

## 一种基于过敏性反应机制的抗植物病毒侵染策略

项 瑜 刘俊君 杨兰英<sup>1</sup> 彭学贤\* 莽克强

(中国科学院微生物研究所病毒室 北京 100080)

(西北农业大学植保系 杨陵 712100)<sup>1</sup>

**摘 要** 基于植物的过敏性反应机制, 构建了 PVY N1b 基因和来自于细菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 的一类 RNase 基因-Barnase 基因的融合基因的植物表达载体。在此表达载体内两基因的拼接处, 保留了原来 PVY 蛋白酶识别 PVY N1b 和 CP 蛋白剪切位点的七肽保守序列。通过农杆菌介导获得此融合基因的转基因烟草植株。病毒侵染试验表明, 转基因植物在病毒侵染后, 发病症状被改变。少部分转融合基因的植株对病毒侵染表现局部抗性。

**关键词** 过敏性反应, 马铃薯 Y 病毒, N1b, Barnase, 转基因植物

自从转烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋白基因的工程烟草获得对 TMV 的抗性<sup>[1]</sup>, 利用基因工程手段增强植物抗病性的研究方兴未艾。目前除已发现 CP 介导的抗病性外, 还相继发现利用病毒的非结构蛋白介导的抗病性<sup>[2~4]</sup>。但进一步的手段仍有待发现。

马铃薯 Y 病毒组 (Potyviruses) 是目前已知的最大的植物病毒组, 造成严重的经济损失。此组病毒的基因组是单一正链 RNA, 长约 10kb, 基因组的 5' 端连一基因组结合蛋白 (Genome-linked protein, VPg), 3' 端有一段 poly (A) 序列。该病毒组的一个重要特点是基因组编码一条大的多肽, 再经自身编码的蛋白酶降解成成熟的病毒外壳蛋白及其它至少 7 种非结构蛋白。关于其蛋白酶对不同的加工位点的识别仅由剪切点的七肽保守序列决定, 而同其两边的氨基酸序列无关<sup>[5~9]</sup>。Rorrer 等连接烟草蚀纹病毒 (Tobacco etch virus, TEV) 的 N1a 基因与外源 Magainin-2 基因或牛痘病毒的 L4R 基因构成一融合基因, 通过无细胞的转录和翻译体系试验发现保留 TEV N1a 剪切点的七肽保守序列, 就能将融合蛋白从剪切点准确地切开<sup>[9]</sup>。本文报道了利用马铃薯 Y 病毒组本身的这种剪切特点设计的一种新的抗病毒策略, 即通过基因工程手段尝试在植物体内人工引入过敏性反应机制来使植物获得抗病反应。

植物过敏性反应是不相容的植物——病原物相互作用中植物对侵染病原物的抗性特征。过敏性反应通过侵染点及其周围细胞的快速坏死来限制病原物的进一步侵染。为了在植物中引入此抗病机制, 我们克隆了马铃薯 Y 病毒 (Potatovirus Y, PVY) 的复制酶基因 (Nuclear inclusion b, N1b) 和细菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 的细胞外核酸酶 (Barnase) 基因, 拼接此两基因成一融合基因, 构建了此融合基因的双元植物表达载体, 在两基因的拼接点, 即在 N1b 基因的 3' 端和 Barnase 基因 5' 端, 保留了供 PVY 蛋白酶识别原

本工作得到国家自然科学基金支持并得到国际科学和文化中心世界实验室 (WL, ICSC, 日内瓦, 洛桑) 的部分资助。

\* 通讯作者。

本文于 1994 年 11 月 3 日收到。

来 N1b 与 CP 蛋白之间剪切点的特异的七肽保守序列；通过农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 介导转化烟草。推测一旦 PVY 侵染此类转基因植株，PVY 本身的蛋白酶从特异的识别位点将植物表达的包括 N1b 和 Barnase 的融合蛋白加工成独立的 N1b 和 Barnase，活性的 Barnase 势必引起侵染点及其周围的细胞快速坏死，从而达到人工诱发过敏性反应的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株 *B. amyloliquefaciens* (1.1099) 来自于本所一室，大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , JM110, 农杆菌 LBA4404/pAL, 质粒 pBluescript KS, 植物表达载体 pBin438 由本实验室提供。T7 DNA 聚合酶序列分析试剂盒, Taq DNA 聚合酶, 限制酶等生化试剂购自 Promega 公司。 $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 为 NEN 产品, 寡聚脱氧核苷酸引物由本所技术室合成。

