

马铃薯 X 病毒外壳蛋白的表达水平与 变偶密码子使用频率的相关性

冯德江 蔡华雅 刘 翔 徐军望 朱 祯*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所 北京 100101)

摘 要 把经密码子修饰的马铃薯 X 病毒(Potato Virus X, PVX)外壳蛋白(Coat Protein, CP)基因和未修饰的野生型外壳蛋白基因与 CaMV 35S 启动子融合后,构建成相应的植物表达载体,利用农杆菌介导转化烟草。分别对修饰 CP 和野生 CP 的转基因烟草进行 Western blot 和 ELISA 分析,结果表明经密码子修饰的 PVX 外壳蛋白的表达量是野生型蛋白表达量的 1/3 ~ 1/5。Northern blot 结果表明修饰和未修饰的外壳蛋白在转录水平上是一致的。以上结果暗示外源基因中稀有密码子的数量可能是限制外源基因表达的一个因素。改变基因中稀有密码子的数量有可能成为控制基因表达的一种有效途径。

关键词 :马铃薯 X 病毒,外壳蛋白,变偶密码子,基因修饰,基因表达

中图分类号 :Q756 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2003)05-0569-08

生物体内编码同一种氨基酸的同义密码子使用频率是不一样的,有的在多个基因中被多次大量使用,而另外的同义密码子却很少使用,从而造成密码子都有一定的使用频率(Codon usage)。对原核单细胞生物如细菌(*Escherichia coli*)、真核单细胞生物如酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)以及对果蝇(*Drosophila melanogaster*)的研究结果表明,不但不同生物的基因组之间表现出一定的密码子偏爱性,而且在同一基因组的不同基因之间也都存在着完全不同的密码子偏爱性^[1~4]。对于这种基因组之间及同一基因组内不同基因之间的密码子偏爱性现象一般认为是生物对翻译准确性逐渐提高的自然选择结果^[5~7]。这一推论来自 3 个方面的证据:第一,密码子的使用频率与 tRNA 的丰度呈正相关^[2,3];第二,密码子使用频率的偏爱程度与基因的表达水平相关,高表达基因比弱表达基因表现出更强的密码子偏爱性^[8];第三,由偏爱的密码子组成的 mRNA 比修饰的含较多稀有密码子的 mRNA 的翻译效率要快得多^[9]。研究还发现,同一基因上的不同部位也表现出一定的密码子偏爱性^[10]。例如,蛋白质中保守氨基酸相应的密码子比非保守区域的密码子表现出更强的密码子偏爱性^[11]。

在其他高等多细胞真核生物中这方面的实验证据还比较少,尤其是在植物方面^[12~14]。为了研究植物中蛋白表达水平与稀有密码子的相互关系,我们修饰了马铃薯 X 病毒(Potato Virus X, PVX)的外壳蛋白(Coat protein, CP)基因,把其中的一些常用密码子替换成烟草中很少使用的稀有密码子。转化烟草后发现修饰的 PVX 外壳蛋白在烟草中表达水平明显低于未修饰外壳蛋白的表达,表明在植物中外源基因的高效表达与基因中密码子使用频率密切相关。

基金项目:国家 973 项目(G2000016205)、国家自然科学基金重点资助项目(39989001)

* 通讯作者。Tel 86-10-64873490, Fax 86-10-64852890, E-mail: zzhz@genetics.ac.cn

作者简介:冯德江(1970-)男,山东郓城人,博士,主要从事分子遗传学研究。E-mail: djfeng@genetics.ac.cn

收稿日期:2002-12-16, 修回日期:2003-06-10

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和试剂

质粒 pCNPT II、pSPROK 及 *E. coli* DH5 α 、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 均为本实验室保存,病毒载体 pP2C2S 由英国 John Inners Center 的 Baulcombe 教授惠赠,为马铃薯 X 病毒 PVXHB 小种的全长 cDNA 克隆;质粒 pBlueKS(+/-) 购自 Stratagene 公司;限制性内切酶及修饰酶购自 TaKaRa 公司;碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体购自美国 Vector 公司;BSA、NBT、TMB 及 BCIP 购自 Sigma 公司。

1.2 PVX 外壳蛋白基因密码子的修饰

依文献 [12] 的方法进行,设计含有突变碱基及限制性内切酶的引物 5 条(图 1),利用聚合酶链式反应把 PVX 外壳蛋白基因中不同位置的偏爱密码子替换成烟草中很少使用的稀有密码子,最终获得多个突变位点和多种氨基酸密码子替换的 PVX 外壳蛋白基因。

