

## 柑橘衰退病毒基因 RNAi 载体的构建

李芳<sup>1,2</sup>, 邓子牛<sup>1,2</sup>, 赵亚<sup>1,2</sup>, 李大志<sup>1,2</sup>, 戴素明<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家柑橘改良中心长沙分中心, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 基于转化病毒基因介导抗性, 通过在植物表达载体 pCAMBIA 2301 上插入启动子-内含子-终止子的方式, 构建一种含有发夹结构的、通用型强的 RNAi 载体骨架结构; 以柑橘衰退病毒(citrus tristeza virus, CTV)的 *p25*、*p20* 和 *p23* 基因保守序列为模板设计正向片段和反向片段, 先后与骨架载体连接, 成功构建了 3 个 RNAi 载体(分别命名为 ds2301-p25、ds2301-p20 和 ds2301-p23), 并将载体 ds2301-p23 注射入墨西哥莱蒙叶片。制作 *p23* 基因的地高辛标记探针, 用 Northern 杂交检测是否有 siRNA 产生。结果表明: 用 Northern 杂交可以检测到 *p23* 特异的 siRNA, 在墨西哥莱蒙叶片中瞬时表达的农杆菌 ds2301-p23 可以发生 RNAi, 表达有效的 siRNA。本研究中构建的骨架载体可以广泛用于 RNAi 载体的构建, 含有柑橘衰退病毒基因片段的 3 个载体可以用于基因功能分析及具有 CTV 抗性的柑橘种质资源获得。

**关 键 词:** 柑橘; 柑橘衰退病毒; RNAi 载体; 载体构建

中图分类号: Q946.8

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2017)02-00140-05

## Construction the RNAi vector for virus genes of Citrus tristeza

LI Fang<sup>1,2</sup>, DENG Ziniu<sup>1,2</sup>, ZHAO Ya<sup>1,2</sup>, LI Dazhi<sup>1,2</sup>, DAI Suming<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.National Center for Citrus Improvement Changsha, Changsha 410128, China)

**Abstract:** According to the pathogen-derived resistance, a framework of a universal RNAi vector with hairpin structure was constructed by inserting a CaMV35s promoter-intron-terminator into a plasmid of pCAMBIA 2301. By adopting the conservation sequence of virus gene *p25*, *p20* and *p23* in Citrus tristeza as templates, three RNAi vectors, including ds2301-p25, ds2301-p20 and ds2301-p23, were separately obtained through inserting three pairs of positive-sense strand and antisense strand into the RNAi vector framework, and the ds2301-p23 was infiltrated into Mexican lime leaves at the same time. Northern blot detection approach was adopted to find the specific siRNA in probe of gene *p23* labeled with digoxigenin. The results showed that the transient expression of *Agrobacterium* in Mexican leaves could triggered RNAi and generated specific siRNA, which indicated that the framework of RNAi vector was successfully constructed, and the three vectors with CTV virus gene segments could be applied in the analysis of gene function and the selection of resistance resource.

**Keywords:** Citrus; citrus tristeza virus (CTV) vector; RNAi; vector construction

柑橘衰退病是由柑橘衰退病毒(citrus tristeza virus, CTV)引起的一种发病范围广、危害较大的病害, 可以侵染柑橘属和部分柑橘属近缘植物, 严重制约全球柑橘产业的平稳发展。柑橘衰退病存在复

杂的株系分化现象<sup>[1]</sup>。不同病毒分离株在寄主上会出现树势衰退、矮化、茎陷点和果实产量与品质下降等症状, 严重者可导致树体死亡。对于 CTV 的防治, 种植无病毒种苗、弱毒系交叉保护(mild strain

收稿日期: 2016-04-19

修回日期: 2016-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(300900972, 3157211); 公益性行业(农业)科研专项(201203076-06); 湖南省研究生科研创新项目(CX2013B290)

