

# 百合无症病毒 CP 基因的克隆及其 RNA i 载体的构建

徐品三<sup>1\*</sup>, 尹雅蕾<sup>1</sup>, 李玉花<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 大连理工大学环境与生命学院, 辽宁大连 116024; <sup>2</sup> 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

**摘要:** 以感染百合无症病毒 (LSV) 的百合叶片总 RNA 为模板, 利用反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增出了 876 bp 的 LSV CP 基因, 经 Blast 比对发现该片段与 GenBank 上发表的 LSV CP 基因序列高度同源, 同源率 98%, 由该序列推导出的氨基酸序列相似性达到 98%。应用 Gateway 技术将扩增的片段通过 BP 反应连接到入门载体 pDONR201, 并进行序列测定, 再通过 LR 反应将目的片段插入到 RNA i 植物表达载体 pH7GW WG2 ( ), 成功构建了适合农杆菌介导的百合转化的 RNA i 载体。

**关键词:** 百合; 无症病毒; CP 基因; 克隆载体; RNA 干扰; Gateway 技术

**中图分类号:** S 682.2; Q 785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 06-0885-06

## Cloning of Lily symptom less virus CP Gene and Construction of Its RNA i Vector

XU Pin-san<sup>1\*</sup>, YIN Ya-lei<sup>1</sup>, and LI Yu-hua<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China; <sup>2</sup> College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** A fragment of 876 bp of *Lily symptom less virus* (LSV) CP gene cDNA sequence was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from the total RNA infected lily leaves. The Blast result showed that the sequence presented a very high match with the LSV CP genes in the GenBank and its homology was 98%. The amino acid sequence was 98% homologous. Using Gateway technology, an entry clone vector (pDONR201) was constructed through the way of BP cloning and a RNA interference (RNA i) transformation vector (pH7GW WG2) was constructed through the way of LR cloning. The RNA i vector was obtained and could be transformed into lily by *Agrobacterium tumefaciens*.

**Key words:** lily; *Lily symptom less virus*; CP gene; cloning vector; RNA interference; Gateway technology

百合无症病毒 (*Lily symptom less virus*, LSV) 属于香石竹潜隐病毒属 (*Carlavirus*), 是严重影响百合生产的主要病毒之一 (Memelink, 1990; 明艳林 等, 2005)。随着百合产业的发展, 该病毒病的发生日益严重, 给百合种植业造成极大的经济损失 (Asjes, 2000)。

目前国内外百合脱毒一般采用茎尖培养、热处理以及抗病毒药剂处理等 (Nyland, 1969; 赵祥云 等, 1993; Xu & Niimi, 1999), 但这些方法治标不治本, 脱毒种球在栽培过程中很容易再感染, 难以从根本上根治病毒 (徐品三 等, 2003)。

在转基因抗病育种方面, 将病毒外壳蛋白和复制酶基因导入植物可在一定程度上增强对病毒的抗性, Pham (1998) 将 LSV 外壳蛋白基因转入龙牙百合 ‘白雪皇后’ (Snow Queen) 的愈伤组织, 诱

收稿日期: 2009 - 01 - 19; 修回日期: 2009 - 05 - 11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771760)

\* E-mail: xupinsan@sina.com

导分化得到 LSV 抗性植株。

RNA 干扰 (RNAi) 介导的病毒抗性是近年发展起来的一种新的抗病毒基因工程策略, 具有抗病性强, 抗性持久, 生物安全性高等优点 (van den Boogaart et al, 2001), 通过双链 RNA 介导诱发的高效特异性降解同源 mRNA 的现象 (Bass, 2000; Sharp, 2001)。利用 RNAi 技术创制抗病转基因植物已取得了很好的效果 (Waterhouse et al, 1998; Wang et al, 2000; Zhu et al, 2004), 但仍未有利用 RNAi 技术创制抗 LSV 百合转基因植物的报道。

作者通过克隆百合无症病毒外壳蛋白基因, 应用 Gateway 技术构建了用于农杆菌转化的 CP 基因 RNAi 植物表达载体, 旨在通过 RNAi 方法将病毒外壳蛋白基因反向重复序列导入百合, 使其转录产生 RNA 的双链发卡环结构, 产生对侵入病毒的抗性, 为抗 LSV 百合转基因品种的培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

