

文章编号:1674-7054(2011)02-0113-04

番木瓜环斑病毒 CP 基因 dsRNA 原核表达载体的快速构建

陈瑶^{1,2} 沈文涛² 言普² 黎小瑛² 周鹏^{1,2}

(1. 海南大学 农学院 海南 儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究/分析测试中心 海南 海口 571101)

摘要: 重点介绍了一种快速构建 dsRNA 原核表达载体的方法。以番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因(PRSV-CP) 3'端-279 bp 保守区段为基础, 通过 OZ-LIC 法构建 861 bp、432 bp 和 279 bp 3 种不同长度的发卡结构, 再通过 *Xho* I 和 *Cla* I 双酶切, 将其连接到 pSP73 原核表达载体上, 构建成 PRSV-CP 基因 dsRNA 原核表达载体。

关键词: 番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因; dsRNA; RNA 沉默; OZ-LIC 法; 原核表达载体

中图分类号: Q 78; S 667.903.6

文献标志码: A

番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus, PRSV) 病害是威胁番木瓜种植业发展最严重的病害。目前, 在栽培技术上无法通过化学方法予以防治。虽然国内外研究人员利用基因工程技术已经培育了一些抗 PRSV 转基因番木瓜, 但其抗病性具有区域性, 不适合大面积推广, 且由于公众出于对转基因植物的生态风险和食品安全性的考虑, 抗病毒转基因植物的应用仍然受到极大地限制。RNA 沉默(RNA silencing) 机制的揭示为植物病毒的防治提供了新的选择^[1]。双链 RNA (dsRNA) 是 RNA 沉默起始的关键分子, dsRNA 的大量积累诱导 RNA 沉默的起始^[2]。研究表明, 通过细菌原核表达的 dsRNA 同样能够有效地干扰植物病毒侵染^[1,3-5], 且与转基因抗病毒植物相比, 更具有安全性和便捷性。笔者利用 RNA 沉默的原理, 构建含有 PRSV-CP 基因保守区域(3'端-278 bp 区段) 不同长度片段的、具有反向重复序列的原核表达载体, 通过转化大肠杆菌 RNase III 缺陷型菌株诱导 PRSV-CP dsRNA 表达, 以期获得一种对环境友好、高效便捷、应用前景广的防控 PRSV 的新方法和新策略。One-step, zero-background ligation-independent cloning (OZ-LIC) 法是徐国勇等人^[6]研究出来的, 该方法是利用 ihpRNA-LIC 载体快速构建内含子的发卡 RNA (ihpRNA) 的方法。传统的方法不但需要付出繁重的劳动, 而且需要耗时、昂贵的克隆步骤。用徐国勇等人的方法构建 ihpRNA 只需用 *T*₄ DNA 聚合酶分别处理 2 种 PCR 产物和 *Sma* I 消化过的 ihpRNA-LIC 载体, 再将 DNA 混合物转入大肠杆菌中就完成了。但利用该方法构建的是植物表达载体, 因此本研究在目的基因 5'端分别设计了 2 个酶切位点—*Xho* I 和 *Cla* I, 通过双酶切将构建好的发卡结构克隆到原核表达载体上, 以期在番木瓜田间抗病方面的实际应用。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒 含 PRSV-CP 基因 cDNA 的质粒由本实验室保存, pRNAi-LIC 载体购自清华大学, HT115, M-Jm109LacY, M-HMS174 菌株(均为 RNase III 缺失体, 通过诱导表达可在细菌体内大量积累 dsRNA) 为山东农业大学朱常香教授馈赠。

1.2 主要试剂和酶 PfuUltra II fusion HS DNA polymerase 高保真酶购自 TaKaRa 公司, *T*₄ DNA polymer-

收稿日期: 2011-06-27

基金项目: 国家自然科学基金(30760134, 31000844), 国家科技支撑计划课题(2009BADA2B02-04), 中央级公益性科研院所基本科研业务费(ITBB110211), 三亚市重点科技计划项目(080112)