作者简介: 李芳(1984—), 女, 山东潍坊人, 博士研究生, 主要从事果树分子技术与资源研究, lifang200709@126.com; \*通信作者, 戴素明, 博士, 助理研究员, 主要从事果树生物技术与育种研究, dsm531@126.com

cross protection , MSCP)和病毒基因介导抗性 (pathogen-derived resistance , PDR)是当前应用较广泛的方法。CTV 病毒可以通过田间带毒蚜虫传播。弱毒系交叉保护往往受地域性、株系专化性等影响。随着分子生物学技术在植物病毒病防治领域的应用,病毒基因介导抗性已成为柑橘衰退病防治研究的重要方法。该方法通过构建 RNAi 载体,导入与病毒基因同源的片段,产生 siRNA 与特异基因配对,引发基因沉默或者被抑制,是病毒基因功能研究的有效方法<sup>[2-4]</sup>。刘静等<sup>[5]</sup>构建了马铃薯 Y 病毒(potato virus Y , PVY) CP 基因发夹结构的 RNAi 载体,获得了具有马铃薯 Y 病毒抗性的转基因植株。LÓPEZ 等<sup>[6]</sup>获得了含 CTV p23+3'UTR 部分基因片段 RNAi 载体的墨西哥莱蒙(*Citrus aurantifolia*),并证实转发夹结构载体的转基因株系更具有抗病性。转带有内含子的发夹结构是获得具有病毒抗性转基因植株的有效方式<sup>[7]</sup>。笔者建立一种含有内含子的 RNAi 载体,并以此为骨架结构快速构建含 CTV 的基因载体。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

感染 CTV 的墨西哥莱蒙 S42(毒系为 T36),用于瞬时表达的墨西哥莱蒙植株,载体 pFGC5941、

pCHF 3 和 pCAMBIA 2301,农杆菌 EHA105 均由国家柑橘改良中心长沙分中心提供。

PCR 回收试剂盒、克隆试剂盒和 RNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;随机引物、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTP Mixtrue 购自宝生物工程(大连)有限公司;限制性内切酶购自 Thermo Fisher 公司,small RNA 提取试剂盒购自 Ambion 公司;地高辛杂交试剂盒购自 Roche 公司。引物合成及测序均由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.2 目的基因片段的扩增和克隆

根据 NCBI 公布的 CTV 基因组序列,选取 *p25*、*p20* 和 *p23* 基因的保守序列片段设计引物,构建 RNAi 载体发夹结构上的双链部分(表 1)。正向插入序列片段的上、下游引物引入 *Xba* I 和 *Pst* I 酶切位点,反向插入片段的上、下游引物引入 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点,并分别加保护性碱基。提取墨西哥莱蒙 S42 叶片的 RNA,并将其反转录为 cDNA,并以此 cDNA 为模板扩增目的片段。PCR 反应体系:dNTP Mixtrue (各 1 mmol/L) 5 μL,引物(10 μmol/μL) 0.5 μL,*Taq* DNA 聚合酶(2 U/μL) 0.5 μL,10 × PCR Buffer 2.5 μL,cDNA 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 14 μL。反应步骤:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 60 s,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。

