

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2015.01.04

## VIGS 技术在甜菜上的应用

龚攀<sup>1,2</sup>, 崔杰<sup>2\*</sup>, 李俊良<sup>2</sup>, 罗成飞<sup>2</sup>, 杨虎臣<sup>2</sup>

(1.哈尔滨工业大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150000;

2.哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 哈尔滨 150090)

**摘要:**病毒诱导基因沉默(VIGS)是一种应用于研究植物基因功能的反向遗传学手段。相对于基因敲除及转基因等方法,它具有时间短、成本低、高通量等优点。随着甜菜全基因组的测序完成,为尽早对大量序列信息进行注释和功能鉴定,急需建立甜菜 VIGS 体系。本文采用目前应用最广泛的烟草脆裂病毒载体在农杆菌的介导下侵染甜菜幼苗叶片,同时设立对照。提取甜菜幼苗叶片总 RNA,并反转录成 cDNA,设计特异引物进行 RT-PCR 检测。结果表明:在侵染植株上检测到了烟草脆裂病毒特异条带,证明该病毒可以对甜菜进行侵染,这一结果为下一步建立甜菜 VIGS 体系奠定了基础。

**关键词:**甜菜;病毒诱导基因沉默;烟草脆裂病毒;RT-PCR

**中图分类号:**TS242.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2015)-01-018-05

### Application of Virus-Induced Gene Silencing in *Beta Vulgaris*

GONG Pan<sup>1,2</sup>, CUI Jie<sup>2\*</sup>, LI Junliang<sup>2</sup>, LUO Chengfei<sup>2</sup>, YANG Huchen<sup>2</sup>

(1. School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150000, China;

2. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

**Abstract:** Virus-induced gene silencing is an effective method of reverse genetics research for gene function analysis in plants. Compared with gene knockout, transgene and some other methods, it has many advantages such as faster, low-cost and high-throughput. With the accomplishment of *Beta vulgaris*' complete genome sequencing, the functional characterization of a large number of sequences need to be identified. It is important to develop a rapid method of VIGS functional analysis system of beet genes. In this paper, we mediated the TRV (*Tobacco rattle virus*) infection of sugar beet seedlings by *Agrobacterium* while *Tobacco rattle virus* is currently the most widely used viral vectors. Total RNA was extracted from the beet leaf and reverse transcribed into cDNA, we designed specific primers used in RT-PCR to detect the virus on the infected beet. The results demonstrated that the virus could infect beet, which laid the foundation for the next VIGS system established in *Beta vulgaris*.

**Keywords:** *Beta vulgaris*; Virus-induced gene silencing; *Tobacco rattle virus*; RT-PCR

病毒诱导基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是一种 RNA 介导的植物防御病毒机制,是基于转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)的技术<sup>[1]</sup>。VIGS 相对于目前一些成熟的功能基因组学工具有以下优点:(1) VIGS 周期短,相对容易实施。VIGS 可以在短期内产生特定基因功能丧失表型从而快速分析其功能特性<sup>[2]</sup>;(2) VIGS 避免了植物遗传转化。一旦 VIGS

系统建立后,在遗传转化较为困难中的植物中进行基因功能分析相对容易<sup>[3]</sup>;(3) VIGS 允许对产生致死表型基因进行功能性分析。它可以用来研究胚胎发育、出苗率及活力相关基因<sup>[3-5]</sup>;(4) VIGS 可以克服功能冗余。使用 VIGS 沉默保守区域,多个相关的基因或基因家族都可以被同时沉默<sup>[6-7]</sup>;(5) VIGS 能够及时沉默组织特异性基因。例如,只在植物开花或穗发育期进行侵染从而沉默特定器

收稿日期:2015-01-28;修回日期:2015-03-01

基金项目:科技部技术开发研究专项(2013EG111232);农业部甜菜产业技术体系项目(CARS-21010202)。

作者简介:龚攀,男,硕士研究生,研究方向:植物生物技术;E-mail:gp68x@126.com。

\*通信作者:崔杰,博士,副教授,研究方向:植物抗逆分子机制;E-mail:cuijie2006@163.com。

官。此外,VIGS还可以用于快速沉默特定基因突变体,或过表达特定基因的植株,从而可以短时间内研究大量复杂的抗逆基因间的相互作用<sup>[8]</sup>。VIGS也可作为其它转录后基因沉默的补充方法。

