

柑橘黄化脉明病毒的 TGB 基因生物信息学分析及亚细胞定位

崔甜甜, 王艳娇, 李中安, 周常勇, 宋 震*

(西南大学/中国农业科学院柑桔研究所, 国家柑橘工程技术研究中心, 重庆 400712)

摘 要: 柑橘黄化脉明病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV) 是一种正义单链 RNA 病毒。其基因组含有 6 个开放阅读框(ORF), 其中 ORF2、ORF3 和 ORF4 组成了三基因连锁结构(triple gene block, TGB)。以感染 CYVCV 的尤力克柠檬 [*Citrus limon* (L.) Burm. f.] 植株的总 RNA 为模板, 扩增和克隆了 CYVCV 的 TGB 基因, 并开展了其编码蛋白的理化性质和分子特性等生物信息学分析; 进而通过 In-Fusion® 技术构建了 TGB 各基因的亚细胞定位载体, 经农杆菌介导转化洋葱表皮细胞并在荧光显微镜下进行亚细胞定位观察。生物信息学分析结果表明, CYVCV-TGB 具有与 *Potexvirus* 属病毒 TGB 相似的理化性质和分子特性, 可能参与病毒在寄主中的运动且需要外壳蛋白的参与。亚细胞定位结果显示, TGBp1 定位于细胞壁(膜)上, TGBp2 和 TGBp3 主要定位于细胞壁(膜), 少量呈星点状定位于细胞内。研究结果为揭示 CYVCV 在寄主中的运动机理奠定了基础。

关键词: 柑橘; 柑橘黄化脉明病毒; 生物信息学分析; 三基因连锁结构; 亚细胞定位

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 08-1579-10

Bioinformatics and Subcellular Localization on *Citrus yellow vein clearing virus*-Triple Gene Block

CUI Tiantian, WANG Yanjiao, LI Zhongan, ZHOU Changyong, and SONG Zhen*

(*Citrus Research Institute, Southwest University/Chinese Academy of Agricultural Sciences; National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China*)

Abstract: *Citrus yellow vein cleansing virus* (CYVCV) is a simple positive-sense RNA virus. Its genome contains six open reading frames (ORFs), among which ORF2, ORF3 and ORF4 constitute a triple gene block (TGB). The TGB gene of CYVCV was amplified and cloned by using the total RNA of infected Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. F.]. Bioinformatic analysis of TGB encoded proteins were carried out with the physicochemical property and molecular characteristics. The TGB gene subcellular localization vector were constructed through the In-Fusion® technology and transformed to onion epidermal cells mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Subcellular localization was then observed under fluorescence microscope. Bioinformatics analysis results showed that the physicochemical properties and molecular characteristics of CYVCV-TGB were similar to that of the *Potexvirus*, and the TGB may

收稿日期: 2017-06-01; **修回日期:** 2017-08-11

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201203076); 重庆市两江学者计划项目; 重庆市基础及前沿研究项目(CSTC2014jcyjA80033); 中央高校基本科研业务专项(XDJK2017B024)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: songzhen@cric.cn; Tel: 023-68349017)

involved in virus movement in the host. Subcellular localization results showed that TGBp1 was located on the cell wall (cell membrane), while TGBp2 and TGBp3 were mainly located on the cell wall (cell membrane), with a small amount located in the cell. These results laid the foundation of revealing the CYVCV movement mechanism.

Keywords: citrus; *Citrus yellow vein clearing virus*; bioinformatics analysis; triple gene block; subcellular localization

柑橘黄化脉明病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV) 主要为害柠檬和酸橙等柑橘品种。该病毒最早被发现于巴基斯坦 (Catara et al., 1988, 1993), 随后在印度 (Alshami et al., 2003)、土耳其 (Önelge et al., 2007) 等地也有报道, 中国于 2009 年在云南瑞丽柠檬上首次发现 (Chen et al., 2014), 随后在重庆、四川、江西等地迅速蔓延, 对柑橘产业造成了严重损失。

柑橘黄化脉明病毒 (CYVCV) 是 α 线性病毒科 (*Alphaflexiviridae*) 印度柑橘病毒属 (*Mandarivirus*) 的成员。CYVCV 基因组为含有 7 529 个核苷酸的正义单链 RNA, 含有 6 个开放阅读框 (ORF), 其中 ORF1 编码一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 和所有复制 (REP) 相关的保守结构域; ORF2、ORF3 和 ORF4 被称作三基因连锁结构 (triple gene block, TGB), 分别命名为 TGB1、TGB2、TGB3, 相应编码 TGBp1、TGBp2、TGBp3 蛋白; ORF5 编码外壳蛋白; ORF6 和 ORF5 有部分重叠, 编码一种 23 kD 的正义单链 RNA 病毒核酸结合蛋白的多肽 (Loconsole et al., 2012)。