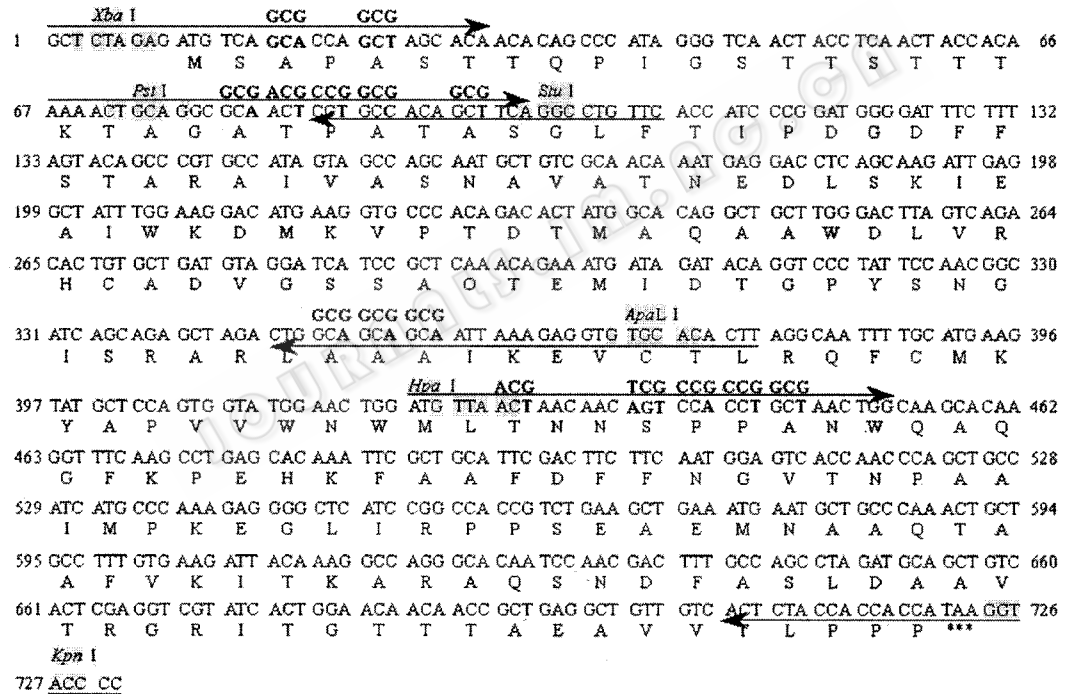


图 1 PVX 外壳蛋白基因序列、突变引物及突变碱基位置

Fig. 1 Sequence of PVX coat protein gene, primers with mutated nucleotides, and positions of mutated nucleotides. Black letters represent mutated nucleotides; Arrows indicate positions and directions of primers; Shadowed letters represent restriction endonuclease and their recognition sequences; Nucleotides beside both termini of CP sequences are added restriction endonucleases and protected nucleotides.

1.3 植物转化载体构建

修饰及没有修饰的野生型 PVX 外壳蛋白基因插入 pSPROK 的 *Xba* I 和 *Kpn* I 之间产生 pSPRCPM 及 pSPRCPW, 用 *Eco* R I 和 *Hind* III 酶切这两个质粒, 回收 CaMV35S-CPM-Tnos 及 CaMV35S-CPW-Tnos 表达结构插入到 pCNPT II 载体的相应位点中, 获得植物转化载体 pCPM2300 及 pCPW2300。

1.4 植物转化

按文献 [15] 的方法进行烟草转化及再生植株的筛选,再生植株水培练苗后,移栽到温室中。

1.5 PCR 鉴定

依文献 [15] 的方法提取部分卡那霉素抗性植株的基因组 DNA,取适量 DNA 作模板,依次加入 *Taq* DNA 酶缓冲液 $2\mu\text{L}$ 、dNTP ($2.5\mu\text{mol/L}$) $2\mu\text{L}$ 、5' 端引物和 3' 端引物各 10pmol 、*Taq* DNA 聚合酶 1U 、加 ddH_2O 至总体积为 $20\mu\text{L}$ 。5' 端引物为:GCTCTAGAGCATGTCAGCAC CAG, 3' 端引物为:GGGCTACCCTGCTGCTGCTGCTAGAGTGAC。反应条件为: 94°C 5min ; 94°C 1min 55°C 1min 72°C 1min 30 个循环 72°C 10min 。

