

大豆翻译起始因子 4E 干扰片段克隆及其 RNAi 载体构建

高 乐,翟 锐,丁雪妮,李 凯,章红运,王 涛,智海剑

(作物遗传与种质创新国家重点实验室,南京农业大学 国家大豆改良中心,农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室,江苏 南京 210095)

摘要:应用基于 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)原理的大豆转基因技术,能够在转录水平沉默同源靶基因,这为转基因抗病毒作物的培育提供了新的策略。通过比对已报道的能与病毒 VPg 发生互作的 10 种植物的 eIF4E 氨基酸序列,确定出大豆 eIF4E 的保守区间为 62~237 位氨基酸序列,克隆出 406 bp 的干扰片段 *eIF4Ei* (含 58 bp 特异性重组序列 attB),进而采用 GATEWAY 技术构建了干扰表达载体 pB7GWIWG2(II)-*eIF4Ei*。之后通过测序证实干扰片段 *eIF4Ei* 在载体构建过程中没有发生变异;酶切试验证实终端质粒的 2 个 *ccdB* 位点均被 *eIF4Ei* 置换;用启动子和终止子设计的引物对含有重组质粒的菌液进行 PCR 扩增,证实 2 个干扰片段以相反的方向插入到终端质粒中。从而证明反向重复的干扰表达载体构建成功,为应用基于 RNAi 原理的大豆转基因技术培育对大豆花叶病毒具有抗性的大豆新种质提供了基础材料。

关键词:大豆花叶病毒;*eIF4E* 基因;RNA 干扰;GATEWAY 技术;载体构建

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)04-0001-06

Cloning of Interference Fragment of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E of Soybean and Construction of Its RNAi Vector

GAO Le, ZHAI Rui, DING Xue-ni, LI Kai, ZHANG Hong-yun, WANG Tao, ZHI Hai-jian

(National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, National Center for Soybean Improvement, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Soybean transformation based on RNA interference (RNAi) can specifically silence the homologous target genes in mRNA level, providing a new strategy for disease-resistant breeding. In this study, we made the amino acid sequence alignment of eIF4E from ten different kinds of plants which have been identified to interact with the virus VPg, then we determined the conserved interval of soybean eIF4E was 62–237 amino acid sequence and cloned the 406 bp interference fragment named *eIF4Ei* (including 58 bp specific recombination sequence attB). Using the GATEWAY technology, the RNAi vector pB7GWIWG2(II)-*eIF4Ei* was constructed, which was identified by PCR amplification, sequencing and restriction digestion. The identification of the recombinant expression vector ensured the *eIF4Ei* interference fragment no mutation in the process of vector construction and two *ccdB* sites were all replaced by *eIF4Ei*, in addition, the insert direction of the two interference fragments in the terminal plasmid was conversed. Overall, the RNAi vector was successfully constructed to be an inverted repeat structure, providing the basic materials for cultivating new germplasm of soybeans resistant to SMV using the soybean transformation technology based on RNAi.

Key words: Soybean mosaic virus; *eIF4E* gene; RNA interference; GATEWAY technology; Vector construction

收稿日期:2014-05-14

基金项目:转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08004-004);国家自然科学基金项目(31171574;31371646;31101164);农业部大豆产业技术体系项目(CARS-004)

作者简介:高 乐(1987-),男,河北石家庄人,在读博士,主要从事转基因大豆抗病品种培育研究。高乐、翟锐为同等贡献作者。

通讯作者:智海剑(1957-),男,河北石家庄人,教授,博士生导师,主要从事大豆遗传育种研究。

大豆原产于中国,已有五千年的栽培历史,是重要的油料和经济作物,在国民膳食体系中扮演着重要角色。大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV)病是一种全球性的病害,属于马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*),广泛分布于世界各大豆产区。早期感染 SMV 会造成大豆植株矮化,晚期感染则会导致大豆种皮斑驳,严重危害大豆产量和品质^[1]。抗病育种是防治 SMV 的有效手段,即将抗病基因导入到植株体内从而获得可遗传的高抗大豆材料。

