

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201601001

引文格式: 陈晓艳, 孟亚雄, 贾小霞, 等. 四价抗马铃薯病毒植物表达载体构建及其对烟草的转化 [J]. 广西植物, 2017, 37(1):87-95.  
CHEN XY, MENG YX, JIA XX, et al. Construction of potato tetravalent anti-virus plant expression vector and its tobacco transformation [J]. *Guihaia*, 2017, 37(1):87-95.

## 四价抗马铃薯病毒植物表达载体构建及其对烟草的转化

陈晓艳<sup>1</sup>, 孟亚雄<sup>1</sup>, 贾小霞<sup>2</sup>, 张武<sup>2</sup>, 刘石<sup>2</sup>, 郭玉美<sup>3</sup>, 齐恩芳<sup>1,2\*</sup>

(1. 甘肃农业大学农学院, 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 兰州 730070; 3. 甘肃农业职业技术学院, 兰州 730070)

**摘要:** 该研究为了培育兼抗4种病毒的马铃薯品种, 采用RT-PCR技术对PVX、PVS、PVY和PLRV的外壳蛋白(CP)基因进行克隆与分析, 获得了大小分别为670、800、700、600 bp的CP基因序列, 将获得的CP基因序列与NCBI中已报道的序列进行比对分析, 其同源性都在96%以上。根据所克隆的CP基因对靶标片段进行筛选, 获得了大小约300 bp的靶标片段PVX-rh、PVS-rh、PVY-rh和PLRV-rh, 同时利用Overlap-PCR技术将4种病毒的靶标片段进行拼接, 得到了长度约为1200 bp的融合片段XSYV-rh, 与预期目标片段XSYV-yxz的相似性达100%。利用DNA重组技术将融合片段XSYV-rh克隆到pGM-T载体上构建克隆载体pGM-T-XSYV-rh, 用Spe I和Sac I对克隆载体pGM-T-XSYV-rh和植物表达载体pART27进行同步双酶切, 用T4 DNA连接酶将XSYV-rh片段连接到载体pART27上, 成功构建了同时含4种病毒CP基因片段的植物表达载体pART27-XSYV-rh。采用直接转化法将植物表达载体导入根癌农杆菌LBA4404中, 并利用农杆菌介导法对烟草品种T12试管苗进行遗传转化, 转化后的烟草植株经PCR检测, 有40株转化植株可扩增出目的条带, 表明XSYV-rh融合基因已成功转入烟草基因组中。

**关键词:** 马铃薯病毒, 融合基因, 载体构建, 遗传转化, 转基因烟草

**中图分类号:** S532 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2017)01-0087-09

## Construction of potato tetravalent anti-virus plant expression vector and its tobacco transformation

CHEN Xiao-Yan<sup>1</sup>, MENG Ya-Xiong<sup>1</sup>, JIA Xiao-Xia<sup>2</sup>, ZHANG Wu<sup>2</sup>,  
LIU Shi<sup>2</sup>, GUO Yu-Mei<sup>3</sup>, QI En-Fang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Agronomy, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China; 2. Potato Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China; 3. Gansu Agriculture Technology College, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** In order to simultaneously foster anti-four-virus potato varieties (PVX, PVS, PVY and PLRV), four different viral coat protein (CP) gene PVX-CP (670 bp), PVS-CP (800 bp), PVY-CP (700 bp) and PLRV-CP (600 bp) were obtained via RT-PCR and sequenced to confirm respectively. And the comparison of the sequences that we obtained and the already reported sequences from NCBI database showed that all four viral CP genes sequences were more than 90% homologous; then around 300 bp size conservative gene fragments PVX-rh, PVS-rh, PVY-rh, PLRV-rh were selected from their respective viral CP genes and four specific bands which were consistent with the fragment size were obtained

收稿日期: 2016-03-25 修回日期: 2016-05-25

基金项目: 国家自然科学基金(31360353); 甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2014-13) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(31360353); Agricultural Biotechnology Research and Application Development Program in Gansu Province(GNSW-2014-13)].

作者简介: 陈晓艳(1989-), 女, 甘肃定西陇西人, 硕士研究生, 作物遗传育种专业, (E-mail) 1060729364@qq.com。

\*通信作者: 齐恩芳, 硕士, 研究员, 主要从事马铃薯品种资源研究, (E-mail) qefang@126.com。

via PCR amplification. The fusion sequence XSYV-rh which is around 1 200 bp long was created with PVX-rh, PVS-rh, PVY-rh and PLRV-rh gene fragments via Overlap-PCR technique. With the help of DNA recombination technique, we integrated XSYV-rh sequence into pGM-T vector and created cloning vector pGM-T-XSYV-rh. The cloning vector pGM-T-XSYV-rh and the plant expression vector pART27 were treated with incision enzyme *Spe* I and *Sac* I; then under the effect of T4 DNA ligase, XSYV-rh sequence was integrated with pART27 expression vector; at last pART27-XSYV-rh plant expression vector was successfully constructed. The pART27-XSYV-rh plant expression vector was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, and subsequently introduced into tobacco (*T12*) assisted by the agrobacterium-mediated transformation. PCR results showed that there were 40 transgenic plants with targeted gene integrated into their genomes.

**Key words:** potato virus, fusion gene, vector construction, genetic transformation, transgenic tobacco

马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 为茄科 (*Solanaceae*) 茄属 (*Solanum*) 一年生草本块茎植物,起源于秘鲁、哥伦比亚及玻利维亚安第斯山区,在哥伦布发现新大陆后从原产地迅速向世界各地传播种植,目前马铃薯种植已遍布全球(李婷婷,2014)。马铃薯作为仅次于小麦、水稻和玉米的第四大粮食作物,在农业生产中有着其他作物不可替代的作用(张丽等,2015)。近年来,随着马铃薯产业迅速发展,对其品质和产量等要求也不断提高,但马铃薯病毒病也日趋严重,且已成为马铃薯退化和减产的重要原因(朴福万,2010;吴兴泉等,2011)。马铃薯病毒病分布于世界各马铃薯种植区,目前已报道感染马铃薯的病毒有 40 余种(Grammatikaki et al,2007),其中危害较重的主要有马铃薯卷叶病毒(Potato leaf roll virus,PLRV)、马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y,PVY)、马铃薯 X 病毒(Potato virus X,PVX)、马铃薯 S 病毒(Potato virus S,PVS)、马铃薯 M 病毒(Potato virus M,PVM)、马铃薯 A 病毒(Potato virus A,PVA)和马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid,PSTV)等(马雪青等,2010)。单独一种马铃薯病毒一般可导致马铃薯减产 10%~30%,严重者在 80% 以上(Salazar et al,1978)。如 PLRV 在我国北方地区造成的马铃薯产量的损失为 30%~40%,严重时候为 80%~90%(霍晓辉等,2013);PVY 严重时减产在 80% 以上(Glais et al,2002;Nolte et al,2004;Whitworth et al,2006;常飞等,2015);PVS 可减产 10%~20%,该病毒不易觉察,主要靠接触传毒,通过热处理及茎尖脱毒技术都较难脱除干净,分布于世界各马铃薯种植区(吴兴泉等,2015);PVX 单一感染症状轻微或潜隐,一般减产 10% 左右,有时可达 50%(姚东校等,2013);马铃薯感染 PVA 后可造成 40% 的减产(张维,2013)。而 2 种甚至几种病毒

