

毛头鬼伞真菌具有抗烟草花叶病毒活性的 $y3$ 基因的克隆及对烟草的转化

王学仁^{1,2}, 何涛¹, 张改娜¹, 郝建国¹, 贾敬芬^{1*}

(¹ 西北大学生命科学学院, 陕西省生物技术重点实验室, 西安 710069)

(² 西安文理学院生命科学系, 西安 710065)

摘要:【目的】蛋白质 Y3 具有抗烟草花叶病毒 (TMV) 活性并由 $y3$ 基因编码。本文的目的是从真菌毛头鬼伞 (*Coprinus comatus*) 中克隆 $y3$ 基因全长并在植物体中展现其对 TMV 的抑制活性。【方法】我们利用试剂盒 5'-Full RACE Core Set (TaKaRa) 扩增了 $y3$ 基因 cDNA 5'-端未知序列, 通过 RT-PCR 获得了全长序列, 并把该全长序列与 CaMV 35 S 启动子和 NOS 终止子一起插入多克隆位点 (MCS) 构建了植物表达载体 pCAMBIA1301- $y3$, 用于农杆菌介导的烟草转化。【结果】 $y3$ 基因全长 534 碱基对, 包含 1 个开放阅读框 (ORF), 编码一条含 130 个氨基酸残基的肽链 (GenBank 检索号: GQ859168; EMBL: FN546262)。其 cDNA 序列和由它推到的氨基酸序列均与已发表的 $y3$ 基因部分片段有高度相似性 (94%)。Northern 杂交分析证实了 $y3$ 基因在转基因烟草中得到表达。接种 TMV 的转基因植株表现出抗 TMV 的活性。【结论】我们克隆了 $y3$ 基因全长并得到了转基因植株。在转基因植株中, 由于 $y3$ 基因的表达改善了植株的抗病毒活性。 $y3$ 基因的克隆和表达无疑为该基因的进一步研究奠定了基础。

关键词: *Coprinus comatus*; $y3$ 基因; Y3 蛋白; 植物表达载体构建

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0182-09

烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV), 是一种 RNA 病毒, 能在烟草上引起花叶病, 也能在其他植物上引起相似后果, 用作实验对象相当有用^[1]。另一方面它又是一种具广泛寄主的病原体, 不仅能感染烟草等茄科植物, 还能感染 200 种以上其他植物^[2]。TMV 每年对世界农业和经济作物的生产造成了相当大的影响, 以烟草为例, 在有些地方年平均发病率为 15%, 大发生年份可达 60%, 严重的田块病株率超过 80%, 甚至绝收^[3]。为了防止烟草花叶病毒的危害, 并且作为化学药物的替代品, 人们不断尝试提取天然生物产物用于烟草花叶病毒的防治, 近十多年来不断有植物或真菌提取物对 TMV 具有抗性的报道^[4-9]。其中一种来自毛头

鬼伞 (*Coprinus comatus*) 的碱性蛋白质 Y3 表现出了良好的 TMV 抗性^[10]。有关这种具有抗 TMV 活性的蛋白质的氨基酸序列和该基因的部分 cDNA 序列已有报道^[11]。本文主要目的是从毛头鬼伞中克隆这一奇异的 TMV 抗性基因全长, 构建植物表达载体, 并对 TMV 敏感的烟草进行转化, 为该基因的功能验证及日后的应用开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试材和菌株: 毛头鬼伞 (*Coprinus comatus* (Mull.: Fr.) S. F. Gray) 5.252 菌株购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。菌

基金项目: 国家自然科学基金 (30671087); 西安市科技创新支撑计划 (YF07109)

* 通信作者。Tel: +86-29-88303484; Fax: +86-29-88305207; E-mail: jiajf38@nwu.edu.cn

作者简介: 王学仁 (1956-), 男, 陕西三原人, 副教授, 博士研究生, 真菌遗传和分子生物学。E-mail: wangxueren56@126.com

收稿日期: 2009-09-04; **修回日期:** 2009-11-09

丝体是通过液态静置培养获得,即在 50 mL 无菌的马铃薯葡萄糖液体培养基(200 克去皮马铃薯切块在水中煮沸 20 min,过滤制取滤液,加入葡萄糖 20 g,待溶解后加入蒸馏水至 1000 mL,分装灭菌即可)中,接入斜面菌种,在 23°C 下静置培养约 20 d,有浮于液体表面的菌丝体形成,备用。TMV 毒株和普通烟草(*Nicotiana tabacum*) NC89 由西北农林科技大学植保学院吴云峰教授惠赠。大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10 菌株和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 菌株为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:本实验所用引物的设计采用 Primer 5.0 软件;核酸序列的比对和衔接采用 DNASTAR 和 DNAMAN 软件。引物合成由 TaKaRa(大连)完成,核酸测序由基康(上海)和上海生工完成。核酸 PCR 扩增所用 ExTaq DNA 聚合酶、LA Taq DNA 聚合酶及相关药品、DNase I (RNase-free)、核酸内切酶和核酸 5'-RACE 所需的 5'-Full RACE Core Set 试剂盒及琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒(Agarose Gel DNA Purification Kit)均购自 TaKaRa(大连)。DNA 分子量标记购自 TaKaRa 和西安海碧。

1.2 真菌及植物 DNA 和 RNA 的提取

真菌总 RNA 提取及植物基因组 DNA 和总 RNA 的提取参阅文献[12]。用于 Northern 分析的植物总 RNA 的提取采用 TRNzol-A⁺ Total RNA Reagent 试剂盒(Tiagen Biotech(Beijing) Co. Ltd.),并按说明操作。

