

王海涛,董 岩,任春梅,等. 玉米黄花叶病毒外壳蛋白的特征分析及亚细胞定位[J].江苏农业学报,2023,39(6):1437-1440.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2023.06.020

玉米黄花叶病毒外壳蛋白的特征分析及亚细胞定位

王海涛¹, 董 岩¹, 任春梅¹, 宛柏杰², 李 硕¹, 程兆榜¹, 季英华¹

(1.江苏省农业科学院植物保护研究所/江苏省食品质量安全重点实验室/国家重点实验室培育基地,江苏 南京 210014; 2.江苏沿海地区农业科学研究所,江苏 盐城 224002)

关键词: 玉米黄花叶病毒; 外壳蛋白; 亚细胞定位

中图分类号: S432.4⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2023)06-1437-04

Characterization and subcellular localization analysis of maize yellow mosaic virus coat protein

WANG Hai-tao¹, DONG Yan¹, REN Chun-mei¹, WAN Bai-jie², LI Shuo¹, CHENG Zhao-bang¹,
JI Ying-hua¹

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu Province/State Key Laboratory Breeding Base, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Agricultural Sciences in the Coastal District of Jiangsu Province, Yancheng 224002, China)

Key words: maize yellow mosaic virus; coat protein; subcellular localization

玉米是中国种植面积最大的作物,可作为粮食、饲料和工业原料,玉米病毒病害是玉米最为严重的病害之一,对玉米生产威胁巨大。玉米黄花叶病毒(Maize yellow mosaic virus, MaYMV)于2016年由Chen等^[1]在中国首次发现并报道,随后在亚洲其他国家、南美洲和非洲等地被相继报道^[2-9]。在中国,该病毒已扩散至云南、四川、福建、安徽和河南等地^[10]。MaYMV在侵染玉米时,可引起花叶、叶片皱缩、植株矮化和红叶等症状^[1,11-13],除侵染玉米外,还侵染小麦、高粱、小米、甘蔗和筒轴茅等^[14-18]。MaYMV主要由玉米缢管蚜(*Rhopalosiphum maidis*)和禾谷缢管蚜(*Rhopalosiphum padi*)以循环型、不增殖的方式传播^[12]。目前关于MaYMV蛋白功能的研究还鲜有报道。

MaYMV是Solemoviridae病毒科,马铃薯卷叶病毒属(*Polerovirus*)成员,病毒粒子为20~30 nm的二十面体结构,基因组是正义单链多顺反子RNA,全长为5 642个核苷酸(GenBank登录号KU248489)。马铃薯卷叶病毒属代表种马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)共编码10种蛋白,分别是P0蛋白(RNA沉默抑制子)、P1蛋白、RNA依赖的RNA聚合酶(*RdRp*)、系统运动蛋白3a、外壳蛋白(Capsid protein, CP)、胞间运动蛋白(Movement protein, MP)、通读功能域蛋白(Readthrough domain, RTD)、蛋白6、蛋白7和复制相关蛋白^[19]。Chen等^[1]发现MaYMV基因组编码7个蛋白,分别是P0蛋白、P1蛋白、P2蛋白、P3(CP)蛋白、P4(MP)蛋白、P3-P5(RTD)蛋白和蛋白3a,而目前关于各蛋白的特征、定位及功能仍不明确,因此探究MaYMV蛋白的特征和定位具有重大意义。

CP是病毒含量最多的结构蛋白,在病毒粒子的组装和分解中扮演着关键的作用。病毒结构的形成始于CP-CP互作以及CP-RNA的互作;除了病毒粒子的组装外,CP通过携带病毒RNA在细胞间进行长距离运动^[20],病毒的复制和蛋白质翻译均受细胞内CP含量调控^[21],如PLRV CP蛋白的

收稿日期:2022-11-19

基金项目:国家自然科学基金项目(32001871);江苏省自然科学基金项目(BK20200283)

