



基于烟草脆裂病毒构建同时表达2种外源蛋白的载体及其应用*

郭 歌¹⁾ 常发光¹⁾ 赖家良¹⁾ 张先文²⁾ 杜志游¹⁾ 廖乾生^{1)**}

(¹⁾ 浙江理工大学生命科学院与医药学院, 杭州 310018; ²⁾ 浙江大学农业实验站, 杭州 310058)

摘要 目的 构建在整个寄主植物中能同时表达两个非融合蛋白的病毒载体。方法 以烟草脆裂病毒 (tobacco rattle virus, TRV) 基因组 RNA2 的农杆菌侵染性克隆 pYL156 为材料, 缺失 TRV RNA2 的 2b 基因 5'端 279 bp 并将其起始密码子 ATG 改变为 AGG、同时引入豌豆早枯病毒 (pea early-browning virus, PEBV) 外壳蛋白 (coat protein, cp) 基因启动子, 获得 pTRV2e² 载体; 在 pTRV2e² 载体的 2b 和 PEBV 的 cp 启动子下游插入不同的外源基因, 测定病毒 TRVe² 表达外源蛋白的能力、携带外源基因后重组病毒的稳定性以及分析蛋白质的生物学功能。结果 病毒 TRVe² 能快速同时表达 2 个非融合的外源蛋白, 且至少能表达 70 ku 外源蛋白, 且该病毒携带~2.0 kb 外源基因能稳定存活于寄主植物中; 病毒 TRVe² 可用于分析蛋白质的生物学功能以及 2 个蛋白质间的相互作用。结论 本文构建的重组病毒 TRVe² 为快速有效地表达 2 个外源蛋白以及分析 2 个蛋白质间的相互作用提供技术工具。

关键词 烟草脆裂病毒, 基因组 RNA2, 二元表达载体, 蛋白质功能分析, 本氏烟

中图分类号 Q939.46

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0180

随着大量植物基因组测序的完成, 迫切需要一个好的载体或技术来快速地分析基因组中新基因或预测蛋白质的生物学功能^[1-2]。目前, 研究功能未知的基因或蛋白质主要通过转基因技术在植物中表达目的蛋白以证实其功能^[3], 但转基因技术存在操作繁琐、周期长及物种限制等制约因素, 利用植物病毒载体探究蛋白质的生物学功能日益成为一种趋势^[4-5]。

病毒复制/翻译效率高, 可在植物中产生大量病毒蛋白, 且基因组小易操作, 大量植物病毒被用作构建外源蛋白表达载体的来源, 但绝大多数植物病毒载体是表达单个外源蛋白^[6-7]。马铃薯 X 病毒 (potato virus X, PVX) 和烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 是目前最常用植物病毒表达载体^[8-9]。越来越多植物病毒用于构建表达多个外源蛋白的载体, 由 2 个 TMV 不同株系的 cp 亚基因组启动子构建表达载体 pGR30B 在本氏烟中能同时表达 2 个不同外源蛋白, 但因缺失病毒 cp 基因, 该载体只能在病毒接种叶产生目的蛋白^[10]; Wang

等^[11]将 TMV cp 亚基因组启动子和 PVX 的 cp 亚基因组启动子插入 PVX 基因组中获得表达载体 pCaPVX440, 该病毒能在整个寄主植物中同时表达 2 个外源蛋白, 但重组病毒的稳定性有待于进一步分析。大麦条纹花叶病毒 (barely stripe mosaic virus, BSMV) 为三分体正义单链 RNA 病毒, Cheuk 等^[12]将其改造成四分体病毒, 用于在寄主植物中同时表达 2 个外源蛋白; 基于甜菜坏死黄脉病毒 (beet necrotic yellow vein virus, BNYVS) 表达载体能同时表达 4 个外源蛋白, 但该载体只能在本氏烟 *rdr6i* 接种叶中同时表达 4 个目的蛋白^[13]。利用多聚体蛋白水解策略或肽酶切割原理基于植物病毒构建的多个蛋白质表达载体在寄主中产生的目的蛋白含有源于病毒蛋白或肽酶的氨基酸残基^[14-16], 而目的蛋白携带其他的氨基酸残基可能

* 转基因生物新品种培育重大专项 (2018ZX08001-03B) 资助项目。

**通讯联系人。

Tel: 0571-86843195, E-mail: qshliao@aliyun.com

收稿日期: 2021-06-23, 接受日期: 2021-08-31

干扰其生物学功能。目前已有多个负链RNA病毒用作构建多个外源蛋白的表达载体来源,如利用大麦黄色条点花叶病毒(barley yellow striate mosaic virus, BYSMV)表达3个外源蛋白^[17],基于番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)构建的外源蛋白表达载体在本氏烟中能同时表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)^[18], Peng等^[19]利用苦苣菜黄网病毒(sonchus yellow net rhabdovirus, SYNVR)在本氏烟中同时表达抗体蛋白IgG的重链和轻链多肽。尽管负链RNA能在整个寄主植物中稳定地同时表达多个外源蛋白,但病毒基因组较大,克隆过程复杂,在病毒接种过程中需要外源表达病毒的复制酶和基因沉默抑制子,实验操作繁琐,且负链RNA病毒表达外源蛋白需要时间周期长^[17-19]。

烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)是烟草脆裂病毒属(*Tobravirus*)的典型成员,寄主范围广,能侵染超过50种单子叶和双子叶家族的400多种植物^[20-22]。TRV为正义单链RNA病毒,基因组由RNA1和RNA2分子组成。RNA1所编码的4个蛋白质参与病毒的复制、移动以及症状产生, RNA2中包含3个开放阅读框(ORF),编码CP、27 ku的2b和18 ku的2c, TRV基因组RNA2中2b和2c基因完全缺失后病毒依然能在植物中的复制、包被和移动^[23-24]。TRV寄主范围广泛,引起的症状反应相对温和,目前被用于构建病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)载体、外源蛋白表达载体和产生引导RNA的基因编辑体^[5, 25-29]。

