

建兰花叶病毒运动蛋白基因克隆及序列分析

刘志昕, 吴豪, 潘俊松, 郑学勤

(中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 海南海口 571101)

Cloning and Sequencing of Movement
Protein Gene of Cymbidium Mosaic Virus

LIU Zhi-xin, WU Hao, PAN Jun-song, ZHENG Xue-qin

(National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Haikou 571101, China)

Abstract: The viral RNA was extracted from purified cymbidium mosaic virus (CyMV) isolated from *Dendrobium* orchid cultivated in Hainan island. The gene of the movement protein (MP) was amplified by means of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and cloned into pGEM-T easy vector. Sequence analysis showed that the gene fragment contained 3 open reading frames (ORFs) which may be encoding 14 kD, 12 kD and 10 kD peptides. The nucleotide sequence of the cloned gene fragment shared 97.8% homology with the MP genes of CyMV isolated from orchids cultivated in Hawaii and Singapore.

Key words: Cymbidium mosaic virus; Movement protein; Gene cloning; Sequence analysis

摘要: 从建兰花叶病毒(CyMV)石斛兰分离物中提取病毒 RNA, 用反转录—聚合酶链式反应(RT-PCR)方法获得约 500 bp 的运动蛋白基因片断, 插入 pGEM-T 载体克隆并测序。序列分析表明, 该基因片断由 474 个核苷酸组成, 和 CyMV 美国夏威夷分离物、新加坡分离物相应基因核苷酸序列分别具有 97.8% 同源性; 根据核酸序列推导该片断含有 3 个部分重叠的开放阅读框架(ORF), 分别编码 14 kD、12 kD 和 10 kD 的多肽。

关键词: 建兰花叶病毒; 运动蛋白; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S688.1; Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)01-0051-04

建兰花叶病毒(Cymbidium Mosaic Virus, CyMV)属于马铃薯 X 病毒属(*Potexvirus*)成员, 是危害各种观赏兰花的主要病毒之一^[1], 除此之外 CyMV 还侵染危害热带香料作物香草兰^[2]。目前美国、新加坡、韩国等分别从本国栽培兰花中分离出 CyMV, 并进行分子生物学研究^[3], 我们亦从海南栽培的石斛兰中获得 CyMV 分离物^[4], 本文报导对其运动蛋白(Movement Protein, MP)基因克隆及序列分析结果。

1 材料和方法

1.1 病毒来源

毒源采自海南儋州兰花圃石斛兰病株, 经生物学分离鉴定, 提纯病毒保存在 -20℃ 备用^[4]。

1.2 质粒及试剂

克隆载体 pGEM-T easy、AMV 反转录酶购自 Promega 公司; Taq 酶、EcoR I、T₄DNA 连接酶购自华美生物工程公司; 测序试剂盒为 Perkin Elmer (PE)公司产品。

1.3 引物设计合成

扩增 CyMV 基因引物参考文献[3]报导序列设计, 其序列为: 上游引物: 5'-CATCGACCATG-GCAGGCTTAGTTCCA-3'; 下游引物: 5'-CTCT-CACCATGGCTCCCATGATTATTTC AAGTTATT-

收稿日期: 1999-11-11, 修回日期: 2000-11-16

作者简介: 刘志昕(1963-), 男, 吉林延吉籍, 副研究员, 博士, 从事植物病毒学及分子生物学研究。

3'。引物在 ABI 381A DNA 自动合成仪上合成。

1.4 病毒 RNA 提取与 RT-PCR 扩增

提纯病毒用酚:酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)各抽提一次,乙醇沉淀获得病毒 RNA。以病毒 RNA 做模板,用 MP 基因下游引物进行反转录,体系为 4 μ L 5' cDNA 合成缓冲液、2 μ L dNTPs(10 mM each)、0.5 μ L RNase 抑制剂、3 μ L 下游引物(0.5 μ g)、2 μ L 模板 RNA(1 μ g)、2 μ L AMV 反转录酶,加 ddH₂O 补足至总体积 20 μ L。42℃ 反应 1 h,95℃ 处理 5 min 灭活酶。

