

利用 PCR 技术克隆黄瓜花叶病毒的外壳蛋白基因

郭东川 乔利亚 方荣祥 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

黄瓜花叶病毒(CMV)是一种植物正链 RNA 病毒,它由蚜虫传播,广泛分布于自然界,可以危害单子叶植物及双子叶植物的 85 科, 365 属中的 775 种植物,给农业生产带来很大的危害。1986 年 Powell 等^[1]将编码烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白的基因转入烟草细胞中表达,获得具有抗 TMV 抗性的烟草。由此启示了利用转病毒外壳蛋白基因途径来培育抗病毒植物。本实验室从山东感病烟草中分离得到一株 CMV(CMV-SD),以此病毒的 RNA 为模板合成 cDNA,利用 PCR 技术成功地克隆到其外壳蛋白基因,对外壳蛋白基因的核苷酸序列进行了测定,结果表明它是属于 CMV WT 亚组的一株病毒。

材 料 和 方 法

(一) 病毒来源

病毒由山东感病烟草中分离得到。

(二) 病毒和 RNA 的提纯

根据 Lot, H. 等方法^[2]纯化病毒。按常规的酚—氯仿抽提方法提纯病毒 RNA。

(三) CMV 外壳蛋白基因的克隆

利用提取得到的病毒 RNA 为模板,用 Boehringer Mannheim 公司的 cDNA 合成试剂盒,以随机引物引发 cDNA 第一链的合成。依据 Cuozzo 等^[3]发表的序列,设计了两个 PCR 引物 5' 端引物为 ACTTGAGTTCGAGCCATGGAC。其中的 ATG 为起始密码子,并引进了 Nco I 切点。3' 端引物为 TAGCCGTGAGCTCGATGGACAA,它与外壳蛋白基因的终止密码子后第 109 至 124 的核苷酸序列互补,并在其中引入了 Sac I 切点。用 Cetus 公司生产的 PCR 试剂盒扩增出 CMV-SD 外壳蛋白的全基因。把 PCR 产物克隆到 pBluescript SK 质粒的 EcoRV 位点中。

(四) CMV-SD 外壳蛋白基因的序列测定

利用 CMV 外壳蛋白基因中的 Hind III 和 Xho I 切点,把 PCR 产物亚克隆到 pBluescript 质粒上,用 USB 公司生产的 Sequenase 试剂盒或 Pharmacia 公司生产的 T7 Sequenase 试剂盒来进行核苷酸序列测定。

结 果 和 讨 论

(一) CMV-SD 外壳蛋白基因的克隆、亚克隆和测序

从 CMV 中提取 RNA,取 500ng 为模板,合成第一条 cDNA 链,通过计算同位素的参入量得出 cDNA 的合成量,取 6ng 作为 PCR 扩增的模板,将 PCR 产物克隆到 pBluescript SK 质粒的 EcoRV 位点中,利用 CMV 外壳蛋白基因的 Hind III 和 Xho I 切点,获得了从 5' 端到 Hind III 和 Xho I,以及从 Hind III 和 Xho I 到 3' 端的 4 个亚克隆。用 Sequenase 试剂盒或 T7 Sequenase 试剂盒以 T3 和 T7 为引物对 CMV-SD 的克隆以及 4 个亚克隆进行双链 DNA 序列测定,结果见图 1。

