

密级：

论文编号：

中国农业科学院 博士学位论文

hpRNA 和 *pac1* 基因介导抗大麦黄矮病毒
转基因小麦研究

**Transgenic wheat expressing virus-derived hairpin RNA and *pac1*
gene respectively showed the resistance to *Barley yellow dwarf
virus-GPV***

博 士 研 究 生 ： 燕 飞

指 导 教 师 ： 成卓敏

申请学位类别 ： 农学博士

专 业 ： 植物病理学

研 究 方 向 ： 植物抗病毒基因工程

培 养 单 位 ： 研究生院

植物保护研究所

提交日期 2006 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph.D Dissertation

**Transgenic wheat expressing virus-derived hairpin RNA and
pac1 gene respectively showed the resistance to *Barley yellow
dwarf virus*-GPV**

Ph.D Candidate: Yan Fei

Advisor: Cheng Zhuomin

Major: Plant Pathology

Specialty: Genetic Engineering of Plants
for Virus Resistance

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2006

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘 要

在以往的抗 BYDV 转基因小麦研究中,已经使用的策略有 CP 基因介导的病毒抗性、复制酶基因介导的病毒抗性、运动蛋白基因介导的抗性,虽然这些抗性手段对 BYDV 具有延迟发病的抗性作用,但一直没有获得能够达到高度抗性水平的抗 BYDV 转基因小麦植株。同时,这些抗性手段都具有专一性,只对基因来源病毒表现抗性,对其他病毒没有作用,即不具有广谱性。本文从进一步提高对 BYDV 的特异抗性和病毒广谱抗性两个方面入手进行小麦转基因研究,希望获得高抗 BYDV 的转基因小麦植株和具有广谱病毒抗性的转基因小麦。

在提高对 BYDV 抗性的转基因小麦研究方面,利用 BYDV-GPV 株系的复制酶基因(Rep)片段和外壳蛋白基因(CP)片段构建可表达复合发夹 RNA(hpRNA)——含有由 Rep 片段双链(CP 双链)RNA 构成的茎和反义 CP(反义复制酶片断)RNA 构成的环——的表达框架,将该框架分别连入含有 CaMV 35S 启动子和 Emu 启动子的真核表达载体,通过农杆菌介导法(转 35S:CP+/Rep-/CP-结构)、基因枪法(转 Emu:Rep+/CP-/Rep-结构)和花粉管通道法(分别转 Emu:Rep+/CP-/Rep-和 Emu:CP+/Rep-/CP-结构)对小麦进行遗传转化,基于该结构表达的 hpRNA 诱发植物体内针对病毒基因组不同部位的 RNA 干扰机制而达到特异性高度抗病毒的目的。实验结果表明:①在农杆菌介导法获得的 82 株 G418 抗性植株中有 75 株 PCR 结果呈阳性;经过第一次病毒抗性试验,有 59 株未发病或只有轻微症状;Dot blot 检测表明 59 株抗性植株中有 46 株整合有外源基因;ELISA 结果表明整合有外源基因的植株中有 37 株能够正常表达外源基因;Southern blot 结果表明外源基因在小麦体内多以双拷贝形式存在;第二次病毒抗性试验表明,在 Dot blot、ELISA 呈阳性的 37 株再生植株中有 14 株表现低度抗性,有 12 株表现中度抗性,有 10 株表现高度抗性,另外 1 株在实验过程中死亡。②在基因枪法转化中,因未使用标记基因,故应用改进的叶片快速 PCR 对再生幼苗在生根阶段进行筛选,共移栽成活 64 株快速 PCR 阳性植株;经第一次病毒抗性试验有 30 株表现抗性,Dot blot 结果表明其中 21 株整合有外源基因;经第二次病毒抗性试验,21 株 Dot blot 阳性植株中有 5 株表现低度抗性,有 8 株表现中度抗性,有 8 株表现高度抗性。③通过花粉管通道法获得转 Emu:Rep+/CP-/Rep-结构的种子 367 粒,获得转 Emu:CP+/Rep-/CP-结构的种子 545 粒;对 T1 代幼苗进行大田抗病性鉴定结果表明,有 2 株转 Emu:CP+/Rep-/CP-结构小麦植株在接毒 40 天后仍没有明显发病症状。

在提高病毒抗性谱方面,利用克隆自粟酒酵母的 *pac1* 基因通过农杆菌介导法转化小麦。该基因是一种 RNA 双链分解酶。由于大多数植物病毒为 RNA 病毒,不管其基因组是单链还是双链,在寄主体内复制过程都会有一个双链 RNA 中间体阶段,如果通过基因工程手段将 *pac1* 基因转入植物体,利用其降解病毒 dsRNA 的活性而阻断病毒复制过程,就有可能达到抗植物病毒病的目的。并且 *pac1* 的作用靶位点只针对 RNA 双链,对 RNA 的序列无特殊要求,这就扩大了其对病毒抗性谱。本转化试验共获得 41 株 G418 抗性植株;经第一次病毒抗性试验获得 30 株抗性植株;其中 27 株 PCR 和 Dot blot 结果呈阳性;ELISA 和 RT-PCR 结果表明 27 株整合有外源基因的再生植株中有 25 株能够正常表达外源基因;经第二次病毒抗性试验,获得 12 株低度抗性植株,12

株中度抗性植株，1 株高度抗性植株。对于转 *pac1* 基因小麦能否对其他小麦病毒表现抗性、真正达到广谱抗病毒的目的，我们将在后续的工作中做进一步研究。

最后，针对构建 hpRNA 时需要多次连接反应的问题，设计了一个含有新型表达框架的双元载体，只要通过 1 步连接反应既可构建完成可表达目的基因 dsRNA 的真核表达载体。以转有绿色荧光蛋白的烟草中的 GFP 为沉默目的基因，通过农杆菌瞬时转化技术成功地沉默了烟草中的 GFP，这就证实了该载体的有效性。该载体可广泛应用于植物功能基因组研究、病毒沉默抑制蛋白研究、植物抗病毒基因工程研究。

关键词：大麦黄矮病毒，小麦，转基因，hpRNA，RNA 干扰，*pac1* 基因，农杆菌介导法，基因枪法，花粉管通道法

Abstract

Resistance derived by virus gene had been applied in the transgenic wheat against *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) research. All transgenic plants obtained by such way showed the reduced and delayed symptoms, however, did not reveal the high level of resistance. Furthermore, this resistance was special only against virus which conferred transgene in transformation. In this paper, we carried out the transformation of wheat research in order to obtain the high level of resistance wheat plants against BYDV and the multi-virus resistance wheat plants.

To improve the resistance of transgenic wheat against BYDV, Replicase gene fragment(Rep) and Coat protein gene fragment(CP) of BYDV-GPV were used to construct an expression frame, which could express the composite hairpin RNA with the dsRNA stem of Rep(CP) and the antisense RNA loop of CP(Rep). The expression frame was then inserted into plant expression vector under 35S promoter or Emu promoter control. hpRNA expressed in plant was hoped to induce RNA interference, then interfere the replication of virus genome, and so confer transformed wheat plant the high level resistance to BYDV-GPV. *Agrobacterium*-mediated transformation (transform the vector with 35S:CP+/Rep-/CP- expression frame), particle bombardment(transform the vector with Emu:Rep+/CP-/Rep- expression frame) and pollen tube path way(transform the vector with Emu:CP+/Rep-/CP- expression frame and Emu:Rep+/CP-/Rep- expression frame respectively) were applied to transfer the vector into plant cell. The results showed as follow. ①75 of 82 G418-resistant plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation, were PCR positive lines. In first antiviral test, 59 of 75 lines did not reveal viral symptoms. And 46 of 59 lines were proved containing the transgene in their genomes by Dot blot analysis. Southern blot result suggested transgene consisted in plant as double copy. ELISA result of *nptII* showed 37 of 46 dot blot positive lines could express the transgene normally. In 37 ELISA positive lines, 14 plants showed the low level of resistance to BYDV-GPV, 12 plants showed the middle level resistance, and 10 plants showed the high level resistance throughout the second antiviral test. ②In particle bombardment transformation, because no marker gene was used, a rapid PCR system though the treated leaves, was carried out to select the putative positive plants at the stage of transferring the regenerated plantlets into root-growing media. Total 64 plants which were positive in rapid PCR analysis were transplanted into soil and alive. No symptoms were observed on 30 of 64 plants in the first antiviral test, among which 21 plants were confirmed by Dot blot analysis consisting the transgene in their genomes. In the second antiviral test, 5 of 21 plants showed the low level of resistance to BYDV-GPV, 8 plants showed the middle level resistance, and 8 plants showed the high level resistance. ③ 367 seeds(transformed with Emu:Rep+/CP-/Rep- vector) and 545 seeds(transformed with Emu:CP+/Rep-/CP- vector) were obtained by pollen tube path way. T1 plants growing in fields were inoculated with virus to detect the resistance phenotype. The result showed that 2 lines (transformed with Emu:CP+/Rep-/CP-) did not reveal the obvious viral symptom after 40 days past inoculation.

In transgenic wheat research for multi-virus resistance, *pac1* gene was transformed into wheat by *Agrobacterium*-mediated transformation. As an RNaseIII like protein, *pac1* could degrade the double-strand RNA which would be formed when plant RNA viruses replicate in plant cell. Total 41 plants were obtained with resistance to G418, in which 30 plants showed resistance to BYDV-GPV in the first antiviral test. PCR and Dot blot analysis proved that 27 of these 30 plants contained the transgene in their genomes. However, ELISA and RT-PCR results revealed 25 of 27 positive plants could express the foreign expression frame, and the 2 others could not. Inoculated with the higher dose of virus, 12 plants showed the low level of resistance to BYDV-GPV, 12 plants showed the middle level of resistance to BYDV-GPV, and 1 plant showed the high level of resistance to BYDV-GPV.

To solve the problem of multi-ligation reaction needed to construct the hpRNA expression vector, a new expression vector was designed. Using this vector, construction of hpRNA expression vector now could be finished in only one ligation reaction. To confirm the availability of this vector to induce the RNA silencing, *gfp* in transgenic tobacco 16c was targeted. Result showed that green fluorescence could not be observed on the leaves infected by *Agrobacterium* containing this vector which should express the *gfp* hpRNA. It proved this vector could be used to silence target gene.

Key words: Barley yellow dwarf virus, Wheat, Transgenic, hairpin RNA, RNA interference, *pac1* gene, *Agrobacterium*-mediated transformation, Particle bombardment, Pollen tube path way

目 录

第 1 章 文献综述	1
1.1 大麦黄矮病毒研究进展	1
1.1.1 生物学特征	1
1.1.1.1 寄主范围和症状	1
1.1.1.2 株系及分布	1
1.1.1.3 病毒传播特点	3
1.1.1.4 病毒颗粒结构	4
1.1.2 分子生物学特征	4
1.1.2.1 基因组结构	4
1.1.2.2 基因产物的功能	5
1.2 抗病毒转基因植物研究进展	8
1.2.1 病毒基因介导的抗病性	8
1.2.1.1 外壳蛋白(Coat protein, CP)基因	8
1.2.1.2 复制酶基因(Replicase gene)	10
1.2.1.3 运动蛋白(Movement Protein, MP)基因	11
1.2.1.4 卫星 RNA(Satellite RNA)	11
1.2.1.5 RNA 干扰介导的抗性	12
1.2.2 非病毒来源的基因介导的抗性	12
1.2.2.1 植物抗病基因	12
1.2.2.2 核糖体失活蛋白(Ribosome inactivating proteins, RIPs)	13
1.2.2.3 核酶(Ribozyme)	13
1.2.2.4 抗体(Antibodies)	14
1.2.2.5 dsRNA 分解酶介导的抗性	14
1.3 RNA 干扰与植物抗病毒	15
1.3.1 RNAi 过程	15
1.3.1.1 RNAi 的起始	15
1.3.1.2 RISC 的装配	16
1.3.1.3 RNAi 作用特点	20
1.3.2 病毒编码的 RNA 沉默抑制蛋白	23
1.3.2.1 p19 蛋白	23
1.3.2.2 HC-Pro	25
1.3.2.3 C2 蛋白	26
1.3.2.4 2b 蛋白	26
1.3.2.5 NS 蛋白	26
1.3.2.6 其他抑制蛋白	27
1.3.3 RNAi 技术在植物抗病毒基因工程中的应用	28

第 2 章 材料与方法	31
2.1 DNA 克隆及测序	31
2.1.1 试剂及仪器	31
2.1.2 菌株和载体	31
2.1.3 大肠杆菌感受态细胞制备	31
2.1.4 质粒提取	32
2.1.4.1 质粒的小量制备	32
2.1.4.2 质粒的大量制备	33
2.1.5 质粒纯化	33
2.1.6 酶切、目的片断回收及连接转化	33
2.1.6.1 酶切及目的片断回收	33
2.1.6.2 连接及转化	34
2.1.7 重组质粒的快速筛选	34
2.1.8 序列测定	35
2.2 遗传转化	35
2.2.1 试剂	35
2.2.2 农杆菌介导的转化	35
2.2.2.1 菌株及载体	35
2.2.2.2 农杆菌用培养基	36
2.2.2.2 农杆菌感受态制备及转化	36
2.2.2.3 植物组培用培养基	37
2.2.3 基因枪法介导的转化	38
2.2.3.1 真核表达载体	38
2.2.3.2 轰击操作	39
2.2.4 花粉管通道法介导的转化	40
2.3 再生植株的检测	40
2.3.1 小麦基因组 DNA 的提取	40
2.3.2 植物组织总 RNA 提取	40
2.3.3 PCR 检测	41
2.3.3.1 直接用叶片进行的 PCR 快速检测	41
2.3.3.2 以提取的小麦基因组 DNA 为模板的 PCR 检测	41
2.3.4 Dot Blot	41
2.3.5 Southern Blot	42
2.3.5.1 探针标记	42
2.3.5.2 膜制备	42
2.3.5.3 杂交	42
2.3.5.4 检测	43
2.3.6 <i>nptII</i> ELISA 检测	43

第3章 病毒来源发夹RNA介导抗BYDV转基因小麦研究	45
3.1 材料与方法	45
3.1.1 真核表达载体的构建	45
3.1.2 用于转化的真核表达载体的制备	47
3.1.3 小麦幼胚组织培养	47
3.1.3.1 小麦品种及组织材料	47
3.1.3.2 幼胚的获取及培养	47
3.1.4 农杆菌介导的遗传转化	47
3.1.4.1 菌液的准备	47
3.1.4.2 浸染转化	48
3.1.4.3 抗性愈伤组织的筛选和转基因苗的获得	48
3.1.5 基因枪法进行的遗传转化	48
3.1.6 花粉管通道法介导的遗传转化	48
3.1.7 转基因再生小麦植株的分子生物学检测	48
3.1.8 抗性检测方法	48
3.1.8.1 温室病毒抗性检测方法	48
3.1.8.2 大田病毒抗性检测方法	49
3.2 结果与分析	49
3.2.1 农杆菌介导对小麦的遗传转化	49
3.2.1.1 hpRNA 真核表达载体构建	49
3.2.1.2 转化及再生植株的获得	50
3.2.1.3 T0代 G418 抗性植株的分子生物学检测	51
3.2.1.4 再生植株的抗病性检测	54
3.2.2 基因枪法对小麦的遗传转化	57
3.2.2.1 hpRNA 真核表达载体构建	57
3.2.2.2 质粒的纯化	57
3.2.2.4 T0代再生植株的分子生物学检测	59
3.2.2.5 再生植株的抗病性检测	60
3.2.3 花粉管通道法对小麦的遗传转化	62
3.2.3.1 hpRNA 真核表达载体构建	62
3.2.3.2 转化及转化种子的获得	62
3.2.3.3 T1代植株的抗病性筛选	63
3.4 讨论	64
3.4.1 小麦遗传转化的外植体选择	64
3.4.2 小麦遗传转化方法	64
3.4.3 hpRNA 介导的抗性	65
第4章 <i>pac1</i>介导抗BYDV转基因小麦研究	67
4.1 材料与方法	67

4.1.1 载体.....	67
4.1.2 农杆菌介导转化.....	67
4.1.3 T0 代再生植株的分子生物学检测	68
4.1.4 病毒抗性检测方法.....	68
4.2 结果与分析.....	68
4.2.1 转基因再生植株的获得.....	68
4.2.2 转基因再生植株的分子检测.....	68
4.2.3 转基因再生植株的抗病性鉴定	70
4.3 讨论	72
第 5 章 正反向双启动子 dsRNA 双元表达载体构建	74
5.1 材料与方法.....	75
5.1.1 表达框架构建.....	75
5.1.2 载体构建.....	75
5.1.3 功能检测体系.....	76
5.2 结果与分析.....	76
5.2.1 表达框架的序列测定.....	76
5.2.1 农杆菌瞬时转染转 <i>gfp</i> 烟草.....	76
5.3 讨论	76
第 6 章 结论与展望	78
6.1 结论	78
6.1.1 获得多株对 BYDV 表现不同程度抗性的转复合 hpRNA 小麦再生植株	78
6.1.2 获得多株对 BYDV 表现不同程度抗性的转 <i>pac1</i> 基因小麦再生植株	78
6.1.3 转基因植株对 BYDV 抗性的剂量效应.....	78
6.1.4 正反向双启动子 dsRNA 双元表达载体构建.....	78
6.2 展望	79
6.2.1 转基因植株后代的抗性遗传分析.....	79
6.2.2 BYDV-GPV 的沉默抑制蛋白分析	79
参考文献	80
致 谢	97
个人简历	98

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
ADARs	adenosine deaminase that act on RNA	RNA 腺苷酸脱氨酶
AMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	苜蓿花叶病毒
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>	雀麦花叶病毒
BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>	甜菜坏死黄脉病毒
BWYV	<i>Beet west yellow virus</i>	甜菜西方黄花病毒
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>	大麦黄矮病毒
BYV	<i>Beet yellows virus</i>	甜菜黄化病毒
CABYV	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	南瓜蚜传黄化病毒
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	花椰菜花叶病毒
CLRV	<i>Cherry leaf roll virus</i>	樱桃卷叶病毒
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>	黄瓜花叶病毒
CP	Coat Protein	外壳蛋白
CPMV	<i>Cowpea mosaic virus</i>	豇豆花叶病毒
CPSMV	<i>Cowpea severe mosaic virus</i>	豇豆重花叶病毒
CYDV-RPV	<i>Cereal yellow dwarf virus-RPV</i>	禾谷类黄矮病毒-RPV
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i>	建兰环斑病毒
DCL	Dicer-like protein	Dicer 类似蛋白
dsRBD	dsRNA-binding domain	双链 RNA 结合结构域
dsRNA	double-stranded RNA	双链 RNA
GCMV	<i>Grapevine chrome mosaic virus</i>	葡萄铬黄花叶病毒
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GSK	Glycogen synthase kinase	糖原合成酶激酶
MP	Movement Protein	运动蛋白
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
PAP	Pokeweed antiviral protein	美洲商陆抗病毒蛋白
PCSV	<i>Peanut chlorotic streak virus</i>	花生褪绿条纹病毒
PLRV	<i>Potato leaf roll virus</i>	马铃薯卷叶病毒
PMMoV	<i>Pepper mild mottle virus</i>	辣椒轻斑驳病毒
PPV	<i>Plum pox virus</i>	李痘病毒
PSTVd	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	马铃薯纺锤块茎类病毒
PVX	<i>Potato virus X</i>	马铃薯 X 病毒
PVY	<i>Potato virus Y</i>	马铃薯 Y 病毒
RdRp	RNA dependent RNA polymerase	RNA 依赖性的 RNA 聚合酶
RDV	<i>Rice dwarf virus</i>	水稻矮缩病毒

RHBV	<i>Rice hoja blanca virus</i>	水稻白叶病毒
RIPs	Ribosome inactivating proteins	核糖体失活蛋白
RISC	RNA-induced silencing complex	RNA 诱导沉默复合物
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
RSV	<i>Rice stripe virus</i>	水稻条纹病毒
siRNA	small interfering RNA	干扰性小 RNA
TAV	<i>Tomato aspermy virus</i>	番茄不孕病毒
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>	芜菁皱缩病毒
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>	烟草蚀刻病毒
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>	烟草花叶病毒
ToMV	<i>To mato mosaic virus</i>	番茄花叶病毒
TRSV	<i>Tabacco ringspot virus</i>	烟草环斑病毒
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>	烟草脆裂病毒
TSV	<i>Tobacco streak virus</i>	烟草条纹病毒
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	番茄斑萎病毒
TVMV	<i>Tobacco vein mottling virus</i>	烟草脉斑驳病毒
TYLCV-C	<i>Tomato yellow leaf curl virus-China</i>	中国番茄黄曲叶病毒
WSMV	<i>Wheat streak mosaic virus</i>	小麦梭条花叶病毒
WYMV	<i>Wheat yellow mosaic virus</i>	小麦黄花叶病毒

第1章 文献综述

1.1 大麦黄矮病毒研究进展

1950年, Oswald在美国加利福尼亚的大麦上首次发现大麦黄矮病毒(*Barley yellow dwarf virus*, BYDV), 该病毒可引起发病植株矮化、叶片黄化 (Oswald *et al*, 1951), 并可侵染小麦、燕麦、高粱、玉米等多种禾本科作物, 造成严重的经济损失。以小麦为例, 1987年我国仅陕西、甘肃两省就损失5亿多公斤小麦(周广和等, 1989); 据美国和澳大利亚的统计, 每年因黄矮病危害而引起的损失分别为9 500万和3 000万美元左右 (Makkouk *et al*, 1987; 2001)。

随着研究的深入, 人们对BYDV的生物学特征、分子生物学特征有了较为系统的了解, 并在此基础上开展了抗BYDV基因工程方面的研究工作, 本文对这些研究领域所取得进展作简要综述。

1.1.1 生物学特征

1.1.1.1 寄主范围和症状

大麦黄矮病毒可侵染 100 多种禾本科作物和杂草 (Slykhuis, 1967), 在我国可侵染小麦、大麦、燕麦、小黑麦、黑麦、甜玉米、野燕麦、雀麦、虎尾草、小画眉草、大凌风草、金色狗尾草、簇毛麦和银鳞茅等, 其中自生麦苗、野燕麦、虎尾草、小画眉草、金色狗尾草等是大麦黄矮病毒的越夏寄主 (周广和等, 1987a)。

寄主植物染病后常出现叶片黄化、红化、卷叶和植株矮化等症状 (图 1-1 A, H)。小麦在苗期染病可导致根系变浅、分蘖减少, 叶片由叶尖向基部逐渐褪绿; 越冬死亡率较高, 残存病株拔节后叶片首先显症, 病叶从下向上发展, 叶尖褪绿变黄, 叶片厚硬刚直, 叶背具蜡质层, 病害严重时, 叶片在褪绿之前开始出现褶皱和皱曲 (图 1-1 B, C), 有时在叶片边缘形成缺刻 (图 1-1 D), 植株严重矮化; 旗叶显著变小, 不抽穗, 或抽穗但穗粒数减少, 穗粒重减轻。拔节期染病, 则从中部向旗叶发病, 典型症状是首先从叶尖开始变黄, 叶脉仍保持绿色或呈现黄绿相间的条纹 (图 1-1 E), 扩至全叶的三分之一至二分之一处, 病叶质地光滑、增厚、挺直、颜色鲜艳, 后期全叶干枯, 植株矮化不明显, 秕穗率增加, 千粒重显著降低。穗期感染往往仅旗叶发病或旗叶先发病, 然后旗叶下 1-2 叶发病, 即由上向下发展, 植株不矮化, 秕穗率高, 千粒重降低 (周广和等, 1987 a)。

1.1.1.2 株系及分布

BYDV 是一类由蚜虫 (图 1-1G) 持久性非增殖性传播的病毒, 根据蚜传特性和基因组结构特征, 在国外已经确定 BYDV 有 PAV, MAV, SGV, RPV, RMV 5 个株系 (Rochow, 1969, 1971);

而我国则分为 GAV, PAV, RMV, GPV 4 个株系, 其中, GAV, PAV 分别与美国的 MAV, PAV 株系关系密切, RMV 与美国的 RMV 类似, GPV 与美国的 5 个株系均无血清学关系, 是中国的特有株系(成卓敏等, 1986)。根据国际病毒委员会第 7 次报告中的分类, BYDV-PAV, -MAV 株系归类于黄症病毒科 (*Luteoviridae*) 黄症病毒属 (*Luteovirus*), BYDV-RPV 株系改名为禾谷类黄矮病毒-RPV (*Cereal yellow dwarf virus-RPV*, CYDV-RPV), 并归类于黄症病毒科马铃薯卷叶病毒属 (*Polerovirus*), 其他 GPV, RMV, SGV 3 个株系是黄症病毒科内未归类病毒(国际病毒委员会第 7、8 次报告)。2003 年在墨西哥 CIMMIT 召开的国际黄矮病毒专业会议上曾讨论将 BYDV-GPV 命名为 CYDV-GPV。但这样并不合适, 原因有三: 一是 GPV 与 RPV 蚜虫传播特性不同, GPV 由麦二叉蚜和禾谷缢管蚜非专化性传播, 而 CYDV-RPV 是由禾谷缢管蚜专化性传播; 二是两者无血清学关系, 从琼脂双扩散、免疫电镜和 ELISA 测定结果来看, 两者无任何阳性反应; 三是从核苷酸序列分析来看, ORF1、ORF2、ORF3 和 ORF5 核苷酸同源性分别为 69%、81%、84%和 69%, 氨基酸序列同源性分别为 57%、81%、77%和 69%, 由于目前 GPV 全长序列测定正在进行之中, 但可以推测全长核苷酸序列同源性小于 80%。参考国际病毒分类委员会给予马铃薯病毒属成员的分类标准, CP 氨基酸序列同源性小于 80%和基因组序列核苷酸同源性小于 85%为不同种的分类标准, GPV 和 RPV 应该属于不同的种。所以将目前的 BYDV-GPV 株系称为小麦黄矮病毒更为合适。由于目前对此命名尚未报告国际病毒分类委员会, 所以本文中仍称 GPV 为 BYDV-GPV 株系。

BYDV 在南美洲、北美洲、欧洲、大洋洲、亚洲等生产小麦的国家和地区都有不同程度的发生和危害(周广和等, 1989)。1960 年, 我国首次在陕西、甘肃的小麦上发现。现在已知我国西北、华北、东北、西南及华东等冬麦、春麦、冬春麦区每年都有不同程度的发生, 如山东、河南、山西、陕西、甘肃、青海、宁夏、内蒙古、河北、北京、辽宁、吉林和黑龙江等省、市、自治区, 及江苏、安徽省北部和四川、云南省局部地区每年都有不同程度的发生(周广和等, 1987a)。

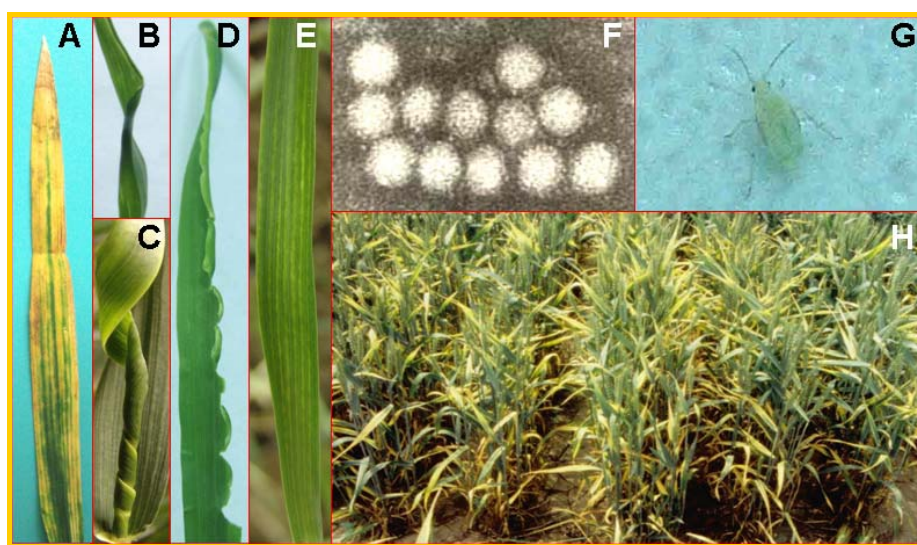


图 1-1 BYDV 颗粒, 传播介体及感染小麦后的症状

Figure 1-1 BYDV particles, transmission vector and symptoms on wheat

1.1.1.3 病毒传播特点

BYDV 只能经蚜虫进行持久性传毒（蚜传特性如表 1-1 所示），不能由种子、土壤、汁液等传播。Bruehl 等（1957）最早报道能被一种蚜虫传播而不被另一种蚜虫传播的 BYDV 株系存在，随后 Rochow（1958）发表了有关 BYDV 株系划分的报道，并于 1969 和 1971 年基于 4 种蚜虫的传播效率，确定了 5 个不同的株系：RPV、MAV、RMV 和 SGV 分别由禾谷缢管蚜、麦长管蚜、玉米蚜和麦二叉蚜专化性传播；PAV 由禾谷缢管蚜和麦长管蚜传播，偶尔也由麦二叉蚜传播（Rochow *et al.*, 1969, 1971）。BYDV 株系鉴定体系的建立为有关病毒与蚜虫介体的互作，影响获毒与传毒机制等方面提供了大量有价值的信息。但 BYDV 株系的介体专化性并不是绝对的，多数情况下是传播效率的高低而不是能不能传播的问题（Rochow, 1958, 1959）。自 1958 年以来美国纽约实验体系进行的测定中，只有玉米蚜均不能传播 MAV 株系，其它多数蚜虫-株系组合的专化性都是相对的（Power *et al.*, 1995）。

表 1-1 BYDV 株系蚜传特性（Rochow *et al.*, 1969, 1971；周广和等, 1986, 1987b）

Table 1-1 Transmission characters of BYDV serotypes by aphid		
株系类型	传毒蚜虫	互作关系
MAV	麦长管蚜 (<i>Sitobion avenae</i>)	专化性
RPV	禾谷缢管蚜 (<i>Rhopalosiphum padi</i>)	专化性
SGV	麦二叉蚜 (<i>Schizaphis graminum</i>)	专化性
RMV	玉米蚜 (<i>Rhopalosiphum maidis</i>)	专化性
PAV	禾谷缢管蚜 (<i>Rhopalosiphum padi</i>)；麦长管蚜 (<i>Sitobion avenae</i>)	非专化性
GAV	麦二叉蚜 (<i>Schizaphis graminum</i>)；麦长管蚜 (<i>Sitobion avenae</i>)	非专化性
GPV	禾谷缢管蚜 (<i>Rhopalosiphum padi</i>)；麦二叉蚜 (<i>Schizaphis graminum</i>)	非专化性

在我国的麦类黄矮病流行中起主导作用的蚜虫是麦二叉蚜。麦二叉蚜的传毒是一种持久性传毒，但不能终生传毒，也不能经卵传毒。在 16-20℃，病毒潜育期为 15-20 d，温度低，潜育期长，25℃以上隐症，30℃以上不显症。麦二叉蚜在病叶上吸食 30 min 即可获毒，在健苗上吸食 5-10 min 即可传毒。获毒后 3-8 d 带毒蚜虫传毒率最高，约可传 20 d 左右。以后逐渐减弱，刚产若蚜不带毒（周广和等，1981）。冬麦区冬前感病小麦是次年的发病中心，在返青拔节期出现一次高峰，发病中心的病毒随麦蚜扩散而蔓延，到抽穗期出现第二次发病高峰。春季收获后，有翅蚜迁飞至糜、谷子、高粱及禾本科杂草等植物越冬，秋麦出苗后迁回麦田传毒并以有翅成蚜、无翅若蚜在麦苗基部越冬，有些地区也产卵越冬。冬、春麦混种区的 5 月上旬，冬麦上有翅蚜向春麦迁飞。晚熟麦、糜子和自生麦苗是麦蚜及病毒越冬场所，冬麦出苗后飞回传毒。春麦区的虫源、毒源有可能来自部分冬麦区，成为春麦区初侵染源（周广和等，1981；1987a）。

病毒、蚜虫介体、寄主植物和环境因子组成的复杂病害系统决定了 BYDV 在小麦上的流行规律。实践证明，在我国冬麦区，传毒蚜虫在根际越冬，在当地自生麦苗、夏玉米或禾本科杂草上

越夏。对于冬春麦混种区，蚜虫可以在春小麦、糜子上越夏，以卵在冬麦根基越冬。对这两种小麦种植区而言，黄矮病的流行相关因子主要包括 BYDV 各株系的数量积累和相对比例、越冬蚜口基数及比例。后者主要和气候因子有关，如降雨量和气温。当 10 月平均气温超过 15℃，2 月平均气温超过 2.8℃，降雨较少时，蚜虫越冬基数大，繁殖快，黄矮病往往发生较重。作物布局也影响虫口数量，从而影响黄矮病发生，尤其冬春麦混种区，应当注意麦子与糜子混种区和冬春麦混种区虫口的监测。对春麦区，蚜虫很难在当地越冬，主要通过冬麦区带毒蚜虫的远距离迁飞传毒，所以冬麦区的大发生往往同时引起春麦区的流行。冬麦播种早，发病重；阳坡重、阴坡轻，旱地重、水浇地轻；粗放管理重、精耕细作轻，瘠薄地重。冬麦区早春麦蚜扩散是传播小麦黄矮病毒的主要时期。小麦拔节孕穗期遇低温，抗性降低易发生黄矮病（周广和等，1981；1987a）。

1.1.1.4 病毒颗粒结构

1964 年，美国学者 Rochow 等对室内人工繁殖的病株组织进行了提纯，利用电子显微镜下观察到一种直径约 30 nm 的等轴对称的正二十面体的粒体；通过薄膜饲毒试验证明电镜下观测到的粒体具有侵染性，从而确定为大麦黄矮病毒的病毒粒体（Rochow *et al.*, 1964）。我国成卓敏等利用酶提纯法对我国的小麦黄矮病病原进行了提纯，通过电镜观察及薄膜饲毒试验明确病毒粒体与国外报道的大麦黄矮病毒相似，直径为 28-32 nm，无包膜（成卓敏等，1982；图 1-1 F）。

1.1.2 分子生物学特征

由于 BYDVs 严格由蚜虫以循环非增殖方式传播，在寄主植株内主要分布于韧皮部，导致病毒颗粒难于提纯。虽然 BYDVs 在生产上可造成严重的经济损失，但人们对其分子生物学研究却进展缓慢。上世纪 80 年代中后期，特别是进入 90 年代以来，随着现代生物技术的发展，关于 BYDVs 的基因组结构、基因转录和表达调控机制等方面的研究均取得了较大进展。

1.1.2.1 基因组结构

BYDV 是一类单链正义 RNA 病毒。目前已测定出了 PAV, MAV, RPV, GAV 的基因组全序列和 RMV, GPV, SGV 的部分序列（Miller *et al.*, 1988a; Vincent *et al.*, 1990, 1991; Ueng *et al.*, 1992; 成卓敏等，1996；晋治波等，2003）。在黄症病毒属的基因组中，5'端编码区域由重叠 8-13 个核苷酸的 2 个开放阅读框架（Open Reading Frame, ORF）组成（ORF1 和 ORF2），而马铃薯卷叶病毒属基因组 5'端由高度重叠的 3 个 ORFs 组成，最前面的 ORF0 在黄症病毒属中不存在，ORF1 和 ORF2 编码的多肽相对应于黄症病毒属的 ORF1 和 ORF2，但重叠 475-628 个核苷酸。尽管重叠长度不相同，但它们的 ORF2 均从 ORF1 通过移码翻译而与 ORF1 产物融合表达，具有 RNA 聚合酶活性。在非编码区之后是含有 3 个 ORFs 的区域，它们通过 1 个亚基因组 RNA（sgRNA）表达，分别编码外壳蛋白（Coat Protein, CP）的 ORF3；隐含在 CP 编码序列中但因阅读框架不同而编码 17-21 kDa 蛋白的 ORF4；以及编码约 50 kDa 蛋白的 ORF5，该蛋白由 CP 终止子通读翻译

而成。黄症病毒属的这 3 个 ORF 最保守，可能控制其特有的生物学性状，如局限于寄主植物韧皮部和蚜虫传播特性等 (Miller *et al*, 1995)。在黄症病毒属 ORF5 的 3' 末端含有一非常长的核苷酸序列 (600-800bp)，而马铃薯卷叶病毒属则仅有 150bp。BYDV-PAV 和 MAV 在这一区域还有一个编码 4.3-6.7 kDa 蛋白的 ORF6，黄症病毒属的其它病毒和马铃薯卷叶病毒属尚未发现该 ORF 的存在。

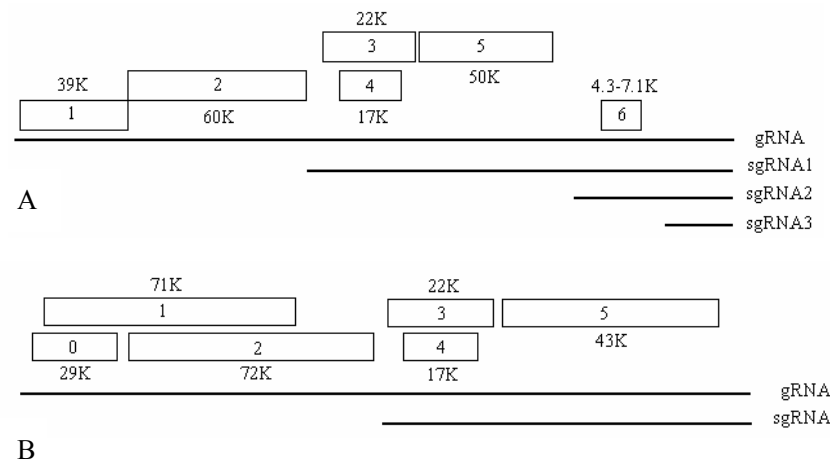


图 1-2 黄症病毒属和马铃薯卷叶病毒属基因组结构 (A, *Luteovirus*; B, *Polerovirus*)
Figure 1-2 Genome structures of *Luteovirus* and *Polerovirus* (A, *Luteovirus*; B, *Polerovirus*)

1.1.2.2 基因产物的功能

现代分子生物学技术的发展，为进行基因产物功能的分析提供了有利的手段，对黄症病毒编码的不同基因产物功能的研究也取得一定的进展，如通过将病毒基因插入到报告基因之后转入植物体内进行表达，对一些蛋白的生化特性进行了瞬时分析研究；将 PAV 全长 cDNA 克隆到噬菌体 RNA 聚合酶启动子后对二者进行了定点突变的研究 (Young *et al*, 1991)。此外，农杆菌感染技术的发展对黄症病毒基因产物的研究也起到了巨大的推动作用，通过将病毒 cDNA 插入到根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的 Ti 质粒，克服了黄症病毒 cDNA 体外转录子不能作为侵染源的限制 (Leiser *et al*, 1992)。

