

基于黄瓜花叶病毒基因组 RNA2 的外源基因表达载体研究

朱品,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: 为了确定黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)基因组 RNA2 能否作为构建表达外源蛋白的载体,实验构建 CMV 的 Fny 株系(CMV-Fny)RNA2 中 2b 基因缺失载体 pCB301-F209 Δ 2b 和携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因载体 pCB301-F209 Δ 2b-*gfp*,并分别将含有质粒 CMV-Fny Δ 2b 和 CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 农杆菌混和物浸润接种寄主植物。结果表明:CMV-Fny Δ 2b 在本氏烟产生轻微花叶症状并且病毒基因组含量降低;在 CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 侵染植株叶片中有绿色荧光的产生;番茄丛矮病毒沉默抑制子 p19 加入有助于 CMV-Fny Δ 2b 表达 GFP;在 RDR6 含量减少的本氏烟 RDR6i 中,与对照接种植株相比,CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 所产生的 GFP 增加。研究获得基于 CMV 基因组 RNA2 所构建的外源蛋白表达载体 CMV-CMV-Fny Δ 2b,并发现加入其它病毒基因沉默抑制子有利于 GFP 的表达。

关键词: 黄瓜花叶病毒;基因组 RNA2;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(2017)02-0265-05

0 引言

近十几年随着许多植物基因组测序的完成或即将完成,急需一个好的载体或实验手段来探知植物基因组中新基因或所预测蛋白的生物学功能^[1-2]。目前,研究植物中功能未知的基因最常用的方法是通过转基因技术在植物中表达其蛋白以证实其功能^[3-4];除此之外,借助植物病毒表达靶基因也能有效证实该基因的生物学功能。目前马铃薯 X 病毒(*Potato virus X*, PVX)和烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)是最常用的植物病毒载体,但 PVX 和 TMV 在植物中引起的症状反应都比较严重,有可能干扰所表达靶蛋白的生物学功能^[5-6]。因此构建一个引起轻微症状的病毒载体,对植物功能基因组学研究具有重要的意义。

黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)是世界上最重要病毒之一,侵染的植物寄主超过 1000 多种,除了黄瓜、番茄和烟草等众多农作物

外,还侵染本氏烟和拟南芥模式植物^[7-8]。CMV 属于雀麦花叶病毒科(*bromoviridae*)病毒成员之一,其基因组分布在 3 条 RNA 分子中,即 RNA1、RNA2 和 RNA3。RNA1 和 RNA2 编码病毒复制相关蛋白, RNA3 编码移动蛋白和外壳蛋白^[7-9]。CMV 的 2b 蛋白是一基因沉默抑制子,由 RNA2 亚基因组 RNA4A 编码,缺失 2b 基因的 CMV 能系统性地侵染烟草和拟南芥等寄主植物,但病毒症状明显减弱^[9-10]。因此,缺失 2b 基因的 CMV 是一较好构建外源蛋白表达载体的候选病毒。

本文通过实验将含 CMV 的 Fny 株系(CMV-Fny)基因组 RNA2 质粒 pCB301-F209 中的 2b 基因缺失获得重组克隆 pCB301-F209 Δ 2b,并构建携带绿色荧光蛋白(*green fluorescent protein*, GFP)载体 pCB301-F209 Δ 2b-*gfp*,将 CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 农杆菌混和物浸润接种于寄主植物,研究以 CMV-Fny Δ 2b 为载体在不同条件下表达 GFP 的情况。

收稿日期:2016-10-14 网络出版日期:2017-01-03

基金项目:国家自然科学基金项目(31470007)

作者简介:朱品(1988-),男,浙江杭州人,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@liyun.com

1 材料与方法

1.1 载体与寄主

CMV-Fny 农杆菌侵染性克隆 pCB301-F109、209 和 309 由前人构建^[7], 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 和农杆菌 GV3101 均保存于本实验室。寄主植物为本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 和依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase 6, RDR6) 下调表达的转基因本氏烟 RDR6i, 植物在 25℃ 温室 16 h 光照/8 h 黑暗条件下培育至 6-8 叶期用于病毒接种。

