

# 白菜病毒诱导基因沉默技术体系的建立

杨学东, 戴 薇, 张昌伟, 王金彦, 孔 敏, 侯喜林\*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 南京 210095)

**摘 要:** 以白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 品种 ‘苏州青’ 为材料, 利用芜菁黄花叶病毒 (*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV) 质粒 pTY 成功抑制了白菜叶片八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS) 基因的表达, 验证了病毒载体 pTY 在白菜上诱导基因沉默的能力, 建立了白菜病毒诱导基因沉默 VIGS 体系。为了进一步验证病毒载体 pTY 在白菜上诱导基因沉默的能力, 以 *BcNRT1* 为靶基因, 构建 pTY-*BcNRT1* 质粒侵染白菜后, 显著抑制了 *BcNRT1* 在转录水平的表达。

**关键词:** 白菜; 芜菁黄花叶病毒; 病毒诱导基因沉默

**中图分类号:** S 634.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 11-2168-07

## The Technology System Establishment of VIGS in Non-heading Chinese Cabbage

YANG Xue-dong, DAI Wei, ZHANG Chang-wei, WANG Jin-yan, KONG Min, and HOU Xi-lin\*

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University; Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (East China), Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In this study, a viral vector derived from *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) was used to induce virus-induced gene silencing (VIGS) of phytoene desaturase gene (*PDS*) in non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino.) cultivar ‘Suzhouqing’ and the result showed that the expression of *PDS* was successfully repressed. The ability of inducing silence was confirmed and the VIGS system was established. To further confirm the VIGS effect on non-heading Chinese cabbage, *BcNRT1* was selected as the target gene, and the expression of *BcNRT1* was successfully inhibited after inoculated.

**Key words:** non-heading Chinese cabbage; *Turnip yellow mosaic virus*; virus-induced gene silencing

病毒诱导基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 是携带植物目的基因片段的病毒侵染植物后诱导植物体内靶基因的沉默效应, 它是一种转录后基因沉默现象 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) (Ratcliff et al., 1997; van Kammen, 1997; 王宏芝 等, 2005; 杨迎伍 等, 2007)。PTGS 是经过植物长期进化的对应病毒入侵自身的防御机制。研究表明, dsRNA 对于基因沉默至关重要, 正义 RNA 介导共抑制, 反义 RNA 介导基因抑制都与 VIGS 有相似特征 (Waterhouse et al.,

收稿日期: 2012-06-25; 修回日期: 2012-10-23

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2009311); 现代农业产业技术体系建设项目 (国家大宗蔬菜产业技术体系 CARS-25-A-12)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hxl@njau.edu.cn)

1998; Smith et al., 2000; 姚丹青 等, 2009)。VIGS 最先用来描述植物防御病毒感染的现象, 最后应用于重组病毒敲除植物内源基因的表达 (Ruiz et al., 1998; 姚丹青 等, 2009)。最早用来研究 VIGS 的植物是本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*)。本氏烟草对于病毒侵染非常敏感, 而且所产生的 VIGS 性状稳定有效 (姚丹青 等, 2009)。关于 VIGS 的研究主要利用重组烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)、马铃薯病毒 X (*Potato virus X*, PVX)、番茄金色花叶病毒 (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV)、苹果潜隐病毒 (*Apple latent spherical virus*, ALSV)、甘蓝缩叶病毒 (*Cabbage leaf curl virus*, CbLCV) 和烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) (Kumagai et al., 1995; Ruiz et al., 1998; Ratcliff et al., 2001; Liu et al., 2002a, 2002b; Burch-Smith et al., 2004)。病毒类型不同, 其寄主范围不同, 沉默效果和部位也不一样。烟草脆裂病毒可以有效引起侵染植株整体产生系统沉默。芜菁黄化花叶病毒 (*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV) 是一种高等植物病毒, 具有正义 RNA 链, 可以侵染许多十字花科植物 (Martinez-Herrera et al., 1994)。关于 TYMV 病毒组分及病毒移动、复制等相关功能已经被详细研究 (Weiland & Dreher, 1989; Bozarth et al., 1992; Chen et al., 2004; Jakubiec et al., 2007)。

PDS 是类胡萝卜素合成途径中的一个关键酶, 最早用来作为指示标记研究 TMV 在烟草上的基因沉默效应。类胡萝卜素在植物中具有光保护作用, 当包含 PDS 基因片段的重组 TMV 病毒侵染植物后, 由于 PDS 的 mRNA 表达受到抑制, 侵染发病的烟草叶片会变成白色 (陶小荣 等, 2004)。BcNRT1 基因编码硝酸盐转运蛋白, 在白菜根部和生长点均有表达, 参与硝酸盐的吸收过程。本研究利用来源于 TYMV 的质粒 pTY 侵染白菜获得成功, 叶片出现发病症状; 克隆了白菜 PDS 作为指示基因, 侵染 3 周后, 叶片明显褪绿; 选取 BcNRT1 片段, 构建 pTY-BcNRT1 载体并侵染白菜, 结果表明白菜 BcNRT1 的表达显著降低。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白菜品种‘苏州青’由南京农业大学白菜课题组提供。芜菁黄化花叶病毒质粒 pTY 由 Antoine Bouteilly (Centre National de la Recherche Scientifique) 馈赠。