根据遗传学标准可将抗性基因划分为显性抗性基因和隐性抗性基因 2 个类型^[2],寄主拥有显性抗性基因或者病毒繁殖所依赖的隐性抗性基因发生突变、缺失都将阻碍病毒的侵染^[3]。显性抗性 *R* 基因通过编码蛋白质与病毒的无毒因子(*Avr*)相结合,直接或间接地引发寄主的超敏反应(Hypersensitive response, HR)和极端抗性(Extreme resistance, ER),进而使得植株获得对病原物近乎免疫的系统抗性^[4-6];隐性抗性基因则是通过改变编码蛋白质的单个或少数几个氨基酸,使得病毒生存所依赖的寄主因子发生突变,从而阻止病毒在植株体内繁殖和扩散来提高植株的抗性^[7-8]。大多数已知的显性 *R* 基因主要是在抗真菌和细菌病害中发挥作用^[9],而在植物抗病毒的研究中则更容易发现隐性抗性基因^[10]。目前从自然界中克隆得到的多种植物的隐性抗病基因,绝大多数与真核翻译起始因子 eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E)有关^[9,11]。

马铃薯 Y 病毒属是植物病毒中最大的属,数量最多、分布最为广泛。在已知的大豆对马铃薯 Y 病毒的抗性基因中,40% 是隐性^[12],最近的研究发现,病毒的 VPg 蛋白能否与寄主的 eIF4E 或其同源异构体 eIF (iso) 4E 发生互作影响着寄主对病毒的抗性^[13]。eIF4E 基因的突变可增强植物的抗病性已在辣椒^[14-15]、番茄^[16]、莴苣^[17]、拟南芥^[18-19]中得到证实。章红运^[20]首次报道了大豆翻译起始因子 4E 与 SMV 的 VPg 蛋白存在互作,并从 208 份大豆品种中筛选出 17 份抗 SMV 材料,序列分析发现,其中 5 份材料的 eIF4E 氨基酸序列存在突变,而 eIF (iso) 4E 均未发生突变,进一步的酵母双杂交试验证实 4 份材料的 eIF4E 不能与 SMV 的 VPg 发生互作,推测这很可能与材料的抗病性有关。因此,将大豆 eIF4E 基因构建成为 RNAi 载体,将其干扰片段导入大豆体内,在 mRNA 水平沉默同源靶基因,敲除大豆 eIF4E 基因功能,使病毒所依赖的寄主因子发生缺失,从而提高大豆对 SMV 的抗性。应用基于

RNAi 原理的大豆转基因技术,通过干扰 eIF4E 的功能改良大豆对大豆花叶病毒抗性的研究还未见报道。

本研究通过比对已报道的能与病毒 VPg 发生互作的 10 种植物的 eIF4E 氨基酸序列,确定出大豆 eIF4E 的保守功能区域,应用 GATEWAY 重组技术快速构建了 RNAi 载体 pB7GWIWG2 (II)-eIF4Ei,为应用基于 RNAi 原理的大豆转基因技术培育对大豆花叶病毒具有抗性的大豆新种质提供了基础材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 大豆品种 Williams 82 由国家大豆改良中心提供。GATEWAY 入门载体 pDONR221、干扰表达载体 pB7GWIWG2 (II)、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 由国家大豆改良中心保存。

1.1.2 酶与试剂盒 限制性内切酶 *Xba* I、*Eco*R I、*Hind* III 购自 Thermo 公司;DNA Marker、RNA 提取试剂盒、2 × *Taq* mix 聚合酶购自 TIANGEN 公司;Prime Script 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司;KOD FX 高保真聚合酶购自 TOYOBO 公司;GATEWAY 试剂盒购自 Invitrogen 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 AXYGENT 公司;测序与引物合成委托上海英俊公司完成。

1.2 方法

1.2.1 eIF4E 保守区间的确定及引物设计 利用 BioEdit 生物软件,将大豆 eIF4E 氨基酸序列 (*Glycine max*, GeneBank 登录号 EU912426) 与已报道的能与病毒 VPg 发生互作的番木瓜 (*Carica papaya*, GeneBank 登录号 FJ644949)、大麦 (*Hordeum vulgare*, GeneBank 登录号 AB592979)、番茄 (*Solanum lycopersicum*, GeneBank 登录号 NM_001247530)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, GeneBank 登录号 NM_117914)、莴苣 (*Lactuca sativa*, GeneBank 登录号 AF530162)、辣椒 (*Capsicum annuum*, GeneBank 登录号 AF521963)、豌豆 (*Pisum sativum*, GeneBank 登录号 DQ641471)、甜瓜 (*Cucumis melo*, GeneBank 登录号 DQ393831)、烟草 (*Nicotiana tabacum*, GeneBank 登录号 DQ393833) 的 eIF4E 氨基酸序列进行比对,找出大豆 eIF4E 保守区间并用 Primer Premier 5.0 软件在该区间内设计正向引物 attB1-eIF4Ei-F 和反向引物 attB2-eIF4Ei-R,小写英文字母为特异性重组序列 attB (表 1)。