1.1.2.2.1 ORF0

ORF0 是马铃薯卷叶病毒属所特有的一个开放阅读框架，翻译产生 P0 蛋白。马铃薯卷叶病毒属病毒间的 ORF0 差异很大，几乎没有同源性 (Mayo *et al*, 1996)，因此很难通过 P0 的氨基酸序列来推导其功能。Van der Wilk 等 (1997) 证明表达 PLRV ORF0 的转基因马铃薯植株产生典型的卷叶症状，症状严重度与蛋白表达水平成正比，转基因植株也不抗 PLRV 的侵染。对甜菜西方黄化病毒 (*Beet west yellow virus*, BWYV) 缺失或失活 ORF0 的研究显示，ORF0 在病毒 RNA 复制、粒体装配、对原生质体的侵染和传播特性上均无作用。最近的研究表明，P0 蛋白可能是抑制植物体针对病毒产生的 RNA 干扰机制的一种蛋白，这也就解释了为什么当它表达量高时病害

会加重。这部分内容会在 1.3.2 中详细讲述。

1.1.2.2.2 ORF1 和 ORF2

P1 和 P2 蛋白通常总是放在一起进行研究, 因为表达 P2 蛋白的 ORF2 没有自己的起始密码子, P2 的表达必须在 P1 蛋白翻译完成时经由核糖体移码翻译出一个 P1-P2 融合蛋白。在用 BWYV 转录 RNA 侵染原生质体的试验中发现 ORF1 和 2 的移码突变有致死作用, 这一结果直接证明 P1 和 P2 是 BWYV 复制过程中所必需的蛋白 (Reutenauer *et al*, 1993)。由于 P1 具有单独表达和与 P2 融合表达两种方式, 因此两者的功能也应该有所不同。有证据表明 P1-P2 融合蛋白与依赖 RNA 的 RNA 聚合酶有关, 而单独表达的 P1 蛋白功能尚不明确。

1.1.2.2.3 ORF3

通过 ORF3 预测的氨基酸序列与 BYDV 纯化后获得的肽链测序结果之间进行的蛋白序列比对, 及 BYDV 抗体可与 ORF3 在大肠杆菌中表达产物相结合这两个结果可以确定, P3 作为病毒的结构蛋白, 通过包被病毒的 RNA 而形成病毒粒子的外壳 (Miller *et al*, 1988b; Rizzo, *et al*, 1992)。Smith 等 (1990) 通过抗马铃薯卷叶病毒 (*Potato leaf roll virus*, PLRV) 的抗体可与在大肠杆菌中表达的 P3 显著反应而证明 P3 为 PLRV 的外壳蛋白。利用提纯病毒抗体与无细胞翻译产物的免疫沉淀反应 (Veidt *et al*, 1988), 以及用具有活性的、含有缺失的 ORF3 的转录子侵染后在原生质体内积累的蛋白进行 Western 印迹分析, BWYV P3 亦被证明为病毒粒体蛋白。

因突变而不能表达 ORF3 的 BWYV RNA 的转录子并没有失去其对昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*) 原生质体的侵染能力, 表明 CP 对于病毒复制是非必需的 (Reutenauer *et al*, 1993), 但在这些原生质体中 BWYV RNA 的积累量却比用野生型的 RNA 接种的原生质体为少。这可能是由于缺乏外壳蛋白的包裹使得子代 RNA 的稳定性降低, 或者是裸露的 RNA 起到了一种反馈抑制信号的作用; 抑或是 CP 对复制过程起着一种未知的刺激作用 (Mayo *et al*, 1996)。

1.1.2.2.4 ORF4

ORF4 的表达产物 P4 蛋白具有细胞间运动蛋白的生化特性。PLRV ORF4 基因编码的 17kDa 蛋白是黄症病毒科中研究最为详细的 ORF4 编码蛋白。此蛋白由亚基因组 RNA1 翻译而来 (Tacke *et al*, 1990)。在原核系统中表达的 PLRV P4 以协作地、非特异方式结合单链核酸, P4 的不同缺失形式的检测结果证实核酸的结合位点位于该蛋白的 C 末端 (Tacke *et al*, 1991)。这一结果与其他病毒如烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Citovsky *et al*, 1990)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Li *et al*, 1996)、苜蓿花叶病毒 (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) (Schoumacher *et al*, 1992)、雀麦花叶病毒 (*Brome mosaic virus*, BMV) (Jansen *et al*, 1998) 中对运动蛋白的研究的结果相同, 并且与 TMV 运动蛋白类似的是, P4 也可以被磷酸化 (Tacke *et al*, 1993)。

在运动蛋白与植物病毒的RNA结合体中,运动蛋白是作为分子伴侣,引导复制产生的病毒基因组到达胞间连丝并协助病毒RNA通过胞间连丝形成系统扩散(Citovsky *et al*, 1993)。研究表明,PLRV 17KDa 蛋白在Ca²⁺和磷脂存在的情况下可被膜蛋白磷酸化(Sokolova *et al.*, 1997)。Sokolova 等(1997)提出 17KDa 蛋白的磷酸化发生在膜结构中,具体部位可能是韧皮部中连接筛管-伴胞复合体的三角形胞间连丝中。虽然黄症病毒科病毒局限在韧皮部,但病毒可在韧皮部薄壁细胞、筛管和伴胞间运动。已有的实验结果证明TMV和其它植物病毒的运动蛋白能介导病毒基因组经由胞间连丝运动(Deom *et al*, 1992; Boyko *et al*, 2002)。Chay 等(1996)对于黄症病毒BYDV-PAV的研究发现,ORF4 的失活虽然不影响病毒在韧皮部的积累,但不能导致系统侵染,并且不能被蚜虫传播;而用ORF4 的突变体和ORF5 的突变体同时侵染韧皮部积累获得的病毒又可以被介体蚜虫传播,但只有表达野生型 17KDa 蛋白的病毒才能导致系统侵染。这一结果表明BYDV-PAV ORF4 表达的 17kDa是系统侵染所必需,而ORF4 和ORF5 两者之间的相互作用可能决定了蚜虫的传毒能力。因此BWYV的研究表明突变的ORF4 并不影响病毒的传播,但决定了蚜虫的传毒能力(ZieglerGraff *et al*, 1996; Brault *et al*, 2005; 2003; 2002; 2000; 1995)。

Nass 等(1998)通过原位杂交和原位免疫定位分析发现,受侵染的燕麦中 BYDV-PAV 的 P4 (17-kDa 蛋白)总是和单链病毒 RNA 联系在一起。Reutenauer 等(1993)也在侵染的原生质体中检测到了 BWYV P4,他们用改变 ORF4 的起始密码的转录子侵染原生质体后发现这一变化并不影响 BWYV RNA 的复制与包装。用农杆菌转染法侵染克利夫兰烟草的试验结果表明,阻止 ORF4 表达的密码子突变可延迟对植株的侵染(Mayo *et al*, 1996)。上述结果进一步证实了 P4 在病毒核酸通过寄主膜系统的运动和系统病害的发生的过程中发挥了重要作用。

1.1.2.2.5 ORF5

ORF5 是通过 ORF3 终止密码子的通读而与 ORF3 融合表达。通过血清学反应,在病株和原生质体中可检测到 PLRV (Bahner *et al*, 1990) 和 BWYV (Reutenauer *et al*, 1993) 全长通读蛋白。但在提纯的 PLRV, BYDV-PAV 和 RPV 中只能检测到较短的通读蛋白(53-58KDa) (Bahner *et al*, 1990; Vincent *et al*, 1991), 而目前对于这一差异的原因尚不明确。Reutenauer 等(1993)通过移码突变或缺失证明 P5 并不影响 BWYV 的 RNA 复制、单细胞侵染以及病毒粒子装配的过程。

所有黄症病毒的通读蛋白序列有着较高的同源性,但在 C 末端的序列变异较大。而 BWYV、南瓜蚜传黄化病毒(*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) 和 PLRV 的 P5 在这一区域有约 45 个氨基酸的序列十分相似。由于这三种病毒均由桃蚜(*Myzus persicae*)传播,因此 Guilley 等(1994)推测这一区域与介体传播的专化性有关。Jolly 等(1994)报道 PLRV 蚜传低效株系与正常株系相差 3 个氨基酸,均位于通读蛋白的 N 端,从某种程度上证实了上述推测。McGrath 等(1996)认为 RPV P5 4302-4972 碱基序列约 24KDa 的蛋白是决定禾谷缢管蚜专化性传播该病毒的区域。

1.1.2.2.6 ORF6

在基因组的 3'末端, BYDV-PAV 和-MAV 有一小的 ORF (ORF6), 可编码约 4.3-6.7KDa 的蛋白 (Miller *et al*, 1988a; Ueng *et al*, 1992)。而 SGV 虽然有较长的 3'末端, 但不存在编码序列 (Rathjen *et al*, 1994)。PAV 和 MAV ORF6 虽然 5'端非常保守, 但 3'端变异很大 (Miller *et al*, 1988a)。由于很容易检测到对应于 ORF6 的 sgRNA, 因此目前人们认为 P6 是有功能的 (Miller *et al*, 1988a; Ueng *et al*, 1992)。该区域的移码突变会使 BYDV-PAV 转录子丧失其侵染性, 也说明 P6 在病毒复制中起某种作用 (Young 等, 1991)。

1.2 抗病毒转基因植物研究进展

1.2.1 病毒基因介导的抗病性

1.2.1.1 外壳蛋白 (Coat protein, CP) 基因

自 1986 年报导首例转 TMV CP 基因获得抗病性植株以后 (Power *et al*, 1986), 已有 *Tobraviruses*, *Luteoviruses*, *Cucumoviruses*, *Potyviruses*, *Tenuiviruses* 等 10 多个属 30 余种病毒进行了转 CP 基因试验 (表 1-2) (Baulcombe *et al*, 1996; Beachy *et al*, 1997; Dasgupta *et al*, 2003)。除 TSWV、RSV 是负链 RNA 病毒外, 上述病毒均为正链 RNA, 且外壳仅由一种类型壳蛋白组成。除 TMV 外, 黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX)、苜蓿花叶病毒 (*Alfalfa mosaic virus*, AMV)、烟草条纹病毒 (*Tobacco streak virus*, TSV)、马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY)、烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV)、葡萄铬黄花叶病毒 (*Grapevine chrome mosaic virus*, GCMV)、甜菜坏死黄脉病毒 (*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYSV)、番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、水稻条纹病毒 (*Rice stripe virus*, RSV)、大麦黄矮病毒 (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) 和小麦黄花叶病毒 (*Wheat yellow mosaic virus*, WYMV) 等的外壳蛋白基因分别被导入烟草、番茄、南瓜、辣椒、水稻、小麦、燕麦多达几十种的转基因受体植物后, 转化植物都表现出不同程度的抗病效果 (Baulcombe *et al*, 1996; Beachy *et al*, 1997; Dasgupta *et al*, 2003)。其中大多数转入 CP 基因的植株对病原病毒或同属病毒具有一定程度的抗性, 表现为推迟症状表显和减轻症状为害或症状限于接种叶片而不扩展到新生叶片, 病毒含量较低。

抗病毒转基因小麦的研究也起始于利用病毒外壳蛋白构建抗性基因植物表达载体。在 1993 年, 成卓敏等首次报道了应用大麦黄矮病毒 GPV 株系的 CP 基因构建抗性基因植物表达载体, 借助花粉管通道法获得了转基因的冬小麦品种北京 837。数年分子检测及田间抗性鉴定结果表明, CP 基因已稳定地遗传到 T6 代, T1 代的分离符合孟德尔遗传规律; 较之对照株, 转基因小麦植株在温室接种 GPV 毒源后表现出病害症状明显减轻和推迟发病的特点; 并且田间抗病性鉴定结果显示, 转基因小麦植株小麦千粒重比对照增加了 20%左右。部分 T2 和 T3 代转基因小麦植株表现出较高的抗性; T4 代转基因小麦与未转基因的亲本材料北京 837 的回交结果表明 CP 基因稳定

地存在于转基因后代中 (Cheng *et al*, 1996; 1997; 1998)。夏光敏等 (1995) 利用基因枪方法, 将分别含有 BYDV-GPV CP 基因和 Gus 基因的植物表达载体共转化小麦品种济南 177 等的幼胚也获得了转基因植株。Gus 基因的瞬时表达频率达到 42%, CP 基因 T0 代转化频率为 2-9%。温室抗病鉴定, 部分植株表现推迟发病。利用 PEG 介导的方法将 BYDV CP 基因转化小麦原生质体和农杆菌介导的方法将 GPV CP 基因转化到小麦幼胚, 获得了阳性的再生植株。1996 年, McCarthy 等在耶路撒冷召开的国际病毒学大会上, 报告了将大麦黄矮病毒 PAV 株系的 CP 基因以及小麦梭条花叶病毒 (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) 的 CP 基因转化小麦获得了具有延迟发病和减轻症状危害的转基因小麦植株。

表 1-2 已经获得的转 CP 基因植物及对病毒的抗性 (Dasgupta *et al*, 2003; Cheng *et al*, 1997)

Table 1-2 Obtained transgenic CP plants and their resistance to viruses (Dasgupta *et al*, 2003; Cheng *et al*, 1997)

植 物	病 毒*	田间试验
玉米	MDMV, MCMV	否
水稻	RSV, RTSV	否
小麦	¹ WSMV ² BYDV	¹ 否 ² 是
杏	PPV	否
甜瓜	ZYMV, WMV2, CMV	是
柑橘	CTV	否
葡萄	GCMV, GFLV, ToRSV	否
香瓜	ZYMV	是
番木瓜	PRSV	是
李子	PPV	否
南瓜	ZYMV, WMV2	是
胡椒	TSWV	否
番茄	ToMV, CMV, TYLCV	是
马铃薯	PVX, PVY, PLRV	是
莴苣	LMV, TSWV	否
豌豆	PEMV	否
黄瓜	CMV	是
甜菜	BNYVV	否
花生	TSWV	否
大豆	BPMV	否
豇豆	BPMV	否

*MCMV, *Maize chlorotic mottle virus*; MDMV, *Maize dwarf mosaic virus*; RTSV, *Rice tungro spherical virus*; CTV, *Citrus tristeza virus*; GFLV, *Grapevine fanleaf virus*; ToRSV, *Tomato ringspot virus*; LMV, *Lettuce mosaic virus*; PEMV, *Pea enation mosaic virus*; BPMV, *Bean pod mottle virus*; WMV, *Watermelon mosaic virus*; PPV, *Plum pox virus*; PRSV, *Papaya ringspot virus*; TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*

尽管 CP 介导的抗性在很多实验中取得了成功（表 1-2），但在应用上还有很大的局限性。因为大部分 CP 介导的抗性主要表现在病毒侵染早期，推迟发病和减轻症状。如果提高病毒接种量或重复接种，则抗性受到很大影响。因此对可能反复感染的田间作物，多年生或通过无性繁殖的作物，加上病毒株系的多样性，CP 介导的抗性就不足以有效地控制病毒的侵染。

另外，若转基因表达的 CP 是来源于以昆虫为介体的病毒时，则可能出现病毒在植株间相互传播的问题。众所周知，转基因表达的 CP 能包裹异源病毒 RNAs，从而使得原本不能蚜传的病毒能被蚜虫传播。正因为如此，转基因表达的 PLRV CP 特别引起人们的注意。此外，一种病毒 CP 基因的植物表达产物可能包装另一种病毒或其它致病因子的基因组，从而形成一种新的致病因子。

1.2.1.2 复制酶基因 (Replicase gene)

继外壳蛋白基因策略的转基因植株能够表达不同程度的抗性后，人们开始寻找病毒的其它基因用于抗病毒研究。利用病毒的复制酶基因构建人工抗性基因转化寄主植物而获得抗病毒转基因植物，是抗病毒植物基因工程的又一重要进展（Baulcombe *et al*, 1996; Beachy *et al*, 1997; Dasgupta *et al*, 2003）。

1990 年，Golemboski 等将 TMV 含有复制酶核心功能团 GDD 的 54 kDa 蛋白基因转化烟草，首次利用病毒复制酶基因获得了对 TMV 具有高度抗性的转基因烟草。自此以后，国内外陆续报道了此类由病毒非结构蛋白基因介导的植物对病毒的抗性。由病毒编码的 RNA 依赖性的 RNA 聚合酶（RNA dependent RNA polymerase, RdRp）基因介导的抗性通常即为复制酶介导的抗性。对于复制酶介导的抗性现已有许多详尽的报道，它们都是以完整或突变（几个核苷酸的缺失或改变所致）的病毒 RdRp 基因在转基因植物体内表达为基础的。例如，Braun 等（1992）和 Rubino 等（1993）分别通过一个 RdRp 基因在转基因植物体内表达诱导了对 PVX 和建兰环斑病毒（*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV）的抗性，而 Donson 等（1993）和 Anderson 等（1992）则通过 RdRp 基因一个片段的转基因表达获得了对 TMV 和 CMV 的抗性。Longstaff 等（1993）通过 RdRp 突变体转化植物也获得了对 PVX 的抗性，随后其他一些转病毒复制酶基因的转基因植物也获得了成功。1998 年 Koev 等报道了将 BYDV-PAV 株系基因组包含有复制酶基因的 5'端部分转化燕麦，获得了转基因植株。对 T2 和 T3 代转基因后代接种 BYDV-PAV 毒源，所有含有转化基因的植株在接种初期均表现出发病症状，但随后可恢复，并可开花、结实，而对照植株则在株高达到 25cm 之前死亡。转基因植株在接种后尽管表现出发病症状，但其体内病毒和病毒 RNA 含量差异很大，在有些植株中难以检测到病毒的存在，表明转基因植株体内可能对病毒在植株体内的积累方面起到限制作用。

BYDV 的复制酶与病毒基因组的 ORF1 和 ORF2 有关。由于 ORF2 中含有复制酶基因的核心序列 GDD，人们据此推测其编码病毒的复制酶。但 ORF2 没有自身的起始密码子，不能独立表达，而是通过 ORF1 的移码与 ORF1 蛋白融合表达。1999 年，田苗英等将 ORF2 的 3'端缺失序列

克隆构建成植物表达载体,并利用花粉管通道法转化普通小麦栽培品种,获得抗性植株。吴茂森(2000),张文蔚(2003)分别通过花粉管通道法和农杆菌介导法将 ORF1, ORF2 全长序列分别导入小麦获得抗性植株;2003 年刘太国将串联的 ORF1, ORF2 通过花粉管通道法导入小麦获得抗性植株。

1.2.1.3 运动蛋白(Movement Protein, MP) 基因

研究表明,不同病毒在细胞间的运动是相似的,在病毒侵染周期中,由病毒基因组正常表达产生细胞间移动蛋白(30 kDa),并促进新合成的病毒颗粒向健康细胞中散布。因此,能表达突变型细胞间移动蛋白的转基因植物可能会扰乱细胞间病毒的传播,这种干扰作用可以在胞间连丝水平或病毒 RNA 水平上发生,并且具有广谱效应,因而成为研究植物转基因抗性的一个诱人方向。目前,已经克隆并表达了包括 AMV、CMV、花椰菜花叶病毒(*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)、花生褪绿条纹病毒(*Peanut chlorotic streak virus*, PCSV), TRV, 烟草环斑病毒(*Tabacco ringspot virus*, TRSV)的胞间移动蛋白基因。构建了这些病毒基因的表达载体并将其转入植物,使之在植物中表达修饰型的细胞间移动蛋白(Baulcombe *et al*, 1996; Beachy *et al*, 1997; Dasgupta *et al*, 2003)。

Malysheuko 等(1993)和 Cooper 等(1995)研究表明,含有缺失的 TMV 运动蛋白的转基因烟草表现对 TMV 的抗性,他们认为这种抗性机制是由于突变蛋白干扰了 TMV 正常运动蛋白的活性所致。Malysheuko 等(1993)研究表明转基因烟草中表达的雀麦花叶病毒(*Brome mosaic virus*, BMV)运动蛋白能表现对 TMV 的部分抗性。由于烟草并不是 BMV 的宿主,因此推测 BMV 的运动蛋白在烟草中功能是异常的,这个异常的运动蛋白干扰了 TMV 正常的运动蛋白的作用从而表现出一定程度的抗性。虽然抗病毒植株对 TMV 的抗性相对来说较弱,但这是首次报道运用病毒运动蛋白转基因工程能产生广谱的病毒抗性,所以显得很有意义。

1996 年, Sijen 等用全长豇豆花叶病毒(*Cowpea mosaic virus*, CPMV) MP 基因转化烟草,发现转基因植株对野生株系 CPMV-Sb 和同源性很高的 CPMV-S1 和 CPMV-S8 株系都具有抗性,但是对包括豇豆重花叶病毒(*Cowpea severe mosaic virus*, CPSMV)在内的其他豇豆花叶病毒属病毒不具有抗性,并且在转基因植株原生质体中检测不到转基因编码的蛋白质。因此,他们提出 MP 介导的抗性可能是在 RNA 水平作用的结果。我国余晓红等(1996)报道用 TMV MP 全长基因构建了两个插入方向相反的植物表达中间载体,转化烟草,获得了生长良好的转基因植株 P26。而 Tacke 等(1996)得到的表达 N 末端或 C 末端延长的黄症病毒属的 PLRV 17kD MP 突变体的马铃薯,不仅全部能抗 PLRV,还抗马铃薯的另两类主要病毒 PVX 和 PVY。

1.2.1.4 卫星 RNA(Satellite RNA)

卫星 RNA 是一类很小的 RNA,本身不具有感染性,要依赖病毒才能复制,其核苷酸序列与辅助病毒及寄主植物之间没有同源性,可将其视为病毒的分子寄生虫。由于卫星 RNA 具有干扰

所寄生的病毒的复制并减轻症状的特性，故可用于防治病毒新方法的开发。

利用卫星 RNA 使 CMV 和 TRSV 症状减轻的转基因研究表明，辅助病毒 RNA 的复制和症状表现均受到了抑制。1987 年英国的 Harrison 等将 CMV 的卫星 RNA 的 cDNA 单体及双体插入 Ti 质粒，其中包含 CaMV 的 35S RNA 启动子及 nos 终止子序列，经土壤杆菌感染烟草叶片，转基因植株明显抗 CMV。同时，CMV 的卫星 RNA 也能抑制番茄不孕病毒（TAV）的症状表现，但并不引起病毒复制的减少。与此类似，TRSV 的卫星 RNA 也干扰甚至不是其辅助病毒的樱桃卷叶病毒（*Cherry leaf roll virus*, CLRV）的复制（Gerlach *et al*, 1987）。田波等（1996）也获得了 CMV 卫星 RNA 转化的抗病毒烟草。

卫星 RNA 具有削弱辅助病毒 CP 进入受侵染细胞叶绿体的能力，因此抑制复制也许不仅是卫星 RNA 保护的单一机制。然而卫星 RNA 工程植株的运用尚有一定问题，首先卫星 RNA 并不能彻底抑制辅助病毒复制，其次卫星 RNA 突变率高，存在经突变变成更为严重的卫星 RNA 的可能，它们在自然界中发生的局限性以及和辅助病毒间关系改变的可能性等不利因素，人们对卫星 RNA 转基因的应用前景并不乐观。

1.2.1.5 RNA 干扰介导的抗性

这一部分内容将在本章第 3 部分进行详细综述。

1.2.2 非病毒来源的基因介导的抗性

1.2.2.1 植物抗病基因

目前已经从多种植物中分离出了对病毒起抗性作用的抗病基因（resistance genes, *R gene*）（表 1-3），它们在病毒信号的刺激下表达，引发抗病反应。目前了解最为详细的一个植物抗病基因是来源于烟草的 *N* 基因（Whitham *et al*, 1994），它针对 TMV 表现出抗性。该基因产物的 N 末端有一个明显的信号接收结构域 TIR，而 C 末端有一个识别结构域 LRR。当 TMV 侵染植物体时，*N* 基因产物识别 TMV 的复制酶，从而引发过敏性反应。试验表明，转 *N* 基因的烟草能够表现出对 TMV 的较高抗性（Whitham *et al*, 1996）。

从马铃薯种分离出来的 *Rx* 基因也是这样的一个基因，它可能通过阻止病毒的复制而表现出对 PVX 的抗性（Bendahmane *et al*, 1999）。转有该基因的烟草（Bendahmane *et al*, 2000）和马铃薯（Bendahmane *et al*, 1999）均表现出对 PVX 的抗性。

2000 年，国外学者从拟南芥菜中分离出一个对芜菁皱缩病毒（*Turnip crinkle virus*, TCV）有抗性的 *RTM* 基因，该基因在植物体内有一对等位基因，*RTM1*，*RTM2*。它们通过影响病毒的长距离运输而起到抗病毒的作用，*RTM* 突变体表现出对 TCV 的完全敏感性（Chisholm *et al*, 2000；

Whitham *et al*, 2000)。除此之外，还有从番茄分离而来对番茄斑萎病毒（*Tomato spotted wilt virus*, TSWV）有抗性的 *Tsw* 基因（Jahn *et al*, 2000）；由马铃薯（*Solanum stoloniferum*）分离而来对 PVY 有抗性的 *Ry* 基因（Mestre *et al*, 2000）；由烟草分离而来对烟草脉斑驳病毒（*Tobacco vein mottling virus*, TVMV）有抗性的 *Va* 基因（Nicolas *et al*, 1997）等等，但这些基因都还没有应用于抗病毒转基因作物研究的报道。

表 1-3 已报道的植物抗病毒基因及相关病毒基因（Dasgupta *et al*, 2003）

Table 1-3 *R* genes against viruses and corresponding *avr* gene products (Dasgupta *et al*, 2003)

抗病基因	植物来源	病毒基因	病毒
<i>HRT</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Dijon	Coat protein	TCV
<i>I</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	n.d.	BCMV
<i>L2</i>	<i>Capsicum</i> sp	Coat protein	PMMV
<i>L3</i>	<i>Capsicum</i> sp.	Coat protein	PMMV
<i>N</i>	<i>N. tabacum</i> cultivar Samsun	Replicase	TMV
<i>RRT</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Dijon	Coat protein	TCV
<i>RTM</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Columbia-O	n.d.	TCV
<i>Rx</i> ,	<i>Nx</i> , <i>Nb</i> <i>Solanum tuberosum</i> cultivar Cara	Coat protein	PVX
<i>Ry</i>	<i>Solanum stoloniferum</i>	NIa protease	PVY
<i>Tm1</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Replicase	TMV
<i>Tm2</i>	<i>L. esculentum</i>	Movement protein	TMV
<i>Tm2(2)</i>	<i>L. esculentum</i>	Movement protein	TMV
<i>TuRB01</i>	<i>Brassica napus</i>	Cylindrical Inclusion protein	TuMV
<i>Va</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> cultivar Burley	Covalently-linked viral genomic protein	TVMV

n.d. not determined; PMMV, *Pepper mild mosaic virus*; BCMV, *Bean common mosaic virus*; TVMV, *Tobacco vein mottling virus*; TCV, *Turnip crinkle virus*; TuMV, *Turnip mosaic virus*

1.2.2.2 核糖体失活蛋白(Ribosome inactivating proteins, RIPs)

许多高等植物能合成核糖体失活蛋白(Ribosome inactivating proteins, RIPs)，这些蛋白能够专一性水解真核生物核糖体28S rRNA上某一特定腺嘌呤处的糖苷键，阻止EF2/GTP复合物与核糖体60S大亚基的结合，从而抑制蛋白质的合成。目前用于植物抗病毒基因工程的RIPs主要是美洲商陆抗病毒蛋白(Pokeweed antiviral protein, PAP)。PAP是从美洲商陆(*Phytolacca americana* L.)叶片中分离出的一种碱性蛋白，分子量约30 kDa。Lodge等(1993)通过对编码PAP的cDNA进行克隆、体外重组、构建表达载体后再转化烟草植株，攻毒试验表明，表达PAP的转基因植物能抵抗PVX、PVY、CMV的侵染。

1.2.2.3 核酶(Ribozyme)

核酶是来自 TRSV 卫星或某些类病毒 RNAs 的一类小 RNA 分子,它具有高度特异性催化切割 RNA 的能力。虽然这种切割通常是分子内的,但其催化域(发夹或锤头型结构)和翼侧反义目标可被用来设计成切割某个特定的目的 RNA(在一个 GUC 三联子前面或后面)。锤头结构的催化域也能切割 GUA 或 GUU 的 3'端序列。

Huillier 等(1992)研究表明,在植物原生质体中,新霉素磷酸转移酶活性能被一个瞬间表达的核酶完全抑制。另外,在原生质体水平上,表达对 TMV 基因序列有切割作用的核酶的烟草中已观察到 TMV 复制及症状的延迟。稳定转化的植株内核酶的表达水平非常低。李洁等(1995)报道了双价核酶对 TMV 的两个靶序列的专一切割作用。研究表明单价核酶催化效率很低,与靶分子比达到 1:1 以上才能完全切割底物 RNA。显然,这种效率难以用于抗 TMV。而双价核酶具有与相应的两个单价核酶相似的对靶 RNA 的作用效率并兼备了该两个单价核酶对靶 RNA 的高度专一性,所以多价核酶更有可能在植物抗病毒基因工程中的应用。王苏燕等(1997)设计了特异切割 CaMV 35S RNA 的锤头型核酶基因 *Rz*,构建植物表达载体后转化油菜,攻毒实验证明 *Rz* 当代转化植株表现出对 CaMV 的高度抗病性,75%的植株不表现任何症状,也测不到 CaMV 的存在,其抗病植株的 T1 后代的抗病性按孟德尔定律 3:1 分离。人们希望,用和性病毒株系(作为一个亚基因组的 RNA)诱导,使能对抗其他重症病毒的核酶得到大量扩增,从而使植物产生“交叉保护”。

1.2.2.4 抗体(Antibodies)

Hiatt 等(1989)报道了个别的转基因烟草植株能表达鼠抗体蛋白的重链或轻链。这些植株通过交互授粉产生种子,栽培后能表达抗体的两条链。最另人惊讶的是,这两条链经恰当的组合后从植物细胞输出进入了细胞间隙。这一发现引起了人们相当大的兴趣,现在许多的研究机构正在从事这方面的研究,试图将经一些植物病毒免疫的动物体内产生的抗体基因转化植物,并在植物体内表达。从技术上考虑,这个策略的关键是植物细胞内表达的抗体能有效地作用于病毒的侵入。目前研究重点放在抗体基因的构建上,希望抗体能以单链蛋白形式存在而不是如动物免疫系统那样以四条交互连接的形式存在。以前认为抗植物病毒外壳蛋白的抗体不太可能对转基因植物产生保护作用,例如阻止病毒的脱壳(类似于 CP 介导的保护作用)。这很容易理解,因为抗体基因在植物的表达水平通常极低,并且抗体与病毒相互作用必须在侵染点位置和侵染当时立即发生才会有效。然而,最近的研究表明,表达单链抗体的烟草表现出了对病毒侵染的保护作用。刘德虎等(1995, 1996)先后报道了分泌 PVY 小鼠中和抗体杂交瘤细胞系的筛选及其抗体轻链基因的克隆和序列分析的研究工作,1996 年又报道构建了全长 PVY 小鼠中和抗体重链基因的植物表达载体,并已获得了转抗体基因的工程植株。

1.2.2.5 dsRNA 分解酶介导的抗性

pac1 基因是粟酒酵母中存在的一个多拷贝阻遏子,对酵母的生长起着重要的调节作用(Iino *et al.*, 1991)。该基因编码一个 364 氨基酸的蛋白质,序列分析表明,编码产物的羧基端与大肠杆菌核

糖核酸酶III有同源性 (Watanabe *et al*, 1995), 体外的酶活测定表明, 它具有降解番茄花叶病毒 (Tomato mosaic virus, ToMV)、CMV、水稻矮缩病毒 (Rice dwarf virus, RDV) 双链RNA和马铃薯纺锤块茎类病毒 (Potato spindle tuber viroid, PSTVd) 的功能。由于大多数植物病毒为RNA病毒, 不管其基因组是单链还是双链, 在寄主体内复制过程都会有一个双链RNA中间体阶段, 如果通过基因工程手段将*pac1* 基因转入植物体, 利用其降解病毒dsRNA的活性而阻断病毒复制过程, 就有可能达到抗植物病毒病的目的。并且*pac1* 的作用靶位点只针对RNA双链, 对RNA的序列无特殊要求, 这就扩大了其对病毒抗性的广谱性。Watanabe等 (1995) 将*pac1* 基因导入烟草, 获得了抗ToMV、CMV、PYV的转基因烟草; Sano等 (1997) 将*pac1* 基因导入马铃薯, 获得了抗PSTVd的转基因马铃薯。同时, 实验表明这些转基因植株生长状态良好, 没有异常表型出现, 说明*pac1* 基因不会对植物体造成伤害, 可以作为病毒抗性基因在植物抗病毒基因工程中加以应用。

1.3 RNA 干扰与植物抗病毒

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是真核生物体内由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 介导的降解同源 RNA 的现象。在细胞中, 长的 dsRNA 被类似 RNA 酶 III 的 Dicer 酶切割成 21~26 核苷酸 (nucleotide, nt) 的干扰性小 RNA (small interfering RNA 或 short interfering RNA, siRNA)。随后, siRNA 与蛋白复合物结合后形成 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC), 并解链。而有活性的 RISC 在其中的 siRNA 反应链指导下同与其互补的转录物结合, 导致 RNA 的降解 (Fire *et al*, 1998; Meister *et al*, 2004)。这是一种转录后水平的基因沉默 (post-transcriptional gene silence, PTGS), 也称 RNA 沉默 (RNA silencing)。目前, RNA 干扰已经成为一项新的反向遗传学技术而广泛应用于基因功能鉴定、疾病治疗和植物抗病毒等研究领域, 极大地促进了所应用领域的发展。

1.3.1 RNAi 过程

1.3.1.1 RNAi 的起始

RNAi 的首要步骤是在 Dicer 酶的催化下将 dsRNA 切割成 siRNA。Dicer 的分子结构中常含有具催化活性的 RNaseIII 结构域和双链 RNA 结合结构域 (dsRNA-binding domain, dsRBD)。研究表明, 在真核细胞中存在多个功能不同的 Dicer 或 Dicer 类似蛋白 (Dicer-like protein, DCL) (Bernstein *et al*, 2001; Schauer *et al*, 2002), 它们在与 RNAi 相关的不同途径或环节中分别或共同起作用。果蝇中的 Dicer-1 (DCR-1) 负责催化 miRNA 前体的产生, Dicer-2 (DCR-2) 负责催化 dsRNA 切割成 siRNA (Lee *et al*, 2004; Kadotani *et al*, 2004)。拟南芥中的 DCL1 与 DCL3 分别与 miRNA 生物活性, 催化产生重复序列和转座子 siRNA 及染色体沉默有关 (Xie *et al*, 2004); 而另外两种 DCL (DCL2、DCL4) 的功能未知。在同一个体中, 相似的 DCL 是通过何种方式起到不同作用的呢? Hamilton 等研究发现, 在拟南芥中存在着 2 种不同长度、不同功能的 siRNA, 长的 (24~26nt) siRNA 与拟南芥染色质的甲基化有关; 而短的 (21~22nt) siRNA 与 mRNA 特异性降解有关 (Hamilton *et al*, 2002)。这正好与不同 Dicer 酶的功能不同相一致, 因此, Dicer 有可能以催化

产生不同长度 siRNA 的方式实现参与完成不同作用的目的,但这还需要更详细的研究 Dicer 的催化反应过程才能证实(燕飞等, 2005a; 宋雪梅等, 2006)。

虽然 Dicer 酶具有独立的催化活性,但在催化由 dsRNA 降解为 siRNA 时还需要其他蛋白的辅助才能共同完成催化反应。在线虫中,DCR-1 是通过识别 dsRNA 结合蛋白 RDE-4 的 dsRNA 而完成特异性切割作用的(Tabara *et al*, 2002),而果蝇中的 DCR-2 是和 R2D2 蛋白一同起到活性作用的(Liu *et al*, 2003; Lingel *et al*, 2003; Pellino *et al*, 2003)。

1.3.1.2 RISC 的装配

1.3.1.2.1 RISC 中的生物大分子

1.3.1.2.1.1 Dicer 酶 Dicer 酶催化了 RNAi 过程中由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 切割成 siRNA 的反应,随后与 siRNA 及其他蛋白一同参与 RISC 装配的起始。

1.3.1.2.1.2 Argonaute 蛋白家族 Argonaute 蛋白是 RISC 的核心组分,在不同物种中存在多种 Argonaute 家族蛋白,如线虫中的 RDE-1 (Xie *et al*, 2004),果蝇中的 AGO-1、AGO-2、Aubergine (Williams *et al*, 2002),锥虫中的 TbAGO1 和 TbPWI1 (Durand-Dubief *et al*, 2003),小鼠 PC12 细胞中的 GERp95 (Thonberg *et al*, 2004),人体细胞中的 PIWI 亚族(4个)和 eIF2C/AGO 亚族(4个)(Doi *et al*, 2003; Hutvagner *et al*, 2002; Sasaki *et al*, 2003)等。

Argonaute 家族蛋白具有 PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) 和 PIWI 两个主要结构域。PAZ 结构域高度保守,主要结构是一个由 6 条链构成的左手 β 桶 (β_{1-3} , β_{6-8}),在桶的一端连有 2 个 α -螺旋 (α_1 , α_2),另一端连一个 $\alpha\beta$ 组件 (β_4 - β_5 - α_3) (Yan *et al*, 2003; Lingel *et al*, 2003),在 β 桶与 $\alpha\beta$ 组件之间形成一个口袋状的结构,恰好可以插入 siRNA 3' 末端突出的两个碱基 (Ma *et al*, 2004),因此,PAZ 是 RISC 中 siRNA 的结合位点。Argonaute 蛋白除了起结合 siRNA 的作用外,另外一个重要的功能是催化 RISC 对靶 RNA 的特异性切割。研究表明,这个切割作用是由 PIWI 结构域完成的。PIWI 结构域与 RNaseH 具有相似的结构特征 (Liu *et al*, 2004; Parker *et al*, 2004)——都含有一个由螺旋包围着的 5 个片层结构,只是 PIWI 在最后一个片层和最后一个螺旋之间还有 Argonaute 蛋白的其他序列 (Song *et al*, 2004);实验也证实 RNaseH 与 Argonaute 蛋白在功能上有相似性:RNaseH 的作用是催化切割 RNA/DNA 杂交链中 RNA 单链,Argonaute 蛋白切割 siRNA 与 RNA 形成的 dsRNA 中的 RNA 单链;并且,RNaseH 的切割产物同 RISC 的切割产物相同,都具有 3' -OH 和 5' 磷酸结构 (Martinez *et al*, 2004);此外,它们的活性都依赖于 Mg^{2+} 的存在 (Schwarz *et al*, 2004)。所有这些证据表明,Argonaute 蛋白是 RISC 中的催化切割活性蛋白,并且这种活性由其中的 PIWI 结构域提供。除了提供催化切割活性外,PIWI 结构域中还存在一个可以直接与 Dicer 结合的区域 (Tahbaz *et al*, 2004),Argonaute 蛋白可能就是以此为结构基础通过与 Dicer 互作而进入 RISC 装配过程的。然而最近 Parker 等 (2005) 分析来源于真菌 (*Archaeoglobus fulgidus*) 的 PIWI 晶体结构时发现,它也能够与一个类似 siRNA 的双螺旋结合,并且可能在与靶 mRNA 识别和 Argonaute 蛋白在 siRNA 引导下完成切割

