

基础研究

7种RNA沉默抑制子对植物病毒载体表达系统表达水平的影响

王盛^{1,2},董洁¹,曹懋¹,穆红珍¹,丁国平¹,张虹¹¹宁夏大学生命科学学院,²西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室,宁夏银川750021

摘要:目的 探索不同植物病毒RNA沉默抑制子对植物病毒载体表达系统重组蛋白表达水平的作用,为合理高效地利用这一新型的外源基因表达平台奠定基础。方法 构建了7种不同的RNA沉默抑制子瞬时表达载体,以农杆菌渗透法,与马铃薯X病毒表达载体PVXd-GFP共侵染寄主植物本明烟,通过对报告基因绿色荧光蛋白(GFP)的荧光观察,并以Western blotting、ELISA和RT-qPCR等测定GFP在烟草中的表达情况,分析不同RNA沉默抑制子对植物中外源基因表达水平的作用和特点。结果 7种病毒RNA沉默抑制子对外源基因GFP在烟草中表达水平的作用效果和持续时间存在差异,其中,番茄丛矮病毒的P19蛋白的增效作用最好,作用时间也最长;非洲木薯花叶病毒的AC2蛋白和水稻黄斑驳病毒的P1蛋白无明显的增效作用。结论 RNA沉默抑制子可以通过抑制病毒诱导的RNA沉默来提高外源基因在植物中的表达水平和表达持续时间,但是不同的植物病毒载体表达系统需要通过筛选获得其最佳的共表达沉默抑制子“伴侣”。

关键词:RNA沉默抑制子;马铃薯X病毒;共表达;绿色荧光蛋白

中图分类号:Q78 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)11-1536-07

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.11.002

Effects of seven RNA silencing suppressors on heterologous expression of green fluorescence protein expression mediated by a plant virus-based system in *Nicotiana benthamiana*

WANG Sheng^{1,2}, DONG Jie¹, CAO Min¹, MU Hongzhen¹, DING Guoping¹, ZHANG Hong¹School of Life Science¹, Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China², Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: Objective To test the effects of 7 virus-encoded RNA silencing suppressors (RSSs) for enhancement of a plant virus-based vector system-mediated heterologous expression of green fluorescence protein (GFP) in *Nicotiana benthamiana*. **Methods** Seven transient expression vectors for the 7 RSSs were constructed and co-inoculated on the leaves of *Nicotiana benthamiana* with PVXd-GFP vector, a novel Potato virus X-based plant expression vector, through agroinfiltration. The protein and mRNA expression levels of the reporter gene GFP in the co-inoculated *Nicotiana* leaves were examined by Western blotting, ELISA and RT-qPCR to assess the effect of the RSSs for GFP expression enhancement. **Results** The 7 RSSs differed in the degree and duration of enhancement of heterologous GFP expression, and the p19 protein of Tomato bushy stunt virus (TBSV) induced the highest expression of GFP. African cassava mosaic virus AC2 protein and Rice yellow mottle virus P1 protein produced no obvious enhancement GFP expression. **Conclusion** Transient co-expression of RSSs suppresses host silencing response to allow high-level and long-term expression of heterologous genes in plant, but the optimal RSS has to be identified for each plant virus-based expression vector system.

Key words: RNA silencing suppressors; *Potato virus X*; co-expression; green fluorescent protein

随着基因工程技术的发展,利用植物作为生物反应器生产外源蛋白的研究因其广阔的商业前景在世界范围内受到广泛地关注^[1]。植物RNA病毒载体表达系统是近年发展起来的新型表达系统,外源基因随着病毒在植物体内的复制和积累而得到高效表达^[2],因而该系统在短时间内就可以生产大量成本低廉、安全的目的

蛋白^[3]。作为一种植物抵抗外界病毒入侵的自然机制, RNA沉默会影响病毒载体表达系统中外源基因的表达水平^[4]。大多数的植物病毒都会编码一种或多种RNA沉默抑制因子(RNA silencing suppressors, RSSs)^[5], RSSs与目的基因共表达可以使外源目的基因在植物中持续而大量的表达^[6-8]。来源于番茄丛矮病毒(TBSV)的P19沉默抑制因子就被广泛地用于提高外源基因在植物中的表达水平。目前,研究人员已先后从植物病毒、动物和人类病毒中鉴定出了20多种RNA沉默抑制子^[9]。它们之间没有序列同源性,结构上也表现高度的多样性,抑制RNA沉默的分子机制也不尽相同,因而了

收稿日期:2012-09-16

基金项目:国家自然科学基金(31060023,31160032);教育部科学技术研究重点项目(209135)

Supported by National Natural Science Foundation of China (31060023, 31160032).