表1 用于载体构建的基因引物

| Table 1 Sequence information for vector constructions |                                            |       |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|
| 基因                                                    | 序列 (5'—3')                                 | 长度/bp |
| <i>p25</i>                                            | 25FF: <u>ACTCTAGAGCCGCTTTGAACAGAGAT</u>    | 451   |
|                                                       | 25FR: <u>ATCTGCAGATCCGCACACAGGTAATG</u>    |       |
|                                                       | 25RF: <u>ATGGATCCGCGCTTTGAACAGAGAT</u>     |       |
|                                                       | 25RR: <u>ATGAGCTCATCCGCACACAGGTAATG</u>    |       |
| <i>p20</i>                                            | 20FF: <u>GGTCTAGATGTGCGATCCTAGCGTAACT</u>  | 401   |
|                                                       | 20FR: <u>ATCTGCAGGCTCGCTCGCTAAAATCTAG</u>  |       |
|                                                       | 20RF: <u>ATGGATCCTGTGCGATCCTAGCGTAACT</u>  |       |
|                                                       | 20RR: <u>ATGAGCTCGCTCGCTCGCTAAAATCTAG</u>  |       |
| <i>p23</i>                                            | 23FF: <u>ACTCTAGATCCCTTCATTATCGACGC</u>    | 439   |
|                                                       | 23FR: <u>ATCTGCAGCCAACGTTTACAGCGTTG</u>    |       |
|                                                       | 23RF: <u>ATGGATCCTCCCTTCATTATCGACGC</u>    |       |
|                                                       | 23RR: <u>ATGAGCTCCCAACGTTTACAGCGTTG</u>    |       |
| <i>intron</i>                                         | CHSAF: <u>GGATCCTGTTACATTATTACATTCAACG</u> | 1286  |
|                                                       | CHSAR: <u>TCTAGACCAAGGCAAGTGAAGTAAGTG</u>  |       |

斜体标注部分为保护碱基;下划线标注部分为限制性内切酶酶切位点。

以大肠杆菌 pFGC 5941 的内含子部分序列为模板设计引物(上、下游引物分别设计酶切位点 *Bam*H I 和 *Xba* I,表 1)。按前叙 PCR 方法扩增目的片段,用以构建发夹结构 RNAi 载体内含子的部

分序列。

分别将回收、纯化的上述 PCR 产物与 pGM-T 载体连接并转化大肠杆菌 DH5α。通过蓝白斑筛选,挑选阳性克隆子摇菌,并进行菌液 PCR 检测,于检测

为阳性的菌液中提取质粒送测序。将测序正确的重组质粒分别命名为 p25-TF/R、p23-TF/R、p20-TF/R 和 intron-T。

### 1.3 柑橘衰退病毒基因 RNAi 载体的构建

于载体 pCHF 3 和 pCAMBIA 2301 中提取质粒后,用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切。将酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。从酶切后的载体 pCHF 3 中回收短片段,从 pCAMBIA 2301 中回收长片段,回收得到的长、短片段用 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶在 16 ℃ 条件下过夜连接。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。将经双酶切验证后的阳性克隆子菌落命名为 2301-35s。用 *Xba* I 和 *Bam*H I 分别对质粒

2301-35s 和 intron-T 进行双酶切,按同样的方法进行回收、连接、转化和双酶切验证,将阳性重组质粒命名为 ds2301。

将含有 CTV *p23* 基因序列片段的载体 p23-TF 和 p23-TR 分别用内切酶 *Pst* I-*Xba* I 和 *Bam*H I-*Eco*R I 进行双酶切,回收的产物先后与质粒 ds2301 连接,将最终得到的重组质粒命名为 ds2301-p23(图 1)。将含有 CTV *p25* 和 *p20* 基因序列片段的 RNAi 载体按同样的方法完成构建,将得到的重组质粒分别命名为 ds2301-p25 和 ds2301-p20。将构建好的以上载体通过热激法转化至农杆菌 EHA 105。