作者简介:王海涛(1990-),男,安徽亳州人,博士,助理研究员,主要从事植物分子病毒学研究。(E-mail) wanghtchnl@163.com

通讯作者:季英华, (E-mail) jiyinghua@jaas.ac.cn

两个酸性功能域参与病毒粒子的组装、系统运动和介体蚜虫传播^[22-23]。此外,CP 对于介体传毒的特异性至关重要^[23],如水稻黑条矮缩病毒(Rice black streaked dwarf virus, RBS-DV)外壳蛋白 P10 通过与多种介体灰飞虱因子互作,调节病毒在介体内的增殖;P10 作为中间调节因子,一方面通过促进磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH*)的磷酸化,诱导介体灰飞虱的自噬反应,促进病毒降解^[24];另一方面,P10 通过与磷脂酰肌醇-二磷酸的结合抑制自噬体与溶酶体的融合,抑制自噬降解,促进病毒增殖^[25]。

为了解析 MaYMV CP 的功能,本研究以 2022 年 8 月在江苏省内染病玉米中分离得到的 MaYMV 为研究对象,对其 CP 蛋白特征进行分析,通过构建杆状病毒表达载体,利用草地贪夜蛾细胞对 MaYMV CP 基因的表达和 CP 蛋白定位进行分析,拟期为后续深入解析 MaYMV CP 与介体蚜虫及寄主植物三者之间的互作提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试病毒、细胞和试剂

供试 MaYMV 毒源为 2022 年 8 月采集于江苏省的具有典型发病症状的玉米植株,保存于-80℃冰箱备用。

草地贪夜蛾细胞(Sf9)为本实验室保存,使用 Sf-900™ II SFM(10902088)培养基于 28℃培养箱避光培养。

RNA 提取试剂(R401-01)、反转录试剂(R312-01)和克隆载体(5 min TA/Blunt-Zero Cloning kit, C601-01)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;用于基因扩增的 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (R045A)和限制性内切酶(QuickCut™ *Xba* I 和 QuickCut™ *Kpn* I)购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒(TSP501-200)和感受态细胞(Trelief™ 5α, TSC-C01)购自北京擎科生物科技有限公司;DH10Bac 感受态细胞(10361012)和转染试剂(Lipofectamine™ 3000, L300008)购自 Thermo Fisher 公司;pFastBac1 载体由本实验室保存;蛋白质裂解液(RIPA Lysis Buffer, P0013B)、His 标签抗体(AF2876-50)和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自碧云天生物技术有限公司;FITC 荧光 Anti 6×His tag® 抗体(His-FITC, ab3554)购自 Abcam 公司。

1.2 蛋白质特征分析

利用在线软件(<https://novopro.cn/tools/>)和 DNASTAR (版本号:11.1.0)对 MaYMV CP 氨基酸序列特征进行分析。

1.3 pFastBac1-MaYMV CP-His 载体的构建

MaYMV 感染的玉米总 RNA 提取参照 RNA 提取试剂盒说明书,提取的总 RNA 保存于-80℃冰箱备用。总 RNA 反转录后利用特异性引物(pFastBac1-MaYMV CP-*Xba* I-F: 5'-tctagaagatctATGAATACGGGAGGTAGAAATGG-3'; pFastBac1-MaYMVCP-*Kpn* I-R: 5'-gggtacTAAATGCTGATGCTGATGCTATTTTCGGGTTTGAACATTG-3')。引物中小写字母为酶切位点,下划线部分字母为 6×His 标签序列)和高保真酶 Prime-

STAR® Max DNA Polymerase 进行扩增,根据说明书设置反应体系如下:25 μl 2×PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Mix、5 μl cDNA 模板、上下游引物各 1 μl、18 μl 无菌水;扩增程序如下:98℃ 3 min, 98℃ 10 s, 58℃ 15 s, 72℃ 45 s, 72℃ 8 min, 16℃ 保存。获得的片段经切胶回收后,连接至克隆载体,经 PCR 检测、酶切验证和测序验证后,将正确的质粒连接至 pFastBac1 载体,利用热激法将连接载体转化入 Trelief™ 5α 感受态细胞,涂布于含氨苄氯霉素的平板上,挑取单菌落,经 PCR 检测后摇菌并利用试剂盒提取质粒。质粒酶切验证和测序验证后,将测序结果正确的质粒(pFastBac1-MaYMV CP-His)保存于-20℃备用。

