

丁锦平. 棉花病毒诱导基因沉默体系构建[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 38-40.

棉花病毒诱导基因沉默体系构建

丁锦平

(商丘师范学院生命科学院/商丘师范学院植物与微生物互作重点实验室, 河南商丘 476000)

摘要:探索了病毒诱导基因沉默载体在棉花上的应用,由烟草脆裂病毒(TRV)改造的 pTV00 载体,构建了棉花标记 *PDS* 基因病毒诱导基因沉默的载体,成功建立了棉花病毒诱导基因沉默体系。

关键词:棉花;基因沉默;病毒载体;TRV;*PDS*

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0038-03

病毒诱导基因沉默(VIGS)技术是指携带一段目标基因表达序列的重组病毒侵染植物,引起植物内同源基因沉默而发生表型变异,通过表型变异进行基因功能分析的方法^[1-2]。该技术具有快速、高通量分析植物基因功能的优点。

PDS 即八氢番茄红素脱氢酶,是类胡萝卜素合成所必需的酶,具有保护叶绿素免受光漂白的作用,而 *PDS* 基因发生沉默,植物就会表现出光漂白症状。*PDS* 表型变异易于辨别,因此 *PDS* 基因成为 VIGS 体系评价的参照基因。最早 *PDS* 基因构建的 VIGS 载体是由烟草花叶病毒(TMV)发展的, Kumagai 等成功构建了 TMV-*PDS* 沉默载体,侵染本氏烟后诱导了 *PDS* 基因的沉默^[3]。并由烟草脆裂病毒(TRV)发展的载体^[4],诱导基因沉默的效率、持久性都比较好,并且只引起温和的病症,而且能侵染分生组织和花。随后病毒载体快速发

展,研究者根据病原-寄主植物相互作用的依赖性等特点,已经在一些植物和病毒之间成功构建了 VIGS 病毒载体, Turnage 等利用大白菜曲叶病毒(CBLCV)在模式植物拟南芥上建立了 VIGS 体系^[5]; Holzberg 等利用大麦条纹花叶病毒(BSMV)首次在单子叶植物大麦上成功抑制了 *PDS* 基因的表达^[6]; John 等首次报道利用棉花皱叶病毒(cotton leaf crumple virus, CLCrV)改造成 VIGS 病毒载体^[7]。目前 VIGS 技术已广泛用于植物功能基因的研究^[7]。

利用 *PDS* 作为标记基因,进行棉花病毒载体诱导基因沉默(VIGS)体系的构建,建立了以烟草脆裂病毒(TRV)为基础改造的 pTV00 载体的棉花 *PDS* 基因的沉默体系,为棉花基因功能验证打下基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

棉花材料:中棉所 41、中棉所 24。载体:该 pTV00、pBINTRA6(TRV 病毒改造)载体由 University of Cambridge 的 David Baulcombe 惠赠。

收稿日期:2013-01-01

基金项目:河南省科技攻关(编号:122102110213);河南省软科学研究(编号:122400410015)。

作者简介:丁锦平(1976—),女,河南长垣人,博士,讲师,研究方向为棉花种质创新及分子生物学。E-mail:jinpinding@163.com。

[3] Jeffries C J. Technical guidelines for the safe movement of germplasm: Potato[M]. Rome: Food Agricultural Organization and International Plant Genetics Institute, 1998: 67.

[4] 季 良. 植物病毒病防治与检疫[M]. 北京:中国农业出版社, 2009: 287-289.

[5] Oruetebarria I, Kekarainen T, Spetz C, et al. Molecular characterization of potato virus V genomes from Europe indicates limited spatio-temporal strain differentiation[J]. Phytopathology, 2000, 90(4): 437-444.

[6] Carl S. Molecular studies on a complex of Potyviruses infecting Solanaceous crops, and some specific virus-host interactions[D]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences Doctoral thesis, 2003.

[7] 刘 梅, 黄 新, 马占鸿, 等. 应用 DPO 引物检测马铃薯病毒的多重 RT-PCR 技术研究[J]. 植物病理学报, 2009, 39(4): 431-434.

[8] Chen H Y, Zhao W J, Gu Q S, et al. Real time TaqMan RT-PCR assay for the detection of cucumber green mottle mosaic virus[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 149(2): 326-329.

[9] 高雅红, 王进忠, 李明福, 等. 李痘病毒实时荧光定量 RT-PCR

检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(1): 77-80.

[10] 崔学慧, 陈舜胜, 于 翠, 等. 实时荧光 RT-PCR 方法检测香石竹环斑病毒[J]. 植物病理学报, 2012, 42(4): 381-386.

[11] 闻伟刚, 张建成, 崔俊霞, 等. 玉米褪绿斑驳病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法研究[J]. 植物检疫, 2011, 25(1): 39-42.

