

# PTA 表达盒的构建及其对本氏烟草 SGS3 基因的干扰研究

孙丹阳<sup>1</sup>, 殷雪鹏<sup>1</sup>, 秋艳<sup>1</sup>, 李景环<sup>1,2</sup>, 哈达<sup>3</sup>, 包文化<sup>1,2</sup>

(1. 内蒙古师范大学 生命科学与技术学院, 内蒙古 呼和浩特 010022;

2. 内蒙古自治区高等学校蒙古高原生物多样性保护与可持续利用重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010022;

3. 内蒙古大学 生命科学学院牧草与特色作物生物技术教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010070)

**摘要:** RNA 干扰作为植物抗病毒免疫的核心机制,其调控网络中 SGS3(suppressor of gene silencing) 基因在 RDR6 介导的双链 RNA 合成过程中扮演关键角色。为深入探究 SGS3 基因功能,对本氏烟草 SGS3 基因引入新型多靶点基因沉默系统——PTA(poly-tRNA-amiRNA)技术,并与传统单个 amiRNA 进行 RNAi 效率的系统性比较。首先针对 SGS3 基因的锌指(ZF)、XS 和卷曲螺旋(coiled coil,CC)等三个结构域各设计合成一个特异性 amiRNA,通过分子克隆技术构建 pBI121-SGS3-amiRNA1/2/3 重组表达载体。利用农杆菌介导的瞬时表达系统,对三个重组载体进行功能验证,结果显示 amiRNA2 对 SGS3 基因的沉默效率显著高于其他两个靶点。基于此,采用 Golden Gate 克隆技术,将上述三个 amiRNA 与三个 tRNA 串联组装,成功构建 PTA-SGS3 表达盒,并整合至 pBI121 植物表达载体。通过与携带绿色荧光蛋白标记的大豆花叶病毒侵染性克隆 SMV-GFP 共侵染本氏烟草,系统检测 PTA 系统的 RNAi 效率及抗病毒活性。RT-qPCR 分析表明,相较于单一 amiRNA,PTA 系统可使 SGS3 基因沉默效率提升 44.8%,显著增强靶基因沉默效果。通过 GFP 荧光强度定量分析及 DAB 组织化学染色实验,发现经 PTA 表达盒侵染的本氏烟草中,SMV 病毒积累量较单 amiRNA 处理组增加 50.6%。

**关键词:** 本氏烟草;RNA 干扰;SGS3 基因;amiRNA;PTA 表达盒

**中图分类号:** Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-8735(2026)01-0001-09

**DOI:**10.3969/j.issn.1001-8735.2026.01.001

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)作为一种重要的植物免疫机制,在抵御病毒侵染中发挥着关键作用。植物中 RNAi 主要由小干扰 RNA(small interfering RNAs, siRNAs)和微小 RNA(microRNAs, miRNAs)介导,通过严格调节植物发育,维持基因组稳定性及保护植物免受外源基因的入侵,发挥多重生物学功能<sup>[1-2]</sup>。RNAi 效应由内源或外源的长双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱导触发,这些 dsRNA 被 RNase III 型 RNA 酶 Dicer 或 Dicer 样蛋白(DICER-like proteins, DCL)切割成 21~24 nt 的 siRNA 或 miRNA<sup>[3]</sup>,随后被 Argonaute(AGO)蛋白加载,并结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC),该复合物通过碱基互补配对识别靶标基因 mRNA 或 DNA,特异性降解靶标 mRNA 或抑制翻译实现转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS),或通过影响 DNA 甲基化实现转录水平基因沉默(transcription gene silencing, TGS)<sup>[4-5]</sup>。dsRNA 的存在是转录后基因沉默(PTGS)的主要触发因素,其中大部分由 RDR6 与 RNA 结合蛋白沉默基因的抑制

收稿日期: 2025-06-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目“鳞翅目昆虫 RNAi 效率的优化及寄主介导的多靶基因沉默(MTS)体系的建立”(32260667);内蒙古师范大学基本科研业务费专项资金资助项目“利用 VIGS 技术挖掘玉米黏虫有效致死基因”(2023JBYJ019);大学生创新训练资助项目“利用核酸农药技术筛选靶向玉米黏虫的关键基因”(S202310135030)。

作者简介: 孙丹阳(2001—),女,在读硕士研究生。

通信作者: 包文化(1990—),女,讲师,博士,主要从事植物抗虫抗逆分子生物学研究,E-mail:20220047@imnu.edu.cn。

子 3(SGS3)共同作用<sup>[6-7]</sup>。SGS3 是 RNA 沉默途径中的一个核心蛋白,尤其是在转录后基因沉默(PTGS)中扮演重要角色,其功能与 RDR6 的功能交织在一起<sup>[8]</sup>。SGS3 通常包含三个结构域,分别是锌指结构域(ZF)、与水稻基因 X 产物相似的 XS 结构域(XS)和卷曲螺旋结构域(CC)。其中,XS 结构域参与 RNA 结合,而 CC 结构域参与同源二聚体形成,ZF 结构域的功能尚不清楚<sup>[9-10]</sup>。SGS3 在 RNAi 介导的抗病毒机制中的作用尚不完全清楚。因此,本文研究本氏烟草 SGS3 基因在 RNAi 介导的抗病毒作用中对大豆花叶病毒(Soybean mosaic virus,SMV)感染的作用。