1.2 载体构建

以质粒 pCB301-F209 为模板, 采用 Phusion® High-Fidelity DNA Master Mix (NEB, American) 通过引物对 F209F1837 5' GCAATACCATCGT CAC CATGG 3'/F209R2658 Mlu I BamH I 5' CG ACGCGTGGATCCTCAAGACTCGGGTAACTC CGCC 3' 获得 PCR 产物 1, 采用引物对 F209F2753 Mlu I 5' CGACGCGTACCTCCCCTTCCGCATCT CCCT 3'/F209R2976 5' ACGGACC GAAGTCCTT CCGA AG 3' 获得 PCR 产物 2; PCR 产物 1 和 PCR 产物 2 割胶回收后分别经 Nco I / Mlu I 与 Mlu I / Bln I 双酶切, 并连接到经 Nco I / Bln I 酶切的载体 pCB301-F209 中, 获得重组克隆 pCB301-F209Δ2b。以质粒 pCB301-gfp 为模板, 通过引物对 gfpF BamH I 5' CGGGATCCAT GAGTAAAGGAGAA GAACTTTTCAC 3'/gfpR Mlu I 5' CGACGCG TTTATTTGTATAGTTCATCC ATGCCA 3' 进行 PCR 扩增获得 gfp 全长基因, 目的片段经 BamH I 和 Mlu I 酶切后克隆到载体 pCB301-F209Δ2b 中, 获得 pCB301-F209Δ2b-gfp, 上述载体构建过程中所使用的限制性内切酶为大连 TAKARA 公司产品。所有的克隆经测序验证其正确性。

1.3 农杆菌转化与病毒接种

质粒 pCB301-F209Δ2b 和 pCB301-F209Δ2b-gfp 通过冻融法分别转入农杆菌 GV3101, 并 PCR 鉴定上述质粒转化的农杆菌。pCB301-F109、pCB301-F209Δ2b、pCB301-F209Δ2b-gfp、pCB301-309 以及 35S-p19 的农杆菌的活化与扩大培养参考刘妮娜等^[11], 菌体经离心收集后用浸润缓冲液 (10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MES 和 200 mmol/L Acetosyringone) 分别调至浓度为 OD₆₀₀ = 0.5, 室温黑暗下放置 3~4 h。各个接种处理的农杆菌混和液经无针头 1 mL 注射器浸润接种至本氏烟叶片中。

1.4 CMV 基因组的 RNA 杂交

分别采集各个病毒接种处理的寄主植物叶片, 并取 0.1 g 用于植物总 RNA 的提取。用 Trizol (Invitrogen, American) 提取植物的总 RNA, 具体方法参考产品使用说明书。CMV 基因组杂交方法参考地高辛标记检测试剂盒 II (Roche, Switzerland) 的产品使用说明书, 杂交探针为互补于 CMV 基因组 RNA1-3 的 3' 端非编码区保守区域, 并用地高辛标记, 其序列为 5' GACTGACCATTTT TAGCCGT AAGCTGGATGGACAACCCGTTTC-DIG 3'。

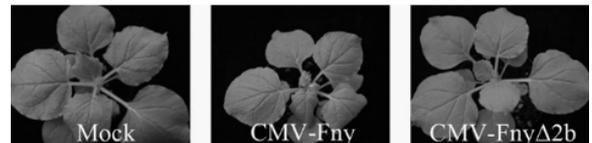
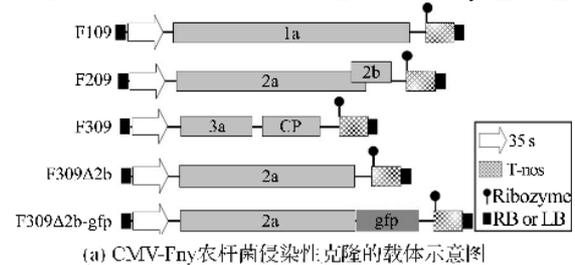
1.5 蛋白 Western blot 检测

