

烟粉虱内共生菌传毒相关 *groEL* 基因 dsRNA 载体的构建及其在烟草中的表达

唐前君^{1,2}, 张德咏², 刘勇², 李基光¹, 谢丙炎³, 肖启明^{1*}

(1.湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省农业科学院 植物保护研究所, 湖南 长沙 410125; 3.中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 烟粉虱内共生菌 *groEL* 基因编码一种与植物病毒传毒相关的 GroEL 蛋白。以 B 型烟粉虱为研究对象, 利用 1 对特异引物, 对 B 型烟粉虱体内的 *groEL* 基因进行 PCR 扩增, 选取 502 bp *groEL* 基因片段构建 dsRNA, 并将其连接植物表达载体 pBIN19, 将重组质粒电激转化农杆菌菌株 LBA4404。采用农杆菌浸染转化本氏烟草, PCR 筛选表明, 目的片段已整合至转基因植株的基因组 DNA; RT-PCR 结果表明, 502 bp 的 *groEL* 基因片段在转基因植株中被转录。

关 键 词: 烟粉虱; *groEL* 基因; 内共生菌; 病毒结合蛋白; 双生病毒; 植物表达载体

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)06-0620-06

Construction of dsRNA vector for a viral binding protein gene(*groEL*) from endosymbionts in *Bemisia tabaci* and its expression analysis in transgenic *Nicotiana benthamiana*

TANG Qian-jun^{1,2}, ZHANG De-yong², LIU Yong², LI Ji-guang¹, XIE Bing-yan³, XIAO Qi-ming^{1*}

(1.College of Bio-Safety Science and Technology, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agriculture Science, Changsha 410125, China; 3.Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: GroEL, a viral binding protein encoding by *groEL* gene from endosymbionts in *Bemisia tabaci*, is an important factor in transmission of plant viruses. In this study, 502 bp fragment of *groEL* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then ligated to the plant expression vector pBIN19. The recombination vector pBIN19::*groEL* was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 by electroporation. Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants were acquired by *Agrobacterium*-mediated approach. PCR and RT-PCR were performed to analyze *groEL*'s transformation and expression in transgenic plants, respectively. The results indicated that *groEL* gene was not only integrated into chromosome DNA of transgenic *N. benthamiana*, but also transcribed in transgenic plants successfully.

Key words: *Bemisia tabaci*; *groEL* gene; endosymbiont; viral binding protein; geminiviruses; plant expression vector

烟粉虱(*Bemisia tabaci*)属同翅目、粉虱科、小粉虱属, 广泛分布于除南极洲外各大洲的90多个国家地区。烟粉虱的大暴发往往伴随着其所传播的病毒病的大暴发^[1]。有研究表明, B型烟粉虱的大

收稿日期: 2010-04-16

基金项目: 国家“863”计划项目(2008AA10Z407); 湖南省杰出青年基金项目(08JJ1004); 国家自然科学基金项目(30871619)