混合侵染带来的损失远大于各病毒单独侵染(崔晓江等,1994),如 PVY 和 PVX 或 PVY 和 PLRV 混合侵染带来的损失远远大于各病毒单独侵染(崔晓江等,1994)。因此,培育抗病毒马铃薯品种是防治病毒病的有效方法。

马铃薯是同源四倍体作物,用常规育种方法改良品种,天然抗性基因资源严重不足,且存在育种周期长、抗性基因遗传不稳定以及远缘杂交种间障碍等问题,而随着细胞工程和现代生物技术的发展,转基因技术可将外源的一个或多个基因转入植物的基因组中,实现植物遗传性状的定向改变,为作物新品种的培育提供了新途径。自 20 世纪 80 年代由农杆菌介导的第一例转基因马铃薯植株问世以来,转基因技术在马铃薯育种上已取得了较大进展(明镇寰和 Ooms,1991)。目前已获得抗 PVX, PVY, PLRV 等转外壳蛋白(CP)基因的抗性植株(龚磊,2013)。随着分子生物技术的发展,利用 Overlap-PCR 等基因融合技术培育出了能抗 2 种或 3 种病毒的转基因马铃薯(宋艳茹等,1994)。因此,利用基因工程技术向植物体内导入外源基因是抗病毒病的一种有效途径。本研究首先用 RT-PCR 法克隆了 PVX、PVS、PVY 和 PLRV 的 CP 基因全序列,同源比对分析 CP 基因的保守区域后,扩增出 4 种病毒 CP 基因 300 bp 左右较保守的基因片段,然后利用 Overlap-PCR 技术将 4 种病毒的 CP 基因片段进行拼接,构建了 pART27-XSYV-rh 植物表达载体,进一步转化烟草,以期培育兼抗 4 种病毒的植物新材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

植物材料:PVX、PVS、PVY 和 PLRV 带毒马铃

薯试管苗叶片。菌株:pGM-T vector 和大肠杆菌菌株 DH5a 购自 TaKaRa 公司。其余菌株由本实验室保存。

试剂:Taq 酶、各种限制性内切酶、氨卞青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kan)、IPTG、X-gal 等均购自 TaKaRa 公司;T<sub>4</sub> DNA 连接酶、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、植物 RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;测序由赛百盛公司完成。

## 1.2 方法

1.2.1 引物设计 参考 NCBI 中已报道的 PVX (Z34261.1)、PVS (GU319954.1)、PVY (X54611.1) 和 PLRV (AY307123.1) CP 基因全长序列,利用 Premier5.0 设计克隆 4 种病毒 CP 基因长度分别为 PVX (670 bp)、PVS (811 bp)、PVY (701 bp)、PLRV (584 bp) 的引物(表 1),用 oligo6.0 软件评估。根据已克隆的 4 种 CP 基因的 cDNA 序列,选择各序列中约 300 bp 无终止突变,且拼接后也无终止突变的基因片段(将拼接的目的片段命名为 XSYV-yxz),利用 Oligo6.0 软件进行引物设计,考虑到后续片段融合需要,在设计引物时加入 Spe I 和 Sac I 酶切位点,最终设计各片段的重叠引物(表 2)。

表 1 CP 基因克隆引物

Table 1 CP cloning primer

基因 Gene	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
PVX	F <sub>x</sub>	5'-TAGCACAAACAGGCCACAGGGT-3'
	R <sub>x</sub>	5'-AGCGGTTGTTGTCCAGTGATACGA-3'
PVS	F <sub>s</sub>	5'-CAGGAGAGACACCACAAGCAATA-3'
	R <sub>s</sub>	5'-AGCATCCCTCCAGTGTACTCAA-3'
PVY	F <sub>y</sub>	5'-GCAGGAGGAAGCACTAAGAAGG-3'
	R <sub>y</sub>	5'-CTAATGCCACCGTCCAACCCGAAAA-3'
PLRV	F <sub>v</sub>	5'-AAAGGAAATGTCAATGCTGG-3'
	R <sub>v</sub>	5'-CTGATGCTGACTCTGAAGGA-3'

1.2.2 CP 基因的克隆 RNA 的提取与 cDNA 的合成:参照 RNA 提取试剂盒说明,提取感染病毒的马铃薯叶片总 RNA。利用 RNA 反转录试剂盒反转录合成 cDNA 第一链。

PCR 扩增:以 cDNA 为模板,分别以 F<sub>x</sub>/R<sub>x</sub>、F<sub>s</sub>/R<sub>s</sub>、F<sub>y</sub>/R<sub>y</sub>、F<sub>v</sub>/R<sub>v</sub> 4 对引物对 4 种 CP 基因进行 PCR

表 2 融合基因片段的引物(重叠引物)

Table 2 Fusion gene primers (Overlapping primer)

引物 Primer	引物序列 Primer sequence
PVX <sub>1</sub>	5'-CGGACTAGT <sup>Spe I</sup> GCAACTCCTGCCACGGCTT-3'
PVX <sub>2</sub>	5'-GGTATTGCTTGTGGTGTCTCTCCAAGTGTGCACACCTCTTTAATTGCTG-3'
PVS <sub>1</sub>	5'-CAGCAATTAAGAGGTGTGCACACTTGGAGAGACACCACAAGCAATACC-3'
PVS <sub>2</sub>	5'-CTTCTTACTGCTTCTCTCTGCTGAAAACCGCGAGTATGGATTG-3'
PVY <sub>1</sub>	5'-GAATCCATACTCGCGGTTTTTCAGCAGGAGGAAGCACTAAGAAG-3'
PVY <sub>2</sub>	5'-CAGTTCTTCTTGTAGCGGCGATTAGTTTCTCTATGTCTGATGCC-3'
PLRV <sub>1</sub>	5'-GGCATACGACATAGGAGAACTAATCGCCGCTCAAGAAGAACTG-3'
PLRV <sub>2</sub>	5'-CGAGCTC <sup>Sac I</sup> CTAATTTGGAATTTGTTGACGTAGGACTG-3'

注:划线部分为酶切位点序列,上标为相应的内切酶。

Note: The underline sequence is the restriction endonuclease cleavage site, and superscript indicates corresponding restriction endonuclease.

