



黄瓜花叶病毒反式遗传复制体系的构建

王琳, 程晓东, 卢冉, 杜志游, 廖乾生
(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

摘要: 为了确定复制酶 1a 在寄主植物中的含量对黄瓜花叶病毒(*Cucumbers mosaic virus*, CMV)基因组复制的影响, 在本氏烟中瞬时表达 CMV 复制酶 1a 和 2a, 构建 CMV 的反式遗传复制体系, 分析 1a 蛋白不同表达水平对基因组 R3-*gfp* 的影响。结果显示: 瞬时表达载体 pCB301 在寄主植物中表达 1a 和 2a 蛋白能复制 CMV 基因组 R3-*gfp*; 在 1a2aR3-*gfp* 侵染本氏烟中 RNA3 和 RNA4 含量低于 R1R2R3-*gfp*, 1a2aR3-*gfp* 复制的效率低于 R1R2R3-*gfp*; 在 1a2aR3-*gfp* 浸润接种的植物中, 1a 浓度接种提高, CMV 基因组 RNA3 和 RNA4 复制受到抑制。该构建反式遗传复制体系为进一步研究 CMV 复制的分子机理提供实验材料以及理论依据。

关键词: 黄瓜花叶病毒; 反式遗传; 复制; 本氏烟

中图分类号: Q812

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2020)03-0262-05

Construction of reverse genetic replication system for *Cucumber mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*

WANG Lin, CHENG Xiaodong, LU Ran, DU Zhiyou, LIAO Qiansheng

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In order to determine the effect of the content of replicase 1a in the host plant on genome replication of *Cucumber mosaic virus* (CMV), replicase 1a or 2a were transiently expressed in *Nicotiana benthamiana*, and reverse replication genetic system of CMV was constructed to analyze the effect of different expression level of 1a protein on genome R3-*gfp*. The results indicated that 1a and 2a protein expressed from transient expression vector pCB301 could drive the replication of CMV genomic R3-*gfp*; RNA3 and RNA4 content in *N. benthamiana* infected by 1a2aR3-*gfp* was lower than that infected by R1R2R3-*gfp*. The replication efficiency of 1a2aR3-*gfp* was lower than that of R1R2R3-*gfp*. In the plants infiltrated and inoculated by 1a2aR3-*gfp*, 1a concentration increased. RNA3 and RNA4 replication were inhibited. The reverse genetic replication system provides the experimental material and theoretical basis for further studying the molecular mechanism of CMV replication.

Key words: *Cucumber mosaic virus*; reverse genetic; replication; *Nicotiana benthamiana*

0 引言

黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)为正义单链 RNA 病毒, 属于雀麦花叶病毒

科(Bromoviridae)的典型成员^[1-2]; CMV 科侵染寄主植物超过 1000 多种, 对烟草、番茄等众多蔬菜和园艺作物造成严重危害^[3]。CMV 病毒颗粒呈球形, 包裹基因组 RNA; CMV 基因组由 3 条 RNA 分

收稿日期: 2019-05-13 网络出版日期: 2019-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31870144); 转基因新品种培育国家重大科技专项(2018ZX08001-03B)

作者简介: 王琳(1994-), 女, 吉林延边人, 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, Email: qshliao@aliyun.com

子组成, 分别为 RNA1、RNA2 和 RNA3^[4-6]。RNA1 和 RNA2 分别编码 1a 与 2a 蛋白, 组成病毒复制酶的组分; RNA2 还通过亚基因组策略编码具有众多功能的 2b 蛋白; RNA3 编码运动蛋白 3a 和病毒外壳蛋白(Coat protein, CP)^[5-7]。