作者简介: 唐前君(1978—), 男, 湖南邵阳市人, 博士, 主要从事植物病毒学研究; *通讯作者, Xqm-Xqm@sohu.com

发生可能导致许多新病毒的大暴发^[2-6]。烟粉虱是双生病毒特定的传毒介体,因此双生病毒也称烟粉虱传双生病毒(whitefly-transmitted geminiviruses, WTG)^[7]。自20世纪90年代以来,随着B型烟粉虱的大发生,由烟粉虱传播的双生病毒已在多个国家和地区多种作物上造成毁灭性危害^[8-9],此外,烟粉虱还传播植物细菌病害和真菌病害^[10]。双生病毒在烟粉虱体内循环,经烟粉虱口针摄入,进入食管和消化道,主动穿过介体肠膜进入血淋巴,再到达唾液腺,最后在唾管内与唾液混合,并经唾管排出体外^[11],它的结构简单,容易遭到外源酶的破坏,因此,在侵入昆虫体内的过程中需要一种自我保护机制。研究表明,昆虫内共生菌产生的GroEL分子伴侣蛋白(hsp60家族的成员)可能对病毒在介体昆虫体内的循环起保护作用。有研究^[12]表明,黄症病毒与内共生菌分子伴侣GroEL在蚜虫体内相互作用,GroEL对病毒的存留是必要的。双生病毒能在烟粉虱血淋巴中存活,同样可能是内共生菌产生的GroEL蛋白对其起到了保护作用。Morin等^[13]研究发现,烟粉虱内共生菌GroEL N-末端30个氨基酸的基本结构与桃蚜、禾谷缢管蚜、麦长管蚜的相似;体外配基分析表明,以色列番茄黄曲叶病毒病TYLCV-Is病毒粒子与GroEL表现出特异的亲和力。在烟粉虱携毒之前,用GroEL抗血清饲喂烟粉虱,烟粉虱传播的几率下降80%以上,病毒DNA在血淋巴内的含量大大减少,表明GroEL蛋白同样在烟粉虱传播病毒时起保护作用。Morin等^[14]克隆了烟粉虱的*groEL*基因,并利用酵母双杂交分别研究了TYLCV-s和AbMV-Is的外壳蛋白(CP)与烟粉虱GroEL的互作,结果发现2种病毒的CP均能与GroEL蛋白结合,不同的是TYLCV-Is能够被烟粉虱传播,而AbMV-Is不能被烟粉虱传播。这说明内共生菌产生的GroEL蛋白对病毒起着保护作用,使病毒进入昆虫体内后得以存活,因此,利用RNA沉默阻断烟粉虱内共生菌GroEL蛋白的表达,进而切断病毒的传播途径,可提高对植物病毒病的防治效果。笔者克隆了B型烟粉虱内共生菌产生的*groEL*基因,随机选取其中的部分基因构建dsRNA,转入烟草,利用含*groEL*基因片段的转基因烟草饲养B型烟粉虱,诱导其体内*groEL*基因的RNA沉默,进入烟粉虱体内

的双生病毒失去保护机制,从而使烟粉虱丧失传毒功能,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

B型烟粉虱(冰冻成虫死体),由中国农业科学院蔬菜花卉研究所张友军教授提供;本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)种子和菌种*E.coli* NM522由湖南省植物保护研究所保存;农杆菌LBA4404由中国农业科学院蔬菜花卉研究所黄三文教授提供;植物表达载体pBIN19(含韧皮部特异性表达启动子rolC)由意大利维罗纳大学Spena教授惠赠。

限制性内切酶购自Fermentas公司;*T₄*连接酶、*Taq*DNA聚合酶和反转录酶购自大连宝生物公司;氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、链霉素(Sm)、利福平(Rif)、RNase A和胶回收试剂盒为上海生工生物技术工程服务有限公司产品;PGEM-TEasy载体购自Promega公司;引物由上海生工生物技术工程服务有限公司合成。

细菌培养采用LB、YEP培养基;浸染培养基采用MS0;共培养基:MS+1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;选择培养基:MS+1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+50 mg/L Kan+250 mg/L头孢霉素;生根培养基:MS+0.2 mg/L NAA+30 mg/L Kan+250 mg/L头孢霉素。

1.2 方法

1.2.1 *groEL* 基因的克隆

采用改进的SDS裂解法^[15],抽提B型烟粉虱总DNA,参照GenBank发表的烟粉虱初生内共生菌*groEL*基因序列(AY445874),根据文献^[16]公布的数据合成PCR引物,上游引物:5'-ATGGCAGCTAAAGACTTAAATTTGG-3';下游引物:5'-TACATCATACCATTATTCCGCCC-3',并参照其方法克隆*groEL*基因全序列,测序结果与其完全一致。

1.2.2 *groEL*基因片段dsRNA植物表达载体的构建

选取*groEL*基因序列中844~1345 bp区域,使用DNAMAN V5.2.2软件自行设计引物,引入相应酶切位点,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

以*groEL*基因全序列为模板,采用*Taq* DNA

polymerase 对反义链进行PCR 扩增. 上下游引物分别引入酶切位点*XhoI*和*KpnI*(引物中的下划线部分), 上游引物: 5'-AAGGTACCGGAGATCGCCG CAAAGAG-3'; 下游引物 5'-AACTCGAGTGGCA CGAAGAGCAACAC-3'. PCR扩增程序为94 °C预变性5 min, 94 °C变性45 s, 59 °C退火45 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环, 72 °C延伸10 min. PCR产物经1%的琼脂糖电泳后, 用DNA凝胶回收试剂盒回收目的片段, 回收产物用*KpnI*和*XhoI*双酶切后定向连接到同样经*KpnI*和*XhoI*双酶切的载体pBIN19上, 用热激法将克隆载体导入大肠杆菌NM522中, 在含有100 µg/mL Kan的LB平板上培养, 重组菌落经PCR初步鉴定后再提取质粒, 质粒经*KpnI*和*XhoI*双酶切鉴定后保存于-20 °C备用. 将重组子命名为pBIN19-G.