1.3 毛头鬼伞 $y3$ 基因的克隆

1.3.1 毛头鬼伞 $y3$ 基因克隆中所用引物:在毛头鬼伞 $y3$ 基因克隆的过程中,用于 5'-RACE、全长基

因扩增和构建植物表达载体的引物列于表 1 中。引物的设计参阅了已发表的 $y3$ 基因部分 cDNA 序列^[11]及 $y3$ 基因的基因组序列(另文发表)。

1.3.2 5'-RACE 扩增基因 $y3$ cDNA 的 5'末端未知序列:基因 $y3$ 的 5'末端未知序列的扩增采用了 5'-Full RACE Core Set 试剂盒(TaKaRa)。按照试剂盒说明,以经过 5'末端磷酸化的 Py21 为引物,以毛头鬼伞 mRNA 为模板,合成 cDNA 第一链,以 RNase H 降解 mRNA 链,然后将 cDNA 链经 T4 RAN 连接酶环化或首尾相连接,再以 Py13 与 Pyr1 和 Py24 与 Pyr2(表 1)为两组引物进行连续两次巢式 PCR 扩增。第一次 PCR 的扩增体系为 50 μ L,含有 5 μ L 10 \times LA PCR Buffer II(含 Mg^{2+})、1 μ L 连接产物、8.0 μ L 各 2.5 mmol/L 的 dNTP、10 μ mol/L 引物 Py13 和 Pyr1 和 2.5 U TaKaRa LA Tag 核酸聚合酶。扩增程序是 94°C 3 min 1 循环;94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min 共 25 循环;最后 72°C 10 min 延伸。第二次 PCR 的体系与程序与第一次 PCR 基本相同,惟有模板为 1 μ L 第一次 PCR 产物,引物为 10 μ mol/L Py24 和 Pyr2。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,再经琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒(TaKaRa)纯化。纯化产物与 pMD18-T 相连,经测序以得到 $y3$ 基因 cDNA 的 5'末端序列。

1.3.3 基因 $y3$ 全长 cDNA 序列的扩增:利用 DNAMAN 软件将上述扩增的 $y3$ 基因 cDNA 的 5'末端序列与已发表的 $y3$ 基因部分 cDNA 序列^[11]和另文发表的 $y3$ 基因基因组 DNA 序列进行比对,依次推断基因 $y3$ 的预测全长。根据此预测全长序列设计 $y3$ 基因 cDNA 全长引物 PRr1 和 PR1(表 1)。

表 1 用于毛头鬼伞 $y3$ 基因 5' RACE 和基因克隆的引物

Table 1 Primers used for 5' RACE and cloning of $y3$ gene of *Coprinus comatus*

Names	DNA sequences of Primers (5'→3')	Used for
Py21	Pi-CAATAGCAAACAGGAAAGGAGC	5'-RACE
Py13	GTAGCAGCGTTGGCCGTGTCT	
Pyr1	CTGTAAGACTGTCCTCAGAACC	
Py24	GGGAGTAAGAGTGTGCGAGAAG	
Pyr2	GCTGCTAACAGATGTCACCCG	
PRr1	TGTAGCAGTTCGAAATCCCCAT	full-length of cDNA sequence of $y3$ gene
PR1	AAGACCAACAGTATTTCATTTCAA	
PRr22	GCTCTAGAGTCCCCATCTCGACTTTCAG(<i>Xba</i> I)	constructing plant expression plasmids of $y3$ gene
PR25	CGCGAGCTCACGCAAGGATAAATAGTTCA(<i>Sac</i> I)	

按照真菌核酸的快速提取方法^[12]进行毛头鬼伞总 RNA 的提取,利用 RevertAidTM第一链 cDNA 合成试剂盒(#K1621, Fermentas),总 RNA 经反转录合

成基因 $y3$ 的 cDNA。以反转录产物为底物,以 PRr1 和 PR1 为引物,扩增 $y3$ 基因的 cDNA 全长序列。其反映体系为 50 μ L,含有 5 μ L 10 \times PCR Buffer(含

Mg²⁺), 5 μL 反转录产物、2 μL 各 2.5 mmol/L 的 dNTP、20 μmol/L 引物 PRr1 和 PR1 和 1.25 U ExTaq 核酸聚合酶 (TaKaRa)。扩增程序是 94℃ 3 min 1 循环; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min 35 循环; 最后 72℃ 10 min 延伸。扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 再经琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒 (TaKaRa) 纯化。纯化产物与 pMD18-T 相连, 用于测序以得到 y3 基因 cDNA 全长序列。利用 DNASTar 软件并参考已经报导的 y3 基因部分氨基酸序列推测 y3 基因的 ORF 和相应的氨基酸序列。羧基端糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 修饰位点的推测借用网络资源 GPI Fungal Prediction Server Version 3.1^[13], 位于 http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html。

1.3.4 用于植物表达载体构建的 y3 基因 cDNA 序列的扩增: 根据 y3 基因的 cDNA 全长序列设计了引物 PRr22 和 PR25 (表 1), 分别带有核酸内切酶 *Xba*I 或 *Sac*I 位点, 其 PCR 扩增产物可用于 y3 基因植物表达载体构建。y3 基因的 cDNA 合成同 1.3.3. 中所述。带有引物 PRr22 和 PR25 的 y3 基因 cDNA 序列的扩增是以反转录产物为模板, 其扩增体系和扩增程序与 1.3.3. 中所述基本一致, 惟有引物为 PRr22 和 PR25, 退火温度为 60℃。扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 经琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒纯化后与 pMD18-T 相连, 用于毛头鬼伞 y3 基因植物表达载体的构建。