### 1.2 方法

1.2.1 PVY N1b 基因的合成改造：根据我们已克隆 N1b 基因全序列<sup>[10]</sup>和基因拼接的需要，合成了 N1b 基因 5' 端引物 I 和 3' 端引物 II：

引物 I：5' TAGGATCCACCATGGCTAAGCATTCTGCATG 3'；

引物 II：5' GTTGATCACCTGTGCTTGATGGTGTACTTC 3'。

PCR 扩增反应条件：以包含有 N1b 全长片段的质粒 pBSKN（由项瑜等构建，待发表）为模板，96℃ 预变性 5min，然后 94℃ 变性 1min，55℃ 复性 1min，72℃ 延伸 2.5min，循环 35 次。

扩增出的目的片段经纯化后，重新克隆入质粒 pBluescript KS，并进行全序列测定。

1.2.2 Barnase 基因的克隆和序列分析：*B. amyloliquefaciens* 染色体 DNA 的分离参考文献 [11]：低速离心收集菌体，酚：氯仿抽取，乙醇沉淀得染色体 DNA。根据文献 [12] 和基因操作的需要合成 Barnase 基因编码区 5' 端引物 III 和 3' 端引物 IV：

引物 III：5' AGGTGATCAACACGTTTGAC 3'；

引物 IV：5' AGGCCTTATCTGATCTTTGTAAAGG 3'。

引物 III 中的第 5 个核苷酸由文献 [12] 中的 T 换成了 G，目的是为了在引物 III 中引入 Bcl I 位点，这样的变化并未引起氨基酸的改变。PCR 扩增条件 94℃，60s；54℃，40s，72℃，30s；循环 35 次。扩增出的目的片段经纯化后克隆入质粒 pBluescript KS，并进行序列测定与分析。

1.2.3 农杆菌的转化和植物转化：参考文献 [13]。

1.2.4 转基因植物的 PCR 检测：植物总 DNA 的提取参考文献 [13]。

PCR 技术可以用来快速检测转基因植物中外源基因的整合情况。因此我们利用 Barnase 基因 5' 端引物 III 和根据双元载体 pBin438 的 NOS 区域设计的引物 V（引物 V：5' GCAAGACCGGCAACAGG 3'）对获得的转基因植物进行 PCR 检测。PCR 检测条件：模板为在含卡那霉素 (kan) 的 MS 培养基上生长正常的转基因植株的总 DNA；94℃，60s；55℃，40s；72℃，40s；35 个循环。

**1.2.5 病毒侵染试验和 ELISA 检测:** 当转基因植物在温室中生长 3~4 周左右, 一般 4~5 叶时, 用浓度为 20 $\mu$ g/ml 的 PVY 摩擦接种, 对照是 pBIN438 空载质粒转烟草植株。观察发病情况和进行 ELISA 检测。

ELISA 检测方法参考文献 [14] 中的双抗体夹心法。其中一抗是鼠抗 PVY 病毒抗体和兔抗 PVY 病毒抗体 (均由本实验室制备), 二抗为羊抗兔酶标记抗体 (购自 Promega 公司)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Nib 基因的合成改造

为了便于基因操作和载体构建, 合成了两对引物, 以我们已构建的包含 Nib 基因全长序列的质粒 pBSKN 为模板, 重新扩增出 Nib 基因 (图 1), 引入所需的酶切位点和 Barnase 基因 5' 端部分序列, 并将其克隆入 pBluescript KS 的 EcoRV 位点, 得质粒 pKNR9 (图 3), 通过全序列分析无误, 并确证包含有我们引入的 BamH I 位点、Bcl I 位点、为了便于在植物中表达的 kozak 序列-ACCATGG-以及在 Nib 基因 3' 端最后一个密码子后引入的 5 个 Barnase 基因的密码子。