作者简介: 陈瑶(1986-), 女, 重庆大足人, 海南大学农学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 周鹏(1963-), 男, 安徽人, 研究员, 博士生导师, E-mail: zhp6301@126.com

ase ,dATP ,dTTP 各种限制性内切酶等购自 Fermentas 公司 ,DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司 ,2 × Taq PCR MasterMix ,TOP10 感受态购自天根生化科技有限公司 ,其它化学试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计 根据徐国勇等人^[6]的方法进行引物设计 ,并由上海生工生物工程有限公司合成。引物名称中的 LIC1 ,2 ,3 ,4 代表该引物带有的接头序列(虚线部分)。试验后期 ,为了能从 pRNAi-LIC 载体上切下发卡结构 ,在基因片段 5′分别设计了 Xho I 和 Cla I 两个酶切位点 ,引物 LIC1 - 8 ,LIC1 - 4 ,LIC1 - 2 上的酶切位点为 Xho I (实线部分 ,下同) ,LIC4 - 8 ,LIC4 - 4 ,LIC4 - 2 上的酶切位点为 Cla I ,见表 1。

表 1 PCR 引物

引物	序列 (从 5′到 3′)
LIC1 - 8	5′ - CGACGACAAGACCCTCTCGAGTCCAAAAATGAAGCTGT - 3′
LIC1 - 4	5′ - CGACGACAAGACCCTCTCGAGACATCTCCAGACATATCTGCTG - 3′
LIC1 - 2	5′ - CGACGACAAGACCCTCTCGAGAATGCAACTGAGAGGTACAT - 3′
LIC2 - X	5′ - GAGGAGAAGAGCCCTTCAATTGCGCATACCCAG - 3′
LIC4 - 8	5′ - AGAGCACACGACCCTATCGATTCCAAAAATGAAGCTGTGG - 3′
LIC4 - 4	5′ - AGAGCACACGACCCTATCGATACATCTCCAGACATATCTG - 3′
LIC4 - 2	5′ - AGAGCACACGACCCTATCGATAATGCAACTGAGAGGTACAT - 3′
LIC3 - C	5′ - CCAGCACGGAACCCCTTCAATTGCGCATACCCAG - 3′

1.4 原核表达载体的构建

1.4.1 PCR 反应 以含 PRSV-CP 基因 cDNA 的质粒为模板 ,LIC1 - 8 ,LIC1 - 4 ,LIC1 - 2 与 LIC2 - X 引物的扩增产物为 PCR 产物 1; LIC4 - 8 ,LIC4 - 4 ,LIC4 - 2 与 LIC3 - C 引物的扩增产物为 PCR 产物 2。反应条件:95 ℃ 预变性 2 min 后进入循环 95 ℃ 20s ,54 ℃ 20 s ,72 ℃ 30 s ,循环数为 30。循环完成后 72 ℃ 延伸 3 min。

1.4.2 载体的连接与转化

参照徐国勇等^[6]的方法(原理如图 1)进行载体的连接与转化。具体步骤如下:1) 利用 T₄ DNA polymerase 的外切酶活性 ,分别处理 PCR 产物 1、PCR 产物 2(22 ℃ 30 min;75 ℃ 20 min) ,此步骤需加入 dATP;2) SmaI 消化载体 pRNAi-LIC (30 ℃ 3 h;65 ℃ 20 min);3) T₄ DNA polymerase 处理步骤 2 产物 (22 ℃ 30 min;75 ℃ 20 min) ,此步骤需加入 dTTP;4) 混合处理后的 PCR 产物 1、2 与载体 (65 ℃ 5 min;22 ℃ 15~30 min)。5) 取 10 μL 步骤 4 产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞 ,抗性为 25 mg · L⁻¹卡那霉素 ,5 mg · L⁻¹氯霉素 ,37 ℃ 培养 16~20 h ,挑取单菌落培养。

