棉花曲叶病毒外壳蛋白基因启动子 不是组织特异表达的启动子

谢迎秋^① 朱 祯^{①*} 刘玉乐^{②*} 吴 茜^① 徐鸿林^①

(^①中国科学院遗传研究所, 北京 100101; ^②中国科学院微生物研究所, 北京 100080. * 联系人, Email: pgmlzz@igtp.ac.cn)

摘要 双生病毒是一种单链 DNA 病毒. 来自番茄金色花叶病毒(TGMV)的资料表明, 其外壳蛋白基因 (*cp*) 启动子在韧皮部特异表达. 对新近发现并鉴定的棉花曲叶病毒(CLCuV) *cp* 启动子的研究表明, 它不是韧皮部特异表达的启动子. 该启动子驱动的 *gus* 基因表达活性不仅存在于韧皮部, 而且出现在叶肉组织和根尖分生组织中. 瞬时表达研究表明, AC2 激活后的 *cp* 启动子在叶肉及叶脉组织均有表达活性.

关键词 CLCuV 启动子 GUS 烟草 棉花

双生病毒(geminiviruses)是一类具有单链环状形式 DNA 基因组的植物病毒, 其基因组是通过病毒链和互补链分别以相反方向编码的^[1]. 病毒链第 1 个读码框和互补链第 1 个读码框之间存在一个大基因间区(large intergenic region, LIR), 该区又被称为双向启动子, 其中一个方向的启动子控制病毒链基因的表达, 主要编码外壳蛋白(coat protein, CP); 另一方向的启动子则调控互补链基因的表达, 主要编码复制蛋白(replication protein, RP)及转录激活因子(AC2). 因此两个方向的启动子分别被称为外壳蛋白基因启动子和复制蛋白基因启动子. 研究表明, *cp* 启动子的活性明显低于 *rp* 启动子的活性^[2], 但在转录激活因子 AC2 存在的情况下, *cp* 启动子瞬时表达活性可提高 3 倍^[3].

来自番茄金色花叶病毒 (TGMV)的资料表明, *cp* 启动子驱动的 *gus* 基因在韧皮部特异表达, 在 AC2 反式激活的情况下, 则驱动 *gus* 基因在植物体内组成型表达^[4]. 该现象为培育抗病毒的转基因植物开辟了一条崭新的途径. Hong 等人^[5]使用 ACMV 的 *cp* 启动子控制核糖体失活蛋白基因在转基因烟草中表达, 并利用 AC2 激活 *cp* 启动子的特点, 使核糖体失活蛋白基因在病毒侵染的情况下高效表达, 起到了抗双生病毒的作用. 最近, Needham 等人^[6]的研究表明, 以烟草黄矮病毒(TYDV)为载体的 *cp* 启动子控制的 *gus* 基因由于病毒的高效复制易引起失活, GUS 染色呈现不规则的斑点状.

棉花曲叶病毒 (cotton leaf curl virus, CLCuV)是新近鉴定的一种进化机制较为复杂的双生病毒. 最近几年, CLCuV 在印巴次大陆地区大面积流行, 严重时可使棉花绝收. CLCuV 由粉虱传播, 侵害的作物非常广泛, 包括棉花、法国豌豆、秋葵、烟草、番茄等双子叶植物, 主要产生叶脉增厚和叶片变黄等症状^[7]. 本实验室分离了 CLCuV 的双向启动子, 并首次发现 *rp* 启动子为强启动子, 在叶肉及韧皮部均有表达^[8, 9], 但至今尚不清楚 CLCuV *cp* 启动子的表达方式. 本文报道了其在烟草及棉花组织中驱动外源基因表达的特性, 为进一步了解病毒与植物间相互作用及培育抗病毒植物奠定了基础.

1 材料与方法

(i) 材料. 菌种 *Escherichia coli* DH5 α , *A.tumefaciens* LBA4404 为本实验室保存. 感染

CLCuV 的番茄叶片由苏格兰作物研究所 Harrison 教授惠赠. 烟草(*Nicotiana tabacum* L)种子(NC89, Xanthi)、棉花种子(晋棉 7 号)为本实验室保存. CLCuV 启动子由本实验室分离并克隆于质粒载体 pGEM7ZP1P2. 瞬时表达质粒载体 pCPGUS, pRPGUS 由本实验室构建^[8, 9]. 克隆载体 pBluescriptKS(+), 阳性对照质粒 pBI121 为本实验室保存. 植物表达载体 pCambia2300 由 Cambia 公司惠赠. 质粒 pBPFQ7 由古巴遗传工程和生物技术中心 Gonzalez 教授惠赠. 限制性内切酶、修饰酶购自华美公司、Biolabs、BRL 公司.