扩增。反应体系 25 μL:5×Primes STAR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 5.0 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol · L<sup>-1</sup>) 2.0 μL, 上下游引物 (10 mmol · L<sup>-1</sup>) 各 0.5 μL, 下游引物 R (10 mmol · L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, 模板 (cDNA) 0.5 μL, Prime STAR HsDNA Polymerase 0.25 μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 补至 25 μL。反应程序:98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 60 s, 循环 30 次;循环结束后,按暂停按钮,每个 PCR 管各加 0.5 μL Taq DNA polymerase, 最后 72 °C 保温 10 min。

扩增产物的回收、测序与序列比对:扩增产物经 1.0% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测后,用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化,纯化产物与 PGM-T 载体连接转化 DH5a 感受态细胞。利用蓝白斑筛选阳性克隆,提取质粒进行 PCR 及 EcoRI 酶切鉴定,最后进行基因测序。测序结果用 DNAMAN5.0 软件分别与 4 个 CP 基因全长序列进行比对。

1.2.3 靶标基因片段 PVX-rh、PVS-rh、PVY-rh 和 PLRV-rh 的扩增 以提取的质粒为模板,分别用四对引物 (PVX<sub>1</sub>/PVX<sub>2</sub>、PVS<sub>1</sub>/PVS<sub>2</sub>、PVY<sub>1</sub>/PVY<sub>2</sub> 和 PLRV<sub>1</sub>/PLRV<sub>2</sub>) 对 4 种靶标基因进行 PCR 扩增。方法同 1.2.2。

1.2.4 目标基因片段 XSYV-rh 的融合 反应体系 25 μL, 包含 5×Primes STAR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 5.0 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol · L<sup>-1</sup>) 2.0 μL, Template1 (纯

化 DNA) 0.5  $\mu\text{L}$ , Template2 (纯化 DNA) 0.5  $\mu\text{L}$ , Prime STAR HsDNA Polymerase 0.25  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 16.75  $\mu\text{L}$ , PCR 扩增条件为 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 循环 5 次; 5 个循环结束后, 按暂停, 加入上游引物 PVX-1 (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 和下游引物 PVS-2 (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , 再按 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 循环 30 次, 按暂停, 给每个 PCR 管各加 0.5  $\mu\text{L}$  Taq DNA polymerase, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 扩增出融合基因 XS-rh, 回收产物 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。同样的方法扩增出融合基因 XSY-rh 和 XSYV-rh。

1.2.5 融合片段的克隆、检测、测序与分析 将融合片段 PCR 扩增产物经 1.0% (w/v) 琼脂糖凝胶进行切胶回收, 将回收产物与 pGM-T 载体连接, 连接产物转化 DH5a 感受态细胞。在含有 100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Amp 的 LB 平板上利用蓝白斑筛选阳性单菌落进行接种培养后, 碱裂解法提取质粒, 经 PCR 及酶切鉴定后, 取一只甘油管送赛百盛公司进行测序。测序结果用 DNAMAN5.0 软件与目标基因片段 XSYV-yxz 进行比对。

1.2.6 植物表达载体 pART27-XSYV-rh 的构建及鉴定 分别提取含目的基因 XSYV-rh 和载体 pART27 的质粒, 用 *Spe* I 和 *Sac* I 对提取的质粒进行同步双酶切, 用 40  $\mu\text{L}$  酶切体系: 包含 1  $\mu\text{L}$  *Spe* I, 1  $\mu\text{L}$  *Sac* I, 4  $\mu\text{L}$  10 $\times$ M Buffer, 20  $\mu\text{L}$  质粒, ddH<sub>2</sub>O 补足 40  $\mu\text{L}$ 。反应条件为 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 回收酶切产物小片段命名为 XSYV-rh, 大片段命名 pART27。用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶将 XSYV-rh 片段连接到载体 pART27 上, 用 10  $\mu\text{L}$  连接体系: 包含 1  $\mu\text{L}$  T<sub>4</sub> DNA ligase Buffer, 1  $\mu\text{L}$  T<sub>4</sub> DNA ligase, 3.5  $\mu\text{L}$  目的片段 XSYV-rh, 1  $\mu\text{L}$  载体 pART27, ddH<sub>2</sub>O 补至 10  $\mu\text{L}$ 。反应条件为 16  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 连接产物转化 DH5a 感受态细胞, 在含有 50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Kan 的 LB 平板上挑取阳性单菌落进行接种培养后, 进行菌液 PCR 检测, 提取质粒后用 *Spe* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定, 1.0% 琼脂糖电泳检测片段长度进而验证含有目的基因片段的植物表达载体 pART27-XSYV-rh 的正确性。

1.2.7 pART27-XSYV-rh 植物表达载体转化根癌农杆菌 LBA4404 根癌农杆菌感受态细胞的制备: 从 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱取一支根癌农杆菌 LBA4404 感受态甘油管, 冰浴融化, 然后在含有 20 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Rif 和 50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Str 的 YEP 平板上划线, 倒置平板, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 1~2 d; 挑取 LBA4404 单菌落接种于同样的 YEP 液体培养基中继续培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.3~0.4; 转入

无菌的离心管中, 置于冰浴中 30 min; 4  $^{\circ}\text{C}$ , 5 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后去掉上清液; 加入 2 mL 预冷的 20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 重悬菌体; 制备好的感受态按照 200  $\mu\text{L}$  分装于无菌的离心管中, 液氮速冻后置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用, 使用时取出置于冰上融化。

植物表达载体 pART27-XSYV-rh 转化根癌农杆菌感受态细胞 LBA4404: 取 2  $\mu\text{g}$  (5~10  $\mu\text{L}$ ) 质粒 DNA, 加入 200  $\mu\text{L}$  感受态细胞中, 轻弹管壁混匀; 置于冰上 30 min, 转入液氮中 5 min, 迅速置于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中 5 min; 加入 800  $\mu\text{L}$  YEP 液体培养基, 28  $^{\circ}\text{C}$  下 250 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 预表达 4~5 h; 取 100~200  $\mu\text{L}$  菌液涂布于含有 20 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Rif, 50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Str 和 50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Kan 的 YEP 固体平板上静置 5~10 min 后, 倒置平板, 28  $^{\circ}\text{C}$  下暗培养 2 d。

