

兼抗玉米矮花叶病毒及粗缩病毒无选择标记 siRNA 复合表达载体的构建

张 姣¹, 赵 阳², 甘德芳^{1*}

(1. 安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘 要: 根据 GenBank 和 MaizeSeq 等数据库中的玉米矮花叶病毒和粗缩病毒外壳蛋白基因(CP)全序列设计特异性引物, RT-PCR 扩增玉米矮花叶病毒及粗缩病毒的 CP 基因特异性 RNA 干扰片段, 分别构建反向重复片段并串联成 pBluscript + SM; Hind III-EcoR I 双酶切 2T-DNA 真核表达载体 pDTB, 插入 Ubiquitin 启动子及 Nos 终止子, 构建 pDTBU; 串联的反向重复片段插入 pDTBU, 构建兼抗玉米矮花叶病毒和粗缩病毒的 siRNA 复合表达载体 pDTBUSM。酶切结果显示, 目的片段均正确插入到相应的载体中。本研究对开展抗病毒 RNA 干扰调控技术研究, 创建高抗病毒玉米新种质具有重要的理论和实践意义。

关键词: 玉米矮花叶病毒; 玉米粗缩病毒; 外壳蛋白; 载体构建; siRNA

中图分类号: S513; S503.53

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)02-0232-06

Construction of marker-free siRNA complex expression vector against MDMV and MRDV

ZHANG Jiao¹, ZHAO Yang², GAN De-fang¹

(1. School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Based on the coat protein gene sequence of MDMV and MRDV in GenBank and MaizeSeq database, six pairs of specific primers were designed and six specific fragments were amplified by RT-PCR to prepare siRNA that corresponded to part of the MDMV CP or MRDV CP gene. In the first cloning step, an inverted repeat sequence of pUCCRNAi + 2 F was constructed. Next, two inverted repeat sequences were inserted into pBluscript SK in series to generate pBluscript + SM. Meanwhile, Ubiquitin promoter and Nos termination were cloned into pDTB to generate pDTBU. In the third step, pDTBU and pBluscript + SM plasmids were digested and joined to generate pDTBUSM. The study presented here provides a valuable tool for plant viral control using RNAi and the PTGS approach.

Key words: maize dwarf mosaic virus (MDMV); maize rough dwarf virus (MRDV); coat protein (CP); vector construction; siRNA

玉米矮花叶病和玉米粗缩病是我国玉米产区普遍发生的两种重要病毒病害^[1-2]。矮花叶病病原为玉米矮花叶病毒 (maize dwarf mosaic virus, MDMV) 和甘蔗花叶病毒 (sugarcane mosaic virus, SCMV)^[3], 通过蚜虫传播; 粗缩病是由玉米粗缩病毒 (maize rough dwarf virus, MRDV) 引起的, 由灰飞虱以持久性方式传播。目前这两种病害在我国玉米产区大面积暴发、流行呈明显上升趋势^[4-5]。对这两种玉米

病毒病的防治, 多采用农药控制传播病毒的蚜虫和灰飞虱, 但农药价格较高、易造成环境污染、费工费时且防治效果差。培育推广抗病品种已成为病毒病防治的迫切需求, 而利用病毒基因转化植物已成为解决植物病毒的主要手段^[6]。利用病毒目的基因进行抗病基因工程研究已经取得了一定的成果^[7-8], 包括病毒外壳蛋白基因、病毒移动蛋白基因、病毒复制酶基因等^[9-12]。利用 RNA 介导的干扰技术等方

收稿日期: 2010-11-01

基金项目: 国家高技术研究与发展计划(863)项目 (2008AA10Z408) 和安徽省高校省级科研项目 (KJ2011A110) 共同资助。

作者简介: 张姣, 女, 硕士研究生。E-mail: zjiao1012@163.com

* 通讯作者: 甘德芳, 女, 副教授。E-mail: gandf@ahau.edu.cn

面的研究, 以筛选标记基因为基础的农杆菌介导法将外源基因转化到植物体内为最多^[13]。由于筛选标记基因大多是编码抗生素抗性和除草剂抗性基因, 可能对生态环境和食品安全造成影响, 同时选择标记基因的存在还限制了转基因植物的进一步改良。因此, 培育无选择标记转基因植物成为植物基因工程研究的一个新趋势^[14-15]。

