

芜菁花叶病毒外壳蛋白基因的序列分析 及其在大肠杆菌中的表达

徐平 许建平 薛朝阳 陈集双 张耀洲 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所, 杭州 310029)

摘要 从杭州郊区感病的甘蓝型油菜上分离到一种致病力较强的芜菁花叶病毒 (Turnip mosaic virus, TuMV) 分离物。大量提取病毒并纯化后, 电镜观察病毒粒子约 $740\text{nm} \times 12\text{nm}$ 。以寡聚 (dT)₁₅ 为引物合成 cDNA, 并根据外壳蛋白 (CP) 基因两端序列设计两个诱变引物进行 PCR 扩增, 得到一个特异性 DNA 片段。将该片段克隆到 pUC18 中, 经 Sanger 双脱氧法测序, 结果表明该 CP 基因全长为 867 bp。与前人报道的两种芜菁花叶病毒 CP 基因的核苷酸序列的同源性分别为 89.5% 和 96.7%, 氨基酸序列的同源性分别为 94.5% 和 97.9%。将 CP 基因亚克隆到原核表达载体 pKK233-2 中, 用 IPTG 诱导含插入片段表达载体的大肠杆菌, Western 印迹检测证明, 大肠杆菌能表达病毒的 CP。

关键词 芜菁花叶病毒, CP 基因, 聚合酶链反应, 序列分析, 表达

芜菁花叶病毒 (Turnip Mosaic Virus, TuMV) 是马铃薯 Y 病毒组的重要成员, 其寄主范围很广, 可侵染多种重要的农作物, 尤其是对十字花科植物危害严重, 给农业生产造成巨大经济损失^[1]。目前主要的防治措施以农药防止蚜虫传播为主。自 1986 年 Abel 等^[2] 将烟草花叶病毒 CP 基因导入烟草植物细胞并获得抗性植株后, 通过基因工程方法将病毒 CP 基因导入植物中, 产生抗病毒工程植株, 已成为一个诱人的抗病育种新途径。我们以从杭州郊区甘蓝型油菜上分离到的一株 TuMV 分离物为材料, 进行了 CP 的基因克隆和序列分析。虽然对 TuMV CP 基因的序列国内外已有过报道^[1,7], 但杭州株的致病力很强, 有必要对其 CP 基因序列再次进行分析。

材料和方法

1 病毒、转化菌和试剂 TuMV 为 1990 年底从杭州郊区感病的甘蓝型油菜上分离到一株具较强致病力的分离物。转化用的大肠杆菌为 JM105 和 JM109。

实验中所用的限制酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、cDNA 合成试剂盒、pUC18 克隆载体和碱性磷酸酶羊抗兔 IgG 均购自 Boehringer Mannheim 公司。聚合酶链式反应 (PCR) 试剂盒购自 Perkin-Elmer Cetus 公司。大肠杆菌表达载体 pKK233-2 购自 Pharmacia 公司。硝酸纤维素滤膜和 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ 购自 Amersham 公司。碱性磷酸酶底物 NBT 和 BCIP 购自 Promega 公司。测序试剂盒购自 US Biochemical。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 购自北京福瑞公司。

本课题由浙江省科委资助。

1993 年 12 月 10 日收稿, 94 年 1 月 17 日修回。

2 病毒的纯化和抗血清制备 病毒的提取和纯化基本按文献^[3]进行, 以一轮 PEG 沉淀和差速离心得到病毒粗提液, 再以 10%—40% 蔗糖密度梯度离心获得纯化病毒。

以提取的病毒经肌肉注射免疫兔子, 按文献^[4]所述制备抗血清。

直接取新鲜纯化的病毒液, 将铜网倒扣其上, 20 分钟左右取出, 经 2% 磷钨酸染色, 电镜下观察。

3 RNA 的提取和 cDNA 合成 取 500 μ l 的病毒液 (约 2mg), 按文献^[5]所述, 经酚: 氯仿抽提和乙醇沉淀获得 RNA, 将所提 RNA 悬浮于无 RNA 酶的水中, -70°C 贮存备用。取 2 μ g RNA 为模板, 以寡聚 (dT)₁₅ 为引物, 利用 AMV 反转录酶, 按文献^[6]合成 cDNA 第一链, 再经 RNase H 处理产物, 用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 合成第二链, 在第二链合成中加入 [α -³²P]dATP, 以便检查合成产物。

