

TMV-RNA 非翻译区对外源基因在整体植物中表达水平的影响

秦红敏 郭洪年 贾燕涛 李利红 田颖川*

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080. *联系人, Email: tianyc@sun.im.ac.cn)

摘要 利用 *GUS* 基因及 TMV-RNA 非翻译区序列构建了 4 种 *GUS* 基因的植物表达载体, 即 pBG437, pBG438, pBG440 和 pBG440 Δ NOS. 在这 4 种表达载体中带双增强子的 35S 启动子的下游分别由 *GUS*-NOS, Ω -*GUS*-NOS, Ω -*GUS*-3' UTR-NOS 和 Ω -*GUS*-3' UTR 组成 4 个不同的表达框架. 转基因烟草 *GUS* 活性检测表明, 转 pBG440 植株的 *GUS* 活性是转 pBG437 的 5 倍, 是转 pBG438 的 1.6 倍; 转 pBG438 的 *GUS* 活性是转 pBG437 的 3.2 倍; 转 pBG440 Δ NOS 的植株均没有检测到活性. 在前 3 组植物之间 *GUS* 表达水平的差异达显著水平. 同样载体在另一种烟草中进行瞬间表达的结果与上述基本一致. 以上结果在整体植株水平上证明 Ω 片段能显著提高外源基因的表达水平, 但与用原生质体体系所得的结果有所不同, 在转基因植物中 3' UTR 似乎不能起 poly(A)的作用, 也不能作为转录终止子. Ω 片段与 TMV 3' UTR 区共同作用时, 提高外源基因表达水平的效果更好.

关键词 TMV-RNA 非翻译区 *GUS* 基因 转基因烟草

离体细胞体系研究结果表明, 许多真核生物包括病毒 mRNA 的非翻译区(UTR)可以通过影响 mRNA 的稳定性和翻译效率对调节蛋白表达水平起着重要的作用. 烟草花叶病毒(TMV)是一种能在烟草及其他寄主植物中高效表达的 RNA 病毒, 其 RNA 的 3' 端 UTR 形成具有复杂高级结构的 5 个假结(pseudoknot). 在 3' 末端的两个假结形成一个类似 tRNA 的尾巴, 这是病毒复制必需的. 紧接这个区的上游是另外 3 个假结(UPD). 这种现象存在于多种植物病毒中, 如雀麦花叶病毒和芜菁花叶病毒^[1]. Gallie^[2]用原生质体体系研究表明, TMV 3' UTR 中 UPD 的主要作用是提高翻译效率, 其机理与真核生物 mRNA 的 poly(A)的作用机理相似. 他推测在植物中普遍存在的一种 102 ku 的蛋白可以结合 UPD, 起到类似 poly(A)结合蛋白的作用. 3' 末端类 tRNA 区对充分发挥 TMV 3' UTR 的功能也是必需的, 它类似 tRNA 的高级结构及性质可能是其发挥增强翻译功能的主要原因^[1].

TMV-RNA 中 5' 端的 67 bp 非翻译前导区和 205 bp 的 3' 端 UTR 有协同作用, 能进一步提高病毒 mRNA 的翻译效率. 在多种真核生物细胞体外表达体系中, TMV Ω 片段都能提高外源基因的表达^[3, 4]. 这种增强表达的作用不依赖于任何病毒基因的产物, 并且在双子叶植物细胞中的作用比在单子叶中强^[5]. Sleat 等人^[6]认为 Ω 片段减少了 mRNA 的二级结构, 使得 40S 核糖体亚基更容易在 5' 端运动以寻找转录起始位点, 并可能使 5' 末端与起始因子的相互作用加强, 因而 TMV Ω 片段对翻译有增强作用. 但以上有关 TMV-UTR 区对外源基因表达影响的研究结果都是在离体细胞表达体系中得到的, 研究 TMV 非翻译区对嵌合基因在整体植物中表达的影响将会更准确地反映 UTR 在体内的真实作用, 但这方面的结果还未见报道.