目前在植物上应用的VIGS病毒载体主要分为三类:RNA病毒载体、DNA病毒载体及卫星病毒载体。烟草脆裂病毒(TRV)属于RNA病毒,是目前应用最广泛的病毒载体,具有病毒症状较轻、沉默效率高、持续时间长以及能够侵染分生组织等优点<sup>[10-11]</sup>,同时它是植物中寄主范围最广的病毒,50多科双子叶和单子叶植物中约400多个品种易受该病毒侵染,并在许多寄主上侵染的同时不引起症状<sup>[12]</sup>。TRV基因组中含有两条RNA链,RNA1能编码RNA依赖的RNA聚合酶基因、运动蛋白以及16K富含半胱氨酸的蛋白<sup>[13]</sup>,RNA2能够编码外壳蛋白以及包含用来克隆目标基因的酶切位点<sup>[8]</sup>,两条链构建成一个双元载体,TRV成功诱导沉默需要RNA1和RNA2同时渗透。

2013年,德国马克斯-普朗克分子遗传学研究所和西班牙国家基因组调控中心等机构共同发布了甜菜的全基因组测序信息<sup>[9]</sup>,这对于甜菜育种、基因功能鉴定等研究具有里程碑意义。由于甜菜获得稳定的遗传转化体较为困难,鉴于VIGS体系的优异性,开发一种针对于甜菜的病毒诱导基因沉默体系对于鉴定大量的基因序列信息具有重要的意义。在本研究中利用构建好的烟草脆裂病毒载体系统对甜菜进行了侵染实验,研究TRV病毒对甜菜的侵染效果,为下一步构建甜菜VIGS体系及基因功能鉴定奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料与培养

甜菜品种为哈尔滨工业大学食品学院甜菜遗传育种课题组培育的二倍体材料CL7,植株在人工气候箱培养,培养条件为昼/夜温度22/18℃,光/暗周期16h/8h,相对湿度(RH)50%~70%。以出苗15天左右(2片真叶甜菜)和出苗40天左右(6片真叶甜菜)为材料进行侵染实验。

### 1.2 菌株与质粒

农杆菌菌株GV3101,质粒pTRV1,pTRV2-PDS(PDS基因来源于番茄)由江苏省农业科学院生物技术所惠赠。

LB固体培养基含50 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素,25 mg·L<sup>-1</sup>利福平。农杆菌重悬液含200 mM乙酰丁香酮,10 mM MES和10 mM MgCl<sub>2</sub>。

### 1.3 引物设计

反转录特异引物:TCCCCTATGGTAAGACAATGAG<sup>[14]</sup>,位于TRV2链下游。

RT-PCR病毒检测引物:F: GGAGTTGAAGAGTTATTACCGAAGG;R: CCGGAATTCGAAACTCAAATGCTACCAA,位于编码TRV病毒外壳蛋白基因上,用于检测病毒扩散程度<sup>[14]</sup>。

### 1.4 农杆菌感受态制备

(1)挑取GV3101单菌落接种于2 mL LB液体培养基(利福平25 mg·L<sup>-1</sup>)中,28℃过夜培养。

(2)吸取1 mL菌液接种至50 mL LB液体培养基(利福平25 mg·L<sup>-1</sup>)中,28℃,200 rpm,培养至OD600 = 0.5。

(3)冰浴10 min后,4 000 rpm离心5 min,用10 mL预冷0.15 M NaCl悬浮洗涤1~2次。4 000 rpm离心5 min,用2 mL预冷20 mM CaCl<sub>2</sub>悬浮。

(4)冰浴30 min后加入20%的甘油(V/V),分装,液氮速冻1 min,储存在-70℃。

### 1.5 转化

(1)将各1 μg质粒pTRV1,pTRV2-PDS分别转化农杆菌,冰浴30 min。

(2)液氮速冻1 min,立即37℃水浴5 min。

(3)加入1 mL LB液体培养基,28℃,150 rpm培养2~3h,4 000 rpm离心1 min。

(4)弃上清,加入100 μL LB液体培养基,混匀,涂抗性平板,28℃培养2天。

### 1.6 农杆菌侵染甜菜

(1)将含有pTRV1和pTRV2-PDS农杆菌28℃分别过夜培养至OD600 = 1.0~2.0,收集菌体,用重悬液悬浮培养至OD600 ≈ 0.8,28℃避光静置3~4 h。