本研究以玉米矮花叶病毒 (maize dwarf mosaic virus, MDMV) 和粗缩病毒 (maize rough dwarf virus, MRDV) 外壳蛋白基因的特异性片段为靶目标, 构建兼抗玉米矮花叶病毒及玉米粗缩病毒的无选择标记 siRNA 复合表达载体, 对开展抗病毒 RNA 干扰调控技术研究, 创建高抗病毒玉米新种质具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米矮花叶病毒 MDMV 和玉米粗缩病毒 S10 质粒由安徽农业大学植保学院惠赠并保存于玉米叶片上, 采用摩擦接种法接种玉米; 干涉载体

pUCCRNAi、中间载体 pBluscript SK、双 T-DNA 载体 pDTB 以及大肠杆菌 DH5 α 均为本实验室保存。限制性内切酶、T₄DNA 连接酶和 DNA marker 购自 Takara 公司, 琼脂糖购自 Promega 生物公司, Gel Extraction Kit 购自上海华舜生物公司, 其它常用药品均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 特异性干涉片段的选取与扩增 利用 GenBank 和 MaizeSeq 等数据库中的 MDMV 和 MRDV 外壳蛋白基因 (CP) 全序列信息, 与已知玉米表达序列和基因组序列以及人类基因组序列进行同源性比对, 确定目的基因片段序列分别为 MDMV (GeneBank accession number: S77088) 上游 512~658 bp, 共 147 bp; 下游 743~882 bp, 共 140 bp。MRDV (GeneBank accession number: AF227206) ORF 框上游 555~685 bp, 共 131 bp; 下游 1 444~1 573 bp, 共 129 bp。设计特异性引物 (表 1), 其中划线部分为限制性内切酶 *Bam*HI (ggatcc) 及 *Sal*I (gtcgac) 位点, RT-PCR 扩增 CP 基因特异性片段。

表 1 玉米 MDMV 及 MRDV CP 基因特异性干涉片段 RT-PCR 扩增的引物序列及其参数

Table 1 Primers and parameters used for RT-PCR amplification

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	片段大小 Fragment size /bp	功能 Function
1	M1: <u>cccgtcgac</u> ctgctttaaagaaaaaac M12: <u>cccggatcc</u> aggagtagcgaattgatga	147	扩增 MDMV CP 基因上游正向特异干涉片段 Amplification of MDMV CP gene upstream specific fragment in forward orientation
2	M2: <u>cccgtcgac</u> atgtatcgcctctgtagagt M12: <u>cccggatcc</u> aggagtagcgaattgatga	247	扩增 MDMV CP 基因上游反向特异干涉片段 Amplification of MDMV CP gene upstream specific fragment in reverse orientation
3	M3: <u>ggggtcgc</u> acggctttcatctgcatgtg M34: <u>cccggatcc</u> ctacagagcgatacatgcca	140	扩增 MDMV CP 基因下游正向特异干涉片段
4	M4: <u>cccgtcgac</u> tttccgtccagaccgaaca M34: <u>cccggatcc</u> ctacagagcgatacatgcca	187	扩增 MDMV CP 基因下游反向特异干涉片段
5	R1: <u>cccggatcc</u> tcaggtttagaagtca R2: <u>cccgtcgac</u> aatcgtaccaccatcaa	131	扩增 MRDV CP 基因上游特异干涉片段
6	R3: <u>ccgggatcc</u> gacaagattgatgattggt R4: <u>cccgtcgac</u> ccgctctactgataaattact	129	扩增 MRDV CP 基因下游特异干涉片段

1.2.2 pUCCRNAi + 2 F 载体的构建 利用 *Bam*HI - *Sal*I 双酶切干涉载体 pUCCRNAi 和正向目的片段, 分别构建 MDMVCP 及 MRDVCP 基因正向连接产物 pUCCRNAi + F, 再将反向目的片段插入到经 *Bgl*II - *Xho*I 双酶切的 pUCCRNAi+F 中, 构建反向重复载体 pUCCRNAi+2 F。

1.2.3 MDMVCP 及 MDRVCP 反向重复片段的串联 利用 *Pst*I - *Sal*I 酶切 pBluscript SK, 将粗缩病毒 MDRVCP

的反向重复片段插入到 pBluscript SK 中构建 pBluscript + S, 再利用 *Pst*I 单酶切将矮花叶病毒 MDMVCP 反向重复片段插入到 pBluscript + S 中, 构建中间复合载体 pBluscript + SM;