本文研究 TMV-RNA 非翻译区对 *GUS* 基因在整体植物中表达水平的影响, 希望对进一

步了解植物病毒 UTR 区功能及构建植物高效表达载体提供依据。

1 材料与方法

(i) 菌种. 宿主菌 *Escherichia coli* DH5 α 、克隆载体 pUC19 和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 为本实验室所存; 含有内含子的葡萄糖醛酸糖苷酶(*GUS*)基因的质粒 p35SGUSINT 为国际农业分子生物学运用研究中心(CAMBIA)的 Jefferson 教授惠赠; 二元表达载体 pBin437 和 pBin438 为本实验室构建; TMV 外壳蛋白的 cDNA 克隆 pGT114 为本实验室以前研究的结果。

(ii) 植物. 瞬间表达用温室培养的长到 10~12 片叶的本明烟(*Nicotiana benthamiana*). 无菌培养的烟草 NC89, 植株长到 4~5 叶时即可用于转化实验。

(iii) 生化试剂及寡核苷酸引物. 限制性内切酶、连接酶和 DNA 修饰酶为 Gibco BRL 等公司的产品; DNA 测序盒为 Pharmacia 公司产品; α -³⁵S-dATP 购自 NEN 公司; 4-甲基 7-羟基香豆素(4-MU)和 4-甲基 7-羟基香豆素葡萄糖醛酸(MUG)为 Sigma 公司产品; PCR 引物由上海生物工程公司合成。

(iv) 4 种 *GUS* 基因植物表达载体的构建和根癌农杆菌转化. pBin437 及 pBin438 的构建见文献[7, 8]. DNA 的酶解、连接、克隆及克隆筛选按常规方法进行. DNA 序列分析按测序盒厂家提供的方法进行. 二元表达载体向根癌农杆菌 LBA4404 直接转化按文献[9]进行. 由于 TMV 3' 端 UTR 在第 4 个假结中存在一个潜在的 poly(A)加尾信号 AATAAA, 为了确定这个 poly(A)加尾信号能否发挥 poly(A)信号的功能及 3' UTR 能否代替 poly(A), 设计了一个没有

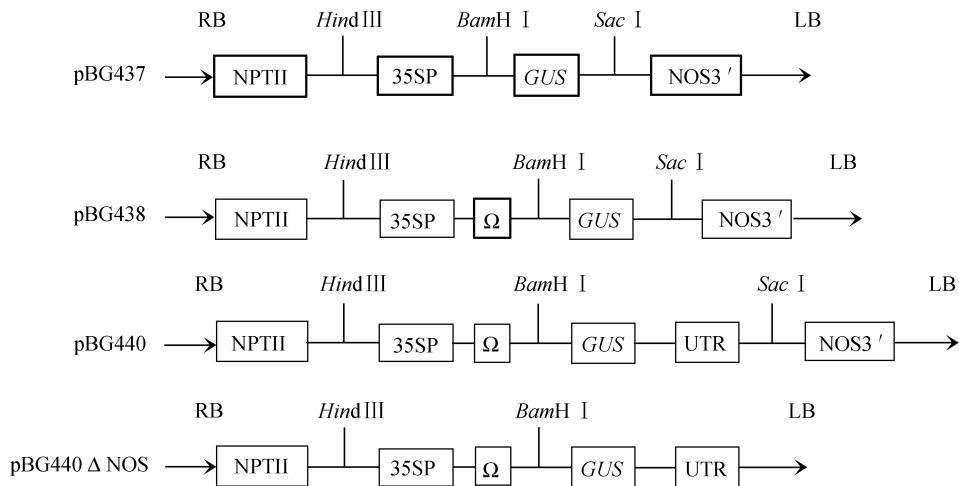


图 1 嵌合 *GUS* 基因表达载体的结构

终止子的二元植物表达载体 pBG440 Δ NOS. 含有内含子的 *GUS* 基因在植物表达载体中的表达框架见图 1. 经酶切和 PCR 确定其结构正确后即转入根癌农杆菌, 用于烟草的转化。

(V) 根癌农杆菌介导的嵌合 *GUS* 基因的瞬间表达. 将一个根癌农杆菌单菌落接种到 5 mL LB(含卡那霉素 50 μ g/mL)培养基中, 在 28 $^{\circ}$ C 300 r/min 下, 摇床培养过夜. 取上述菌液 1 mL, 加到 50 mL 同样培养基中, 28 $^{\circ}$ C 300 r/min 摇过夜. 然后在 4 $^{\circ}$ C, 4 000 r/min 离心收集

菌体, 再将菌体悬浮, 使最终浓度至 A_{600} 为 1.5, 静止放置在室温下 3 h. 在同一植株的不同叶片上分别注射 4 种根癌农杆菌溶液, 使根癌农杆菌液浸润整个叶片, 以 LBA4404 菌悬液为空白对照. 3~5 d 内按文献[10]的方法检测注射过的叶片蛋白提取液的 GUS 比活性.