CMV 侵入寄主植物后脱去 CP, 将病毒粒子中基因组 RNA 释放于寄主细胞中^[4,6]。CMV 基因组 RNA1 和 RNA2 利用植物细胞的蛋白翻译系统, 分别表达出 1a 和 2a 蛋白^[4,6]; 在液泡膜上, 1a、2a 蛋白与寄主中的蛋白因子组装成病毒复制复合体(Viral replication complex, VRC)^[8-9]。VRC 以 CMV 基因组 RNA 为复制模板合成负链 RNA, 以负链 RNA 为模板复制产生子代正义单链 RNA^[4,6,8-9]。CMV 复制产生的基因组 RNA1 和 RNA2 进一步翻译出 1a 与 2a 蛋白, 并形成更多的 VCR, 不断驱动复制过程, 从而使得 CMV 的基因组 RNA 在寄主细胞中大量增殖^[9-12]。在番茄雀麦花叶病毒(*Brome mosaic virus*, BMV) 复制过程中, 提高 1a 蛋白表达量使得 BMV 在寄主植物细胞中基因组积累量降低, 并且 1a 蛋白增加量越多, 病毒基因组含量降低越明显^[13]。BMV 在寄主植物中有效地完成侵染循环过程需要 BMV 基因组的翻译和复制存在着动态平衡关系, BMV 基因组 RNA1 的 5' 端非编码区域的 B-box 顺式元件即调节复制酶 1a 表达又控制 RNA1 复制, 在病毒基因组翻译过程和复制过程中起桥梁连接作用, 从而使得 BMV 在植物中高效率增殖^[13-14]。在 CMV 的复制循环过程中, 基因组 RNA 既是蛋白翻译模板又是病毒复制的模板, 但调控基因组 RNA 在翻译过程与复制过程的分子机制目前还未见报道。

在寄主植物中, CMV 基因组 RNA1 与 RNA2 首先是作为 mRNA 编码复制酶 1a 和 2a, 在病毒 VRC 中又作为复制模板合成更多的 RNA1 和 RNA2, 因此在 CMV 侵染细胞中 1a 和 2a 蛋白含量呈动态变化^[8-9]。为了分析复制酶 1a 在 CMV 侵染过程中作用, 本文以瞬时表达 1a 和 2a 蛋白载体为材料, 构建 CMV 反式复制系统, 确定 1a 蛋白表达量与 CMV 基因组复制量相关性, 为进一步研究其复制分子机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

CSPD 化学发光检测试剂盒 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 购自美

国 Roche 公司, GFP 抗体及检测试剂购自美国 Abcam 公司, 地高辛标记的 DNA 探针和其它常用生化试剂购自上海生物工程有限公司。

1.2 病毒载体

CMV 基因组农杆菌侵染性克隆载体 pCB301-R1、pCB301-R2 和 pCB301-R3-*gfp*^[15], CMV 复制酶 1a 和 2a 蛋白瞬时表达载体 pCB301-1a 与 pCB301-2a^[16], 番茄丛矮病毒(*Tomato bush stunt virus*, TBSV) 的基因沉默抑制子表达载体 35S-p19 和载体 pCB301, 均保存于本实验 -20 °C 冰箱中, 相应的农杆菌菌株保存于 -80 °C 超低温冰箱。

1.3 植物

寄主植物为本氏烟(*Nicotiana benthamiana*), 本氏烟播种 7~10 d 后移栽, 在光周期 16 h/8 h(光照/黑暗) 的条件下培养至 6~8 叶期, 用于病毒农杆菌接种。

1.4 CMV 农杆菌培养与浸润接种

分别将 -80 °C 保存的含质粒 pCB301、pCB301-R1、pCB301-R2、pCB301-R3-*gfp*、pCB301-1a、pCB301-2a 和 35S-p19 农杆菌进行活化、扩大培养、菌体收集和农杆菌浸润接种, 具体方法参考文献^[17]。