人工小 RNA(artificial microRNA, amiRNA)是另一种重要的 RNA 沉默工具。与 siRNA 不同,amiRNA 技术是一种基于内源 miRNA 前体骨架的新型基因沉默技术。该技术通过将内源 miRNA 前体茎环结构中的 miRNA/miRNA\*序列替换为人工设计的 amiRNA/amiRNA\*序列,经生物体内加工后产生具有特定功能的人工 miRNA,从而实现靶基因表达的调控,可有效抑制靶标基因的表达<sup>[11]</sup>。amiRNA 技术具有唯一性、有效性和精确性,目前已在植物生长发育调控、作物遗传改良、代谢通路基因功能解析以及生物/非生物胁迫耐受性研究等领域展现出重要应用价值<sup>[12]</sup>。

针对单个 amiRNA 仅能靶向干扰单一基因位点的局限性,本研究引用了一种基于 amiRNA 的 PTA 技术以提升基因沉默效率。该技术借助 Golden Gate 克隆技术同时组装多个片段,将多个 tRNA 片段与针对不同靶标序列设计的 amiRNA 序列串联,构建成 PTA 多顺反子表达盒。当进行转录时,tRNA 两端的特异性识别序列被 2 个核糖核酸酶(RNaseP 和 RNaseZ)切割,同步释放出多个独立的 amiRNA。这些 amiRNA 可分别靶向结合各自的特异性靶标位点,实现对同一基因多位点或多个不同基因的同时干扰,目前该技术仅应用于玉米黏虫和拟南芥,还未见其他相关报道<sup>[13-14]</sup>。PTA 技术通过整合多靶点沉默机制,突破了传统单靶点干扰的效率瓶颈,为复杂基因网络调控研究及多基因协同改良提供了高效工具。本研究针对本氏烟草 RNAi 相关途径病毒防御相关的 SGS3 基因构建 PTA 表达盒,并比较其与单个 amiRNA 之间的 RNAi 效应,探究表达多个基因的 amiRNA 的 PTA 表达盒是否产生更高效的 RNA 干扰效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物栽培和试剂

研究所使用的烟草为 17wt 本氏烟草,种植于本实验室人工气候室,生长最佳温度为(25±2)℃,相对湿度为 70%~80%,光周期为 16 h:8 h(光:暗)。Taq 聚合酶、Trizol 试剂、cDNA 反转录试剂盒、*Bsa* I 酶、*T*<sub>7</sub> 连接酶和 RT-qPCR 检测试剂盒等试剂购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌 DH5α 和农杆菌 GV310 以及 2K-Trans Marker 购自全式金公司。T-miR159b 和 pGTR 载体由华中农业大学谢卡宾教授惠赠,双元表达载体 pBI121 保存于本实验室。引物合成由南京金斯瑞公司完成,DNA 测序由北京擎科生物科技公司完成。

### 1.2 靶基因 SGS3 特异的 amiRNA 重组载体的构建

利用本氏烟草基因组数据库(www.benthgenome.com)针对 SGS3 基因设计 3 个 amiRNA 序列。根据 amiRNA 序列设计引物,通过 PCR 扩增获得目的片段,经双酶切回收后,连接至 *Xba* I 和 *Kpn* I 线性化的 pBI121 载体,构建重组载体 pBI121-amiRNA1/2/3。利用菌落 PCR、酶切验证和测序等方式确认克隆的正确性。

### 1.3 PTA 表达盒的构建及本氏烟草瞬时干扰分析

以 T-miR159b 和 pGTR 质粒为模板,通过引物分别扩增 3 个 amiRNA 和 3 个 tRNA 片段(表 1),经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后将符合预期大小的片段进行胶回收。将 6 个回收产物按 1:1 摩尔比混合,通过 *Bsa* I /*T*<sub>7</sub> 酶一步法进行 Golden Gate 组装。具体组装的反应体系和反应程序如下:6 个片段胶回收产物各 40~50 ng,BSA 2 μL;2×*T*<sub>7</sub> DNA ligase Buffer 10 μL,*Bsa*I 0.5 μL;*T*<sub>7</sub> DNA 连接酶 0.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。混合后于 37℃、5 min 酶切和 20℃、10 min 连接;并于 20℃延伸 1 h。组装产物稀释 10 倍后,利用上述扩增长片段的引物 PCR 扩增,获得 845 bp 的 PTA 多顺反子表达盒,连接至

pMD19-T 载体并经酶切、PCR 扩增及测序验证。验证正确的 PTA 片段亚克隆至 pBI121 表达载体, 构建 pBI121-PTA-AGO 重组质粒并转化 GV3101 农杆菌。利用该菌株与表达 GFP 的 SMV 病毒共侵染 3~4 叶期本氏烟草, 侵染液中加入 1:100 的 1 mol/L MES 和  $MgCl_2$ , 以及 1:1 000 的 200 mmol/L 乙酰丁香酮。平行对照实验使用单一的 AGO1 或 AGO2 基因的 pBI121-amiRNA 重组载体。

