

芜青花叶病毒外壳蛋白基因的克隆和表达

邱并生 王晋芳 王小凤 沈学军 田 波

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

芜青花叶病毒 (Turnip Mosaic Virus, TuMV) 属于马铃薯 Y 病毒组, 其基因组为单链 RNA, 寄主范围广, 能侵染 20 个科的双子叶植物^[1]。在我国 TuMV 的分布遍及各地, 是危害油菜、白菜、萝卜等十字花科作物的主要病毒。目前尚无有效的防治手段。转基因植物的研究为植物抗病毒育种提供了一条有利途径。本实验成功地合成了 TuMV-RNA 的 cDNA, 以 pUC19 为载体进行了外壳蛋白基因的克隆。Western Blot 分析结果表明, 第 30 号重组克隆在大肠杆菌中有 TuMV 外壳蛋白产物的表达。

材 料 和 方 法

(一) TuMV-cDNA 合成和克隆

1. 病毒的提纯: 将 TuMV (北京郊区大白菜分离物) 繁殖在芥菜上作为提取材料, 参照 Choi^[2] 的方法, 经差速离心和 CsSO₄ 梯度离心得到提纯的病毒样品。

2. TuMV-RNA 的提取: 主要依据 Toriyama^[3,4] 方法进行。提纯的 TuMV 经蛋白酶 K 和 SDS-酚处理, 提取 RNA。

3. cDNA 合成: 根据 TuMV-RNA 3' 末端具有 poly(A) 的特点, 以 oligo(dT) 作引物, 用 BRL 公司的 cDNA 合成试剂盒分别合成 cDNA 的第一条链和第二条链, 加入 EDTA 到 20mmol/L 终止反应, 琼脂糖凝胶电泳分析产物大小。

4. cDNA 克隆: 用 *E. coli* 的 DNA 聚合酶 I 大片段酶将 cDNA 两端补齐, 用 SmaI 将 pUC19 切成平端, 在 T₄-DNA 连接酶作用下室温反应 4 小时。重组质粒转化 *E. coli* DH5 α 。具体方法详见文献[5]。

(二) 重组克隆的筛选及鉴定

1. 菌落杂交: 以 γ -³²P-ATP 标记 TuMV-RNA 5' 末端制备杂交探针, 杂交方法按 Shah^[6] 方法进行。

2. 重组质粒的检查: 采用快提法^[7] 提取质粒, 用 EcoRI 和 BamHI 进行酶切, 经 1% 琼脂糖

凝胶电泳分离检测插入片段。

(三) TuMV 外壳蛋白基因的筛选

1. 重组克隆的免疫筛选: 首先用带有 pUC19 的 *E. coli* DH5 α 对 TuMV 抗血清进行非特异性吸收处理^[8]。将阳性克隆菌点在硝酸纤维素膜上, 在含有 Ampicillin 的 LB 平板上培养, 用氩仿熏滤膜 15 分钟, 后悬于裂解液 (100mmol/L Tris-HCl pH7.8, 150mmol/L NaCl, 5mmol/L MgCl₂, 1.5% BSA, 1 μ g/ml 牛胰 DNase, 40 μ g/ml 溶菌酶) 中室温过夜, 经 TNT (10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 150mmol/L NaCl, 0.05% 吐温 20) 处理后, 与 TuMV 抗血清进行免疫反应, 最后采用碱性磷酸酶系统进行显色^[9]。

2. Western Blot 分析: 将直接免疫筛选得到的阳性克隆菌体悬于蛋白裂解液 (2% SDS, 5% 巯基乙醇, 62.5mmol/L Tris, 10% 甘油, 0.05% 溴酚蓝) 中煮沸 10 分钟, 离心后的上清液进行 SDS-PAGE 分离蛋白, 将蛋白电转移到硝酸纤维素膜上。转移缓冲液为 10mmol/L NaHCO₃, 3mmol/L Na₂CO₃ (pH9.9), 350mA 转移 30 分钟, 免疫及显色反应与直接免疫筛选相同。

结 果 和 讨 论

(一) cDNA 合成和克隆

合成的 cDNA 经 1.4% 碱性琼脂糖电泳和放射自显影分析, 表明第一和第二链的大小在 0.30—3kb。通过载体 pUC19 转化后获得白色克隆。

以 TuMV-RNA 为探针, 挑选出 300 多个白色转化菌进行菌落杂交, 其中有 39 个杂交斑点为强阳性。此结果证明这 39 株克隆菌含有 TuMV-cDNA。

