

## 烟草花叶病毒及其弱毒疫苗-N14 基因组 cDNA 克隆的构建与侵染性分析

杨 恭 邱 井 生 \*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 烟草花叶病毒基因,弱毒疫苗 N14 基因,克隆,转录,烟草感染

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)02-0207-04

植物病毒弱毒疫苗在防治植物病毒病害中发挥着重要的作用,但对于其致弱的根本原因和机理仍不十分清楚。弱病毒能够在植物体内生存和繁殖,却不严重危害植物的生长、开花和种子生产,而对外来病毒具有杀灭和防治作用,这种共生和保护宿主的现象是大多数植物弱病毒所具有的共同特征,具有普遍性<sup>[1-6]</sup>。研究植物病毒的致弱机理不仅对于搞清其抗病和防病机理具有理论意义,而且对于病毒基因组的改造和制备基因工程疫苗具有实际价值和指导意义。

烟草花叶病毒弱毒疫苗 N14 是由本研究室将烟草花叶病毒番茄株(ToMV)用亚硝酸处理后,分离筛选而获得的对 TMV(包括部分真菌)感染有明显保护作用的弱毒株,通过近 20 年大田使用,表现有稳定的免疫性和遗传性。本研究室已对其理化性质,感病组织中双链 RNA 的变化情况和免疫蛋白以及 RNA 体外翻译产物等进行了研究<sup>[7]</sup>。本文从核酸分子水平上研究 N14 的致弱机理,克隆了具有侵染性的烟草花叶病毒和弱毒疫苗-N14 的全基因组 cDNA,为下一步深入研究致弱机理奠定了基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 毒源、菌种和质粒

TMV 强毒株和弱毒疫苗 N14 以及大肠杆菌 DH5 $\alpha$  均来自本研究室,pUC18 质粒购自华美生物工程公司。

#### 1.2 酶与试剂

蛋白酶 K 为 Merck 公司产品;RT-PCR 系统、*Sma*I、*Hinc*II、*Pst*I、*Kpn*I 为德国 Boehringer Mannheim 产品;T4 多聚核苷酸激酶、T4 DNA 聚合酶、PCR 产物纯化试剂盒、体外转录系统、*Taq* DNA 聚合酶测序试剂盒均为 Promega 公司产品;T4 DNA 连接酶、*Bam*HI、*Eco*RI、*Cla*I、*Stu*I 和 Klenow 片段为 TaKaRa 生物工程公司产品;RNase、尿素、丙烯酰胺(Acr)、N,N'-亚甲双丙烯酰胺(Bis)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)为 Pharmacia 公司产品;Tryptone、Yeast

Extract 和低熔点琼脂糖为 Oxoid LTD(England)产品;其他常规试剂为国产分析纯。

#### 1.3 病毒基因组 RNA 的制备

病毒的分离和纯化以及 RNA 的提取按文献报道的方法进行<sup>[8]</sup>。

#### 1.4 质粒的提取、转化和 DNA 常规操作

参照文献<sup>[9]</sup>的有关方法进行。

#### 1.5 RT-PCR 扩增基因组 cDNA

按已发表的 TMV 强株<sup>[10,11]</sup>cDNA 全序列设计引物,并在上游引物的 5'端加上噬菌体 SP6 的转录启动子序列,在下游引物的 5'端设计 *Kpn*I 酶切位点,引物序列如下:

5'引物: GATTTAGGTGACACTATAGTATTTTACAA-CAATTAC(37 bases,下划线部分为 SP6 转录启动子);3'引物: GGTACCTGGGCCCA(T)ACCGGGGT(24 bases,下划线部分为 *Kpn*I 酶切位点)。由中国科学院微生物研究所生物新技术中心合成。

RT-PCR 操作均按照试剂盒的说明进行。RT 反应在 42 $^{\circ}$ C 作用 1 h。PCR 扩增的循环条件为:94 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30s,68 $^{\circ}$ C 6 min,35 个循环;68 $^{\circ}$ C 10min。

#### 1.6 TMV 和 N14 全长基因克隆(图 1)

1.6.1 PCR 产物的酶切处理和分段克隆:扩增产物纯化回收,用 T4 多聚核苷酸激酶和 T4 DNA 聚合酶分别进行 5'末端加磷和 3'末端的削平,再用 *Bam*HI 酶切,获得 1~3333 序列的大片段(5'序列,3.3 kb)和 3334~6395 序列的小片段(3'序列,3.1 kb);低熔点琼脂糖分离回收后,分别用 *Sma*I/*Bam*HI 和 *Hinc*II/*Bam*HI 克隆于 pUC18(pTBS/pNBS,pTBH/pNBH);转化于用氯化钙制备的新鲜感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,筛选重组克隆,*Bam*HI、*Cla*I、*Eco*RI、*Stu*I 酶切鉴定。

1.6.2 5'大片段和 3'小片段的连接:5'大片段和 3'小片段的克隆基因随机配对,TMV 和 N14 分别用 *Bam*HI/*Pst*I 或

收稿日期:1999-04-05,修回日期:1999-12-30。

基金项目:国家自然科学基金资助(39770034)。

\* 通讯作者。

*Bam*HI/*Sph*I 将 3' 克隆序列插入到以 5' 序列重组质粒为新的载体中 (pTMV - Cv/pN14); 转化于感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 用 *Bam*HI, *Kpn*I, *Pst*I 或 *Bam*HI, *Sac*I/*Sph*I, *Pst*I 酶切和 PCR 扩增鉴定全序列基因的重组克隆。

