

150-155



番茄花叶病毒外壳蛋白基因及 3'端非编码区的 克隆、序列分析及其表达

薛朝阳 周雪平^V 刘勇 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所, 杭州 310029)

5432.41

摘要 根据已报道的番茄花叶病毒 L 株系 (ToMV-L) 序列人工合成引物, 经 RT-PCR 扩增并克隆了我国番茄花叶病毒分离物 (ToMV-S1) 的外壳蛋白 CP 基因及 3'端非编码区, 序列测定结果表明, 所得 cDNA 共长 682 个核苷酸, 其中 CP 基因含 480 个核苷酸, 编码 158 个氨基酸, 3'端非编码区含 202 个核苷酸, 其核苷酸序列与 ToMV-L 株系具有 99.5% 的同源率。将该基因片段克隆到 pGEMEX-1 载体中, 转入 *E. coli* 后诱导表达, 经 Western blot 检测证明, 该基因已在大肠杆菌中正确表达。这是我国首次报道 ToMV CP 基因序列。

关键词 番茄花叶病毒, 外壳蛋白基因, 3'端非编码区, 序列分析, 表达

番茄花叶病毒 (ToMV) 属烟草花叶病毒属, 病毒粒子杆状, 大小为 15~18 × 300 nm^[1]。ToMV 寄主范围很广, 并广泛分布于世界各地。它除了在番茄、辣椒等蔬菜作物上引起严重危害外, 也能危害多种花卉和林木^[2-4]。ToMV 主要通过汁液机械传播及种子带毒传播。

周雪平等从杭州番茄上分离到了 ToMV, 并对其生物学、血清学特性进行了研究^[5], 同时比较了与 TMV 的关系^[6]。为了进一步在基因水平上弄清我国 ToMV 的结构特点, 作者对该病毒分离物的外壳蛋白 (CP) 基因及 3'端非编码区进行了研究, 现将结果报道如下。

材料与amp;方法

1 材料

ToMV-S1 分离物由周雪平等分离鉴定^[5], 质粒 pBluescript SK (以下简称 pBSK), pBI121 和 *E. coli* 菌株 DH5α 由本研究所提供, 质粒 pGEMEX-1 和 *E. coli* 菌株 JM109/JM109(DE3) 由 Promega 公司提供。

所用 PCR 试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、cDNA 合成试剂盒、原核表达和 Western 免疫检测系统及测序试剂盒均来自 Promega 公司, [α -³²P]dATP 来自北京亚辉公司, 其它常用化学药品为国产分析纯试剂。

2 方法

2.1 病毒 RNA 提取

提纯病毒用苯酚/氯仿 (1:1) 抽提三次, 乙醇沉淀病毒 RNA, 真空抽干后用无 RNA 酶的灭菌水溶解。

2.2 cDNA 合成及 PCR 扩增

根据 ToMV-L 株系^[7]的 CP 基因及 3'端非编码区基因序列合成特异性引物。

收稿日期: 1997-07-14, 修回日期: 1997-11-24

* 浙江省青年科技人才培养专项资金资助项目

本文中序列在 EMBL 中的登录号为 Z98201

5'端引物 A 为:5' CCGGATCCATGTCTTAUCTCAATCAC-3'

BamHI

3'端引物 B 为:5' GTAAGCTTGTAACTGGGCCUCAAACUGGGGGT-3'

HindIII HincII

以 1 μ g ToMV-S1 RNA 为模板,加入 0.5 μ g 引物 B,70 $^{\circ}$ C 处理 5 min 后按 Promega 公司的 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA 第一链,取第一链产物 1 μ L 为模板,通过 Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 进行 PCR 扩增,扩增条件 94 $^{\circ}$ C,60 $^{\circ}$ C 和 72 $^{\circ}$ C 各 1 min,共 30 循环。最后一轮循环后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

2.3 PCR 产物的克隆、筛选

PCR 产物加入 1 u T4 DNA 聚合酶,12 $^{\circ}$ C 处理 15 min 后 75 $^{\circ}$ C 温浴 10 min,然后用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收 PCR 产物,产物与经 Hinc II 酶切的 pBSK 质粒载体平末端连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。在含氨苄青霉素的麦康凯平板上挑取白色菌落,抽提质粒 DNA,并用 BamHI、HindIII 消化,筛选具有 0.7 kb 左右插入片段的重组子。

