

## 以黄瓜花叶病毒为载体表达绿色荧光蛋白

卢冉,常发光,杜志游,廖乾生

(浙江理工大学生命科学学院,杭州 310018)

**摘要:**为了构建基于黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)的外源蛋白表达载体,实验在获得 CMV 的 LS 株系(CMV-LS)农杆菌侵染性克隆(pCB301-R1,R2 和 R3)的基础上,将 CMV-LS 基因组 RNA3 的外壳蛋白(coat protein,CP)基因置换成绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)基因,研究以 CMV-LS 为载体在本氏烟中表达 GFP 基因的情形。农杆菌浸润接种结果表明,以 R1R2R3-gfp 为载体在寄主中的 GFP 表达量远高于植物瞬时表达载体 pCB301 产生的 GFP,番茄丛矮病毒基因沉默抑制子 p19 加入有助于 CMV 表达 GFP,将移动蛋白(movement protein,MP)缺失 C 端的 33 个氨基酸残基而构建表达载体 R1R2 R3mp $\Delta$ 33-gfp 在寄主中的 GFP 含量大大增加。农杆菌菌液稀释接种的结果表明 R1R2 R3mp $\Delta$ 33-gfp 接种 OD<sub>600</sub> 值为 0.01 均能有效在本氏烟中表达产生 GFP。

**关键词:**黄瓜花叶病毒;农杆菌浸润接种;表达载体;绿色荧光蛋白

**中图分类号:** Q812 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851 (2016) 06-0917-05 **引用页码:** 110704

### 0 引言

植物生物反应器(Plant bioreactor)是指通过分子生物学手段,利用植物悬浮细胞培养或植株为加工场所,大规模生产具有重要功能的药用蛋白或工业酶的方法<sup>[1-2]</sup>。利用农作物生产外源蛋白主要有两种途径,一是通过转基因方法将外源蛋白的基因整合到植物染色体中使得目的蛋白稳定性表达,二是以病毒为载体在植物瞬时表达外源蛋白<sup>[2-3]</sup>。以植物为生物反应器生产外源蛋白,由于该技术操作简单、成本低廉,具有广阔的研究前景和商业开发价值<sup>[2-4]</sup>。

烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)是最早改造成表达载体植物病毒,成功用于表达流感病毒血凝素抗原、艾滋病病毒膜蛋白抗原疫苗、疟疾抗原等疫苗<sup>[5]</sup>,除此之外,马铃薯 X 病毒(*Potato virus X*, PVX)、番茄丛矮病毒(*Tomato bushy stunt virus*, TBSV)、芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)等众多植物病毒用于构建载体表达

药用蛋白<sup>[6-8]</sup>。由于病毒在植物中积累量高、复制快、基因组小易操作等特点,以植物病毒载体表达外源蛋白已经成为利用农作物生产药用蛋白的新平台<sup>[3,6-7]</sup>。

黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)是世界上分布最广病毒之一,侵染 85 个科 365 属中的 1000 多种植物,如黄瓜、烟草、番茄、白菜等重要农作物<sup>[9-10]</sup>。CMV 是正义单链 RNA 病毒,基因组大小约 8600 nt(nucleotide),分布在 3 条 RNA 分子中,即 RNA1, RNA2 和 RNA3; RNA1 和 RNA2 编码复制酶 1a 和 2a 蛋白, RNA3 编码移动蛋白(Movement protein, MP)和外壳蛋白(Coat protein, CP)<sup>[10-11]</sup>。本研究将 CMV 的 LS 株系(CMV-LS)基因组 RNA1~3 分别克隆到植物瞬时表达载体 pCB301 中,获得 CMV-LS 农杆菌侵染性克隆;构建绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,GFP)代替病毒 CP 的载体 pCB301-R3-gfp,分析以 CMV 为外源蛋白表达载体在本氏烟中表达 GFP 的情形。

收稿日期: 2016-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31470007);浙江省自然科学基金项目(Y3080228)