1.4 y3 基因植物表达载体的构建

上述用于植物表达载体构建的 y3 基因 cDNA 序列的扩增产物与植物表达载体 pBI121 分别用核酸内切酶 *Xba*I 和 *Sac*I 分解, 两者的酶解产物经琼脂糖凝胶分离并纯化后连接, 使 y3 基因序列插入 pBI121 载体的 CaMV 35S 启动子和 NOS 末端序列之间的 *GUS* 位点上并取代 *GUS* 基因, 形成重组载体 pBI121-y3。pBI121-y3 再由限制酶 *Hind*III 和 *Eco*RI 分解, 片断 CaMV 35S 启动子 - y3 - NOS 经分离纯化后插入植物表达载体 pCAMBIA1301 (CAMBIA, Australia) 的多克隆位点 (MCS) 上, 以获得基因 y3 的植物双元表达载体 pCAMBIA1301-y3, 进而用于植物的转化。植物表达载体的构建过程见图 1。

1.5 烟草 NC89 的转化

植物双元表达载体 pCAMBIA1301-y3 经测序验证无误后, 利用冻融法转化根癌农杆菌 LBA4404 (Holsters et al., 1978)^[14], 随后在含有 50 μg/mL Kan、20 μg/mL Rif 和 100 μg/mL Str 的 YEB 平板上培养 2-3 d, 筛选阳性菌株。

烟草 NC89 的转化采用叶盘法^[15], 大小约 0.5 cm × 0.5 cm 的无菌烟草叶片在农杆菌悬液中浸 5-8 min, 无菌滤纸吸去多余菌液后, 置于加有 2 mg/L 6 BA、0.2 mg/L NAA 的 MS 分化培养基上, 于 25℃ 暗培养 2 d, 转移到含有 2 mg/L 6 BA、0.2 mg/L NAA 和 50 μg/mL 潮霉素、250 μg/mL 头孢霉素的 MS 分化培养基上, 25℃ 光照培养至不定芽生成。随机选取分化良好的不定芽转移到含有 50 μg/mL 潮霉素、250 μg/mL 头孢霉素的 1/2 MS 生根培养基上进行生根培养。培养约 20 d 龄的植株叶片用于转基因鉴定, 并以经未携带 y3 基因的 pCAMBIA1301 空载体转化的烟草叶片为对照。

1.6 阳性株系的筛选和 Northern 分析

利用上述核酸提取方法分别提取转基因植株的基因组 DNA 和总 RNA, 并利用 PCR 和 RT-PCR 方法筛选阳性植株。筛选与鉴定中所用 PCR 引物为 PRr2: 5'-TCCCCATCTCGACTTTTCAG-3' 和 PR2: 5'-ACGCAAGGATAAATAGTTCACA-3'。RT-PCR 鉴定的实验方法与全长 y3 基因的扩增方法基本相同 (见 1.3.3 节), 只是用于反转录的总 RNA 来自转基因烟草, 引物为 PRr2/PR2, 并且退火温度为 50℃。PCR 鉴定的模板是烟草基因组 DNA, PCR 扩增过程与用于 RT-PCR 中 PCR 过程相同。

Northern 杂交所用植物总 RNA 的提取采用 TRNzol-A⁺ Total RNA Reagent 试剂盒, 并按说明操作。所得植物总 RNA 经 DNase I (RNase-free) 处理分解残余 DNA, 再以酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 纯化处理后, 经酒精沉淀、洗涤并复溶于 DEPC 处理的 ddH₂O 中, 备用。探针的制取是以 pMD18-T-y3 为模板, PRr2/PR2 为引物, 经 PCR 扩增和纯化得到用于探针制作的 PCR 产物。此产物经 Digoxigenin-dUTP, alkali-labile 标记后用作探针。Northern 杂交采用 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche), 其操作过程按试剂盒说明进行。对照采用空载体转化植株, 处理过程同上。

1.7 转基因烟草对 TMV 的抗性试验

对定植成活 20 d 龄的供试转基因烟草小苗, 采用石英砂摩擦叶片法, 将由 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2) 制成的 TMV 悬液接种于叶片上, 温室培养, 定期观察病态发展情况并做记录。同时, 对未转化 y3 基因的烟草接种 TMV 作为阳性对照; 对未转化 y3 基因的烟草不接 TMV 作为阴性对照。本 TMV 抗性实验共重复进行 3 次。