表 1 本试验所用引物

Tab. 1 Primers used in this experiment

引物 Primer	序列 Sequence(5'→3')
attB1- <i>eIF4Ei</i> -F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCCATCTACACTTTCGCCAC
attB2- <i>eIF4Ei</i> -R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCTTTCCAATGCTCACCT
35S-P	GACGCACAATCCCACTATCC
35S-T	GCTCAACACATGAGCGAAAC

1.2.2 RT-PCR 方法克隆干扰片段 *eIF4Ei* 播种大豆品种 Williams 82 于装有营养土的花盆中,在人工气候箱中培养至幼苗期。采取幼嫩的叶片在液氮中研磨充分,用 TIANGEN 试剂盒提取大豆总 RNA,并通过琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 是否发生降解,完整性较好的 RNA 将用于反转录第一链的合成。采用 Prime Script 试剂盒合成 cDNA,产物保存于 -20 ℃。

以上述 cDNA 为模板,用引物 attB1-*eIF4Ei*-F、attB2-*eIF4Ei*-R 扩增大豆干扰片段 *eIF4Ei*。PCR 反应体系为 50 μL: dNTPs 10 μL, Buffer 25 μL, cDNA 1 μL, 正、反向引物各 1.5 μL, KOD FX 1 μL, 无菌水 10 μL。反应参数为: 94 ℃ 预变性 2 min; 98 ℃ 变性 10 s, 62 ℃ 退火 30 s, 68 ℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 68 ℃ 延伸 5 min。反应完成后在 1% 琼脂糖凝胶上检测 PCR 产物,采用 AXYGEN 试剂盒纯化回收正确位置的条带并进行测序分析。

1.2.3 *eIF4E* 基因 RNAi 载体的构建 BP 反应构建入门克隆: 经测序验证的 PCR 纯化产物与入门载体 pDONR221 进行重组反应。将 attB-*eIF4Ei* 2 μL、pDONR221 vector 0.5 μL、BP 酶 1 μL、TE Buffer 6.5 μL 轻柔地混合均匀后 25 ℃ 连接过夜,然后加入 1 μL 蛋白酶 K 于 37 ℃ 水浴 10 min 终止 BP 反应。取 10 μL BP 连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5α,然后涂布于 LB 平板(含 50 mg/L 卡那霉素)上培养单克隆,单克隆扩繁后进行 PCR 反应以及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,阳性单克隆菌液进行测序试验并提取质粒 pDONR221-*eIF4Ei* 用于进行 LR 反应。

LR 反应构建表达克隆: BP 反应产物 4 μL, 终端质粒 pB7GWIWG2(II) 1 μL, LR 酶 2 μL, TE Buffer 3 μL, 25 ℃ 过夜连接后加入 1 μL 蛋白酶 K, 37 ℃ 水浴 10 min 终止 LR 反应。将适量 LR 连接产物转入 DH5α 大肠杆菌感受态,在含有 100 mg/L 壮观霉素的 LB 平板上倒置培养过夜。次日挑取单克隆进行 PCR 反应,检测为阳性的单克隆菌液进行测序验证,测序正确的单克隆菌液扩繁后提取质粒 pB7GWIWG2(II)-*eIF4Ei*,保存于 -20 ℃ 冰箱。

1.2.4 RNAi 载体的鉴定以及农杆菌转化 酶切鉴定干扰片段 *eIF4Ei* 的插入位点: 对重组质粒 pB7GWIWG2(II)-*eIF4Ei* 进行 *Xba* I 单酶切试验

和 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切试验。单酶切反应体系为: pB7GWIWG2(II)-*eIF4Ei* 5 μL, *Xba* I 2 μL, Buffer 5 μL, 无菌水 8 μL; 双酶切反应体系为: pB7GWIWG2(II)-*eIF4Ei* 5 μL, *EcoR* I、*Hind* III 各 1 μL, Buffer 5 μL, 无菌水 8 μL。酶切反应于 37 ℃ 金属浴中保持 30 min,之后用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测并观察。