2.4 cDNA 的序列测定

以纯化的重组质粒 DNA 为模板,按常规双脱氧链终止法进行序列测定反应。

2.5 CP 基因的原核表达

重组质粒用 BamHI 和 HindIII 双酶切后回收 cDNA 片段,并与经 BamHI 和 HindIII 双酶切的 pGEMEX-1 载体连接,以保证病毒 CP 基因以正确的阅读框构建在 pGEMEX-1 上,使其置于 pGEMEX-1 的 T7 启动子控制下,连接产物转化 JM109(DE3),经 IPTG 诱导培养,从菌体中提取水溶性蛋白,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移蛋白至硝酸纤维素膜上,然后按 Western blot 检测试剂盒操作说明进行印迹反应。其中 ToMV 抗血清由本研究室制备。

结 果

1 目的基因的 cDNA 合成,PCR 扩增及重组子筛选

提取的病毒 RNA 经反转录合成 cDNA 第一链后进行 PCR 扩增,取 10 μ L 产物经 2% 琼脂糖电泳,可见均一的 0.7 kb 片段,与预期的大小一致(图 1)。扩增产物经 T4 DNA 聚合酶补平处理后,平末端连接于 pBSK 的 Hinc II 位点上,并转化大肠杆菌 DH5 α ,用麦康凯培养基筛选转化菌,从平板上挑取 30 个白色菌落,用煮沸法提取重组质粒,琼脂糖电泳后取 5 个含插入片段的重组子,分别用 BamHI 和 HindIII 酶切后,发现 pB8 重组子能被 BamHI 切下约 0.7 kb 的片段,而 pB10 则被 HindIII 切下约 0.7 kb 的片段。由于设计的引物中 5'端含 BamHI 位点,3'端含 HindIII 位点,酶切结果说明 pB8 和 pB10 均含外源 DNA,但插入方向相反(图 2)。

2 CP 基因及 3'端非编码区的结构特点

对 pB8 和 pB10 分别用 T7 DNA 聚合酶进行序列测定,结果表明 ToMV-S1 CP 基因和 3'端非编码区全长 682 个碱基,其中 CP 基因含有 480 个碱基,编码区起始于 1~3 位的 AUG,终止于 478~480 位的 UAA,编码 158 个氨基酸,其分子量的理论值约为 17 735 Da,3'端非编码区长 202 个碱基(图 3)。单链 RNA 中各种核苷酸出现频率:A.28.3%,G.20.5%,U.23.0%,C.28.2%。

ToMV-S1 CP 基因及 3'端非编码区的核苷酸序列与日本报道的 ToMV-L 株系^[1]相比,发现有 3 个碱基差异,同源率为 99.5%(图 3),其 CP 基因所编码的氨基酸与 ToMV-L 仅有 1 个差异,氨基酸同源率为 99.4%(图 4);ToMV-S1 与 TMV-U1 株系^[9]CP 基因核苷酸同源率为

76.2%, 编码氨基酸同源率为 82.9%, 3'端非编码区核苷酸同源率为 81.2%。

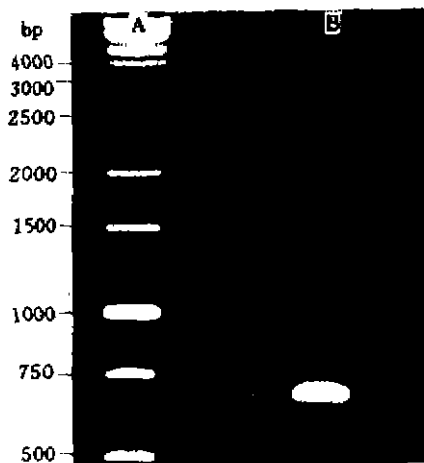


图1 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物

Fig. 1 The electrophoresis of PCR product in agarose gel
A DNA marker B PCR product

