

大豆花叶病毒外壳蛋白基因的克隆和 其在大肠杆菌中的表达

刘俊君 彭学贤 李荔 莽克强

(中国科学院微生物研究所植物生物工程开放实验室, 北京 100080)

通过多聚酶连锁反应(PCR), 我们合成了包括病毒外壳蛋白基因在内的病毒基因组3'端区域, 并完成了其全部序列分析, 比较SMV(北京分离物)和SMV-N株的序列发现: 外壳蛋白基因的核苷酸序列同源性达93.4%, 其氨基酸序列同源性高达98.5%, 就基因组3'端非编码序列而言, 其同源性达88.8%。Western blot分析结果表明所克隆的cDNA片段在大肠杆菌JM107中能表达正常的病毒外壳蛋白。

关键词 大豆花叶病毒; 外壳蛋白基因; 基因表达

大豆花叶病毒(Soybean Mosaic Virus)是马铃薯Y病毒组的重要成员之一, SMV基因组是单一正链RNA, 长约10kb, 病毒外壳蛋白基因位于基因组的3'末端非编码区的上游^[1], SMV在我国大豆各主要产区普遍存在, 其发病率一般为20—80%, 重灾年份, 个别地区发病率可达100%, 对于大豆生产影响很大。除影响产量外, 同时引起大豆种子斑驳, 降低大豆品质^[2]。将病毒外壳蛋白(Coat protein)基因导入植物体内产生的转基因植株在抗TMV、CMV等感染方面国内外均有成功的报道, 基于我国在大豆原生质体再生和转化方面有相当工作基础^[3], 因此利用同样的原理, 可望在大豆抗病育种上取得一定的突破。本文利用国内SMV北京分离物(SMV-BJ)为毒源, 通过多聚酶连锁反应方法, 合成和修饰了SMV外壳蛋白基因, 报道了包括SMV3'端非编码区区域在内的外壳蛋白基因的核苷酸顺序及其在大肠杆菌内的表达结果。

材料和方 法

(一) 材料

1. 毒源采自中国科学院遗传研究所

试验农场。

2. cDNA合成试剂盒和Taq DNA聚合酶购自Promega公司, T7 DNA聚合酶序列分析试剂盒、限制酶等生化试剂购自Boehringer公司, α -³²S-dATP、 α -³²P-dATP为NEN产品, PCR引物由中国科学院微生物研究所技术室合成。

(二) 方法

1. 病毒纯化和病毒RNA分离: 毒源摩擦接种大豆幼苗第一对真叶发病后, 收集的病叶经组织捣碎机匀浆, 四氯化碳澄清, 再经过蔗糖垫(20%)差速离心和硫酸铯梯度(10%—40%)离心, 得到病毒纯化物, 病毒RNA按照常规SDS-酚法抽提纯化^[4]。

2. cDNA合成和PCR扩增CP基因: 取0.1—0.5 μ g SMV-RNA为模板, 以oligo(dT)₁₈为引物, 根据cDNA合成试剂盒要求, 合成单链cDNA, 根据已经发表的SMV-N株系基因组3'端核苷酸序列^[1], 设计并合成PCR的两个引物, 用于SMV-CP基因的扩增。

本文于1992年5月5日收到。

本工作为中国科学院8.5重大科研项目的课题。

5' 端引物: 5' C TCC ATG GCA GCC AAG GAG AAG GAA GG3'

3' 端引物: 5' TTG TCG ACA ACA AAC ATT GCC GCA C3'。为了便于基因操作, 将 CP 基因插入到二元载体, 以及基因在细菌和高等植物体内的表达, 在 PCR 5' 端引物中引入了起始密码 ATG 和限制酶 NcoI 位点, 在 PCR 3' 端引物中包含 polyA 区域的两个碱基及一个 SalI 位点, 取 2.5 μ l 单链 cDNA, 进行 PCR 扩增, 94 $^{\circ}$ C 变性反应 1 min, 56 $^{\circ}$ C 复性反应 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 2 min, 循环周期 30 个, PCR 产物经电泳检查以后, 平头连接到 pBluescript KS 载体的 EcoRV 位点内, 转化大肠杆菌 XL-1 blue 菌株, 在含有 IPTG 和 X-gal 的氨苄青霉素 LB 平板上挑选白色重组菌落。

