

烟草坏死病毒 A 诱导的基因沉默及其条件优化*

高 阳 张永亮 张晓峰 韩成贵 于嘉林 李大伟**

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 以烟草坏死病毒 A 中国分离物(*Tobacco necrosis virus A Chinese isolate*, TNV-A)侵染性 cDNA 克隆为基础, 通过基因替换、基因插入策略构建获得多种重组 TNV-A^c, 比较了外源基因片段插入位置、插入形式及接种植物培养温度对 TNV-A^c 诱导的基因沉默的影响。外源基因片段替换 CP 基因 19~828 nt 的重组 TNV-A^c 丧失了在本生烟中的系统移动能力, 也不能有效诱导相应基因发生明显的沉默, 说明替换策略不适合于 TNV-A^c。向 CP 基因终止密码子 UAG 附近插入外源基因片段后, TNV-A^c 仍可进行复制, 但最适的插入位点位于 UAG 之后, 且容纳外源片段的长度约为 120 nt。当外源片段以反向重复的形式插入 UAG 之后, 诱导基因沉默的效率较高。接种植物的培养温度也会显著影响基因沉默的效率以及插入片段的稳定性, 低温(18℃)条件下诱导 *NbPDS* 基因沉默的效率明显高于高温(24℃)条件, 且沉默表型可持续 110 天以上。除了本生烟 *PDS* 基因, TNV-A^c 沉默载体还可诱导本生烟 *sulfur* 基因 *Su* 和镁离子螯合酶 H 亚基基因 *ChlH* 发生沉默, 以上结果说明, TNV-A^c 具有开发为本生烟基因功能鉴定的新 VIGS 载体的潜力。

关键词 烟草坏死病毒 A, 病毒诱导的基因沉默, 条件优化

学科分类号 Q939.46

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00129

病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是近年来发展起来的一种快速鉴定植物基因功能的反向遗传学工具, 其原理是, 携带目的基因片段的重组病毒侵染植物后, 由于同源抑制诱导相应的植物内源基因发生沉默, 从而根据表型的变化分析目的基因的功能^[1-2]。基于 RNA 沉默原理的 VIGS 技术, 在未获得基因全长的情况下, 通过插入 EST 序列、候选基因的片段或者 cDNA 文库即可鉴定目的基因的功能。此外, 通过 VIGS 技术可在数周之内获取相应基因的表型, 无需构建超表达或者 RNAi 转基因植株。目前, VIGS 已在茄科^[3-4]、禾本科^[5-6]和豆科^[7-8]等重要粮食作物和经济作物的功能基因组学研究中得到了广泛的应用。

构建 VIGS 载体首先保持重组病毒的侵染活性, 目前, 将植物内源基因片段插入病毒基因组中的技术主要有基因替代法和基因插入法。对于基因替代策略构建的 VIGS 载体, 通常将病毒基因组中与昆虫、线虫等传播有关的基因, 或者病毒编码的 RNA 沉默抑制子替换成外源基因, 被替换的基因不能为病毒复制所必需, 并且替换后也不能影响病毒在寄主植物体内的系统移动^[4, 9]。而插入法是在

不影响病毒基因组二级结构的情况下, 将外源的植物基因片段插入病毒的 2 个开放阅读框(open reading frame, ORF)之间, 或者置于病毒的亚基因组(subgenome)启动子之后^[10]。对于基因组相对较小的卫星 DNA 分子, 则可以将目的片段插入两个重复的卫星 DNA 分子之间^[11]。

VIGS 载体中外源基因片段插入的方式有: 正向插入、反向插入、反向重复(inverted repeats, IR)插入和发夹状结构(hairpin)插入等形式。理论上, 含有长度仅为 23 nt 插入片段的 VIGS 载体就可诱导目的基因的沉默^[12], 但在实际应用中, 通常需要选择更长的目的基因片段^[9]。Lacomme 等^[13](2003 年)向烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)载体中插入了不同形式的外源片段, 并比较了诱导内源基因沉默的效果, 结果显示, 单臂长度为 40 nt

* 国家自然科学基金资助项目(30325001), 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2006CB101903)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62733326, E-mail: Dawei.Li@cau.edu.cn

收稿日期: 2011-03-18, 接受日期: 2011-05-23

的反向重复结构可以更有效地诱发沉默, 其目的基因 mRNA 积累量在沉默前后的降低幅度比利用发夹状结构、反向插入和正向插入策略减少 65% 以上. 利用芜菁黄花叶病毒(*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV)在拟南芥上的研究表明, 将单臂长度为 38 nt 的 *AtPDS* 基因片段以反向重复形式插入 TYMV 载体, 就可有效诱导基因沉默^[14].

不同的温度条件下, 植物抵御病毒侵染的能力不同^[15], 病毒诱导的基因沉默表型同样受温度等环境条件的影响, 导致其诱导的沉默表型不稳定. 在低温(18℃~22℃)条件下, 双生病毒——棉花皱叶病毒(*Cotton leaf crumple virus*, CLCrV)在棉花体内的积累量比高温(26℃~30℃)条件下高 10 倍左右, 诱发棉花 *ChII* 基因和 *PDS* 基因沉默的效果也明显优于高温条件下^[16].

TNV-A^c 是烟草坏死病毒 A(*Tobacco necrosis virus A*, TNV-A)侵染大豆(*Glycine max*)的一个新株系, 属于番茄丛矮病毒科(*Tombusviridae*)坏死病毒属(*Necrovirus*), 人工接种条件下可侵染 8 科 29 种植物, 症状多为局部枯斑, 系统侵染大豆和本生烟时, 可在上部叶片出现坏死斑^[17]. 病毒粒体直径约 28 nm, 为单组分 ss(+)RNA, 基因组大小为 3 682 nt. 基因组 5'端编码 23 ku 蛋白, 其终止密码子的通读可产生一个 82 ku 蛋白, 构成病毒的复制酶组分, 位于基因组中部的 ORF2 和 ORF3 分别编码 8 ku 和 6 ku 的小蛋白, 与病毒的胞间运动相关, 基因

组 3'端编码 30 ku 外壳蛋白(coat protein, CP)^[18-19] (图 1a).

