

## 生物技术

## 烟草 CN 基因的 RNA 沉默载体构建与功能分析

张改云<sup>1</sup>, 熊腾飞<sup>2</sup>, 马有志<sup>3</sup>, 郭家明<sup>2</sup>, 陈学平<sup>2</sup>

1 中国科学院南海海洋研究所, 海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广州市新港西路 164 号, 510301;

2 中国科学技术大学, 化学系, 合肥市金寨路 96 号, 230026;

3 中国农业科学院, 作物科学研究所, 北京市中关村南大街 12 号, 100081

**摘要:** 黄花烟 HZNH 是我国特有的地方种质资源, 接种烟草花叶病毒 (TMV) 后表现出超敏反应和系统获得性抗性。目前, 已从 HZNH 中克隆到 1 个同 TMV 抗病基因 N 基因同源的基因, 命名为 CN 基因。为方便利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术研究烟草 CN 基因的功能, 构建了用于 RNAi 的植物转化载体 pPZYICN。通过农杆菌介导的叶盘法转化含 N 基因的烟草 Xanthi-nc, 获得了 32 株转基因植株, TMV 接种后, 转基因 Xanthi-nc 没有丧失对 TMV 的抗性, 说明 CN 基因的 RNA 干扰载体不能沉默 N 基因的表达, 故 CN 基因可能是 HZNH 中特有的抗性基因, 从而为获得新的烟草抗病基因及抗病品种奠定基础。

**关键词:** CN 基因; 烟草花叶病毒; RNA 沉默

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2010.04.016

中图分类号: TS413, Q7 文献标识码: A 文章编号: 1004-5708(2010)04-0077-06

## The construction of tobacco CN gene RNAi vector and its function analysis

ZHANG Gai-yun<sup>1</sup>, XIONG Teng-fei<sup>2</sup>, MA You-zhi<sup>3</sup>, GUO Jia-ming<sup>2</sup>, CHEN Xue-ping<sup>2</sup>

1 Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, 164 West Xingang Road, Guangzhou 510301, China;

2 Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, 96 Jinzhai road, Hefei 230026, China;

3 Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 12 Zhongguancun South Street, Beijing 100081, China

**Abstract:** *Nicotiana rustica* L. HZNH, a China specific tobacco germplasm, displays hypersensitive response (HR) and systemic acquired resistance following infection with tobacco mosaic virus (TMV). A resistance N gene homologous, designated CN gene, had been cloned from HZNH plants by homology cloning technique. In order to identify CN gene function via RNA interference (RNAi), a plant-transformation vector, pPZYICN, suitable for generation of hairpin-RNA constructs was prepared. 32 transgenic Xanthi-nc lines were obtained by agrobacterium-mediated leaf disc transformation. Resistance to TMV was retained in transgenic Xanthi-nc plants, which suggested that RNA silence vector with CN gene fragment had no impact on N gene expression. Hence CN may be a special gene in HZNH plants. Therefore, the isolation and function analysis of the CN gene may provide candidate genes for improving tobacco tolerance to TMV.

**Key words:** CN gene; tobacco mosaic virus; RNA silence

烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus; TMV) 是烟草广泛传播的一种病毒, 世界各烟区普遍发生, 特征症状包括: 叶片呈现深绿和浅绿相间的不规则形状, 植株生

长受到抑制, 叶片畸形。TMV 严重影响了烟叶产量, 品质和市场价格, 因此已被看作是一种经济重要型病害。

目前对 TMV 具有抗性的基因只有 2 个: N 基因和 NH 基因。来自烟草 *N. glutinosa* 的 N 基因是第 1 个植物抗病基因, 用玉米转座激活子 Ac 从 TMV-U1 (TMV 的普通菌株) 抗性烟草的突变体中分离出来<sup>[1]</sup>。除了 TMV-OB 菌株外, N 基因对其他所有已知的烟草花叶病毒都具有抗性<sup>[2]</sup>。包含 N 基因的烟草对 TMV 的抗

