

黄瓜花叶病毒 cDNA 载体在烟草细胞中表达外源基因

雷万里 方荣祥* 张国华

(中国科学院微生物研究所植物生物技术开放实验室 北京 100080)

摘 要 为了探讨利用黄瓜花叶病毒(CMV)构建表达载体的可行性,分离了山东株(SD)CMV RNA 3 的全长 cDNA。测定其全序列后,采用定点突变的方法在衣壳蛋白(CP)基因起始密码子处改造出一个 *Nsi* I 位点,可将外源基因引入 *Nsi* I 位点和 CP 基因终止密码子上游附近的 *Xho* I 或 *Sal* I 位点而置换掉 CP 基因。分别用绿色荧光蛋白(GFP)基因、 β -葡糖醛酸酶(GUS)基因以及小鼠二氢叶酸还原酶(DHFR)基因 3 种报告基因置换 CP 基因。将 Fny 株 CMV RNA 1、RNA 2 和 SD-CMV 嵌合 RNA 3 的 cDNA 分别插入 pCass 载体的 35S 启动子和终止子之间,将构建的置换型载体直接以质粒的方式转染烟草原生质体,表达了 3 种报告基因。

关键词 黄瓜花叶病毒,置换型载体,烟草原生质体

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0040-06

由于可以快速高效表达外源蛋白,以及研究植物与病原体的相互作用,植物病毒载体应用得越来越广泛^[1]。黄瓜花叶病毒(CMV)属于雀麦花叶病毒(BMV)科黄瓜花叶病毒属,可侵染 85 科 1000 多种植物^[2,3],适于构建植物病毒载体。CMV 基因组由三个正链 RNA 分子组成,按分子量由大到小的顺序命名为 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3^[3]。RNA 1 和 RNA 2 编码 CMV RNA 依赖性 RNA 聚合酶的重要组分 1a 和 2a 蛋白^[4],不需要 RNA 3 的存在即可独立复制^[5],预示着 RNA 3 上编码移动蛋白(3a)和衣壳蛋白(CP)的基因都可被外源基因置换。鉴于置换 CP 基因比置换 3a 基因更能高效地表达外源基因^[6],因此用 CMV 构建载体时,宜用外源基因置换 CMV 的 CP 基因。我们用 3 种报告基因分别置换山东株(SD)CMV RNA 3 的 CP 基因,将嵌合 SD RNA 3 和 Fny 株的 RNA 1 与 RNA 2 的 cDNA 分别克隆在 35S 启动子和终止子之间构建成置换型载体,以 DNA 的方式直接转染烟草原生质体,表达了三种报告基因,表明 CMV 可用于构建表达载体。

1 材料与方法

1.1 质粒

pGEM-T 载体为 Promega 公司产品;pCass 2 质粒^[7]由丁守伟博士惠赠;含 GFP 基因的 pBIN35S-

mgfpER 质粒^[8]由 Haseloff 博士惠赠;含 Fny 株 CMV RNA 1 和 RNA 2 全长 cDNA 的质粒 Fny109 与 Fny209 由 Rizzo 等构建^[9],中国农业大学于嘉林教授提供;含 β -糖醛酸酶(GUS)基因和小鼠二氢叶酸还原酶(DHFR)基因的质粒由本实验室保存。

1.2 细胞系及毒株

烟草 BY-2 悬浮细胞系由本实验室保存;山东株黄瓜花叶病毒(SD-CMV)分离自山东大田感病烟草,本实验室保存。

1.3 引物

构建 CMV 载体所用引物的名称及其序列见表 1。

1.4 SD-CMV RNA 3 全长 cDNA 克隆及序列测定

SD-CMV 病毒粒子提纯及 RNA 提取方法参见文献^[10]。比较 GenBank 中 CMV RNA 3 序列同源性,根据 5'端和 3'端的保守序列分别合成引物 R5 和 R3,按文献^[11]进行 RNA 直接测序和用 Gibco-BRL 公司试剂盒进行 3' RACE 测定 SD RNA 3 的 5'和 3'末端序列。根据测得的末端序列合成引物 P5 与 P3,通过 RT-PCR 合成 SD RNA 3 全长 cDNA,克隆到 pGEM-T 载体中,命名为 pTF3。