[12] 郭立新, 段维军, 张祥林, 等. 啤酒花潜隐类病毒的实时荧光 RT-PCR 检测[J]. 植物病理学报, 2012, 42(5): 466-473.

[13] 廖 芳, 郭京泽, 刘 鹏, 等. RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 一步法检测大豆中菜豆荚斑病毒[J]. 植物保护学报, 2009, 36(2): 141-145.

[14] 闻伟刚, 谭 钟, 张吉红, 等. 检测小麦线条花叶病毒的 TaqMan MGB 探针技术[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(2): 351-355.

[15] 郭立新, 向本春, 朱水芳. 苹果茎沟病毒实时荧光 RT-PCR 反应体系的优化[J]. 北方园艺, 2009(3): 8-11.

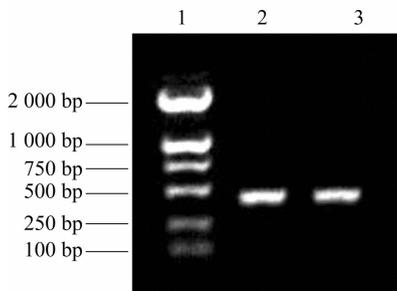
[16] 郭京泽, 李兴红, 廖 芳, 等. 实时荧光 RT-PCR 检测辣椒轻斑病毒的研究[J]. 植物保护, 2008, 34(2): 117-120.

[17] Olmos A, Bertolini E, Gil M, et al. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids[J]. Journal of Virological Methods, 2005, 128(1/2): 151-155.

1.2 方法

1.2.1 棉花 *PDS* (八氢番茄红素脱氢酶) 基因片段扩增 以棉花幼嫩叶片为材料,参考宝生物第一链合成反转录试剂盒方法,合成第一链。*PDS* 基因片段扩增引物根据棉花 *PDS* 基因序列 (GenBank 登录号 EU541446) 设计^[7]: P_1 : 5' - CGCG-GATTCTG AAGACTGGAGAGAGATT - 3' (加 *Bam*H I 酶切位点), P_2 : 5' - CGGGGTACCTTTA CTCTGATCCGCAGATA - 3' (加 *Kpn* I 酶切位点), 扩增棉花 *PDS* 基因。PCR 反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 然后 72 °C 延伸 10 min。

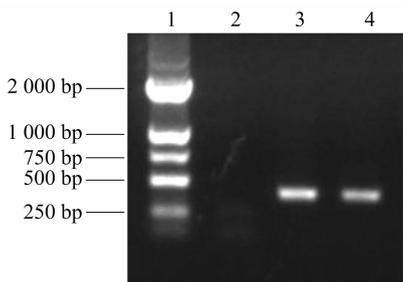
1% 琼脂糖电泳检测表明, 在两个棉花品种中棉 41、中棉 24 均得到有 400 bp 大小 PCR 产物 (图 1), 该片段与预测 *PDS* 扩增基因片段大小一致。



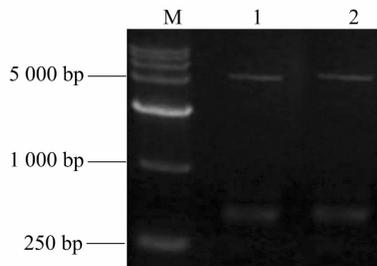
1—DL2000; 2—中棉所24 PCR扩增产物;
3—中棉所41 PCR扩增产物
图1 PCR扩增*PDS*基因片段

1.2.2 *PDS* 基因片段回收及酶切连接 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒对扩增 *PDS* 片段进行回收, 回收片段和 pTV00 载体质粒经 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切后进行连接。酶切体系 1 × L buffer, *Kpn* I 1.5 U, pTV00 载体质粒或 PCR 回收产物 15 μL, ddH₂O 补足 40 μL, 反应条件 37 °C 下 4 ~ 5 h; 上述反应液中加入 1 × K buffer, *Bam*H I 酶 2 U, ddH₂O 补足 60 μL, 然后进行第二次酶切, 30 °C 下 3 h, 65 °C 10 ~ 15 min; 连接反应体系, T₄ DNA 连接酶 1 μL, 1 × T₄ ligase buffer, 酶切后的 pTV00 质粒载体和 PCR 产物分别 2 μL 和 6 μL, 连接反应条件 16 °C 下反应 16 h。

1.2.3 转化 DH5α 大肠杆菌 利用 CaCl₂ 将连接产物进行大肠杆菌的转化, 挑选单克隆提取质粒并进行 PCR 检测和双酶切检测, 结果显示: pTV00 - *PDS* 质粒模板在 400 bp 处扩增出目的条带, 而空质粒为模板则没有扩增出目的条带 (图 2)。对重组质粒双酶切, 得到大小约 400 bp 目的条带 (图 3), pTV00 - *PDS* 基因沉默载体构建成功。