PCR 反应体系为:5 μ L 10' PCR 缓冲液、5 μ L dNTPs(2.5 mM each)、上、下游引物各 2 μ L、5 μ L 反转录产物、1 μ L Taq 酶(3U),加 ddH₂O 补足至总体积 50 μ L。反应在 PE 公司生产的 2400 PCR 热循环仪上进行,94℃ 变性 3 min 后,进入 94℃ 30 s、50℃ 30 s、72℃ 40 sec 30 次循环,最后 72℃ 保温 5 min。

1.5 MP 基因克隆及序列分析^[5]

PCR 扩增产物经 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收,与 pGEM-T easy 载体连接,转化 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞,涂 X-Gal/TPTG 平板培养,挑取白色菌落扩大繁殖,小量提取质粒电泳检测筛选重组子,并通过酶切电泳确定获得重组克隆。

重组克隆扩大繁殖,大量提取质粒,在 DNA 自动测序仪上测序。用微机 DNASIS 软件对所测 DNA 序列进行分析比较。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增结果

以 CyMV 病毒 RNA 做模板,用 MP 基因下游引物反转录合成 cDNA 第一链,紧接着用其做模板,用 MP 基因两端引物进行 PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶

电泳检测,获得长度约 500 bp 的 DNA 片段(图 1)。

2.2 MP 基因克隆

PCR 扩增产物回收后,经与 pGEM-T easy 载体连接,转化细菌感受态细胞,经选择培养和筛选鉴定获得重组克隆,提取质粒用 *Eco*R I 酶切可切下与 PCR 产物长度相当的 DNA 片断,证明所获得重组子的正确性(图 1)。

2.3 MP 基因序列分析

对克隆在 pGEM-T easy 载体上的 CyMV MP 基因测序,结果显示插入序列为 474 bp,与设计相符(图 2)。本文报导的 CyMV 中国分离物与文献报导的美国夏威夷分离物和新加坡分离物 1^[3,6]相比较,其核苷酸序列同源性均为 97.8%,而后两个分离物同源性为 98.5%,说明分离物之间略有差异(表 1)。

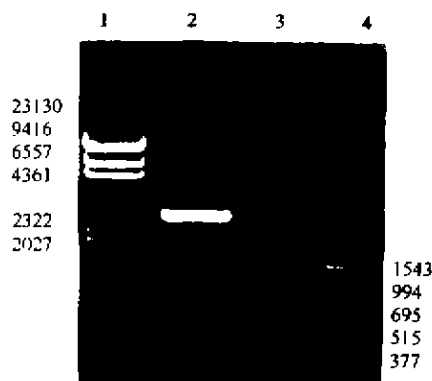


图 1 PCR 扩增产物及重组质粒酶切电泳图谱

1: λ DNA/*Hind* III; 2: *Eco*R I 酶切重组质粒; 3: PCR 扩增产物; 4: PCR marker

Fig. 1 PCR product and restriction map of the recombinant plasmid

1: λ DNA/*Hind* III marker; 2: recombinant plasmid digested by *Eco*R I; 3: PCR product; 4: PCR marker

表 1 不同 CyMV 分离物 MP 基因序列同源率

Table 1 MP nucleotide and amino acid sequences identities of several CyMV isolates

	海南分离物 Hainan isolate	夏威夷分离物 Hawaiian isolate	新加坡分离物 Singapore isolate
海南分离物 Hainan isolate		97.7 ^a 97.3 ^b 96.7 ^c	96.1 ^a 95.5 ^b 100 ^c
夏威夷分离物 Hawaiian isolate	97.8		96.8 ^a 96.4 ^b 96.7 ^c
新加坡分离物 Singapore isolate	97.8	98.5	

注:斜线上为 MP 基因编码多肽氨基酸序列, a, b, c 分别为 14 kD、12 kD、10 kD 多肽同源率;斜线下方为 MP 基因片断核苷酸序列同源率。

Note: Data above the diagonal refer to MP amino acid sequences homologies, a, b, c refer to homology of 14 kD, 12 kD and 10 kD peptide amino acid sequences respectively; data below the diagonal refer to the nucleotide sequence homologies.