作者简介:王盛,博士,副教授, E-mail: wang_s@nxu.edu.cn

解不同 RSSs 对外源基因表达的增效作用差异对于合理地利用 RSSs 和应用植物病毒载体表达系统均具有重要的现实意义。本研究构建了来源于不同植物病毒的 7 种 RSSs 瞬时表达载体,与表达外源基因 GFP 的马铃薯 X 病毒(*Potato virus X*, PVX)表达载体 PVXdT-GFP^[10]共侵染,通过分析植物中 GFP 的表达情况,探索不同 RSSs 的促进表达的作用效果和特点。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体和植物种子

大肠杆菌(*Escherich coli*)DH5 α 菌株和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV3101(C58)由本实验室保存;7 种不同的 RSSs 基因分别为美国俄勒冈州立大学 Valerian V. Dolja 博士和英国剑桥大学 David Baulcombe 博士惠赠(表 1);农杆菌二元载体 pCB302 由

美国俄勒冈州立大学 Valerian V. Dolja 博士惠赠;马铃薯 X 病毒表达载体 PVXdT-GFP 由俄罗斯莫斯科大学 J. G. Atabekov 博士惠赠;本明烟(*Nicotiana benthamiana*)种子由中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所张永江博士提供。

1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶 *Nco* I 和 *Xba* I (NEB), Anti-GFP 兔 IgG (Bioss), HRP-羊抗兔 IgG (中杉生物), 实时荧光定量 PCR 试剂盒(全式金), ECL 发光试剂盒(鼎国生物), GFP 标准品(BioVision)。

1.3 不同 RSSs 瞬时表达载体的构建

用不同 RSSs 特异引物(引物及引物序列见表 2)分别扩增目的基因片段,回收后的片段和载体 pCB302 分别用 *Nco* I 和 *Xba* I 酶切,酶切产物经回收、连接、转化、筛选及测序等步骤获得不同 RSSs 瞬时表达载体重组质粒。

表 1 实验中使用的病毒 RNA 沉默抑制子

Tab.1 RNA silencing suppressors (RSSs) used in this study

沉默抑制子	病毒	病毒属	文献
2b	黄瓜花叶病毒 Cucumber mosaic virus (CMV)	黄瓜花叶病毒属 Cucumovirus	[11]
AC2	非洲木薯花叶病毒 African cassava mosaic virus (ACMV)	菜豆金色花叶病毒属 Begomovirus	[12-13]
P25	马铃薯 X 病毒 Potato virus X (PVX)	马铃薯 X 病毒属 Potexvirus	[14]
P21	甜菜黄化病毒 Beet yellowing virus (BYV)	甜菜黄化病毒属 Closteovirus	[15-16]
P19	番茄丛矮病毒 Tomato bushy stunt virus (TBSV)	番茄丛矮病毒属 Tombusvirus	[7, 17]
P1	水稻黄斑驳病毒 Rice yellow mottle virus (RYMV)	南方菜豆花叶病毒属 Sobemovirus	[18]
HC-Pro	烟草蚀纹病毒 Tobacco etch virus (TEV)	马铃薯 Y 病毒属 Potyvirus	[19]

表 2 用于质粒构建的引物及引物序列

Tab.2 Primers used for plasmid construction

质粒	引物	引物长度 (nt)	引物序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
pCBNoX 2b	2b(+)	25	ggcgCCATGGatgtgttgacagtag	303
	2b(-)	27	ggcgTCTAGAtcaaacgaccctcgg	
pCBNoX AC2	AC2(+)	25	ggcgCCATGgaatcttcatcacct	408
	AC2(-)	30	ggcgTCTAGActaaagacccttaagaaaag	
pCBNoX P25	P25(+)	26	ggcgCCATGGatattctcatagtag	681
	P25 (-)	28	ggcgTCTAGActatggccctgcgcgac	
pCBNoX P21	P21(+)	31	ggcgCCATGGagtttttcttaagtactgtg	534
	P21 (-)	29	ggcgTCTAGAttatacagctataccgagg	
pCBNoX P19	P19(+)	26	ggcgCCATGGaacgactatacaagg	519
	P19 (-)	29	ggcgTCTAGAttactgctttcttttcg	
pCBNoX P1	P1(+)	27	ggcgCCATGgcacgggtggaagtctt	474
	P1 (-)	29	ggcgTCTAGAtcagaattgaggtacttg	
pCBNoX HC-Pro	HC-Pro(+)	28	ggcgCCATGggcgacaataatcaatctctg	1383
	HC-Pro(-)	32	ggcgTCTAGAttatccaacattgaagttttc	

引物序列中的 ggcg 为保护碱基;大写字母碱基代表相应的酶切位点

1.4 重组质粒的农杆菌转化^[20]

取不同RSSs重组质粒和病毒载体PVXdt-GFP各5 μl分别与100 μl农杆菌GV3101感受态细胞混合,置于冰上1 min后,进行电击转化;培养后,挑取单菌落进行菌落PCR鉴定。

1.5 农杆菌渗滤法侵染烟草植物^[21]