(二) TuMV 外壳蛋白基因的表达

在硝酸纤维素膜上进行直接免疫筛选的结果, 只有第 30 号重组克隆出现了显色斑点。对该

本文于 1991 年 4 月 9 日收到。

克隆进行 Western Blot 检测,结果膜上出现了一条与 TuMV 外壳蛋白同样大小 (27000 Dalton) 的显色带(见图 1),从而确证了第 30 号克隆含有 TuMV 外壳蛋白的基因。

在用 EcoRI 和 BamHI 对重组质粒进行酶切分析时发现第 30 号克隆能产生两个片段,这表明插入到 pUC19 中的 TuMV-cDNA 片段中含有此限制性内切酶位点,于是我们分别用 EcoRI 和 BamHI 对第 30 号进一步作酶切分析,结果仅有 EcoRI 可将 TuMV-cDNA 切成大小分别为 0.60kb 和 0.35kb 两个片段(见图 2)。

本实验的结果表明我们已经获得能表达 TuMV 外壳蛋白基因的克隆,对植物抗病基因工程打下了基础。TuMV 外壳蛋白基因的序列分析正在进行中。



图 1 Western Blot 分析 TuMV 外壳蛋白基因在 *E. coli* DH5 α 中的表达

1. TuMV 外壳蛋白; 2. *E. coli* DH5 α ;
3. 含有外壳蛋白基因的重组克隆(第 30 号克隆)

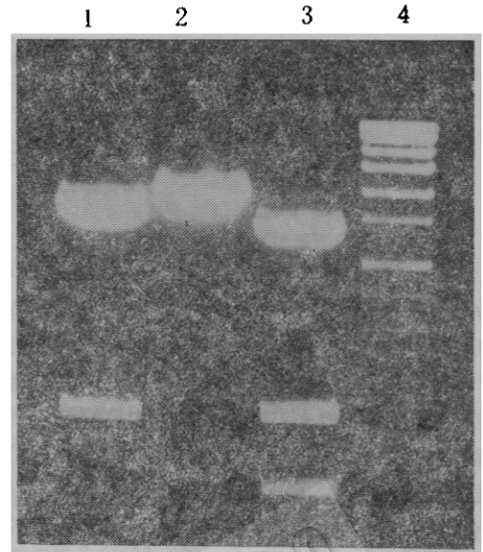


图 2 第 30 号重组质粒酶切电泳图谱

1. EcoRI 单酶切; 2. BamHI 单酶切; 3. EcoRI + BamHI 双酶切; 4. 标准分子量(枯草芽孢杆菌噬菌体 Sppl DNA 的 EcoRI 酶切片段)

参 考 文 献

- [1] 复旦大学生物系植物病毒研究室(译): 植物病毒志, 第一集, 第 21—23 页, 上海科学技术出版社, 上海, 1981 年。
- [2] Choi, J. K. et al.: *Ann. Phytopatho Soc. Japan*, **43**: 440—448, 1977.
- [3] Toriyama, S. et al.: *J. Gen. Virol.*, **67**: 1247—1255, 1986.
- [4] Toriyama, S. et al.: *J. Gen. Virol.*, **70**: 505—511, 1989.
- [5] Stanton, B. G.: *Plant Molecular Biology Manual*, PMAN-A7/39—41, Kluwer Academic Publishers, London, 1988.
- [6] Shah, D. M. et al.: *Science*, **233**: 478—481, 1986.
- [7] Sorghini, M. A.: *Nucleic Acids Res.*, **17**(9): 3604. 1988.
- [8] Sambrook, J. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

CLONING AND EXPRESSION OF COAT PROTEIN GENE OF TURNIP MOSAIC VIRUS

Qiu Bingsheng Wang Jinfang Wang Xiaofeng Shen Xuejun Tian Po

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Turnip mosaic virus (TuMV), a member of the potyvirus group, and considered to be the main virus that cause severe disease of crucifer plants, such as *Brassica Campestris*, *B. Pekinensis*, *Raphanus Sativus* etc. The RNA was extracted from TuMV, purified by differential centrifugation and CsSO₄ density gradient centrifugation, using oligo-dT as a primer to synthesize cDNA, which was then cloned into vector pla-

smid pUC19. It has been shown by immunological screening and Western Blot analysis that the No. 30 clone expressed the coat protein gene product. The sequence analysis of coat protein gene is in progress.

Key words

Turnip mosaic virus; Coat protein;
Gene expression