

# 在小麦上实施基因沉默的 VIGS 系统优化

张立荣, 杨文香, 刘大群

(河北农业大学 植物保护学院植物病理系, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001)

**摘要:** 以大麦条纹花叶病毒 (Barley stripe mosaic virus, BSMV) 改造的 VIGS (Virus induced gene silencing) 载体在单子叶植物中能够介导基因沉默, 因此 BSMV 在植物基因功能鉴定中具有广泛的应用。本试验通过在近等基因系 TdLr24 中对 BSMV VIGS 载体系统进行优化, 以保证更方便地在小麦近等基因系 (NIL) 中实施 VIGS 功能验证。

**关键词:** 大麦条纹花叶病毒; VIGS 基因功能鉴定

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)02-0111-03

## Optimisation of Barley Stripe Mosaic Virus-induced Gene Silencing in Wheat

ZHANG Li-rong YANG Wen-xiang LIU Da-qun

(College of Plant Protection, Biological Control Center of Plant Diseases and Pests  
of Hebei Province, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract** Virus induced gene silencing (VIGS) offers a rapid and high-throughput technical platform for gene function analysis using Barley stripe mosaic virus (BSMV)-based vectors in wheat. In this paper, we report optimization of BSMV-induced gene silencing in NIL TdLr24 in order to carry out VIGS in wheat.

**Key words** BSMV; Virus-induced gene silencing; Gene function characterization

病毒诱导的基因沉默 (Virus induced gene silencing, VIGS) 指携带目标基因片段的病毒侵染植物后, 可诱导植物内源基因沉默, 引起表型变化, 进而根据表型变异研究目标基因的功能<sup>[1-3]</sup>。在单子叶植物中可利用的载体是大麦条纹花叶病毒 (Barley stripe mosaic virus, BSMV) 改造的 VIGS 载体, 并在大麦上实现了八氢番茄红素脱氢酶 (PDS) 基因的沉默<sup>[4,5]</sup>。PDS 是类胡萝卜素合成所必需的酶, 常作为 VIGS 体系的指示基因。Hein<sup>[6]</sup>以 BSMV 改造的病毒载体在大麦上验证了 Mla13 介导的抗白粉性<sup>[6]</sup>。不同的小麦品种对大麦条纹花叶病毒的忍耐程度不同, 充分利用适宜症状的小麦品种是完成基因功能鉴定的基础。Scofield<sup>[7]</sup>利用大麦的一段 PDS 基因在小麦中实现了基因沉默, 并且验证了 Lr21 介导的叶锈抗病性, 并且发现大麦的一段 PDS 基因在大麦和小麦沉默中症状有明显的区别。我们感兴趣的是利用小麦中 PDS 基因的片段沉默小麦 PDS 基因, 是否症状会更明显。为在近等基因系上

对抗病基因更好的进行基因功能研究, 优化了已有的大麦条纹花叶病毒载体系统, 对其沉默效率进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小麦品种 TdLr24 种子由河北农业大学锈病室提供。BSMV 由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 条 RNA 链组成, BSMV 重组病毒载体 BSMV:  $\gamma$ PDS-B (片段来源于大麦) 由陈贤明博士 (美国) 惠赠; 限制性内切酶购自 NEB 公司; mMESSAGEMachine High Yield Capped RNA Transcription Kit 购自 Ambion 公司。

### 1.2 小麦 PDS 基因片段的克隆、测序

按照天根公司 RNAex Reagent Systems 方法提取小麦 RNA 以及 SuperScript™ First 2 Strand Synthesis System for RT2PCR 试剂盒方法合成第一链 cDNA。根据小麦 PDS 基因的保守序列设计引物, 并分别引入 Pac I 和 Not I 的酶切序列, 以小麦第

收稿日期: 2010-11-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771391)

作者简介: 张立荣 (1973-), 女, 天津人, 博士, 主要从事分子植物病理学研究。

通讯作者: 刘大群 (1958-), 男, 河北石家庄人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物病害生物防治和分子植物病理学研究。

杨文香 (1966-), 女, 河北沧州人, 博士生导师, 主要从事分子植物病理学研究。

一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。所用引物序列如下: F1: ATATTAATTAAGTGGATGAAAAAGCAGGG TGTTCG; R1: TATGCGGCCGCTACTTTCAGGAGGA TTACCATCC。