**作者简介:** 张改云, 女, 博士, 主要从事植物或微生物的基因克隆与功能研究, E-mail: zhgyun2008@yahoo.com.cn

陈学平 (通讯作者), 男, 博士, 副教授, 主要从事烟草抗病基因的克隆与功能研究, E-mail: ustechxp@sina.com

**基金项目:** 国家烟草专卖局资助项目 (110200101006)**收稿日期:** 2009-08-23

性表现为超敏反应,超敏反应发生在病原菌侵染后的几个小时,能引起侵染位点及其附近区域的细胞快速死亡<sup>[3]</sup>,随后,植株对次级侵染表现出较强的抗性,这种植物组织中抗性的传播称为系统获得性抗性<sup>[4]</sup>。*NH*基因从烟草 *N. tabacum* cv. *Xanthi nn* 中被克隆出来,是 *N* 基因的 1 个同源基因,存在于除 *N. benthamiana* 外所有被检测的 TMV-U1 抗病烟草和感病烟草中<sup>[5]</sup>,含 *NH* 基因的 TMV-U1 感病烟草在 TMV-Cg 侵染时表现出类超敏反应,尽管会发生定点防卫反应,但是病毒继续系统性传播<sup>[5]</sup>。*N* 基因和 *NH* 基因编码蛋白都具有核苷酸结合位点(NBS),富亮氨酸重复(LRR)及果蝇 Tool 蛋白及 N 端的哺乳动物白细胞介素-1 受体(TIR)结构域。

黄花烟 HZNH 是我国特有的地方种质资源,陈学平等在进行烟草种质资源筛选时发现,接种烟草花叶病毒后 HZNH 表现出超敏反应和系统获得性抗性<sup>[6]</sup>。目前,我们已从 HZNH 中克隆到 1 个同抗病 *N* 基因和 *NH* 基因同源的基因,命名为 *CN* 基因<sup>[7]</sup>。*CN* 基因编码蛋白也属于 TIR/NBS/LRR 类。接种烟草花叶病毒后,*CN* 基因在 HZNH 中的表达增强并具有温度敏感性。组织特异性表达分析表明:*CN* 基因在叶中表达量较高,在茎中表达量较低,在根中表达量最低。通过农杆菌介导的方法将 *CN* 基因转入感烟草花叶病毒烟草 K326,转基因烟草在烟草花叶病毒接种后表现出超敏反应和系统性超敏反应<sup>[7]</sup>。

为进一步研究 *CN* 基因的功能,我们构建了用于 RNAi 的植物转化载体 pPZYICN。该载体以 pPZY110 二元载体为骨架,含有 GUS 基因片段和目的基因片段的正向和反向克隆。通过农杆菌介导的叶盘法转化烟草 *Xanthi-nc*, 获得了 32 株转基因植株, TMV 接种后,转基因 *Xanthi-nc* 没有丧失对 TMV 的抗性,说明 *CN* 基因的 RNA 干扰载体不能沉默 *N* 基因的表达,故 *CN* 基因可能是 HZNH 中特有的抗性基因,从而为获得新的烟草抗病基因及抗病品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

TMV-U1 抗性品种 *N. tabacum* cv. *Xanthi-nc*, 中国烟草地方种质 *N. rustica* L. HZNH 和 TMV-U1 感病品种 *N. tabacum* cv. K326 被用于本次研究中。*Xanthi-nc* 和 K326 由中国农业科学院烟草研究所惠赠, HZNH 由中国烟草南方育种中心惠赠。

### 1.2 质粒和菌株

质粒 pGEMCN 和 pCAMBIA1381 由北京大学秦跟

基副教授惠赠,所用其他质粒、农杆菌菌株(LBA4404)和大肠杆菌菌株(DH5 $\alpha$ )均由本实验室保存。TMV-U1 菌株由南京农业大学许志刚教授惠赠。