将RSS与PVXdt-GFP表达载体的农杆菌菌液分别在LB液体培养基(含50 μg/ml Rif, 50 μg/ml Gen, 50 μg/ml Kan)中28℃振荡培养16~18 h。再将菌液按1:25转接入10 ml IM培养基(含50 μg/ml Rif, 50 μg/ml Gen, 50 μg/ml Kan, 200 μmol/ml AS)中28℃振荡培养至 D_{600} 为0.8。离心收集菌体,等体积重悬(10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MES)。再次离心收集菌体,等体积重悬(10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MES, 200 μmol/ml AS),室温静置2~3 h后侵染。以农杆菌GV3101做空白对照,用无针头的1 ml无菌注射器将不同RSSs载体农杆菌菌悬液和PVXdt-GFP载体农杆菌菌悬液按1:1的比例混合,轻轻压入5~6叶期本明烟草叶片背面,每个点接菌量为0.1 ml。每个处理接3株植物,每株植物接3片叶。打孔取样时,将来源于不同叶位、不同植物的同一处理样品合并为一组,以降低植株和叶位不同造成的实验误差。每组实验重复3次。

1.6 侵染烟草后GFP表达的荧光检测

在暗室,于手持长波紫外灯(Black Ray[®] B-100AP; UVP, Upland, CA)下对侵染烟草叶片GFP表达荧光情况观察并用数码相机记录结果;进一步剥取侵染叶片下表皮制片,在荧光倒置显微镜下观察并记录结果。

1.7 烟草叶片可溶性总蛋白(TSP)的提取

在液氮下研磨烟草叶片,粉末以2.5 ml/g比例加入蛋白提取缓冲液(50 mmol/L Na₃PO₄, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 0.05% Triton X-100, 5 mg/ml 抗坏血酸钠, 10 μg/ml亮抑酶肽, pH 7.2);于4℃下放置1.5 h, 12 000×g离心15 min,取上清-20℃保存。

1.8 SDS-PAGE凝胶电泳和Western blotting

烟草TSP经12%SDS-PAGE后,以Bio-Rad半干转印仪15 V下转移30 min至PVDF膜上。一抗为1:500稀释的Anti-GFP抗体,二抗为1:5000稀释的HRP标记羊抗兔IgG, ECL发光试剂显色。

1.9 烟草叶片中GFP表达量测定

打孔收取烟草叶片样品,称质量后提取其可溶性总蛋白,利用间接ELISA方法对各样品GFP进行定量。以健康烟草叶片样品为背景扣除,以GFP标准样品建立标准曲线。

1.10 实时荧光定量PCR检测外源基因表达水平的调控^[22]

取侵染后烟草叶片,提取总RNA,以β-actin基因为内参,用qPCR技术测定不同处理样品中GFP基因mRNA相对表达水平。

1.11 统计学处理

数据以Microsoft office Excel 2003提供的统计工具进行t-Test分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RSSs瞬时表达载体的构建及其共侵染病毒表达载体—PVXdt-GFP

利用限制性内切酶Nco I和Xba I,将来源于不同植物病毒的RSSs基因片段克隆到农杆菌二元载体pCB302中,获得7种不同的RSSs瞬时表达载体。RSSs序列前后分别融合有CaMV 35S启动子、TEV引导序列和CaMV终止子序列,且整个表达盒位于农杆菌二元载体左右边界之间(图1A),可以利用农杆菌渗滤技术侵染寄主植物。病毒表达载体PVXdt-GFP是以农杆菌二元载体pBIN19为“骨架”的一种基于马铃薯X病毒(Potato virus X, PVX)的RNA病毒表达载体^[10]。载体去除了病毒基因中除RdRp基因外的其他病毒编码序列(图1B),因而既不能在寄主中移动,也不能形成完整的病毒粒体。用来评价不同RSSs作用,可以避免由于病毒移动、寄主生长状态差异以及PVX病毒自身携带的RNA沉默抑制子P25等原因而产生的试验误差。将不同RSSs表达载体分别与PVXdt-GFP载体共侵染寄主植物,通过观察和测定侵染组织中GFP的积累和表达情况,分析不同RSSs对外源基因表达的作用效果和特点。