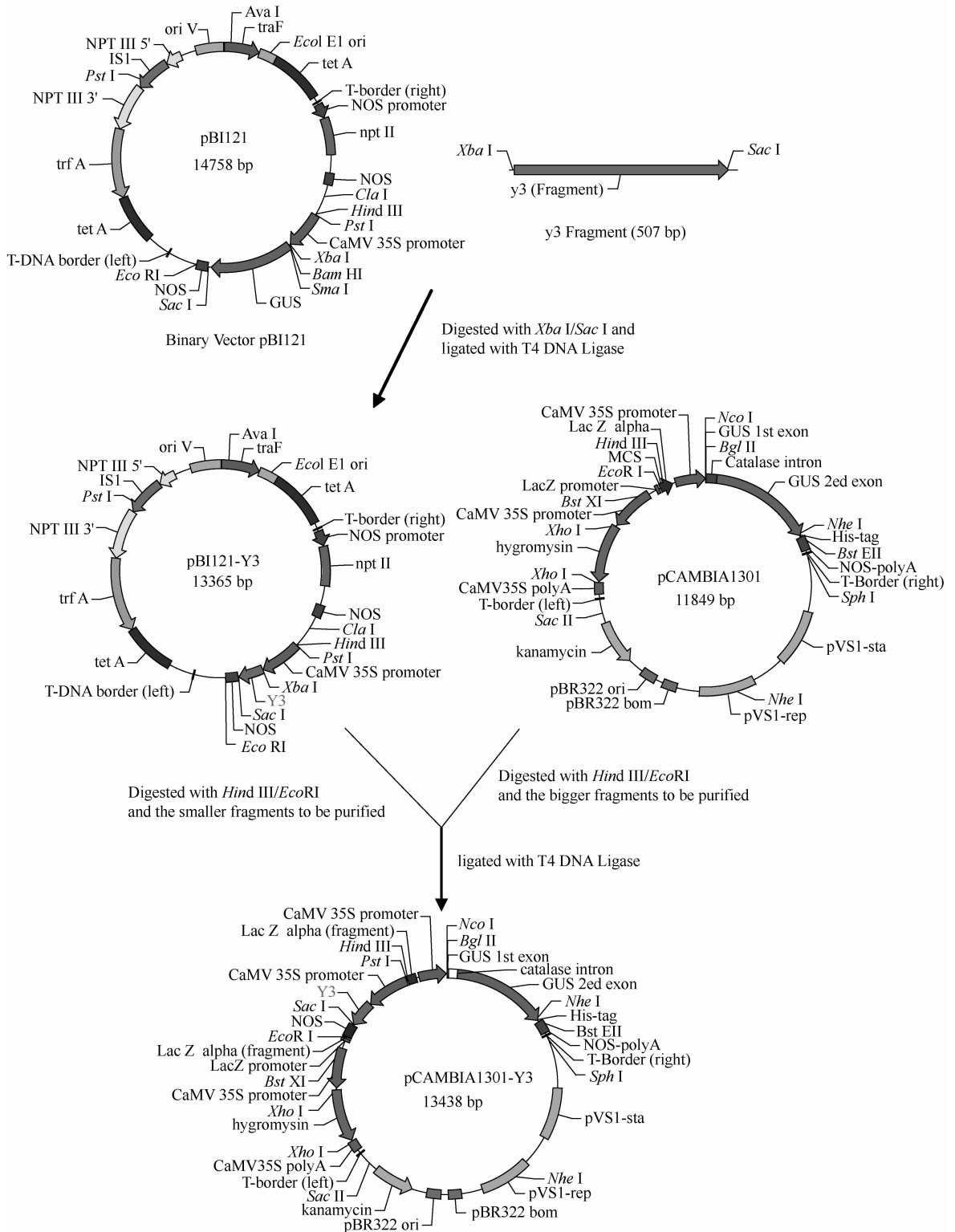


图 1 带有 $\gamma 3$ 基因的植物表达载体 pCAMBIA1301-y3 的构建

Fig. 1 Construction of plant expression plasmid pCAMBIA1301-y3 with $\gamma 3$ gene. The Fragment y3, with restriction sites *Xba*I and *Sac*I at its 5'- and 3'- terminals, and the binary vector pBI121 were digested with *Xba*I and *Sac*I and then purified respectively. Fragment y3 was ligated into pBI121, resulting in that y3 sequence was inserted at the location between CaMV 35S promoter and the NOS terminator of pBI121 with replacing the GUS fragment, to produce plasmid pBI121-y3. Plasmid pBI121-y3 was digested with *Hind*III and *Eco*RI, and the fragment CaMV35S promoter-y3-NOS was isolated and then inserted into MCS (multiple cloning site) of pCAMBIA1301 (CAMBIA, Australia), to acquire plant expression plasmid pCAMBIA1301-y3.

2 结果

2.1 毛头鬼伞 *y3* 基因的 cDNA 序列及推导的多肽序列

通过 5'-RACE 扩增基因 *y3* 的 5' 末端未知序列获得了一条 266 bp cDNA 片段。以此片段序列与已发表的 *y3* 基因部分 cDNA 序列为基础,设计 *y3* 基因 cDNA 全长引物 PR1 和 PRr1。利用此引物对,通过 RT-PCR 扩增获得毛头鬼伞 *y3* 基因全长序列为 534 bp。其中 148 bp 为新扩增所得序列,其余 386 bp 与文献[11]所报告序列具有高度相似性,相似率达到 94%。该全长序列含有一个开放阅读框

```
TGTAGCAGTT CGAAATCCCC ATCTCGACTT TCAGAACTAC TACACAATGATCTCCACCAAGATTTTC
                                     M I S T K I F
ACCATCCTCGCGTGTGTGCTGGTGTGTTTGTAGCTCAAGATCCTCTTTCATGCTATGATAACTTCGGAAACCGA
T I L A V V A G V L A Q D P L S C Y D N F G N R
GACGTCGCTGCTGTGCTCGCTTCATCGACGACTTCTGCGACACTCTTACTCCCAACATTTATCGCCCCAGA
D V A A C A R F I D D F C D T L T P N I Y R P R
GACAACGGCCAACGCTGCTACGTAGTCAATGGACATAAATGTGACTTCACCGTCTTCAACACTAATAATGGT
D N G Q R C Y V V N G H K C D F T V F N T N N G
GGAAGCCCCATCAGGGCTAGCACTCCCAACTGTAAGACTGTCTGAGAGCGGGTGTAAATAGATGCCCCACT
G S P I R A S T P N C K T V L R A A A N R C P T
GGTGAAGGGGAAAGATTAACCCAGTGCCTTTCTTGTGCTATTGATCCCAATGATGGTGATGTAGC
G G R G K I N P S A P F L F A I D P N D G D C S
ACCGACTTCTAA AGGCTGAGCT GGTTCCTTAG AAGTCAAAGT CATAAGTAGT CCACCTAGGAT GTGAA
T N D stop
CTATTTATCC TTGCGTTGAA TATGAATACT GGTGTTGCTT
```

