

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2023.06.003

黄瓜花叶病毒基因沉默载体的 病毒含量和症状分析

吴娟, 李佳燕, 李伟, 曾紫怡, 竺锡武

湖南人文科技学院 农业与生物技术学院, 湖南 娄底 417000

摘要: 病毒诱导的基因沉默(Virus-induced Gene Silencing, VIGS)已被广泛应用于植物基因功能研究, 具有操作容易、较短时间内即可观察到沉默效果、成本较低的特性. 黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic Virus, CMV) VIGS 载体已经应用于沉默辣椒、烟草、大豆等植物基因, 对于研究植物基因功能有重要作用. 研究以 CMV 的 Fny 株系(CMV-Fny)RNA2 中 2b 基因缺失载体 CMV-F209 Δ 2b 和表达 2b 基因 N 端 61 个氨基酸的载体 CMV-F2092b61aa 为对象, 插入不同长度的外源基因 gfp 片段后, 分析 CMV VIGS 载体在本氏烟植株上的病毒表达含量及诱导产生的病毒症状. 结果表明, 插入外源基因片段后, 病毒外壳蛋白(Coat Protein, CP)基因 RNA 表达水平均明显降低. 携带不同长度 gfp 序列的重组病毒 CMVF2092b61aa-gfp₁₀₀、CMVF2092b61aa-gfp₂₀₀ 和 CMVF2092b61aa-gfp₃₅₀ 其 CP RNA 含量比装载最适长度 gfp 序列的 CMVF209 Δ 2b-gfp₃₅₀ 高 10 倍左右, 且同样不引发明显病毒症状. 由此可见, CMVF2092b61aa 相比 CMV-F209 Δ 2b 更适合作为高效的 VIGS 载体, 且初步探明它的最适插入片段长度为 200~350 nt.

关键词: 病毒诱导的基因沉默; 黄瓜花叶病毒;
2b; 病毒含量

中图分类号: S432

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2023)06-0021-07

Analysis of Virus Content and Symptoms of Cucumber Mosaic Virus-based Gene Silencing Vector

WU Juan, LI Jiayan, LI Wei, ZENG Ziyi, ZHU Xiwu

Institute of Agriculture and Biotechnology, Hunan University of Humanities, Science and Technology, Loudi Hunan 417000, China

收稿日期: 2023-09-23

基金项目: 湖南省教育厅科研创新平台开放基金(18K100).

作者简介: 吴娟, 博士, 讲师, 主要从事植保生物技术研究.

通信作者: 竺锡武, 研究员.

Abstract: Virus-induced gene silencing (VIGS) has been widely used for plant gene functional analysis. It is easy to operate, to observe the silencing effect in short time and low cost. Cucumber Mosaic Virus (CMV) has been successfully deployed as a VIGS vector in plants such as chili, tobacco and soybean, playing an important role in plant gene functional analysis. In this study, GFP gene fragments of different lengths were inserted into the 2b gene deletion vector CMV-F209 Δ 2b and CMV-F2092b61aa with truncated 2b to analyze the virus expression level and induced virus symptoms of these CMV VIGS vectors in *Nicotiana benthamiana*. The results indicated that the accumulation of CP RNA was significantly reduced after inserting foreign gene fragments. The CP RNA contents of recombinant viruses CMVF2092b61aa-gfp₁₀₀, CMVF2092b61aa-gfp₂₀₀, and CMVF2092b61aa-gfp₃₅₀ carrying different length of GFP sequences were about 10 times higher than that of CMVF209 Δ 2b-gfp₃₅₀ carrying the optimal length of GFP sequence, and they also did not cause obvious virus symptoms. Therefore, CMVF2092b61aa is more suitable as an efficient VIGS vector than CMV-F209 Δ 2b, and its optimal fragment length of insertion has been preliminarily determined to be 200~350 nt.