1.4.3 酶切鉴定 1) BamH I 和 Sac I 双酶切连接成功的质

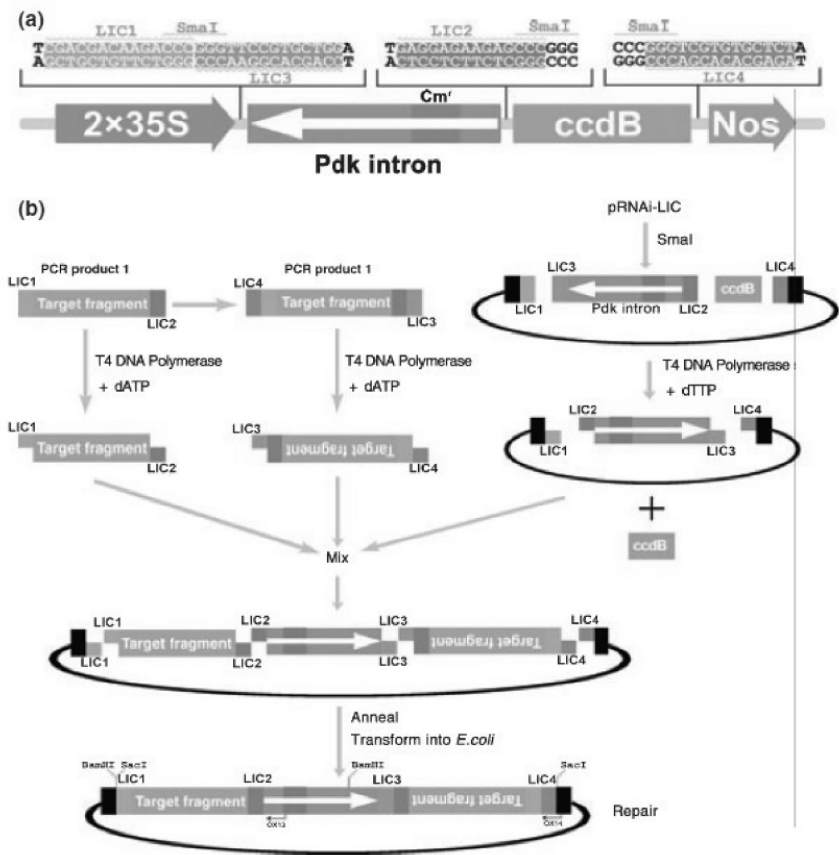


图 1 OZ-LIC 法构建 ihpRNA 的原理图^[3]

粒,可产生 9.7 kb 载体片段和另外 2 条 DNA 片段,一条是 622 bp 加上目的片段,另一条是 1 053 bp 加上目的片段,前提为目的片段中没有 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点。2) *Xho* I 和 *Cla* I 双酶切连接成功的质粒产生 4 条带,第 2 条带为需回收的目的条带。

1.4.4 dsRNA 原核表达载体的构建与鉴定 利用 *Xho* I 与 *Cla* I 双酶切将发卡结构 DNA 片段切下,与同样酶切处理的载体 pSP73 混合,在 *T*₄ DNA ligase 的作用下,16 ℃ 连接过夜。取 5 μL 分别转化 RNase III 缺陷型菌株 HT115、M-Jm109LacY 和 M-HMS174 制备的感受态细胞,37 ℃ 培养过夜,挑取单菌落培养。分别用 LIC4-8、LIC4-4、LIC4-2 与 LIC3-C 为引物做菌液 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定后的阳性克隆制成穿刺管送 invitrogen(上海)公司测序。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆 以 cDNA 为模板,LIC1-8、LIC1-4、LIC1-2 与 LIC2-X 为正反向引物扩增 PCR 产物 1,LIC4-8、LIC4-4、LIC4-2 与 LIC3-C 为正反向引物扩增 PCR 产物 2。扩增结果如图 2 所示。

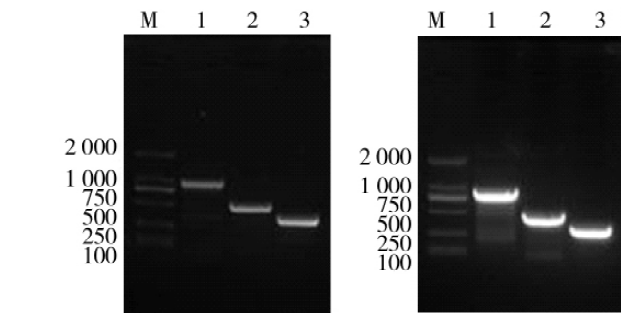


图 2 目的基因的扩增

M: DL2000; 左为 PCR 产物 1,分别扩增了约 61 bp、432 bp、279 bp 的目的片段,各片段两端均与接头序列 LIC1、LIC2 相连; 右为 PCR 产物 2,分别扩增了约 861 bp、432 bp、279 bp 的目的片段,各片段两端均与接头序列 LIC3、LIC4 相连。