4 PCR 和基因克隆 参照文献^[1,7]报道的 TuMV CP 基因序列, 考虑到便于重组和在原核生物和真核生物载体中克隆和表达, 设计了下列两个引物:

5' 端引物 5' GCGTCGACCATGGCAGGTGAAACGCTTG 3'

3' 端引物 5' TGTCGACTTTATTCCTGGGTCATAACCCCTGAACGCC 3'

以合成的双链 cDNA 为模板, 用 Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 进行扩增。先在反应管中加入除 Taq DNA 聚合酶以外的全部试剂, 94°C 变性 5 分钟后, 加入 Taq DNA 聚合酶, 反应在 94°C 45 秒, 48°C 2 分钟, 72°C 3 分钟条件下扩增 35 轮循环, 最后一轮循环在 72°C 下保温 20 分钟。将反应后的 PCR 产物经 T4 DNA 聚合酶和 Klenow 片段补平后, 重组到 pUC18 的 SmaI 位点中。

质粒 DNA 的小量抽提用碱裂解法, 大量抽提纯化用 CsCl-溴化乙锭梯度平衡离心法, 参照文献^[8]。

5 序列分析 将含 CP 基因的质粒经酶切并亚克隆, 以供序列分析。序列分析以经 CsCl-溴化乙锭平衡梯度离心纯化的双链质粒 DNA 为模板, 以 [α -³⁵S]dATP 为标记物, 按文献^[6]进行测序反应, 6% 聚丙烯酰胺测序凝胶的配制、电泳和放射自显影参照文献^[4]。

6 基因在大肠杆菌中表达和 Western 印迹 大肠杆菌表达载体为 pKK233-2, 将含有插入外源基因 pKK233-2 载体的大肠杆菌接种到 5ml 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 培养至 OD₆₀₀ 达 0.5, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 继续培养 6 小时, 5000g 离心收集细胞, 加 500 μ l 生理盐水悬浮后, 煮沸 5 分钟, 进行 SDS-PAGE。电泳完毕后, 通过电转移进行 Western 印迹, 用抗血清检测表达产物, 方法参照文献^[9]。

结 果

1 病毒的提取和抗血清制备

纯化后病毒经岛津 2201 型紫外分光光度计扫描分析呈典型的病毒吸收曲线, 其 A₂₆₀ / A₂₈₀ 比值为 1.25。将纯化后的 TuMV 病毒经 2% 磷钨酸负染后, 可在电镜下观察到长度均一微弯曲的线性病毒, 病毒粒子大小约 740nm × 12nm, 样品中未见到其他形式的病毒粒子存在。以经 PEG 粗提的病毒免疫兔子制备抗血清, 所得血清的 ELISA 效价达 1 : 2048 以上。

2 RNA 提取和 cDNA 合成

取纯化的病毒约 2mg 剥去外壳, 提取 RNA, 将所得 RNA 溶于无 RNA 酶的超纯水中, 并在紫外分光光度计上扫描, 样品在 260nm 处有一强烈的吸收峰, 在大于 260nm 的其他波长处没有吸收峰, 呈典型的核酸吸收曲线。

取 2 μ g RNA 为模板合成 cDNA。利用 cDNA 第二链合成中加入的 [α -³²P]dATP, 以末端放射性标记的 λ Hind III 酶切片段为分子量标记物, 经琼脂糖凝胶电泳和放射自显影检查合成的 cDNA 长度, 结果大部分 cDNA 长度分布于 0.5kb ~ 6.5kb 之间。

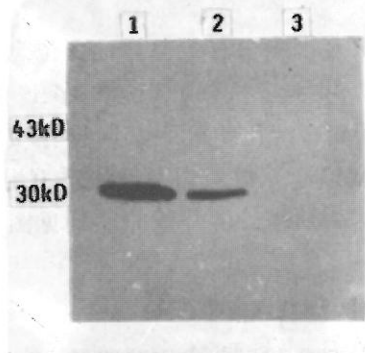


图 5 CP 基因在大肠杆菌中表达

1. 纯化病毒; 2. 含插入 CP 基因 pKK233-2 的 JM105; 3. 仅含 pKK233-2 的 JM105。

Figure 5 Expression of CP gene in *E. coli*

1. Purified virus; 2. JM105 containing pKK233-2 with inserted CP gene; 3. JM105 containing pKK233-2.

与 TuMV 抗血清起反应的 CP, 其大小与直接来自病毒的 CP 相同, 约为 32kD, 而同时以仅含 pKK233-2 载体的 JM105 菌进行的对照则不产生与抗血清起反应的蛋白质。