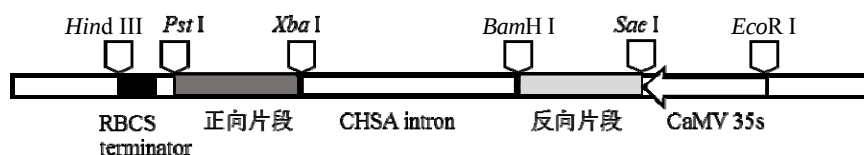


图1 载体ds2301-p23

Fig.1 Vector ds2301-p23

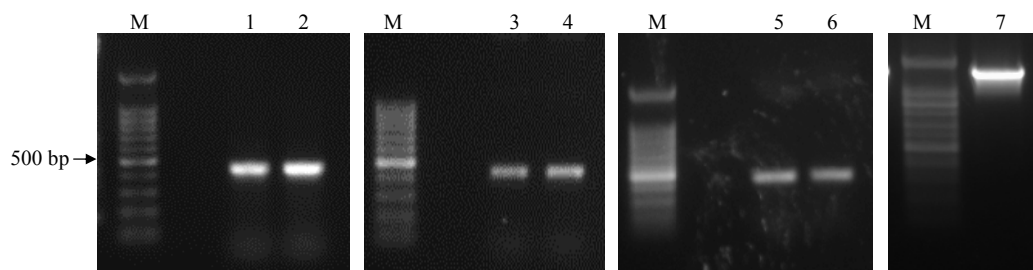
### 1.4 特异 siRNA 的检测

农杆菌 ds2301-p23 经缓冲液重悬后,注入墨西哥莱蒙叶片会发生瞬时表达<sup>[8]</sup>。提取瞬时表达叶片的总 RNA,分离得到 small RNA。将 small RNA 经普通聚丙烯酰胺胶电泳后转至尼龙膜。按照地高辛杂交试剂盒说明书制备探针(F 为 CTCGATGCCTTA TCGTGTCTTCTACC R 为 TCCACGAAAGCAACA CAGCTAGTAC)。经过预杂交、杂交、洗膜等程序,待条带在尼龙膜上呈现后,将结果拍照保存。按同样的方法操作,将发生瞬时表达的农杆菌 pCAMBIA 2301 设为阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因片段的获得

以感染 CTV 的墨西哥莱蒙 S42 的 RNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增 *p25*、*p20* 和 *p23* 基因的含有酶切位点的正向和反向片段,分别得到约 451、401、439 bp 的单一一条带,没有非特异性扩增,测序结果证实扩增产物为目的基因片段。以大肠杆菌 pFGC 5941 为模板,PCR 扩增查尔斯合成酮内含子片段,得到约 1 286 bp 的条带。条带大小与预期目的片段的相符(图 2)。



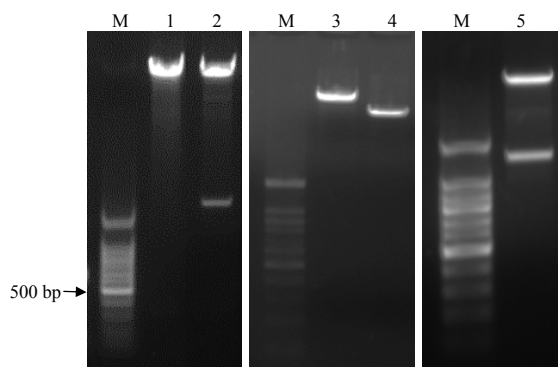
M 100 bp DNA Marker ;1, 2 *p25* 的正向和反向片段 ;3, 4 *p20* 的正向和反向片段 ;5, 6 *p23* 的正向和反向片段 ;7 载体 pFGC5941 内含子的扩增产物。

图2 *p25*、*p20*、*p23*和内含子扩增产物的电泳结果

Fig.2 Electrophoresis of PCR amplified products of *p25*, *p20*, *p23* and CHSA intron

## 2.2 RNAi 载体的构建结果

质粒 pCHF 3 和 pCAMBIA 2301 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后,分别得到预期的目的条带(图 3)。酶切后的 pCHF 3 产生的小片段约为 1 541 bp,此片段序列即为含 CaMV 35S 启动子和 RBCS terminator 的结构;质粒 intron-T 经 *Xba* I 和 *Bam*HI 双酶切后得到约 1 286 bp 的条带。条带大小与预期片段大小相符,表明酶切产物为内含子结构。

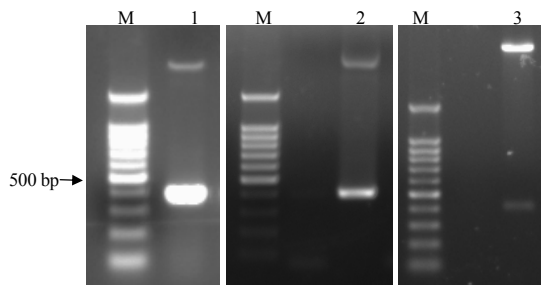


1 载体 pCHF 3; 2 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的载体 pCHF 3; 3 载体 pCAMBIA 2301; 4 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的载体 pCAMBIA 2301; 5 经 *Xba* I 和 *Bam*HI 双酶切的载体 intron-T; M 100 bp DNA Marker。