图 2 *y3* 基因的 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence of *y3* gene and deduced amino acid sequence. *y3* gene cDNA consists of 534 bps and includes an ORF, from which an amino acid sequence of 130 amino acid residues was deduced. Underlined capitals indicated the newly isolated fragment. Most possibly, the bolded A at 97 of the amino acid sequence was a GPI modification site.

2.2 *y3* 基因植物表达载体的构建结果

y3 基因植物表达载体的构建过程见图 1。载体构建完成后,利用 PCR 和双酶切方法对其进行鉴定,鉴定结果见图 3。

在图 3 所示的 3 组实验中,植物表达载体 pCAMBIA1301-*y3* 经 PCR 和 *Xba*I/*Sac*I 酶切均得到了 *y3* 基因条带;同时,用 *Hind*III/*Eco*RI 对其进行酶切也得到了 CaMV 35 S Promoter- *y3*- NOS 片断,说明毛头鬼伞 *y3* 基因已经正确地整合在了植物二元表达载体 pCAMBIA1301 中,形成了 pCAMBIA1301-*y3* 载体。

2.3 毛头鬼伞 *y3* 基因转化烟草

植物表达载体 pCAMBIA1301-*y3* 经过测序验证,证实其序列与插入方向无误。利用冻融法转化根癌农杆菌 LBA4404,在含有 50 μ g/mL Kan、

(ORF),编码的蛋白质的肽链长度为 130 个氨基酸残基。该阅读框与文献[11]所报道序列的阅读框具有相同的终止位点,并且在推导的氨基酸序列中有后 101 个氨基酸序列与 Y3 蛋白的氨基酸序列相比具有相当高的同源性,相似率为 94%。*y3* 基因的 cDNA 序列和推导的氨基酸序列见图 2,GenBank 中的索引号 (Accession No.) 为 GQ859168;EMBL 中的索引号为 FN546262。

依据羧基端糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 修饰位点的推测结果,虽然未发现潜在的 GPI 修饰位点,但是 Y3 蛋白的第 97 位腺嘌呤 (A) 具有最大可能性 (图 2),因为它的分值最高。

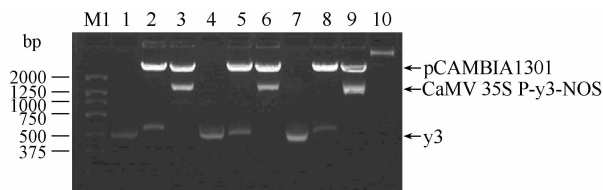


图 3 植物表达载体 pCAMBIA1301-*y3* 的 PCR 及酶切鉴定

Fig. 3 Identification of plant expression plasmid pCAMBIA1301-*y3* with PCR and restriction digestion. M1: 125 bp DNA ladder; Lane 10: pCAMBIA1301-*y3* as control; Lanes 1-3, 4-6, 7-9 were 3 groups of PCR and restriction tests; Lanes 1, 4, 7 were results of PCR; Lanes 2, 5, 8 were pCAMBIA1301-*y3* digested with *Xba*I/*Sac*I; Lanes 3, 6, 9 were pCAMBIA1301-*y3* digested with *Hind*III/*Eco*RI.

20 μ g/mL Rif 和 100 μ g/mL Str 的 YEB 平板上共获得阳性菌株 176 株。再经过 PCR 和双酶切的鉴定

证实了 pCAMBIA1301- $\gamma 3$ 的存在后, 选取其中 3 株用于烟草 NC89 的转化。

烟草 NC89 的叶片经过与含有 pCAMBIA1301- $\gamma 3$ 载体的根癌农杆菌 LBA4404 共培养后, 于含有 2 mg/L 6 BA、0.2 mg/L NAA 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢霉素的 MS 分化培养基上形成密集的不定芽。随机选取完整芽体转入生根培养基, 获得转基因烟草植株无性系 41 个, 用于转基因阳性植株的筛选。并以 pCAMBIA1301 空载体的转化株为对照。