植物病毒侵染寄主植物后, 其核酸利用宿主细胞的转录、表达系统开始自身遗传物质的装配, 病毒遗传物质只有成功从侵染点扩散到周围健康细胞, 才是侵染植物成功 (Carrington et al., 1996; Nelson, 1998)。植物病毒在寄主植物体内进行细胞间转移和长距离运输需要其编码的运动蛋白来完成 (Lucas & Gilbertson, 1994; Carrington et al., 1996), 因此, 运动蛋白在病毒侵染植株过程中起着重要作用。不同植物病毒的运动蛋白类型不尽相同, 多数植物病毒仅编码一个蛋白来行使运动蛋白的功能 (Lough et al., 2000; Waigmann et al., 2007)。例如烟草花叶病毒编码一个 30 kD 的蛋白与单链病毒组 RNA 结合, 形成直径缩小、无折叠管状的蛋白-核酸复合物 (Citovsky et al., 1992) 穿越胞间连丝。然而也有相当一部分植物病毒编码多个蛋白一起完成运动蛋白的功能, 如大麦条斑花叶病毒 (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV) (Lim et al., 2008; 孙现超, 2010)、马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 和马铃薯帚顶病毒 (*Potato mop-top virus*, PMTV) (Torrance et al., 2005) 等。此类运动蛋白的特点是必需由三基因连锁结构 (TGB) 编码的蛋白 (TGBp1、TGBp2、TGBp3) 共同起作用完成运动过程, 3 个蛋白中任意 1 个的缺失都会阻碍病毒在植物体内的运输。但不同病毒又有各自的特点 (Callaway et al., 2001), 如一类是类似马铃薯病毒属的成员, 病毒的运动需要外壳蛋白和运动蛋白的参与 (Krishnamurthy et al., 2003; Bayne et al., 2005; Verchot-Lubicz et al., 2007), 外壳蛋白先与病毒核酸结合, 再与 TGBp1 形成核酸-蛋白复合物 (Morozov & Solovyev, 2003); 另一类是类似大麦病毒属的病毒成员, 病毒的运动无需外壳蛋白的参与, 核酸直接与 TGBp1 形成复合物 (Schmitt et al., 1992; 邓衍福 等, 2012)。然后复合物与结构蛋白 TGBp2、TGBp3 结合, 在微管、微丝蛋白的帮助下沿着内质网运动到胞间连丝处, TGBp1 与胞间连丝作用, 使核酸-蛋白复合物到达相邻细胞, 完成胞间运动。在此过程中 TGBp2 和 TGBp3 作为辅助因子协助病毒 RNA 的胞间运动。

虽然已有关于柑橘黄化脉明病毒 TGB 编码的蛋白参与病毒在胞间运动 (Loconsole et al., 2012) 的报道, 但后续研究很少, 关于柑橘黄化脉明病毒 TGB 的基本性质、结构和具体作用机制都不清晰。

为进一步了解 TGB 的相关信息, 本研究中将 CYVCV-TGB 基因进行克隆并与已知病毒的 TGB 基因序列进行系统进化分析, 利用现有的生物信息学手段对其编码的运动蛋白进行结构和功能预测, 并通过构建与报告基因 GFP 融合表达的细胞定位载体, 结合农杆菌介导的瞬时表达技术以及荧光检测技术, 以明确 TGB 蛋白的亚细胞定位, 为进一步研究 CYVCV 蛋白的作用机理提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验于 2016 年 10 月至 2017 年 1 月在西南大学柑桔研究所国家柑橘苗木脱毒中心实验室进行。感染柑橘黄化脉明病毒的尤力克柠檬作为毒源植株, 由国家柑橘苗木脱毒中心保存; 洋葱球茎购自重庆市北碚区歇马农贸市场。大肠杆菌菌株 BM JM109、农杆菌菌株 GV3101 购自北京博迈德生物技术有限公司。亚细胞定位载体 Pcx-DG-GFP 由西南大学柑桔研究所改良中心李强老师惠赠。

1.2 引物设计

根据 NCBI 中已报道的 CYVCV 全基因组序列 (GenBank 登录号为 KP313240), 利用 ORF 找出 TGB 所对应的三段基因的开放阅读框, 利用 PrimerPriemer5.0 软件设计引物 (表 1), 送至 Invitrogen 生物工程公司合成。

表 1 TGB 基因扩增所需引物列表
Table 1 List of internal primers designed

引物 Primer	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	扩增片段大小/bp Amplicon size	退火温度/℃ Annealing temperature
TGBp1	F CGCGGGCCCCGGGATCATGGACTTACCTGAGCTC	678	60
	R TATGATCAGTGGATCTCAGGAGGAGGTTGTAGAG		
TGBp2	F CGCGGGCCCCGGGATCATGCCTCTACAACCTCCTCTGA	327	60
	R TATGATCAGTGGATCTCAGGTGTGGGGAATAGGCT		
TGBp3	F CGCGGGCCCCGGGATCATGCAGTCAATAGATTACTAATC	183	55
	R TATGATCAGTGGATCTTAAACCGGTTTAGCCGG		

注: 下划线部分是与 Pcx-DG-GFP 载体同源的 15 bp。
Note: The underlined part is 15 bp homologous to the Pcx-DG-GFP vector.