目前国内外基于植物病毒构建多个蛋白质表达载体,因选择的病毒特性不一样,存在不同类型缺点:a.表达多个蛋白质的重组病毒不能系统性侵染寄主植物;b.外源基因插入影响病毒基因组的完整性,使得外源蛋白不能有效表达;c.病毒载体在植物中产生的外源蛋白含有非目的蛋白氨基酸残基;d.表达目的蛋白需要较长的时间,且表达量低。本文通过缺失TRV基因组RNA2侵染性克隆(pYL156)中2b基因的279碱基、引入豌豆早枯病毒(pea early-browning virus, PEBV)cp亚基因组启动子序列,获得载体pTRV2e²,通过重组病毒TRV2e²中自身携带2c亚基因组启动子和外源插入cp亚基因组启动子在本氏烟整个植株中同时表达2个非融合外源蛋白,并利用其分析蛋白质的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

质粒 pTRV1、pYL156 (pTRV2)、pUC57-PEBV CP pro、pBI121-*gfp*、pBI121-*rfp*、pCMBIA-*AtGapC2*、pCMBIA-*NbHsp70*、pBI121-LS 2b、pUC57-XEG1、pUC57-*Avh52* 和大肠杆菌 DH5 α 菌株及农杆菌 GV3101 菌株均保存于本实验室。

1.1.2 寄主植物

本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)寄主植物,播种后~10 d后移栽,在25℃、16 h/8 h(光照/黑暗)光周期条件下培养至6~8叶期,用于农杆菌浸润接种。

1.2 方法

1.2.1 载体构建

以质粒pYL156为模板,通过引物对P1/P2进行PCR扩增,目的产物割胶回收后经Hind III/EcoRI双酶切,并连接到Hind III/EcoRI的载体pYL156中,连接产物转化至大肠杆菌DH5 α ,获得重组质粒pTRV2e¹。以pUC57-PEBV CP pro为模板,通过引物对P3/P4进行扩增获得PEBV CP基因启动子序列,通过Mlu I/Sma I双酶切克隆至pTRV2e¹中,获得克隆pTRV2e²。采用引物对P5/P6进行PCR扩增获得基因*gfp*,经EcoRI/Mlu I双酶切连接质粒pTRV2e¹/pTRV2e²,分别获得载体pTRV2e¹-*gfp*/pTRV2e²-*gfp*-MCS2。通过引物对P7/P8进行PCR扩增,目的产物割胶回收,经BamHI/Sma I双酶切克隆至质粒pTRV2e²中获得载体pTRV2e²-MCS1-*gfp*。通过引物对P9/P10进行*rfp*基因的PCR扩增,目的片段通过EcoRI/Mlu I双酶切回收并克隆至pTRV2e²-MCS1-*gfp*,获得载体pTRV2e²-*rfp*-*gfp*。通过引物对P11/P12扩增含有HA标签序列*gfp*基因,并通过经BamHI/Sma I双酶切克隆至质粒pTRV2e²,获得pTRV2e²-MCS1-*gfp*-HA。通过引物对P13/P14进行扩增基因*GapC2*,并通过经BamHI/Sma I双酶切克隆至载体pTRV2e²-MCS1-*gfp*-HA,获得pTRV2e²-MCS1-*GapC2*-HA。通过引物对P15/P16进行扩增基因*Hsp70*,并通过经BamHI/Sma I双酶切克隆至载体pTRV2e²-MCS1-*gfp*-HA,获得pTRV2e²-MCS1-*gfp*-HA。通过引物对P17/P18扩增CMV-LS 2b基因,经EcoRI/Mlu I双酶切连接质粒pTRV2e²-MCS1-*gfp*,获得载体pTRV2e²-2b-*gfp*。通过引物对P19/P20进行PCR扩

增获得 *XEG1*, 并通过双酶切克隆到载体 pTRV2e² 中, 获得 pTRV2e²-*XEG1*-MCS2。通过 P21/P22 引物对 PCR 扩增获得 *Avh52*, 通过 *Bam*HI/*Sma*I 双酶切分别克隆到载体 pTRV2e²/pTRV2e²-*XEG1*-MCS2, 分别获得 pTRV2e²-MCS1-*Avh52* 和 pTRV2e²-*XEG1*-*Avh52*。构建载体所用引物详细信息见附件表 S1。

1.2.2 农杆菌转化、接种和病毒表型观察

上述构建的 pYL156 相关载体均采用冻融法转入农杆菌中 GV3101, 农杆菌活化与培养、菌体收集、浸润接种的具体方法参考刘妮娜等^[30]。农杆菌 pTRV1 与 pYL156 混和物为 TRV、pTRV1 与 pTRV2e¹ 混和物为 TRVe¹、pTRV1 与 pTRV2e² 混和物为 TRVe²。在暗室中用长波型手提便携式紫外灯观察到本氏烟叶片荧光表型, 并用携带 Wratten 过滤器 15 的柯达照相机拍照记录, 汁液摩擦接种的方法参考廖乾生等^[31]。

1.2.3 植物总RNA提取和RNA印迹

取各个病毒侵染的系统叶 0.1 g, 用 Trizol 提取总 RNA, 具体过程按照 Trizol 产品说明书进行。RNA 电泳、转膜和杂交方法参考地高辛标记检测试剂盒 II 产品使用说明书, 杂交探针为互补于 RNA2 的 3'端一段核苷酸, 探针的详细信息见附件表 S1。TRVe²-MCS1-*gfp* 和 TRVe²-*2b-gfp* 侵染植株中 *gfp* 的 siRNA 杂交具体方法参考文献 Du 等^[32], siRNA 探针详细信息见附件表 S1。TRV 基因组 RNA2 和 *gfp* 的 siRNA 杂交信号采用软件 Image J 量化处理, 并通过 SPASS 软件分析数据, 以 TRVe²-MCS1-*gfp* 量为 100%, 计算 TRVe²-*2b-gfp* 相对含量及标准误差。

1.2.4 植物总蛋白质提取与免疫印迹

分别取各个相应病毒侵染植物的系统叶 0.1 g, 液氮研磨至粉末状, 加入含 2% β -巯基乙醇的 PBS 缓冲液研磨至均一状液体, 离心后取上清并加入 2 $\times$ 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 水浴煮 10 min, 10 000 r/min 5 min, 取上清备用。蛋白质转膜、抗体杂交和底物显色的方法参考文献^[33], 所用抗体为 GFP、RFP、HA 标签和黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 2b 蛋白。TRVe²-MCS1-*gfp* 和 TRVe²-*2b-gfp* 侵染植株中 GFP 杂交结果采用软件 Image J 量化处理, 并通过 SPASS 软件分析数据, 以 TRVe²-MCS1-*gfp* 量为 100%, 计算 TRVe²-*2b-gfp* 相对含量及标准误差。

