

香蕉束顶病毒复制酶和黄瓜花叶病毒衣壳蛋白 融合基因植物表达载体的构建

郑 耘, 李华平, 肖火根, 范怀忠

(华南农业大学 植物病毒研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 利用重组 PCR 技术将香蕉束顶病毒的复制酶基因和黄瓜花叶病毒的衣壳蛋白基因融合重组, 并与植物表达载体 pBI121 连接, 构建了抗香蕉束顶病和香蕉花叶病的双价植物表达载体, 通过冻融法转化载体入根癌农杆菌 LBA4404, 获得了工程农杆菌 pBI121.FBC, 从而为培育抗病转基因香蕉品种奠定了基础。

关键词: 香蕉束顶病毒; 黄瓜花叶病毒; 融合基因

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0018-04

Construction of plant expression vector of fusion genes with *Banana bunchy top virus* replicase and *Cucumber mosaic virus* coat protein

ZHENG Yun, LI Hua-ping, XIAO Huo-gen, FAN Huai-zhong

(Lab of Plant Virology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Two genes, the replicase gene from *Banana bunchy top virus* and coat protein gene from *Cucumber mosaic virus*, were firstly fused together with PCR, and were inserted into a plant expression vector-pBI121. The plant expression vector was transformed to *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. As a result, the engineered agrobacteria containing pBI121.FBC were gotten, and would be further used to develop a engineering banana variety resistant to two kinds of viruses.

Key words: *banana bunchy top virus*; *cucumber mosaic virus*; fusion genes

香蕉花叶病和香蕉束顶病是危害香蕉生产的两大病害, 其病原分别为黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)和香蕉束顶病毒(*Banana bunchy top virus*, BBTV)。香蕉花叶病和束顶病广泛分布于世界香蕉产区。在我国, 花叶病于 1974 年在广州市郊首次发现, 此后逐年发生严重, 一般发病率为 20%~40%, 个别高达 80%~90%^[1]。香蕉束顶病在我国广东、广西、福建、云南等省区的部分产区发病率达 5%~25%左右, 严重的地块已发展到毁灭的程度^[2]。由于商品用香蕉品种本身多为三倍体, 具有不育的遗传特性, 因此, 传统的育种方法不能在培育抗病品种中得到实质的应用, 有必要借助现代基因工程技术

来培育香蕉抗病新品种。自 20 世纪 90 年代以来, 国外香蕉育种工作者利用细胞工程技术, 建立了多种转基因受体系统, 并利用基因工程手段克隆了许多香蕉抗病基因^[3]。在转基因香蕉研究中, 国外已构建包含有 *Udi* 报告基因的植物表达载体, 并用以转化香蕉悬浮系, 已获得了表达报告基因的再生香蕉植株^[4]。但遗憾的是仍未获得具有抗病性的转基因香蕉。徐春香等^[5,6]已在我国成功地建立了香蕉胚性细胞悬浮系转基因受体系统。李华平等^[7]、杜道林等^[8]克隆得到了香蕉花叶病原——CMV 衣壳蛋白基因。徐春香、何自福等分别完成了 BBTV NS 株系和 NSP 株系基因组的 6 个组分基因克隆序列分析工

收稿日期: 2004-11-08

作者简介: 郑 耘(1969-), 男, 农艺师, 博士, 现在深圳出入境检验检疫局工作。通讯作者: 李华平(1961-), 男, 教授, 博士; E-mail: huaping@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870434); 广东省科技攻关项目(C20209)

© 2005 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作^[3]. 李华平等^[9, 10]已分别完成了香蕉 CMV 衣壳蛋白(Coat protein, CP)基因和 BBTV 复制酶(Replicase, Rep)基因的转化, 获得了单抗病毒的转基因香蕉植株. 为了使获得的转基因香蕉品种同时具备抵抗 2 种普遍发生的香蕉束顶病和香蕉花叶病的目的, 有必要构建多基因表达载体用于基因转化. 本文利用 PCR 基因重组技术, 构建了包含 BBTV 复制酶和 CMV 衣壳蛋白 2 种基因在同一个植物上表达的载体, 从而为利用植物基因工程技术培育双抗香蕉束顶病和香蕉花叶病的转基因香蕉品种奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH_{10B} 菌株和根癌农杆

菌 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 菌株, 均由华南农业大学遗传工程研究室刘耀光教授惠赠, 植物表达载体 pBI121、BBTV 复制酶基因克隆和 CMV 衣壳蛋白基因克隆由华南农业大学植物病毒研究保存. 各种限制性内切酶和工具酶均购自 TaKaRa 公司, 引物由上海博亚公司合成.