### 1.3 PCR 引物

*CN* 基因片段 CNF 克隆自载体 pGEMCN,引物序列如下:正向引物 CN1: 5'-GGAGAACGTAGCAGACTATGG-3',反向引物 CN2: 5'-GCAACAGGTGAGATCCAGATG-3'。GUSF 基因片段克隆自载体 pCAMBIA1381,正向引物 GUS1: 5'-GCTTCGCGTCGGCATCCG-3',反向引物 GUS2: 5'-CACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3'。卡那抗性基因扩增正向引物 NPT1: 5'-TCGGCTATGACTGGGCACAACAG-3',反向引物 NPT2: 5'-CGAGATCATCGCCGTCGGGCAT-3'。TMV 衣壳蛋白(CP)基因扩增正向引物 CP1: 5'-CAAACA-CAACAAGCTCGAACTGTC-3',反向引物 CP2: 5'-GCAGGACCAGAGGTCCAAACC-3'。

### 1.4 *CN* 基因的植物 RNA 干扰载体 pPZYICN 的构建

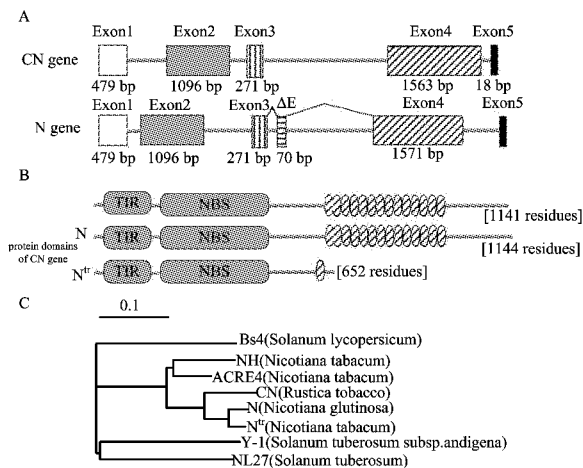
1. 用高保真酶以 CN1 和 CN2 为引物从质粒 pGEMCN 中扩出 *CN* 基因的 1014 bp 长的 DNA 片段 CNF,并从胶中回收该片段;
2. 用平端限制性内切酶 *EcoR* V 酶切质粒 pBS,并从胶中回收载体片段;
3. 将 CNF 与 pBS 连接后转化 *E. coli*;
4. 转化菌在含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素以及 IPTG 和 x-gal 的 LB 平板上筛选;
5. 白色菌落再用 PCR 筛选获得正向插入 CNF 的 pBS 质粒(命名为 pBSCNF)和反向插入 CNF 的 pBS 质粒(命名为 pABCNF);
6. 用 PCR 的方法从载体 pCAMBIA1381 载体中扩出长 1 kb 的 GUSF 片段,并克隆到 pBS 中,获得 pBS-GUSF;
7. 用 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切植物表达载体 pPZY110,并回收载体片段 PZYF;
8. 用 *Xba* I 和 *Sal* I 双酶切 pABCNF,并回收含 CNF 的片段 ABCNF;
9. 用 *Sal* I 和 *EcoR* I 双酶切 pBSGUSF,并回收含 GUSF 的片段 BSGUS;
10. 用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切 pBSCNF,并回收含 CNF 的片段 BSCNF;
11. 将 DNA 片段 PZYF、ABCNF、BSGUS 和 BSCNF 在同一体系中进行连接反应,使各片段首尾相连;
12. 转化 *E. coli* 后,在含氯霉素的 LB 培养基上筛选获得 RNA 干扰植物表达载体 pPZYICN。

## 1.5 CN 基因的植物 RNA 干扰载体 pPZYICN 的烟草转化

通过电击转化法将 pPZWCN 载体转入农杆菌菌株 LBA4404,按照 Horsch 等<sup>[8]</sup>的方法通过叶盘转化法将植物表达载体转入感病烟草 K326。转基因烟草通过卡那筛选和卡那引物扩增来进行阳性鉴定。

## 1.6 TMV 接种

TMV-U1 菌株首先在感病品种 K326 活体植株上扩繁及活化,按照 Park 等<sup>[9]</sup>的方法进行 TMV 接种,将感病 K326 叶片于磷酸缓冲液(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)中研磨,然后将含 TMV 的叶片汁液用毛笔涂抹于已洒有二氧化硅的充分伸展的叶片上,模拟接种时,用磷酸缓冲液和二氧化硅涂抹叶片,接种完成后,用自来水冲洗叶片。接种后 3~20 d,通过抗病或感病反应来评价植株对 TMV-U1 的抗感情况。