1.4 重组穿梭质粒的制备

参照杆状病毒表达系统说明书,制备 MaYMV CP 的重组穿梭质粒,方法如下:将 pFastBac1-MaYMV CP-His 质粒转化至 DH10Bac 感受态细胞,涂布于含有 100 μg/ml 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-gal)、50 μg/ml 卡那霉素、50 μg/ml 四环素、40 μg/ml 异丙基硫代半乳糖苷和 7 μg/ml 庆大霉素的 LB 平板上倒置培养,挑取白色菌落接种至含有以上抗生素的平板上复筛,将同样为白色的菌落接种至含有 50 μg/ml 卡那霉素、50 μg/ml 四环素和 7 μg/ml 庆大霉素的 3 ml 液体 LB 培养基中,在 37℃ 220 r/min 摇床上过夜振荡培养,用于穿梭质粒的提取,将提取的质粒命名为 Bacmids-MaYMV CP-His。

1.5 MaYMV CP 的亚细胞定位观察

参照 Lipofectamine™ 3000 的使用说明书,将 Bacmids-MaYMV CP-His 重组穿梭质粒转染至草地贪夜蛾细胞(Sf9)中,转染 48 h 后取出细胞,用 1×PBS 润洗 3 次,使用 2%的多聚甲醛固定 30 min,0.1% Triton X-100 渗透 15 min,1×PBS 润洗 3 次,使用 His-FITC 抗体在避光条件下对细胞标记 1 h,将抗体孵育处理好的细胞置于激光共聚焦显微镜 LSM880 下观察。

1.6 MaYMV CP 的 Western blot 分析

取重组穿梭质粒转染后的 Sf9 细胞,使用蛋白质裂解液提取细胞总蛋白质,裂解后离心并吸取上清液,加入适量 SDS-PAGE 5×Loading buffer,在 99℃条件下处理 10 min,12 000 r/min 离心 2 min。取 10 μl 的蛋白质样品在 12% SDS-PAGE 胶上电泳,电泳结束后,使用金斯瑞 eBlot™ L1 快速湿转仪,参照说明书对蛋白质进行印记。使用相应的抗体对 MaYMV CP-His 检测,使用天能 Tanon 5200 Multi 全自动化学发光成像分析系统观察结果。

2 结果与分析

2.1 MaYMV CP 特征分析

为了更加深入了解 MaYMV CP 的特征,我们利用 DNASTAR 和在线软件从蛋白质的疏水性、信号肽、跨膜区、核定位信号和蛋白质基序(Motif)等方面对 MaYMV CP 蛋白

特性进行了分析,结果发现 MaYMV CP 含有 197 个氨基酸,相对分子质量为 2.14×10^4 ,含有 36 个强碱氨基酸、13 个强酸氨基酸、59 个疏水性氨基酸和 138 个亲水性氨基酸,表明 MaYMV CP 是一个亲水蛋白质。在对其信号肽和跨膜区进行分析时发现, MaYMV CP 蛋白不存在信号肽和跨膜区;进一步分析发现, MaYMV CP 蛋白在氨基酸序列的 N 端有两个相近的核定位信号,该结果表明 CP 蛋白可能定位于细胞核内。在对其蛋白质 motif 分析时发现, MaYMV CP 存在两个酰胺化位点,表明 CP 蛋白可能发生酰胺化修饰。