Key words: virus-induced gene silencing; cucumber mosaic virus; 2b; virus content

病毒诱导的基因沉默(Virus-induced Gene Silencing, VIGS)是指携带目的基因片段的病毒侵染植物后在植物体内产生 dsRNA, 被宿主的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)体系将携带有植物基因片段的重组病毒的转录产物降解为 21~30 nt 的 siRNAs, 然后 siRNAs 靶向降解与其序列同源的植物内源靶基因的转录产物, 瞬间下调靶基因的表达, 从而使植物在 2~3 周内快速出现功能缺失表型^[1]. 它是一种转录后水平的基因沉默现象, 病毒介导的基因沉默技术与转基因介导的基因沉默技术因其双链 RNA 来源不同而作为 RNA 干扰(RNAi)技术的两个分支存在. 这种方法操作简便、快速、有效, 适用于进行高通量操作, 所以 VIGS 成为进行大规模靶基因功能筛选的重要研究工具, 尤其对于那些难以进行转基因的物种. 研究发现, 至少有 50 多种来自不同科属的病毒能作为各种模式植物和一些农作物的 VIGS 载体^[2].

黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic Virus, CMV)是一种球形的二十面体病毒, 直径为 28~30 nm, 存在于细胞的细胞质和细胞核中^[3]. 黄瓜花叶病毒属于雀麦花叶病毒科、黄瓜花叶病毒属的一个典型成员. 它可以感染 1 200 多种植物, 是自然界分布最广、宿主最多的植物病毒之一^[4]. 黄瓜花叶病毒是三分体病毒类型, 其遗传信息库包括有 3 条正单链(RNA1、RNA2 和 RNA3), 可合成 1a 蛋白、2a 蛋白、3a 蛋白、外壳蛋白(Coat Protein, CP)等; 2b 蛋白翻译自亚基因组 RNA4A, 参与病毒细胞间移动、RNA 沉默的抑制及对抗植物体 SA 诱导的抗性, 也与病毒症状的产生密切相关^[5]. 2b 蛋白是 CMV 最小的蛋白, 只有约 110 个氨基酸, 它是最早被称为病毒 RNA 沉默抑制子(Viral Suppressor of RNA Silencing, VSR)的病毒蛋白, 其 N 端 61 个氨基酸就是抑制活性部位, 对于结合 siRNA 双链是必需的^[6-7]. 目前 CMV 病毒载体的研究都已将 CMV 的 RNAs1、2 和 3 的全长 cDNA 片段分别连入 pCB301 等植物表达载体双 35S 启动子的下游, 构建 CMV 侵染性克隆, 该侵染性克隆可以通过农杆菌浸润的方法接种至植物, 造成系统侵染^[8]. CMV VIGS 载体的构建主要是对 RNA2 进行改造, 去掉部分或全部 2b 基因序列, 引入终止密码子和 MCS, 由于改造过程中, 2b 蛋白遭到破坏, 降低了其对 RNA 沉默的抑制, 使其更适于病毒诱导基因沉默^[9-10].

姚敏等^[8]的研究表明, 2b 缺失突变体 CMV-Fny Δ 2b 在本氏烟上虽然早期有微弱的曲叶症状, 但中后期无任何症状, RT-PCR 检测表明 Fny2b 缺失突变体可系统侵染本氏烟, 这与 Ding

等^[11]早期报道 2b 缺失后能够系统侵染普通烟相一致. 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^[12]. 程晓东等^[10]用 CMV 不同株系的 RNA2 与 CMV-Fny 基因组 R1 和 R3 进行组合接种, 获得在本氏烟中症状轻的病毒组合 F1TshR2F3, TshR2 的 2b 基因缺失 3' 端的 95 nt 碱基(Tsh2 VIGS)后病毒能系统性侵染寄主植物, 但降低病毒外壳蛋白(Coat Protein, CP)含量. 2b 基因完全缺失也有可能影响 CMV VIGS 载体在一些植物上的复制和系统移动, 导致无侵染性, 所以报道的 CMV 载体一般保留了 2b 蛋白的 N 端 60~94 个氨基酸序列^[9]. 也有观点认为, 保留的 2b 序列内含 RNA 沉默抑制子活性的功能域, 有可能会影响病毒诱导的基因沉默^[9]. 向志丹等^[13]的研究发现, 基于沉默的效率和稳定性, 完全缺失 2b 基因的载体 CMV-Fny Δ 2b 的最适插入片段是 350 nt 左右. 本试验分析了 CMV-Fny Δ 2b 载体插入 350 bp 的 *gfp* 外源基因片段, 以及 CMV-F2092b61aa 载体分别插入 100 bp、200 bp 和 350 bp 的 *gfp* 外源基因片段, 其病毒外壳蛋白 RNA 水平的变化, 及诱导产生的病毒症状的变化.

