

病毒来源的抗病毒基因的构建 和在植物中的表达

田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

Construction of Virus Resistant Genes Originated from Virus and Its Expression in Plants

Tian Bo

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

寄主植物对病毒感染产生各种类型的抗病性, 包括高度抗病的免疫性, 抗侵染, 抗扩展和抗增殖的抗病性, 过敏性抗病性, 耐病性以及传毒介体的抗性。但是至今我们还不能把编码这些抗性的基因分离出来, 进行基因转移。所以在植物基因工程中应用植物来源的抗病毒基因为时尚早。由于病毒分子生物学的发展, 已阐明了一些病毒的基因组的结构与功能, 为利用病毒来源的抗病毒基因开辟了道路。随着 DNA 重组和克隆技术的发展, 以及双子叶植物基因转化技术的日趋完善, 使植物抗病毒的基因工程得以突破。已由病毒外壳蛋白基因、病毒卫星 RNA 的 cDNA 和病毒弱株系的全长 cDNA 转化植物, 获得抗病性的表达。探索病毒来源的反义 RNA 和中和抗体基因作为抗病毒基因的可能性也在进行中。

一、由外壳蛋白基因构建的抗病毒基因

病毒的感染可诱导寄主产生对病毒的免疫性。对病毒基因组结构与功能的深入研究, 启发人们设想, 能否将病毒诱导免疫性的基因引入寄主, 使寄主产生对病毒的抗性而又不产生有侵染性的病毒, 达到安全的免疫性。但病毒的哪个基因担负抗性的诱导呢? 早已知道病毒株系间的交叉保护作用可能与外壳蛋白的结构有关。用 TMV 进行的研究, 所取得的突破性进展确实证实了这一点。

(1) 菸花叶病毒(TMV)外壳蛋白(cp)的基因工程

TMV UI 株的基因组由 6395 个核苷酸组成。70—4919 编码复制酶; 4903—5709 编码与病毒在细胞间转移有关的 30K 蛋白; 5712—6196 编码 Cp。用引物合成 Cp 基因的 dsDNA, 在 puc 9 质粒中克隆, 从构建的 PTM 37 质粒中切下 Cp 序列, 与 PMON 237 载体联接。再把编码 cp 的序列从构建的 PTM 28 中切下, 插入表达载体 PMON 316, 组成 pTM 319 质粒(图 1), 组入 *Agrobacterium tumefaciens*, 并用于转化菸叶片。通

本文于1987年12月31日收到。

过卡那霉素抗性, 选择出 8 株转化菸植株。其中 6 株菸中每个二倍体基因组含有 1—5 Cp 拷贝, 二株含有 10 个以上的拷贝。转化植株中 Cp 信使 RNA 比 TMV 感染的菸叶中编码 Cp 的亚基因组低分子量成分(LMC)长 200 个核苷酸。转化植株中 cp 的含量达到叶蛋白的 0.1%。大部分转化植株所结种子表达 Cp 的性状分离符合 3:1 分离定律。表达 Cp 植株接种 TMV 后, 延迟发病 12—30 天 (Abal 等, 1986)。Nelson 等(1987)进一步比较了 Cp 表达和不表达的植株接种与 UI 株有血清学关系的强株系 PV 230。在转化的 Xanthi NC 植株 (对 TMV 产生局部斑症状) 上其斑点数只有未转化植株的 5% 以下。在转化的 Xanthi 植株 (对 TMV 产生系统症状) 上, 其发病率只有未转化植株的 30%。作者称这种抗病作为谓基因工程交叉保护。

(2) 苜蓿花叶病毒(AMV)外壳蛋白的基因工程:

Tumer 等(1987)用非常不同于 TMV 的 AMV 来验证 TMV—CP 的基因工程交叉保护作用是否也适用于其它病毒的可能性。AMV 基因组由 RNA 1、2 和 3 组成。RNA—4

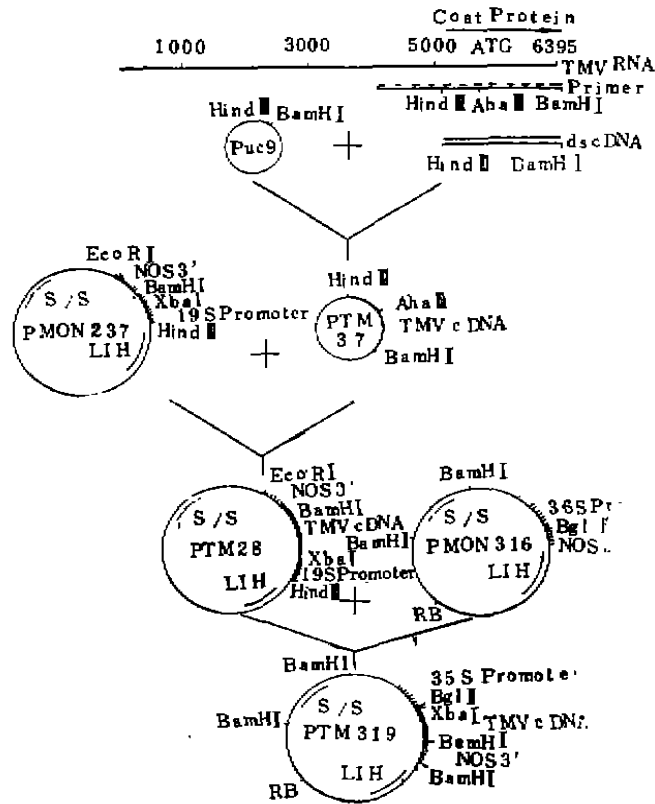


图 1 TMV 外壳蛋白基因的构建
(Abal 等, 1986)

Fig 1. Construction of coat proteingene

是编码外壳蛋白的亚基因组。由 RNA—4 反转录合成的 AMV CP 基因, 插入 pMON 9800 表达载体。以含 pMON 9800 的 *A. tumefaciens* 转化菸和蕃茄叶片, 菸和蕃茄转化植株中 CP 基因拷贝数均为 1—5, 其转录子的大小为 1.2 和 1.9 kb。菸植株中 CP 的量达到可提取的叶蛋白的 0.1—0.4%, 蕃茄植株中达 0.1—0.8%。对照植株均无 CP 产

生。菸转化植株接种 AMV 一周后, 每片接种叶上产生 6—55 个退绿斑, 两周后上部叶片产生系统明脉和花叶症状。CP 转化植株接种叶上不表现退绿斑, 两周后也没有系统症状。植株中病毒浓度, 对照比 CP 转化的高出 110—815 倍。CP 转化植株自花授粉的后代种子性状分离比例, 有的为 3:1, 说明系单位点插入; 有的为 15:1, 说明为双位点插入。接种后两周, 表达 CP 植株的发病率为 15—28%, 对照植株为 82—100%。由此可见, AMV CP 的保护效果比 TMV CP 还高。

最新消息表明, 黄瓜花叶病毒 CP 和马铃薯病毒 X CP 基因转化的植物也获得对各自病毒的抗病性。看来, 各种病毒的 CP 基因的转化, 都可表达对该病毒的抗病性。

二、由卫星 RNA 构建的抗病毒基因

卫星 RNA 是依赖于病毒才能复制的一类低分子量 RNA。其核苷酸序列与辅助病毒和寄主植物没有同源性。它能干扰辅助病毒的复制, 并改变症状的表现, 常常引起症状的减轻。可以把卫星 RNA 看做病毒的分子寄生物, 我们首先用卫星 RNA 组建成黄瓜花叶病毒的生防制剂(田波等, 1983, 1987), 这一发现立即引起植物基因工程学家的注意(Baulcombe 等, 1986)。

(1) 黄瓜花叶病毒(CMV)卫星 RNA 的基因工程,

CMV 基因组由 RNA 1、2、3 和亚基因组 RNA—4 组成。有的株系中还含有 RNA—5, 是一种卫星 RNA。Baulcombe 等(1986)将 CMV 1—17 N 株系的卫星 RNA 的 cDNA 双体插入 Ti 质粒 ROK-1 的 BamH1 切点。其表达箱包含花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S RNA 的启动子和蓝曙红合成酶终止序列(NOS-TERM)(图 2)。构建了含卫星 RNA 的 cDNA 的 Ti 质粒表达载体。经 *A. tumefaciens* 感染菸叶片, 以卡那霉素抗性为选择标记, 再生成植株。转化的植株生长正常, 能开花结果, 无任何病毒症状, 经 Southern 和 Northern 杂交证明在 DNA 和 RNA 中都有卫星 RNA 的全长序列。为了测定转录的卫星 RNA 的生物活性, 在转化植株上接种 CMV, 发现有大量单位长度的卫星 RNA 产生而病毒基因组 RNA 减少 95%。只在第 1 至第 3 片叶子上形成斑驳, 此后形成的叶片

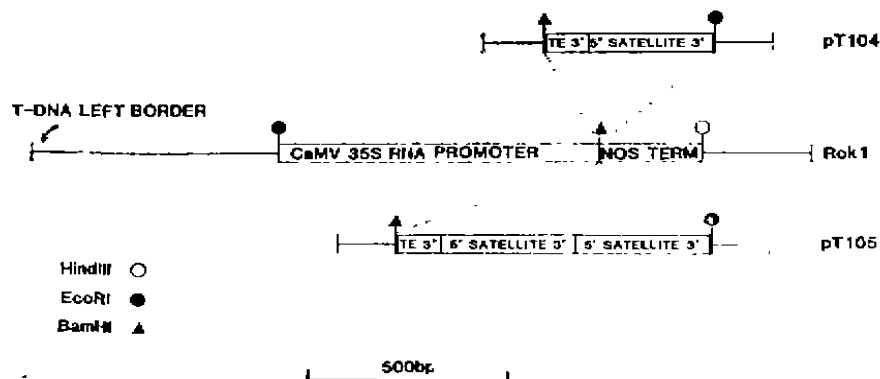


图 2 CMV 卫星 RNA cDNA 基因构建 (Baulcombe, 1986)
Fig 2 Construction of CMV satellite RNA cDNA gene

不表现花叶症状, 接近正常的植株。而用对照 DNA 转化的植株症状严重, 植株矮化。我们(吴世萱等, 1988)以 CMV 卫星 RNA-1 的 dsRNA 为模板, 分别用其 3'-端

和 5'-端部分序列合成的寡核苷酸为引物,合成了分别复盖卫星 RNA 3'-端和 5'-端的二个克隆并进行 DNA 水平上的操作,建成了全长的卫星 RNA-1 的 cDNA 克隆。将此完整的 cDNA 插入到 Ti 质粒表达载体 ROK-2 中。与上述例子不同的是,这里用的是完整的卫星 RNA 单体,已转化菸草,并获得抗 CMV 的基因工程植株。这种植株当感染 CMV 后能大量表达卫星 RNA,从而干扰了 CMV RNA 基因组的复制,使症状减轻或消失。

(2) 菸环斑病毒 (TobrV) 卫星 RNA 的基因工程:

该病毒的卫星 RNA (STobrV) 由 359 个核苷酸组成,具有线状和环状结构。它能致弱 TobrV 引起的症状。Gerlach 等 (1987) 用克隆的 STobrV 的 cDNA 与 Ti 质粒表达载体构建三个基因: ST(+), 由全长 cDNA 的三聚体构成,其排列方向可产生 (+) 转录子 (即 (+) STobrV), ST(-) 由全长 cDNA 的三聚体构成,其排列方向产生 (-) 转录子 (即 (-) STobrV), SH(+) 由全长 cDNA Hae III 酶切片断 (含 57—319 序列) 构成,其排列方向可产生 (+) 转录子。用上述三个基因转化菸草。接种 TobrV 后, ST(+) 和 ST(-) 基因转化的植株,转录出大量的 STobrV,而 SH(+) 和未能转化的植株接种 TobrV 后一周则没有 STobrV 产生,症状也有明显差别。SH(+) 和未转化的植株接种 TobrV 后一周出现典型中心坏死的环斑。三周后在新生出的叶片有明显的症状,叶片缩小,植株矮化。ST(+) 转化的植株接种后一周只出现中心不坏死的环斑,此后新生叶上几乎没有症状,植株大小与未接种的相近。ST(+) 转化植株中病毒复制量也相应降低,转化植株所结的种子,抗病性状分离比例为 3:1。

ST(-) 转化植株除接种初期产生中心坏死的环斑外,其它表现与 ST(+) 相似。(-) STobrV 本来没有生物活性,之所以表现抗病性可能是某一植物本身的启动子启动了这一基因,或者 (-) STobrV 被植物依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶转录出微量 STobrV 之故。

上述两个例子都说明利用干扰病毒复制的卫星 RNA 构建抗病毒基因是一种有效的方法。从植物基因工程学来说,这种方法不需基因产物的大量表达,它只需要转入的基因产生少量转录产物,当野生病毒感染时转录出的少量卫星 RNA 能利用病毒的复制酶大量地复制,发挥对病毒的干扰作用。从病毒方面看,随着对病毒基因组的深入研究,在愈来愈多的植物病毒中发现了卫星 RNA。例如线虫传多面体病毒组的六种以上的病毒,黄瓜花叶病毒组的所有三个成员,绒毛菸斑驳病毒组的所有四个成员,番茄丛矮病毒组的一个成员,菸坏死病毒组的一个成员。最近又在黄症病毒组的大麦黄矮病毒中发现了卫星 RNA。为扩大卫星 RNA 的应用创造了条件。通过卫星 RNA 结构与功能的研究,自然界已存在的卫星 RNA 还可通过人工点突变改善其功能。另外还有可能根据病毒复制机理的研究,人工合成可与病毒核酸复制酶竞争的类似卫星 RNA,这就将这一方法扩大应用于更多的病毒病的防治。

但是由于卫星 RNA 构建的抗病毒基因可在体内转录出具有生物活性的卫星 RNA,通过介体能传染给其它植物。因此要估计通过卫星 RNA 的突变,产生加重症状的潜在缺点。

三、用弱病毒全长 cDNA 导入而产生的抗病毒的转化植株

外壳蛋白基因转化的植物只获得延迟发病的抗病效果。日本东京大学 Ohno (1987)

和 Yamaya 等(1988)分别将 TMV-L (番茄株)和其致弱突变体 TMVL-IIA 的全长 cDNA 转化菸草。他们将全长的 cDNA 拷贝置于 CaMV 35S RNA 启动子的下游,此启动子经过改造可使转录恰好从 5'-末端开始,再以 Ti 质粒为载体导入菸草。用全长 cDNA 转化的菸植株产生典型的花叶和矮化症状。叶片匀浆液具有侵染性。可见转化植株所产生的症状是由于病毒 cDNA 插入植物染色体 DNA,并转录出 TMV RNA,由转译的外壳蛋白组装成侵染性病毒颗粒之故。用 LIIA CDNA 转化的植株也产生侵染性病毒颗粒,但病毒量低得多,植株也不表现花叶和矮化病状。用 TMV L 作攻击接种后40天仍不表现花叶和矮化症状,而未转化的植株接种后7—10天就产生严重的症状。这一结果说明,全长的致弱病毒的 cDNA,可产生此外壳蛋白基因强得多的保护作用。但其缺点在于侵染性病毒颗粒的产生,也存在与应用弱毒弱苗相同的问题。

四、构建抗病毒基因的其它途径

(1) 病毒反意 RNA

近年来已证明反意 RNA (或负链 RNA) 对原核和动物细胞的基因表达有抑制作用。在细菌中,与转录起始区互补的反意 RNA 最为有效。在真核系统中与 3'-末端序列互补的反意 RNA 有抑制作用。如果植物病毒的反意 RNA 也有抑制病毒基因组表达的作用,那末就有可能用于许多病毒的抗病毒基因的构建。

Baulcombe 等(1987)将菸环斑病毒 RNA- 的四个基因组的反意 RNA 构建成基因插入 Ti 表达载体,并再生成菸植株。但均未表达任何对病毒的抗性。这可能是:(a)所用反意 RNA 序列未包括 5'-和 3'-端;(b)反意 RNA 的抑制作用不足以抑制病毒的复制;(c)病毒 RNA 包入蛋白外壳内,使反意 RNA 不能起作用。进一步的研究将能澄清这一问题。

(2) 中和抗体基因

Woods 等(1985)已报道把小白鼠杂交瘤细胞免疫球蛋白 λ 和 μ 的 cDNA,通过质粒转化到酵母细胞中。酵母细胞能合成、加工和分泌免疫球蛋白轻链和重链,并能形成有生物活性的抗体。利用抗体对病毒的中和作用,如能将编码免疫 γ -球蛋白的基因转化到植物中去,可能会在植物体内对病毒产生中和作用而达到抗病的效果。

综上所述,病毒分子生物学的基础研究成果已开始对病毒病防治产生深远的影响。

参 考 文 献

- [1] Abel, P. et al. 1986. *Science* 232, 738—743.
- [2] Baulcombe, D.C. et al. 1986. *Nature* 321, 446—449.
- [3] Baulcombe, D.C. et al. 1987. Resistance to viral disease through expression of viral genetic Viruses from plant genome. CIBA Foundation Symposium 133. Resistance of Plants to Viruses. (In press).
- [4] Gerlach, W. et al. *Nature* 328, 802—805.
- [5] Harrison, B.D. et al. *Nature* 328, 799—802.

-
- [6] van Leon, L.C. et al., 1985, *Plant Mol. Biol.* 4 111—161.
 - [7] Nelson, R.S. et al., 1987, *Virology* 158, 126—132.
 - [8] Richardson, M. et al., *Nature* 327, 432—434.
 - [9] Tien P. et al., 1983 *Seed Science & Technology* 11, 969—972.
 - [10] Tien P. et al., 1987 *Ann. app. Biol.* 111, 143—152.
 - [11] Tumer, M.E. et al., 1987, *EMBO J.* 6, 1181—1188.
 - [12] Wood, C.R. et al., 1985, *Nature* 314, 446—449.
 - [13] Yamaya Jun, et al., *Mol. gen. Genetics*, (in press)
 - [14] 吴世宣等, 1988, 科学通报 (投稿中).
 - [15] 大野晴司 1987, 农业生物技术学术讨论会, 杭州.