3. CP 基因克隆的限制酶分析以及全序列测定: 重组质粒选用 BamHI、NcoI、SalI 和 PstI 进行酶解, 在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳分析, 以确定 CP 基因的插入方向及其酶谱。通过 CP 基因内 BamHI 和 PstI 位点, 做两个亚克隆于 pBluescript KS 质粒中, 参照 Kuchuan Hsiao 方法^[6]对重组质粒及两个亚克隆进行序列分析。

4. 蛋白质分析: 将克隆于 pBluescript KS 质粒内的 CP 基因通过 EcoRI/SalI 切出, 插入 pUC18 对应位点, 转化 JM107, 在含有 IPTG 及 X-gal 平皿上挑选阳性菌落, 接种于 LB 培养液中, 经过 IPTG 诱导后, 离心收获细菌。菌体蛋白经过样品处理液 (0.0625 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% 蔗糖, 5% β -巯基乙醇), 100 $^{\circ}$ C 处理 5 min 以后, 用 Tricine-SDS-PAGE 分离。以病毒外壳蛋白为阳性对照, pUC18 转化的大肠杆菌 JM107 菌体蛋白为阴性对照。一块凝胶用 Coomassie 亮蓝染色, 用于 Western

blot 分析的另一块凝胶转移至硝酸纤维素膜上, 用洗涤缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.1% Tween-20, 0.04% Na₂S₂O₃) + 5% BSA, 于 37 $^{\circ}$ C 保温 60 min, 进行预包被, 加入抗血清, 37 $^{\circ}$ C 保温 60 min 后, 用洗涤缓冲液冲洗 3 次, 然后与稀释的碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 IgG 保温 60 min, 同样洗膜以后, 在 ALP 缓冲液 (100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂·6H₂O, 100 mmol/L Tris-HCl pH 9.5) 中洗涤数分钟, 与底物溶液 (10 ml ALP 中含 3.3 mg NBT, 1.65 mg BCIP, 100 μ l 二甲基甲酰胺) 反应显色^[8]。

结果与讨论

(一) SMV 病毒和病毒 RNA 提取

病毒纯化物经 Beckman DU-7 紫外扫描仪分析, 显示病毒的特征吸收曲线。用 3% 磷钨酸负染以后, 在电镜下可观察到正常大小的 SMV 病毒粒子。纯化的 SMV-RNA 经 0.8% 琼脂糖电泳分析, 显示单一的核酸带, 降解甚微 (见图 1), 这些证据说明, 本程序提取的病毒基本上是纯净的。

(二) SMV-CP 基因的限制酶酶切分析和全序列测定

单链 cDNA 的 PCR 产物, 经电泳检查, 为长约 1 kb 的单一片段, 与预期大小一致 (见图 2)。PCR 产物平头插入 pBluescript KS EcoRV 位点, 所得重组质粒命名为 pLM (见图 3), 经几种限制酶酶切分析发现: pLM 具有 SMV-N 株系 CP 基因相同的位点。

通过对质粒 pLM 及其亚克隆进行序列分析, 获得了 SMV-BJ 基因组 3' 端区域的核苷酸序列 (见图 4)。比较 SMV-

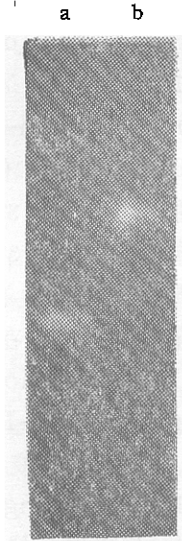


图 1 SMV-RNA电泳图
 Fig.1 The electrophoresis pattern of SMV-RNA
 a. TMV-RNA(control); b. SMV-RNA