农杆菌 LBA4404-pART27-XSYV-rh 鉴定: 挑取阳性单克隆, 重新扩繁菌液, 进行菌落 PCR 鉴定。

### 1.3 含 XSYV-rh 融合基因烟草植株的获得及初步筛选

1.3.1 烟草无菌苗的培养 70% 乙醇消毒 T<sub>12</sub> 烟草种子 30 s 后, 用无菌水清洗 2~3 次, 再用 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 消毒 8 min, 用无菌水清洗 6~10 次; 将消毒后的种子置于 MS 固体培养基中, 于 25~26  $^{\circ}\text{C}$ , 14 h 光照/10 h 黑暗条件下萌发。14 d 后将萌发出的 T<sub>12</sub> 烟草幼苗转移至含有 MS 培养基的培养瓶中, 相同条件下培养 4~6 周, 其生长正常细嫩叶片可用于遗传转化。

1.3.2 农杆菌工程菌菌液的准备 将农杆菌工程菌 LBA4404-pART27-XSYV-rh 接种在含 20 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Rif, 50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Str 和 50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Kan 的 YEP 固体培养基, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  条件下避光培养 2 d 后挑单菌落接种到同样的 YEP 液体培养基中, 于 28  $^{\circ}\text{C}$ , 260 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 条件下避光振荡培养 24~36 h。将活化好的菌液按 1:50 进行放大培养, 至 OD<sub>600</sub> 值为 0.5。将达到对数生长期的菌液倒入 50 mL 无菌的离心管中, 5 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 离心 10 min, 弃上清, 用 MS 液体培养基 (pH7.0) 重悬菌体。

1.3.3 农杆菌转化烟草的方法 烟草叶片不进行预培养, 在无菌条件下将烟草试管苗的成熟叶片剪去主脉和叶边缘, 再剪成 0.5~1.0 cm<sup>2</sup> 的小块置于小烧杯中, 倒入重悬好的菌液, 使叶片与农杆菌充分接触, 侵染 8~10 min, 其间不断摇动小烧杯, 保证侵染均匀。时间到后, 将菌液倒掉, 用无菌水冲洗 3 次。先夹出叶片, 再用无菌滤纸吸去叶片周围多余的菌

液,以叶片上表面接触培养基,将叶片接到共培养基(MS + 6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>)中,每皿 8~9 片,培养皿用封口膜封口,倒置,28 °C 暗培养 72 h 左右,当看到叶片与培养基接触边缘长出一圈白色农杆菌时,先用无菌水清洗 3 次,之后用 MS 液体培养基洗涤 2 次,再用无菌滤纸吸干叶片表面的液体后,最后将叶片转入添加有一定浓度 Kan 和 Cb 的芽诱导培养基(MS + 6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + Kan 100 mg · L<sup>-1</sup> + Cb 500 mg · L<sup>-1</sup>)中,置于温度(22±1)°C、光照强度 3 000 lx,光照时间 14 h · d<sup>-1</sup>条件下培养 20 d 左右。

1.3.4 转基因烟草抗性筛选 待长出 1~2 cm 的诱导芽后,将诱导芽小心转入到 Kan 减半并加有 Cb 的生根培养基(1/2MS + Kan 50 mg · L<sup>-1</sup> + Cb 300 mg · L<sup>-1</sup>)中诱导生根并扩繁,直到长成完整植株。

1.3.5 转基因烟草的 PCR 检测 利用植物基因组 DNA 小量提取试剂盒,提取转基因烟草植株的基因组 DNA。参照方法 1.2.3 进行 PCR 扩增检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 外壳蛋白基因的克隆及酶切鉴定

以 PVX-CP、PVS-CP、PVY-CP、PLRV-CP 的 cDNA 为模板, F<sub>X</sub>/R<sub>X</sub>、F<sub>S</sub>/R<sub>S</sub>、F<sub>Y</sub>/R<sub>Y</sub>、F<sub>V</sub>/R<sub>V</sub> 4 对引物进行 PCR 扩增,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,观察到 4 条大小分别为 670、800、700、600 bp 左右的片段,条带大小与预期的片段大小一致(图 1:A)。进一步比对得出,这 4 条序列与 NCBI 中已公布的 PVX、PVS、PVY 和 PLRV 四条片段的同源性在 96% 以上。将扩增产物回收纯化后与 pGM-T 载体连接,连接产物转化 DH5a 感受态细胞,筛选阳性克隆,提取 4 种质粒后对 4 种质粒进行 *EcoR* I 酶切,酶切结果表明:切出的条带大小与预期的片段大小相符,如图 1:B 所示。将鉴定正确的质粒分别命名为 pGM-T-X、pGM-T-S、pGM-T-Y、pGM-T-V。

### 2.2 目的片段 XSYV-rh 的融合

2.2.1 目标基因片段 PVX-rh、PVS-rh、PVY-rh、PLRV-rh 的扩增 按照 1.2.3 所述方法中的 PCR 扩增反应程序体系,分别以 pGM-T-X、pGM-T-S、pGM-T-Y、pGM-T-V 质粒为模板,将 PVX<sub>1</sub>/PVX<sub>2</sub>、PVS<sub>1</sub>/PVS<sub>2</sub>、PVY<sub>1</sub>/PVY<sub>2</sub>、PLRV<sub>1</sub>/PLRV<sub>2</sub> 4 对引物进行 PCR 反应,扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,观察到 4 条 300 bp 左右大小的条带,其大小与预期片段大小符合,如图 2 所示。将 PCR 产物进行纯化回收,

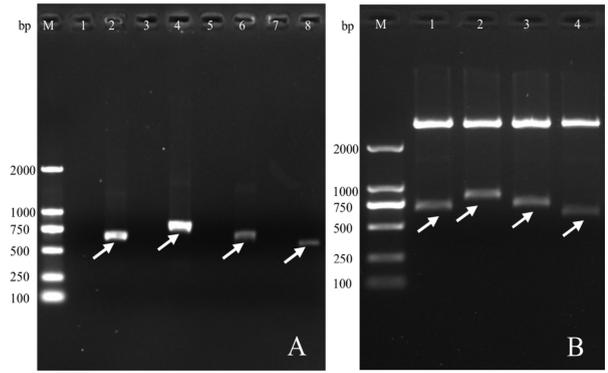


图 1 PVX-CP、PVS-CP、PVY-CP、PLRV-CP 基因的 PCR 及所对应质粒 pGM-T-X、pGM-T-S、pGM-T-Y、pGM-T-V 的 *EcoR* I 酶切电泳图 A: M. Marker D2000; 1, 3, 5, 7. PVX-CP、PVS-CP、PVY-CP、PLRV-CP 所对应的空白对照; 2, 4, 6, 8. PVX-CP、PVS-CP、PVY-CP、PLRV-CP 基因扩增片段。B: M. Marker D2000; 1, 2, 3, 4. 质粒 pGM-T-X、pGM-T-S、pGM-T-Y、pGM-T-V 的 *EcoR* I 酶切鉴定。

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR products of PVX-CP, PVS-CP, PVY-CP, PLRV-CP and Restrict digestion of pGM-T-X, pGM-T-S, pGM-T-Y, pGM-T-V plasmid A: M. Marker D2000; 1, 3, 5, 7. PVX-CP, PVS-CP, PVY-CP, PLRV-CP corresponding; 2, 4, 6, 8. respectively PVX-CP, PVS-CP, PVY-CP, PLRV-CP gene amplified fragment. B: M. Marker D2000; 1, 2, 3, 4. Plasmid pGM-T-X, pGM-T-S, pGM-T-Y, pGM-T-V's *EcoR* I restriction enzyme digestion, respectively.