1.6 Western blot

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离转基因烟草蛋白样品后,电转移到 PVDF 膜上,用碱性磷酸酶 (AP) 的底物 NBT/BCIP 显色分析。具体操作按产品说明书进行。

1.7 Northern blot

采用异硫氰酸胍法提取烟草叶片总 RNA^[16],取 $15\mu\text{g}$ 不同植株的总 RNA 进行琼脂糖变性凝胶电泳分离后,转移至 Hybond N⁺ (Amersham) 尼龙膜^[18],以 PVX 外壳蛋白基因片段和 18S rDNA 为探针进行杂交,探针标记依照随机引物标记试剂盒进行 (Promega)。按照标准步骤进行 Northern blot 分析。

1.8 ELISA 检测

在样品检测孔中加入 $50\mu\text{L}$ 样品并加包被液 (Na_2CO_3 0.015mol/L , NaHCO_3 0.035mol/L , NaN_3 0.2%) 至 $200\mu\text{L}$ 4°C 包被过夜后,加 PBST (KCl 0.2% , NaCl 8% , KH_2PO_4 1.5mmol/L , Na_2HPO_4 0.5mol/L , Tween20 0.15%) 洗涤 3 次; $1\mu\text{g}$ BSA 37°C 封闭酶标板 1h 后同样用 PBST 洗涤 3 次,加入一抗 37°C 反应 1h, PBST 洗涤 3 次,加二抗 37°C 反应 1h, PBST 洗涤 3 次,加底物 (NBT) 溶液暗反应 25min 后加入 2mmol/L H_2SO_4 终止反应 5min 后测 OD_{450} 。

2 结果

2.1 植物表达载体的构建、烟草转化和再生植株的检测

为了检测 tRNA 丰度和基因表达的关系,设计了含有突变碱基及限制性内切酶的引物,以病毒载体 pP2C2S 为模板,利用聚合酶链式反应,分别扩增出相应含有突变位点的片段,酶切后与剩余未突变部分及相应酶切的克隆载体 pBlueKSC (+/-) 连接,获得含有部分突变的 PVX 外壳蛋白基因。以此部分突变外壳蛋白基因为模板,利用另外含有突变碱基的引物再次进行 PCR 扩增,最终获得多个突变位点密码子修饰的 PVX 外壳蛋白基因 *cpm*。将获得的修饰基因插入到 *E. coli* 载体 pBlueKSC (+/-) 的 *Xba* I 和 *Kpn* I 位点之间,获得 pBCPM 质粒。本实验共替换了 17 个碱基 15 个不同氨基酸的同义密码子,使 PVX 外壳蛋白基因中含有较多的稀有同义密码子。突变引物及突变碱基位置见图 1,烟草及 PVX 外壳蛋白中部分氨基酸的同义密码子的使用频率见表 1。把修饰后的及没有突变的外壳蛋白基因的表达结构构建到 pCNPTII 载体中,得到植物表达载体 pCPM2300 和 pCPW2300 (图 2)。利用农杆菌介导的叶盘法转化烟草得到转化烟草后,提取总 DNA 进行 PCR 检测,在转化烟草中均扩增出和对照质粒大小一致的 PVX 外壳蛋白基因片段。

表 1 烟草 *Nicotiana tabacum* 及马铃薯 X 病毒中部分密码子的使用频率*

Table 1 Some codon usages of tobacco (*Nicotiana tabacum**) and PVX

| Amino acid | Codon | Frequency (10^{-3}) of codon usage | | Amino acid | Codon | Frequency (10^{-3}) of codon usage | |
|------------|-------|--|------|------------|-------|--|------|
| | | T | P | | | T | P |
| Ser | UCA | 17.6 | 13.4 | Ala | GCU | 31.9 | 29.3 |
| | UCC | 10.4 | 10.3 | | GCA | 22.8 | 28.8 |
| | UCG | 5.2 | 4.0 | | GCC | 12.7 | 27.2 |
| | UCU | 20.2 | 9.5 | | GCG | 5.8 | 7.9 |
| | AGC | 10.0 | 16.4 | | CCA | 20.4 | 20.7 |
| | AGU | 13.1 | 12.0 | | CCC | 6.8 | 11.9 |
| Thr | ACA | 17.3 | 29.6 | CCG | 4.8 | 8.6 | |
| | ACC | 9.9 | 20.1 | CCU | 18.9 | 12.0 | |
| | ACG | 4.5 | 7.0 | | | | |
| | ACU | 21.1 | 26.2 | | | | |

* The codon usage data are from the GenBank database ; The usage of triplets in boldface are rare codons in tobacco (T) and potato virus X (P).