采用同样的方法扩增带限制性内切酶*BamHI*和*XbaI*的酶切位点(引物中的下划线部分)的502 bp正义链, 上游引物: 5'-TAGGATCCGGAGATCGCCG CAAAGAG-3'; 下游引物: 5'-CGTGTACATGGCA CGAAGAGCAACAC-3'. 正义链PCR产物用*BamHI*和*XbaI*双酶切后定向连接到同样用*BamHI*和*XbaI*双酶切的pBIN19-G上, 重组质粒用PCR筛选后再用*BamHI*和*XbaI*双酶切检测, 得到的重组质粒命名为pBIN19-2G, 重组质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序.

1.2.3 *groEL*基因片段dsRNA植物表达载体转化农杆菌

提取植物表达载体pBIN19-2G质粒并纯化, 用冻融法导入农杆菌LBA4404的感受态细胞中, 转化后的菌液涂布于含Kan(50 mg/L)、Rif(25 mg/L)的YEP 固体培养基中, 28 °C培养2 d后, 经PCR筛选阳性菌落, 挑取单菌落接种于含Kan和Rif的YEP液体培养基中, 28 °C振荡培养过夜, 少量提取农杆菌重组子质粒DNA作为模板进行PCR验证.

1.2.4 烟草的培养

将本氏烟草种子装入1.5 mL的离心管, 70%酒精浸45 s, 6%的NaHClO₃灭菌10~15 min, 无菌水冲洗4~5次, 接入不加任何激素的1/2 MS培养基中, 培养温度(25±2) °C, 光照度2 500 lx, 每天光照12 h, 培养15~20 d. 取无菌苗叶片, 并将其切

成0.5 cm×0.5 cm的小块, 转接到共培养基诱导其产生愈伤组织及分化不定芽, 当不定芽长至2 cm高时将其切下, 转入生根培养基上诱导生根形成完整植株. 选择长势最好的组培苗作为遗传转化的受体材料.

1.2.5 烟草的遗传转化

对未转化的烟草进行选择压力试验, 确定起始选择压力后, 通过叶盘法^[17]转化烟草, 用卡那霉素(Kan)筛选阳性植株.

1.2.6 转基因烟草的PCR检测

取200 mg 幼嫩叶片, 洗净后低温冷冻干燥后研磨成粉末, 用CTAB法提取总DNA, 干燥后溶于100 µL TE 中. 取1 µL总DNA, 用特异引物进行PCR验证. 上游引物: 5'-GCCGTATGCACCTATTTCAT GT-3'(位于内含子上); 下游引物: 5'-AATATTGT GGCCCGGAGA-3'(位于终止子上).

1.2.7 转基因烟草的RT-PCR验证

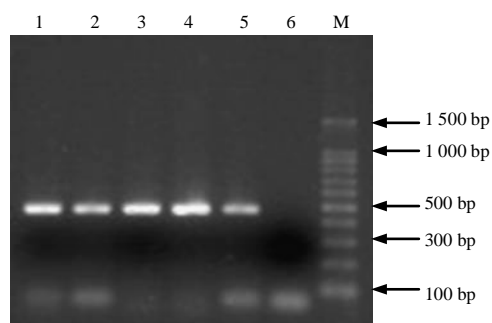
采用TRIZOL提取转基因烟草和未转基因烟草的总RNA. 用紫外分光光度计测定RNA浓度和纯度, 在200 µL管内加入1~1.5 µg RNA样品, 再加入1 µL 50 pmol/L基因正义链扩增引物的下游引物, 70 °C水浴5 min后, 立即置冰上2 min, 将处理好的RNA与下游引物混合液分成两等份, 再分别加入5×M-MLV缓冲液2 µL、RNase inhibitor 0.5 µL, dNTPs (10 mmol/L) 2 µL, M-MLV(200 U/µL)1 µL, 用RNase-free H₂O补足至10 µL, 42 °C水浴1 h后加入15 µL ddH₂O, 混匀置于72 °C, 7 min后用正义链引物进行PCR扩增.