本研究以 TNV-A^c 侵染性 cDNA 克隆为基础, 通过基因替换和基因插入策略分别构建了多种基于 TNV-A^c 的 VIGS 载体, 进而比较了两种策略诱导本生烟内源基因沉默的能力, 分析了不同形式的外源片段对基因沉默效率的影响, 明确了 TNV-A^c 诱导本生烟内源基因沉默的温度条件, 同时对外源片段在重组病毒侵染过程中的稳定性及沉默表型的持续时间进行了分析.

1 材料与方法

1.1 植物材料和生长环境

本生烟(*Nicotiana benthamiana*)在温室育苗后移入人工气候室, 14 h 光照 /10 h 黑暗, 18℃ 下或 24℃ 下生长.

1.2 菌种和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 EHA105 由本实验室保存. 双元载体 pCass4-Rz^[20]由美国加州大学 Berkeley 分校 Andrew Jackson 教授惠赠.

1.3 TNV-A^c 重组病毒载体的构建

替换型 TNV-A^c 重组病毒载体的构建均以 T7 启动子驱动下 TNV-A^c 的侵染性 cDNA 克隆 pMTC27^[19]为模板, 通过重叠 PCR 或反向 PCR 的方法构建获得(图 1a). 35S 启动子驱动下的农杆菌

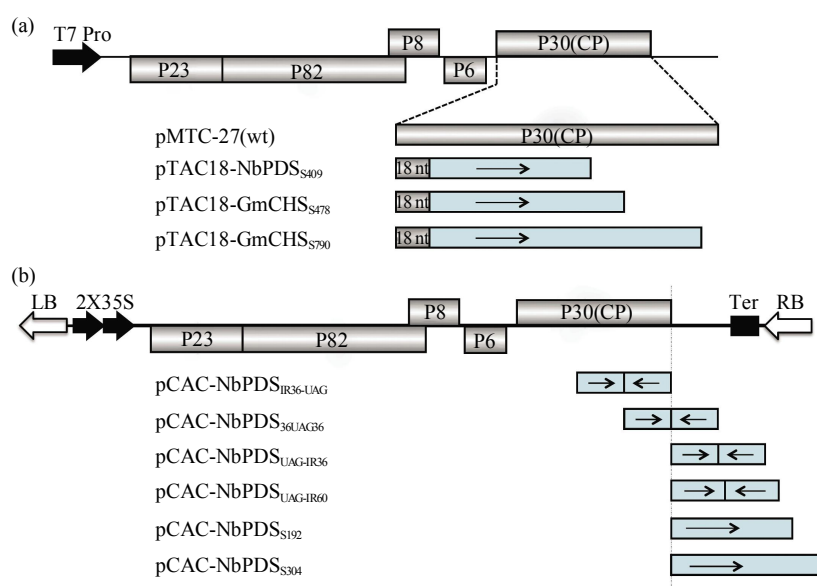


Fig. 1 Construction of TNV-A^c-based gene silencing vectors

(a) Different lengths of *PDS* and *GmCHS* fragments derived from *N. benthamiana* and *Glycine max*, respectively, were fused immediately downstream of the CP ORF that only kept the 18 nt at its 5' end. (b) Inverted-repeats of *PDS* fragments (2×36 nt) were inserted at different positions around the stop codon (UAG) of CP ORF. Furthermore, longer *PDS* fragments were inserted immediately behind the UAG stop codon with a pattern of inverted repeats or in sense orientation to analyze the length of heterologous fragments that TNV-A^c could tolerate.

注射载体的获得是将含有外源片段的 TNV-A^c 全长 cDNA 克隆至双元载体 pCass4-Rz(图 1b), 所有克隆中外源片段的插入区域都经 DNA 测序验证。

本研究所用的本生烟内源基因主要有 3 种, 分别是八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS) 基因(GenBank 登录号: AJ571700)^[21]、sulfur 基因 *Su*(GenBank 登录号: AJ571699)^[22]和镁离子螯合酶 H 亚基基因 *ChlH*(GenBank 登录号: AF014052)^[23]。

1.4 重组 TNV-A^c 侵染性 cDNA 克隆的体外转录与接种

以约 0.1~0.2 μg 经 *Sma* I 线性化的质粒 DNA 为模板, 用 T7 RNA 体外转录试剂盒(Promega 公司)于 37℃ 反应 1.5 h. 将体外转录物与等体积的 2×GKP 缓冲液(50 mmol/L 甘氨酸, 30 mmol/L K₂HPO₄ (pH 9.2), 1%皂土, 1%硅藻土)混合, 机械摩擦接种本生烟叶片^[18-19]。

1.5 农杆菌注射接种(agroinfiltration)本生烟

将重组质粒经冻融法转化农杆菌后^[24], 挑单菌落接种到 50 ml 液体 LB 培养基(含 100 mg/L 利福平, 100 mg/L 卡那霉素, 10 mmol/L MES, 20 μmol/L As)中于 28℃ 摇菌培养至 A₆₀₀ 达到 1.0~2.0, 2 218 g 离心 10 min 收集菌体, 再用重悬缓冲液(含 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MES, 100 μmol/L As)悬浮菌体沉淀, 调整菌液 A₆₀₀ 至 0.8~1.0, 菌液用 1 ml 无针头注射器浸润接种苗龄为 3 周的本生烟叶片。

