

甜菜黑色焦枯病毒外壳蛋白 与病毒致病性的关系*

曹云鹤 原雪峰 王晓星 郭立华

蔡祝南 韩成贵 李大伟** 于嘉林

(中国农业大学, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 利用 RT-PCR 方法, 构建获得了由 T7 RNA 聚合酶启动子驱动的甜菜黑色焦枯病毒 (BBSV) 全长 cDNA 克隆 pUBF52. 摩擦接种苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 后, 体外转录产物可导致与野生病毒相同的枯斑症状, 蛋白质印迹和 RNA 印迹检测也都证明了转录产物的侵染活性. 构建了 BBSV p24 基因的原核表达载体 pECP1, 转化大肠杆菌 BL21 后的诱导表达产物能够与 BBSV 的抗血清呈现特异性反应, 表明该基因编码产生 BBSV 的外壳蛋白(CP). 以 pUBF52 为模板, 分别构建了 BBSV CP 基因的移码突变体和不同程度的缺失突变体. 侵染性检测表明, CP 基因的移码突变对 BBSV 在苋色藜上所导致的枯斑症状及病毒 RNA 在寄主体内的积累基本没有影响, 但 CP 基因的大部或完全缺失会使体内病毒 RNA 的积累水平大大降低, 其中 CP 基因完全缺失的突变体转录物接种苋色藜后仅能够产生很轻的枯斑症状. 将绿色荧光蛋白 (GFP) 基因和葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因分别与 BBSV CP 基因的 5'端融合, 构建了表达载体 pBGFP 和 pBGUS. 摩擦接种苋色藜叶片后可观察到 GFP 或 GUS 基因的表达, 为探索利用 BBSV 作为外源蛋白的表达载体奠定了基础.

关键词 甜菜黑色焦枯病毒, 侵染性 cDNA 克隆, 外壳蛋白, 致病性

学科分类号 Q939.46

20 世纪 80 年代以来, 在我国新疆、宁夏、内蒙古、甘肃、黑龙江、吉林等甜菜主产区陆续发现了一种黑色焦枯型甜菜病毒病害, 给生产带来了巨大的损失. 该病害在甜菜上的症状主要表现为叶片直立向上, 叶脉间产生黑色焦枯病斑, 叶缘内卷, 根毛大量坏死等, 对甜菜生产的危害已超过甜菜丛根病 (Rhizomania), 并且日趋加重^[1~3]. 本实验室经过十多年的研究, 根据该病原病毒的生物学和血清学性质、真菌传播特点、基因组的大小和结构、核苷酸序列同源性, 以及在某些分离物中存在卫星 RNA 组分等研究结果, 在国际上首次证明该病毒为番茄丛矮病毒科 (Tombusviridae) 坏死病毒属 (Nerovirus) 的一种新的病毒, 定名为甜菜黑色焦枯病毒 (*Beet black scorch virus*, BBSV)^[4~6].

BBSV 仅在我国发现, 在其他国家或地区还没有关于该病毒报道. 自然条件下 BBSV 只侵染甜菜, 人工机械接种条件下可侵染 4 科 15 种植物, 如苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、番杏 (*Tetragonia expansa*) 和本氏烟 (*Nicotina benthamiana*)

等. BBSV 是一种直径为 28 nm 的球型病毒, 外壳蛋白 (coat protein, CP) 亚基为单一组分, 分子量约为 24.5 ku. BBSV 基因组为一条 ss(+)RNA, 由 3 644 个核苷酸组成 (宁夏分离物 and 新疆分离物的 GenBank 登录号分别为 AF452884 和 AY626780), 包含 6 个开放阅读框 (ORFs) (图 1). 位于基因组 RNA 5'端的 ORF₁ 编码一 23 ku 的蛋白质, 其琥珀终止密码子 UAG 通读后产生 82 ku 蛋白, 通读区具有病毒复制酶的保守序列 GDD. ORF₃、ORF₄ 和 ORF₅ 编码 3 个紧密相连的小蛋白 P7a、P7b 和 P5', 协同决定病毒的胞间运动. 位于 3'端的 ORF₆ 编码一 24.5 ku 的蛋白质 (p24), 与病毒的外壳蛋白分子质量大小相当, 推测为病毒的外壳蛋白基因, 但还没有实验证据证明^[6,7]. 本研究在通过原核表达证明

*国家自然科学基金 (30325001 和 30270063) 和国家高技术研究发展计划 (863) 重大专项 (2002AA206641) 资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 010-62733326, E-mail: Lidw@cau.edu.cn

收稿日期: 2005-09-06, 接受日期: 2005-12-05

ORF₆ 编码蛋白为 BBSV 外壳蛋白的基础上, 利用 BBSV 的侵染性 cDNA 克隆, 研究了 BBSV 外壳蛋白与病毒的致病性的关系.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒毒源和抗血清. BBSV 宁夏分离物^[4]由本实验室采自宁夏甜菜产区, 摩擦接种莧色藜叶片活化后, 提取病毒, 低温保存. BBSV 特异性抗血清由本实验室制备并保存.

