双生病毒在生物技术中的应用

杨秋颖, 杨秀玲, 丁波, 周雪平*

中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

* 联系人, E-mail: zzhou@zju.edu.cn; xpzhou@ippcaas.cn

收稿日期: 2015-12-08; 接受日期: 2016-02-24; 网络版发表日期: 2016-05-25

国家自然科学基金(批准号: 31390422)资助

摘要 双生病毒是一类世界范围广泛发生的植物单链 DNA 病毒, 其致病危害严重, 是作物病害防控的重要对象。但同时, 双生病毒具有快速侵染、增殖、转录、表达而不整合入植物基因组的特点, 使之成为有广阔发展前景的高效病毒表达载体。本文概括介绍了双生病毒结构和双生病毒载体发展历史, 详细归类了双生病毒载体的具体构建方式和应用条件, 讨论了双生病毒载体在生物技术应用中的优势, 并简要介绍了双生病毒启动子的组织特异性表达特性, 为进一步利用双生病毒载体提供了相关背景知识。

关键词 双生病毒, 双生病毒载体, 蛋白表达, VIGS, 基因编辑, 启动子

病毒是一类微小的感染性粒子, 作为寄生在寄主细胞内的可遗传的核酸物质, 其具有独立的编码体系, 以最精简的方式编码自身传播与扩增所需要的调控与复制因子, 并最大可能地利用寄主细胞的生物反应体系资源, 进行高效复制扩增^[1,2]。病毒粒子由核心遗传物质核酸和包装核酸的衣壳蛋白组成, 一些病毒还具有磷脂类包裹在衣壳外的囊膜结构^[3~5]。病毒粒子的简单微型结构和扩增能力使其具有了良好的生物工程微载体的特性。目前病毒载体已经在微囊膜包被药物和基因工程中广泛应用, 人们对其研究涉及生物技术、纳米结构和生物医学等多学科的交叉^[6~11]。

1 双生病毒的结构和特性

双生病毒科(Geminiviridae)有 200 余种病毒, 是

植物病毒类群中最的一类。双生病毒(Geminivirus)的寄主范围广阔, 包括多种单子叶及双子叶植物^[12]。双生病毒最初主要分布在热带和亚热带地区, 由于近年来国际贸易交流的增加和全球气候变暖, 导致双生病毒及其媒介昆虫的广泛爆发流行, 危害多种重要粮食作物和经济作物, 引起世界各国的重视并促进了相关基础研究的快速发展^[12,13]。双生病毒粒子具有特殊的不完整双二十面体的衣壳结构(图 1A)^[14,15]。衣壳蛋白(coat protein, CP)由单基因编码, 不同种类病毒的衣壳蛋白分子结构不同, 决定了它们以各自特定的方式进行病毒基因组包装, 形成各种固定模式的双二十面体结构。作为一类单链环状的 DNA 病毒, 双生病毒的环状核酸复制单元包装在衣壳内, 并依据所含有复制单元的数量分为单组分双生病毒和双组分双生病毒两大类。以双生病毒中

引用格式: 杨秋颖, 杨秀玲, 丁波, 等. 双生病毒在生物技术中的应用. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 524-534

Yang Q Y, Yang X L, Ding B, et al. The application of geminiviruses in biotechnology. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 524-534, doi: 10.1360/N052015-00091

图 1 双生病毒的结构

A: 双生病毒衣壳的双二十面体结构示意图; B: 单组分双生病毒的基因组 DNA 和 β -卫星与 α -卫星 DNA 的结构和编码基因的分布; C: 双组分双生病毒的基因组 DNA-A 和 DNA-B 的结构和编码基因的分布. (图中单、双组分双生病毒的结构和编码基因分布以 Begomoviruses 为例)

种类最多的菜豆(*Phaseolus vulgaris*)金色花叶病毒属(*Begomovirus*)为例, 单组分病毒含有一个 2.5~2.8 kb 的主要环状 DNA(图 1B), 而双组分双生病毒含有两个大小相近, 各约为 2.5~2.8 kb 的 DNA-A 和 DNA-B(图 1C). 单组分双生病毒 DNA 和双组分双生病毒 DNA-A 的病毒链主要编码具有病毒粒子包装功能的衣壳蛋白(CP/AV1/V1)和衣壳蛋白前的编码蛋白 V2; 而互补链主要编码复制相关蛋白(Rep/AC1/C1)、转录激活蛋白(TrAP/AC2/C2)和复制增强蛋白(REN/AC3/C3), 在病毒 DNA 复制、转录过程中起关键作用. 双组分双生病毒的 DNA-B 则编码运动蛋白(BC1/MP)和核穿梭蛋白(BV1/NSP)(图 1B 和 C). 有些单组分双生病毒除病毒 DNA 编码病毒生命周期所需的几种主要蛋白外, 还常伴随有卫星 DNA, 如 α -卫星(α satellite, 也曾称 DNA1)和 β -卫星(β satellite, 曾称 DNA β)(图 1B)^[16]. 双生病毒的基因组 DNA 和卫星 DNA 上都具有供病毒复制起始蛋白(Rep)结合并启动复制的结构. 在植物细胞内, 这些病毒 DNA 以双链的形式进行滚环复制(rolling-circle

replication, RCR)^[17]. 单组分双生病毒的 DNA 复制起始茎环结构位于一个 200~300 bp 的基因间区域(intergenic region, IR); 在双组分病毒中, 类似的区域被称为共同区域(common region, CR), 并在 DNA-A 和 DNA-B 中高度同源; 在卫星 DNA 中, 卫星保守区(satellite conserved region, SCR)和富含 A 区(A-rich region)负责卫星 DNA 的起始^[14]. 这些特殊的二级结构与病毒编码的负责复制起始、转录、包装、运动的蛋白, 共同组成了病毒精简而高效的扩增体系(图 1). 同时, 双生病毒的 IR 区还具有启动子的功能, 能够双向启动病毒链(正义链)和互补链(反义链)上基因的表达.