作者简介: 卢冉(1986-),男,河南郑州人,硕士研究生,主要从事植物病毒学方面的研究。

通信作者: 廖乾生, E-mail: qshliao@aliyun.com

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒与寄主植物

CMV-LS 的 cDNA 克隆 pUC-LS109、209 和 309、植物瞬时表达载体 pCB301 和 pCB301-gfp、TBSV 的基因沉默抑制子表达载体 pCB301-p19 和农杆菌 GV3101 均保存于本实验室。CMV 寄主植物为本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*), 本氏烟在 25℃ 温室 16 h 光照/8 h 黑暗条件下培育至 5-7 叶期用于农杆菌浸润接种。

### 1.2 CMV 农杆菌侵染性克隆载体构建

因 CMV-LS 基因组 R1 和 R2 的 5' 端和 3' 的序列超过 30 个碱基相同, PCR 扩增基因组 R1 与 R2 的正反引物相同, 为 R12F 5' TTTCATTTGGAGAGGGTTTATTCTCAAGAGCGTATGGTTC 3'/5' ATGCCATGCCGACCCTGGTCTCCTTATGGA GAACCTG 3', 分别以质粒 pUC-LS109 和 209 为模板, 采用 Phusion® High-Fidelity DNA Polymerases (NEB, America) 进行 PCR 扩增, 目的产物割胶回收。通过引物对 R3F 5' TTTCATTTGGAGAGGTAATCTTACCACTTTCTTTTCAC G3' /R3R5' ATGCCATGCCGACCCTGGTCTCCT TATGGAGAACCTG 3', 以质粒 pUC-LS309, PCR 扩增获得 CMV-LS 的基因组 R3 的全长基因。以限制性内切酶 *Stu* I 和 *Sma* I (TAKARA, 大连) 对质粒 pCB301 进行双酶切, 获得线性化载体。CMV-LS 的基因组 R1、R2 和 R3 通过 In-Fusion Cloning 试剂盒 (Clontech, America) 连接到 pCB301 载体中, 分别获得载体 pCB301-R1, pCB301-R2 和。上述正向引物中小写字母的 15 个碱基是载体 pCB301 的 35S 启动子序列, 反向引物中小写字母的 15 碱基与载体 pCB301 的核酶序列互补。

以质粒 pCB301-R3 为模板, 采用 Phusion® High-Fidelity DNA Master Mix (NEB, America) 通过引物对 R3F1877 *Bam* H I *Mlu* I 5' CGGGATCCACGCGTCCGTGTGTTTACCGGCGTCC3'/R3R1229 *Bam* H I 5' CGGGATCCTCCGTGTGTTTACCGGCGTCCGAAG 3' 获得大小为 6200bp 的 PCR 产物; 目的产物割胶回收后经 *Bam* H I 酶切连接后, 并转化到感受态细胞 DH5α (TAKARA, 大连) 中, 阳性克隆经 *Bam* H I 和 *Mlu* I 酶切鉴定后确认获得 CP 缺失的载体 pCB301-R3ΔCP。以质粒 pCB301-gfp 为模板, 通过引物对 gfpF *Bam* H I 5' CGGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAACTTT

TCAC 3'/gfpR *Mlu* I 5' CGACGCGTTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCA3' 进行 PCR 扩增获得 gfp 全长基因, 目的片段经 *Bam* H I 和 *Mlu* I 酶切后克隆到载体 pCB301-R3ΔCP 中, 获得 pCB301-R3-gfp。以 pCB301-R3-gfp 为模板, 通过引物 R3F209 5' GTGTGACCTAGGTCGACATCATTGG 3'/R3R836 *Spe* I 5' GACTAGTCTAGTGCCCAGACGCATTTTGATTAAG 3' 进行 PCR 扩增获得 638bp 目的片段; PCR 产物经 *Sal* I/*Spe* I 双酶切后克隆到载体 pCB301-R3-gfp 中, 获得移动 MP 的 3' 端缺失 33 个氨基酸残基载体 pCB301-R3mpΔ33-gfp。上述所有的克隆经测序验证其正确性。