分别采集各个处理的寄主植物叶片, 用含 2% β-巯基乙醇的磷酸缓冲液提取植物的总蛋白。蛋白转膜及 GFP 抗体 (Abcam, American) 的杂交检测方法具体参照文献^[12]。

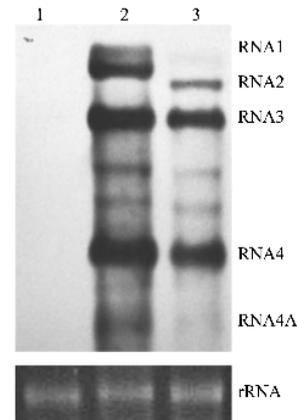
2 结果与分析

2.1 CMV-FnyΔ2b 在本氏烟中的症状反应

为了研究 CMV-Fny 的 2b 基因缺失后, 病毒能否系统性感染本氏烟, 实验构建 CMV-Fny 基因组



(b) 浸润接种7天后病毒在本氏烟中的症状



(c) Northern blot分析植株系统叶中CMV-FnyΔ2b基因组含量

图1 CMV-FnyΔ2b 载体示意图及其在寄主植物中的症状

RNA2 缺失 2b 基因的载体 pCB301-F209 Δ 2b(图 1(a)),并将含有 pCB301-F109、pCB301-F209 Δ 2b 和 pCB301-F309 农杆菌混和物浸润接种于寄主植物,7d 后 CMV-Fny 引起本氏烟叶片皱缩和矮化;CMV-Fny Δ 2b 侵染的植株无明显的症状反应,与对照接种本氏烟的表型相类似(图 1(b))。CMV 基因组 RNA 杂交结果表明:2b 基因缺失后,CMV-Fny Δ 2b 能系统性侵染寄主植物,但病毒基因组 RNA 大大降低(图 1(c))。

2.2 以 CMV-Fny Δ 2b 为载体表达 GFP

为了确定 CMV-Fny Δ 2b 能否作为外源蛋白的表达载体,本文将 pCB301-F109、pCB301-F209 Δ 2b-*gfp* 和 pCB301-309 农杆菌混和物接种到本氏烟中。接种 3d 后 CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 浸润的叶片有荧光呈现(结果未显示),7d 后 CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 所侵染本氏烟上部非接种叶片呈现绿色荧光现象,而 CMV-Fny Δ 2b 所侵染寄主植物的接种叶和系统叶均无荧光产生(图 2(a))。寄主植物中的蛋白分析结果表明,CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 侵染的植株中存在 GFP,而对照接种植物中检测不到 GFP(图 2(b))。