1.2.4 pDTBU 中间载体的构建 利用 *Hind*III - *Eco*RI 酶切双 T-DNA 载体 pDTB, 插入 Ubiquitin 启动子及 Nos 终止子, 构建 pDTBU 中间载体;

1.2.5 无选择标记复合表达载体 pDTBUSM 的构建

利用 *Sal* I-*Sac* I 酶切中间复合载体 pBluescript+SM, 回收串联重复片段, 插入到经 *Sac* I 单酶切的

pDTBU 中间载体中, 构建兼抗 MDMV 及 MRDV 的无选择标记复合表达载体 pDTBUSM (图 1)。

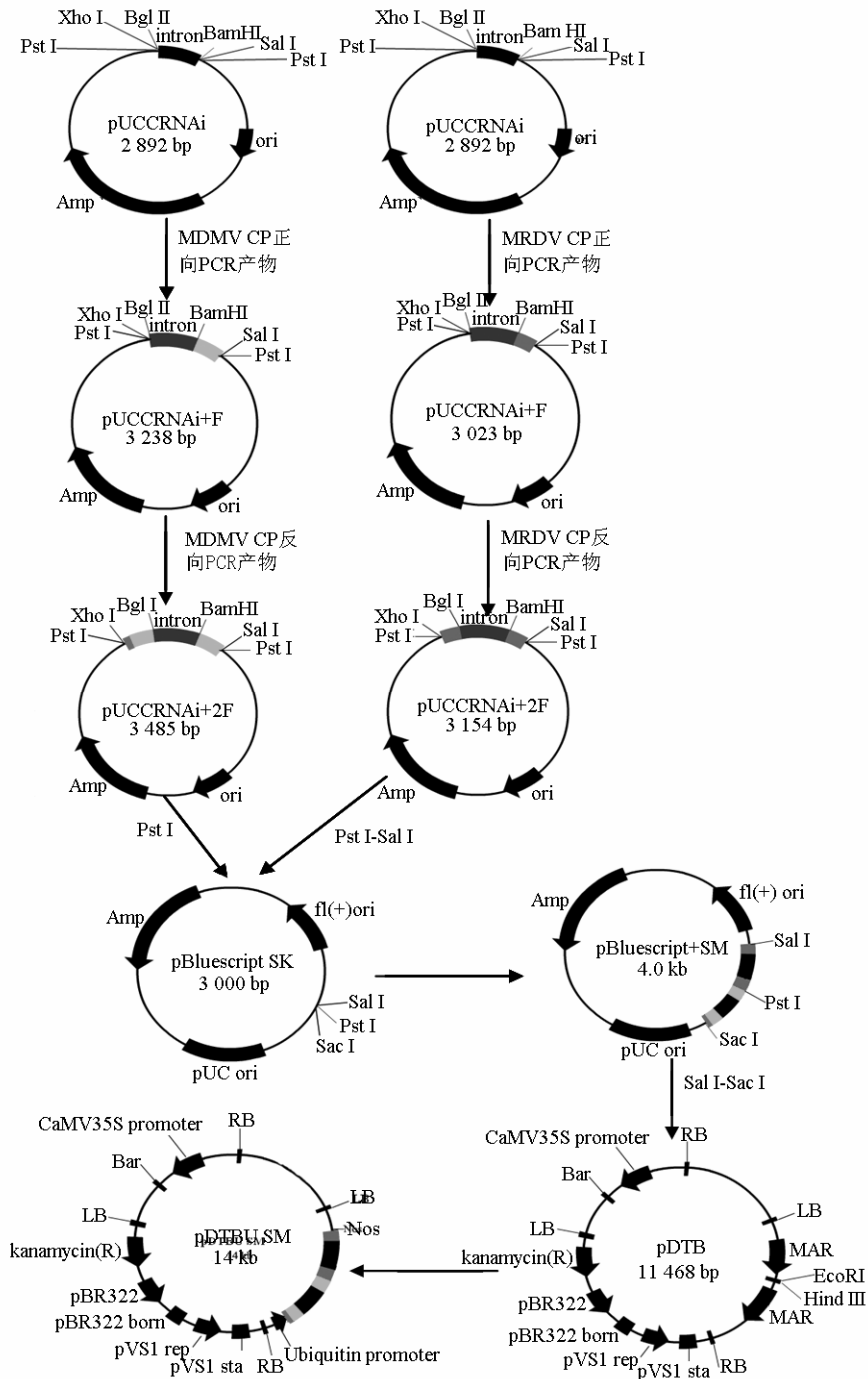


图 1 玉米兼抗 MDMV 及 MRDV 无选择标记 siRNA 复合表达载体的构建图谱
Figure 1 Construction of complex expressing vector pDTBUSM