病毒可以侵入寄主细胞体内, 来表达病毒基因组上的编码序列, 是自然界中发生的基因传递体系. 因此, 模拟病毒感染过程, 开发病毒载体, 构成了病毒学和基因工程研究的重要组成部分. 基于对双生病毒基因组结构和功能的充分了解, 研究者们将其改造为各种基因工程载体并广泛应用于基因沉默、蛋白表达等方面, 以对植物基因功能进行研究、实践于作物改良和外源蛋白的生产.

2 双生病毒载体的基本构建方式

将外源核酸片段连接在病毒基因组上, 可以在寄主体内进行外源基因片段的复制扩增. 在植物中, 研究者们采取了农杆菌 Ti-质粒介导的病毒基因组向植物转移的手段. 根据线性串联重复病毒 DNA 序列在病毒 Rep 蛋白参与的复制扩增的条件下, 能够重组形成仅含有一个完整环状病毒基因组的单元进行 RCR 复制的特性, 将两个串联重复病毒基因组单元构建入 Ti-质粒的左右边界内, 这样的 Ti-病毒载体经农杆菌浸染植物后, 串联重复病毒单元在复制过程中发生内部重组, 产生环状游离病毒单元, 并以完整病毒的形式继续大量复制和转录, 达到类似病毒感染的效果(图 2)^[18]. 在农杆菌介导的病毒复制单元转染方法发明之后, 构建部分编码序列缺失的病毒载体, 研究病毒编码基因的策略得到了充分的发展. 在对病毒编码序列了解的基础上, 将外源基因片段设计在不干扰病毒基因表达的位置, 或替换不影响病毒基本复制的编码基因, 以达到不同的载体构建目的. 农杆菌介导的双生病毒侵染性克隆载体系统的建立是植物病毒载体研究的一个重大突破, 并且被

图2 农杆菌介导的植物寄主基因组整合病毒载体的线性结构示意图

以单组分双生病毒的主要环状DNA为例, Rep启动复制并形成游离环状病毒载体以RCR方式大量扩增, 提供大量外源基因模板

广泛应用^[18,19]。

双生病毒的DNA/DNA-A能够自主复制, 而DNA-B和多数卫星组分都需要DNA/DNA-A提供的Rep蛋白来支持其复制。因此, 在DNA-B或卫星DNA作为载体时需要辅助病毒DNA/DNA-A的共转化。另外, α -Rep虽然支持 α -卫星DNA的自我复制, 但 α -卫星的细胞间移动和系统侵染还需要辅助病毒编码的蛋白; 并且 α -卫星的存在还总是伴随病毒DNA和 β -卫星^[20]。从而, 含有DNA/DNA-A、DNA-B和卫星DNA的复合病毒载体可以由不同的Ti-质粒构建, 然后用含有不同Ti-病毒载体的农杆菌共同浸染植株以进行转化; 或将几个线性病毒载体串联构建在一个Ti-质粒的左右边界之间, 进行转化。

3 常见的双生病毒载体应用

3.1 蛋白表达载体

植物病毒载体的应用为大规模基因工程蛋白的表达提供了有效的平台。长期以来, 外源重组蛋白的表达一般由大肠杆菌、酵母、昆虫或动物培养细胞来进行。植物虽然是最经济的自养生物反应器, 但转基因植物法规条例复杂、转化过程漫长, 转基因植物与其他蛋白表达体系相比优势不显著。农杆菌介导的植物病毒载体技术的快速浸染和大量瞬时表达的特性使农作物有了成为表达常规小分子蛋白的反应器, 并形成规模化“分子农业”(molecular pharming)的可能。同时, 基因过表达也是研究基因功能、改良植物性状的重要方法。双生病毒载体的高拷贝复制能力

为大规模蛋白表达提供了充足的DNA模板支撑, 因此适用于非基因组整合的外源编码序列表达, 即规避了整合方式转化时外源毒性基因对生长期植物的毒害, 又不产生干扰自然界物种资源的稳定转基因植物, 是理想的生物工程载体选择。

对外源蛋白病毒表达载体的探索最早开始于以烟草花叶病毒为载体的氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyl transferase, CAT)合成的研究^[21], 随后, 双生病毒蛋白表达载体——非洲木薯花叶病毒(African cassava mosaic virus, ACMV)载体也有效地用于了CAT蛋白^[22]的表达, 从此双生病毒蛋白表达载体的开发与应用迅速发展。常用于双生病毒载体构建的病毒有: 菜豆黄矮病毒(bean yellow dwarf virus, BeYDV)、甜菜曲顶病毒(beet curly top virus, BCTV)和烟草黄矮病毒(tomato yellow dwarf virus, TYDV)、小麦矮化病毒(wheat dwarf virus, WDV)和玉米条纹病毒(maize streak virus, MSV)等^[23]。双生病毒表达载体除了表达Gus, GFP等报告基因以对载体的功效进行测试, 现已应用在生物医药的生物酶表达、抗原表达、抗体制备等许多方面, 如高表达的BeYDV载体在用于本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)中抗埃博拉病毒单克隆抗体的轻链和重链的生产时, 能够从每百克植物新鲜叶片中得到0.5 mg抗体蛋白, 并且不同复制子编码的轻链与重链能够在植物体内正确组装成有抗原结合活力的四聚复合体分子^[24]。与最初利用转基因植物生产单克隆抗体^[25]的方法相比, BeYDV载体介导的外源蛋白表达由不断复制的游离状态病毒单元承载, 无需转基因后漫长地等待阳性再生苗的形成和高表达稳定整合植株的筛选, 因此导入病毒复制子十几天后即可收获含有大量外源蛋白的植物材料, 效率远高于传统的转基因。由于这些优势, 双生病毒载体也用于了工业化胰酶蛋白(trypsinogen)、玻璃体黏连蛋白(vitronectin)、抗乙肝病毒、人免疫缺陷病毒和人乳头瘤病毒抗原的生产^[23,26-28]。此外, 双生病毒载体还用于基因编辑酶的表达以进行植物基因组编辑(详见本文关于基因编辑载体的介绍)。具体双生病毒蛋白表达载体应用举例见表1。