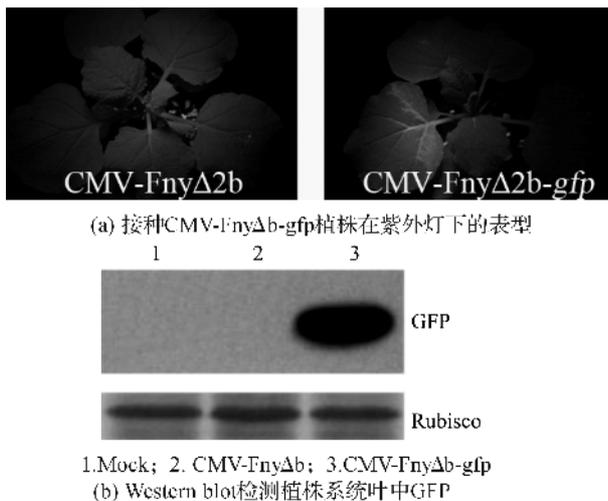


图 2 以 CMV-Fny Δ 2b 载体在本氏烟中表达 GFP

2.3 沉默抑制子 p19 对 CMV-Fny Δ 2b 表达 GFP 影响

由于缺失基因沉默抑制子 2b 蛋白,CMV-Fny Δ 2b 能侵染寄主,但病毒基因组含量低。为了确定 CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 接种过程中加入其它病毒的基因沉默抑制子能否提高其在本氏烟中 GFP 表达量,本文将含质粒 pCB301vF109、pCB301-F209 Δ 2b-*gfp*、pCB301-309 及 35S-p19 农杆菌混和后接种于本氏烟中,结果表明:沉默抑制子 p19 加入有利于 CMV-Fny Δ 2b 表达 GFP,接种叶中荧光强度明显高于对照接种(图 3(a));由于 p19 蛋白是瞬

时表达而不能移动至植株非接种叶片,因此在本氏烟系统叶中,两者荧光强度没有明显差别(图 3(b))。RNA 杂交和 Western blot 结果进一步证实,p19 蛋白提高 CMV-Fny Δ 2b 在接种叶 GFP 表达量而系统叶无明显的影响(图 3(c)–(d))。

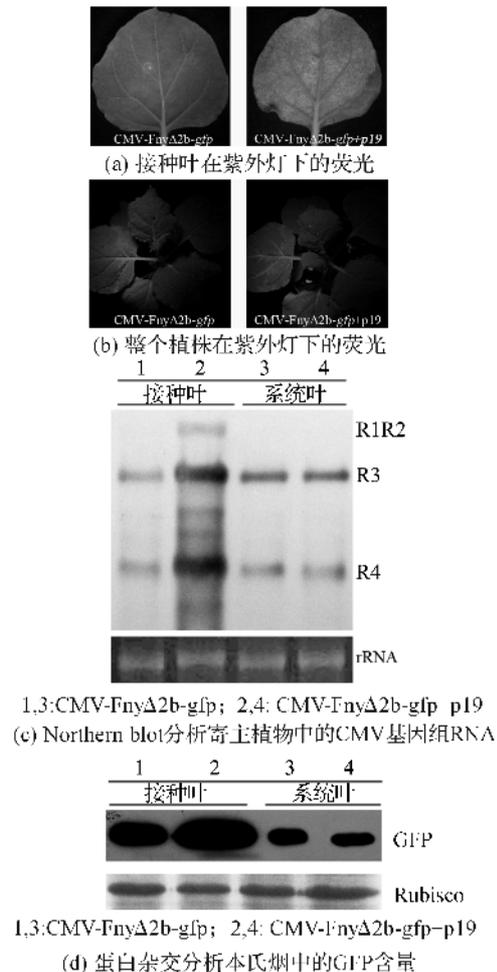


图 3 沉默抑制子 p19 提高 CMV-Fny Δ 2b 载体在本氏烟中 GFP 表达量

2.4 以本氏烟 RDR6i 为寄主植物有利于 CMV-Fny Δ 2b 表达 GFP

依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 6(RNA dependent RNA polymerase 6, RDR6)参与植物抗病毒反应过程,寄主中 RDR6 含量减少,造成病毒症状反应加重和病毒基因组 RNA 含量提高^[13]。为了确定 CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 在本氏烟 RDR6i 中 GFP 表达量是否增加,本文将 pCB301-F109、pCB301-F209 Δ 2b-*gfp* 和 pCB301-309 农杆菌混和物分别接种于本氏烟和本氏烟 RDR6i 中。7d 后,CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 在本氏烟 RDR6i 大部分叶片中均产生明显的荧光,而对照接种的植物中,少数叶片呈现明显荧光(图 4(a))。Northern blot 和蛋白杂交结果显示:在本氏烟 RDR6i

为寄主植物中,CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 的基因组 RNA 和 GFP 含量均明显增加(图 4(b)-(c))。