### 1.2 基因克隆与 TYMV 病毒载体 pTY 的构建

根据 NCBI 数据库中同源基因设计引物 BcPDSF: 5'-ATGGTTGTGTTTGGGAATGT-3' 和 BcPDSR: 5'-TCATGTTGATACAGTTGTCTC-3', 从白菜叶片 cDNA 中克隆获得白菜 BcPDS 基因开放阅读框。从 NCBI 数据库中获得白菜 BcNRT1 序列, 基因登录号为 JF439305。PCR 反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。从 BcPDS 和 BcNRT1 序列中分别选取合适的 40 bp 序列: BcPDS, 5'-TTGAGGAACAACGAGATGCTGACATGGCCAGAGAAATAA-3'; BcNRT1, 5'-GTGAAGGCAAGCGTCTCCGGTTTTGGGTCAGACCAATTCG-3'。在 TakaRa 公司分别合成反向互补序列 80 bp。合成的 DNA 片段经过磷酸化处理。用 SnaBI 限制性内切酶酶切载体 pTY, 回收纯化并且去磷酸化。磷酸化的 DNA 片段和去磷酸化的 pTY 载体按照摩尔比 3:1 用 T4 连接酶连接, 转化大肠杆菌, 氨苄平板筛选, 挑取单克隆, PCR 检测并测序。选取病毒 CP 基因片段设计特异引物 (CPF: 5'-TCCACCCTCACACCTTC-3' 和 CPR: 5'-GGGACAGACCTCGCTAACT-3') 进行 PCR 来检测侵染植株是否成功。

### 1.3 病毒侵染

大量提取重组病毒质粒,用超纯水溶解,使得浓度达到  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。白菜品种‘苏州青’露白后在白天  $22^\circ\text{C}$ , 16 h, 黑夜  $18^\circ\text{C}$ , 8 h 的环境条件下培养至 2 片真叶。用注射器吸取质粒溶液 1 mL, 避开叶脉, 向真叶背面注射, 可以看到质粒溶液向四周扩散。侵染前浇水, 以确保质粒溶液容易渗入叶片。一周后再侵染一次。两周过后观察发病症状。

### 1.4 实时定量 PCR 反应

提取白菜叶片 RNA 采用天根 RNA simple Total RNA Kit。以白菜总 RNA 为模板合成 cDNA, 采用 PrimeScript RT reagent Kit (TakaRa)。用白菜 *Actin* 作为参考基因, 根据基因序列设计实时定量引物, *BcPDS* (*BcPDS*F1: 5'-AAGACAAGAACAAGGCGAAGG-3'和 *BcPDS*R1: 5'-ACGAGGAGCAC TACGGAAAGA-3'), *Actin* (*Actin*-F: 5'-GTTGCTATCCAGGCTGTTCT-3'和 *Actin*-R: 5'-AGCGTGA GGAAGAGCATAAC-3')和 *BcNRTI* (*BcNRTI*F: 5'-AACACAAACCCTTCTCGATGCT-3'和 *BcNRTI*R: 5'-GCTCCACCGCCTCAATACA-3')。实时定量 PCR 使用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。相对定量使用参照基因的  $\Delta C_T$  法, 诱导率等于  $2^{-\Delta C_T}$ ,  $\Delta C_T = C_{T \text{ 目标基因}} - C_{T \text{ Actin}}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 白菜 *PDS* 开放阅读框的获得及分析

以白菜叶片 cDNA 为模板扩增获得白菜 *PDS* 的开放阅读框 cDNA 序列 1 692 bp, 命名为 *BcPDS*, 登录号为 JQ846499。氨基酸序列在 NCBI 数据库比对, 与拟南芥、甘蓝型油菜、水稻、玉米、烟草等 *PDS* 氨基酸序列有较高同源性。用白菜 *BcPDS* 编码的氨基酸序列和拟南芥、烟草、番茄、甘蓝型油菜、水稻、玉米和大麦的 *PDS* 编码的氨基酸序列做进化树 (图 1)。结果表明, 高等植物的 *PDS* 蛋白可以分成 2 支, 单子叶植物和双子叶植物。系统进化树分析表明, 白菜 *BcPDS* 与拟南芥和甘蓝型油菜的 *PDS* 具有较近的亲缘关系, 可以作为病毒侵染指示基因。

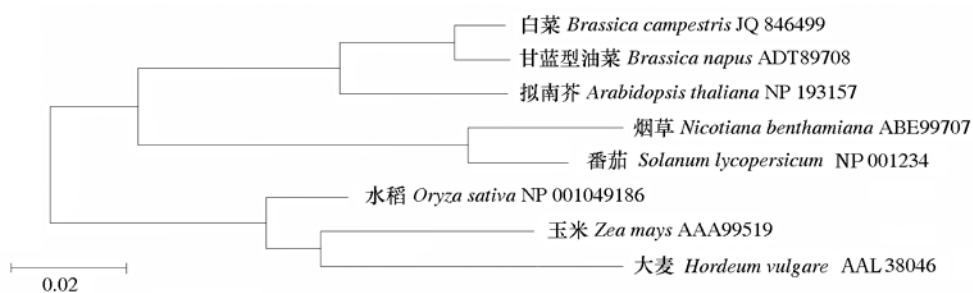


图 1 部分物种 *PDS* 的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the *PDS* gene family from several plant species