1.2 方法

1.2.1 融合基因植物表达载体的构建策略 利用重组 PCR 技术法将 BBTV *Rep* 和 CMV *CP* 连接在一起, 经过酶切后, 插入已删除了 *GUS* 基因的植物表达载体 pBI121 的 T-DNA 中, 构建重组植物表达载体 pBI121.FBC (图 1).

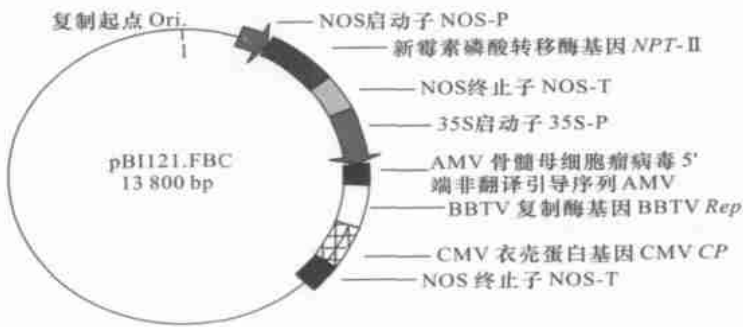


图 1 重组植物表达载体 pBI121.FBC 结构简图
Fig. 1 Sketch map of plant expression vector of fused genes

1.2.2 引物设计 根据已发表的 BBTV *Rep*^[11] 和 CMV *CP* 基因^[7] 核苷酸序列设计 4 条引物. 其中, 引物 P_{BBZ} 与 BBTV *Rep* 开放阅读框起始密码子附近的序列相对应, 并在 5'-末端添加 *Xba*I 酶切位点和 3 个保护碱基; 引物 P_{BBZ} 与 BBTV *Rep* 终止密码子附近的序列及 CMV *CP* 5'-末端起始密码子附近的序列互补, 并去除 BBTV *Rep* 的终止密码子 TGA; 引物 P_{CM1} 与 BBTV *Rep* 3'-端终止密码子附近的序列及 CMV *CP* 5'-端起始密码子附近的序列相对应, 同样去除 BBTV *Rep* 终止密码子 TGA; 引物 P_{CMY} 与 CMV *CP* 的开放阅读框终止密码子序列互补, 并在 3'-末端添加 *Sac*I 酶切位点和 3 个保护碱基. 引物序列如下:

P_{BBZ}: 5'-CTG TCTAGATG GCG CGA TAT GTG GTA TGC-3',
P_{BB2}: 5'-GAT TCA GAT TTG TCC ATG CAA GCA ACT AGC TTT A-3',
P_{CM1}: 5'-TAA AGC TAG TTG CTT GCA TGG ACA AAT CTG AAT C-3',

P_{CMY}: 5'-AAT GAG CTC TCA AAC TGG GAG CAC CCC TGA-3'.

1.2.3 BBTV *Rep* 和 CMV *CP* 基因 PCR 扩增 以含有 BBTV *Rep* 的质粒为模板, 用 P_{BBZ} 和 P_{BB2} 为引物进行扩增, 得到 BBTV *Rep* 基因. 再以含有 CMV *CP* 的质粒为模板, 用 P_{CM1} 和 P_{CMY} 为引物进行扩增, 得到 CMV *CP* 基因, 电泳后, 采用 TaKaRa 公司的凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物. 2 个基因的 PCR 反应体系和程序相同.

PCR 反应体系: 10× *Pfu* Buffer 2.5 μL, dNTPs(10 mmol/L)2 μL, P_{BBZ}、P_{BB2}(0.5 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 0.02 μg, *Pfu* 酶(5 U/μL)0.5 μL, 补灭菌水至 25 μL. PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 5 个循环; 94 °C 变性 1 min, 65 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 用酶热启动法.

1.2.4 BBTV *Rep* 和 CMV *CP* 融合基因 PCR 扩增 利用重组 PCR 技术^[12] 得到 BBTV *Rep* 和 CMV *CP* 融

合基因,电泳后,用 TaKaRa 公司的凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

重组 PCR 反应体系: 10× *Pfu* Buffer 2.5 μL, dNTPs(10 mmol/L) 2 μL, *P*_{BBZ}、*P*_{CMY} (0.5 μmol/L) 各 1 μL, 纯化的 BBTV *Rep* 的 PCR 产物和 CMV *CP* 的 PCR 产物各 0.02 μg, *Pfu* 酶(5 U/μL) 0.5 μL, 补灭菌水至 25 μL。

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 65 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 4 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.5 BBTV *Rep* 和 CMV *CP* 重组植物表达载体 pBI121.FBC 的克隆 将得到的融合基因用 *Sac*I 和 *Xba*I 双酶切,凝胶回收后,与经相同酶切过的植物表达载体 pBI121 连接,连接产物转化感受态大肠杆菌,经卡那霉素筛选得到包含融合基因的克隆。