感染 LSV 的卷丹百合病叶 2007 年取自大连。大肠杆菌 DH5 为大连理工大学植物基因工程实验室保存。

克隆载体 pMD19-T vector 购于大连 TaKaRa 公司。采用 Gateway 技术构建的商业化目的载体 pH7GW WG2 ( ) 由东北林业大学生命科学学院惠赠。RNA 提取试剂 TRIzol RNA 反转录试剂、DNA 聚合酶以及引物等均为大连 TaKaRa 公司产品。Gateway BP reaction 试剂盒、Gateway LR reaction 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司。引物由大连 TaKaRa 公司合成, 编号及序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Sequence of primers

编号 Number	序列 Sequence	作用 Action
LSV CP1	F 5'-ATGCAATCAAGACCAGCACA-3'	获得 LSV CP 基因全长 To get full-length LSV CP gene
	R 5'-TCATCCATTATTTGCGTAA-3'	
LSV CP2	F 5'-AAAAAGCAGGCTGGCAGGCCACACCCAGT-3'	扩增保守片段 To amplify conservative fragment
	R 5'-AGAAAGCTGGGTGGGACCCGCTCCATTCTTAA-3'	
attB	F 5'-GGGGACAA GTTTGTACAAAAAGCAGGCT-3'	获得适合 Gateway 技术 RNAi 载体的目的片段 To obtain fragment being suitable for the RNAi vector of Gateway technology
	R 5'-GGGGACCACTTTGTACAAAGAA GCTGGGT-3'	
35S	F 5'-GACGCACAA TCCCACTA TCC-3'	LR 反应阳性克隆 PCR 检测 PCR identification for LR reaction
	R 5'-GCTCAACACATGAGCGAAAC-3'	

1.2 LSV CP 基因的克隆

采用 TRIzol 法提取感病百合叶片总 RNA, 溶解于经 DEPC 处理过的灭菌超纯水中。根据已报道的 LSV 序列 (GenBank 登录号为 NC005138) 设计引物 LSV CP1。

在 20  $\mu$ L 反应体系中加入 1  $\mu$ g 总 RNA 作模板, 50 pmol LSV CP1 R 为引物, 在 AMV 逆转录酶作用下合成 cDNA 第 1 链, 其热循环程序为室温放置 10 min, 42  $^{\circ}$ C 60 min 后冰上放置 2 min, 反转录合成 cDNA。

取 5  $\mu$ L cDNA 产物, 补加引物 LSV CP1 后进行 PCR 扩增。扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s; 55  $^{\circ}$ C 复性 45 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。

PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 试剂盒回收目标条带并克隆到 pMD19-T vector, 再对克隆片段进行测序分析。

### 1.3 RNA i目标区段选择及引物设计

以 LSV CP mRNA 序列 (GenBank 登录号为 FJ456352) 作 Blast 分析, 比较与其它基因的同源性。选择 470 bp 之间的区域作为 RNA 干涉区段, 使用 primer 3 程序在线设计引物, 并在正向引物和反向引物两端分别加上 atB1 和 atB2 位点序列, 设计最终引物 LSV CP2。

### 1.4 利用 Gateway 技术构建 RNA i 载体

BP 反应: 在 1.5 mL 离心管中加入以下反应体系 (总体积 20.0  $\mu\text{L}$ ): atB-PCR product (约 150 ng) 1.0  $\mu\text{L}$ , pDONR<sup>TM</sup> vector (150 ng) 1.0  $\mu\text{L}$ , 5  $\times$ BP clonase<sup>TM</sup> reaction buffer 4.0  $\mu\text{L}$ , BP clonase<sup>TM</sup> enzyme mix 4.0  $\mu\text{L}$ , TE buffer pH 8.0 10  $\mu\text{L}$ 。短暂离心后将混合体系 25  $^{\circ}\text{C}$  水浴 12 h 以上, 加入 2  $\mu\text{L}$  Proteinase K solution, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 10 min, 终止 BP 反应。

取 2.0  $\mu\text{L}$  反应体系用热激法转化 DH5 感受态细胞。将全部转化细胞均匀涂布在含 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素的 LB 固体培养基上。37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16 h 后, 挑取克隆用含有 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素的 LB 液体培养基培养过夜, 然后取 2  $\mu\text{L}$  菌液作 PCR 扩增, 将有扩增产物且片段大小正确的克隆进行测序。取测序结果正确的阳性克隆菌液提取质粒作为入门载体克隆, 紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测质粒的浓度和纯度。