### 2.2 病毒质粒 pTY 对白菜的侵染效果

为了证实 TYMV 病毒质粒是否能够侵染白菜品种‘苏州青’,用病毒空质粒 pTY 对其进行接种, 20 d 后观察芜菁黄化花叶病毒发病症状。结果表明, 接种病毒植株叶片与对照相比明显褪绿, 症状明显, 为典型芜菁黄化花叶病毒发病症状 (图 2)。用 *CP* 特异引物 CPF/R 检测发现, 发病植株有目的条带, 对照没有 (图 3)。



图 2 白菜在病毒质粒 pTY 侵染后的发病症状

对照：用水侵染；pTY：用病毒质粒侵染。

Fig. 2 Symptoms of non-heading Chinese cabbage inoculated with pTY

Control: Plant inoculated with water;

pTY: Plant inoculated with plasmid.

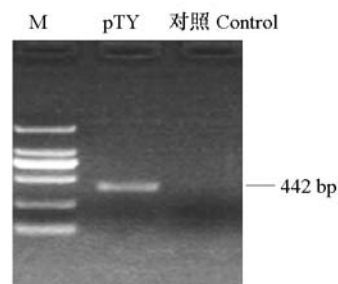


图 3 侵染 pTY 植株的 PCR 检测

M: DL2000 marker; pTY: 用质粒 pTY 侵染;

对照：用水侵染。

Fig. 3 PCR determination of inoculated plant with plasmid pTY

M: DL2000 marker; pTY: Plant inoculated with pTY;

Control: Plant inoculated with water.

### 2.3 pTY-BcPDS 重组质粒侵染白菜后引发 *BcPDS* 沉默

为了验证该病毒质粒是否可以引起白菜 VIGS 沉默效应，克隆了 *BcPDS*，并选取其中 40 bp 作为靶基因序列，构建载体 pTY-BcPDS。大量提取 pTY-PDS 质粒，侵染白菜叶片，观察接种效果。结果表明，接种植株新叶出现白色斑点，之后叶片漂白越来越明显，逐渐扩散到整个叶片（图 4）。

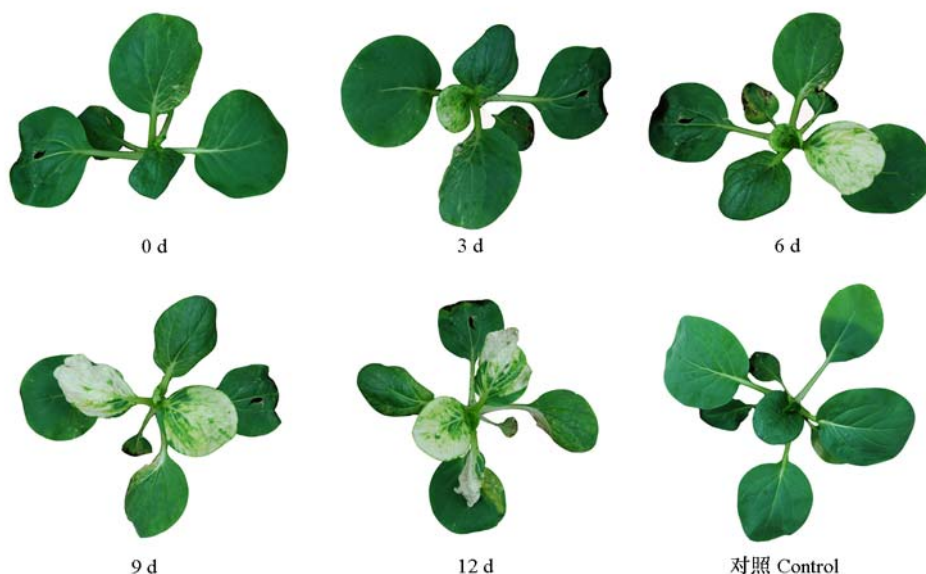


图 4 用质粒 pTY-PDS 侵染植株一定时间后发病症状观察

0 d: 发病症状出现, 3 d: 发病症状出现 3 d, 以此类推。白色部位: 由于 *PDS* 基因被沉默引起。对照: 用水侵染。

Fig. 4 The symptoms observation after plants inoculated with pTY-PDS for different days

0 d: Symptoms first appeared, 3 d: Three days after the symptoms first appeared, and so on.

White areas: Caused by photographing resulting from the silencing of the *PDS* gene.

Control: Plants inoculated with water.

提取叶片总 RNA，反转录获得 cDNA，用特异引物 CPS/R 扩增目的条带，结果表明出现光漂白症状的白菜均有 522 bp 目的条带（图 5）。为了在转录水平证实 *BcPDS* 基因的沉默效果，用引物