过程中起作用。如果是这样,那都能结合siRNA的PAZ和PIWI两个结构域是如何分工、以协同而非拮抗的作用共同完成作用的呢?这的确是一个值得深入研究的问题。

除 PAZ 和 PIWI 这两个主要的结构域之外,在锥虫的 TbAGO1 结构中还发现其 N 末端存在一个富含 RGG 重复的结构域,该结构域的缺失严重影响到 mRNA 的切割 (Shi *et al*, 2004)。这个富含 RGG 的结构域可能也是保证 Argonaute 蛋白完成催化切割作用所必需的结构之一。

1.3.1.2.1.3 siRNA RISC 中的 siRNA 是 RNAi 过程中指导完成特异性切割作用的“向导”。这种“向导”作用是基于碱基互补配对原则完成的,因此每一个 RISC 中只能包含 siRNA 中的一条链,以便于同靶 RNA 的互补结合,完成指导降解的作用 (Martinez *et al*, 2002)。虽然 siRNA 中的每一条链都有可能装配到 RISC 中 (Elbashir *et al*, 2001a; Elbashir *et al*, 2001b; Nykanen *et al*, 2001),但实验表明,RISC 只对其中的一条链表现出更强的亲和性 (Schwarz *et al*, 2003; Khvorova *et al*, 2003)。siRNA 5' 端的碱基配对与否 (Amarzguioui *et al*, 2004), 配对碱基之间的结合力大小 (Chiu *et al*, 2003) 影响 siRNA 中的哪一条链能够进入 RISC 的装配过程。在果蝇中, R2D2 对 siRNA 链的选择过程中起到决定性作用 (Tomari *et al*, 2004)。然而,也有研究发现,在一个只有单链 siRNA 而不发生 RNAi 的系统中加入 siRNA 的互补链,则能够引发干扰作用 (Xu *et al*, 2004),这说明 siRNA 的双链结构也是 RISC 装配过程中必不可少的。这两方面的结果说明, siRNA 两条链的不平衡性只能发生在 siRNA 双链结构完成对 RISC 装配的影响之后,才不会导致 RISC 装配的终止。可是,如果在体内确实存在这种偏向性的话, RISC 只能偏向于同靶 RNA 互补的那一条链才不会因为无法与靶序列互补结合而导致机体能量上的浪费。但是在尚不知靶 RNA 序列的 RNAi 起始阶段, RISC 是如何特异地选择 siRNA 链的呢? 人们目前对此还一无所知。但是从以上这些实验结果来看,对 siRNA 结构进行多种形式的改造和修饰 (Layzer *et al*, 2004) 不影响 RNAi 作用,说明 RISC 对 siRNA 的结构变化具有较大的兼容性,因此,从分析机体内 siRNA 的结构入手,有可能获得 RISC 所偏爱的 siRNA 链的一些共有特征,从而揭示 RISC 特异识别、选择某一条 siRNA 链的作用机制。

1.3.1.2.1.4 其他大分子 除了以上几种生物大分子外, RISC 中还存在其他一些功能不确定的组分,如果蝇 RISC 中的 VIG (Vasa intronic gene product), dFXR (fragile-X-related protein) 和 tudor-SN (tudor staphylococcal-nuclease-domain -containing protein) (Meister *et al*, 2004)。其中在人体内已经找到了 dFXR 同源物 FMRP (fragile X mental retardation protein) (Jin *et al*, 2004),但功能未知; VIG 是一种富含 RGG 的蛋白质,这与锥虫中 TbAGO1 的 N 末端很相似,它是否也同 TbAGO1 的功能一样参与 Argonaute 蛋白的切割呢? 最近 Scadden 等发现 Tudor-SN 可能同 RNA 腺苷酸脱氨酶 (adenosine deaminase that act on RNA, ADARs) 对 dsRNA 的修饰过程共同起作用,协助 RISC 完成切割: 首先, dsRNA 在 ADARs 作用下将 50% 的腺苷酸 (A) 变成次黄苷酸 (I),而后, Tudor-SN 能够特异地和高度富含 IU, UI 对的 dsRNA 结合,从而协助 RISC 完成切割作用,但这还需要进一步的研究验证。

除此之外,还有在线虫中发现的 MUT7 (Bastiaan *et al*, 2005) 和 RDE-3 (Chen *et al*, 2005),

试验表明前者可能参与了复合体构成并可能在产生 siRNA 之后、切割靶 RNA 之前起作用；而后者可能对于 siRNA 的积累及干扰效应产生有关。总之，目前对上述这些蛋白质的具体功能还不是十分清楚，尚需要深入研究。

1.3.1.2.2 RISC 的装配

1.3.1.2.2.1 装配的起始 在果蝇中，RISC 的装配起始于 dsRNA 被 DCR-2 切割成 siRNA 之后（图 1-3-①）。在这个切割过程中，DCR-2 是与 R2D2 结合共同起作用的。由于 DCR-2 中不存在 dsRBD，因此切割过程中直接与 siRNA 作用的可能是 R2D2。切割作用的完成意味着 RISC 装配的开始，RISC 装配的起始物即是切割完成后形成的 DCR-2/R2D2/siRNA 复合物（Pham *et al*, 2004; Lee *et al*, 2004），然后其他组分有序地结合其上，就开始了 RISC 的装配过程。然而，起始复合物究竟是由 DCR-2/R2D2 完成切割后直接与其切割产物 siRNA 结合形成的，还是由细胞内其它未行使切割功能的 DCR-2 和 R2D2 与 siRNA 结合形成的（图 1-3-①），目前对此还不清楚，也有可能这两种方式同时存在，因为这样就可以在保证装配效率的同时也不影响切割效率，从而使机体内的 RNAi 效应得以高效完成。

1.3.1.2.2.2 RISC 组分的有序组装 RISC 装配起始物形成后，RISC 中的其他组分陆续地参与进来进行 RISC 的组装过程。这些组分包括 Dicer、Argonaute 蛋白、以及其他未知功能的蛋白。

Lee 等在果蝇的 Dicer 研究中发现，在成熟的 RISC 中存在两种 Dicer，它们在装配过程中分别起到不同的作用：DCR-2 起稳定起始复合物 DCR-2/R2D2/siRNA 结构的作用，而 DCR-1 则保证了 RISC 中间体能够完成正常的功能，这些功能包括与 Argonaute 蛋白及其他蛋白因子的结合、解旋酶对复合体的识别及 siRNA 的解链等（Lee *et al*, 2004）。因为在 RNAi 的起始阶段并没有 DCR-1 的作用，而 DCR-1 在装配过程中又有助于其他组分的结合，所以 DCR-1 应该是在 RISC 装配起始物形成之后，又先于其他组分而组装到起始复合物中来（图 1-3-②），从而保证了 RISC 中间体能够进一步结合 Argonaute 等组分以完成装配过程。

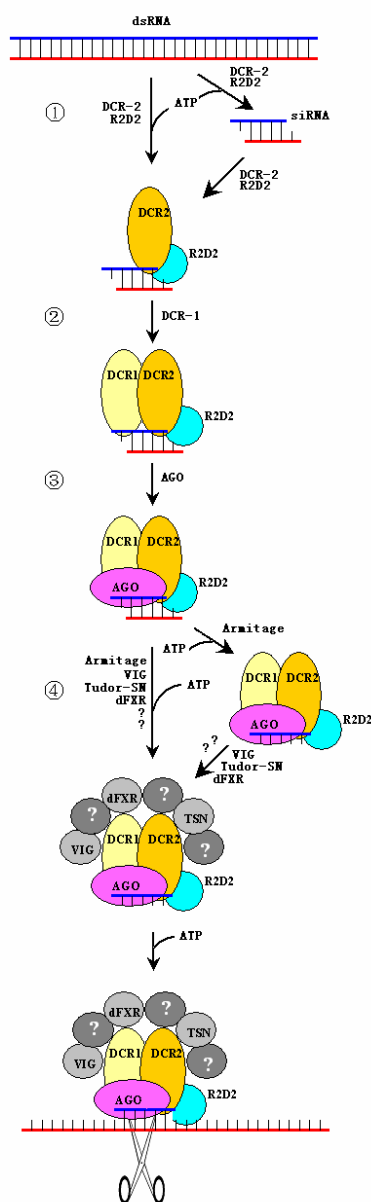


图 1-3 RISC 的装配过程 (宋雪梅等, 2006)

Figure 1-3 A model of RISC assembly

在 Argonaute 蛋白结构中曾介绍,它具有可以同 siRNA 结合的 PAZ 结构域和可以同 Dicer 结合的 PIWI 结构域,而研究也发现,Dicer 中的 dsRBD 与 PAZ 结构域很相似,也能够靶定双链 siRNA 的 3' 突出末端,所以可以推测,Argonaute 蛋白是通过 PIWI 与 Dicer 互作进入 RISC 的组装过程,同时,Dicer 将其通过 dsRBD 携带的 siRNA 的另一末端交给 Argonaute 蛋白中的 PAZ 结构域(Song *et al*, 2004; Martinez *et al*, 2004),以便于 siRNA 指导 RISC 由 Argonaute 蛋白完成特异性切割作用。也就是说,在 RISC 的装配过程中可能存在一个 siRNA 的传递过程。理论上,大分子在较小的范围内传递转移应该需要一定的空间才能保证分子能够完成空间结构的变化,所以 Argonaute 蛋白很可能先于其他组分进入 DCR-1/DCR-2/R2D2/siRNA 中间体(图 1-3-③),以保证复合物有足够的空间来完成 siRNA 的传递。需要指出的是,在果蝇的 DCR-2 中并不存在 dsRBD,推测可能是

装配中间体内的 DCR-1 或 (和) R2D2 参与了 siRNA 的传递。

RISC 装配的最终完成还需要其他组分的参与,但是目前对这些组分的结构、功能,是在 siRNA 解链之前还是接链之后 ((图 1-3-④)) 进入 RISC 等问题了解的还很少。希望随着 RNAi 机制研究的深入,这些问题会引起人们更多的关注。

1.3.1.2.2.3 siRNA 的解链 RISC 中间体中 siRNA 的解链是 RNAi 作用的关键环节,这是在解旋酶的催化下完成的,并需要 ATP 供给能量 (图 1-3-④) (Tomari *et al*, 2004; Cook *et al*, 2004)。目前在多种生物体中发现了不同的解旋酶参与了 RNAi 作用,如线虫中的 DRH-1/2、MUT-14、SMG-2,拟南芥中的 SDE3,果蝇中的 Armitage 等 (Meister *et al*, 2004)。其中果蝇中的 Armitage 与 SDE3 同源, *armi* 突变体导致成熟 RISC 缺失,但不影响 RNAi 早期过程 (Tomari *et al*, 2004; Cook *et al*, 2004), 所以解旋作用应该是 RISC 装配进行时发生的事件。根据 Ma 等 (2004) 的研究, PAZ 结构域对双链 siRNA 的结合能力要远远强于对单链 siRNA 的结合能力,说明在 Argonaute 蛋白进入 RISC 装配中间体、完成 siRNA 的传递作用之前, siRNA 应该一直处于双链状态,也就是说 Armitage 是在 Argonaute 蛋白进入 RISC 中间体后又起到解旋作用的。可它是在 Argonaute 蛋白进入 RISC 之后哪个环节起作用呢? 最近 Pham 等 (2004) 对其获得三种处于不同装配阶段的 RISC 复合物 (中间体) 研究发现, 只有最后成熟的“完整”复合体中的 siRNA 是以单链形式存在的, 另两种中间体中的 siRNA 都以双链形式存在, 说明解旋作用很有可能是在 RISC 装配完成的最后阶段才发生的。但是, 目前对于 Armitage 是否参与了 RISC 的构成还不清楚。

1.3.1.2.3 RISC 在单链 siRNA 指导下切割互补转录物

解旋后呈单链形式的 siRNA 同多种蛋白质共同装配成具有活性功能的成熟 RISC, 然后在其引导下与靶 RNA 结合, 并在 RISC 中的 Argonaute 蛋白的作用下将之切割, 从而完成 RNAi 过程。

尽管目前对于 RNAi 过程有了一个较为清晰的了解, 但对于 RNAi 过程完成, 被切割后的 RNA 是如何降解的问题还不清楚, 直到最近 Tamas 等 (2005) 研究了果蝇细胞内 RISC 切割产物的降解过程时发现, 靶 mRNA 经 RISC 切割后的 5' 片断在一个复合体的作用下从 3' 端开始迅速降解; 而 3' 片断则从 5' 末端开始经 XRN1 降解。复合体介导的 5' 片断切割过程需要酵母 Ski2p, Ski3p, Ski8p 的同源物, 表明它们的作用是调节复合体的降解活性。同时, siRNA 的靶 mRNA 是在 RISC 的切割点末端开始降解的, 并没有一个去帽儿和去腺苷酸的过程。相对于目前将研究目光集中于 RNAi 的中间细节来说, 对 RNAi 的下游过程的研究也有可能是在拓宽视野的同时起到他山之石可以攻玉的目的, 对 RNAi 中间过程的研究反过来起到推动作用。

1.3.1.3 RNAi 作用特点

1.3.1.3.1 RNAi 作用的特异性

RNAi 在进化上是高度保守的,是真核生物体内天然的抗外源基因侵入的防御系统。RNAi 的最主要的特点在于其作用的高度特异性,这一特点是由 siRNA 与目的 RNA 特异性互补所保证的。Semizarov 等(2003)针对同一个基因的三个不同靶作用区设计了不同的 siRNA 序列对靶基因进行沉默诱导,利用 DNA 芯片(DNA microarrays)对 RNAi 过程中的基因表达特征进行分析以检测 siRNA 的特异性。结果表明,针对同一作用区的不同 siRNA 对目的基因施加影响后,目的基因表现出几乎相同的表达特征,可是针对不同作用区的 siRNA 对目的基因表达的影响各不相同。而 Chi 等(2003)和 Jackson 等(2003)通过对特异 siRNA 干扰后基因组的表达变化进行分析,同样证明了 RNAi 的高度特异性。其实,也正是因为 RNAi 具有高度特异性的特点而成为鉴定基因功能(Uhlirova *et al*, 2003; Van *et al*, 2003),基因组分析(Ashrafi *et al*, 2003; Pothof *et al*, 2003; Kamath *et al*, 2003),植物抗病毒研究(Kubota *et al*, 2003; Vanitharani *et al*, 2003),人类多种疾病治疗(McCaffrey *et al*, 2003; Lee *et al*, 2003; Kao *et al*, 2004)研究等的有力工具。

1.3.1.3.2 与染色质修饰相关

越来越多的实验证明, RNAi 过程与染色质修饰相关,包括染色质的甲基化和异染色质化。尽管还不明确是 RNAi 过程中有染色质修饰的参与,还是染色质修饰可由 RNAi 过程来完成,但众多的实验表明,两者在形成过程上、功能上有交叉。Schramke 等(2003)的在裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)上的研究表明,发夹 RNA 的表达与靶基因区域染色体修饰和染色质凝集及异染色质蛋白的募集有关。并且有 2 种蛋白,Clr4 组蛋白甲基转移酶和与异染色质蛋白 HP1 (heterochromatin protein 1) 同源的 Swi6 在该过程中起重要作用。前者的作用是将靶染色质附近区域组蛋白 H3 中的赖氨酸 9 甲基化,从而导致染色质聚集,形成沉默异染色质,同时它可能还同 Dicer 酶一起参与了切割 dsRNA 形成 siRNA 的过程;而后者的功能可能与异染色质化由同源区域向周围扩散有关。Manika 等(2003)利用果蝇的 *piwi*, *aubergine*, *spindle-E* (*homeless*, *hls*) 基因突变体进行 RNAi 研究,结果这 3 种突变体均表现出染色体组蛋白 H3 的赖氨酸 9 甲基化程度的降低,和 HP1 与 HP2 (heterochromatin protein 2) 的脱离的现象,尤其是在 *spindle-E* 突变体中,降低和脱离程度更加明显。由于在 RNAi 过程中起重要作用的 *piwi*、*aubergine* 基因参与该过程,因此推测 RNAi 可能在果蝇特定位点的异染色质化过程中起作用。同时, *spindle-E* 基因产物在异染色质形成过程中作用可能要更强于 *piwi*、*aubergine* 所编码的蛋白质 (Pal-Bhadra *et al*, 2003)。可是,除了有相关蛋白参与外, RNAi 是如何直接同染色体在特异部位的异染色质化联系到一起呢? Verdel 等(2004)从裂殖酵母中分离纯化得到一种 RNAi 效应复合物 RITS (RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing, RITS),它由 Ago1, Chp1 (一种与异染色质化有关的染色质结合蛋白) 和一种全新的蛋白 Tas3 构成,另外还包括由 Dicer 酶催化产生的小 RNA,这些 RNA 同着丝粒重复序列同源。这就找到了 RNAi 和异染色质化的桥梁,实验也证明 siRNA 对于 RITS 在异染色质化区域定位是必需的。同时, Volpe 等(2003)和 Hall 等(2003)的实验表明,涉及异染色质装配过程的着丝粒,端粒,有丝分裂和减数分裂时染色体配对分离等,要行使其正常的功能或完成其正常活动,都有赖于 RNAi 途径 (Volpe *et al*, 2003; Hall *et al*, 2003)。

1.3.1.3.3 沉默作用沿靶序列的移动

在线虫和植物细胞中都可以检测到 dsRNA 诱导的沉默现象可以沿着与其同源的 DNA 序列向该目的基因的非同源区域扩散的现象 (Sijen *et al*, 2001; Klahre *et al*, 2002)。该过程的完成可能涉及以下几方面的内容。首先, dsRNA 产生的 siRNA 在依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)作用下可以在 mRNA 上合成包括起始 dsRNA 序列之外的上游或下游的新的 dsRNA, 然后在 Dicer 酶的作用下产生次生 siRNA, 导致沉默信号沿靶序列移动 (Sijen *et al*, 2001; Roignant *et al*, 2003)。在缺乏 RdRP 的果蝇和哺乳动物细胞中检测不到此现象 (Chi *et al*, 2003), 从某种程度上说明了该种可能的存在性的。其次, 这种移动也可能是由于 dsRNA 或 siRNA 与同源的 DNA 序列发生作用, 诱发染色体结构的变化, 从而使目的基因表达出不正常的几乎也是全长的 RNA 转录物, 由于不能正常转录而导致了基因的沉默 (Vaistij *et al*, 2002)。已知的染色体结构变化有靶 DNA 序列的甲基化及异染色质化现象 (Volpe *et al*, 2002; Martienssen *et al*, 2003), 它们都能影响到基因的转录。当然, 也有可能 siRNA 导致目的基因的甲基化后, 甲基化向周围的扩散导致转录的障碍, 从而发生基因沉默 (Van Houdt *et al*, 2003)。第三, 当另外一个与起始 dsRNA 无同源序列, 但与 RNAi 作用的目的基因有一段相同序列的基因存在时, dsRNA 可能也导致该基因的沉默 (Alder *et al*, 2003)。虽然这 3 种情况都有实验证明其可能性, 但这 3 个过程是各自独立的, 还是相互有影响, 甚至某些蛋白成分是同源的等问题都还是需要进一步分析、研究的。

1.3.1.3.4 沉默信号系统性扩散

dsRNA 被释放到胞外空间后, 可以引发系统性的 RNA 沉默, 这种现象在多种生物体中发现, 包括线虫 (Fire *et al*, 1998), 涡虫 (*planarian*) (Sanchez *et al*, 1999) 及植物 (Palauqui *et al*, 1997)。证据是观察到远离最初 dsRNA 释放位点的细胞发生了 RNA 沉默。在机体内, 沉默信号的转移可能通过 2 种方式, 一种是通过循环系统将在其中的 dsRNA 或 siRNA 转移到机体其他组织部位, 如在线虫中, dsRNA 可以从体液 (用注射方法)、消化道 (浸泡或饲喂的方法) 进入细胞, 引发系统性的 RNAi; 在植物体中, 在某一部位进行的通过农杆菌介导的瞬时转化, 农杆菌可能通过维管系统进入其他组织, 转化其细胞使其表达产生 dsRNA 导致系统效应。另外一种方式可能涉及 dsRNA 或其他 RNAi 信号的细胞间运动, 即 dsRNA 还可能从已经感染了的细胞进入邻近的未感染细胞, 最终对动物体造成系统的影响。Winston 等研究线虫 *sid-1* (表达一种具有跨膜结构域的蛋白) 突变体内系统性 RNAi 时发现, 该突变体不具有对喂食的 dsRNA 和细胞内表达的 dsRNA 产生系统性效应的能力 (Winston *et al*, 2002)。因而可以推测, 系统性沉默的发生可能依赖于跨膜蛋白对沉默信号的运输。但是, 系统性沉默方面众多的疑团, 例如果蝇和人体细胞中不发生系统沉默^[43]、某些情况下 (不同的启动子驱动) (Timmons *et al*, 2003) 在线虫体内也不发生系统性沉默等, 表明沉默信号的系统性扩散可能涉及多方面的因素综合调控 (Tijsterman *et al*, 2004)。毕竟对于一个生命体来讲, 这涉及一个对外来刺激 (核酸入侵) 是否值得耗费能量去整体面对的问题。尤其是对上述的细胞间信号传递方式, 如果机体可以在一个细胞内将威胁 (外来核酸) 清除, 就没有必要浪费整体的物质和能量再去防卫。所以机体可能会有一个精细的感应调控机制来完成这个权衡过程, 做出正确的、有利于自身整体发展的判断, 是将问题系统化还是限于局部。所以, 沉默信号的扩散, 系统性沉默的产生可能不是一个简单调控下的产物, 对其机理还需要进一步的

努力研究。

1.3.2 病毒编码的 RNA 沉默抑制蛋白

植物 RNA 病毒在植物体内都有一个在 RdRP 参与下形成 dsRNA 结构的过程,这就为植物体内的 RNAi 提供了一个诱导起始物,导致植物体对病毒的自然抵抗能力,因此说植物体内的 RNAi 是天然的抗病毒机制。然而植物体的这种病毒防卫系统,并不能完全阻止病毒的侵染,病毒有时还是能够成功感染植物并在其体内增殖扩散,这就涉及到病毒编码的沉默抑制蛋白的作用。这种蛋白通过阻断寄主 RNAi 中的某一个环节达到抑制沉默、保护病毒 RNA 顺利复制的目的。目前人们已经从多种病毒中分离到这类蛋白,如 p19 蛋白、HC-Pro、NS 蛋白、C2 蛋白、2b 蛋白等(燕飞等, 2004a; 2005b; Wang *et al*, 2005), 其中对 p19 蛋白的结构及功能机制研究得最为深入。

1.3.2.1 p19 蛋白

番茄丛矮病毒(*Tomato bushy stunt virus*, TBSV)编码的 p19 蛋白是目前研究最多的一类。TBSV 是一种正单链 RNA 病毒,能够侵染 20 多个科 120 多种植物。它所编码的一种 19kD 蛋白质(p19)是一个多功能蛋白,不但决定了病害的发生程度,同时还与 TBSV 的细胞间运动、长距离扩散及系统感染时病症产生有关。最近发现, p19 还是一种 RNA 沉默抑制蛋白,可以与 RNAi 过程中的 siRNA 结合,通过阻止成熟 RISC 的产生而完成抑制沉默作用。虽然人们对于沉默抑制蛋白的研究也仅仅是刚刚开始,但最近在 p19 晶体结构及作用特点方面取得的进展为深入揭示沉默抑制蛋白作用机制打下了良好的基础。

1.3.2.1.1 p19 的晶体结构

研究表明, p19 由 4 个 β 片层和 5 个 α 螺旋构成(图 1-5)(Ye *et al*, 2003; Vargason *et al*, 2003; Baulcombe *et al*, 2004)。在体内, p19 通过两个分子内 $\alpha 5$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 之间的结合以二聚体形式存在(Ye *et al*, 2003; Vargason *et al*, 2003; Park *et al*, 2004)。二聚体内连续 8 个 β 片层形成凹面,正好可以通过与 siRNA 骨架中的磷酸基团和核糖 2'-OH 的连接作用将 siRNA 包裹起来。由于这个凹槽两端各伸出 1 个 α 螺旋($\alpha 2$),使得二聚体容纳 siRNA 的长度受到限制。实验表明, p19 与 21nt~22nt 的 siRNA 的结合力最强,而对于更短(19nt)或更长(25nt)的 siRNA 结合力急剧下降(Ye *et al*, 2003),说明 p19 适宜结合的 siRNA 长度是 21nt~22nt。P19 这种结构限制结合 siRNA 长度的特点对于保证病毒完成增殖周期有重要意义,因为在植物体内存在两种类型的 siRNA, 24nt~26nt 的 siRNA 与染色质甲基化有关;而 21nt~22nt 的 siRNA 与 RNA 的特异性降解有关(Hamilton *et al*, 2002)。p19 通过与 21nt~22nt 的 siRNA 结合,抑制由它参与的 RNAi 过程就已经清除了病毒复制的障碍,如果同时也中止与异染色质化有关长 siRNA 的作用,就有可能影响到寄主细胞正常的生长状态,这无疑对病毒的复制、扩散不利。所以, p19 的结构特点是符合病毒进化的产物。

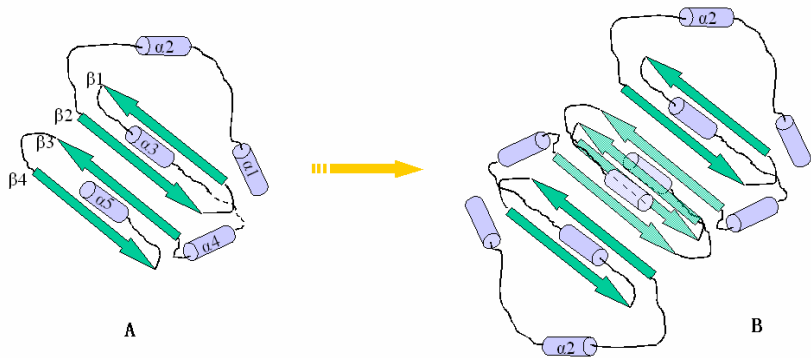


图 1-5 p19 及其二聚体结构示意图 (A: p19 结构; B: p19 二聚体结构) (燕飞等, 2005b)
Figure 1-5 Structures of p19 and its dimer (A: p19; B: dimmer.)

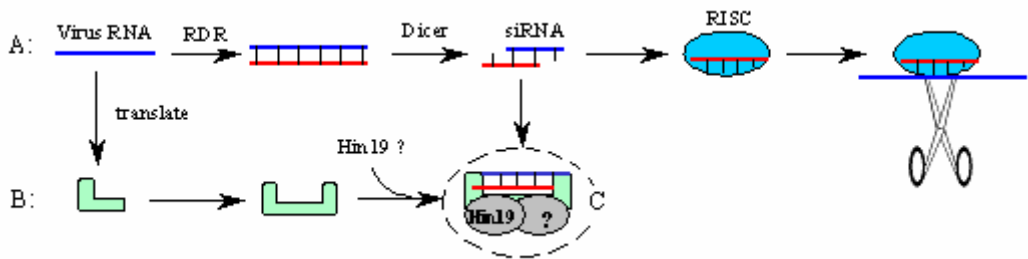


图 1-4 p19 作用机制 (A: RNAi 降解病毒 RNA 途径; B: p19 抑制沉默途径; C: p19 作用方式) (燕飞等, 2005b)
Figure 1-4 Mechanism of p19 suppressing silence (A: Anti-virus pathway mediated by RNAi in plants;
B: Pathway of p19 suppressing silence C: Complex for p19 to function.)

1. 3. 2. 1. 2 p19 作用特点

1. 3. 2. 1. 2. 1 作用方式与作用部位 虽然 p19 具有与 siRNA 独立结合的能力 (Silhavy *et al*, 2002; Ye *et al*, 2003; Mette *et al*, 2001), 但它在植物体内完成抑制作用可能还需要某些寄主蛋白的参与。最近, Park 等利用酵母双杂交系统就发现这样一种蛋白 Hin19, 它具有双链 RNA 识别元件(RRM) (Park *et al*, 2004), 能够在体内和体外与 p19 特异性结合。目前还不清楚 Hin19 的具体功能及对植物体本身具有何种意义, 但 Hin19 的发现至少说明, p19 可能与其他蛋白结合, 以复合体的形式起到沉默抑制作用 (图 1-4, C)。对于该复合体中是否还存在其他寄主来源的蛋白也还有待于深入研究。

病毒的复制过程依赖于寄主细胞内的能量及物质体系, 该过程中病毒的双链 RNA 复制中间体是 RNAi 攻击的目标, p19 只有在这个阶段阻止 RNAi 的作用, 才能够保证病毒复制过程不受 PTGS 的影响。因此, p19 应该是一种在病毒 RNA 复制之前就已经在细胞质内表达了早期蛋白。然而 Papp 等 (2003) 在拟南芥细胞内的 RNAi 研究中发现, 细胞核内的 p19 可导致游离 21nt~22nt siRNA 的急剧减少, 而细胞质中的 p19 却不能降低 21nt siRNA 的数量, 说明 p19 在寄主细胞内的作用位置是细胞核。可是由此却产生很多疑问: ① 既然 p19 本身就具有同 siRNA 结合的能力,

那为何在细胞质内却不能同 siRNA 结合？细胞质内存在影响 p19 结合 siRNA 能力的因子？② 作为在细胞质内表达的早期蛋白，p19 是如何进入细胞核行使功能的？③ 通常认为植物正单链 RNA 病毒在细胞质内完成复制，那么针对病毒的 RNAi 过程也应该发生在细胞质才能达到 RNA 沉默的目的，那为什么 p19 和 siRNA 要到另一个空间（细胞核）去作用呢？目前的 p19 抑制沉默作用研究结果对这些问题还无法回答，相信随着研究的深入，我们会对沉默抑制过程和 TBSV 的生命周期都有更深的认识。

1.3.2.1.2.2 影响植物体发育过程 目前已知，p19 是通过与病毒 RNA 同源的 siRNA 结合起到沉默抑制作用的，但植物体内存在两种 21nt~22nt 大小的小 RNA，一种是 RNAi 过程中的 siRNA，还有一种是 miRNA，也是由 Dicer 切割而来，它的功能是与多种蛋白质结合后指导复合体与靶序列 mRNA 结合，中止 mRNA 翻译过程而起到调控植物发育的作用。p19 不能对两种长度相同的小 RNA 做出选择，所以 p19 在起沉默抑制作用时也会抑制 miRNA 作用途径，这可能就是 Dunoyer 等（2004）实验中发现 p19 能够影响植物发育的原因。从病毒角度讲，影响植物体发育不利于自身在植物体内的增殖和扩散，所以 p19 表现出来的影响植物发育作用不应该是病毒有意为之的一个结果。换句话说，影响到植物体发育很可能是 p19 抑制沉默时的一个副作用。

1.3.2.1.2.3 剂量效应 因为 p19 阻止 siRNA 指导 RISC 切割靶 RNA 这一沉默效率成级数扩大、对病毒复制产生致命影响的过程的发生，而对 RNAi 的起始环节即 dsRNA 切割成 siRNA 的过程不起作用。所以如果在 RNAi 起始阶段产生的 siRNA 数量很多，而 p19 表达量很少的情况下，植物体就能够成功地通过 RNAi 达到防御病毒侵染的作用；反之，p19 则能够发挥作用，抑制 RNAi。因此，p19 的表达量影响到抑制 RNA 沉默的水平。实验也证实，p19 的抑制活性受到剂量的影响（Qiu *et al*, 2002）。提高侵染病毒的数量通常能够打破植物体内的 RNA 沉默作用（Noris *et al*, 2004）。

1.3.2.2 HC-Pro

辅助蛋白酶成分（HC-Pro）是病毒在植物体内长距离运输和在细胞内顺利完成复制所必需的一种二聚体多功能蛋白质（Plisson *et al*, 2003），它在抵抗植物以 PTGS 为基础的防御系统中，可以抑制 PTGS 的作用。众多的转 HC-Pro 基因实验表明，转化植株对亲本病毒（HC-Pro 来源的病毒）和非亲本病毒均表现出强烈的敏感性。在因植物 PTGS 而不表达外源基因的转基因植物中感染可产生 HC-Pro 的病毒后，PTGS 受到抑制，外源基因重新表达（Tenllado *et al*, 2003）。而导入 HC-Pro 缺陷基因的实验也表明，该缺陷基因序列会成为 PTGS 的作用位点，致使低水平的 mRNA 和蛋白质的积累。这些结果说明病毒产生的 HC-Pro 可有效抑制 PTGS，从而使病毒顺利完成侵染。但是进一步的研究发现，发生在 HC-Pro 的蛋白酶活性位点上的缺陷突变体仍然可以抑制 PTGS，因此，HC-Pro 的沉默抑制活性可能并不依赖于其蛋白质水解活性（Kasschau *et al*, 2001）。

在转 HC-Pro 基因植株感染病毒时可观察到一个有趣现象是，植物首先表现出严重的感染症状，紧接着会显示恢复表型（即不表现症状），然后又重新出现感染症状，这说明了植物 PTGS

抗病毒机制和病毒的抑制 PTGS 作用相互拮抗的过程 (Mlotshwa *et al*, 2002)。同 p19 蛋白类似, HC-Pro 可能也是在 PTGS 产生 siRNA 后的下游过程中起作用, 阻断 PTGS 某个环节, 从而导致沉默抑制。Mette 等 (2001) 的实验表明, HC-Pro 不但不能抑制起始 dsRNA 介导的基因沉默, 并且在有 HC-Pro 存在的条件下, siRNA 的水平增加了 5 倍, 靶启动子的甲基化也稍有提高。Llave 等 (2000) 的实验也证实, HC-Pro 是针对 PTGS 的维持而不是 PTGS 的起始和信号产生起作用, 包括影响 siRNA 的积累和 DNA 的甲基化程度。有趣的是, 沉默抑制基因转入植物体后同样也可能受到植物体的 PTGS 作用, 发生沉默。Mlotshwa 等 (2002) 在转来自于豇豆蚜传花叶病毒 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV) 病毒的 HC-Pro 烟草研究中, 就发现有一个株系 (h48) 只有低水平的 HC-Pro RNA 存在, 并且对 CABMV 表现出抗性。说明 h48 中的 HC-Pro 基因本身虽然可以产生 PTGS 的抑制蛋白, 但同样可能会因为 PTGS 作用而沉默。

1.3.2.3 C2 蛋白

C2 蛋白最初是从中国番茄黄曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus-China*, TYLCV-C) 中分离到的一种在病毒致病过程中起作用, 可抑制植物体 PTGS 的核定位蛋白, 并且这种抑制作用很可能是在细胞核内完成的。Dong 等 (2003) 在详细研究了 C2 蛋白结构后发现, 该蛋白质在一个富含碱性氨基酸的区域内有一段富含精氨酸的核定位信号区 17KVQHRIAKKTTRRRR31。如果将 4 个连续的精氨酸残基替换成 28DVGG31 时, 用绿色荧光蛋白质 (Green fluorescent protein, GFP) 标记的 C2 蛋白失去转运 GFP 入核、失去诱导坏死及抑制植物 PTGS 的能力 (Van *et al*, 2002)。另外 C2 蛋白中存在一个高度保守的锌指结构 C36-X1-C38-X7-C46-X6-H53-X4-H58C59 和 4 个潜在的磷酸化位点 T52、S61、Y68、S74。C2 蛋白借助该锌指结构结合锌和 DNA, 而其结合锌和 DNA 的能力则影响 C2 介导的抑制 PTGS 过程。C2 蛋白锌指结构中的 3 个半胱氨酸突变会降低其与锌和 DNA 的结合能力 (Van *et al*, 2002; 2003); 而 Trinks 等 (2005) 研究发现, 核定位信号和锌指结构突变后, 该蛋白则失去抑制局部沉默和抑制沉默信号系统扩散的能力。

1.3.2.4 2b 蛋白

黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 编码的 2b 蛋白在转基因烟草中也可以抑制 PTGS。Simon-Mateo 等 (2003) 证明, 表达沉默抑制蛋白 2b 的 CMV 感染转基因烟草可重新激活沉默外源基因的表达。Lucy 等 (2000) 研究发现, CMV 的 2b 蛋白定位于悬浮烟草细胞和体细胞的细胞核内, 具有富含精氨酸的一段核定位信号 22KRRRRR27。与 C2 蛋白相同的是, 2b 的核定位信号是有效抑制 PTGS 所必需的, 因此抑制 PTGS 的作用可能发生在细胞核内。

1.3.2.5 NS 蛋白

NS 蛋白是第一个从负链 RNA 病毒中分离出来的沉默抑制蛋白。Takeda 等 (2002) 通过鉴定番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 中的 NS 蛋白的 RNA 沉默抑制活性发现, 该蛋白质抑制正义外源基因诱导的 PTGS, 而不抑制反向重复序列诱导的 PTGS。在发生沉默的转 *gfp*

基因烟草中, TSWV 的侵染导致了 *gfp* 基因的完全复活。基于农杆菌的瞬时表达系统研究发现, 表达 NS 的叶片部位不存在 siRNA, 由此说明 NS 蛋白可能在 RNA 沉默中最初产生 siRNA 的阶段起作用。与该现象相类似的还有水稻白叶病毒 (*Rice hoja blanca virus*, RHBV) 来源的 NS3 蛋白 (Bucher *et al*, 2003)。2004 年 Li 等报道了人类流感病毒 (A、B、C) 可以编码一种 RNA 沉默抑制蛋白 NS1, 而 NS1 就是一种 dsRNA 结合蛋白。上述研究结果表明, NS 蛋白可能是在 PTGS 的开始初期, 同起始 dsRNA 结合, 使之不能被 Dicer 酶切割成 siRNA, 从而导致 PTGS 的抑制。

1.3.2.6 其他抑制蛋白

除上述蛋白质, 在许多病毒中也分离鉴定出了一些沉默抑制蛋白, 尽管人们还不清楚其作用机制, 但这些沉默抑制蛋白却各自有不同的特点。这些研究结果一方面说明了病毒对植物的 PTGS 防卫系统抑制的普遍性, 同时也说明针对不同寄主不同的病毒可能会表现出不尽相同的抑制策略。

1.3.2.6.1 p0 蛋白

Pfeffer 等 (2002) 的研究表明, 甜菜西方黄化病毒 (*Beet western yellows virus*, BWYV) 中的 p0 蛋白在瞬时表达系统中, 表现出强烈的沉默抑制活性, 它能抑制转 *gfp* 基因烟草中的 *gfp* 的 PTGS。另外南瓜蚜传黄化病毒 (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) 和马铃薯卷叶病毒 (*Potato leafroll virus*, PLRV) 中的 p0 也都表现出 PTGS 抑制活性。p0 由 BWYV 的近 5' 端基因表达, 但在侵染过程中, 由病毒基因组表达的量很少, 甚至检测不到。这种低积累, 低抑制的状况可能同 p0 起始密码子区域的翻译起始元件的活性有关。但是, 提高 p0 翻译起始频率的突变体在植物体内复制时却表现出不稳定性, 并且其后代中 p0 的起始密码子经常重新被替换成低效的起始密码子 ACG、GTG、ATA。这种密码子的选择过程对维持 p0 在基因组中的低表达具有重要意义。而选择过程的方式和机制, 以及病毒低表达该抑制蛋白的目的仍需要进一步的研究和探讨。