### 1.3 农杆菌转化与浸润接种

CMV-LS 的农杆菌侵染性克隆载体 pCB301-R1、pCB301-R2、pCB301-R3、pCB301-R3-gfp 和 pCB301-R3mpΔ33-gfp 通过冻融法分别转化到农杆菌 GV3101 中; 含有上述质粒的农杆菌的活化与扩大培养参考刘妮娜等<sup>[12]</sup>, 菌体经离心收集后用浸润缓冲液 (10 mmol/L  $MgCl_2$ , 10 mmol/L MES 和 200 mmol/L Acetosyringone) 调至浓度为  $OD_{600} = 0.5$ , 室温黑暗下放置 3~4 h。用无针头 1 mL 注射器将病毒浸润接种至本氏烟叶片背面。

### 1.4 植物总蛋白的提取与 Western blot 检测

分别采集并称取各个处理的本氏烟浸润叶 0.5 g, 用 1 mL 现配含 2% β-巯基乙醇的 1×TE 缓冲液提取植物的总蛋白。蛋白的转膜以及 GFP 抗体 (Abcam, America) 的检测方法具体参照袁素敬等<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 CMV-LS 农杆菌侵染性克隆的构建

为了构建 CMV-LS 的农杆菌侵染性克隆, 通过 CMV-LS 基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 的全长引物, 分别进行 PCR 扩增获得目的 DNA 片段, 并通过 In-Fusion Cloning 技术连接到 T-DNA 载体 pCB301 中, 分别获得 pCB301-R1、R2 和 R3 (图 1)。上述质粒分别转入到农杆菌 GV301 后混和共同接种于本氏烟中, 浸润接种 7 d, Western blot 分析寄主植物非接种叶中的外壳蛋白 CP 的含量 (结果未显示), 这表明 CMV-LS 通过农杆菌浸润接种也能有效侵染本氏烟。由于 CMV-LS 在本氏烟中症状反应非常轻, CMV-LS 侵染引起寄主植物的症状反应与 pCB301 空载体对照接种的植株无明显差别 (结果未显示)。

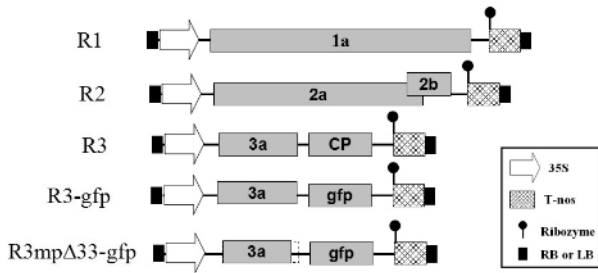


图 1 CMV 及其表达载体农杆菌侵染性克隆构建示意图

## 2.2 以 CMV-LS 为载体表达绿色荧光蛋白

CMV 编码 5 个蛋白,其中 CP 蛋白参与病毒颗粒的形成,在寄主植物中的含量最高<sup>[10-11]</sup>。本实验中,构建用 *gfp* 基因代替 *cp* 基因的载体 R3-gfp(图 1),研究以 CMV-LS 为载体表达外源蛋白的情形。含有质粒 pCB301-R1、R2 和 R3-gfp 和 TBSV 的基因沉默抑制子 p19 的农杆菌菌液混和后共同浸润接种于本氏烟中,5 d 紫外灯下观察结果如图 2a 所示, pCB301-gfp 与 R1R2R3-gfp 浸润接种的叶片中均有荧光的产生,但前者在本氏烟中的荧光强度明显弱于后者,而空载体对照处理的叶片中无荧光出现。蛋白杂交的结果也表明 R1R2R3-gfp 在本氏烟中表达 GFP 量远高于 pCB301-gfp(图 2b)。