1.5 CMV 在寄主表达的 GFP 的检测

分别采集病毒接种本氏烟叶片, 并称取 0.2 g 用于植物总蛋白的提取。总蛋白提取、蛋白电泳、蛋白转膜以及 GFP 的检测的具体方法参考文献^[15]。

1.6 CMV 基因组 RNA 的 Northern blot 分析

分别采集病毒接种的寄主植物叶片, 并提取其总 RNA, 并通过 Nanodrop 2000 测定各个样品 RNA 浓度。RNA 转膜、预杂交、杂交以及地高辛信号检测方法参考文献^[18], RNA 杂交的探针为 5' GACTGACCATT TTTAGCCGTAAGCTGGATGG-ACAACCCGTTTC-DIG 3', 该探针序列互 CMV 基因组 RNA1~3 的 3' 非编码区保守部分互补。

2 结果分析与讨论

2.1 寄主植物中瞬时表达 1a 和 2a 蛋白驱动 CMV 基因组 RNA3 复制

载体 pCB301-R3-*gfp* 是采用基因 *gfp* 替换 CMV 的 CP 基因策略构建, *gfp* 表达蛋白的 mRNA 是来源于基因组 R3-*gfp* 复制产生的亚基因组 RNA4^[15]。为了分析在寄主植物中表达 CMV 的复制酶 1a 和 2a 能否启动基因组 R3-*gfp* 复制, 本文将农杆菌 pCB301-1a、2a、R3-*gfp* 和 35S-p19 混和物浸润接种于本氏烟叶片(叶脉左边), 同时以

pCB301-R1、R2、R3-*gfp* 和 35S-p19 混和物接种为对照(叶脉右边),在浸润接种 3、5 d 和 7 d 分别观察寄主植物中绿色荧光、检测 GFP 的表达水平以及分析 CMV 基因组积累量,结果如图 1 所示。图 1(a)为 CMV 在本氏烟中表达 GFP 后产生绿色荧光现象,接种 3 d,1a2aR3-*gfp* 和 R1R2R3-*gfp* 浸润接种区域均能观察到 GFP 表达,1a2aR3-*gfp* 和 R1R2R3-*gfp* 接种 5 d 在寄主植物中呈现荧光强度与接种 3 d 相比明显增加;接种 7 d,1a2aR3-*gfp* 和 R1R2R3-*gfp* 产生的荧光强度呈下降趋势;R1R2R3-*gfp* 浸润接种区域所产生荧光强度均明显高于 1a2aR3-*gfp*。以上结果表明,在本氏烟中表达 CMV 的 1a 和 2a 蛋白能驱动病毒基因组 R3-*gfp* 复制,1a2aR3-*gfp* 在寄主植物中的复制效率低于 R1R2R3-*gfp*。CMV 在本氏烟中表达 GFP 的 Western blot 检测结果如图 1(b)所示,由图 1(b)可知,1a2aR3-*gfp* 和 R1R2R3-*gfp* 浸润接种叶片中可检测到 GFP 条带,进一步证实在植物细胞中表达 1a 和 2a 蛋白能复制 CMV 的基因组 R3-*gfp*;杂交信号强度与紫外灯下观察到的绿色荧光亮度相一致。图 1(c)为本氏烟中 CMV 基因组 RNA 积累量 Northern blot 结果,由图 1(c)可知:3、5 d 和 7 d,1a2aR3-*gfp* 浸润接种寄主植物均能检测 CMV 基因组 RNA3 和 RNA4,并且 RNA4 含量变化与图 1(a)中绿色荧光强度及图 1(b)GFP 含量的变化相一致;R1R2R3-*gfp* 接种区域中 RNA3 和 RNA4 的含量均高于 1a2aR3-*gfp* 接种区域中 RNA3 和 RNA4 含量,其原因是 R1R2R3-*gfp* 侵染寄主植物后,在 1a 和 2a 蛋白作用下 RNA1/RNA2 经过复制后产生更多的子代 RNA1/RNA2 分子,并进一步地翻译出复制酶 1a 和 2a,从而使得 CMV 复制效率更高^[16];接种 1a2aR3-*gfp* 植物中 RNA 杂交无法检测到 CMV 的基因组 RNA1 和 RNA2,因为在载体 pCB301-1a 与 pCB301-2a 构建过程中,是将 RNA1 和 RNA2 中编码 1a 和 2a 蛋白的开放阅读框序列克隆至载体 pCB301,浸润接种农杆菌 pCB301-1a 与 pCB301-2a 本氏烟中产生 1a 和 2a 的 mRNA 不含 RNA1 和 RNA2 的非编码区域序列^[16,19]。综上所述,通过载体 pCB301 在本氏烟中瞬时表达 CMV 的复制酶 1a 和 2a 能复制基因组 R3-*gfp*,但由其驱动 R3-*gfp* 的复制效率低于 RNA1 和 RNA2。