图3 酶切产物的电泳结果

Fig.3 Electrophoresis of enzyme digestion results

质粒 p23-TF 和 p23-TR 分别经内切酶 *Pst* I-*Xba* I 和 *Bam*HI-*Sac* I 两两组合双酶切后,产生约 439 bp 的单一目的条带,质粒 p25-TF/R 经双酶切后产生约 451 bp 的目的条带,质粒 p20-TF/R 经双酶切后产生约 401 bp 的目的条带。以上条带的大小均与其预期条带大小一致。得到的序列片断为 RNAi 载体发夹结构的双链结构(图 4)。



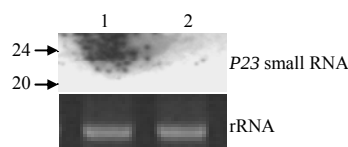
1 载体 p25-TF; 2 载体 p20-TF; 3 载体 p23-TF; M 100 bp DNA Marker。

图4 含有CTV 基因正向插入片段载体酶切产物的电泳结果

Fig.4 Electrophoresis of enzyme digestion results of vectors with forward segments

## 2.3 p23 特异 siRNA 的瞬时表达检测

注射后第 3 天提取叶片总 RNA,分离得到 small RNA。Northern 杂交检测结果表明,从注射 ds2301-p23 载体墨西哥莱蒙叶片中提取到的 rRNA 能够与探针结合,并检测出了特异条带,构建的 RNAi 载体在柑橘中能够诱发 RNAi,产生 p23 特异的 siRNA。从注射农杆菌 pCAMBIA 2301 墨西哥莱蒙叶片的 rRNA 中没有检测到特异条带(图 5)。结果表明,构建的 RNAi 载体能够在柑橘叶片中发生瞬时表达,产生特异的 siRNA。



1 农杆菌 ds2301-p23; 2 农杆菌 pCAMBIA 2301。

图5 Northern杂交检测p23特异的siRNA

Fig.5 Result of p23 specific siRNA detected from Northern blot

## 3 结论讨论

本研究将 CaMV 35S 启动子-终止子和查尔斯合成酮内含子连接到植物表达载体 pCAMBIA 2301,获得一个 RNAi 载体的骨架结构。CTV p25、p20 和 p23 基因的保守序列分别按正、反向插入到骨架结构的两端,形成互补的反向重复序列。该反向重复序列即为 RNAi 载体。用 Northern 杂交检测 siRNA,证实此载体已构建成功。

RNAi 载体构建方式有 3 种,即插入正向片段、反向片段和带有 intron 的发夹结构,其中互补的发夹结构载体在转化植物后更能产生抗性<sup>[9-11]</sup>。在含有发夹结构的 RNAi 载体中,插入的基因片段长度影响转基因植株的抗病性,目的基因以 300~600 bp 最容易获得抗性<sup>[12]</sup>。本研究设计中设计 CTV 基因保守序列用于构建 RNAi 载体,满足了最大可能获得抗病性序列片段长度的要求,也不会产生病毒蛋白,安全性高,并且转入不同 CTV 毒系的基因保守序列后得到的转基因植株能够产生广谱抗性。

关于柑橘 RNAi 载体抗病毒的研究较多,Soler 等<sup>[13]</sup>构建含有 p25+p23+p20 序列全长的发夹结构,获得了具有 CTV 抗性的墨西哥莱蒙。CHENG 等<sup>[14]</sup>以 p20 基因长片段序列和短片段序列相连的方式构建了 dsRNA 结构的载体,获得了具有 CTV 抗性的

