

中国番茄黄化曲叶病毒双向启动子的鉴定*

关翠萍 周雪平**

浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029

摘要 以中国番茄黄化曲叶病毒(TYLCCNV)Y10分离物感染的烟草植物总DNA为模板, 扩增病毒双向启动子片段, 并分别以不同方向与 *gus* 基因和 *nos* 终止子融合, 构建了植物表达载体. 用土壤杆菌介导的方法将质粒载体导入本氏烟叶片细胞和植株茎部进行瞬时表达结果表明, 互补链和病毒链启动子均能驱动 *gus* 基因表达, 并且互补链启动子的活性高于病毒链启动子的活性. TYLCCNV 伴随的卫星DNA β 分子的 β C1的表达载体与启动子载体进行瞬时共表达时, β C1对病毒链和互补链启动子的活性均没有调节作用.

关键词 中国番茄黄化曲叶病毒 双向启动子 瞬时表达

双生病毒科(*Geminiviridae*)病毒是一类植物单链DNA病毒, 该科分类上被划分为4个属, 即玉米线条病毒属(*Mastrevirus*)、菜豆金黄花叶病毒属(*Begomovirus*)、曲顶病毒属(*Curtovirus*)和伪曲顶病毒属(*Topocuvirus*). 大多数病毒属于菜豆金色花叶病毒属. 该属病毒互补链通常编码4个开放阅读框(ORF), 分别为AC1蛋白(又称复制蛋白), AC2蛋白(转录激活蛋白), AC3蛋白(复制增强蛋白)和AC4蛋白; 病毒链编码有两个ORF, 分别为AV1蛋白(又称外壳蛋白)和AV2蛋白. 在病毒链和互补链第一个ORF之间存在1个约200—300核苷酸长的非编码区(intergenic region, IR), 由于它能启动病毒链和互补链基因的转录, 所以这一区域又被称为双向启动子. 目前已有多种双生病毒的启动子活性被鉴定, 并且互补链的启动子活性通常高于病毒链^[1-5].

中国番茄黄化曲叶病毒(TYLCCNV)Y10分离物是本实验室鉴定的伴随有DNA β 分子的双生病毒^[6]. 本研究以该分离物为材料, 用瞬间表达的方法鉴定了该病毒的双向启动子活性, 并分析与TYLCCNV伴随的卫星分子—DNA β 分子编码的

β C1蛋白对双向启动子活性的调节作用.

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 及根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105由本实验室保存, 植物表达载体pINT121由中国科学院微生物研究所方荣祥研究员惠赠, 植物表达载体pBINGUS, pBIN- β C1均由本实验室构建. 本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)植株生长于温室中, TYLCCNV Y10分离物由本实验室鉴定, 限制性内切酶购自上海生工公司, 克隆载体pMD18-T购自大连宝生物工程公司.

1.2 植物总DNA的制备

按照Zhou等^[7]的方法从感染TYLCCNV的烟草叶片中提取植物总DNA.

1.3 双向启动子的克隆

根据TYLCCNV Y10分离物基因组(GenBank

2005-02-05收稿, 2005-03-07收修改稿

* 国家杰出青年科学基金(批准号: 30125032)和国家自然科学基金(批准号: 30270062)资助项目

** 通讯作者, E-mail: zzhou@zju.edu.cn

登录号: AJ319675) 的序列设计特异性引物 TYLCCNV-F (5'-TTGACTGGTCAATTGGTGTC-3', 相应于 TYLCCN 的 2592—2611 位) 和 TYLCCNV-R (5'-TAATCTCTAGCACGAATGACTAA-3', 相应于 TYLCCNV 的 288—266 位), 以提取的 TYLCCNV 感染的植物总 DNA 为模板, 扩增双向启动子片段. 将扩增片段连至克隆载体 pMD18-T 上, 用通用引物 M13 和启动子引物 TYLCCNV-R 或 TYLCCNV-F 筛选得到病毒链方向插入载体的克隆 pMD-V 及互补链方向插入载体的克隆 pMD-C, 将筛选获得的阳性克隆进行测序验证.

