

2—5A 系统在植物抗病毒中的应用

陈 冉^{1,2}, 蒋士君², 张振臣^{1*}

(1. 河南省农业科学院植物保护研究所, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州 450002)

中图分类号: S432 文献标识码: A 文章编号: 1004—3268(2005)04—0041—03

植物病毒病害给农作物生产造成了严重危害, 传统的防治方法远远无法满足生产的要求。近 20 年来, 随着基因工程技术的发展, 为防治植物病毒病开辟了新的途径。1986 年, Powell—Abel 等将烟草花叶病毒(TMV)的外壳蛋白基因转入烟草, 获得第 1 例抗 TMV 转基因植株^[1]。自此以后, 发展了多种植物抗病毒基因工程策略, 应用较多的基因有病毒来源的外壳蛋白基因、复制酶基因、移动蛋白基因等; 非病毒来源的植物的抗病基因、毒素蛋白基因以及来自动物的抗体基因等。

在高等脊椎动物细胞内, 干扰素 (IFN) 细胞因子家族能诱导细胞产生抗病毒状态。在病毒侵染发生后, 受病毒侵染的细胞产生并分泌 α 或 β 干扰素, 干扰素结合在细胞表面的受体上, 激活 jak—STAT 信号转导途径诱导干扰素刺激基因, 这些基因产生一些蛋白质行使干扰素的功能, 包括抗病毒功能。2

—5A 系统就是由干扰素诱导的一种抗病毒途径, 此途径广泛存在于爬行动物、鸟类和哺乳动物中。

2—5A (本文以 2—5A 表示所有 2'—5' 连键的寡聚腺苷酸) 系统中, 2'—5' 寡腺苷酸合成酶 (2, 5—oligoadenylate synthetase, 2—5 OASE) 是干扰素诱导产生的最重要的一种酶, 此酶激活 Ribonuclease L (RNaseL), 行使抗病毒功能。作者综述了 2—5A 系统的基本特性及其在植物抗病毒中的应用。

1 2—5A 系统基本特性

2—5A 系统主要由 2 种酶组成: 2—5 OASE 和 RNaseL。2—5A 有很多重要生物功能, 近年来的研究表明, 2—5A 可能是超出仅作为干扰素功能介导体的一种多功能细胞调节因子^[2]。

1.1 2—5 OASE 和 RNaseL

1976 年 Roberts 等报道, IFN 处理细胞的抽提

收稿日期: 2004—10—29

基金项目: 河南省杰出人才创新基金 (0221000700); 国家攻关引导项目 (2003BA761C) 资助

作者简介: 陈 冉 (1977—), 男, 河南淮滨人, 在读硕士, 主要从事植物抗病毒基因工程研究。

通讯作者: 张振臣 (1964—), 男, 河南延津人, 研究员、博士, 主要从事植物病毒病害的研究。E—Mail: zhangzhenchen@126.com

抗白粉病基因的分子标记配合使用, 可以在较短的时间内选育含 2 个以上抗白粉病基因的聚合品种, 在小麦抗白粉病基因的分子检测和育种实践中具有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] 陈松柏, 蔡一林, 周荣华, 等. 小麦抗白粉病基因 *Pm4* 的分子标记[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(3): 231—234.
- [2] Tanksley S D, Yong N D, Paterson A H, et al. RFLP mapping in plant breeding: new tools for old science[J]. Biotechnology, 1989, 7(3): 257—264.
- [3] 刘红彦, 何文兰, 杨共强, 等. 小麦抗白粉病基因的分子标记及标记辅助育种研究进展[J]. 河南农业大学学

报, 2001, 35(1): 26—31.

- [4] 宋玉立, 何文兰, 张忠山. 河南省小麦白粉菌毒性结构与小麦品种抗白粉病性分析[J]. 河南农业科学, 1997 (12): 19—21.
- [5] Ma Z Q, Sorrell M E, Tanksley S D. RFLP markers linked to powdery mildew resistance genes *Pm1*, *Pm2*, *Pm3* and *Pm4* in wheat[J]. Genome, 1994, 37: 871—875.
- [6] 刘金元, 刘大钧, 陶文静, 等. 小麦白粉病抗性基因 *Pm4a* 的 RFLP 标记转化为 STS 标记的研究[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(2): 113—116.
- [7] Ma Z Q, Wei J B, Cheng S H. PCR—based markers for the powdery mildew resistance gene *Pm4a* in wheat[J]. Ther Appl Genet, 2004, 109: 140—145.