2.2 共侵染烟草叶片GFP表达的荧光观察

将7个RSSs重组农杆菌菌悬液分别与PVXdt-GFP重组菌悬液混合侵染于寄主本明烟植株同一叶片的的不同部位,不同处理在烟草叶片上的侵染位置如图2A所示。在长波紫外灯下观察侵染叶片GFP表达的荧光情况。空白对照和农杆菌GV3101菌株阴性对照在实验所用侵染叶片的相应侵染部位均无GFP荧光信号。单独侵染PVXdt-GFP,叶片GFP表达荧光强度在侵染后第3天最高,第5天开始下降,第9天观测不到GFP荧光信号;不同RSSs与PVXdt-GFP混合侵染样品,则在第5天荧光强度达到最高,第7天后开始下降,第9天后仍然可以观测到明显的GFP荧光信号。观察侵染后第17天叶片背面,样品P19和P25仍有明显的GFP表达,而其他样品无GFP荧光信号;侵染第23天后,仅能在P19样品的叶片背面观察到GFP信号(图2B)。结果表明,RSSs对外源基因GFP在烟草中的表达有增效作用,但是在作用效果和作用持续时间上存在差异。从作用效果来看,在所有已记录的时间点上,AC2共表达的作用效果最差,P1次之,其他RSSs目测差异不明显;从作用持续时间来看,P19共表达的作用持续时间最长(在25 d的观察期中均有作用),P25次之(作用效果持续20 d左右)。此外,单独侵染PVXdt-GFP的处理在侵染3 d后GFP表达量开始下降,RSSs共

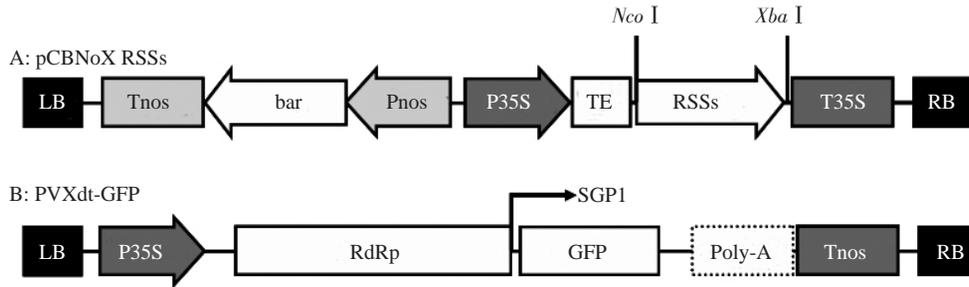


图1 RSSs瞬时表达载体pCBNoX RSSs和报告基因表达载体PVXdt-GFP的结构示意图

Fig.1 Schematic representation of pCBNoX RSSs and PVXdt-GFP vectors used in the present study. The diagrams show the binary vectors pCBNoX RSSs (A) and *Potato virus X* (PVX)-based vectors-PVXdt-GFP (B). The individual RSS was cloned by PCR, and then inserted into pCBNoX RSSs at the site of *Nco* I and of *Xba* I under control of 35S promoter (A). LB: Left borders of the T-DNA; Tnos: Terminator sequences of nopaline synthase (*nos*); bar: Gene for phosphinothricin acetyltransferase; Pnos: Promoter of *nos* gene; P35S: 35S promoter of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); TE: Translational enhancer of *Tobacco etch virus* (TEV); RSSs: RNA silencing suppressors; T35S: CaMV 35S terminator; RB: Right borders of the T-DNA; RdRp: Gene of viral RNA-dependent RNA polymerase; SGP: Subgenomic promoters; GFP: Green fluorescent protein gene; Poly-A: A *poly(A)* tail to PVX. Note: The boxes are not drawn to scale.

侵染处理在第5天GFP表达量呈上升趋势,判断侵染后第4~5天是寄主基因沉默与RSSs反沉默相互作用的作用结果呈现时间,因而也是比较评价RSSs对烟草中外源基因的表达作用效果的较佳的时间。

在可见光下观察,侵染叶片在侵染12 d左右均呈不同程度的褪绿和坏死,且症状随时间延长而加重。由于各侵染点的农杆菌浓度是一样的,因此推测这些表型可能与RSSs本身性质有关。

2.3 不同RSSs对烟草中外源基因GFP的表达情况分析

为了避免寄主不同植株个体间和同一植株叶片位置间的差别对实验结果产生的误差,同时方便结果的观察,将7种不同RSSs处理侵染于植株同一叶片的不同部位,侵染部位如图3A所示。

在紫外光下观察侵染第5天叶片GFP表达的荧光情况,结果显示AC2和P1无明显的增效作用,其余RSSs作用效果显著且目测差异不大,结果与图1B的观察结果一致;为了进一步验证RSSs作用效果,剥取各处理侵染部位叶片下表皮制片,在荧光显微镜下观察细胞中GFP表达的荧光(图3B)。结果显示,P19样品的GFP荧光信号最强,其他从强到弱依次为HC-Pro、2b、P21、P25、P1和AC2;同时提取各处理的可溶性总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳和Western blotting分析。结果(图3C)可见,与健康烟草叶片样品相比,不同RSSs处理的样品在27 000处均有一条明显的差异蛋白质条带。Western blotting结果显示,27 000处的差异条带是GFP蛋白。根据GFP表达量的高低,不同RSSs共表达作用效果可初步分为,P19和HC-Pro、2b、P21和P25、P1和AC2等3不同的层次。