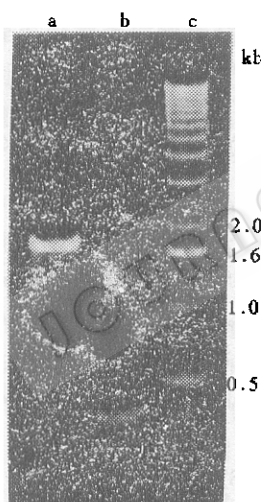


图 1 PVY Nib 基因和来源于细菌 *B. amyloliquefaciens* 的 Barnase 基因的 PCR 扩增合成

Fig. 1 Amplification of PVY Nib gene and Barnase gene from *B. amyloliquefaciens*.

a. Nib; b. Barnase; c. Molecular weight standard

gca	cag	gtG	atc	aac	acg	tlI	gac	GGG	GTT	GCG	GAT	36
A	Q	V	I	N	T	F	D	G	V	A	D	12
TAT	CTT	CAG	ACA	TAT	CAT	AAG	CTA	CGT	GAT	AAT	TAC	72
Y	L	Q	T	Y	H	K	L	P	D	N	Y	24
ATT	ACA	AAA	TCA	GAA	GCA	CAA	GCC	CTC	GGC	TGG	GTG	108
I	T	K	S	F	A	Q	A	L	G	W	V	36
GCA	TCA	AAA	GGG	AAC	CTT	GCA	GAC	GTC	GCT	CCG	GGG	144
A	S	K	G	N	L	A	D	V	A	P	G	48
AAA	AGC	ATC	GGC	GGA	GAC	ATC	TTC	TCA	AAC	AGG	GAA	180
K	S	I	G	G	D	I	F	S	N	R	E	60
GGC	AAA	CTC	CCG	GGC	AAA	AGC	GGA	CGA	ACA	TGG	CGT	216
G	K	L	P	G	K	S	G	R	T	W	R	72
GAA	GCG	GAT	ATT	AAC	TAT	ACA	TCA	GGC	TTC	AGA	AAT	252
E	A	D	I	N	Y	T	S	G	F	R	N	84
TCA	GAC	CGG	ATT	CTT	TAC	TCA	AGC	GAC	TGG	CTG	ATT	288
S	D	R	I	L	Y	S	S	D	W	L	I	96
TAC	AAA	ACA	ACG	GAC	CAT	TAT	CAA	ACC	ITT	ACA	AAG	324
Y	K	T	T	D	H	Y	Q	T	F	T	K	108
ATC	AGA	TAA										333
I	R											110

图 2 Barnase 基因 (来源于细菌 *B. amyloliquefaciens*) 的核苷酸序列及其推导出的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and derived amino acid sequences of Barnase gene from *B. amyloliquefaciens*.

### 2.2 Barnase 基因的克隆和序列分析

以提取的 *B. amyloliquefaciens* 的染色体 DNA 为模板直接进行 PCR 扩增出 0.33kb 的片段 (图 1), 纯化后克隆入 pBluescript KS 质粒的 EcoRV 位点, 得质粒 pKBS (图 3), 序列测定表明我们合成的 Barnase 基因不包括前导肽序列 (图 2), 仅是编码区的 330 个核苷酸, 与国外已报道的 Barnase 基因序列 [12] 相比, 有两个核苷酸的差异, 但氨基酸序列完全相同。

## 2.3 Nib 基因与 Barnase 基因的拼接

将带有 Barnase 基因的质粒 pKBS 用 Bcl I 和 Xho I 酶切得 0.33kb 的 Barnase 基因片段, 然后克隆入带 Nib 基因的质粒 pKNR9 的 Bcl I 和 Xho I 位点之间得质粒 pKNB (图 3), 由于我们在设计引物时就考虑了基因的正确重叠和正确编码, 这样拼接的基因仅有一个阅读框架, 即从 Nib 基因 5' 端引入起始密码子 ATG 到 Barnase 基因 3' 端的终止子 TAA; 同时在设计中保留了原来 Nib 基因 3' 端与 CP 基因 5' 端剪切点的保守七肽序列。通过序列分析和酶切分析, 确证完成了融合基因的正确拼接。

