

马铃薯 Y 病毒 HC-Pro 中心区域在病毒协生作用中的主导地位

鲁瑞芳 李为民 王海云 郭 明 彭学贤*

(中国科学院微生物研究所植物生物技术开放实验室,北京 100080)

摘 要 利用 PCR 方法获得了马铃薯病毒中国株系(PVY-C)HC-Pro 基因的 5 个缺失突变体,构建了相应的植物表达载体。通过土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法转化了烟草品种 K₃₂₆(*Nicotina tabacum* cv. K₃₂₆)。PCR 和 Southern blot 分析证明了 HC-Pro 基因及其缺失突变体已整合到烟草基因组中,Western blot 表明它们在转基因烟草中得到了表达。侵染性试验发现 HC-Pro 中心区域介导转基因烟草中 PVY-C 和黄瓜花叶病毒(CMV)、PVY-C 和马铃薯 X 病毒(PVX)之间的协生作用,从而明确了 PVY-C HC-Pro 中心区域为病毒协生作用的功能区域。

关键词 马铃薯 Y 病毒,HC-Pro 基因,突变,中心区域,协生作用

中图分类号 S432.4⁺1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0264-05

在自然界植物病毒协生作用发生普遍,是植物病毒病为害和流行的主要原因之一。据不完全统计,它已经存在于 16 个病毒属 34 种病毒以及类病毒、卫星病毒、卫星 RNA 等亚病毒中^[1~8]。植物病毒协生作用通常发生在亲缘关系较远的两种病毒之间,但最近在同属病毒之间也发现了协生现象^[6~8]。协生作用的显著特点是加重病害症状,导致新病害的发生和流行。1997 年由于病毒的复合感染使非洲木薯花叶病在乌干达大流行,严重地限制了木薯的生产^[7]。玉米致死性坏死病、大豆顶枯病、马铃薯种薯退化病等均由病毒协生作用所致^[1,2,4]。协生作用还会扩大病毒的寄主范围,影响病毒的致病性。玉米品种 N28 和 H84 抗小麦条纹花叶病毒(Wheat streak mosaic rymovirus, WSMV),当玉米褪绿斑驳病毒(Maize chlorotic mottle machlomovirus, MCMV)混合感染时,WSMV 则能够克服寄主的抗性并建立系统侵染^[4]。

随着分子生物技术与细胞学的迅速发展,人们对协生作用的研究逐渐由表观形象描述深入到细胞水平乃至分子机理的探讨。新近的研究发现协生作用中一种病毒调控另一种病毒的复制和运输^[1,5,9]。马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus)成员参与的协生作用中, Potyvirus 通常作为激发病毒促进另一种异源病毒的复制,而 Potyvirus 复制水平不变或稍有降低^[1,9~11]。

如马铃薯 Y 病毒(Potato Y potyvirus, PVY)和马铃薯 X 病毒(Potato X potexvirus, PVX)之间的协生作用(PVY/PVX)中,发现 PVY 促进 PVX 的侵染,使 PVX 的为害加重,而 PVX 对 PVY 则无影响,即 PVY 介导 PVY/PVX 的协生作用^[1,9,11]。然而仅在三例协生作用中, Potyvirus 的病毒成为受益者,在寄主中病毒滴度较单独侵染时明显增加^[2,3,12]。

本文以 PVY 中国株系(PVY-C)HC-Pro 基因^[13]为材料,通过 PCR 等方法获得了 PVY-C HC-Pro 基因 5 个缺失突变体,明确了 PVY-C HC-Pro 基因介导 PVY/PVX 协生作用的功能区域。

1 材料和方法

1.1 植物材料、毒源和抗血清

烟草品种 K₃₂₆(*Nicotina tabacum* cv. K₃₂₆)、马铃薯 X 病毒(Potato X potexvirus, PVX)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic cumovirus, CMV)为本实验室保存。PVX 抗血清购自美国 ATCC 公司, PVY-C HC-Pro 的抗血清由本实验室制备^[13]。