2.2 Western blot

为了比较修饰和未修饰的 PVX 外壳蛋白基因在转基因烟草中的表达,对部分转基因烟草进行了 Western blot 分析。为了取材的一致性,分别对 pCPW2300 质粒转基因烟草的 5、15 及 24 号植株, pCPM2300 质粒转基因烟草的 30、36、44 及 71 号植株新鲜展开的第 6 片真叶取材 (0.2g),于 500 μ L 研磨液中 4 $^{\circ}$ C 研磨后取 50 μ L 进行 SDS-PAGE、转膜、杂交。结果表明,未修饰外壳蛋白基因在转基因烟草中的表达强于密码子修饰的外壳蛋白在转基因烟草中的表达 (图 3-c)。利用扫描成像系统的 Imagequant 软件对条带的强弱进行分析,结

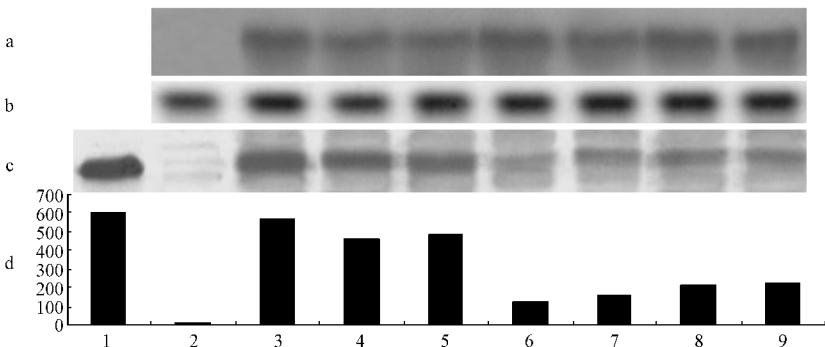


图 3 转基因烟草的 Western blot 及 Northern blot 分析

Fig. 3 Western blot and Northern blot analyses of transgenic tobaccos

a: Northern blot results of transformants ; b: 18S rRNA ; c: Western blot results of transformants ; d: Intensities of the specific bands in Western blot

1. 200 ng PVX native CP, as a positive control ; 2. 50 μ g protein extracted from a pCNPT II transformant, as a negative control ; 3 ~ 5. 50 μ g total protein extracted from leaf tissue of transgenic tobaccos with non-modified CP gene ; 6 ~ 9. 50 μ g protein extracted from a transgenic tobacco with modified CP gene.

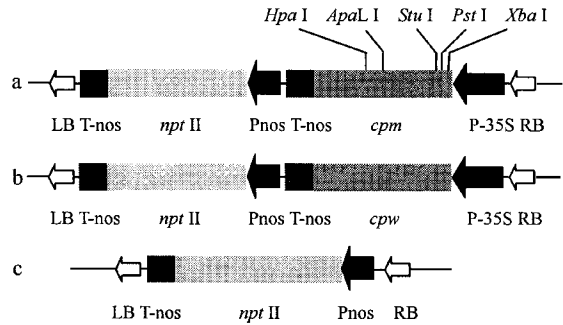


图 2 植物表达载体结构示意图

Fig. 2 Sketch maps of plant expression

vector pCPM2300 and pCPW2300

a: pCPM2300 ; b: pCPW2300 ; c: pCNPT II.

P-nos. Promoter of nopaline synthase gene ; P-35S. CaMV35S promoter ; npt- II. Plant selective marker neomycin phosphotransferase gene ; cpm and cpw. Codon modified and non-modified PVX coat protein gene ; T-nos. Terminator of nopaline synthase gene ; LB and RB. Left and right border of T-DNA.