2.2 CMV 复制酶不同组合对病毒复制的影响

为了确定本氏烟中 CMV 的 1a 蛋白含量与 R3-*gfp* 复制效率相关性,分别将 R1R2R3-*gfp*、

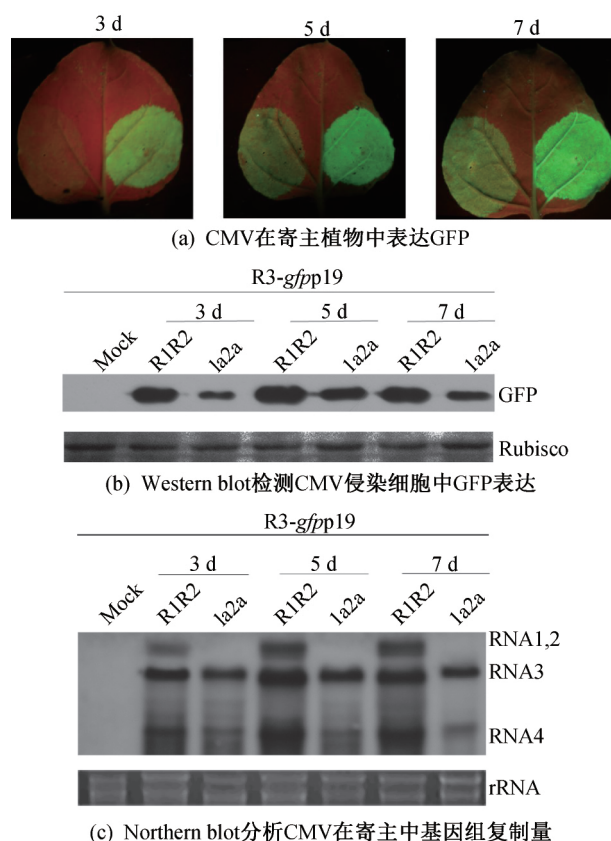
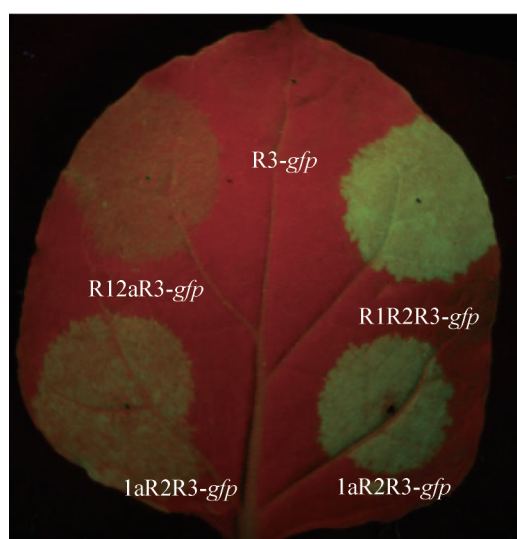


