

426-431

11226(10)

第7卷第4期  
1992年12月中 国 病 毒 学  
VIROLOGICA SINICAVol.7 No.4  
Dec. 1992烟草花叶病毒装配起始位点反义 RNA  
表达型中间载体的构建彭 海 沈学仁<sup>✓</sup> 吴建华 龚祖坝

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海200031)

提 要

5432.41

利用基因工程方法培育抗病毒植物新品种的途径之一, 是在植株中建立一个产生病毒基因组功能片段的反义 RNA 的系统。本工作设计并合成了一段烟草花叶病毒(TMV)装配起始位点反义 RNA 的基因, 再以 pBR 325 为基本质粒, 构建了包含带有花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 启动子和 PolyA 信号的反义 RNA 表达单元, 以及为筛选转基因植株所必须的 NPT-II 表达单元的中间载体, 为以后经土壤农杆菌而获得转基因烟草植株打下了基础。

关键词: 烟草花叶病毒(TMV) 反义 RNA 中间载体

烟草花叶病毒(TMV)装配起始位点位于该病毒基因组的近3'端。TMV 的装配是由 TMV 外壳蛋白的20S聚合体与该位点结合开始的<sup>[1]</sup>。我们前期的工作表明: 在体外, 与 TMV 装配起始位点互补的 DNA 片段可以抑制 TMV 的装配<sup>[2]</sup>。这意味着该位点的反义 RNA 也能起到类似的作用。因此, 利用植物遗传工程的方法, 在植株体内建立一个产生 TMV 装配起始位点反义 RNA 的系统, 将是可能获得抗 TMV 的植株新品种的有效途径之一。为此, 我们首先设计并合成了反义 RNA 基因, 又成功地构建了这一反义 RNA 的表达型中间载体, 为进一步获得转基因烟草植株打下了基础。

## 材 料 和 方 法

## 一、材料:

本工作所用的内切酶、连接酶、激酶等均为德国 Boehringer 公司产品; 小牛肠道碱性磷酸酶为美国 Sigma 公司产品; (γ-<sup>32</sup>P)ATP 为美国 Amersha 公司产品。大肠杆菌 JM83 和质粒 PBR325 由本所吴祥甫副研究员赠送。

## 二、方法:

- 1、质粒的分离和制备: 按 Maniatis 等<sup>[3]</sup>和 Armitage 等<sup>[4]</sup>的碱裂解法。
- 2、DNA 的酶切, 连接及质粒 DNA 转化大肠杆菌: 按 Maniatis 等的方法<sup>[3]</sup>。

本文于1991年8月12日收到, 1992年4月25日修回。

\*本工作为863高技术项目。

3、酶切DNA片段的电泳分离和回收:参照 Weislander 的方法<sup>[5]</sup>。为减少低熔点琼脂糖的用量,酶切片段先在普通琼脂糖中电泳分离,然后在要回收的条带前挖一宽约1cm的槽;灌入低熔点琼脂糖,继续电泳,待DNA条带进入低熔点琼脂糖后再割出回收。

4、DNA的合成:单链cDNA和引物用ABI公司381A型DNA合成仪合成。双链DNA的合成参照 Maniatis 等的方法<sup>[3]</sup>,先将单链cDNA和引物进行退火,再用Klenow酶法合成互补链。

5、探针的制备:按 Maniatis 等的方法<sup>[3]</sup>,先用小牛肠道碱性磷酸酶处理,去除DNA片段的5'端磷酸基团,再按 Maxam 和 Gilbert 的方法<sup>[6]</sup>进行5'端<sup>32</sup>P标记。

6、原位杂交:参照 Maniatis 等的方法<sup>[3]</sup>。杂交液为5×Denhardt, 3×SSC, 1%SDS。杂交温度为52℃。

## 结果和讨论

### 一、反义RNA基因的设计与合成

TMV-RNA的装配起始位点含有一百多个核苷酸,其中心部位有一段7个核苷酸的靶顺序。这一靶顺序及其邻近区域不仅具有特异的二级结构,而且从已知的TMV各株系的基因组RNA顺序比较来看,靶顺序是一个非常保守的区域<sup>[1]</sup>。我们选取TMV普通株的靶顺序及其两侧部分邻接区共30个核苷酸的顺序作为反义RNA的作用区域。先用DNA合成仪合成了该区域的cDNA(包括两端加上的便于基因工程操作的限制性内切酶位点,共44个核苷酸)和为合成双链所用的12个核苷酸的引物,再用Klenow酶法合成了反义RNA基因,以下简称AR(图1)。