1.6 RT-PCR 和 Western blotting 检测

分别提取接种植株叶片总 RNA, 经 DNase I 处理后, 取约 3 μg 总 RNA 用于 RT-PCR 检测. 所用引物位于 TNV-A^c CP 基因终止密码子的侧翼, 以检测插入的外源基因片段在重组病毒基因组中的稳定性, 引物的序列分别为 5' ATTGAACCAATC-AACCCAACAATG 3' (对应于 TNV-A^c 的 3410~3433 nt)和 5' GGGGTGGGGCAAAGCCCCTCA 3' (与 TNV-A^c 的 3661~3682 nt 反向互补)。

取接种后的本生烟上位叶片 0.5 g, 液氮中研磨后加入 300 μl 蛋白质上样缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 10%甘油, 2% SDS, 5% β- 巯基乙醇, 0.1%溴酚蓝). 取上清 20 μl 经 12.5% SDS-PAGE 分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上. 一抗采用 TNV-A^c 特异性抗血清, 二抗采用碱性磷酸酯酶标记的 A 蛋白(AP-A, 0.5 g/L, Sigma 公司), 用

含有 NBT(330 mg/L)和 BCIP(165 mg/L)底物的缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.5, 100 mmol/L NaCl)显色。

1.7 siRNA 的 Northern blotting 检测

siRNA Northern blotting 参考文献[25]并加以改进, 取 0.2~0.5 g 叶片置于液氮中充分研磨, 加入 1.3 ml Trizol(Invitrogen 公司)后研磨使其和样品充分混合, 将样品转移至 2 ml Eppendorf 管中, 加入 500 μl 氯仿 / 异戊醇抽提 2 次, 离心后转移上层水相至新离心管中, 并加入等体积的异丙醇, 混匀后室温放置 10 min, 4℃ 下 12 000 g 离心 10 min 沉淀 RNA, 经 75%乙醇洗涤后, 干燥并溶解. RNA 经 15%聚丙烯酰胺凝胶(含 7 mol/L 尿素)分离后, 利用 Bio-Rad 半干转膜装置, 将其转移至尼龙膜(Hybond N⁺)上, 将体外转录出的放射性标记的本生烟 *PDS* mRNA 片段(855~1264 nt)经碳酸水解制备探针, 进行 Northern blotting 检测。

2 结果与分析

2.1 替换型载体不能有效引发基因沉默

目前, 替换型 VIGS 载体通常是将不影响病毒侵染和复制的元件替换为植物内源基因片段^[26-27]. TNV-A^c 的基因组只有 3 682 nt, 基因排列十分紧凑(图 1a), 为最大程度降低插入外源基因片段对病毒侵染活性的影响, 同时保持病毒基因组 RNA 二级结构的相对稳定, 本研究首先尝试将外源基因片段替换 TNV-A^c 外壳蛋白. 以 TNV-A^c 侵染性 cDNA 克隆 pMTC27 为模板, 将长度分别为 790、478 nt 的大豆查尔酮合成酶基因(*GmCHS*)片段以及 409 nt 的本生烟 *PDS* 基因(*NbPDS*)片段分别替换 CP 基因的 19~828 nt 区域(只保留 CP 基因 5' 端 18 nt 和终止密码子 UAG), 获得 3 种重组病毒载体 pTAC18-GmCHS_{S790}、pTAC18-GmCHS_{S478} 和 pTAC18-NbPDS_{S409}(图 1a)。

将 3 种重组病毒载体的体外转录物分别接种本生烟, 3 周后, 野生型病毒在上位叶出现了典型的系统坏死症状, 而 3 种重组病毒在上位叶均未出现典型症状和明显的内源基因沉默表型. 提取接种叶片总 RNA, 以 CP 基因终止密码子的侧翼序列为引物, RT-PCR 检测插入的外源基因的完整性, 结果表明, 接种 pTAC18-GmCHS_{S478} 和 pTAC18-NbPDS_{S409} 的叶片扩增片段大小与预期相符, 接种

pTAC18-GmCHS_{S790} 的叶片除目的条带外, 还有 3 条小的条带(图 2), 说明外源基因片段存在部分丢失的现象. 在上位叶中用 RT-PCR 均未检测到重组病毒. 以上结果说明, 在保留 CP 基因 5'端 18 nt 的条件下, TNV-A^C 容纳外源基因片段的能力为 500 nt 左右, 携带外源基因片段的重组病毒虽然可在接种叶片进行复制, 但是丧失了系统移动能力, 进而不能有效诱导本生烟内源基因的沉默, 因此采用替换 CP 基因策略构建 VIGS 载体不适合于 TNV-A^C.

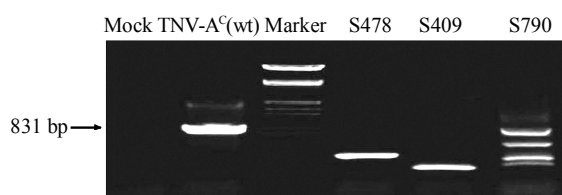


Fig. 2 Detection of CP-replacement virus by RT-PCR in *N. benthamiana*

2.2 不同形式外源片段对 TNV-A^C 诱导基因沉默的影响

TNV-A^C 基因组长度为 3 682 nt, 只编码 5 种蛋白质, 每种蛋白质均具有多种生物学功能, 然而构建 VIGS 要保证各基因正常行使功能, 在不破坏各个 ORF 的情况下, 可供插入外源片段的位置有限. 其 3'非编码区的长度为 240 nt, 这类病毒存在多种 5'和 3'端 RNA-RNA 相互作用^[28], 因而对此区域的分子操作往往可能影响病毒的复制能力, 考虑到以上限制因素, 将插入位点选择在靠近 CP 终止密码子附近. 利用正向插入和反向重复插入 2 种结构形式, 将长度为 192 nt 和 304 nt 的 *NbPDS* 基因片段以正向插入的形式、将长度为 72 nt(2×36 nt)和 120 nt(2×60 nt)的 *NbPDS* 基因片段以反向重复的形式分别插入 TNV-A^C 的农杆菌注射载体 pCXB-A^C 中的 CP 基因终止密码子 UAG 之后, 获得 4 种重组质粒 pCAC-NbPDS_{S192}、pCAC-NbPDS_{S304}、pCAC-NbPDS_{UAG-IR36} 和 pCAC-NbPDS_{UAG-IR60}(图 1b).