1.2 菌种和质粒

大肠杆菌 DH5 α (*Escherichia coli* DH5 α)、土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404、质粒 pBlue-scriptSK 由本实验室提供。pBin438、pBSKHC 和 pBin-HC 均由本实验室构建。

1.3 寡聚核苷酸引物

根据我们已经获得的 PVY-C HC-Pro 基因的核苷酸序列^[13]设计了 6 个寡聚核苷酸引物,由上海生物工程公司合成。6 个寡聚核苷酸引物的序列和在基因中的位置见表 1。

1.4 PVY-C HC-Pro 基因缺失突变体的克隆

以质粒 pBSKHC^[13]的 DNA 为模板,利用高忠实性的 Taq PlusI 聚合酶并按表 1 中的引物组合进行 PCR 扩增。PCR 的反应条件为 94℃1min,55℃1min,72℃1min,30 个循环。将 PCR 产物经 T4DNA 聚合酶补平后,再用 BamHI 酶解,然后分别克隆到载体

pBluescriptSK 的 BamHI 和 EcoRV 位点。转化 DH5 α 感受态细胞。经酶切鉴定和测序筛选阳性克隆。所获得的克隆依次命名为 pBSKN、pBSKM、pBSKNM、pBSKC 和 pBSKMC。

1.5 PVY-C HC-Pro 基因缺失突变体植物表达载体的构建

首先用 ClaI 酶解 pBSKN、pBSKM、pBSKC、pBSKNM 和 pBSKMC,然后经 T4DNA 聚合酶补平,再用 BamHI 酶切,回收目的片段;pBin438 经 SalI 酶解、补平后,再用 BamHI 酶解,回收后分别与上述目的片段连接。PCR 扩增和酶切鉴定筛选阳性克隆。

表 1 寡聚核苷酸引物的序列及其在 PVY-C HC-Pro 基因中的位置

Table 1 The nucleotide sequence and its position in PVY-C HC-Pro gene of six oligonucleotide primers

Primer	Nucleotide sequence of oligonucleotide primer	Position in HC-Pro gene	Pair of primers
1	5'CTGGATCCACCAATGTCGAATGCCGAACAATTTTGTG3'	1 - 20nt	1, 2
2	5'GTTTACAGCTGAGCCACCTGCC3'	449 - 62nt	
3	5'TAGGATCCACCATGGTGGCTCAGCTGAGT3'	453 - 469nt	3, 4
4	5'CITTTATTGGTCACCACTATTGCC3'	956 - 973nt	1, 4
5	5'TAGGATCCACCATGGGCAATAGTGGTGACCA3'	946 - 962nt	5, 6
6	5'TTGTGACTTAACCAACTCTATAATGTTTTTA3'	1349 - 1368nt	3, 6

1.6 烟草转化

以 4~5 片叶龄的烟草叶片为转化受体,采用叶盘法转化烟草。

1.7 再生植株的 PCR 和 Southern blot 分析

按 CTAB 法提取植物总 DNA。PCR 的反应条件同前。Southern blot 分析按 Promega 公司 Promer-agene labeling system 说明书标记 PVY-C HC-Pro 基因的探针。

1.8 转基因植物 Western blot 分析

叶片经液氮处理研成粉末,再加入提取缓冲液研成匀浆,12 000 r/min 离心,取上清液进行 SDS-PAGE。用半干转移仪(Bio-Rad)把蛋白转移至 NC 膜。然后进行免疫反应。多抗为 PVY-C HC-Pro 基因原核表达产物制备的兔抗血清^[13]。以感染 PVY 的烟草和健康烟草的可溶性总蛋白分别为阳性和阴性对照。

1.9 攻毒试验和酶联免疫分析

待幼苗长至 4~5 片叶龄时,分别磨擦接种 PVX、CMV,同时以非转基因烟草 K326 为对照。重复一次。接种 PVX 后 1 周内每天采集接种叶上面

的第一片叶片 100mg,进行间接酶联免疫(ELISA)检测。PVX 抗血清的工作浓度为 1:10⁶,二抗碱性磷酸酶标记羊抗兔的工作浓度为 1:5000,反应底物为对苯磷酸。在 Bio-Rad 酶联仪 Model 550 上读数。