利用 DNASIS 对 GenBank 中 CMV 毒株 RNA 3 部分及全序列酶切位点进行分析,采用多种限制酶进行酶解,构建出 SD-CMV RNA 3 全长 cDNA 的物理图谱,并据此进行亚克隆(图 1);利用 *Sal* I 酶

表 1 构建 CMV 载体所用引物

Primer	Sequence
R5	5'-ACCTTGGAAAGCCAT-3'
R3	5'-TTGTCCATCCAGCTTACGG-3'
P5	5'- <u>CTACGTA</u> ATCTTACCACTGT-3' (1)
P3	5'- <u>CGGATC</u> TGGTCTCCTATA-3' (2)
M	5'-GTCGAGTTATGCATAAATCTGAATC-3' (3)
S	5'-GGCCGGGATCATGCGACG-3'
GU	5'- <u>AATGCAT</u> GAAGACTAATCTTTTCTC-3' (3)
GD	5'- <u>ACTCGAGA</u> AAGCTCATCATGTTTGTAT-3' (4)
GusU	5'- <u>AATGCAT</u> GAAGACTAATCTTTTCTC-3' (3)
GusD	5'- <u>ACTCGAGA</u> AAGCTCATCATGTTTGTAT-3' (4)
DU	5'- <u>AATGCAT</u> GTTTCGACCATTGAAC-3' (3)
DD	5'-A <u>CTCGAGT</u> TATACTTGATGCCTTTTTC-3' (4)
FU	5'-GTTTATTTACAAGAGCGTAC-3'
F1D	5'-AGAGTCTAGACAATCGAG-3' (5)
F2D	5'-TCCTCGGGAGT <u>GTTCG</u> ACACC-3' (6)

Restriction endonuclease recognition sequences added in the primers are underlined (1) *Sna*BI (2) *Bam*HI (3) *Nsi*I (4) *Xho*I (5) *Xba*I ; (6) *Sal*I.

切 pTF3 ,回收 3 个片段 ,带有 pGEM-T 载体骨架的片段自连即为一个亚克隆 ;另外两个片段克隆进 pBluescript SK 载体(Stratagene)的 *Sal* I 位点 ,用 *Sal* I 和 *Sca* I 酶切含较大片段的 pBluescript SK 载体 ,回收含 RNA 3 cDNA 序列的两个小片段 ,分别克隆进 *Sal* I 和 *Eco*RV 酶切的 pBluescript SK。采用双脱氧链末端终止法测定各亚克隆的序列 ,在此基础上合成 8 个引物(SD1 至 SD8 ,见图 1) ,挑取两

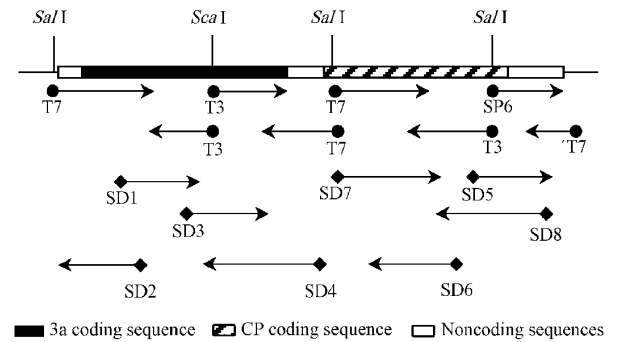


图 1 SD-CMV RNA 3 全长 cDNA 测序策略
Fig.1 Sequencing strategy of the full-length cDNA from SD-CMV RNA 3
Sequencing primers ● Universal primers T7 ,T3 or SP6.
◆ Synthetic specific primers.