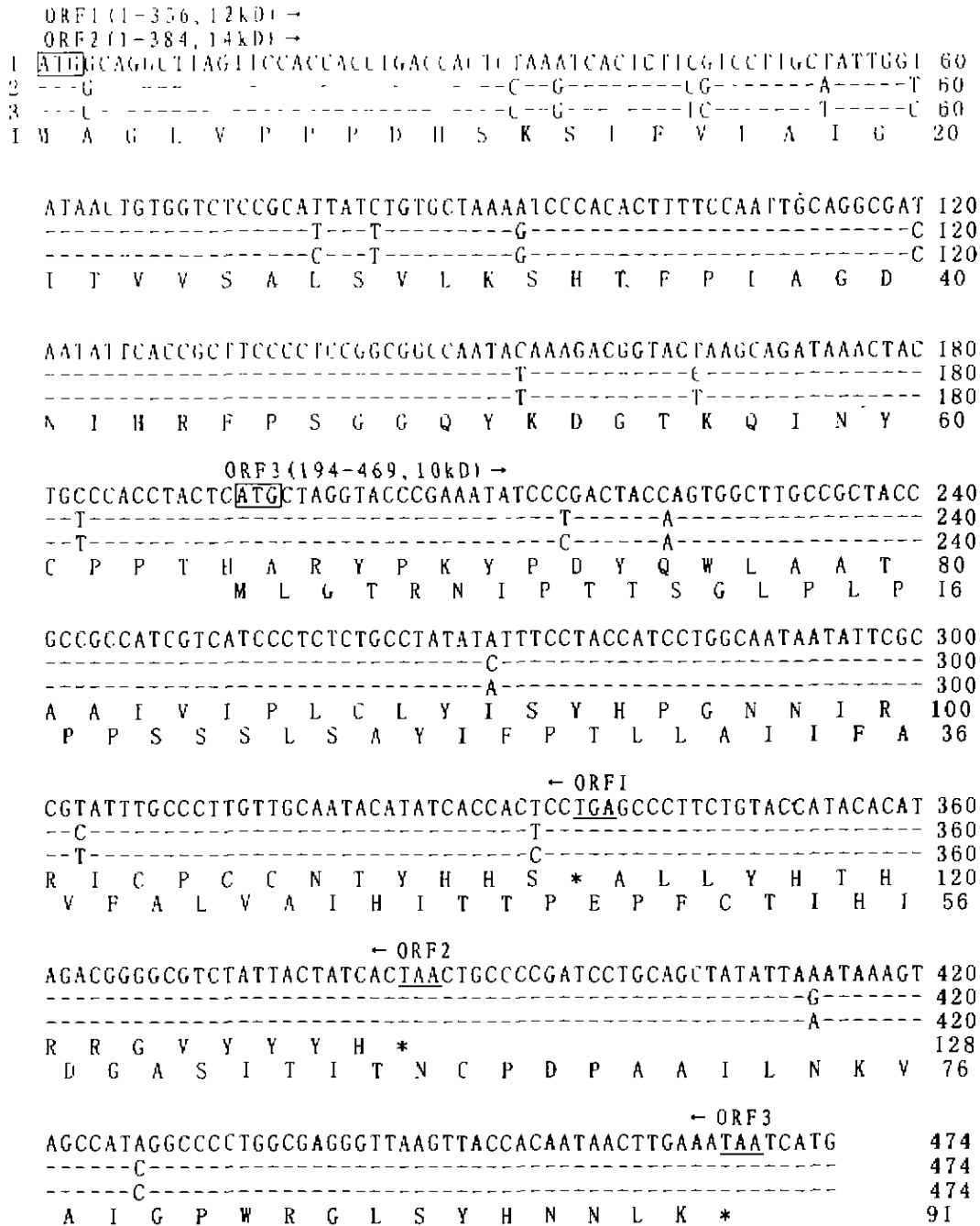


图 2 CyMV 不同分离物 MP 基因核苷酸序列比较及根据海南分离物推导的氨基酸序列

1,2,3 分别为海南、夏威夷和新加坡分离物核苷酸序列;4:根据海南分离物推导的氨基酸序列;-:核苷酸和 1 相同;* :终止密码子

Fig. 2 Nucleotide sequences comparison of the CP genes of several CyMV isolates and amino acid sequence deduced from Hainan isolate
1, 2, 3 refer the nucleotide sequence of Hainan isolate, Hawaiian isolate and Singapore isolate respectively; 4, The deduced amino acid sequence are given only for Hainan isolate, -: nucleotides identical to 1; * represented stop codons.

根据核苷酸序列推导编码蛋白质序列,分析其阅读框架(ORF),发现该 DNA 序列包含 3 个 ORF。其中第 1 至 336 核苷酸编码 12 kD 多肽,其后是 TGA 终止密码子,在第 384 个核苷酸后是另一终止密码 TAA,因此第一个 ORF 可能通读编码出 14 kD

的另一多肽,这种情况在 TMV 等许多病毒基因表达中存在^[7]。第 3 个 ORF 由第 194~469 核苷酸构成,与前两个 ORF 部分重叠,该 ORF 编码 10 kD 多肽。

3 讨论

3.1 MP 基因产物的作用与组成

病毒是细胞内分子形式的寄生物,植物病毒从一个细胞到另一细胞的移动是病毒侵染繁殖的基本过程,这个过程是由病毒特定基因编码的蛋白质(MP)参与完成的。现已发现有3种不同的MP构成类型,其中CyMV所在的Potexviruses属病毒是以三基因连锁方式表达并构成MP,即由3个部分重叠的病毒基因产物联合发挥运动蛋白作用^[7]。本文报导的序列所编码的产物有可能行使MP功能。

3.2 MP 基因的利用

MP参与病毒在细胞间的运动,其机制较复杂,涉及到MP与细胞间连丝的作用,MP与病毒核酸的相互作用等^[7]。通过转基因研究已证明TMV 30 kD MP对病毒胞间运动具有作用^[8],表达缺失型MP转基因烟草具有抗TMV及其它不相关病毒的作用,其机制可能是干扰了野生病毒MP的正常功能。本文克隆的CyMV MP基因,为进一步进行基因改造和转基因研究打下了基础。