2 结果与分析

2.1 表达载体pBIN19-2G的构建

在*groEL*基因502 bp片段正义链引入酶切位点*BamHI*和*XbaI*, 反义链引入酶切位点*KpnI*和*XhoI*, 扩增所需片段, 反义链PCR产物和pBIN19载体用*KpnI*和*XhoI*双酶切, 酶切产物连接后重组质粒转化*E.coli* NM522, PCR筛选, 1%琼脂糖凝胶电泳(图1), 提取pBIN19-G质粒*KpnI*和*XhoI*双酶切验证(图2). PCR产物和酶切产物均在502 bp处有1条带, 与预期结果一致. 用类似的方法将正义链连接到pBIN19-G, 用转基因烟草PCR检测引物对重组子

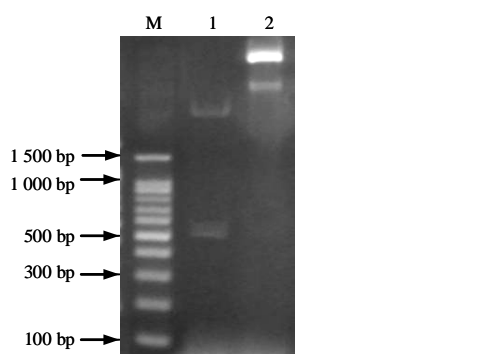
pBIN19-2G 进行 PCR 筛选(图 3),提取质粒用 *Bam*HI 和 *Xba*I 双酶切验证,1% 琼脂糖凝胶电泳(图 4) PCR 产物在 793 bp(502 bp CP 加上 291 bp 内含子和终止子片段)处有 1 条带,与预期结果一致,酶切产物在 502 bp 处有 1 条带,也与预期结果一致。



1~4 质粒pBIN19-2G的PCR产物;5 阳性对照;6 空白对照;M 100 bp DNA Marker.

图1 重组质粒pBIN19-G PCR鉴定

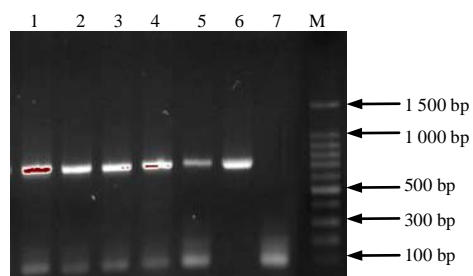
Fig.1 Identification of pBIN19-G by PCR



M 100 bp DNA Marker; 1 pBIN19-G/*Kpn*I和*Xho*I双酶切; 2 pBIN19-G质粒.

图 2 表达载体pBIN19-G的酶切鉴定

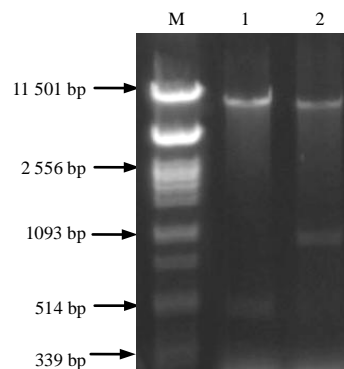
Fig.2 Identification of pBIN19-G by restriction enzymes digestion



1~5 质粒pBIN19-2G的PCR产物;6 阳性对照;7 空白对照;M 100 bp DNA Marker.

图 3 表达载体pBIN19-2G PCR鉴定

Fig.3 Identification of pBIN19-2G by PCR



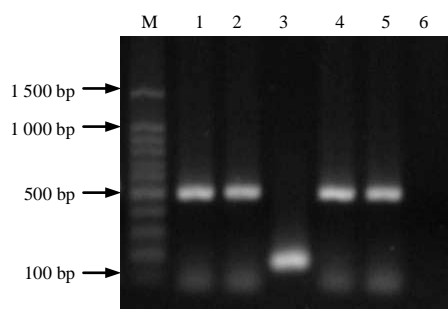
M λ DNA/*Pst*I Marker; 1 pBIN19-2G/*Bam*HI和*Xba*I双酶切; 2 pBIN19-2G/*Xho*I和*Xba*I双酶切.

图 4 表达载体pBIN19-2G的酶切鉴定

Fig.4 Identification of pBIN19-2G by restriction enzymes digestion

2.2 pBIN19-2G表达载体的农杆菌转化

挑选培养在含 Kan 和 Rif 的 YEP 固体培养基平板上的单克隆,接种于液体培养基中培养,取农杆菌菌体进行菌落 PCR 检测(图 5),证明已将含有 *groEL* 基因 502 bp 片段表达载体成功转入农杆菌 LBA4404 中。



1、2、4 重组质粒pBIN19-2G的PCR产物;3 阴性克隆;5 质粒阳性对照;6 空白对照;M 100 bp DNA Marker.