SD1 5'-GCGCTGATAACGC-3' SD2 5'-AACGAGGGGCCGG-3'
SD3 5'-TGCGCGCAGTGAGTC-3' SD4 5'-TACGCATCGAAAGC-3'
SD5 5'-GAGTAAATVCCCTTTGC-3' SD6 5'-ATGCGCGAAACAAGCTTC-3'
SD7 5'-TGGATCTTAAGAGTC-3' SD8 5'-GAGGCACCTTTTG-3'

个全长 cDNA 克隆进行序列测定 ,以确保获得完整的 SD RNA 3 序列。实验中所用限制酶均为 New England Bio-Labs 公司产品 ,Sequenase Version 2.0 测序试剂盒为 USB 公司产品 , α -³⁵S-dATP 为 DuPont 公司产品。

1.5 SD-CMV RNA 3 置换盒的构建及引入报告基因

以 pTF3 为模板 ,按照 Clontech 定点突变试剂盒说明书用突变引物 M 和选择引物 S 进行定点突变 ,在 SD RNA 3 cDNA 的 CP 基因起始密码子处造出一个 *Nsi* I 位点。由于 pGEM-T 载体含有一个 *Nsi* I 位点 ,将改造后的 cDNA 转移到预先消除了 *Xho* I 位点的 pBluescript SK 中 ,构建的置换盒命名为 pSD3(图 2)。

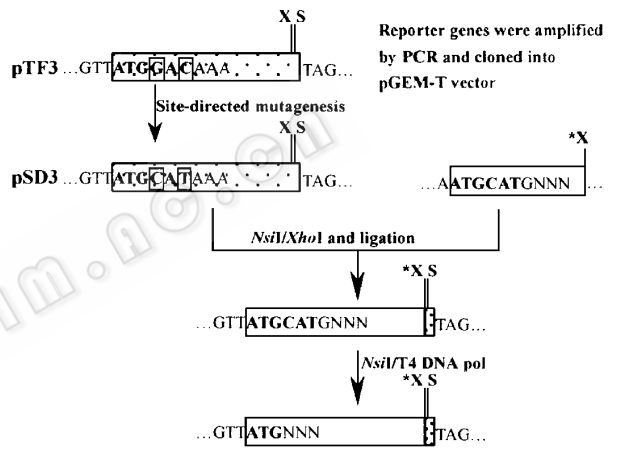


图 2 由 SD-CMV RNA 3 cDNA 构建的置换盒(pSD3)和引入报告基因示意图

Fig.2 Replacement cassette constructed with CMV RNA 3 cDNA
Stippled box :the CMV CP coding sequence ;empty box :the reporter gene coding sequence ;N :*Nsi* I ;X :*Xho* I ;S :*Sal* I ;
NNN :the second codon of the reporter gene ;the asterisk (*) represents stop codon of the reporter gene

以各母源质粒为模板 ,用引物 GU/GD、GusU/GusD 和 DU/DD 对 GFP、GUS 和 DHFR 基因进行 PCR 扩增 ,扩增产物先分别克隆到 pGEM-T 载体中 ,用 *Nsi* I 和 *Xho* I 切出 ,连接到相应酶切处理的 pSD3 中置换掉 CP 基因 ,并通过 *Nsi* I 酶切和 T4 DNA 聚合酶处理成平端后自连 ,恢复各报告基因的起始密码子(图 2)。

1.6 CMV 载体构建

为了方便克隆 ,将 pBluescript SK 中的多克隆位点用 *Kpn* I 和 *Sac* I 切出 ,连接到 pCass2 中 ,命名为 pCassKS(图 3) 。以 Fny109 为模板 ,用引物 FU 和 F1D 进行 PCR ,分离 Fny RNA 1 5' cDNA (388bp) 产物经 T4 DNA 聚合酶处理成平端后用