1.3.2.6.2 p21 蛋白

Reed 等 (2003) 在甜菜黄化病毒 (*Beet yellows virus*, BYV) 中检测到一种分子量为 21 kD 的蛋白质, 它能够抑制由双链 RNA 诱导的对 *gfp* 的沉默。p21 存在时, *gfp* 表达的积累并没有明显影响到 siRNA 的累积。另外, 不存在 dsRNA 诱导子时, p21 可提高 *gfp* 的表达水平。在长线形病毒属 (*Closterovirus*) 其他病毒的 p21 同源物中也观察到相同的现象。计算机分析表明, p21 类似蛋白与其他已知的 RNA 沉默抑制蛋白无关, 是一个新的蛋白质家族。通过对感染 BYV 的植株的亚细胞分布检测表明, p21 以可溶性细胞质成分和细胞基质蛋白质形式存在于细胞中。

1.3.2.6.3 病毒复制酶

Kubota 等 (2003) 在烟草研究中发现, 用野生型番茄花叶病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV)

L 株感染可以打破 *gfp* 的沉默，伴随有可见症状；然而其他一些弱毒株[L(11)和 L(11)A]却不能抑制 *gfp* 的沉默。对 L (11) 和 L (11) A 进行序列的比较分析显示，复制酶基因中仅一个碱基的变化而导致氨基酸替换，致使弱毒株产生抑制缺失的表型。利用农杆菌瞬时表达系统进一步证实产生抑制 PTGS 的作用的正是 130 kD 的复制酶蛋白。初步的研究结果显示，该蛋白质可能也是在 PTGS 途径产生 siRNA 后的下游过程中阻止了 siRNA 的利用，结果导致了 PTGS 抑制。

1.3.2.6.4 病毒衣壳蛋白

不仅病毒的复制酶可以产生 PTGS 抑制作用，病毒的衣壳蛋白同样具有抑制沉默的活性。Thomas 等（2003）对芜菁皱缩病毒（*Turnip crinkle virus*, TCV）的所有蛋白质进行了综合分析，检测它们对烟草叶片中外源报告基因沉默的抑制能力。结果发现，只有衣壳蛋白 p38 表现出抑制活性。尽管它的抑制作用不是很明显，但当 p38 从马铃薯 X 病毒（*Potato virus X*, PVX）载体上表达时，可观察到随着 PVX RNA 的积累症状表现得越来越严重。因此，在植物抗病毒基因工程利用病毒衣壳基因，复制酶基因全长序列作为抗性基因研究中，需要充分考虑到其表达产物是否会产生 PTGS 抑制作用，否则，研究工作很可能无法得到预期的抗性结果。

随着 RNAi 介导的基因沉默的研究深入，病毒针对寄主 PTGS 抗病毒机制所采取“攻防”策略的研究也越来越引起人们的兴趣。这些研究不仅在理论上具有重要意义，同时也可以将抑制蛋白的抗沉默、促表达的作用应用到工业化生产中。Voinnet 等（2003）将番茄丛矮病毒编码的 p19 蛋白与烟草蛋白激酶基因共表达，由于 p19 抑制了 PTGS 作用，从而使蛋白质瞬时高水平表达，表达量可增高 50 倍之多。这无疑为快速分离纯化有用蛋白质提供了一个有用的系统。虽然沉默抑制蛋白的研究还不是十分深入，相信随着人们对于病毒编码的抑制蛋白的作用机理、结构、调控特点、多能性（如复制酶，衣壳蛋白）等问题的详细的研究和探讨，人们在基因表达和外源基因转移的研究都会取得突破性的进展。

1.3.3 RNAi 技术在植物抗病毒基因工程中的应用

植物体内的 RNAi 机制与病毒可编码沉默抑制蛋白是病原物——寄主在自然界长期相互斗争、协同进化的结果，是两者互作过程中各自的“进攻”和“防御”体系。所以，在相对中性的自然界中，植物体天然的 RNAi 系统不能起到完全或较高水平地抵御某种病毒侵染的作用。可是如果人为地将某种病毒的某一序列设计成双链结构，导入植物体，使之表达可诱发 RNAi 的 dsRNA，通过诱导的 RNAi，强化植物体内天然的 RNAi 抗病毒机制，就有可能获得较高抗性的转基因植物。事实上，众多的实验结果已经表明了该策略的可行性（表 1-4，燕飞等，2004b）。

2000 年 Wang 等利用含有大麦黄矮病毒（*Barley yellow dwarf virus*, BYDV）PAV 株系的复制酶基因片断，将其设计成反向重复序列构建成可产生发夹结构的载体，并将该载体导入大麦，在 25 个转化系中，有 9 个转化系表现出强的抗性，并且这种抗性是专化的；稳定遗传的 2 个株系后代中，ELISA 检测不到接种病毒的存在，说明利用来源于病毒的双链 RNA 可以达到抗病毒的目

的。然而他们并未对抗性产生的中间过程如 siRNA 的存在等问题进行论证。2002 年 Kalantids 等在转黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) cDNA 反向重复序列的再生烟草植株中检测到一个完全抗性的株系, 并且证实烟草病毒抗性直接与 siRNA 的产生相关。同时, 接种病毒的转化植物体表现出敏感型、恢复型 (表现症状但新长出的叶片无症状)、完全抗性三种表型。其中的敏感型尽管对病毒敏感, 但症状要比对照轻得多。这三种表型除了说明 RNA 沉默信号在植物体内可以扩散, 产生系统性沉默外, 还说明利用 RNAi 手段获得的抗性植株的抗性强度大小并不完全一致。Tenllado 等 (2001) 观察了以直接注射和农杆菌介导转化两种方式将病毒 dsRNA 导入植物叶片细胞后的结果发现, 两种方式都可成功阻止烟草蚀刻病毒 (*Tobacco etch virus*, TEV)、辣椒轻斑驳病毒 (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) 和苜蓿花叶病毒 (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) 这 3 种病毒的侵染过程。同时, 他们还将用于直接注射的 dsRNA 由最初的 0.8 μ g/ μ l 稀释到 10 倍和 100 倍后进行相同浓度的病毒接种。结果表明, 未稀释的一组中检测不到 PMMoV 在植物体内的积累; 稀释 10 倍的一组有轻微的病毒感染症状; 而稀释 100 倍的一组并未表现出对病毒感染的抑制, 并且植物体内的病毒含量与对照持平。这样的结果说明了 dsRNA 诱导的植物病毒抗性是 dsRNA 剂量依赖的, 这与在动物上得出的结论一致 (Kobayashi *et al*, 2004)。而 Pandolfini 等 (2003) 的实验结果表明, 即使导入烟草的李痘病毒 (*Plum pox virus*, PPV) 基因组片断含有可剪切的内含子序列, 在转化体中也可以检测到转化片断 siRNA 的存在, 并表现出对 PPV 侵染的系统抗性。众多的实验研究表明, 利用 RNAi 技术以工程化的手段赋予植物病毒抗性具有高度可行性, 有可能成为植物抗病毒基因工程研究中的一种高效抗性手段。

表 1-4 利用 RNAi 技术已经进行植物病毒抗性研究的抗病毒种类 (燕飞等, 2004b)

Table 1-4 Viruses researched for transgenic virus resistant plant mediated by RNAi

病毒种类	病毒属	转化受体	转化方式	是否获得再生植株
BYDV	<i>Leuteovirus</i>	大麦	农杆菌转化	是
TMV	<i>Tobamovirus</i>	烟草	注射, 农杆菌介导瞬时转化	否
PMMoV	<i>Tobamovirus</i>	烟草	瞬时转化	否
PYV	<i>Potyvirus</i>	烟草	注射、农杆菌瞬时转化, 农杆菌转化	是
PPV	<i>Potyvirus</i>	烟草	农杆菌转化	是
AMV	<i>Alfamovirus</i>	烟草	注射、农杆菌介导瞬时转化	否
CMV	<i>Cucumovirus</i>	烟草	农杆菌介导转化	是
ACMV	<i>Begomovirus</i>	烟草	电击转化	否

PMMoV, *Pepper mild mottle virus*; ACMV, *African cassava mosaic virus*

总之, 人们在 RNAi 机制的研究取得了较大进展的基础上进行的利用 RNAi 介导植物抗病毒基因工程的研究显示出了在植物病毒病防治上的应用潜力, 这除了因为其表现出的高效、特异性抗性外, 更重要的是同以往应用外壳蛋白基因、复制酶基因介导的抗性研究相比, dsRNA 诱导的抗性具有 RNAi 这一机制的理论基础。因此, 虽然利用该技术进行的抗病毒应用还很少, 但可以预测, 在随后的几年将有更多基于 RNAi 技术的抗病毒转基因作物的研究及推广应用。

1.4 本论文研究目的

在以往的抗 BYDV 转基因小麦研究中,已经使用了 CP 基因介导的病毒抗性、复制酶基因介导的病毒抗性、运动蛋白基因介导的抗性等策略,虽然这些抗性手段对 BYDV 具有延迟发病的抗性作用,但一直没有获得能够达到高水平的抗性的抗 BYDV 转基因小麦植株。同时,这些抗性手段都具有专一性,只对基因来源病毒表现抗性,对其他病毒没有作用,即不具有广谱性。本文从进一步提高对 BYDV 的特异抗性和广谱抗性两个方面入手进行小麦转基因研究,希望获得高抗 BYDV 的转基因小麦植株和具有广谱病毒抗性的转基因小麦。

在提高对 BYDV 抗性的转基因小麦研究方面,利用 BYDV-GPV 株系的复制酶基因(Rep)片段和外壳蛋白基因(CP)片段构建成可表达复合发夹 RNA(hpRNA)通过农杆菌介导法、基因枪法和花粉管通道法对小麦进行遗传转化,基于该结构表达的 hpRNA 诱发植物体内针对病毒基因组不同部位的 RNA 干扰机制而达到特异性高度抗病毒的目的。在提高病毒抗性谱方面,利用克隆自粟酒酵母的 *pac1* 基因通过农杆菌介导法转化小麦,利用该基因降解 dsRNA 的特点从而希望转基因小麦表现对多病毒的抗性。

第2章 材料与方法

本章所述材料与方法是分子生物学实验、组织培养过程中应用到的常规试剂配制及实验操作步骤，针对不同实验目的进行的具体实验方案的实施、路线等信息将在以后各章分述。

2.1 DNA 克隆及测序

2.1.1 试剂及仪器

限制性内切酶购自 Promega 公司；连接酶购自 Invitrogen 公司；其他若无特殊说明均为国产生化试剂。

低温高速台式离心机（eppendorf）；超速台式离心机（Beckman）；低温高速立式离心机（HITACHI）；台式离心机（国产）；电泳设备（北京六一）；凝胶成像系统（Eagle EyeII system, Stratagene）；控温真空干燥仪（HITACHI）；紫外分光光度计（HITACHI）；-20℃低温冰箱（SANYO）；杂交炉（Amersham）；移液器（Gilson）。

2.1.2 菌株和载体

克隆载体转化菌为 Top10（购自 Tiangen 公司）；T-载体使用 Promega 公司 pGEM-T-easy；常规克隆使用 pGEM-3Z。

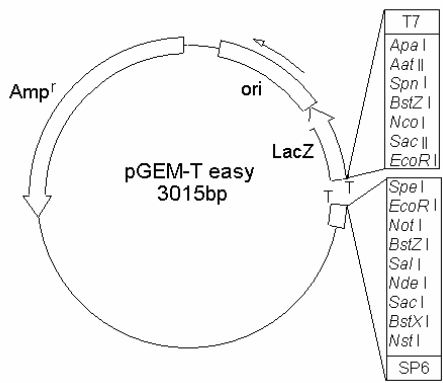


图 2-1 pGEM-T easy 图谱
Figure 2-1 Map of pGEM-T easy

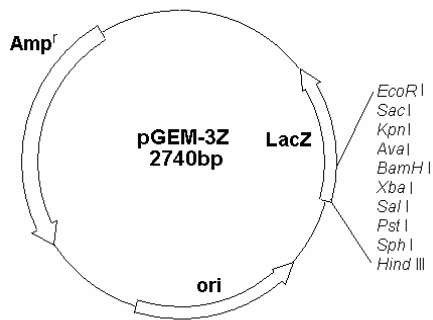


图 2-2 pGEM-3Z 图谱
Figure 2-2 Map of pGEM-3Z

2.1.3 大肠杆菌感受态细胞制备

采用CaCl₂法制备新鲜或冷冻保存的大肠杆菌感受态细胞，步骤如下。

① 从于 37℃培养 16-20 h 的新鲜平板中挑去Top10 细菌单菌落于 100 ml LB培养基中，剧烈

振荡摇培约 3 h, $OD_{600}=0.5-0.6$ 。

LB 培养基

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
加水至	1 L
调节 pH 至 7.0; 固体时再加 9 g 琼脂粉	
120℃ 高压蒸汽灭菌 20 min	

- ② 在无菌条件下, 将细菌转移到冰预冷的 50 ml 离心管中, 冰上放置 10 min。
- ③ 4℃, 4000 rpm 离心 10 min 后, 倒尽培养液。
- ④ 用 10 ml 冰预冷的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 重悬沉淀。
- ⑤ 4℃, 4000 rpm 离心 10 min 后, 倒尽 $CaCl_2$ 溶液。
- ⑥ 每 50 ml 原培养物用 2 ml 冰预冷的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 重悬沉淀。
- ⑦ 将上述重悬细胞分装成 200 μ l 的小份即可使用, 也可用液氮速冻, 置 -70℃ 冰箱保存备用。

2.1.4 质粒提取

2.1.4.1 质粒的小量制备

采用碱裂解法小量制备质粒, 步骤如下。

- ① 将细菌培养物分装成 1 ml 于 Eppendorf 管中, 4℃, 10000 rpm 离心 30 s, 倒尽培养液。
- ② 将细菌沉淀重悬于冰预冷的 100 μ l Solution I 中, 剧烈振荡重悬菌体。

Solution I

50 mmol/L 葡萄糖
25 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)
10 mmol/L EDTA (pH8.0)
105℃ 高压蒸汽灭菌 15 min, 4℃ 保存。

- ③ 加入 200 μ l 新配置的 Solution II, 轻轻混匀菌体, 确保管内表面均与 Solution II 接触。

Solution II

0.2 mol/L NaOH
1% SDS
分别配制成 10× 溶液, 用时稀释现用。

- ④ 加入 150 μ l 冰预冷的 Solution III, 轻轻颠倒混匀, 冰浴 5 min。

Solution III

5 mol/L 乙酸钾 60 ml
冰乙酸 11.5 ml
水 28.5 ml

- ⑤ 4℃, 12000 rpm 离心 5 min, 将上清转移至另一离心管中。
- ⑥ 向上清中加入 2 倍体积无水乙醇, 混匀, 室温放置 2 min。

- ⑦ 4℃, 12000 rpm 离心 5 min, 倒尽上清
- ⑧ 用 1 ml 预冷的 70%乙醇清洗 1 次, 真空干燥。
- ⑨ 干燥后的沉淀溶于 20 μ l 无菌水中。

2.1.4.2 质粒的大量制备

采用碱裂解法大量制备质粒, 步骤如下。

- ① 将洗过的 500 ml 细菌沉淀重悬于 18 ml Solution I 中, 剧烈振荡重悬菌体。
- ② 加入 2 ml 新配制的溶菌酶溶液[10 mg/ml, 溶于 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)]。
- ③ 加入 40 ml 新配制的 Solution II, 颠倒充分混匀菌体, 室温放置 10 min。
- ④ 加入 20 ml 冰预冷的 Solution III, 颠倒混匀, 冰浴 10 min。
- ⑤ 4℃, 4000 rpm 离心 15 min, 转头自然停转。
- ⑥ 用 4 层纱布过滤上清至一 250 ml 离心瓶中, 加入 0.6 倍体积异丙醇充分混匀, 室温放置 10 min。
- ⑦ 室温 5000 rpm 离心 15 min, 回收核酸。
- ⑧ 倒尽上清, 室温用 70%乙醇清洗 1 次, 真空干燥。
- ⑨ 干燥后的沉淀溶于 3 ml 无菌水中。

2.1.5 质粒纯化

采用 CsCl 密度梯度离心纯化大量提取的质粒, 并通过有机溶剂抽提除溴化乙锭, 步骤如下。

- ① 测 DNA 溶液体积, 按 1 g/ml 的量精确地加入固体 CsCl, 可将溶液加温至 30℃助溶混匀。
- ② 每 10 ml DNA 溶液加入 0.8 ml 溴化乙锭溶液 (10 mg/ml 溶于水), 混匀。
- ③ 用注射器将溶液转移至 Beckman Quick-seal 离心管中, 平衡、密封。
- ④ 室温以 98000 rpm 离心 6 h。
- ⑤ 取出离心管, 普通光照下在梯度中心可见两条 DNA 区带, 用注射器将下层区带取出。
- ⑥ 将取出的 DNA 溶液置于 5 ml 离心管中, 加入等体积的异戊醇, 震荡混匀。
- ⑦ 室温 1500 rpm 离心 3 min。
- ⑧ 用枪头将下层水相吸至另一 5 ml 离心管中, 重复第⑥步, 直至水相和有机相均变为无色。
- ⑨ 取水相 DNA 溶液用无菌水稀释 3 倍, 再用稀释后的 2 倍体积的无水乙醇 4℃沉淀 DNA 15 min, 再于 4℃, 10000 rpm 离心 15 min。
- ⑩ 沉淀干燥后溶于适量无菌水中, 紫外分光光度计测量 DNA 浓度。

2.1.6 酶切、目的片断回收及连接转化

2.1.6.1 酶切及目的片断回收

自 1 ml 菌液提取的质粒溶于 20 μ l 无菌水 (下同), 对重组质粒进行限制性内切酶酶切鉴定

时, 取 3 μl 质粒 DNA、2 μl 与酶相适应的酶切 Buffer、14 μl 无菌水 (单酶切时 14.5 μl)、两种酶各 0.5 μl 于离心管中, 置之于 37°C 温育 2 h 后, 全部点样于 1.2% 琼脂糖凝胶并电泳。凝胶 EB 染色后紫外下成像、拍照。

当两种限制性内切酶没有通用高效酶切 buffer 时, 先用需低离子浓度 Buffer 的内切酶切割 1-2 h, 后用需高离子浓度 Buffer 的内切酶切割 1-2 h, 再电泳检测。

需对酶切片断回收用于连接转化时, 取 4 管含有 20 μl 质粒 DNA 的离心管, 每管按比例加入 Buffer、水, 在 60 μl 体系下进行酶切, 酶量增加到每种酶 1.5 μl , 时间延长至 3 h。反应结束后, 全部点样, 合适的电压、凝胶浓度电泳后, EB 染色, 紫外灯下切下目的条带置于小离心管中, 按如下步骤回收 DNA (鼎国公司)。

- ① 用吸头捣碎切下的凝胶, 加入 3 倍体积的溶液 A。
- ② 50°C 水浴直至胶完全溶化, 而后按每 1 ml 加 25 μl 的量加入溶液 B, 混匀。
- ③ 将溶液移至离心柱中, 室温静置 2 min, 室温 8000 rpm, 离心 30-60 s, 弃液体。溶胶液量大时可重复该步骤。
- ④ 离心柱中加入 500 μl 的溶液 C, 室温 8000 rpm, 离心 30-60 s, 弃液体。重复一次。
- ⑤ 将离心柱置于一新的离心管中, 室温放置 10 min。
- ⑥ 加入 20 μl 溶液 D, 50°C 温育 2 min。
- ⑦ 室温 15000 rpm 离心 1 min, 管底即为纯化的 DNA 溶液。

此方法同样用于 PCR 扩增产物电泳后的回收。

2.1.6.2 连接及转化

将目的片断、载体酶切回收后, 按如下体系进行连接反应:

目的片断	3 μl
载体	1 μl
5 \times buffer (Invitrogen)	2 μl
T4 Ligase	1 μl
无菌水	3 μl

25°C 连接 5 min 后, 将连接产物轻轻加入到 200 μl 感受态细胞中, 置于冰上 30 min 后取出放到 42°C 恒温器中, 热激 90 s 后迅速取出再次置于冰上, 3 min 后取出, 加入 500 μl LB 液体培养基, 37°C 温育 45 min。取恢复培养的细菌 50 μl 和 500 μl 分别涂布于含有 8 μl IPTG (200 mg/ml)、80 μl X-gal (20 mg/ml) 和氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g/ml}$) 的平板上, 37°C 过夜培养。不需蓝白斑筛选时, 平板只含有抗生素即可。

2.1.7 重组质粒的快速筛选

挑取连接转化后平板上长出的抗性单菌落进行 Cracking 快速检测,通过和阴性对照对比可以快速找到可能含有正确连接载体的单克隆,再挑取这些菌落进行摇菌、提质粒酶切鉴定或直接测序,可节省时间。实验步骤如下:

- ① 用灭菌的枪头挑取少量菌落,均匀地涂布于小离心管,菌落与离心管对应编号。
- ② 加入 10 μ l 无菌水、10 μ l 2 \times Cracking buffer 振荡混匀,室温下放置 5 min。

2 \times Cracking Buffer

1 mol/L NaOH	10 ml
0.5 mol/L EDTA	2 ml
10% SDS	10 ml
溴酚蓝	0.05 g
甘油	20 ml
加无菌水至	100 ml

- ③ 全部点样,1.2%琼脂糖凝胶电泳,以不含目的片断的载体作为阴性对照(蓝白斑筛选时可用蓝斑进行同样裂解作为阴性对照)。
- ④ 挑取电泳图中质粒 DNA 条带比阴性条带明显滞后的那个(些)对应菌落摇菌,提质粒,酶切鉴定,或测序。

2.1.8 序列测定

根据连接片断的结构、大小选用测序公司的ABI PRISMTM 377xl或ABI PRISMTM 3730xl DNA 测序仪测序。

2.2 遗传转化

2.2.1 试剂

实验所用玉米素(ZT)、生长素(IAA)、激动素(KT)、2,4-D、萘乙酸(NAA)等植物激素以及肌醇、维生素 B1、维生素 B5、维生素 B6、维生素 C 均购自 Sigma 公司。

除 G418 购自 Gibco 外,其余链霉素、氨苄青霉素、羧苄青霉素、卡那霉素等抗生素均为国产。

其他若无特殊说明均为国产生化试剂。

2.2.2 农杆菌介导的转化

2.2.2.1 菌株及载体

实验所用农杆菌菌株为 LBA4404，本身具有链霉素抗性；克隆连接的目的片段插入到双元表达载体 pBI121 中，该载体含有 *nptII* 抗性基因和 *gus* 基因，如图 2-3 所示。

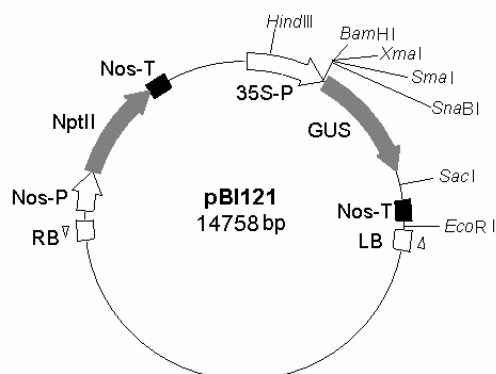


图 2-3 pBI121 质粒图谱

Figure 2-3 Map of pBI121

2.2.2.2 农杆菌用培养基

农杆菌 LBA4404 在含有相应抗生素的 YEB 固体或液体培养基上（中）生长。

YEB 培养基

牛肉膏	5 g
Yeast extract	1 g
Tryptone	5 g
蔗糖	5 g
MaSO ₄ ·7H ₂ O	0.493 g
加水至	1 L; pH 7.2; 固体时加琼脂粉 9 g
120℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。	

2.2.2.2 农杆菌感受态制备及转化

农杆菌感受态细胞的制备及双元载体的转入：

- ① 挑取农杆菌单菌落接种于 10 ml 含有链霉素（50 mg/L）的 YEB 培养基中，28℃，振荡培养 24 h。
- ② 取 1 ml 菌液至 50 ml 新鲜培养基中，摇培至 OD₆₀₀ 达到 0.6。
- ③ 分装到 5 ml 离心管中，冰浴 10 min。4℃，4000 rpm 离心 10 min，收集菌体。
- ④ 弃上清，每管加入 100 μl 20 mmol/L 的 CaCl₂ 重悬。
- ⑤ 取一管按上述方法制备好的农杆菌感受态细胞，加入构建好的双元载体 1 μg，置液氮中冻 5 min。
- ⑥ 取出融化后 37℃ 水浴 5 min；加入 1 ml YEB 液体培养基，28℃ 摇培 6 h。

- ⑦ 室温 10000 rpm 离心 30 s，弃去部分上清，剩下约 100 μl 。
- ⑧ 将 100 μl 菌液涂布于含有链霉素（50 mg/L）和卡那霉素（20 mg/L）的平板上，28℃培养 3 d。

2.2.2.3 植物组培用培养基

实验中小麦组织培养用培养基都是在 MS 基本培养基的基础上改进而成，MS 基本培养基及各阶段所需培养基的配制方法如下。

① 配制 MS 基本培养基母液。

母液种类	成分	扩大倍数	称取量 (mg)	定容体积 (ml)
大量元素	KNO ₃	20×	38000	1000
	NH ₄ NO ₃		33000	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O		7400	
	KH ₂ PO ₄		3400	
	CaCl ₂ · 2H ₂ O		8800	
微量元素	MnSO ₄	200×	4460	1000
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O		1720	
	H ₃ BO ₃		1240	
	KI		166	
	NaMoO ₄		50	
	CuSO ₄ · 5H ₂ O		5	
	CoCl ₂ · 6H ₂ O		5	
铁盐	Na ₂ -EDTA	200×	7460	1000
	FeSO ₄ · 4H ₂ O		5560	
维生素和氨基酸	甘氨酸	200×	400	1000
	VB ₁		20	
	VB ₅		100	
	VB ₆		100	

以上成分 4℃保存。

② MS 基本培养基成分

20×大量元素	50 ml
200×微量元素	5 ml
200×铁盐	5 ml
200×维生素和氨基酸	5 ml
水解酪蛋白	500 mg

天门冬酰氨	150 mg
肌醇	100 mg
维生素 C	100 mg
蔗糖	30 g
加蒸馏水至	1 L pH5.8 固体时根据所需 软硬程度添加琼脂粉 7-12g
120℃高压蒸汽灭菌 15 min。	

③ 植物激素的配制

植物激素首先配制成母液，浓度为 0.5 mg/L。各激素溶解方法如下。

IAA, ZT, NAA	先用少量 95%乙醇溶解，再加水定容
KT	先溶于少量 1 mol/L HCl 中，再加水定容
2, 4-D	先溶于少量 1 mol/L NaOH 中，再加水定容
以上成分 4℃保存	

④ 组培各阶段所需培养基

MS 诱导培养基:	MS 基本培养基 + 2, 4-D (2 mg/L) + KT (0.4 mg/L)
MS 筛选培养基:	MS 诱导培养基 + 2, 4-D (2 mg/L) + KT (0.4 mg/L) + G418 (25 mg/L) + 羧苄青霉素 (500 mg/L)
预分化培养基:	MS 诱导培养基 + 2, 4-D (0.5 mg/L) + KT (0.4 mg/L) + G418 (25 mg/L) + 羧苄青霉素 (500 mg/L)
分化培养基:	MS 诱导培养基 + ZT (0.5 mg/L) + IAA (0.5 mg/L) + G418 (25 mg/L) + 羧苄青霉素 (500 mg/L)
壮苗培养基:	MS 诱导培养基 + NAA (0.5 mg/L) + G418 (25 mg/L) + 羧苄青霉素 (500 mg/L)
浸染转化培养基 (液体):	MS 诱导培养基 + 乙酰丁香酮 (200 mmol/L) + 0.1% F-68

除浸染转化培养基外皆 120℃高压蒸汽灭菌 15 min；转化培养基用灭菌的 MS 液体诱导培养基添加（转化时）乙酰丁香酮和 F-68。

2.2.3 基因枪法介导的转化

2.2.3.1 真核表达载体

基因枪转化小麦幼胚愈伤组织时用的真核表达载体由含有 Emu 启动子的 pEmu（本室保存）构建而来，该载体不含标记基因，图谱如下。

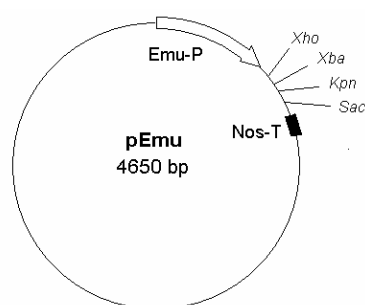


图 2-4 pEmu 载体图谱

Figure2-4 Map of pEmu

2.2.3.1 所用培养基

实验操作的前期即小麦幼胚愈伤组织的诱导方法和轰击完恢复培养后的分化培养基与农杆菌介导方法相同，只是不加抗生素。不同之处在于轰击前的高渗预处理。

高渗培养基：MS 诱导培养基+ 甘露醇 (0.2 mol/L) + 山梨醇 (0.2 mol/L)

2.2.3.2 轰击操作

2.2.3.2.1 金粉的处理和微弹制备

- ① 称取金粉 4 mg (供轰击 50 次使用)，放入灭菌小离心管中，加入 1 ml 无水乙醇，涡旋振荡 10 min，静置 5 min，室温 10000 rpm 离心 1 min，弃掉上清；重复该步骤 3 次。
- ② 加入 1 ml 无菌水，高强度剧烈振荡悬浮，静置 1 min，室温 10000 rpm 离心 20 s，弃上清；重复该步骤 3 次。
- ③ 加入 1 ml 灭菌的 50%甘油重新悬浮，每管 50 μ l (供 6 次轰击) 分装，室温可保存 2 周。
- ④ 按每次轰击 1 μ g 的量加入到处理好的金粉悬浊液中，再加入 10 倍于 DNA 体积的 2.5 mol/L 的 CaCl_2 ，振荡 5 min 后，4℃ 静置沉降，弃上清后加入 1 ml 70%乙醇振荡悬浮，4℃ 静置沉降，重复洗涤 3 次。
- ⑤ 按照每次轰击 10 μ l 的量加入无水乙醇，悬浮制成微弹。
- ⑥ 取 10 μ l 微弹涂于用 70%乙醇处理过的微弹载体的内壁上，使乙醇自然挥发，备用。

2.2.3.2.1 轰击步骤

- ① 打开超净台，用 70%乙醇擦拭超净台内部和基因枪内外，打开紫外灯，灭菌 30 min。
- ② 将可裂膜、阻拦网、铜环等置 70%乙醇中放置 10 min，放在灭菌滤纸上风干。
- ③ 打开气瓶，调节压力至 1300 psi。
- ④ 打开真空泵和基因枪电源，将可裂膜、阻拦网和铜环安装到固定装置中，把培养皿放到托盘上，使组织材料正好在托盘中央的圆圈范围之内，托盘放到枪仓内倒数第二档（微弹飞行距离 12 cm），关闭仓门。

- ⑤ 按下抽真空键 (Vac), 当真空表读数达到 25 mmHg. 时, 使键处于 “Hold” 档, 按下 “Fire” 键直到可裂膜破裂, 轰击完毕; 按下放气键, 使真空表归零。
- ⑥ 打开仓门, 整理培养皿, 封口, 继续步骤④-⑥进行下一次射击。

2.2.4 花粉管通道法介导的转化

在小麦扬花期, 用记号笔标记刚刚开花的小花, 30 min 后, 用小剪刀剪去小花内的柱头, 同时滴加 10 μ l 含有 pPPI45 的水溶液 (0.2 μ g/ μ l), 候其自然结实。

2.3 再生植株的检测

2.3.1 小麦基因组 DNA 的提取

- ① 取 0.2 g 叶片放入研钵中, 加入石英砂、液氮, 充分研磨后, 将粉末转置小离心管中。
- ② 立即加入 300 μ l DNA 提取 Buffer, 充分混匀, 65°C 温浴 30 min。

DNA 提取 Buffer

100mM	Tris HCl, pH8.5
50mM	Na ₂ (EDTA)
100mM	NaCl
2%	SDS

- ③ 加入冰冷的 5 mol/L KAc, 颠倒混匀, 冰上放置 15 min; 4°C, 6000 rpm 离心 5 min, 上清移至另一离心管中。
- ④ 加入等体积的酚/氯仿 (1:1), 混匀, 4°C, 6000 rpm 离心 5 min, 上清移至另一离心管。
- ⑤ 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 混匀。用枪头将絮状 DNA 挑至另一离心管, 70%乙醇洗 2 次。
- ⑥ 真空干燥 5 min 后取出, 晾干后, 加入 200 μ l 无菌水, 4°C 过夜溶解沉淀。
- ⑦ 加入 RNaseA 至终浓度 50 μ g/ml, 37°C 温浴 1 h 后, 加酚/氯仿混匀, 4°C, 10000 rpm 离心 5 min, 取上清, 重复抽提 1 次。
- ⑧ 上清中加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc, 混匀, 加入 2 倍体积 -20°C 的无水乙醇, -20°C 放置 30 min。
- ⑨ 4°C, 10000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 70%乙醇洗沉淀 1 次。
- ⑩ 真空干燥 5 min 后取出, 晾干后, 溶于适量无菌水。

当 DNA 样品用于 PCR 扩增时, 操作到第⑥步即可; 当做 Southern blot 需大量 DNA 时, 加大取材量, 相应加大试剂量, 第②步 65°C 温浴 1 h 即可。

2.3.2 植物组织总 RNA 提取

- ① 取 0.1 g 新鲜叶片, 加入液氮, 在 1.5 ml 离心管中充分研磨。

- ② 加入 1 ml Trizol buffer, 充分混匀, 4℃, 12000 rpm 离心 10 min。
- ③ 取上清, 加入 0.2 ml 氯仿抽提一次。
- ④ 取上清, 加入等体积异丙醇, 室温放置 10 min, 4℃, 12000 rpm 离心 10 min。
- ⑤ 沉淀用 75%乙醇洗一次, 干燥后溶于 30 μ l DEPC ddH₂O中, -20℃或-70℃保存备用。

2.3.3 PCR 检测

2.3.3.1 直接用叶片进行的 PCR 快速检测

为了快速方便地在幼苗期对无筛选标记的基因枪转化再生植株进行, 实验对幼苗叶片进行简单的碱处理后, 在特殊的 PCR 缓冲条件下对目的片段进行扩增。实验方法如下。

- ① 将少量幼苗叶片放入小离心管中, 用剪刀剪成0.5 cm长的小段。
- ② 加入400 μ l 0.3 mol / L NaOH 后置沸水煮20 s取出。
- ③ 加入400 μ l 0.3mol / L HCl和200 μ l 0.5mol / L Tris-HCl(pH8.0), 再次沸水浴3 min取出。
- ④ 挑取经上述处理的一段叶片到扩增体系中进行PCR反应 (除PCR buffer与普通PCR不同外, 其他条件相同)。

PCR buffer成分:

67 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)
16 mmol/L [NH₄]₂SO₄
80 mmol/L MgCl₂
0.45% Triton X-100

2.3.3.2 以提取的小麦基因组 DNA 为模板的 PCR 检测

根据不同的目的基因, 调整退火温度, 在如下体系中进行扩增。

10×PCR buffer	2.5 μ l
dNTPs (10mmol/L each)	0.5 μ l
MgCl ₂ (25mmol/L)	2.0 μ l
Primer1(10pmol/L)	0.8 μ l
Primer2(10pmol/L)	0.8 μ l
基因组 DNA (25~50ng/ μ l)	2.0 μ l
ddH ₂ O至总体积	25.0 μ l

94℃变性 10 min, 然后 94℃变性 1 min, X℃复性 1.5 min, 72℃延伸 Y min, 共计 35 个循环, 最后在 72℃延伸 10 min。根据引物特点和片段长度, 调节 X 和 Y。

2.3.4 Dot Blot

将提取的小麦总DNA于 100℃变性 10 min, 迅速置于冰水中, 每个样品取 5-10 μ g点于带正电

尼龙膜上(Hybond-N⁺, Amersham, 下同), 晾干后 80℃真空干燥 1-2 h。DNA探针的标记按DNA探针标记与检测试剂盒(Roche)说明书进行, 具体操作参见下面的Southern blot部分。

2.3.5 Southern Blot

2.3.5.1 探针标记

- ① 回收 CP 扩增片断, 定量后取 3 µg DNA, 用水稀释至 16 µl, 沸水煮 10 min 后迅速置冰上。
- ② 取 4 µl Dig-high prime (1 号管) 到上述变性的 DNA 中, 混匀、简单离心, 37℃温育过夜。
- ③ 加入 2 µl 0.2 mol/L EDTA 终止反应。

2.3.5.2 膜制备

- ① 在如下体系中对小麦总 DNA 进行酶切处理。

小麦总 DNA	25 µg
10×酶切 buffer	20 µl
<i>Hind</i> III	2.5 U/µg DNA
加水至 50 µl, 37℃温浴 12 h。	

- ② 酶切完成后, 0.8%琼脂糖凝胶、1 V/cm 恒压电泳 12 h。
- ③ 电泳完毕后, 将凝胶在 EB 溶液中染色 10 min, 紫外灯下检查酶切结果并切掉多余的胶。
- ④ 凝胶转入 0.25 mol/L HCl 中脱嘌呤 15 min, 蒸馏水冲洗 2 次, 0.4 mol/L NaOH 漂洗 1 次。
- ⑤ 将凝胶翻转后放在滤纸桥上, 放上 1 张与凝胶大小相当的尼龙膜, 赶除气泡; 在膜上放 3 层与尼龙膜大小相同的滤纸, 赶除气泡; 将凝胶周围用胶片封好, 放上大小相当的吸水纸, 压上约 500 g 的重物, 转膜 10 h 以上, 其间更换吸水纸。
- ⑥ 转膜完成后, 用 2×SSC 洗膜 10 min, 用滤纸吸干, 80℃真空干燥 2 h, 用保鲜膜包好, 4℃存放至杂交。

2.3.5.3 杂交

杂交在与杂交炉配套的杂交瓶内进行。

- ① 用预热的 Easy Hyb(10 ml/100cm²) 预杂交膜 30 min。

稀释的 Easy Hyb Granules: 用 64 ml 水分两次加入到 7 号瓶子中, 在 37℃ 5 min 立即震荡解冻, 尔后将之预热至杂交温度。

- ② 按 25 ng/ml Dig easy Hyb 的量将探针沸水煮 5 min, 迅速置于冰上变性。
- ③ 按上述量将变性的探针加入到 Dig easy hyb 中 (含有探针的 Dig easy hyb 可以贮存于 -20℃, 再次使用之前在 68℃变性 10 min 即可)。
- ④ 倒掉预杂交液, 加入含有探针的 Dig easy hyb (3 ml/100cm²), 42℃轻摇温育过夜。
- ⑤ 用充足的 2×SSC, 0.1% SDS 洗膜 2 次, 各 5 min, 保持摇动; 用预热到 65-68℃的 0.5×

SSC, 0.1% SDS 65-68℃条件下洗膜 2 次, 各 15 min, 保持摇动。

2.3.5.4 检测

- ① 杂交和洗过的膜用冲洗缓冲液简单淋洗 1 次 1-5 min。

冲洗缓冲液:

0.1 mol/L 马来酸
0.15 mol/L NaCl, pH7.5
0.3% 吐温 20

- ② 在 100 ml Blocking solution 中浸泡 30 min。

用马来酸缓冲液稀释 Blocking solution (6 号管) 到工作浓度

马来酸缓冲液:

0.1 mol/L 马来酸
0.15 mol/L NaCl
pH7.5 (用固体 NaOH 调)