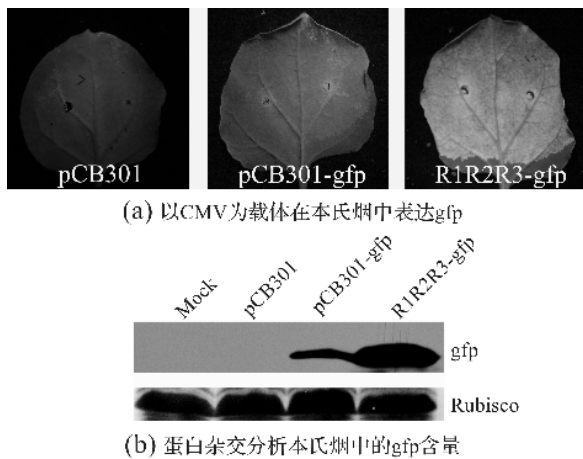


图 2 以 CMV-LS 为载体表达在本氏烟中表达 GFP

## 2.3 沉默抑制子 p19 对 CMV 表达绿色荧光蛋白的影响

CMV 的 CP 蛋白包裹病毒基因组 RNA,防止 RNA 被寄主中 RNA 酶降解<sup>[10,11]</sup>。载体 pCB301-R3-gfp 是由 *gfp* 置换 *cp* 所构建,R1R2R3-gfp 在寄主中缺少 CP 保护基因组 RNA 的作用,使得病毒基因组含量低;而植物病毒基因沉默抑制子能有效地抑制病毒基因组 RNA 受寄主中 RNA 酶的降解<sup>[5]</sup>。本试验中分析基因沉默抑制子 p19 对 CMV 在本氏烟中表达 GFP 的影响,含有 pCB301-R1、R2、R3-gfp 与 p19 农杆菌混和后共同接种于本氏烟中,以

R1R2R3-gfp+pCB301 处理为对照。病毒接种 7 d,荧光均匀地分布于 R1R2R3-gfp+p19 浸润的叶片区域,对照接种的荧光主要在浸润叶的叶脉和浸润区域的边缘出现(图 3a);Western blot 检测结果表明,在 R1R2R3-gfp 浸润接种时添加 p19 大大提高病毒表达的 GFP 含量(图 3b)。

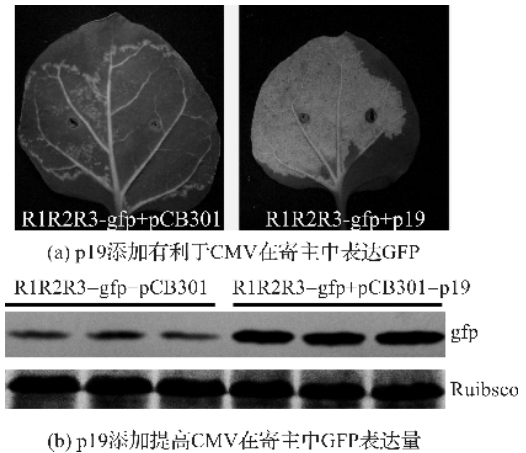


图 3 p19 对 CMV 载体表达绿色荧光影响

## 2.4 移动蛋白缺失 C 端的 33 个氨基酸有利于 CMV 表达 GFP

CMV 在寄主的细胞与细胞间移动除了 MP 外,还需要 CP 的参与,但 CP 的 3' 端 33 个氨基酸残基后,CMV 的胞间移动则不依赖于 CP<sup>[14]</sup>。通过 PCR 方法构建 MP 的 C 端缺失 33 个氨基酸残基的载体 pCB301-R3mpΔ33-gfp 的示意图如图 1 所示,含有质粒 R3mpΔ33-gfp 的农杆菌与 R1、R2 以及 p19 共同浸润于本氏烟叶片中;5 d 紫外灯观察结果如图 4a 所示,MP 的 C 端缺失了 33 个氨基酸残基提高 CMV 所表达的 GFP 含量,使得植株中的荧光强度明显高于对照处理。本氏烟中 GFP 含量检测结果也进一步证实了 R1R2R3mpΔ33-gfp 所表达的 GFP 量高于 R1R2R3-gfp。