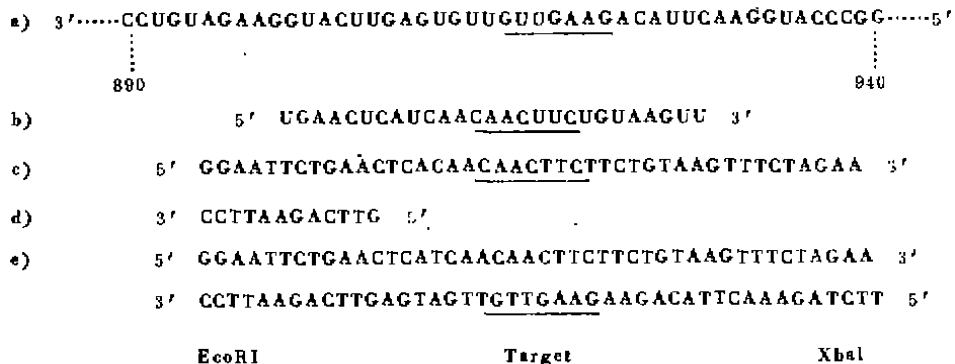


图1 TMV装配起始位点反义RNA基因的设计。a. TMV-RNA装配起始位点部分顺序;

b. 反义RNA; c. 合成的反义DNA; d. 引物; e. 反义RNA基因(AR)

Fig. 1 Design of antisense RNA gene for origin assembly of TMV genome. a) Part of the origin of TMV-RNA; b) Antisense RNA; c) Synthetic cDNA; d) Primer; e) Antisense RNA gene (AR)

### 二、质粒A的构建

质粒pNE0105和pBR325分别用EcoRI和HindIII双酶切,经电泳分离,从pNE0105获得含K<sup>mr</sup>表达单元的片段(2.0kb),从pBR325获得含Ap<sup>r</sup>的片段(1.4kb),

两者用  $T_4$  连接酶连接, 转化感受态大肠杆菌 JM83, 分别以 Ap、Cm、Tc 进行筛选, 选取仅对 Ap 有抗性的菌落, 从中提取质粒 A。质粒 A 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切, 可获得含  $Km^r$  表达单元的片段 (2.0kb 见图 2)。

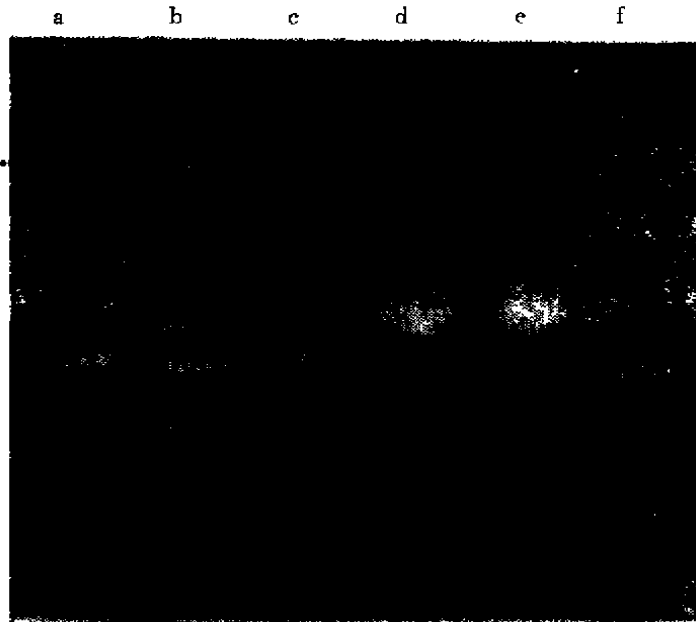


图 2 1.0% 琼脂糖凝胶电泳

a. PNE0105; b. pNE0105 经 EcoR I 和 Hind III 酶切; c. 质粒 A; d. 质粒 A 经 EcoR I 酶切;  
e. 质粒 A 经 Hind III 酶切; f. 质粒 A 经 EcoR I 和 Hind III 酶切

Fig 2 1.0% agarose gel electrophoresis a. PNE 0105; b. pNE 0105 digested with EcoR I and Hind III; c. Plasmid A; d. plasmid A digested with EcoR I; e. plasmid A digested with Hind III; f. plasmid A digested with EcoR I and Hind III.