1.2.6 重组植物表达载体 pBI121.FBC 克隆的鉴定、转化 将克隆得到的融合基因表达载体分别用克隆引物 *P*_{BBZ}和 *P*_{CMY}进行测序,采用 *Sac*I、*Xba*I 进行双酶切鉴定。序列分析由 TaKaRa 公司完成。将经鉴定的重组植物表达载体 pBI121.FBC 用液态冻融法转化农杆菌 LBA4404。采用碱裂解法小量抽提重组植物表达载体后,用 PCR 法进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 BBTV *Rep* 基因和 CMV *CP* 基因的 PCR 单独扩增结果

分别以含有 BBTV *Rep* 基因和含有 CMV *CP* 基因的质粒为模板,经特异性引物 *P*_{BBZ}、*P*_{BB2}和 *P*_{CM1}、*P*_{CMY} PCR 单独扩增后,分别得到长度约为 900 bp 和 700 bp 的 2 个片段(图 2),它们分别与预计的 BBTV *Rep* 和 CMV *CP* 基因的大小一致,说明已得到目的片段。



1, 7: 阴性对照; 2, 3: BBTV 复制酶基因; 4: DL2000 DNA Marker; 5, 6: CMV 衣壳蛋白基因

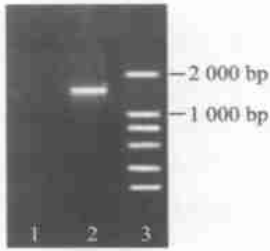
1, 7: negative control; 2, 3: BBTV *Rep* gene; 4: DL2000 DNA Marker; 5, 6: CMV *CP* gene

图 2 BBTV *Rep* 和 CMV *CP* 基因 PCR 扩增
Fig. 2 Amplification of BBTV *Rep* gene and CMV *CP* gene with PCR

2.2 重组 PCR 反应结果

纯化后的 BBTV *Rep* 基因和 CMV *CP* 基因的

PCR 产物,经重组 PCR 扩增后,产生 1 条大小约为 1 600 bp 的 DNA 片段(图 3),该片段和预先设计的融合基因的大小一致,说明已扩增得到了重组融合基因。



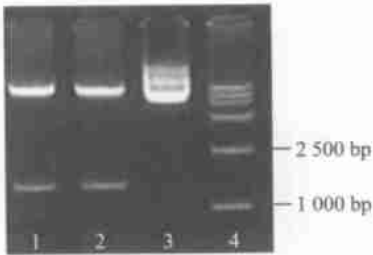
1: 阴性对照; 2: 重组融合基因; 3: DL2000 DNA Marker
1: negative control; 2: recombinant fusion gene; 3: DL 2000 DNA Marker

图 3 重组 PCR 扩增的融合基因的分析

Fig. 3 Analysis of fusion genes by recombinant PCR

2.3 重组植物表达载体 pBI121.FBC 的 PCR 和酶切鉴定结果

将重组融合基因克隆入除去了 *GUS* 基因的植物表达载体 pBI121,获得了重组植物表达载体,命名为 pBI121.FBC。经特异性引物 *P*_{BBZ}和 *P*_{CMY} PCR 鉴定、*Sac*I 和 *Xba*I 双酶切鉴定(图 4),均得到大小约为 1 600 bp 的目的片段,与预期相符。表明所获得的重组植物表达载体含有 BBTV *Rep* 和 CMV *CP* 重组融合基因。



1, 2: *Xba*I-*Sac*I 双酶切; 3: 未酶切重组质粒; 4: DL15000 DNA Marker
1, 2: digested with *Xba*I and *Sac*I; 3: un-digested; 4: DL15000 DNA Marker

图 4 重组植物表达载体 pBI121.FBC 的酶切鉴定

Fig. 4 Digested identification of recombinant vector pBI121.FBC

2.4 重组植物表达载体 pBI121.FBC 的测序鉴定

经 TaKaRa 公司用特异性引物 *P*_{BBZ}和 *P*_{CMY} 进行重组区域核苷酸序列鉴定,所测的核苷酸序列结果与预先设计的完全相同,这表明我们所获得的重组植物表达载体 pBI121.FBC,含有 BBTV *Rep* 基因和 CMV *CP* 基因,并正确融合。

2.5 转化农杆菌

从 *E. coli* 阳性克隆中抽提重组质粒 pBI121.FBC,采用冻融法转化农杆菌 LBA4404 菌株,从转化得到的农杆菌中抽提质粒,经 PCR 鉴定,得到