物能产生一种低分子量的蛋白质生物合成抑制剂 (LMWI), 此后, 通过化学和酶学方法证明此 LMWI 是一类连键为 2'-5' 磷酸二酯键的多聚腺苷酸化合物。它是由 IFN 诱导的 2-5 OASE 合成的, 2-5 OASE 需要双链 RNA 存在时, 才能诱导产生 2-5A。另一个就是依赖 2-5A 的 RNaseL, RNaseL 是一种动物细胞内潜在的核酸内切酶, 广泛存在于人、鼠、兔、爬虫等的器官、组织和培养细胞。2-5A 激活 RNaseL, RNaseL 降解病毒 RNA, 阻止病毒复制, 达到抗病毒的目的。

1.2 2-5A 系统的作用途径

2-5A-RNaseL 作用途径就是: 在双链 RNA 存在时, 2-5 OASE 被激活, 以细胞中的 ATP 和单链 RNA 为底物, 合成一种特殊结构, 激活 RNaseL, RNaseL 降解 mRNA 和 rRNA, 从而抑制蛋白质的生物合成。该途径是 IFN 和 2-5A 发挥生物效应的主要途径。因为病毒感染的细胞通常都含有激活 2-5 OASE 的双链 RNA, 单链 RNA 病毒的生命周期中也含有双链 RNA 的中间体。RNaseL 可降解经干扰素治疗的被病毒感染的细胞中的 RNA, 目前, 已证实了哺乳动物细胞 2-5A 系统可以抑制细小核糖核酸病毒、脊髓灰质炎病毒和脑炎灰质炎病毒的复制。

2 2-5A 系统在植物抗病毒中的应用

干扰素的抗病毒功能在动物中已有很多的应用, 但是植物中没有类似哺乳动物那样的 2-5A 系统。Kerr 等人的研究表明, 在烟草属植物中检测不到 RNaseL 的存在, 在烟草花叶病毒 (TMV) 侵染的、经干扰素处理的, 或者 poly (I)、poly (C) 处理的植物中都没有检测到 2-5A 合成酶和 2-5A^[3]。但是, 由于很多植物病毒都是 RNA 病毒, 它们在寄主细胞中复制时, 都会产生双链 RNA 中间体。因此, 人们就设想干扰素作用于植物时是否会产生类似动物细胞那样的抗病毒特性。近年来的研究发现, 外源人的 α 或 β 干扰素具有保护植物免受某些病毒侵染的作用, 因此, 利用基因工程技术, 将外源 IFN 基因导入植物体内, 就有可能培育出具有抗病毒特性的转基因植物, 达到广谱抗病毒的目的。

人体干扰素 (HuIFN) 能在某些植物中诱导对病毒的抗性。Orchansky 等 (1982)^[4] 发现, HuIFN 能降低 TMV 对 Samsun 烟草叶碟和原生质体的侵染。

Rosenberg 等 (1985) 也证实, HuIFN α 能抑制不同品种的烟草原生质体中 TMV 的增殖。Sela 及其同事 (1982) 也在普通烟-TMV 系统中发现经基因工程改造的 HuIFN 具有同天然 HuIFN 相类似的效应。Vicent 等 (1987) 报道, 除 HuIFN α 外, HuIFN γ 也能显著地抑制 TMV 对曼陀罗 (*Datura stramonium*) 的侵染。

Yair Devash (1982)^[5] 等报道, 干扰素诱导动物细胞产生的 2'-5' 寡聚腺苷酸能保护植物免于 TMV 的侵染。当用 2'-5' 寡聚腺苷酸处理植物后, 通过酶联免疫吸附测定, 发现 TMV 增殖可减少 80%~90%, 但 2-5A 必须早于病毒侵染使用才能获得抗病毒活性, 而且在接种 6h 后活性最强。

Yair Devash (1984)^[6] 等用病毒侵染试验和酶联免疫吸附测定方法, 分别在 TMV 侵染的烟草叶碟、原生质体和烟草植株上, 用 5' 端去磷酸化的 2'-5' 腺苷酸三体复合物和具有 2'-5' 三体复合物的类似物进行处理, 发现二者都可以抑制 TMV 的复制。

在烟草原生质体上的试验表明, 用 1×10^{-8} mol/L 2'-5' 腺苷酸三体复合物作用于原生质体, 72 h 后能抑制 53% 的 TMV 复制。浓度为 1×10^{-7} mol/L 时, 2'-5' 腺苷酸三体复合物和 2'-5'-虫草苷-3'-脱氧腺苷三体复合物抑制病毒复制分别可达 93% 和 96%。

在完整植株上的试验表明, 2'-5' 腺苷酸三体复合物及其类似物都可抑制 TMV 的复制。当用 10^{-6} mol/L 的 2'-5' 腺苷酸三体复合物处理受 TMV 侵染的 *N. glutinosa* 叶片时, 对病毒复制的抑制可达 89%~99%。

在烟草叶碟上的实验表明, 用 200 nmol/L 的 2'-5' 腺苷酸三体复合物可以完全抑制 TMV 复制 60 h, 96 h 后抑制活性完全消失。

Tuive (1993)^[7] 等将一种来自大鼠的 2-5 OASE 基因和花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 35S 启动子连接到植物表达载体 pHTT202 上, 用农杆菌介导法转化马铃薯, 获得的转基因植株, 经 Southern 杂交和 Northern 杂交, 证明了 2-5 OASE 基因在转基因马铃薯中的整合和表达。大田条件下, 用非转基因马铃薯和表达马铃薯 X 病毒 (PVX) 外壳蛋白 (CP) 基因的转基因马铃薯作对照进行试验, 发现转 2-5 OASE 基因和 PVX CP 基因的转基因植株都能抑制 PVX 的侵染, 表现在转基因马铃薯叶片和