- ③ 在 20 ml 抗体溶液中浸泡 30 min。

抗体 (4 号管) 使用前 10000 rpm 离心 5 min, 按 1:10000 加入到稀释好的 Blocking solution 中

- ④ 用 100 ml 冲洗缓冲液冲洗 2 次, 各 15 min。

- ⑤ 在 20 ml 检测缓冲液中平衡 2-5 min。

检测缓冲液:

0.1 mol/L Tris-HCl
0.1 mol/L NaCl
pH9.5

- ⑥ 将膜的 DNA 面向上放到杂交袋中, 加入 1 ml CSPD (5 号瓶), 迅速将杂交袋上面覆盖在膜上, 使底物能够在膜表面均匀扩散, 不能有气泡, 15-25℃放置 5 min。

- ⑦ 将液体挤净, 并封口 (膜如果暴露干燥会有背景), 37℃温育湿润的膜 10 min, 以使化学荧光充分反应。

- ⑧ 在 X 光片上 15-25℃曝光 15-25 min 或更长时间, 以获得理想信号强度。

2.3.6 *nptII* ELISA 检测

- ① 用蒸馏水稀释样品抽提缓冲液 PEB1 至工作浓度。

- ② 称重小麦叶片 (不要超过 100 mg), 把叶片放置 1.5 ml 离心管中, 然后加入重量的 5 倍体积的抽提缓冲液, 整个过程要在冰上操做。

- ③ 充分研磨, 然后按照 1:10 用抽提缓冲液稀释 (注意冰上操做)。

- ④ 每个酶标孔加③0.1 ml, 然后将酶标板放在湿润的盒子 (盒子内放湿润滤纸以保湿), 把盒子放在 4℃冰箱, 过夜。

- ⑤ 第二天先准备冲洗缓冲液: 配制 500 ml PBS-Tween-20(PBST)缓冲液需要 25 ml PBST+475 ml 蒸馏水。
- ⑥ 用 4 倍体积的冲洗缓冲液来稀释 MRS, 然后用稀释好的 MRS 分别按照 1:100 来稀释抗体 A 和抗体 B。
- ⑦ 从 4℃冰箱中取出前一天准备的样品, 用力甩掉酶表孔中液体, 在吸水纸上干燥片刻, 然后用冲洗缓冲液洗 4-5 次, 最后每个酶标孔加入 0.1ml ⑥, 室温放置 2-2.5 h。
- ⑧ 用力甩掉酶表孔中液体, 在吸水纸上干燥片刻, 用冲洗缓冲液洗 4-5 次, 然后每个酶标孔加 TMB 0.1 ml, 此时表达 *npt* II 的样品会迅速变蓝, 15 min 之后每个酶标孔加 0.05 ml 3 mol/L 的硫酸, 此时显示兰色的样品会变黄。

第3章 病毒来源发夹 RNA 介导抗 BYDV 转基因小麦研究

在以往的抗 BYDV 转基因小麦研究中,已经使用的策略有 CP 基因介导的病毒抗性(Cheng *et al.*, 1994)、复制酶基因(缺失、正向串联)介导的病毒抗性(吴茂森, 2000; 刘太国, 2003)、运动蛋白基因介导的抗性(晋治波, 2003),虽然这些抗性手段对 BYDV 具有延迟发病的作用,但一直没有获得能够达到免疫水平的抗 BYDV 转基因小麦植株。随着对真核生物体内 RNAi 机制研究的日益深入,利用该技术进行的植物抗病毒基因工程研究也成为植物病理学领域的研究热点之一。2000 年 Wang 等利用含有 BYDV-PAV 株系复制酶基因反向重复序列的载体,获得了 2 个抗性可达免疫水平的大麦再生株系。Tenllado 等(2001)观察了以直接注射和农杆菌介导转化两种方式将病毒 dsRNA 导入植物叶片细胞后的结果发现,两种方式都可成功阻止 TEV、PMMoV、AMV 的侵染过程。2002 年 Kalantidis 等在 CMV cDNA 反向重复序列的再生烟草植株中也检测到一个完全抗性的株系。众多的实验研究表明(详请参阅第 1 章第 3 部分),利用 RNAi 技术以工程化的手段赋予植物病毒抗性有高度可行性,同时具有特异性强、效率高的特点,因此有可能成为植物抗病毒基因工程研究中的一种高效抗性手段。本实验利用可表达 BYDV-GPV 株系部分基因序列发夹 RNA(hairpin RNA, hpRNA)结构的植物表达载体,通过农杆菌介导法、基因枪法和花粉管通道法对小麦进行转化,期望该结构能够引发植物体针对病毒的 RNAi 过程,从而获得高抗 BYDV 转基因再生小麦植株。

3.1 材料与方法

3.1.1 真核表达载体的构建

首先在克隆载体 pGEM-T easy 和 pGEM-3Z 内进行可表达 dsRNA 结构所需目的片断的连接。实验需要的目的片断有: CP 正向片断(CP+)和反向片断(CP-),长度均为 603 bp; 复制酶正向片断(Rep+)和反向片断(Rep-),长度均为 600 bp。通过连接反应获得可表达 CP+/Rep-/CP-结构和 Rep+/CP-/Rep-结构(如图 3-1 所示)的真核表达载体。



图 3-1 目的 dsRNA 结构

Figure 3-1 Structures of dsRNA expected

设计合适的引物,以本室保存的 BYDV-GPV 株系 CP 基因和复制酶基因的 cDNA 为模板进行扩增。其中 CP+的上游引物含有 *Xba*I 酶切位点,下游引物含有 *Xho*I, *Bam*HI 酶切位点,前者在后者的上游; CP-上游引物含有 *Sac*I 酶切位点,下游引物含有 *Bam*HI 酶切位点; Rep-上游引物含 *Bam*HI, 下游引物含 *Xho*I 位点(所有引物由上海生工合成)。将各片断克隆至 T 载体,测序,

用序列正确的克隆进行下一步操作，详细构建策略如下。

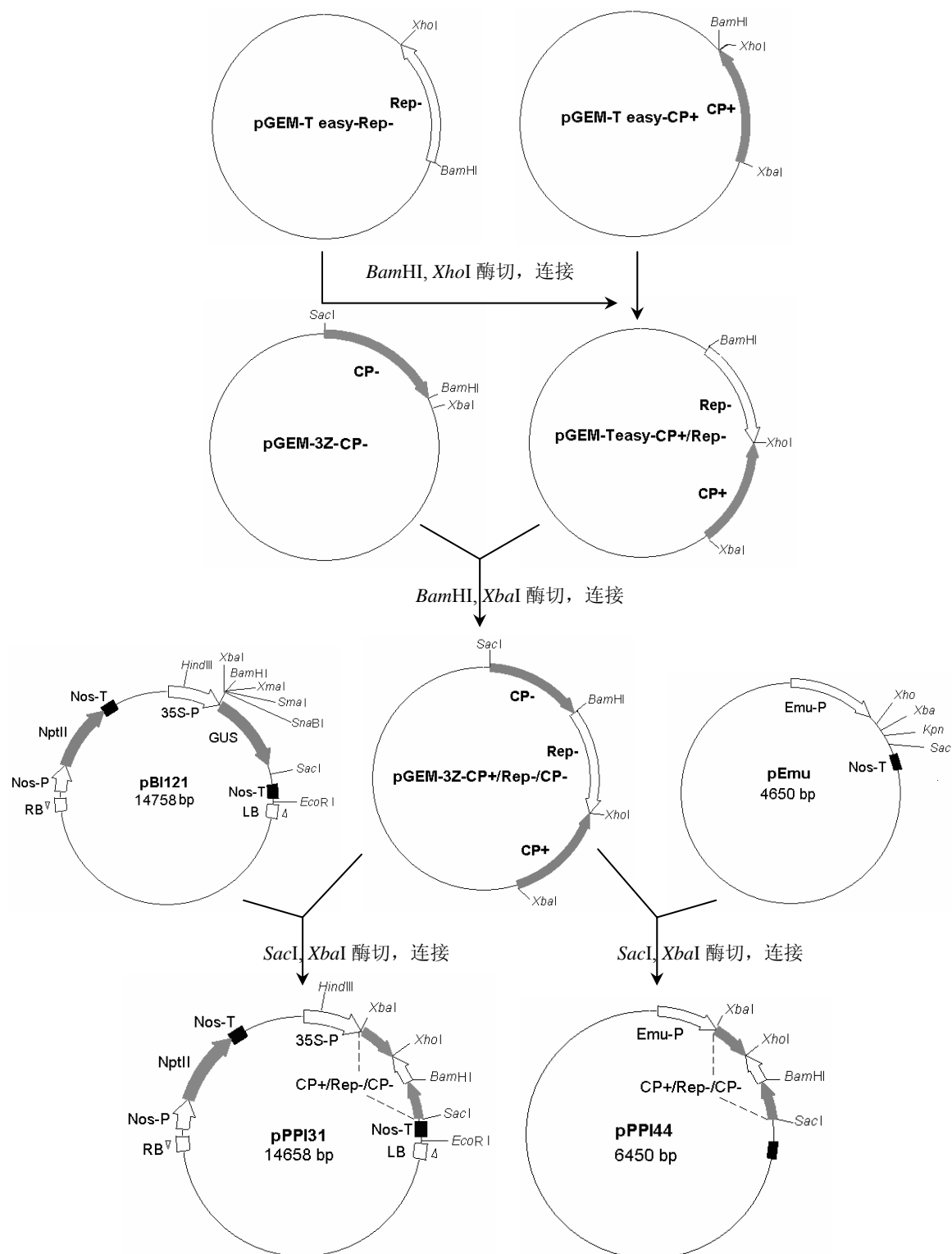


图 3-2 真核表达载体构建策略

Figure 3-2 Construction strategy of vector used in plant transformation

将构建好的表达框架经过 *Xba*I 和 *Sac*I 双酶切，分别连入农杆菌介导法用到的 pBI121 载体以

及基因枪和花粉管通道法用的 pEmu 载体中, 分别命名为 pPPI31 和 pPPI44 (如图 3-3 所示)。

用同样的策略构建“Rep+/CP-/Rep-”结构的真核表达载体, 分别命名为 pPPI32 和 pPPI45。

3.1.2 遗传转化用真核表达载体制备

本实验中, 真核表达载体 pPPI31 用于农杆菌介导的小麦遗传转化, pPPI45 用于基因枪法对小麦的遗传转化, pPPI44 和 pPPI45 用于花粉管通道法对小麦的转化。

pPPI31 通过冻溶法(第2章材料与方法)转入农杆菌 LBA4404 中, 用 15%的甘油保存于-20℃冰箱, 进行转化试验时提前活化培养。

用于基因枪法和花粉管通道法转化的 pPPI45 载体在转化前通过碱裂解法大量提取质粒, 并通过 CsCl 梯度离心进行纯化(第2章材料与方法)。对部分纯化后的质粒用无菌水稀释至浓度 0.2 μg/μl, 用于花粉管通道法转化。

3.1.3 小麦幼胚组织培养

3.1.3.1 小麦品种及组织材料

农杆菌介导法和基因枪法转化时以冬麦陇鉴 127 为转化目的品种; 采撷小麦幼胚为外植体诱导愈伤组织。花粉管通道法转化时以保丰 104 为转化品种。

3.1.3.2 幼胚的获取及培养

取温室或大田开花 14 d 左右的麦穗, 70%乙醇擦拭麦穗表面, 剥取幼嫩种子, 放置于三角瓶中, 在超净台上用 70%乙醇浸泡 1 min 后倒净, 无菌水洗 1 次。用 20%的次氯酸钠浸泡消毒 20 min, 中间换一次次氯酸钠。消毒完毕后, 彻底倒净次氯酸钠, 用无菌水冲洗 3 次。将无菌的麦粒分装至无菌平板, 用镊子将幼胚挑出接种于含有 MS 诱导培养基的平板上, 25℃黑暗培养 7-10 d。

3.1.4 农杆菌介导的遗传转化

3.1.4.1 菌液的准备

取保存在甘油中的农杆菌菌株 LBA4404-pPPI31, 在含有链霉素(50 mg/L)和卡那霉素(20 mg/L)的 YEB 培养基上划线培养, 28℃黑暗培养 3 d 后, 挑取单菌落接种于 YEB 液体培养基中, 28℃黑暗振荡培养过夜; 次日, 将菌液按 1:10 用 YEB 培养基稀释, 然后继续振荡培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.8 左右。将菌液在超净台内倒入离心管, 离心, 收集菌体, 用液体浸染转化培养基重悬洗一次, 最后菌体重悬于浸染转化培养基, OD₆₀₀ 值为 0.8。

3.1.4.2 浸染转化

在超净台内将菌液置于培养皿中，将诱导 7-10 d 的小麦幼胚愈伤组织浸入培养皿内菌液中；30 min 后将所有组织块取出，放到铺有 2 层滤纸的培养皿内，封口膜封口，24℃ 黑暗条件下共培养农杆菌和组织块 3 d。

3.1.4.3 抗性愈伤组织的筛选和转基因苗的获得

共培养结束后将组织块转移到筛选培养基上，24℃ 条件下光照培养 15-20 d；将经筛选培养存活下来的愈伤组织转移到预分化培养基，24℃ 光照培养 15-20 d；接着将组织块转移到分化培养基上，24℃ 光照培养 15-20 d；将在分化培养基上分化出来的幼苗去除残留的愈伤组织，转移到壮苗培养基，培养生根；待长出一定数量的幼苗实生根后将幼苗从培养基中取出，清洗掉残留的培养基，移栽到花盆中，18℃ 光照温室培养。

3.1.5 基因枪法进行的遗传转化

基因枪法转化小麦幼胚愈伤组织材料与农杆菌介导法一样，即使用培养 7-10 d 的幼胚组织块；转化时，提前将组织块放到高渗培养基（见第 2 章材料与方法）上处理 4-6 h；轰击完毕后，组织块继续在高渗培养基上 24℃ 黑暗培养 18-20 h，然后转至诱导培养基继续 24℃ 黑暗培养 14 d；恢复培养后，与农杆菌介导法一样对组织块进行预分化、分化、壮苗培养，所用培养基与农杆菌介导法一样，只是不加用于筛选和抑制农杆菌生长的抗生素；移栽过程也与农杆菌介导法一样。

3.1.6 花粉管通道法介导的遗传转化

在小麦扬花期，用记号笔标记刚刚开花的小花，30 min 后，用小剪刀剪去小花内的柱头，同时滴加 10 μ l 含有 pPPI45 的水溶液（0.2 μ g/ μ l），候其自然结实。

3.1.7 转基因再生小麦植株的分子生物学检测

详细操作过程见第 2 章材料与方法。

3.1.8 抗性检测方法

3.1.8.1 温室病毒抗性检测方法

3.1.8.1.1 接毒试验

对农杆菌和基因枪法获得的 T0 代再生苗进行温室病毒抗性检测。

转基因幼苗自培养基移栽置土壤成活，待幼苗长至 20 cm 高后，用在 GPV 毒源上饲毒 2 d 的麦二叉蚜进行接毒，每株接虫 15-20 头，3 d 后用敌敌畏去除蚜虫，接毒 15 d 后开始详细记录发病情况。到第一次接毒 30 d 时，进行第 2 次接毒，每株接虫 30 头，14 d 后去虫，记录发病情况。

3.1.8.1.2 转基因感病植株和抗性植株的分类

第一次接毒后，转基因植株在第 10 dpi (day post infection) 至 30 dpi 期间，老叶片（新叶向下第 3-4 片叶）黄化严重、旗叶黄化的植株，我们认定其为感病类型；而老叶片仅局部黄化，黄化区域不扩散或扩散缓慢，和不发病的植株，我们认定其为抗病类型。在第 2 次接毒时将感病类型淘汰，只对抗病类型作第 2 次高接毒量试验。

在第 2 次接毒后的 40 d 内老叶黄化严重，旗叶梢部褪绿、黄化的植株认定其为低度抗性类型；对老叶片仅梢部黄化或轻微褪绿的植株认定为中度抗性类型；对新老叶均无症状的植株认定为高度抗性类型。

3.1.8.2 大田病毒抗性检测方法

花粉管通道法获得的种子于 10 月份播种于田间，次年 4 月初小麦返青后接种 GPV 饲毒的蚜虫，每株接种 20-25 头，15 d 后详细记录发病情况。

3.2 结果与分析

3.2.1 农杆菌介导对小麦的遗传转化

3.2.1.1 hpRNA 真核表达载体构建

在克隆载体 pGEM- T easy 和 pGEM-3Z 中进行多次酶切、连接后，将 CP⁺，Rep⁻，CP⁻ 3 个片段按正确顺序连接成可以表达成双链茎环结构的 dsRNA，三个片段在 pGEM-3Z 中的酶切鉴定如图 3-3 所示。

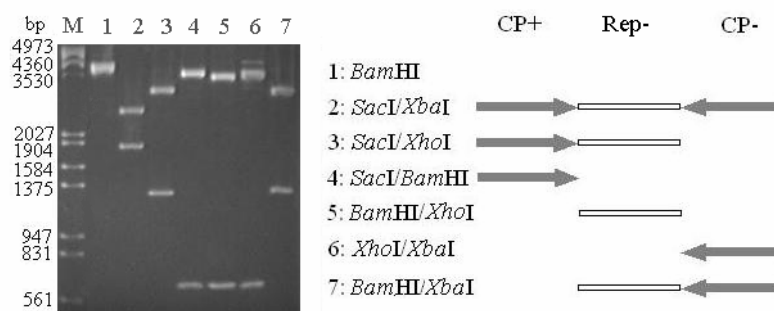


图 3-3 pGEM-3Z-CP⁺/Rep⁻/CP⁻酶切图谱

Figure 3-3 Restriction analysis of pGEM-3Z-CP⁺/Rep⁻/CP⁻

酶切结果表明 3 个片段是以正确顺序连接。同时, 以 T7 和 SP6 启动子序列为特异引物对 pGEM-3Z-CP+/Rep-/CP-载体中插入片段两端各测一个反应进行测序鉴定, 结果也同样证明了 3 个片段连接顺序的正确性。

而后, 用 *SacI* 和 *XbaI* 双酶切将 pGEM-3Z-CP+/Rep-/CP-中的 CP+/Rep-/CP-结构切下, 连入经同样酶切的双元载体 pBI121 中, 酶切鉴定连接正确后 (图 3-4), 命名为 pPPI31, 然后导入到农杆菌 LBA4404 中。

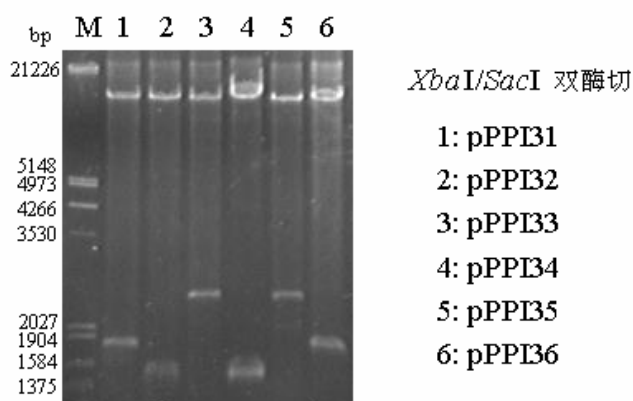


图 3-4 pPPI31-36 插入片段酶切鉴定图谱 (pPPI32-36 未在本文中用到)

Figure 3-4 Restriction analysis of pPPI31-36 by *XbaI/SacI* (pPPI32-36 are not used in this paper)

3.2.1.2 转化及再生植株的获得

转化材料是小麦开花 14 d 后剥离的幼胚 (图 3-5 A), 幼胚在 MS 诱导培养基上 24℃ 黑暗条件下生长 7-10 d 后, 可以看到有愈伤组织形成 (图 3-5 B), 此时即可用于农杆菌浸染 (图 3-5 C)。在剥离幼胚阶段, 共准备了 8000 个幼胚用于本次转化实验。经过 10 d 左右的诱导培养, 每个平板上都有几个幼胚处于生长停滞状态, 不产生愈伤组织。浸染时要去除这些“死亡”的幼胚, 最后阶段, 实际用于转化的幼胚数为 7200 个。

浸染后, 经过 3 d 的共培养, 将组织块转到含有筛选剂 G418 的 MS 筛选培养基上进行阳性愈伤组织的筛选和抑制农杆菌生长处理, 该过程在 24℃ 光照情况下进行的, 培养时间是 21 d。在筛选过程中, 有一部分组织块逐步褐化死亡, 其余部分则仍保持良好的生长状态 (图 3-5 D)。筛选过程完成后, 将抗性组织块转移到预分化培养基 (21 d)、分化培养基 (21 d), 促使分化。在分化期间, 又有一部分愈伤组织块褐化死亡, 而存活的组织块开始有大批量的绿色芽点出现 (最早在预分化之前少量愈伤组织块就开始有绿色芽点出现) (图 3-5 E), 开始分化。这些绿色芽点到分化后期有的能分化出绿苗 (图 3-5 F), 而有些则在筛选压力下白化、死亡 (图 3-5 G)。分化处理后, 共获得 432 株仍保持绿色的幼苗, 将这些幼苗基部的愈伤组织去除干净, 转移到含有壮苗培养基的大试管内, 进行生根壮苗培养 (图 3-5 H1)。该过程中, 又有一部分幼苗白化死亡 (图

3-5 H2), 最后经过 21-30 d 的生根壮苗处理, 有 253 株幼苗在壮苗过程中白化死亡; 有 179 株幼苗能够保持绿色, 正常生长, 但其中 76 株幼苗没有生根。将生根的 103 株 G418 抗性幼苗转移到温室花盆中, 最终成活 82 株 (图 3-5 I)。

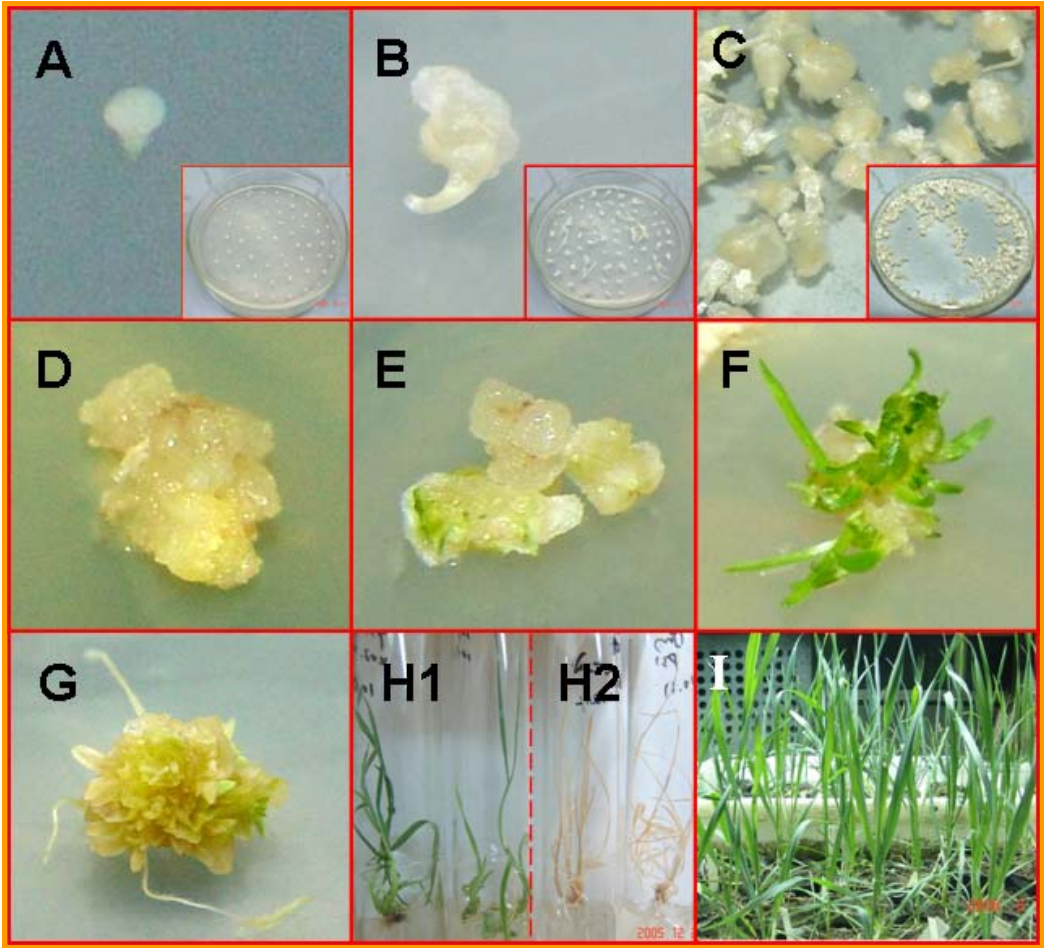


图 3-5 农杆菌介导法转化小麦胚愈伤组织及其再生

Figure 3-5 Transformation and regeneration of wheat calli mediated by *Agrobacterium*

A: 开花 14 d 后的小麦幼胚; B: 经 7-10 d 暗培养的小麦幼胚; C: 对组织块进行农杆菌浸染; D: 未分化之前的愈伤组织块; E: 组织块出现绿色芽点, 开始分化; F: 分化出的幼芽; G: 在 G418 筛选培养基上白化的幼芽; H: 幼芽转至含 G418 的壮苗培养基仍保持绿色的苗 (H1) 和白化的苗 (H2); I: 移入土壤的 G418 抗性植株

表 3-1 处于农杆菌介导不同转化阶段的组织块数

Table 3-1 Numbers of calli in different stages of transformation mediated by *Agrobacterium*

剥离幼胚 数(个)	浸染组织 块数(个)	壮苗前抗性 苗数(株)	壮苗后抗性 苗数(株)	移栽抗性苗 数(株)	成活数 (株)
8000	7200	432	179	103	82

3. 2. 1. 3 T0 代 G418 抗性植株的分子生物学检测

3. 2. 1. 3. 1 PCR 检测

对移栽成活的 82 株 G418 抗性再生植株进行 PCR 检测，目的片断是 CP 基因反向重复片断之间的 Rep 反义链序列，所用引物即为该片段的两端部分序列，扩增目的片断长度为 600 bp，退火温度为 58℃。

结果表明，在 82 株 G418 抗性植株中，有 75 株 PCR 结果呈阳性，抗性植株的 PCR 阳性率为 91.5%，部分电泳结果如图 3-6 所示。PCR 结果说明尽管经过长时期的筛选过程，仍有少量植株虽然未整合有标记基因，但仍能在 G418 筛选过程中幸存下来。

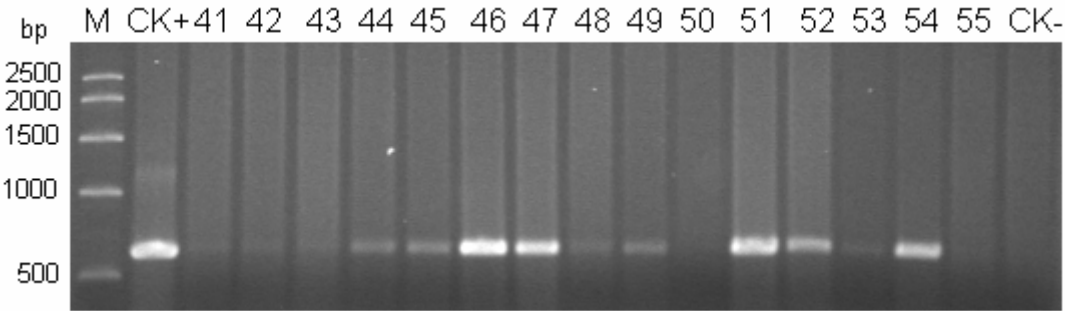


图 3-6 G418 抗性再生植株的 PCR 结果

Figure 3-6 PCR analysis of regenerated transgenic plants resistant to G418

3.2.1.3.2 Dot blot 检测

Dot blot 检测与抗病性检测同时进行，选取第一次接毒后不发病和发病症状轻的植株共 59 株进行 Dot blot 检测。结果表明，其中 46 株在 Dot blot 中有阳性信号，而其他 13 株没有信号，实验重复 2 次以后判定这 13 株为阴性植株。Dot blot 结果说明了外源基因片段存在于这 46 株小麦基因组中。

与 PCR 结果相比较，46 株 Dot blot 阳性植株在 PCR 结果中全部呈阳性，13 株 Dot blot 阴性植株中有 7 株在 PCR 结果中呈阴性，但有 5 株在 PCR 结果中呈阳性。这样的结果表明，虽然 PCR 时进行了 3 次重复，但仍存在一定比例的假阳性植株。在这些植株中，外源基因可能是以游离而非与染色体整合的状态存在，从而在在 Dot blot 中呈阴性。

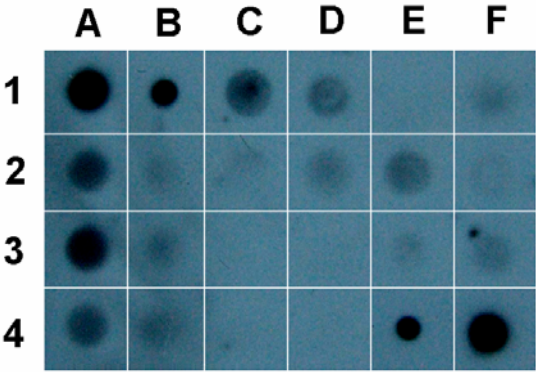


图 3-7 PCR 阳性植株的 Dot blot 检测

Figure 3-7 Dot blot of transgenic PCR positive wheat lines

A1, F4: 稀释 100×的阳性对照；B1, E4: 稀释 1000×的阳性对照；D4: 未转基因阴性对照；其余为转基因样品

3.2.1.3.3 Southern blot 分析

对 Dot blot 阳性植株 p31-57, p31-71, p31-77, p31-90 提取总 DNA, 进行 Southern blot 分析, 结果如图 3-8 所示。Southern blot 结果表明, 外源基因片段在再生小麦植株内以双拷贝形式存在, 这符合农杆菌介导法获得的小麦转基因植株中外源基因低拷贝插入的特点, 但这 4 株小麦同时表现双拷贝, 除了偶然性因素之外, 还存在因为信号弱而导致更小的靶条带显示不出的可能。

在对小麦中的外源基因进行 Southern blot 分析时, 小麦基因组 DNA 的质量、含量和酶切效果对杂交结果有很大影响。由于小麦基因组达 1.6×10^{10} bp, 分别是人类基因组和水稻基因组的 5 倍和 35 倍, 因此外源基因在基因组中的浓度相对较低, 提高 southern blot 时的 DNA 用量是获得较好杂交信号的主要手段; 然而, DNA 溶液浓度过高又使得单酶切效果不好, 所以调整 DNA 浓度与酶切时间是小麦外源基因 southern blot 分析的关键。本试验中的小麦 DNA 用量为 25 μ g, *Hind*III 单酶切 16 h, 获得了较弱的阳性信号。在此基础上进一步提高 DNA 含量, 有可能获得更强的阳性信号, 可是本试验中 T0 代植株的叶片不足以再提取更大量的 DNA, 所以未对 southern blot 结果作进一步优化。

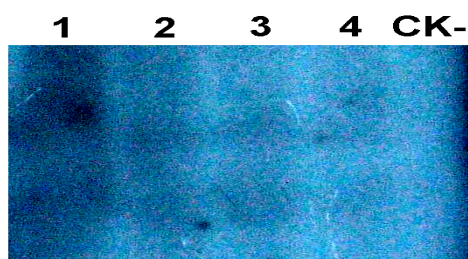
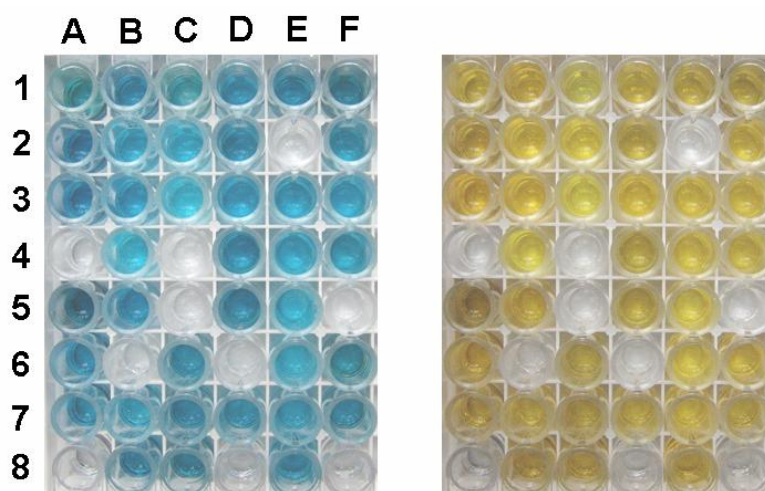


图 3-8 转 hpRNA 小麦再生植株的 Southern blot 分析

Figure 3-8 Southern blot of transgenic wheat expressing hpRNA of BYDV

1: p31-57, 2: p31-71, 3: p31-77, 4: p31-90, CK-: 未转基因对照

图 3-9 阳性植株的 *nptII* 产物 ELISA 检测Figure 3-9 ELISA of *nptII* production in positive transgenic wheat lines

左图为显色反应时结果，其中 A1 为阳性对照，F8 为阴性对照，其余为转基因样品（F5，F6，F7 为其他转基因样品）；右图为终止反应后的颜色，样品顺序与左图相对应。

3.2.1.3.4 *nptII* 基因产物的 ELISA 检测

为了检测整合到基因组中的外源基因能否正常表达，我们对整合框架中的标记基因 *nptII* 基因的表达产物新霉素磷酸转移酶进行 ELISA 检测。结果表明，在 46 株 Dot blot 阳性的植株中，有 9 株没有颜色反应，而其他 37 株具有不同颜色深浅的颜色反应，结果如图 3-9 所示。ELISA 结果说明经过培养过程中 G418 的筛选，大部分植株能够表达 *nptII* 基因，从而能够在 G418 筛选压下存活，然而仍有一些不能表达 *nptII* 基因的植株能够幸存下来。

ELISA 中加入显色底物后样品呈蓝色，颜色的深浅表明了植株中表达量的差异；加入 3M 硫酸终止反应后，原来呈蓝色的样品转为黄色。

3.2.1.4 再生植株的抗病性检测

对移栽成活的 75 株再生小麦植株进行第 1 次接毒试验，15dpi-30dpi 期间有 16 株表现出与对照非转基因植株同样的症状，表现为老叶片黄化严重，旗叶黄化，认定这些植株为感病植株，在后续鉴定中将这此植株淘汰；而其他 59 株植株没有发病或只是表现局部的褪绿，认定这些植株为抗性植株作进一步鉴定（图 3-10A）。

表 3-2 农杆菌转 hpRNA 小麦第 1 次接毒试验结果

Table 3-2 The first antiviral test of transgenic wheat transformed by *Agrobacterium*

第一次接毒抗性	株系
感病类型（16 株）	P31-9, 10, 11, 15, 26, 28, 29, 33, 47, 49, 52, 55, 56, 66, 76, 86
抗病类型（59 株）	P31-1, 3, 4, 6, 7, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 48, 50, 51, 53, 54, 57, 58, 59, 62, 63, 64, 67, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 90, 92

对第一次接毒表现抗性的 59 株转基因植株进行第二次高接毒量接毒，40 dpi 后总结发病记录，结合分子生物学检测结果将各株系发病症状及抗性程度总结如下表。

表 3-3 农杆菌转 hpRNA 小麦第 2 次接毒试验结果

Table3-3 Molecular detection and the second antiviral analysis results of transgenic wheat lines

株系	PCR	Dot blot	ELISA	初期症状（10-15dpi）	中期症状（16-25dpi）	后期症状（25-40dpi）	抗性程度
p31-1	-	-	0	无	老叶黄化	无	低
p31-3	+	+	-	老叶黄化	无	老叶梢部黄化	低
p31-4	-	-	0	无	无	老叶黄化	低
p31-6	+	+	-	无	老叶黄化	无	低

p31-7	+	+	+	无	老叶黄化	无	低
p31-13	+	-	0	无	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	中
p31-14	+	+	+	无	无	老叶梢部黄化	中
p31-16	+	-	0	无	老叶黄化	老叶黄化	低
p31-17	+	+	+	无	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄花	中
p31-18	+	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p31-19	+	+	+	无	无	老叶黄化	低
p31-20	+	+	+	无	无	无	高
p31-21	+	+	+	无	无	无	高
p31-22	-	-	0	无	无	老叶梢部褪绿	中
p31-23	+	+	-	无	老叶梢部黄化	老叶黄化	低
p31-25	+	+	+	无	无	无	高
p31-27	+	+	+	无	无	无	高
p31-31	+	+	+	老叶黄化	新叶皱缩, 卷曲	无	低
p31-32	+	+	+	无	无	无	高
p31-34	+	+	+	无	老叶黄化	老叶梢部黄化	低
p31-35	+	+	-	无	老叶梢部褪绿	老叶梢部褪绿	中
p31-36	+	+	+	无	无	无	高
p31-37	+	+	+	无	无	无	高
p31-38	+	+	+	老叶黄化	老叶梢部黄化	老叶黄化	低
p31-39	+	+	+	老叶梢部黄化	无	老叶梢部褪绿	中
p31-40	+	+	+	无	无	无	高
p31-41	+	+	+	老叶黄化	老叶梢部黄化	老叶梢部黄化	低
p31-43	+	+	+	老叶黄化	无	无	低
p31-45	+	-	0	无	老叶梢部黄化	老叶梢部褪绿	低
p31-48	+	+	+	老叶黄化	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	低
p31-50	+	-	0	无	老叶梢部褪绿	老叶黄化	低
p31-51	+	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p31-53	+	-	0	老叶黄化	无	老叶梢部黄化	低
p31-54	+	+	+	老叶黄化	老叶旗叶褪绿	老叶旗叶黄化	低
p31-57	+	+	-	老叶褪绿	老叶黄化	老叶黄化	低
p31-58	+	+	+	无	无	无	高
p31-59	+	+	+	老叶黄化	老叶梢部黄化	老叶黄化	低
p31-62	+	+	+	老叶梢部黄化	无	枯死	-
p31-63	+	+	+	无	老叶梢部黄化	无	中
p31-64	+	+	+	老叶梢部褪绿	老叶黄化	老叶梢部黄化	低
p31-67	+	+	+	无	老叶黄化	无	低
p31-71	+	+	+	无	无	无	高

p31-72	+	+	-	老叶黄化	老叶黄化	老叶黄化	低
p31-73	+	+	+	新叶皱缩	老叶皱缩	老叶梢部褪绿	低
p31-74	+	+	-	老叶梢部褪绿	老叶黄化	无	低
p31-75	-	-	0	无	老叶黄化	无	低
p31-77	-	-	0	无	老叶黄化	老叶黄化	低
p31-78	+	+	+	无	老叶梢部褪绿	无	中
p31-79	+	+	+	无	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	中
p31-80	+	+	+	无	老叶梢部褪绿	无	中
p31-81	+	+	+	老叶梢部褪绿	老叶黄化	老叶梢部黄化	中
p31-82	-	-	0	无	老叶黄化	无	低
p31-83	+	-	0	老叶梢部黄化	老叶梢部黄化	老叶梢部黄化	中
p31-84	+	+	-	老叶黄化死亡	老叶梢部黄化	老叶梢部黄化	低
p31-85	+	+	-	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	老叶黄化	低
p31-87	-	-	0	无	老叶黄化	无	低
p31-88	+	+	+	无	老叶梢部黄化	老叶黄化	低
p31-90	+	+	+	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	无	中
p31-92	+	+	+	老叶梢部褪绿	老叶梢部褪绿	无	中