讨 论

TuMV 基因组 DNA 与其他马铃薯 Y 组病毒成员一样为单一的阅读框架, 可表达产生一个约 360kD 的多肽前体, 并通过病毒基因组本身编码的三种蛋白酶 P1、HC-Pro 和 NIa 的加工产生约 8 种成熟的蛋白。CP 的分子量约 32kD, 该基因位于阅读框架的 3' 端, 因此其中没有起始密码, 只有终止密码。我们在设计引物时, 加入了起始密码 ATG, 考虑到今后需要在原核生物和真核生物表达载体中克隆和表达, 设计引物时, 在基因 5' 端加入真核生物 mRNA 高效表达所需的共有序列 5' ACCATGG 3'^[8], 在 3' 端加入多聚腺苷化所需的序列 5' AATAAA 3'^[9], 以及在基因两端分别加入 2 个 SalI、1 个 NcoI 和 1 个 SmaI 位点。

PCR 技术近年来发展很快, 由于该法可迅速灵敏地扩增特定的片段, 使人们易于检测并克隆某种基因, 又由于该法可根据实验要求对引物进行改造, 满足各种研究需要, 因此被广泛用于基因克隆的研究中。值得注意的是, Taq DNA 聚合酶在合成中具有较高的错配率, 所以在利用 PCR 进行基因克隆和序列分析的过程中, 最好分析数个独立的重组子, 或者直接用 PCR 扩增产物进行序列分析以减少被分析序列中的错误。

我们所得到的芜菁花叶病毒 CP 基因序列与已经发表的两种序列都具有较高的同源性, 但同时也存在一定差别, 该 CP 基因的核苷酸序列与中国科学院微生物所首先报道序列的同源性为 89.5%, 而与加拿大报道序列的同源性为 96.7%, 氨基酸序列的同源性则分别为 94.5% 和 97.9%, 造成这种差别很可能是由于下列原因: ① 病毒的株系不同所致; ② PCR 扩增中 Taq DNA 聚合酶的错配。但这种差别是否与寄主范围、致病性等有关, 尚有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Kong L-J, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of coat protein gene of turnip mosaic virus. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18:5555
- 2 Abel P P, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 1986, 232:738-743
- 3 Nicolas O, Laliberte J F. The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. *J Virol*

Methods, 1991, 32:57-66

- 4 李德葆, 徐平. 重组 DNA 的原理和方法. 杭州: 浙江科技出版社, 印刷中
- 5 Maiss E, et al. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. J Gen Virol, 1989, 70 : 513-524
- 6 Sambrook J, et al. Molecular cloning. 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 7 Tremblay M F, et al. Sequence of the 3' -terminal region of Turnip Mosaic Virus RNA and the capsid protein gene. J Gen Virol, 1990, 71:2169-2772
- 8 Kozak M. The scanning model for translation: An update. J Cell Biol, 1989, 108:229-235
- 9 田颖川, 等. 表达烟草花叶病毒 CP 的转基因烟草及其对 TMV 的抗性. 中国科学 B 辑, 1990, 8:822

SEQUENCE ANALYSIS AND EXPRESSION IN *E. COLI* OF TURNIP MOSAIC VIRUS COAT PROTEIN GENE

Xu Ping Xu Jianping Xue Zhaoyang
Chen Jishuang Zhang Yaozhou Li Debao

(Biotechnology Institute, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, 310029)

One virulent isolate of turnip mosaic virus was isolated from infected *Brassica rape* in Hangzhou suburbs. The virus was purified by sucrose gradient centrifugation. The purified virus particles observed by electronic microscope were about 740nm × 12nm. The cDNA was synthesized with oligo(dT)₁₅ and PCR was carried out with two mutagenesis primers flanking the coat protein gene. One specific DNA segment was amplified. It was cloned into pUC18. The sequence of the coat protein gene was 867 nucleotides long determined by Sanger dideoxy method. It was compared with two reported TuMV coat protein gene sequences. The homology of nucleotide sequences between them were 89.5% and 96.7% respectively and the homology of amino acid sequences were 94.5% and 97.9% respectively. The coat protein gene was subcloned into the prokaryotic expression vector pKK233-2. *E. coli* containing the expression vector with the inserted fragment was induced by IPTG. It was proved that the coat protein gene was expressed in *E. coli* by Western blotting.

Key words: Turnip mosaic virus, Coat protein gene, Polymerase chain reaction, Sequence analysis, Expression