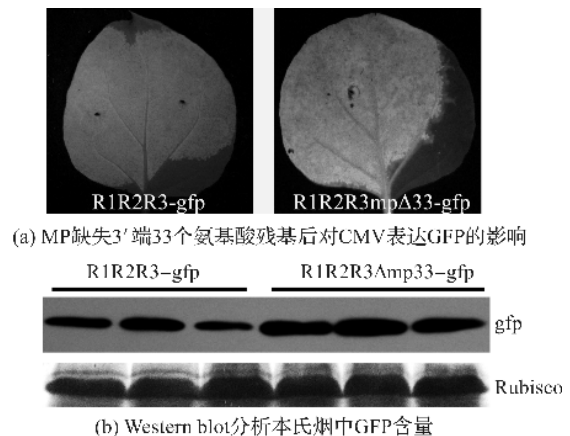


图 4 MP 缺失 C 端的 33 个氨基酸残基提高 CMV 在寄主中的 GFP 表达量



## 2.5 接种浓度对 CMV 表达 GFP 的影响

为了确定 CMV 载体在本氏烟中表达 GFP 最佳接种浓度,分别将含有 R1、R2、R3mp $\Delta$ 33-gfp 以 p19 农杆菌菌液调至 OD<sub>600</sub> 至 0.5,共同混和后分别稀释至 20、50、100、200 和 400 倍,并浸润接种于寄主植物中。紫外灯观察结果如图 5a 所示,5 d 病毒接种浓度为 0.5OD<sub>600</sub> 时,荧光最亮,随着接种浓度的降低,荧光强度降低,但菌液稀释至 200 倍在 CMV 浸润区域荧光斑点零星分布;7 d 各个浸润区域的荧光强度均有增加,菌液稀释 20 倍接种与不稀释接种的荧光强度没有明显的差别图 5b,这表明 R1R2R3mp $\Delta$ 33-gfp 的菌液接种浓度为 0.01OD<sub>600</sub> 时,GFP 也能得到有效表达。

## 3 讨论

以植物病毒为载体表达药用蛋白在国外已有众多的报道,但国内学者所构建的能高效表达外源蛋白的植物病毒载体非常有限<sup>[4,7]</sup>。CMV 侵染寄主植物超过 1000 种,并且基因组结构较简单,是构建植物病毒表达载体的很好候选病毒。CMV-LS 属于 CMV 亚组 II 成员,在寄主植物中引起症状反应轻,本实验室保存的 CMV-LS 的基因组 cDNA 克隆,通过体外转录成 RNA 后才能侵染寄主植物,而由体外转录成本较高,并且实验操作过程繁琐。通过花椰菜花叶病毒 (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) 的 35S 启动子转录产生 RNA 获得植物病毒侵染性克隆的方法,具有简单、快速、成本低以及侵染活性高等特点<sup>[7,15]</sup>。本研究首先将 CMV-LS 的基因组 RNA 克隆到植物瞬时表达载体中,获得该病毒的农杆菌侵染性克隆(图 1),这为以 CMV 构建外源蛋白的表达载体奠定基础。