3.2 基因沉默载体

病毒诱导的基因沉默是病毒入侵时引发寄主核酸防御机制对病毒序列沉默的表现^[43]。现在认为, 病

表 1 已报道的双生病毒蛋白表达载体及其应用

双生病毒名称	寄主植物	表达基因	参考文献
African cassava mosaic virus (ACMV)	<i>Cassava</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	CAT	[28]
Ageratum yellow vein virus (AYVV)	<i>N. benthamiana</i> , <i>N. tabacum</i>	Gus	[29]
Beet curly top virus (BCTV)	<i>N. benthamiana</i> <i>N. benthamiana</i>	HAV VP1-Fc, GFP GFP	[30] [31]
Bean yellow dwarf virus (BeYDV)	<i>N. benthamiana</i> <i>N. benthamiana</i> <i>N. benthamiana</i> <i>N. tabacum</i> <i>N. tabacum</i> <i>N. tabacum</i> , <i>Solanum tuberosum</i>	6D8 H2-GPI, mAb 6D8 light chain 6D8 H2-GPI, mAb 6D8 light chain, GFP, DsRed HPV-16-CP L1, p24 Gus, GFP Gus, GFP NVCP, GFP	[32] [24] [28,33] [34] [35] [36]
Maize streak virus (MSV)	<i>Zea mays</i> <i>Z. mays</i>	NPT II, Gus Bar	[37] [38]
Tomato golden mosaic virus (TGMV)	<i>N. tabacum</i> <i>N. tabacum</i>	Gus, NPT Endostatin, Gus	[39] [40]
Tobacco yellow dwarf virus (TYDV)	<i>N. tabacum</i>	Gus, Human vitronectin, Bovine trypsin, Trypsinogen, Barnase 14, TMV RdRp fragment, p19	[26,41]
Wheat dwarf virus (WDV)	<i>Triticum monococcum</i>	NPT, CAT, β -galactosidase, Npt, CA	[42]

毒在复制转录过程中产生了单链的异常 RNA (aberrant RNA, aRNA), aRNA 被依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA dependent-RNA polymerase, RDRP) 识别, 形成双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)^[44,45]. Dicer 与 AGO 蛋白组装的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 剪切双链 RNA, 形成成熟的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 并引导 siRNA 与同源 mRNA 序列或基因组 DNA 序列匹配, 分别在转录后水平 (post transcriptome gene silencing, PTGS) 和转录水平 (transcriptome gene silencing, TGS) 沉默病毒基因. 当植物基因的同源序列嵌入病毒基因组中, 并借助病毒进入寄主植物扩增转录时, 也引起对植物同源基因的沉默作用. 基于 siRNA 的 (siRNA-based virus-induced gene silencing, SIR-VIGS) 的原理, 研究者开发出双生病毒的 VIGS 载体, 广泛应用于植物功能基因的研究^[43,46]. 例如, 棉花皱叶病毒 (cotton leaf crumple virus, CLCrV) 载体对 *CHLI* (magnesium chelatase subunit 1) 基因的沉默适用于棉花叶绿素合成的研究^[47]. SIR-VIGS 载体构建所需要的同源序列不长, 一般选取 200~350 bp 左右, 开发设计简洁^[48]. 结合农杆菌介导的快速浸染, 再辅以双生病毒的系统运动能力和小 RNA 的扩散能力, 能够形成良好的全植株沉默效应.

除了上述以同源序列方式构建的 SIR-VIGS 载体外, 研究者还开发了以反向重复序列为基础的 SIR-VIGS 载体^[35]. 反向重复序列在转录后可形成双链发夹结构, 不需要 RDRP 的作用直接生成 siRNA 的前体 dsRNA, 这种载体虽然构建略显复杂, 但可能具有更强的沉默效果^[49].

除了 SIR-VIGS 外, 研究者还开发出一种以 miRNA (microRNA) 为基础的 VIGS (miRNA-based VIGS, MR-VIGS 或 MIGS) 作为新的沉默载体构建方式. miRNA 是真核生物特定基因编码的调控靶基因表达的小 RNA 序列. MR-VIGS 是利用构建在病毒载体上的人工 miRNA 表达单元, 经由植物体内的转录和 miRNA 成熟过程, 沉默植物体内具有互补序列的 mRNA 的表达调控方式^[47,50,51]. 与 SIR-VIGS 相比, MR-VIGS 的靶序列更加特异, 减少了对非靶基因的沉默, 但其具体沉默效果受人工设计的 miRNA 序列的影响较大, 需要根据数据库资源与计算统计生物学设计多个候选人工 miRNA 序列, 并通过具体生物学试验筛选最优沉默序列. 在植物中, 一些 mRNA 被 miRNA 切割后的产物能通过 RDRP 合成 tasiRNA (trans-acting siRNA) 来放大沉默信号. 由此, 研究者在 MR-VIGS 的基础上, 近两年进一步发展了以 tasiRNA 机制放大沉默信号的 MIGS 载体的设计, 得到更有效的沉默作用^[52,53].

双生病毒的 VIGS 载体充分利用了双生病毒载体快速复制外源小片段的优势, 并且双生病毒的各个环状 DNA 组分, 都是可利用的载体改造的重要基础结构, 便于设计成多种双生病毒载体. 例如, 中国番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV)的 β -卫星载体用于沉默番茄叶绿素合成基因时, 沉默可以在植物各生长周期、各组织器官引发, 并且沉默效果可以持续植物整个生命周期而不表现明显病毒症状^[54]; 烟草曲茎病毒(tobacco curly shoot virus, TCSV)的 α -卫星载体用于沉默烟草抗病毒基因 *NtEDS1* 时效率比其他病毒组分载体更高^[55]. 表 2 概括地总结了各种双生病毒 VIGS 载体的应用,

对双生病毒 VIGS 载体进行了归类, 并列举了这些载体在不同模式植物或作物中的应用.