注：+，结果呈阳性；-，结果呈阴性；0，未作检测

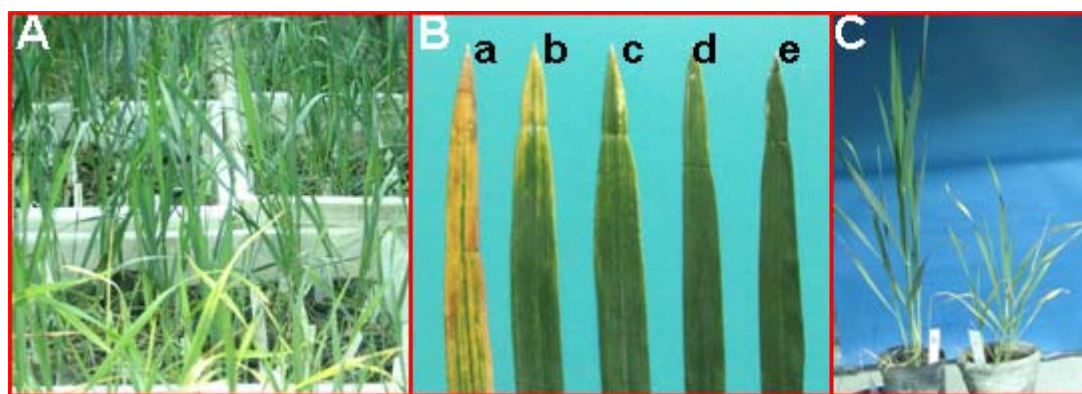


图 3-10 转 dsRNA 小麦植株抗 BYDV 检测

Figure 3-10 BYDV resistance test of transgenic wheat expressing dsRNA of BYDV

A 为第一次接毒后获得抗性植株（图片下部位为对照），B 为第二次接毒后叶片发病症状（a 为对照叶片黄化，b 为叶梢黄化，c 和 d 为叶梢褪绿，e 为无症状），C 为第二次接毒后获得高度抗性植株

抗性试验结合分子检测结果表明，在 Dot blot 呈阳性、ELISA 呈阳性的 37 株再生植株中有 14 株表现低度抗性，有 12 株表现中度抗性，有 10 株表现高度抗性，有 1 株在该过程中死亡。然而在高接毒量抗性检测过程中，有 3 株（p31-13, p31-35, p31-83）ELISA 成阴性（说明不表达外源基因）和 dot blot 呈阴性（说明未整合外源基因）的植株表现中度抗性，对于这些植株是否是由于遗传转化操作造成变异、这种表型能否遗传等问题，我们将会做进一步跟踪分析。

3. 2. 2 基因枪法对小麦的遗传转化

3. 2. 2. 1 hpRNA 真核表达载体构建

与农杆菌介导法相似,先在 pGEM-3Z 中构建 Rep+/CP-/Rep-结构,然后再将该结构导入 pEmu 载体得到 pPPI45,用于基因枪法对小麦的遗传转化。Rep+/CP-/Rep-结构的酶切鉴定图和 pPPI45 的酶切鉴定图分别如图 3-11 和图 3-12 所示。

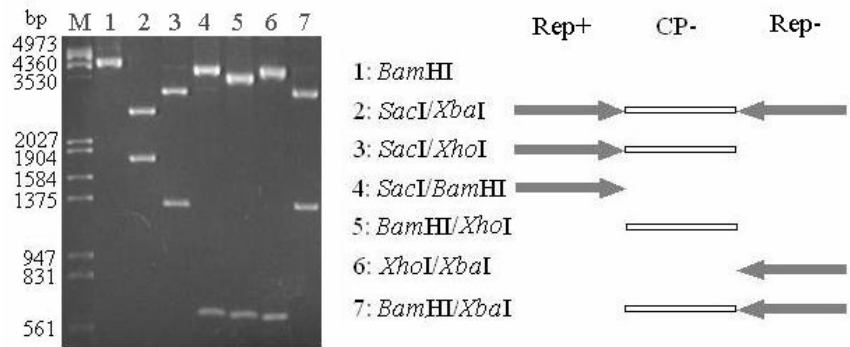


图 3-11 pGEM-3Z-Rep+/ CP- / Rep-酶切图谱

Figure 3-11 Restriction analysis of pGEM-3Z- Rep+/ CP- / Rep-

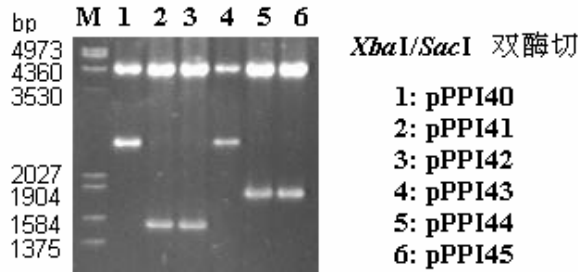


图 3-12 pPPI40-45 插入片段酶切鉴定图谱 (pPPI40-44 未在本文中用到)

Figure 3-12 Restriction analysis of pPPI40-45 by XbaI/SacI (pPPI40-44 are not used in this paper)

3. 2. 2. 2 质粒的纯化

用碱裂解法大量制备 pPPI44, pPPI45 质粒,然后用 CsCl 梯度离心法纯化环形质粒。超速离心后,在普通光照下可以看到离心管内各成分的分层情况(图 3-13 A)。用注射器将环形质粒 DNA 取出(图 3-13 B),然后用异戊醇多次抽提将溶液中的 EB 去除干净。

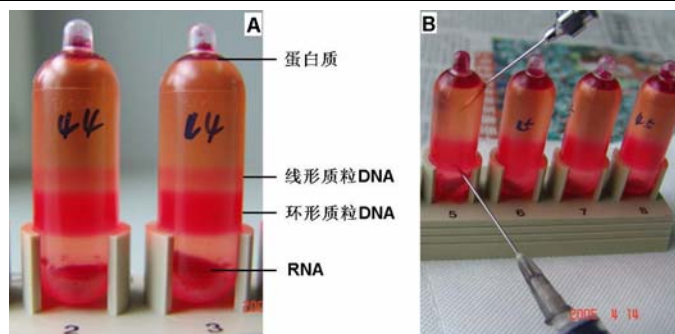


图 3-13 CsCl 纯化质粒

Figure 3-13 Purification of plasmid by CsCl

3.2.2.3 转化及再生植株的获得

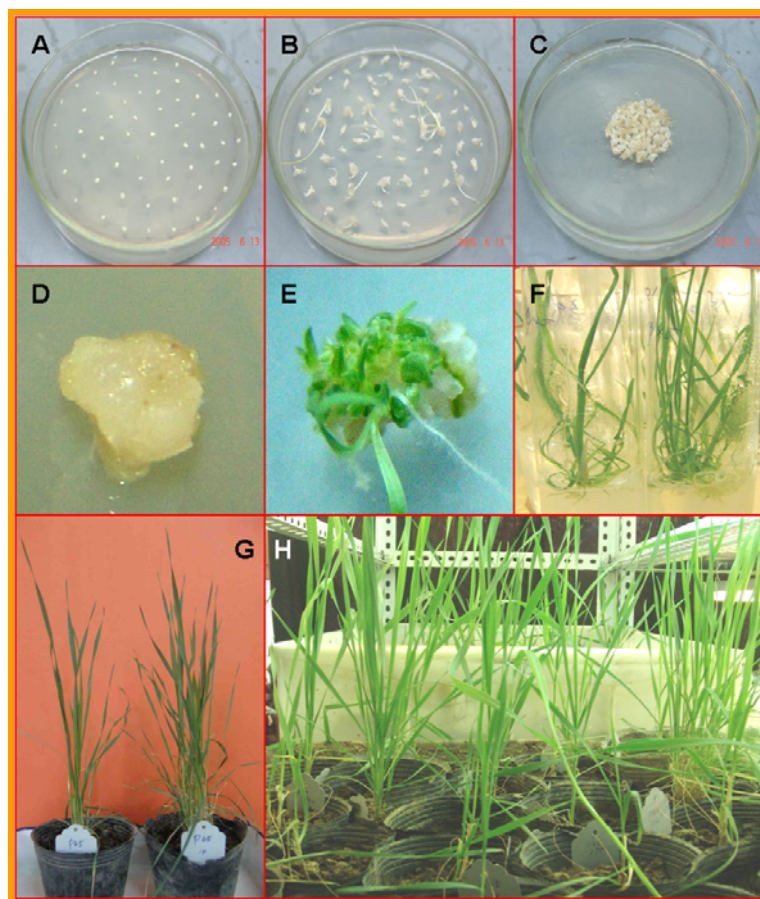


图 3-14 基因枪法转化小麦

Figure 3-14 transformation of wheat by particle bombardment

剥离的幼胚（图 3-14A）经过 7-10 d 的愈伤诱导（图 3-14B），转到 MS 高渗培养基上，在培养基中心处摆放成一硬币大小圆（图 3-14C），高渗处理 4-6 h 后进行基因枪轰击转化。转化完成后，继续在高渗培养基上保持 18-20 h，然后转至开始时的 MS 诱导培养基 24℃ 黑暗培养 14 d；经过这段时间的培养，愈伤组织块逐渐长大（图 3-14D），转移到同农杆菌介导法的预分化、

分化、壮苗培养基上后，组织块开始分化（图 3-14E），长出幼苗（图 3-14F），等到长出实生根后移栽到花盆土壤中（图 3-14G, H）。

基因枪法共轰击有效幼胚 2300 个，经过预分化、分化处理后共获得再生幼苗 114 株。

3. 2. 2. 4 T0 代再生植株的分子生物学检测

3. 2. 2. 4. 1 直接以处理后的叶片为模板进行的快速 PCR 检测

在基因枪法转化设计中，因为没有筛选标记基因存在，所以在后期转化苗的筛选过程中工作量将会很大。为了避免后期工作的积压，在将幼苗移入壮苗培养基之前，取 1.5 cm 的幼苗叶片经处理后放到 PCR 体系中直接进行扩增。共对移入壮苗培养基的 114 株幼苗进行叶片快速 PCR 分析，结果表明其中的 73 株有扩增条带（图 3-16），对这些植株进行壮苗培养后共获得移栽成活植株 64 株（表 3-4）。

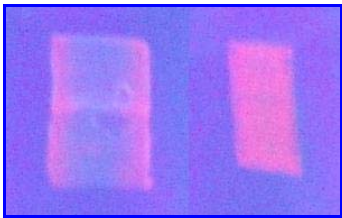


图 3-15 未经处理（左）和处理后（右）叶片 EB 染色结果

Figure 3-15 Stain results of control (left) and treated leaf (right) with EB

未经处理的叶片仅在剪切伤口处有荧光出现，而处理后的叶片通体发出较强的荧光，说明经过处理后的叶片表面细胞内基因组 DNA 已经裸露出来，可以作为 PCR 的模板用于扩增检测。

表 3-4 基因枪法转化幼苗数据

Table 3-4 Data about regeneration of wheat calli in particle bombardment

轰 击 幼 胚 数	再生幼苗 数	快速 PCR 阳性幼 苗数	移栽成活阳性幼 苗数	Dot blot 阳性
2300 个	144 株	73 株	64 株	

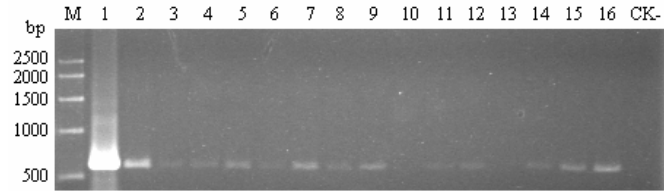


图 3-16 基因枪法转化小麦植株叶片快速 PCR 结果

Figure 3-16 Rapid PCR analysis of potential transgenic wheat obtained by particle bombardment

M 为 DNA 分子量标准；1 为质粒对照；2-16 为转基因样品；CK-为非转基因对照

3. 2. 2. 4. 2 Dot blot

对移栽成活的 64 株植株进行第 1 次接毒试验后,对其中的 30 株抗性植株进行 Dot blot 检测,结果表明其中的 21 株具有阳性信号(部分结果见图 3-17),其他 9 株不具有阳性信号,试验又重复 2 次后断定这 9 株为阴性植株。

分析这 9 株快速 PCR 呈阳性而 Dot blot 呈阴性结果的原因,可能是两方面的因素所造成:一是基因枪瞬时转化的影响,使得在幼苗期的细胞内存在有游离的未整合的质粒 DNA 片断;二是质粒污染的影响,基因枪轰击时金粉表面含有高浓度质粒 DNA,虽然经过近 40 d 的分化培养和 PCR 前的处理,幼苗叶片表面仍有可能附着痕量的质粒 DNA。这两方面的原因可能造成了快速 PCR 结果的假阳性。

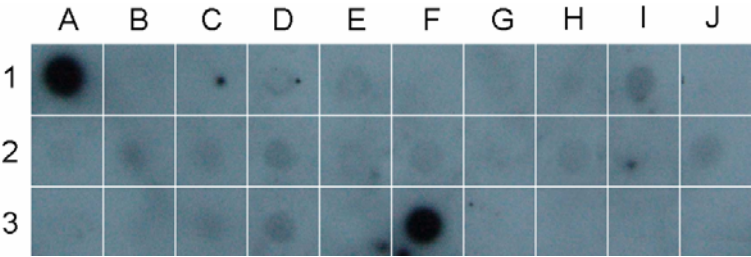


图 3-17 基因枪转化植株 Dot blot 检测结果

Figure 3-17 Dot blot of transgenic wheat DNA transformed though particle bombardment

A1 和 F3 为质粒对照; B1 和 E3 为非转基因对照; G3, H3, I3, J3 为空白对照; 其他为转基因样品

3. 2. 2. 5 再生植株的抗病性检测

移栽后的 64 株基因枪法再生小麦幼苗经过第一次的接毒试验,在第 10 dpi(day post infection)后,部分植株陆续发病。到 15 dpi 时,老叶片(新叶向下第 3-4 片叶)黄化严重、接近死亡、旗叶黄化的植株,我们认定其为感病类型,这样的植株有 34 株;在 15 dpi 至 30 dpi 期间,老叶片仅局部黄化,黄化区域不扩散或扩散缓慢,和不发病的植株,我们认定其为抗病类型,这样的植株有 30 株(图 3-18,表 3-5)。第一次接毒后的感病类型植株的发病情况与对照非转基因发病情况一致。

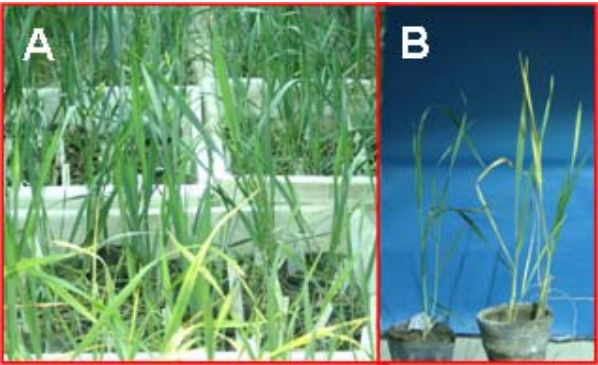


图 3-18 转 dsRNA 小麦植株抗 BYDV 检测

Figure 3-18 BYDV resistance test of transgenic wheat expressing dsRNA of BYDV

A 为第一次接毒后获得抗性植株(图片下部位为对照),B 为第二次接毒后获得高度抗性植株

表 3-5 基因枪法转基因植株第 1 次接毒试验结果

Table 3-5 The first antiviral test of transgenic wheat transformed by particle bombardment

第一次接毒抗感性	株 系
感病类型 (34 株)	p45-4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 22, 23, 25, 28, 29, 31, 33, 39, 42, 45, 59, 60, 61, 64, 67, 72, 88, 90, 91, 103, 104, 108, 112, 124
抗病类型 (30 株)	p45-1, 2, 5, 17, 32, 34, 35, 40, 41, 44, 47, 48, 58, 62, 69, 70, 71, 75-1, 92, 95, 105, 106, 111, 114, 115, 116, 119, 122, 123, 129

在第 1 次接毒 30 dpi 后对 30 株抗病植株进行第 2 次接毒并记录发病情况。40 dpi 后总结发病记录, 结合分子生物学检测结果将各株系发病症状及抗性程度总结如表 3-6。

表 3-6 基因枪法转基因抗性植株分子检测和第 2 次抗病结果

Table3-6 Molecular detection and the second antiviral analysis results of transgenic wheat lines

株系	快速 PCR	Dot blot	初期症状 (10-15dpi)	中期症状 (16-25dpi)	后期症状 (25-40dpi)	抗性
p45-1	+	-	无	无	无	高
p45-2	+	-	老叶梢部黄化	老叶黄化	老叶、旗叶黄化	低
p45-5	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p45-17	+	+	无	老叶梢部黄化	无	中
p45-32	+	-	无	老叶梢部褪绿	老叶黄化	低
p45-34	+	-	无	老叶梢部褪绿	老叶黄化	低
p45-35	+	+	老叶黄化	无	无	低
p45-40	+	+	无	无	无	高
p45-41	+	+	无	老叶黄化	无	低
p45-44	+	-	老叶黄化	老叶梢部黄化	老叶梢部黄化	低
p45-47	+	-	无	老叶黄化	老叶黄化	低
p45-48	+	-	老叶梢部黄化	老叶黄化	无	低
p45-58	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p45-62	+	-	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	老叶黄化	低
p45-69	+	+	无	无	老叶黄化	低
p45-70	+	+	无	无	老叶梢部黄化	中
p45-71	+	+	无	无	无	高
p45-75-1	+	+	无	无	无	高
p45-92	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p45-95	+	+	无	无	老叶梢部黄化	中
p45-105	+	+	无	无	无	高
p45-106	+	+	老叶梢部褪绿	老叶黄化, 新叶卷曲	老叶梢部褪绿	低
p45-111	+	+	无	无	无	高
p45-114	+	-	无	老叶梢部黄化	老叶梢部褪绿	中

p45-115	+	+	无	旗叶黄化	旗叶黄化	低
p45-116	+	+	无	无	无	高
p45-119	+	+	无	无	无	高
p45-122	+	+	无	无	无	高
p45-123	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p45-129	+	+	无	老叶梢部黄化	老叶梢部黄化	中

注：+，结果呈阳性；-，结果呈阴性

表 3-7 第 2 次接毒试验结果

Table3-7 the second antiviral test result

抗性程度	株系数（株）	株 系
低度抗性	5	P45-35, 41, 69, 106, 115
中度抗性	8	P45-5, 17, 58, 70, 92, 95, 123, 129
高度抗性	8	P45-40, 71, 75-1, 105, 111, 116, 119, 122

第二次接毒试验结果表明，有 12 株表现低度抗性，其中包括了经 Dot blot 鉴定呈阴性的 7 株小麦植株；有 9 株表现中度抗性，其中包括 1 株阴性植株；有 9 株没有任何症状发生，表现高度抗性，其中包括 1 株阴性植株。与其他的转化试验相比中，在中度抗性和高度抗性的植株都有阴性植株存在，这可能由无标记基因导致筛选压力不足、转化操作导致遗传变异等造成。我们将保存这些阴性抗性材料以对这些植株进行大田接毒试验，作进一步抗性鉴定。

3.3.3 花粉管通道法对小麦的遗传转化

3.3.3.1 hpRNA 真核表达载体构建

用构建的 pPPI44，pPPI45 载体进行花粉管通道法转化，pPPI45 载体构建策略及结果在基因枪转化部分已说明，pPPI44 在材料与方法和基因枪转化部分已述及。

3.3.3.2 转化及转化种子的获得

在小麦扬花期，共选择 2000 个小花用于转化，其中用载体 pPPI44 转化 1200 个小花，用 pPPI45 载体转化 800 个小花；最后分别获得种子 545 和 367 粒（表 3-7）。

表 3-8 花粉管通道法所用载体及转化结果

Table 3-7 Vectors used for transformation though pollen tube path way and transformation results

载体名称	插入片段结构	处理小花儿数（个）	获得种子数（粒）
pPPI44	CP+/Rep-/CP-	1200	545
pPPI45	Rep+/CP-/Rep-	800	367

因为转化时需用剪刀将柱头剪下，滴加外源目的 DNA，这样的外界刺激对小麦的结实造成很大的影响，除了表现在结实率低外，结实的种子也比未经处理的个体要小（图 3-19），重量也轻（表 3-8）。

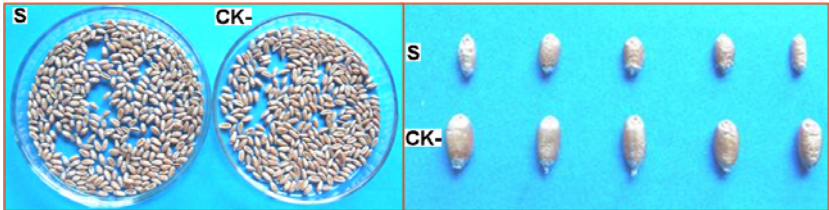


图 3-19 未转化和经转化小花儿结实籽粒比较

Figure 3-19 Seeds from treated wheat flowers and untreated control flowers

S, 转化后小花结实籽粒; CK-, 未处理小花结实籽粒

表 3-9 未转化和经转化小花儿结实籽粒重量比较

Table3-8 Weight comparison of seeds from treated wheat flowers and untreated control flowers

处理情况	籽粒数	总重（克）	千粒重（克）
转化后	912	24.893	27.295
未转化	1100	34.452	31.320

3.3.3.3 T1 代植株的抗病性筛选

将花粉管通道法转化小麦获得的种子播种于田间，来年返青后接饲毒 3 d 的蚜虫。接虫 20 d 后多数植株开始发病，然而大约共有 18 株小麦症状较轻，其中转 p44 质粒植株 10 株，转 p45 质粒植株 8 株，症状如图 3-20A 所示。

接虫 34 d 后，田间调查植株的发病情况，发现原来症状较轻的 18 株小麦有 16 株表现出明显的黄化症状，但仍有 2 株症状不明显，如图 3-20B 所示。

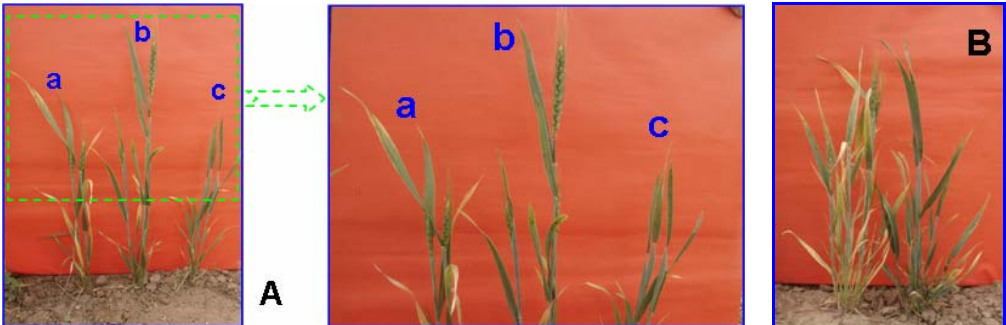


图 3-20 花粉管通道法转化小麦获得的 T1 代植株抗病毒试验

Figure 3-20 Antivirus test of T1 transgenic wheat plants obtained by pollen tube path way

图 A 为接毒 20 d 时的结果，a 为发病症状，b 和 c 为未发病植株；图 B 为接毒 34 d 后发病植株与症状不明显植株

3.4 讨论

小麦基因组达 1.6×10^{10} bp, 分别是人类基因组和水稻基因组的 5 倍和 35 倍, 同时小麦组织分化能力弱, 这使得在拟南芥菜、烟草、水稻上经常使用的转基因技术不能简单地移植到小麦转基因研究中。在近 20 年来的研究中, 国内外学者通过对不同小麦品种的选择、外植体的选择, 以及对转化手段尤其是农杆菌介导转化法的改进, 使得近年来成功获得目的表型转基因小麦植株的报道越来越多。

3.4.1 小麦遗传转化的外植体选择

尽管在瞬时表达研究中, 多种不同来源的小麦外植体都可以获得较好的结果, 但能够获得再生植株的外植体仅局限于小麦的幼穗和幼胚 (Jones, 2005)。在近些年来的研究中, 使用最多的受体材料是经预培养适当天数的幼胚, 试验表明它可适于基因枪法和农杆菌法介导的小麦转化。根据小麦不同基因型, 最佳的幼胚预处理时间大约在 1-2 周之内。本研究使用的小麦品种是陇鉴 127, 本实验室的前期研究表明, 预培养 7-10 d 获得的幼胚愈伤组织拥有最高的再生潜能, 因此本研究采用这一数据进行小麦转基因程序。从转化情况来看, 当转化后愈伤组织转到愈龄 (自幼胚预培养之日算起) 为 24 d 时, 愈伤组织开始有芽点出现, 到分化中期组织块基本 (愈龄 80 d) 停止分化, 在筛选压力下 (农杆菌介导法) 能够分化的组织块约在 40% 左右; 而在无筛选压力 (基因枪转化) 时, 能够分化的组织块占到 60% 以上。这样的分化能力已经能够满足小麦的遗传转化。

3.4.2 小麦遗传转化方法

基因枪法是早期小麦转基因研究中应用最频繁的手段, 只要组织材料的分化情况较好就不受基因型的影响, 这样的稳定性是基因枪法的优势之一。

为了避免转基因后代的生物安全性问题, 也为了提高转化效率和降低外源插入片段对基因组的影响, 本实验转化过程中未使用标记基因, 这无疑会大大增加后期的筛选工作难度。为了解决后期筛选问题, 我们改变传统先获得再生植株再进行分子检测的路线, 在分化出幼苗的早期即通过叶片的快速 PCR 检测转基因小麦的阳性植株, 大大节省了后期的工作量; 同时在进一步的分子验证过程中, 结合抗病结果, 淘汰掉感病的转基因植株, 只有在有抗性的植株中筛选潜在的阳性植株, 也大大节约了获得阳性抗性植株的时间。最终在具有抗性的再生植株中共筛选到 21 株 Dot blot 阳性植株, 通过此种转化途径及筛选办法获得阳性植株的比率为 0.91%。

基因枪法在外源基因插入位点的多元化、复杂化的特点和其耗费较高的缺点推动了农杆菌介导小麦转化研究的发展和应用, 在近几年, 已经有多个实验室均获得了不同小麦基因型的转基因再生植株。同基因枪法相比, 农杆菌介导法的优点是转移的外源基因拷贝数少; 插入后片段稳定, 很少重排; 具有较大的片断承载能力等 (Jones *et al*, 2005)。然而研究表明, 不同的小麦基因型对不同农杆菌菌株的敏感性不同; 不同双元载体和宿主菌组合后的转化能力也不同 (Wu *et al*, 2003; Jones, 2005; Jones *et al*, 2005)。本研究使用的小麦品种陇鉴 127 对农杆菌菌株 LBA4404 敏感, 而

菌株 LBA4404 与 pBI121 载体组合并未在已报道的小麦转化中应用 (Jones *et al*, 2005)。实验的最终结果表明 LBA4404 -pBI121 的菌株-载体组合可以应用于小麦的转基因研究。

本实验农杆菌介导法中共对约 7200 个幼胚进行转化, 获得 PCR 阳性植株 75 株, PCR 阳性获得率约为 1%。在农杆菌介导法应用中, 试验人员的工作经验对试验结果有非常大的影响, 如在本实验中的生根培养环节, 前期近乎一半的绿色幼苗生根率只达 30%左右, 虽然后期有所改善, 但之前的损失已经无法挽回; 另外在移栽管理方面也造成了一定损失。根据目前的经验和本试验的操作方法, 该农杆菌介导小麦转化体系至少应该能够达到 2%的 PCR 阳性植株获得率。

花粉管通道法是我国科研工作者开发利用的一种小麦转化方法, 在过去 10 年里, 本实验室一直致力于该方法的改进工作。在过去的工作中, 经常采用目的片段和标记基因共转化的方法对小麦进行转化。本研究中, 为了提高转化频率和避免有关转基因安全性问题的发生, 我们只使用目的片段, 不加标记基因对小麦植株进行转化, 希望能够获得尽量多的目的表型植株。在后代筛选方面, 由于没有标记基因, 只能通过分子生物学手段检测目的基因的存在与否, 而这无疑加大了筛选工作量。对此问题, 我们改变传统的先分子检测、再对阳性植株进行抗病检测的常规路线, 将转基因筛选直接与转基因的目的相结合, 对获得 T1 代幼苗直接进行病毒抗性实验, 而后对抗性实验呈阳性的植株进行分子生物学检测, 这就大大地减少了工作量。

3.4.3 hpRNA 介导的抗性

在抗 BYDV 转基因研究中, Keov 等、McGrath 等和 Wang 等通过基因枪法利用病毒的 CP 基因片段和复制酶基因片段获得对 BYDV 表现一定抗性的转基因燕麦和大麦, 表现出病毒量减少和 (或) 症状减轻性状, 然而这种性状在后代遗传中表现不稳定。我们实验室一直在做抗 BYDV 转基因小麦方面的工作, 获得了转 CP 基因、复制酶片段的转基因植株, 但抗性程度不高, 表现出延迟症状发生和症状减轻性状。这种抗性程度不高的状况伴随着 RNAi 机制的深入研究而得到逐步改善, Wang 等通过农杆菌介导法将表达病毒 hpRNA 结构的表达框架导入大麦获得了能够稳定高度抗性的转基因小麦, 并且这种性状在后代中能够稳定遗传。

众多的试验已经表明, 通过在植物体内表达病毒某基因的 dsRNA, 可有效强化植物体针对病毒基因组的 RNAi 作用, 为植物抗病毒基因工程研究提供了新途径。在以往的 RNAi 介导抗病毒研究中, 都是针对病毒的某一个基因或者是两个相邻的基因 (连续的核苷酸序列) 构建反向重复表达载体 (Wang *et al*, 2000; Tenllado *et al*, 2001; Kalantidis *et al*, 2002; Nicola-Negri *et al*, 2005), 使之在植物体内表达, 从而达到抗病毒目的。本实验利用病毒来源的不同基因片段构建成一个不但可表达复制酶基因片段的 RNA 双链, 还可同时表达 CP 反义链的结构, 因为反义链也能在某种程度上抑制同源基因表达 (Wesly, *et al*, 2001), 所以这样的复合结构可以通过在病毒 RNA 链的多个位点起始干扰效应, 而达到进一步提高干扰效率、提高抗病程度的目的。虽然本实验最终获得多株高度抗性植株, 但由于传代少, 目前还不能确定抗性能否稳定遗传, 因此并未对该复合结构是否起到了预期的效应作进一步检测, 我们将在后代稳定抗性株系的研究中就此问题作进一步探讨。

在病毒抗性试验中, 对抗性植株进行第 2 次高接毒量的接毒, 不但可以了解在模拟室外高毒

量环境下再生植株的抗性程度，同时也表明了这种抗性的一个特点，即低接毒量时表现抗性的植株在高接毒量时可能会发病，说明 dsRNA 介导的这种抗性对于 BYDV 来讲可能具有病毒剂量效应的特点。目前对于 BYDV 是如何积累这种剂量效应的还不清楚，根据最新植物 RNAi 与抗病毒研究进展（燕飞等，2004；Qu *et al.*, 2005），我们认为，BYDV 有可能通过抑制植物体的 RNAi 过程来逐步提高对 RNAi 的抵抗能力；同时，BYDV 在小麦体内含量很少，在含量相对少的情况下尚能起到抑制 RNAi 作用，据此可以预测 BYDV 的这种抑制 RNAi 的能力可能还会很强。我们将对此作进一步研究。

第4章 *pac1* 介导抗 BYDV 转基因小麦研究

在目前的抗病毒转基因小麦研究中,抗性基因的来源仍局限于致病病毒本身,如CP基因(片断)(Cheng *et al*, 1994; 董瑾等, 2002),复制酶基因(片断)(吴茂森, 2000),运动蛋白基因(片断)(晋治波, 2003)等,不管其介导抗性程度如何,这些基因(片断)诱导的抗性的一个显著特点是专一性,即所获得的抗性转基因植株只对抗性基因同源的病毒有抗性,对其他病毒不起作用。基于不同的理论基础对多种病毒有抗性的抗性基因如*pac1* 基因(Watanabe *et al*, 1995; Sano *et al*, 1997), PAP基因(Dasgupta *et al*, 2003)已经在烟草等植物上应用,获得的再生植株表现出对多种病毒的抗性,而在小麦抗病毒基因工程研究中应用这些基因的报道还很少。

pac1 基因来源于粟酒酵母,编码一个有 364 个氨基酸的蛋白质,其羧基端与大肠杆菌核糖核酸酶III有同源性(Watanabe *et al*, 1995)。体外酶活测定表明, PAC1 具有降解番茄花叶病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)、CMV、水稻矮缩病毒(*Rice dwarf virus*, RDV)双链RNA和马铃薯纺锤块茎类病毒(*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd)的功能。由于大多数植物病毒为RNA病毒,不管其基因组是单链还是双链,在寄主体内复制过程都会有一个双链RNA中间体阶段,如果通过基因工程手段将*pac1* 基因转入植物体,利用其降解病毒dsRNA的活性而阻断病毒复制过程,就有可能达到抗植物病毒的目的。并且*pac1* 的作用靶位点只针对RNA双链,对RNA的序列无特殊要求,这就扩大了其对病毒抗性的广谱性。Watanabe等(1995)将*pac1* 基因导入烟草,获得了抗ToMV、CMV、PVY的转基因烟草;Sano等(1997)将*pac1* 基因导入马铃薯,获得了抗PSTVd的转基因马铃薯。同时,实验表明这些转基因植株生长状态良好,没有异常表型出现,说明*pac1* 基因不会对植物体造成伤害,可以作为广谱病毒抗性基因在植物抗病毒基因工程中加以应用。

本试验利用克隆自粟酒酵母的 *pac1* 基因通过农杆菌介导法转化小麦,分子生物学验证了再生小麦中外源基因的整合和表达情况;接种大麦黄矮病毒(*Barley yellow dwarf virus*, BYDV)检测了转基因小麦植株的抗性情况。

4.1 材料与方法

4.1.1 载体

利用本实验室构建的真核表达载体 pBI121-*pac1* 进行小麦的遗传转化,该载体是用 *pac1* 基因替换 pBI121 中的 *gus* 基因构建而成,图谱如下。

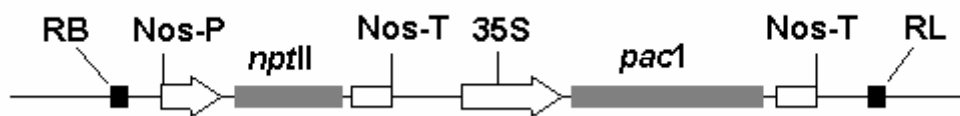


图 4-1 pBI121-*pac1* 图谱

Figure 4-1 Map of pBI121-*pac1*

4.1.2 农杆菌介导转化

与第 3 章农杆菌介导转化部分相同。

4.1.3 T0 代再生植株的分子生物学检测

PCR, Dot blot, Southern blot 方法与第 3 章有关部分相同; ELISA 检测方法参见第 2 章。
RT-PCR 时取 2 μg RNA, 在 30 μl 体系中 (200 U MMLV, 50 U RNasin, 3 μl 0.1 mol/L DDT, 1 μl 10 mmol/L dNTPs, 2 μg 下游引物), 在 42℃下反应 2 h。取 5 μl 反转录产物为模板进行 PCR。PCR 引物根据 *pac1* 羧基末端保守序列设计可扩增 600 bp 片段的上游引物 P4 (5'-ATCCAAATCAGTCGAATCCG-3'), 下游引物 P5 (5'-AGAGTAATCTTTTGCAA GG-3')。为了防止 RNA 样品中的 DNA 污染, PCR 时每个样品取 1 μg 未转录的 RNA 作为阴性对照。

4.1.4 病毒抗性检测方法

温室内进行 T0 代的 BYDV 抗性检测, 方法同第 3 章。

4.2 结果与分析

4.2.1 转基因再生植株的获得

实验共对 6300 个有效幼胚进行农杆菌介导 *pac1* 对小麦的遗传转化, 经过与第 3 章农杆菌介导部分相同的筛选、分化壮苗后 (图 4-2), 共获得 82 株绿色幼苗, 但其中有 30 株没有生根; 将生根的 52 株 G418 抗性幼苗转移到温室花盆中, 最终成活 41 株 (表 4-1)。

表 4-1 处于农杆菌介导不同转化阶段的组织块数

Table 4-1 Numbers of calli in different stages of transformation mediated by *Agrobacterium*

剥离幼胚数(个)	浸染组织块数(个)	壮苗前抗性苗数(株)	壮苗后抗性苗数(株)	移栽抗性苗数(株)	成活数(株)
7000	6300	226	82	52	41

4.2.2 转基因再生植株的分子检测

再生植株的分子生物学检测与病毒抗性检测同时进行, 选择首次接毒无发病症状和症状较轻的 30 株小麦做 PCR 和 Dot blot 检测。结果在 30 株再生幼苗中有 27 株有 PCR 扩增目的条带, 而其他 3 株没有扩增条带, 实验进行 3 次重复以后确认这 27 株是转基因阳性植株。提取这 27 株阳性植株总 DNA 进行 Dot blot 的检测, 结果与 PCR 结果一致, 说明外源插入片段存在于小麦染色体中。

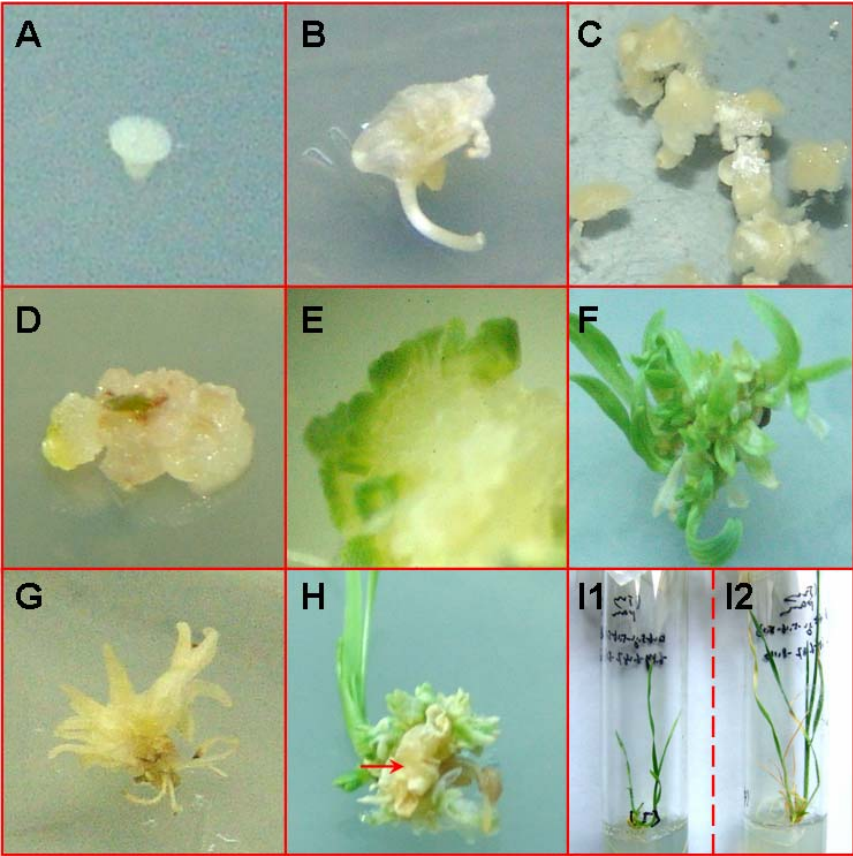


图 4-2 农杆菌介导 *pac1* 基因转化小麦

Figure 4-2 Transformation of wheat with *pac1* though *Agrobacterium*

A, 开花 14d 的小麦幼胚; B, 预培养 7-10d 的幼胚; C, 农杆菌浸染转化; D, G418 筛选中正常生长的组织块; E, 组织开始分化; F, 组织块分化出幼芽; G, 筛选过程中白化的幼芽; H, 筛选过程中正常生长的幼芽(箭头示同一愈伤块上白化的幼芽); I, 壮根培养基上正常生长的幼苗 (I1) 和逐渐发生白化的幼苗 (I2)