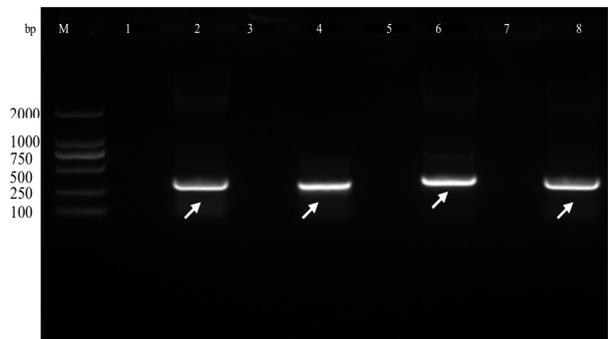


图 2 目标基因 PCR 产物电泳图谱 M. Marker D2000; 1, 3, 5, 7. 空白对照; 2, 4, 6, 8. PVX-rh、PVS-rh、PVY-rh、PLRV-rh 产物。

Fig. 2 Target gene PCR product gel electrophoresis profiles M. Marker D2000; 1, 3, 5, 7. blank control; 2, 4, 6, 8. PVX-rh, PVS-rh, PVY-rh, PLRV-rh product.

分别命名为 PVX-rh、PVS-rh、PVY-rh、PLRV-rh。

2.2.2 XSYV-rh 基因片段的融合结果 照 1.2.4 中所述方法进行 PVX-rh、PVS-rh、PVY-rh、PLRV-rh 四片段 PCR 融合扩增,融合产物分别命名为 XS-rh, XSY-rh 和 XSYV-rh,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,观察到

600 bp(图 3:A)、900 bp(图 3:B)和 1 200 bp(图 3:C)左右大小的条带,其大小与预期片段大小相符合。

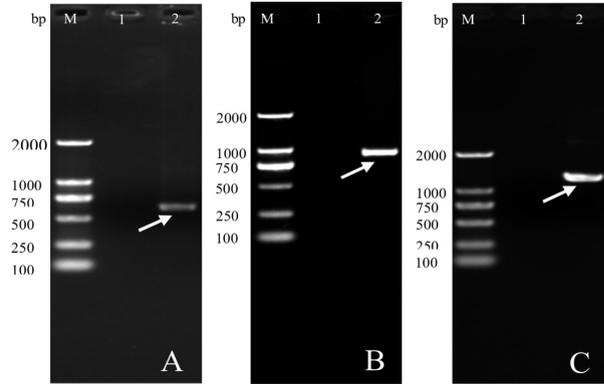


图 3 XS-rh、XSY-rh、XSYV-rh 电泳检测图 A: M. Marker D2000; 1. 空白对照; 2. XS-rh PCR 扩增产物。B: M. Marker D2000; 1. 空白对照; 2. XSY-rh PCR 扩增产物。C: M. Marker D2000; 1. 空白对照; 2. XSYV-rh PCR 扩增产物。

Fig. 3 Gel electrophoresis of XS-rh, XSY-rh, XSYV-rh  
A: M. Marker D2000; 1. Blank control; 2. PCR product of XS-rh product. B: M. Marker D2000; 1. Blank control; 2. PCR product of XSY-rh; C: M. Marker D2000; 1. Blank control; 2. PCR product of XSYV-rh product.

**2.2.3 融合基因片段 XSYV-rh 的酶切检测** 将 XSYV-rh 扩增产物回收纯化后连接 pGM-T 载体,连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,利用蓝白斑筛选 5 个阳性克隆,对菌液进行 PCR 检测,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测得到 1 200 bp 左右大小的片段(图 4:A),从图中挑选一个条带最亮最好的用碱裂解法从该条带所对应菌液中提取质粒,命名为 XSYV-rh。对该质粒 XSYV-rh 进行 PCR 检测和 *Spe* I、*Sac* I 双酶切检测,PCR 产物和酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,均可分别观察到 1 200 bp 左右的条带(图 4:B,C);该序列的测序结果表明:其大小与理论预期筛选出的无终止突变的约 1 200 bp 基因序列大小、顺序均一致,相似度达 100%,可以判断四个片段已经按照预期融合在一起。

### 2.3 植物表达载体 pART27-XSYV-rh 的构建及其 PCR 和酶切鉴定

植物表达载体 pART27-XSYV-rh 构建过程如图 5 所示。转化大肠杆菌 DH5a 后,提取质粒,进行 PCR 检测,扩增出 1 200 bp 左右的目的条带(图 6:A)。双酶切后可见约 1 200 bp 的目的条带和线性载体(图 6:B),说明 pART27-XSYV-rh 植物表达载体构建成功。

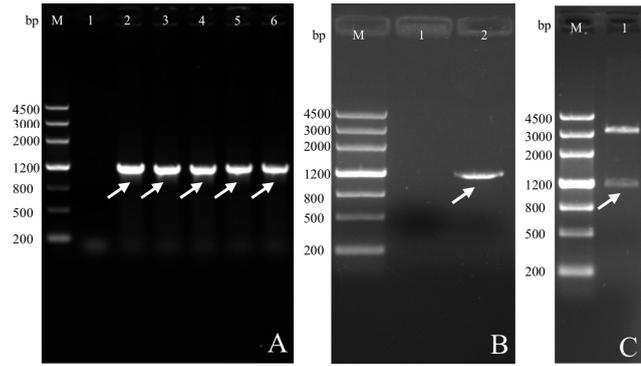


图 4 XSYV-rh 菌落、质粒 PCR 及酶切电泳图 A: M. Marker III; 1. 空白对照; 2-6. 6 个 XSYV-rh 白色菌斑 PCR 产物。B: M. Marker III; 1. 空白对照; 2. 质粒 PCR 结果。C: M. Marker III; 1. XSYV-rh 的 *Spe* I/ *Sac* I 双酶切鉴定。

Fig. 4 XSYV-rh colony, plasmid PCR and digestion products electrophoresis A: M. Marker III; 1. Blank control; 2-6. SYV-rh white plaque PCR product. B: M. Marker III; 1. Blank control; 2. Plasmid PCR results. C: M. Marker III; 1. XSYV-rh the *Spe* I/ *Sac* I double digestion.