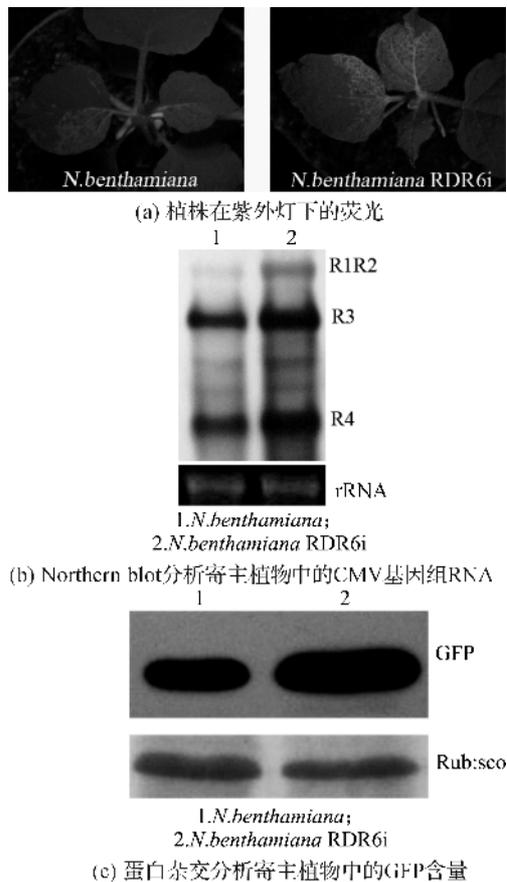


图 4 以为本氏烟 RDR6i 为寄主有利于 CMV-Fny Δ 2b 表达 GFP

3 讨论

通过植物病毒为载体表达外源蛋白不需要经过转基因过程,实验操作简单,可在短时间内高含量表达目的蛋白。因而,植物病毒载体在植物功能基因组学研究方面发挥了非常重要的作用^[5,16]。目前基于植物病毒所开发的表达载体,由于用外源靶标蛋白代替病毒的某个功能蛋白,往往造成病毒不能系统地侵染整个寄主植物,外源蛋白的表达仅仅存在于病毒接种的部位^[5-6,16]。利用 2 个外壳蛋白启动子构建策略而构建 TMV 和 PVX 表达载体能系统性移动至整个寄主植物,但由于 TMV 和 PVX 在本氏烟等寄主植物中症状均比较严重,并且者两个病毒均不能侵染拟南芥,限制了表达载体 TMV 和 PVX 更为广泛的应用^[5]。CMV-Fny 能侵染拟南芥、本氏烟和番茄等实验模式植物,但引起寄主植物产生严重的症状反应^[9-10,14-15]。本文中,由 CMV-Fny 基因组 RNA2 中的 2b 基因缺失而 CMV 构建

的 CMV-Fny Δ 2b 在本氏烟中的症状反应表现为轻微花叶(图 1b),并且利用 CMV-Fny Δ 2b 中的 2b 基因启动子序列在本氏烟中可系统性地表达 GFP(图 2a)。因此 CMV 可作为表达外源蛋白载体的候选病毒。CMV 的 2b 蛋白在病毒侵染过程中起基因沉默抑制子作用,抵御寄主植物对病毒基因组 RNA 的降解^[9-10]。本研究发现:在 CMV-Fny Δ 2b 接种过程中加入其他病毒基因沉默抑制子,可提高 GFP 的表达量(图 3(a));并且以抗病毒反应受到抑制的本氏烟 RDR6i 为寄主植物有利于 CMV-Fny Δ 2b 表达 GFP(图 4(a))。因此以缺失 2b 基因的 CMV 突变体表达外源蛋白,可以外源加入其它病毒基因沉默抑制子或以基因沉默途径受到抑制植物突变体为寄主,以提高病毒外源蛋白表达量,从而更好地研究植物基因功能。

