

CMV 甜瓜分离物外壳蛋白基因的克隆及植物表达载体的构建*

马新艳^{1,2}, 古勤生^{1**}, 刘丽锋¹, 李 宁¹, 杨民和³, 彭 斌¹, 李 莉¹

(1. 中国农业科学院郑州果树研究所生物技术中心, 河南郑州 450009; 2. 江西农业大学农学院, 江西南昌 330045; 3. 福建师范大学
学生物工程学院, 福建福州 350007)

Cloning and Construction of Plant Expression of the Coat Protein Gene of a Melon Isolate of Cucumber Mosaic Virus

MA Xin-yan^{1,2}, GU Qin-sheng^{1**}, LIU Li-feng¹, LI Ning¹, YANG Min-he³, PENG Bin¹, LI Li¹
(1. Zhengzhou Institute of Pomology, CAAS, Zhengzhou 450009, China; 2. College of Agriculture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 3. College of Biological Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: The coat protein gene of Cucumber mosaic virus (CMV) from melon isolate (CH99/90) was amplified by RT-PCR from the total RNA of infected zucchini leaves and cloned into pUCmT vector. The gene consisted of 657 nucleotides encoding 218 putative amino acids. Nucleotide sequence alignments showed that the CP gene shared 92.2% ~ 93.9% homology with that of CMV subgroup I strains, whereas only 76.8% ~ 77.8% homology with that of CMV subgroup II strains. The nucleotide sequence shared 91.8% ~ 93.4% homology with CMV isolate previously reported from China except for XB isolate. This melon isolate was classified into subgroup I based on these data. The gene was constructed into plant expression vector by using intermediate vector pJIT163 (recombinant plasmid designated as pBCP). The recombinant plasmid was transferred into competent cells of *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Transformation of the gene into watermelon is undertaking.

Key words: CMV; Chinese isolate; Coat protein gene; Sequence analysis; Plant expression vector

摘要: 从河南省临颖县采集的病毒感染的甜瓜样本经 ELISA 检测和接种分离获得黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 分离物。将该分离物接种西葫芦, 从发病的叶片中提取总 RNA, 并以此为模板经 RT-PCR 扩增获得 CMV 的外壳蛋白 (cp) 基因, 将其克隆到 pUCmT 质粒上。经序列测定和分析, 结果表明该 cp 基因由 657 个核苷酸组成, 编码 218 个氨基酸。其核苷酸序列与黄瓜花叶病毒亚组 I 的分离物有较高的同源性, 达 92.2% ~ 93.9%, 与亚组 II 的同源性仅为 76.8% ~ 77.8%, 与我国报道的 CMV 分离物的 cp 基因序列比较, 除香蕉株系 XB 外核苷酸序列的同源性达 91.8% ~ 93.4%。根据这些分析, 该 CMV 分离物属于亚组 I。将 cp 基因通过中间载体 pJIT163 定向克隆到植物表达载体 pBINPLUS 中 (重组双元载体质粒命名为 pBCP), 并经冻融法导入农杆菌中, 经 PCR 及酶切鉴定, 证实质粒已被导入。利用该植物表达载体对西瓜的遗传转化工作正在进行中。

关键词: CMV; 中国分离物; 外壳蛋白基因; 序列分析; 植物表达载体

中图分类号: S432.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)03-0307-04

黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 为世界性分布病毒, 能侵染包括单子叶和双子叶植物在内的分属于 85 科 365 属中的 755 种植物, 是寄主植物最多、分布最广、最具经济重要性的植物病毒

之一^[1]。该病毒分类上属于雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*) 黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*) 的典型种^[2]。病毒粒体球形, 基因组包括三种 RNA (RNA 1-3) 和亚基因组 RNA (RNA 4), 有些分离物还含有

收稿日期: 2004-10-29, 修回日期: 2004-11-29

* 基金项目: 国家“863”资助 (2004AA241171); 河南省科技攻关项目 (0324050015)

作者简介: 马新艳 (1979 -), 女, 河南省籍, 硕士研究生, 研究方向为抗病育种。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 0371-6723734, E-mail: guqsh@mail.china.com