表 1 研究所有引物

Tab. 1 All primers used in this study

引物序列 5'-3'	引物名称	扩增目的	扩增长度/bp
ggatctagaGTGGCACCGAGTCGG	PTA-1	用于扩增 PTA-SGS3 表达盒的 第一个 tRNA 片段	187
ATGGTCTCAGCTTGTTACGCATTGCAC- CAGCCGGGAAT	PTA-2 SGS3		
TAGGTCTCCAAGCTTGGACCTGGAGGGTT- TAGCAGGGTGA	PTA-3 SGS3	用于扩增 PPTA-SGS3 表达盒的 第一个 amiRNA 片段	120
ATGGTCTCACATTGTTACGCATGAAGAGT- GAAGCCATTAATA	PTA-4 SGS3		
TAGGTCTCCAATGTTGGACCAAAA- CAAAGCACCCAGTGGTC	PTA-5 SGS3	用于扩增 PTA-SGS3 表达盒的 第二个 tRNA 片段	187
ATGGTCTCAGCGTGTCTGACGGTGCAC- CAGCCGGGAAT	PTA-6 SGS3		
TAGGTCTCCACGCGAAGAGATGGAGGGTT- TAGCAGGGTGA	PTA-7 SGS3	用于扩增 PTA-SGS3 表达盒的 第二个 amiRNA 片段	120
ATGGTCTCACAGTGTCTGACGGGAAGAGT- GAAGCCATTAATA	PTA-8 SGS3		
TAGGTCTCCACTGGAAGAGAAAA- CAAAGCACCCAGTGGTC	PTA-9 SGS3	用于扩增 PTA-SGS3 表达盒的 第三个 tRNA 片段	120
ATGGTCTCAGCTGAGCTTAGCCTGCAC- CAGCCGGGAAT	PTA-10 SGS3		
TAGGTCTCCCAGCGAGAAGTTGGAGGGTT- TAGCAGGGTGA	PTA-11 SGS3	用于扩增 PTA-SGS3 表达盒的 第三个 amiRNA 片段	210
TCACGGAGGTACCTTTTTTTTTTTT- TACTTCTCCATGAGCTTAGCCGAAGAGT- GAAGCCA	PTA-12 SGS3		
TCACggaggtaccTTTTTT	PTA-13	与 PTA1 一起用于扩增组装之后 长片段	835
GAAACACCAGATGCAGGCTAAA CAGTCCGCGCATCATGAATTAT	SGS3-qPCR-F SGS3-qPCR-R	SGS3 基因 qPCR 引物	194
ggatctagaATGCGTAACAAGCTTGGACCTG- GAGGGTTTAGCAGGGTGAAGTAAAG	amiRNA1-F	SGS3 基因 amiRNA1 扩增引物	204
ggaggtaccATGCGTAACAATGTTGGAC- CAGAAGAGTGAAGCCATTAAGGG	amiRNA1-R		
ggatctagaCCGTCAGACACGCGAAGAGATG- GAGGGTTTAGCAGGGTGAAGTAAAG	amiRNA2-F	SGS3 基因 amiRNA2 扩增引物	204
ggaggtaccCCGTCAGACACTGGAAGAGA- AGAAGAGTGAAGCCATTAAGGG	amiRNA2-R		
ggatctagaGGCTAAGCTCAGCGAGAAGTTG- GAGGGTTTAGCAGGGTGAAGTAAAG	amiRNA3-F	SGS3 基因 amiRNA3 扩增引物	204
ggaggtaccGGCTAAGCTCATGGAGAAG- TAGAAGAGTGAAGCCATTAAGGG	amiRNA3-R		

注:表中红色字体的序列为 XbaI 酶切位点,绿色字体的序列为 KpnI 酶切位点。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 和量化 GFP 荧光强度

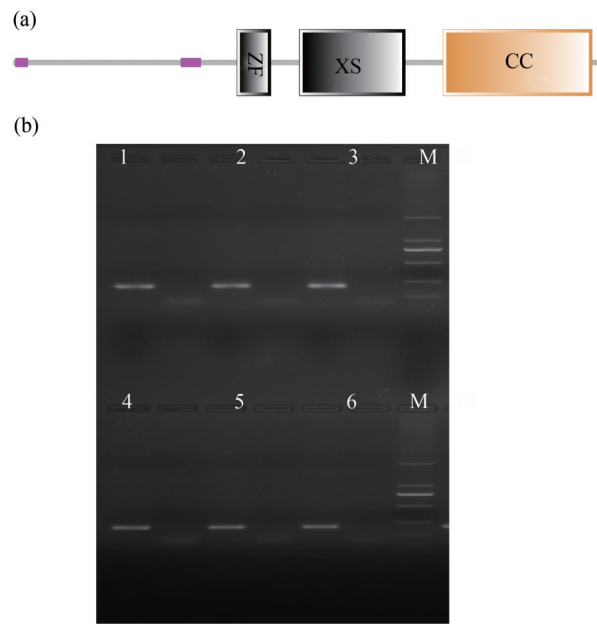
在本氏烟草瞬时表达系统中,通过实时荧光定量 PCR 检测 pBI121-PTA-SGS3 或 pBI121-amiRNA 的靶基因沉默效应。侵染本氏烟草 6 天后收集侵染部位的叶片,使用 Trizol 法提取总 RNA 并反转录生成 cDNA,以 *NbActin*(登录号 NM\_102866.3)作为内参,比较 PTA 与单个 amiRNA 的沉默效果。利用 Gel-Pro Analyzer 软件,对 SMV-GFP 与 PTA 表达盒或单个 amiRNA 共侵染部位的 GFP 荧光转换为灰度密度,用 *t* 检验比较法比较单个 amiRNA 和 PTA 表达盒侵染的叶片 GFP 荧光强度值。