(2)将含有pTRV1和pTRV2-PDS的农杆菌等量混合。

(3)选择甜菜内轮叶片背部,用针头轻轻划破,注射渗透叶片。

(4)接种5个星期后,观察表型。

### 1.7 RT-PCR检测病毒侵染情况

(1)Trizol法提取实验组、对照组叶片总RNA。

(2)cDNA第一链合成使用Takara公司PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit,按说明书操作。对照组使用随机引物,实验组使用反转录特异引物。

(3)以cDNA为模板,使用病毒检测引物进行PCR扩增。

(4)电泳及分析图像。

## 2 结果与分析

### 2.1 甜菜叶片病毒侵染实验

我们对2片真叶和6片真叶期的甜菜叶片进行了农杆菌侵染,同时设置两组对照组,一组为仅注射重悬液的甜菜幼苗,另一组为注射了包含 pTRV1 和

pTRV2-PDS 侵染液的2片真叶期番茄幼苗,5周后,观察植株叶片变化。

从甜菜实验组表型看到,2叶期和6叶期侵染实验组叶片均出现了轻微卷曲和局部颗粒状突起,表现出轻微的侵染症状(图1 B, C),说明烟草脆裂病毒可能对甜菜产生了影响。

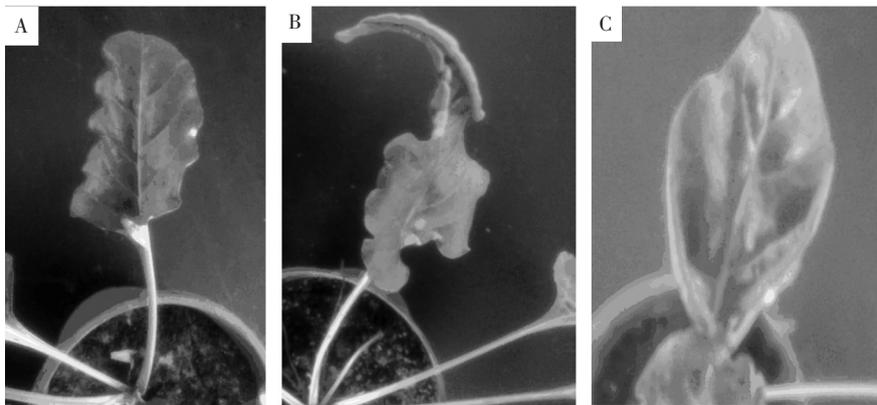


图1 侵染5周后叶片表型变化

Fig.1 Phenotypes of the infected leaf after 5 weeks

注:A:甜菜对照组;B:6叶期甜菜侵染植株;C:2叶期甜菜侵染植株。

Notes: A: the beet control group; B: 6-leaf stage infected beet; C: 2-leaf stage infected beet.

在侵染约5周后,以番茄作对照组可以看到,从第4~6片真叶开始出现漂白现象(如图2B),比预计的15~20天时间晚了许多,说明本研究中设置的培养条件对于病毒在番茄上的繁殖传播并不是最适宜的。

在侵染约7周后,甜菜实验组,2叶期侵染和6叶期侵染相继出现了部分叶片叶缘局部变黄并略显

透明的现象(如图2C, D),并且2叶期侵染甜菜出现的部位相对较多,进一步表明病毒对甜菜产生了侵染效果,并且幼苗期甜菜更适合病毒的积累繁殖。由于PDS基因在植物中相对较为保守,虽然在pTRV2上构建的靶基因是来源于番茄的PDS基因,但对甜菜也产生了部分影响。