3.3 抑制 miRNA 沉默的吸收载体

病毒载体除了可以过量表达 miRNA, 用于 MIGS, 还可以用于抵抗 miRNA 沉默. 植物中 miRNA 吸收又称为小串联重复靶位点模拟 (small tandem target mimic, STTM), 是将 miRNA 的互补序列串联排布, 在植物中过量表达, 用以吸收植物体内的 miRNA, 从而影响植物基因表达调控的技术^[47,67,68]. 棉花中双生病毒 miRNA 吸收载体的构建利用了双生病毒载体无需永久转基因并且高表达的特性, 成功

表 2 双生病毒沉默载体^{a)}

沉默载体	病毒组分	双生病毒名称	病毒基因组结构	替换蛋白	寄主植物	沉默基因	参考文献
SIR -VIGS	DNA-A	Abutilon mosaic virus (AbMV)	Bipartite	CP	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>NbPDS</i>	[56]
		African cassava mosaic virus (ACMV)	Bipartite	CP	<i>Cassava, N.tabacum</i>	<i>PDS, Su, CYP79D2, CYP79D1</i>	[57]
		Cabbage leaf curl virus (CaLCuV)	Bipartite	CP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ChlI, Su</i>	[58]
		Cabbage leaf curl virus (CbLCV)	Bipartite	CP	<i>Arabidopsis</i>	<i>GFP, CH42, PDS</i>	[59]
		Cotton leaf crumple virus (CLCrV)	Bipartite	CP	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>ChlI, PDS</i>	[60]
		Cotton leaf crumple virus (CLCrV)	Bipartite	CP	<i>G.hirsutum, G. barbadense</i>	<i>ChlI, EF-1a, Bt</i>	[47]
		Tomato golden mosaic virus (TGMV)	Bipartite	CP*	<i>N.benthamiana</i>	<i>Su</i>	[61]
		Tomato golden mosaic virus (TGMV)	Bipartite	CP	<i>N.benthamiana</i>	<i>Su, Luc</i>	[62]
	DNA-B	Cabbage leaf curl virus (CbLCV)	Bipartite	BR1	<i>Arabidopsis</i>	<i>CH42</i>	[59]
		Tomato golden mosaic virus (TGMV)	Bipartite	BR1	<i>N.benthamiana</i>	<i>NbRBR1, Su</i>	[63]
		Tomato golden mosaic virus (TGMV)	Bipartite	BR1*	<i>N.benthamiana</i>	<i>Su, PCNA, GFP</i>	[61]
	α -satellite	Tobacco curly shoot virus (TbCSV)	Monopartite	Rep ¹	<i>N.benthamiana</i>	<i>NbTOM1, NBTOM3</i>	[64]
		Tobacco curly shoot virus (TbCSV)	Monopartite	Rep*	<i>N.tabacum</i>	<i>Gus,Su, NtEDS1</i>	[55]
	β -satellite	Bhendi yellow vein mosaic virus (BYVMV)	Monopartite	β C1**	<i>N.benthamiana</i>	<i>GFP, PDS, PCNA, AGO1</i>	[65]
		Cotton leaf curl Multan virus (CLCuM)	Monopartite	β C1	<i>N.tabacum, N.benthamiana, S.lycopersicum, A.thaliana, G.hirsutum</i>	<i>Su, UidA</i>	[66]
		Tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV)	Monopartite	β C1	Tomato	<i>ChlI</i>	[54]
		Tomato yellow leaf curl China virus isolate -Y10 (TYLCCNV-Y10)	Monopartite	β C1	<i>N.benthamiana</i>	<i>PCNA, PDS, SU, GFP</i>	[46]
MIGS	DNA-A	Cabbage leaf curl virus (CaLCuV)	Bipartite	Cp	<i>N.benthamiana</i>	<i>PDS, Su, CLAI1, SGT1</i>	[50,51]
		Cotton leaf crumple virus (CLCrV)	Bipartite	CP	<i>G.hirsutum, G.barbadense</i>	<i>ChlI</i>	[47]

a) *: 在病毒基因下游以不破坏编码框的方式插入病毒载体; **: 在保留 β C1 启动子的同时替换 β C1 基因

地对棉花中重要发育调控小 RNA——mir165 的含量进行了削减, 为多拷贝大基因组作物在 miRNA 表达水平的改良提供了技术支撑^[47].

3.4 基因编辑载体

基因编辑(genome editing)是以基因工程核酸内切酶在设计靶点识别并切割基因组序列的基因组定点改造方式. 基因编辑以非同源重组末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)产生小范围碱基缺失而导致基因敲除, 或以同源重组来进行准确的大区段的基因替换或缺失. 基因编辑常用的几种工程内切酶是锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)^[69]、转录激活效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)^[70,71]和 CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced palindromic repeats/Cas9)基因编辑器^[72,73]. 在靶位点的识别方式上, ZFN 和 TALEN 依靠蛋白结构识别特定 DNA 序列, 而 CRISPR/Cas 系统的 Cas9 核酸酶依靠 20 个碱基左右的 RNA 序列与互补基因组序列匹配识别. 在识别结构的设计复杂度上, ZFN 的编码单元最小但设计复杂; TALEN 比较大但设计相对简单; 而 CRISPR/Cas9 系统的 Cas9 编码区最大, 但互补碱基序列设计最简单. 这 3 种基因编辑方式各有优点, 都是高效基因编辑的选择. 由于 CRISPR/Cas9 系统的编辑效率与精准度高, 载体设计构建简单, CRISPR/Cas9 是目前最受瞩目并迅速推广应用的编辑系统^[74]. 利用农杆菌 Ti-质粒载体表达基因编辑体系的技术已经日趋成熟, 工程内切酶在改造位点不引入外源筛选基因和工程内切酶基因, 但所产生的转基因植株还需要通过回交来分离筛选不含有外源筛选基因和工程内切酶基因的后代植株. 而病毒载体在非基因组整合的情况下表达编辑酶, 利用病毒载体进行植物组编辑可以免去耗时的外源基因分离程序, 因此近年来研究者加强了对基因编辑病毒载体的改造, 使得基因编辑后的作物不受转基因条例的约束, 提高了新品种的应用范围.