1.3 RNA 提取与 cDNA 的合成

按照 Trizol 试剂说明书提取 CYVCV 毒源植株的总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 用紫外分光光度计 (Smart Spec™Plus, Bio-Rad, 美国) 测定 RNA 的浓度。使用 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒合成 cDNA。

1.4 TGB 的扩增与生物信息学分析

以 cDNA 为模板分别用特异引物对 TGBp1、TGBp2、TGBp3 进行 PCR 扩增, 反应体系为 25 μL: 2× primeSTAR max Premix 12.5 μL, 10 μmol · L⁻¹ 特异上下游引物各 1 μL, cDNA 2 μL, RNase free H₂O 8.5 μL。扩增参数为: 94 °C 2 min、94 °C 30 s、退火 (TGBp1、TGBp2 的退火温度为 60 °C, TGBp3 的退火温度为 55 °C) 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳检测后用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目标片段。

用在线软件 ProParam (<http://www.expasy.org/protparam>) 分析 TGB 的物理和化学性质; 用 Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析蛋白保守结构域;

用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析亲(疏)水性; 用 PSORT (<https://psort.hgc.jp/>) 预测亚细胞定位; 用 TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 分析跨膜结构域; 多重序列比对分析与进化树构建使用 MEGA6.0 (Tamura et al., 2013)。

1.5 亚细胞定位载体的构建和定位分析

采用 In-Fusion[®] 技术(In-Fusion HD Cloning Kit)进行亚细胞定位载体的构建。先将 Pcx-DG-GFP 载体用 *Bam*H I 酶切, 取酶切后的 Pcx-DG-GFP 线性载体 2 μ L, 上述胶回收的目标片段 (TGBp1、TGBp2、TGBp3) 4 μ L, 5 \times In-Fusion HD Enzyme 2 μ L, RNase free H₂O 补足到 10 μ L, 50 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。得到 GFP-基因融合表达载体, 分别命名为 TGBp1-GFP、TGBp2-GFP、TGBp3-GFP。转化大肠杆菌 BM JM 109, PCR 筛选阳性克隆, 并对阳性克隆送华大生物公司完成测序。测序结果利用软件 DNAMAN6.0 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada) 进行序列比对。将测序正确的质粒热激转化农杆菌 GV3101 中。

采用农杆菌介导洋葱表皮细胞瞬时表达蛋白定位方法 (Sun et al., 2007; 刘海燕 等, 2009), 将带有 GFP 融合载体的农杆菌菌液加到含对应抗生素的 LB 液体培养基 (20 mg \cdot L⁻¹ Rif, 50 mg \cdot L⁻¹ Kan), 200 r \cdot min⁻¹, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 ~ 16 h。离心收集菌体, 用缓冲液悬浮 (悬浮缓冲液: 10 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol \cdot L⁻¹ MES, 200 μ mol \cdot L⁻¹ As), 使其 OD₆₀₀ 为 0.8 ~ 1.0。选取新鲜、生长状况良好的洋葱, 除去外面的 3 ~ 4 层鳞片, 将球茎置于 75% 乙醇中浸泡 10 min, 然后用无菌水洗涤 3 次。用无菌解剖刀十字形切开洋葱球茎, 取球茎内部较新鲜肥厚的鳞片, 在内表皮 (凹面) 用刀片划出面积为 1 cm² 的小方块, 用镊子将小方块撕下, 贴近叶肉的一面朝下, 平铺于含高渗培养基的培养皿内。将预培养 24 h 后的洋葱内表皮置于重悬液中, 20 min 后夹起表皮一角, 稍滤干菌液, 平铺于 MS 固体培养基上, 置于 28 $^{\circ}$ C 下暗培养 24 ~ 36 h, 然后在荧光显微镜下观察蛋白的亚细胞定位。

2 结果与分析

2.1 TGB 基因的扩增

以 CYVCV 的 cDNA 为模板, 分别加入 3 对特异性引物, PCR 扩增出 TGBp1、TGBp2 和 TGBp3 基因 (图 1)。测序结果经 Blast 分析表明所扩增的目的条带序列与 KP313240 同源率为 98%。

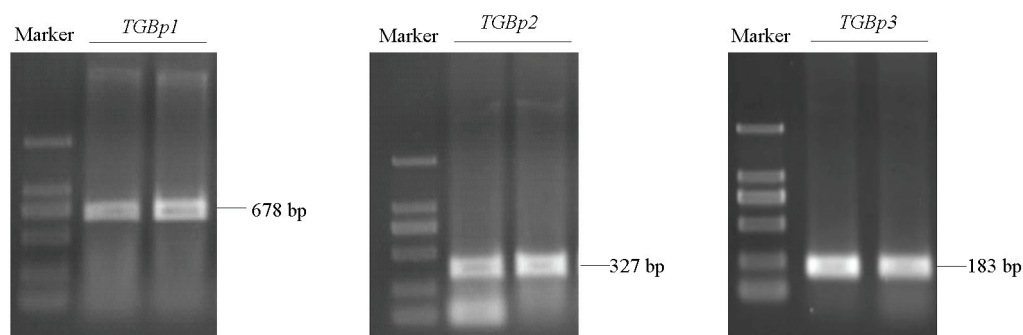


图 1 PCR 扩增得到 TGBp1、TGBp2 和 TGBp3

Fig. 1 PCR products amplified from TGB

2.2 TGB 基因的生物信息学分析

2.2.1 序列分析

将 CYVCV-TGB 基因在核酸水平上进行 Blast 分析, 构建系统进化树 (图 2)。CYVCV-TGBp1 与苹果茎痘病毒 (NC003462) 和马铃薯 X 病毒 (GU373815) 聚为一簇; CYVCV-TGBp2 与百合无症状病毒 (FJ456352) 和马铃薯 S 病毒 (AJ863509) 聚为一簇; CYVCV-TGBp3 与马铃薯 S 病毒 (AJ863509) 聚为一簇[百合无症状病毒、马铃薯 S 病毒属于香石竹潜隐病毒属 (*Carlavirus*)]。在比对过程中发现, TGBp1 与其他植物病毒的 TGBp1 序列同源性最高, 说明在进化过程中具有较强的保守性, TGBp2 次之, TGBp3 最差。