Xba I 酶切, 连接到 pCassKS 的 *Stu* I 和 *Xba* I 位点之间。Fny109 经 *Pst* I 酶切、T4 DNA 聚合酶削平后, 用 *Xba* I 酶切; 同时将 pBluescript SK 用 *Not* I 酶切、T4 DNA 聚合酶补平和 *Xba* I 酶切。

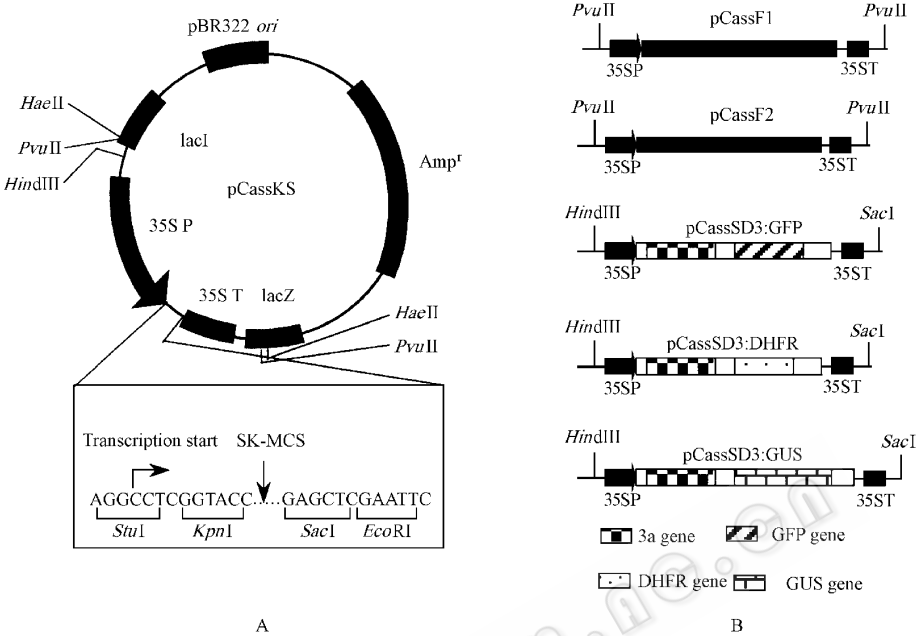


图 3 克隆载体 pCassKS 的结构示意图及构建的 CMV 载体体系

Fig.3 Structure of the cloning vector pCassKS and full-length cDNA clones of Fny-CMV RNAs 1 and 2 and the chimeric SD-CMV RNA 3 with CP gene replaced by reporter genes
A. Molecular structure of cloning vector pCassKS. SK-MCS :multiple cloning sites from pBluescript SK.
B. CMV-based expression cassettes released by relevant endonuclease digestion before inoculation.
35SP 35S promoter with the duplicated enhancer ;35ST 35 S terminator.

以 Fny209 为模板, 用引物 FU 和 F2D 进行 PCR, 分离 Fny RNA 2 5'端 cDNA(160bp), 产物经 T4 DNA 聚合酶处理成平端后用 *Sal* I 酶切, 连接到 pCassKS 的 *Stu* I 和 *Sal* I 位点之间。用 *Sal* I 和 *Pst* I 酶切 Fny209 将 Fny RNA 2 3' cDNA 克隆到用 *Sal* I 与 *Pst* I 酶切处理的 pBluescript SK 中, 再用 *Sal* I 和 *Sac* I 切出连接到 pCassKS 中 Fny RNA 2 的 5' cDNA 之后。含 Fny RNA 2 全长 cDNA 的克隆命名为 pCassF2。