2.4 不同RSSs对烟草中表达的外源GFP表达量和其

mRNA积累的定量分析

为了进一步明确不同RSSs共侵染对外源基因表达的增效作用差异,利用间接ELISA法对各样品中GFP蛋白质含量进行定量分析,结果显示GFP表达量从高到低依次是P19、HC-Pro、2b、P25、P21、P1和AC2;AC2和P1样品与PVXdt-GFP单独侵染样品在GFP表达量上无明显的差别($P>0.05$,图4A);细胞内GFP mRNA积累水平的变化规律(图4B)与蛋白质含量变化规律一致。结果表明,RSSs确实可以通过抑制VIGS保护病毒载体RNA,进而提高其携带的外源基因的表达水平;不同RSSs对其共侵染病毒载体PVXdt-GFP介导的外源蛋白表达水平的增效作用有差异,其中P19的增效作用最好,而AC2和P1几乎没有增效作用。考虑到P19作用持续时间也最长,选择TBSV-P19作为PVXdt-GFP病毒表达载体“共表达伴侣”。

2.5 沉默抑制子P19对外源基因GFP在烟草中表达的时间规律分析

为了明确PVXdt-GFP病毒表达载体共表达“伴侣”TBSV-P19对外源蛋白表达增效作用的规律,测定其共侵染后不同时间点植物侵染叶片中GFP蛋白含量。结果(图5)表明,侵染3 d后外源基因表达量开始上升;到第7天左右增效作用最强,在实验测定的时间点内均有一定程度的增效作用。

3 讨论

当前,在植物中生产外源蛋白有2种途径:一是稳定表达,即将外源基因整合进植物染色体基因组,使外源基因在植物中稳定表达;二是瞬时表达,例如将外源基因整合到病毒基因组中,用携带外源基因的病毒感染