2.4 转基因烟草的筛选和鉴定

2.4.1 PCR 与 RT-PCR 鉴定: 转基因烟草阳性株系的筛选

首先是首先提取 41 个无性系的基因组 DNA, 经过 PCR 检测证实其中有 23 个无性系为阳性株系。部分检测结果见图 4。

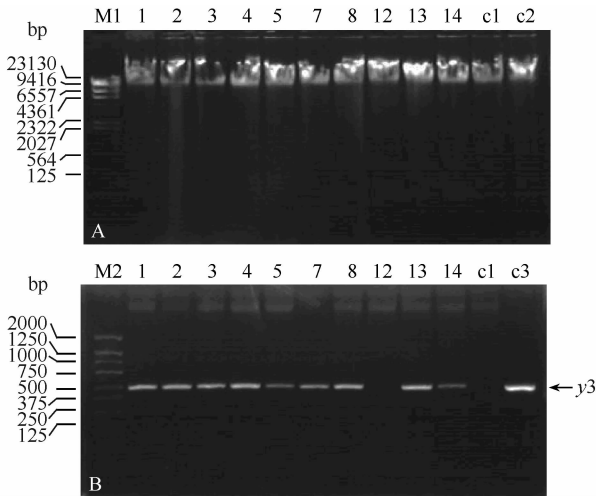


图 4 转基因烟草的 DNA 提取及 PCR 检测

Fig. 4 DNAs extracted from transgenic tobacco plantlets and PCR identification. A. DNAs extracted from transgenic tobacco plantlets; B. PCR identification of transgenic tobacco plantlets. M1: λ DNA digested with *Hind*III; M2: 125 bp DNA ladder; Lanes 1-5, 7-8, 12-14: transformants with pCAMBIA1301- $\gamma 3$; c1: a transformant with pCAMBIA1301; c2: non-transgenic tobacco plantlets; c3: DNA of plasmid pCAMBIA1301- $\gamma 3$ as control.

提取此 23 个阳性株系的总 RNA, 经降解残余 DNA 的处理后, 进行 RT-PCR, 结果证实其中 17 个无性系为阳性株系。部分检测结果见图 5。

2.4.2 Northern 杂交分析: 从经过 PCR 和 RT-PCR 鉴定的阳性株系中, 选取 7 个转基因无性系 (1, 16, 21, 23, 28, 30, 39) 与 1 株对照株系进行 Northern 杂交分析。结果显示 7 株转基因植株中均有阳性印迹可见, 作为对照的空载体植株的杂交结果中未见杂交印迹。在这些阳性株系中以株系 1, 16, 30 和

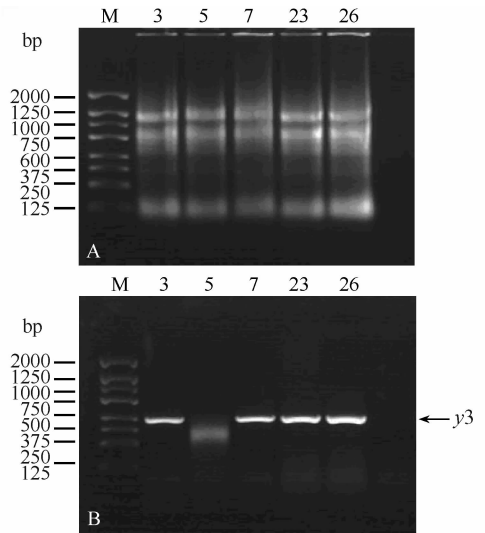


图 5 转基因烟草总 RNA 提取和 RT-PCR 检测

Fig. 5 Total RNAs extracted from transgenic tobacco plantlets and RT-PCR identification. A: Total RNAs extracted from transgenic plantlets 3, 5, 7, 23, 26; B. RT-PCR identification of transgenic plantlets 3, 5, 7, 23, 26; M: 125 bp DNA ladder.

39 的杂交效果最明显 (图 6)。

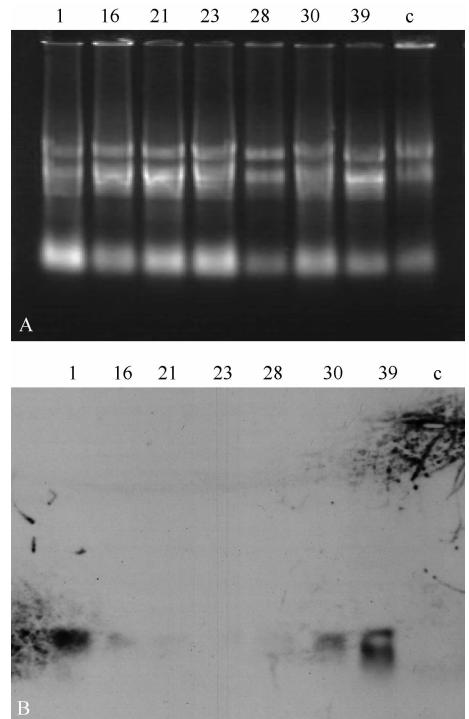


图 6 转基因烟草 Northern 杂交分析

Fig. 6 Northern blot analysis of transgenic tobacco plantlets. A: the total RNAs extracted from transgenic tobacco plantlets; B: Northern blot results of the plantlets. Lanes 1, 16, 21, 23, 28, 30 and 39: transgenic tobacco plantlets; c: a transformant with pCAMBIA1301 as control. As a result, transgenic plantlets 1, 16, 30, 39 were obviously positive for gene $\gamma 3$ transgenic expression.

2.6 转基因烟草对 TMV 的抗性

转基因烟草对 TMV 的抗性试验选取了 5 个转基因株系和 1 个对照株系分别接种 TMV, 并以 1 个

不接 TMV 的对照株系一起培养, 定期观察, 纪录列于表 2 中。

表 2 转基因烟草的 TMV 回接后的表现

Table 2 Exhibition of transgenic tobacco plantlets after inoculation with TMV.