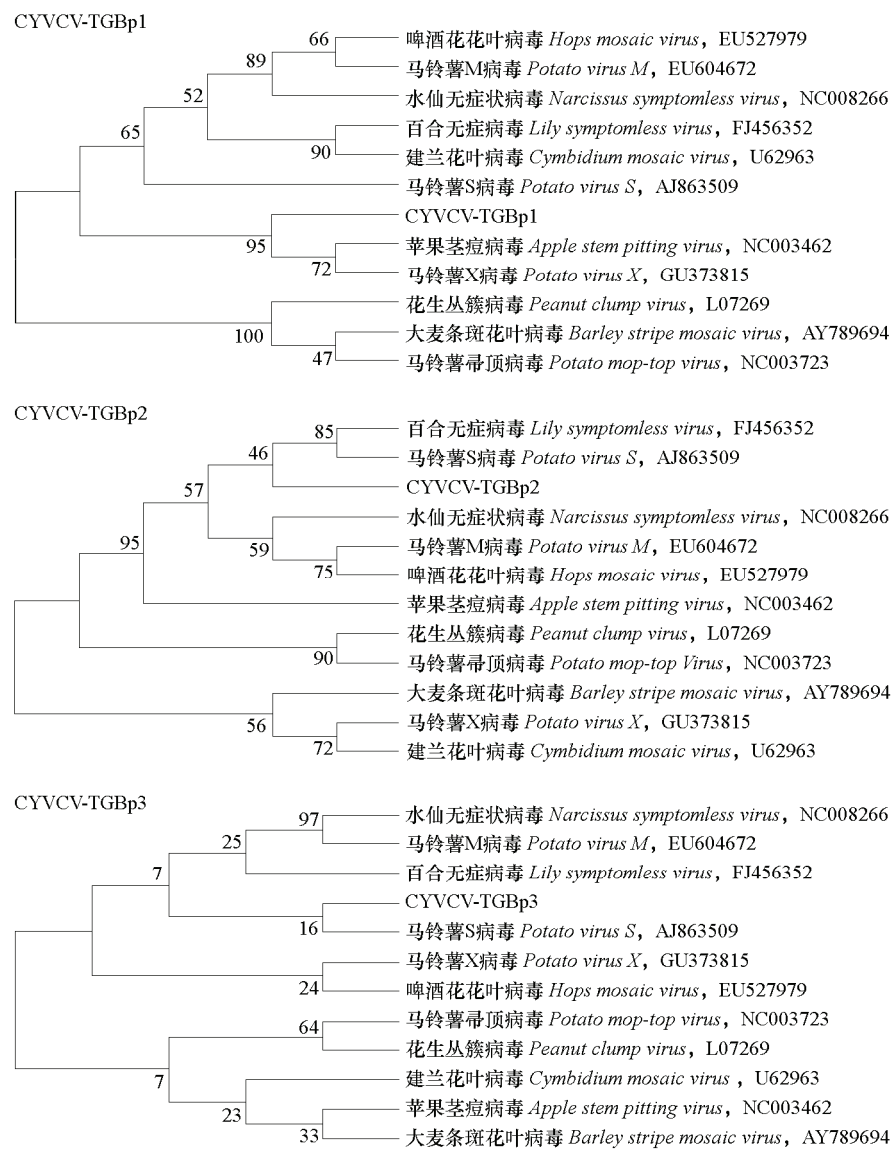


图 2 CYVCV-TGB 与其他物种的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic evolutionary analyses of CYVCV-TGB proteins from different plant species

2.2.2 理化性质分析

蛋白质的理化性质是研究蛋白质的基础。本研究用 ProParam 对 CYVCV-TGB 进行分析, 结果如表 2。TGBp1、TGBp2 和 TGBp3 蛋白的不稳定参数分别为 42.26、49.81、46.33, 说明均属于不稳定蛋白质。

表 2 CYVCV-TGB 基因基本理化性质分析
Table 2 Basic physical and chemical properties analysis for CYVCV-TGB

编码蛋白 Encoded protein	氨基酸数 Amino acid number	分子量/kD Molecular weight	理论等电点 pI	不稳定参数 Unstable parameter	理论推导半衰期 Theoretical derivation half-life
TGBp1	225	25.06	6.49	42.26	> 10 h
TGBp2	108	12.03	9.81	49.81	> 10 h
TGBp3	60	6.21	4.87	46.33	> 10 h

