

两株大蒜病毒外壳蛋白基因的克隆 及其在大肠杆菌中的表达*

马 筠^{1**} 杨 恭^{2**} 徐绍华² 魏军亚² 邱并生^{2***}

(¹ 天津师范大学化学与生命科学院 天津 300074)

(² 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要: 利用建立 cDNA 库的方法, 通过 RT-PCR 分别扩增和克隆了感染我国天津地区大蒜的大蒜花叶病毒(GMVc)和大蒜潜隐病毒(GLVc)的外壳蛋白(CP)基因, 并对其分别在原核细胞中进行了诱导表达和表达产物的分析。克隆基因的序列测定与分析表明, GMVc 的 CP 基因全长 867 个核苷酸, 编码 289 个氨基酸, 与报道的一株 GMV 的核苷酸和氨基酸的同源性分别为 88.5% 和 97.2%, 属于马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus)的成员; GLVc 的 CP 基因全长 885 个核苷酸, 编码 294 个氨基酸, 与报道的一株 GLV 的核苷酸和氨基酸同源率分别为 73.6% 和 90.9%, 属于香石竹潜隐病毒属(Carlavirus)的成员; 克隆基因的表达产物经 SDS-PAGE 分析表明, GMVc 和 GLVc 的外壳蛋白分别约 32kD 和 34kD, 与预测的结果一致。本实验结果对感染我国大蒜的病毒进行分子水平的确切诊断、分类和调查奠定了基础, 将对大蒜病毒病的防治与脱毒大蒜的生产具有重要的意义。

关键词: 大蒜花叶病毒, 大蒜潜隐病毒, 外壳蛋白基因, 克隆, 表达

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 04-0415-06

大蒜病毒病是大蒜生产中最严重的流行病害, 其病原主要由马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus)的洋葱黄矮病毒(OYDV)、韭菜黄条病毒(LYSV)、大蒜花叶病毒(GMV)和香石竹潜隐病毒属(Carlavirus)的大蒜潜隐病毒(GLV)以及蒜属植物的大蒜病毒(Allexivirus) A、B、C 和 D 等成员的混合感染组成^[1~3]。主要病理症状为大蒜植株的花叶、扭曲、矮化、褪绿条斑和叶片开裂等, 常导致大蒜减产 20% ~ 45%^[1]。由于多病毒的混合感染, 很难从种植的大蒜中分离到单一的病毒株系。国内虽曾报道过一些初步的研究结果, 但都仅限于对病原形态或理化性质的研究^[4~7]。

随着分子生物学的发展, 国外已克隆和测定了不少侵染大蒜的病毒全基因组或部分基因组的核苷酸。本研究以我国天津出产的大蒜为病理材料, 提取感染的病毒, 获得其 RNA 后建立了相应的 cDNA 库; 根据已发表的资料设计引物, 用 PCR 方法分别获得了大蒜潜隐病毒和大蒜花叶病毒中国分离物的全长外壳蛋白(coat protein, CP)基因, 并进行了克

* 天津市二十一世纪青年基金资助(963702811)

** 同为第一作者

*** 通讯联系人, email: qiubs@sun.im.ac.cn

作者简介: 马 筠(1963 -), 女, 天津市人, 天津师范大学化学与生命科学院副教授, 硕士, 主要从事植物基因工程; 杨 恭(1963 -), 男, 甘肃省武山县人, 中国科学院微生物研究所微生物学专业 98 级博士生。

本文报道的基因序列在 Genbank 中的接收号为 GLVc: AF314147; GMVc: AF314146

收稿日期: 2000-10-25, 修回日期: 2000-02-07

隆和序列测定;对测定的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行了比较和分析;之后将其插入原核表达载体进行了诱导表达。本文报道这两株病毒的中国分离物 CP 基因的克隆、序列测定与分析以及在原核细胞中的表达结果。

1 材料和方法

1.1 病理材料

为来源于天津市郊区种植的大蒜。

1.2 菌种、质粒与试剂

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3),质粒 pET-30a 均为本实验室收藏;限制性内切酶、T4DNA 连接酶购自 TaKaRa(大连)公司;RNA 纯化试剂盒、cDNA 合成试剂盒分别购自 Amasham Pharmarcia 和 CLONTECH 公司;T 载体系统为 Promega 公司产品;其余试剂为国产分析纯。