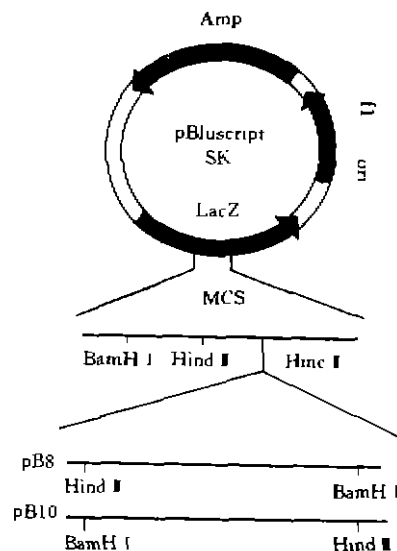


图2 重组质粒 pB8 和 pB10 的物理图谱

Fig. 2 Map of the recombinant plasmids pB8 and pB10

3 CP 基因的原核表达

pB8 经 BamHI 和 HindIII 酶切后回收片段, 以正确的阅读框架重新组装到 pGEMEX-1 的 T7 基因 10 中, 构建了能在 *E. coli* 中表达的原核表达载体 pG9。预计的表达产物为一融合蛋白, 包括 T7 基因 10 的 288 个氨基酸和完整的 ToMV-S1 外壳蛋白的 158 个氨基酸, 其大小约为 49.2 kDa。pG9 重组质粒转入高效表达菌株 *E. coli* JM109 (DE3) 中, 经 IPTG 诱导培养, 提取菌体水溶性蛋白, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和考马斯亮兰染色, 发现 49 kDa 附近有一条特异性蛋白带, 而不含外源基因的 pGEMEX-1 转化菌诱导后无特异带产生 (图 5a)。Western blot 检测也证实在 49 kDa 处有一特异的阳性反应带 (图 5b), 证明 ToMV CP 基因已在 *E. coli* 中正确表达, 并且具有免疫学活性, 为以后该基因在真核细胞中的正确表达提供了保障。

讨 论

番茄花叶病毒 (ToMV) 基因组为单股正链 RNA, 长约 6.4 kb^[1]。由于它与 TMV 有较密切的血清学关系, 因而长期以来, 一直把它当作是 TMV 的一个株系, 但由于两者在寄主范围、血清学关系和衣壳蛋白的氨基酸组成及序列等方面均有差异, 自 1971 年以后, ToMV 已作为单一病毒从 TMV 中分出^[1, 10, 11]。

周雪平等从杭州番茄上分离鉴定了 ToMV, 并对于 ToMV 的生物学、血清学特性及其与 TMV 的差异进行了系统的比较研究^[5, 6]。我们在此基础上, 克隆了该 ToMV 分离物的 CP 基因及 3'端非编码区的 cDNA, 测定并分析其序列后发现与日本报道的 ToMV-L 序列有非常高