### 2.4 农杆菌介导的 LBA4404-pART27-XSYV-rh 转化及 PCR 鉴定

将构建好的表达载体转化根癌农杆菌,挑取阳性克隆,对菌液进行 PCR 鉴定,特异扩增出约 1 200 bp 的目标条带(图 7)。结果表明,构建的植物表达载体已成功转入根癌农杆菌 LBA4404。

### 2.5 转基因烟草的获得及 PCR 检测

阳性单菌落用于烟草转化,其筛选过程中抗性苗的获得如图 8 所示。工程菌浸染后的叶片经共培养、选择培养及生根培养后,得到无菌抗性苗 60 株。以引物 PVX<sub>1</sub>/PLRV<sub>2</sub>进行 PCR 检测,结果表明阳性对照(质粒 pART27-XSYV-rh)和 40 株转化植株扩增出约 1 200 bp 大小的片段,而空白对照(ddH<sub>2</sub>O)、阴性对照(未转化烟草)没有扩增出任何片段(图 9 为 PCR 检测的部分结果),初步证明 XSYV-rh 融合基因已转入烟草中。

## 3 讨论与结论

近年来,利用病毒来源的基因获得抗性转基因植物已成为植物抗病毒育种的重要途径。科学研究表明,表达病毒 CP 基因的转基因马铃薯能显著延缓该病毒病害症状的发展并减轻其危害程度(A Hoekema et al, 1989)。自 1986 年 Abel et al (1986)

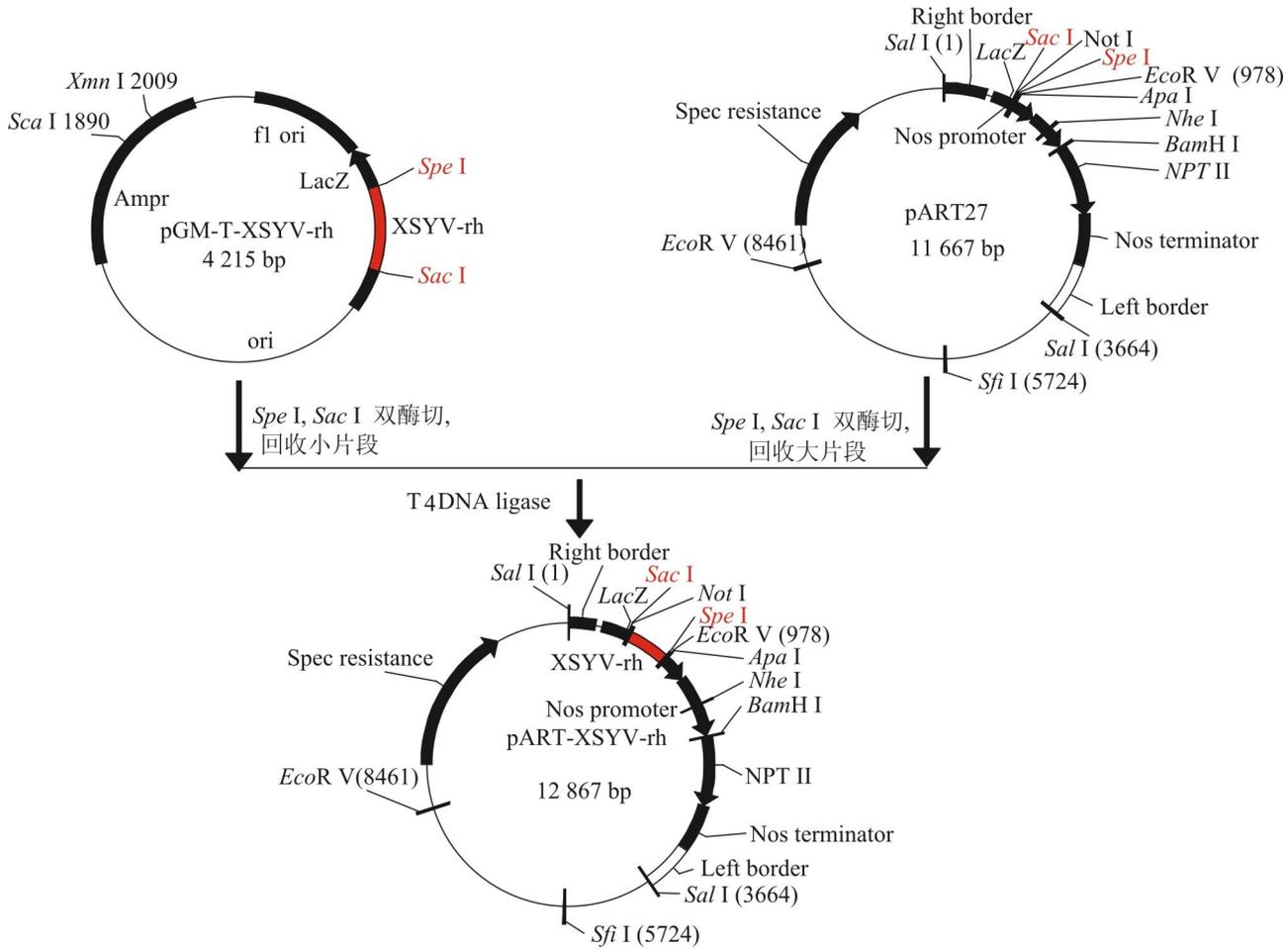


图 5 植物表达载体 pART27-XSYV-rh 的构建模式图

Fig. 5 Schematic diagram for construction of the pART27-XSYV-rh plant expression vector

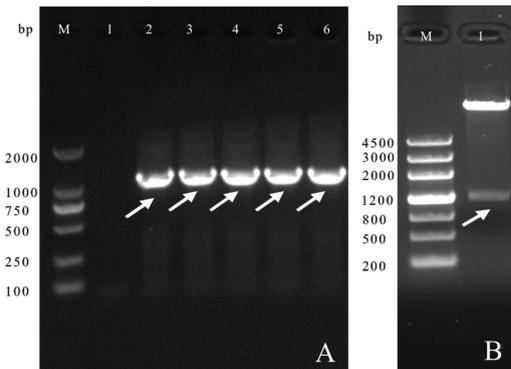


图 6 pART27-XSYV-rh 菌落 PCR 及质粒 *Spe I/Sac I* 双酶切电泳图 A: M. Marker 2000; 1. pART27-XSYV-rh 菌落 PCR 鉴定。B: M. Marker III; 1. pART27-XSYV-rh 质粒 *Spe I/Sac I* 双酶。

Fig. 6 pART27-XSYV-rh colony PCR and plasmid *Spe I/Sac I* double digestion electrophoresis A: M. Marker 2000; 1. pART27-XSYV-rh colony PCR. B: M. Marker III; 1. pART27-XSYV-rh plasmid *Spe I/Sac I* double enzyme.