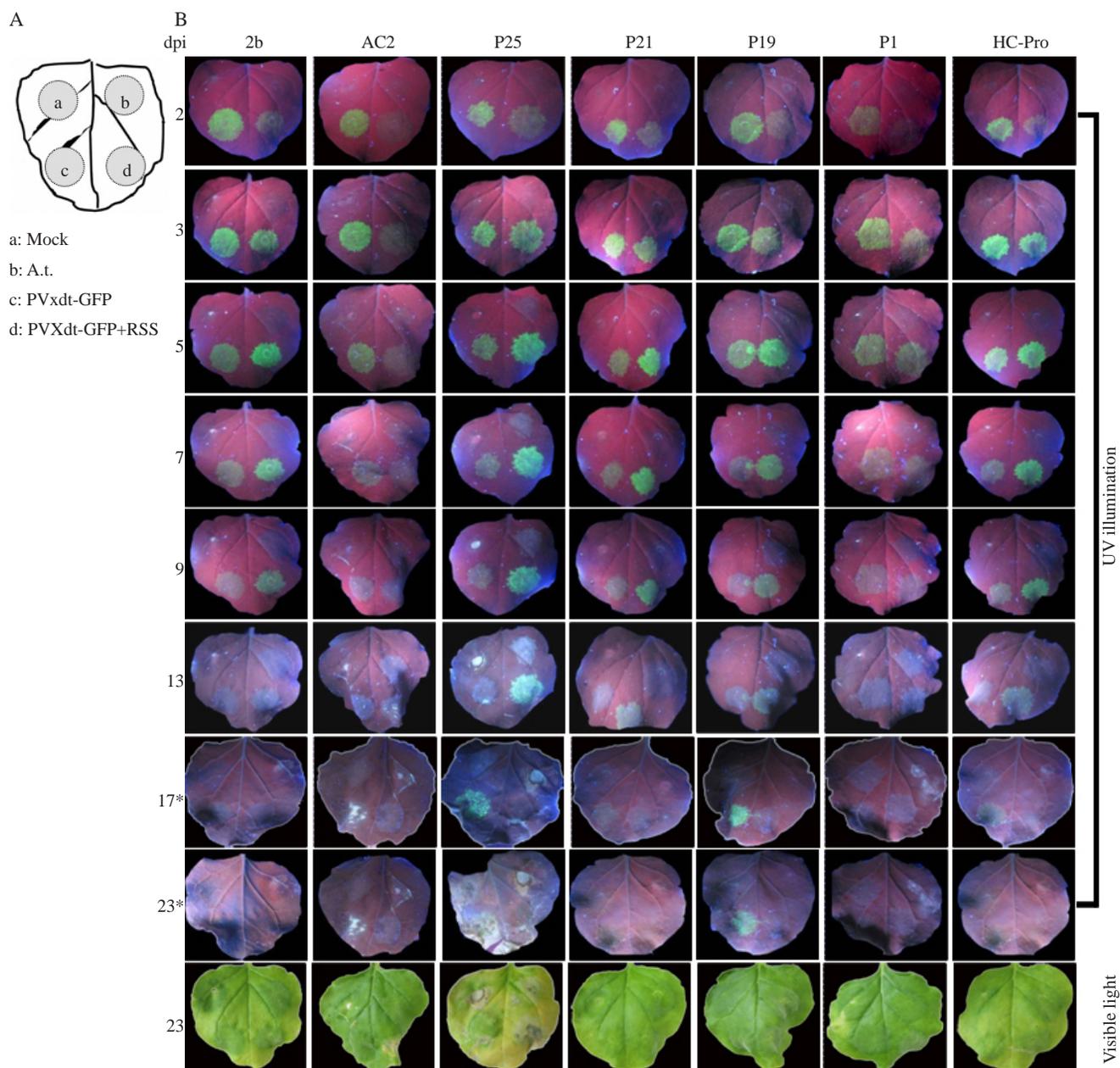


图2 共侵染本烟叶片GFP表达荧光变化情况

Fig.2 Changes of GFP fluorescence in the leaves of *N. benthamiana* after coinfiltrated with pCBNoX RSSs and PVXdt-GFP. Infiltrations of buffer (Mock), *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 alone (A. t.), or PVXdt-GFP alone were used as controls, which were infiltrated in different areas on a leaf (A). Photographs were taken under UV or visible light at different days post-inoculation (dpi) (B). The asterisk beside the number 17 and 23 indicates that the observation was taken from downside of the inoculated leaves on the 17th and 23rd dpi. *: Downside of the leaves

植物,外源基因随着病毒在植物体内的复制和扩散而得到高效表达^[23]。但是,由于转录后基因沉默(PTGS)的影响,植物表达系统外源基因的表达水平都普遍偏低^[24]。

1998年,研究人员发现植物病毒会编码一种被称为RSSs的蛋白质,通过RSSs作用于沉默的不同阶段,解除或干扰宿主的沉默途径,以此来对抗植物的PTGS,规避系统性RNA沉默^[19]。研究人员还发现,利用病毒编码的RSSs与目的基因在植物中共表达可以使目的基因在植物中高水平、持续的表达^[7]。自从认识到RSSs具有提高外源基因在植物中表达水平的作用后,

大部分利用植物作为生物反应器表达外源基因的研究都试图利用RSSs来提高表达的效率。但是不同病毒编码的RSSs不同,它们的作用位点和作用机制也不尽相同^[5]。理论上特定的RSSs对不同的植物表达系统的增效作用程度应该存在差异,因而深入理解RSSs,对于RSSs的合理应用具有重要的意义。

本研究构建了7种常见RSSs瞬时表达载体并对它们对植物病毒载体表达系统表达水平的影响进行了研究。结果表明,对于既定的植物表达系统(本实验中是PVX病毒载体表达系统)而言,不同RSSs对它的增效