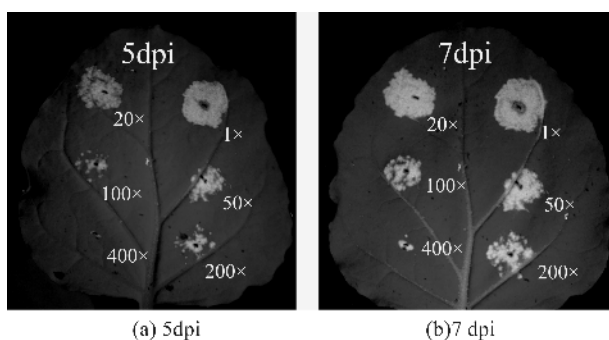


图 5 R1R2R3mp $\Delta$ 33-gfp 在不同农杆菌接种浓度下表达 GFP 的情况

将植物病毒改造成外源蛋白表达载体,前提是不能影响病毒的在寄主中复制过程,因此在植物病

毒表达载体构建的过程中不得破坏复制酶相关区域,目前大多数的植物病毒表达载体都是利用 CP 蛋白编码区域表达外源蛋白,如 TMV, PVX 以及 TBSV 等<sup>[4-5,7-8]</sup>。CMV 编码 5 个蛋白,其中 CP 蛋白在寄主中的含量最高,笔者在 pCB301-R3 的基础上用 gfp 基因取代 CMV 的 cp 基因构建表达载体(图 1),R1R2R3-gfp 在本氏烟中的活性测定结果表明以 CMV 为载体表达的 GFP,其含量远高于瞬时表达载体 pCB301-gfp 所产生的 gfp(图 2),因此 CMV 可以用于构建表达外源蛋白的载体。在植物病毒表达外源蛋白过程中,加入沉默基因沉默抑制子有利于外源蛋白在植物中的表达<sup>[4,7]</sup>,R1R2R3-gfp+p19 共接种后在本氏烟中的荧光亮度明显增强(图 3),因此以 CMV 为载体高效表达外源蛋白需要额外基因沉默抑制子的加入。CMV 在寄主细胞间的移动需要 MP 和 CP 的参与,而 MP 的 C 端缺失 33 个氨基酸残基后,病毒的胞间移动则不依赖于 CP,pCB301-R3-gfp 是将 gfp 代替 cp 而构建,因此病毒 R1R2R3-gfp 只局限在单个细胞中进行增殖。mp 缺失 33 个氨基酸残基后的载体 R1R2R3mp $\Delta$ 33-gfp 在本氏烟中的 GFP 表达量明显高于对照接种(图 4),其原因可能是 CMV 基因组 RNA 的胞间移动有利于病毒的复制和增殖,病毒的基因组 RNA 积累量高从而使得载体 R1R2R3mp $\Delta$ 33-gfp 产生更多的 GFP。含有 R1、R2、R3mp $\Delta$ 33-gfp 农杆菌菌液稀释的结果表明,在浸润接种的浓度 OD<sub>600</sub> 为 0.01 时,GFP 也能得到高效表达(图 5)。病毒接种浓度低也能在本氏烟中表达 GFP,这说明 CMV 侵染本氏烟的效率,降低了实验成本,为大规模地表达其它外源蛋白奠定基础。至于以 CMV 为载体在其它寄主植物表达 GFP 或在本氏烟中表达其它分子量更大的外源蛋白,有待于进一步研究。

本研究中获得利用 CMV 表达外源蛋白的载体,发现 MP 缺失 33 个氨基酸残基提高 GFP 的表达量,确定 CMV 接种浓度为 0.01OD<sub>600</sub> 时也能有效表达 GFP。

## 参考文献:

- [1] 陈金梅,姜路壹,洪治. 植物生物反应器制药的现状 & 展望[J]. 生物技术通报,2015,31(10):1-7.
- [2] YAO J, WENG Y, DICKEY A, et al. Plants as factories for human pharmaceuticals: applications and challenges [J]. International Journal of Molecular Sciences,2015,16(2):28549-28565.