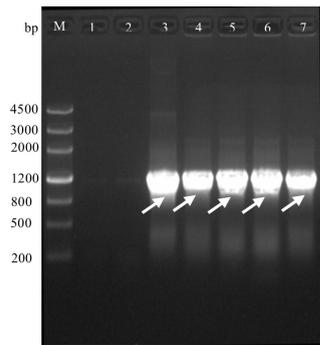


图 7 LBA4404-pART27-XSYV-rh 菌液 PCR 检测结果

M. Marker III; 1. 空白对照; 2. 阴性对照 (以空的 LBA4404 菌液为模板); 3. 阳性对照 (以质 pART27-XSYV-rh 为模板); 4-7. 菌液 PCR 产物。

Fig. 7 LBA4404-pART27-XSYV-rh bacteria PCR results M. Marker III; 1. Blank control; 2. Negative control (with empty LBA4404 bacteria as a template); 3. Positive control (quality pART27-XSYV-rh template) positive control, the purpose of bacteria; 4-7. PCR product of objective bacteria.

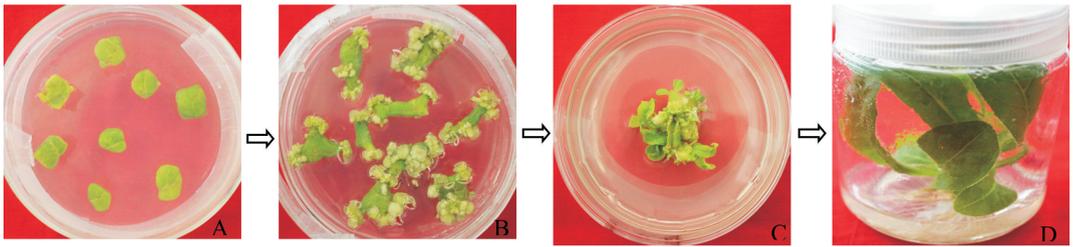


图 8 抗性苗的获得过程 A. 共培养后的烟草叶片; B. 愈伤组织; C. 抗性芽; D. 抗性苗。

Fig. 8 Process of obtaining resistant seedlings A. Co-cultured tobacco leaves; B. Callus; C. Resistant shoots; D. Resistant plants.

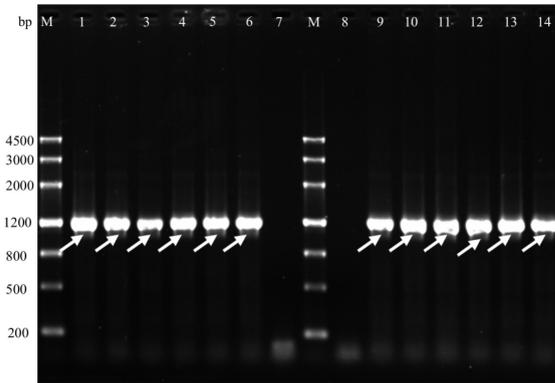


图 9 转基因植株 PCR 鉴定结果 注:两个 M 均为 Marker III; 2-6, 10-14. 引物 PVX-1/PLRV-2 对部分转基因植株进行 PCR 鉴定; 1, 9. 阳性对照 (pART27-XSYV-rh 质粒); 7. 空白对照 (ddH<sub>2</sub>O); 8. 阴性对照 (未转基因植株)。

Fig. 9 PCR analysis of transgenic plants Note: M. Marker III; 2-6, 10-14. Primers PVX-1/PLRV-2 on the part of the transgenic plants were identified by PCR; 1, 9. Positive control (pART27-XSYV-rh plasmid); 7. Blank control (ddH<sub>2</sub>O); 8. Negative control (non-transgenic plants).

首先将烟草花叶病毒 (TMV) 的 CP 基因导入烟草获得抗 TMV 的转基因烟草以来, 利用病毒的 CP 基因防治植物病毒病的例子已有许多, 李奇科等 (2009) 利用马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的 CP 基因获得了稳定、高效的抗病效果。美国孟山都公司最先获得同时表达 PVX 和 PVY CP 基因的双价转基因马铃薯 (Lawson et al, 1990)。宋艳茹等 (1994) 首次获得 PVY + PLRV 的转基因马铃薯株系。崔晓江等 (1994) 通过构建载体获得了同时抗 PVY、PVX 和 PLRV 的转 3 基因马铃薯。但是, 目前还未见转 4 价病毒 CP 基因马铃薯的报道, 而多个基因构建在不同载体上转入同一受体体会因为载体间的相互影响而导致效率降低。本研究利用重叠延伸 PCR 技术

将 PVX、PVS、PVY 和 PLRV 外壳蛋白基因通过末端互补、重叠延伸进行体外重组连接, 得到了融合基因片段 XSYV-rh, 测序结果与预期 XSYV-yxz 序列完全一致, 表明 4 种病毒外壳蛋白基因融合成功。用农杆菌介导法转化的烟草中, 在获得的转基因烟草中, PCR 检测证明 XSYV-rh 基因已整合到烟草基因组中, 因而为该载体的进一步广泛应用打下了基础, 希望借此获得同时抗 4 种病毒的转基因植物材料。若要从转基因植株的抗性基因的拷贝、调控表达与功能等方面进行研究, 还要做 Southern Blot、Northern Blot 以及 Western Blot, 对转入基因进行全面了解, 对其相应的蛋白功能做全面研究。目前, 实验室正在对获得的抗性烟草植株进行 GUS 瞬时表达检测, 以及蛋白分析与表达产物的生物活性检测试验都仍在进行之中。

## 参考文献:

- ABEL PP, NELSON RS, DE B, et al, 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. Science, 232(4751):738-743.
- CUI XJ, PENG XX, ZHOU XR, et al, 1994. Trivalent turn viral coat protein gene of potato obtained[J]. Chin Sci Bull, 39(21):1992-1995. [崔晓江, 彭学贤, 周雪荣, 等, 1994. 3 价转病毒外壳蛋白基因马铃薯的获得[J]. 科学通报, 39(21):1992-1995.]
- CUI XJ, PENG XX, SHEN YF, et al, 1994. Cloning and sequencing of PLRV coat protein gene and construction of vectors for transgenic potato resistant to coinfection of PVY, PVX and PLRV [J]. Chin J Biotechnol, 10(2): 185-189. [崔晓江, 彭学贤, 沈禹飞, 等, 1994. 马铃薯单双三价抗病毒基因表达载体的构建[J]. 生物工程学报, 10(2):185-189.]
- CHANG F, ZOU WC, GAO FL, et al, 2015. Comparative analysis of population genetic structure of *Potato virus Y* from different hosts [J]. Hereditas, 37(3): 292-301. [常飞, 邹文超, 高芳鑫, 等, 2015. 不同寄主来源的马铃薯 Y 病毒群体遗传结构的比较分析[J]. 遗传, 37(3):292-301.]
- GLAIS L, TRIBODET M, KERLAN C, 2002. Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY(N)W and PVY(NTN) variants are single to multiple recombinants