2.2 pFastBac1-MaYMV CP-His 载体的验证

用特异性引物 pFastBac1-MaYMV CP-*Xba* I-F 和 pFastBac1-MaYMV CP-*Kpn* I-R 扩增 MaYMV CP,切胶回收后将其克隆至 TA/Blunt-Zero 中间载体,PCR 检测、酶切验证和测序正确的质粒用于后续杆状病毒表达载体的构建。利用 T4 DNA 连接酶将酶切后的片段连接至酶切后的 pFastBac1 载体上,得到质粒 pFastBac1-MaYMV CP-His。对质粒 pFastBac1-MaYMV CP-His 进行菌液检测,发现均为阳性克隆,随后挑选 2 个阳性克隆,摇菌提取质粒进行酶切验证发现两条清晰的条带,并且其中一条与目的片段大小一致,经测序后将阳性质粒用于重组穿梭质粒的制备。

2.3 Bacmids-MaYMV CP-His 重组穿梭质粒的验证

为了获得重组穿梭质粒,利用热激法将构建成功的 pFastBac1-MaYMV CP-His 转化入 DH10Bac 感受态细胞,涂布于含有多种抗生素的 LB 平板上,倒置培养 48 h 后可以看到蓝色和白色菌落,从中挑取白色菌落至新的含有多种抗生素的平板上,挑取仍为白色的菌落,接种至新鲜的含有多种抗生素的 LB 液体培养基中,振荡培养 16 h,提取质粒即为重组穿梭质粒 Bacmids-MaYMV CP-His。

2.4 MaYMV CP 的亚细胞定位和蛋白检测

为了明确 MaYMV CP 的亚细胞定位,我们对转染了 Bacmids-MaYMV CP-His 质粒的 Sf9 细胞进行荧光标记,置于激光共聚焦显微镜下观察,结果发现无杆状病毒感染的 Sf9 细胞内没有 His-FITC 的荧光信号,仅 DAPI 标记的细胞核信号;而转染了 Bacmids-MaYMV CP-His 质粒的细胞,可以检测到定位于细胞质的绿色荧光信号,此外,在细胞核内也可以观察到 MaYMV CP-His 的表达,这一结果表明 MaYMV CP 定位于细胞质和细胞核内,与预测的该蛋白质具有核定位信号的特征一致。

为了进一步明确 Sf9 细胞内 Bacmids-MaYMV CP-His 的表达,我们提取了转染杆状病毒质粒的细胞总蛋白质,利用 Western blot 进行检测发现,转染了杆状病毒 MaYMV CP-His 的细胞内可以检测到相对分子质量为 2.2×10^4 的目的蛋白质,而转染了空载体的细胞内没有检测到目的蛋白质,但在两种细胞内均可以检测到单一的相对分子质量为 4.4×10^4 的内参蛋白 β -actin,该结果进一步表明 MaYMV CP-His 在 Sf9 细胞内的表达。

3 讨论

自 2016 年 Chen 等^[1]报道 MaYMV 的发生与为害以来,该病毒先后在亚洲其他国家、美洲和非洲等国家和地区的玉米种植区发生和流行^[2-9],该病毒对全球玉米生产造成了巨大的损失。目前, MaYMV 在中国已蔓延至多个省市,给中国玉米生产造成了较为严重的负面影响。因此研究 MaYMV 蛋白质的定位,对 MaYMV 蛋白质的功能及其与寄主和介体的互作关系具有十分重要的意义。

病毒 CP 在病毒生命周期及其与寄主或者介体互作等方面发挥着十分重要的作用^[26]。Dai 等^[27]发现,顺式表达的 CP 蛋白对芜菁花叶病毒(Turnip mosaic virus, TuMV)在植物细胞内的运动是必需的。目前关于 MaYMV CP 在介体蚜虫或者寄主植物中的功能尚不明确。