2 结果与讨论

2.1 TRV2相关载体构建及侵染活性

TRV 基因组由 RNA1 和 RNA2 组成, 基因组 RNA1 单独能系统性侵染寄主植物^[23], 由 TRV 基因组 RNA2 改造而成的载体 (pYL156) 是目前广泛地应用于植物功能基因组学研究重要工具之一^[5, 26, 34]; 此外, 利用 PEBV 的 *cp* 亚基因组启动子构建外源蛋白的表达载体^[35-37]。在 pYL156 载体中, TRV 基因组 RNA2 中第 1 643~3 465 区域碱基缺失, 保留 2b 蛋白 N 端 101 个氨基酸, 完全缺失 2c 启动子和 ORF^[34]。Morton 等^[37] 将 pYL156 载体中 2b 蛋白 N 端 101 个氨基酸完全缺失, 并引入 2 个 PEBV *cp* 基因亚基因组启动子, 构建同时表达 2 个外源蛋白的载体, 本文基于载体 pYL156 构建含有 TRV 的 2b 和 PEBV *cp* 亚基因组启动子外源蛋白表达载体。pYL156、pTRV2e¹ 和 pTRV2e² 载体中 TRV 基因组 RNA2 结构示意图如图 1a 所示, pYL156 中 RNA2 含有 2b 基因 ORF 的 5'端 303 bp。通过缺失 2b 基因 ORF 的 5'端 279 bp, 将 2b 基因的起始密码子 (ATG) 改为 AGG, 获得 pTRV2e¹ 载体。在 pTRV2e¹ 载体中, 引入 PEBV *cp* 基因亚基因组启动子构建载体 pTRV2e²。为了分析改造后的 TRV 基因组 RNA2 是否具有侵染活性, 将农杆菌 pYL156、pTRV2e¹ 和 pTRV2e² 分别与农杆菌 pTRV1 混和物共同浸润接种于本氏烟, 浸润接种 5 d, TRVe¹ 和 TRVe² 侵染寄主植物后不产生明显的症状反应, 与 Mock 接种相似, 而 TRV (TRV1+pYL156) 侵染则引起叶片坏死表型 (图 1b), 与程维舜等^[38] 报道的结果相一致。Northern blot 分析结果表明, 在寄主植物的系统叶均能检测到 TRV、TRVe¹ 和 TRVe² 基因组 RNA, 因 TRVe¹ 中缺失 2b 基因 ORF 的 5'端 279 bp, 其基因组 RNA2 长度明显比 TRV 小 (图 1c), 以上结果表明重组病毒 TRVe¹ 和 TRVe² 均可系统性侵染寄主植物。

2.2 2b和cp启动子驱动的外源蛋白表达

为了确定病毒载体 TRVe¹ 和 TRVe² 中亚基组启动子能否驱动外源蛋白的表达, 构建载体 pTRV2e¹-*gfp* 和 pTRV2e²-MCS1-*gfp* 和 pTRV2e²-*rfp-gfp* (图 2a)。病毒 TRVe¹-*gfp*、TRVe²-MCS1-*gfp* 和 TRVe²-*rfp-gfp* 接种本氏烟 24 h, 3 个病毒的浸润接种叶在荧光显微镜下均能观察到绿色荧光现象 (结果未显示); 接种 5 d 的植株荧光表型如图 2b 所示, 除了 TRVe¹ 对照接种的本氏烟外, TRVe¹-*gfp* 和

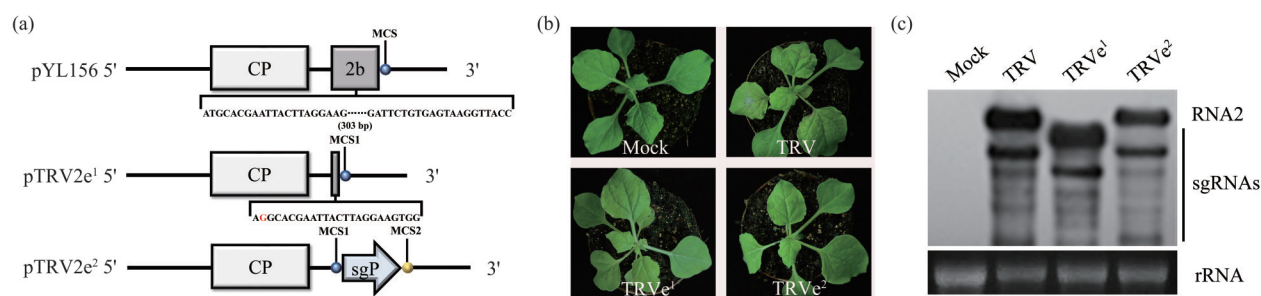


Fig. 1 Infection assays of expression vectors based on tobacco rattle virus in *Nicotiana benthamiana* plants

(a) Schematic illustration of TRV genomic RNA2 in the pTRV2 expression vector constructs. Plasmid pYL156 (AF406991) was T-DNA clone harboring tobacco rattle virus (TRV) genomic RNA2. Multiple cloning site (MCS1) contained *Eco*RI, *Xba*I, *Xho*I and *Mlu*I, MCS2 included *Bam*HI, *Kpn*I, *Nco*I and *Sma*I. sgP was the subgenomic promoter of *cp* gene from pea early-browning virus (PEBV) RNA2(X78455). (b) Symptom expression on *N. benthamiana* plants infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 mixtures harboring plasmid pTRV1, pYL156 or its constructs at 5 d. (c) Northern blot was used to analyze the level of TRV genomic RNAs in the systematic leaves of host plants. During Northern blot, subgenomic RNAs (sgRNAs) or defective RNAs of TRV RNA2 were collectively referred to as sgRNAs.