(vi) 根癌农杆菌介导的烟草转化和再生. 按文献[9]进行, 分化培养时卡那霉素(Kn)浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 生根培养时为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

(vii) 转化再生植株的 PCR 检测. 烟草 DNA 的提取按文献[8]进行, 取 1 μL (约 20 ng) 烟草 DNA, 用 NOS 正链引物 (5' CGCGGTGTCATCTATGTTAC) 和 GUS 负链引物 (5' ATCGAAACGCAGCACGATAC), 按常规方法进行 PCR 和电泳检查分析.

(viii) GUS 酶活性测定. 按文献[10]进行, 蛋白浓度的测定用 Bio-Rad Protein II 测定液按厂家提供方法进行.

2 结果

2.1 嵌合 GUS 基因的瞬间表达

用根癌农杆菌注射本明烟叶片后检测嵌合 GUS 基因的瞬间表达情况, 所得结果应是反映一群被转化的细胞中 GUS 活性的平均值, 这对比较外源基因的表达效果有较为可信的参考价值. 4 种嵌合基因的瞬间表达结果如图 2 所示. 从图 2 可以看出, 转 pBG440 的叶片 GUS 表达效果最好, 平均比活性是转 pBG437 的 6.6 倍; 是转 pBG438 的 1.4 倍; 转 pBG438 的是转 pBG437 的 4.7 倍. 实验中发现相同结构的嵌合 GUS 基因在不同植株上表达水平差异很大, 这可能是不同植株生理状态不同、转化效率差别大造成的. 另外, 同一植株不同位置的叶片表达效果也有差异, 但是差异并不显著. 实验中在同一植株不同位置的叶片上注射含不同嵌合 GUS 基因的根癌农杆菌菌液, 以及在不同植株上取相对相同位置的叶片注射不同的农杆菌菌液, 以减小系统误差. 这 4 种表达载体中的 GUS 基因在不同植株中表达水平有很大差异. 虽在所测植株数有限的情况下不宜进行统计分析, 但基本趋势是一致的, 即如图 2 所示, 每株中 GUS 基因的表达活性都是转 pBG440 > pBG438 > pBG437, 转 pBG440 Δ NOS 检测不到 GUS 活性. 这一结果也反映了用农杆菌介导的瞬间表达方法所得结果是稳定可靠的.

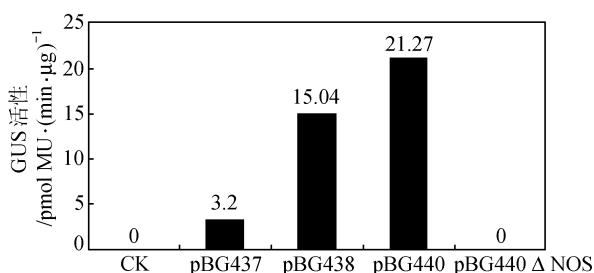


图 2 4 种不同结构的 GUS 基因瞬间表达的平均活性

2.2 在转基因烟草中 TMV UTR 对 GUS 基因表达的影响

对部分表达 GUS 酶活性的再生植株进行 PCR 检测, 每种随机取 20 个样, PCR 均为阳性, 取 pBG440 Δ NOS 植株检测, 80% 的植株 PCR 为阳性. PCR 检测结果 (资料略) 初步表明可以表达 GUS 活性的植株或 80% 以上的转化再生植株为转基因植株.