LR 反应: 在 1.5 mL 离心管中加入以下反应体系 (总体积 20  $\mu\text{L}$ ): Entry clone (100 ~ 300 ng) 1  $\mu\text{L}$ , pH7GW WG2 ( ) (300 ng) 1  $\mu\text{L}$ , LR clonase<sup>TM</sup> enzyme mix 4.0  $\mu\text{L}$ , 5  $\times$ LR clonase<sup>TM</sup> reaction buffer 4.0  $\mu\text{L}$ , TE buffer pH 8.0 10  $\mu\text{L}$ 。混匀后短暂离心, 将混合体系置 25  $^{\circ}\text{C}$  水浴 12 h 以上, 加入 2  $\mu\text{L}$  Proteinase K solution, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 10 min, 终止 LR 反应。

取 2.0  $\mu\text{L}$  反应体系用热激法转化 DH5 感受态细胞。将全部转化细胞均匀涂布在含 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  壮观霉素的 LB 固体培养基上。37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16 h 后, 挑取克隆用含 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  壮观霉素的 LB 液体培养基培养过夜。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取及 LSV CP 基因的克隆与序列分析

取少量感病百合的叶片作为样品, 采用 TRIzol 法提取总 RNA (图 1)。

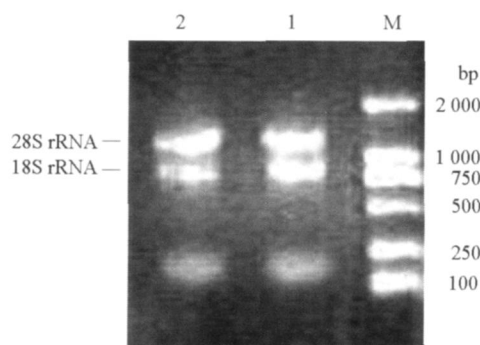


图 1 百合叶片 RNA 提取

M: DL 2000 DNA marker; 1, 2: 百合叶片提取的 RNA。

Fig. 1 Extracted RNA from lily leaves

M: DL 2000 DNA marker; 1, 2: RNA from lily leaves

以反转录产物为模板, 用特异引物 LSV CP1 扩增出百合无症病毒 CP 基因片段 (图 2), 将此片段克隆到 pMD19-T 载体上。测序结果表明基因长 876 bp, 编码 291 个氨基酸序列。经 Blast 分析比对表明本研究所克隆的 LSV CP 基因片段与所登录的 LSV CP mRNA 序列有 98% 的同源性。

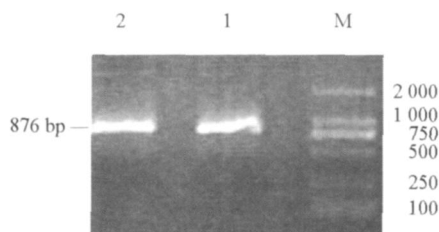


图 2 琼脂糖电泳检测 RT-PCR扩增产物

M: DL 2000 DNA marker; 1、2: RT-PCR产物。

Fig. 2 The electrophoresis of RT-PCR product

M: DL 2000 DNA marker; 1, 2: RT-PCR product

## 2.2 目标区段基因的克隆

用所设计的引物 LSV CP2, 以百合叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经纯化后克隆到 pMD19-T 上, PCR 检测为阳性的克隆菌 (图 3)。测序鉴定结果与设计的目的序列完全一致, 获得用于 RNAi 构建的目的序列。

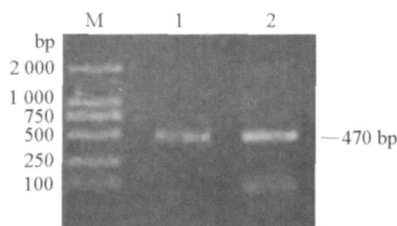


图 3 RNAi 目标区段的 PCR 扩增

M: DL 2000 DNA marker; 1、2: PCR 产物。

Fig. 3 The PCR amplification of target gene

M: DL 2000 DNA marker; 1, 2: PCR product

## 2.3 BP 反应后阳性克隆 PCR 检测

将 atB-PCR 产物连接到入门载体后, 挑取 5 个克隆菌提取质粒后用 LSV CP2 的一对引物 PCR 扩增。电泳检测结果表明, 样品 4 为假阳性 (图 4), 其他为阳性克隆, 大小合适, 表明 RNA 干扰区段正确插入到入门载体中, 得到正确的入门克隆。