4 结论

本文获得 CMV 基因组 RNA2 中的 2b 基因缺失的病毒 CMV-Fny Δ 2b,发现该病毒在本氏烟引起的轻微的症状反应,并确定 CMV-Fny Δ 2b 能在本氏烟整个植株中表达 GFP;证实 CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 接种过程中加入外源沉默抑制子可提高 GFP 表达量及以本氏烟 RDR6i 为寄主有助于 CMV-Fny Δ 2b-*gfp* 表达 GFP。

参考文献:

- [1] CHEN H, HE H, ZHOU F, et al. Development of genomics-based genotyping platforms and their applications in rice breeding[J]. Curr Opin Plant Biol, 2013,16(2):247-254.
- [2] LUO J. Metabolite-based genome-wide association studies in plants[J]. Curr Opin Plant Biol, 2015, 24: 31-38.
- [3] HEFFERON KL. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins [J]. Virology,2012,433(1):1-6.
- [4] MA X, ZHU Q, CHEN Y, et al. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications[J]. Mol Plant,9(7):961-974.
- [5] FONDONG VN, NAGALAKSHMI U, DINESH-KUMAR SP. Novel functional genomics approaches: a promising future in the combat against plant viruses[J]. Phytopathology,2016,106(10):1231-1239.
- [6] MASCIA T, NIGRO F, ABDALLAH A, et al. Gene silencing and gene expression in phytopathogenic fungi using a plant virus vector[J]. Proc Natl Acad Sci U S

- A, 2014, 111(11):4291-4296.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] DIAZ-PENDON JA, LI F, LI W X, et al. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(6):2053-2063.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] SCHWACH F, VAISTIJ FE, 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 Physiol*, 2005, 138(4):1842-1852.
- [14] DICKMEIS C, FISCHER R, COMMANDEUR U. Potato virus X-based expression vectors are stabilized for long-term production of proteins and larger inserts[J]. *Biotechnol J*, 2014, 9(11):1369-1379.
- [15] 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.
- [16] LEWSEY MG, GONZALEZ I, KALININA NO, et al. Symptom induction and RNA silencing suppression by the *Cucumber mosaic virus* 2b protein[J]. *Plant Signal Behav*, 2010, 5(6):705-708.

Study on Exogenous Gene Expression Vector Based on Cucumber Mosaic Virus Genome RNA2 in *Nicotiana Benthamiana*

ZHU Pin, CHANG Faguang, DU Zhiyou, LIAO Qiansheng

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

Abstract: In order to verify whether *Cucumber mosaic virus* (CMV) genome RNA2 could serve as the vector to express exogenous protein, 2b gene deletion vector pCB301-F209 Δ 2b and pCB301-F209 Δ 2b-*gfp* carrying green fluorescent protein (GFP) in CMV Fny strain RNA2 were constructed in the experiments. The agrobacterium mixtures containing plasmids CMV-Fny Δ 2b and CMV-Fny Δ 2b-*gfp* was respectively inoculated into the host plant. The results indicate that CMV-Fny Δ 2b generated slight mosaic symptom in *Nicotiana benthamiana* and the level of viral genome reduced. Green fluorescence emerged in the plant leaves infected by CMV-Fny Δ 2b-*gfp*. The presence of gene silencing suppressor protein p19 from *Tomato bush stunt virus* in the inoculum of CMV-Fny Δ 2b-*gfp* contributed to GFP expression by CMV-Fny Δ 2b. In *N. benthamiana* RDR6i with reduced RDR6 accumulation, GFP generated by CMV-Fny Δ 2b-*gfp* increased, compared with the control plant. In this study, exogenous protein expression vector CMV-Fny Δ 2b based on CMV genome RNA2 was gained, and it was found that the addition of other virus gene silencing suppressor contributed to GFP expression.

Key words: Cucumber mosaic virus; genome RNA2; expression vector; green fluorescent protein

(责任编辑:唐志荣)