2 结果与分析

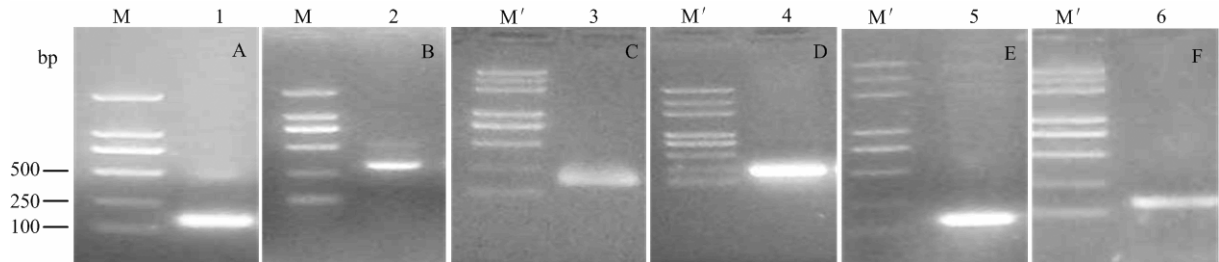
2.1 玉米矮花叶病毒 CP 基因上游片段 M1 反向重复载体 pUCCRNai+2F 的构建

2.1.1 玉米矮花叶病毒 CP 基因上游片段 M1 的

RT-PCR 扩增 提取感染玉米矮花叶病毒病的玉米叶片 RNA, 利用 Promega 反转录试剂盒进行反转录成 cDNA, 以此 cDNA 为模板, 分别扩增矮花叶病毒病 CP 基因上游片段的正向 (图 2 A) 和反向 (图 2 B) 产物。

2.1.2 玉米矮花叶病毒 CP 基因上游片段 M1 的反向重复载体 pUCCRNai+2F 构建 pUCCRNai 载体由 pUC18 改造而成的, 是以内含子为间隔序列, 两边是互为同尾酶的载体, 其中 *Bam*HI 与 *Bgl*III 是一对同尾酶, *Sal*I 与 *Xho*I 是一对同尾酶。将正向 PCR

产物插入到 *Bam*H I-*Sal* I 位点, 构建 pUCCRNai + F (图 3, A; 346 bp), 再将反向 PCR 产物插入到 pUCCRNai + F 的 *Bgl* II - *Xho* I 位点, 构建反向重复载体 pUCCRNai + 2F (正向 147 bp + 内含子 199 bp + 反向 247 bp = 593 bp) (图 3, A; 593 bp)。

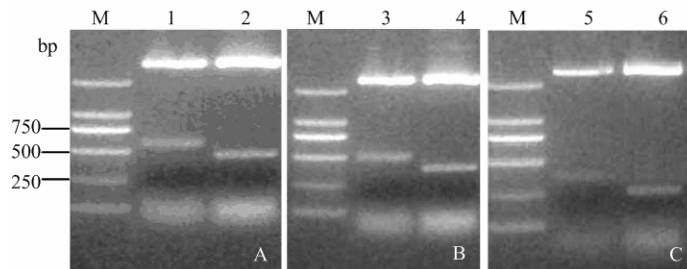


M: DNA 标准分子量 (DL2000); M': DNA 标准分子量 (DL2000 plus); 1-4: MDMV CP 基因的 PCR 产物 1: 上游正向 RT-PCR 产物; 2: 上游反向 RT-PCR 产物; 3: 下游正向 RT-PCR 产物; 4: 下游反向 RT-PCR 产物; 5-6: MRDV CP 基因的 RT-PCR 产物 5: 上游片段 RT-PCR 产物; 6: 下游片段 RT-PCR 产物

M: DNA marker (DL2000); M': DNA marker (DL2000 plus); 1-4: RT-PCR products of MDMV CP gene 1: upstream fragment in positive orientation; 2: upstream fragment in reverse orientation; 3: downstream fragment in positive orientation 4: downstream fragment in reverse orientation; 5-6: RT-PCR products of MRDV CP gene ;5: upstream fragments; 6: downstream fragment