A, CN 和 N 基因基因组结构示意图;

B, CN 和 N 基因推定蛋白结构域的示意图;

C, CN 蛋白同其他 TIR-NBS 蛋白的系统发育关系

图 1 CN 基因和 N 基因的结构分析及其系统发育树

## 2 结果与分析

### 2.1 CN 基因与 N 基因的序列比较

通过同源克隆技术,1 个新的 N 基因同源基因 CN 基因,已从 HZNH 烟草中被分离出来<sup>[7]</sup>,CN 基因全长 6688 bp,由 5 个外显子和 4 个内含子组成(图 1A),其外显子序列同相应的 N 基因的外显子序列具有 90% 以上的核苷酸序列一致性,在长度上几乎相同,CN 基因同 N 基因可能在相同的位点被剪切。但是 CN 基因的内含子同 N 基因的内含子在序列和长度上都有较大差别。CN 基因的内含子 1 和内含子 3 分别为 666 bp 和 2209 bp,比相应 N 基因的内含子分别长

436 bp 和 391 bp, CN 基因的内含子 2 和内含子 4 分别为 267 bp 和 120 bp,比 N 基因相应内含子 2 和 4 分别短 575 bp 和 213 bp。

序列分析表明 CN 基因的开放阅读框为 3423 bp,编码 1 个含 1141 个氨基酸的多肽,CN 蛋白的预测分子量是 130.6 KDa,预测编码蛋白含 TIR-NBS-LRR 结构域。TIR 和 NBS 结构域位于蛋白的 N 末端,LRR 结构域位于蛋白的 C 末端,推定 CN 蛋白的 LRR 结构域包含 14 个不完全的 LRR 重复,这一点同 N 蛋白是相同的(图 1B),系统发育树进一步确定了 CN 基因和 N 基因属于相同的亚家族(图 1C)。

### 2.2 RNAi 表达载体的构建

RNA 沉默载体构建有多种方法,在此,我们构建了能形成发夹结构 RNA 的载体,转录表达后利用植物体内 DICER 切割形成沉默所需的 siRNA。采用这种方法需要 1 个与目标基因 mRNA 同源的片段,我们选取了 CN 基因中一个 1014 bp 的片段,并将此片段从载体 pGEMCN 中克隆出来(图 2)。同样,用 PCR 的方法从载体 pCAMBIA1381 中扩出长 1 kb 的 GUSF 片段(图 2)。PCR 结果如图 2 所示,产物大小与设计相符。将扩增产物分别与 pBS 载体连接并转化大肠杆菌,PCR 鉴定后选取阳性克隆测序,测序得到的序列结果与原序列相符。将植物表达载体 pPZY110,含 GUSF 基因片段的载体 pBSGUSF,含 CNF 正向插入片段的载体 pB-SCNF 和反向插入片段的载体 pABCNF 用相应的酶分别进行酶切(见材料和方法),回收 PZYF, BSGUS, BSCNF 和 ABCNF 基因片段,并将其在同一体系中进行连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5a,通过抗性筛选及 PCR 检测获得用于 CN 基因功能分析的 RNAi 植物表达载体 pPZYICN。整个载体构建过程见图 3。