TRVe²-MCS1-*gfp* 侵染的寄主系统叶中均产生绿色荧光, TRVe²-*rfp-gfp* 侵染植株的系统叶呈现亮黄色表型。TRVe²-*rfp-gfp* 侵染植株系统叶在激光共聚焦显微镜观察的结果如图 2c 所示, 在本氏烟同一个细胞中能同时观察到绿色荧光和红色荧光, 表明 TRVe²-*rfp-gfp* 能同时表达 GFP 和 RFP。免疫印迹 (Western blot) 分析结果表明, GFP 抗体可以在 TRVe¹-*gfp*、TRVe²-MCS1-*gfp* 和 TRVe²-*rfp-gfp* 侵染寄主植物系统叶的总蛋白中检测到目的蛋白, 而对

照接种 TRVe¹ 则检测不到 GFP 信号; 在 TRVe²-MCS1-*gfp* 的样品中目的条带信号强度明显高于 TRVe¹-*gfp* (图 2d), 表明前者侵染寄主植物中 GFP 表达量高于后者, 与观察到的绿色荧光表型一致。在 TRVe²-*rfp-gfp* 侵染的本氏烟植株总蛋白能同时检测到 GFP 和 RFP (图 2d), 以上结果表明病毒载体 TRVe² 能在整个寄主植物中同时快速地表达 2 个外源蛋白。

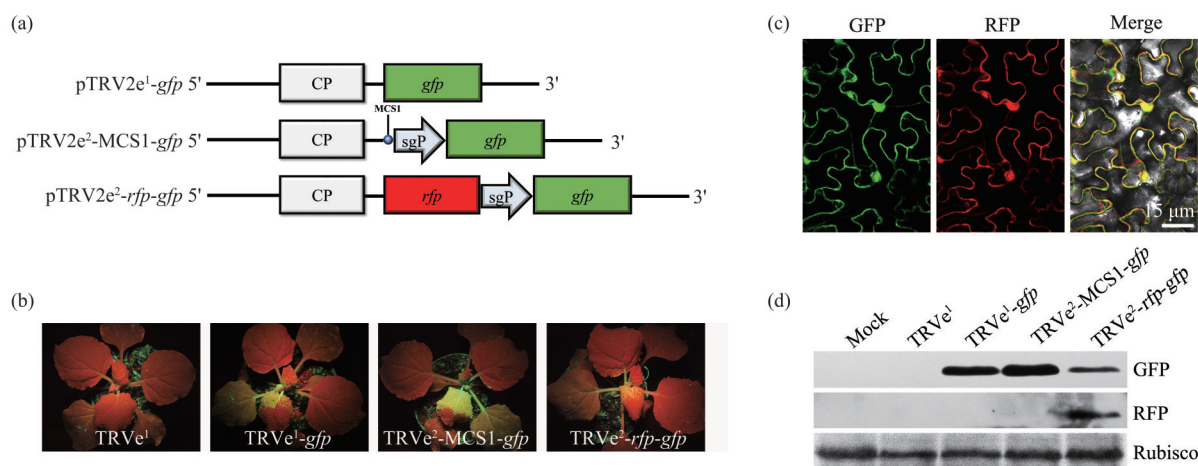


Fig. 2 Expression of green fluorescent protein and red fluorescent protein in the whole host plants via TRVe² vector

(a) Diagrammatic illustration of the pTRV2 expression vector constructs for expressing GFP or/and RFP. (b) Green fluorescence appearance on the seedlings of *N. benthamiana* infiltrated with bacterial suspension mixtures containing pTRV1 and pTRV2 derivatives under UV light at 5 d. (c) Green fluorescence and red fluorescence were visualized in the same cell of *N. benthamiana* plants infiltrated with *A. tumefaciens* mixtures carrying pTRV1 and pTRV2e²-*rfp-gfp* under confocal laser microscopy. (d) The levels of GFP and RFP in the systematic leaves of host plants were detected by Western blot with specific antibodies.

2.3 两个启动子表达外源蛋白能力的比较

为了比较载体pTRV2e²中2个亚基因组启动子驱动外源蛋白表达能力, 构建载体 pTRV2e²-*gfp*-MCS2和pTRV2e²-MCS1-*gfp*, 两者中的*gfp*基因分别由TRV内源2*b*亚基因组启动子和PEBV *cp*亚基因组启动子驱动表达(图3a)。病毒TRVe²-*gfp*-MCS2和TRVe²-MCS1-*gfp*接种5 d, 紫外灯下观察寄主植物荧光表型如图3b所示, 在本氏烟接种叶和系统叶中, TRVe²-MCS1-*gfp* 侵染引起的荧光现

象明显强于TRVe²-*gfp*-MCS2。RNA印迹(Northern blot)结果显示, 2个病毒在侵染寄主植物接种叶和系统叶病毒基因组RNA含量基本相同(图3c)。Western blot进一步证实, 在接种叶和系统叶中病毒TRVe²-MCS1-*gfp*所产生的GFP量均高于TRVe²-*gfp*-MCS2(图3c)。以上结果表明, 病毒TRVe²中PEBV *cp*基因亚基因组启动子驱动外源蛋白表达能力强于TRV 2*b*基因亚基因组启动子。

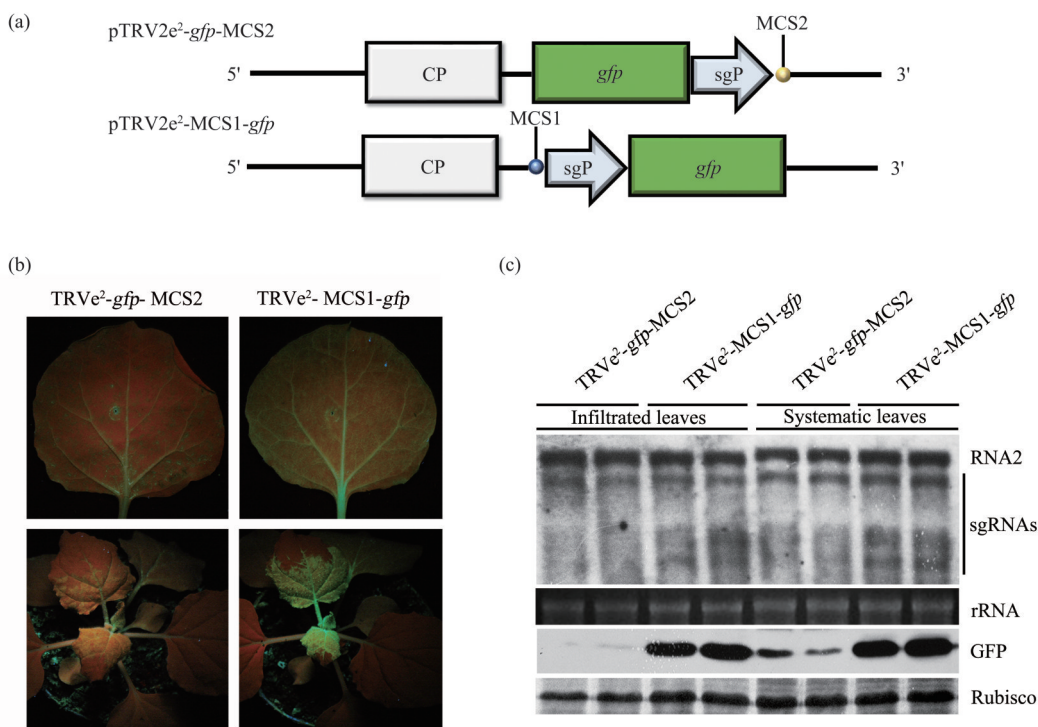


Fig. 3 Comparison of the levels of GFP expression driven by either TRV 2*b* or PEBV *cp* subgenomic promoters in *N. benthamiana* plants using TRVe² vector