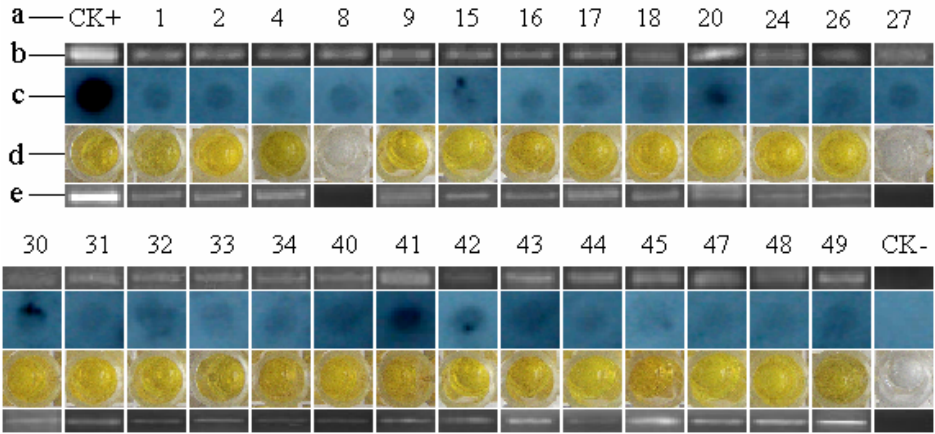


图 4-3 转基因植株的分子生物学检测

Figure 4-3 Molecular detection of transgenic wheat lines

a 为样品编号, b 为 PCR 扩增 *pac1* 基因结果, c 为以 *pac1* 基因片段为探针的 Dot blot 结果, d 为 *nptII* ELISA 结果, e 为 *pac1* RT-PCR 结果; CK+ 为阳性对照(PCR、dot blot 和 RT-PCR 时为含有 *pac1* 的质粒; ELISA 时为 NPTII 蛋白样品), CK- 为非转基因植株

在农杆菌介导转化过程中，包含于 T-DNA 内的 *nptII* 基因伴随目的基因一同转移，插入植物基因组中。实验对 27 株阳性再生小麦植株做 *nptII* 的 ELISA 检测表明，有 25 株具有颜色反应，而其他 2 株（*pac-8*, *pac-27*）没有颜色反应。结果说明，经过 G418 筛选后的再生植株大部分是能够表达 *nptII* 基因的转基因植株，但仍有不能表达 *nptII* 的 2 株转基因植株能够在 G418 筛选压力下幸存下来。标记基因的表达说明插入小麦基因组的 T-DNA 框架能够在多数小麦体内正常转录和翻译。对于 *pac-8*, *pac-27* 这 2 株 PCR、dot blot 阳性植株不能表达标记基因，可能是由于 T-DNA 插入框架不能在基因组内表达所造成。

以提取的 ELISA 阳性植株总 RNA 进行 RT-PCR 检测，结果表明，在 ELISA 呈阳性的植株中均能够扩增出 600 bp 的片段（图 4e），而在非转基因植株（图 4e）和直接以 RNA 为模板的 PCR 扩增（结果未显示）中没有目的条带出现，这进一步证实了 *pac1* 基因能够在这些植株体内正常表达。而对 *pac-8*, *pac-27* 进行 RT-PCR 仍没有目的条带出现，进一步证明了标记基因和目的基因的沉默是由于完整的外源框架发生沉默所致，对于造成外源框架沉默的原因，有可能是框架插入到了基因组异染色质区域，导致外源基因在转录水平发生沉默，从而不能正常表达外源序列。

4.2.3 转基因再生植株的抗病性鉴定

对实验获得的 41 株农杆菌介导转 *pac1* 基因小麦进行第 1 次接毒后，从第 10 dpi 开始，部分植株开始发病，发病植株基本与对照病程一致，只是最早发病的植株比对照植株提前 3 天，并且在统计期间（10 dpi 至 30 dpi）有 4 株发病严重，其中的 3 株很快死亡（21-24 dpi 时），另 1 株主茎黄化死亡时分蘖还保持绿色，但到 30 dpi 时也死亡。最后到 30 dpi 为止，共有 11 株（包括死亡的 4 株）表现明显的老叶片严重黄化（表现在黄化叶片多，单叶片黄化面积大）、旗叶黄化症状，我们判定其为感病类型植株，直接淘汰，不对其进行第 2 次接毒；而其他 30 株除个别植株表现老叶片褪绿外不表现任何症状，我们判定其为抗性植株（图 4-4A），对这些植株进行第 2 次接毒试验。

表 4-2 转 *pac1* 基因植株第 1 次接毒试验结果

Table4-2 Result of the first antiviral analysis on transgenic wheat lines

第一次接毒抗感性	株系
感病类型（11 株）	p-3, 7, 10, 11, 13, 14, 21, 22, 25, 28, 41
抗病类型（30 株）	p-1, 2, 4, 8, 9, 15, 16, 17, 18, 20, 24, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 41, 40, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 51, 52

表 4-3 转 *pac1* 基因植株分子生物学检测数据

Table4-3 Data of molecular detection for transgenic *pac1* wheat plants

移栽成活	第 1 次接毒抗性苗数	PCR 阳性	Dot blot 阳性	ELISA 阳性	RT-PCR 阳性
41 株	30 株	27 株	27 株	25 株	25 株

对第一次接毒表现抗性的 30 株转基因植株进行第二次高接毒量接毒，40 dpi 后总结发病记

录, 结合分子生物学检测结果将各株系发病症状及抗性程度总结如下表。

表 4-4 转 *pac1* 基因抗性植株分子检测和第 2 次抗病结果

Table4-3 Molecular detection and the second antiviral analysis results of transgenic *pac1* wheat lines

株系	PCR	Dot blot	ELISA	RT-PCR	初期症状 (10-15 dpi)	中期症状 (16-25 dpi)	后期症状 (25-40 dpi)	抗性程度
p-1	+	+	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p-2	+	+	+	+	无	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	中
p-4	+	+	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p-8	+	+	-	-	无	老叶梢部黄化	老叶梢部黄化	低
p-9	+	+	+	+	老叶梢部黄花	无	旗叶梢部黄化	低
p-15	+	+	+	+	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	老叶黄化	低
p-16	+	+	+	+	老叶梢部黄化	无	无	中
p-17	+	+	+	+	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	老叶黄化	低
p-18	+	+	+	+	老叶皱缩	老叶皱缩梢部黄化	无	中
p-20	+	+	+	+	无	老叶梢部黄化	老叶梢部黄化	低
p-24	+	+	+	+	老叶黄化	老叶黄化	老叶黄化	低
p-26	+	+	+	+	老叶梢部黄化	老叶、旗叶黄化	旗叶黄化	低
p-27	+	+	-	-	无	老叶梢部黄化	老叶梢部黄化	低
p-29	-	-	0	0	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	老叶黄化	低
p-30	+	+	+	+	无	无	无	高
p-31	+	+	+	+	老叶黄化	老叶黄化	植株死亡	低
p-32	+	+	+	+	无	老叶梢部黄化	老叶梢部黄化	低
p-33	+	+	+	+	新叶黄绿条纹	老叶黄化	植株死亡	低
p-34	+	+	+	+	新叶缺刻	老叶缺刻、黄化	老叶黄化	低
p-40	+	+	+	+	新叶皱缩	老叶缺刻	无	中
p-41	+	+	+	+	无	老叶黄化	老叶黄化	低
p-42	+	+	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p-43	+	+	+	+	新叶黄化、卷曲	老叶缺刻	无	中
p-44	+	+	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p-45	+	+	+	+	无	老叶黄化	老叶黄化	低
p-47	+	+	+	+	无	老叶梢部褪绿	老叶梢部黄化	中
p-48	+	+	+	+	无	无	老叶梢部褪绿	中
p-49	+	+	+	+	老叶黄化	无	无	中
p-51	-	-	0	0	老叶黄化	老叶黄化	老叶褪绿	低
p-52	-	-	0	0	老叶黄化	老叶黄化	老叶黄化	低

注: +, 结果呈阳性; -, 结果呈阴性; 0, 未作检测

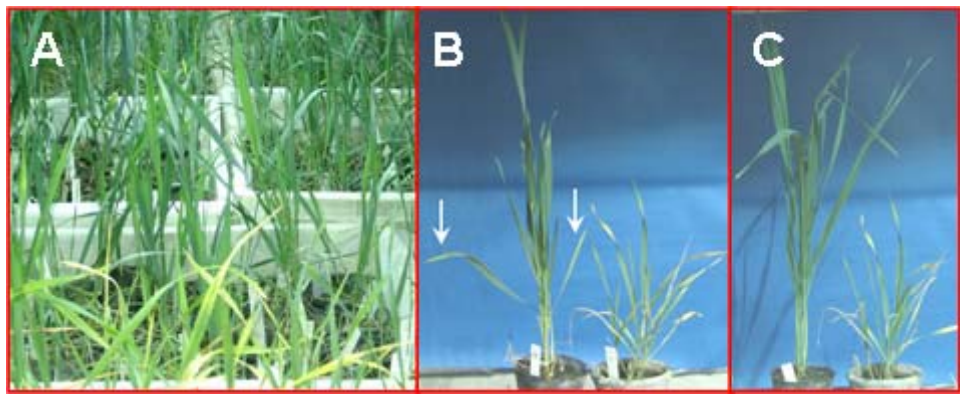


图 4-4 转 *pac1* 小麦植株抗 BYDV 检测

Figure 4-4 BYDV resistance test of transgenic wheat expressing *pac1* of BYDV

A 为第一次接毒后获得抗性植株（图片下部位为对照），B 为第二次接毒后获得中度抗性植株（箭头指叶片梢部轻微褪绿），C 为第二次接毒后获得高度抗性植株

在第 1 次接毒 30 dpi 后对 30 株抗病植株进行第 2 次接毒并记录发病情况。对接下来 30 d 内老叶黄化严重，旗叶梢部褪绿、黄化的植株认定为低度抗性类型；对老叶片仅局部黄化，或梢部轻微褪绿的植株认定为中度抗性类型（图 4-4B）；对新老叶均无症状的植株认定为高度抗性类型（图 4-4C）。第 2 次接毒 30 d 后统计发病记录，结果有 17 株表现低度抗性，这其中包括了在 Dot blot 分析中结果呈阴性的 3 株小麦和 ELISA 中呈阴性的 2 株小麦；有 12 株表现中度抗性；有 1 株没有任何症状发生，表现高度抗性。

表 4-5 PCR、Dot blot 阳性植株第二次接毒后症状表现和抗性程度

Table 4-5 Different levels of resistance to BYDV for PCR, Dot blot positive lines in the second antiviral test

株 系	症 状			抗性程度
	初期（1-10 dpi）	中期（11-20 dpi）	后期（21-30 dpi）	
Pac-8, 9, 15, 17, 20, 24, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 41, 45	叶梢褪绿或黄化	近 1/2 叶片面积发生黄化	近 1/2 叶片面积发生黄化	低度抗性
Pac-1, 2, 4, 16, 18, 40, 42, 43, 44, 47, 48, 49	无	叶梢褪绿	叶梢褪绿或黄化	中度抗性
Pac-30	无	无	无	高度抗性

4.3 讨论

小麦病毒病害给小麦生产造成严重损失，以往的小麦抗病毒基因工程研究主要应用来源于病原物的基因（片段）来获得对该病毒有抗性的转基因植株，而应用广谱病毒抗性基因进行小麦转基因研究的还很少，仅有 2001 年 Zhang 等在 Transgenic research 上发表的利用大肠杆菌 RNaseIII 基因通过基因枪法获得了抗大麦条纹花叶病毒的小麦再生植株，可是原核生物的功能基因能否在真核生物体内持续、稳定地表达并行使功能还是未知数。

在以往的实验中,日本的 Watanabe 等, Sano 等和我国的步威等都对 *pac1* 的 dsRNA 降解活性做过检测,结果表明 *pac1* 原核表达产物在体外能够对 ToMV, CMV, PSTVd 的 dsRNA 表现出良好的降解活性。本实验室用 RDV dsRNA 检测 *pac1* 原核表达产物的活性也获得了同样结果,进一步证实 *pac1* 针对 dsRNA 而对序列无特殊要求的降解活性。本文利用来源于酵母的 *pac1* 基因进行小麦基因工程研究具有以下特点:①*pac1* 的广谱病毒抗性特点有希望获得对多种病毒有抗性的转基因小麦;②真核基因与原核基因相比能够更稳定地在真核细胞内表达、执行功能和遗传。

对于 *pac1* 介导植物病毒抗性的理论基础,还有一点需要特别提到,也是很让人感兴趣的问题:*pac1* 是否与 RNA 干扰机制有关? RNAi 是真核生物体内的一种沉默基因表达的机制(Meister *et al*, 2004),是植物体内的天然抗病毒防御体系(Wang *et al*, 2005),也是目前生命科学各领域研究的热点之一;该过程是由 Dicer 酶特异性切割 dsRNA 成 siRNA 后起始干扰效应的,而 Dicer 也是一种 RNaseIII 类似物,同样包括 RNaseIII 结构域和 dsRNA 结合结构域,又都存在于真核生物体内。*pac1* 是否同 Dicer 功能一样,可以引发 RNAi 过程呢?这是很值得进一步研究的问题,这不但有助于深入了解 *pac1* 的作用机理,也为抗病毒基因工程研究有提供了新的思路,即通过转入 Dicer 类似基因而强化植物体的 RNAi 机制也有可能达到抗病毒的目的。

BYDV 抗性实验结果首先表明了 *pac1* 在小麦体内的表达确实起到了抵抗 BYDV 引发病症的作用。虽然从目前 RT-PCR 的结果还看不出 *pac1* 的表达量与抗性程度的正相关关系,如表达量较高的 *pac*-43、45 植株表现中度抗性,而表达量处于平均水平的 *pac*-30 却表现高度抗性,但因为 mRNA 翻译成蛋白质的过程可能还受到转录后基因沉默等的影响而导致 mRNA 表达水平不能反映蛋白质的表达水平,所以我们将后面的实验中对 *pac1* 的表达蛋白作进一步检测以明确蛋白表达量与抗性程度之间的关系。BYDV 抗性实验结果同时也表明 *pac1* 介导的抗性可能具有剂量效应,在低度抗性和中度抗性的转基因植株中表现很明显:在低接毒量时转基因植株不发病,而当接毒量提高时就会表现出不同程度的症状。这可能是由于 *pac1* 表达量一定时,过量的病毒 dsRNA 导致 PAC1 蛋白反应底物的过饱和状态,从而使得部分病毒 dsRNA 未受到 PAC1 的影响能够正常复制、增殖。

对于转基因小麦能否对其他小麦病毒表现抗性、真正达到广谱抗病毒的目的,以及这种抗性的剂量效应是否也在其他病毒中体现,我们将在后续的工作中做进一步研究。同时对于转基因小麦的病毒抗性能否在后代植株中稳定遗传,我们也将在今后的工作中深入研究。

第5章 正反向双启动子 dsRNA 双元表达载体构建

目前,针对某个已知的基因,设计可诱导其沉默的 siRNA,通过合适的手段导入细胞或机体,使该基因表达水平下降或完全沉默,从而了解该基因的功能,是 RNA 干扰技术在目前最广泛的应用。同时,借助操作简便的 RNA 干扰技术,使得在基因组水平批量地沉默众多基因,短期内对大量基因的功能进行鉴定成为可能,这首先在果蝇和线虫上成功应用。Boutros 等(2004)针对果蝇基因组设计了 19470 个不同的 siRNA 屏蔽果蝇培养细胞基因组内的基因,鉴定出了 438 个与细胞的生长变异有关的基因。Kim 等(2004)则对果蝇的胚胎进行了基因组范围内的 RNA 干扰分析后,从 5800 多个基因中鉴定出在果蝇心脏形成过程中发挥重要作用的一系列编码转录因子及细胞信号蛋白的基因。这些基因的发现对于深入了解果蝇的发育生物学将起到极大的促进作用。在利用 RNA 干扰技术进行哺乳动物基因功能鉴定方面,目前还没有规模性鉴定基因功能的报道,大多只是对所研究的某一个基因利用 RNA 干扰手段了解其作用。最近 Berns 等(2004)和 Paddison 等(2004)进行的 RNA 干扰文库的研究工作大大促进了哺乳动物中大范围的基因功能遗传缺失研究。Berns 等针对 7914 个人类基因建立了可表达 23742 个不同 siRNA 的 RNA 干扰文库,并证实了该文库的有效性;而 Paddison 等不但建立了可作用于 9610 个人类基因的 RNA 干扰文库,同时还建立了针对 5563 个小鼠基因的 dsRNA 表达文库。这些 RNA 干扰库的建立将为全面而深入地了解哺乳动物的基因功能打下坚实的基础。

众多实验结果显示,利用 RNA 干扰技术进行功能基因组分析的巨大优势是可快速建立基因与表型之间的直接对应关系,在较短的时间内明确众多基因的功能。在动物及医学研究中,诱导 RNAi 的起始物多是目的基因的 siRNA,主要通过化学手段体外合成或通过载体体内表达产生。可是,从目前各公司合成价格情况来看,体外合成费用很高,一对 siRNA 的价格在 2000 元(人民币)左右,而针对一个基因要想获得较高沉默效率的 siRNA,至少要合成 4 对 siRNA 来比较沉默效率,这对于研究单个基因来说费用还能够接受,如果在基因组范围内研究众多基因功能则费用问题可能会限制研究的进展,所以这时,人们都采用载体表达的方法来产生目的基因的 siRNA。可是,这也同样有一个问题,目前人们导入哺乳动物细胞、线虫、果蝇的表达载体,都有一个目的小片段(21-26nt)的反向重复序列结构,有时在中间还插入一段几个核苷酸的间隔序列,这就涉及多个片段的连接或者合成,所以费用同样较高,对于小片段的操作也需要一定的实验技术。这些费用上困难或者操作上的不便对于国内外资金投入很高的医学分子生物学、功能基因组学来说或许不是各自研究领域的瓶颈问题,然而对于资金投入相对较少的植物功能基因研究来讲,经费还是很多实验室不得不考虑的问题。对于植物中的 RNAi 技术应用,人们大多采用载体表达较长的 dsRNA 来达到试验目的,而 dsRNA 的产生是通过中间连有间隔序列的基因片段的反向连接结构表达产生的。该结构的构建涉及 3 个或 2 个片断的连接,同样,对于单个基因的研究,构建一个这样的结构不是一个难题,可是如果要象线虫或果蝇中的研究那样,在基因组范围内大批量的沉默众多基因,都通过该种方式反向连接的话,那么工作不仅量大而且繁琐,费用也较高。

本试验尝试构建一个双启动子的载体,能够一步插入目的序列后,即可表达产生其同源基因

的 dsRNA，这不但可减少工作量，也极大降低了实验费用。这个载体在植物功能研究中应用潜力很大，尤其应用于功能基因组众多基因的功能鉴定，优势更加明显。同时，在双启动子 dsRNA 植物表达载体中插入植物病毒基因组片段也可应用于植物抗病毒基因工程研究。

5.1 材料与方法

5.1.1 表达框架构建

在克隆载体内构建图 5-1A 的表达框架，该框架含有正向的一套 35S::NosT 元件和一套反向的 35S::NosT 表达元件，中间的插入序列两端含有克隆位点，可以插入目的基因的部分序列，表达目的基因的 dsRNA（图 5-1D）。

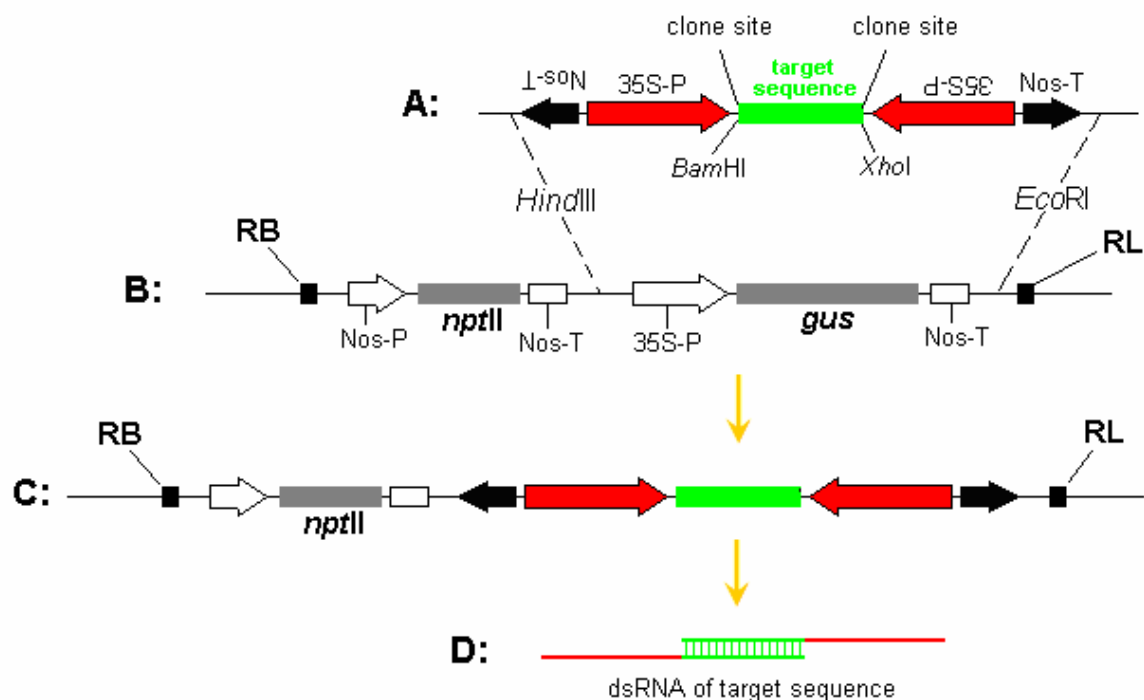


图 5-1 所构建的阅读框架表达示意图

Figure 5-1 Expression frame constructed for test

5.1.2 载体构建

用 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切将上述表达框架连入同样双酶切的 pBI121 中（图 5-1B, C），替换下 pBI121 中的 35S:*gus*:Nos-T 表达框，酶切鉴定连接正确后，用液氮冻融法导入农杆菌 LBA4404。

5.1.3 功能检测体系

为了检测该载体能否有效诱导目的基因的表达沉默,我们以转绿色荧光蛋白的本珊烟(16c)中的 *gfp* 为目的基因,利用农杆菌瞬时转化烟草叶片,在紫外光下观察叶片变色情况并拍照。操作步骤如下:

- ① 将构建好的 *gfp* 沉默载体 0.1 μg 加入到 100 μl 农杆菌 LBA4404 感受态细胞中,液氮冷冻 5 min 后取出融化,加入 500 μl YEB 培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 4 h 后离心去除上清 400 μl ,剩余 200 μl 重悬菌体,全部涂布于含有链霉素(50 mg/L)和卡那霉素(50 mg/L)的 YEB 固体培养基上,25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d。
- ② 挑取单菌落于液体 YEB 培养基(含链霉素 50 mg/L,卡那霉素 50 mg/L)中,28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜;次日按 1:100 的比例重新加入到 YEB 液体培养基(含链霉素 50 mg/L,卡那霉素 50 mg/L)中,等到 OD₆₀₀ 达 0.5 时取出,离心收集菌体,重悬于 MgCl₂(0.01 mmol/L)和 MES(0.01 mmol/L)中;利用 1 ml 注射器对含有 *gfp* 基因的烟草叶片进行注射转染,分别在 4 d、7 d、9 d 和 11 d 后在长波紫外灯下观察叶片变化情况,拍照。同时,以插入无关序列的载体为对照进行转染。
- ③ 提取叶片总 RNA,反转录后以 *gfp* 两端序列为引物作 RT-PCR,检测 *gfp* mRNA 的存在情况。

5.2 结果与分析

5.2.1 表达框架的序列测定

表达框架构建完成后,对其进行序列测定以验证结构的正确性。结果表明,各元件没有碱基错误,并以预期的方式组合成表达框架。

5.2.1 农杆菌瞬时转染转 *gfp* 烟草

利用农杆菌瞬时转化系统转染含有 *gfp* 基因的烟草叶片后 4 d (4dpi), 7 dpi, 9 dpi, 11 dpi 时在长波紫外灯下观察叶片变化情况,结果如图 5-2 所示。与对照相比,处理的叶片在 7 dpi 时开始变红,到第 11 dpi 时叶片转染部分完全变红。这样的结果说明在转染部位, *gfp* 的表达受到了由载体表达的 dsRNA 的抑制,从而不能显示荧光(图 5-3)。

对这些叶片中的 *gfp* mRNA 进行 RT-PCR 分析(图 5-4),证实了在有颜色反应的叶片中没有 *gfp* mRNA 的存在,说明已经被 RNAi 机制所降解,从而不能表达 GFP。

5.3 讨论

本试验成功构建了双启动子 dsRNA 植物表达载体,并通过农杆菌瞬时转化系统成功利用该载体沉默了转 *gfp* 基因烟草叶片中的 *gfp* 表达,证明了这种载体的有效性。该载体实现了通过 1 个连接反应即可完成传统方法需 2 至 3 个连接反应才可完成的能表达双链 RNA 的植物表达载体构建过程,大大节约时间和财力。可应用于植物功能基因组学研究、病毒沉默抑制蛋白研究和植

物抗病毒基因工程研究；尤其适用于在基因组范围沉默众多基因表达的植物功能基因 RNA 干扰库的建立。

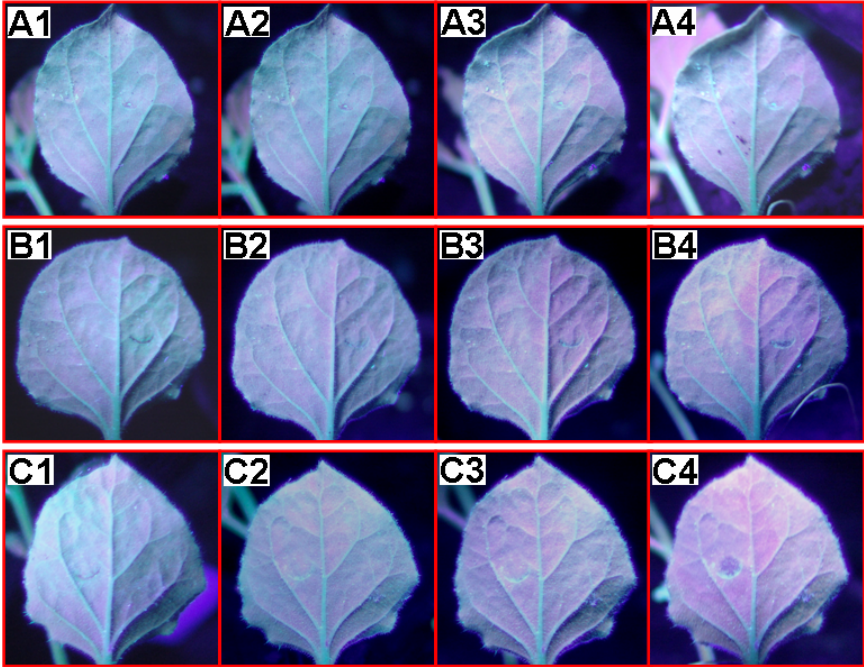


图 5-3 利用载体沉默转 *gfp* 烟草中的 *gfp* 表达

Figure 5-3 Silencing *gfp* expression in *N. b* (16c) though constructed vector

A1, A2, A3, A4 分别为对照在转染烟草叶片后 4、7、9、11 d 的颜色变化；B1, B2, B3, B4 分别为沉默 *gfp* 载体转染烟草叶片 a 后 4、7、9、11 d 时的颜色变化；C1, C2, C3, C4 分别为沉默 *gfp* 载体转染烟草叶片 b 后 4、7、9、11 d 时的颜色变化

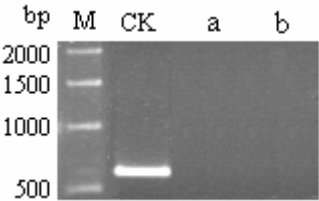


图 5-4 转染后叶片 *gfp* 的 RT-PCR 结果

Figure 5-4 RT-PCR for *gfp* in *N.b* (16c) after transient transformation by *Agrobacterium*

M: Marker; CK: 对照; a, b: 分别为瞬时转化后的叶片 a 和叶片 b

第 6 章 结论与展望

6.1 结论

6.1.1 获得多株对 BYDV 表现不同程度抗性的转复合 hpRNA 小麦再生植株

与以往针对单一序列构建发夹 RNA 进行抗病毒研究工作不同, 本实验构建、应用了不同病毒基因组片段构成的复合 hpRNA 结构进行 RNAi 介导的抗病毒研究工作。

通过农杆菌介导法、基因枪法、花粉管通道法将构建的复合 hpRNA 结构导入小麦。PCR、Dot blot、ELISA、Southern blot 检测和抗病性检测表明: ①农杆菌介导法共获得 37 株对 BYDV-GPV 表现抗性的转基因再生植株, 其中有 14 株表现低度抗性, 有 12 株表现中度抗性, 有 10 株表现高度抗性, 另外 1 株在实验过程中死亡; Southern blot 表明外源基因在小麦体内以双拷贝形式存在。②基因枪法获得 21 株阳性植株, 其中 5 株表现低度抗性, 8 株表现中度抗性, 8 株表现高度抗性; 同时建立了不含标记基因叶片快速 PCR 筛选体系。③花粉管通道法获得 3 株对 BYDV-GPV 表现抗性的植株, 目前正在对其进行分子生物学鉴定。

6.1.2 获得多株对 BYDV 表现不同程度抗性的转 *pac1* 基因小麦再生植株

通过农杆菌介导法将 *pac1* 基因导入小麦, PCR、Dot blot、ELISA、RT-PCR 检测证实, 共获得 25 株能够正常表达外源基因的转基因阳性植株, 其中 12 株对 BYDV-GPV 表现低度抗性, 12 株中度抗性, 1 株高度抗性。对于转 *pac1* 基因小麦能否对其他小麦病毒表现抗性、真正达到广谱抗病毒的目的, 我们将在后续的工作中做进一步研究。

6.1.3 转基因植株对 BYDV 抗性的剂量效应

在两种不同方式介导抗性的转基因研究中, 抗病毒检测表明, 它们表现出的病毒抗性有一个共同的特征, 即部分植株在低接毒量时不发病, 但在高接毒量时却表现出不同程度的发病症状。由于这些特征在 hpRNA 和 *pac1* 介导的转基因研究中尚未有过公开报道, 对于这种抗性的病毒剂量效应产生的原因还不清楚。结合最新的研究进展, 我们认为 hpRNA 介导抗性的剂量效应的产生可能与 BYDV-GPV 编码沉默抑制蛋白有关; 而 *pac1* 介导抗性的剂量效应可能与酶切反应底物过饱和有关。

6.1.4 正反向双启动子 dsRNA 双元表达载体构建

针对构建 hpRNA 时需要多次连接反应的问题, 设计了一个含有新型表达框架的双元载体, 只要通过 1 步连接反应即可完成可表达目的基因 dsRNA 的真核表达载体构建过程。以转有绿色荧光蛋白的烟草中的 GFP 为沉默目的基因, 通过农杆菌瞬时转化技术成功地沉默烟草中的 GFP,

这就证实了该载体的有效性。该载体可广泛应用于植物功能基因组研究、病毒沉默抑制蛋白研究、植物抗病毒基因工程研究。

6.2 展望

6.2.1 转基因植株后代的抗性遗传分析

转 hpRNA 小麦再生植株后代的病毒抗性检测、外源基因拷贝数的遗传变化及遗传分离情况还需要作进一步研究；对遗传稳定、抗性明显的株系需要检测 siRNA 的存在与否以证明 hpRNA 确实引发了体内的 RNAi 机制。对于转 *pac1* 基因小麦的后代植株除了作同上的遗传分析外，还要接种其他小麦病毒以检测其抗性程度；另外，进一步验证和明确 *pac1* 基因表达产物的体外活性、以及表达量与抗性程度之间的关系有助于进一步证明转基因小麦的抗病性。

6.2.2 BYDV-GPV 的沉默抑制蛋白分析

分析 BYDV-GPV 能否编码沉默抑制蛋白有助于揭示 hpRNA 介导病毒抗性的剂量效应，同时对于 BYDV 分子生物学研究有重要意义。在这个研究过程中，可以应用经典的同源基因引发基因沉默体系，还可同时应用本实验新构建的载体即 dsRNA 引发的同源基因沉默体系进行研究。因为目前沉默抑制蛋白种类的多样化、作用方式的多样化暗示它们可能针对不同的基因沉默方式有不同的反应模式。

参考文献

- Aapola AI, *et al.* Relationships among three isolates of *barley yellow dwarf virus*. *Virology*, 1971, 46(1): 127-141
- Alder MN, *et al.* Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference. *RNA*, 2003, 9(1): 25-32
- Allen E, *et al.* *Barley yellow dwarf virus* RNA requires a cap-independent translation sequence because it lacks a 5' cap. *Virology*, 1999, 253(2): 139-144
- Amarzguioui M, *et al.* An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(4): 1050-1058
- Anderson JM, *et al.* A defective replicase gene induces resistance to *cucumber mosaic virus* in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(18): 8759-8763
- Ashrafi K, *et al.* Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*, 2003, 421(6920): 268-272
- Bahner I, *et al.* Expression of the genome of *potato leafroll virus*: readthrough of the coat protein termination codon in vivo. *J Gen Virol*, 1990, 71 (Pt 10): 2251-2256
- Bastiaan BJ, *et al.* RDE-2 interacts with MUT-7 to mediate RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(1): 347-355
- Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*, 2004, 431(7006): 356-363
- Baulcombe DC, *et al.* Crystal structure of p19 - a universal suppressor of RNA silencing. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(6): 279-281
- Baulcombe DC. Mechanism of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell*, 1996, 8(10): 1833-1844
- Baulcombe DC. Replicase-mediated resistance: a novel type of virus resistance in transgenic plants. *Trends Microbiol*, 1994, 2(2): 60-63
- Beachy RN. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, 8(2): 215-220
- Bendahmane A, *et al.* Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J*, 2000, 21(1): 73-81
- Bendahmane A, *et al.* The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*, 1999, 11(5): 781-792
- Berns K, *et al.* A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, 2004, 428(6981): 431-437
- Bernstein E, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, 409(6818): 363-366
- Boutros M, *et al.* Genome-Wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science*, 2004, 303(5659): 832-835

- Boyko V, *et al.* Intramolecular complementing mutations in *tobacco mosaic virus* movement protein confirm a role for microtubule association in viral RNA transport. *J Virol*, 2002, 76(8): 3974-3980
- Brakke MK, *et al.* Ribonucleic acid of *barley yellow dwarf virus*. *Virology*, 1974, 61(1): 240-248
- Brault V, *et al.* Effects of point mutations in the major capsid protein of *beet western yellows virus* on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *J Virol*, 2003, 77(5): 3247-3256
- Brault V, *et al.* Aphid transmission of *beet western yellows luteovirus* requires the minor capsid read-through protein P74. *EMBO J*, 1995, 14(4): 650-659
- Brault V, *et al.* Effects of point mutations in the readthrough domain of the *beet western yellows virus* minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J Virol*, 2000, 74(3): 1140-1148
- Brault V, *et al.* The *polerovirus* minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. *J Virol*, 2005, 79(15): 9685-9693
- Brault V, *et al.* Translational frameshifting mediated by a viral sequence in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(6): 2262-2266
- Brault V, *et al.* Virus-induced gene silencing in transgenic plants expressing the minor capsid protein of *Beet western yellows virus*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2002, 15(8): 799-807
- Braun CJ, *et al.* Hemenway expression of amino-terminal portions or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to *potato virus X* infection. *Plant Cell*, 1992, 4(6): 735-744
- Brown CM, *et al.* Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the *barley yellow dwarf virus* PAV coat protein gene stop codon. *J Virol*, 1996, 70(9): 5884-5892
- Bruehl GW, *et al.* Host range of two strains of the *barley yellow dwarf virus*. *Plant Dis Rep*, 1957, 41(7): 730-734
- Brummelkamp TR, *et al.* A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, 296(5567): 550-553
- Bruyere A, *et al.* Effects of mutations in the *beet western yellows virus* readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology*, 1997, 230(2): 323-334
- Bucher E, *et al.* Negative-strand *tosopoviruses* and *tenuiviruses* carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J Virol*, 2003, 77(2): 1329-1336
- Chay CA, *et al.* Aphid transmission and systemic plant infection determinants of *barley yellow dwarf luteovirus*-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology*, 1996, 219(1): 57-65
- Chen CC, *et al.* A member of the polymerase beta nucleotidyltransferase superfamily is required for RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol*, 2005, 15(4): 378-383
- Chen J, *et al.* Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell*, 2004, 16(5): 1302-1313
- Cheng ZM, *et al.* *Barley yellow dwarf virus* coat protein gene and transgenic wheat plants obtained by pollen tube path way. *Prog Nat Sci*, 1994, 4(2): 235-240

- Cheng ZM, *et al.* Resistance to virus gene expression in transgenic wheat plants. *High Technology Letters*, 1996, 2(2): 103-106
- Cheng ZM, *et al.* Transgenic wheat plants resistant to *barley yellow dwarf virus* obtained by pollen tube pathway-mediated transformation. *Chinese Agricultural Science – For the compliments to the 40th Anniversary of the Chinese Academy of Agricultural Science*. China Agricultural Sciencetech Press, 1997: 98-108
- Cheng ZM, *et al.* Transgenic wheat plants resistant to *barley yellow dwarf virus* obtained by pollen tube pathway-mediated transformation. In: *Agricultural Biotechnology: Laboratory, Field and Market---Proceedings of the 4th Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology*. P. J. Larkin, ed. Darwin Australia, 1998: 21-23
- Chi H, *et al.* Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(1): 420-427
- Chi JT, *et al.* Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(11): 6343-6346
- Chisholm ST, *et al.* Cloning of the Arabidopsis *RTM1* gene, which controls restriction of long-distance movement of *tobacco etch virus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(1): 489-494
- Chiu Y, *et al.* siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA*, 2003, 9(9): 1034-1048.
- Citovsky V, *et al.* The P30 movement protein of *tobacco mosaic virus* is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell*, 1990, 60(4): 637-647
- Citovsky V, *et al.* Transport of nucleic acids through membrane channels: snaking through small holes. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 47: 167-197
- Cook HA, *et al.* The *Drosophila* SDE3 homolog armitage is required for oskar mRNA silencing and embryonic axis specification. *Cell*, 2004, 116(6): 817-829
- Cooper B, *et al.* A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology*, 1995, 206(1): 307-313
- Dasgupta I, *et al.* Genetic engineering for virus resistance. *Curr Sci*, 2003, 84(3): 341-354
- Deom CM, *et al.* Molecular characterization and biological function of the movement protein of *tobacco mosaic virus* in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(9): 3284-3288
- Deom CM, *et al.* Plant virus movement proteins. *Cell*, 1992, 69(2): 221-224
- Doi N, *et al.* Short-interfering –RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr Biol*, 2003, 13(1): 41-46
- Dong X, *et al.* Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol*, 2003, 77(12): 7026-7033
- Donson J, *et al.* Broad resistance to *tobamoviruses* is mediated by a modified *tobacco mosaic virus* replicase transgene. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1993, 6(5): 635-642
- Dunoyer P, *et al.* Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded

- suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, 2004, 16(5): 1235-1250
- Durand-Dubief M, *et al.* TbAGO1, an Argonaute protein required for RNA interference is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Biol*, 2003, 1(1): 2
- Elbashir SM, *et al.* Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*, 2001, 20(23): 6877-6888
- Elbashir, SM, *et al.* RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188-200
- Fire A, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811
- Gadani F, *et al.* Genetic engineering of plants for virus resistance. *Arch Virol*, 1990, 115(1-2): 1-21
- Gerlach WL, *et al.* Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of *tobacco ringspot virus*. *Nature*, 1987, 328(6133): 802-805
- Golemboski DB, *et al.* Plants transformed with a *tobacco mosaic virus* nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(16): 6311-6315
- Guilley H, *et al.* Nucleotide sequence of *cucurbit aphid-borne yellows luteovirus*. *Virology*, 1994, 202(2): 1012-1017
- Habili N, *et al.* Evolutionary relationship between *luteoviruses* and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(23): 9543-9555
- Hall IM, *et al.* RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(1): 193-198
- Hamilton A, *et al.* Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4671-4679
- Harrison BD, *et al.* Virus resistance in transgenic plants that express *cucumber mosaic virus* satellite RNA. *Nature*, 1987, 328(6133): 799-802
- Havelda Z, *et al.* In situ characterization of *Cymbidium Ringspot Tombusvirus* infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol*, 2003, 77(10): 6082-6086
- Herbers K, *et al.* Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *Plant J*, 1997, 12(5): 1045-1056
- Hiatt A, *et al.* Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 1989, 342(6245): 76-78
- Hohjoh H. Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes. *FEBS Lett*, 2004, 557(1-3): 193-198
- Hu T, *et al.* *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(10): 1010-1019
- Hulanicka MD, *et al.* ORF1 of *potato leafroll virus* encodes a serine proteinase indispensable for viral replication. Oral presentation at the XIth International Congress of Virology, Sydney, 9-13 August 1999
- Hutvagner G, *et al.* A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002,

- 297(5589): 2056-2060
- Iino Y, *et al.* *S. pombe pac1*, whose overexpression inhibits sexual development, encodes a ribonuclease III-like RNase. EMBO J, 1991, 10(1): 221-226
- Jackson AL, *et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nat Biotechnol, 2003, 21(6):635-637
- Jahn M, *et al.* Genetic mapping of the *Tsw* locus for resistance to the *Tospovirus Tomato spotted wilt virus* in *Capsicum spp.* and its relationship to the *Sw-5* gene for resistance to the same pathogen in tomato. Mol Plant-Microbe Interact, 2000, (6): 673-682
- Jansen KA, *et al.* Characterization of the *brome mosaic virus* movement protein expressed in *E. coli*. Virology, 1998, 242(2): 387-394
- Jayaram C, *et al.* Nucleotide sequences of the coat protein genes of two aphid-transmissible strains of *soybean mosaic virus*. J Gen Virol, 1991, 72 (Pt 4): 1001-1003
- Jin P, *et al.* Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. Nat Neurosci, 2004, 7(2): 113-117
- Jolly CA, *et al.* Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of *potato leafroll luteovirus* affect the formation of an epitope and aphid transmission. Virology, 1994, 201(1): 182-185
- Jones HD, *et al.* Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. Plant Methods, 2005, 1: 5
- Jones HD. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. J Cereal Sci, 2005, 41(2): 137-147
- Kadotani N, *et al.* One of the two dicer-like proteins in the filamentous fungi *Magnaporthe oryzae* genome is responsible for hairpin RNA-triggered RNA silencing and related siRNA accumulation. J Biol Chem, 2004, 279(43): 44467-44474
- Kalantidis K, *et al.* The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. Mol Plant-Microbe Interact, 2002, 15(8): 826-833
- Kamath RS, *et al.* Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. Nature, 2003, 421(6920): 231-237
- Kamer G, *et al.* Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. Nucleic Acids Res, 1984, 12(18): 7269-7282
- Kao SC, *et al.* BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. J Biol Chem, 2004, 279(3): 1942-1949
- Kasschau KD, *et al.* Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. Virology, 2001, 285(1): 71-81
- Khvorova A, *et al.* Functional siRNA and miRNA exhibit strand bias. Cell, 2003, 115(2): 209-216
- Kim YO, *et al.* A functional genomic screen for cardiogenic genes using RNA interference in developing *Drosophila* embryos. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(1): 159-164

- Klahre U, *et al.* High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(18): 11981-11986
- Kobayashi N, *et al.* Vector-based in vivo RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(2): 688-693
- Koev G, *et al.* A positive-strand RNA virus with three very different subgenomic RNA promoters. *J Virol*, 2000, 74(13): 5988-5996
- Koev G, *et al.* Extreme Reduction of Disease in Oats Transformed with the 5(prime) Half of the *Barley Yellow Dwarf Virus*-PAV Genome. *Phytopathology*, 1998, 88(10): 1013-1019
- Koev G, *et al.* Primary and secondary structural elements required for synthesis of *barley yellow dwarf virus* subgenomic RNA1. *J Virol*, 1999, 73(4): 2876-2885
- Koonin EV, *et al.* Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1993, 28(5): 375-430
- Kubota K, *et al.* *Tomato mosaic virus* replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J Virol*, 2003, 77(20): 11016-11026
- Kujawa AB, *et al.* Structural requirements for efficient translational frameshifting in the synthesis of the putative viral RNA-dependent RNA polymerase of *potato leafroll virus*. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(9): 2165-2171
- L'Huillier PJ, *et al.* Cytoplasmic delivery of ribozymes leads to efficient reduction in alpha-lactalbumin mRNA levels in C127I mouse cells. *EMBO J*, 1992, 11(12): 4411-4418
- Layzer JM, *et al.* In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*, 2004, 10(5): 766-771
- Lee MT, *et al.* Inhibition of *human immunodeficiency virus* type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a *lentivirus* vector. *J Virol*, 2003, 77(22): 11964-11972
- Lee YS, *et al.* Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 2004, 117(1): 69-81
- Leiser RM, *et al.* Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with *beet western yellows luteovirus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(19): 9136-9140
- Li Q, *et al.* Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of *cucumber mosaic cucumovirus* and *tobacco mosaic tobamovirus*. *Virology*, 1996, 216(1): 71-79
- Li WX, *et al.* Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(5): 1350-1355
- Lichner Z, *et al.* Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *J Gen Virol*, 2003, 84(4): 975-980
- Lingel A, *et al.* Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 2003, 426(6965): 465-469
- Lister RM, *et al.* Coat protein mediated resistance to *barley yellow dwarf virus* in oats. *Phytopathology*, 1995, 85: 1117
- Lister, RM, *et al.* Serotyping of *barley yellow dwarf virus* isolates from Egypt. *Phytopathol Mediterr*,

- 1994, 33(2): 152-157
- Liu J, *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 2004, 305(5689): 1437-1441
- Liu Q, *et al.* R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, 2003, 301(5641): 1921-1925
- Llave C, *et al.* Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (24): 13401-13406
- Lodge JK, *et al.* Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(15): 7089-7093
- Longstaff M, *et al.* Extreme resistance to *potato virus X* infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO J*, 1993, 12(2): 379-386
- Lucy AP, *et al.* Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J*, 2000, 19(7): 1672-1680
- Ma JB, *et al.* Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 2004, 429(6989): 318-322
- Makkouk KM, *et al.* First record of *barley yellow dwarf virus-RPV* infecting wheat in Uzbekistan. *Plant Dis*, 2001, 5(10): 1122
- Makkouk KM, *et al.* The “yellow plague” of cereals, *barley yellow dwarf virus*. In: World perspectives on barely yellow dwarf. CIMMYT MEXICO. D F. M EXICO, 1987, 1-6
- Malysenko SI, *et al.* Reduction of *tobacco mosaic virus* accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins. *J Gen Virol*, 1993, 74(Pt 6): 1149-1156
- Manika, Pal-Bhadra, *et al.* Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science*, 2003, 303(5658): 669-672
- Martienssen RA. Maintenance of heterochromatin by RNA interference of tandem repeats. *Nat Genet*, 2003, 35(3): 213-214
- Martin RR, *et al.* Evolution and molecular biology of *luteoviruses*. *Annu Rev Phytopathol*, 1990, 28: 341-363
- Martinez J, *et al.* RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*, 2004, 18(9): 975-980
- Martinez J, *et al.* Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 2002, 110(5): 563~574
- Mayo MA, *et al.* Evidence that *potato leafroll virus* RNA is positive-stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate. *J Gen Virol*, 1982, 59(1): 163-167
- Mayo MA, *et al.* Nucleotide sequence of *potato leafroll luteovirus* RNA. *J Gen Virol*, 1989, 70(Pt5): 1037-1051
- Mayor MA, *et al.* Molecular biology of *luteoviruses*. *Adv Virus Res*, 1996, 46: 413-460
- McCaffrey AP, *et al.* Inhibition of *hepatitis B virus* in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 639-644

- McCarthy PL, *et al.* Coat protein-mediated resistance to *wheat streak mosaic virus* and *barley yellow dwarf viruses* in soft white winter wheat. Presented at 10th Int. Congr. Virol., 1996, Jerusalem: p184
- McGrath PF, *et al.* A domain of the readthrough protein of *barley yellow dwarf virus* (NY-RPV isolate) is essential for aphid transmission. *Eur J Plant Pathol*, 1996, 102(7): 671-679
- McGrath PF, *et al.* Coat protein-mediated resistance to isolates of barley yellow dwarf in oats and barley. *Eur J Plant Pathol*, 1997, 103(8): 695-710
- Meister G, *et al.* Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004, 431(7006): 343-349
- Mestre P, *et al.* An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the *Nla* proteinase from *potato virus Y*. *Plant J*, 2000, 23(5): 653-661
- Mette MF, *et al.* Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral suppressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing. *Curr Biol*, 2001, 11(14): 1119-1123
- Miller WA, *et al.* A satellite RNA of *barley yellow dwarf virus* contains a novel hammerhead structure in the self-cleavage domain. *Virology*, 1991, 183(2): 711-720
- Miller WA, *et al.* Alternative tertiary structure attenuates self-cleavage of the ribozyme in the satellite RNA of *barley yellow dwarf virus*. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(19): 5313-5320
- Miller WA, *et al.* Minus-strand initiation by *brome mosaic virus* replicase within the 3' tRNA-like structure of native and modified RNA templates. *J Mol Biol*, 1986, 187(4): 537-546
- Miller WA, *et al.* Prospects for Genetically Engineered Resistance to Barley Yellow Dwarf Viruses. *In*: D'Arcy CJ and Burnett PA (eds) *Barley yellow dwarf: 40 years of progress*. Am Phytopathol Soc Press, St. Paul, MN, 1995, 345-370
- Miller WA, *et al.* Sequence and identification of the *barley yellow dwarf virus* coat protein gene. *Virology*, 1988b, 165(1): 306-309
- Miller WA, *et al.* Sequence and organization of *barley yellow dwarf virus* genomic RNA. *Nucleic Acid Res*, 1988a, 16(13): 6097-6111
- Miller WA, *et al.* Synthesis of *brome mosaic virus* subgenomic RNA in vitro by internal initiation on (-)-sense genomic RNA. *Nature*, 1985, 313(5997):68-70
- Miller WA, Rasochova L. *Barley yellow dwarf viruses*. *Annu Rev Phytopathol*, 1997, 35:167-190
- Mlotshwa S, *et al.* Transgenic plants expressing HC-Pro show enhanced virus sensitivity while silencing of the transgene results in resistance. *Virus Genes*, 2002, 25(1): 45-57
- Mohan BR, *et al.* Genes and cis-acting sequences involved in replication of *barley yellow dwarf virus*-PAV RNA. *Virology*, 1995, 212(1): 186-195
- Muller WC, *et al.* An aphid-injection method for the transmission of *barley yellow dwarf virus*. *Virology*, 1961, 14(2): 253-258.
- Mutterer JD, *et al.* Role of the *beet western yellows virus* readthrough protein in virus movement in *Nicotiana clevelandii*. *J Gen Virol*, 1999, 8(Pt 10): 2771-2778
- Nass PH, *et al.* In situ localization of *barley yellow dwarf virus*-PAV 17-kDa protein and nucleic acids in oats. *Phytopathology*, 1998, 88(10): 1031-1039

- Nicolas O, *et al.* Variations in the VPg protein allow a *potyvirus* to overcome *Va* gene resistance in tobacco. *Virology*, 1997, 237(2): 452-459
- Nicola-Negri ED, *et al.* Hairpin RNA- mediated silencing of *Plum pox virus* P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. *Transgenic Res*, 2005, 14(6): 989-994
- Noris E, *et al.* *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* can overcome transgene -mediated RNA silencing of two essential viral genes. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 6): 1745-1749
- Nykanen A, *et al.* ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 2001, 107(3): 309-321
- Oswald, JW *et al.* A new virus disease of cereals transmissible by aphids. *Plant Dis Rep*, 1951, 35(5): 471-475
- Paddison PJ, *et al.* A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature*, 2004, 428(6981): 427-431
- Palauqui JC, *et al.* Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J*, 1997, 16(15): 4738-4745
- Pandolfini T, *et al.* Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the *rolC* promoter confers systemic disease resistance to *plum pox virus* without preventing local infection. *BMC Biotechnol*, 2003, 3 (1): 7
- Papp I, *et al.* Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol*, 2003, 132(3): 1382-1390
- Park JW, *et al.* The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing p19 interacts with itself and an RNA binding host protein. *Virology*, 2004, 323(1): 49-58
- Parker JS, *et al.* Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J*, 2004, 23(24): 4727-4737
- Parker JS, *et al.* Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, 2005, 434(7033): 663-666
- Pellino JL, *et al.* R2D2 leads the silencing trigger to mRNA's death star. *Cell*, 2003, 115(2): 132-133
- Pfeffer S, *et al.* P0 of *Beet western yellows virus* is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol*, 2002, 76(13): 6815-6824
- Pham JW, *et al.*, Sontheimer E J. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell*, 2004, 117(1): 83-89
- Plisson C, *et al.* Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J Biol Chem*, 2003, 278(26): 23753-23761
- Plumb RT. Chemical and cultural control of barley yellow dwarf. In: *Barley Yellow Dwarf, A Proceedings of the Workshop*. CIMMYT, 1984, p53
- Pothof J, *et al.* Identification of genes that protect the *C. elegans* genome against mutations by genome-wide RNAi. *Genes Dev*, 2003, 15(4): 443-448
- Powell-Abel P, *et al.* Delay of disease development in transgenic plants that express the *tobacco mosaic*

- virus* coat protein gene. *Science*, 1986, 232(4751): 738-743
- Power A, *et al.* Aphid transmission of *barley yellow dwarf viruses*: interaction between viruses, vectors and host plants. In *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress*. C. D'Arcy and P.A. Burnett. APS Press. 1995, 259-289
- Prufer D, *et al.* In vivo expression of a full-length cDNA copy of *potato leafroll virus* (PLRV) in protoplasts and transgenic plants. *Mol Gen Genet*, 1997, 253(5): 609-614
- Prufer D, *et al.* Ribosomal frameshifting in plants: a novel signal directs the -1 frameshift in the synthesis of the putative viral replicase of *potato leafroll luteovirus*. *EMBO J*, 1992, 11(3): 1111-1117
- Prufer D, *et al.* Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of *cucurbit aphid-borne yellows virus* and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other *luteoviruses*. *Virology*, 1995, 214(1): 150-158
- Qiu WP, *et al.* *Tombusvirus* P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2002, 15(3): 269-280
- Rasochova L, *et al.* The satellite RNA of *barley yellow dwarf virus*-RPV is supported by *beet western yellows virus* in dicotyledonous protoplasts and plants. *Virology*, 1997, 231(2): 182-191
- Rathjen JP, *et al.* *Soybean dwarf luteovirus* contains the third variant genome type in the *luteovirus* group. *Virology*, 1994, 198(2): 671-679
- Reed JC, *et al.* Suppressor of RNA silencing encoded by *Beet yellows virus*. *Virology*, 2003, 306(2): 203-209
- Reutenauer, A., *et al.* Identification of *beet western yellows luteovirus* genes implicated in viral replication and particle morphogenesis. *Virology*, 1993, 195(2): 692-699
- Rizzo TM, *et al.* Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding the capsid protein of the MAV isolate of *barley yellow dwarf virus*. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(15): 4625
- Rizzo TM, *et al.* Localization of a surface domain of the capsid protein of *barley yellow dwarf virus*. *Virology*, 1992, 186(1): 300-302
- Rochow WF, *et al.* Aphids can acquire strains of *barley yellow dwarf virus* they do not transmit. *Virology*, 1961, 15(3): 382-384
- Rochow WF, *et al.* Comparison of local-lesion and electronmicroscope particle-count methods for assay of *potato virus X* from plants doubly infected by *potato viruses X* and Y. *Virology*, 1955, 1(1): 28-39
- Rochow WF, *et al.* Purification and antigenicity of three isolates of *barley yellow dwarf virus*. *Virology*, 1971, 46(1): 117-126
- Rochow WF, *et al.* Purification of *barley yellow dwarf virus*. *Virology*, 1964, 51(24): 310-322
- Rochow WF, *et al.* Serological blocking of aphid transmission of *barley yellow dwarf virus*. *Virology*, 1967, 33(2): 359-362
- Rochow WF, *et al.* Use of aphids injected with virus-specific antiserum for study of plant viruses that circulate in vectors. *Virology*, 1975, 63(1): 282-286
- Rochow WF, *et al.* Variation within *rhopalosiphum padi* and transmission of *barley yellow dwarf virus*

- by clones of four aphid species. *Virology*, 1966, 30(2): 286-296
- Rochow WF, *et al.* Virus multiplication in plants doubly infected by *potato viruses X* and *Y*. *Virology*, 1955, 1(1): 10-27
- Rochow WF. Apparent loss of vector specificity following double infection by two strain of *barley yellow dwarf virus*. *Phytopathology*, 1965, 55(1): 62-68
- Rochow WF. Biological properties of four isolates of *barley yellow dwarf virus*. *Phytopathology*, 1969, 59(11): 1580-1589
- Rochow WF. The role of aphids in vector specificity of *barley yellow dwarf virus*. *Plant Dis*, 1958, 42(8): 905
- Rochow WF. Transmission of *barley yellow dwarf virus* acquired from liquid extracts by aphids feeding through membranes. *Virology*, 1960, 12(2): 223-232
- Rochow WF. Variation within and among aphid vector of plant viruses. *Ann N Y Acad Sci*, 1963, 105: 713-729
- Rochow, WF. Transmission of strains of *barley yellow dwarf virus* by two aphid species. *Phytopathology*, 1959, 49(7): 744-748
- Roignant JY, *et al.* Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA*, 2003, 9(3): 299-308
- Rubino L, *et al.* Resistance to *cymbidium ringspot tomosvirus* infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing the virus coat protein gene. *Plant Mol Biol*, 1993, 21(4): 665-672
- Sanchez AA, *et al.* Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during *planarian* regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(9): 5049-5054
- Sano T, *et al.* Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to *potato spindle tuber viroid*. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(12): 1290-1294
- Sasaki T, *et al.* Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics*, 2003, 82(3): 323-330
- Scadden AD, *et al.* The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(6): 489-496
- Scalla R, *et al.* Protein component of two isolates of *barley yellow dwarf virus*. *Virology*, 1977, 78(2): 576-580
- Schauer SE, *et al.* Dicer-like1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(11): 487-491
- Schmitz J, *et al.* In situ localization of the putative movement protein (pr17) from *potato leafroll luteovirus* (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology*, 1997, 235(2): 311-322
- Schoumacher F, *et al.* Binding of RNA by the *alfalfa mosaic virus* movement protein is biphasic. *FEBS Lett*, 1992, 308(3): 231-234
- Schramke V, *et al.* Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Science*, 2003, 301(5636): 1069-1074
- Schwarz DS, *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003, 115(2):

199-208

- Schwarz DS, *et al.* The RNA-induced silencing complex is a Mg(2+)-dependent endonuclease. *Curr Biol*, 2004, 14(9): 787-791
- Semizarov D, *et al.* Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(11): 6347-6352
- Shi H, *et al.* Function of the trypanosome argonaute 1 protein in RNA interference requires the N-terminal RGG domain and arginine 735 in the piwi domain. *J Biol Chem*, 2004, 279(48): 49889-49893
- Sijen T, *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 2001, 107(4): 465-476
- Sijen T, *et al.* RNA-Mediated Virus Resistance: Role of Repeated Transgenes and Delineation of Targeted Regions. *Plant Cell*, 1996, 8(12): 2277-2294
- Silhavy D, *et al.* A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J*, 2002, 21(12): 3070-3080
- Silver SL, *et al.* Replication of *barley yellow dwarf virus* satellite RNA transcripts in oat protoplasts. *Virology*, 1994, 198(1): 331-335
- Simon-Mateo C, *et al.* Suppressor activity of *potyviral* and *cucumoviral* infections in *potyvirus*-induced transgene silencing. *J Gen Virol*, 2003, 84(10): 2877-2883
- Slykhuis, JT. Virus disease of cereals. *Rev Appl Mycol*, 1967, 46: 401-429
- Smith OP, *et al.* Nucleotide sequence and *E. coli* expression of the coat protein gene of the yellowing strain of *soybean dwarf luteovirus*. *Arch Virol*, 1993, 133(1-2): 223-231
- Sokolova M, *et al.* The *potato leafroll virus* 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett*, 1997, 400(2): 201-205
- Song JJ, *et al.* Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 2004, 305(5689): 1434-1437
- Song SI, *et al.* Satellite *cereal yellow dwarf virus*-RPV (satRPV) RNA requires a double hammerhead for self-cleavage and an alternative structure for replication. *J Mol Biol*, 1999, 293(4): 781-793
- Tabara H, *et al.* The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*, 2002, 109(7): 861-871
- Tacke E, *et al.* Characterization of a *potato leafroll luteovirus* subgenomic RNA: differential expression by internal translation initiation and UAG suppression. *J Gen Virol*, 1990, 71 (Pt 10): 2265-2272
- Tacke E, *et al.* Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(11): 1597-1601
- Tacke E, *et al.* Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of *potato leafroll luteovirus* identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology*, 1993, 197(1): 274-282
- Tacke E, *et al.* The *potato leafroll luteovirus* 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding

- protein. *J Gen Virol*, 1991, 72 (Pt 8): 2035-2038
- Tahbaz N, *et al.* Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep*, 2004, 5(2): 189-194
- Takeda A, *et al.* Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett*, 2002, 532(1-2): 75-79
- Tamas I, *et al.* Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA*, 2005, 11: 459-469
- Tenllado F, *et al.* Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J Virol*, 2001, 75(24): 12288-12297
- Tenllado F, *et al.* Transient expression of homologous hairpin RNA causes interference with plant virus infection and is overcome by a virus encoded suppressor of gene silencing. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2003, 16(2): 149-158
- Thomas CL, *et al.* Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology*, 2003, 306(1): 33-41
- Thonberg H, *et al.* Characterization of RNA interference in rat PC12 cells: requirement of GERp95. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(4): 927-934
- Tijsterman M, *et al.* Genes Required for Systemic RNA Interference in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 2004, 14(2): 111-116
- Timmons L, *et al.* Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Bio Cell*, 2003, 14(7): 2972-2983
- Tomari Y, *et al.* A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, 2004, 306(5700): 1377-1380
- Tomari Y, *et al.* RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell*, 2004, 116(6): 831-841
- Trinks D, *et al.* Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J Virol*, 2005, 79(4): 2517-2527
- Ueng PP, *et al.* Nucleotide sequence analysis of the genomes of the MAV-PS1 and P-PAV isolates of *barley yellow dwarf virus*. *J Gen Virol*, 1992, 73(Pt2): 487-492
- Uhlirova M, *et al.* Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad-Complex in insect metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15607-15612
- Vaistij FE, *et al.* Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell*, 2002, 14(4): 857-867
- van der Giessen K, *et al.* RNAi-mediated HuR depletion leads to the inhibition of muscle cell differentiation. *J Biol Chem*, 2003, 278(47): 47119-47128
- van der Wilk F, *et al.* Expression of the *potato leafroll virus* ORF0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(2): 153-159
- van HH, *et al.* RNA target sequences promote spreading of RNA silencing. *Plant Physiol*, 2003, 131(1): 245-253

- van WR, *et al.* Contribution of the zinc finger to zinc and DNA binding by a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol*, 2003, 77(1): 696-700
- van WR, *et al.* Mutation of three cysteine residues in *Tomato yellow leaf curl virus-China* C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression. *Mol Plant-Microbe Interac*, 2002, 15(3): 203-208
- van WR, *et al.* Virus survival of RNA silencing without deploying protein-mediated suppression in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Lett*, 2004, 562(1-3): 65-70
- Vanitharani R, *et al.* Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(6): 9632-9636
- Vargason JM, *et al.* Crystal structure of CIRV p19 bound to siRNA. *Cell*, 2003, 115(7): 799-811
- Veidt I, *et al.* Nucleotide sequence of *beet western yellows virus* RNA. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(21): 9917-9932
- Veidt I, *et al.* Synthesis of full-length transcripts of *beet western yellows virus* RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology*, 1992, 186(1): 192-200
- Verdel A, *et al.* RNAi-Mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, 2004, 303(5658): 672-676
- Vincent JR, *et al.* Nucleotide sequence analysis and genomic organization of NY-RPV isolate of *barley yellow dwarf virus*. *J Gen Virol*, 1991, 72(Pt10): 2347-2355
- Vincent JR, *et al.* Nucleotide sequences of coat protein genes for three isolates of *barley yellow dwarf virus* and their relationships to other *luteovirus* coat protein sequences. *J Gen Virol*, 1990, 71(Pt12): 2791-2799
- Voinnet O, *et al.* An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the P19 protein of *tomato bushy stunt virus*. *Plant J*, 2003, 33(5): 949-956
- Volpe T, *et al.* RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res*, 2003, 11(2): 137-146
- Volpe TA, *et al.* Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 2002, 297(5588): 1833-1837
- Wang MB, *et al.* A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to *barley yellow dwarf virus*. *Mol Plant Pathol*, 2000, 1(6): 347-356
- Wang MB, *et al.* RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(2): 216-222
- Wang S, *et al.* A potential mechanism for selective control of cap-independent translation by a viral RNA sequence in cis and in trans. *RNA*, 1999, 5(6): 728-738
- Wang S, *et al.* A sequence located 4.5 to 5 kilobases from the 5' end of the *barley yellow dwarf virus* (PAV) genome strongly stimulates translation of uncapped mRNA. *J Biol Chem*, 1995, 270(22): 13446-13452
- Watanabe Y, *et al.* Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a doublestranded-RNA specific ribonuclease. *FEBS Letters*, 1995, 372(2-3): 165-168

- Waterhouse PM, *et al.* Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 2001, 411(6839): 834-842
- Waterhouse PM, *et al.* Genetic engineering of virus resistance. In: *Molecular Biology of Rice* (Shimamoto K., ed.). Tokyo: Springer-Verlag, 1998, 257-281
- Whitham S, *et al.* The *N* gene of tobacco confers resistance to *tobacco mosaic virus* in transgenic tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(16): 8776-8781
- Whitham S, *et al.* The product of the *tobacco mosaic virus* resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 1994, 78(6): 1101-1115
- Whitham SA, *et al.* Arabidopsis *RTM2* gene is necessary for specific restriction of *tobacco etch virus* and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell*, 2000, 12(4): 569-582
- Williams RW, *et al.* ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(10): 6889-6894
- Winston WM, *et al.* Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 2002, 295(5564): 2456-2459
- Wintermantel WM, *et al.* *Cucumber mosaic virus* is restricted from entering minor veins in transgenic tobacco exhibiting replicase-mediated resistance. *Virology*, 1997, 231(2): 248-257
- Wu H, *et al.* Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(9): 659-668
- Xie Z, *et al.* Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2004, 2(5): E104
- Xu Y, *et al.* Functional comparison of single- and double-stranded siRNAs in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(3): 680-687
- Yan KS, *et al.* Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, 2003, 426(6965): 468-474
- Ye K, *et al.* Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*, 2003, 426(6968): 874-878
- Young MJ. Infectious in vitro transcripts from a cloned cDNA of *barley yellow dwarf virus*. *Virology*, 1991, 180(1): 372-379
- Yu LY, *et al.* Simultaneous inhibition of GSK-3 α and GSK-3 β using hairpin siRNA expression vector. *Mol Ther*, 2003, 7(2):228-236
- Zhang L Y, *et al.* Accumulation of *Barley stripe mosaic virus* is significantly reduced in transgenic wheat plants expressing a bacterial ribonuclease. *Transgenic Res*, 2001, 10(1): 13-19
- Ziegler Graff V, *et al.* The coat protein of *beet western yellows luteovirus* is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1996, 9(4): 501-510
- 步威等. 酵母 *pac-1* 基因的克隆、序列分析和在大肠杆菌中的高效表达及活性测定. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 203-206
- 成卓敏等. 大麦黄矮病毒 GPV 株系的提纯及血清学研究. *病毒学报*, 1986, 2(3): 275-278

- 成卓敏等. 大麦黄矮病毒 GPV 株系外壳蛋白基因序列分析及其植物表达质粒的构建. 中国科学(C 辑), 1996, 26(3): 250-256
- 成卓敏等. 大麦黄矮病毒外壳蛋白基因的合成及用花粉管途径获得小麦转基因植株. 自然科学进展——国家重点实验室通讯, 1993, 3(6): 560-564
- 成卓敏等. 小麦黄矮病的病原提纯的鉴定. 植物病理学报, 1982, 12(1): 58-60
- 董瑾等. 抗小麦黄花叶病毒转基因小麦的获得及病毒诱导的基因沉默. 科学通报, 2002, 47(10): 763-767
- 洪健等. 植物病毒分类图谱. 北京: 科学出版社, 2001, 115-124
- 晋治波等. 大麦黄矮病毒 GAV 基因组全序列测定及其结构分析. 中国科学(C 辑), 2003, 33(6): 505-513
- 李洁等. 双价核酶对烟草花叶病毒的两个靶序列的专一切割作用. 生物工程学报, 1995, 11(1): 20-26
- 刘德虎等. 植物抗体基因工程I. 高技术通讯, 1995, 5(2): 42-44
- 刘德虎等. 植物抗体基因工程II. 高技术通讯, 1995, 5(3): 44-46
- 刘德虎等. 植物抗体基因工程III. 高技术通讯, 1995, 5(4): 46
- 刘德虎等. 植物抗体基因工程IV. 高技术通讯, 1996, 6(4): 8-11
- 刘太国. BYDV-GPV 株系正向串联体结构复制酶基因介导的转基因小麦研究. 中国农业科学院博士研究生学位论文, 2003
- 宋雪梅等. 沉默诱导复合物中的生物大分子及其装配. 遗传, 2006, 28(6): 761-766
- 田波. 病毒卫星RNA及其致弱病毒的机理——我国病理学基础研究进展之一例. 微生物学通报, 1996, 23(6): 345-352
- 田苗英等. 大麦黄矮病毒缺失复制酶基因植物表达载体的构建及转基因小麦的获得. 中国农业科学, 1999, 32(5): 49-54
- 王苏燕等. 转基因油菜中核酶介导的对花椰菜花叶病毒的高度抗病性. 中国科学(C辑), 1997, 27(5): 426-431
- 吴茂森. 大麦黄矮病毒 GPV 株系复制酶基因介导的抗病毒转基因小麦的研究. 中国农业科学院博士研究生学位论文, 2000
- 夏光敏等. 抗大麦黄矮病毒转基因小麦可育植株的获得 (摘要). 细胞生物学通讯, 1995, 增刊: 10
- 燕飞等. RNA 干扰机制研究进展. 遗传, 2005a, 27(1): 167-172
- 燕飞等. RNA 干扰技术在几项研究领域的应用. 中国生物工程杂志, 2004b, 24(8): 14-19
- 燕飞等. 病毒编码的转录后沉默抑制蛋白. 生命的化学, 2004a, 24(4): 281-284
- 燕飞等. 番茄丛矮病毒 p19 蛋白抑制转录后沉默作用机制. 病毒学报, 2005b, 21(5): 403-405
- 余晓红等. 烟草花叶病毒运动蛋白基因的 cDNA 克隆, 序列测定及植物转化. 生物工程学报, 1996, 12(2): 211-214
- 张文蔚. 根癌农杆菌介导的大麦黄矮病毒 GPV 株系复制酶基因转化小麦的研究. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2003
- 郑银英等. 酵母双链 RNA 分解酶基因的克隆、序列分析、原核表达及体外活性检测. 农业生物技术学报, 2002, 10(增刊): 30-31

- 周广和等. 麦类病毒病及其防治. 上海: 上海科学技术出版社, 1987a, 8-14
- 周广和等. 麦蚜远距离迁飞与春麦黄矮病发生流行关系的研究. 中国植物病理学会论文摘要, 1981, 138
- 周广和等. 世界大麦黄矮病研究进展. 世界农业, 1989, (7): 36-38
- 周广和等. 小麦黄矮病毒 4 种株系鉴定与应用. 中国农业科学, 1987b, 20(4): 7-12
- 周广和等. 一种由麦二叉蚜和麦长管蚜传播的小麦黄矮病毒株系的鉴定. 植物病理学报, 1986, 16(1): 17-21

致 谢

本论文是在成卓敏研究员的悉心指导下完成的。在将近三年的科研工作中，成老师高屋建瓴的指点给了我前进的方向，也给了我独自设计、探索、尝试新实验思路、新技术方案的空间，这让我充分体会到了科研的魅力，更让我感受到科研带来的乐趣！同时，成老师实事求是、平易近人、坚持原则的工作作风和处世方式是我学习的榜样。深深感谢成老师三年来在工作、生活方面给予的关心和帮助！

感谢本组李世访研究员在论文实验进展和论文撰写方面给予的关心和支持；感谢张文蔚助理研究员在农杆菌转化方面的指点；感谢肖红女士在日常科研工作和学习生活的方方面面给予的协助！

衷心感谢吴茂森副研究员和刘太国博士在实验技术路线、试验方案和具体实验方法、以及论文写作过程中给予的指导和帮助！

在实验过程中，段霞瑜研究员、于嘉林教授、张杰研究员、叶兴国研究员提供了部分实验材料，同时，张杰研究员在专利申请方面给予了很大的帮助和支持，在此向四位老师表示深深的谢意！

感谢冯洁研究员在植物组织培养和专利申请方面给予的协助和支持！

特别感谢分子植病组的老师和同学们准许我经常性地使用他们的实验仪器设备，他们是何晨阳研究员、吴茂森副研究员、齐放军副研究员、张新建博士、许景升博士、孙蕾博士、周建波硕士、刘维震硕士、孟威硕士、刘喜梅硕士、吴静硕士、高士强硕士。

感谢本组所有同学在实验过程中给予的帮助，他们是张二芹博士、苏前富硕士、郭瑞硕士、周莹硕士、杨元爱硕士、吴鸣谦硕士、李黎硕士、毛玉洁硕士；感谢已经毕业的李永丽硕士、王晶硕士、王姝杰硕士、范卫红硕士、郭文广硕士。

最后，衷心感谢我的妻子宋雪梅女士在实验工作中给予帮助和在生活中给予无微不至的关怀！她的鼓励和支持保证了我每天能够以饱满的热情投身于科研工作！深深感谢我敬爱的父母和家人给予我的爱，这份爱是促使我一直努力向前的动力！深深感谢岳父岳母对我学业的支持及对我工作紧张而不能探望他们所给予的理解！

再次感谢所有关心和帮助我的师长、同学和朋友！

燕飞

2006年5月

个人简历

燕飞，1976年11月出生于河北省景县。1999年毕业于河北大学生物系生物学专业；同年考入河北大学植物学专业攻读硕士学位研究生，在朱宝成教授指导下从事抗虫转基因小麦、水稻，发根农杆菌转化胀果甘草的研究，2002年7月获得硕士学位；2003年9月考入中国农业科学院研究生院植物病理学专业，在成卓敏研究员指导下从事小麦抗病毒基因工程研究。

在学期间发表论文及申请专利情况：

- [1] 燕飞, 郑银英, 张文蔚, 肖红, 李世访, 成卓敏. 农杆菌介导法获得转 *pac1* 基因小麦并表现对大麦黄矮病毒的抗性. *科学通报*, 已录用
- [2] 燕飞, 张文蔚, 肖红, 李世访, 成卓敏. 转病毒来源 hpRNA 小麦表现对大麦黄矮病毒的抗性. *遗传*, 已录用
- [3] 燕飞, 宋雪梅, 成卓敏. 番茄丛矮病毒 p19 蛋白抑制转录后基因沉默作用机制. *病毒学报*, 2005, 21(5): 403-405
- [4] 燕飞, 张文蔚, 肖红, 李世访, 成卓敏. 农杆菌介导 *pac1* 基因对小麦的遗传转化. *农业生物灾害预防与控制研究* (中国农业科技出版社), 2005, 922-924
- [5] 燕飞, 成卓敏. RNA 干扰机制研究进展. *遗传*, 2005, 27(1): 167-172
- [6] 燕飞, 成卓敏. RNA 干扰与植物抗病毒. *生物技术通报*, 2005, (4): 1-4
- [7] 燕飞, 成卓敏. RNA 干扰技术在几项研究领域的应用. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(8): 14-19
- [8] 燕飞, 成卓敏. 病毒编码的转录后沉默抑制蛋白. *生命的化学*, 2004, 24(4): 1-4
- [9] 燕飞, 成卓敏. RNAi 技术在植物抗病毒基因工程研究中的应用. *生命的化学*, 2004, 24(增刊): 102-105
- [10] 燕飞, 梁玉玲, 崔东亚, 张慧, 朱宝成. 发根农杆菌转化胀果甘草的研究. *河北大学学报* (自然科学版), 2004, 24(5): 562-531
- [11] 宋雪梅, 燕飞, 杜立新. 沉默诱导复合物中的生物大分子及其装配. *遗传*, 2006, 28(6): 761-766
- [12] 申请专利“正反向双启动子植物 RNAi 表达载体”(第一发明人), 申请号: **200610011669.6**

E-mail: dianyong@yeah.net; bioyanfei@gmail.com