1 材料与方 法

1.1 试验试剂

限制性内切酶、Taq PCR 酶、Pyrobest[®] DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶(RNaseH⁻)、重组 RNase 抑制剂、T4 DNA 连接酶购于宝日医生物技术(北京)有限公司; DNA 清洁回收试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于爱思进生物技术(杭州)有限公司; 2 \times qPCR Mix(SYBR Green I)、引物购于北京擎科生物科技股份有限公司; Trizol 试剂购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 其他试剂购于生工生物工程(上海)股份有限公司.

1.2 寄主植物

本氏烟幼苗于 25 $^{\circ}$ C、16 h 光照/8 h 黑暗的植物培养室中培养, 生长至 5~7 叶期接种病毒.

1.3 质粒及其构建

CMV Fny 基因组 RNA1-3 的侵染性克隆(pCB301-CMV F109, pCB301-CMV F209 和 pCB301-CMV F309)和 2b 基因缺失质粒 pCB301-CMV F209 Δ 2b-MCS 由浙江理工大学赠与. pCB301-F2092b61aa-MCS 是以质粒 pCB301-F209 Δ 2b-MCS 为基础构建的. 以本实验室已有的 pCB301-CMV F209 质粒为模板, 采用引物 2bNcoIF2 和 2b61aaMluR 通过 PCR 扩增 2b61aa 的 DNA 序列片段, 大小为 750 bp 左右, pCB301-CMV F209 Δ 2b-MCS 质粒用 NcoI 和 Mlu I 双酶切后, 切下 570 bp 左右片段后, 约 7 400 bp 载体片段与同样经过酶切的 PCR 产物连接, 获得 pCB301-CMV F2092b61aa-MCS 质粒.

为了构建含不同长度的 *gfp* 基因片段的重组质粒, 采用不同的下游引物与 GFP350MluF 组合, PCR 扩增获得 100 bp, 200 bp 和 350 bp 的 *gfp* 基因片段. 经 Mlu I 和 BamH I 酶切, 克隆至预先经 Mlu I/BamH I 酶切的 pCB301-CMV F209 Δ 2b-MCS 和 pCB301-CMV F2092b61aa-MCS 质粒, 构建产生重组质粒 pCB301-CMV F209 Δ 2b-*gfp*₃₅₀, pCB301-CMV F2092b61aa-*gfp*₁₀₀, pCB301-CMV F2092b61aa-*gfp*₂₀₀ 和 pCB301-CMV F2092b61aa-*gfp*₃₅₀. 所有重组质粒均测序正确, CMV 载体构建过程见图 1.