2.2.3 保守结构域预测

对 CYVCV-TGB 的保守结构域进行预测, TGBp1 在 25 ~ 90 氨基酸残基处有一段 P-loop-NTPase super family 的保守结构域, 在 23 ~ 217 氨基酸残基处有一段 Viral-helicase1 保守结构域; P-loop-NTPase super family 包括不同组的核苷酸/核苷酶家族和 ATP 结合盒式核酸结合区, P-loop-NTPase 还可参与细胞的不同功能。Viral-helicase1 指的是 RNA 解旋酶家族, 具有 RNA 解旋酶和核酸水解酶活性。TGBp2 在 4 ~ 99 氨基酸残基处有一段植物病毒运动蛋白家族 (Plant-vir-prot super family) 的保守结构域。TGBp3 在 21 ~ 58 氨基酸残基处有一段 7 kD 外壳蛋白家族 (coat super family) 保守结构域。

2.2.4 亲 (疏) 水性预测

CYVCV-TGB 的亲 (疏) 水性预测结果: TGBp1 一端具有疏水性, 另一端具有亲水性; TGBp2 的亲水区域集中在 30 ~ 70 氨基酸处, 就总体趋势结合蛋白质理化性质的预测, TGBp1 和 TGBp2 介于亲水性和疏水性之间; TGBp3 则疏水性较强, 只有在 40 ~ 60 氨基酸处具有亲水性, 可能与该蛋白为膜结合蛋白有关。

2.2.5 跨膜结构预测

确定蛋白的跨膜结构对认识蛋白的功能和作用有着重要的帮助。CYVCV-TGB 蛋白的跨膜结构预测结果: TGBp1 整个序列中没有跨膜区域, 说明该蛋白不是跨膜蛋白, 而 TGBp2 在 10 ~ 30、60 ~ 100 氨基酸处有两处跨一膜区域, TGBp3 在 8 ~ 30 氨基酸处有一处跨膜区域, 说明两者为跨膜蛋白。

2.2.6 亚细胞定位预测

CYVCV-TGB 的亚细胞定位如表 3 所示, 数字表示蛋白位于该细胞器的可能性大小。TGBp1 主要位于细胞质、内质网、线粒体中; TGBp2 主要位于细胞质膜、内质网上; TGBp3 主要位于细胞质膜、内质网上。

表 3 CYVCV-TGB 的亚细胞定位预测
Table 3 The subcellular localization prediction for CYVCV-TGB

编码蛋白 Encoded protein	细胞质 Cytoplasm	内质网 ER	细胞核 Nucleus	线粒体 Mitochondrion	细胞质膜 Plasma membrane
TGBp1	10.5	6	1	3.5	
TGBp2		2			7
TGBp3		2		1	3.5

注: 数字表示蛋白位于该细胞器的可能性大小。
Note: The numbers indicate the possibility of the protein located in the organelle.

2.3 亚细胞定位分析

为了探索 CYVCV-TGB 蛋白在植物亚细胞结构中的分布情况, 构建了瞬时表达载体 TGBp1-GFP、TGBp2-GFP、TGBp3-GFP。用含有重组质粒的农杆菌侵染洋葱表皮细胞, 借助于绿色荧光蛋白信号确定目标蛋白在细胞内的分布。暗培养 24 ~ 36 h 后制成玻片标本, 使用荧光显微镜观察洋葱表皮细胞内绿色荧光蛋白基因的表达情况, 结果如图 3 所示。由图中可以看出, 没有导入目的基因的空载体 GFP 侵染洋葱表皮细胞后, 整个细胞内都有绿色荧光。表达载体 TGBp1-GFP 侵染的洋葱表皮细胞在细胞壁(细胞膜)有绿色荧光, 表明该基因编码蛋白定位于细胞壁(细胞膜)上, TGBp2-GFP、TGBp3-GFP 则少量呈星点状位于细胞内, 大部分位于细胞壁(细胞膜)上。