按照 TaKaRa公司的 DNA 凝胶回收试剂盒方案纯化 PCR 产物。利用 TaKaRa 公司的 pMD 19T Vector系统克隆小麦 *PDS* 基因片段并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。测序后,用 BLAST 工具进行同源性比较。

### 1.3 小麦 *PDS* 基因 $\gamma$ 重组载体的构建及重组 $\gamma$ 载体阳性克隆中插入片段的验证

将小麦 *PDS* 基因片段用 *Pac*I 和 *Not*I 酶切,与 BSMV:  $\gamma$ PDS-B 用 *Pac*I 和 *Not*I 酶切后的载体部分连接,构成 BSMV:  $\gamma$ PDS-W,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,筛选阳性克隆。通过 *Pac*I 和 *Not*I 酶切验证插入片段的正确性。

### 1.4 VIGS载体的线性化、转录反应及接种

将 BSMV:  $\alpha$ 、BSMV:  $\beta$ 、BSMV:  $\gamma$ PDS-B、BSMV:  $\gamma$ PDS-W 载体分别用限制性内切酶 *Mlu*I、*Spe*I、*Bss*HI 进行酶切线性化。参照 Ambion公司 mMES-SAGE mMach ine High Yield Capped RNA Transcription Kit, 转录产物混合直接用于一叶一心小麦的传染。接种反应参照文献[5]进行。以空载体作对照进行接种。

### 1.5 温度对 VIGS的影响

在温室中进行 3 次温度测试, 15~ 20℃、21~ 25℃、26~ 30℃分别接种病毒,观察温度对 *PDS* 基因沉默表型的影响。

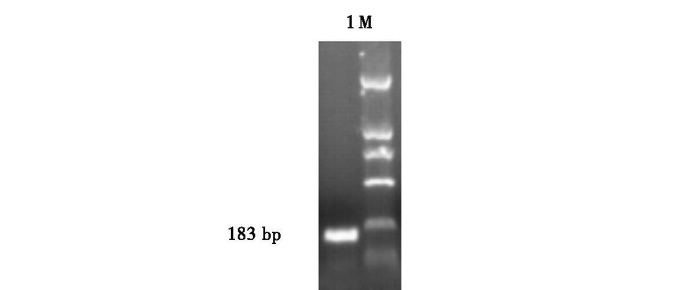
### 1.6 半定量 RT-PCR

为了验证沉默效率,进行了 RT-PCR 分析。以不接种和接种空载病毒载体为对照,在小麦接种病毒 1 d 和 8 d 时分别取样,提取第 3 片小麦叶片总 RNA,然后对其进行反转录反应。选取在小麦中组成型表达的基因 *Tublin* 作为内标,通过调整模板浓度,使内标基因的 PCR 扩增产物量一致,这时的模板用于 *PDS* 基因的表达分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦 *PDS* 基因 cDNA 片段的克隆与序列分析

以小麦近等基因系材料 TdLr24cDNA 为模板,根据小麦 *PDS* 基因的保守序列设计引物进行 PCR 扩增,获得一条 183 bp 的条带(图 1),与预期片段大小相符。回收该条带,并进行连接转化。经克隆测序,获得一条通读序列。经 BLASTn 比对,与大麦、燕麦、水稻、玉米 *PDS* 基因有较高的同源性。与小麦 *PDS* 基因同源性为 97%。



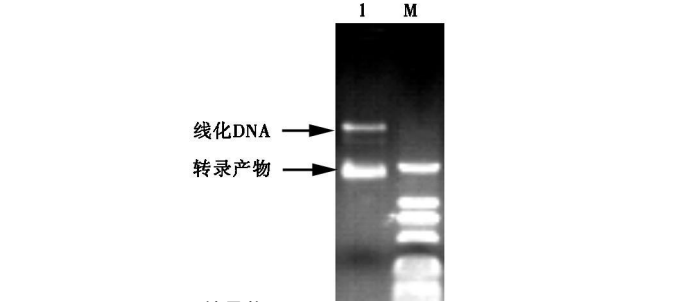
1. RT-PCR 产物; M. DL2000 Marker  
1 RT-PCR product M. DL2000 Marker