## 2 结果分析

### 2.1 利用特异性 amiRNA 在本氏烟草中瞬时沉默靶基因

本研究以本氏烟草 RNAi 途径中的关键基因 SGS3 为靶标,分别在其 3 个不同结构域 ZF、XS 以及 CC(图 1a)各设计 1 个 amiRNA 序列,以拟南芥 miR159b 骨架为模板扩增 3 个 amiRNA 序列,将其分别克隆至双元表达载体 pBI121 中。菌落 PCR、质粒 PCR 均表明其大小与预期大小相符(204 bp),进一步测序验证表明成功构建了 3 个重组载体,分别命名为 pBI121-SGS3-amiRNA1、pBI121-SGS3-amiRNA2 和 pBI121-SGS3-amiRNA3(图 1b)。

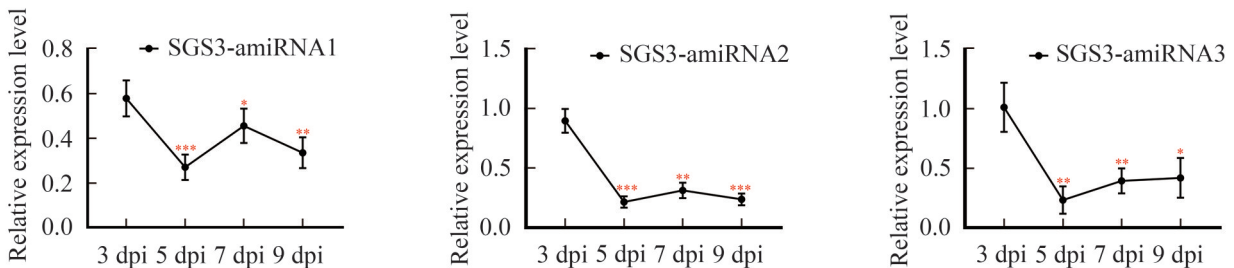
为确定最佳干扰时间点,本文将上述 3 个重组质粒分别转化至农杆菌 GV3101 后,注射侵染 17wt 本氏烟草叶片。分别于侵染后 3、5、7、9 d 取样,通过 RT-qPCR 分析 SGS3 基因表达水平。*NbActin* 基因作为内参基因,根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算靶标基因的表达情况,通过 *t* 检验计算对照组和处理组之间的显著性差异,每组实验做 3 个技术重复、3 个生物重复。结果显示,侵染第 5 d 时干扰效果最为显著(图 2),故后续实验将采用侵染 5 d 后取样,检测靶基因的干扰效果。



注:(a)为 SGS3 蛋白结构域;(b)为 PCR 鉴定电泳图,泳道 M 为 Trans2K Marker;泳道 1、2、3 为三个菌落 PCR 检测结果;泳道 4、5、6 为三个质粒 PCR 检测结果。

图 1 SGS3 蛋白结构域和 amiRNA 序列的菌落及质粒 PCR 的结果

Fig. 1 SGS3 protein domains and colonies of three amiRNA sequences along with plasmid PCR results



注:\*,\*\*,\*\*\*分别表示  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  和  $P < 0.001$  的显著性差异。下同。

图 2 3 个 amiRNA 在不同取样时间对 SGS3 基因的干扰效率比较

Fig. 2 The comparison of the interference efficiency of three amiRNAs on the SGS3 gene at different sampling times

将各个 amiRNA 重组体侵染本氏烟草 5 d 后取样,采用 RT-qPCR 分析靶基因表达水平,评估 3 个 amiRNA 的干扰效率,结果如图 3 所示。接种空载体 pBI121(EV)的植株作为对照组,对照中的 SGS3 表达量被设定为 1,本氏烟草 *NbActin* 基因作为内参,*t* 检验同上。RT-qPCR 结果显示,SGS3 基因的 3 个 amiRNA 中,amiRNA2 的干扰效果最佳,与对照组相比,靶基因的表达量下降了 74.5%,而 amiRNA1 和 amiRNA3 的靶基因表达量分别下降了 27% 和 38.5%。

## 2.2 构建本氏烟草 SGS3 基因特异性 PTA 表达盒

本研究引用了一种基于 PTA 的多靶基因沉默系统,其核心是采用 Golden Gate 克隆技术实现无缝组装。Golden Gate 克隆利用 II s 型限制性内切酶(如 *Bsa* I)在识别位点外切割 DNA 产生黏性末端,同时通过  $T_7$  连接酶将多个目的 DNA 片段按既定顺序连接,实现无痕拼接。该系统的多顺反子 tRNA-amiRNA 转录后,tRNA 被 RNaseP 和 RNaseZ 特异性识别并切割,释放多个 amiRNA 同时干扰相应靶基因。期望与单一 amiRNA 相比,实现更显著的转录后基因沉默效果(图 4)。

利用表 1 引物扩增构建 PTA-SGS3 表达盒所需的 3 个 amiRNA 和 3 个 tRNA 片段,琼脂糖凝胶电泳检测显示,PCR 产物大小与预期一致,其中 amiRNA1 与 amiRNA2 均为 187 bp,amiRNA3 为 210 bp;tRNA1 为 124 bp,tRNA2 和 3 个 tRNA 片段进行回收纯化后,采用 Golden Gate 克隆技术,按照预先设计的顺序将 6 个片段进行串联组装。随后使用 PTA1 和 PTA13 引物进行 PCR 扩增,成功获得 SGS3 基因对应的 PTA 表达盒。

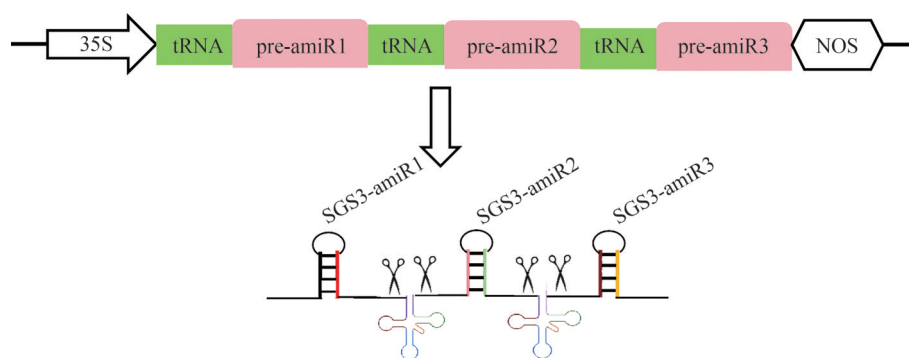


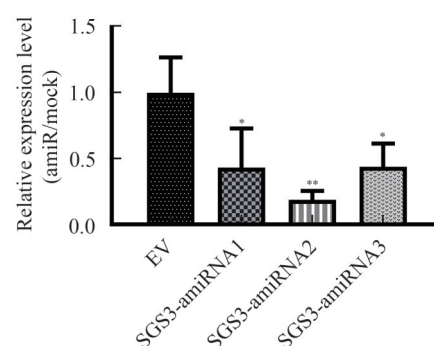
图 4 PTA 表达盒的作用原理

Fig. 4 The schematic of the PTA expression cassette mechanism

将胶回收的 PTA 表达盒克隆至 pMD19-T 载体,经 PCR 扩增、酶切及测序验证,成功构建 pMD19-T-PTA-SGS3(图 5b,c)。从该重组载体中扩增 PTA-SGS3 表达盒,连接至 pBI121 表达载体,PCR 结果显示,750~1000 bp 区间存在特异性条带与预期大小相符(845 bp),*Xba*I/*Kpn*I 双酶切产物大小符合预期(图 5d,e),DNA 测序进一步证实 PTA-SGS3 表达盒成功整合至 pBI121 表达载体。

## 2.3 SGS3 基因特异性 PTA 表达盒对抗 SMV 活性的影响

为了验证靶标基因 amiRNA 对应的 PTA 表达盒是否能够提高 RNAi 效率,本文将 PTA 表达盒(pBI121-PTA-SGS3)和前期验证干扰效果最佳的单个 amiRNA 的重组载体 pBI121-SGS3-amiRNA2,分别与表达绿色荧光蛋白(GFP)的大豆花叶病毒(SMV-GFP)载体共侵染本氏烟草。对本氏烟草侵染部位的

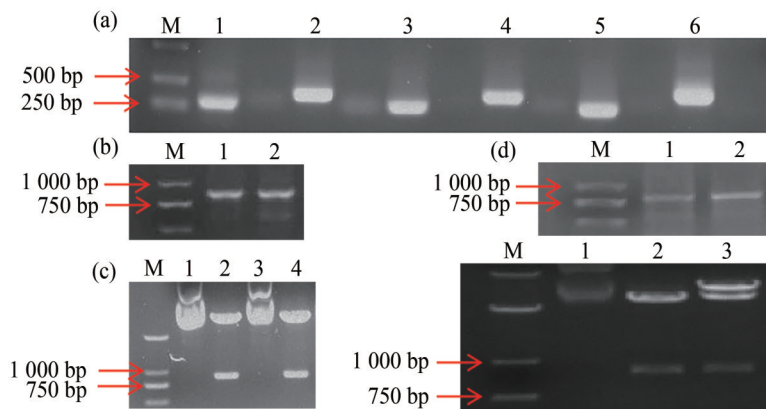


注:将 3 个 pBI121-amiRNA 重组质粒转化到 GV3101 中侵染本氏烟草叶片,并在侵染 5 天后收集叶片,通过实时定量 PCR 测定靶标基因的表达水平。

图 3 SGS3 基因 3 个 amiRNA 序列干扰效率比较

Fig. 3 The comparison of the interference efficiency of the three amiRNA sequences targeting the SGS3 gene

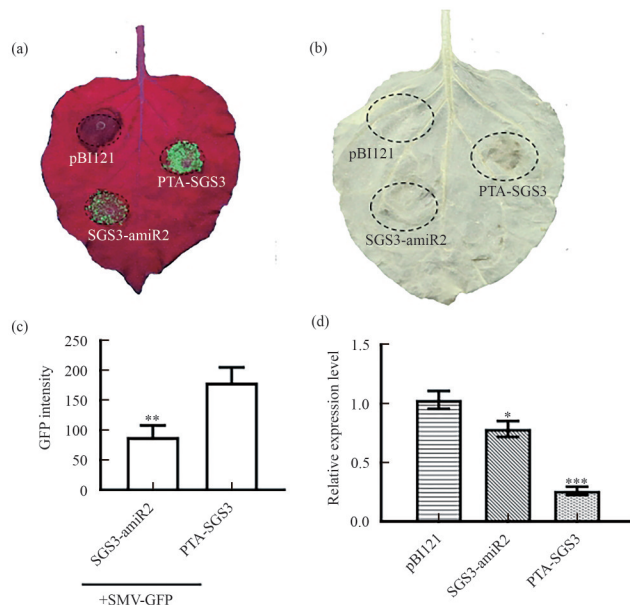
GFP 荧光强度分析发现,相对于表达单个 amiRNA,串联表达 SGS3 基因 3 个 amiRNA 的 PTA 表达盒的病毒积累量更多,也即 GFP 荧光强度更强(图 6a),表明 SGS3 基因下调使其抗 SMV 的能力下降。其他 pBI121-SGS3-amiRNA1 和 pBI121-SGS3-amiRNA3 也做了与病毒共侵染实验,但未见明显的表型效果。利用 Gel-Pro Analyzer 软件对其荧光强度进一步分析也发现,与 pBI121-SGS3-amiR2 相比,pBI121-PTA-SGS3 荧光强度提高了 50.6%(图 6c)。与此同时,侵染本氏烟草叶片 4 d 后,选择出现明显表型的叶片进行 DAB 染色观察,发现侵染 PTA-SGS3 的叶片坏死相较于单个 amiRNA 更严重,与 GFP 荧光强度的结果一致(图 6b)。最后,通过对靶标基因进行表达量分析发现,注射 PTA-SGS3 的本氏烟草的 SGS3 基因的表达水平相较于单个 amiRNA 下调了 44.8%(图 6d)。



注:(a)泳道 1、3、5 是以 pGTR 为模板扩增的 3 个 tRNA 片段,泳道 2、4、6 是以 T-miR159b 为模板扩增 3 个 amiRNA 序列;(b)为重组质粒 pMD19-T-PTA-SGS3 的 PCR 检测结果;(c)为重组质粒 pMD19-T-PTA-SGS3 的酶切验证结果,泳道 1、3 为未酶切的重组质粒 pMD19-T-PTA-SGS3,泳道 2、4 为 pMD19-T-PTA-SGS3 的 *Xba*I 和 *kpn*I 酶切产物;(d)为 pBI121-PTA-SGS3 重组质粒的 PCR 检测结果;(e)为 pBI121-PTA-SGS3 重组质粒的双酶切检测,泳道 1 为未酶切的重组质粒 pBI121-PTA-SGS3,泳道 2、3 为重组质粒 pBI121-PTA-SGS3 的 *Xba*I 和 *kpn*I 酶切产物。

图 5 PTA 表达盒重组载体的构建

Fig. 5 The construction of the recombinant vector of the PTA expression cassette



注:(a)为 SMV 病毒积累量;(b)为 DAB 染色结果显示叶片出现坏死表型;(c)为 GFP 蛋白积累量;(d)为靶标基因相对表达量。

图 6 PTA-SGS3 或单个 amiRNA 与 SMV-GFP 共侵染后本氏烟草叶片表型以及表达量分析

Fig. 6 The phenotypic analysis and expression level quantification of *Nicotiana benthamiana* leaves co-infiltrated with either the PTA-SGS3 or a single amiRNA together with SMV-GFP

GFP 蛋白荧光强度分析、SMV-GFP 积累情况、DAB 染色以及靶标基因表达量分析均非常直观证明 PTA 表达盒的 RNAi 效率高于单个 amiRNA。PTA 表达盒能更明显降低靶标基因的表达,并导致 RNAi 途径的缺失,从而导致病毒更容易侵染植物,进一步表明 SGS3 基因参与了本氏烟草 RNAi 的关键步骤,且可能参与抗病毒过程。