## 2.4 植物表达载体的构建和转基因植物的获得

将带有 Nib+Barnase 融合基因的质粒 pKNB 用 BamH I 和 Xho I 双酶切得 1.8kb 片段、插入双元表达载体 pBin438 的 BamH I 和 Sal I 之间, 即在 pBin438 的 35S-UTT-NOS3'<sup>(15)</sup> 这个植物表达框架之中 (图 3, pBin438NB)。在融合基因的起始密码子 ATG 前引入了高等植物基因高效表达所必需的特征性 kozak 序列 5'-ACCATGG-3', 同时在融合基因 3' 端引入终止密码子 TAA。以保证此植物表达载体在植物中的完整表达。以此双元表达载体转化农杆菌 LBA4404, 通过农杆菌介导的叶圆盘法转化烟草。通过 kan 抗性筛选, 获得 17 个转化植株。利用引物 III 和引物 V 从 pBin438NB 的 kan 抗性的转化植株的总 DNA 中可以扩增出预期的特异性的约 0.5kb 片段, 而在转 pBin438 空载质粒的烟草植株中不能检测到类似特异性片段 (图 4)。说明我们确实获得了含 Nib+Barnase 融合基因的转基因烟草。

## 2.5 转基因植物对病毒侵染的反应

在一般情况下, 似乎融合的 Barnase 基因对植物没有危害, 这一点通过我们获得的

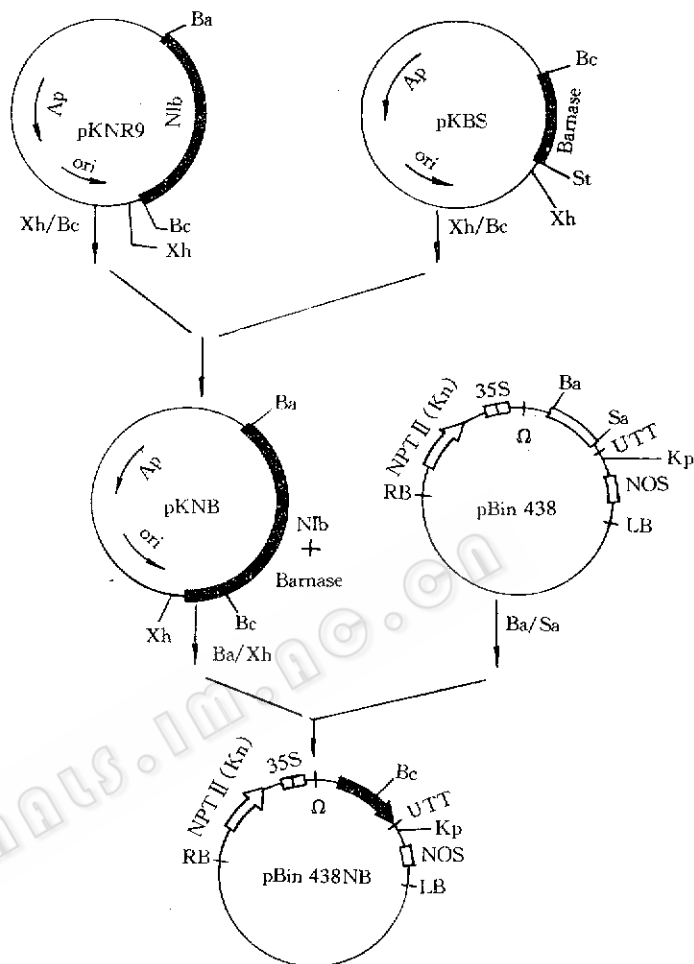


图 3 Nib+Barnase 融合基因植物表达载体构建路线图  
Fig. 3 Construction of plant expression vector of fusion gene of PVY Nib and Barnase from *B. amyloliquefaciens*

Ba. BamH I; Bc. Bcl I; Sa. Sal I; St. Stu I; Xh. Xho I.

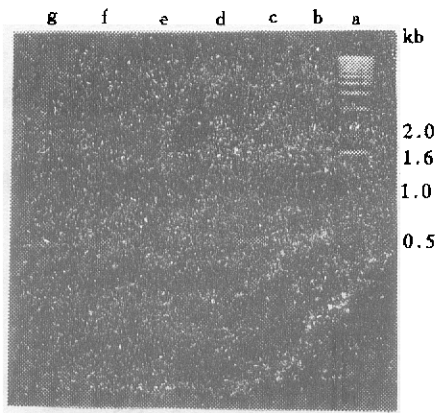


图 4 部分转基因植物的 PCR 检测结果

Fig. 4 Identification of N1b+Barnase transgenic tobacco by PCR

a. Molecular weight standard; b. pBin438 transgenic control; c~g. 438NB5, 8, 10, 12 & 16, respectively.