图 2 目的片段 RT-PCR 产物

Figure 2 RT-PCR products of the target fragments



M: DNA 标准分子量 (DL2000); 1-2: MDMV CP 上游片段重组质粒的酶切验证; 3-4: MDMV CP 下游片段重组质粒的酶切验证; 5-6: MRDV CP 下游片段重组质粒的酶切验证; 1, 3, 5: pUCCRNai + 2F 质粒的 *Sal* I - *Pst* I 双酶切; 2, 4, 6: pUCCRNai + F 质粒的 *Sal* I - *Pst* I 双酶切

M: DNA marker (DL2000); 1-2: recombinant plasmid of MDMV CP upstream fragment; 3-4: recombinant plasmid of MDMV CP downstream fragment; 5-6: recombinant plasmid of MRDV CP downstream fragment; 1,3,5: pUCCRNai + 2F plasmids digested by *Sal* I - *Pst* I; 2,4,6: pUCCRNai + F plasmids digested by *Sal* I - *Pst* I

图 3 重组质粒 pUCCRNai + F 及 pUCCRNai + 2F 的 *Sal* I - *Pst* I 酶切电泳

Figure 3 Map of recombinant plasmids pUCCRNai + F and pUCCRNai + 2F digested by *Sal* I - *Pst* I

2.2 玉米矮花叶病毒 CP 基因下游片段 M2 反向重复载体 pUCCRNai+2F 的构建

2.2.1 玉米矮花叶病毒 CP 基因下游片段 M2 的 RT-PCR 扩增 同样根据 1.1 方法扩增得到 MDMVCP 基因下游片段 M2 的正向 (图 2, C; 140 bp) 和反向 (图 2, D; 187 bp) RT-PCR 产物。

2.2.2 玉米矮花叶病毒 CP 基因下游片段 M2 的反向重复载体 pUCCRNai+2F 构建 同理将正向 RT-PCR 产物插入到 *Bam*HI - *Sal* I 位点, 构建 pUCCRNai+F (图 3, B; 339 bp), 再将反向 PCR 产物插入到

pUCCRNai + F 的 *Bgl*III - *Xho*I 位点, 构建反向重复载体 pUCCRNai + 2F (正向 140 bp + 内含子 199 bp + 反向 187 bp = 526 bp) (图 3, B; 526 bp)。

2.3 玉米粗缩病毒 CP 基因上游片段 S1 及下游片段 S2 的反向重复载体 pUCCRNai+2F 的构建

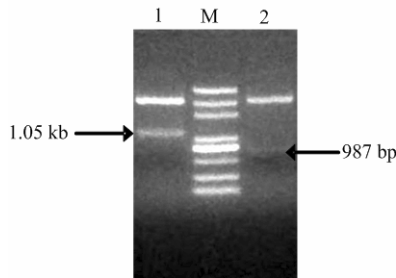
2.3.1 玉米粗缩病毒 CP 基因上游片段 S1 及下游片段 S2 的 RT-PCR 扩增 同样根据 1.1 方法扩增得到 MRDVCP 基因上游片段 S1 的 PCR 产物 (图 2, E; 129 bp) 和下游片段 S2 的 PCR 产物 (图 2, F; 131 bp)。

2.3.2 玉米粗缩病毒 CP 基因上游片段 S1 及下游片段

S2 的反向重复载体 pUCCRNAi+2F 构建 将下游 PCR 产物分别插入到 pUCCRNAi 的 *Bam*H I - *Sal* I 及 *Bg*III- *Xho*I 位点, 构建下游片段的反向重复载体 pUCCRNAi + 2 F (正向 129 bp + 内含子 199 bp + 反向 129 bp = 457 bp) (图 3, C); 同理将上游 PCR 产物分别插入到 pUCCRNAi 中构建 pUCCRNAi+2F (正向 131 bp + 内含子 199 bp + 反向 131 bp = 461 bp)。