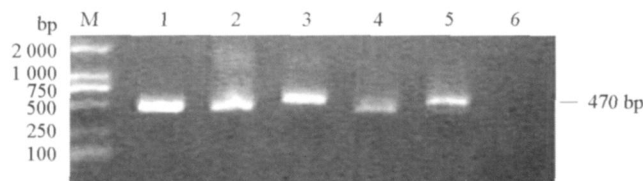


图 4 BP 反应后克隆 PCR 扩增检测

M: DL 2000 DNA marker; 1~5: BP 反应阳性克隆; 6: 对照。

Fig. 4 PCR identification for BP reaction

M: DL 2000 DNA marker; 1 - 5: Positive clone of BP reaction;  
6: Negative control

## 2.4 LR 反应后阳性克隆 PCR 检测

为检测 RNA 干涉区段是否同时正确插入到目的载体的 2 个位点, 用 atB-R 和 atB-F (图 5, A), 35S-R 和 35S-F (图 5, B), atB-F 和 35S-R (图 5, C) 引物扩增所挑取的克隆菌液, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。结果表明, 所挑取的 3 个克隆均能同时被引物扩增 (图 5), 表明所得的克隆均为阳性克隆。

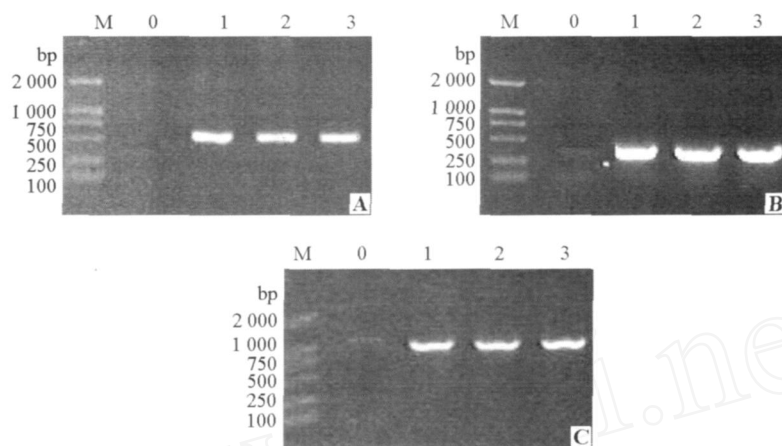


图 5 LR反应后克隆 PCR扩增检测

M: DL 2000 DNA marker; 0: 对照; 1~3: LR反应阳性克隆; A: 用 atB-R和 atB-F为引物扩增挑取的克隆菌;  
B: 用 35S-R和 35S-F为引物扩增挑取的克隆菌; C: 用 atB-F和 35S-R为引物扩增挑取的克隆菌。

Fig 5 PCR identification for LR reaction

M: DL 2000 DNA marker; 0: Negative control; 1 - 3: Positive clone of LR reaction; A: PCR identification with atB-R and atB-F; B: PCR identification with 35S-R and 35S-F; C: PCR identification with atB-F and 35S-R.

### 3 讨论

RNA i技术在抗病毒研究中倍受关注, 并取得了显著成绩。百合无症病毒病在我国的发生日益严重, 阻碍了我国百合种球国产化进程, 探索一种高效根治百合病毒病的方法已成为燃眉之急。在本试验中, 作者设计利用 RNA i技术进行百合抗病毒基因工程的研究, 首次构建了适合农杆菌介导的百合转化的 LSV CP基因介导的 RNA i载体, 对今后百合的抗病毒工程研究具有重大现实意义。

近年来 RNA i技术以其高效、特异及操作简便等特性已经成为基因功能研究中一项有力的工具。但不同的转化系统、不同的应用形式也可能产生不同的效果。在设计、构建表达双链 RNA的重组质粒时, 质粒中包含的基因片段长度或两片段之间的间隔长度都可能影响 RNA的构象, 从而影响 RNA i的效果。

dsRNA诱导的植物病毒抗性是依赖于 dsRNA剂量的, 在构建植物 RNA干扰的表达载体时, 应当考虑到启动子的影响, 启动子强弱对于外源基因的表达水平有重要的影响。虽然 CaMV35S启动子是应用较为广泛的启动子, 但其在如水稻, 小麦等禾本科植物中的表达强度比在双子叶植物中的低, 这样在构建准备转化禾本科植物的表达载体时, 可用 Ubiquitin启动子等以获得较高的干扰程度。