通过 *Sac* I 酶切和 T4 DNA 聚合酶处理 pCassKS 以缺失 *Sac* I 位点, 随后用 *Bam*HI 和 *Pvu* II 切出含有 35S 终止子的序列, 连接到 pUC19 的 *Bam*HI 和 *Sma* I 位点之间。用 *Sna*BI 和 *Bam*HI 从 pSD3 中切出 3 种嵌合 cDNA, 分别克隆到 pCassKS 的 *Stu* I 和 *Bam*HI 位点中, 再用 *Hind*III 和 *Bam*HI 切出, 将含有 35S 启动子的嵌合 cDNA 克隆到 pUC19 中的 35S 终止子之前, 分别命名为 pCassSD3 : GFP、pCassSD3 : GUS 和 pCassSD3 :

把 Fny RNA 1 3' cDNA 克隆到处理好的 pBluescript SK 中, 再用 *Xba* I 和 *Sac* I 切出连接到 pCassKS 中 Fny RNA 1 的 5' cDNA 之后。含 Fny RNA 1 全长 cDNA 的克隆命名为 pCassF1。

DHFR。
1.7 置换型载体的测试

烟草悬浮细胞 BY-2 的培养及原生质体的制备参见文献 [12]; 根据 Damm 等的方法 [13] 进行 PEG 介导转染; 按照 Saunders 等的方法 [14] 进行电击转染。转染时将含有嵌合 RNA 3 cDNA 的质粒用 *Hind* III 和 *Sac* I 进行酶切, 与 *Pvu* II 酶切的 pCassF2 和 pCassF1 质粒按 10 μ g、12 μ g 和 14 μ g 的比例混匀, 接种体系见图 3。以 10 μ g 酶切处理的含相应嵌合 RNA 3 cDNA 的质粒做为阴性对照转染原生质体。接种时加入 10 μ g 鲑精 DNA 或不加鲑精 DNA, 以分析其对转染效率的影响。用 GUS 报告基因验证 CMV 载体时, 以 pBI221 作为阳性对照, 以含荧光蛋白酶(LUC)基因的质粒作为内标。分析小鼠的 DHFR 基因时, 向培养基中加入 2.5 μ mol/L 氨甲基蝶呤筛选转染了 CMV cDNA 载体的原生质体。

培养 24h 后, 取 10 μ L 转染的原生质体于荧光

显微镜 (Olympus ,BX-60)下检测 GFP 并拍照记录。GUS 活性测定参见 Jefferson 的方法^[15]。根据细胞在选择培养基中的存活情况结合 RT-PCR 分析是否存在含 DHFR 基因的嵌合 SD-CMV RNA 3 来判断是否表达了 DHFR。在阴性对照细胞全部死亡后 ,提取转染了 CMV 载体的所有存活原生质体中的 RNA(方法参见文献 [16])经无 RNase 的 DNase (Promega)处理后 ,用引物 DD 进行逆转录 ,并与 SD7 一起进行 PCR 扩增。

2 结 果

2.1 SD-CMV RNA 3 全长 cDNA 序列分析及置换盒的构建

根据测序结果得知 ,SD-CMV RNA 3 全长 2219 个核苷酸 ,3a 基因从 122 位到 958 位核苷酸 ,编码 279 个氨基酸 ;CP 基因从 1262 位到 1915 位核苷酸 ,编码 218 个氨基酸。测得的序列已登录到 DDBJ ,获得登记号 AB008777。同源性比较结果显示 SD-CMV RNA 3 与 Fny-CMV 和 Q-CMV RNA 3 同源性分别为 93% 与 74% ,根据目前公认的亚组分类标准^[17] ,SD 属于第 I 亚组。Roossinck 等^[18]根据 GenBank 中所有 CMV RNA 3 部分以及全序列构建出进化树 ,发现可将 CMV 划分为 IA、IB 和 II 三个亚组 ,SD 被划分到 IB 亚组。