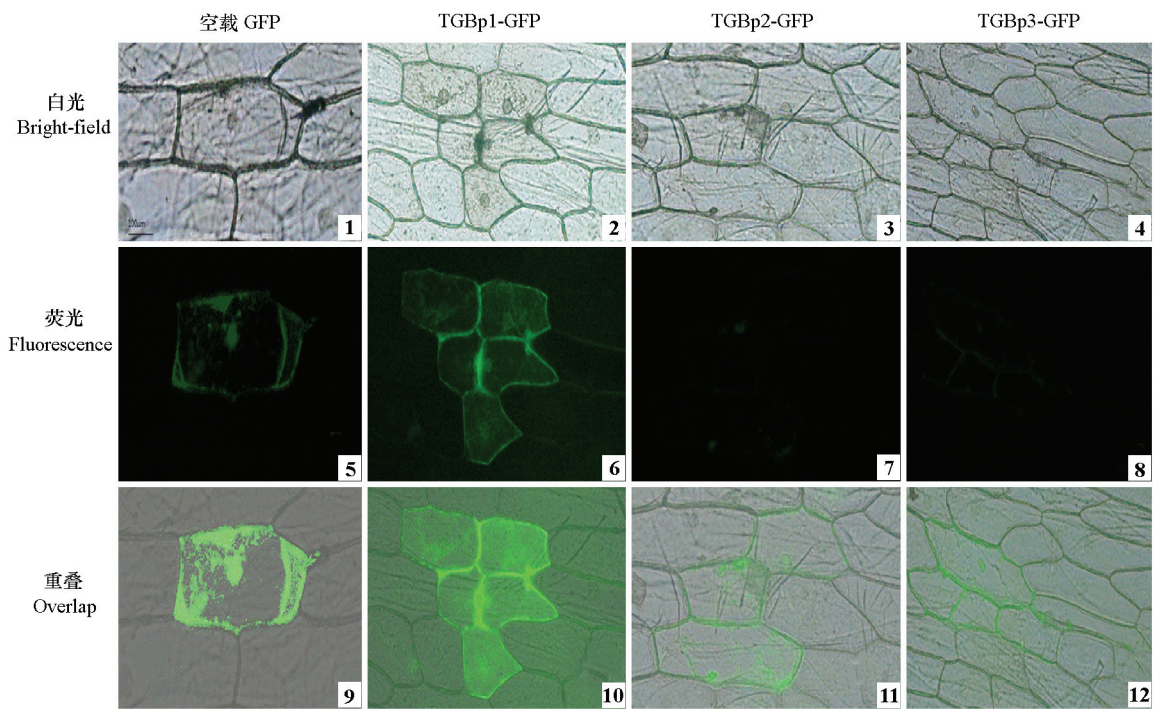


图 3 CYVCV-TGB 与 GFP 在洋葱表皮细胞中的瞬时表达
Fig. 3 The transient expression of CYVCV-TGB and GFP in onion cells

3 讨论

三基因连锁 (TGB) 方式是一个比较大的植物病毒运动蛋白家族, 目前对该家族成员的研究还处于初步阶段, 其功能尚不完全清楚。Voinnet 等 (2000) 和 Senshu 等 (2011) 的研究表明, 一些种属的 TGBp1 是病毒的沉默抑制子, 病毒侵染植物细胞后, 细胞会自动对病毒 RNA 产生沉默功能, 使其不能表达, TGBp1 作为沉默抑制子抑制 RNA 沉默活性, 促进病毒侵染。Mitra 等 (2003) 和 Krishnamurthy 等 (2003) 的研究表明, TGBp2 的作用对于病毒的运动是必需的, 主要提供一种动力促进核酸—蛋白复合物的运输; TGBp3 和 TGBp2 最终会在内质网上进行相互作用, 促进病毒运动。

Potexvirus 病毒是研究植物体内病毒运动机制的一种重要模式病毒。本研究中通过对 CYVCV-TGB 的生物信息学分析发现, CYVCV-TGB 的亲(疏)水性、跨膜结构域与 PVX-TGB (Krishnamurthy

et al., 2002; Samuels et al., 2007) 相似, 因此可以推测 CYVCV-TGB 的作用位点与 PVX-TGB 可能相同。进化树和蛋白质理化性质预测可以看出, CYVCV-TGB 和 PVX-TGB 的同源性较差, 且两者的分子大小也不完全相同, 说明 CYVCV-TGB 的分子机制和致病机理有一定的差异。保守结构域预测显示, TGBp1 氨基酸序列中有一段 P-loop-NTPase super family 的保守结构域和 Viral-helicase 1 保守结构域, P-loop-NTPase super family 包括不同组分的核苷酸和 ATP 结合盒式核酸结合区, P-loop-NTPase 还可参与细胞的不同功能; Viral-helicase 1 指的是 RNA 解旋酶家族, 该家族的 RNA 解旋酶和核酸水解酶活性已被证实 (Kalinina et al., 2002)。由此可以看出 CYVCV-TGBp1 和大多数病毒的 TGBp1 类似, 含有 ATP 结合区, 为转运物质提供能量; 含有核酸结合区, 在转运过程中结合病毒 RNA, 形成复合物。TGBp2 氨基酸中有一段植物病毒运动蛋白家族 (Plant-vir-prot super family) 的保守结构域。TGBp3 氨基酸序列中有一段 7 kD 外壳蛋白家族 (coat super family)。

亚细胞定位结果显示 TGBp1-GFP 编码蛋白定位于细胞壁 (细胞膜) 上, 而 TGBp2-GFP、TGBp3-GFP 则少量呈星点状位于胞内, 大部分位于细胞壁 (细胞膜) 上。结合生物信息学分析 TGBp1 能够与 ATP 结合, 产生能量, 再加上亚细胞定位预测时 TGBp1 主要定位于线粒体中, 这点与真实结果不符, 推测在试验观察时蛋白已进行到最后阶段, 正处于胞间连丝处。TGBp2-GFP、TGBp3-GFP 则少量呈星点状位于胞内, 大部分位于细胞壁 (细胞膜) 上。推测 TGBp2-GFP、TGBp3-GFP 可能会在内质网或线粒体上定位, 但是由于荧光显微镜无法观测到细胞的亚显微结构, 所以看到呈星点状。由进化树分析结果, 以及香石竹潜隐病毒属 (*Carlavirus*) 与马铃薯 X 病毒属 (*Potexvirus*) 类似的报道 (吴海霞, 2015); 再加上对模式病毒 *Potexvirus* 的研究, 已经确定 PVX-TGBp1 主要定位于胞间连丝处, PVX-TGBp2、PVX-TGBp3 主要定位于胞内的内质网上 (Solovyev et al., 1996; Samuels et al., 2007; 燕飞 等, 2010), 可以初步推测 CYVCV-TGB 类似马铃薯 X 病毒属成员, 即 CYVCV 的运动需要外壳蛋白的参与。从而可以尝试利用 Abel 等 (1986) 和 Beachy 等 (1987) 的方法克隆 CYVCV 的外壳蛋白基因, 并将其连接于花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子下游, 再经农杆菌介导的外壳蛋白基因转入柑橘细胞中, 最后经组织培养的方法来获得转基因植株, 进一步评价抗病性。