(a) Schematic representation of the pTRV2e² constructs for expressing GFP. (b) Green fluorescence appearance on the seedlings of *N. benthamiana* infiltrated with bacterial suspension mixtures containing pTRV1 and pTRV2 derivatives under UV light at 5 d. (c) RNA blot analysis of TRV genomic RNAs and Western blot detection for GFP in the host plants.

2.4 利用TRVe²表达不同长度的外源蛋白

为了分析病毒TRVe²对不同长度外源基因的表达能力, 分别将基因*gfp* (720 bp)、拟南芥三磷酸甘油醛脱氢酶C2亚基基因*GapC2* (1 017 bp)、烟草热激蛋白70基因*Hsp70* (1 950 bp)克隆至载体pTRVe²中, 获得载体pTRV2e²-MCS1-*gfp*-HA、pTRV2e²-MCS1-*GapC2*-HA和pTRV2e²-MCS1-*Hsp70*-HA; 病毒TRVe²-MCS1-*gfp*-HA、TRVe²-MCS1-*GapC2*-HA和TRVe²-MCS1-*Hsp70*-HA接种

接种寄主植物5 d, 分别采集寄主植物系统叶用于Northern blot杂交和Western blot分析, 结果如图4所示。在pTRV2e²载体插入不同长度的基因后, 重组病毒基因组RNA2长度增加(图4a); 通过HA抗体在各个病毒接种寄主的系统叶中均能够检测到目的蛋白(图4b)。以上结果表明, 病毒TRVe²在本氏烟系统叶中至少能表达70 ku外源蛋白。TRV基因组RNA1的大小为~6.8 kb, RNA2大小为~3.9 kb, 病毒粒子呈直杆状^[20-24, 39], 本文构建

TRV2^{e2}载体中 TRV2 基因组大小为~2 kb, 病毒 TRVe²能在整个植株中表达~2.0 kb 外源基因, 完全符合预期。病毒 TRVe²在寄主植物中能否表达 2.0

kb 以上外源基因、并能在寄主中系统移动的相关工作本实验室正在进行中。

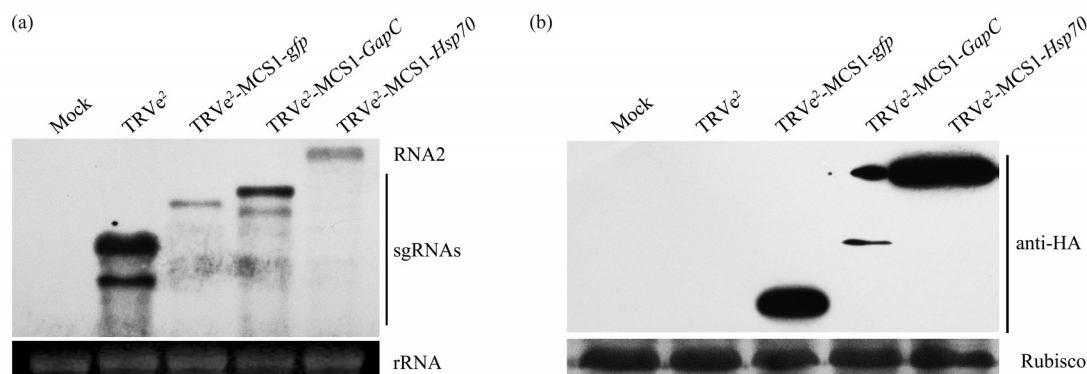


Fig. 4 Expression of various proteins in *N. benthamiana* plants with TRVe²

(a) Northern blot analysis of TRV genomic RNAs in the systematic leaves of *N. benthamiana* plants. (b) Proteins in the seedlings of *N. benthamiana* challenged with TRV constructs were detected by Western blot using anti-HA peptide antibody.

2.5 TRVe²在寄主中保持稳定

为了分析病毒 TRVe²携带外源基因后在寄主植物稳定性, 取 TRVe²-MCS1-Hsp70-HA 农杆菌浸润接种 10 d 寄主系统叶, 通过汁液摩擦转接于健康本氏烟中, 连续进行 3 次转接。分别采集 3 次转接寄主系统叶用于病毒基因组杂交和蛋白质检测。结果 (图 5) 表明, TRVe²-MCS1-Hsp70 在 3 次转接植株中的病毒基因组 RNA2 积累量与大小与农杆菌浸润接种寄主相比无明显差别, 插入到 TRV 基因组 RNA2 中外源基因 Hsp70 不丢失; 在病毒侵染植株系统叶的总蛋白质中均能检测到 Hsp70, 并且 Hsp70 含量在 3 次转接的植株中含量没有明显差别,

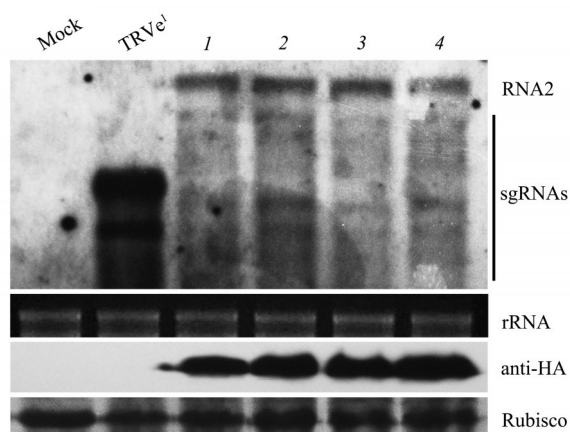


Fig. 5 Analysis of stability of TRVe²-MCS1-Hsp70-HA by serial passages in *N. benthamiana* plants

1: Agro-infiltrated; 2: first passage; 3: second passage; 4: third passage.