图 5 表达载体pBIN19-2G转入农杆菌的PCR鉴定

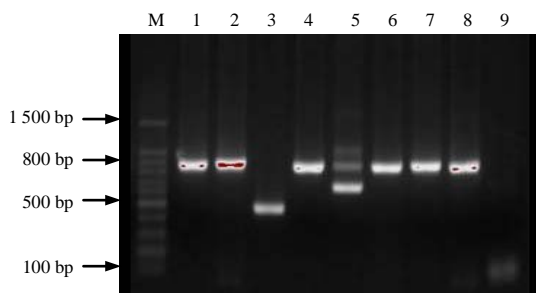
Fig.5 *Agrobacterium tumefaciens* pBIN19-2G plasmid PCR

2.3 烟草的遗传转化

侵染外植体为叶片,预培养2 d 后将受侵染外植体转接到选择培养基上,10 d 左右后,边缘有白色愈伤组织生成,选择培养约20~30 d,叶片转化细胞分化出抗性芽,待不定芽长到1~2 cm时,切下抗性芽,在生根培养基上进行生根培养,培养15 d左右,选择根长约2 cm,主茎3 cm左右的幼苗,炼苗4~5 d,移栽。空根癌农杆菌LBA4404浸染及未侵染对照叶片未见愈伤组织形成和分化。

2.4 转基因植株PCR鉴定

由于卡那霉素抗性筛选到的阳性植株,可能存在一定概率的假阳性,因此要对转基因植株进行分子生物学分析和生理测试.经过生根培养得到生根苗,提取基因组DNA,对17株转化苗进行PCR验证,证实15株转化苗可以扩增出793 bp片段,与选取 *groEL* 基因片段大小一致(图6).



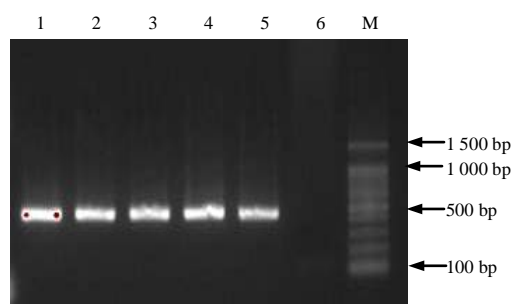
M 100 bp DNA Marker; 1 农杆菌质粒阳性对照; 2、4、6、7、8 转基因烟草PCR验证; 3、5 假阳性植株; 9 转LBA4404烟草阴性对照.

图6 转基因植株的PCR鉴定

Fig.6 Agarose gel electrophoresis of transformed *Nicotiana benthamiana* PCR

2.5 转基因植株RT-PCR鉴定

提取转基因植株总RNA,电泳证实RNA无降解后反转录成cDNA后进行PCR检测.阴性对照为非转基因本氏烟cDNA为模板的PCR产物,转基因植株PCR产物502 bp左右处有1条带(图7),说明目的基因在转基因烟草植株中被转录.



M 100 bp DNA Marker; 1~5 为转基因植物; 6 非转基因植株.

图7 转基因植株RT-PCR检测

Fig.7 RT-PCR screening of kanamycin-resistant plant transformed by *groEL* gene

3 讨论

大部分植物病毒都依靠昆虫介体传毒^[18],已知

的双生病毒均由烟粉虱传播.昆虫介体与其传播病毒之间存在特异性的互作,*groEL*基因能在植物体内与存在于植物韧皮部的双生病毒进行互作^[19].dsRNA在多种昆虫体内诱导RNA沉默表现对靶标基因的特异性沉默^[20-21].近年来,许多韧皮部特异性启动子陆续被鉴定,Pandolfini等^[22]利用韧皮部特异性启动子*rolC*构建了表达Plum pox virus(PPV)基因dsRNA的植物表达载体,该载体在韧皮部高效表达.笔者构建带有韧皮部特异性启动子*rolC*的dsRNA的植物表达载体,使目的基因在转基因烟草的韧皮部特异性表达,不仅能避免外源基因的高效表达可能对植物的不利影响,而且能使烟粉虱在韧皮部取食的同时目的基因随即进入其体内,有效诱导*groEL*基因RNA沉默.本研究以B型烟粉虱内共生菌传毒相关*groEL*基因为研究对象,构建含有*groEL*基因片段的反向重复植物表达载体,采用叶盘法转化本氏烟,成功获得转基因烟草,并进行了相关的分子生物学鉴定,结果表明,外源基因已整合到本氏烟中,并在烟草中得到表达.目前正在利用所获得的转基因烟草饲养B型烟粉虱,检测其体内的*groEL*基因浓度的变化,并将经转基因烟草饲养B型烟粉虱及其子代再用被双生病毒感染的烟草进行饲养,再让其取食健康烟草植株,观察传毒能力的变化等,以求获得能诱导B型烟粉虱丧失传毒功能的转基因植株.