1.3 大蒜病毒提取与 RNA 纯化

取 5g 幼嫩的大蒜叶组织,液氮冷冻研磨,加入 50mL 0.5mol/L 的硼酸缓冲液(BB)、25mL 氯仿、25mL 四氯化碳,匀浆 10min,8 000g 离心 10min;取上清加入 5%的 PEG(Mr 6000)和 1.75%的 NaCl,4℃静置 80min,10 000g 离心 20min;沉淀用 20mL BB 悬浮过夜,然后 8 000g 离心 10min。去沉淀,上清加入上述同样浓度的 PEG 和 NaCl,4℃静置 1h,离心 10min;之后用 400 μ L RNA 抽提缓冲液和 800 μ L 洗脱缓冲液溶解沉淀,按试剂盒的操作说明过 Oligo(dT)-纤维素柱,再洗脱,可获得足量的病毒 RNA。

1.4 病毒 cDNA 的合成与 PCR

按试剂盒的操作说明进行,取 0.5 μ g 的 RNA 样品,加入修饰的 Oligo(dT)引物等,RNA 在 72℃变性 2min,cDNA 第一条链在 42℃ 1h 合成;之后取 2 μ L cDNA 做模板,加入 Taq DNA 聚合酶和引物等,进行 PCR 扩增。GLVc(大蒜潜隐病毒中国分离物)的 5'端引物为 5'-GGAATTCCATATGGCTAACGAAGAAGAAGAACTC-3'(划线区分别为 *Eco*RI 和 *Nde*I 位点),3'端引物为 5'-CGGGATCCTATAGCAGCAATAGTCTAC-3'(划线部分为 *Bam*HI 位点);GMVc(大蒜花叶病毒中国分离物)的 5'端引物为 5'-CATATGPGCTAATGATGAATTAGATGCA-3'(划线区为 *Nde*I 位点),3'端引物为 5'-CGATCCTCACTGCATGTCCG-CACCATCAAG-3'(划线部分为 *Bam*HI 位点)。PCR 扩增的条件为 94℃ 45s,45℃ 45s,72℃ 1min 30s,最后 72℃延伸 10min。低熔点琼脂糖回收扩增的特异产物,用于克隆。

1.5 CP 基因的克隆

将回收的扩增片段不进行任何处理,按 T 载体系统的操作说明直接克隆于 T 载体中,用 TSS 法^[8]转化于 DH5 α ,用 PCR 法和 *Nde*I 与 *Bam*HI 酶切鉴定重组克隆,重组克隆命名为 pGGLVc 与 pGGMVc。

1.6 CP 基因的 cDNA 序列测定与分析

重组质粒用 M₁₃ 双向引物进行全自动测序(377 测序仪),然后将序列测定结果与 GenBank 中的有关数据进行同源性比较和分析。

1.7 CP 基因表达载体的构建

将 pGGLVc 与 pGGMVc 分别用 *Nde*I 与 *Bam*HI 酶切,回收 900bp 左右的片段,连接于用相同酶消化的 pET-30a,构建非融合表达载体 pET-GLVc 和 pET-GMVc。

1.8 CP 基因的诱导表达与表达产物的初步鉴定

将构建好的表达载体分别转入大肠杆菌 BL21(DE3)(TSS 法),按文献[8]描述的方法进行诱导表达和检测。

2 结果

2.1 大蒜潜隐病毒(GLVc)和大蒜花叶病毒(GMVc)中国分离物 CP 基因的 PCR 扩增与克隆

RT-PCR 结果(图 1)显示,目的基因片段均在 0.9kb 左右,与参考序列的基因大小相似(图 1, Lane1 和 Lane4);所建立的 cDNA 库片段大小不等(Lane2),并存在较大的片段,有望在该库中克隆全长基因或其它大蒜病毒基因。利用 pGEM-T 载体直接将目的基因的 PCR 产物进行克隆(图 2)。

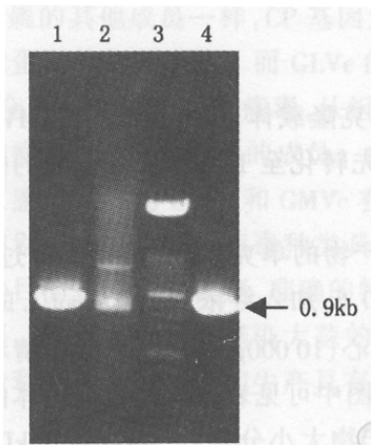


图 1 大蒜潜隐病毒(GLVc)与大蒜花叶病毒(GMVc)CP 基因的 RT-PCR 产物电泳分析(1%琼脂糖)

Fig.1 Analysis of RT-PCR products of garlic latent virus (GLVc) and garlic mosaic virus (GMVc) coat protein genes in 1% agarose

Lane 1&4: RT-PCR products of GLVc and GMVc coat protein genes respectively;

Lane 2: cDNA library established by RT; Lane 3: DNA marker-XIV from Boehringer Mannheim.