将上述重组质粒和野生型病毒载体 pCXB-A^C 分别转化农杆菌 EHA105, 等比例注射接种本生

烟, 每组 10 株. 2 周后, 只有注射 pCAC-NbPDS_{UAG-IR36} 的本生烟植株新生叶片出现可见的叶片漂白表型. 3 周后, 注射 pCAC-NbPDS_{UAG-IR60} 植株的新生叶片开始出现漂白表型. 4 周后, 注射 pCAC-NbPDS_{S192} 的新生叶片有 6 株出现轻微的漂白区域, 注射 pCAC-NbPDS_{S304} 的本生烟 10% 的新生叶片有白化现象, 此时注射 pCAC-NbPDS_{UAG-IR36} 和 pCAC-NbPDS_{UAG-IR60} 的本生烟在新生叶片上均出现大面积漂白表型, 并且随着时间的延长白化表型也可以扩展到叶柄和茎秆上, 相比之下, 注射 pCAC-NbPDS_{UAG-IR36} 的植株白化程度更强一些(图 3). Northern blotting 检测到了 *NbPDS* 特异性 siRNA, 与相应植株的沉默表型相吻合(图 3). 以上结果说明, TNV-A^C 作为 VIGS 载体可诱发本生烟内源 *NbPDS* 基因的沉默, 且反向重复结构诱导基因沉默的效率更高.

2.3 外源基因片段插入位置对 TNV-A^C 诱导的基因沉默的影响

本实验室前期研究结果表明, TNV-A^C CP 的羧基端并非形成稳定的病毒粒子结构所必需, 此区域插入一定长度的外源片段后重组病毒仍能保持较高的侵染性^[29]. 在明确反向重复形式的外源片段可相对高效诱导沉默的基础上, 本节围绕 CP 的终止密码子 UAG, 进一步比较 3 种插入位置对 TNV-A^C 诱导的基因沉默的影响, 即分别为在 UAG 之前反向重复插入 72 nt(pCAC-NbPDS_{IR36-UAG})、在 UAG 的两侧各插入 36 nt(pCAC-NbPDS_{36UAG36})和 UAG 之后反向重复插入 72 nt(pCAC-NbPDS_{UAG-IR36})(图 1b). 将上述载体转化农杆菌并分别注射本生烟, 每组 10 株. 4 周后, 注射 NbPDS_{IR36-UAG} 和 NbPDS_{36UAG36} 的本生烟只有部分新生叶片出现漂白斑点, 所诱导的 *NbPDS* 基因沉默效率和强度远低于 NbPDS_{UAG-IR36}(图 4a). 以 CP 基因终止密码子的侧翼序列为引物进行 RT-PCR 检测, 结果显示, 在发生沉默的上位叶片中, pCAC-NbPDS_{IR36-UAG} 携带的外源基因片段已经发生丢失, 而 pCAC-NbPDS_{36UAG36} 和 pCAC-NbPDS_{UAG-IR36} 携带的外源基因片段能够稳定存在(图 4b). 这些结果说明, 紧邻 TNV-A^C CP 终止密码子 UAG 之后是插入外源片段的适宜位点, 在此位点插入外源基因片段能够高效诱导目的基因沉默.

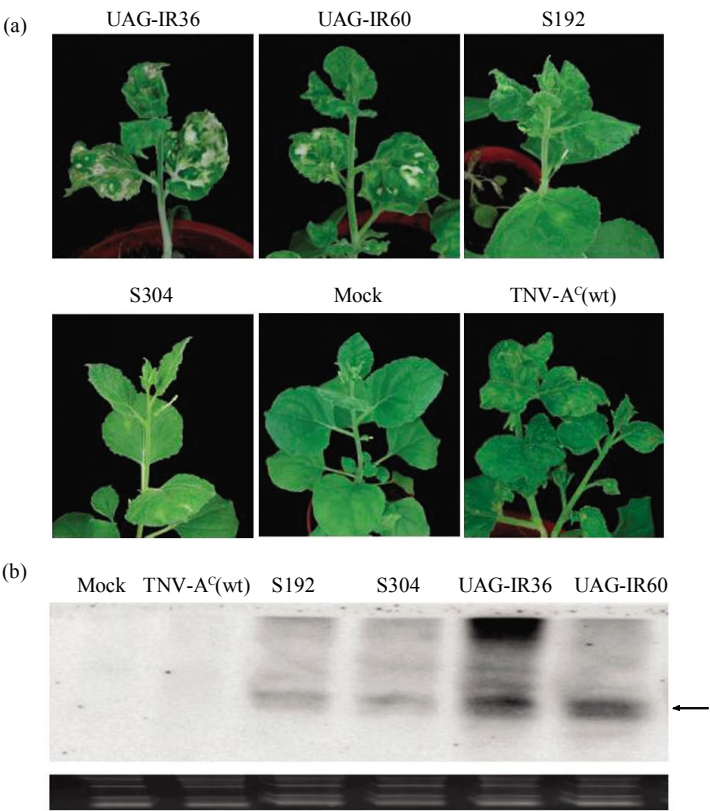


Fig. 3 Insertion of heterologous fragments immediately behind the UAG stop codon of CP ORF could induce *PDS* silencing in *N. benthamiana*
(a) Silencing phenotypes of *N. benthamiana* that agro-infiltrated with different chimeric TNV-A^c. (b) Molecular detection of the *PDS*-specific siRNA in *N. benthamiana* after being agro-infiltrated with TNV-A^c-based *NbPDS* gene silencing vectors.