1.4 表达载体的构建

表达载体 pINT121 包含 CaMV 35S-*gus-nos* 表

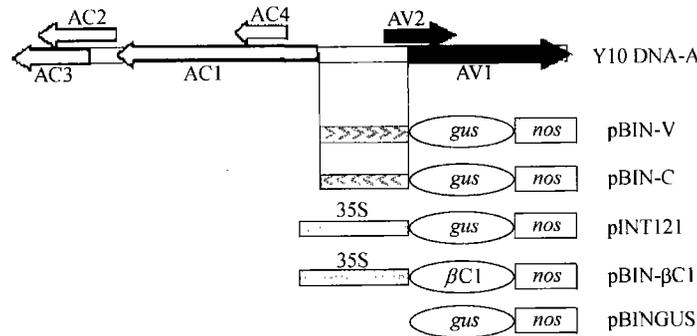


图1 表达载体结构示意图

1.5 瞬间表达

用土壤杆菌介导的方法进行瞬间表达^[8]. 将含有重组质粒的根癌土壤杆菌在 YEB 液体培养基中培养, 28°C 摇菌至对数生长期, 收集菌体, 用 MMA 溶液 [10 mmol/L 2-(N-吗啉)-乙基磺酸 (MES), 100 μmol/L 乙酰丁香酮, 10 mmol/L MgCl₂] 调整菌液浓度至 OD₆₀₀ = 1.5, 室温静止放置 2 h. 选取 6-7 周龄本氏烟植株中部的近完全展开叶, 用 1 mL 的一次性注射器将菌液浸润于每片叶片的脉间细胞, 用于荧光光度分析; 另外, 注射等量菌液于一些植株的茎中部, 用于组织化学分析. 在浸润的过程中, 一种载体单独浸润的菌液用量为 300 μL; 当两种载体共浸润时, 每种载体的菌液各取 300 μL 等量混匀后离心, 再用 300 μL 的 MMA 溶液重悬菌体用于浸润. 64 h 后取样进行活性分

析, 每个样品至少重复 4 次. 达盒, 作为阳性对照; pBINGUS 由 pINT121 中 *gus-nos* 片段插入质粒载体 pBINPLUS 的 *Bam*HI/*Eco*RI 位点构建而成, 作为阴性对照. 将克隆载体 pMD-V 和 pMD-C 经 *Sal*I/*Xba*I 酶切后插入表达载体 pBINGUS 的 *Sal*I/*Xba*I 位点, 使其与下游的 *gus-nos* 片段融合, 筛选后分别得到病毒链启动子重组质粒 pBIN-V 和互补链启动子重组质粒 pBIN-C. 表达载体 pBIN-βC1 为本实验室构建, 其中 βC1 基因置于 CaMV 35S 启动子下游并与 *nos* 片段融合 (图 1). 将构建后的所有表达载体通过三亲交配的方法分别导入根癌土壤杆菌 EHA105 中, 用于瞬间表达.

析, 每个样品至少重复 4 次.

1.6 组织化学染色

采取植株的茎进行 GUS 组织化学染色^[9]. 用注射点上部的茎做徒手切片, 置于含有 1 mmol/L X-Gluc 的 GUS 染色液中 37°C 温育 3-12 h. 染色后将切片样品用 75% 乙醇脱色至无色, 于解剖镜 (Leica DC300, Mannheim, Germany) 下观察照相.

1.7 荧光光度测定

采取浸润后的叶片用于荧光光度分析^[9]. 将叶片用液氮研磨至粉末状, 加入 3 倍体积的 GUS 提取液 (50 mmol/L 磷酸缓冲液 pH 7.0, 10 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠, 0.1% Triton X-100, 0.1% 十二烷基肌氨酸钠, 10 mmol/L β-巯基乙醇), 4°C 下 12000 r/min 离心 10 min, 上清吸于一干净离心管

中用于GUS荧光活性的测定. 取10 μL的上清与1 mmol/L (4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖醛酸)(4-MUG)反应30 min, 0.2 mol/L 碳酸钠终止反应. 用荧光光度仪(Perkinelmer LS50B, Pharmacia)测定GUS荧光光度值, 生物分光光度计(Eppendorf, Hamburg, Germany)测定蛋白含量.

1.8 GUS 活性分析

启动子的相对GUS活性以测得的GUS荧光值相对于35S启动子的GUS荧光值的百分数表示, 取平均值并计算标准差, 用SPSS 12.0 统计分析软件中ANOVA的LSD方法进行多重比较分析.