Time after inoculation/d	Transgenic tobacco lines					Controls	
	1	13	21	212	30	c1 *	c2 *
0	+ **	+	+	+	+	+	- **
5	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
10	normal	leaf surfaces slightly wrinkled	normal	normal	leaf surfaces uneven	leaf surfaces uneven	normal
20	normal	new leaves slightly protuberant	normal	new leaves slightly protuberant	wrinkly Leaves with green spots	new leaves wrinkly	normal
30	normal	Leaf margins curled	tiny green spots on the leaves	leaf surface protuberant	wrinkly Leaves with green spots	new leaves wrinkly & with green spots	normal
40	new leaves slightly protuberant	new leaves slightly protuberant	Leaves with curled margin & green spots	new leaves shortened	new leaves smooth	new leaves with necrotic spots	normal
50	new leaf margins curled slightly	green spots at margins of leaves	normal new leaves	leaf margins wrinkled	new leaves relatively normal	new leaves shortened & wrinkled	normal
60	Leaf margins curled slightly	Longitypical leaves with nodular margins	normal new leaves	new leaves shortened & wrinkled	clear phytosis but growing well	new leaves relatively smooth	normal

* c1, c2: non-transgenic tobacco plantlets. ** + : inoculated with TMV - : uninoculated with TMV.

由表 2 可见, 5 个转基因株系和 1 个阳性对照, 经 TMV 感染和培育一段时间后, 虽然都有感病的症状出现, 如叶面隆起 (protuberant leaf surface)、叶缘卷曲 (curled Leaf margins)、叶面深绿斑 (dark green spots), 甚至畸形等, 但是不同的株系在感染后症状出现的时间间隔和病症表现的程度上却有较大差异。比如, No. 1 株系和 No. 21 株系与阳性对照和其他转基因株系相比症状出现的时间较晚, 迟发 10-20 d, 而且发病的程度也非常轻微, 尤其 No. 21 病症最为轻微, 而且新生叶片有回归正常的迹象。另外 No. 1、No. 21 和 No. 30 在 Northern 分析中可见有基因 $y3$ 的表达, 但是在抗病毒的的表现上却有程度上的差异, 即 No. 1 和 No. 21 的抗病毒性较 No. 30 为强。由此可以推测基因 $y3$ 在转基因烟草中表现出了抗病毒活性, 但是这种抗病毒活性具有株系间的差异。

3 讨论

业已证实来自毛头鬼伞的蛋白质 Y3 具有体外抗病毒 TMV 和抑制人胃癌细胞株 MGC-803 的活性^[7], 因此扩增 $y3$ 基因的全长并在合适的受体中得到表达获得其活性蛋白质用于农作物生产中 TMV

的防治或者用于医疗中肿瘤的防治是非常有意义的。本文通过 5' RACE 成功扩增了 $y3$ 基因的 5' 末端未知序列及随后的 $y3$ 基因全长序列, 并且在此基础上利用 $y3$ 基因的全长序列构建了植物表达载体, 成功转化了 TMV 敏感作物——烟草 NC89, 为进一步研究奠定了必要的基础。

$y3$ 基因的全长序列的获得是本研究的重要收获。 $y3$ 基因 5' 末端的 RACE 扩增, 曾经尝试过多种 5'-RACE 方法, 试用过不同的 5'-RACE 的试剂盒, 最终在采用了 5'- Full RACE Core Set 试剂盒后才取得成功。分析其原因是由于该试剂盒采用了 RNA 连接酶, 使得 $y3$ 基因的 mRNA 经反转录生成的 cDNA 单链环化连接或首尾相接, 再由两对引物进行巢式 PCR 扩增, 由此保证了低拷贝数目的基因能得以扩增。在 5'-RACE 取得成功的基础上, 才有全长基因序列扩增的成功。

本研究所获得的 $y3$ 基因序列可以被认定为全长序列是基于三点考虑, 一是本研究所获得的基因序列具有完整的阅读框, 该阅读框与已发表的 $y3$ 基因的表达产物——碱性蛋白 Y3 的阅读框具有相同的终止密码子, 并且推导的氨基酸序列中后 101 个氨基酸序列与 Y3 蛋白的氨基酸序列相比具有高度

的相似性^[11]; 二是已发表的 $\gamma 3$ 基因的表达产物——碱性蛋白 Y3 在体外是具有活性的, 说明它的 cDNA 序列的 5' 末端未知序列不会过长; 三是我们在实验中获得的 $\gamma 3$ 基因的 DNA 序列中的 5' 侧翼序列中已发现了核酸转录启动元件(另文发表)。由此推测我们已经获得了 $\gamma 3$ 基因的全长序列。

本研究构建了 $\gamma 3$ 基因的植物表达载体 pCAMBIA1301- $\gamma 3$ 并且转化了 TMV 敏感植物——烟草 NC89。通过 Northern 杂交分析表明了 $\gamma 3$ 基因在烟草中得到了转录。转基因烟草对 TMV 的抗性试验也表明 $\gamma 3$ 基因在转基因植物体内的表达产物虽然对烟草花叶病毒复制的抑制程度有限, 但还是具有一定的抑制活性。这一点与文献[11]所述——Y3 蛋白在体内对 TMV 的增殖的抑制效应远不及在体外对 TMV 的失活效应——之间也有相互印证。Y3 蛋白在植物体内对 TMV 活性的抑制作用不及它在体外的抑制作用, 分析其原因有三点, 一是抗病毒蛋白 Y3 在植物细胞内是否得到了高效表达, 表达的产物是否具有在真菌细胞中的原有构型; 二是 Y3 蛋白是一种糖蛋白, 当 $\gamma 3$ 基因在植物细胞中表达时, 产物是否得到了正确的糖基化; 三是即使 $\gamma 3$ 基因在植物体内得到了正确地表达和糖基化, 细胞中的环境是否也有利于它的表达产物的活性得以正常发挥。为这些问题给出答案是今后进一步研究的方向。