果更直观的显示出修饰和未修饰外壳蛋白表达的区别(图 3-d),未修饰外壳蛋白转基因烟草 5 号植株中目的蛋白的表达量可达近 200ng,而修饰外壳蛋白转基因 30 号植株的表达为 30ng,仅为 2 号植株的 1/6。

2.3 Northern blot

外源基因插入位点的不同或拷贝数的多少不一样,可能会导致转录的不同从而使蛋白水平表现出差异。为了检验以上蛋白水平表达差异是否因转录的不同,对以上 PVX 外壳蛋白表达差异的转基因烟草进行了 Northern blot,结果表明密码子修饰及未修饰的外壳蛋白基因在转录水平上是一致的。在个别转 pCPW2300 质粒的烟草中, PVX 外壳蛋白基因在蛋白水平表达低的,其转录水平却很高,甚至强于蛋白表达高的转基因烟草(图 3-a),说明蛋白水平上的差异不是由于转录的不同而引起的,而是在转录后的某个环节。

2.4 ELISA

为了更准确的比较密码子修饰和未修饰的 PVX 外壳蛋白基因在转基因烟草中的表达,取 pCPW2300 载体和 pCPM2300 载体的转基因植株各 48 株,转 pCNPTII 空载体的转基因烟草及非转基因烟草各 12 株进行 ELISA。结果表明密码子未修饰的外壳蛋白的表达显著高于密码子修饰的外壳蛋白的表达,单株最高可以达到修饰外壳蛋白表达量的 5 倍,平均表达水平是密码子修饰的外壳蛋白表达水平的 3 倍。

3 结论

基因中不同的同义密码子的使用频率并不是随意的,许多生物的基因都具有一定的密码子使用频率^[17]。这种偏爱性的产生是生物在翻译水平上选择的结果,最丰富的 tRNA 相对应的同义密码子就是最偏爱的密码子,高表达的基因往往含有较高的偏爱密码子, tRNA 数量、同义密码子的使用频率及基因表达活性三者之间的相互关系的实验证据首先来自大肠杆菌^[18]。后来对酵母的 6 个核基因的研究中得出了同样的结论^[19]。对酵母的一些组成型表达基因中的密码子和 20 种 tRNA 的数量的研究也揭示了 tRNA 数量和由相应密码子组成的基因在蛋白表达水平上的一种正相关关系^[2]。在高表达的基因中密码子和相应的 tRNA 丰度也是一种相辅相成的关系^[20]。由于原核基因和真核基因在密码子组成上的差异,当原核基因在真核中表达或真核基因在原核中表达时,密码子的组成、相应 tRNA 丰度及蛋白质的表达水平三者之间的关系表现的尤为突出^[21]。

由于在病毒与寄主植物长期共同进化过程中,病毒携带的基因适于在宿主细胞内表达(使用植物偏爱密码子),因此病毒基因中密码子的使用频率往往和寄主植物的密码子使用频率相近或相同(表 1)。本研究中,我们将 PVX 外壳蛋白基因中某些密码子变成烟草中较少使用的同义稀有密码子,结果发现外壳蛋白在转基因烟草中的表达大大减弱,平均表达水平为密码子未修饰外壳蛋白的 1/3。这说明大量利用寄主的稀有密码子进行蛋白合成时,这种蛋白的表达量会大大降低。Kleber-Janke 等在大肠杆菌中表达不同的花生过敏原时发现, cDNA 中含编码精氨酸 AGA/AGG 密码子(大肠杆菌中较少、甚至不用的稀有密码子)达 8%~10%的 Ara h1、2、6 比含 AGA/AGG 密码子达 0.8%的 Ara h5 表达量要低很多。在不改变 AGA/AGG 密码子含量的情况下,在细菌中表达大肠杆菌的编码精氨酸稀少 tRNA 的 *argU*、*ileY* 和 *lueW* 基因,使精氨酸稀少密码子含量高的 Ara h1、2、6 表达提高

了 100 多倍^[22]。此外, Dieci 等用含有大肠杆菌 *argU* 基因的质粒转化已经含有外源核糖体蛋白基因的大肠杆菌, 增加稀少 tRNA 的量, 结果使外源蛋白表达量达到了细菌总蛋白的 50%^[23]。通过增加细菌中稀少 tRNA 的量来获得目的蛋白高表达的实验还有许多^[24~27]。以上实验说明基因中稀有密码子的数量是蛋白合成的一个限制因子, 而这种限制作用又是通过 tRNA 进行调节的。