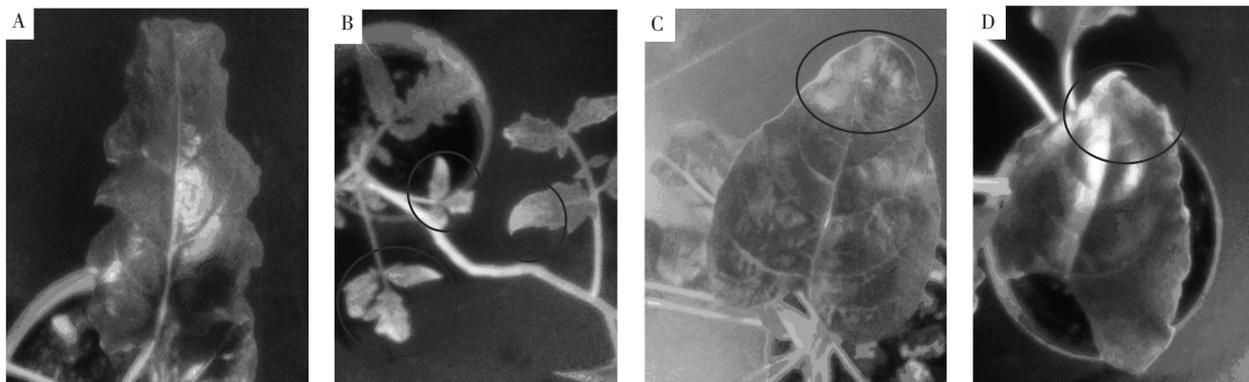


图2 侵染7周后叶片表型变化

Fig.2 Phenotypes of the infected leaf after 7 weeks

注:A:甜菜对照组;B:侵染5周后番茄对照组;C:6叶期甜菜侵染植株;D:2叶期甜菜侵染植株。

Notes: A: the beet control group; B: the infected tomato group after 5 weeks; C: 6-leaf stage infected beet plant; D: 2-leaf stage infected beet plant.

### 2.2 病毒侵染植株分子检测

为检测TRV在甜菜植株中的扩散情况,对出现叶

片局部漂白的甜菜老叶及新生嫩叶分别提取总RNA,质量检测合格后,用于下一步进行半定量RT-PCR检测。

分别取对照及处理组甜菜叶片 200 mg 提取总 RNA,经琼脂糖电泳,结果见图 3。在 18 s 和 28 s 区域有明显条带,表明其完整性良好,可用于后续实验。

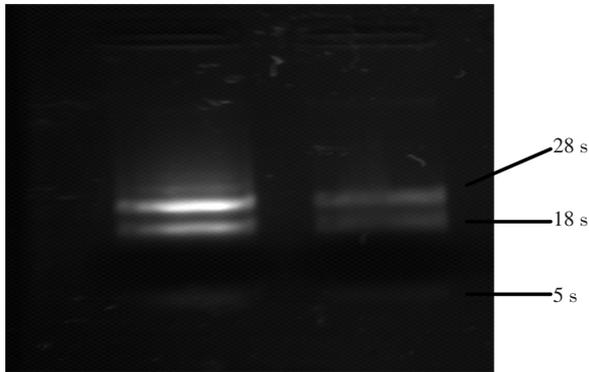


图3 甜菜叶片总 RNA 电泳图

Fig.3 Electrophoresis of beet leaf total RNA

上述提取的 RNA 经反转录成 cDNA 后进行 RT-PCR,结果表明,接种病毒后,病毒积累的情况各不相同,在 2 叶期和 6 叶期感染的植株老叶及 2 叶期感染的植株新生嫩叶中均检测到目标片段,但在 6 叶期感染植株嫩叶中没有检测到(见图 4),表明 TRV 病毒对于甜菜具有一定的侵染能力;研究结果还表明,在本研究中设置的培养条件下,该病毒对于较小的植株侵染能力较强,但是扩散能力对于较大的植株来讲较弱,因此,今后还需进一步优化培养条件。

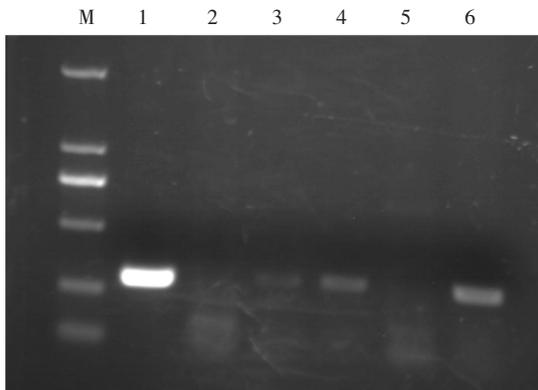


图4 病毒侵染 RT-PCR 检测图

Fig.4 virus infection by RT-PCR map

注:M;Marker DL 2000;1~6:不同 cDNA 模板 PCR 产物;1:质粒 pTRV2;2:未侵染叶片;3:2 叶期侵染嫩叶;4:2 叶期侵染老叶;5:6 叶期侵染嫩叶;6:6 叶期侵染老叶。

Notes: M: Marker DL 2000; 1~6: different cDNA template PCR product; 1: plasmid pTRV2; 2: uninfected leaf; 3: 2-leaf stage infected tender leaf; 4: 2-leaf stage infected old leaf; 5: 6-leaf stage infected tender leaf; 6: 6-leaf stage infected old leaf.