2 结果和讨论

2.1 PVY-C HC-Pro 基因缺失突变体的克隆

以质粒 pBSKHC^[13]的 DNA 为模板,利用 6 个人工合成的寡聚核苷酸引物进行 PCR 扩增,获得 5 种 PCR 产物,其大小与预期的相当。按前述方法,将 5 种 PCR 产物克隆到 pBluescriptSK 的 BamHI 和 EcoRV 位点。通过酶切鉴定和序列测定结果表明阳性克隆 pBSKN、pBSKM、pBSKC、pBSKNM 和 pBSKMC 中外源插入片段的大小分别为 462bp、521bp、422bp、973bp 和 815bp。

2.2 PVY-C HC-Pro 基因缺失突变体植物表达载体的构建

对 pBSKN、pBSKM、pBSKC、pBSKNM 和 pBSKMC 酶解和补平后,回收目的片段,并将它们分别克隆到植物表达载体质粒 pBin438 的相应位点,筛选得到

的重组质粒依次命名 pBinN、pBinM、pBinC、pBinNM 和 pBinMC(图 1)。上述 5 种植物表达载体质粒和 pBinHC 分别转化土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404, 经 PCR 和酶切鉴定, 得到了含对应质粒的 6 种农杆菌工程菌。

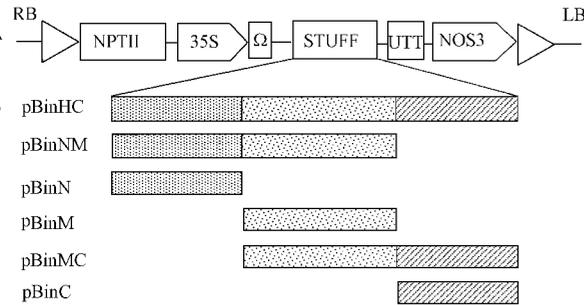


图 1 PVY-C HC-Pro 基因及其缺失突变体植物表达载体的构建图

Fig.1 Construct of plant expression vector containing PVY-C HC-Pro gene or its deletion mutant

2.3 再生植株的 PCR 和 Southern blot 分析

采用叶盘法转化烟草品种 K₃₂₆(*Nicotina tabacum* cv. K₃₂₆)。当转化体的根系长至 2~3cm 时, 将再生植株移入土中, 于温室继续培养。转 pBinN、pBinM、pBinC、pBinNM、pBinMC 和 pBinHC 的再生植株分别命名为 N、M、C、NM、MC 和 HC, 共移栽成活 268 株(T₀)。在检测的 102 株再生植株中, PCR 阳性率为 80.2%。

植物总 DNA 用 *Eco*RI 酶解后, 经电泳和真空转移至 Z-Probe 膜上, 65℃ 杂交过夜。Southern blot 分析结果表明转 PVY-C HC-Pro 基因及其 5 个缺失突变体的烟草均能与 HC-Pro 基因产生特异的杂交信号, 而非转基因烟草则无任何杂交信号(图 2), 说明 PVY-C HC-Pro 基因及其 5 个缺失突变体均整合到烟草染色体中。

2.4 PVY-C HC-Pro 基因及其缺失突变体在转基因烟草中的表达

利用 PVY-C HC-Pro 的兔抗血清对 158 株转基因烟草进行了 Western blot 检测, 89 株为阳性, 其中 N、M、C、NM、MC、HC 分别为 22/38、16/33、14/21、8/15、12/20、17/31 株。部分阳性植株的 Western blot 检测结果见图 3, N、M、C 在大约 17kD, MC、NM、HC 分别在大约 30kD、35kD、50kD 处与 PVY-C HC-Pro 的抗血清发生免疫反应, 并形成了特异的条带(图 3)。