PCR 鉴定干扰片段 *eIF4Ei* 的插入方向: 设计终端载体 pB7GWIWG2(II) 启动子和终止子的引物 35S-P 和 35S-T(表 1),分别与引物 attB2-*eIF4Ei*-R(表 1)组合,以含有重组质粒的大肠杆菌菌液为模板进行 PCR 反应。采用 25 μL 反应体系: 阳性大肠杆菌菌液 1 μL, 35S-P/35S-T 1 μL, attB2-*eIF4Ei*-R 1 μL, 2 × *Taq* mix 聚合酶 12.5 μL, 无菌水 9.5 μL。反应参数为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 62 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 5 min。反应结束后对 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳并在凝胶成像系统中观察扩增情况。

经过 PCR、测序、酶切验证后的重组质粒采用冻融法转化 EHA105 农杆菌感受态, 28 ℃、200 r/min 的条件下复苏 3 ~ 4 h, 于含有 25 mg/L 利福平和 100 mg/L 壮观霉素的 YEB 平板上培养单克隆。36 ~ 48 h 后挑取单克隆, 扩繁后进行菌液 PCR 扩增, PCR 鉴定为阳性的单克隆菌液加入适量的甘油保存于 -80 ℃ 冰箱。

2 结果与分析

2.1 干扰片段 *eIF4Ei* 的克隆

通过比对已知的能与病毒 VPg 发生互作的 10 种植物的 *eIF4E* 氨基酸序列,发现大豆 *eIF4E* 在 62 ~ 237 位氨基酸序列区间内与其他植物的 *eIF4E* 存在相似的功能保守区域(图 1),因此,在保守区间内设计正、反向引物 attB1-*eIF4Ei*-F、attB2-*eIF4Ei*-R(表 1),用于克隆干扰片段 *eIF4Ei*。提取大豆叶片总 RNA 后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示, RNA 质量较好满足反转录的要求(图 2)。用上述正、反向引物,以反转录的 cDNA 为模板扩增干扰片段 *eIF4Ei*,电泳检测结果显示,目标片段大小为 406 bp(含 58 bp 特异性重组序列 attB),与预期一致