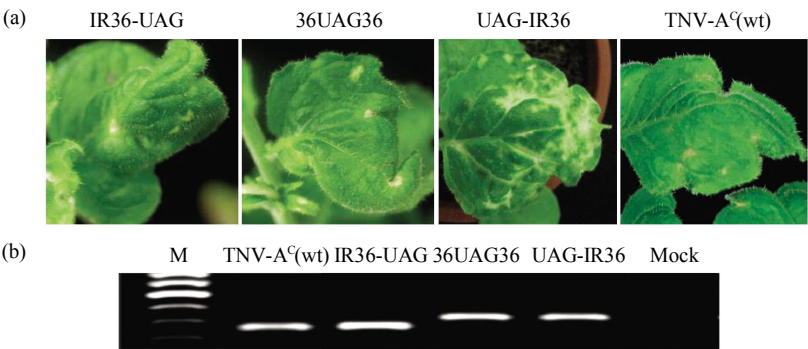


Fig. 4 The effects of position of insertion fragments on gene silencing
(a) Silencing phenotypes induced by TNV-A^c-based VIGS vectors. (b) RT-PCR detection of the stability of chimeric TNV-A^c when inserting the *PDS*_{IR36} at different positions around the UAG stop codon of CP ORF.

2.4 接种植物培养温度对 TNV-A^c 诱导基因沉默的影响

本实验室前期研究表明, TNV-A^c 侵染本生烟适宜温度为 18℃ ~ 26℃, 温度较低时, 病毒在本生烟上系统侵染的能力显著增强, 上位叶的坏死症

状明显加重. 为优化 TNV-A^c 诱导本生烟内源基因沉默的条件, 通过实验比较了接种植物在不同培养温度条件下(18℃ 和 24℃)内源基因的沉默效率、载体的稳定性和沉默表型的持续性. 将注射 pCAC-NbPDS_{UAG-IR36} 的本生烟分为 2 组, 每组 16

株, 分别置于 18℃ 或者 24℃ 条件下进行观察. 4 周后, 置于 18℃ 下的本生烟均呈现典型的 *NbPDS* 基因沉默表型, 沉默区域从局部斑点逐渐扩大为片状分布, 同时也伴随有 TNV-A^c 侵染所致的坏死症状. 置于 24℃ 条件下的本生烟仅有 5 株的上位叶出现少量微弱的白化斑点, 程度明显比 18℃ 条件下弱, 同时病毒系统侵染产生的症状也较轻 (图 5a).

接种后 110 天, 置于 18℃ 条件下的本生烟新生上位叶片仍可观察到白化表型, 而置于 24℃ 下的本生烟沉默表型已不可见 (图 5b). Western blotting 检测结果显示, 无论在 18℃ 还是 24℃ 条件

下, 重组病毒均可系统侵染本生烟 (图 5c). 以 CP 基因终止密码子的侧翼序列为引物进行 RT-PCR 检测, 结果可见, 置于 18℃ 条件下的本生烟 RT-PCR 产物大小约 320 bp, 与预期大小相符, 而置于 24℃ 条件下的本生烟 RT-PCR 产物只有 250 bp 左右, 与野生型 TNV-A^c 的 RT-PCR 产物相近, 说明插入的外源基因片段已经丢失 (图 5d). 由此可见, 在低温 (18℃) 条件下, 重组 TNV-A^c 病毒稳定性强, 外源片段不易丢失, 所诱导的内源 *NbPDS* 基因沉默表型持续时间长 (可达 110 天以上), 这与 Senthil-Kumar^[30]报道的以 TRV 为基础的 VIGS 载体诱导 *NbPDS* 基因沉默的效果相似.

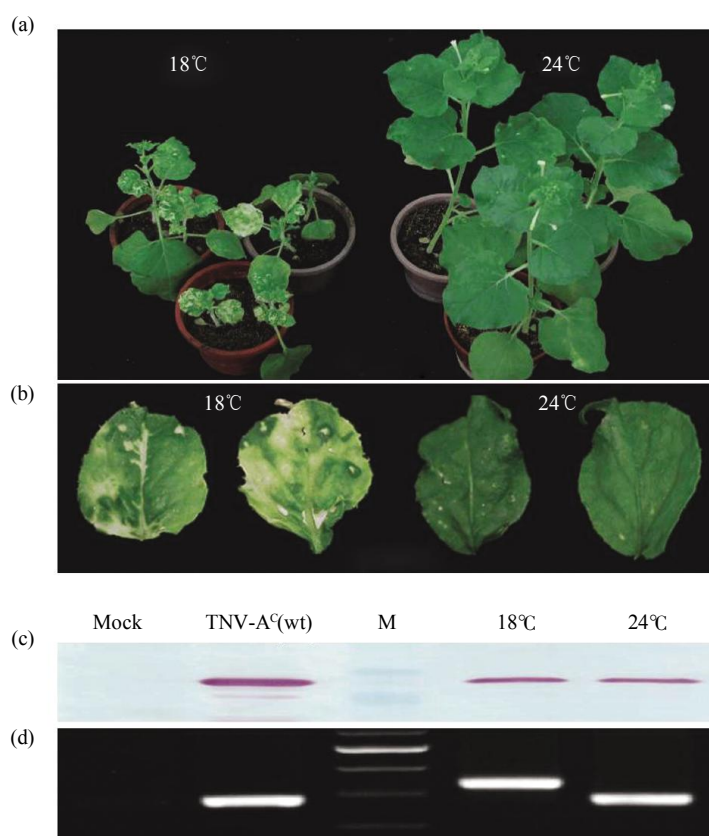


Fig. 5 The culture temperatures could affect the silencing phenotypes induced by TNV-A^c-based VIGS

The silencing phenotypes at different temperatures (a, b) and Western blotting (c) and RT-PCR (d) analyses showed that chimeric TNV-A^c tended to lose the inserted foreign sequence during infection under high plant growth temperature.