第 5 种 RNA,即卫星 RNA^[1]。

CMV 在我国发生十分普遍,我国学者先后从 38 科的 120 多种植物上分离到 CMV,这些 CMV 分离物在十字花科、茄科、豆科及葫芦科等蔬菜作物、烟草、香蕉和西番莲上造成严重危害^[3,4]。从 98 年、99 年北方地区葫芦科作物病毒病的调查结果来看,CMV 在葫芦科作物病毒病样本中的检测率分别为 28.3%和 10.8%,仅次于 WMV 和 ZYMV^[5],是危害北方地区葫芦科作物的主要病毒之一。本文以 99 年从甜瓜上分离获得的 CMV 毒原为材料,通过 RT-PCR 方法扩增 *cp* 基因,并克隆、序列测定,通过序列比较和酶切位点分析该分离物的亚组分型。在此基础上进行了该病毒外壳蛋白基因植物表达载体的构建,并将其转化到农杆菌中。

1 材料和方法

1.1 实验材料

甜瓜上分离到的 CMV(CH99/90)毒源、pBIN-PLUS 载体、转化受体菌 *E. coli* DH5 和农杆菌 LBA4404 由本中心保存;pJIT163 载体由河南农科院植保所提供;限制性内切酶、克隆载体 pUCm-T 购自上海生工公司,Taq 酶购自华美生物工程公司,T4 DNA 连接酶及 DNA 分子量标准购自宝信生物科技有限公司,Trizol-reagent 试剂购自 Invitrogen 公司和溴化乙锭购自 Sigma 公司。

1.2 目的基因的获得、克隆及测序

按照 Trizol-reagent 试剂盒提供的方法从 CMV(CH99/90)接种发病的小西葫芦叶片中提取总 RNA^[6]。根据已报道的 CMV *cp* 基因序列,合成两个引物,5 端引物 5'-CCGGATCCA TGGACAA ATC-3',3 端的引物为 5'-TGTCGACTCA GACTG GTGCACC-3',在 5 端引物和 3 端引物中分别引入了 *Bam*HI、*Sal*II 的酶切位点,引物由上海生工合成。以病毒 RNA 为模板,用引物进行反转录,42 反应 1h。以反转录产物为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1.0%琼脂凝胶电泳,由柱式胶回收试剂盒(北京鼎国生物技术发展中心)回收。纯化的 PCR 产物和克隆载体 pUCm-T 连接,转化 *E. coli* DH5。参考 Sambrook 等的碱裂解法^[7]提取质粒 DNA(命名为 pUCP-90),经 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切鉴定。宝信生物科技有限公司采用双向测定方法测定。

1.3 序列比较

采用 DNAMAN version 4.0(Lynnon BioSoft),用于比较分析核苷酸和推导的氨基酸序列的同源

性。

1.4 中间表达载体的获得

用 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切 pUCP-90 质粒和 pBIT163 质粒,琼脂凝胶电泳回收目的片段和 pBIT163 的大片段。将目的片段克隆到中间表达载体 pJIT163 的 2 ×35S 启动子下游,得到重组质粒 pJCP。利用单菌落直接快速鉴定方法选择具有插入片段的质粒进行鉴定。

1.5 植物表达载体的构建

*Xho*I 和 *Kpn*I 双酶切 pBINPLUS 和 pJCP,琼脂凝胶电泳回收目的片段,采用直接回收法从溶液中回收 pBINPLUS 质粒双酶切后的大片段。直接回收方法:双酶切产物中分别加入 10 倍体积的 ddH₂O 和苯酚:氯仿:异戊醇(25 24 1),12 000r/min 4 离心 2min。取上清加入 2 倍体积的无水乙醇和总体积 0.1 倍体积的 5mol/L 乙酸钠,置于 -20 冰箱中 30min 后,12 000r/min 4 离心 5min。弃上清留沉淀,沉淀中加入 70%乙醇清洗,室温干燥。沉淀用 20μL 含 25μg/mL RNA 酶 A(不含 DNA 酶)的 ddH₂O 溶解,置于 -20 冰箱中备用。用回收产物进行连接反应并转化 DH5,涂布于含卡那霉素的 LB 平板上。碱裂解法提取质粒 DNA,经 PCR 和双酶切验证重组子 pBCP。