2.5 PVY-C HC-Pro 基因缺失突变体对 PVX 和 CMV 致病性的影响

PVX 和 CMV 两次接种转基因烟草 102 株和 109

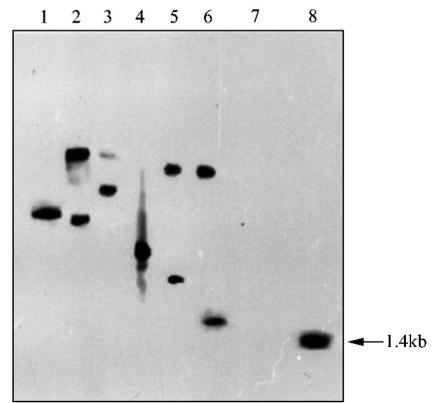


图 2 转基因烟草的 Southern blot 分析

Fig.2 Southern blot analysis of T₀ transgenic tobacco lines 1~6. Transgenic tobacco plants expressing pBinN, pBinM, pBinC, pBinNM, pBinMC and pBinHC, respectively. 7. Nontransgenic tobacco. 8. pBSKHC BamHI/ClaI

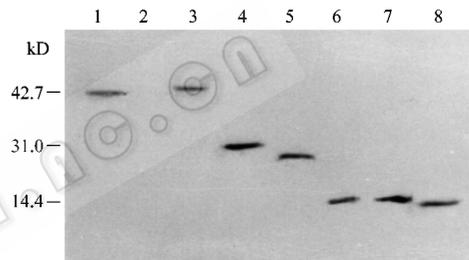


图 3 转基因烟草的 Western blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of T₀ transgenic tobacco lines 1. Tobacco infected by PVY-C. 2. Healthy tobacco. 3~8. Transgenic tobacco HC, MC, NM, M, N and C

株。接种 1 周后, 转基因烟草 N、C 和非转基因烟草 K₃₂₆ 开始发病, 出现明脉和花叶症状。接种后 35d 内, N、C 植株一直表现为花叶, 而且症状严重程度与 K₃₂₆ 相近。在接种的转基因烟草 M、MC、NM、HC 中, 大部分植株比对照提前 2~3d 发病, 并于 10~12d 后出现系统坏死, 继而个别植株开始死亡。其中 Western blot 阳性植株均表现典型的协生症状。M、MC、NM、HC 中的其它植株的系统发病时间和症状类型与对照相同。攻毒试验结果表明除 N、C 外, 其余转基因烟草均能介导 PVY/PVX、PVY/CMV 的协生作用。

接种 PVX 1 周内对接种叶上面的第 1 片叶进行了 ELISA 检测, 结果发现接种后第 3 天只有 2 株转基因烟草呈 ELISA 阳性; 第 4 天转基因烟草 M、MC、NM 中也出现了 ELISA 阳性株; 第 5 天 6 种转基因烟草和非转基因烟草中均有 ELISA 阳性株, 但转基因烟草中阳性株出现的频率高于非转基因对照(表 2)。

表 2 转 PVY-C HC-Pro 基因及其突变体烟草中 PVX 病毒的侵染速率

Table 2 The infection speed of transgenic tobacco plants expressing PVY-C HC-Pro gene or its deletion mutant by PVX

Lines	Days of postinoculation						
	1	2	3	4	5	6	7
N	0/12	0/12	0/12	0/12	5/12	7/12	10/12
M	0/12	0/12	0/12	3/12	7/12	7/12	12/12
C	0/11	0/11	0/11	0/11	5/11	6/11	11/11
NM	0/13	0/13	0/13	4/13	8/13	8/13	13/13
MC	0/14	0/14	0/14	5/14	10/14	12/14	13/14
HC	0/10	0/10	2/10	8/10	9/10	10/10	—
CK	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	4/10	10/10