在获得序列的基础上 ,设计引物进行定点突变。突变引物 M 将 CP 基因第二个密码子的碱基 G 和 C 分别突变为 C 和 T(图 2 黑体加框显示) ,从而改造出一个 *Nsi* I 位点(黑体黑示) 。外源基因可以插入 *Nsi* I 和靠近 CP 基因终止密码子的 *Xho* I 或 *Sal* I 位点(分别位于 CP 基因终止密码子上游 78 与 52 个核苷酸) ,从而将 SD-CMV RNA 3 cDNA 构建成一个置换盒。

2.2 置换型载体的构建

将 3 种报告基因分别插入 pSD3 的 *Nsi* I 和 *Xho* I 位点置换掉 CP 基因 ,再用 *Nsi* I 酶切和 T4 DNA 聚合酶处理 ,恢复了各自的起始密码子(图 2) 。将嵌合 SD RNA 3 及 Fny RNA 1 和 RNA 2 的 cDNA 5'端以平端的方式连接到 pCassKS 载体的 *Stu* I 位点之后 ,可以确保转录出的病毒 RNA 5'端没有附加碱基。

2.3 置换型载体的测试

由植物病毒构建的置换型载体一般用体外转录的病毒基因组 RNA 转染原生质体 ,验证构建载体的可行性。我们直接利用克隆在 35S 启动子和终止

子之间的病毒 cDNA ,通过转染原生质体 ,也表达了 3 种报告基因。Ding 等^[19]发现直接利用 Q-CMV cDNA 时 ,用限制酶酶切释放含 35S 启动子和终止子的病毒 cDNA ,可以增加侵染能力 ,因此接种前将 CMV 载体的 3 个组分都用相应的限制酶进行了酶切处理(图 3)。

携带 GFP 基因的 CMV 载体转染烟草原生质体后 ,荧光显微镜下表达 GFP 的细胞呈现翠绿色 ,很容易和未表达 GFP 的原生质体区分开来(结果未列出) 。通过计算转染原生质体中表达 GFP 的细胞数可以得到转染效率。电击与 PEG 介导两种方式的转染效率都较低 ,介于 1/150~1/200。加入鲑精 DNA 后 ,转染效率未见改变。

活性分析证实 CMV cDNA 载体表达了 GUS。虽然加入鲑精 DNA 未能提高转染效率 ,但 GUS 的相对活性增加了近 1 倍(图 4) ,或许是鲑精 DNA 保护了接种的 CMV 载体组分不被宿主细胞降解。同时 CMV 载体能表达 GUS ,显示可以容忍较大的外源基因 ,因为 GUS 基因的大小是 CP 基因的 2.8 倍。从图 4 可知 ,CMV 载体的表达水平较低 ,与 pBI221 的表达水平相似。不过 CMV 载体需要 3 个组份同时转入一个细胞才能表达外源基因 ,而一旦转录出病毒基因组 RNA(包括嵌合 RNA) ,又能在细胞质中复制而扩增了外源基因 ,因此不能直接比较二者的表达水平。

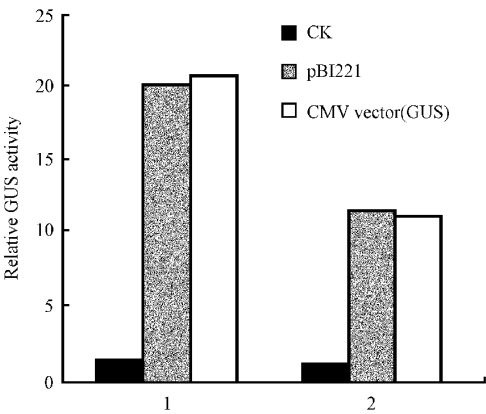


图 4 含 GUS 基因的 CMV 载体与 pBI221 在原生质体中的表达水平(以经过 LUC 活性校正的 GUS 相对活性表示)

Fig.4 Expression of GUS in tobacco protoplasts from CMV vector(GUS) and pBI221

The relative activities of GUS are calculated by normalization with the luciferase activities. Tobacco BY-2 protoplasts were transfected with (1) or without carrier DNA (2) .