图 1 引物 F1 R1 扩增的 *PDS* 基因片段

### Fig 1 *PDS* product amplified by primer pair F1: R1

### 2.2 BSMV: $\gamma$ PDS-W 载体的构建及其载体的线性化、转录反应

将 *Pac*I 和 *Not*I 酶切后的小麦 *PDS* 片段插入  $\gamma$ 载体,构建成 BSMV:  $\gamma$ PDS-W,载体经 *Pac*I 和 *Not*I 酶切验证已经成功插入片段。载体经线性化后转录产物反应均产量很高,在 200 ng/ $\mu$ L 以上(图 2)。



1 转录物; M. DL2000 Marker  
1 Transcription product M. DL2000 Marker

图 2 BSMV:  $\gamma$ PDS-W 转录产物

### Fig 2 Transcription product of BSMV: $\gamma$ PDS-W

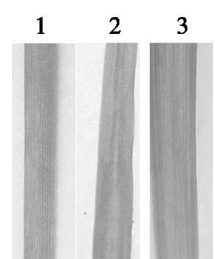
### 2.3 温度对基因沉默的影响

病毒接种小麦第 2 片叶后 8 d 在 15~ 20℃条件下,BSMV:  $\gamma$ PDS-W 和 BSMV:  $\gamma$ PDS-B 都没有观察到可见的光漂白现象,说明 *PDS* 基因没有被有效沉默。在 21~ 25℃时,BSMV:  $\gamma$ PDS-W 第 3 片叶表现出大面积的光漂白现象,而 BSMV:  $\gamma$ PDS-B 只出现了条形的白斑,相对于 BSMV:  $\gamma$ PDS-W 光漂白的面积较小(图 3)。在 26~ 30℃条件下,都有大面积的光漂白现象,但是小麦生长过快,影响后期的接菌试验。而对照 BSMV: 00 在这三个温度下都产生轻微的病毒斑,没有光漂白现象发生。结果表明,在 21~ 25℃较低的温度下,如果在小麦上沉默 *PDS* 基因,来源于小麦 *PDS* 基因的片段更有效,光漂白现象更明显,而且低温利于小麦生长。

### 2.4 半定量 RT-PCR

为了进一步证实 *PDS* 基因是否被有效沉默,在接种病毒第 1 天和第 8 天后采集第 3 片叶片,提取 RNA,用小麦组成型表达的基因 *Tublin* 作为内标调

整浓度, 进行 RT-PCR 分析。结果表明, 接种 1 d 时, 无论是接种 BSMV: 00, BSMV:  $\gamma$ PDS-W 还是 BSMV:  $\gamma$ PDS-B 的 *PDS* 基因都有表达, 而在接种病毒 8 d 时, 接种 BSMV: 00 的 *PDS* 基因仍然正常表达, BSMV:  $\gamma$ PDS-W 和 BSMV:  $\gamma$ PDS-B 的 *PDS* 基因均被沉默了, 而内源基因 *Tublin* 的表达水平始终一致 (图 4)。