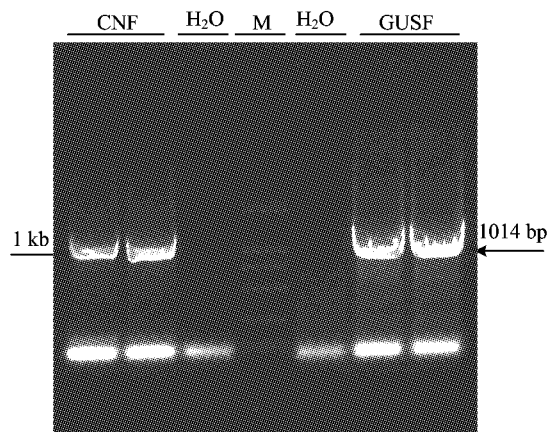


图 2 CNF 基因片段和 GUSF 基因片段的克隆

注:M:DL2000 marker; H<sub>2</sub>O:相应的水对照

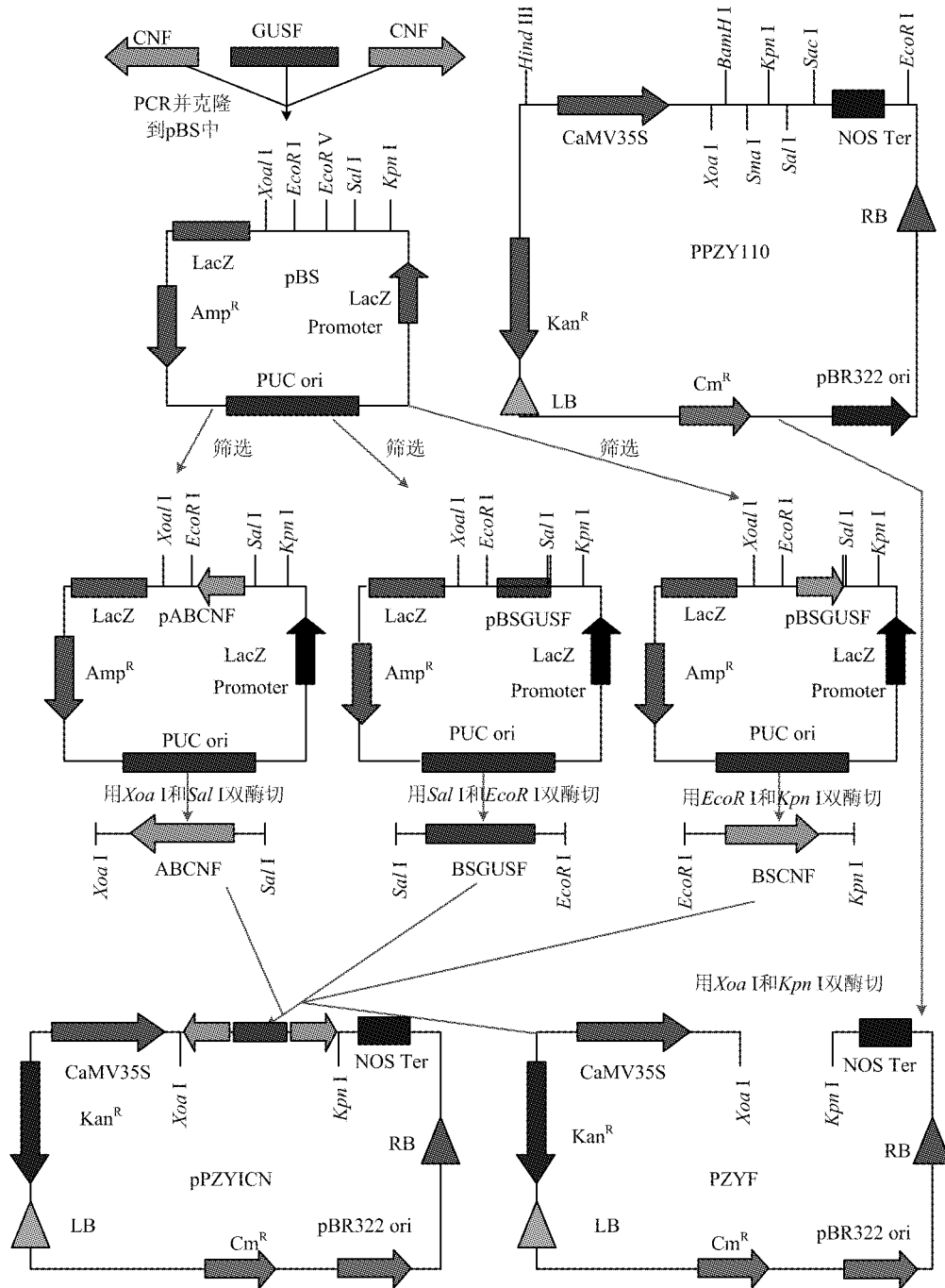


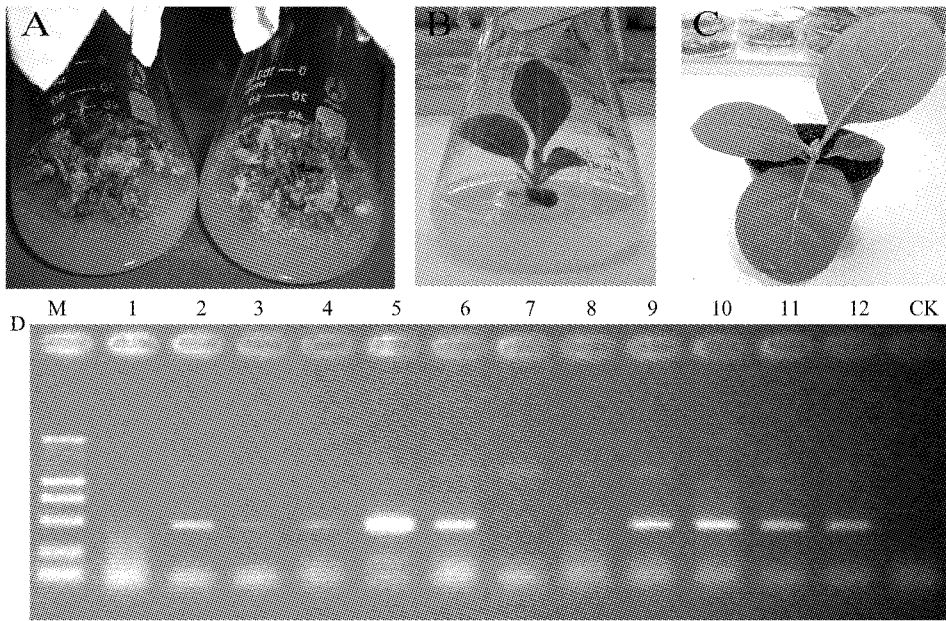
图3 CN 基因的植物 RNA 干扰载体 pPZYICN 的构建

2.3 转基因植株的获得

将含 CN 基因的 RNA 干扰植物表达载体用电击转化农杆菌 LBA4404, 并通过农杆菌介导的叶盘转化法将植物表达载体转入含 N 基因的烟草 Xanthi-nc 中, 转化后在 1/2 MS 培养基中暗培养 2 d, 然后转至分化培养基进行分化培养, 约 2~3 周以后就可以形成愈

伤组织, 在愈伤组织上可以直接分化出抗性芽(图 4A), 抗性芽生长至 2~3 cm 时, 转到生根培养基生根(图 4B), 约 3~4 周抗性芽长出根系, 转移至花盆中进行培养(图 4C)。经筛选标记 Kan<sup>r</sup> 抗性筛选及抗性 NPT II 基因的 PCR 检测后, 共获得 32 株转化体(图 4D)。