2 结果与分析

2.1 双向启动子的克隆和表达载体的构建

以感染TYLCCNV的烟草植物总DNA为模板, 用特异性引物扩增得到大小约为0.4 kb的双向启动子片段, 与预测的大小一致. 将扩增片段连至克隆载体pMD18-T上, 经筛选获得病毒链和互补链插入方向的阳性克隆pMD-V和pMD-C, 用SalI/XbaI双酶切切下外源片段插入表达载体pBINGUS的SalI/XbaI位点, 筛选后分别获得含病毒链启动子的质粒载体pBIN-V和互补链启动子

的质粒载体pBIN-C.

2.2 双向启动子的序列分析

启动子序列测定结果表明, 克隆的片段含有完整的双向启动子区, 全长为434 nt. 用PlantCARE (<http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE/index.htm>)程序分析双向启动子序列, 结果见图2. 图中AV1的翻译起始位点A定为+1, TATA-box, CAAT-box, GC-motif, G-box和Stem-loop用方框表示, 其他特征序列用下划线表示, 向右箭头代表病毒链方向, 向左箭头代表互补链方向. 在病毒链和互补链启动子中含有大多数真核生物中存在的一些顺式作用元件, 如TATA-box, CAAT-box, G-box和GC-motif. 在病毒链启动子序列中, TATA-box位于转译起始位点上游的-195 nt处, 在TATA-box上游的43 nt处有一个CAAT-box(-238 nt); 在互补链启动子序列中, 离转译起始位点最近的TATA-box位于上游的-371 nt处, 在其上游的24 nt处有一个CAAT-box(-347 nt). 其他顺式元件如G-box, GC-motif也在病毒链和互补链转译起始位点的上游被鉴定. 在病毒链和互补链启动子序列的茎环上游包含4个重复序列, 这些序列在其他双生病毒中也存在, 推测它们

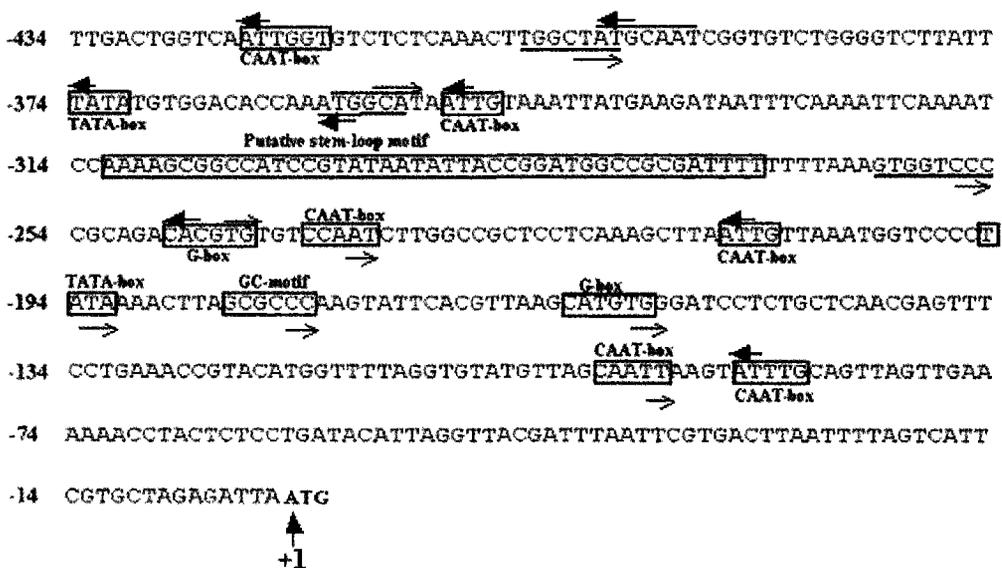


图2 双向启动子的核苷酸序列及结构

可能是病毒互补链编码的 AC1 蛋白的识别和结合位点, 与病毒复制起始有关^[5, 10]. 另外, 在病毒链启动子序列的-262 nt 处鉴定了一个在多数双生病毒共同区都存在的晚期保守因子 CLE(GTGGTCCC), 它被认为是转录激活蛋白的结合位点^[10].

2.3 双向启动子的组织化学检测

为了鉴定双向启动子是否具有活性, 将含有载体 pBIN-V 和 pBIN-C 的土壤杆菌菌液注射到植株茎中进行瞬间表达, 用注射点上部的茎做徒手切片

后在 GUS 染色液中染色, 结果表明, 在 pBIN-V (图 3(a)) 和 pBIN-C (图 3(b)) 表达的植株茎部的维管组织和部分皮层细胞都可观察到蓝色位点, 说明两者都能驱动 *gus* 基因在植物细胞中表达, pINT121 的 35 S 启动子呈现了强 GUS 染色(图 3(c)), 在 pBINGUS 表达的茎部细胞中没有观察到蓝色位点(图 3(d)). 组织化学染色结果表明, 瞬间表达中, 病毒链启动子和互补链启动子均能驱动 *gus* 基因表达.