2.4 中间载体 pBluescript+SM 的构建

为了获得兼抗矮花叶病毒及粗缩病毒的材料, 以 pBluescript SK 作为中间载体, 将 MRDVCP 基因的反向重复序列利用 *Pst* I-*Sal* I 插入到 pBluescript 中构建成 pBluescript+S, 再将 MDMVCP 基因的反向重复序列通过 *Pst* I 单酶切插入到 pBluescript+S 中, 构建 pBluescript+SM (593 bp+457 bp = 1.05 kb; 526 bp + 461 bp = 987 bp), 通过 *Sa*II - *Sac* I 酶切验证重组子 (图 4)。

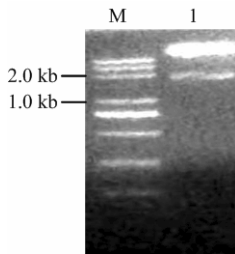


M: DNA 标准分子量 (DL2000 plus); 1: pBluescript + SM2 质粒的 *Sal* I-*Sac* I 双酶切; 2: pBluescript + SM1 质粒的 *Sal* I-*Sac* I 双酶切

M: DNA marker (DL2000 plus); 1: pBluescript + SM2 plasmids digested by *Sa*II-*Sac*I; 2: pBluescript + SM1 plasmids digested by *Sal* I-*Sac* I

图 4 pBluescript+SM1 和 pBluescript + SM2 的 *Sal* I - *Sac* I 双酶切

Figure 4 Map of recombinant plasmids pSK+ SM1 and pSK + SM2 digested by *Sa*II - *Sac* I



M: DNA 标准分子量 (DL2000 plus); 1: pDTBU 质粒的 *Hind* III - *Eco*R I 双酶切

M: DNA marker (DL2000 plus); 1: pDTBU plasmids digested by *Hind* III - *Eco*R I

图 5 pDTBU 质粒 *Hind* III-*Eco*R I 双酶切

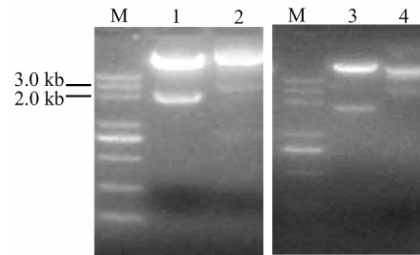
Figure 5 Map of Recombinant plasmids pDTBU digested by *Hind* III - *Eco*R I

2.5 无选择标记载体 pDTB 与 Ubiquitin 启动子及 Nos 终止子连接 (pDTBU)

无选择标记载体 pDTB 是一个含有双 T-DNA 的真核表达载体, 其中一个 T-DNA 区段含有除草剂抗性基因—*bar* 基因, 另一个 T-DNA 含有多克隆位点。将 Ubiquitin 启动子 (1.5kb) 及 Nos 终止子 (250 bp) 通过 *Hind* III - *Eco*R I 位点插入到 pDTB 中构建带有 Ubiquitin 启动子及 Nos 终止子的 pDTBU 表达载体 (图 5)。

2.6 无选择标记复合表达载体 pDTBUSM 的构建

将串联在一起的 2 个反向重复序列 pBluescript + SM1、pBluescript + SM2 通过 *Sac* I-*Sal* I 双酶切, 分别插入到 pDTBU 的 *Sac*I 位点, 分别构建 pDTBUSM1 和 pDTBUSM2, 利用 *Hind* III-*Eco*R I 双酶切验证重组质粒。由图 6 可以看出, 重组质粒 pDTBUSM1 能切出 1 条 2.7 kb 的条带 (1.8 kb + 0.9 kb ≈ 2.7 kb) (图 6, 左), 重组质粒 pDTBUSM2 能切出 1 条约 2.9 kb 的条带 (1.8 kb+1.05 kb ≈ 2.9 kb) (图 6, 右), 而 pDTBU 只能切出 1 条约 1.8 kb 的条带, 说明无选择标记复合表达载体 pDTBUSM 构建成功。



M: DNA 标准分子量 (DL2000 plus); 1: pDTBUSM1 质粒的 *Hind* III - *Eco*R I 双酶切; 4: pDTBUSM2 质粒的 *Hind* III - *Eco*R I 双酶切; 2, 3: pDTBU 质粒的 *Hind* III - *Eco*R I 双酶切

图 6 pDTBUSM1、pDTBUSM2 及 pDTBU 的 *Hind* III - *Eco*R I 双酶切

Figure 6 Map of Recombinant plasmids pDTBUSM1, pDTBUSM1 and pDTBU digested by *Hind* III - *Eco*R I