N1b+Barnase 转基因植株能正常生长得到验证。当转基因植物在温室中生长 3~4 周左右，一般 4~5 叶时，用浓度为 20μg/ml 的 PVY 摩擦接种了 17 株 N1b+Barnase 融合基因的转基因植株，对照是 pBin438 空载质粒的转化植株 (B438) 和非转化的烟草组培植株。在接种后 6~15d，当攻毒的对照植株逐渐发展成全株系统花叶症状时，大部分 N1b+Barnase 转基因植株首先在接种叶表现黄化和急剧坏死，然后迅速向邻近的叶片扩展，在发病后 1~3 周内基本整株黄化坏死，从叶片反应症状及发展趋势上看完全与 PVY-C 在正常烟草上的表现不同，我们认为 N1b+Barnase 转基因植株对 PVY-C 侵染的反应属于急剧坏死类型或淬死型 (图 5, f,



图 5 N1b+Barnase 转基因植物对马铃薯 Y 病毒侵染的反应

Fig. 5 Response of N1b+Barnase transgenic plants to the infection of PVY

a, e & h, pBin438 transgenic control; b, c, d, f & g, 438NB5, 10, 12, 8&16, respectively.

g)。在 17 株 N1b+Barnase 转基因的烟草中有少数植株, 如 438NB5, 438NB10 和 438NB12 对 PVY 侵染仅表现局部症状: 在接种后 7 至 10d 左右接种叶出现局部黄化和坏死症状; 以后只限于向邻近 1~2 叶扩散而不延伸至全株, 上部叶片无明显症状(图 5, b、c 和 d)。虽然这些植株的最下部 1~2 片叶已经或正在枯死, 但是病毒 ELISA 值仅为对照的 1/5~1/3; 上部的两片叶的 ELISA 值与未接种的健康对照一样(见表 1)。值得指出的是, 在另外的实验中, 我们获得了全长 N1b 基因转化烟草植株, 在 PVY 攻毒后并不表现急剧坏死症状, 甚至有少部分植株表现完全的抗病效果<sup>[6]</sup>。说明 N1b+Barnase 融合基因很可能在植物中得到表达。可能当 PVY 侵染时, 由于 PVY 自身编码的蛋白酶仅识别原来 PVYN1b 3'端和 CP 5'端之间剪切点的七肽保守序列-YEVHHQ/A-, 而不管剪切点两边的氨基酸序列, 从而将融合蛋白加工成独立的 N1b 和 Barnase, 活性的 Barnase 造成细胞的死亡。这和我们实验的结果相吻合。但是, 实验结果并不是我们设想的病毒侵染引起转基因植株的局部的枯斑反应, 我们设计的 Barnase 不带有信号肽, 因此设想其在细胞内的运输受到限制, 只能降解侵染点附近的细胞 RNA 和病毒的 RNA, 造成细胞的局部坏死, 从而限制病毒的进一步扩展。但是, 大部分转基因的 438NB 植株在病毒接种后表现全株或部分黄化和坏死, 并且在除接种叶以外的其它叶片有花叶症状出现。说明病毒侵染后并不能很有效地快速加工融合蛋白成 N1b 蛋白和 Barnase 蛋白, 这很可能是由于病毒的蛋白酶对外源的融合蛋白的剪切效率很低造成的。在 Parks 等的 TEV 蛋白酶加工 TEV 多聚蛋白的体外试验中, 蛋白酶和底物的比率在 5:1 以上<sup>[9]</sup>。所以推测只有病毒侵染达到一定程度时才能有部分融合蛋白被病毒的蛋白酶切成活性的 Barnase 蛋白, 造成细胞的坏死。另外, 我们是整张叶片的摩擦接种, 因而可能很难在系统侵染寄主上形成局部的坏死斑症状。目前还不能排除 Barnase 在植物组织内扩散转移的可能性。在转基因的 438NB 植株间接种后症状轻重的差别是否与外源基因在烟草基因组上的插入位点有关, 有待进一步研究。