参考文献

- [1] Brown L. ed. The new shorter Oxford English dictionary. Vol 2. Oxford; Oxford Univ. Press. 1993.
- [2] Scholthof, K-BG. Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annual Reviews Phytopathology*, 2004, 42:13-34
- [3] 史随孝, 张满让, 张新民. 烟草花叶病防治药剂筛选试验. 西北农业学报 (*Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*), 1999, 8 (4): 13-16.
- [4] 付鸣佳, 林健清, 吴祖建, 等. 杏鲍菇抗烟草花叶病毒蛋白的筛选. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2003, 43 (1): 29-34.
- [5] 孙慧, 赵辰光, 全鑫, 等. 杨树菇凝集素 AAVP 具有抗病毒和促进菌丝分化功能. 中国生物化学与分子生物学报 (*Chinese Journal of Biochemistry & Molecular Biology*), 2003, 19 (2): 210-214.
- [6] 刘国坤, 谢联辉, 林奇英, 等. 15 种植物的单宁提取物对烟草花叶病毒(TMV)的抑制作用. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2003, 33 (3): 279-283.
- [7] 吴丽萍, 吴祖建, 林奇英, 等. 毛头鬼伞 (*Coprinus comatus*) 中一种碱性蛋白的纯化及其活性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2003, 43 (6): 793-798.
- [8] 李丹, 赵文红, 孔宝华, 等. 云南大型真菌提取物及其多糖组分对 TMV 的抑制作用. 云南农业大学学报 (*Journal of Yunnan Agricultural University*), 2009, 24 (2): 175-180.
- [9] Chen J, Yan XH, Dong JH, et al. Tobacco Mosaic Virus (TMV) Inhibitors from *Picrasma quassioides* Benn. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57 (15): 6590-6595.
- [10] 吴丽萍, 吴祖建, 林奇英, 等. 一种食用菌提取物 $\gamma 3$ 对烟草花叶病毒的钝化作用及其机制. 中国病毒学 (*Virologica Sinica*), 2004, 19 (1): 54-57.
- [11] Wu LP, Wu ZJ, Lin D, et al. Characterization and amino acid sequence of $\gamma 3$, an antiviral protein from mushroom *Coprinus comatus*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 24 (7): 597-603.
- [12] 方卫国, 杨星勇, 张永军, 等. 真菌核酸的一种快速提取方法. 应用与环境生物学学报 (*Chinese Journal Applied and Environmental Biololy*), 2002, 8 (3): 305-307.
- [13] Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M., et al. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 337 (2): 243-253.
- [14] Holsters M, de Waele D, Depicker A, et al. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular & General Genetics*, 1978, 163: 181-187.
- [15] Horsch RB, Fry, JE, Hoffmann, NL, et al. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science: New Series*, 1985, 227 (4691): 1229-1231.

Cloning of $y3$ gene encoding a tobacco mosaic virus inhibitor from *Coprinus comatus* and transformation to *Nicotiana tabacum*

Xueren Wang^{1,2}, Tao He¹, Gaina Zhang¹, Jianguo Hao¹, Jingfen Jia^{1*}

(¹ The Provincial Key Laboratory of Biotechnology, School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

(² Department of Life Science, Xi'an University of Arts and Science, Xi'an 710065, China)

Abstract: [Objective] The protein Y3 was a TMV inhibitor which was encoded by $y3$ gene. The aim of this work was to clone the full length of $y3$ gene from *Coprinus comatus* and to reveal its inhibitory function to TMV in *in vivo* conditions.

[Methods] We amplified the unknown 5'-terminal cDNA sequence of $y3$ gene with 5'-Full RACE Core Set (TaKaRa), obtained the full length of this gene by RT-PCR, constructed the expression plasmid pCAMBIA1301- $y3$ via inserting gene $y3$ sequence, CaMV 35 S promoter, and NOS terminator at MCS and transformed it into *Nicotiana tabacum* via agrobacterium-mediation. [Results] The full length of $y3$ gene was 534 bps including one ORF encoding 130 amino acid residues (GenBank Accession No. GQ859168; EMBL FN546262). The cDNA sequence and its deduced amino acid sequence showed high similarity (94%) to the published fragment of $y3$ gene sequence. Northern blot analysis proved the transcription of $y3$ gene in transgenic tobacco plants. The transgenic plants inoculated with TMV expressed the inhibitory activity to TMV. [Conclusion] We cloned the full length of $y3$ gene and obtained transgenic tobacco plants. The expression of $y3$ gene in transgenic plants improved the inhibitory activity to TMV. The cloning and expression analysis of $y3$ gene might provide background information for future studying of $y3$ gene.

Keywords: *Coprinus comatus*; $y3$ gene; protein Y3; vector construction

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671087) and by the Innovation of Science and Technology in Xi'an (YF07109)

* Corresponding author. Tel: +86-29-88303484; Fax: +86-29-88305207; E-mail: jiajf38@nwu.edu.cn

Received: 4 September 2009 / Revised: 9 November 2009

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5-7个月之内发表。

(1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。

(2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。