酸橙, 而 *p23* 基因 RNAi 载体的构建因与植物表达载体酶切位点冲突而失败。本研究中所用的植物表达载体 pCABMIC 2301 含有 2 个 CaMV 35S 启动子, 分别启动下游的 *gus* 和 *npt II* 基因, 通过在此载体上插入第 3 个启动子和终止子连接入查尔斯合成酮内含子的方式, 形成一种用于构建 dsRNA 结构的骨架载体。此载体上有多个常用的限制性内切酶酶切位点, 目标基因与载体连接时选择范围大, 载体构建效率高。通过 Northern 杂交, 检测到瞬时表达农杆菌 ds2301-*p23* 柑橘叶片中 *p23* 特异的 siRNA, 进一步证明了所构建载体的有效性。笔者将进一步分析含有 *p25* 和 *p20* 基因的 RNAi 载体的抗病效果, 以获得具有抗性的转基因柑橘。

#### 参考文献:

- [1] 周彦, 王雪峰, 刘科宏, 等. 柑橘衰退病毒株系比对 [C]//中国植物病理学会 2005 年学术年会暨植物病理学报创刊 50 周年纪念会论文集, 2005.
- [2] GUTIÉRREZ-E M A, LUTH D, MOORE G A. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of Citrus tristeza virus[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(11): 745-753. DOI:10.1007/s002990050313.
- [3] ANANTHAKRISHNAN G, ORBOVIĆ V, PASQUALI G, et al. Transfer of citrus tristeza virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation [J]. In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2007, 43(6): 593-601. DOI:10.1007/s11627-007-9059-0.
- [4] MUNIZ F R, DE SOUZA A J, STIPP L C L, et al. Genetic transformation of *Citrus sinensis* with citrus tristeza virus (CTV) derived sequences and reaction of transgenic lines to CTV infection[J]. Biologia Plantarum, 2011, 56(1): 162-166. DOI:10.1007/s10535-011-0195-3.
- [5] 刘静, 陈雪梅, 宋云枝, 等. 马铃薯 Y 病毒 HC-Pro、CI、NIb 和 CP 基因介导的病毒抗性比较研究[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 57-65.
- [6] LÓPEZ C, CERVERA M, FAGOAGA C, et al. Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against citrus tristeza virus in transgenic Mexican lime[J]. Mol Plant Pathol, 2010, 11(1): 33-41. DOI:10.1111/j.1364-3703.2009.00566.x.
- [7] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811. DOI:10.1038/35888.
- [8] LI F, DAI S M, DENG Z N, et al. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transient expression in *Citrus*[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(3): 572-579. DOI:10.1016/j.s2095-3119(16)61460-0.
- [9] SMITH N A, SINGH S P, WANG M B, et al. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs[J]. Nature, 2000, 407(6802): 319-320. DOI:10.1038/35030305.
- [10] WESLEY S V, HELLIWELL C A, SMITH N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants[J]. Plant J, 2001, 27(6): 581-590. DOI:10.1046/j.1365-3113x.2001.01105.x.
- [11] HOFVANDER P, ANDERSSON M, LARSSON C T, et al. Field performance and starch characteristics of high-amylose potatoes obtained by antisense gene targeting of two branching enzymes[J]. Plant Biotechnol J, 2004, 2(4): 311-320. DOI:10.1111/j.1467-7652.2004.00073.x.
- [12] HELLIWELL C, WATERHOUSE P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants [J]. Methods, 2003, 30(4): 289-295. DOI:10.1016/s1046-2023(03)00036-7.
- [13] SOLER N, PLOMER M, FAGOAGA C, et al. Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of citrus tristeza virus confers complete resistance to the virus[J]. Plant Biotechnol J, 2012, 10(5): 597-608. DOI:10.1111/j.1467-7652.2012.00691.x.
- [14] CHENG C Z, YANG J W, YAN H B, et al. Expressing *p20* hairpin RNA of citrus tristeza virus confers *Citrus aurantium* with tolerance/resistance against stem pitting and seedling yellow CTV strains[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(9): 1767-1777.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库