利用 Gateway技术构建的载体是一种二元载体, 因此能直接用于农杆菌介导的植物转化, 从而为利用 RNA干扰技术大规模、高通量的研究植物特异和未知基因功能打开方便之门。在具体的实验操作中, 经过 BP反应一般使 atB-PCR产物的量多于供体载体, 便于 RNA干涉区段插入到载体中。而采用 LR反应一般目的载体量稍大。

### References

- Asjes C J. 2000. Control of aphid-borne *Lily symptomless virus* and *Lily mottle virus* in *Lilium* in the Netherlands. *Virus Res*, 71 (1 - 2): 23 - 32.
- Bass B L. 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*, 101: 235 - 238.
- Memelink J. 1990. Homologies between the genomes of a carlavirus (*Lily symptomless virus*) and a potexvirus (*Lily virus X*) from lily plants. *J*

- Gen Virol, 71: 917 - 924.
- Ming Yan-lin, Zheng Guo-hua, Li Yan, Lin Shirming 2005. Advance in the reseach of *Lily symptomless virus*. Plant Quarantine, 19 (1): 42 - 45. (in Chinese)
- 明艳林, 郑国华, 李 燕, 林石明. 2005. 百合无症状病毒的研究进展. 植物检疫, 19 (1): 42 - 45.
- Nyland G 1969. Heat treatment of virus diseases of perennial plants. Ann Rev Phytopath, 7: 331 - 354.
- Pham Khanh 1998. Transformation of lily on resistance against *Lily symptomless virus* (LSV). Viruskrankeiten der Pflanzen Tagung: 124 - 127.
- Shap P A. 2001. RNA interference. Genes Dev, 15: 485 - 490.
- van den Boogaart T, Wen FJ, Davies JW. 2001. Replicase-derived resistance against *Pea early browning virus* in *Nicotiana benthamiana* is an unstable resistance based upon post transcriptional gene silencing. MPMI, 14 (2): 196 - 203.
- Wang M B, Abbott D C, Waterhouse P M. 2000. A single copy of a virus-derived transgene encoding haip in RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. Mol Plant Pathol, 1 (6): 347 - 356.
- Waterhouse P M, Gatham M W, Wang M B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 13959 - 13964.
- Xu P S, Nimi Y. 1999. Evaluation of virus-free bulb lets production by antiviral and/or heat treatment in vitro scale cultures of *Lilium longiflorum* 'Georgia' and *L.* 'Casablanca'. Japan Soc HortSci, 68: 640 - 647.
- Xu Pin-san, Su Qiao, An Li-jia 2003. Preliminary study on virus-free by adventitious bud culture in *Lilium* spp. Acta Horticulturae Sinica, 30 (5): 597. (in Chinese)
- 徐品三, 苏 乔, 安利佳. 2003. 百合不定芽培养脱毒初探. 园艺学报, 30 (5): 597.
- Zhao Xiang-yun, Cheng Lian, Xing You-mei, Xie Li-ping, Jia Xue-wen 1993. Studies on bulblet culture and devirus of *Lilium sulphureum* baker. Acta Horticulturae Sinica, 20 (3): 284 - 288. (in Chinese)
- 赵祥云, 程 廉, 邢尤美, 谢丽萍, 贾学文. 1993. 百合珠芽组培及脱毒研究. 园艺学报, 20 (3): 284 - 288.
- Zhu Jun-hua, Zhu Chang-xiang, Wen Fu-jiang, Song Yun-zhi 2004. Comparison of resistance to *Potato virus Y* mediated by direct and inverted repeats of the coat protein gene segments in transgenic tobacco plants. Acta Phyto-pathologica Sinica, 34 (2): 133 - 140.

## 图书推荐

## 《蔬菜学》

本书由方智远院士主编,江苏科学技术出版社出版发行。全书共分7大章,33个小题,44万字,552页,本书较系统地记叙了中国蔬菜学发展的历史轨迹、学术成就;比较全面地论述了蔬菜作物种质资源、遗传育种、栽培技术、病虫害防治以及贮藏加工等各个专业的性质、研究内容;简述了21世纪中国蔬菜学的发展趋势。本书兼理论性与实践性、政策性与操作性于一体,有利于读者更加深入地了解蔬菜学,研究蔬菜学,是从事蔬菜科研、教学及生产实践有关人员的良好参考书籍。定价:47元(含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街12号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编100081。