3 讨论

RNA 沉默是一种真核生物固有的、转录后水平起作用的同源依赖的基因沉默现象^[17-18]。目前 RNAi 作为一种高效的反向遗传学手段, 已广泛应用于多种动植物的功能基因组研究和代谢途径分析, 并且

在植物的抗病毒育种中也表现出了巨大的优势, 具有抗病性强、抗性持久、抗性植株频率高和生物安全性高, 遗传稳定等优点, 成为植物抗病毒基因工程的热点^[19]。利用 RNA 沉默的原理, 从病毒自身序列中扩增一段与其同源的基因片段, 利用 RNA 干扰技术进行玉米抗病毒病的改良, 为植物病毒防治提供新思路。

本研究利用 RT-PCR 分别扩增玉米矮花叶病毒 MDMV 及粗缩病毒 MRDV 外壳蛋白 CP 基因 140 bp 左右的特异性片段, 将来自不同病毒的干涉片段串联一起, 而且每个基因分别选择两个干涉片段, 可对这些片段或组合进行干涉效果的分析、优化, 以获得最有效的片段。本研究转化的 RNA 干涉片段小, 对受体其它农艺性状影响小, 遗传稳定性高, 便于获得对目的基因干涉而其它农艺性状优良的转基因植株。同时将 RNA 干扰技术与标记基因的分选技术结合起来, 构建的复合载体转入玉米后, 在后代的分离中获得无标记转基因植株的可能性大。所以, 无论是从安全性考虑, 还是从转基因技术本身考虑均具有重要意义。

参考文献:

- [1] 周伦理. 玉米矮花叶病研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(2): 396-401.
- [2] 王桂香, 庄克章, 李龙, 等. 玉米粗缩病和抗病育种研究进展[J]. 玉米科学, 2008, 16(3): 123-125.
- [3] 吕香玲, 张宝石. 玉米矮花叶病研究进展[J]. 作物杂志, 2007, 3: 27-31.
- [4] 蒋军喜, 李桂新, 周雪平. 玉米矮花叶病毒研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 77-81.
- [5] 李荣新. 玉米粗缩病周年生态防控技术研究与实践[J]. 现代农村科技, 2010, 9: 22-23.
- [6] 孟祥兵, 王秀芳. 基因沉默[J]. 生命的化学, 2001, 21(2): 111-114.
- [7] Goldbach R, Bucher E, Prins M. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview [J]. Virus Res, 2003, 92: 207-212.
- [8] Feng D J, Liu X, Song G S, et al. Virus-induced PVX coat protein gene silencing and methylation in transgenic tobaccos [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(1): 116-123.
- [9] 郭兴启, 李菡, 张杰道, 等. 表达马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因的转基因烟草抗病机制研究[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(4): 372-376.
- [10] 刘小红, 张红伟, 刘昕, 等. MDMV-CP 基因的克隆及其转基因玉米的研究[J]. 生物工程学报, 2005, 21(1): 144-148.
- [11] 雷海英, 雷海英, 孙毅, 等. 病毒复制酶基因介导玉米抗矮花叶病的研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(5): 114-117.
- [12] Gan D F, Zhang J, Jiang H B, et al. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection[J]. Plant Cell Reports, 2010, 29: 1261-1268.
- [13] 陈松彪, 李旭刚, 王锋, 等. 无选择标记转基因植物的培育[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(2): 1-7.
- [14] 辛翠花, 周庆昌, 屈冬玉, 等. 无选择标记植物表达载体构建[J]. 园艺学报, 2008, 35(5): 701-706.
- [15] Zhou H Y, Chen S B, Li X G, et al. Generating marker-free transgenic tobacco plants by *agrobacterium*-mediated transformation with double T-DNA binary vector [J]. Acta botanica sinica, 2003, 45(9): 1103-1108.
- [16] Baulcombe D. RNA silencing in plants [J]. Nature, 2004, 431: 356-363.
- [17] Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA [J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(2): 110-119.
- [18] 牛颜冰, 郭失迷, 宋艳波, 等. RNA 沉默—新型的植物病毒病害防治策略[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(2): 47-50.
- [19] Zhai Z Y, Sooksa-nguan T, Vatamaniuk OK. Establishing RNA interference as a reverse-genetic approach for gene functional analysis in protoplasts [J]. Plant Physiology, 2009, 149: 642-652.