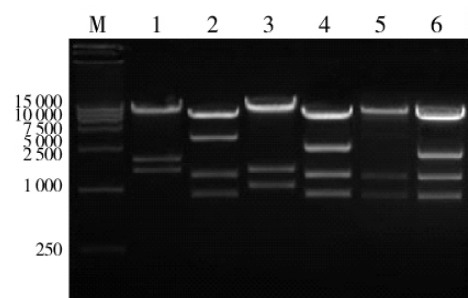


图 3 酶切鉴定结果

M: DL15000; 1、3、5: *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切结果; 2、4、6: *Xho* I 和 *Cla* I 双酶切结果(酶切顺序均为 pRNAi-861、pRNAi-432、pRNAi-279)。

2.2 原核载体构建和鉴定 以 OZ-LIC 法构建载体后,转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,37 ℃ 培养后,挑取单菌落摇菌,提取质粒分别命名为 pRNAi-861、pRNAi-432、pRNAi-279。

酶切鉴定: 做了 2 种酶切鉴定,如图 3 所示: 1) 因为目的片段中没有 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点,因此 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切质粒产生 3 条片段,第 1 条是 9.7 kb 的载体片段,第 2 条是 1 053 bp 加上目的片段(861、432、279),最后 1 条是 622 bp 加上目的片段(同前所述)。2) *Xho* I 和 *Cla* I 双酶切质粒,产生 4 条片段,第 2 条片段为需回收的发卡结构,861 的目的片段大小约为 3 351 bp、432 的目的片段大小约为 2 493 bp、279 的目的片段大小约为 2 187 bp,均与预测片段大小一致。

2.3 dsRNA 原核表达载体的鉴定 3 种发卡结构经 *Xho* I 和 *Cla* I 双酶切后回收目的条带,分别与原核表达载体 pSP73 连接,质粒命名为 pSP73-861、pSP73-432、pSP73-279。分别转化缺陷型菌株 HT115、M-Jm109LacY 和 M-HMS174 感受态细胞后,经 37 ℃ 培养挑取单菌落摇菌,取 1 μL 菌液为模板,分别用 LIC4-8、LIC4-4、LIC4-2 与 LIC3-C 为引物做菌液 PCR,结果如图 4 所示,PCR 能扩增出与预期大小一致的 DNA 片段(934 bp、505 bp、352 bp),分别命名为 HT115-861、LacY-861、Hms-861; HT115-432、LacY-432、Hms-432; HT115-279、LacY-279、Hms-279。将 PCR 鉴定的阳性克隆制成穿刺管送 invitrogen(上海)公司测序,其结果符合预先的实验设计,说明 PRSV-CP 基因 dsRNA 原核表达载体已构建成功。

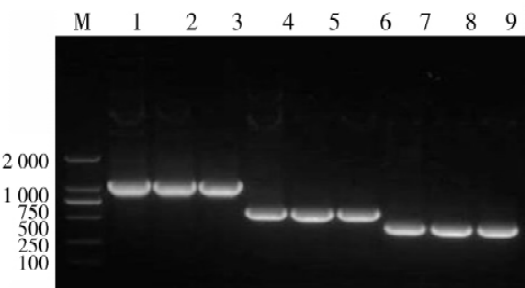


图 4 菌液 PCR 鉴定结果

M: DL2000; 1、2、3: HT115-861、LacY-861、Hms-861 扩增结果; 4、5、6: HT115-432、LacY-432、Hms-432 扩增结果; 7、8、9: HT115-279、LacY-279、Hms-279 扩增结果。