1.1.2 菌种和质粒. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10b 和 BL21(DE3)、质粒 pET-28a(+) (Novagen 公司) 和 pUC19 由本实验室保存, pUCm-T 载体购自上海生工生物技术有限公司.

1.1.3 工具酶、引物及其他试剂. M-MLV 反转录酶、T7 RNA 聚合酶购自 Promega 公司, *Pfu* DNA 聚合酶购自上海生工公司, T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、Klenow 酶和限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司, 其他试剂均为国产分析纯. 所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 病毒与病毒 RNA 的提取. 参照薄玉霞等^[5]的方法从感染 BBSV 的病叶中提取病毒, 利用苯酚-氯仿抽提获得病毒 RNA.

1.2.2 CP 基因原核表达载体构建. 根据 ORF₆ 的核苷酸序列设计引物 BB-15: 5' GGGAATTCCATA-TGGCACCTAAGCGCAA 3' (与 BBSV 基因组的 2 647~2 663 nt 相对应, 并引入 *Nde* I 酶切位点). 以含 BBSV 3'端 2.3 kb 的重组质粒 pGA83 为模板, 以 BB-15 和位于载体 (T-easy, Promega 公司) 上的通用引物 SP6(5' CATACGATTTAGGTGACACTA-TAG 3')为引物进行 PCR 扩增, 获得约 1.0 kb 的 DNA 片段, 琼脂糖凝胶电泳回收后, 以 *Nde* I 酶切回收的 DNA 片段, 插入 pET-28a(+) 的 *Nde* I 位点, 经酶切鉴定, 获得 ORF₆ 的原核表达载体 pECP1.

1.2.3 BBSV 侵染性 cDNA 克隆的构建. 根据 BBSV RNA 5'端序列, 设计引物 BB-18(5' TGTAATACGACTCACTATAgAAGAAACCTAACCAGTTTC-TCGTTGATCAGCGAT 3', 与 1~34 nt 序列相对应, 下划线为 T7 RNA 聚合酶的启动子序列, 其下游的 g 是为了提高转录效率而引入的^[6]) 和 BB-14 (5' TCCCCCGGGCCACCTGGAAGACCAGGTAT-AT 3', 与 3 621~3 644 nt 序列互补, 下划线为引

入的 *Sma* I 位点). 以提纯的 BBSV RNA 为模板, 以 BB-14 为引物反转录合成 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 用 BB-14 和 BB-18 引物进行 PCR 扩增 (94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 4 min), 获得了 BBSV 全长 cDNA. PCR 产物经 T4 DNA 聚合酶切平后, 连入载体 pUC19 的 *Sma* I 位点. 经蓝/白斑筛选、酶切鉴定, 获得 BBSV 全长 cDNA 克隆 pUBF52.

1.2.4 BBSV 外壳蛋白(CP)基因突变体的构建.

用 *Eco*N I 单酶切 pUBF52, Klenow 酶补平后, 用 T4 DNA 连接酶催化自连接, 获得 CP 基因的移码突变体 pBSCP4, 该突变体可表达产生一种由 37 个氨基酸组成的蛋白质, 其中前 23 个氨基酸与 CP N 端一致.

用 *Pst* I 酶切 pUBF52, 产生 5.3 kb、0.55 kb 和 0.4 kb 3 个片段, 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳回收其中的 5.3 kb 和 0.4 kb 的 2 个片段, 然后进行连接, 经酶切鉴定, 获得了 CP 基因中间 552 nt (缺失 2 719~3 270 nt, 两末端仍各保留了 72 nt) 缺失的突变体 pBDCP.

以 pUBF52 为模板, 以 BB-20 (5' TTATTGACTATACTAGAAAGC 3', 与 2 623~2 643 nt 互补) 和 BB-21 (5' ATCCCACATCCTGGTGTGG 3', 与 3 345~3 364 nt 相对应) 为引物, 进行反向 PCR 扩增 (94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 6 min, 共 30 个循环), 获得 5.6 kb 的 PCR 产物, 扩增产物经 T4 DNA 聚合酶切平后自我连接, 获得 CP 基因完全缺失的突变体 pDCP18 (图 1).

1.2.5 GFP 和 GUS 表达载体的构建. 以 pUBF52 为模板, 用引物 BB-21 和 BB-46 (5' CTAGCCTCC-TGCAGCAGGAGCCCG 3', 与 2 704~2 724 nt 互补, 下划线为引入的终止密码子) 进行反向 PCR 扩增 (94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 6 min, 共 30 个循环), 扩增产物经 T4 DNA 聚合酶切平后自连接, 经过筛选获得仅保留 p24 基因 5' 端 78 nt 的突变体 pDCPcs1. *Eco*N I 单酶切 pDCPcs1 后, 用 Klenow 酶补平, 与完整的 GFP 基因 (*gfp*mut2)^[9] 或者 GUS 基因 (由质粒 pBI121 扩增获得)^[10] 分别连接, 经过筛选和鉴定, 构建 GFP 蛋白和 GUS 蛋白融合在 CP N 端 23 个氨基酸下游的表达载体 pBGFP 和 pBGUS (图 1).