2.5 TNV-A^c 诱导本生烟其他内源基因的沉默

在明确 TNV-A^c VIGS 载体类型、外源片段结构形式、插入位置以及接种植物培养温度条件的基础上, 尝试利用 TNV-A^c VIGS 载体沉默本生烟的 *Su* 基因^[22]和 *ChlH* 基因^[23]. 将单臂长度为 36 nt 的本生烟 *Su* 基因和 *ChlH* 基因片段以反向重复的方式

分别插入到 CP 终止密码子 UAG 之后, 农杆菌注射接种本生烟, 3 周后, 注射植株的新生叶片分别产生典型的黄化表型 (图 6a). 以本生烟泛素 (ubiquitin) 基因 *Ubq* 为内参, 用半定量 RT-PCR (循环数分别为 20、25 和 30) 检测 *Su* 基因和 *ChlH* 基因沉默后的相对表达水平, 结果显示这 2 种本生烟

内源基因的 mRNA 转录水平均明显降低(图 6b). 以上结果说明, 基于 TNV-A^c 的 VIGS 载体可有效下调本生烟内源基因的表达水平, 在本生烟基因功能验证中具有应用的潜力.

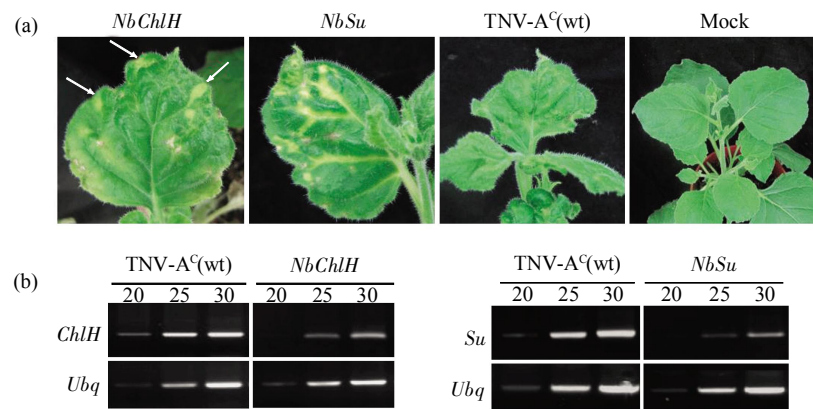


Fig. 6 TNV-A^c based VIGS vector could be used to silence *NbChlH* and *NbSu* in *N. benthamiana*
(a) Silencing phenotypes in *N. benthamiana* when agro-infiltrated with TNV-A^c-based VIGS. Arrows indicated the region that silencing phenotypes appeared. (b) RNA extracted from the leaves was subjected to semi-quantitative RT-PCR amplification (20, 25 and 30 cycles). Amplified ubiquitin gene (*Ubq*) served as internal controls for each samples.

3 讨 论

植物 RNA 病毒的外壳蛋白是一种多功能蛋白, 参与病毒的运动、介体传播、症状形成等过程^[31]. TNV-A^c 的外壳蛋白非病毒复制所必需, 除具有包装 RNA 功能外, 还是病毒在植物体内长距离运输的决定因子^[18, 32-33]. CP 替换型重组 TNV-A^c 只能侵染本生烟接种叶, 丧失了系统移动的能力, 在上位叶上不能诱导 *NbPDS* 基因沉默, 这与本实验室以相同策略构建的重组甜菜黑色焦枯病毒 (*Beet black scorch virus*, BBSV) 诱导本生烟内源基因沉默的结果相似(张晓峰等, 未发表). 与此相反, 当绿色荧光蛋白基因 *gfp* 替换部分 BBSV CP 后, 重组 BBSV 则可以高效率诱导转基因本生烟 16C 中 *gfp* 的系统沉默, 说明植物内源基因和外源转基因在基因沉默的敏感性上是有差别的, 也与前人的报道相一致^[34-35]. 近期研究表明内源基因与外源转基因沉默的差异可能与植物体内 DCL4 和 AGO1 共同作用下的 siRNA 转运方式有关^[36].

基因沉默由 dsRNA 所引发, dsRNA 的来源有两种途径, 一种是由正向或反向的单链 RNA 序列, 在病毒或者细胞内依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)的作用下合成, 另一种是含有反向重复序列的单链 RNA

由分子内部碱基互补所形成的发夹结构^[37]. Lacomme 等^[13]报道在病毒的基因组中加入的反向重复序列可以折叠成发夹结构, 可增加 dsRNA 的生成, 从而增强 VIGS 的沉默效率, 并且该策略同样适用于基于芜菁黄花叶病毒(TYMV)的 VIGS 载体^[14]. 我们在 TNV-A^c 的 CP 之后分别插入 2 种结构、4 个不同长度 *NbPDS* 片段, 比较了其诱导本生烟 *PDS* 基因的沉默效率, 结果显示, 反向重复序列诱导目的基因沉默的效率更高, 且长度为 36 nt 的基因片段即可引发沉默, 与 TYMV 沉默载体中 38 nt 拟南芥 *PDS* 基因(*AtPDS*)片段诱导沉默的结果类似.