Baltes 等人^[75]以双生病毒科的 BeYDV 为载体, 全面探索系统评价了 ZFN, TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑方法和效果. 其中, 有关 CRISPR/Cas9 系统的探索是植物病毒载体方面开创性的工作, 但可能是由于双生病毒载体进行 Cas9 大基因扩增和表达的效率不高, 病毒载体 CRISPR/Cas9 系统的基

因编辑效率还远低于其他两种方式, 使之难以应用于实际生产. 另一项 CRISPR/Cas9 双生病毒载体的探索工作是在甘蓝(*Brassica oleracea*)曲叶病毒(cabbage leaf curl virus, CaLCuV)中进行的^[51]. 其中病毒载体携带 gRNA 单元, 而 Cas9 由农杆菌永久转化的基因工程烟草提供^[76]. 这样的表达组合, 使得转基因植物 Cas9 的表达与 CaLCuV-sgRNA 载体组合产生的基因编辑效果明显高于完全由双生病毒载体表达的 CRISPR/Cas9 系统. 但是这个方法在工程植物中引入了 Cas9 的过表达背景, 失去了病毒载体瞬时表达 Cas9, 而不将其引入被编辑植物的优势. 因此, 现有的双生病毒载体 CRISPR/Cas9 系统还有待进一步改进优化.

4 双生病毒启动子与载体启动子的应用

启动子是指能被转录因子识别与结合的特定的碱基序列. 转录因子与启动子的复合体引导 RNA 聚合酶的停靠与活化, 调控 mRNA 的转录起始. 除部分持家基因受组成型启动子调控, 进行组成型稳定表达外, 大部分基因的启动子都具有组织和时空特异性的转录调控功能, 以适应植物生长发育的需要. 双生病毒作为植物细胞内的寄生核酸, 为了适应植物的体内环境, 其启动子也多表现为组织和时空表达的特性, 并受环境因素影响. 对病毒启动子的研究, 不但可以解析病毒基因表达的调控方式, 同时也为基因工程开发遴选适用于不同需要的启动子.

双生病毒 DNA 的启动子主要位于复制起始区. 病毒 DNA/DNA-A, DNA-B 的 IR/CR 区的启动子具有双向转录起始功能, 向两侧转录病毒链与互补链编码的转录子, 直至小基因间区域(small intergenic region, SIR)终止. 双生病毒启动子区的研究集中在对玉米线条病毒属和菜豆金色花叶病毒属的研究上. 现已证明小麦矮缩病毒、玉米条纹病毒、番茄曲叶病毒(tomato leaf curl virus, TLCV)、CaLCuV、番茄金色花叶病毒(tomato golden mosaic virus, TGMV)的衣壳蛋白启动子驱动报告基因在韧皮部维管组织表达^[77-81]. 双生病毒 β -卫星编码的 β CI 基因的启动子和增强子序列位于基因编码区上游 1 kb 左右的位置, 一些 β CI 基因启动子表达也位于韧皮部, 如 TYLCCNV β CI 的启动子^[82]和木尔坦棉花曲叶病毒(cotton leaf curl Multan virus, CLCuMV)的 β CI 启动

子^[83]。以上的启动子活性强度有限。对各种启动子活性检测仅发现 CLCuMV 互补链的启动子和布雷瓦拉棉花曲叶病毒(cotton leaf curl Burewala virus, CLCuBV)的启动子有特异的高活性韧皮部表达, 活性高于组成型的 35S 启动子^[84,85]。但是, 在对 CLCuBuV 的启动子活性检测的载体构建中, 构建载体中抗性基因的 35S 启动子与作为被检测启动子的 CLCuBuV 片段紧邻。由于 35S 启动子可以起到增强子的作用^[86], CLCuBuV 片段启动 Gus 表达的活性是否受到了抗性基因 35S 启动子的影响还需要进一步验证。双生病毒启动子集中在韧皮部维管组织表达的现象, 推测是进化上适应病毒维管组织传输的需要。韧皮部特异性表达启动子的研究, 为抗韧皮部寄生虫或病原菌的转基因植物改良提供了精确组织表达的选择。

双生病毒基因的转录虽然由寄主植物提供的转录聚合酶与转录因子来执行, 但病毒自身也编码重要的转录激活调控因子, 如转录激活蛋白(transcription activator protein, TrAP)等^[81,87]。TrAP/AC2 通过与 CP 基因启动子区的 DNA 序列或其他蛋白因子互作, 直接或间接反式激活病毒链的转录; 而 Rep/AC1 与 AC1 启动子区的抑制序列结合, 抑制 AC1 基因自身的转录^[88,89]。双生病毒启动子序列具有植物表达调控元件的特性, 与寄主植物的转录因子、转录聚合酶和病毒编码的转录调控因子相互作用, 调控病毒在植物体内的生命活动。双生病毒启动子的韧皮部表达元件的研究为外源基因在韧皮部表达提供了启动子资源, 结合双生病毒自身编码蛋白的转录调控因子活性和寄主植物转录因子的作用, 为双生病毒启动子在转基因中的应用发展提供了基础。

5 双生病毒载体的优点

双生病毒之所以被应用于多种载体的构建, 是由于其具有以下一些优点: (i) 高效。双生病毒载体在植物体内高拷贝复制, 生成远高于植物基因组多拷贝基因的游离模板单元, 为外源蛋白表达提供了充足的 DNA 模板, 例如, pRIC-p24 病毒载体可以增殖达到 10^3 的拷贝数^[28]。并且由于病毒基因组编码运动蛋白, 促使病毒从接种部位向整个植株扩散从而系统性侵染, 可在侵染植株中得到大量的外源蛋白表达产物, 克服永久转基因植株再生时间长和转化