1—DL2000; 2—PTV00空质粒的PCR产物;
3~4—PTV00-*PDS*重组质粒的PCR产物
图2 棉花PTV00-*PDS*基因沉默载体PCR扩增鉴定



M—DL15000; 1~2—酶切pTV00-*PDS*重组质粒
图3 双酶切鉴定基因沉默载体pTV00-*PDS*

1.2.4 转化 GV3101 农杆菌 CaCl₂ 转化法转化农杆菌, 挑取阳性 pTV00 - *PDS* - GV3101 克隆用于侵染棉花。

1.2.5 农杆菌共介导侵染棉花 棉花种子萌发后种植在培养钵中, 每周浇施 2 次 Hoagland 营养液, 光暗周期 16 h - 8 h, 温度 25 ~ 23 °C。以长出 1 ~ 2 片真叶时的棉花为试验材料, 验证棉花病毒沉默载体沉默效果。

TRV 为二元 RNA 病毒, 因此需要二元病毒载体共侵染棉花, 载体 PBINTRA6 - GV3101 已构建好。分别挑取 pBINTRA6 - GV3101、pTV00 - *PDS* - GV3101 单克隆至 5 mL LB (Kana Rif Tet) 培养基中, 200 r/min 28 °C, 摇菌 2 ~ 3 d, 然后 1 : 50 的比例扩大培养, 分别取 1 mL 上述菌液再分别加至含终浓度为 10 mmol/L 的 MES 和 20 μmol/L 的乙酰丁香酮 50 mL LB (Kana Rif Tet) 培养基中, 摇菌过夜至 $D_{600\text{nm}}$ 为 1.0 ~ 1.2。离心收集菌体沉淀 (3 000 r/min, 20 min), 沉淀重悬于液体 MS 中 (10 mmol/L 的 MES、100 μmol/L 的乙酰丁香酮及 10 mmol/L 的 MgCl₂), 调整菌液的 D 值, 待 2 种菌液的 D 值均为 1.0 ~ 1.5, 使 pBINTRA6 - GV3101 的 D 值略高于 pTV00 - *PDS* 的 D 值, 将 2 种菌液等量混合, 100 r/min 25 °C, 摇菌 2 h。用注射器按压 4 周龄棉花叶子的背面进行侵染。

在植物培养室中进行接种棉花的培养, 温度为 18 ~ 23 °C, 光周期为 16 h - 8 h, 每周浇施 2 ~ 3 次 Hoagland 营养液。

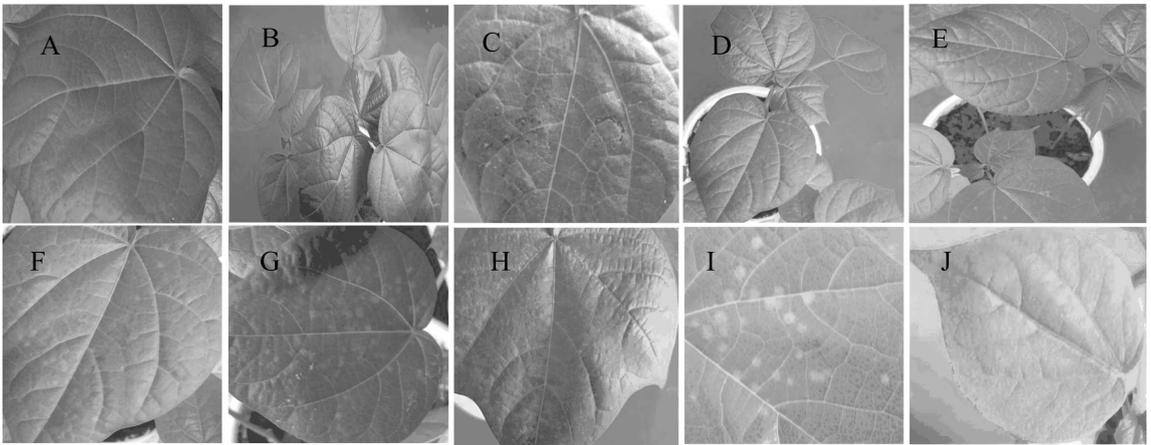
2 结果与分析

2.1 接菌后棉花表型变化

接种 10 d 后侵染棉花表型变化, 对照表型没有漂白的症状 (图 4 - A、图 4 - B), 而 pTV00 - *PDS* 病毒载体侵染棉花叶片开始出现漂白现象 (VIGS 症状, 图 4 - D、图 4 - E、图 4 - F), 3 ~ 4 周后漂白症状逐渐加重得到进一步发展 (图 4 - G、图 4 - H、图 4 - I、图 4 - J), 表明 TRV 病毒载体可以对棉花的内源基因进行基因沉默。