本研究对 MaYMV CP 氨基酸序列进行预测,结果发现,该蛋白质在 N 端和 C 端分别存在 NGRR 和 GGRR 两个酰胺化位点。蛋白质或者多肽 C 端酰胺化是最重要的翻译后修饰,对于信号转导和受体识别等多种生物活动都至关重要,然而目前还没有关于病毒蛋白质酰胺化调控病毒侵染的报道。MaYMV CP 的 C 端存在的 GGRR 酰胺化位点是否调控该病毒在介体蚜虫或寄主植物内的侵染,还需要进一步研究。

MaYMV 主要由蚜虫进行传播,目前已知马铃薯卷叶病毒属成员病毒以网格蛋白介导的内吞方式突破介体蚜虫的肠道和唾液腺屏障^[19]。PLRV 基因组编码的 P0 蛋白、P1 蛋白和 P7 蛋白通过抑制因介体蚜虫取食引起的寄主植物激素变化,进而促进介体蚜虫的生殖^[28], MaYMV CP 是否会影响寄主植物激素变化进而影响介体昆虫生殖反应仍需进一步研究。本研究发现, MaYMV CP 含有核定位信号,并且定位于细胞质和细胞核内。有研究结果表明,水稻条纹病毒(Rice stripe virus, RSV)核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, NP)进入介体灰飞虱细胞核后与转录因子 YY1 互作,抑制 YY1 对凋亡抑制因子 FAIM 的激活,促进了昆虫中肠细胞的抗病毒凋亡反应,最终抑制病毒复制^[29], MaYMV CP 进入细胞核后是否会调控病毒的增殖还需要进一步研究。MaYMV 基因组除了编码 CP 蛋白之外,还编码 P0 和 MP 等蛋白,然而目前关于这些蛋白在植物和昆虫细胞内的亚细胞定位及其具体功能仍不清楚,为了预防 MaYMV 的大面积暴发与流行,当前亟需对该病毒及其介体蚜虫以及寄主玉米之间的互作进行深入研究。

参考文献:

- [1] CHEN S, JIANG G Z, WU J X, et al. Characterization of a novel Polerovirus infecting maize in China [J]. Viruses, 2016, 8 (5): 120.
- [2] GONÇALVES M C, GODINHO M, ALVES-FREITAS D M T, et al.