后嵌合体筛选复杂的问题。(ii) 利于毒性基因的表达。作为瞬时表达体系的双生病毒载体, 避免了持续表达毒性因子对再生植株的影响, 寄主植物能够健康地发育到病毒接种时间点, 以承担瞬时大量外源蛋白表达的任务。同时也避免了致死突变体在转化过程中组成型表达或敲除带来的细胞毒性, 克服了不易得到转化苗的困难。(iii) 针对各种寄主植物, 有多种双生病毒载体选择。双生病毒能够侵染多种单子叶及双子叶植物^[12], 特别是可以侵染再生困难和难以稳定转基因的众多物种, 因此对应多数作物都能找到对应的双生病毒作为构建载体。(iv) 不向子代植物垂直传播。双生病毒在植物细胞核内复制, 但并不整合入植物基因组中。(v) 利用双生病毒对寄主植物的专一性限制病毒载体的随机传播。不同种类的双生病毒有特异的寄主物种选择, 有选择地采用特定的双生病毒, 针对性地构建病毒载体, 可以仅对单一作物进行侵染, 避免病毒载体对同一地域内其他的植物种类造成影响。(vi) 应用简化双生病毒载体可以进一步限制病毒载体的随机传播。简化载体只选择性地保留了必需的编码基因和复制起始必需的 IR 结构区域; 或仅保留了 IR 区, 而将编码其他蛋白的任务由辅助病毒载体或农杆菌介导的植物永久转基因来执行^[19]。这样含有外源片段的病毒载体往往放弃了编码侵染和运动的蛋白, 甚至复制起始蛋白的功能, 从而避免了病毒向自然界的意外传播。

与另一类基因工程常用的 RNA 病毒载体相比, 双生病毒还有作为 DNA 病毒载体: (i) 不用通过体外转录来合成 RNA 病毒链, 比 RNA 载体更稳定, 不易在载体保存过程中降解; (ii) DNA 基因组比 RNA 基因组相对稳定, 突变几率低, 外源表达产物保真性高的优势^[90]。

6 结语和展望

双生病毒载体经过 30 余年的发展, 已经形成了一系列蛋白表达载体和基因沉默载体, 并在此基础上发展了基因编辑载体。利用病毒载体特有的高效、简便, 无需基因组整合即可进行高效表达的应用方式, 不依赖于细胞周期的高拷贝复制和在植物体内扩散移动的能力, 结合特定双生病毒组织特异性启动子、诱导启动子、病毒转录调控蛋白、寄主植物转录调控蛋白的应用, 进行病毒转录产物、表达蛋

白的精确时空调控, 人们已经将双生病毒载体作为高效的生物反应器. 然而, 由于其内部特性如衣壳的结构与复制大小限制导致了外源基因承载力的局限性^[91-93], 双生病毒载体的成熟应用还仅局限在一些特定的领域, 如 VIGS 载体和小分子多肽的表达载体

等方面. 在优化现有的载体体系的基础上, 还需要从基础理论研究上对双生病毒复制转录的限制因素给予突破, 进一步探索提升双生病毒载体的大片段基因承载与转录表达的方法, 开发相应的技术, 使双生病毒载体具有更广阔的分子农业应用空间.

参考文献

- 1 Snyder J C, Bolduc B, Young M J. 40 Years of archaeal virology: expanding viral diversity. *Virology*, 2015, 479–480: 369–378
- 2 Nasir A, Sun F J, Kim K M, et al. Untangling the origin of viruses and their impact on cellular evolution. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1341: 61–74
- 3 Stanley W M, Lauffer M A. Disintegration of tobacco mosaic virus in Urea Solutions. *Science*, 1939, 89: 345–347
- 4 Caspar D L, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1962, 27: 1–24
- 5 Lenard J. Virus envelopes and plasma membranes. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1978, 7: 139–165
- 6 Lomonosoff G P, Evans D J. Applications of plant viruses in bionanotechnology. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 375: 61–87
- 7 Li F, Wang Q. Fabrication of nanoarchitectures templated by virus-based nanoparticles: strategies and applications. *Small*, 2014, 10: 230–245
- 8 Young M, Willits D, Uchida M, et al. Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology. *Annu Rev Phytopathol*, 2008, 46: 361–384
- 9 Hernandez M, Rosas G, Cervantes J, et al. Transgenic plants: a 5-year update on oral antipathogen vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 2014, 13: 1523–1536
- 10 Kim H S, Jeon J H, Lee K J, et al. N-glycosylation modification of plant-derived virus-like particles: an application in vaccines. *Biomed Res Int*, 2014, doi: 10.1155/2014/249519
- 11 Hastie E, Samulski R J. Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success—a personal perspective. *Hum Gene Ther*, 2015, 26: 257–265
- 12 Moffat A S. Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science*, 1999, 286: 1835
- 13 Mansoor S, Zafar Y, Briddon R W. Geminivirus disease complexes: the threat is spreading. *Trends Plant Sci*, 2006, 11: 209–212
- 14 Zhou X. Advances in understanding begomovirus satellites. *Annu Rev Phytopathol*, 2013, 51: 357–381
- 15 Brown J K, Fauquet C M, Briddon R W, et al. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Associated Press, Elsevier Inc.; London, UK: 2012. pp. 351–373.
- 16 Fondong V N. Geminivirus protein structure and function. *Mol Plant Pathol*, 2013, 14: 635–649
- 17 Rizvi I, Choudhury N R, Tuteja N. Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. *Arch Virol*, 2015, 160: 375–387
- 18 Grimsley N, Hohn B, Hohn T, et al. “Agroinfection” an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 3282–3286
- 19 Peyret H, Lomonosoff G P. When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 1121–1135
- 20 Mansoor S, Briddon R W, Zafar Y, et al. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 128–134
- 21 Takamatsu N, Ishikawa M, Meshi T, et al. Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. *EMBO J*, 1987, 6: 307–311
- 22 Ward A, Etesami P, Stanley J. Expression of a bacterial gene in plants mediated by infectious geminivirus DNA. *EMBO J*, 1988, 7: 1583–1587
- 23 Chen Q, He J, Phoolcharoen W, et al. Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants. *Hum Vaccin*, 2011, 7: 331–338
- 24 Huang Z, Phoolcharoen W, Lai H, et al. High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106: 9–17
- 25 Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 1989, 342: 76–78
- 26 Dugdale B, Mortimer C L, Kato M, et al. In plant activation: an inducible, hyperexpression platform for recombinant protein production in plants. *Plant Cell*, 2013, 25: 2429–2443