可能由于 GUS 基因在烟草基因组中插入位置的不同, 或不同植株之间生理状态不同, 造成个体之间表达水平差异很大. 通过扩大样本量, 可使得系统中单个样本对结果的影响减

小,取得更为准确可信的结果. 本实验共获得 pBG437 转基因 50 株,pBG438 的 95 株,pBG440 的 116 株, pBG440 Δ NOS 的 80 株. 对每一植株进行 GUS 比活性测定后, 获得有 GUS 活性表达的 pBG437 为 33 株, 占总再生植株的 66%; pBG438 为 50 株, 占 53%, pBG440 为 81 株, 占 70%. 转 pBG440 植株中, 表达 GUS 活性的植株比例稍高于其他类型的比例, 可能是这一类型的 *GUS* 基因的表达水平高造成的. 但总的看各类型植株中表达 *GUS* 活性的植株占总再生植株的百分比差别不大, 表明 4 个构建的转化条件较一致, 转化效率相近. 转 pBG440 Δ NOS 的植株虽 PCR 为阳性但没有检测到 *GUS* 表达. 不同表达水平的转基因植株在各组转基因植株中所占的比例见图 3. 从图 3 可见, 转 pBG440 的烟草 *GUS* 活性高表达的 (>30 pmol MU/(min $\cdot$ μ g)) 所占的比例最大, 转 pBG438 的 *GUS* 活性高的植株占的比例高于转 pBG437 的烟草, 在 *GUS* 低水平表达的植株 (1~10 pmol MU/(min $\cdot$ μ g)) 中, 转 pBG437 的比例最高, 转 pBG440 的最低. pBG437 等 3 组转基因植株 *GUS* 平均表达活性差异的统计分析结果列于表 1. 从表 1 可见, 转 pBG440 的平均 *GUS* 比活性最高, 是转 pBG438 的 1.6 倍, 是转 pBG437 的 5 倍; 转 pBG438 的平均 *GUS* 比活性明显高于转 pBG437 的, 是转 pBG437 的 3.2 倍. 在 *t* 检验中与 $t_{0.05}$ 值相比, 3 组转基因植株表达的 *GUS* 平均活性之间的差异均达显著水平. 这表明 3 组表达水平的差异是基因的不同结构所致, 而不是个体差异造成的.

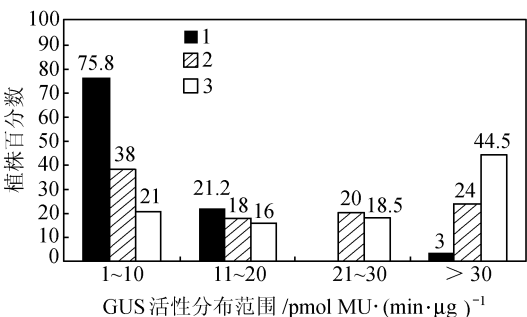


图 3 转基因烟草 *GUS* 活性的分布
1——pBG437, 2——pBG438, 3——pBG440

表 1 *GUS* 表达水平差异检验 (*t* 检验)^{a)}

表达载体	植株数	GUS 平均活性	差异显示 (<i>t</i>)		
			$P = 0.95, t_{0.05} = 1.98 < t $		
			pBG437	pBG438	pBG440
pBG437	33	7.987 75	—	*	- 4.894 58
pBG438	50	23.341 4	- 3.325 22	—	*
pBG440	81	36.693 7	*	2.435 08	—

a) *GUS* 活性单位: pmol MU/(min $\cdot$ μ g). * 表示差异显著;—表示不显著

3 讨论

Dowson 等人^[3]在原生质体瞬间表达体系中, 将 TMV 的 5' UTR 的 Ω 片段加到 *CAT* 基因和 *GUS* 基因 5' 端, 可以提高报道基因的表达 4~6 倍. Gallie^[2]用烟草原生质体电转化实验证明, 添加 TMV Ω 片段到 *CAT*, *GUS*, *LUC* 基因转录物的 5' 端, 可分别提高表达 33, 21 和 36 倍. 在我们用农杆菌介导的瞬间表达和转基因烟草实验中, 转 pBG438(Ω -*GUS*-NOS)的 *GUS* 基因的平均表达水平分别是 pBG437(*GUS*-NOS)的 4.7 和 3.24 倍(图 2, 表 1), 这表明在嵌合基因的 5' 端添加 TMV Ω 片段可以明显提高外源基因的表达. 从而证明在整体植物中, TMV Ω 片段对外源基因的表达确实有增强作用, 但增强的程度与 Gallie^[2]在原生质体体系中得到的结果有较大差别, 用整体植物所得结果更能反映该调控元件在体内的真实作用.

有 TMV Ω 片段和 3' UTR 同时存在的表达载体 pBG440, 在瞬间表达和转基因植物中,

GUS 基因都获得了最好的表达效果. 这表明整合状态下 TMV 3' UTR 对报道基因的表达也有一定的增强作用, 当 TMV 3' UTR 和 Ω 片段同时存在时, 能进一步提高外源基因的表达(见图 2, 表 1). 这一在整体植物中的结果与 Danial 等人^[11]在体外原生质体表达体系中的结果基本一致.

在 *GUS* 基因的 3' 端去掉 NOS 终止子, 仅有 TMV 3' UTR 单独存在时(pBG440 Δ NOS)不能有效地表达 *GUS* 报道基因, 所以推测 TMV 3' UTR 不能替代转录终止子, TMV 3' UTR 中潜在的 poly(A)信号也不能起到正常的添加 poly(A)尾的作用. 这再次表明 poly(A)的添加不仅需要 poly(A)信号, 其他一些旁侧序列也是必需的^[12,13]. 在整合状态下, TMV 3' UTR 和 Ω 片段提高外源基因表达的作用依赖于 poly(A)的存在, 正常的 poly(A)加尾是它们发挥作用的前提. 这再一次证明了 poly(A)尾对真核 mRNA 的稳定性以及对翻译的效率都有至关重要的作用. 改变 poly(A)信号或其他相关序列将会影响转录的正常终止, 使得 poly(A)的加尾不正常, 从而会严重影响 mRNA 的稳定性及蛋白的正常表达.

本实验从瞬间表达和转基因植物两个方面, 对 TMV-RNA 的非翻译区对嵌合 *GUS* 基因在整体植物中表达的影响作了较系统的研究, 证明在整合状态下, TMV-RNA 的 Ω 片段和 3' UTR 区可以明显地提高外源基因的表达水平. 同时所构建的植物表达载体在植物基因工程研究中将会发挥重要作用.

致谢 本工作为国家“八六三”生物高技术计划支持项目(批准号: Z-17-01-01).

参 考 文 献

- 1 Gallie D R, Feder J N, Robert T, et al. Functional analysis of the tobacco mosaic virus tRNA-like structure in cytoplasmic gene regulation. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(18): 5031~5036
- 2 Gallie D R. Translational control of cellular and viral mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32: 145~158
- 3 Dowson D M J, Ashurst J L, Mathias S F, et al. Plant viral leaders influence expression of a reporter gene in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 1993, 23: 97~107
- 4 毛立群, 郭三堆. Ω 序列和 3' poly(dA)长度与基因表达效率的关系. *植物学报*, 1998, 40 (12): 1166~1168
- 5 Gallie D R, Lucas W J, Walbot V. Visualizing mRNA expression in plant protoplast: factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell*, 1989, 1: 301~311
- 6 Sleat D E, Hull R, Turner P C, et al. Studies on the mechanism of translational enhancement by the 5' leader sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Eur J Biochem*, 1988, 175(1): 75~86
- 7 贾盘兴, 蔡金科, 马德钦, 等. 微生物遗传学实验技术. 北京: 科学出版社, 1992. 104
- 8 李太元, 田颖川, 秦晓峰, 等. 高效抗虫转基因烟草的研究. *中国科学, B 辑*, 1994, 24(3): 276~282
- 9 田颖川, 秦晓峰, 许丙寅, 等. 表达苏云金杆菌 δ 内毒素基因的转基因烟草的抗虫性. *生物工程学报*, 1991, 7(1): 1~10
- 10 Richard A J. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, (5): 387~405
- 11 Danial R, Gallie V W. RNA pseudoknot domain of tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells. *Genes & Development*, 1990, 4: 1149~1157
- 12 Gil A, Proufoot N J. A sequence downstream of AAUAAA is required for rabbit β -globin mRNA 3' -end formation. *Nature*, 1984, 312: 473~474
- 13 McDevitt M A, Imeperiale M J, Haseeb A I, et al. Requirement of a downstream sequence for generation of a poly(A) addition site. *Cell*, 1984, 37: 993~995

(1999-09-28 收稿, 2000-01-05 收修改稿)