- First report of maize yellow mosaic virus infecting maize in Brazil [J]. *Plant Disease*, 2017, 101(12): 2156.
- [3] BERNREITER A, TEJEIRO R G, JARRIN D, et al. First report of maize yellow mosaic virus infecting maize in Ecuador [J]. *New Disease Reports*, 2017, 36: 11.
- [4] LIM S, YOON Y, JANG Y W, et al. First report of maize yellow mosaic virus on *Zea mays* in South Korea [J]. *Plant Disease*, 2018, 102(9): 1864.
- [5] PALANGA E, LONGUE R D S, KOALA M, et al. First report of maize yellow mosaic virus infecting maize in Burkina Faso [J]. *New Disease Reports*, 2017, 35: 26.
- [6] MASSAWE D P, STEWART L R, KAMATENESI J, et al. Complete sequence and diversity of a maize-associated *Polerovirus* in East Africa [J]. *Virus Genes*, 2018, 54(3): 432-437.
- [7] GUADIE D, ABRAHAM A, TESFAYE K, et al. First report of maize yellow mosaic virus infecting maize (*Zea mays*) in Ethiopia [J]. *Plant Disease*, 2018, 102(5): 1044.
- [8] YAHAYA A, DANGORA D B, ALABI O J, et al. Detection and diversity of maize yellow mosaic virus infecting maize in Nigeria [J]. *Virus Disease*, 2019, 30(4): 538-544.
- [9] READ D A, FEATHERSTONE J, REES D J G, et al. First report of maize yellow mosaic virus (MaYMV) on maize (*Zea mays*) in Tanzania [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2019, 101: 203.
- [10] WANG F, ZHOU B G, GAO Z L, et al. A new species of the genus *Polerovirus* causing symptoms similar to maize yellow dwarf virus-RMV of maize in China [J]. *Plant Disease*, 2016, 100(7): 1508.
- [11] STEWART L R, TODD J, WILLIE K, et al. A recently discovered maize polerovirus causes leaf reddening symptoms in several maize genotypes and is transmitted by both the corn leaf aphid (*Rhopalosiphum maidis*) and the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*) [J]. *Plant Disease*, 2020, 104(6): 1589-1592.
- [12] SHI Y J, HAN X Y, LI Q L, et al. First report of maize yellow mosaic virus causing maize reddening in Henan, China [J]. *Plant Disease*, 2022, 106(12): 3220.
- [13] SUN S R, CHEN J S, HE E Q, et al. Genetic variability and molecular evolution of maize yellow mosaic virus populations from different geographic origins [J]. *Plant Disease*, 2021, 105(4): 896-903.
- [14] SUN S R, CHEN J S, YANG J, et al. First report of maize yellow mosaic virus infecting sugarcane in China [J]. *Plant Disease*, 2019, 103(9): 2482.
- [15] LIM S, YOON Y, JANG Y W, et al. First report of maize yellow mosaic virus infecting *Panicum miliaceum* and *Sorghum bicolor* in South Korea [J]. *Plant Disease*, 2017, 102(3): 689.
- [16] YAHAYA A, RWAHNIH M A, DANGORA D B, et al. First report of maize yellow mosaic virus infecting sugarcane (*Saccharum* spp.) and itch grass (*Rottboellia cochinchinensis*) in Nigeria [J]. *Plant Disease*, 2021, 101(7): 1335.
- [17] NITHYA K, VISHNUVARDHAN J, BALASARAVANAN S, et al. First report of maize yellow mosaic virus (MaYMV) infecting sugarcane in India and its molecular characterization [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2021, 50: 633-638.
- [18] GUO M, YUAN X, SONG Y, et al. First report of maize yellow mosaic virus (MaYMV) naturally infecting wheat in China [J]. *Plant Disease*, 2022, 106(10): 2763.
- [19] FAROOQ T, HUSSAIN M D, SHAKEEL M T, et al. Global genetic diversity and evolutionary patterns among Potato leafroll virus populations [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1022016.
- [20] DOLJA V, HALDEMAN R, ROBERTSON N, et al. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants [J]. *EMBO Journal*, 1994, 13(6): 1482-1491.
- [21] IVANOV K I, MÄKINEN K. Coat proteins, host factors and plant viral replication [J]. *Current Opinion of Virology*, 2003, 2: 712-718.
- [22] 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]. *Journal of Virology*, 2005, 79(2): 1207-1214.
- [23] HOGENHOUT S A, AMMAR E D, WHITFIELD A E, et al. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2008, 46: 327-359.
- [24] WANG Q, LU L, ZENG M, et al. Rice black-streaked dwarf virus P10 promotes phosphorylation of GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) to induce autophagy in *Laodelphax striatellus* [J]. *Autophagy*, 2022, 18(4): 745-764.
- [25] WANG H, ZHANG J, LIU H, et al. A plant virus hijacks phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate to escape autophagic degradation in its insect vector [J]. *Autophagy*, 2022, 10: 1-16.
- [26] 蒋素华, 白冰洋, 牛苏燕, 等. 甘薯 G 病毒基因克隆及组培快繁苗病毒检测 [J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(24): 60-64.
- [27] DAI Z, HE R, BERNARDS M A, et al. The cis-expression of the coat protein of turnip mosaic virus is essential for viral intercellular movement in plants [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(9): 1194-1211.
- [28] PATTON M F, BAK A, SAYRE J M, et al. A polerovirus, potato leafroll virus, alters plant-vector interactions using three viral proteins [J]. *Plant Cell Environment*, 2020, 43(2): 387-399.
- [29] ZHAO W, ZHU J, LU H, et al. The nucleocapsid protein of rice stripe virus in cell nuclei of vector insect regulates viral replication [J]. *Protein Cell*, 2022, 13(5): 360-378.

(责任编辑:成纾寒)