- 27 Hefferon K L. DNA virus vectors for vaccine production in plants: Spotlight on geminiviruses. *Vaccines* (Basel), 2014, 2: 642–653
- 28 Regnard G L, Halley-Stott R P, Tanzer F L, et al. High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector. *Plant Biotechnol J*, 2010, 8: 38–46
- 29 Tamilselvi D, Anand G, Swarup S. A geminivirus AYVV-derived shuttle vector for tobacco BY2 cells. *Plant Cell Rep*, 2004, 23: 81–90
- 30 Chung H Y, Lee H H, Kim K I, et al. Expression of a recombinant chimeric protein of hepatitis A virus VP1-Fc using a replicating vector based on beet curly top virus in tobacco leaves and its immunogenicity in mice. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 1513–1521
- 31 Kim K I, Sunter G, Bisaro D M, et al. Improved expression of recombinant GFP using a replicating vector based on Beet curly top virus in leaf-disks and infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Mol Biol*, 2007, 64: 103–112
- 32 Phoolcharoen W, Bhoo S H, Lai H, et al. Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9: 807–816
- 33 Rybicki E P, Martin D P. Virus-derived ssDNA vectors for the expression of foreign proteins in plants. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 375: 19–45
- 34 Hefferon K L, Fan Y. Expression of a vaccine protein in a plant cell line using a geminivirus-based replicon system. *Vaccine*, 2004, 23: 404–410
- 35 Mor T S, Moon Y S, Palmer K E, et al. Geminivirus vectors for high-level expression of foreign proteins in plant cells. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 81: 430–437
- 36 Zhang X, Mason H. Bean yellow dwarf virus replicons for high-level transgene expression in transgenic plants and cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93: 271–279
- 37 Ugaki M, Ueda T, Timmermans M C, et al. Replication of a geminivirus derived shuttle vector in maize endosperm cells. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 371–377
- 38 Shen W H, Hohn B. Vectors based on maize streak virus can replicate to high copy numbers in maize plants. *J Gen Virol*, 1995, 76: 965–969
- 39 Hayes R J, Coutts R H, Buck K W. Stability and expression of bacterial genes in replicating geminivirus vectors in plants. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 2391–2403
- 40 Hong S H, Kim K I, Chung H Y, et al. Expression of recombinant endostatin in *Agrobacterium*-inoculated leaf disks of *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 1433–1439
- 41 Dugdale B, Mortimer C L, Kato M, et al. Design and construction of an in-plant activation cassette for transgene expression and recombinant protein production in plants. *Nat Protoc*, 2014, 9: 1010–1027
- 42 Matzeit V, Schaefer S, Kammann M, et al. Wheat dwarf virus vectors replicate and express foreign genes in cells of monocotyledonous plants. *Plant Cell*, 1991, 3: 247–258
- 43 Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe D C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 1998, 10: 937–946
- 44 Jayachandran B, Hussain M, Asgari S. RNA interference as a cellular defense mechanism against the DNA virus baculovirus. *J Virol*, 2012, 86: 13729–13734
- 45 Yang Q, Ye Q A, Liu Y. Mechanism of siRNA production from repetitive DNA. *Genes Dev*, 2015, 29: 526–537
- 46 Tao X, Zhou X. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *Plant J*, 2004, 38: 850–860
- 47 Gu Z, Huang C, Li F, et al. A versatile system for functional analysis of genes and microRNAs in cotton. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 638–649
- 48 Huang C, Qian Y, Li Z, et al. Virus-induced gene silencing and its application in plant functional genomics. *Sci China Life Sci*, 2012, 55: 99–108
- 49 Axtell M J. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 137–159
- 50 Tang Y, Wang F, Zhao J, et al. Virus-based microRNA expression for gene functional analysis in plants. *Plant Physiol*, 2010, 153: 632–641
- 51 Tang Y, Lai Y, Liu Y. Virus-induced gene silencing using artificial miRNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Methods Mol Biol*, 2013, 975: 99–107
- 52 Chen W, Zhang Q, Kong J, et al. MR VIGS: microRNA-based virus-induced gene silencing in plants. *Methods Mol Biol*, 2015, 1287: 147–157
- 53 Pandey P, Senthil-Kumar M, Mysore K S. Advances in plant gene silencing methods. *Methods Mol Biol*, 2015, 1287: 3–23
- 54 Cai X, Wang C, Xu Y, et al. Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector. *Virus Res*, 2007, 125: 169–175
- 55 Huang C J, Zhang T, Li F, et al. Development and application of an efficient virus-induced gene silencing system in *Nicotiana tabacum*