病毒 TRVe²在携带~2.0 kb 外源基因后可以稳定存在于寄主植物中, 并在整个寄主植物中表达目的蛋白。

2.6 利用 TRVe²验证 CMV 2b 基因沉默抑制子的功能

黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 的 2b 蛋白是基因沉默抑制子, 抑制寄主植物对 CMV 抗病反应^[33]。本文构建病毒载体 TRVe²-2b-gfp 用于验证 CMV 的 2b 蛋白具有抑制基因沉默功能。病毒接种 3 d, TRVe²-2b-gfp 在寄主植物接种叶中荧光强度明显高于 TRVe²-MCS1-gfp; 病毒接种 5 d, 2 个病毒均扩展至本氏烟的系统叶, 并且 TRVe²-2b-gfp 荧光表型强于 TRVe²-MCS1-gfp (图 6a)。在 TRVe²-2b-gfp 侵染本氏烟系统叶能检测到 2b 蛋白, 与 TRVe²-MCS1-gfp 相比, TRVe²-2b-gfp 侵染植株中 GFP 含量增加 2.2 倍 (图 6b)。为了确定病毒 TRVe²-MCS1-gfp 表达 CMV 2b 蛋白后是否也增加 TRV 的基因组积累量, 分别提取 TRVe²-MCS1-gfp 和 TRVe²-2b-gfp 所侵染寄主植物系统叶总 RNA 和 siRNA 用于 Northern blot 分析。结果表明: TRVe²-2b-gfp 在本氏烟中的基因组 RNA 含量是 TRVe²-MCS1-gfp 的 4.67 倍 (图 6c), 表明 TRVe²-2b-gfp 引起本氏烟产生更明显的荧光表型是由于 TRVe²-2b-gfp 表达 CMV 的 2b 蛋白增加病毒基因组 RNA 所导致。TRVe²-MCS1-gfp 和 TRVe²-2b-gfp 侵染植株的 gfp-siRNA 杂交结果表明, siRNA 在 TRVe²-

MCS1-*gfp* 侵染寄主中含量高于 TRVe²-2*b-gfp* (图 6d)。以上结果表明, 病毒 TRVe²可用于研究蛋白质的生物学功能。

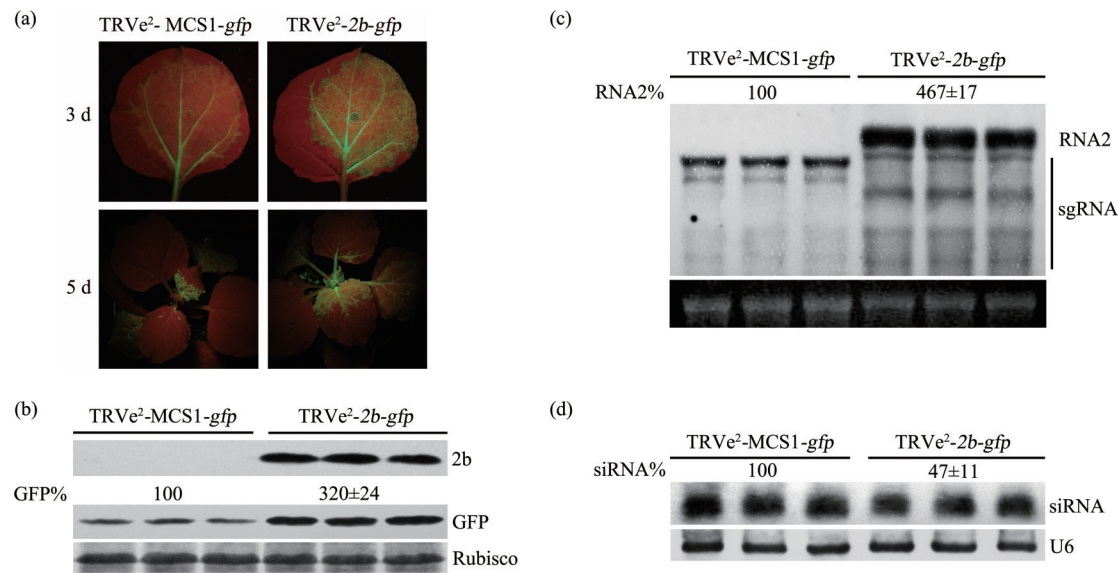


Fig. 6 Application of the TRV-based dual expression vector for analysis of CMV 2b protein involved in antiviral defense response on *N. benthamiana* plants

(a) Fluorescence phenotype on the *N. benthamiana* plants infiltrated with *A. tumefaciens* mixtures carrying TRV1, TRVe²-MCS1-*gfp* and TRVe²-2*b-gfp* respectively was illuminated under UV light. (b) CMV 2b protein and GFP expressed from TRV vector in the systematic leaves of *N. benthamiana* was detected by protein gel blot analysis. (c) Northern blot was used to analyze the level of TRV genomic RNAs in the systematic leaves of *N. benthamiana* (d) The level of *gfp*-derived siRNA in the systematic leaves of *N. benthamiana* was assayed by Northern blot.

2.7 利用TRVe²分析XEG1和Avh52的相互作用

XEG1是来自于大豆疫霉菌的激发子, PVX载体表达XEG1蛋白后, 在本氏烟上引发植物的防御反应, 导致叶片呈现坏死症状, 而预先在本氏烟中表达RXLR效应子Avh52后再表达XEG1, XEG1引起的细胞坏死反应则被抑制^[40]。本文利用质粒pTRV2e²分别构建单独表达XEG1或Avh52, 同时表达XEG1和Avh52的载体; 农杆菌浸润接种

36 h, 接种病毒TRVe²-XEG1-MCS2的叶片呈现坏死表型, TRVe²-XEG1-Avh52侵染的叶片无明显坏死症状, TRVe²-MCS1-*gfp*和TRVe²-MCS1-Avh52的接种叶均不产生坏死症状(图7a), 与Ma等^[40]报道的结果相一致。Western blot结果显示, TRVe²-XEG1-MCS2、TRVe²-XEG1-Avh52和TRVe²-MCS1-Avh52浸润接种的叶片中均能检测到相应目的蛋白(图7b)。以上结果表明, 病毒TRVe²可用于分析