- between PVY(O) and PVY(N) isolates[J]. Arch Virol, 147(2):363-378.
- GONG L, 2013. RNA interfere transgene PLRV resistance study [D]. Xining: Qinghai University. [龚磊, 2013. RNA 干涉转基因马铃薯抗卷叶病毒(PLRV)抗病性研究[D]. 西宁: 青海大学.]
- GRAMMATIKAKI G, AVGELIS A, SONNINO A, 2007. Behavior of potato gametoclonal plants against the necrotic strain of potato Y potyvirus[J]. Russ J Plant Physiol-Engl Tr, 54(4): 507-512.
- HOEKEMA A, HUISMAN MJ, MOLENDIJK L, et al, 1989. The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X[J]. Nat Biotechnol, 7(3): 273-278.
- HUO XH, SHEN YM, LIU GF, et al, 2013. P0 of potato leafroll virus suppress RNA silencing and its interaction with AGO protein [J]. Biotechnol Bull, 8(3): 70-76. [霍晓辉, 申永梅, 刘国富, 等, 2013. 马铃薯卷叶病毒 P0 蛋白抑制 RNA 沉默及其与 AGO 蛋白的相互作用[J]. 生物技术通报, 2013(3): 70-76.]
- LI TT, 2014. Development and application of PVS and PLRV ELISA Kit [D]. Kunming: Yunnan University. [李婷婷, 2014. PVS 和 PLRV ELISA 检测试剂盒的研制与应用[D]. 昆明: 云南大学.]
- LI QK, TAO G, QIU YB, et al, 2009. RNAi vector targeting and interference effect determination of PVY CP gene[J]. Genom Appl Biol, 28(3): 460-464. [李奇科, 陶刚, 邱又彬, 等, 2009. 马铃薯 Y 病毒 CP 基因 RNAi 载体构建与干涉效果测定[J]. 基因组学与应用生物学, 28(3): 460-464.]
- LAWSON C, KANIEWSKI W, HALEY L, et al, 1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato Virus X and potato Virus Y in transgenic russet burbank[J]. Biotechnology, 8(02): 127-134.
- MA XQ, WANG YG, ZHOU XJ, et al, 2010. Research advances of potato virus [J]. Food Ind, 31(10): 429-434. [马雪青, 王永刚, 周贤婧, 等, 2010. 马铃薯病毒研究新进展[J]. 食品工业科技, 31(10): 429-434.]
- MING ZH, OOMS G, 1991. The construction of the plasmid containing the chimaeric patatin-GUS gene and its expression [J]. Acta Bot Sin, 33(12): 943-948. [明镇寰, Ooms G, 1991. 含 patatin-GUS 嵌合基因的质粒的构建及其在马铃薯中的表达[J]. 植物学报, 33(12): 943-948.]
- NOLTE P, WHITWORTH JL, THORNTON MK, et al, 2004. Effect of seedborne potato Virus Y on performance of russet burbank, russet norkotah and shepody potato [J]. Plant Dis, 88(3): 248-252.
- PU FW, 2010. Occurrence and control of potato virus diseases [J]. Mod Agric Sci Technol, 7(17): 186-195. [朴福万, 2010. 马铃薯病毒病害的发生及防治[J]. 现代农业科技, 7(17): 186-195.]
- SONG YR, LI C, HOU LL, et al, 1994. Construction of plant expression vectors and identification of transgenic potato plants [J]. Acta Bot Sin, 36(11): 842-848. [宋艳茹, 李枏, 侯林林, 等, 1994. 双价外壳蛋白基因植物表达载体的构建及马铃薯转基因植株的鉴定[J]. 植物学报, 36(11): 842-848.]
- SALAZAR LF, HARRISON BD, 1978. Host range, purification and properties of potato virus T [J]. Ann Appl Biol, 89(2): 223-235.
- WU XQ, PEI Y, CHEN SH, 2015. Review on genome structure and strains differentiation of potato Virus S [J]. J Henan Agric Sci, 44(1): 9-12. [吴兴泉, 裴杨, 陈士华, 2015. 马铃薯 S 病毒的基因组结构与株系分化研究进展[J]. 河南农业科学, 44(1): 9-12.]
- WU XQ, SHI Y, YANG QD, 2011. Potato viruses and their detection in virus-free seed potato production in China [J]. Chin Pot J, 25(6): 363-366. [吴兴泉, 时妍, 杨庆东, 2011. 我国马铃薯病毒的种类及脱毒种薯生产过程中病毒的检测[J]. 中国马铃薯, 25(6): 363-366.]
- WHITWORTH JL, NOLTE P, MCINTOSH C, et al, 2006. Effect of potato Virus Y on yield of three potato cultivars grown under different nitrogen levels [J]. Plant Dis, 90(1): 73-76.
- YAO DX, HONG K, YANG LC, et al, 2013. Molecular identification of a potato virus X isolated from potatoes in Guizhou [J]. Guangdong Agric Sci, 40(13): 139-141. [姚东校, 洪鲲, 杨立昌, 等, 2013. 马铃薯 X 病毒贵州分离物的分子鉴定[J]. 广东农业科学, 40(13): 139-141.]
- ZHANG L, SONG YX, GONG L, et al, 2015. Progress on genetic transformation of potato mediated by *Agrobacterium* [J]. Mol Plant Breed, 13(7): 1660-1667. [张丽, 宋玉霞, 巩榴, 等, 2015. 农杆菌介导的马铃薯转化研究进展[J]. 分子植物育种, 13(7): 1660-1667.]
- ZHANG W, 2013. Detection and molecular characterization of isolates of potato Virus A in Hunan Province [D]. Changsha: Hunan Agricultural University. [张维, 2013. 马铃薯 A 病毒湖南分离物株系鉴定[D]. 长沙: 湖南农业大学.]

## 关于“毛茛科六新种”发表的说明

本刊 2016 年出版的 36 卷增刊 1(庆祝王文采院士 90 华诞专刊)中发表了王文采编著的“毛茛科五新种”和“靖西铁线莲, 广西毛茛科一新种”二文。为了便于国内外数据库收录及读者了解, 我们又在本刊 36 卷第 11 期(正刊)中刊出上述二文合并而成的“毛茛科六新种”一文。

特此说明。