1.2.6 CP 基因的诱导表达、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析及蛋白质印迹. 按照《分子克隆实验指南》^[11] 的方法进行 pECP1 的诱导表达和表达产物

的蛋白质印迹(Western blotting)分析, 其中蛋白质转膜采用电转移的方法, BBSV 特异性抗血清稀释 300 倍后使用.

1.2.7 BBSV 侵染性 cDNA 克隆的体外转录与摩擦接种.

以约 100~200 ng 线性化的质粒为模板, 在灭菌的 Eppendorf 管中依次加入 6 μ l 10 mmol/L NTP

(ATP、GTP、CTP 和 UTP 各 1.5 μ l)、3 μ l 100 mmol/L DTT、30 U RNasin 和 10 U T7 RNA 聚合酶, 补水至 30 μ l, 37 $^{\circ}$ C 保温 1.5 h 进行体外转录.

将体外转录物与等体积的 2 $\times$ GKP 缓冲液 (50 mmol/L 甘氨酸, 30 mmol/L K₂HPO₄, pH 9.2, 1% 皂土, 1% 硅藻土)混合, 均匀涂抹苋色藜 (*C. amaranticolor*) 叶片.

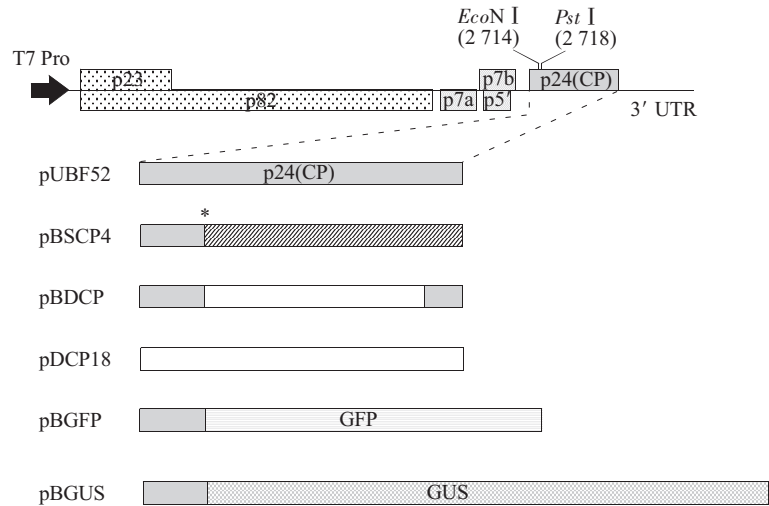


Fig. 1 Organization of BBSV genome and its mutants for CP gene

1.2.8 RNA 印迹(Northern blotting). 采用 DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) 试剂盒, 探针标记、预杂交、杂交、洗膜和显色等步骤均按照该试剂盒的说明进行. 探针为地高辛标记的 BBSV 基因组 3'端非编码区 (由引物 BB-21 和 BB-14 扩增质粒 pUBF52 获得, 片段大小为 0.3 kb).

1.2.9 GFP 表达的显微观察. 取接种后 3~4 天的叶片, 置于载玻片上, 加少许水, 盖上盖玻片, 在 488 nm 蓝光激发下, 用激光共聚焦显微镜 (Carl Zeiss LSM 510) 观察 (10 倍物镜).

1.2.10 GUS 的组织化学染色. 取新鲜的叶片在固定液 (1% 甲醛, 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 0.05% Triton X-100) 中固定 30 min. 将固定后的叶片放在染色液 (50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 0.1 mol/L K₃[Fe(CN)₆], 0.1 mol/L K₄[Fe(CN)₆], 10 mmol/L Na₂•EDTA, 0.001%(体积比) Triton X-100, 20% 甲醇, 0.05 g/L X-Gluc) 中染色 16 h 以上, 避光, 轻摇. 染色后的叶片放在脱色液 (5% 甲醛, 5% 乙酸, 5% 乙醇) 中脱色, 直到颜色清晰为止.

2 结果与分析

2.1 BBSV ORF₆ 编码的 p24 蛋白是病毒的外壳蛋白亚基

构建的原核表达载体 pECP1 含有完整的 ORF₆ 及其下游的 3'端非编码区, 表达产物经 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和考马斯亮蓝 -R250 染色, 结果表明: IPTG 诱导后, pECP1 可以特异表达出约

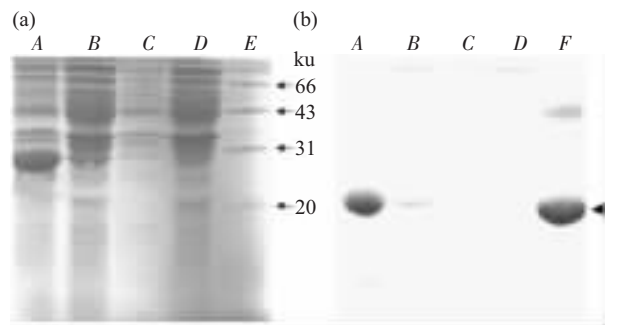


Fig. 2 Expression of p24 protein coding by BBSV ORF₆ in *E. coli* (a) and its Western blotting analysis (b)
A: pECP1 induced with IPTG; B: pECP1 without IPTG induction; C: pET28a (+) induced with IPTG; D: pET28a (+) without IPTG induction; E: Protein molecular mass marker; F: Purified BBSV virions.