(图3)。将 PCR 产物进行割胶回收并送交测序,测序结果证明所克隆的基因片段是正确的。

<i>Carica papaya</i>	61	HPELEHFWTFWFDNFSKSKCATWGSSMRSVYTFRTVEEFWSLYNNIHHPSKLVAGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFGRGKS	149
<i>Hordeum vulgare</i>	0	---ENAWTFWFDNPQKSRVAVWGSTIHIHTFSTVEDFWSLYNNIHHPSKLVAGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTISGRGKS	86
<i>Solanum lycopersicum</i>	56	HPELEHFWTFWFDNPTTKSRCTAWGSSLRNVYTFSTVENFWGAYNNIHHPSKLVAGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFGRGKS	144
<i>Arabidopsis thaliana</i>	60	HPELEHFWTFWFDNPAVSKQTSWGSSLRPFVTFSTVEEFWSLYNNIHHPSKLVAGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFGRGKS	148
<i>Lactuca sativa</i>	55	HPELEHFWTFWFDTPSAKSKQVAVWGSSMRPIYTFSTVEEFWSLYNNIHHPSKLVAGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFGRGKS	143
<i>Glycine max</i>	62	HPELEHFWTFWFDNPSKSKCAAWGSSIRPIYTFSTVEEFWSLYNNIHHPSKLVAGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFGRGKS	150
<i>Capsicum annuum</i>	53	HPELEHFWTFWFDNPAVSKQCAAWGSSLRNVYTFSTVEDFWGAYNNIHHPSKLVAGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFGRGKS	141
<i>Pisum sativum</i>	53	HLEENFWTFWFDTPAAKSKCAAWGSSMRPIYTFSTVEEFWSLYNNIHHPSKLVAGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFGRGKS	141
<i>Cucumis melo</i>	60	HPELEHFWTFWFDNPSKSKCATWGASIRPIYTFSTVEEFWSLYNNIHHPSKLVAGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFGRGKS	148
<i>Nicotiana tabacum</i>	47	HPELEHFWTFWFDNPSKSKCAAWGSSIRPIYTFSTVEDFWSLYNNIHHPSKLVAGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFGRGKS	135
<i>Carica papaya</i>	150	DTCLWLYTLLAMIGECCFDHGDEICGVVNVVRGQEKIALWTKNAANEAAQVSGKQWKEFLDYNDTMGFIFHEDAKKLERAAKNRYTV	236
<i>Hordeum vulgare</i>	87	DTFWLHTLLALIGECCFDHGDEICGAVVSVRKNQERVAIWTKNAANEAAQVSGKQWKEFLDYKDSIGFVVDHAKRSKSAKNRYTV	173
<i>Solanum lycopersicum</i>	145	DTSWLYTLLAMIGHQCFDHGDEICGAVVSVRAGKEKIALWTKNAANEAAQVSGKQWKEFLDYSDSVGFIFHDDAKRLDRNAKNRYTV	231
<i>Arabidopsis thaliana</i>	149	DKSWLYTLLALIGECCFDHGDEICGAVVNVIRGQERISITWTKNAANEAAQVSGKQWKEFLDYNNISIGFIFHEDAKKLERAAKNRYTV	235
<i>Lactuca sativa</i>	144	DTCLWLYTLLAMIGECCFDHGDDICGAVVNVVRGQEKIALWTKNAANEAAQVSGKQWKEFLDYNDTIGFIFHEDAKKLERAAKNRYTV	230
<i>Glycine max</i>	151	DTCLWLYTLLAMIGECCFDHGDEICGAVVNVVRGQDKIAIWTKNAANEAAQVSGKQWKEFLDYNDTIGFIFHEDAKKLERAAKNRYTV	237
<i>Capsicum annuum</i>	142	DTSWLYTLLAMIGHQCFDHGDEICGAVVSVRGRGKEKISLWTKNAANEAAQVSGKQWKEFLDYSDSVGFIFHDDAKRLDRNAKNRYTV	228
<i>Pisum sativum</i>	142	DTSWLYTLLAMIGECCFDHGDEICGAVVNVVRGAEKISITWTKNAANEAAQVSGKQWKEFLDYNETMGFIFHDDAKRLDRNAKNRYTV	228
<i>Cucumis melo</i>	149	DNGWLYTLLAMIGECCFDGDEICGAVVNVVRGQDKISITWTKNAANEAAQVSGKQWKEFLDYNEISIGFIFHDDAKKLERAAKNRYTV	235
<i>Nicotiana tabacum</i>	136	DTCLWLYTLLAMIGECCFDGDEICGAVVNVVRGQEKIALWTKNAANEAAQVSGKQWKEFLDYNDISIGFIFHDDAKKLERAAKNRYTV	218

图1 10种植物 eIF4E 氨基酸的保守区间

Fig.1 Conservative interval of eIF4E of ten kinds of plants

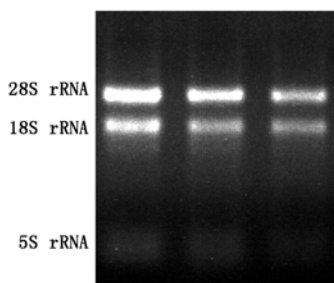
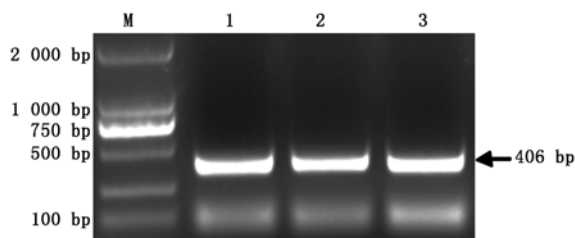