大小为1 600 bp 的扩增片段(图 5), 证明已获得含有植物表达载体 pBI121. FBC 的工程菌株。



1: 阳性对照; 2~ 5: 为工程农杆菌; 6: DL2000 DNA Marker
1: positive control; 2~ 5: agrobacteria with vector; 6: DL 2000 DNA Marker
图 5 重组植物表达载体 pBI121. FBC 转化农杆菌后的 PCR 鉴定
Fig. 5 Identification of agrobacteria with recombinant pBI 121. FBC by PCR

3 讨论

植物抗病毒基因工程是解决植物病毒病害的有效方法, 已经在生产实际中取得较好的效果. 但是, 目前由此方法获得的抗病毒转基因植株, 往往是通过构建单个病毒的 1 个基因的植物表达载体而完成转化的, 单个基因植物表达载体由于只携带 1 种病毒的基因, 因而所获得的转基因植物只能抗单一病毒病. 可是在农业生产中一种作物往往受到多种病毒病的危害, 如何解决一种作物受多种病毒病害的问题是当今植物病毒学研究中面临的一个新课题. BBTV 和 CMV 是香蕉上的 2 种重要的病毒病害. 之前, 我们曾分别将 BBTV 和 CMV 单个基因转化入香蕉, 分别获得了单抗 BBTV 和 CMV 的抗病转基因香蕉植株^[9 10]. 本文是在以上工作的基础上, 构建含有这 2 种病毒基因的植物表达载体拟用于今后进一步对香蕉的遗传转化, 希望通过双基因的转化来获得双抗这 2 种病毒的转基因香蕉植株, 从根本上解决危害香蕉的这 2 种香蕉上主要的病毒病害问题.

植物抗病毒基因工程广泛采用基于病毒外壳蛋白基因和复制酶基因的抗病策略. 大量的转基因试验结果^[3]表明, 病毒的复制酶基因介导的抗病性具有抗病性强的特点, 而病毒的外壳蛋白基因介导的抗病性则具有抗病谱广的特性. 本试验采用重组 PCR 技术将 BBTV 复制酶基因的整个开放阅读框、CMV 衣壳蛋白的整个开放阅读框连接在一起, 得到

融合基因, 再引入植物表达载体, 用于对香蕉的遗传转化, 从而为最终获得具有复制酶和衣壳蛋白基因介导抗性特点的双抗 (BBTV 和 CMV) 转基因香蕉植株奠定基础. 从转单一病毒基因获得的转基因植株看, 每种病毒基因分别介导的抗性是较高的^[9 10], 但将 2 种基因融合后是否仍然能够表现出转复制酶和衣壳蛋白基因介导的抗性特征, 有待今后研究证实.

参考文献:

[1] 李华平, 胡晋生, 范怀忠. 香蕉花叶病毒检测技术的研究[J]. 病毒学报, 1997, 13(3): 273— 277.
[2] 孟 清, 曹先维. 香蕉束顶病毒研究进展[J]. 中国病毒学报, 1997, 12(2): 97— 102.
[3] 郑 耘, 肖火根, 李华平, 等. 香蕉抗病基因工程[J]. 中国生物工程杂志, 2003 23(8): 39— 42.
[4] GANAPATHI T R. Genetic transformation and hybridization: Agrobacterium mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB)[J]. Plant Cell Reports 2001, 20(2): 157— 162.
[5] 徐春香, 李华平, 肖火根, 等. 香蕉分生小球体途径胚性细胞悬浮系的建立[J]. 园艺学报, 2003 30(5): 580— 582.
[6] 徐春香, PANIS B, STROSSE H, 等. 影响体胚发生途径香蕉(*Musa* spp., AAB group) 植株再生的因素[J]. 植物生理学通讯, 2004 40(3): 293— 296.
[7] 李华平, 胡晋生, BARRY K, 等. 侵染香蕉的黄瓜花叶病毒株系衣壳蛋白基因的克隆和序列分析[J]. 病毒学报, 1996 12(3): 235— 242.
[8] 杜道林, 苏 杰, 周 鹏, 等. 香蕉花叶病毒外壳蛋白基因克隆及表达载体的构建[J]. 广西植物, 2002, 22(1): 81— 84.
[9] 李华平, HU J S, WANG M. 香蕉茎尖遗传转化法研究[J]. 热带植物学报, 2000 21(4): 33— 38.
[10] 李华平, HU J S, WANG M, 等. 香蕉束顶病毒复制酶基因的转化研究[A]. 朱有勇. 植物病理学研究进展[C]. 昆明: 云南科技出版社, 1999. 128— 129.
[11] 何自福, 李华平, 肖火根, 等. BBTV 两个株系组分 I 的克隆和序列分析[J]. 植物病理学报, 2000 30(4): 364— 369.
[12] 李 容, 韩成贵, 李大伟, 等. 绿色荧光蛋白与黄瓜花叶病毒运动蛋白融合基因的构建及在大肠杆菌中的表达[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(1): 19— 22.

【责任编辑 周志红】