27 ku 的蛋白质(图 2a), 与预期的融合蛋白的大小相符. 利用 BBSV 特异性抗血清(由提纯的病毒粒子免疫家兔所制备)对表达产物进行了 Western blotting 检测, 表达产物呈现阳性反应, 所表达的特异蛋白略大于病毒的外壳蛋白(图 2b), 因此证明 BBSV ORF₆ 编码的 p24 蛋白为病毒的外壳蛋白亚基.

2.2 BBSV 侵染性 cDNA 克隆的构建及其侵染性检测

采用 RT-PCR 的方法扩增获得了 BBSV 的全长 cDNA 片段(图 3), 在其 5' 端含有 T7 RNA 聚合酶识别的启动子序列, 在该序列和 BBSV cDNA 序列之间引入了一个额外的核苷酸 G, 以提高体外转录的效率^[8]. BBSV cDNA 的 3' 端序列为 CCC, 因此在设计引物 BB-14 时引入一个 *Sma* I 酶切位点(BBSV cDNA 序列中无此位点), 以使 *Sma* I 线性化的侵染性 cDNA 克隆的体外转录物在其 3' 端不存在额外的核苷酸. 将 BBSV 全长 cDNA 克隆到 pUC19 的 *Sma* I 位点, 获得重组质粒 pUBF52.

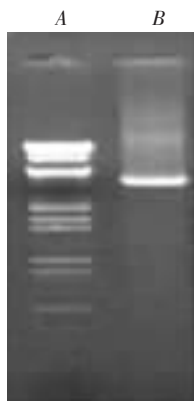


Fig. 3 RT-PCR amplification of full-length cDNA of BBSV RNA

A: λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III marker; B: PCR product.

将 pUBF52 用 *Sma* I 线性化后进行体外转录, 经琼脂糖凝胶电泳检查, 体外转录物与病毒 RNA 大小相当(图 4). 将体外转录物与 2× GKP 缓冲液混合后, 摩擦接种苋色藜叶片, 3~4 天后产生与 BBSV RNA 接种相同的枯斑症状.

提取发病苋色藜叶片的总 RNA, 以 BBSV 3' 端 cDNA 为探针进行 Northern blotting 检测, 均产生相同的杂交条带, 即 BBSV 在寄主体内复制过程中, 除产生基因组 RNA 外, 还产生 2 条亚基因组 RNA. Western blotting 检测结果证明, pUBF52

的体外转录物不仅可以在寄主体内复制, 而且可以表达产生相同大小病毒外壳蛋白(图 5), 因此说明所构建 BBSV 侵染性 cDNA 克隆 pUBF52 是具有生物活性的.

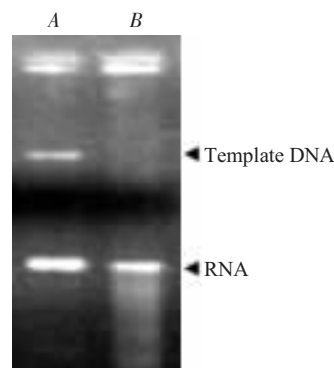


Fig. 4 *In vitro* transcripts of BBSV full-length cDNA clone
A: *In vitro* transcript of pUBF52; B: BBSV RNA.

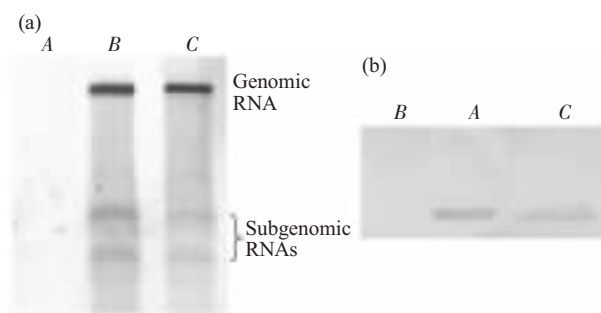


Fig. 5 Northern blotting (a) and Western blotting (b) detection for the infectivity of *in vitro* transcript of BBSV full-length cDNA clone (pUBF52)

A: Leaves inoculated with purified BBSV RNA; B: Mock inoculation with 2× GKP buffer; C: Leaves inoculated with *in vitro* transcript of pUBF52.

2.3 BBSV CP 基因突变体的构建及其对苋色藜的致病性

以 BBSV 侵染性 cDNA 克隆 pUBF52 为模板, 按照 1.2.4 部分所述的方法, 构建了 BBSV CP 基因的近 5' 端(位于 2 717 nt 处)的移码突变体 pBSCP4、中间 552 nt 缺失的突变体 pBDCP 和 CP 基因完全缺失突变体 pDCP18. 经 DNA 序列测定验证, 所获得的 3 种突变体的突变区域均与预计相符.