在目前已知的 VIGS 载体中, TNV-A^c 的基因组是最小的, 其优势是便于分子操作, 但是小的基因组所能容纳外源基因片段的长度也会受到限制. 向 TNV-A^c 的 CP 之后正向插入长度为 304 nt 的 *NbPDS* 基因片段, 重组病毒系统运动能力明显减弱, 当正向插入长度为 192 nt 的 *NbPDS* 基因片段时, 重组病毒虽然可以系统侵染本生烟, 但是外源基因片段发生了不同程度的丢失. 在 CP 之后插入 72 nt(2×36 nt)和 120 nt(2×60 nt)的重组 TNV-A^c, 系统侵染本生烟的效率均达到 100%, 且未观察到外源基因片段丢失的现象. 由此可见, TNV-A^c VIGS 载体容纳外源基因片段的长度以 120 nt 左右为宜,

既可保证重组病毒系统侵染本生烟, 又能保持插入片段的稳定性, 所诱导的沉默效应可以持续 110 天以上。

利用 TNV-A^c VIGS 载体沉默 *NbPDS* 基因时观察到, 外界环境温度对该病毒诱导基因沉默的效率和载体稳定性有重要的影响。18℃ 下, pCAC-NbPDS_{UAG-IR36} 诱导沉默的效率高、持续时间长, 插入片段稳定(图 5b), 与之相比, 24℃ 条件下沉默效率低, 插入片段也不稳定。Cai 等^[38]研究烟草脆裂病毒(TRV)VIGS 载体沉默番茄 *Chl I* 基因的条件时发现, 22℃、25℃ 和 28℃ 环境中的沉默效率分别为 93.9%、67.2% 和 0%。Fu 等^[39]证明低温对 TRV 诱导的沉默表型及持续性有显著影响。不仅是 RNA 病毒, DNA 病毒——棉花皱叶病毒(CLCrV)诱导的基因沉默中, 环境温度也起到决定性作用^[40]。在本生烟抗病毒侵染过程中, RDR6 基因发挥了关键性作用, 但其活性受环境温度的影响^[15], 24℃ 下, 本生烟 RDR6 活性较高, 产生次级 siRNA 的能力较强, 使得侵入病毒所承受的寄主沉默压力较大, 这将迫使病毒通过重组删除外源片段来抵抗寄主的沉默筛选压力^[40-41], 本研究中, 重组 TNV-A^c 在高温条件下更易丢失外源片段, 很可能由寄主沉默压力增大所致。

TNV-A 寄主范围广泛, 可系统侵染模式植物本生烟和经济作物大豆等, 该病毒具有基因组体积小、易于进行遗传操作、体外转录产物不需加帽且侵染效率高等明显特点, 具有开发为病毒载体的潜力。目前仅有本实验室利用 TNV-A^c 表达外源蛋白的研究^[29], 尚未将 TNV-A 开发为 VIGS 载体。本研究通过对 TNV-A^c 基因组中的不同插入位点、基因片段插入长度及结构形式、接种植物培养温度等因素的优化, 得到了可高效沉默本生烟内源基因的 VIGS 载体。由于 TNV-A^c 可系统侵染大豆, 下一步我们将会对 TNV-A^c 是否可在大豆上诱导基因沉默开展研究。

参 考 文 献

- [1] 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. *Plant J*, 2004, **39**(5): 734–746
- [2] Purkayastha A, Dasgupta I. Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiol Biochem*, 2009, **47**(11–12): 967–976
- [3] Gossele V, Fache I, Meulewaeter F, *et al.* SVISS-a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants. *Plant J*, 2002, **32**(5): 859–866
- [4] Liu Y L, Schiff M, Dinesh-Kumar S P. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J*, 2002, **31**(6): 777–786
- [5] van der Linde K, Kastner C, Kumlehn J, *et al.* Systemic virus-induced gene silencing allows functional characterization of maize genes during biotrophic interaction with *Ustilago maydis*. *New Phytol*, 2011, **189**(2): 471–483
- [6] Cakir C, Gillespie M E, Scofield S R. Rapid determination of gene function by virus-induced gene silencing in wheat and barley. *Crop Sci*, 2010, **50**(Suppl 1): S77–S84
- [7] Yamagishi N, Yoshikawa N. Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with *Apple latent spherical virus* vectors. *Plant Mol Biol*, 2009, **71**(1): 15–24
- [8] Zhang C, Bradshaw J D, Whitham S A, *et al.* The development of an efficient multipurpose *Bean pod mottle virus* viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. *Plant Physiol*, 2010, **153**(1): 52–65
- [9] Ratcliff F, Martin-Hernandez A M, Baulcombe D C. *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*, 2001, **25**(2): 237–245
- [10] Himer C, Dunoyer P, Moissiard G, *et al.* Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J*, 2003, **22**(17): 4523–4533
- [11] Huang C J, Xie Y, Zhou X P. Efficient virus-induced gene silencing in plants using a modified geminivirus DNA1 component. *Plant Biotechnol J*, 2009, **7**(3): 254–265
- [12] Bartel D. MicroRNAs genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281–297
- [13] Lacomme C, Hrubikova K, Hein I. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats. *Plant J*, 2003, **34**(4): 543–553
- [14] Pflieger S, Blanchet S, Cambarde L, *et al.* Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis using a 'one-step' TYMV-derived vector. *Plant J*, 2008, **56**(4): 678–690
- [15] Qu F, Ye X, Hou G, *et al.* RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol*, 2005, **79**(24): 15209–15217
- [16] Tuttle J R, Idris A M, Brown J K, *et al.* Geminivirus-mediated gene silencing from *Cotton leaf crumple virus* is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiol*, 2008, **148**(1): 41–50
- [17] Xi D H, Li J, Han C G, *et al.* Characterization of *Tobacco necrosis virus A*, an isolate infected soybean (*Glycine max*). *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, **37**(6): 595–603
- [18] Li J, Li M, Li C, *et al.* Effects on the local symptoms of subgenomic RNAs expressions and their translational products of *Tobacco necrosis virus A* Chinese isolate. *Chin Sci Bull*, 2008, **53**(11): 1682–1690
- [19] Xi D H, Li J, Han C G, *et al.* Complete nucleotide sequence of a new strain of *Tobacco necrosis virus A* infecting soybean in China and infectivity of its full-length cDNA clone. *Virus Genes*, 2008, **36**(1): 259–266
- [20] Annamalai P, Rao A L N. Replication-independent expression of

- genome components and capsid protein of brome mosaic virus in planta: A functional role for viral replicase in RNA packaging. *Virology*, 2005, **338**(1): 96–111
- [21] Tao X R, Zhou X P. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *Plant J*, 2004, **38**(5): 850–860
- [22] Kjemtrup S, Sampson K S, Peele C G, *et al.* Gene silencing from plant DNA carried by a *Geminivirus*. *Plant J*, 1998, **14**(1): 91–100
- [23] Hiriart J B, Aro E M, Lehto K. Dynamics of the VIGS-mediated chimeric silencing of the *Nicotiana benthamiana ChlH* gene and of the *Tobacco mosaic virus* vector. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, **16**(2): 99–106
- [24] Holsters M, Waele D, Depicker A, *et al.* Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet*, 1978, **163**(2): 181–187
- [25] Sijen T, Fleenor J, Simmer F, *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 2001, **107**(4): 465–476
- [26] Valentine T, Shaw J, Blok V C, *et al.* Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. *Plant Physiol*, 2004, **136**(4): 3999–4009
- [27] Constantin G D, Krath B N, MacFarlane S A, *et al.* Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant J*, 2004, **40**(4): 622
- [28] Miller W A, White K A. Long-distance RNA-RNA interactions in plant virus gene expression and replication. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, **44**(1): 447–467
- [29] Zhang Y L, Li J, Pu H, *et al.* Development of *Tobacco necrosis virus A* as a vector for efficient and stable expression of FMDV VP1 peptides. *Plant Biotechnol J*, 2010, **8**(4): 506–523
- [30] Senthil-Kumar M, Mysore K S. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Plant Biotechnol J*, 2011, **9**(7): 797–806
- [31] Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillock E, *et al.* The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol*, 2001, **39**: 419–460
- [32] Molnar A, Havelda Z, Dalmay T, *et al.* Complete nucleotide sequence of tobacco necrosis virus strain D^H and genes required for RNA replication and virus movement. *J Gen Virol*, 1997, **78**(6): 1235–1239
- [33] Zhang Y J, Zhang X F, Niu S F, *et al.* Nuclear localization of *Beet black scorch virus* capsid protein and its interaction with importin [alpha]. *Virus Res*, 2011, **155**(1): 307–315
- [34] Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe D C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 1998, **10**(6): 937–946
- [35] Fagard M, Vaucheret H. (Trans)Gene silencing in plants: How many mechanisms?. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, **51**: 167–194
- [36] Chitwood D H, Timmermans M C P. Small RNAs are on the move. *Nature*, 2010, **467**(7314): 415–419
- [37] Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet*, 2005, **6**(3): 206–220
- [38] Cai X, Wang C, Xu Y, *et al.* Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector. *Virus Res*, 2007, **125**(2): 169–175
- [39] Fu D, Zhu B, Zhu H, *et al.* Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J*, 2005, **43**(2): 299–308
- [40] Zhong X, Hou H, Qiu W. Integrity of nonviral fragments in recombinant *Tomato bushy stunt virus* and defective interfering RNA is influenced by silencing and the type of inserts. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, **18**(8): 800–807
- [41] Barajas D, Tenllado F, Díaz-Ruiz J R. Characterization of the recombinant forms arising from a *Potato virus X* chimeric virus infection under RNA silencing pressure. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, **19**(8): 904–913

Development and Optimization of *Tobacco necrosis virus A* Induced Gene Silencing in *Nicotiana benthamiana**

GAO Yang, ZHANG Yong-Liang, ZHANG Xiao-Feng, HAN Cheng-Gui, YU Jia-Lin, LI Da-Wei**

(State Key Laboratory of Agro-Biotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract A series of recombinant viruses were engineered by gene replacements or gene insertions into an infectious cDNA clone of *Tobacco necrosis virus A* Chinese isolate (TNV-A^C). TNV-A^C-based virus induced gene silencing (VIGS) containing different structural arrangements of sequences targeting specific genes and variations in the positions of exogenous fragment insertions were evaluated along with temperature effects on inoculated plants. Replacement of the coat protein (CP) gene by exogenous gene fragments could not be applied to TNV-A^C because the chimeric TNV-A^C constructs were unable to induce silencing of corresponding endogenous gene and derivatives lacking the CP could not move systematically in *Nicotiana benthamiana*. We found that the optimal position for insertion of exogenous gene fragments was the region immediately behind the stop codon of the CP gene, and the maximum lengths of fragments that could be accommodated within virions was around 120 nt. An *NbPDS* fragment inserted into TNV-A^C as an inverted repeat produced a VIGS derivative that could silence endogenous *NbPDS* in *N. benthamiana* with extremely high efficiency. We also found that temperature could significantly affect gene silencing efficiency of inoculated plants and the stability of heterologous gene fragments. Plants grown at 18°C exhibited substantially higher gene silencing efficiency compared with 24°C, and the duration of silencing persisted for more than 110 days. The TNV-A^C-based VIGS vectors were also able to induce efficient silencing of endogenous *Su* and *ChlH* genes in *N. benthamiana*. Taken together, our results show that TNV-A^C has the potential for development into a novel VIGS vector suitable for functional genomics of *N. benthamiana*.

Key words *Tobacco necrosis virus A*, virus induced gene silencing (VIGS), condition optimization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00129

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30325001) and National Basic Research Program of China (2006CB101903).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62733326, E-mail: Dawei.Li@cau.edu.cn

Received: March 18, 2011 Accepted: May 23, 2011