的同源性,而与 TMV-U1 株系相关序列则差异较大,这与我们所进行的生物学、血清学试验结果相符,这是国内首次报道 ToMV 的 3'端 RNA 序列。

```

ToMV-S1 AUGUCUACUCAUACACUUCUCCAUCCGCAUUGUGUUUUUGUCAUCUGUAUGGGCUGACCCUUA 66
ToMV-L -----
TMV-U1 -----AGU-----A-----U--G--C-----C-----A-CG-----C-----A-----

ToMV-S1 GAAUUGUAAACGUUUGUACAAAUUCGUUAGGUAACCAGUUUCAACACAGCAAGCAAGAACUACU 132
ToMV-L -----
TMV-U1 --G--AA-U--UU-A-----U--G--C-----A--U-----A-----UC-----GUC

ToMV-S1 GUUCAACAGCAGUUCAGCGAGGUGUGAAACCUUCCUCAGAGCACCGUCAGAUUUCUGGCGAU 198
ToMV-L -----
TMV-U1 -----AGA--A-----U-----CA--A--AGUA--U--U--G--C-----A--AG--

ToMV-S1 GUUUUAAGGUGUACAGGUACA AUGCAGUUUAGAUCCUCUAUUACUGCGUUGCGGGGUCUUUC 264
ToMV-L -----
TMV-U1 -AC-U-----G--A-----C--G--G--C--A--AC--U-A--UG-A--C

ToMV-S1 GAUACUAGGAUAGAAUAAUCCGAAUAGAAAACCCAGCAGUCCGACAAACAGCUGAAACGUUAGAU 330
ToMV-L -----
TMV-U1 --C-----A-----A-----U-----U--GC--AC--C--G--U--C-----

ToMV-S1 GCUACCCGCGAGGUGAGACGACCGUACGGUUGCAUUCGGUCUGCUAUAUUAAUUUAGUUAUGAA 396
ToMV-L -----
TMV-U1 -----U--U--A-----A-----G--C--AA--AGC--G-----A--AGUA--

ToMV-S1 CUAGUAAGAGGUACUGGACUGUACAUAUCAGAAUACUUUUAGAAUAGUUCUGGGUUGGUCUGGACC 462
ToMV-L -----
TMV-U1 U-GA-C-----A--C--UCU--U--G--GCU--C--G--CUCU-----U-----U-----

ToMV-S1 UCUGCACCGCAUCUUA**AUGCAUAGGUGC***CGAAAUUAAGUUUGUGUUUCUAAAACACA 528
ToMV-L -----
TMV-U1 ---GU-----A---G--GGUA--UCA--A---AUAAU-----CG--A-----CCG--U-----

ToMV-S1 CGUGGUACGUACGAUAACGUACAGUUUUUCCCUCCACUUAUUUGAAGGGUAGUGUCUUGGAGC 594
ToMV-L -----
TMV-U1 -----G-----C--U-----U-----U-----

ToMV-S1 GCGCGGAGUAAACAUAUAUGGUUCAUAUAUGUCCGUAGGCACGUAAAAAAGCGAGGGGAUUCGAU 660
ToMV-L -----
TMV-U1 -----GUC--UG-----CA--C-----U-----G-----

ToMV-S1 UCCCCCGAAACCCCGGUUGGGGCCCA 687
ToMV-L -----
TMV-U1 C-----UU-----A-----

```

图3 ToMV-S1与ToMV-L、TMV-U1的CP基因及3'端非编码区序列比较

Fig 3 Comparison of the nucleotide sequences of ToMV-S1, ToMV-L and TMV-U1 CP genes and 3' non-coding regions * ; means base absence

侵染番茄的大多为 ToMV,很少会是 TMV^[1,12,13]。虽然 ToMV 在番茄上引起严重危害,但目前尚无有效措施加以防治。利用转病毒 CP 抗病基因工程获得抗性品种,不失为一条有效的防治途径。据报道^[1,5,12],虽然 ToMV 与 TMV 的 CP 基因具有很高的序列同源性,但 ToMV 与 TMV 之间无交叉保护作用,选用 ToMV CP 基因导入番茄进行 ToMV 危害的防治比用 TMV CP 基因效果更好。我们构建了 ToMV CP 基因的原核表达载体,同时还构建了植物表达载体,为通过转基因植物研究植物病毒致病机理及番茄抗 ToMV 基因工程打下了基础。

```

ToMV-S1  SYSITSPSQFVFLSSVWADPIELLNVCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFSEVWKFFPQSTV  60
ToMV-L  -----
TMV-U1   ---T-----A-----I-L---A-----V--R-----S--V--

ToMV-S1  RPPGDVYKVYRYNAVLDPLITALLGSFDTRNRRIIEVENQQSPPTAETLDATRRVDDATVA  120
ToMV-L  -----A-----
TMV-U1   ---DSDF-----V---A-----AN-----

ToMV-S1  IRSAINNLVNELVRGTGLYNQNTFESMSGLVWTSAPAS  158
ToMV-L  -----
TMV-U1   -----IV--I---S--RSS---S-----G--T
    
```

图4 ToMV-SI与ToMV-L、TMV-U1 CP基因氨基酸序列比较

Fig 4 Comparison of amino acid sequences of CP genes of ToMV-SI, ToMV-L and TMV-U1