本实验中, 部分转基因烟草植株的 Northern blot 分析表明, PVX 外壳蛋白表达量不同的转基因植株中其转录水平却没有明显差异。推测当密码子修饰外壳蛋白基因 *cpm* 在植物细胞质中进行蛋白翻译时, 核糖体就会遇到稀有密码子, 由于稀有密码子相应的 tRNA 数量较少, 不能及时到达核糖体的氨酰位, 就会造成核糖体的停滞, 造成蛋白表达量的降低^[28]。

本实验说明了 tRNA 丰度、密码子使用频率和蛋白表达三者之间的关系, 同时暗示着植物可能利用三者之间的关系来调节自身基因在生长发育过程中的时空表达。我们的实验结果为那些想在真核生物中高效表达外源基因的实验提供了理论上的依据, 尤其是以植物体为反应器的生物制药工程提供了很好的理论指导。

参 考 文 献

- [1] Gramtja R, Gaitoer C, Gouy M, *et al.* Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. *Nucleic Acids Res*, 1981, **9**: 43 ~ 79.
- [2] Ikemura T. Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in protein genes. *J Mol Biol*, 1982, **158**: 573 ~ 597.
- [3] Ikemura T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol*, 1985, **2**: 13 ~ 34.
- [4] Sharp P M, Cowf E, Higgins D G, *et al.* Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophilamelanogaster* and *Homo sapiens*, a review of the considerable within species diversity. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**: 8207 ~ 8211.
- [5] Bulmer M. Coevolution of codon usage and transfer RNA abundance. *Nature*, 1988, **325**: 728 ~ 730.
- [6] Bulmer M. The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. *Genetics*, 1991, **129**: 897 ~ 907.
- [7] Hartl D L, Moriyama E N, Sawyer S A. Selection intensity for codon bias. *Genetics*, 1994, **1138**: 227 ~ 234.
- [8] Sharp P M, Devine K M. Codon usage and gene expression level in *Dictyostelium discordenm* highly expressed genes do "prefer" optimal codons. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**: 5029 ~ 5038.
- [9] Sorensen M A, Kuriand C G, Pedersen S. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1989, **207**: 365 ~ 377.
- [10] Xia X H. Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias. *Genetics*, 1996, **144**: 1309 ~ 1320.
- [11] Akashi H. Synonymous codon usage in *Drosophila melanogaster*: natural selection and translational accuracy. *Genetics*, 1994, **136**: 927 ~ 935.
- [12] Perlak F J, Fuchs R L, Dean D A, *et al.* Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 3324 ~ 3328.
- [13] Rocher E J D, Vargo-Gogola T C, Diehn S H, *et al.* Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants. *Plant Physiol*, 1998, **117**: 1445 ~ 1461.
- [14] Batard Y, Hehn A, Nedelkina S, *et al.* Increased expression of P450 and P450-reductase proteins from monocots in heterologous systems. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **379**(1): 161 ~ 169.
- [15] Gao Y F, Zhu Z, Xiao G F, *et al.* Isolation of soybean kunitz trypsin inhibitor gene and its application in plant insect-resis-

- tant genetic engineering. *Acta Botanica Sinica*, 1998, **40**:405 ~ 411.
- [16] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**:156 ~ 159.
- [17] Pavese A. Relationships between transcriptional and translational control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: A multiple regression analysis. *J Mol Evol*, 1999, **48**:133 ~ 141.
- [18] Ikemura T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translation system. *J Mol Evol*, 1981, **151**:389 ~ 409.
- [19] Bennetzen J L, Hall B D. Codon selection in yeast. *J Biol Chem*, 1982, **257**:3026 ~ 3031.
- [20] Percudani R, Pavese A, Ottonello S. Transfer RNA gene redundancy and translational selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 1997, **268**:322 ~ 330.
- [21] Smith D W. Problems of translating heterologous genes in expression systems: the role of tRNA. *Biotechnol Prog*, 1996, **12**:417 ~ 422.
- [22] Kleber-Janke T, Becker W M. Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr Purif*, 2000, **19**(3):419 ~ 424.
- [23] Dieci G, Bottarelli L, Ballabeni A, et al. tRNA-assisted overproduction of eukaryotic ribosomal proteins. *Protein Expr Purif*, 2000, **18**(3):346 ~ 354.
- [24] Cormack B P, Bertram G, Egerton M, et al. Yeast-enhanced green fluorescent protein(yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbio*, 1997, **143**(2):303 ~ 311.
- [25] Imamura H, Jeon B, Wakagi T, et al. High level expression of *Thermococcus litoralis* 4-alpha-glucanotransferase in a soluble form in *Escherichia coli* with a novel expression system involving minor arginine tRNA and GroELS. *FEBS Lett*, 1999, **457**(3):393 ~ 396.
- [26] Baca A M, Hol W G. Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of plasmodium and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*. *J Parasitol*, 2000, **30**(2):113 ~ 118.
- [27] Valencik M L, McDonald J A. Codon optimization markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart. *Transgenic Res*, 2001, **10**(3):269 ~ 275.
- [28] Chen, G F T, Inouye M. Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**:1465 ~ 1473.