- using geminivirus alphasatellite. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2011, 12: 83–92
- 56 Krenz B, Wege C, Jeske H. Cell-free construction of disarmed abutilon mosaic virus-based gene silencing vectors. *J Virol Methods*, 2010, 169: 129–137
- 57 Fofana I B, Sangare A, Collier R, et al. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Mol Biol*, 2004, 56: 613–624
- 58 Muangsang N, Beclin C, Vaucheret H, et al. Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *Plant J*, 2004, 38: 1004–1014
- 59 Turnage M A, Muangsang N, Peele C G, et al. Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 30: 107–114
- 60 Tuttle J R, Idris A M, Brown J K, et al. Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiol*, 2008, 148: 41–50
- 61 Peele C, Jordan C V, Muangsang N, et al. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant J*, 2001, 27: 357–366
- 62 Kjemtrup S, Sampson K S, Peele C G, et al. Gene silencing from plant DNA carried by a Geminivirus. *Plant J*, 1998, 14: 91–100
- 63 Jordan C V, Shen W, Hanley-Bowdoin L K, et al. Geminivirus-induced gene silencing of the tobacco retinoblastoma-related gene results in cell death and altered development. *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 163–175
- 64 Huang C, Xie Y, Zhou X. Efficient virus-induced gene silencing in plants using a modified geminivirus DNA1 component. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7: 254–265
- 65 Jeyabharathy C, Shakila H, Usha R. Development of a VIGS vector based on the beta-satellite DNA associated with bhendi yellow vein mosaic virus. *Virus Res*, 2015, 195: 73–78
- 66 Kumar J, Gunapati S, Kumar J, et al. Virus-induced gene silencing using a modified betasatellite: a potential candidate for functional genomics of crops. *Arch Virol*, 2014, 159: 2109–2113
- 67 Yan J, Gu Y, Jia X, et al. Effective small RNA destruction by the expression of a short tandem target mimic in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24: 415–427
- 68 Reichel M, Li Y, Li J, et al. Inhibiting plant microRNA activity: molecular SPONGEs, target MIMICs and STTMs all display variable efficacies against target microRNAs. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 915–926
- 69 Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1156–1160
- 70 Miller J C, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 143–148
- 71 Christian M, Cermak T, Doyle E L, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186: 757–761
- 72 Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823–826
- 73 Weeks D P, Spalding M H, Yang B. Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 483–495
- 74 Mahfouz M M, Piatek A, Stewart C N Jr. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 1006–1014
- 75 Baltes N J, Gil-Humanes J, Cermak T, et al. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell*, 2014, 26: 151–163
- 76 Yin K, Han T, Liu G, et al. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep*, 2015, 5: 14926
- 77 Mazithulela G, Sudhakar D, Heckel T, et al. The maize streak virus coat protein transcription unit exhibits tissue-specific expression in transgenic rice. *Plant Sci*, 2000, 155: 21–29
- 78 Dinant S, Ripoll C, Pieper M, et al. Phloem specific expression driven by wheat dwarf geminivirus V-sense promoter in transgenic dicotyledonous species. *Physiol Plant*, 2004, 121: 108–116
- 79 Dry I, Krake L, Mullineaux P, et al. Regulation of tomato leaf curl viral gene expression in host tissues. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13: 529–537
- 80 Lacatus G, Sunter G. Functional analysis of bipartite begomovirus coat protein promoter sequences. *Virology*, 2008, 376: 79–89
- 81 Sunter G, Bisaro D M. Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology*, 1997, 232: 269–280
- 82 Guan C, Zhou X. Phloem specific promoter from a satellite associated with a DNA virus. *Virus Res*, 2006, 115: 150–157
- 83 Eini O, Behjatnia S A, Dogra S, et al. Identification of sequence elements regulating promoter activity and replication of a monopartite begomovirus-associated DNA β satellite. *J Gen Virol*, 2009, 90: 253–260

- 84 Khan Z A, Abdin M Z, Khan J A. Functional characterization of a strong bi-directional constitutive plant promoter isolated from cotton leaf curl Burewala virus. *PLoS One*, 2015, 10: e0121656
- 85 Xie Y, Liu Y, Meng M, et al. Isolation and identification of a super strong plant promoter from cotton leaf curl Multan virus. *Plant Mol Biol*, 2003, 53: 1–14
- 86 Kay R, Chan A, Daly M, et al. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, 1987, 236: 1299–1302
- 87 Shivaprasad P V, Akbergenov R, Trinks D, et al. Promoters, transcripts, and regulatory proteins of Mungbean yellow mosaic geminivirus. *J Virol*, 2005, 79: 8149–8163
- 88 Sunter G, Hartitz M D, Bisaro D M. Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: autoregulation of geminivirus replication protein. *Virology*, 1993, 195: 275–280
- 89 Eagle P A, Orozco B M, Hanley-Bowdoin L. A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell*, 1994, 6: 1157–1170
- 90 Domingo E, Holland J J. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*, 1997, 51: 151–178
- 91 Yaakov N, Levy Y, Belausov E, et al. Effect of a single amino acid substitution in the NLS domain of tomato yellow leaf curl virus-Israel (TYLCV-IL) capsid protein (CP) on its activity and on the virus life cycle. *Virus Res*, 2011, 158: 8–11
- 92 Kunik T, Palanichelvam K, Czosnek H, et al. Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *Plant J*, 1998, 13: 393–399
- 93 Wartig L, Kheyr-Pour A, Noris E, et al. Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology*, 1997, 228: 132–140

The Application of Geminiviruses in Biotechnology

YANG QiuYing, YANG XiuLing, DING Bo & ZHOU XuePing

State Key Laboratory For Plant Diseases and Insect Pest, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Geminiviruses are a group of single-stranded DNA viruses with worldwide distribution. Despite their destructive damage on crop production, geminiviruses can serve as plant virus-based expression vectors for plant genetic engineering due to their ability in efficient infection, replication and transcription without integrating into host plants' genome, which makes them potent in transient expression of exogenous genes. This review introduced structures of geminiviruses, the development of geminivirus-based vectors and applications of these vectors. It also described geminiviruses' promoters and their tissue-specific activity. In summary, we provide comprehensive information for the application of geminiviruses in biotechnology.

geminivirus, geminivirus vector, protein expression, VIGS, gene editing, promoter

doi: 10.1360/N052015-00091