对 CYVCV-TGB 生物信息学分析和亚细胞定位观察的结果, 为进一步阐释 CYVCV 的运动蛋白提供了可借鉴的信息, 从而为进一步明确 CYVCV 运动蛋白的作用机理提供了一定的理论基础。对从运动蛋白角度通过分子生物学的方法体外突变运动蛋白基因, 将其连接载体转入植物体中, 转基因植物表达失去运动功能的运动蛋白, 正常病毒侵染植物体后, 缺失功能的运动蛋白与病毒表达功能正常的运动蛋白竞争胞间连丝处的靶蛋白, 从而达到抗病的效果。因此, 体外突变运动蛋白对培育抗病的柑橘苗木具有重要的意义。当然, 要想更深入地了解 CYVCV-TGB 基因的功能, 不能只靠生物信息学软件的预测, 还需要更多的试验来验证, 这将是今后的研究方向。

References

- Abel P P, Nelson R S, De B, Hoffmann N, Rogers S G, Fraley R T, Beachy R N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene. *Science*, 232 (4751): 738 - 743.
- Alshami A A A, Ahlawat Y S, Pant R P. 2003. A hitherto unreported yellow vein clearing disease of citrus in India and its viral etiology. *Indian Phytopathology*, 56: 422 - 427.
- Bayne E H, Rakitina D V, Morozov S Y, Baulcombe D C. 2005. Cell-to-cell movement of *Potato potexvirus X* is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 44: 471 - 482.
- Beachy R N, Abel P P, Nelson R S, Rogers S G, Fraley R T. 1987. Transgenic plants that express the coat protein gene of TMV are resistant to infection by TMV. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, 48: 205 - 213.

- Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillock E T, Sit T L, Lommel S A. 2001. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 419.
- Carrington J C, Kasschau K D, Mahajan S K, Schaad M C. 1996. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell*, 8: (10): 1669 – 1681.
- Catara A, Azzaro A, Davino M, Polizzi G. 1988. Virus, viroid and prokaryotic diseases of citrus in Pakistan//Proceedings 6th Conference IOCV. Rolling Meadows: Riverside: 957 – 962.
- Catara A, Azzaro A, Davino M, Polizzi G. 1993. Yellow vein clearing of lemon in Pakistan//Proceedings 12th Conference IOCV. Rolling Meadows: Riverside: 364 – 367.
- Chen H M, Li Z A, Wang X F, Zhou Y, Tang K Z, Zhou C Y, Zhao X Y, Yue J Q. 2014. First report of *Citrus yellow vein clearing virus* on lemon in Yunnan, China. *Plant Disease*, 98: 1747.
- Citovsky V, Wong M L, Shaw A L, Prasad B V, Zambryski P. 1992. Visualization and characterization of *Tobacco mosaic virus* movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *The Plant Cell*, 4: 397 – 411.
- Deng Yan-fu, Chen Zhi-juan, Cheng Xiao-fei, Zhang Peng-cheng, Hu Feng, Shi Nong-nong. 2012. Cloning and prokaryotic expression of *Cymbidium mosaic virus* TGB1 and TGB2 gene. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 24 (6): 1045 – 1049. (in Chinese)
- 邓衍福, 陈芝娟, 程晓非, 章鹏程, 胡 风, 施农农. 2012. 建兰花叶病毒 TGB1 和 TGB2 基因的原核表达. *浙江农业学报*, 24 (6): 1045 – 1049.
- Kalinina N O, Rakitina D V, Solov'yev A G, Schiemann J, Morozov S Y. 2002. RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology*, 296: 321 – 329.
- Krishnamurthy K, Heppler M, Mitra R, Blancaflor E, Payton M, Nelson R S, Verchot-Lubicz J. 2003. The *Potato virus X* TGBp3 protein associates with the ER network for virus cell-to-cell movement. *Virology*, 309: 135.
- Krishnamurthy K, Mitra R, Payton M E, Verchot-Lubicz J. 2002. Cell-to-cell movement of the PVX 12K, 8K, or coat proteins may depend on the host, leaf developmental stage, and the PVX 25K protein. *Virology*, 300: 269.
- Lim H S, Bragg J N, Ganesan U, Lawrence D M, Yu J, Isogai M, Hammond J, Jackson A O. 2008. Triple gene block protein interactions involved in movement of *Barley stripe mosaic virus*. *Journal of Virology*, 82: 4991 – 5006.
- Liu Hai-yan, Feng Dong-ru, Liu Bing, He Yan-ming, Wang Hong-bin, Wang Jin-fa. 2009. Studies on subcellular localization of MpASR in onion epidermal cells mediated by *Agrobacterium*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 17 (3): 218 – 222. (in Chinese)
- 刘海燕, 冯冬茹, 刘 兵, 何炎明, 王宏斌, 王金发. 2009. 农杆菌介导的 MpASR 蛋白在洋葱表皮细胞的定位研究. *热带亚热带植物学报*, 17 (3): 218 – 222.
- Loconsole G, Önelge N, Potere O, Giampetruzzi A, Bozan O, Satar S, De Stradis A, Savino V, Yokomi R K, Saponari M. 2012. Identification and characterization of *Citrus yellow vein clearing virus*, a putative new member of the genus *Mandarivirus*. *Phytopathology*, 102: 1168 – 1175.
- Lough T J, Netzler N E, Emerson S J, Sutherland P, Carr F, Beck D L, Lucas W J, Forster R L. 2000. Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol Plant Microbe Interact*, 13: 962 – 974.
- Lucas W J, Gilbertson R L. 1994. Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Phytopathology*, 32: 387 – 415.
- Mitra R, Krishnamurthy K, Blancaflor E, Payton M, Nelson R S, Verchotlubicz J. 2003. The *Potato virus X* TGBp2 protein association with the endoplasmic reticulum plays a role in but is not sufficient for viral cell-to-cell movement. *Virology*, 312: 35 – 48.
- Morozov S Y, Solov'yev A G. 2003. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology*, 84: 1351 – 1366.
- Nelson R S. 1998. The Mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 59: 476 – 533.
- Önelge N, Bozan O, Gök M, Satar S. 2007. Yellow vein clearing of lemons in Turkey//17th Iocv Conference. Rolling Meadows: Riverside: 227 – 228.
- Samuels T D, Ju H J, Ye C M, Motes C M, Blancaflor E B, Verchotlubicz J. 2007. Subcellular targeting and interactions among the *Potato virus X* TGB proteins. *Virology*, 367: 375 – 389.