参考文献:

- [1] Bedford I D ,Bridson R W ,Brown J K ,et al .Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci*(Gennadius) biotypes from different geographic regions[J] . Ann Appl , 1994 , 125(2) : 311-325 .
- [2] Saikia A K , Muniyappa V . Epidemiology and control of tomato leaf curl viruses in southern India[J] . Tropical Agri , 1989 , 66(4) : 350-354 .
- [3] Costa H S , Brown J K . Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci* and the association of one population with silver leaf symptom induction[J] . Entomol Exp Appl , 1991 , 61(3) : 211-219 .
- [4] Perring T M ,Cooper A D ,Kazmer D J ,et al .New strain of sweet potato whitefly invades California vegetables [J] . Calif Agric , 1991 , 45 : 10-12 .

- [5] Polston J E , Anderson P K . The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere[J] . Plant Dis , 1997 , 81(12) : 1358-1369 .
- [6] Rybicki E P , Pietersen G . Plant virus disease problems in the developing world[J] . Adv Trus Res , 1999 , 53 : 127-175 .
- [7] Harrison B D , Robinson D J . Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses)[J] . Ann Rev Phytopathol , 1999 , 37 : 369-398 .
- [8] Moffat A S . Plant pathology : Geminiviruses emerge as serious crop threat[J] . Science , 1999 , 286 : 1835 .
- [9] Boulton M I . Geminiviruses : Major threat to world agriculture[J] . Ann Appl Biol , 2003 , 142 : 143 .
- [10] Zeidan M , Czosnek H . Acquisition and transmission of *Agrobacterium* by the whitefly *Bemisia tabaci*[J] . Mol Plant Microbe In , 1994 , 7(6) : 792-798 .
- [11] Czosnek H , Ghanim M , Morin S , et al . White-flies : Vectors ,and victims(?) ,of geminiviruses[J] .Adv Virus Res , 2001 , 57 : 291-322 .
- [12] vanden Heuvel J F J M , Verbeek M , vander Wilk F . Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leaf roll virus by *Myzus persicae* [J] . J Gen Yrol , 1994 , 75(10) : 2559-2565 .
- [13] Morin S , Ghanim M , Zeidan M , et al . A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus[J] . Virology , 1999 , 256(1) : 75-84 .
- [14] Morin S , Ghanim M , Sobol I , et al . The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomovirus in the yeast two-hybrid system[J] . Virology , 2000 , 276 : 404-416 .
- [15] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . 分子克隆实验指南[M] . 2版 . 金冬雁 , 黎孟枫 , 译 . 北京 : 科学出版社 , 1992 : 25-26 .
- [16] 谭周进 , 谢丙炎 , 肖启明 , 等 . 烟粉虱内共生菌传毒相关 *groEL* 基因的克隆及其原核表达[J] . 植物病理学报 , 2004 , 34(4) : 314-318 .
- [17] 王关林 , 方宏筠 . 植物基因工程[M] . 2版 . 北京 : 科学出版社 , 2002 : 519-520 .
- [18] Hull R . Matthew's Plant Virology[M] San Diego : Academic Press , 2002 : 555-578 .
- [19] Akad F , Dotan N , Czosnek H . Trapping of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and other plant viruses with a GroEL homologue from the whitefly *Bemisia tabaci*[J] . Arch Virol , 2004 , 149 : 1481-1497 .
- [20] Schoppmeier M , Damen W G M . Double-stranded RNA interference in the spider *Cupiennius salei* : The role of Distal-less is evolutionarily conserved in arthropod appendage formation[J] . Dev Genes Evol , 2001 , 211 : 76-82 .
- [21] Araujo R N , Santosa A , Pinto F S , et al . RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera : Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection[J] . Insect Biochem Mol Biol , 2006 , 36 : 683-693 .
- [22] Pandolfini T , Molesini B , Avesani L , et al . Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the *rolC* promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection [J] . BMC Biotechnol , 2003 , 3(1) : 7-21 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平