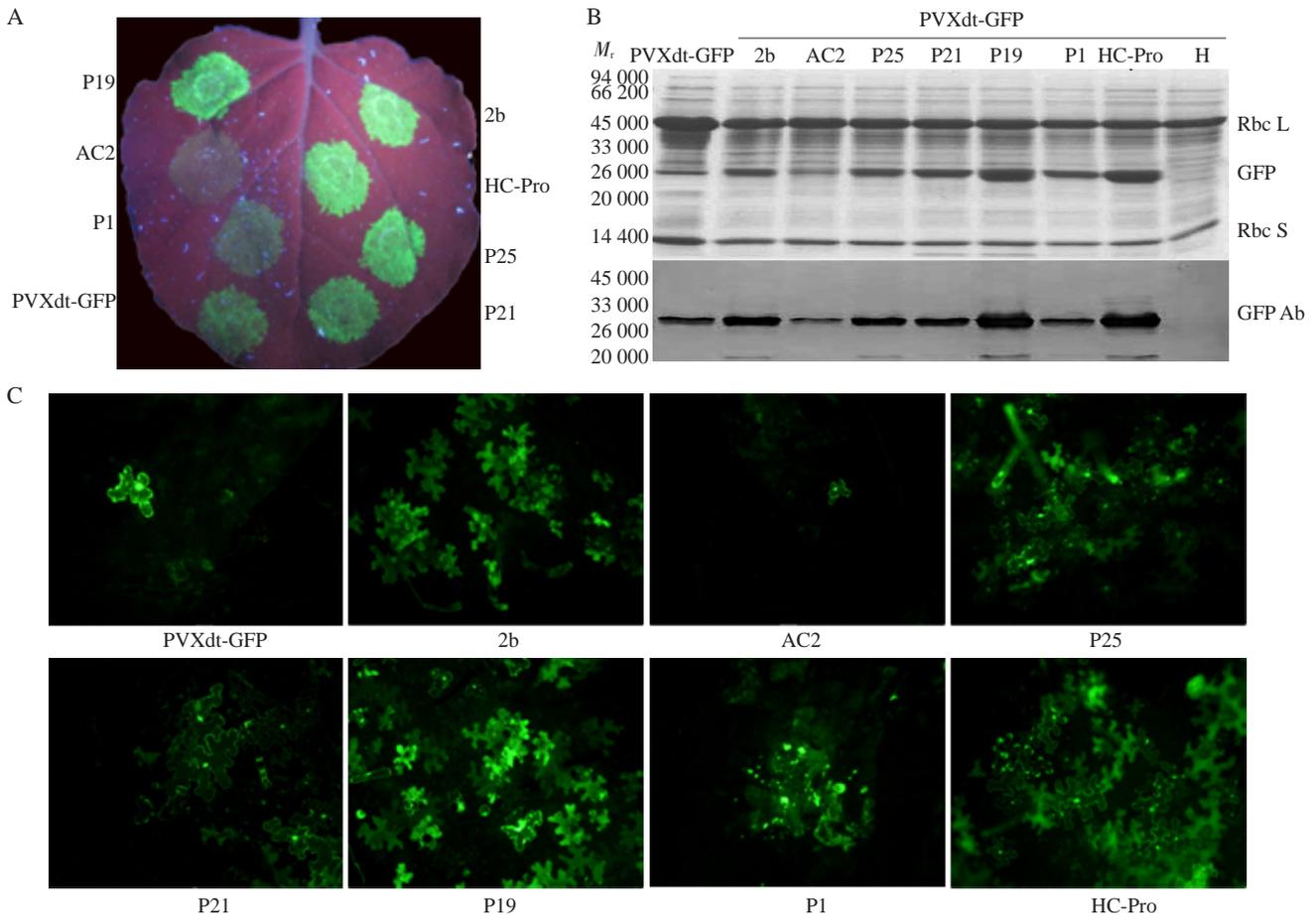


图 3 不同 RSSs 对外源基因 GFP 在烟草中的表达效果

Fig.3 Effect of different RSSs on PVXdt-mediated transient GFP expression at 5 days post-infiltration. A: The leaf of *N. benthamiana* plants were infiltrated with a mixture of *A. tumefaciens* cultures carrying PVXdt-GFP vector and different RSSs constructs. Co-expression of viral suppressors enhanced ectopic GFP expression, as assessed under UV illumination. Red background is due to chlorophyll autofluorescence, and green to GFP fluorescence. B: SDS-PAGE (upper panel) and Western blotting (lower panel) analysis showing GFP expression levels in *N. benthamiana* leaves. C: Fluorescence microscopy of *N. benthamiana* epidermal cells transiently expressing GFP with RSSs as indicated.

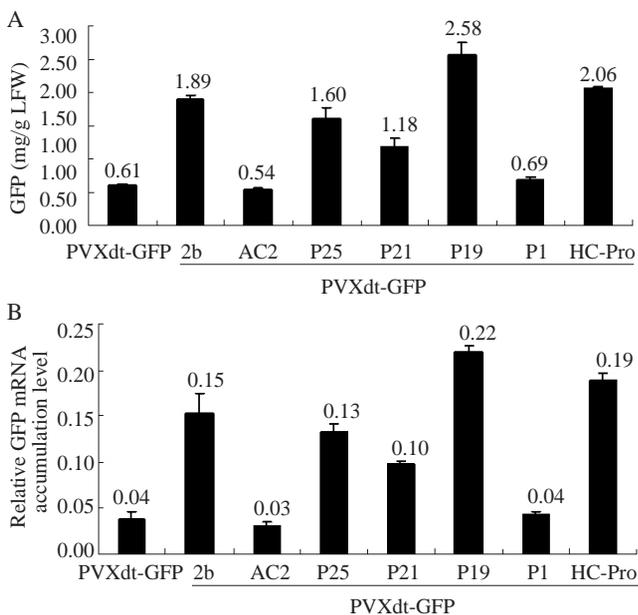


图 4 不同 RSSs 对外源基因 GFP 在烟草中表达的 ELISA 和 RT-qPCR 分析

Fig.4 ELISA and RT-qPCR analysis of the relative levels of PVXdt-mediated GFP expression with different RSSs at 5 days post-inoculation. LFW: Leaf fresh weight.

作用确实存在较大的差异。此外,通过与前人实验结果的比对还发现,特定的 RSSs 对不同的植物病毒载体表达系统的增效作用也不相同。例如,对于本实验中使用的 PVXdt-GFP 载体表达系统来说,CMV-2b 沉默抑制子的增效作用显著,TEV-P1 的作用效果不明显;而对于甜菜黄化病毒(*Beet yellows virus*, BYV)病毒载体表达体系而言,TEV-P1 的作用效果相当好,CMV-2b 则几乎没有效果^[25]。因此,认为任意选用一种 RSSs 来提高表达系统外源基因表达水平的做法是盲目且不合理的。在实际应用中,通过实验筛选获得与表达系统相适应的“RSSs 伴侣”,才能使系统外源基因的表达效率最大化。另外,对于植物 RNA 病毒载体表达系统来说,由于病毒自身都会编码 RSSs,在选择 RSSs 时应该尽量避免使用同种或同属病毒编码的 RSSs,以免由于同源重组导致的病毒载体的不稳定和生物安全性问题。