按照前述的方法, 将各突变体用 *Sma* I 线性化后, 进行体外转录并摩擦接种苋色藜叶片, 其中移码突变体 pBSCP4 和缺失突变体 pBDCP, 无论显症时间的长短还是症状的严重程度上都与野生型

pUBF52没有明显的区别. 而 CP 基因完全缺失的突变体 pDCP18 的体外转录物接种苋色藜叶片后, 叶片的发病时间延长 3~4 天, 大约 1 周左右才显症, 而且发病程度明显减轻, 且主要以褪绿斑为主 (图 6). 因此说明, 突变体虽然不能产生完整的外壳蛋白, 但对苋色藜的致病性并没有发生明显的改变.

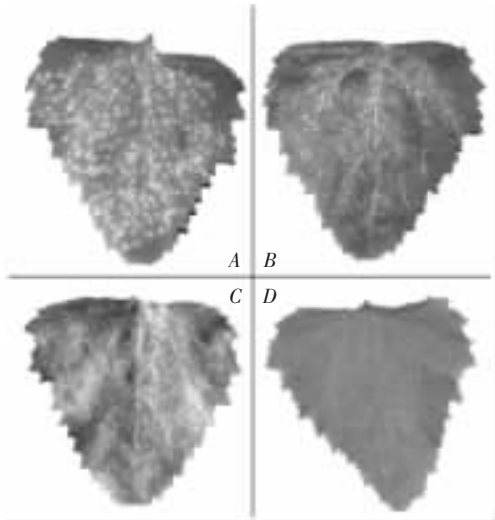


Fig. 6 Symptoms of *C. amaranticolor* infected by pUBF52 and its mutants for CP gene
A: Leaf inoculated with pUBF52; B: Leaf inoculated with pBSCP4; C: Leaf inoculated with pBDCP; D: Leaf inoculated with DCP18.

以相同浓度的 pUBF52、pBSCP4、pBDCP 和 pDCP18 的体外转录物分别接种苋色藜叶片, 分别在接种后 1 天、3 天和 5 天 (dpi) 提取叶片总 RNA, 以地高辛标记 BBSV 3'端非编码区的 cDNA 为探针进行 Northern blotting 分析 (图 7), 从病毒 RNA 累积量来看, 1dpi 检测结果表明: pBSCP4 与 pUBF52 没有明显区别, 而 pBDCP 和 pDCP18 的病毒 RNA 累积量较 pUBF52 低. 3dpi 和 5dpi 杂交结果显示, 与 pUBF52 相比, pBSCP4 的 RNA 累积量也随时间的延长而渐呈下降趋势.

2.4 BBSV 作为外源基因表达载体的初步探索

为了探索 BBSV 作为外源基因表达载体的可能性及其所能够容纳外源基因的大小, 构建获得 GFP 蛋白和 GUS 蛋白融合在 BBSV CP 蛋白 N 端 23 个氨基酸下游的表达载体 pBGFP 和 pBGUS, 经 DNA 序列测定验证, 所获得的表达载体的相位正确.

pBGFP 和 pBGUS 的体外转录物接种苋色藜后, 仅能看到零星病斑. 由于重组病毒 RNA 的复制水平较低, Northern blotting 很难检测到 (结果未示). 但在共聚焦显微镜下, 可以清晰地观察到 pBGFP 体外转录物接种的苋色藜叶片呈现绿色的荧光. 使用组织化学染色, 可以观察到 GUS 基因在 pBGUS 体外转录物接种的苋色藜叶片中能够表达 (图 8). 因此, BBSV 有进一步开发为外源基因表达载体的潜力.

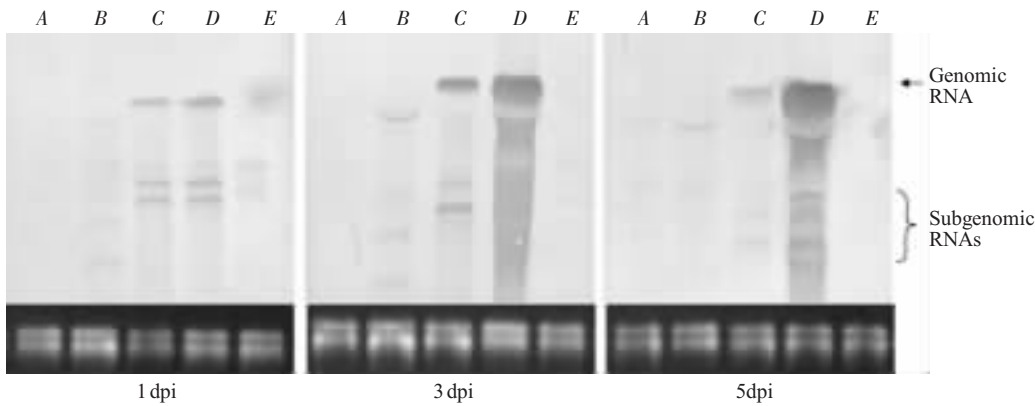


Fig. 7 Northern blotting of the total RNA of *C. amaranticolor* leaves inoculated with pUBF52 and its mutants for CP gene
A: Leaves inoculated with pDCP18; B: Leaves inoculated with pBDCP; C: Leaves inoculated with pBSCP4; D: Leaves inoculated with pUBF52; E: Mock inoculation with 2×GKP buffer.

