(包括部分 35S 终止子和 attB-HC-Proi)和 478 bp(包括部分 35S 启动子和 attB-HC-Proi)的片段,说明 *HC-Proi* 基因与 pB7GWIWG2(II) 重组形成了反向重复结构,与预期结果相吻合,表明 RNAi 表达载体构建成功(图 7)。提取质粒,采用冻融法转化农杆菌 EHA105 感受态细胞,在抗性 YEB 平板上挑取单克隆并进行菌液 PCR 反应,结果证明重组表达载体成功导入农杆菌中(图 8)。



M: DNA Marker V 分子量标准; 1, 2: attB-HC-Proi 扩增片段。

M: Molecular marker of DNA Marker V; 1, 2: Amplification fragment of attB-HC-Proi.

图 8 pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi*

农杆菌菌液 PCR 扩增图

Fig. 8 PCR amplification of pB7GWIWG2(II)-*HC-Proi* in *Agrobacterium* liquid

3 讨论

选择合适的目的基因和载体对遗传转化的成功率以及转化材料的抗性有直接的影响。在抗病毒作物的培育中,利用病毒自身的基因片段构建干扰载体比抗病基因或是 *CP* 基因所构建的表达载体对病毒更加具有针对性。在 Wang 等^[2]和 Furutani 等^[3]的试验当中,虽然构建的都是 *CP* 基因的表达载体,但在转基因后代中均发现了 RNA 介导的抗性(RNA-mediated resistance),即 RNA 干扰。本研究选取的 *HC-Pro* 基因是首个被鉴定的 PTGS 抑制子^[16],在 SMV 生活史中起着重要作用,通过对国内外不同 SMV 流行株系 *HC-Pro* 基因的核苷酸序列进行比对,克隆出保守片段,并成功地构建了含有内含子的 RNAi 载体,为利用转基因手段培育对大豆花叶病毒具有持久、广谱抗性的大豆新种质提供了基础材料,对大豆花叶病毒的防治有着现实的意义。

在构建上述载体时,本实验室采用了 Invitrogen 公司推出的 GATEWAY 重组系统,包括 BP 和 LR 两个反应。其优点是:(1)仅需在正反向引物的 5'端

加上特异性重组序列 attB,便可代替传统的酶切链接等步骤,节省了大量的时间和人力;(2)在入门载体和目标载体上均含有 *ccdB* 致死基因,含有非重组质粒的大肠杆菌无法生长,而长出的菌落基本上都是阳性克隆,省去了繁琐的筛选工作。

目前,本实验室正利用此载体从事转基因大豆抗病品种培育的研究,已经获得 T₀代转基因植株,并且通过 PCR、除草剂涂抹等方法初步鉴定出部分阳性植株,有待于通过 Southern blot 进一步确定,并最终获得对 SMV 具有抗性的转基因大豆。

参考文献

- [1] Abel P P, Nelson R S, de B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. Science, 1986, 232(4751): 738-743.
- [2] Wang X, Eggenberger A L, Nutter J F W, et al. Pathogen-derived transgenic resistance to soybean mosaic virus in soybean[J]. Molecular Breeding, 2001, 8(2): 119-127.
- [3] Furutani N, Hidaka S, Kosaka Y, et al. Coat protein gene-mediated resistance to soybean mosaic virus in transgenic soybean[J]. Breeding Science, 2006, 56(2): 119-124.
- [4] 牛莉莉, 安利佳. RNA 干涉机制的研究进展及植物学意义[J]. 分子植物育种, 2004, 2(3): 429-435. (Niu L L, An L J. Research progress and botany significance of RNA interference mechanism[J]. Molecular Plant Breeding, 2004, 2(3): 429-435.)
- [5] 袁葵洲, 吴秀山. RNAi 机制研究的最新进展[J]. 生命科学研究, 2003, 7(1): 8-14. (Yuan W Z, Wu X S. Advances in the mechanism of RNAi[J]. Life Science Research, 2003, 7(1): 8-14.)
- [6] Han P, Wang X M, Gu X F. Research progress of double-stranded RNA interference(RNAi) in the application of different creatures[J]. Nature, 2002, 24(2): 200-202.
- [7] 王志坤, 李文滨, 刘珊珊. RNA 干扰技术及在植物抗病研究中的应用[J]. 大豆科学, 2008, 27(3): 521-526. (Wang Z K, Li W B, Liu S S. Technology of RNAi and its application in disease resistance of plant[J]. Soybean Science, 2008, 27(3): 521-526.)
- [8] 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]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(8): 826-833.
- [9] Takahashi S, Komatsu K, Kagiwada S, et al. The efficiency of interference of potato virus X infection depends on the target gene[J]. Virus Research, 2006, 116(1): 214-217.
- [10] Tenllado F, Martinez-Garcia B, Vargas M, et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections[J]. BMC biotechnology, 2003, 3(1): 3-14.
- [11] Pinto Y M, Kok R A, Baulcombe D C. Resistance to rice yellow mottle virus(RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(7): 702-707.
- [12] 许宗宏, 郝青南, 陈李森, 等. 基于大豆花叶病毒衣壳蛋白基因的 RNA 干扰植物表达载体的构建[J]. 华北农学报, 2010, 25(S2): 1-4. (Xu Z H, Hao Q N, Chen L M, et al. Plant expression construct based on RNAi for soybean mosaic virus[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(S2): 1-4.)
- [13] Hill J H, Benner H I. Properties of soybean mosaic virus ribonucleic acid[J]. Phytopathology, 1980, 70(3): 236-239.
- [14] Jayaram C H, Hill J H, Miller W A. Complete nucleotide sequences of two soybean mosaic virus strains differentiated by response of soybean containing the Rsv resistance gene[J]. The Journal of General Virology, 1992, 73(8): 2067-2077.
- [15] Rojas M R, Zerbini F M, Allison R F, et al. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins[J]. Virology, 1997, 237(2): 283-295.
- [16] Anandalakshmi R, Pruss G J, Ge X, et al. A viral suppressor of gene silencing in plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(22): 13079-13084.

欢迎订阅 2014 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

《大豆科学》为双月刊,16 开本,每期 144 页。国内外公开发行,国内每期定价:10.00 元,全年 60.00 元,邮发代号:14-95。国外每期定价:10.00 美元(含邮资),全年 60 美元,国外代号:Q5587。全国各地邮局均可订阅,也可向编辑部直接订购。

热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部(邮编:150086)

电话:0451-86668735

网址:www.haasep.cn

E-mail: dadoukx@sina.com ddkexue@126.com