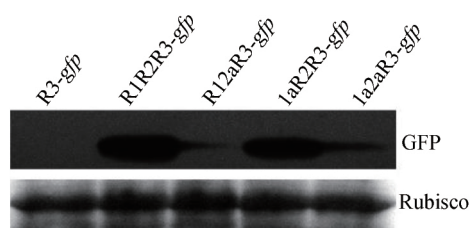
图1 瞬时表达复制酶 1a 和 2a 复制 CMV 基因组 R3-*gfp*

R12aR3-*gfp*、1aR2R3-*gfp* 和 1a2aR3-*gfp* 农杆菌混和物浸润接种于寄主植物同一叶片的区域,侵染 3 d 的结果如图 2 所示。紫外灯下观察显示,CMV 在侵染区域产生绿色荧光亮度强弱依次为 R1R2R3-*gfp*、1aR2R3-*gfp*、1a2aR3-*gfp* 和 R12aR3-*gfp*,这表明寄主植物中 1a 含量高低影响病毒表达 GFP(图 2(a))。图 2(b)为 R1R2R3-*gfp*、R12aR3-*gfp*、1aR2R3-*gfp* 和 1a2aR3-*gfp* 在寄主植物中 GFP 的 Western blot 分析,结果表明:在 R12aR3-*gfp* 接种本氏烟中 GFP 含量最低,R1R2R3-*gfp* 产生的 GFP 量最高,与图 1(a)中绿色荧光强度相一致。图 2(c)为 CMV 基因组 RNA 杂交分析结果,由图 2(c)可知:在 R1R2R3-*gfp*、R12aR3-*gfp*、1aR2R3-*gfp* 和 1a2aR3-*gfp* 接种本氏烟中,R1R2R3-*gfp* 侵染寄主中能同时检测 CMV 的基因组 RNA1、RNA2、RNA3 和 ~RNA4;在 R12aR3-*gfp* 侵染植株中检测到 RNA1、RNA3 和 RNA4,并且其含量最低;在 1aR2R3-*gfp* 接种本氏烟中检测到 RNA2、RNA3 和 RNA4,而 1a2aR3-*gfp* 侵染的寄主植物只能检测 RNA3 和 RNA4。以上结果表明,CMV 复制酶接种组合 R1R2、R12a、1aR2 和 1a2a 均能复制基因组 R3-

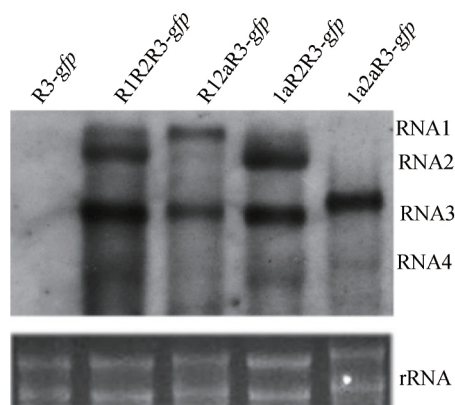
gfp, 但复制效率有明显差异。在 *R1R2R3-gfp*、*R12aR3-gfp* 和 *1aR2R3-gfp* 侵染本氏烟中, CMV 基因组 RNA1 和 RNA2 由于复制产生更多的子代 RNA1 和 RNA2 分子作为 1a 和 2a 蛋白的 mRNA, 进而获得更多的复制酶^[4,6,16], 在 *R12aR3-gfp* 接种寄主植物中, 病毒基因组 RNA 含量明显低于 *R1R2R3-gfp* 和 *1aR2R3-gfp*, 其原因可能是在 CMV 复制循环过程中, 过量表达 1a 蛋白抑制病毒复制过程。在 *R1R2R3-gfp* 和 *1aR2R3-gfp* 接种的本氏烟中, 病毒基因组 RNA 的含量没有明显差别, 其原因有待于进一步的研究。