3 讨论

在植物病毒协生作用中, potyvirus 的病毒成员介导的协生作用占居首位, 它们能够与其它 8 个病毒属的成员发生协生作用^[1-3, 10-12, 14, 15]。除了 PVY 与 PVX 间发生协生作用外^[1, 9], Potyvirus 属的其它病毒如烟草饰纹病毒(Tobacco etch potyvirus, TEV)、烟草脉斑驳病毒(Tobacco vein mottling potyvirus, TVMV)、甜椒斑驳病毒(Pepper mottle potyvirus, PepMoV)等也能与 PVX 发生协生作用^[10, 11, 16]。Vance 等人(1995)用 PVX 分别接种转 TVMV CP、CI、NIa、NIa-glnH、CI-6KD-NIa-NIb-CP、P1-(HC-Pro)-P3 基因或基因片段的烟草, 结果发现只有 P1-(HC-Pro)-P3 的转基因植株出现明脉、坏死等协生症状, 其余仅表现轻微的花叶症状^[10]。Pruss 等人以表达 TEV P1-(HC-Pro)的转基因烟草为材料, 进一步证明 TEV P1-(HC-Pro)提高了 TMV 和 CMV 在转基因烟草中的基因组 RNAs 的积累。然后利用 PVX 侵染性克隆构建了 3 种嵌合载体: PVX-TEV5' 端序列(P1-(HC-Pro)和部分 P3)、PVX-TEV HC-Pro 和 PVX-TEV noHC-Pro(HC-Pro 基因无起始密码子), 通过侵染性实验和分子检测证明 HC-Pro 蛋白, 并非它的 RNA 介导 PVX/TEV 协生作用, 同时证明 P1、P3 对于 PVX/TEV 协生作用是非必需的^[11]。然而他们没有回答 TEV HC-Pro 基因哪个区域介导协生作用。

1997 年 Shi 等人对 TEV P1-(HC-Pro)基因编码区进行了突变, 通过插入 NcoI 位点, 得到了 6 种不同的突变体。PVX 的攻毒试验结果发现突变位点位于 P1、HC-Pro N 端的转基因植株表现协生症状, 而位于 HC-Pro 中心区域 2 个突变体的转基因植株仅呈现轻微症状。说明 TEV HC-Pro 的中心区域介导

PVX/TEV 协生作用, 而 P1、HC-Pro N 端对协生作用无影响。用 TEV HC-Pro N 端缺失 66 个氨基酸残基的缺失突变体 TEV-2del 和 PVX 共同侵染烟草, 结果也支持 TEV HC-Pro N 端在介导 PVX/TEV 协生作用和反式激活 PVX 复制均没有作用^[16]。本研究通过对 PVY-C HC-Pro 基因和 5 种缺失突变体在 PVX/PVY 协生作用中的作用, 发现除转基因烟草 N、C 外, 其余转基因植物均能够介导 PVX/PVY、CMV/PVY 的协生作用, 即 PVY-C HC-Pro 基因的中心区域为介导协生作用的功能区, 在协生作用中起主导作用。关于 PVY-C HC-Pro 中心区域两个保守区的定点突变对 PVX/PVY 协生作用的影响我们将另文报道。

Potyvirus HC-Pro 是一种多功能蛋白^[17]。它的 N 端控制介体传播和病毒的复制; C 端具有蛋白酶活性, 以顺式方式催化自身的断裂; 中心区域则参与病毒细胞间和长距离运输。对转基因植株上部叶片的 ELISA 检测发现凡是含有 PVY-C HC-Pro 基因中心区域的突变体在接种后第 4 天均检测到了 PVX 病毒粒体, 而突变体 N、C 与非转基因烟草在第 5 天才检测到 PVX, 推测 PVY-C HC-Pro 中心区域具有促进 PVX 运输的作用。利用绿色荧光蛋白(GFP)作为报告基因研究植物病毒在寄主体内的移动情况具有直接、快速的优点^[18], 将含有 GFP 的 PVX 侵染性克隆通过农杆菌感染上述 6 种转基因烟草的工作正在进行之中。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Damirdagh I S, Ross A F. A marked synergistic interaction of potato viruses X and Y in inoculated leaves of tobacco. *Virology*, 1967, **31**: 296 ~ 307
- [2] Lee Y S, Ross J P. Top necrosis and cellular changes in soybean doubly infected by soybean mosaic and bean pod mottle viruses. *Phytopathology*, 1972, **62**: 839 ~ 845
- [3] Valkonen J P T. Accumulation of potato virus Y is enhanced in *Solanum brevidens* also infected with tobacco mosaic virus or potato spindle tuber viroid. *Ann Appl Biol*, 1992, **121**: 321 ~ 327
- [4] Scheets K. Maize chlorotic mottle machlomovirus and wheat streak mosaic rymovirus concentrations increase in the synergistic disease corn lethal necrosis. *Virology*, 1998, **242**: 28 ~ 38
- [5] Scholthof K B. A synergism induced by satellite panicum mosaic virus. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, **12**: 163 ~ 166
- [6] Ding S W, Shi B J, Li W X *et al*. An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, **93**: 7470 ~ 7474
- [7] Fondong V N, Pita J S, Rey M E C *et al*. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant

~ 297

- [8] Harrison B D , Zhou X , Otim-Nape G W *et al.* Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. *Ann Appl Bio* ,1997 **131** :437 ~ 448
- [9] Vance V B. Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology* ,1991 **182** :486 ~ 494
- [10] Vance V B , Berger P H , Carrington J C *et al.* 5' proximal sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* ,1995 **206** :583 ~ 590
- [11] Pruss G , Ge X , Shi M X *et al.* Plant viral synergism : the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* ,1997 **9** :859 ~ 868
- [12] Karyeija R F , Kreuze J F , Gibson R W *et al.* Synergistic interaction of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology* 2000 **269** :26 ~ 36
- [13] GUO M (郭明) , LU R F (鲁瑞芳) , WANG H Y (王海云) *et al.* Cloning and sequencing of helper component proteinase gene of potato virus Y and its expression in *Escherichia coli* . *Journal of Agricultural Biotechnology* (生物技术学报) ,2000 **8** (3) :249 ~ 252
- [14] Uyemoto J K , Bockelman D L , Claflin L E. Severe outbreak of corn lethal necrosis disease in Kansas. *Plant Dis* ,1980 **64** :99 ~ 100
- [15] Barker H. Invasion of non-phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by potato leafroll virus is enhanced in plants also infected with potato Y potyvirus. *J Gen Virol* ,1987 **68** :1223 ~ 1227
- [16] Shi X M , Miller H , Verchot J *et al.* Mutation in the region encoding the central domain of helper component proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *Virology* ,1997 **231** :35 ~ 42
- [17] Maia I G , Haenni A L , Bernardi F. Potyviral HC-Pro : A multifunctional protein. *J Gen Virol* ,1996 **77** :1335 ~ 1341
- [18] YUE L I (岳莉莉) , QI Y F (齐义鹏) . Green fluorescent protein-A new marker in the fields of cytology and molecular biology. *Progress in Biotechnology* (生物工程进展) ,1997 **17** :40 ~ 43

The Primary Role of Central Region of HC-Pro of Potato Y Potyvirus in Synergism of Plant Viruses

LU Rui-Fang LI Wei-Min WANG Hai-Yun GUO Ming PENG Xue-Xian*

(Plant Biotechnology Laboratory , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract Five deleted mutants of HC-Pro gene of Chinese isolate of potato Y potyvirus (PVY-C) were obtained by PCR mutation and their plant expression vectors were constructed. They were transformed into tobacco K326 (*Nicotina tabacum* cv. K326) mediated by *Agrobacterium*. PCR and Southern blot analysis revealed that PVY-C HC-Pro gene and its deleted mutants were integrated into tobacco genome and Western blot analysis showed that they were all expressed in transgenic tobacco plants. Furthermore infection test demonstrated that the central region of PVY-C HC-Pro can mediate synergism of PVY-C/cucumber mosaic cucumovirus (CMV) and PVY-C/potato X potyvirus (PVX), identifying that it is functional domain in synergism.

Key words potato Y potyvirus , HC-Pro gene , the central region , functional domain , synergism

Received : November 27 , 2000

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China (39800001).

* Corresponding author. Tel 86-10-62522107 , Fax 86-10-62560912 , E-mail emvxx@sun.jim.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>