### 三、质粒 B 的构建

质粒 pRT101 用 EcoR I 和 Xba I 双酶切, 电泳分离得大片段 (3.31 kb), 用  $T_4$  连接酶与经 EcoR I 和 Xba I 双酶切 AR 片段连接, 转化感受态大肠杆菌 JM83, 在 Ap 培养基上初步筛选后, 再用  $^{32}P$  标记的 AR 基因作探针进行和原位杂交筛选, 获得含有质粒 B 的菌落 (图 3), 质粒 B 含有带花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 强启动子和 PolyA 信号的 AR 基因。

### 四、质粒 C 的构建

质粒 B 经 Hind III 酶切后, 电泳分离获得含 AR 表达单元的片段 (0.7kb), 用  $T_4$  连接酶插入质粒 A 中  $Km^r$  表达单元下游的 Hind III 位点, 经 Ap 培养基初步筛选, 所得菌落分别以  $Km^r$  基因和 AR 基因为探针进行原位杂交, 筛选出对两种探针均表现为阳性的菌落 (图 4), 从中提取质粒 C, 即反义 RNA 表达型中间载体。

从上述结果可以看出, 获得反义 RNA 表达型中间载体的基本路线是: 从质粒 pNE 0105 获得为以后筛选转基因植株所必需的  $Km^r$  表达单元, 插入 pBR325 的 EcoR I 与 Hind III 位点之间, 获得嵌合质粒 A, 将 AR 基因插入质粒 pRT 101 的 CaMV 35S 启动子和 PolyA 信号之间, 获得嵌合质粒 B。再从质粒 B 中切出 AR 表达单元, 插入质粒 A, 从

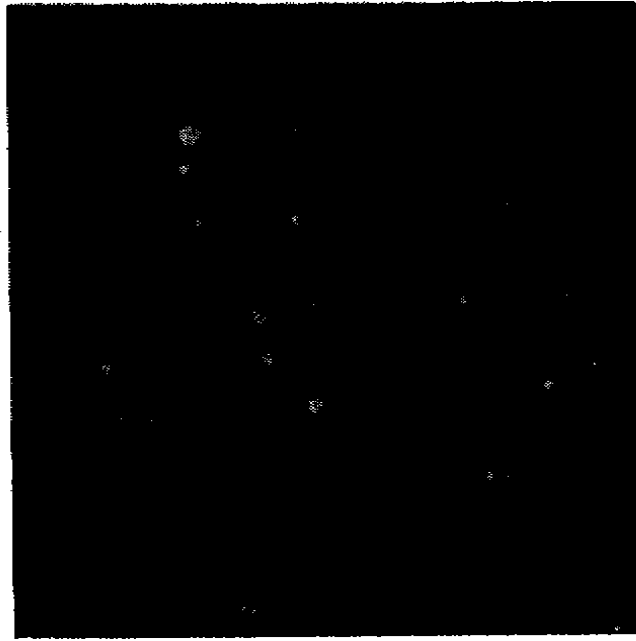


图3 原位杂交放射自显影(复制于X光片)。探针为AR基因。

Fig. 3 Autoradiography of in situ hybridization (Copied from X-ray film).  
AR gene as probe.

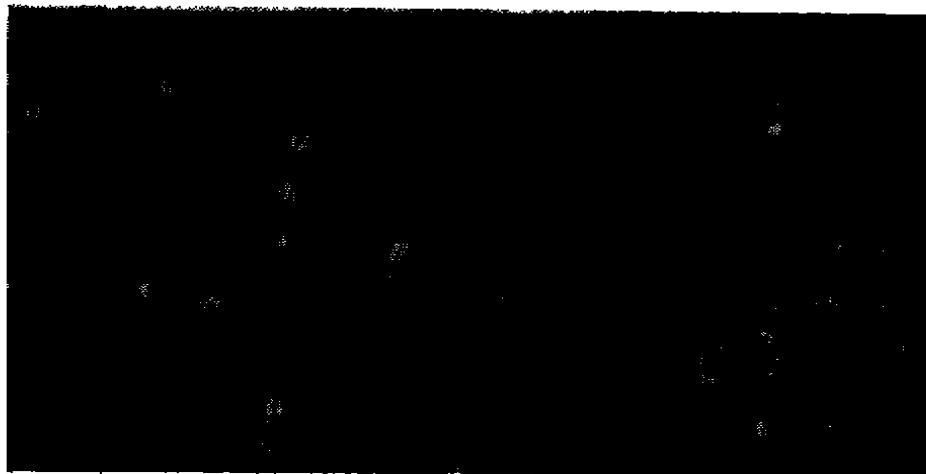


图4 原位杂交放射自显影(复制于X光片)。A. 探针为AR基因; B. 探针为Km<sup>r</sup> 基因  
基因双阳性菌落的标号为1, 5, 49, 52。

Fig. 4 Autoradiography of in situ hybridization (Copied from X-ray films).  
A AR gene as probe; B. Km<sup>r</sup> gene as probe, Double-positive clones labelled  
with 1, 5, 49, 52.