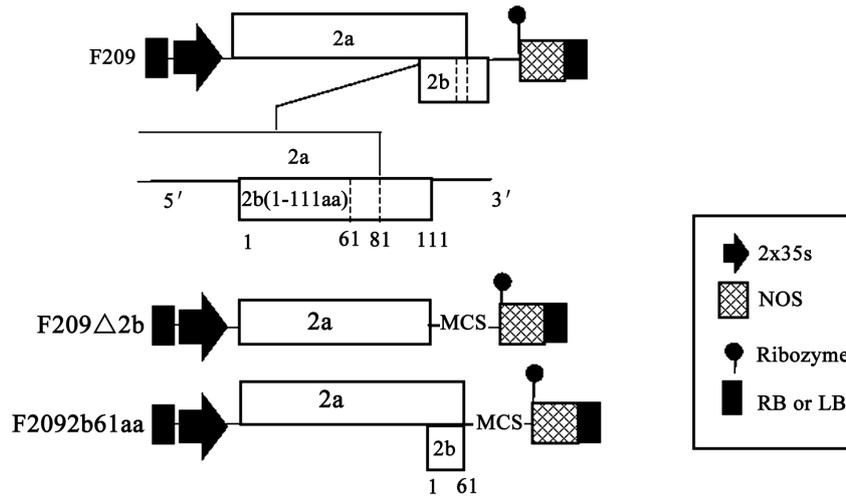


图 1 CMV 载体构建示意图

1.4 农杆菌浸润接种病毒

pCB301-CMVF109 ~ F309, pCB301-CMVF209 Δ 2b-MCS, pCB301-CMVF2092b61aa-MCS, pCB301-CMVF209 Δ 2b-gfp₃₅₀, pCB301-CMVF2092b61aa-gfp₁₀₀, pCB301-CMVF2092b61aa-gfp₂₀₀ 和 pCB301-F2092b61aa-gfp₃₅₀ 质粒采用冻融法转入农杆菌 GV3101 中, 农杆菌浸润接种本氏烟参考张斯 (2014) 的方法, 农杆菌 GV3101 (pCB301-CMVF109)、GV3101 (pCB301-CMVF209, pCB301-CMVF209 Δ 2b-MCS 等) 和 GV3101 (pCB301-CMVF309) 等比例混合, 用无针头注射器浸润接种于 6~7 叶龄本氏烟中间叶位相对的两叶片, 接种后的本氏烟 25 °C 黑暗处理 24 h 后, 继续 25 °C、16 h 光照/8 h 黑暗温室培养。

1.5 qRT-PCR 分析接种烟草 CMV CP 基因 mRNA 含量

提取 CMV, CMVF209 Δ 2b-MCS, CMVF209 Δ 2b-gfp₃₅₀, CMVF2092b61aa-MCS, CMVF2092b61aa-gfp₁₀₀, CMVF2092b61aa-gfp₂₀₀ 和 CMVF2092b61aa-gfp₃₅₀ 侵染本氏烟相同叶位系统叶的总 RNA, 并用 RNase-Free DNase 消化以除去 DNA. 总 RNA 经 nanodrop 初步定量和 1×TBE 琼脂糖电泳进行质量检测. 以本氏烟 Actin 为内参基因, CMV CP 基因特异的 qRT-PCR 引物为 F309CPqF2 和 F309CPqR2, 具体引物序列见表 1. 总 RNA 用 M-MLV 反转录酶进行反转录, qRT-PCR 按照试剂盒的说明书进行. CP 基因的 mRNA 相对表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算获得。

表 1 引物信息

引物名称	引物序列(5'~3')	用途
2bNcoIF2	CATGCCATGGCTGAGTTTGCTG	pCB301-CMVF2092b61aa-MCS 质粒构建
2b61aaMluR	ACTCCGCCACGTTACATGATCCACTTGA	TAGAACGGTAG
GFP _{Mlu} F	CGACGCGTGAGCTGAAGGGCATCGACT	gfp 片段克隆共用正向引物
GFP ₃₅₀ BamHR	CGGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT	gfp ₃₅₀ 克隆
GFP ₂₀₀ BamHR	CGGGATCCTCGCCGATGGGGGTGTTC	gfp ₂₀₀ 克隆
GFP ₁₀₀ BamHR	CGGGATCCTTCTGCTTGTGCGCCATG	gfp ₁₀₀ 克隆
F309CPqF1	GAAGCTTGTTTCGCGCATTC	qRT-PCR
F309CPqR1	CACCTATATCAGCGGCATC	qRT-PCR
NbActinF1	CCACATGCCATTCTCCGTCT	qRT-PCR
NbActinR1	TCCCTGACAATTCCCGCTC	qRT-PCR

1.6 数据处理与统计学分析

本研究所收集数据采用 SPSS 26.0 软件进行分析.

2 结果与分析

2.1 CMV Fny 及重组病毒在本氏烟上的症状反应

将 CMV Fny RNA2 进行改造后,只表达 2b 基因 N 端 61 个氨基酸的病毒 CMVF2092b61aa 在接种后的本氏烟上的病毒症状反应与 CMV Fny 相比较轻很多,植株无严重矮化和叶片卷曲症状,只是幼叶呈现浓绿与淡绿不均匀的斑驳即轻花叶症状,而完全缺失 2b 基因的病毒 CMVF209 Δ 2b 则无明显病毒症状(图 2).携带 100 bp~350 bp 的外源基因片段的重组病毒 CMVF2092b61aa-gfp₁₀₀, CMVF2092b61aa-gfp₂₀₀, CMVF2092b61aa-gfp₃₅₀ 和 CMVF209 Δ 2b-gfp₃₅₀ 都不表现明显病毒症状反应(表 2).

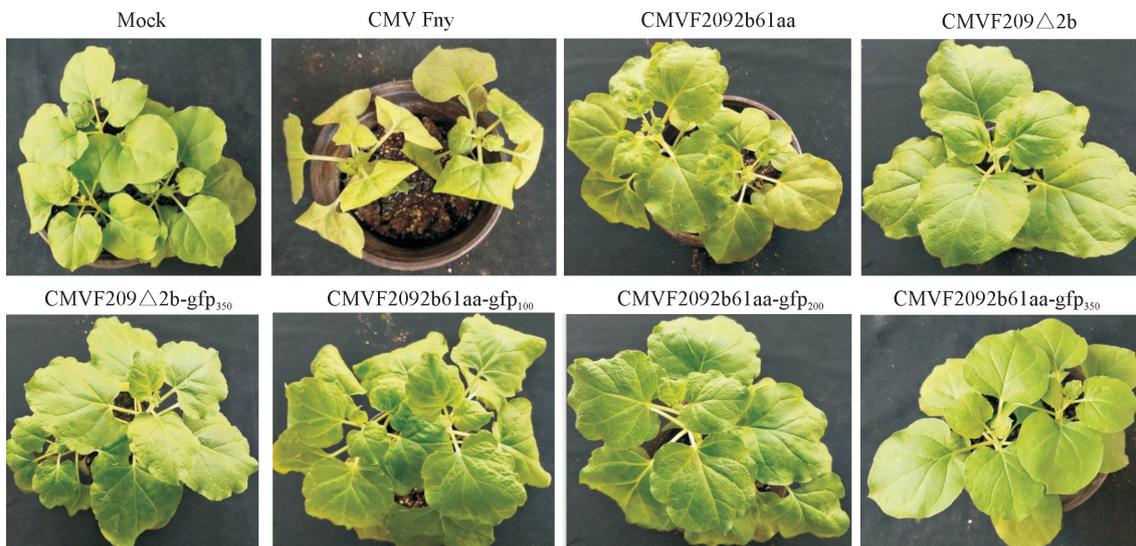


图 2 本氏烟接种病毒或缓冲液(Mock)15 d 的症状

表 2 CMV Fny 及重组病毒在本氏烟上的症状反应

病毒	本氏烟症状
CMV Fny	植株严重矮化和叶片卷曲
CMVF2092b61aa	轻花叶
CMVF209 Δ 2b	无明显病毒症状
CMVF209 Δ 2b-gfp ₃₅₀	无明显病毒症状
CMVF2092b61aa-gfp ₁₀₀	无明显病毒症状
CMVF2092b61aa-gfp ₂₀₀	无明显病毒症状
CMVF2092b61aa-gfp ₃₅₀	无明显病毒症状

2.2 病毒在本氏烟上的含量分析

为了分析改造后的 CMV VIGS 载体 CMVF209 Δ 2b, CMVF2092b61aa 和携带外源基因片段的重组病毒是否会影响病毒基因组含量,将 100 nt~350 nt 不等的外源基因片段插入改造后的 CMV VIGS 载体,并将 CMV Fny、改造后的病毒载体及重组病毒 CMVF2092b61aa-gfp₁₀₀, CMVF2092b61aa-gfp₂₀₀, CMVF2092b61aa-gfp₃₅₀ 和 CMVF209 Δ 2b-gfp₃₅₀ 通过农杆菌浸润法接

种本氏烟. 在接种后 15 d, 通过荧光定量 PCR 方法, 对成功接种的本氏烟相同叶位的上部系统叶(非顶部叶片)中的 CMV CP 基因 mRNA 水平进行相对定量. 结果如图 3 所示, 与野生型病毒 CMV Fny 相比, 改造后的病毒 CMVF2092b61aa CP 基因表达量下降了 52%, 而 CMVF209 Δ 2b 下降 96%; 与 CMVF2092b61aa 相比, 插入外源基因片段的重组病毒 2b61aa-gfp₁₀₀, 2b61aa-gfp₂₀₀ 和 2b61aa-gfp₃₅₀ 分别下降了 90%, 32% 和 78%. 已有报道 CMVF209 Δ 2b 作为基因沉默载体, 最适插入片段为 350 nt 左右, 而装载 350 nt 片段后 CP 基因表达量下降了 66%. CP 基因的表达量代表了病毒基因组 RNA 水平, 以上结果说明, 作为基因沉默载体, CMVF2092b61aa 比 CMVF209 Δ 2b 在本氏烟上病毒含量高 10 倍以上, 且装载外源基因片段的 2b61aa-gfp₃₅₀ 和 2b61aa-gfp₂₀₀ 其病毒量也是 CMVF209 Δ 2b-gfp₃₅₀ 的 10 倍以上. 由于 CMVF2092b61aa 装载 100~350 nt 不等的外源基因片段后, 在本氏烟上也不表现明显病毒症状, 但其具有更高的表达量, 将会产生更高的沉默效率, 所以比 CMVF209 Δ 2b 更适合作为基因沉默载体, 且本研究初步发现它的最适插入片段是 200 nt 左右.

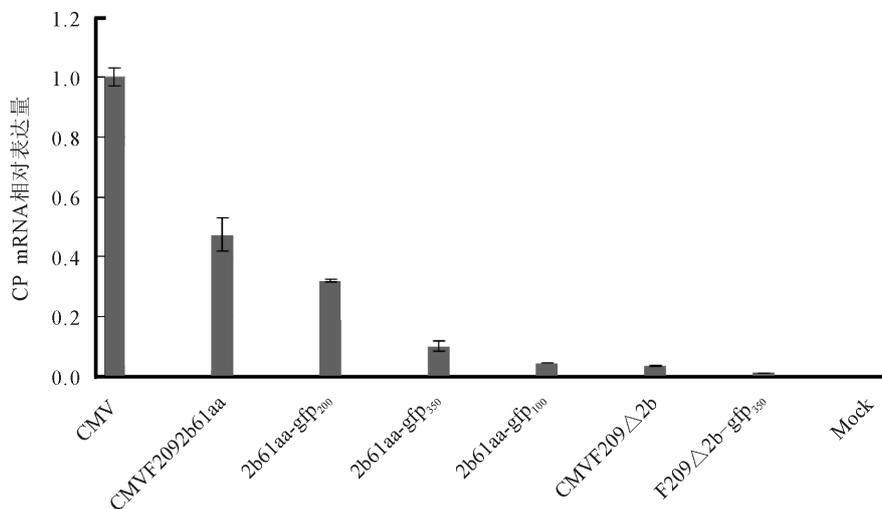


图 3 qRT-PCR 分析病毒侵染烟草中 CP mRNA 含量

3 结论与讨论

病毒诱导基因沉默(VIGS)已经成为一种常用的基因功能研究工具, 大约有 50 多种病毒能用于植物的基因沉默. 其中, 烟草脆裂病毒(Tobacco Rattle Virus, TRV)、马铃薯 X 病毒(Potato Virus X, PVX)、苹果潜隐球形病毒(Apple Latent Spherical Virus, ALSV)等已经建立了稳定的用于双子叶植物基因沉默的体系. 但是, 在单子叶植物中, VIGS 的应用还是非常有限. 黄瓜花叶病毒属于雀麦花叶病毒科、黄瓜花叶病毒属的一个典型成员. 它可以感染 1 000 多种植物, 因此是分布最广、宿主最多的植物病毒之一. CMV-Fny 属于 CMV 中 Subgroup I, 是强致病性的株系.

本研究将 CMV-Fny 接种于本氏烟, 7 d 后植株开始呈现叶片蜷曲、皱缩的症状, 随后症状还有加重的趋势, 15 d 后植株还明显矮化. 以植物病毒作为 VIGS 载体, 首先该病毒载体在寄主植物上引发的症状反应要轻微, 以免引发的严重症状干扰目标基因沉默后植株表型. 对 CMV-Fny RNA2 进行改造后, 2b 基因完全缺失的载体 CMVF209 Δ 2b 在本氏烟上不表现明显病毒症状, 保留 2b 基因 N 端 61 个氨基酸的载体 CMVF2092b61aa 虽然表现一定的病毒症状,

但插入 100~350 nt 不等的外源基因 gfp 片段后, 也都不表现明显病毒症状. 由于缺失基因沉默抑制子 2b 蛋白, CMVF209 Δ 2b 能系统侵染本氏烟, 但影响病毒 CP 含量, 病毒基因组含量显著降低, 而 CMVF2092b61aa 的病毒基因组 CP RNA 含量高很多, 这可能与 2b 蛋白其抑制活性位于其 N 端 61 氨基酸有关. 虽然装载外源基因片段后, 病毒 CP 含量都明显降低, 重组病毒 CMVF2092b61aa-gfp₁₀₀, CMVF2092b61aa-gfp₂₀₀ 和 CMVF2092b61aa-gfp₃₅₀ 均比装载最适长度的 CMVF209 Δ 2b-gfp₃₅₀ 高很多, 且同样不引发明显病毒症状. 作为高效的 VIGS 载体, 不仅在寄主植物上引发的病毒症状轻微, 且病毒表达含量高. 所以, CMVF2092b61aa 更适合作为高效的 VIGS 载体, 且它的最适插入片段是 200~350 nt.

参考文献:

- [1] 郭惠珊, 高峰, 赵建华, 等. 发展基因沉默技术, 控制作物土传真菌病害 [J]. 中国科学院院刊, 2017, 32(8): 822-829.
- [2] ABRAHAMIAN P, HAMMOND R W, HAMMOND J. Plant Virus-Derived Vectors: Applications in Agricultural and Medical Biotechnology [J]. Annual Review of Virology, 2020, 7(1): 513-535.
- [3] PALUKAITIS P, GARCÍA-ARENAL F. Cucumoviruses [J]. Advances in Virus Research, 2003, 62: 241-323.
- [4] SALÁNKI K, GELLÉRT Á, NEMES K, et al. Molecular Modeling for Better Understanding of Cucumovirus Pathology [J]. Advances in Virus Research, 2018, 102: 59-88.
- [5] JACQUEMOND M. Cucumber Mosaic Virus [M]//Advances in Virus Research. Amsterdam: Elsevier, 2012: 439-504.
- [6] HWANG M S, LINDENMUTH B E, MCDONALD K A, et al. Bipartite and Tripartite Cucumber Mosaic Virus-Based Vectors for Producing the Acidothermus Cellulolyticus Endo-1, 4- β -Glucanase and other Proteins in Non-Transgenic Plants [J]. BMC Biotechnology, 2012, 12: 66.
- [7] DUAN C G, FANG Y Y, ZHOU B J, et al. Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-Mediated Slicing, Transgene-Induced RNA Silencing, and DNA Methylation by Distinct Domains of the Cucumber Mosaic Virus 2b Protein [J]. The Plant Cell, 2012, 24(1): 259-274.
- [8] 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.
- [9] 王蓉. 用于玉米基因功能研究的黄瓜花叶病毒基因沉默载体的创建 [D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [10] 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.
- [11] DING S W, LI W X, SYMONS R H. A Novel Naturally Occurring Hybrid Gene Encoded by a Plant RNA Virus Facilitates Long Distance Virus Movement [J]. The EMBO Journal, 1995, 14(23): 5762-5772.
- [12] 朱品, 常发光, 杜志游, 等. 基于黄瓜花叶病毒基因组 RNA2 的外源基因表达载体研究 [J]. 浙江理工大学学报(自然科学版), 2017, 37(2): 265-269.
- [13] 向志丹, 张震霄, 李超, 等. 黄瓜花叶病毒基因沉默载体的效率和稳定性分析 [J]. 浙江农业学报, 2017, 29(4): 625-630.

责任编辑 苏荣艳