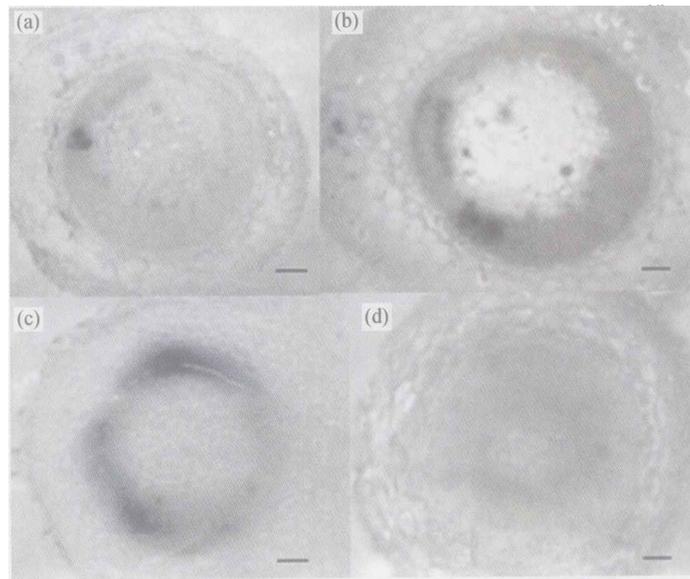


图3 烟草茎中 GUS 瞬间表达活性的组织化学检测
(a)–(d) 分别为 pBIN-V, pBIN-C,
pINT121, pBINGUS, 图中标尺为 20 μm

2.4 双向启动子的荧光活性测定

浸润 64 h 后, 采取叶片测定启动子的 GUS 荧光活性值. 分析结果见图 4, 括号中数字为各样品的实验重复数. 结果表明, pBIN-V 和 pBIN-C 的平均相对 GUS 活性分别是 $(10.90 \pm 1.26)\%$ 和 $(13.54 \pm 2.18)\%$, 二者之间存在显著性差异 ($P < 0.05$). pBINGUS 的相对活性值为 $(1.17 \pm 0.12)\%$, 与 pBIN-V 之间和 pBIN-C 之间的差异均达到了显著水平 ($P < 0.05$); pINT121 的相对活性值为 $(100.00 \pm 17.70)\%$, 与 pBIN-V 和 pBIN-C 之间的差异均达到了极显著水平 ($P < 0.01$). 以上结果表明病毒链

和互补链启动子均具有活性, 且互补链启动子的活性高于病毒链.

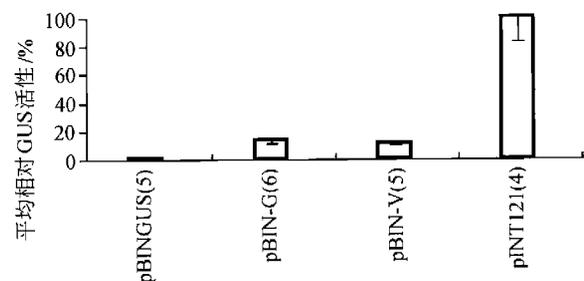


图4 烟草叶片中 GUS 瞬间表达的荧光活性分析

2.5 β C1 蛋白对双向启动子的调节作用

为了明确 β C1 蛋白对双向启动子是否具有调节作用, 将 pBIN- β C1 分别与 pBIN-V 和 pBIN-C 在烟草叶片中共表达, 测定 GUS 活性. 分析结果见图 5, 括号中数字为各样品的实验重复数. 结果表明, 当 pBIN- β C1 与 pBIN-V 共表达时, 相对 GUS 活性是 $(8.98 \pm 1.56)\%$, 与单独浸润 pBIN-V 的活性 $(9.74 \pm 2.78)\%$ 相比, 没有显著性差异 ($P > 0.05$); pBIN- β C1 与 pBIN-C 共表达时的相对 GUS 活性 $(13.26 \pm 3.14)\%$ 与单独浸润 pBIN-C 的活性 $(12.15 \pm 1.78)\%$ 相比, 也没有显著性差异 ($P > 0.05$), 这些结果表明当 β C1 蛋白与双向启动子载体共表达时, 对启动子的活性没有明显的调节作用.