### 3 讨论

利用烟草脆裂病毒在甜菜上建立 VIGS 体系是

可行的。烟草脆裂病毒侵染甜菜后,会产生轻微的侵染症状,对于甜菜的生长发育影响不是很大。本研究结果显示,烟草脆裂病毒在甜菜中的扩散能力相对于其他植物诸如烟草、番茄等较弱,环境对于病毒的扩散繁殖能力有很大的影响,植物的培育条件与 VIGS 的沉默效果密切相关<sup>[15]</sup>。因此,可以在进一步的工作中探索病毒在甜菜上更为适宜的生长环境,或者改变侵染的方法,或这可以考虑采取幼苗全株浸泡于感染液。

PDS(八氢番茄红素脱氢酶基因)是影响类胡萝卜素合成的限速酶之一,沉默该基因会导致叶绿素合成受限,植物叶片会出现漂白的迹象<sup>[16]</sup>。该基因通常用作建立 VIGS 体系的标志性基因,因此,今后进一步研究将甜菜 PDS 基因构建到 pTRV2 上进行甜菜 VIGS 体系建立及利用该体系鉴定甜菜基因功能将是下一步工作的重点。

### 参考文献(References)

- [1] LU R, MARTIN-HERNANDEZ A M, PEART J R, et al. Virus-induced gene silencing in plants [J]. *Methods*, 2003, 30 (4): 296-303.
- [2] DINESH-KUMAR S P, ANANDALAKSHMI R, MARATHE R, et al. Virus-induced gene silencing [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 236: 287-294.
- [3] 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 [J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(5): 734-746.
- [4] RATCLIFF F, MARTIN-HERNANDEZ A M, BAULCOMBE D C. Technical advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing [J]. *The Plant Journal*, 2001, 25(2): 237-245.
- [5] LIU Y, NAKAYAMA N, SCHIFF M, et al. Virus induced gene silencing of a deficiens ortholog in nicotiana benthamiana [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54(5): 701-711.
- [6] EKENGREN S K, LIU Y, SCHIFF M, et al. Two mapk cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in ptomediated disease resistance in tomato [J]. *The Plant Journal*. 2003, 36:905-917.
- [7] HE X, ANDERSON J C, DEL POZO O, et al. Silencing of subfamily I of protein phosphatase 2A catalytic subunits results in activation of plant defenses responses and localized cell death [J]. *The Plant Journal*. 2004, 38: 563-577.
- [8] LIU Y, SCHIFF M, DINESH-KUMAR S P. Virus-induced gene silencing in tomato [J]. *The Plant Journal*, 2002, 31(6): 777-786.

- [9] DOHM J, MINOCHE A, HOLTGRÄWE D, et al. The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet *beta vulgaris* [J]. *Nature*, 2014, 505(7484):546-549.
- [10] VALENTINE T, SHAW J, BLOK V C, et al. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136(4):3999-4009.
- [11] MARTÍN-HERNÁNDEZ ANA M, BAULCOMBE DAVID C. Tobacco rattle Virus 16-Kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(8):4064-4071.
- [12] 吕坤. 棉花病毒诱导的基因沉默体系的建立及其在棉花抗黄萎病中的应用[D]. 南京:南京农业大学, 2013. LÜ Kun. Establishment of virus-induced gene silencing in cotton and its application in cotton resistance to verticillium wilt [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.
- [13] MACFARLANE S A. Molecular biology of the tobamoviruses [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(pt11):2799-2807.
- [14] 王心宇, 吕坤, 蔡彩平, 等. TRV 病毒介导的基因沉默体系在棉花中的建立及应用[J]. *作物学报*, 2014, (08):1356-1363. WANG Xinyu, LÜ Kun, CAI Caiping, et al. Establishment and application of TRV-mediated Virus-induced gene silencing in cotton [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, (08):1356-1363.
- [15] 宋震, 李中安, 周常勇. 病毒诱导的基因沉默(VIGS)研究进展[J]. *园艺学报*, 2014, (09):1885-1894. SONG Zhen, LI Zhongan, ZHOU Changyong. Research advances of Virus-induced gene silencing (VIGS) [J]. *Journal Article*, 2014, (09):1885-1894.
- [16] 朱海生, 李永平, 温庆放, 等. 草莓八氢番茄红素脱氢酶基因 *pds* 的克隆及特征分析[J]. *园艺学报*, 2011, 38(01):55-60. ZHU Haisheng, LI Yongping, WEN Qingfang, et al. Cloning and characterization of *pds* gene in *fragaria ananass* [J]. *Journal Article*, 2011, 38(01):55-60.