在所有已经研究的 RSSs 中, TBSV-P19 是一个非常特殊的例子。从本研究结果和现有的相关报道来看,它除了对于烟草花叶病毒(*Tobacco Mosaic Virus*,

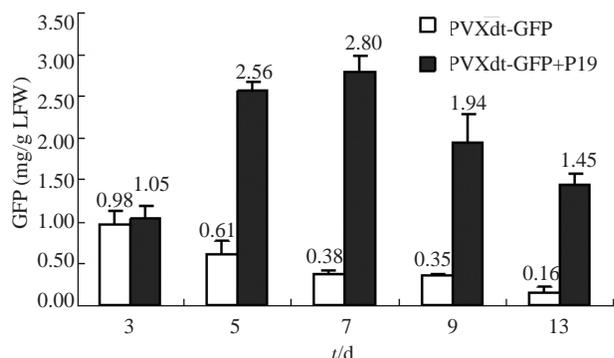


图5 TBSV-P19对外源基因GFP在烟草中表达的ELISA定量分析

Fig.5 Effect of TBSV-P19 on PVXdt-mediated transient GFP expression in *Nicotiana benthamiana*. Transient expression of GFP was assessed by ELISA in the absence or presence of P19 at 5 days post-infiltration.

TMV)表达载体pJL TRBO-G表达系统没有增效作用^[26]外,对大多数植物病毒载体表达系统或非病毒载体表达系统都有不错的增效作用,似乎可以作为大多数植物表达系统的“通用RSSs伴侣”。

参考文献:

- [1] Boehm R. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1102: 121-34.
- [2] Lico C, Chen Q, Santi L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants[J]. J Cell Physiol, 2008, 216: 366-77.
- [3] Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants[J]. Curr Opin Biotechnol, 2007, 18(2): 134-41.
- [4] Scholthof HB. Heterologous expression of viral RNA interference suppressors: RISC management [J]. Plant Physiol, 2007, 145(4): 1110-7.
- [5] Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(3): 206-20.
- [6] Johansen LK, Carrington JC. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system[J]. Plant Physiol, 2001, 126(3): 930-8.
- [7] Voinnet O, Rivas S, Mestre P, et al. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus[J]. Plant J, 2003, 33(5): 949-56.
- [8] Sainsbury F, Lomonosoff GP. Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication[J]. Plant Physiol, 2008, 148(3): 1212-8.
- [9] Burgyán J, Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing [J]. Trends Plant Sci, 2011, 16(5): 265-72.
- [10] Komarova TV, Skulachev MV, Zvereva AS, et al. New viral vector for efficient production of target proteins in plants[J]. Biochemistry (Moscow), 2006, 71(8): 846-50.
- [11] Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus[J]. Science, 2002, 296: 1319-21.
- [12] Dong X, van Wezel R, Stanley J, et al. Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing[J]. J Virol, 2003, 77(12): 7026-33.
- [13] Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(24): 14147-52.
- [14] Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*[J]. Cell, 2000, 103(1): 157-67.
- [15] Reed JC, Kasschau KD, Prokhnevsky AI, et al. Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus[J]. Virology, 2003, 306(2): 203-9.
- [16] Ye K, Patel DJ. RNA silencing suppressor p21 of Beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure[J]. Structure, 2005, 13(9): 1375-84.
- [17] Qu F, Morris TJ. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2002, 15(3): 193-202.
- [18] Lacombe S, Bangratz M, Vignols F, et al. The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing[J]. Plant J, 2010, 61(3): 371-82.
- [19] Anandalakshmi R, Gij P, Ge X, et al. A viral suppressor of gene silencing in plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13079-84.
- [20] Grimsley N, Hohn B, Hohn T, et al. "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(10): 3282-6.
- [21] Velásquez AC, Chakravarthy S, Martín GB. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato [J]. J Vis Exp, 2009(28): 1-4.
- [22] Ma P, Liu J, He H, et al. A viral suppressor P1/HC-pro increases the GFP gene expression in agrobacterium-mediated transient assay[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 158(2): 243-52.
- [23] Streatfield SJ. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants[J]. Plant Biotechnol J, 2007, 5(1): 2-15.
- [24] Saxena P, Hsieh YC, Alvarado VY, et al. Improved foreign gene expression in plants using a virus-encoded suppressor of RNA silencing modified to be developmentally harmless [J]. Plant Biotechnol J, 2011, 9(6): 703-12.
- [25] Chiba M, Reed JC, Prokhnevsky AI, et al. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon [J]. Virology, 2006, 346(1): 7-14.
- [26] Lindbo JA. TRBO: a high-efficiency tobacco Mosaic virus RNA-based overexpression vector [J]. Plant Physiol, 2007, 145(4): 1232-40.

(编辑:黄开颜)