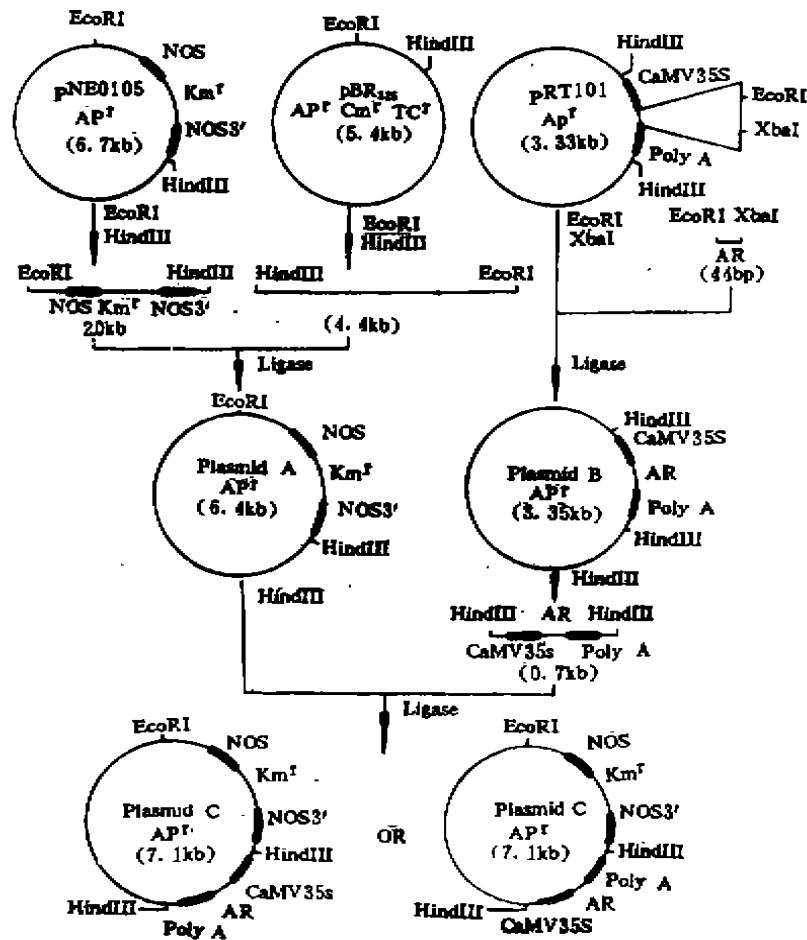


图 5 构建TMV装配起始位点反义RNA表达型中间载体的策略

Fig. 5 The strategy of construction of the intermediate vector expressing antisense RNA gene for the assembly origin of TMV genome

而构建了TMV装配起始位点反义RNA的表达型中间载体(质粒C)。(图5)

质粒pRT101的CaMV35S启动子转录起始位点至AR基因插入的EcoRI位点仅7个核苷酸,且不含有ATG(参见[7]),排除了转录产物被翻译的可能性,转录产物的融合片段也很小,不至于影响其作为反义RNA的功能。由于DNA片段的插入大都采取了双酶切的方法,避免了反向连接的问题。质粒C的构建虽然采取单酶切的方法,AR表达单元的插入可有两个方向,但AR表达单元是独立的,其插入的方向性并不影响它的表达。中间载体中除含有反义RNA表达单元外,还含有筛选转基因植株所必需的Km<sup>r</sup>表达单元。这一中间载体的构建成功为进一步转化烟草组织,再生转基因烟草植株奠定了基础,这些工作目前正在进行之中。

## 参 考 文 献

- [1] Okada Y. 1988, *Adv. Biophys.* 22: 95.  
 [2] 彭海等, 1989, *病毒学杂志*, (4): 427.  
 [3] Maniatis T, et al., 1982, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.  
 [4] Armitage P, et al., 1978, in: Draper J, et al, eds., *Plant Genetic Transformation and Gene Expression*, Blackwell, Oxford, Chapter 1.  
 [5] Weislander L., 1979, *Anal. Biochem.* 98: 305.  
 [6] Maxam A.M, and Gilbert W., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 500.  
 [7] Topfer R, et al., 1987, *Nucl. Nucl. Res.* 15: 6090.

## Construction of Intermediate Vector Expressing Antisense RNA Gene for the Assembly Origin of TMV-RNA

Peng Hai, Shen Xue-ren, Wu Jian-hua, Gong Zu-xun

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

In this paper we have designed and constructed an antisense gene which is complementary with the assembly origin of TMV-RNA, then a intermediate vector which contains the expressing unit, consisting of CaMV 35S promoter, antisense RNA gene and poly A signal, as well as the NPT-II expressing unit was constructed. The NPT-II is essential for the selection and transformation of plants. Thus, the successful construction of this intermediate vector will facilitate obtaining the transgenic plants.

**Key words:** Tobacco mosaic virus (TMV) Antisense RNA  
Intermediate vector