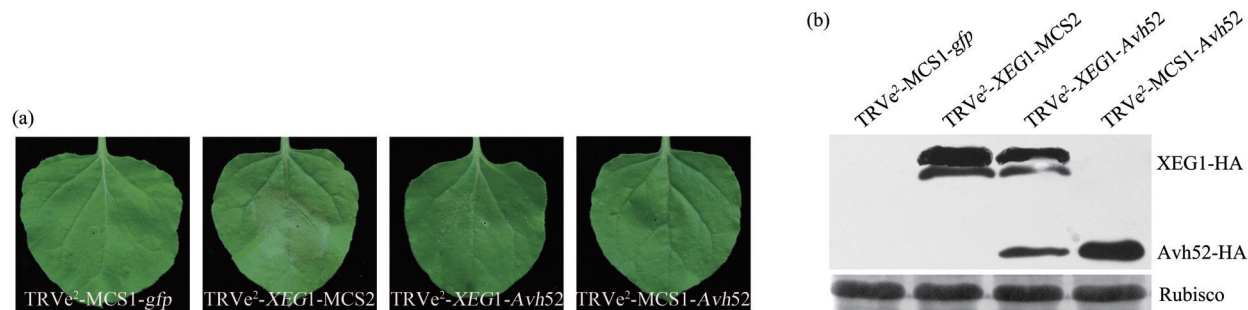


Fig. 7 Application of the TRV-based dual vector for analysis of suppression of XEG1-induced cell death in *N. benthamiana* leaves by RXLR effector Avh52

(a) Phenotype expression on the leaves of *N. benthamiana* plants Agro-infiltrated with TRVe²-XEG1 and TRVe²-XEG1-Avh52 at 36 h. (b) Western blot analysis of XEG1 and Avh52 proteins in *N. benthamiana* leaves.

2个蛋白质之间的相互作用。

3 结 论

本文利用TRV基因组RNA2农杆菌侵染性克隆pYL156构建含有2个亚基因组启动子的载体pTRV2e²,并用于在本氏烟整个植株中同时表达2个外源蛋白,主要结论如下:a.病毒TRVe²能系统性侵染本氏烟,并通过病毒基因组RNA2中的2个亚基因组启动子在整个植株中同时快速、高含量地表达2个非融合外源蛋白;b.病毒TRVe²至少能表达大小为70 ku非融合外源蛋白;c.重组病毒TRVe²携带外源基因后能在寄主植物保持稳定;d.病毒TRVe²可用于快速分析蛋白质的生物学功能以及蛋白质与蛋白质的互作。本文结果为利用植物病毒构建表达多个非融合蛋白载体提供理论指导,表达载体TRVe²为快速研究植物的基因功能提供技术工具。

附件 PIBB_20210180_S1.pdf 见本文网络版(<http://www.pibb.ac.cn>或<http://www.cnki.net>)

参 考 文 献

- [1] 常敬礼,郭玉双,杨德光,等.植物功能基因组学研究进展.玉米科学,2008,16(2):56-59
Chang J L, Guo Y S, Yang D G, *et al.* Journal of Maize Sciences, 2008, 16(2): 56-59
- [2] Wang H, Cimen E, Singh N, *et al.* Deep learning for plant genomics and crop improvement. Curr Opin Plant Biol, 2020, 54:34-41
- [3] Luo C, Fernie A R, Yan J. Single-cell genomics and epigenomics: technologies and applications in plants. Trends Plant Sci, 2020, 25(10):1030-1040
- [4] Rommens C M, Salmeron J M, Baulcombe D C, *et al.* Use of a gene expression system based on potato virus X to rapidly identify and characterize a tomato Pto homolog that controls fenthion sensitivity. Plant Cell, 1995, 7(3):249-2457
- [5] Tian J, Pei H, Zhang S, *et al.* TRV-GFP: a modified tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function. J Exp Bot, 2014, 65(1): 311-322
- [6] 年洪娟,杨淑慎,张锡梅.外源基因在植物病毒表达载体中表达策略的研究进展.西北植物学报,2002,22(5):1268-1274
Nian H J, Yang S Z, Zhang X M. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2002, 22(5): 1268-1274
- [7] Gleba Y, Marillonnet S, Klimyuk V. Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(2):182-188
- [8] Baulcombe D C, Chapman S, Santa Cruz S. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. Plant J, 1995, 7(6):1045-1053
- [9] Shivprasad S, Pogue G P, Lewandowski D J, *et al.* Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. Virology, 1999, 255(2):312-323
- [10] Roy G, Weisburg S, Foy K, *et al.* Co-expression of multiple target proteins in plants from a tobacco mosaic virus vector using a combination of homologous and heterologous subgenomic promoters. Arch Virol, 2011, 156(11):2057-2061
- [11] Wang Y, Cong Q Q, Lan Y F, *et al.* Development of new potato virus X-based vectors for gene over-expression and gene silencing assay. Virus Res, 2014, 191:62-69
- [12] Cheuk A, Houde M. A new barley stripe mosaic virus allows large protein overexpression for rapid function analysis. Plant Physiol, 2018, 176(3):1919-1931
- [13] Jiang N, Zhang C, Liu J *Yet al.* Development of Beet necrotic yellow vein virus-based vectors for multiple-gene expression and guide RNA delivery in plant genome editing. Plant Biotechnol J, 2019, 17(7):1302-1315
- [14] Seo J K, Choi H S, Kim K H. Engineering of soybean mosaic virus as a versatile tool for studying protein-protein interactions in soybean. Sci Rep, 2016, 6:22436
- [15] Kelloniemi J, Mäkinen K, Valkonen J P. Three heterologous proteins simultaneously expressed from a chimeric potyvirus: infectivity, stability and the correlation of genome and virion lengths. Virus Res, 2008, 135(2):282-291
- [16] Zhao F, Lim S, Igori D, *et al.* Development of tobacco ringspot virus-based vectors for foreign gene expression and virus-induced gene silencing in a variety of plants. Virology, 2016, 492:166-178
- [17] Gao Q, Xu W Y, Yan T, *et al.* Rescue of a plant cytorhabdovirus as versatile expression platforms for planthopper and cereal genomic studies. New Phytologist, 2019, 223(4):2120-2133
- [18] Feng M F, Cheng R X, Chen M L, *et al.* Rescue of tomato spotted wilt virus entirely from complementary DNA clones. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(2):1181-1190
- [19] Peng X X, Ma X N, Lu S T, *et al.* A versatile plant rhabdovirus-based vector for gene silencing, miRNA expression and depletion, and antibody production. Front Plant Sci, 11: 627880
- [20] Angenent G C, Posthumus E, Brederode F T, *et al.* Genome structure of tobacco rattle virus strain PLB: further evidence on the occurrence of RNA recombination among tobamoviruses. Virology, 1989, 171(1):271-274
- [21] Yin Z, Pawelkiewicz M, Michalak K, *et al.* Single-nucleotide polymorphisms and reading frame shifts in RNA2 recombinant regions of tobacco rattle virus isolates Slu24 and Deb57. Arch Virol, 2014, 159(11):3119-3123
- [22] Kirk W W, Gieck S L, Crosslin J M, *et al.* First report of corky ringspot caused by tobacco rattle virus on potatoes (*Solanum tuberosum*) in Michigan. Plant Dis, 2008, 92(3):485
- [23] Deng X, Kelloniemi J, Haikonen T, *et al.* Modification of tobacco rattle virus RNA1 to serve as a VIGS vector reveals that the 29K movement protein is an RNA silencing suppressor of the virus. Mol Plant Microbe Interact, 2013, 26(5):503-514
- [24] Yin Z, Pawelkiewicz M, Michalak K, *et al.* The genomic RNA1 and