本文于 1992 年 4 月 25 日收到。

感谢蔡文启,田颖川同志提供的 CMV 病毒。

CMV-SD

ACTTGAGTTCGAGCC 15

	ATG	GAC	AAA	TCT	GAA	TCA	ACC	AGT	GCT	GGT	CGT	AAC	CGT	CGA	CGT	60
	M	D	K	S	E	S	T	S	A	G	R	N	R	R	R	15
CMV-BD	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CMV-JV	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*
	CGT	CGG	CGT	CGT	GGT	TCC	CGC	TCC	GCT	TCC	TCC	TCC	GCG	GAT	GCC	105
	R	P	R	R	G	S	R	S	A	S	S	S	A	D	A	30
	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	P	*	*	*	*	*	*
	TTT	AGA	GTC	CTG	TCG	CAG	CAA	CTT	TCG	CGA	CTT	AAT	AAG	ACG	AAC	150
	F	R	V	L	S	Q	Q	L	S	R	L	N	K	T	N	45
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	*
	TTG	GCA	GCT	GGT	CGT	CCT	ACT	ATT	AAC	CAC	CCA	ACC	TTT	GTG	GGG	195
	L	A	A	G	R	P	T	I	N	H	P	T	F	V	G	60
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	AGT	GAA	CGT	TGT	AAA	CCT	GGG	TAC	ACG	TTC	TCA	TCT	ATT	ACC	CTG	240
	S	E	R	C	K	P	G	Y	T	F	S	S	I	T	L	75
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*
	AAG	CCA	CCG	AAA	ATA	GAC	CGC	GGG	TCT	GAT	TAT	GGT	AAA	AGG	TTG	285
	K	P	P	K	I	D	R	G	S	D	Y	G	K	R	L	90
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	L	Y	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*
	TTA	CTA	CCT	GAT	TCA	GTC	ACG	GAA	TTC	GAT	AAG	AAG	CTT	GTT	TCG	330
	L	L	P	D	S	V	T	E	F	D	K	K	L	V	S	105
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	Y	*	*	*	*	*	*	*
	CGC	ATT	CAA	ATT	CGA	GTT	AAT	CCT	TTG	CCG	AAA	TTT	GAT	TCT	ACC	375
	R	I	Q	I	R	V	N	P	L	P	K	F	D	S	T	120
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	GTG	TGG	GTG	ACG	GTC	CGT	AAA	GTT	CCT	GCC	TCC	TCG	GAC	CTG	TCC	420
	V	W	V	T	V	R	K	V	P	G	S	S	D	L	S	135
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*
	GTT	GCC	GCC	ATC	TCT	GCT	ATG	TTT	GCG	GAC	GGA	GCC	TCA	CCG	GTA	465
	V	A	A	I	S	A	M	F	A	D	G	A	S	P	V	150
	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CTG	GTT	TAT	CAG	TAT	GCT	GCA	TCC	GGA	GTC	CAA	GCC	AAC	AAT	AAA	510
	L	V	Y	Q	Y	A	A	S	G	V	Q	A	N	N	K	165
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	TTG	TTG	TAT	GAT	CTT	TCG	GCG	ATG	CGC	GCT	GAT	ATT	GGC	GAC	ATG	555
	L	L	Y	D	L	S	A	M	R	A	D	I	G	D	M	180
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	CGA	AAG	TAC	GCC	GTT	CTC	GTG	TAT	TCA	AAA	GAC	GAT	GCT	CTC	GAG	600
	R	K	Y	A	V	L	V	Y	S	K	D	D	A	L	E	195
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	ACG	GAT	GAG	TTA	GTA	CTT	CAT	GTC	GAC	ATT	GAG	CAC	CAA	CGC	ATT	645
	T	D	E	L	V	L	H	V	D	I	E	H	Q	R	I	210
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*

```

CCC ACG TCT GGG GTG CTC CCA GTT TGA ATCCGTGTTTCCCAGAACCCCTCC 695
P   T   S   G   V   L   P   V                               218
*   *   *   *   *   *   *   *
*   S   *   R   *   *   *   *

CTCCAGTTTTTCTGAGGCGGGAGCTGAGTTGGCAGTTTTGCTACAACTGTCTGAAGTCA 754

CTAAACGCTTTTGTGGTGAACGGG TTGTCCATCGAGCTCACGGCTA                799

```

图 1 CMV-SD CP 基因的核苷酸序列及 CMV-SD、CMV-BD、CMV-JV CP 的氨基酸序列的比较
 第一行 CMV-SD 为 pBluescript SK 质粒中插入的 CMV-SD 外壳蛋白基因的核苷酸序列和推出的氨基酸序列;
 第二行为 CMV-BD 相应的氨基酸序列; 第三行为 CMV-JV 相应的氨基酸序列

(二)CMV -SD 与其他 CMV 株系间外壳蛋白基因的同源性比较

根据血清学性质、宿主范围、肽谱和核酸杂交分析, Piazzolla 等^[4]把 CMV 分为 S 和 WT 两个亚组, CMV-Q 株系属于 S 亚组, 随着对 CMV 外壳蛋白基因研究的深入, 发现 CMV S 和 WT 亚组外壳蛋白基因的同源性差别也很大, 亚组内外壳蛋白基因同源性在 90% 以上, 亚组间的同源性在 70—80%^[5,6]。

从图 1 可见, CMV -SD 的外壳蛋白基因序列与另两个在国内分离到的 CMV 株系 (CMV-BD^[7], CMV-JV^[8]) 的外壳蛋白基因核苷酸序列的同源性分别为 95.9% 和 93.2%; 氨基酸序列的同源性分别为 97.7% 和 94.5%。它与 CMV -D 和 CMV -Q 外壳蛋白核苷酸序列的同源性分别为 93.9% 和 76.0%。因此基于病毒外壳蛋白核苷酸序列的分析可以认为, CMV -SD 是与 CMV -D 同属于 CMV WT 亚组的一株 CMV 病毒。

参 考 文 献

- [1] Powell, A. P. et al.: *Science*, **232**: 738—743, 1986.
- [2] Lot, H. et al.: *Ann. Phytopathol.*, **4**: 25—32, 1972.
- [3] Cuozzo, M. et al.: *Bio/Technology*, **8**: 549—557, 1988.
- [4] Piazzolla, P. et al.: *J. Gen. Virol.*, **45**: 126—132, 1979.
- [5] Quemada, H. et al.: *J. Gen. Virol.*, **70**:1065—1073, 1989.
- [6] Rizzo, T. M. et al.: *J. Gen. Virol.*, **69**: 1777—1787, 1988.
- [7] 胡天华等: 科学通报, **34**: 1652—1655, 1989。
- [8] 叶寅等: 科学通报, **36**:1340—1344, 1991。

CLONING OF COAT PROTEIN GENE OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS (SD STRAIN) BY PCR

Guo Dongchuan Qiao Liya Fang Rongxiang Mang Keqiang
 (Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Coat protein (CP) gene of CMV -SD was synthesized by polymerase chain reaction and then cloned in pBluescript SK. The nucleotide sequence of the cloned CP gene was determined by dideoxy termination method. Comparison of the nucleotide sequence of CMV-SD CP gene in pair with that of CP genes from CMV D, Q, BD and JV strains revealed the homologies of 93.9%, 76.0%, 95.9% and 93.2%, respectively. While at the amino acid sequence level, the homologies were 97.2%, 79.4%, 97.7% and 94.5%, respectively. Therefore, we concluded that CMV-SD belonged to the CMV WT subgroup.

Key words Cucumber Mosaic Virus (CMV); Coat protein (CP)