1.6 重组双元载体直接转化农杆菌

用冻融法^[8]将 pBCP 直接转化农杆菌 LBA4404 的感受态细胞,转化后的菌液涂布于含利福平和卡那霉素平板,28 温箱培养 2~3d。挑取单菌落接种于 2mL 含利福平 50μg/mL 和卡那霉素 100μg/mL 的 YEB 培养基中培养过夜后,取 1mL 菌液置于 1.5mL 离心管,离心收集菌体,加 50μL 无菌水煮沸 10min,取上清作模板进行 PCR 扩增,扩增产物用 1.0%琼脂凝胶电泳验证。

2 结果

2.1 CMV(CH99/90) *cp* 基因的扩增及克隆

以 CMV(CH99/90)接种发病的西葫芦叶片总 RNA 为模板进行反转录,然后进行 PCR 扩增,产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检查,显示出一条分子量约为 700bp 的条带。PCR 产物克隆至载体 pUCm-T(简称 T-vector),经 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切鉴定,筛选出含有插入片段的重组子(pUCP-90)。

2.2 核苷酸序列及氨基酸序列同源性分析

pUCP-90 重组克隆经双向测序法测定,获得克隆片段的全长序列,其长度为 836bp,进一步采用 DNAMAN version 4.0 软件分析,结果表明 CMV

该分离物的 *cp* 基因全长 657 个碱基,最大开放读框(ORF)为 654 个核苷酸,编码 218 个氨基酸,计算机分析分子量为 24 KD。CMV(CH99/90)的 *cp* 基因 GenBank 登录号为 A Y611027。

中国分离物 CH99/90 与国内外已报道的 CMV 两个亚组株系或分离物 *cp* 基因的核苷酸和氨基酸序列的同源性进行比较。与亚组 I 国外分离物 Fny ((GenBank 登录号 D10538)、M(D10539)、Legume(D16405)、Y(D12499)、Ix(U20219)、NT9(D28780)、C(D00462)的核苷酸序列同源性分别为 93.8%、92.2%、93.2%、93.5%、93.5%、93.9%、93.3%、93.3%;其推导的氨基酸序列同源性分别为:96.8%、93.1%、95.9%、95.0%、95.4%、97.2%、95.4%、95.4%。与亚组 I 国内分离物 GB^[9]、RB^[10]、JV^[11]、O^[11]、SD^[12]、ZJZC(AJ575589)、Pf(AF368182)、P1(AJ006988)的核苷酸序列同源性分别为 92.4%、93%、91.8%、92.2%、93.4%、92.7%、93%、93%;其推导的氨基酸序列同源性分别为 95.9%、96.3%、94.0%、95.4%、96.3%、96.8%、96.8%、95.4%。与亚组 II 国外分离物 Ls(AF127976)、Q(M21464)、Trk7(L15336)的核苷酸序列同源性分别为 77.5%、77.8%、76.8%;其推导的氨基酸序列同源性分别为 CH99/9082.5%、83.4%、81.1%;与亚组 II 国内分离物 XB^[9]的核苷酸序列和氨基酸序列同源性分别为 77.8%、83.4%。因此本研究的分离物 *cp* 基因与亚组 I 有较高的同源性,核苷酸序列的同源性为 92.2%~93.9%,编码的氨基酸序列的同源性为 93.1%~97.2%;与亚组 II 株系比较,核苷酸序列的同源性为 76.8%~77.8%,编码的氨基酸序列的同源性为 81.1%~83.4%。与我国已报道的其它分离物的 *cp* 基因相比,除与徐平东报道的 XB 核苷酸同源性较低(77.8%)外,其余均具有较高的同源性达 91.8%~93.4%。

2.3 pUCP-90 质粒及双酶切验证

CMV 的 *cp* 基因和克隆载体 pUCmr-T 连接后获得分子量大小约为 3400bp 的 pUCP-90 质粒,用 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切该质粒得到两个片段,大小约为 850bp (包含目的基因及 pUCmr-T 的少部分)和 2550bp (图 1)。