- RNA2 sequences of the tobacco rattle virus isolates found in polish potato fields. *Virus Res*, 2014, **185**:110-113
- [25] Becker A, Lange M. VIGS--genomics goes functional. *Trends Plant Sci*, 2010, **15**(1):1-4
- [26] Senthil-Kumar M, Mysore K S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends Plant Sci*, 2011, **16**(12):656-665
- [27] Ali Z, Abul-Faraj A, Piatek M, *et al.* Activity and specificity of TRV-mediated gene editing in plants. *Plant Signal Behav*, 2015, **10**(10):e1044191
- [28] Ghoshal B, Vong B, Picard C L, *et al.* A viral guide RNA delivery system for CRISPR-based transcriptional activation and heritable targeted DNA demethylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 2020, **16**(12):e1008983
- [29] Ellison E, Nagalakshmi U, Gamo M, *et al.* Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs. *Nat Plants*, 2020, **6**(6): 620-624
- [30] 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. *农业生物技术学报*, 2014, **22**(8): 1027-1034
- Liu N N, Cheng X D, Lu R, *et al.* *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, **22**(8): 1027-1034
- [31] 廖乾生,杜志游,张华荣,等. 黄瓜花叶病毒CB7株系引起心叶烟坏死反应与RNA2相关. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(8):824-829
- Liao Q S, Du Z Y, Zhang H R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(8):824-829
- [32] Du Z, Chen A, Chen W, *et al.* Using a viral vector to reveal the role of microRNA159 in disease symptom induction by a severe strain of cucumber mosaic virus. *Plant Physiol*, 2014, **164**(3):1378-1388
- [33] Du Z, Chen A, Chen W, *et al.* Nuclear-cytoplasmic partitioning of cucumber mosaic virus protein 2b determines the balance between its roles as a virulence determinant and an RNA-silencing suppressor. *J Virol*, 2014, **88**(10):5228-5241
- [34] Liu Y, Schiff M, Marathe R, *et al.* Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 2002, **30**(4):415-429
- [35] Sha A, Zhao J, Yin K, *et al.* Virus-based microRNA silencing in plants. *Plant Physiol*, 2014, **164**(1): 36-47
- [36] MacFarlane S A, Popovich A H. Efficient expression of foreign proteins in roots from tobavirus vectors. *Virology*, 2000, **267**(1): 29-35
- [37] Marton I, Zuker A, Shklarman E, *et al.* Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiol*, 2010, **154**(3):1079-1087
- [38] 程维舜,徐秋芳,黎飞,等. 适于烟草脆裂病毒诱导的本氏烟基因沉默分析的对照载体构建. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2012, **38**(1): 10-20
- Cheng W S, Xu Q F, Li F, *et al.* *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2012, **38**(1): 10-20
- [39] Yin Z, Pawelkiewicz M, Michalak K, *et al.* The genomic RNA1 and RNA2 sequences of the tobacco rattle virus isolates found in Polish potato fields. *Virus Res*, 2014, **185**:110-113
- [40] Ma Z, Song T, Zhu L, *et al.* A *Phytophthora sojae* glycoside hydrolase 12 protein is a major virulence factor during soybean infection and is recognized as a PAMP. *Plant Cell*, 2015, **27**(7): 2057-2072

Construction of Dual Expression Vector Based on Tobacco Rattle Virus and Its Application for Analysis of Protein Function in *Nicotiana benthamiana**

GUO Ge¹⁾, CHANG Fa-Guang¹⁾, LAI Jia-Liang¹⁾, ZHANG Xian-Wen²⁾,
DU Zhi-You¹⁾, LIAO Qian-Sheng^{1)**}

¹⁾College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²⁾The Agricultural Experiment Station, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Objective In order to construct a viral vector that can simultaneously express two non-fusion proteins in the whole host plants. **Methods** *Agrobacterium* infectious clone pYL156 containing tobacco rattle virus (TRV) genomic RNA2 was used to construct dual expression vector pTRV2e² by deleting 279 bp of 5' end of 2b gene, changing initiation codon of 2b gene ATG to AGG, and introducing the subgenomic promoter of pea early-browning virus (PEBV) coat protein (cp) gene. Different exogenous genes were cloned into the downstream of 2b and PEBV cp subgenomic promoters to measure the ability of virus TRVe² to express two foreign proteins, assess the stability of reconstructed TRVe² and analyze the function of proteins in the seedlings of *Nicotiana benthamiana*. **Results** TRVe² could simultaneously and rapidly produce two non-fused target proteins and express at least a 70 ku foreign protein in the whole host plants; TRVe² harboring 2.0 kb exogenous gene could stably exist in *N. benthamiana* plants and could be served as technical means for analyzing the biological function of the proteins and the interaction between two proteins. **Conclusion** Recombinant virus TRVe² constructed in this study provide a toolbox for fast and efficient production of double foreign proteins and for analysis of the interaction between two proteins in the host plants.

Key words tobacco rattle virus, genomic RNA2, dual expression vector, analysis of protein function, *Nicotiana benthamiana*

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0180

* This work was supported by a grant from Genetically Modified Organisms Breeding Major Projects (2018ZX08001-03B).

** Corresponding author.

Tel: 86-571-86843195, E-mail: qshliao@aliyun.com

Received: June 23, 2021 Accepted: August 31, 2021