Relativity Between Expression Level of Potato Virus X Coat Protein and the Codon Usage of Wobble Codon

Feng Dejiang Cai Huaya Liu Xiang Xu Junwang Zhu Zhen *

(Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The relationship between the quantities of rare codons and the expression levels of foreign genes is very important in gene engineering. But up to now, there is few experiment on it in multi-cellular eukaryotes, especially in plants. To study the effect of rare codons on the expression level of potato virus X (PVX) coat protein (CP) in transgenic tobacco, some preferred codons in PVX coat protein gene were substituted with synonymous rare codons without changing the encoded amino acid sequence using site-specific mutation. The modified coat protein gene (*cpm*) and non-modified coat

protein gene(*cpw*) were inserted into binary vector under the control of CaMV35S promoter , and these two plant expression constructs were transferred into tobacco(*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) genomes via *Agrobacterium* mediated method and transgenic plants were generated. Western blot and ELISA of these transgenic tobaccos showed that the expression level of modified CP is about one third to one sixth of that of non-modified CP. Northern blot analysis of RNAs from some transformants indicated that the transcriptional levels of *cpm* are the same as that of *cpw* , which implicated that the quantity of rare codons in foreign gene was a possible limited factor in foreign gene expression process. Changing the quantity of rare codons maybe an effective method for organism to control gene expression.

Key words : Potato virus X , Coat protein , Wobble codon , Gene modification , Gene expression

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development(G200016205) ; Key Project of Chinese National Natural Science Foundation(39989001)

* Corresponding author. Tel : 86-10-64873490 ; Fax : 86-10-64852890 ; E-mail : z Zhu@genetics.ac.cn

Received date : 16-12-2002

欢迎订阅 2004 年《中国药学文摘》

《中国药学文摘》、中国药学文摘数据库网络版、光盘(2004 年)中国药学文献数据网络系统即《中国药学文摘》刊物、数据库网络版、数据库光盘是国家科技部重点扶植、国家食品药品监督管理局主管的我国药学文献大型检索和查询系统。该系统于 1981 年创建 ,主要收载国内外公开发行的 700 余种医药学及相关学科期刊中的药学文献 ,以文摘、简介、题录等形式进行报道。

该系统内容涵盖药学各个领域 ,共设十二个栏目 :药理学理论与发展动态、生药学和中药材、药物化学、药物生产技术、药剂学和制剂技术、药理学和毒理学、生物药剂学、药物分析、临床应用与药物评价、药品管理、制药设备和工厂设计及包装、药品和新药介绍等。该系统拥有近 32 万多条数据 ,本数据库每年以 3 万多条数据递增 ,且内容丰富 ,查询方便 ,可为医药生产、科研、教学、流通、医院药房、药店、情报和管理机构服务。该系统采用全新的系统结构和快速检索的新标引法 ,实现了对大容量、大范围全文本信息资料的零等待智能快速查询。根据实际工作需要 ,实现了库、刊、网为一体的服务系统 ,大大提高了查全率和查准率 ,即可全文检索 ,又可从文献类型、主题词、关键词等 12 个入口检索、查询。读者可分别从网络、光盘、文本三种途径查到所需要的文献。该系统曾获国家科技进步三等奖 ,文本版即国内外公开发行的杂志《中国药学文摘》曾多次获得有关部委的奖励 (国家科委、国防科工委、中国科学院、中国科协、国家自然科学基金会五大部委的全国科技信息系统优秀成果二等奖、全国科技检索期刊一等奖、第二届全国优秀科技期刊评比三等奖、全国医药情报成果二等奖、第二届国家期刊奖百种重点期刊奖)。

《中国药学文摘》为月刊 ,内容同中国药学文摘数据库 ,16 开本 ,每期 260 页左右 ,每期约 65 万字 ,全年 476 元。