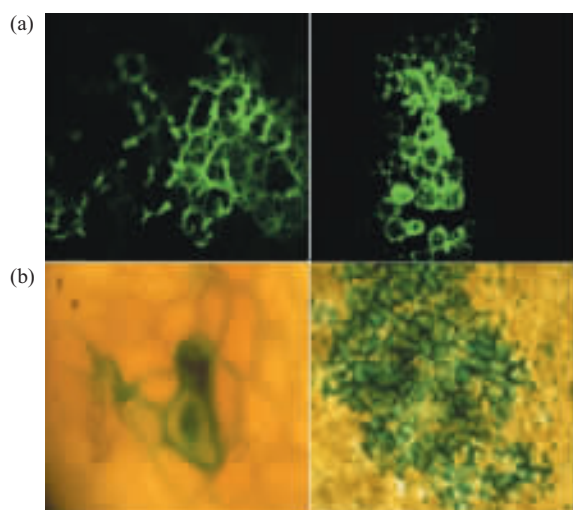


Fig. 8 Expression observation of GFP and GUS genes fused in BBSV CP gene

(a) GFP is observed by confocal microscope (488 nm, 100×); (b) GUS is histochemical stained (left: 400×; right: 100×).

3 讨 论

植物病毒的外壳蛋白 (CP) 是包围在病毒核酸外的一种结构性蛋白, 不同病毒的外壳蛋白的氨基酸序列相似性很低, 除保护核酸免受外界核酸酶的降解外, 外壳蛋白还具有以下功能: a. CP 参与病毒在寄主体内的移动和运输. 病毒在寄主体内的运动包括通过维管束组织的长距离运输和细胞间的短距离移动两种. 在烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 系统侵染烟草的过程中, 其 CP 能帮助病毒 RNA 通过维管束进行长距离运输, 但不参与病毒 RNA 的胞间移动过程^[12-14]. BBSV 的 CP 突变体仍然能在苜蓿上产生与野生型病毒相似的症状, 说明 CP 蛋白可能与 BBSV 的胞间移动无关. 由于尚未找到易于接种的 BBSV 的系统侵染寄主, 因此, CP 在 BBSV 长距离运输过程中的作用尚不清楚. b. CP 与病毒的介体传播有关. 介体传播是很多病毒侵染循环过程中的一个重要环节, 如马铃薯卷叶病毒 (*Potato leafroll virus*, PLRV)、西瓜花叶病毒 (*Watermelon mosaic virus*, WMV) 等病毒的 CP 蛋白就与其蚜虫传毒有关^[15]. Kakani 等^[16, 17]证实, 同属于番茄丛矮病毒科 (Tombusviridae) 的黄瓜坏死病毒 (*Cucumber necrosis virus*, CNV) 的真菌传播是通过病毒粒子的外壳蛋白与游动孢子上的特异受体相互识别而发生的, 位于病毒粒子表面的一些氨基酸与黄瓜油壶菌 (*O. bornovanus*) 特异传播该病毒有关, 而 CNV 吸附到 *O. bornovanus* 游动孢子表面

需要 *O. bornovanus* 的一些寡聚糖 (Oligosaccharide) 的参与. 蒋军喜等^[18]证明 BBSV 是由甘蓝油壶菌 (*O. brassicae*) 以游动孢子鞭毛体外带毒的方式进行传播, BBSV CP 蛋白在真菌传播中的作用以及是否也存在类似 CNV 和真菌介体的特异识别机制尚需进一步的试验证据. c. CP 参与病毒的基因组激活 (genome activation). 雀麦花叶病毒 (*Alfalfa mosaic virus*, AIMV) 的 RNA 在没有病毒外壳蛋白或 CP 亚基因组转录物的情况下, 不能形成有效的侵染^[19, 20], 当 AIMV CP 的 N 端与病毒 RNA 结合后, 其构象发生了改变, 因而使病毒从翻译模式切换到复制模式^[21]. 从本研究的结果看, BBSV 对苜蓿的有效侵染并不需要 CP 的参与. d. CP 与病毒的致病性有关. 已有证据表明芜菁皱缩病毒 (*Turnip crinkle virus*, TCV) 外壳蛋白 N 端 25 个氨基酸具有激发子功能, 能够诱导寄主的过敏性反应^[22]. Wang 和 Simon^[23]的研究也表明, TCV 的 CP 可以调节症状的严重程度. e. CP 是 RNA 沉默的抑制子 (suppressor of RNA silencing). 在病毒与寄主互作的过程中, RNA 沉默是真核生物用来于抵抗病毒入侵的一种普遍的防御机制, 而病毒也相应地通过编码沉默抑制子来对抗寄主的 RNA 沉默. 目前已知, 至少芜菁皱缩病毒 (TCV) 和柑橘速衰病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV) 的 CP 具有抑制 RNA 沉默的功能^[24-26], 我们的初步结果也显示, BBSV 的 CP 对寄主的 RNA 沉默具有一定抑制作用 (待发表).