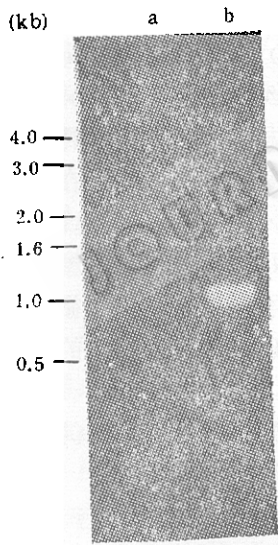


图 2 PCR产物电泳图
 Fig.2 The electrophoresis pattern of PCR product
 a. 1kb molecular weight standard
 b. The product of PCR

BJ和SMV-N株的核苷酸和氨基酸序列可知：外壳蛋白基因的核苷酸序列同源性达93.4%，其编码蛋白的氨基酸序列同源性更高，达到98.5%。在外壳蛋白的265个氨基酸中，仅4个氨基酸的改变，SMV-

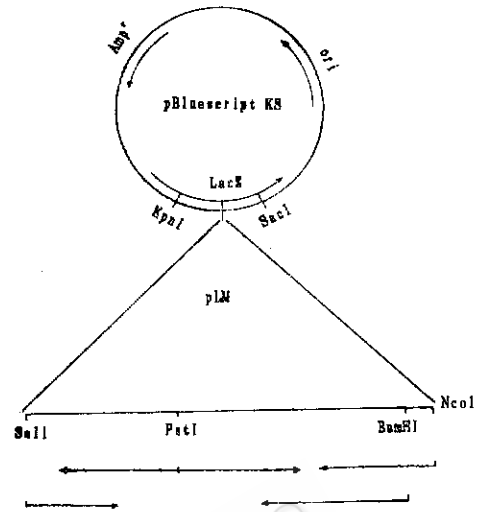


图 3 pLM质粒结构图
 Fig.3 The structure of plasmid pLM
 Arrows indicate the strategy of sequencing

BJ 具有蚜虫传毒所必须的特征性序列DAG；而在SMV-N中，该序列突变成了DAD，不能为蚜虫所传播。马铃薯Y病毒组成员各株系的外壳蛋白差异一般多表现在蛋白的N-端^[7]。但是，SMV-BJ和SMV-N株外壳蛋白的氨基酸差异有两个发生在C端，分别为第257和第264位。就其3'端非编码序列而言，其同源性是88.8%，其中SMV-N株有两个终止密码，而SMV-BJ仅有一个终止密码。这些证据表明：SMV-BJ和SMV-N株是近缘的两个不同株系。

(三) SMV-CP 基因在大肠杆菌中的表达

病毒提纯物经SDS裂解缓冲液处理以后的电泳分析结果表明：SMV 外壳蛋白分子量约为30kDa(见图5A)。根据外壳蛋白基因序列推算出的理论分子量为29.8kDa，两者高度一致，除30kDa主带以外，另外有分子量较小的两条弱带，分别为28kDa和26kDa。当纯化病毒在4℃冰

箱内贮存两个月以后,发现以28kDa带为主,用Western-blot分析,其中28kDa带最深,30kDa带次之,而26kDa带则着色很弱(见图6),在马铃薯Y病毒组中,许多病毒也发现有类似的外壳蛋白降解现象,而且各降解成分的血清学性质不完全一致^[8]。

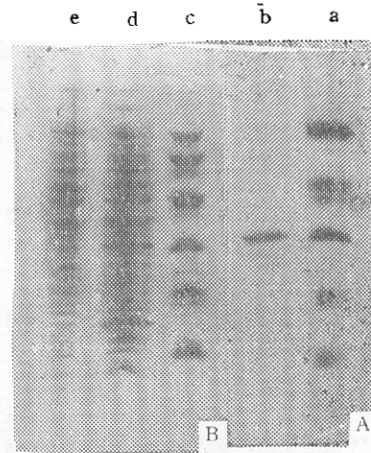


图5 病毒外壳蛋白SDS-PAGE图(考马斯亮蓝染色)

Fig.5 The SDS-PAGE pattern of SMV coat protein(stained by Coomassie blue R-250)

- A: a. Molecular weight standard (kDa, 67, 43, 30, 20, 14)
 b. The coat protein of purified SMV-BJ
 B: c. Molecular weight standard (kDa, 94, 66, 43, 30, 20, 14)
 d. Proteins from JM107/pUM
 e. Proteins from JM107/pUC18