3 讨 论

dsRNA 是起始转录后基因沉默(PTGS)的关键分子。传统的构建 dsRNA 表达载体的方法通常需要多次的酶切、连接反应,这不仅耗费巨大,而且操作相对复杂、耗时。本研究所用的 OZ-LIC 法是不依赖 T_4 连接酶的克隆方法,它只需要 2 次 PCR 反应,再利用 T_4 DNA 聚合酶的外切酶活性切出互补的粘性末端后进行连接,最后转化感受态细胞就完成全部操作。相对于传统构建方法来说非常简单,而且高效。已有试验证明 dsRNA 外用可以诱导植物的病毒抗性,并在多种作物身上得到验证。早期的研究始于 Tenllado 等^[7],他们用大肠杆菌特异性菌株初步建立了辣椒轻度斑驳病毒(Pepper mild mottle virus, PMMoV)复制酶基因(PMMoV IR 54) dsRNA 的细菌大量生产体系和粗提取方法,证明用此粗提取液直接用于喷雾烟草叶面可诱导烟草对 PMMoV 的抗性。张德咏等人构建了 CMV-MP 基因 dsRNA 表达载体,直接对烟草喷施表达 dsRNA 的细菌超声波破碎液,有一定的保护和治疗效果,且保护效果好于治疗效果,发病率分别为 45% 和 75%^[3]。尹国华等人构建了 TMV-MP 基因的 dsRNA 表达载体,并用其 dsRNA 提取液和 TMV 混合接种烟草植株,抗病率为 60%^[8]。Defang Gan 等人利用含 SCMV 的 CP 基因 dsRNA 粗提物喷雾应用于玉米上,有效抑制了 SCMV 的感染^[5]。本研究构建了 PRSV-CP 基因的 dsRNA 原核表达系统,为后续研究 dsRNA 诱导 RNA 沉默奠定基础。已有的研究表明,dsRNA 是很稳定的,对 DNase 和 Rnase 均有较强的抗性^[3]。可以预见,本研究构建的 dsRNA 原核表达载体及其相关大肠杆菌工程菌株,将为防治 PRSV 病毒病研究奠定一定的物质基础。

参考文献:

- [1] TENLLADO F, CESARL, JOSERAMON D R. RNA interference as new bio-technological tool for the control of virus disease in plants [J]. *Virus Res*, 2004, 102: 85–96.
- [2] 牛娜, 牛成峰, 胡有燕, 等. 源于马铃薯 Y 病毒 CP 基因的 dsRNA 原核表达及提取 [J]. *青岛农业大学学报: 自然科学版*, 2009, 26(3): 184–187.
- [3] 张德咏, 朱春晖, 成飞雪, 等. 表达 dsRNA 的细菌提取液可抑制黄瓜花叶病毒对烟草的侵染 [J]. *植物病理学报*, 2008, 38(3): 304–311.
- [4] YIN Guo-hua, SUN Zhao-nan, LIU Nan, et al. Production of double-stranded RNA for interference with TMV infection utilizing a bacterial prokaryotic expression system [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84: 323–333.
- [5] GAN De-fang, ZHANG Jiao, JIANG Hai-bo, et al. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 1261–1268.
- [6] XU Guo-yong, SUI Ning, TANG Yang, et al. One-step, zero-background ligation-independent cloning intron-containing hairpin RNA constructs for RNAi in plants [J]. *New Phytologist*, 2010, 187: 240–250.
- [7] TENLLADO F, BELEN M G, MARISOL V, et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections [J]. *BMC Biotechnology*, 2003, 3: 3–13.
- [8] 尹国华, 刘楠, 孙兆楠, 等. 利用 Red 重组系统敲除大肠杆菌 rnc 基因构建 dsRNA 原核表达体系 [J]. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2009, 40(3): 461–464.

Fast Construction of dsRNA Prokaryotic Expression Vector of Papaya Ringspot Virus CP Gene

YAO Chen^{1, 2}, SHEN Wen-tao², YAN Pu², LI Xiao-ying², ZHOU Peng^{1, 2}

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Analysis & testing center, CATAS, Haikou 571101, China)

Abstract: In the paper, a method for constructing dsRNA prokaryotic expression vector was introduced. The conserved region of PRSV-CP gene, which is 278 bp of 3'-end region, was used as the base, three hairpin structures of different lengths (861 bp, 432 bp, 279 bp) were cloned and constructed through one-step, zero-background ligation-independent cloning (OZ-LIC) method, and which were successively cloned into pSP73 prokaryotic expression vector after being digested with *Xho* I and *Cla* I. Finally three recombinants of dsRNA prokaryotic expression plasmid of PRSV-CP gene were obtained.

Key words: PRSV-CP; dsRNA; RNA silencing; OZ-LIC method; prokaryotic expression vector