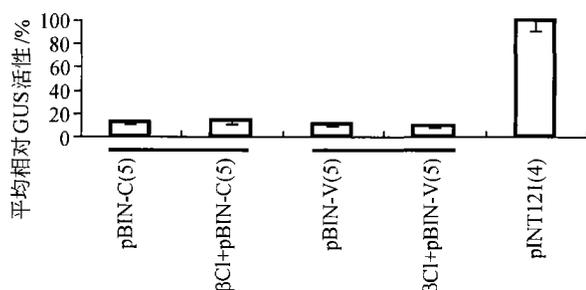


图 5 β C1 蛋白对双向启动子 GUS 瞬间表达荧光活性的影响

3 讨论

本研究通过瞬间表达的方法测定了 TYLCCNV 的双向启动子活性. 组织化学染色分析表明, 病毒链和互补链启动子都能驱动 *gus* 基因的表达, 用 PlantCARE 程序对启动子序列分析时发现了双向启动子序列中包含大多数真核启动序列中都存在的顺式作用元件 TATA-box 和 CAAT-box. 另外, 在启动子序列中还鉴定了几个 G-box 和 GC-motif, 它们是双生病毒共同区中普遍存在的保守元件. 研究表明, G-box 能与寄主转录因子结合促进基因的转录, 在番茄金色花叶病毒(TGMV)的 AL61 启动子中, G-box 作为一种强顺式作用元件与寄主因子作用激活 *luc* 基因的表达. 香蕉束顶病毒(BBTV)的 DNA-6 的启动子中 G-box 的同源序列也参与了对启动子活性的调节^[4, 10, 11]. GC-motif 能够与寄主因子互作来激活病毒链基因的表达, 缺失这一基序, 将会导

致启动子活性丧失^[12-14].

双向启动子的荧光光度测定结果表明, 互补链启动子的活性高于病毒链启动子的活性, 与多数双生病毒中启动子的鉴定结果相一致, 这可能与互补链基因编码早期基因产物, 而病毒链编码晚期基因产物有关^[1, 3, 5]. 在病毒链启动子序列的 -262 nt 处, 发现一个多数双生病毒都具有的晚期保守因子 (CLE, GTGGTCCC), 它通常被认为与双生病毒互补链的转录激活因子 TrAP 相结合, 以激活病毒链基因的转录^[15, 16]. TrAP 对病毒链启动子的活性是否具有调节作用, 还需要进一步的实验来证明.

某些单组分双生病毒伴随有卫星分子-DNA β , 其基因组大小为 DNA-A 的一半^[6, 17, 18]. 在已经鉴定的所有 DNA β 分子中, 都含有一个位置和大小保守的 ORF- β C1, 研究表明, β C1ORF 编码产物是一个重要的症状决定因子^[19, 20]. DNA β 分子依赖辅助病毒进行复制, 辅助病毒需要 DNA β 分子产生典型症状. 双生病毒 IR 区序列中通常包含参与复制和转录的重要元件, β C1 是 DNA β 分子中惟一的功能蛋白. 为了验证 β C1 蛋白对双向启动子的活性是否具有调节作用, 将 β C1 蛋白与双向启动子在烟草叶片中共表达. GUS 荧光测定结果表明, β C1 蛋白对病毒链启动子和互补链启动子的活性均没有显著的影响, 说明 β C1 蛋白单独存在时, 并没有对双向启动子的活性起调节作用. 当 DNA β 分子存在时, 病毒的复制量明显增加, 因为 β C1 蛋白是 DNA β 分子中惟一的功能蛋白, 所以 β C1 蛋白很可能参与 DNA β 与病毒之间的互作. 在很多双生病毒中都发现, 某些编码蛋白如复制相关蛋白, 外壳蛋白以及 AC2/C2 蛋白具有 DNA 结合能力, 并通过与 DNA 结合影响病毒的生命活动^[21-25]. 在已经鉴定的 AC2/C2 蛋白和转录激活机制中, AC2/C2 蛋白能通过不同的细胞因子互作以结合到作用元件上^[26]. 结合本研究结果推测, β C1 蛋白很可能是通过与其他蛋白互作后结合到 DNA 序列上以实现启动子活性的调节.