### 3 讨论

RNAi 作为植物抗病毒免疫的关键机制,在植物抵御病毒入侵过程中发挥着核心作用<sup>[15]</sup>。本研究首次明确了本氏烟草中 SGS3 基因抗 SMV 功能,可为解析 RNAi 抗病毒通路中该基因作用机制提供直接实验证据。本研究聚焦本氏烟草 SGS3 基因在抗 SMV 途径中的功能,通过引入 PTA 技术,并与传统单 amiRNA 进行对比,深入探究其在 RNAi 效率及抗病毒活性方面的差异。针对 SGS3 基因的不同结构域设计特异性 amiRNA,为精准调控 SGS3 基因表达奠定了基础。瞬时表达实验结果显示 amiRNA2 沉默效率最高,这表明针对不同结构域设计的 amiRNA 在沉默效果上存在显著差异。这可能与 SGS3 基因各结构域的功能重要性、空间构象以及 amiRNA 与靶序列的互补程度等多种因素相关<sup>[16]</sup>。不同结构域在 SGS3 蛋白行使功能过程中扮演着不同角色,如 ZF、XS 和 CC 结构域可能参与了蛋白-蛋白相互作用、RNA 结合等关键过程,对这些结构域的有效干扰可能会对 SGS3 基因功能产生不同程度的影响。值得注意的是,靶向 XS 结构域的 amiRNA2 表现出最高的沉默效率(图 2c),暗示该结构域可能在 SGS3 介导的 dsRNA 合成中发挥核心功能,这一发现为解析 SGS3 的分子机制提供了新方向。PTA 技术的引入是本研究的一大亮点。通过 Golden Gate 克隆技术将多个 amiRNA 与 tRNA 串联组装成 PTA-SGS3 表达盒,qRT-PCR 结果清晰地表明,与单一 amiRNA 相比,PTA 系统显著增强了基因沉默效果。这一结果充分体现了 PTA 技术多靶点基因沉默方面的独特优势。多个 amiRNA 的协同作用能够从多个位点对靶基因进行干扰,增加了与靶基因 mRNA 互补配对的机会,从而更有效地抑制靶基因的表达<sup>[17]</sup>。这与近年来关于多靶点沉默技术在增强 RNAi 效率中的优势报道一致<sup>[13]</sup>。tRNA 的引入可能有助于稳定 amiRNA 的表达和加工过程,进一步提高了基因沉默的效率和稳定性。在抗病毒活性方面,GFP 荧光强度分析和 DAB 染色实验结果显示,PTA 表达盒侵染后 SMV 积累量更多,这意味着 PTA 表达盒更易导致 RNAi 途径缺失,使病毒更易侵染植物。DAB 染色结果显示,PTA-SGS3 处理叶片中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累量减少(图 5c),提示 SGS3 可能通过调控活性氧(ROS)信号通路参与抗病毒防御。这一现象看似与预期相悖,但深入分析可知,SGS3 基因在植物抗病毒 RNAi 途径中具有重要功能,当利用 PTA 技术强烈抑制 SGS3 基因表达时,植物正常的抗病毒 RNAi 途径受到破坏,从而无法有效地抵御 SMV 的入侵。这一结果从反面证实了本氏烟草 SGS3 基因在抗 SMV 途径中确实存在关键功能,为解析 SGS3 基因在抗病毒 RNAi 途径中的作用提供了有力的新证据<sup>[18]</sup>。从农业生物技术应用的角度来看,本研究成果具有重要意义。一方面,PTA 技术作为一种高效的基因沉默工具,为植物抗病毒机制研究提供了新的手段。通过精准调控植物体内关键基因的表达,能够深入研究植物与病毒之间的相互作用机制,为开发新型抗病毒策略提供理论基础。另一方面,对于作物抗病育种而言,明确 SGS3 基因的功能以及 PTA 技术的有效性,为培育具有更强抗病毒能力的作物品种提供了新策略。可以通过基因编辑等技术手段,在作物中优化 SGS3 基因的表达或者利用 PTA 技术构建高效的抗病毒体系,从而提高作物对病毒病害的抗性,减少农业生产中的损失<sup>[19]</sup>。

### 参考文献:

- [1] JIN Y, ZHAO J H, GUO H S. Recent advances in understanding plant antiviral RNAi and viral suppressors of RNAi[J]. *Current Opinion in Virology*, 2021, 46: 65-72.
- [2] WANG C N, JIANG F, ZHU S F. Complex small RNA-mediated regulatory networks between viruses/viroids/satellites