(a) 在本氏烟中CMV表达GFP后的绿色荧光表型



(b) 蛋白杂交分析CMV在本氏烟中GFP表达量



(c) Northern blot检测CMV基因组RNA

图2 1a 蛋白不同表达水平对 CMV 基因组 R3-*gfp* 复制的影响

2.3 1a 瞬时表达载体不同农杆菌接种浓度对 R3-*gfp* 复制的影响

为了进一步确定在寄主植物增加 1a 蛋白含量抑制 CMV 的 R3-*gfp* 复制, 本文在菌液浓度均为 0.2 OD₆₀₀ 的农杆菌 pCB301-2a、pCB301-R3-*gfp* 和 35S-p19 混和物分别加入浓度为 0.2、0.5、1.0 OD₆₀₀ 和 2.0 OD₆₀₀ 农杆菌 pCB301-1a, 并浸润接种于本氏烟叶片不同区域, 病毒 1a2aR3-*gfp* 在寄主植物产生绿色荧光表型、GFP 的表达水平以及基因组 RNA3/RNA4 的含量如图 3 所示。接种 3 d, 随着 1a 浓度的增加, 1a2aR3-*gfp* 在本氏烟中呈现绿色荧光强度逐渐减弱, 1a 浓度为 0.2 OD₆₀₀, 寄主植物中产生的荧光最亮(图 3(a))。图 3(b) 为 1a2aR3-*gfp* 在本氏烟中表达 GFP 的 Western blot 检测, 结果表明: 1a 浓度为 0.2 OD₆₀₀ 时 GFP 含量最高, 1a 浓度为 2.0 OD₆₀₀ 时 GFP 含量最低, 与图 3(b) 中 1a2aR3-*gfp* 在寄主植物呈现绿色荧光强弱结果相一致。Northern 杂交检测表明: 随着农杆菌 pCB301-1a 接种浓度提高, 在本氏烟中由 R3-*gfp* 复制所产生子代 RNA3 和 RNA4 含量降低(图 3(c))。以上结果表明, 1a 蛋白的表达量高抑制 CMV 基因组 RNA 的复制, 导致寄主植物中基因组 RNA3 和 RNA4 复制量降低。Yi 等^[13-14] 在 BMV 侵染性克隆 R1、R2 和 R3 的农杆菌混和物中分别加入表达 MP、CP、1a、2a、NS3 和 NS5B 农杆菌, 并浸润接种至本氏烟中, 发现 1a 的加入抑制 BMV 正链/负链 RNA 的合成, 并且 1a 浓度越高, BMV 基因组复制受抑制越明显。本文在 1a2aR3-*gfp* 接种寄主植物中, 1a 农杆菌接种浓度提高使得 R3-*gfp* 复制过程抑制, 这与 Yi 等^[13-14] 报道现象相一致。至于过量表达复制酶 1a 抑制 CMV 基因组的复制分子机制, 有待于进一步的研究。

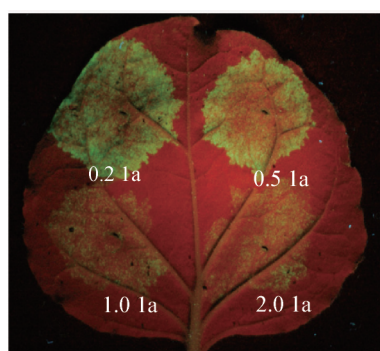
3 结 论

本文采用瞬时表达复制酶 1a 和 2a 载体, 构建 CMV 基因组 R3-*gfp* 在本氏烟中的反式遗传复制体系, 通过蛋白杂交和 Northern blot 分别检测 GFP 表达量和 R3-*gfp* 复制水平, 主要结果如下:

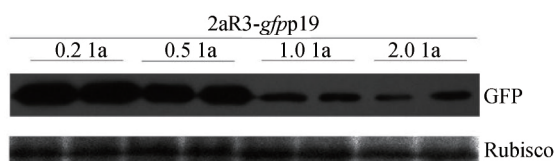
a) 在本氏烟中瞬时表达复制酶 1a 和 2a 蛋白能有效地驱动复制 CMV 基因组 R3-*gfp*。

