



# 番木瓜环斑病毒分离物(SM)外壳蛋白 基因克隆及序列分析

刘俊君 彭学贤 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

番木瓜环斑病毒 (Papaya Ringspot Virus 简称 PRV) 是马铃薯 Y 病毒组 (Potyvirus group) 的成员之一。PRV 严重危害我国的番木瓜生产, 流行年间甚至达到毁灭性程度。60 年代以来, 我国番木瓜因受 PRV 危害, 已从多年生高产果木变成一年生低产果木, 果实品味下降<sup>[1]</sup>。

利用植物基因工程手段进行抗病育种, 即将病毒外壳蛋白 (Coat Protein 简称 CP) 基因或影响病毒复制的有关片段导入植物中, 从中筛选抗病品种。在抗 TMV、CMV 等方面, 已经初见成效<sup>[2]</sup>。最近, Kaishu Ling 等通过农杆菌转化, 将改造好的 PRV-CP 基因导入烟草, 产生的转基因烟草对马铃薯 Y 病毒组其他成员 TEV、PVY、PeMV 等有一定的抗性<sup>[3]</sup>。因此利用同样的手段, 也可望在防治 PRV 病害及抗病番木瓜品种选育上有所突破。我们以国内番木瓜环斑病毒分离物 SM 的病毒基因组 RNA 为模板, 寡 dT 为引物, 反转录获得病毒 cDNA。通过多聚酶连锁反应 (PCR), 从 cDNA 中扩增出外壳蛋白基因。通过对该基因的限制性内切图谱分析以及序列测定, 并与国外已报道的株系比较, 初步认为中国番木瓜环斑病毒 SM 分离物是有别于国外的不同株系。

## 材料与 方法

### (一) 材料

PRV 分离物 SM 由中科院华南植物研究所提供。

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, 限制性内切酶等生化试剂购自 Boehringer 公司,  $\alpha$ -<sup>32</sup>S-dATP、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 为

NEN 产品。PCR 引物由中科院微生物所技术室合成。

### (二) 方法

1. 病毒分离、纯化以及病毒 RNA 提取: 主要参照 Nobuhiro Suzuki 方法提纯病毒<sup>[4]</sup>。磨擦接种西葫芦子叶, 病叶组织经捣碎机匀浆, 四氯化碳澄清, 经过蔗糖垫差速离心和硫酸铯梯度离心 (10—40%), 得到纯化病毒。

病毒 RNA 按常规酚法抽提纯化。

2. cDNA 合成和 PCR 扩增 CP 基因: 以 0.1—0.5  $\mu$ g PRV-RNA 为模板, oligo (dT)<sub>15</sub> 作引物, 按 cDNA 合成试剂盒要求, 合成 cDNA。

根据已发表的 PRV-W 株系的 CP 基因序列<sup>[5]</sup>, 设计并人工合成 PCR 的两个引物:

5' 端引物: 5'TCCCATGGCCAAAATG AAGCTGTGG 3'

3' 端引物: 5'AGGTCGACAAACACACA AGCGC 3'

为了便于将 CP 基因插入双元载体和基因表达, 在 PCR 5' 端引物中引入了起始密码 ATG 和 NcoI 位点, 在 PCR 3' 端引物中引入了 SalI 位点。

取 2.5  $\mu$ l ss-cDNA, 进行 PCR 扩增, 94℃ 变性 1 分钟, 55℃ 复性 1 分钟, 72℃ 延伸反应 2 分钟。循环 30 个周期。

PCR 产物平头连接到 pBluescript KS 载体的 EcoRV 位点, 转化 XL-1 blue 菌株, 在含 IPTG 和 X-gal 的氨苄青霉素平板上, 挑选白色重组菌落。

