生物工程学报 13(4):440～442,1997
Chinese Journal of Biotechnology

甜菜坏死黄脉病毒外壳蛋白基因在甜菜转基因植株中的表达

姚华建 李大伟 于嘉林 邢怡明 蔡祝南 刘 仪
(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

甜菜坏死黄脉病毒(Beet Necrotic Yellow Vein Virus, BNYVV)是一种由甜菜多粘菌(*Polymyxa betae*)传播的多分体植物病毒,基因组由4～5条单链正意RNA构成[1]。60年代末,由Tamada首次报道[2],这种病毒可对甜菜造成严重危害,侵染甜菜后产生丛根症状(Rhizomania),并导致甜菜产量和含糖量的大幅度下降。除欧洲、北美及日本的严重发生以外,我国自70年代以来在东北、内蒙古及西北许多省区也有大量甜菜丛根病的发生报道[3]。由于尚无有效药剂及措施用于甜菜丛根病或病毒传播介体的防治,在我国也无法采用大面积轮作作为防治手段,所以目前在世界各地及我国上述地区甜菜丛根病的发病面积逐年扩展,对甜菜生产和制糖业造成直接威胁。针对这一情况,本文报道了含有甜菜坏死黄脉病毒外壳蛋白基因的甜菜植株的转化再生工作,以期在甜菜亲本育种中获得新的抗性材料,为抗病毒品种的培育打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种:含有BNYVV NM分离物外壳蛋白(CP)基因的重组质粒pGC24由本室构建获得[4]。Ti质粒pBI121购自Clontech公司,大肠杆菌(*E. coli*)JM101、DH5α和土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404(pAL4404)为农业生物技术国家实验室保存。

1.1.2 酶及试剂:卡那霉素(Kan)和链霉素(Sm)购自Sigma公司,羧苄青霉素(Cb)为上海第四制药厂生产。各种内切酶、工具酶及试剂盒均购自Promega公司和华美公司,同位素购自亚辉生物工程公司。

1.1.3 甜菜品种モノシトリ由日本北海道立农业试验场Tamada T.博士惠赠,BNYVV抗血清分别由Tamada T博士和美国农业部Salinas试验站刘兴业博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 植物表达载体的构建和鉴定:重组质粒pGC24经Hind Ⅲ酶切,DNA聚合酶Klenow片段补平后,再用Xba Ⅰ酶切。电泳回收pGC24酶切片段,并与经Xba Ⅰ和Sma Ⅰ双酶切的双元载体pBI121连接(图1)。转化DH5α,经Kan筛选获得重组子后,酶切鉴定插入片段大小及方向,并用引物1和引物2[4]对插入片段进行PCR扩增。

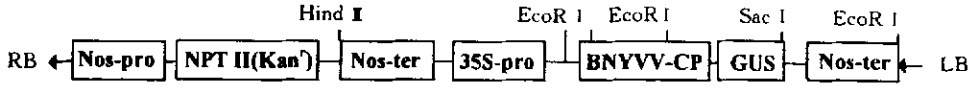
1.2.2 转化土壤农杆菌:按照An的方法[5]制备农杆菌感受态细胞,-70℃保存备用。取200μl感受态细胞,加入1μg重组Ti质粒,置37℃水浴融化后,再加入1ml YEB培养基,28℃振荡培养4h。用0.1ml培养细胞涂布含有75μg/ml Kan、125μg/ml Sm的YEB平板培养基,28℃培养2d。所得菌落,提取质粒后,以BNYVV外壳蛋白基因为探针进行杂交鉴定。

1.2.3 甜菜的转化及再生:用含有重组Ti质粒的农杆菌单菌落,接种YEB液体培养基(Kan75μg/ml、Sm125μg/ml),28℃振荡培养至OD_{600}0.8～1.0,用MS基本培养液稀释50倍。经表面消毒后的甜菜种子,萌发产生下胚轴,取0.5～1.0cm的节段为外植体。与菌液混合5～10min后,吸除多余菌液,将外植

本课题受到国家自然科学基金(编号:39670035)和"863"青年基金的资助。
本文于1996年11月8日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

体在25～28℃下共培养2d。在选择性分化培养基上(MS, Cb 500mg/L, Kan 100mg/L, BA 2mg/L, NAA 0.2mg/L, GA_3 5mg/L),25℃光照培养,诱导形成愈伤组织并生芽。待抗性芽长至约3cm时,切下转移到生根培养基上(MS, Cb 500mg/L, Kan 100mg/L, NAA 5mg/L),诱导生根。



pBGY6 (13.7kb)