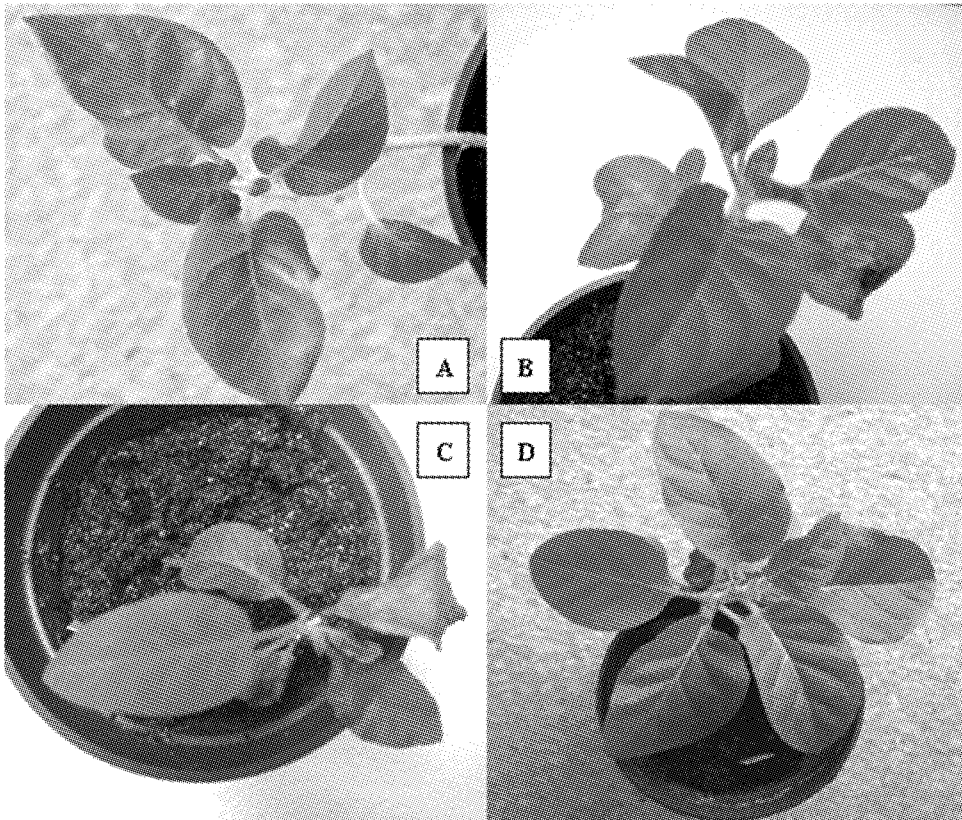




A 形成抗性芽;B 生成根系;C 形成植株;D 转基因烟草的卡那检测

图 4 转基因烟草的获得及阳性检测

注:M: DL2000 marker;CK:非转基因对照;1-12:不同的转基因烟草株系编号



A:野生型 Xanthi-nc 的 TMV 接种;B:转基因 Xanthi-nc 室温条件下的 TMV 接种;C:转基因 Xanthi-nc 植株 TMV 接种后于 32℃ 保持 48h,然后再置于室温正常培养。D:野生型 K326 的 TMV 接种

图 5 野生型及转基因植株的 TMV 接种



## 2.4 转基因烟草的 TMV 接种

为检测 *CN* 基因沉默载体是否在 *Xanthi-nc* 转基因植株中起到预期的作用,我们对转基因 *Xanthi-nc* 进行了 TMV 接种试验,并比较了转基因和野生型 *xanthi-nc* 以及野生型 K326 在接种 TMV 前后的变化(图 5)。野生型 *xanthi-nc* 接种 TMV 后出现明显的坏死斑(图 5A),而对 TMV 敏感的野生型 K326 叶片没有明显的变化(图 5D,花叶症状在 10 d 之后出现);坏死斑同样出现在转基因 *Xanthi-nc* 的烟草叶片上(图 5B),且接种 TMV 后于 30 °C 以上培养 2 d,再置于室温的转基因 *Xanthi-nc* 烟草有更明显的超敏反应(图 5C)。图 5A 中坏死斑明显小而且数量少,这是由于接种的 TMV 浓度不同造成的。在其他的重复试验中也证明了浓度越大,坏死斑越多。

TMV 衣壳蛋白是 TMV 在植物中进行系统传播所必须的蛋白。为验证在转基因植株未出现坏死斑的叶片内是否含有 TMV 病毒,我们检测了 TMV 壳蛋白(*CP*)基因的表达情况(图 6)。和预期结果相同,在接种叶片上检测到了 TMV 病毒的存在,而未出现坏死的叶片上则没有检测到 TMV 病毒的存在,这进一步证明了转基因 *xanthi-nc* 没有丧失抗病特性。此外,我们还发现在烟草的下部叶片接种较大浓度的 TMV 时,能引起同侧上部叶片发生超敏反应,这可能是由于发生超敏反应的坏死组织不能限制过多的 TMV 病毒,从而一定量的 TMV 沿着韧皮等组织向上传播的结果。