(ii) 植物总 DNA 的制备. 按照 Harrison 等人^[7]的方法从感染 CLCuV 的番茄叶片中提取总 DNA.

(iii) 启动子-*gus* 表达载体构建. 将 pCPGUS, pRPGUS^[8, 9]上含有的 *cp* 启动子-*gus-Tnos*, *rp* 启动子-*gus-Tnos* 片段分别插入植物表达载体 pCambia2300 的多克隆位点, 获得质粒 pCPGUS2300(图 1)、pRPGUS2300^[8, 9].

(iv) 反式作用因子 AC2 表达载体构建. 通过 PCR 方法得到 *ac2* 基因片段, 模板为以 CLCuV 感染的番茄叶片中提取的总 DNA. 引物设计¹⁾: 5' 端引物 P3: 5' -CGCGAATTCCTAGACGAGGAAAAGAAGAC-3'; 3' 端引物 P4: 5' -CGGGTCGACTCTATTAATTGAAATTACACCGAG-3'. 5' 端引物含有 *EcoR* I 位点, 所以将 PCR 扩增产物 3' 端用 Klenow 酶补平后, 5' 端用 *EcoR* I 酶解, 插入克隆载体 pBluescriptKS(+)的 *Sma* I /*EcoR* I 双酶解位点中得到 pBlueAC2P. 质粒 pBPFQ7 包含有非转译增强序列 Ω 、CaMV 35S 启动子和 *nos* 终止子的基因表达载体. 将 pBlueAC2P 经 *EcoR* I /*Xba* I 双酶解后插入 pBPFQ7 载体中的 *EcoR* I /*Xba* I 双酶解位点中, 得到 pBPFAC2 表达载体. 再将 pBPFAC2 经 *Hind* III 酶解后回收 CaMV 35S 启动子-*ac2-Tnos* 片段并插入 pCPGUS2300 的 *Hind* III 酶解位点中, 得到表达载体 pCPGUS230AC2(图 1).

(v) 棉花及烟草叶片的基因枪轰击、培养及 GUS 活性组织化学染色. 按文献[10]的方法进行基因枪轰击及恢复培养. GUS 活性测定及组织化学染色按 Jefferson^[11]的方法进行, 将转化叶片整体染色或徒手切片后固定, 以 70%乙醇脱色, 用 Olympus 显微镜和解剖镜进行观察照相.

(vi) 烟草转化及再生植株的筛选、PCR 检测. 按文献[12]的方法进行烟草转化及再生植株的筛选. 对卡那霉素抗性植株进行基因组 DNA 的提取^[7], 最终将 DNA 溶解于 TE 缓冲液中. 以提取的总 DNA 为模板, 进行 *gus* 基因部分片段的 PCR 扩增, 引物为 P1, P2. 5' 端引物 P1: 5' -CTGCGACGCTCACACCGATACC-3'; 3' 端引物 P2: 5' -TCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3'. 反应条件参照文献[7].

2 结果

2.1 *cp* 启动子的表达活性

以烟草品种 NC89 作为受体品种, 通过农杆菌介导的叶盘法转化方式, 用质粒 pCPGUS2300(图 1)转化烟草, 获得了卡那霉素抗性植株. 以 CaMV 35S 启动子为阳性对照, 测定抗性植株的 GUS 活性, 比较了 CLCuV *cp* 启动子与 CaMV 35S 启动子在寄主细胞中的表达活性, 如图 2 所示, CLCuV *cp* 启动子转化的 NC89 植株中, 绝大多数 GUS 活性较低, 最高

1) 刘玉乐. 双生病毒的分子生物学. 中国科学院微生物研究所博士论文. 1997

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2000-45-10-1062>

图1 表达载体的构建

图 2 CLCuV *cp* 启动子与 CaMV 35S 启动子驱动的 *gus* 基因表达活性比较
CLCuV CP: *gus*——pCPGUS2300 转化植株, CaMV 35S: *gus*——pBI121 转化植株, CK——未转化植株

的也未达到 CaMV 35S 启动子的平均水平.

2.2 *cp* 启动子的瞬时表达及其与 *rp* 启动子的比较

瞬时表达研究表明, 单独的 CLCuV *cp* 启动子在其天然寄主植物棉花的叶片组织中有微弱的活性(图版 I -1 蓝色斑点所示, 附本刊后, 下同), 但未发现蓝色斑点限于叶脉维管组织的现象, 暗示该启动子不是韧皮部特异表达的启动子. 被 AC2 激活的 *cp* 启动子则在烟草和棉花的叶肉及维管组织均有较强活性(图版 I -2, 3), 类似于 *rp* 启动子的表达方式(图版 I -4), 但表达强度远远低于 *rp* 启动子.

2.3 *cp* 启动子在转基因烟草中的稳定表达

分别采用两种烟草品种 NC89 和 Xanthi 作为受体品种, 通过农杆菌介导的叶盘法转化方式, 将质粒 pCPGUS2300 转化烟草, 同时采用 pRPGUS2300 及 PBI121 作为对照, 这两种质粒分别含有 CLCuV *rp-gus-Tnos* 及 CaMV 35S-*gus-Tnos* 的表达结构. 对获得的卡那霉素抗性植株 PCR 检测结果(图 3)初步表明, *gus* 基因已整合于基因组中. 对 GUS 检测呈阳性的转化植株(NC89 和 Xanthi)进行组织化学定位, 发现尽管两种烟草品种 NC89 和 Xanthi 转化植株个体间 GUS 染色程度存在差异, 但绝大多数 *cp* 启动子转化

图 3 转基因植株的 PCR 检测
M——pGEM7Z/*Hae* III 分子量标准, 1~5——转化植株, 6——阳性质粒 pCPGUS2300, 7——未转化植株, 箭头示 PCR 扩增的 *gus* 基因片段

图 3 转基因植株的 PCR 检测

M——pGEM7Z/*Hae* III 分子量标准, 1~5——转化植株, 6——阳性质粒 pCPGUS2300, 7——未转化植株, 箭头示 PCR 扩增的 *gus* 基因片段

植株叶片组织的表达方式类似于 *rp* 启动子和 CaMV 35S 启动子, 在叶脉维管束及叶肉细胞均有较高的活性(图版 II -1~4). 对大部分 *cp* 启动子转化植株的分析表明, GUS 活性不仅存在于茎部的内、外韧皮部, 木质部周围的薄壁细胞也显示 GUS 活性(图版 II -5, 6). 根部染色结果表明, *cp* 启动子在根尖及根中部均有活性, 但根尖的活性最强, 尤其是分生组织(图版 II -7). 根中部细胞分裂较迅速, 欲分化产生侧根的组织也具有较强的活性(图版 II -9), 暗示 *cp* 启动子可能与细胞分裂有关. *rp* 启动子则在根尖、维管束及薄壁细胞都具有非常强的活性(图版 II -8,10).

3 讨论

研究证实, TGMV *cp* 启动子的表达方式较为复杂. 单独的 *cp* 启动子仅在叶片的韧皮部表达, 叶肉和其他类型的细胞中没有发现启动子的活性; AC2 激活的 *cp* 启动子则在叶肉和韧皮部均表达^[4]. *cp* 启动子的表达活性还受发育调控, 其表达活性在转基因二代幼苗发芽后 14 d 才开始出现. *cp* 启动子受 AC2 因子的调控机制因不同器官而异. AC2 在韧皮部通过激活机制提高 *cp* 启动子的表达活性, 在叶肉细胞则通过解除转录抑制来提高 *cp* 启动子的表达活性. 本文通过转基因研究发现, 单独的 CLCuV *cp* 启动子表达活性较低, 在叶肉及维管组织均有表达活性; 推测 CLCuV 的 *cp* 启动子的调控机制可能与 TGMV 有所不同. 我们还发现, AC2 激活的 *cp* 启动子在叶肉及维管组织均有瞬时表达活性, 然而在转基因植株中没有检测到稳定表达的活性, 与 Hong 等人^[5]的结果相似. 虽然 Needham 等人^[6]得到了 TYDV 病毒为载体的 *cp* 启动子控制的 *gus* 基因转化植株, 但 GUS 染色呈现不规则的斑点状, 不能真实反映 *cp* 启动子的组织化学定位.

双生病毒启动子间的序列存在较大差异^[1], 但对于其功能上的差异尚不清楚. 目前已发现, 不同双生病毒间 *rp* 启动子的组织化学定位有所不同. 玉米条纹病毒(MSV)的 *rp* 启动子在转基因水稻维管组织特异表达^[13], 而 CLCuV 的 *rp* 启动子则在叶肉及维管组织中均有表达^[8, 9]. *cp* 启动子的组织化学定位结果也有所不同, 如 TGMV 的 *cp* 启动子在韧皮部特异表达^[4]; 本文却发现, CLCuV 的 *cp* 启动子不局限于韧皮部表达. 不同双生病毒的 *cp* 启动子在植物中组织化学定位的不同可能与病毒本身的进化机制有关, 但关键因素可能还在于启动子顺式元件的差异. 我们正在进行 CLCuV *cp* 启动子的缺失分析, 以期找到与组织定位有关的元件及负调控元件, 通过修饰改造 CLCuV *cp* 启动子元件达到提高该启动子表达活性的目的, 使之在基因工程中具有更高的应用价值.

致谢 在显微拍摄过程中得到中国科学院遗传研究所李家洋研究员及牟中林博士的热忱帮助. 本工作为国家自然科学基金(批准号:39989001, 39880023)、国家“八六三”高技术计划基金(批准号: Z-17-01-01, BH-02-01-01)、中国科学院重大项目基金(批准号: KY951-A1-302-12-08)、国家转基因植物研究与产业化开发专项基金(ZJY-A-07)资助项目.

参 考 文 献

- 1 谢迎秋, 朱 祯. 植物双生病毒的复制及转录调控研究进展. 病毒学报, 1999, 15: 377~386
- 2 Zhan X, Haley A, Richardson K, et al. Analysis of the potential promoter sequence of African cassava mosaic virus by transient expression of the β -glucuronidase gene. J Gen Virol, 1991, 72: 2849~2852
- 3 Sunter G, Bisaro D M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. Virology, 1991, 180: 416~419

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2000-45-10-1062>

- 4 Sunter G, Bisaro D M. Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein(TrAP): evidence for activation and depression mechanisms. *Virology*, 1997, 232: 269~280
- 5 Hong Y, Saunder K, Hartley M R, et al. Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of dianthin in transgenic plants. *Virology*, 1996, 220: 119~127
- 6 Needham P D, Atkinson R G, Morris B A M, et al. GUS expression patterns from a tobacco yellow dwarf virus-based episomal vector. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 631~639
- 7 Harrison B D, Liu Y L, Khalid S, et al. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Ann Appl Biol*, 1997, 130: 61~75
- 8 谢迎秋, 朱 祯, 刘玉乐, 等. 一种强启动子的分离与功能. *植物学报*, 2000, 42: 50~54
- 9 谢迎秋, 朱 祯, 刘玉乐, 等. 部分缺失的棉花曲叶病毒互补链启动子具有强活性. *高技术通讯*, 2000, 10(4): 13~17
- 10 任延国, 于小兰, 山 松, 等. 水稻 *psbA* 启动子诱导的 GUS 基因在烟草叶绿体中的瞬间表达. *农业生物技术学报*, 1995, 3: 78~83
- 11 Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5: 387~405
- 12 刘春明, 朱 祯, 周兆斓, 等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂抗虫转基因烟草的获得. *科学通报*, 1992, 37: 405~411
- 13 Legavre T, Guiderdoni E, Peterschmit M, et al. Leftward transcriptional activity of the maize streak virus promoter: vascular tissue specificity in transgenic rice. In: Dean J F D, ed. *Book of Abstracts: 5th International Congress of Plant Molecular Biology*. Singapore: Kluwer Academic Publishers, 1997. 9

(1999-10-21 收稿, 2000-02-16 收修改稿)

CLCuV 启动子驱动的 *gus* 基因在烟草及棉花中的瞬时表达

通过基因枪将质粒 pCPGUS(1)、pCPGUS230AC2 (2)轰击棉花叶片后 3 d *gus* 基因表达，pCPGUS230AC2

(3)、pRPGUS (4)轰击烟草叶片后 3 d *gus* 基因表达. $\times 12$

CLCuV *cp* 及 *rp* 启动子驱动的 *gus* 基因表达比较

1. *cp* 启动子转化植株的叶片横截面，示维管束及叶肉组织；2. *rp* 启动子转化植株的叶片横截面；3. *cp* 启动子转化植株的叶片，示叶肉组织；4. *rp* 启动子转化植株的叶片；5. *cp* 启动子转化植株的茎横截面；6. *rp* 启动子转化植株的茎横截面，示内、外韧皮部及薄壁细胞中的 GUS 染色；7. *cp* 启动子转化植株的根，示根尖 GUS 染色；8. *rp* 启动子转化植株的根，示根尖 GUS 染色；9. *cp* 启动子转化植株的根，示 GUS 染色；10. *rp* 启动子转化植株的根，示 GUS 染色。l 示叶片，ph 示韧皮部，op 示外韧皮部，ip 示内韧皮部，py 示薄壁细胞，rt 示根尖