2.4 目的基因与中间载体的连接结果

连接转化得到的重组子 pJCP 提取质粒经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证,得到分子量大小约为 4500bp 条带,用 *XhoI* 和 *KpnI* 双酶切 pJCP 质粒,得到大小分别约为 1700bp (含目的基因及 2 × 35S 启动子)

和 2700bp 两条带(图 2)。

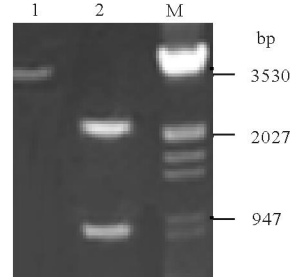


图 1 pUCP-90 质粒及酶切鉴定

Fig. 1 plasmid pUCP-90 and digestion of plasmid 1, pUCP-90 plasmid; 2, pUCP-90 digested by *EcoRI*/*HindIII*.

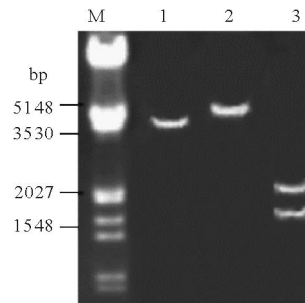


图 2 重组质粒 pJCP 及酶切鉴定

Fig. 2 Recombinant plasmid pJCP and digestion of plasmid 1, plasmid pJIT163; 2, Recombinant plasmid pJCP; 3, plasmid pJCP digested by *XhoI*/*KpnI*.

2.5 植物表达载体的构建结果

XhoI 和 *KpnI* 双酶切 pBINPLUS 和 pJCP,回收并连接 pBINPLUS 酶切后的大片段和 pJCP 酶切后的目的片段,连接转化得到重组双元载体 pBCP,提取质粒经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证,得到分子量大小约为 14000bp 条带,酶切鉴定重组双元载体 pBCP(图 3)。

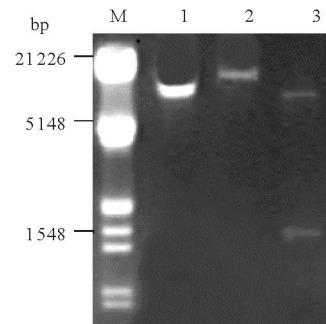


图 3 重组双元质粒 pBCP 及酶切鉴定

Fig. 3 Recombinant plasmid pBCP and digestion of plasmid 1, plasmid pBINPLUS; 2, Recombinant plasmid pBCP; 3, plasmid pBCP digested by *XhoI*/*KpnI*.

2.6 重组双元载体转化农杆菌及 PCR 验证

pBCP 质粒转化 LBA4404 后进行 PCR 扩增,然后 1% 琼脂糖凝胶电泳验证,得到大小约为 700bp 条带(图 4),表明重组子转化农杆菌成功。

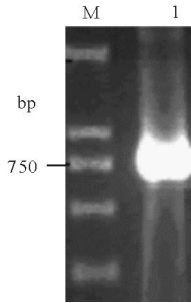


图4 含 pBCP 质粒的农杆菌转化子 PCR 鉴定

Fig.4 PCR identification of At harbored pBCP
1, PCR result of At harbored pBCP; M, Marker.

3 讨论

我们首次对侵染北方地区葫芦科作物的 CMV 甜瓜分离物的 *cp* 基因进行了核苷酸序列分析,分析结果表明,该分离物 *cp* 基因与 CMV 亚组 I 株系的 *cp* 基因有较高的同源性。与我国已报道的其它分离物的 *cp* 基因相比,除 XB 外其余均具有较高的同源性,说明该分离物属于亚组 I。田兆丰等用酶切的方法鉴定了我国部分地区侵染甜椒的 CMV 亚组分型,即 CMV 以 *MspI* 酶切,产生 2 个片段的为亚组 I,产生 4 个片段的为亚组 II^[13]。我们也借鉴该方法,用 *MspI* 对 CMV 甜瓜分离物进行酶切,结果产生 2 个片段,说明此结果和核苷酸序列分析的结果是一致的。由 DNAMAN Version 4.0 序列分析的结果,可以看出 CH99-90 *cp* 基因的第 48 位、82 位、88 位和 91 位分别出现了 T、K、R 和 V 四个特有的氨基酸,代替了其它株系所共有的 A、R、K 和 L。通过 *cp* 基因氨基酸序列的比较发现,我国 CMV 亚组 I 株系或分离物在进化的过程中具有变异连续性,因为许多株系间有共同变异的氨基酸位点,而这些位点另外几个株系中又十分保守。如 CH99-90、GB、JV、O、SD、Pf、P1 株系 CP 蛋白第 65 位由 R K、GB、SD、Pf、P1 株系 CP 蛋白第 24 位有 P S。