侵染性检测表明, CP 基因的移码突变 (pBSCP4) 和大片段缺失 (pBDCP) 对 BBSV 在苜蓿上所导致的枯斑症状基本没有影响, CP 基因完全缺失突变体 (pDCP18) 接种苜蓿后仅能够产生很轻的枯斑症状. 说明除 N 端的 23 个氨基酸外, CP 蛋白的大部分区域与 BBSV 对苜蓿的致病性无关, BBSV CP 蛋白 N 端 23 个氨基酸是否也具有 TCV CP 类似的激发子功能尚待进一步研究. 从病毒 RNA 的积累水平看, 接种后 1 天 (1dpi) CP 移码突变体的 RNA 积累量与野生型病毒没有明显区别, 但 CP 的大部分缺失突变体和完全缺失突变体 RNA 积累量很低 (图 7), 可能是由于病毒 RNA 的大片段缺失导致病毒 RNA 空间结构发生了较大的变化, 因而降低了病毒 RNA 的复制效率. 3dpi 和 5dpi 的 Northern blotting 检测结果表明, CP 移码突变体的病毒 RNA 积累量也呈下降趋势, 可能是由于该突变体不能产生完整的病毒外壳蛋白来包装病毒的 RNA, 因而被寄主体内的 RNA 酶降解所致.

将绿色荧光蛋白(GFP)基因和葡萄糖苷酸酶(GUS)基因分别融合在BBSV CP基因5'端69 nt的下游, 摩擦接种苋色藜叶片后可观察到GFP或GUS基因的表达. 在此基础上, 本实验室以轮状病毒(Rotavirus)的VP6基因替代BBSV的CP基因, 用该重组病毒的体外转录产物摩擦接种苋色藜, 间接ELISA检测结果表明, VP6蛋白的平均表达量可达植物总可溶性蛋白的0.25%^[27], 因此BBSV具有进一步开发为外源蛋白表达载体的潜力.

参 考 文 献

- 崔星明. 一种侵染甜菜的球形病毒. 石河子农学院学报, 1988, **10** (1): 73~78
Cui X M. Journal of Shihezi Agricultural College, 1988, **10** (1): 73~78
- 蔡祝南, 陈定虎, 吴茂森, 等. 甜菜黑色焦枯型病毒病原、cDNA合成、光生物素标记及探针制备. 北京农业大学学报, 1993, **19** (3): 112
Cai Z N, Chen D H, Wu M S, *et al.* Journal of Beijing Agricultural University, 1993, **19** (3): 112
- 张靠稳, 王素玲, 蔡祝南, 等. 宁夏甜菜焦枯病研究初报. 中国甜菜糖业, 1996, (2): 3~8
Zhang K W, Wang S L, Cai Z N, *et al.* China Beet and Sugar, 1996, (2): 3~8
- Cai Z N, Ding Q, Cao Y H. Characterization of a sugar beet (*Beta vulgaris* L.) virus causing black scorch symptom in China, a possible member of *Necrovirus*. The Fourth International Working Group of Plant Viruses with Fungal Vector, California, USA, 1999
- 薄玉霞, 蔡祝南, 丁群, 等. 甜菜黑色焦枯病毒核酸特性、RNA2的cDNA克隆和部分序列分析. 农业生物技术学报, 1996, **4** (3): 269~276
Bo Y X, Cai Z N, Ding Q, *et al.* J Agri Biotechnol, 1996, **4** (3): 269~276
- Cao Y H, Cai Z N, Ding Q, *et al.* The complete nucleotide sequence of *Beet black scorch virus* (BBSV), a new member of the genus *Necrovirus*. Arch Virol, 2002, **147** (12): 2431~2435
- 原雪峰. 甜菜黑色焦枯病毒的基因功能及表达策略研究: [学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2005
Yuan X F. Analysis for gene functions and expression strategy of *Beet black scorch virus*: [Ph. D dissertation]. Beijing: China Agricultural University, 2005
- Quillet L, Guilley H, Jonard G, *et al.* *In vitro* synthesis of biologically active *Beet necrotic yellow vein virus* RNA. Virology, 1989, **172** (1): 293~301
- Cormack B P, Valdivia R H, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene, 1996, **173** (1): 33~38
- Chen P Y, Wang C K, Soong S C, *et al.* Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular Breeding, 2003, **11** (4): 287~293
- Sambrook, J, Fritsch, E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 17.1~18.88
- Dawson W O, Bubrick P, Grantham G L. Modification of the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene affecting replication, movement and symptomatology. Phytopathology, 1988, **78** (6): 783~789
- Dawson W O. Tobamovirus-plant interactions. Virology, 1992, **186** (2): 359~367
- Ding X, Shintaku M H, Carter S A, *et al.* Invasion of minor veins of tobacco inoculated with *Tobacco mosaic virus* mutants defective in phloem dependent movement. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (20): 11155~11160
- Lee L, Kaplan I B, Ripoll D R, *et al.* A surface loop of the Potato leafroll virus coat protein is involved in virion assembly, systemic movement and aphid transmission. J Virol, 2005, **79** (2): 1207~1214
- Kakani K, Robbins M, Rochon D. Evidence that binding of *Cucumber necrosis virus* to vector zoospores involves recognition of oligosaccharides. J Virol, 2003, **77** (7): 3922~3928
- Kakani K, Sgro J Y, Rochon D. Identification of *Cucumber necrosis virus* coat protein amino acids affecting fungus transmission and zoospore attachment. J Virol, 2001, **75** (12): 5576~5583
- 蒋军喜, 张景凤, 车少臣, 等. 甜菜黑色焦枯病毒经甘蓝油壶菌传播的研究. 江西农业大学学报, 1999, **21** (4): 525~528
Jiang J X, Zhang J F, Che S C, *et al.* Journal of Jiangxi Agricultural University, **21** (4): 525~528
- Bol J F, van Vloten-Doting L, Jaspars E M J. A functional equivalence of top component RNA in the initiation of infection by *Alfalfa mosaic virus*. Virology, 1971, **46** (1): 73~85
- Jaspars E M J. Interaction of *Alfalfa mosaic virus* nucleic acid and protein. In: Davies J W ed. Molecular Plant Virology, Boca Raton, FL: CRC Press, 1985. 155~225
- Olsthoom R C L, Mertens S, Brederode F T, *et al.* A conformational switch at the 3' end of a plant RNA virus regulates viral replication. EMBO J, 1999, **18** (17): 4856~4864
- Zhao Y, DelGrosso L, Yigit E, *et al.* The amino terminus of the coat protein of *Turnip crinkle virus* is the AVR factor recognized by resistant Arabidopsis. Mol Plant-Microbe Interact, 2000, **13** (9): 1015~1018
- Wang J, Simon A E. 3' end stem-loops of the subviral RNAs associated with *Turnip crinkle virus* are involved in symptom modulation and coat protein binding. J Virol, 2000, **74** (14): 6528~6537
- Thomas C L, Leh V, Lederer C, *et al.* *Turnip crinkle virus* coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. Virology, 2003, **306** (1): 33~41
- Qu F, Ren T, Morris T J. The coat protein of *Turnip crinkle virus* suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. J Virol, 2003, **77** (1): 511~522
- Lu R, Folimonov A, Shintaku M, *et al.* Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101** (44): 15742~15747
- 周勃. 利用植物病毒表达轮状病毒VP6亚单位食用疫苗的研究: [学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2005
Zhou B. Development of Oral Rotavirus VP6 Subunit Vaccine by Plant Expression: [Master dissertation]. Beijing: China Agricultural University, 2005