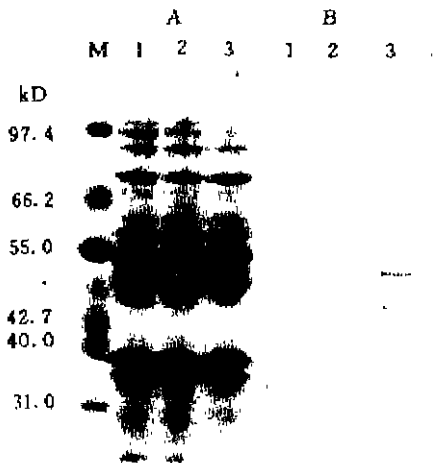


图5 ToMV-SI CP基因在E. coli中的表达及Western检测

a. 表达蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳 b. Western免疫检测

Fig 5 The expression in E. coli and Western blot analysis of

ToMV-SI CP gene

A. SDS-PAGE analysis B. Western immunoblot

1. JM109 bacterial transformed by pG9

2. JM109 bacterial transformed by pGEMEX-1 and induced by IPTG

3. JM109 bacterial transformed by pG9 and induced by IPTG

M. protein marker

参 考 文 献

- Hollng M, Hurlinga H. Tomato mosaic virus. C. M. I/A. A. B. Description of plant viruses, 1995, No. 156
- Reddick B B. Isolation and partial characterization of a tobacco virus from flowering dogwood in Tennessee. *Plant Disease*, 1989, 73: 174~176
- Jacobi V, Castello J D. Isolation of tomato mosaic virus from waters draining forest stands in New York State. *Phytopathology*, 1991, 81: 1112~1117
- Jacobi V, Castello J D, Flachmann M. Isolation of tomato mosaic virus from Red Spruce. *Plant Disease*, 1992, 76: 518~522
- 周雪平, 钱秀红, 刘勇等. 侵染番茄的番茄花叶病原研究. *中国病毒学*, 1996, 11(3): 268~276
- 周雪平, 薛朝阳, 刘勇等. 番茄花叶病毒番茄分离物与烟草花叶病毒蚕豆分离物生物学、血清学比较及特异性检测. *植物病理学报*, 1997, 27(1): 53~58
- Nobuhiko Tadokamatsu, Takeshi Ohno, Tesuo Meshi *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of the 30K and the coat protein cistron of TMV (tomato strain) genome. *Nucleic Acids Research*, 1983, 11: 3767~3778
- Golet P, Lomonosoff G P, Butler P J G *et al.* Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

- 1982, 79:5818-5822
9. Harrison B D, Finch I T, Gibbs A J *et al*. Sixteen groups of plant viruses. *Virology*, 1971, 45:356-363
 10. Oshita N, Harrison B D. Tobacco mosaic virus. *C. M. I/A. A. R. Description of plant viruses*, 1975, No. 151
 11. Brown A A. The plant viruses. Vol 2. Tomato mosaic virus. New York: Plenum Press, 1986. 181-204
 12. Patricia B, Bernie Sammons, Wojciech Kaniewski *et al*. Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus or tomato mosaic virus coat protein genes. *Phytopathology*, 1992, 82:683-690

Cloning, Sequence Analysis and Expression in *E. coli* of Coat Protein Gene and 3' Noncoding Region of Tomato Mosaic Virus

Xue Chaoyang Zhou Xueping Liu Yong Li Dehao

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

Abstract The coat protein (CP) gene and 3' noncoding region of tomato mosaic virus SI isolate (ToMV-SI) were amplified by RT-PCR with specific primers designed on the basis of reported ToMV L strain (ToMV-L) sequence. The cDNA fragment was cloned and sequenced, its sequence showed that the CP gene has 480 nucleotides in length, which encodes 158 amino acids and 3' noncoding region contains 202 nucleotides. The nucleotide sequence of ToMV-SI showed 99.5% homology when compared with that of ToMV-L and 76.2% homology when compared with that of TMV-U1. The CP gene was inserted into pGEMEX-1. Western immunoblot showed that this gene was expressed in *E. coli* with the proper reading frame. The gene was also inserted into plant expression vector pBI121.

Key words Tomato mosaic virus, Coat protein gene, 3' noncoding region, Sequence analysis, Expression