- Schmitt C, Balmori E, Jonard G, Richards K E, Guilley H. 1992. *In vitro* mutagenesis of biologically active transcripts of beet *Necrotic yellow vein virus* RNA 2: evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 5715 – 5719.
- Senshu H, Yamaji Y, Minato N, Shiraishi T, Maejima K, Hashimoto M, Miura C, Neriya Y, Namba S. 2011. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by *Potato virus M*. *Journal of Virology*, 85: 10269 – 10278.
- Solovyev A G, Savenkov E I, Agranovsky A A, Morozov S Y. 1996. Comparisons of the genomic *cis*-elements and coding regions in RNA β components of the hordeiviruses *Barley stripe mosaic virus*, *Lychnis ringspot virus*, and *Poa semilatent virus*. *Virology*, 219: 9 – 18.
- Sun W, Cao Z, Li Y, Zhao Y, Zhang H. 2007. A simple and effective method for protein subcellular localization using *Agrobacterium*-mediated transformation of onion epidermal cells. *Biologia*, 62 (5): 529 – 532.
- Sun Xian-chao, Zhao Wen-jun, Qing Ling, Yang Shui-ying. 2010. Comparing and analyzing the triple gene blocks sequence of *Barley stripe mosaic virus* China strain. *Acta Phytopathologica Sinica*, 40 (4): 433 – 437. (in Chinese)
- 孙现超, 赵文军, 青玲, 杨水英. 2010. 大麦条纹花叶病毒中国株三基因盒 TGB 序列对比分析. *植物病理学报*, 40 (4): 433 – 437.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725 – 2729.
- Torrance L, Cowan G, Haupt S, Gillespie T, Ziegler A, Rush C M. 2005. Role of *Potato mop-top virus* triple gene block proteins in intracellular movement and replication//*Proceedings of Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*. Quedinburg, Germany: Julius Kühn-Institute Federal Research Centre for Cultivated Plants.
- Verchot-Lubicz J, Ye C M, Bamunusinghe D. 2007. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*, 88: 1643 – 1655.
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe D C. 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 103: 157 – 167.
- Waigmann E, Curin M, Heinlein M. 2007. *Tobacco mosaic virus* – a model for macromolecular cell-to-cell spread. *Plant Cell Monographs*, 7 (1): 29 – 62.
- Wu Hai-xia. 2015. Cloning, expression and location for TGB gene of *Lily symptomless virus* [M. D. Dissertation]. Dalian: Dalian University of Technology. (in Chinese)
- 吴海霞. 2015. 百合无症状病毒 TGB 基因克隆、表达及定位分析 [硕士论文]. 大连: 大连理工大学.
- Yan fei, Lu Yu-wen, Zheng Hong-ying, Lin Lin, Chen Jian-ping. 2010. Cell localization of *Garlic X virus* TGB2 protein and its interaction with a nucleolus protein//*Proceedings of Chinese Society for Plant Pathology*. Beijing: China's Agricultural Science and Technology Press. (in Chinese)
- 燕飞, 鲁宇文, 郑红英, 林林, 陈剑平. 2010. 大蒜 X 病毒 TGB2 蛋白的细胞定位及与一个细胞核仁蛋白的互作研究//*中国植物病理学会论文集*. 北京: 中国农业科学技术出版社.