2.2 PCR 和 RT-PCR 鉴定

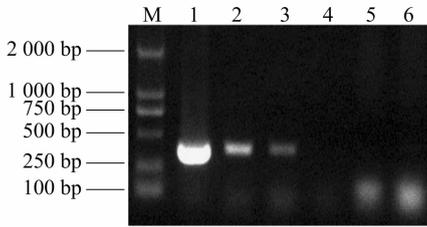
提取接菌后 2 周棉花叶片 DNA, 应用根据 TRV 病毒鞘蛋白序列设计特异引物 pTV00F: 5' - GCTGCTAGTTCATCTG-CAC - 3', pTV00R: 5' - GCACGGATCTACTTAAAGAAC - 3' PCR 扩增, 检测病毒载体侵染棉花状态, PCR 结果可以看出: 应用病毒特异引物在接菌的棉花和接菌的番茄叶片 DNA 中, 分别扩增出了病毒特异片段, 该片段大小和空病毒载体扩增出的片段大小一致, 没有接菌的棉花和番茄叶片 DNA 中都没有条带, 说明该病毒载体已经成功侵染棉花, 并在棉花组织中复制传播 (图 5)。



A、B.阴性对照；C.侵染痕迹；D、E、F.侵染10 d后的表型；G、H、I、J.侵染3~4周的表型

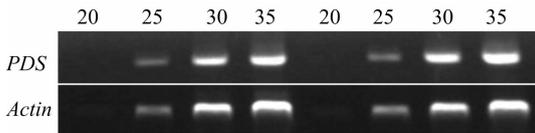
图4 PTV00-PDS-GV3101侵染棉花表型变化

提取接菌后3周棉花叶片RNA,将提取RNA采用核酸蛋白检测仪定量,稀释成相同的浓度,参考宝生物第一连合成反转录试剂盒方法,合成第一连,应用PDS扩增引物做RT-PCR, *Actin* 作为内参对照,结果显示,沉默植株和对照植株PDS基因表达量没有明显的变化(图6)。



M—DL2000;1—PCR产物以PTV00空载为模板;2—PCR产物以pTV00载体侵染过的番茄DNA为模板;3—PCR产物以pTV00-PDS载体侵染棉花DNA为模板;4—6—PCR产物未侵染的番茄、棉花DNA及水对照的PCR产物

图5 PTV00病毒载体侵染棉花后PCR检测



20、25、30、35分别代表PCR循环数; *Actin*内参对照,对照棉花植株(左);沉默棉花植株(右)

图6 棉花PDS基因沉默RT-PCR结果

3 讨论

研究结果表明,烟草脆裂病毒(TRV)在实验室内可以侵染棉花。由烟草脆裂病毒(TRV)构建了棉花pTV00-PDS-VIGS病毒载体,该载体成功诱导棉花PDS基因沉默,造成棉花叶片上出现了漂白现象,为利用VIGS验证棉花基因功能奠定了基础,但沉默的效果并没有达到整个叶片,使PDS基因的RT-PCR的分析也没有表现出明显的表达量降低。目前尚没有烟草脆裂病毒侵染棉花的报道,因此该病毒侵染棉

花的条件还不成熟。不同植物对病毒侵染的敏感期不同,在植物体内传播的条件也不同,棉花病毒诱导基因沉默国内报道较少,还需进一步优化培养条件使病毒载体能够更快更大范围内沉默目标基因。

影响病毒沉默的条件很多,如温度、湿度、光照、接菌条件、接菌苗龄^[8]。因此,可以从影响病毒的侵染因素和病毒在植物体内传播的因素两方面完善病毒沉默体系,建立高效棉花基因功能验证体系。

参考文献:

- [1] 陶小荣,周雪平,崔晓峰,等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物基因功能研究中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展,2004,31(9):777-783.
- [2] Burch-Smith T M, Anderson J C, Martin G B, et al. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants[J]. The Plant Journal,2004,39(5):734-746.
- [3] Kumagai M H, Donson J, Della-Cioppa G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1995,92(5):1679-1683.
- [4] Ratcliff F, Martin-Hernandez A M, Baulcombe D C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing[J]. The Plant Journal,2001,25(2):237-245.
- [5] Turnage M A, Muangsan N, Peele C G, et al. Geminivirus-based vectors for gene silencing in Arabidopsis[J]. The Plant Journal,2002,30(1):107-114.
- [6] Holzberg S, Brosio P, Gross C, et al. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant[J]. The Plant Journal,2002,30(3):315-327.
- [7] John R T, Idris A M, Judith K B, et al. Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton[J]. Plant Physiology,2008,148:41-50.
- [8] 张增艳,姚乌兰,辛志勇. 植物基因功能鉴定新工具——病毒诱导基因沉默技术的研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2006,7(1):100-105.