表 1 部分 N1b+Barnase 转基因植株在 20 $\mu$ g/ml PVY 接种后 30d ELISA 检测值

Table 1 The ELISA result of part of N1b+Barnase transgenic plants at 30 days of post-inoculation

ELISA OD Strain	Leaf position			
	2	3	5	6
438NB10	0.01	0.12	0.21	0.19
438NB12	0.02	0.12	0.21	ND**
B438	0.20	0.23	0.61	ND
-CK*	0.02	0.02	0.03	ND

\*: -CK uninoculated pBin438 transgenic plants

\*\*: ND=not determined

我们设想利用 potyviruses 特异的剪切加工特点, 可以设计出多种抗病毒策略, 用各种抗性基因替代病毒本身不同组分, 保留病毒本身的保守的剪切点序列, 这样可以选择性地抵制 Potyviruses 的侵染或 Potyviruses 与其它病毒的混合侵染。

## 参 考 文 献

- [1] Able P P, Nelson R S, De B *et al.* Science, 1986, **232**: 738~743.
- [2] Golemboski D B, Lomonosoff G B, Zaitlin M *et al.* Proc Natl Sci U, 1990, **87**: 6311~6315.
- [3] Anderson J M, Palukaitis P, Zaitlin M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, **89**: 8759~8763.
- [4] Maiti I B, Murphy J F, Shaw J G. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90**: 6110~6114.
- [5] Carrington J C. & Dougherty W G. J Virol, 1987, **61**: 2540~2548.
- [6] Dougherty W G, Carrington J C, Cary S M. *et al.* EMBO J, 1988, **7**: 1281~1287.
- [7] Parks T D, Smith H A, Dougherty W G. *et al.* J Gen Virol, 1992, **73**: 149~155.
- [8] Dougherty W G, Parks T D. Virology, 1989, **172**: 145~155.
- [9] Rorrer K, Parks T D, Scheffler B *et al.* J Gen Virol, 1992, **73**: 775~783.
- [10] 彭学贤, 项 瑜, 刘俊君等. 生物多样性, 1994, **2** (1): 35~37.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular Cloning (Seco Edition), Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [12] Hartley R W. J Mol Biol, 1988, **202**: 913~915.
- [13] 田颖川, 秦晓峰, 王桂铃等. 中国科学, B辑, 1990, **8**: 811~831.
- [14] 梁训生, 张成良, 张作芳. 植物病毒血清学技术, 北京: 农业出版社, 1986.

## A New Strategy Derived from Plant Hypersensitivity Against the Infection of Potato Virus Y

Xiang Yu   Liu Junjun   Yang Lanying<sup>1</sup>   Peng Xuexian   Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Academic Sinica, Beijing 100080)

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling 712100)<sup>1</sup>

**Abstract** In order to introduce an artificial hypersensitivity in plant, a binary plant expression vector carrying the fusion gene cassette of the nuclear inclusion b (Nlb) gene from potato virus Y, Chinese isolate (PVY-C) and the barnase gene encoding one of the extracellular ribonucleases from *Bacillus amyloliquefaciens* has been constructed and transferred into tobacco. In the cassette, at the linkage site between the 3' termini of Nlb gene and the 5' termini of barnase gene coding region, the heptapeptide consensus sequences, which is the special recognized cleavage site for PVY protease to process the Nlb and coat protein translated from PVY genome, has been kept. The symptom caused by the infection of PVY-C in transgenic tobacco was found to be changed into yellow mosaic and necrosis, which is different from the systematic mosaic infected by PVY-C in non-transgenic tobacco. Majority of the transgenic plants died of yellow mosaic and necrosis among 8~25 days of post-inoculation. Fortunately, three of total seventeen transgenic plants just show yellow mosaic and necrosis limited to the inoculated and the adjacent 1~2 non-inoculated leaves, the top 2 leaves have not been infected by virus. A possible hypothesis has been proposed to explain the phenomena.

**Key words** Plant hypersensitivity, potato virus Y, nuclear inclusion b (Nlb), barnase, transgenic plant