3. CP 基因克隆的限制性内切酶分析及全序列分析: 重组质粒选用 EcoRI Sac II, Bam HI 和 SalI 进行酶解, 在 0.8% 的琼脂糖凝胶

GCC AAA AAT GAA GCT GTG GAT GCT GGT TTG AAT GAG AAG CTT AAA GAA AAA  
 GAA AAA CAA AAA GAA GAA AAA GAT AAA CAA AAG GTT AAA AAT GAT GAT GGT  
 ACT AAT GAT GGA AAC GAT GTG TCA ACT AGT ACA AAA ACT GGA GAG AGA GAT  
 AGG GAT GTC AAT GCC GGA ACT AGT GGG ACT TTT ACT GTT CCG AGG ATA AAA  
 TCA TTT ATT GAT AAG ATG ATT TTA CCA AGA ATT AAG GGA AAA ACT GTC CTT  
 AAT TTG AAT CAT CTT CTT CAG TAT AAT CCG CAA CAA ATT GAC ATC TCA AAC  
 ACT CGC GCC ACT CAA TCT CAA TTT GAA AAG TGG TAC GAG GGA GTG AGG AAT  
 GAT TAC GGT CTG AGT GAT AAC GAA ATG CAG GTA ATG TTA AAC GGT TTG ATG  
 GTT TGG TGT ATC GAA AAT GGT ACA TCT CCA GAC ATA TCT GGT GTC TGG GTA  
 ATG ATG GAT GGG GAA ACT CAA GTC GAT TAC CCC ATC AAA CCT TTG ATT GAG  
 CAC GCA ACT CCT TCG TTT AGG CAG ATC ATG GCT CAC TTC AGT AAC GCG GCA  
 GAA GCA TAC ATC GCG AAG AGG AAT GCA ACT GAG AGG TAC ATG CCG CGG TAT  
 GGA ATC AAG AGA AAT TTG ACT GAC ATT AGT CTC GCT AGA TAT GCT TTC GAT  
 TTC TAT GAG GTG AAT TCA AAA ACA CCT GAT AGG GCT CGT GAA GCT CAT ATG  
 CAG ATG AAA GCT GCA GCC GTG CGC AAC ACT AAT CGC AGA ATG TTT GGA ATG  
 GAC GGC AGT GTC AGT AAC AAG GAA GAA AAC ACG GAG AGA CAC ACA GTG GAA  
 GAT GTC AAC AGA GAC ATG CAC TCT CTC CTG GGT ATG CGC AAT TGA

图1 PRV-SM 外壳蛋白基因核苷酸序列

上电泳分析。

克隆的 CP 基因经 *Sac*II 酶切后,亚克隆于 pBluescript KS 质粒中。参照 Kuchuan Hsiao 方法<sup>[6]</sup>,进行快速序列分析。

## 结果与讨论

### (一) PRV 病毒和病毒 RNA 的提取

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% 磷酸钨酸染色以后,在电泳下,观察到标准大小的 PRV 病毒粒子。

纯化的 PRV-RNA 经 0.8% 琼脂糖电泳分析,显示出单一的核酸带,降解较少。

### (二) PRV-CP 基因的限制性内切酶分析和序列测定以及同国外株系的同源性比较

单链 cDNA 的 PCR 扩增产物,经电泳检查,长约 0.9 kb 与已知 CP 基因大小一致。*Eco*RI, *Sac* II 是 PRV-W 和 PRV-P 株系 CP 基因中已知的限制性内切酶位点。克隆的 PRV-SM 的 CP 基因经上述酶切电泳后,获得了与 PRV-W 和 PRV-P 相同的酶切图谱。

为了减少 PCR 带来错误掺入的可能性,我们测定了两个克隆的 CP 基因全序列,其结果

完全一致(图1)。PRV 中国分离物 SM 的 CP 基因全长 861 pb,编码 286 个氨基酸。与 PRV-P 及 PRV-W 的 CP 基因比较<sup>[5]</sup>,其核苷酸序列的同源性分别为 88.43% 和 89.54%。就其编码蛋白的氨基酸顺序而言,与 PRV-W 和 PRV-P 的同源性均为 94.43%。有 16 个氨基酸的改变,其中包括一个氨基酸的缺失,且主要变异位点位于蛋白质的 N 端。由此可见,PRV 中国分离物 SM 很可能是一个与 PRV-W 和 PRV-P 不同的株系。

目前我们已经将该基因插入大肠杆菌的表达质粒 pE5.10 和双元载体 pBin 438。通过农杆菌转化或其他方法,以期将该基因转入番木瓜,获得抗病的工程植株。

### 参考文献

1. 吴方城等:植物病理学报,13: 21—27,1983.
2. Lawson C et al.: *Bio/Technology*, 8: 127—134,1990.
3. Kaishu Ling et al.: *Bio/Technology*, 9: 752—758, 1991.
4. Nobuhiro Suzuki et al.: *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 55: 586—593, 1989.
5. Hector Quemada et al.: *Journal of General Virology*, 71: 203—210, 1990.
6. Ku-chuan Hsiao: *Nucleic Acids Research*, 19: 2787, 1991.