参考文献

- [1] Zettler F W, Ko N J, Wisler G C, *et al.* Viruses of orchids and their control [J]. *Plant Disease*, 1990, 74(9):621-626
- [2] Wisler G C, Zettler F W, Wu L, *et al.* Virus infections of vanilla and other orchids in French Polynesia [J]. *Plant Disease*, 1987, 71(12):1125-1129.
- [3] Barry K, Hu J S, Kuehnle A R, *et al.* Sequence analysis and detection using immunocapture-PCR of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in Hawaiian orchids [J]. *J. Phytopathology*, 1996, 144:179-186.
- [4] 潘俊松,刘志斯,郑学勤. 建兰花叶病毒的分离、鉴定及检测研究 [J]. *热带作物学报*, 1997, 18(1):63-70.
- [5] 萨姆布鲁克, J, 弗里奇, E F, 曼尼阿蒂斯, T 著. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 北京:科学出版社, 1992:34-69.
- [6] Neo, K K, Wong, S K, Wu, M. Nucleotide sequences of the two ORFs upstream to the coat protein gene of cymbidium mosaic virus [J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, 18:1027-1029.
- [7] 朱玉贤,李毅. 现代分子生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 1997:410-414.
- [8] Deom, C M, Oliver, M J, Beachy, R N. The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement [J]. *Science*, 1987, 237:389-394.