- and host plants[J]. *Virus Research*, 2022, 311: 198704.
- [3] PARENT J S, BOUTELLER N, ELMAYAN T, et al. Respective contributions of *Arabidopsis* DCL2 and DCL4 to RNA silencing[J]. *The Plant Journal*, 2015, 81(2): 223-232.
- [4] TAN H J, LI B S, GUO H W. The diversity of post-transcriptional gene silencing mediated by small silencing RNAs in plants[J]. *Essays in Biochemistry*, 2020, 64(6): 919-930.
- [5] BOLOGNA N G, VOINNET O. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65: 473-503.
- [6] KUMAKURA N, TAKEDA A, FUJIOKA Y, et al. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies[J]. *FEBS Letters*, 2009, 583(8): 1261-1266.
- [7] JOUANNET V, MORENO A B, ELMAYAN T, et al. Cytoplasmic *Arabidopsis* AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis[J]. *The EMBO Journal*, 2012, 31(7): 1704-1713.
- [8] YOSHIKAWA M, PERAGINE A, PARK M Y, et al. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*[J]. *Genes & Development*, 2005, 19(18): 2164-2175.
- [9] ELMAYAN T, ADENOT X, GISSOT L, et al. A neomorphic SGS3 allele stabilizing miRNA cleavage products reveals that SGS3 acts as a homodimer[J]. *The FEBS Journal*, 2009, 276(3): 835-844.
- [10] ZHANG D P, TRUDEAU V L. The XS domain of a plant specific SGS3 protein adopts a unique RNA recognition motif (RRM) fold[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(14): 2268-2270.
- [11] SABLOK G, PÉREZ-QUINTERO Á L, HASSAN M, et al. Artificial microRNAs (amiRNAs) engineering: On how microRNA-based silencing methods have affected current plant silencing research [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 406(3): 315-319.
- [12] 林艺华, 郑涛, 高三基, 等. 人工 miRNA 技术及其在植物抗病育种中的应用[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(2): 47-52.
- [13] BAO W H, LI A G, ZHANG Y N, et al. Improvement of host-induced gene silencing efficiency *via* polycistronic-tRNA-amiR expression for multiple target genes and characterization of RNAi mechanism in *Mythimna separata*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(7): 1370-1385.
- [14] ZHANG N N, ZHANG D D, CHEN S L, et al. Engineering artificial microRNAs for multiplex gene silencing and simplified transgenic screen[J]. *Plant Physiology*, 2018, 178(3): 989-1001.
- [15] DING S W, VOINNET O. Antiviral immunity directed by small RNAs[J]. *Cell*, 2007, 130(3): 413-426.
- [16] BARTEL D P. microRNAs genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [17] SCHWAB R, OSSOWSKI S, RIESTER M, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(5): 1121-1133.
- [18] SCHWACH F, VAISTIJ F E, JONES L, et al. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(4): 1842-1852.
- [19] BRODERSEN P, VOINNET O. The diversity of RNA silencing pathways in plants[J]. *Trends in Genetics*, 2006, 22(5): 268-280.

## Construction of PTA Expression Cassettes and Their Interference Study on the *SGS3* Gene in *Nicotiana benthamiana*

SUN Danyang<sup>1</sup>, YIN Xuepeng<sup>1</sup>, Qiuyan<sup>1</sup>, LI Jinghuan<sup>1,2</sup>, Hada<sup>3</sup>, BAO Wenhua<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China;

2. Key Laboratory for Biodiversity Conservation and Sustainable Use on the Mongolian Plateau, Inner Mongolia Higher Education Institutions, Hohhot 010022, China;

3. Key Laboratory of Herbage & Endemic Crop Biology, Ministry of Education, College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China)

**Abstract:** RNA interference is a core mechanism of antiviral immunity in plants. The *SGS3* (suppressor of gene silencing) gene plays a crucial role in the regulatory network of RNA interference during the RDR6-mediated synthesis of double-stranded RNA. To further investigate the function of the *SGS3* gene, this paper introduced a novel multi-target gene silencing system—PTA (poly-tRNA-amiRNA) technology—into the *SGS3* gene of *Nicotiana benthamiana* and conducted a systematic comparison of RNAi efficiency with traditional single amiRNA. First, the paper designed and synthesized a specific amiRNA targeting three structural domains of the *SGS3* gene: zinc finger (ZF), XS, and coiled coil (CC), respectively. It constructed recombinant expression vectors pBI121-*SGS3*-amiRNA1/2/3 using molecular cloning techniques. Employing an *Agrobacterium*-mediated transient expression system, the paper performed functional validation of the three recombinant cassettes. The results show that amiRNA2 exhibits significantly higher silencing efficiency of the *SGS3* gene compared to the other two targets. Based on this, Golden Gate cloning technology was utilized to assemble the three aforementioned amiRNAs with three tRNAs in tandem, successfully constructing the PTA-*SGS3* expression cassette, which was then integrated into the pBI121 plant expression vector. By co-infecting *N. benthamiana* with *Agrobacterium* strains harboring the PTA construct and the SMV-GFP infectious clone, which carried a green fluorescent protein marker, the paper systematically assessed the RNAi efficiency and antiviral activity of the PTA system. RT-qPCR analysis indicates that, compared to a single amiRNA, the PTA system improves the silencing efficiency of the *SGS3* gene by 44.8%, significantly enhancing the silencing effect on the target gene. Quantitative analysis of GFP fluorescence intensity and DAB histochemical staining experiments reveals that *N. benthamiana* infected with the PTA expression cassettes shows a 50.6% increase in SMV virus accumulation compared to the single amiRNA treatment group.

**Key words:** *Nicotiana benthamiana*; RNA interference; *SGS3* gene; amiRNA; PTA expression cassette

【责任编辑 张颖娟】