质粒pLM经EcoRI/SalI切出外壳蛋白基因片段,插入pUC18对应位点,得到SMV-CP基因的大肠杆菌表达质粒pUM, pUM的阅读框架和表达方向与载体pUC18完全一致。SMV-CP基因在JM107中的表达产物经过SDS-PAGE分离,电泳胶板经考马斯亮蓝染色以后,发现转pUM的JM107比对照(pUC18)明显地多出两个多肽,一个多肽分子量为

30kDa,与病毒外壳蛋白的正常大小一致,另一个多肽分子量为16kDa(见图5B)。用Western-blot进一步分析表明:这两个特异多肽均与SMV外壳蛋白的抗血清呈阳性反应(见图6)。因此,30kDa多肽是SMV-CP基因在JM107中的正常表达产物,而16kDa多肽可能是正常表达的外壳蛋白在大肠杆菌中发生降解作用后的产物。因此病毒外壳蛋白在体外和在大肠杆菌内的降解产物是不一样的,这些证据表明我们所克隆和改造的SMV外壳蛋白基因具有完整的表达活性,而且在大肠杆菌JM107中表达活性较高。

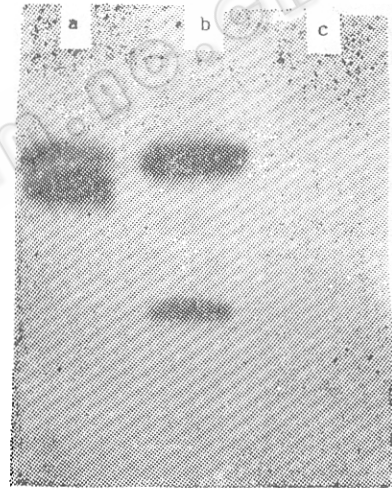


图6 Western-blot分析SMV-BJ CP基因在大肠杆菌JM107中的表达

Fig.6 Western-blot analysis of SMV coat protein synthesized in *E. coli* JM107
 a, SMV coat protein (positive control).
 b, The products of plasmid pLM in JM107
 c, The products of plasmid pUC18 in JM107 (negative control).

目前,我们已经将SMV-CP基因插入含有抗菌素标记的中间载体,试图通过原生质体转化、农杆菌介导的外植体转化或其他途径,最终获得转外壳蛋白基因的大豆,从中筛选抗性品种。

参 考 文 献

- [1] Eggenberger, A. L. et al.: *J. gen. Virol.*, 70: 1853—1860, 1989.
[2] 张明厚等: 植物病理学报, 10 (2): 113—118, 1980.
[3] 黄健秋等: 植物学报, 34 (1): 26—30, 1992.
[4] Gould, A. K.: *Virology*, 108: 123, 1981.
[5] Ku-chuan Hsiao: *Nucleic Acids Research*, 19: 2787, 1991.
[6] Towbin, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 76: 4352—4354, 1979.
[7] Allison, R. F. et al.: *Nature*, 521: 446—449, 1986.
[8] Hiebert, E. and McDonald, J. G.: *Virology*, 70: 144—150, 1976.

Cloning and Expression of Coat Protein Gene of Soybean Mosaic Virus in *Escherichia coli*

Liu Junjun Peng Xuexian Li Li Mang Keqiang
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

The 3'-terminal genomic region of the Beijing isolate of Soybean Mosaic Virus (SMV-BJ) has been cloned through technique of polymerase chain reaction (PCR). We have analyzed the nucleotide sequence of 3' region of SMV-BJ genome. Comparisons of the nucleotide and deduced amino acid sequences of SMV-BJ coat protein gene with those of SMV-N strain show 93.4% and 98.5% identity between them, respectively. Alignments of the 3' non-coding sequence in pair with that of SMV-N strain show homology of 88.8%. It has been found that the SMV coat protein gene is expressed in *E. coli* by western blot analysis. The coat protein produced in *E. coli* has the same electrophoretic mobility as SMV coat protein.

Key words: Soybean mosaic virus; coat protein gene; gene expression