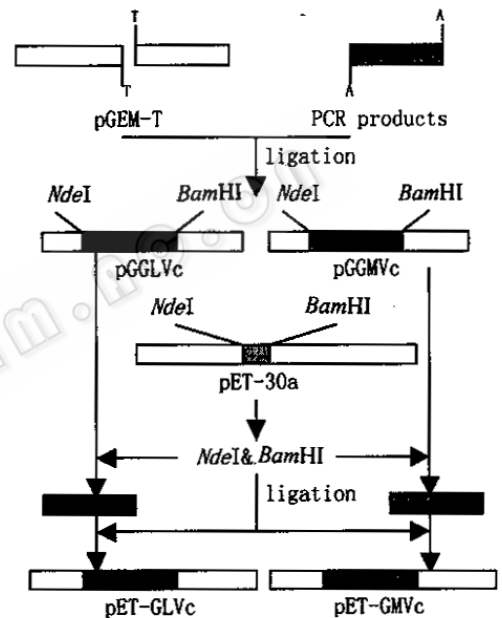


图 2 GLVc 和 GMVc CP 基因克隆载体(pG-GLVc/pGGMVc)与表达载体(pET-GLVc/pET-GMVc)的构建

Fig. 2 Constructions of pGGLVc/pGGMV and pET-GLVc/pET-GMVc

2.2 DNA 序列测定与分析

2.2.1 序列测定结果: GLVc 和 GMVc CP 基因全长分别为 885 和 867 个核苷酸,前者起始密码为 AUG,终止密码 UGA; GLVc: A = 28.25%, G = 24.52%, T = 24.63%, C = 22.60%
A + T = 52.88%, G + C = 47.12%, Tm = 83.65; GMVc: A = 33.45%, G = 25.84%, T = 21.80%, C = 18.92%, A + T = 55.25%, C + G = 44.75%, Tm = 82.67。

2.2.2 核苷酸序列的比较分析: 对克隆基因进行同源性比较分析,发现二者核苷酸的同源性只有 22.9%,说明二者的种属完全不同; GLVc 与已报道的一株 GLV CP 基因的同源性最高,为 73.6%,但核苷酸总数不等,后者为 894 个核苷酸; GMVc 与已报道的一株 GMV

同源率最高,为 88.5%,与一株韭菜黄条病毒(LYSV)的同源率为 77.7%(图 3)。

2.2.3 从克隆基因推断的 CP 氨基酸序列分析,发现二者的氨基酸同源率仅 13.1%,GLVc 与 GMVc 外壳蛋白的分子量分别为 34kD 和 32kD,预测等电点分别为 6.62 和 6.43;GLVc 与报道的 GLV CP 同源率为 90.9%;GMVc 与 GMV CP 的同源率达 97.2%(图 3)。

2.2.4 克隆基因的分子进化树:用 DNASTar 软件包,对克隆基因进行分子系统发育分析,发现 GMVc 与 GMV 及 LYSV 的亲缘较近,同为马铃薯 Y 病毒属的成员;而 GLVc 与 GLV 的亲缘最近,同时也与大蒜普通潜隐病毒具有一定的同源性,同属于香石竹潜隐病毒属的成员;该结果表明本实验克隆的基因确实为大蒜潜隐病毒和大蒜花叶病毒的外壳蛋白基因,但同源性较低的结果暗示了该病毒因地域的不同或大蒜品种的不同而有一定的变异。克隆基因与大蒜病毒 A、B、C 和 D 的相应基因同源性较差,因而在分类和进化上,后者应归为不同的一属(图 3)。

2.3 外壳蛋白基因的表达

2.3.1 外壳蛋白基因表达载体的构建:用限制性酶从克隆载体 pGGLVc 与 pGGMVc 中切下,分别转移到用相同的酶处理的 pET-30a 中(图 2),先转化至 DH5 α ,获得正确的插入克隆后,将重组的表达载体转化入 BL21(DE3)宿主菌。