图1　甜菜坏死黄脉病毒NM分离物外壳蛋白基因植物表达载体的结构

1.2.4 转基因甜菜的检测:(1)NPT Ⅱ活性的检测:参照Roy等人的方法[6]进行。分别以未经转化的健康甜菜叶片蛋白提取物、含有重组Ti质粒或不含有重组Ti质粒的大肠杆菌JM101蛋白粗提物为对照。

(2)转基因甜菜的PCR检测:取0.1g叶片,用CTAB缓冲液(3% CTAB, 1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA, 100mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.2% 巯基乙醇)和苯酚/氯仿抽提,获得植物总DNA。用根据BNYVV外壳蛋白基因两端序列合成的引物1和引物2[4]进行30个循环的PCR反应。所得产物经琼脂糖凝胶电泳检测,并用 α-^{32}P 标记的外壳蛋白基因探针进行杂交。

(3)转基因甜菜的免疫印迹(Western blot)检测:取0.1g叶片在液氮中研成粉末,按1:1(w/v)加入缓冲液(62.5mmol/L Tris-HCl pH6.8, 20% 甘油, 5% 巯基乙醇, 2% SDS, 0.02% 溴酚蓝),煮沸10min后,10 000r/min离心5min,取上清液4℃保存备用。经SDS-PAGE后,按照Towbin等人的方法[7],将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,并用碱性磷酸酯酶标记的BNYVV外壳蛋白抗体进行Western blot检测。

2　结果与分析

2.1　植物表达载体的构建

按照图1所示策略构建获得重组Ti质粒pBGY6。提取质粒,经过酶切及PCR扩增鉴定,证明pBGY6中含有正确插入的BNYVV外壳蛋白基因(图版I-A)。

2.2　土壤农杆菌的转化鉴定

由含有Kan和Sm的双抗性培养基上随机挑取转化子,提取质粒后,用 α-^{32}P 标记的外壳蛋白基因探针进行点杂交。结果表明所有克隆均为阳性(图版I-B)。

2.3　甜菜的转化再生

选用上述农杆菌转化子与甜菜外植体共培养48h以后,在分化培养基上培养。每2周更换一次培养基。约2～3周后,被转化的外植体开始形成愈伤组织或直接分化出抗性芽。诱导生根之后,将再生植株移入花盆定植,共获得13株成活的卡那霉素抗性甜菜。

2.4　转基因甜菜的检测

取上述再生甜菜植株,分别提取粗蛋白进行NPT Ⅱ活性测定。结果表明所取样品均具有NPT Ⅱ活性(结果未示)。上述甜菜植株提取总DNA后,PCR扩增结果显示,与未转化植株相比,再生植株中均可获得多个DNA条带。这可能是由于引物与重组质粒的非特异性结合而引起的。经过杂交试验表明,在这些条带中包括了BNYVV CP基因的扩增产物(图版I-C)。取部分以上甜菜植株,抽提叶片总蛋白并经SDS-PAGE。免疫印迹试验证明,在转化的甜菜中,除可能由于抗血清特异性问题引起的非转化性反应条带以外,都有一条分子量与BNYVV外壳蛋白相同的特异性谱带(图版I-D)。

以上结果表明,本试验所构建的BNYVV外壳蛋白基因已经整合到甜菜基因组中,并得到了表达。所得再生植株的整合及表达情况表现一致,转基因甜菜对于甜菜坏死黄脉病毒的抗病性有待鉴定。这一结果为抗甜菜丛根病基因工程育种打下了一些基础,进一步的工作正在进行之中。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

参 考 文 献

[1]Jupin I, Tamada T, Richarde K E. Seminar in Virology, 1991, 2:121～129.
[2]Tamada T, Baba T. Ann Phytopathol Soc Japan. 1973, 39:325～332.
[3]高锦梁,邓 峰,刘 仪.植物病理学报,1983,13(2):1～4.
[4]姚华建,于嘉林,刘仪等.生物工程学报,1993,9(2):147～151.
[5]An G. Methods in Enzymology, 1987, 153:293～305.
[6]Roy P, Sahasradbudhe N, Plant Molecular Biology, 1990, 14:873～876.
[7]Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76:4350～4354.

Expression of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Coat Protein Gene in Transformed Sugarbeet Plants

Yao Huajian Li Dawei Yu Jialin Xing Yiming Cai Zhunan Liu Yi
(*National Laboratory for Agrobiotechnology, Beijing Agriculture University, Beijing* 100094)

Abstract With Ti plasmid pBI121, a binary vector of pBGY6 containing BNYVV coat protein gene was constructed for transformation of *Agrobacterium tumefaciens* and sugarbeet. The regenerated sugarbeet plants was detected by means of NPT Ⅱ assay, PCR-hybridization and Western blot, which showed that the target gene was integrated and expressed in the transgenic plants.

Key words Beet necrotic yellow vein virus, coat protein gene, transformation, expression in plants

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn