

研究报告

Research Report

病毒抑制子 HCPro 诱导拟南芥中 YUC1 的表达

金太成 郎晨婧 王悦 吴艳菊 孟大伟 杨丽萍*

吉林师范大学生命科学学院, 四平, 136000

* 通信作者, yangliping781124@163.com

摘要 生长素在植物的生长发育过程中发挥重要作用, 病毒侵染影响宿主生长素的积累。本研究中, 我们揭示了病毒抑制子 HCPro 诱导生长素生物合成基因表达的分子机制。我们利用农杆菌介导的叶片侵染法在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中瞬时表达了报告基因 *GUS* 和病毒抑制子 HCPro。我们的结果证实 HCPro 能够诱导 *YUC1* 基因启动子 DNA 去甲基化而激活其基因表达, 为病毒与宿主互作的分子机制研究奠定了基础。

关键词 拟南芥, 叶片侵染法, 生长素生物合成基因

Viral Suppressor HCPro Induce the Expression of YUC1 in *Arabidopsis thaliana*

Jin Taicheng Lang Chenjing Wang Yue Wu Yanju Meng Dawei Yang Liping*

The School of Life Science, Jilin Normal University, Siping, 136000

* Corresponding author, yangliping781124@163.com

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0013

Abstract Auxin plays an important role in plant growth and development, viral infection affects host auxin accumulation. In this study, we revealed the molecule mechanism by which the viral suppressor HCPro activated the expression of auxin biosynthetic gene in plants. We transiently expressed the foreign gene *GUS* and the viral suppressor HCPro in *Arabidopsis thaliana* by using *Agrobacterium*-mediated leaf-infection. The results confirmed that HCPro can induce the DNA demethylation of *YUC1* gene promoter and activate the gene expression in plants, and provided a basis for study on the molecule mechanism of interaction between virus and host.

Keywords *Arabidopsis thaliana*, Leaf-infection, Auxin biosynthetic gene

植物中外源基因的表达方法包括稳定表达和瞬时表达两种方式(Walmsley and Arntzen, 2000), 瞬时表达体系具有简单、快速和高效等优势(Shivprasad et al., 2000)。农杆菌介导的叶片注射法是一种在植物中瞬时表达外源基因的常用方法。人们利用这种侵染方法在离体烟草叶片中瞬时表达了多种外源蛋白(Kathuria et al., 2002; Wang and Li, 2002)。有研究者利用农杆菌介导的叶片注射法在烟草(*N.tabacum*)中

高水平表达了绿色荧光蛋白(GFP)(Jia et al., 2003)。Liu 等利用叶片注射法在烟草中成功地表达了人表皮酸性成纤维细胞生长因子(ha FGF)(Liu et al., 2007)。2008 年, Yang 等利用根部吸收法在烟草中瞬时表达了 GFP(Yang et al., 2008)。2013 年, 我们利用农杆菌侵染新技术在豌豆中瞬时表达 haFGF(杨丽萍等, 2013); 2016 年, 我们在烟草中建立并优化了根部真空侵染法, 并用此方法成功高效表达了外源基因。研

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 6 月 1 日; 接受日期: 2020 年 6 月 4 日; 发表日期: 2020 年 6 月 11 日

引用格式: 金太成, 郎晨婧, 王悦, 吴艳菊, 孟大伟, 杨丽萍, 2020, 病毒抑制子 HCPro 诱导拟南芥中 YUC1 的表达, 分子植物育种(网络版), 18(13): 1-5 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0013) (Jin T.C., Lang C.J., Wang Y., Wu Y.J., Meng D.W., and Yang L.P., 2020, Viral suppressor HCPro induce the expression of YUC1 in *Arabidopsis thaliana*, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(13): 1-5 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0013))

究表明, 这些瞬时表达体系和侵染方法的研究为植物生物反应器的研究提供了基础依据, 也为药用蛋白和疫苗的快速生产提供了平台。

YUC 基因是生长素生物合成基因, 该基因家族共有 11 个成员(Cheng et al., 2006)。*YUC* 基因在生物发育中至关重要, *YUC* 基因表达的变化会影响生长素的生物合成, *YUC* 基因的过量表达也会导致植物发育异常。例如, *YUC6* 转基因植株叶片生长素水平升高, *YUC8* 和 *YUC9* 的过度表达导致拟南芥的茎和叶的异常表型。本研究中, 我们利用农杆菌介导的叶片侵染法在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植物中瞬时表达报告基因 *GUS*。我们利用这种侵染方法在拟南芥植物中表达了病毒抑制子 HC-Pro, 基因表达的检测结果显示 HC-Pro 能够诱导 *YUC1* 的表达; 亚硫酸盐测序结果证明 HCPro 能够诱导 *YUC1* 基因启动子 DNA 去甲基化而激活其基因表达, 为病毒与宿主互作的分子机制研究奠定了基础。

1 结果与分析

1.1 利用农杆菌介导法表达 *GUS* 基因

首先, 我们将 pCambia2301-*GUS* 表达载体转化农杆菌 EHA105, 然后利用农杆菌介导的叶片侵染法在拟南芥中瞬时表达 *GUS* 报告基因, 并进行了连续 14 天的观察和拍照记录。利用 *GUS* 化学组织染色法检测了 *GUS* 基因在拟南芥中的表达。结果表明: 在农杆菌侵染后第 7 天, *GUS* 开始在注射的伤口部位表达(图 1A); 在农杆菌侵染后第 10 天, 农杆菌通过微管束向四周传递, 可以观察到 *GUS* 在侵染叶片中由伤口部位向外扩散表达(图 1B; 图 1C); 在注射后的第 14 天, *GUS* 在未侵染的茎中(图 1D)和新生叶片中大量表达(图 1E)。

1.2 拟南芥中 *GUS* 基因的快速表达

提取侵染后第 7~10 天的植物材料进行基因表达检测, 结果表明: 在拟南芥中报告基因 *GUS* 被成功表达, 说明利用农杆菌介导的叶片侵染法进行外源基因快速表达的有效性。为了进一步确定外源基因是否在新生叶片和茎中被瞬时表达, 我们对报告基因 *GUS* 进行的 RT- 半定量 PCR 检测。分别提取侵染叶片(侵染后第 15 天)和新生叶片的总 RNA 进行反转录, 获得的 cDNA 作为模板进行报告基因的表达检测, 结果显示: 在农杆菌侵染后第 15 天叶片和新生叶片中 *GUS* 都有表达(图 2B), 说明利用农杆菌介导的叶片注射法可以实现外源基因在拟南芥中的表达。

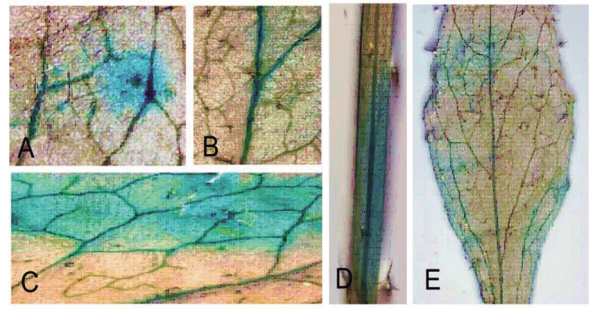


图 1 利用 *GUS* 染色法检测 *GUS* 基因的表达

注: A: 农杆菌侵染后第 7 天在侵染叶片中呈现 *GUS* 的表达; B-C: 农杆菌侵染后第 10 天呈现的 *GUS* 表达; D-E: 侵染后的第 14 天 *GUS* 在新生的茎和叶片中表达增加

Figure 1 Detection of *GUS* gene expression by *GUS* staining method
Note: A: The expression of *GUS* appeared in the infection leaves at 7 days after agro-inoculation; B-C: The expression of *GUS* appeared in the infection leaves at 10 days after agro-inoculation; D-E: The expression of *GUS* increased in new stems and leaves at 14 days after agro-inoculation

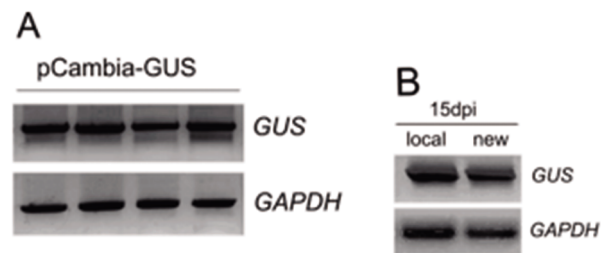


图 2 利用 RT- 半定量 PCR 检测 *GUS* 基因的表达

注: A: 侵染后植物中 *GUS* 基因的表达被检测; B: 新生叶片和侵染叶片中 *GUS* 基因的表达检测

Figure 2 The detection of *GUS* gene expression by RT- sqPCR
Note: A: The expression of *GUS* was detected in the plants at 10 days after agro-inoculation; B: The expression of *GUS* was detected in the new and local leaves at 15 days after agro-inoculation

1.3 利用农杆菌介导法在拟南芥中表达 HCPro

我们之前已经成功构建了 pBI121-HCPro 表达载体, 为了进一步研究 HCPro 的功能, 我们利用农杆菌介导法在拟南芥中瞬时表达 HCPro。选取叶片舒展的拟南芥为植物材料进行注射侵染。以携带空载体的农杆菌侵染的拟南芥为对照(图 3A), 表达 HCPro 的拟南芥植物的表型发生明显的变化。侵染后的第 7 天, 被侵染的叶片表现轻度卷曲的症状(图 3B); 侵染后的第 10 天, 有的侵染叶片严重蜷曲变形, 新生叶片表现为锯齿状(图 3C), 与我们之前获得的 HCPro 转基因拟南芥植物的表型十分相似(Yang et al., 2016), 表明 HCPro 开始在新生叶片中表达。在侵染后的第 14~15 天, 叶片边缘的锯齿状更加明显, 部分叶片严

重卷曲变形, 并出现黄化和枯萎的叶片症状(图 D)。侵染后的拟南芥植物表型的变化暗示了 HCPro 表达改变了宿主内源基因的表达及基因表达的调控机制。提取侵染植物的总 RNA, 进行半定量 RT-PCR 检测, 结果证实了 HCPro 在拟南芥中的表达(图 3E)。

1.4 病毒抑制子 HCPro 诱导 YUC1 基因表达

为了研究 HCPro 是否能够诱导生长素生物合成基因 YUC1 的表达, 我们以侵染空载体的拟南芥和表达 HCPro 的拟南芥为材料, 比较分析两种植物材料中 YUC1 基因的表达水平。分别提取两种植物的总 RNA, 半定量 RT-PCR 检测结果表明, 在瞬时表达 HCPro 植株中 YUC1 基因的表达量显著上调(图 4A)。研究结果进一步揭示, 与侵染空载体的拟南芥相比, 表达 HCPro 拟南芥中 YUC1 启动子区 DNA 甲基化水平有不同程度的降低(图 4B), 三个位点中 CG 位点降低 16.56%, CNG 位点降低 18.89%, CHH 位点降低 13.38%。结果表明 HCPro 介导了 YUC1 启动子区 DNA 去甲基化而激活其基因的表达。

2 讨论

研究表明, 马铃薯 Y 病毒(*potato virus Y*, PVY)编

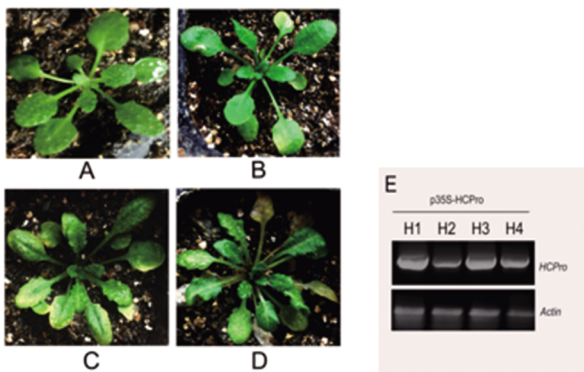


图 3 表达 HCPro 的拟南芥表型及基因表达检测

注: A: 携带空载体的农杆菌侵染的拟南芥作为对照; B: 农杆菌侵染后第 7 天叶片呈现蜷曲状; C-D: 侵染后第 10-14 天, 被侵染的拟南芥呈现明显变形的叶片, 新生叶片呈现明显的锯齿状; E: 被侵染的植物中 HCPro 基因的表达检测, Actin 被作为对照

Figure 3 The phenotype of *Arabidopsis thaliana* expressed HCPro and the detection of gene expression

Note: A: Mock-infected *Arabidopsis thaliana* served as controls; B: The leaves appeared curled and deformed after agro-inoculation; C-D: The infected *Arabidopsis thaliana* exhibited obvious deformed leaves, new leaves exhibited obvious serration; E: The detection of HCPro gene expression in infected plants, Actin served as controls

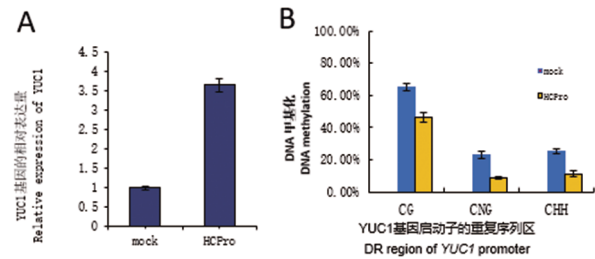


图 4 YUC1 表达水平和 DNA 甲基化分析

注: A: 利用定量 PCR 检测空载体侵染的植物和表达 HCPro 的植株中 YUC1 基因的表达水平; B: 亚硫酸盐测序法分析空载体侵染的植物和表达 HCPro 的植物中 YUC1 启动子重复序列区的 DNA 甲基化, DR: 分散重复

Figure 4 Analyses of DNA methylation and the expression levels of YUC1

Note: A: Detection of the expression levels of YUC1 gene in mock-infected plants and the expressed HCPro plants.; B: Analyses of DNA methylation as determined by bisulfite sequencing in the repeat regions of YUC1 promoters in mock-infected plants and the expressed HCPro plants. DR, dispersed repeat

码的 HC-Pro 蛋白干扰了植物 DNA 甲基化(Soitamo et al., 2011), 我们之前的研究结果进一步揭示病毒抑制子 HC-Pro 在植物基因组中的 DNA 去甲基化作用(Yang et al., 2016)。由于 HC-Pro 转基因植物具有败育的特征(Yang et al., 2016), 本研究中, 我们建立了农杆菌介导的植物瞬时表达体系, 为深入研究 HC-Pro 蛋白的功能奠定实验基础。来源于病毒的表达载体经常被用于植物中外源基因的瞬时表达。植物瞬时表达系统主要的侵染方法主要有农杆菌介导的叶片注射法和真空侵染法(Kapila et al., 1997)。例如: 研究者利用病毒介导法在烟草中瞬时表达了酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)(Liu et al., 2007)。我们之前的研究利用来源于烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)的 30B 表达载体在烟草中瞬时表达了报告基因 GFP(Yang et al., 2008)。这种方法具有快速和表达效率高的优势而被人们广泛应用。研究中我们利用农杆菌介导的叶片侵染法, 在植物中进行外源基因瞬时表达的研究。这种方法主要通过农杆菌的传播和扩散, 使其携带的表达载体和外源基因被快速表达。结果表明, 利用这种方法成功表达了报告基因 GUS 和功能蛋白 HCPro。

生长素生物合成基因 YUC1 主要在分生组织、幼原基和生殖器官中表达。本研究结果表明, 以携带空载体的农杆菌侵染的拟南芥作对照, 在瞬时表达 HCPro 的拟南芥植物中 YUC1 表达量明显增加(图4)。已有研究结果表明病毒和病毒抑制子能够干扰 RNA

介导的 DNA 甲基化(RNA directed DNA methylation, RdDM)途径(Jamous et al., 2011; Ivanov et al., 2016)。例如,BSCTV 编码的病毒抑制子 C2 介导水杨酸防御途径上游调控因子 ACD6 启动子 DNA 甲基化水平显著降低,并激活 SA 途径(杨丽萍等, 2013)。我们之前的研究结果揭示 HCPPro 能够介导 DNA 甲基化的降低并激活防御基因的表达(Yang et al., 2016)。本研究结果证实 HCPPro 介导了 YUC1 启动子区域重复序列的三个位点 DNA 甲基化的降低(图 4B),并激活 YUC1 基因的表达,为进一步探索病毒及病毒抑制子与宿主的表观遗传调控互作机制奠定了研究基础。

3 材料与方法

3.1 材料与来源

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子和菌株由本实验室保存;植物表达载体 pCambia-GUS 由本实验室保存。

3.2 农杆菌介导的拟南芥侵染

将 EHA105-pBI121-*HC-Pro* 农杆菌菌液活化,并于 50 mL LB 液体培养基中扩摇培养,加入 20 μmol 的 AS 和 100 μmol 的 MES。4 000 r/min 的条件下离心 10 min,收集农杆菌。配置溶液(100 mL 的 ddH₂O 加入 1 mmol 的 MgCl₂, 1 mmol 的 MES 和 100 μmol 的 AS),将农杆菌进行重悬,浓度为 OD₆₀₀=1.0 左右,农杆菌重悬液室温放置 3 h 后用于叶片侵染。利用去掉针头的注射器将农杆菌重悬液注入到叶片组织中,每株植物注射 2-3 个叶片。在黑暗条件下培养 24 h 后将植物转移到正常条件下培养。拟南芥的培养温度为 22~25℃。

3.3 亚硫酸盐测序

利用 CTAB 法提取拟南芥总 DNA,使用 EpiTect Bisulfite Kit 试剂盒 (Qiagen) 对纯化后的 DNA 进行亚硫酸盐处理。亚硫酸盐处理后的 DNA 样品作为模板,进行 YUC1 基因启动子区 PCR 扩增,并对 PCR 产物进行检测分析,由华大生物公司完成测序。

3.4 半定量 RT-PCR 和定量 PCR 检测基因表达

我们利用 TRIzol 法提取植物的总 RNA,半定量 RT-PCR 的检测,预变性:取 2.5 μg 的 RNA,用 ddH₂O 调整到 10 μL 体系,先进性 RNA 进行预变性,预变性条件为:70℃处理 5 min;4℃,5 min。预变性后的 RNA 进行反转录,以反转录后的 cDNA 为模

板,进行 PCR 和定量 PCR (qPCR)检测。

3.5 GUS 染色分析

将 GUS 染色液与 GUS 染液缓冲液按照 1:50 的体积比配置成 GUS 染色工作液,-80℃下避光放置备用。将拟南芥植物材料放于 50 mL 的烧杯中,加入适量配置好的 GUS 染色工作液完全覆盖过植物材料,用锡箔纸将烧杯包好,利用真空侵染法进行染色。真空压力为 0.08 MPa,时间 5 min。观察到植物材料沉浸到 GUS 染液底部,重复两次实验。将整个烧杯置于 37℃孵育 24 h。随着孵育时间的延长,GUS 表达的部位或位点呈现蓝色或蓝色斑点(整个过程均避光操作)。将植物材料用 30 mL 卡诺氏固定液在室温条件下固定 1~3 h。然后进行脱色处理,设置乙醇的体积分数为 25%、50%、70%、85%和无水乙醇,每个浓度下脱色处理 1~3 h。显微镜下观察拍照。样本可以在 75%的乙醇中 4℃下保存 1~3 月。

作者贡献

金太成是本研究的实验研究的执行人,完成数据分析和论文稿的写作;杨丽萍指导实验设计,数据分析,以及完成论文的修改;郎晨婧、孟大伟、王悦和吴艳菊参与完成相关实验。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由吉林省教育厅科研项目(JJKH2019101-3KJ)和国家青年科学基金项目(31301043)共同资助。

参考文献

- Cheng Y.F., Dai X.H., and Zhao Y.D., 2006, Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*, *Genes Dev.*, 20(13): 1790-1799
- Ivanov K.I., Eskelin K., Ba?i? M., De S., L?hmus A., Varjosalo M, and M?kinen K., 2016, Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPPro, *Plant J.*, 85(1): 30-45
- Jamous R.M., Boonrod K., Fuellgrabe M.W., Ali-Shtayeh M.S., Krczal G., and Wassenegger M., 2011, The helper component-proteinase of the Zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro, *J. Gen. Virol.*, 92(Pt9): 2222-2226
- Jia H.G., Pang Y.Y., and Fang R.X., 2003, Agroinoculation as a simple way to deliver a tobacco mosaic virus-based expres-

- sion vector. *Acta Botr. Sin.*, 45(7): 770-773
- Kapila J., Rycke R.D., Montagu V., and Angenon G., 1997, An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves, *Plant Sci.*, 122(1): 101-108
- Kathuria S., Sriraman R., Nath N., Sack M., Pal R., Artsaenko O., Talwar G.P., Fischer R., and Finnern R., 2002, Efficacy of plant-produced recombinant against HCG, *Human Reproduction*, 17(8): 2054-2061
- Liu J.Y., Ma P.D., Sun Y., Yang M.Y., Yang L.P., Wu Y.F., Zhu X.J., and Wang X.Z., 2007, Expression of human acidic fibroblast growth factor in *Nicotiana benthamiana* with a potato-virus-X-based binary vector, *Biotechnol Appl. Bioch.*, 48(3): 143-147
- Shivprasad S., Pogue G.P., Lewandowski D.J., Hidalgo J., Donson J., Grill L.K., and Dawson W.O., 1999, Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors, *Virology*, 255(2): 312-323
- Soitamo A.J., Jada B., and Lehto K., 2011, HC-Pro silencing suppressor significantly alters the gene expression profile in tobacco leaves and flowers, *BMC Plant Biol.*, 11: 68
- Walmsley A.M., and Arntzen C.J., 2000, Plants for delivery of edible vaccines, *Curr. Opin. Biotech.*, 11(2): 126-129
- Wang M., and Li Q.R., 2002, Transient expression of Strictosidine synthase in tobacco leaves by vacuum infiltration, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 34(6): 703-706
- Yang L.P., Jin T.C., and Zhou X.F., 2013, Transient expression of ha FGF in Pea plant by new Agroinoculation biotechnology, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, (10): 71-75 (杨丽萍, 金太成, 周晓馥, 2013, 利用农杆菌侵染新技术在豌豆中瞬时表达 haFGF, *生物技术通报*, (10): 71-75)
- Yang L.P., Wang H.W., Liu J.Y., Li L., Wang X.F., Song Y.H., Sun S.G., Wang L., Zhu X.J., and Wang X.Z., 2008, A simple and effective system for foreign gene expression in plants via root absorption of agrobacterial suspension, *J. Biotechnol.*, 134(3-4): 320-324
- Yang L.P., Xu Y.N., Liu Y.Q., Meng D.W., Jin T.C., and Zhou X.F., 2016, HC-Pro viral suppressor from *tobacco vein banding mosaic virus* interferes with DNA methylation and activates the salicylic acid pathway, *Virology*, 497: 244-250