在含 2.5μmol/L 氨基甲基蝶呤的培养基中 ,阴性对照细胞在第 4 天就全部死亡 ,而转染 CMV 载体

的原生质体中有少数细胞可存活至第 7 天终止实验时,看来 CMV cDNA 载体表达了 DHFR,并赋予这些细胞对氨基蝶呤的抗性。RT-PCR 结果(未列出)也显示转染 CMV cDNA 载体的存活原生质体中,存在含 DHFR 基因的嵌合 SD-CMV RNA 3。

3 讨 论

我们在前期实验中发现,Fny RNA 1 和 RNA 2 cDNA 的体外转录产物可以支持 SD-CMV RNA 3 在原生质体中的增殖并表达 CP(结果未列出),因此在本实验中应用 Fny RNA 1 和 RNA 2 的 cDNA 与嵌合 SD RNA 3 的 cDNA 一起构建 CMV 表达载体。通过转染原生质体,证实节段重配(segment reassortment)的 CMV RNA 基因组的 3 个组份 cDNA 可做为载体表达外源基因。这是首次直接利用克隆在 35S 启动子和终止子之间的 CMV cDNA 载体在原生质体中表达外源基因的报道。直接操作克隆在 35S 启动子和终止子之间的病毒 cDNA,不仅比通常采用的操作体外转录的 RNA 更方便快捷,而且可以确保在宿主细胞核内转录而来的基因组 RNA 分子 5'端没有附加碱基,而通常一个附加碱基就能导致一些植物正链 RNA 病毒(如 BMV)复制水平下降 1000 倍左右^[20]。

Saunders 等^[14]通过电击法用野生型 CMV 基因组 RNA 转染原生质体时,转染效率高达 60%,我们采用电击和 PEG 介导两种方法直接用 cDNA 转染原生质体时,效率都很低。虽然 CMV 的 cDNA 克隆在 35S 启动子之后可以避免转录出的病毒基因组 RNA 5'端带有非病毒基因组的碱基,但不能避免转录产物 3'端携带很长非病毒的核酸序列,而 3'端携带其它序列也能影响病毒基因组 RNA 分子的复制,例如 3'端携带非病毒碱基数超过 42 个时,BMV RNA 就不能复制^[21]。由 pCass 载体转录而来的 CMV RNA 3'端携带来自 35S 终止子的序列(超过 164 个核苷酸),可能也影响了病毒基因组 RNA 分子(包括嵌合 RNA 3)的复制而表现出很低的转染效率。此外,用 cDNA 直接转染时,3 个 cDNA 组份必须同时转入一个细胞,转移进去的 3 个组份都必须进入细胞核,必须都能获得转录并运输到细胞质中,才能启动 RNA 分子复制和表达外源基因,这些都可能转染效率较低,并表现出较低的表达水平。不过用原生质体表达外源基因本来就存在产量低而成本高的问题,因此一般也只用于验证构建载体的可行性^[1]。因此,尽管直接用 CMV cDNA 载