2.3.2 克隆基因的诱导、表达与检测:挑选上述转化产物的单克隆,小规模培养过夜,然后以 10%的接种量在 LB 中重新培养至 OD₆₀₀ \approx 0.4 ~ 0.6,加入终浓度为 2mmol/L 的 IPTG 诱导 6h,离心(5 000g,10min)收集菌体,超声波裂解,离心(10 000g,10min)后取上清和沉淀分别用于 SDS-PAGE 检测,获得电泳分析图(图 4)。从图中可见表达产物以包涵体的方式存在于细胞质。GLVc 与 GMVc 外壳蛋白基因的表达产物大小分别约 34kD 和 32kD,与预测的大小基本一致。

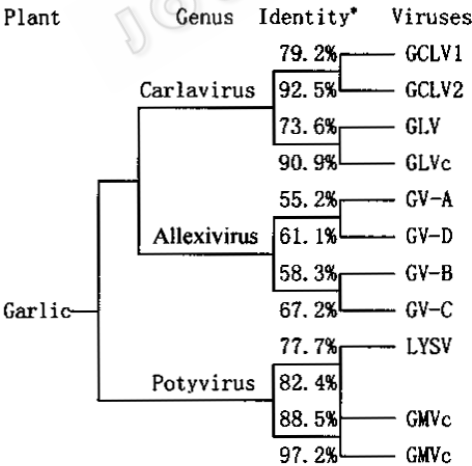


图 3 克隆基因的同源性分子系统发育树

Fig.3 Homology and molecular phylogenetic tree of GLVc and GMVc CP genes
Accession numbers: GCLV1 ~ AB004805; GCLV2 ~ AB004804; GV-A ~ AB010300; GV-B ~ GVU89243; GV-C ~ AB010302; GV-D ~ AB010303; GLV ~ D11161; GLVc ~ AF314147; LYSV ~ D11118; GMVc ~ AF314146; GMV ~ X67134.
* Identity; numbers on and down the lines are nucleotide and amino acid homology percents, respectively.

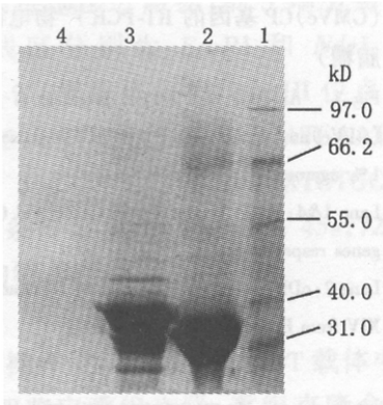


图 4 GLVc 与 GMVc CP 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 Analysis of expression products of the GLVc and GMVc CP genes
Lane 1: Mid-range protein marker from Promega; Lane 2&3: Expressed GMVc and GLVc CPs in a form of inclusion body; Lane 4: Pellet of broken *E. coli* with pET-30a as a control.

3 讨论

获得病毒特异性免疫抗体最快捷的方法是将纯化的病毒直接作为免疫原用于免疫。但是,侵染大蒜的各种病毒由于混合感染及其感染量的差异,很难将他们一一分离和纯化,因而不易用上述方法获得相应病毒的免疫抗体。本实验采用分子生物学方法克隆了我国天津地区侵染大蒜的 GLVc 与 GMVc CP 基因,并进行了序列测定与分析以及大肠杆菌的高效表达。以表达产物进行免疫获得抗体,将对确切检测和调查我国大蒜病毒的侵染与流行情况奠定基础。

由本实验克隆的 GMVc 外壳蛋白基因所推导的氨基酸序列的 N 端,也有类似马铃薯 Y 病毒(Potyvirus)属成员外壳蛋白 N 端所共有的 DAG(Asp-Ala-Gly)基元,而且也象马铃薯 Y 病毒属的其他成员一样,CP 基因无自己独立的转录与翻译调控元件,外壳蛋白是一个通读大蛋白的切割产物。而 GLVc 的 CP 则不同,具有自己单独的基因转录与翻译调控元件,完全不同于马铃薯 Y 病毒,从组成其基因的核苷酸分析与比较结果来看,则属于香石竹潜隐病毒(Carlavirus)属的成员。此外,核苷酸序列和氨基酸序列的比较与分析发现,不同地区感染大蒜的 GLVc 和 GMVc 在基因组核苷酸水平上具有明显的差异,这些差异可能对详细划分感染大蒜的病毒种类具有重要意义。实验结果还暗示,以建立 cDNA 库的方法克隆目的基因具有快速、准确的特点,从该 cDNA 库中(图 1)还可克隆其他感兴趣的病毒基因,因而,有可能对感染大蒜的 RNA 病毒作出全面的了解。这将对大蒜病毒病的全面防治和脱毒大蒜品种的生产具有非常重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Tsuneyoshi T, Matsumi T, Deng T C, *et al.* *Arch Virol*, 1998, **143**:1093 ~ 1107.
- [2] Tsuneyoshi T, Matsumi T, Natsuaki K T, *et al.* *Arch Virol*, 1998, **143**:97 ~ 113.
- [3] Tsuneyoshi T, Sumi S. *Phytopathology*, 1996, **86L**:253 ~ 259.
- [4] 赵顺庆, 范怀忠, 高乔婉, 等. 病毒学杂志, 1987, **2**:75 ~ 86.
- [5] 陆关成, 洪 健, 徐 正, 等. 中国病毒学, 1992, **7**:197 ~ 206.
- [6] 周桂珍, 曹鸣庆, 裘季燕, 等. 植物病理学报, 1989, **19**:145 ~ 149.
- [7] 崔昌荣, 李晓东, 李学湛. 科学通报, 1991, **18**:1439 ~ 1440.
- [8] Frederick M A, Roger B, Robert E K, *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. A compendium of methods from Current Protocols in Molecular Biology. Third Edition. USA, John Wiley & Sons Inc, 1995. 16:1 ~ 18.