块茎中 PVX 病毒浓度要低于非转基因植株,但同时也发现,表达 2—5 OASE 基因的转基因马铃薯叶片和块茎中的病毒浓度要低于表达 PVX CP 基因的转基因植株。

研究发现,只表达鼠 2—5 OASE 基因,而没有表达 RNaseL 基因的转基因马铃薯对 PVX 的侵染只是部分抑制而不是在所有转基因植株中都能产生抗性,因此,人们开始尝试把 2—5A 系统中的 2 种酶 2—5 OASE 和 RNaseL 的基因都转入植物中。

Mitra 等人^[3]把人 2—5 OASE 基因和人 RNaseL 基因和花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S 启动子连接到双元植物表达载体 pAM 2200 上,用农杆菌介导法转化烟草,获得转基因植株。经 Southern blot、Northern blot 和 Western blot 鉴定,转基因植株同时存在 2—5 OASE 与 RNaseL。用 TMV、苜蓿花叶病毒(AMV)和烟草蚀纹病毒(TEV)接种转基因植株,并设单独表达 2—5 OASE、RNaseL 和植物表达载体 Pam2200 的转基因植株作为对照。试验结果表明,表达人 2—5 OASE 基因和人 RNaseL 基因的转基因烟草能抑制病毒的侵染,而且不管 AMV 病毒浓度高低,只在接种叶片上产生症状;当接种 TEV 病毒时,病毒虽然能向未接种的叶片转移,但 TEV 的数量有很明显的减少。

另外,Ogawa^[8]也报道,同时含 2—5 OASE 与 RNaseL 的转基因烟草杂交后代,能对 TMV,黄瓜花叶病毒(CMV)和马铃薯 Y 病毒(PVY)的侵染产生抗性。并能完全抑制 CMV 的侵染,只在 CMV 接种叶片上形成坏死斑;PVY 侵染后,也只在接种叶片上形成坏死斑,病毒数量没有增加。但是当用 CMV 或 PVY 侵染单独表达 2—5 OASE 或 RNaseL 的转基因植株时,则能形成典型的症状。

我国学者陈炬等^[9]首次把人 IFN α 基因在烟草植株中表达成功。随后也有人在水稻等作物上进行了尝试,证明干扰素基因能在植物细胞中表达,并使植物产生抗病毒性^[9~12]

我们也构建了 2—5A 基因和 RNaseL 基因的植物表达载体,在农杆菌介导下,对番茄和辣椒进行转化,目前已获得转基因植株,正在进行抗病性鉴定,期望能获得具有抗性的转基因植株。

我国是个农业大国,每年由于病毒病害造成的损失难以计数。植物抗病毒基因工程给植物病毒病的防治提供了新的途径。相信随着越来越多的抗

病毒基因的克隆和利用,抗病毒转基因植物将会得到更广泛的应用。

参考文献:

- [1] Powell Abel P, Nelson R S, De B *et al.* Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco Mosaic Virus coat protein gene[J]. *Science* 1986, 232: 738—743.
- [2] 黎荣松,刘新垣. 干扰素作用机理和 2—5A 系统[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1990, 17(3): 188—193.
- [3] Amitava Mitra, Danw Higgins, Willem G, *et al.* Silverman A mammalian 2—5A system functions as an antiviral pathway in transgenic plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(6): 6780—6785.
- [4] Patricia Orchansky, Menachem Rubinstein. Human Interferons Protect Plants from Virus Infection[J]. *The National Academy of Sciences* 1982, 79(7): 2278—2280.
- [5] Devash Y, Biggs S. Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco leaf disks is inhibited by (2'—5') oligoadenylate[J]. *Science*, 1982, 216: 1415—1416.
- [6] Devash Y, Gera A, Willis D H, *et al.* 5'—dephosphorylated 2'—5'—adenylate trimer and its analogs inhibition of tobacco mosaic virus replication in tobacco mosaic virus-infected leaf discs, protoplasts and intact tobacco plant [J]. *J Biol Chem*, 1984, 259: 3482—3486.
- [7] True E. Transgenic potato plants expressing mamalian 2', 5'—oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X. infection under field conditions[J]. *Bio/Technology*, 1993, 11: 1048—1052.
- [8] Amitava Mitra, Danw Higgins, Willem G, *et al.* Silverman A mammalian 2—5A system functions as an antiviral pathway in transgenic plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(6): 6780—6785.
- [9] Toshiya Ogawa, Tamaki Hori, Isao Ishida. Virus-induced cell death in plants expressing the mammalian 2', 5' oligoadenylate system[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 1566—1569.
- [10] 陈炬,孙勇如,李向辉,等. α 干扰素 cDNA 在转化的烟草植株中的表达[J]. *中国科学(B 辑)*, 1990(3): 253—260.
- [11] 朱祯,李玉英. 转基因水稻植物再生及外源人 α 干扰素 cDNA 表达[J]. *中国科学(B 辑)*, 1992(2): 149—155.
- [12] 李向辉. 植物遗传操作[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996.
- [13] 侯云德. 分子病毒学[M]. 北京: 学苑出版社, 1990.