Effect of *Beet black scorch virus* Coat Protein on Viral Pathogenicity *

CAO Yun-He, YUAN Xue-Feng, Wang Xiao-Xing, GUO Li-Hua,

CAI Zhu-Nan, HAN Cheng-Gui, LI Da-Wei**, YU Jia-Lin

(State Key Laboratory of Agro-biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract A full-length *Beet black scorch virus* (BBSV) cDNA clone (pUBF52) was constructed by RT-PCR. The clone contains an upstream T7 RNA polymerase promoter designed for *in vitro* transcription of infectious RNAs from the linearized plasmid that faithfully represent the viral cDNA. Leaves of *Chenopodium amaranticolor* inoculated with *in vitro* transcripts developed the same symptoms and disease phenotype as the wild type virus. The presence of BBSV RNA and coat protein in the leaves was confirmed respectively by Northern blotting and Western blotting. Comparisons of specific immunoreactions between the expression product of the BBSV p24 gene in *E. coli* and antiserum against purified BBSV virions demonstrated that the p24 gene encodes the coat protein. Based on the sequence of the pUBF52 cDNA, a frame-shift mutant and two deletion mutants were generated. One of the deletions encompasses the entire CP ORF and the other truncates 174 amino acids from the central region of the protein. Transcripts derived from the frame-shift CP mutant, which terminates the CP after the first 23 amino acids, elicited the same symptom phenotype and levels of RNA accumulation as the wild type virus, but the leaves infected with the CP deletion mutants exhibited greatly reduced RNA accumulation. In addition, leaves inoculated with *in vitro* transcripts of the mutant in which the entire CP gene was deleted had lower local lesions than wild type virus transcripts. Two expression vectors, pBGFP and pBGUS, were constructed by fusing the GFP and GUS genes to the 23 N-terminal amino acids of the CP gene, respectively. Leaves infected with *in vitro* transcripts of pBGFP and pBGUS exhibited expression of GFP and GUS proteins as assessed by laser confocal microscopy and histochemical staining, respectively. The high levels of expression of the GFP and GUS proteins provide tools that can be used for studies of replication and movement of the virus, and indicate that BBSV has considerable biotechnology potential as a plant virus expression vehicle.

Key words *Beet black scorch virus*, infectious cDNA clone, coat protein, pathogenicity

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30325001, 30270063) and Hi-Tech Research and Development Program of China (2002AA206641).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62733326, E-mail: Lidw@cau.edu.cn

Received: September 6, 2005 Accepted: December 5, 2005