体转染原生质体的表达水平有限,但我们的实验结果证实了 CMV 可以构建为表达载体。若能反式提供 CP,构建的置换型载体有望以互补型载体的方式接种植株,由转基因表达的 CP 协助置换型 CMV 载体在接种植株内系统移动,从而在植株水平上大量表达外源基因。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Scholthof H B, Scholthof K B G. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu Rev Phytopathol*, 1996, **34**: 299~323
- [2] Gallitelli D. Present status of controlling cucumber mosaic virus. *Plant Virus Disease Control*, APS press, Chapter 38, 1998
- [3] Palukaitis P. Cucumber mosaic virus. *Adv Virus Res*, 1992, **41**: 281~348
- [4] Hayes R J, Buck K W. Complete replication of an eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-Dependent RNA polymerase. *Cell*, 1990, **63**: 363~368
- [5] Nitta N, Takanami Y, Kuwata S *et al.* Inoculation with RNAs 1 and 2 of Cucumber mosaic virus induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplasts. *J Gen Virol*, 1988, **69**: 2695~2700
- [6] Canto T, Prior D A M, Hellwald K H *et al.* Characterization of cucumber mosaic virus, IV. movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology*, 1997, **237**: 237~248
- [7] Shi B J, Ding S W, Symons R H. Plasmid vector for cloning infectious cDNAs from plant RNA viruses: high infectivity of cDNA clones of tomato aspermy cucumovirus. *J Gen Virol*, 1997, **78**: 1181~1185
- [8] Haseloff J, Siemering K R, Prasher D C *et al.* Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 2122~2127
- [9] Rizzo T M, Palukaitis P. Construction of full length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3: generation of infectious RNA transcripts. *Mol Gen Genet*, 1990, **222**: 249~256
- [10] Takanami Y. A striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology*, 1981, **109**: 120~126
- [11] DeBorde D C, Naeve C W, Herlocher M L *et al.* Resolution of a common RNA sequencing ambiguity by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Anal Biochem*, 1986, **157**(2): 275~282
- [12] Hall R D. The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures. *Plant Tissue Culture Manual*, Kluwer Academic Publishers, **A3**: 1~21, 1991
- [13] Damm B, Willmitzer L. *Arabidopsis* protoplast transformation and re-generation. *Plant Tissue Culture manual*. Kluwer Academic Publishers, 1991, **A7**: 1~20

- [14] Saunders J A , Rhodes S C , Kaper J M. Effects of electroporation pulse wave on the incorporation of viral RNA into tobacco protoplasts. *Bio Techniques* ,1989 ,**7** :1124~1131
- [15] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants :The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* ,1987 ,**5** :387~405
- [16] Chomczynski P , Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* ,1987 ,**162** :156~159
- [17] Owen J , Shintaku M , Aeschleman P. Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains CMV RNA 3. *J Gen Virol* ,1990 ,**71** :2243~2249
- [18] Roossinck M J , Zhang L , Hellwald K H. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J Virol* ,1999 ,**73** :6752~6758
- [19] Ding S W , Rathjen J P , Li W X *et al.* Efficient infection from cDNA clones of cucumber mosaic cucumovirus RNAs in a new plasmid vector. *J Gen Virol* ,1995 ,**76** :459~464
- [20] Mori M , Mise K , Kobayashi K. Infectivity of plasmids containing brome mosaic virus cDNA linked to the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. *J Gen Virol* ,1991 ,**72** :243~246
- [21] Dzianott A M , Bujarski J J. Derivation of an infection viral RNA by autolytic cleavage of *in vitro* transcribed viral cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1989 ,**86** :4823~4827

Cucumber mosaic virus cDNA Vector Expressed Foreign Genes in Tobacco Cells

LEI Wan-Li FANG Rong-Xiang* ZHANG Guo-Hua

(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China*)

Abstract Full-length cDNA of SD strain CMV (SD-CMV) RNA 3 was cloned and sequenced. An *Nsi* I site was created at the sequence around the start codon of coat protein (CP) gene and a replacement cassette was constructed. The CP gene was replaced by green fluorescent protein (GFP) gene β -glucuronidase (GUS) gene or mouse dihydrofolate reductase (DHFR) gene , respectively. The cDNAs of Fny-CMV RNAs 1 and 2 and the chimeric SD-CMV RNA 3 were cloned between the 35S promoter and terminator separately. Tobacco protoplasts transfected with the CMV cDNA vectors expressed the three reporters , implying that CMV could be used as an expression vector.

Key words *Cucumber mosaic virus* , replacement vector , tobacco protoplast

Received : July 13 , 2000

This work was supported by a grant (101-04-02-01) from the 863 Hi-Tech Program.

Corresponding author. Tel 86-10-62548243 ; Fax 86-10-62548243 ; E-mail :fangrx@sun. im. ac. cn