CLONING AND EXPRESSION OF TWO GARLIC VIRUS COAT PROTEIN GENES *

Ma Yun^{1**} Yang Gong^{2**} Xu Shaohua² Wei Junya² Qiu Bingsheng^{2***}

(¹ Chemistry and Life College of Tianjin Teachers University, Tianjin 300074, China)

(² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The coat protein(CP)genes of garlic mosaic virus(GMVc)and garlic latent virus(GLVc) isolated from garlic (*Allium*) plants in Tianjin, China, were amplified from an established cDNA li-

brary by PCR method and subsequently expressed in *E. coli* using the pET-30a expression system. The determined sequences of GMVc and GLVc CP genes show that the complete GMVc CP gene has 867 nucleotides encoding 289 amino acids. It has 88.5% and 97.2% homology, at the levels of nucleotide and amino acid, respectively, to a reported GMV, indicating that it belongs to *Potyvirus*. The complete GLVc CP gene has 885 nucleotides coding for 294 amino acids. It has 73.6% and 90.9% homologous percents, in nucleotide and amino acid, respectively, compared to a previously reported GLV, suggesting that it is a member of *Carlavirus*. The expressed products presented in inclusion body and were analyzed by SDS-PAGE. The molecular weights of GMVc and GLVc CPs appear in 32kD and 34 kD size, respectively, which are consistent with the deduced sizes of these two CPs. These data will be virtually significant to the further investigation of viruses infecting garlic plant, the control of garlic virus diseases and the production of virus-free garlic plants.

Key words: Garlic mosaic virus, Garlic latent virus, Coat protein gene, Cloning, Expression

* Supported by the 21st Century Youth Funds of Tianjin, China

** Contributed to this work equally; *** To whom correspondence should be addressed

* * * * *

投稿须知

参照《中国科学院自然科学期刊编排格式规范》和国家标准 GB7713 - 87 及《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》的要求,对本刊经常遇到的一些格式暂作如下规定:

正体与斜体

1. 物种的学名:菌株的属、种用拉丁文斜体,属的首字母大字,其余小写;属以上用拉丁文正体。病毒一律正体,首字母大写。
2. 限制性内切酶:内切酶前 3 个字母用斜体,后面的字母和编码正体平排,如 *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, *Sau*3AI 等。
3. 氨基酸和碱基的缩写:氨基酸缩写用 3 个字母表示时,仅第一个字母大写,其余为小写,全部正体。用单字母表示时为大写正体。碱基缩写均为大写正体。
4. 质粒和载体:质粒(粘粒)一律用正体,首字母 P 为小写,后面字母和数码平排,如 pBR322、pHSG274 等。

计量单位

计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。

1. 时间:日(天)用 d;小时用 h;分钟用 min,秒用 s 等,单位符号均用英文小写正体。
2. 溶液浓度:溶液浓度用 mol/L 表示,而不用 M 或 N。
3. 旋转速度:单位符号为 r/min,而不用 rpm。
4. 生物大分子的分子量:蛋白质用 kD;核酸用 bp 或 kb。
5. 光密度:光密度符号为斜体的 OD。
6. 图表中数值的量和单位:用量与单位的比值表示数值,即物理量符号(斜体)与单位(正体)之间用斜线隔开,如 t/h(时间,单位是小时)。

下转 504 页