冯兰香等从中国的番茄中发现有 CMV 亚组 I 和亚组 II 的株系^[14]。CMV 亚组 I 在中国广泛存在,周雪平等认为可能是我国的生态环境有利于 CMV 的生存,而亚组 II 可能通过种子从国外引入^[15],我国的甜瓜是否受亚组 II 的 CMV 侵染有待进一步证明。在进行植物表达载体构建时,我们借助含启动子的表达载体 pJIT163 作为中间载体,完成植物高效表达载体的构建。重组子除了经提取质

粒酶切验证外,我们还采用了单菌落直接快速鉴定法,这样可以省去提取质粒的步骤。酶切载体后的大片段直接从溶液中回收,不仅方便而且纯度高。重组二元载体转化农杆菌采用冻融法,无论是置于液氮中还是冰浴,PCR 验证的结果都是一致的,都成功的转入农杆菌中。利用该植物表达载体对西瓜的遗传转化工作目前正在进行中。

参考文献

- [1] Kaper J M, Waterworth H E. Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis [M]. New York: Elsevier/North Hotland Biomedical Press. 1981, 257-332.
- [2] Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Classification and Nomenclature of Virus: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[J]. Arch Virol, 1995:341-347.
- [3] 徐平东. 中国黄瓜花叶病毒的亚组及其性质研究[D]. 福州:福建农业大学,1997.
- [4] 周雪平,刘 勇,薛朝阳,等. 十字花科蔬菜上黄瓜花叶病毒分离物的比较研究[J]. 微生物学报,1997,37(3):203-211.
- [5] 古勤生, Piero Roggero, Marina Ciuffo, et al. 我国北方地区葫芦科作物病毒病的调查与病原鉴定[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(4):88-89.
- [6] 古勤生. 葫芦科主要作物病毒的鉴定和小西葫芦黄花叶病毒的变异性[D]. 北京:中国农业大学,2001.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed, Cold Spring Harbor: Cold Spring Habor Laboratory,1989.
- [8] Hofgen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for Agrobacterium transformation[J]. Nucl Acids Res. 1988,16(20):9877.
- [9] 徐平东,周仲驹,林奇英,等. 黄瓜花叶病毒亚组 I 和 II 分离物外壳蛋白基因的序列分析与比较[J]. 病毒学报,1999,15(2):164-171.
- [10] 刘 勇,周雪平,薛朝阳,等. 黄瓜花叶病毒赤豆分离物外壳蛋白基因序列分析及原核表达[J]. 农业生物技术学报,1999,7(1):51-55.
- [11] 叶 寅,徐雷新,田 波. 一个黄瓜花叶病毒强株系的外壳蛋白基因的合成、克隆、序列分析和表达[J]. 1991,17:1340-1344.
- [12] 郭东川,乔利亚,方荣祥,等. 利用 PCR 技术克隆黄瓜花叶病毒的外壳蛋白基因[J]. 微生物学报,1993,33(3):233-235.
- [13] 田兆丰,裘季燕,刘伟成,等. 我国部分省市甜椒黄瓜花叶病毒的亚组鉴定[J]. 植物病理学报,2004,34(2):190-192.
- [14] 冯兰香,杨翠荣. 中国番茄黄瓜花叶病毒血清组的鉴定[J]. 园艺学报,2000,27(6):418-422.
- [15] 周雪平,刘 勇,薛朝阳,等. 黄瓜花叶病毒两株系的生物学、血清学和外壳蛋白基因序列的比较[J]. 自然科学进展,1999,9(12)(增刊):1254-1261.