- [3] BOES A, REIMANN A, TWYMAN R M, et al. A plant-based transient expression system for the rapid production of malaria vaccine candidates[M]. *Methods Molecular Biology*, 2016, 1404: 597-619.
- [4] 高丁梅, 马婷, 丁向真, 等. 利用Ⅱ型启动子转录的U6RNA提高植物病毒表达载体在植物中表达外源基因的水平[J]. *中国分子生物学与生物化学学报*, 2015, 31(8): 883-890.
- [5] LIU Z, KEARNEY CM. A tobamovirus expression vector for agroinfection of legumes and *Nicotiana* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 147(4): 151-159.
- [6] CEROVSKA N, HOFFMEISTEROVA H, MORAVEC T, et al. Transient expression of human papillomavirus type 16 L2 epitope fused to N- and C-terminus of coat protein of Potato virus X in plants[J]. *Journal of Bioscience*, 2012, 37(1): 125-133.
- [7] ABOUL-ATA A, VITTI A, NUZZACI M, et al. Plant-based vaccines: novel and low-cost possible route for mediterranean innovative vaccination strategies[J]. *Advances in Virus Research*, 2014, 89: 1-37.
- [8] MARDANOVA ES, KOTLYAROV RY, KUPRIANOV VV, et al. Rapid high-yield expression of a candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors[J]. *BMC Biotechnology*, 2015, 15(1): 1.
- [9] 程晓东, 施伟, 杜志游, 等. 基于黄瓜花叶病毒(CMV)基因沉默载体的构建[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(12): 1550-1558.
- [10] SCHOLTHOF KB, ADKINS S, CZOSNEK H, et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(9): 938-954.
- [11] THOMPSON JR, LANGENHAN JL, FUCHS M, et al. Genotyping of Cucumber mosaic virus isolates in western New York State during epidemic years: Characterization of an emergent plant virus population [J]. *Virus Research*, 2015, 210: 169-177.
- [12] 刘妮娜, 程晓东, 卢冉, 等. ToMV 番茄坏死株系农杆菌侵染性克隆构建及其表达[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(8): 1027-1034.
- [13] 袁素敬, 梁余培, 陈勇毅, 等. 高效表达 *Smad2* 蛋白的 A549 细胞模型的建立[J]. *浙江理工大学学报*, 2013, 30(3): 372-376.
- [14] NAGANO H, MISE K, FURUSAWA I, et al. Conversion in the requirement of coat protein in cell-to-cell movement mediated by the cucumber mosaic virus movement protein [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(17): 8045-8053.
- [15] 姚敏, 张天奇, 田志超, 等. 农杆菌介导的 CMV 侵染性克隆及 2b 缺失突变体构建[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(14): 3060-3068.

## Green Fluorescent Protein Expression Based on Cucumber Mosaic Virus

LU Ran, CHANG Faguang, DU Zhiyou, LIAO Qiansheng

(College of life science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** In this study, *Cucumber mosaic virus* (CMV), genomic RNAs of CMV LS strain were inserted into plant binary vector pCB301 respectively to obtain CMV-LS T-DNA infectious clones. In order to construct exogenous protein expression vector from CMV, coat protein (CP) gene in CMV genomic RNA3 was replaced with green fluorescent protein (GFP) and the seedlings of *Nicotiana benthamiana* were infiltrated with mixtures of *A. tumefaciens* containing plasmid pCB301-R1, R2 and R3-gfp to analyze the level of GFP expression. The results indicated that the accumulation of GFP expressed from R1R2R3-gfp was higher than that from transient expression vector pCB301-gfp and the addition of silencing suppressor protein p19 from *Tomato bush stunt virus* resulted in an increase in the amount of GFP. Deletion of the C-terminal 33 amino in CMV movement protein (MP) acids led to higher level of GFP expressed from vector R1R2 R3mp $\Delta$ 33-gfp in the seedlings of *N. benthamiana*. The data of infiltration with bacterium suspension mixture of different dilution suggested that R1R2 R3mp $\Delta$ 33-gfp vector could efficiently express GFP in *N. benthamiana* infected with infiltrated with mixtures of *A. tumefaciens* at optical density (OD<sub>600</sub>) of 0.01.

**Key words:** *Cucumber mosaic virus*; *Agrobacterium* infiltration inoculation; expression vector; green fluorescent protein

(责任编辑: 许惠儿)