1 BSMV: 00; 2 BSMV:  $\gamma$ PDS-B; 3 BSMV:  $\gamma$ PDS-W.

图 3 21~ 25℃ 下小麦 *PDS* 基因沉默表型

Fig 3 Symptom silenced *PDS* gene at 21– 25℃

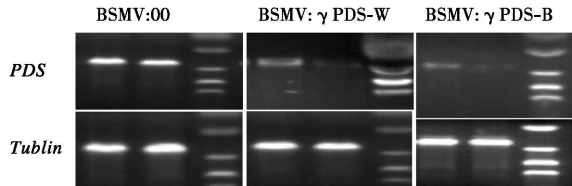


图 4 *PDS* 基因 RT-PCR 产物

Fig 4 The RT-PCR products of the *PDS* gene

### 3 讨论

目前克隆的候选基因和 EST 序列的不断增长, 反义 RNA 技术、RNA i、T2DNA 或转座子插入突变文库以及基因过表达等分析方法为研究基因功能提供了强有力的工具<sup>[8]</sup>。然而这些技术均需要获得转基因植物, 对于遗传转化效率非常低的小麦等植物, 很难快速分析大量基因的功能。基于瞬间表达的 VIGS 技术, 为植物功能基因组的研究提供了一个高通量分析的技术平台<sup>[9]</sup>。根据在单子叶和双子叶植物上对 RNA 沉默效果与序列同源性的关系研究, 张增艳等<sup>[10]</sup>利用 BSMV VIGS 载体的大麦 *PDS* 基因插入片段有效地沉默了小麦叶片中 *PDS* 基因。据她研究小麦 VIGS *PDS* 基因沉默效果较适温度在 25~ 30℃。本研究采用的 BSMV VIGS 载体上插入的一段 183 bp 的小麦 *PDS* 基因片段, 与大麦相对应的 *PDS* 基因片段的一致性为 97%。研究发现将内源基因片段以直接反向互补的形式构建到病毒载体上, 能有效提高病毒诱导的基因沉默。在较低的温度 (21~ 25℃) 下, 插入小麦的 *PDS* 基因片段表现了很好的沉默现象, 这说明在对小麦进行 *PDS* 基因沉默时插入小麦的 *PDS* 基因片段更有效。

而 Scofield<sup>[10]</sup>也利用大麦 *PDS* 基因片段沉默了大麦与小麦 *PDS* 基因, 发现利用大麦的 *PDS* 基因片段去沉默小麦的 *PDS* 基因在症状上与大麦不同。本研究恰恰证实了在小麦上 *PDS* 基因沉默的症状的区别可能正是由于大麦与小麦片段的关键碱基的差别引起的。

半定量 RT-PCR 的结果表明,  $\gamma$  重组载体中无论是插入小麦的 *PDS* 片段还是大麦的 *PDS* 片段, *PDS* 基因均被有效的沉默。但是在 21~ 25℃ 比较低的温度下, 插入来源于小麦的 *PDS* 基因片段, 小麦生长健壮, 更易于观察到沉默表型。当然, 影响 VIGS 的因素还有很多<sup>[11]</sup>, 笔者还对接种病毒的量, 接种小麦的时期等进行了研究, 发现其中最重要的条件就是适宜的温度。随着越来越多的基因组序列的测定, 与传统的研究基因功能的方法相结合, VIGS 将在植物基因功能研究中广泛的应用。

### 参考文献:

[1] 陶小荣, 周雪平, 崔晓峰, 等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物基因功能研究中的应用 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31: 777– 783.

[2] Burch-Smith T M, Anderson J C, Martin G B, *et al*. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants [J]. The Plant Journal, 2004, 39: 734– 746.

[3] Boulcme D C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing [J]. Curr Opin plant Biol, 1999, 2: 109– 113.

[4] Holzberg S, Brosio P, Gross C, *et al*. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant [J]. Plant J, 2002, 30: 315– 327.

[5] Lacombe C, Hrubikova K, Hein I. Enhancement of virus-induced gene silencing through virus-based production of inverted repeats [J]. Plant J, 2003, 34: 543– 553.

[6] Hein I, Barciszewska-Pacak M, Hrubikova K, *et al*. Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley [J]. Plant Physiology, 2005, 138: 2155– 2164.

[7] Tai Y S, Jennifer Bragg, Michael C. Virus vector for gene silencing in wheat [J]. Bio Techniques, 2005, 39: 310– 314.

[8] Scofield S R, Richard S N. Resources for Virus-Induced Gene Silencing in the Grasses [J]. Plant Physiology, 2009, 149: 152– 157.

[9] 王宏芝, 李瑞芬, 王国英, 等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物功能基因组学研究中的应用 [J]. 自然科学进展, 2005, 15(1): 8– 14.

[10] 徐幼平, 徐秋芳, 宋晓毅, 等. 病毒诱导的基因沉默 [J]. 浙江大学学报: 农业生命科学版, 2008, 34(2): 119– 131.

[11] 张增艳, 姚乌兰, 辛志勇. 植物基因功能鉴定新工具—病毒诱导基因沉默技术的研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(1): 100– 105.

[12] Wang C, Cai X, Wang X, *et al*. Optimisation of tobacco rattle virus-induced gene silencing in Arabidopsis [J]. Functional Plant Biology, 2006, 33: 347– 355.