参 考 文 献

- Zhan X C, Haley A, Richardson K, et al. Analysis of the potential promoter sequences of African cassava mosaic virus by transient expression of the β -glucuronidase gene. J Gen Virol, 1991,

- 72: 2849—2852
- 2 许煜泉, 詹祥灿, Morris B. 烟草黄矮双生病毒中双向启动子的活性及其调节控制. 病毒学报, 1998, 14: 68—74
 - 3 Haley A, Zhan X C, Richardson K, et al. Regulation of the activities of *African cassava mosaic virus* promoters by the AC1, AC2, and AC3 gene products. *Virology*, 1992, 188: 905—909
 - 4 Eagle P A, Hanley-Bowdoin L. Cis element that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *J Virol*, 1997, 71: 6947—6955
 - 5 谢迎秋, 朱 祯, 吴 茜, 等. 一种强启动子的分离与功能. 植物学报, 2000, 42(1): 50—54
 - 6 Zhou X P, Xie Y, Tao X R, et al. Characterization of DNA β associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. *J Gen Virol*, 2003, 84: 237—247
 - 7 Zhou X P, Xie Y, Zhang Z K. Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting tobacco in Yunnan, China. *Arch Virol*, 2001, 146(8): 1599—1606
 - 8 Yang Y N, Li R G, Qi M. *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J*, 2000, 22(6): 543—551
 - 9 Jefferson R A, Kavanaugh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, 6: 3901—3907
 - 10 Argüello-Astorga G R, Guevara-Gonzalez R G, Herrera-Estrella L R, et al. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology*, 1994, 203: 90—100
 - 11 Dugdale B, Beetham P R, Becker D K, et al. Promoter activity associated with the intergenic regions of *Banana bunchy top virus* DNA-1 to -6 in transgenic tobacco and banana cells. *J Gen Virol*, 1998, 79(10): 2301—2311
 - 12 Fenoll C, Black D M, Howell S H. The intergenic region of maize streak virus contains promoter elements involved in rightward transcription of the viral genome. *EMBO J*, 1988, 7: 1589—1596
 - 13 Fenoll C, Schwarz J J, Black D M, et al. The intergenic region of *Maize streak virus* contains a GC-rich element that activates rightward transcription and binds maize nuclear factors. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 865—877
 - 14 Collin S, Fernandez-Lobato M, Gooding P S, et al. The two non-structural proteins from *Wheat dwarf virus* involved in viral gene expression and replication are retinoblastoma-binding proteins. *Virology*, 1996, 219: 324—329
 - 15 Ruiz-Medrano R, Guevara-Gonzalez R G, Argüello-Astorga G R, et al. Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the pepper huasteco virus coat protein gene. *Virology*, 1999, 253: 162—169
 - 16 Hung H C, Petty I T D. Functional equivalence of late gene promoters in *Bean golden mosaic virus* with those in *Tomato golden mosaic virus*. *J Gen Virol*, 2001, 82: 667—672
 - 17 Saunders K, Bedford I D, Briddon R W, et al. A unique virus complex caused ageratum yellow vein disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6890—6895
 - 18 Briddon R W, Mansoor S, Bedford I D, et al. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology*, 2001, 285: 234—243
 - 19 Cui X F, Tao X R, Xie Y, et al. A DNA β associated with *Tomato yellow leaf curl China virus* is required for symptom induction. *J Virol*, 2004, 78: 13966—13974
 - 20 Saunders K, Norman A, Gucciardo S, et al. The DNA β satellite component associated with ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein (β C1). *Virology*, 2004, 324: 37—47
 - 21 Fontes E P B, Luckow V A, Hanley-Bowdoin L. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *Plant Cell*, 1992, 4: 597—608
 - 22 Liu H, Boulton M I, Davies J W. Maize streak virus coat protein binds single- and double-stranded DNA in vitro. *J Gen Virol*, 1997, 78: 1265—1270
 - 23 Palanichelvam K, Kunik T, Citovsky V, et al. The capsid protein of *Tomato yellow leaf curl virus* binds cooperatively to single-stranded DNA. *J Gen Virol*, 1998, 79: 2829—2833
 - 24 Noris E, Jupin I, Accotto G P, et al. DNA-binding activity of the C2 protein of tomato yellow leaf curl geminivirus. *Virology*, 1996, 217: 607—612
 - 25 Van wezel R, Liu H T, Wu Z R, et al. Contribution of the zinc-finger to zinc and DNA binding by a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol*, 2003, 77: 696—700
 - 26 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