b) 病毒 1a2aR3-*gfp* 在寄主植物中的复制效率低于病毒 R1R2R3-*gfp*。

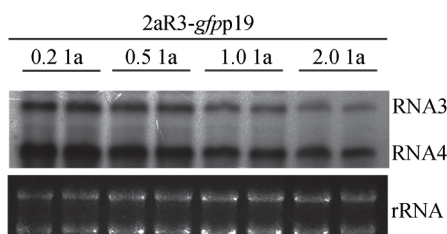
c) 在寄主植物中 1a 蛋白过量表达抑制 CMV 基因组 RNA 复制。



(a) 不同浓度1a浸润接种1a2aR3-*gfp*在本氏烟中呈现绿色荧光表型



(b) 蛋白杂交检测1a2aR3-*gfp*在本氏烟中表达GFP



(c) Northern blot分析1a2aR3-*gfp*在本氏烟中基因组RNA3和RNA4含量

图3 不同接种浓度的1a对R3-*gfp*复制的影响

本文所构建CMV反式遗传复制体系为更深入地研究1a蛋白调控病毒复制分子机理以及鉴定参与病毒复制过程的寄主因子提供实验材料和理论依据。

参考文献:

- [1] 徐平东, 谢联辉. 黄瓜花叶病毒亚组研究进展[J]. 福建农业大学学报, 1998, 27(1): 82-91.
- [2] 覃瑞, 程旺元. 黄瓜花叶病毒研究进展[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2004, 23(2): 33-37.
- [3] Donato Gallitelli. The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture[J]. *Virus Research*, 2000, 71(1): 9-21.
- [4] Palukaitis P, García-Arenal F. *Cucumoviruses* [J]. *Advance Virus Research*, 2003, 62: 241-323.
- [5] 廖乾生, 杜志游, 张华荣, 等. 黄瓜花叶病毒 CB7 株系引起心叶烟坏死反应与 RNA2 相关[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(8): 824-829.
- [6] Jacquemond M. *Cucumber mosaic virus* [J]. *Advance Virus Research*, 2012, 84: 439-504.
- [7] Mochizuki T, Ohki S T. *Cucumber mosaic virus*: Viral genes as virulence determinants [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(3): 217-225.
- [8] Chen M H, Roossinck M J, Kao C C. Efficient and specific initiation of subgenomic RNA synthesis by *Cucumber mosaic virus* replicase in vitro requires an upstream RNA stem-loop[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(23): 11201-11209.
- [9] Tayon R J, Kim M J, Kao C C. Completion of RNA synthesis by viral RNA replicases [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(17): 3576-3582.
- [10] Kao C C. Lessons learned from the core RNA promoters of *Brome mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2002, 3(1): 53-59.
- [11] Wang R, Du Z, Bai Z et al. The interaction between endogenous 30S ribosomal subunit protein S11 and *Cucumber mosaic virus* LS2b protein affects viral replication, infection and gene silencing suppressor activity[J]. *PloS One*, 2017, 12(8): e0182459.
- [12] Gao S, Lu J, Cheng X et al. Heterologous replicase from *Cucumoviruses* can replicate viral RNAs, but is defective in transcribing subgenomic RNA4A or facilitating viral movement[J]. *Viruses*, 2018, 10(11): 590.
- [13] Yi G, Gopinath K, Kao C C. Selective repression of translation by the *Brome mosaic virus* 1a RNA replication protein[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(4): 1601-1609.
- [14] Yi G, Kao C C. cis- and trans-acting functions of *Brome mosaic virus* protein 1a in genomic RNA1 replication[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(6): 3045-3053.
- [15] 卢冉, 常发光, 杜志游, 等. 以黄瓜花叶病毒为载体表达绿色荧光蛋白[J]. 浙江理工大学学报, 2016, 35(6): 917-921.
- [16] He L, Wang Q, Gu Z, et al. A conserved RNA structure is essential for a satellite RNA-mediated inhibition of helper virus accumulation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(15): 8255-8271.
- [17] 高双玉, 杜志游. 关于二羧酸-三羧酸盐载体蛋白负调控黄瓜花叶病毒积累的初步研究[J]. 浙江理工大学学报, 2018, 39(5): 613-618.
- [18] 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.
- [19] Seo J K, Kwon S J, Choi H S et al. Evidence for alternate states of *Cucumber mosaic virus* replicase assembly in positive- and negative-strand RNA synthesis[J]. *Virology*, 2009, 383(2): 248-260.

(责任编辑:唐志荣)