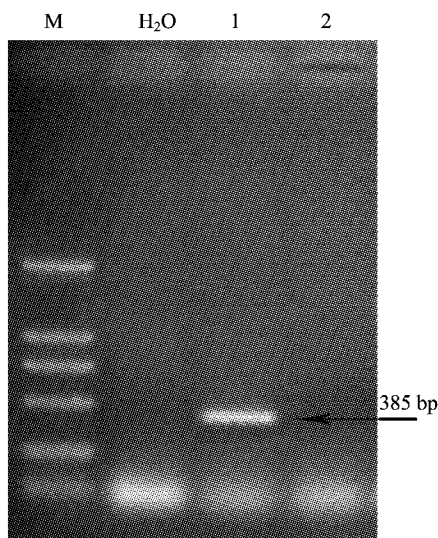


图 6 TMV CP 基因的检测

注: M: DL2000 marker; H<sub>2</sub>O: 水对照; 1: 接种植株接种叶片(有坏死斑); 2: 接种植株非接种叶片(无坏死斑叶片)。

## 3 结论

用同源克隆法,我们已从中国特有的高抗 TMV 的烟草种质 HZNH 中克隆到 1 个与 *N* 基因等抗病基因具有高度相似性的抗病候选基因 *CN* 基因,该基因全长 3426 bp,编码一个含有 1141 个氨基酸残基的蛋白,之前,我们已通过农杆菌介导的方法将 *CN* 基因转入感烟草花叶病毒烟草 K326,转基因烟草在烟草花叶病毒接种后表现出超敏反应和系统性超敏反应<sup>[7]</sup>。在本研究中,我们通过 RNA 干扰技术进一步验证了 *CN* 基因的功能,构建了用于 RNAi 的 *CN* 基因的植物转化载体 pPZYICN,通过农杆菌介导的叶盘法转化烟草 *Xanthi-nc*,获得了 32 株转基因植株, TMV 接种后,转基因 *Xanthi-nc* 没有丧失对 TMV 的抗性,说明 *CN* 基因的 RNA 干扰载体不能沉默 *N* 基因的表达,故 *CN* 基因可能是 HZNH 中特有的抗性基因,从而为获得新的烟草抗病基因及抗病品种奠定基础。

## 参考文献

- [1] Whitham S, Dinesh-Kumar S P, Choi D, et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor[J]. *Cell*, 1994, 78(6):1101-1115.
- [2] Tobias I, Rast B, Maat D Z. Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: comparative host reactions and serological relationships[J]. *Eur J Plant Pathol*, 1982, 88:257-268.
- [3] Morel J B, Dangl J L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants[J]. *Cell Death Differ*, 1997, 4: 671-683.
- [4] Ryals J, Uknes S, Ward E. Systemic acquired resistance[J]. *Plant Physiol*, 1994, 104:1109-1112.
- [5] Stange C, Matus J T, Elorza A, et al. Identification and characterization of a novel tobacco mosaic virus resistance *N* gene homologous in *Nicotiana tabacum* plants[J]. *Funct Plant Biol*, 2004, 31(2):149-158.
- [6] 陈学平,夏凯,孔繁明,等. 烟草品种对 TMV 抗性差异的比较研究[J]. *中国烟草科学*, 2001(1):1-3.
- [7] Zhang Gaiyun, Chen Ming, Guo Jiaming, et al. Isolation and Characteristics of the *CN* Gene, a Tobacco Mosaic Virus Resistance *N* Gene Homolog, from Tobacco [J]. *Biochem Genet*, 2009, 47:301-314.
- [8] Horsch R B, Fry J, Hoffmann N, et al. Leaf disc transformation. In: Gelvin S B, Schilperoort R A (eds) *Plant molecular biology manual*[M]. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 1988:1-9.
- [9] Park J M, Park C J, Lee S B, et al. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco[J]. *Plant Cell*, 2001, 13:1035-1046.