图2 大豆叶片总 RNA 提取

Fig.2 Total RNAs extracted from soybean leaf



M. D2000 分子量标准;1~3. attB-eIF4Ei 干扰片段。

M. Molecular Marker of D2000;1~3. Interference fragment of attB-eIF4Ei.

图3 干扰片段 attB-eIF4Ei 的扩增

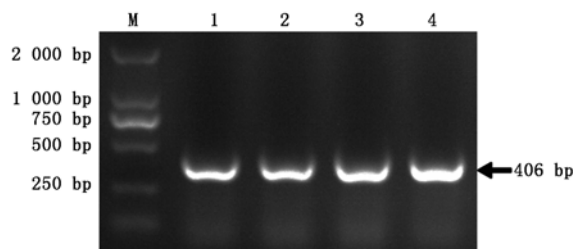
Fig.3 Interference fragment amplification of attB-eIF4Ei

2.2 入门克隆的构建与 RNAi 载体的获得

通过 BP 反应使纯化的干扰片段与入门载体发生重组形成入门克隆 pDONR221-eIF4Ei,之后转化大肠杆菌 DH5 α 并培养单克隆。单克隆扩繁后进行菌液 PCR 反应以及琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,用引物 attB1-eIF4Ei-F、attB2-eIF4Ei-R (表1) 扩增得到了大小正确的条带(图4)。将 PCR 阳性克隆菌液送交测序,测序结果与目的片段序列完全一致,说明干扰片段 eIF4Ei 正确地插入到入门载体中。

提取质粒 pDONR221-eIF4Ei,通过 LR 反应使其与终端质粒发生重组形成 pB7GWIWG2 (II)-eIF4Ei,以相同的方式获得单克隆并进行 PCR 检测,扩增得到的片段大小与预期一致,即 406 bp 的条带(图5)。将菌液测序结果在 NCBI 上进行 Blast,与

大豆 eIF4E 基因的匹配度达到 100%,说明干扰片段 eIF4Ei 已插入终端质粒中。



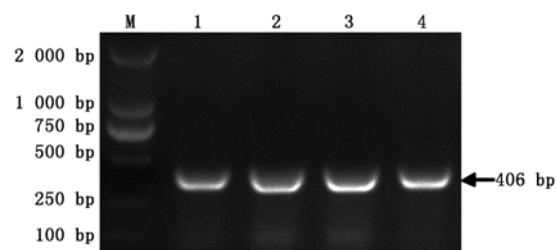
M. D2000 分子量标准;1~4. attB-eIF4Ei 干扰片段。

M. Molecular Marker of D2000;1~4. Interference fragment of attB-eIF4Ei.

图4 pDONR221-eIF4Ei 菌液 PCR 扩增

Fig.4 PCR amplification of pDONR221-eIF4Ei

in bacteria liquid



M. D2000 分子量标准;1~4. attB-eIF4Ei 干扰片段。

M. Molecular Marker of D2000;1~4. Interference fragment of attB-eIF4Ei.

图5 pB7GWIWG2 (II)-eIF4Ei 菌液 PCR 扩增

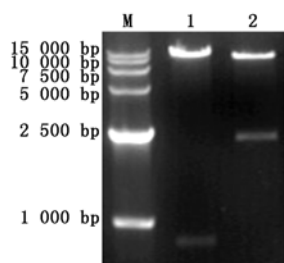
Fig.5 PCR amplification of pB7GWIWG2 (II)-eIF4Ei

in bacteria liquid

2.3 重组表达载体的鉴定与工程菌的获得

提取重组质粒 pB7GWIWG2 (II)-eIF4Ei,经过 Xba I 单酶切和 EcoR I、Hind III 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,单酶切获得了 867 bp 和 10 902 bp 的 2 条带,双酶切获得了 2 340 bp 和 9 429 bp 的 2 条带,大小与预期相符合(图6),说明重组表达载体在 2 个 ccdB 位点均插入了干扰片段 eIF4Ei。分别用 35S-P、attB2-eIF4Ei-R 和 35S-T、attB2-eIF4Ei-R 这 2 对引物对重组质粒大肠杆菌菌液进行 PCR 扩增,电泳结果显示,2 对引物的扩增

长度分别为 558, 544 bp (图 7), 说明干扰片段 *eIF4Ei* 以相反的方向插入终端质粒。上述结果说明干扰片段 *eIF4Ei* 在载体构建过程中未发生变异, 以相反的方向同时取代 2 个 *ccdB* 位点与 pB7GWIWG2 (II) 成功组合并且形成反向重复的结构, RNAi 载体构建成功 (图 8)。



M. D15000 分子量标准; 1. *Xba* I 单酶切; 2. *EcoR* I, *Hind* III 双酶切。
M. Molecular Marker of D15000; 1. Restriction enzyme digestion of *Xba* I; 2. Restriction enzyme digestion of *EcoR* I and *Hind* III.

图 6 重组质粒酶切鉴定

Fig. 6 Identification of recombinant vector by restriction enzyme digestion

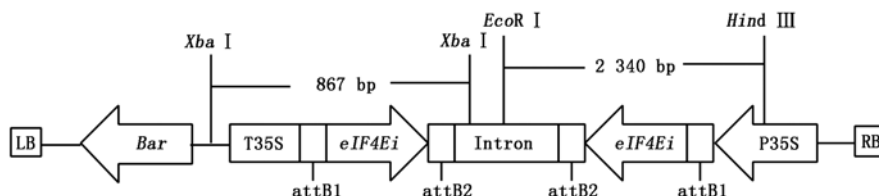
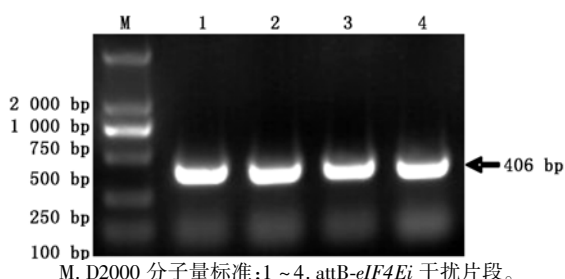


图 8 重组质粒 pB7GWIWG2(II)-*eIF4Ei* 结构图

Fig. 8 Construct map of recombinant plasmid pB7GWIWG2(II)-*eIF4Ei*



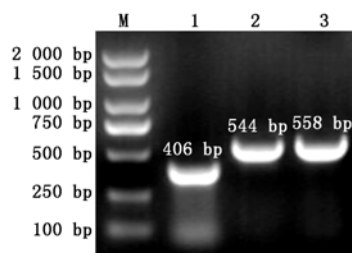
M. D2000 分子量标准; 1~4. *attB-eIF4Ei* 干扰片段。
M. Molecular Marker of D2000; 1~4. Interference fragment of *attB-eIF4Ei*.

图 9 pB7GWIWG2(II)-*eIF4Ei* 农杆菌菌液 PCR 扩增

Fig. 9 PCR amplification of pB7GWIWG2(II)-*eIF4Ei* in agrobacterium liquid

3 讨论

随着科技进步, 人们对植物病毒基因组结构和侵染方式有了深入了解。研究人员发现病毒侵染植株后需要依赖特定的寄主因子才能完成自身的繁殖和传播, 如果病毒所依赖的寄主因子发生突变或缺失将阻碍病毒的侵染从而提高自身的抗病性, 这种作用方式已在多种植物上被证实^[14-19]。目前, 已从自然界不同类型植物中克隆到了 14 个隐性抗病基因, 其中有 12 个是 *eIF4E* 或其同源异构体 *eIF* (iso) *4E*^[9], 这尤其在植物与马铃薯 Y 病毒属病毒的互作



M. DL2000 plus 分子量标准; 1. *attB-eIF4Ei* 干扰片段; 2. 35S-T 和 *attB2-eIF4Ei-R* 扩增片段; 3. 35S-P 和 *attB2-eIF4Ei-R* 扩增片段。

M. Molecular Marker of DL2000 plus; 1. Interference fragment of *attB-eIF4Ei*; 2. Amplification fragment of 35S-T and *attB2-eIF4Ei-R*; 3. Amplification fragment of 35S-P and *attB2-eIF4Ei-R*.

图 7 *eIF4Ei* 干扰片段插入方向鉴定

Fig. 7 Insert direction identification of *eIF4Ei* interference fragment

提取质粒并采用冻融法转化农杆菌 EHA105, 培养出的单克隆扩繁后进行 PCR 检测, 电泳结果显示重组质粒已正确进入根癌农杆菌中 (图 9), 加入适量甘油长期保存于 -80°C 冰箱。

中发挥关键作用^[12-13]。*eIF4E* 的发现给人们在植物抗病毒研究领域提供了新的方法策略, 即可以通过转基因技术将其干扰片段导入植株体内, 通过诱发 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 在转录水平沉默同源靶基因的功能, 从而获得抗病材料。

本研究以大豆 *eIF4E* 为靶基因构建植物干扰表达载体, 以期通过大豆转基因技术将其干扰片段导入植株体内, 敲除大豆 *eIF4E* 的功能, 从而获得对大豆花叶病毒具有抗病性的新材料。*eIF4E* 为大豆内源隐性抗病基因, 通过沉默其功能不但可以提高植物抗病性, 同时还解决了外源抗性基因所带来的生物安全问题。本试验在构建上述载体时采用了 GATEWAY 重组体系, 其高效、便捷的优点极大缩短了人力的投入与载体构建的时间。构建载体过程中, 每一步反应均经过 PCR 检测和测序验证, 保证了干扰片段序列的准确性; 干扰片段插入方向的验证试验和酶切试验证实了重组质粒的 2 个 *ccdB* 位点均被置换并且方向相反, 从而最终证明我们成功地构建了反向重复结构的干扰表达载体。

今后的研究中, 本实验室将致力于基于 RNAi 原理的大豆转基因试验, 期望通过干扰大豆 *eIF4E* 基因的功能使植株获得隐性抗性, 进而培育出对

SMV 具抗性的新种质,为育种家提供良好的亲本材料,这对大豆花叶病毒抗病育种工作有着深远意义。

参考文献:

- [1] Zhang X, Sato S, Ye X, *et al.* Robust RNAi-based resistance to mixed infection of three viruses in soybean plants expressing separate short hairpins from a single transgene [J]. *Phytopathology*, 2011, 101(11): 1264 – 1269.
- [2] Robaglia C, Caranta C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection [J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11(1): 40 – 45.
- [3] Fraser R S S, Van-Loon L C. Genes for resistance to plant viruses [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1986, 3: 257 – 294.
- [4] Bonas U, Lahaye T. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(1): 44 – 50.
- [5] Goldbach R, Bucher E, Prins M. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview [J]. *Virus Research*, 2003, 92(2): 207 – 212.
- [6] Soosaar J L M, Burch-Smith T M, Dinesh-Kumar S P. Mechanisms of plant resistance to viruses [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3: 789 – 798.
- [7] Johansen I E, Lund O S, Hjulsager C K, *et al.* Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(14): 6609 – 6614.
- [8] Fraser R S S. The genetics of resistance to plant viruses [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1990, 28: 179 – 200.
- [9] Wang A, Krishnaswamy S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(7): 795 – 803.
- [10] Truniger V, Aranda M A. Recessive resistance to plant viruses [J]. *Advances in Virus Research*, 2009, 75: 119 – 159.
- [11] Maule A J, Caranta C, Boulton M I. Sources of natural resistance to plant viruses status and prospects [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(2): 223 – 231.
- [12] Provvidenti R, Hampton R O. Sources of resistance to viruses in the potyviridae [J]. *Archives of Virology*, 1992, 5: 189 – 211.
- [13] 卢航, 赵小明, 白雪芳, 等. 翻译起始因子 4E 在植物病毒侵染中的作用 [J]. *中国农业科技导报*, 2007, 9(6): 35 – 40.
- [14] Ruffel S, Gallois J L, Moury B, *et al.* Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper vein mottle virus infection of pepper [J]. *The Journal of General Virology*, 2006, 87(Pt7): 2089 – 2098.
- [15] Ruffel S, Dussault M H, Palloix A, *et al.* A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2002, 32(6): 1067 – 1075.
- [16] Kang B C, Yeam I, Li H, *et al.* Ectopic expression of a recessive resistance gene generates dominant potyvirus resistance in plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5(4): 526 – 536.
- [17] Nicaise V, German-Retana S, Sanjuán R, *et al.* The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus lettuce mosaic virus [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(3): 1272 – 1282.
- [18] Yoshii M, Nishikiori M, Tomita K, *et al.* The *Arabidopsis cucumovirus* multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(12): 6102 – 6111.
- [19] Duprat A, Caranta C, Revers F, *et al.* The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor(iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2002, 32(6): 927 – 934.
- [20] 章红运. 大豆花叶病毒基因组全序列测定及大豆 *eIF4E* 和 *eIFiso4E* 基因与病毒 *VPg* 基因的互作分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.