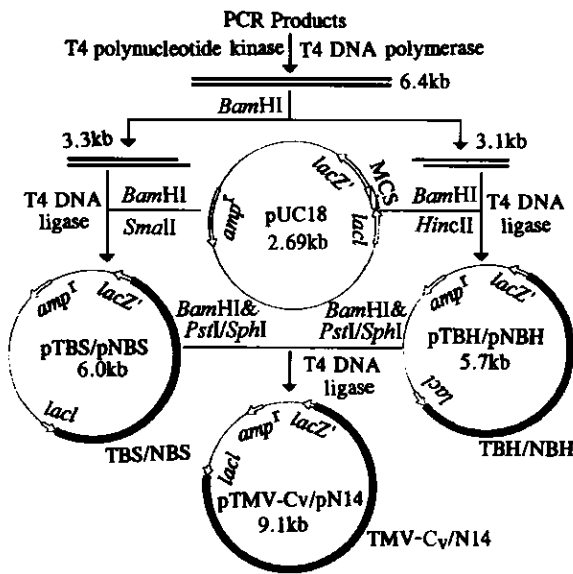


图 1 克隆质粒 pTBS/pNBS、pTBH/pNBH、pTMV-Cv/pN14 的构建

## 1.7 克隆基因引物区序列的测定

用 Taq Track 测序系统, 测序引物为 pUC/M13 forward (24 mer) 和 pUC/M13 reverse (17 mer), 放射性同位素为 ( $\alpha$ -<sup>35</sup>S)dATP(1 000Ci/mmol)。

## 1.8 体外转录和感染烟草

1.8.1 模板的制备和 RNA 的合成: 碱法提取重组质粒约 2  $\mu$ g, 用 *Pst*I 线性化 pTMV - Cv, *Sph*I 线性化 pN14, Klenow 片段 (5 u/ $\mu$ g DNA) 削平 3' 突出端, 酚/氯仿抽提 2 次, 乙醇沉淀。线性化模板溶于 DEPC 处理的无菌水中。按转录试剂盒的操作说明进行体外转录。

1.8.2 感染烟草: 按文献 [11] 报道的方法, 转录产物不经 DNase 处理, 直接用于侵染烟草。先接种枯斑三生烟 (*Nicotiana glauca* NN), 出现枯斑后, 转接普通烟 (*Nicotiana tabacum* cv. 黄苗榆品种) 和三生烟。观察系统症状和枯斑形成情况。选在三生烟上能出现枯斑, 而在普通烟上出现 TMV 和 N14 典型症状的重组克隆。

## 2 结果与分析

### 2.1 RT-PCR

TMV 和 N14 的 PCR 扩增产物为单一条带 (图 2), 长度约 6.4 kb。

由于该病毒基因组较大, 进行 RT 反应时, 常用反转录酶中 RNaseH 活性较高, 不易得到全长 cDNA 单链产物。而本试验所用的反转录系统中, RNaseH 的点突变降低了其自身活性, 易于得到全长的 cDNA 第一条链, 使 PCR 能扩增出全基因组。而且用于 PCR 扩增的 DNA 聚合酶 (PWO DNA

polymerase) 碱基错配率为  $1.5 \times 10^{-6} \sim 3.2 \times 10^{-6}$ , 比普通 Taq DNA 聚合酶 (错配率  $2.6 \times 10^{-5}$ ) 低近 10 倍, 保证了克隆基因的真实性。

### 2.2 病毒全长基因的克隆与鉴定

2.2.1 TMV 和 N14 5' 序列和 3' 序列分段克隆的酶切鉴定: 根据参考序列和实验证实, 在 TMV 和 N14 的 cDNA 中, 3.3 kb 处都有一个 *Bam*HI 酶切位点, 用该酶处理 PCR 产物, 产生 3 kb 左右的两个片段 (图 2)。分别克隆后, 将 TMV 5' 序列的克隆质粒 (pTBS) 用 *Eco*RI 酶切, 均产生 3 条带: 0.3 kb, 2.3 kb; 3.4 kb; 而 3' 序列的克隆质粒 (pTBH) 被 *Bam*HI 和 *Cla*I 消化后均为 2 条带: 2.3 kb, 3.5 kb (图 2)。与参考序列完全吻合。

N14 5' 序列的克隆质粒 (pNBS) *Eco*RI 酶切后均为 2 条带: 0.3 kb, 5.7 kb; 3' 序列的重组质粒 (pNBH) 用 *Bam*HI 和 *Stu*I 酶切后也为 2 条带: 2.3 kb, 3.5 kb (图 2), 与参考序列完全一致。

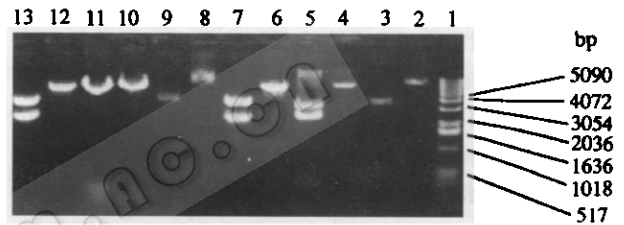


图 2 TMV 与 N14 cDNA 以及克隆质粒 pTBS, pNBS, pTBH, pNBH 的酶切分析

Lane1: 1 kb DNA ladder marker; Lane2&3: RT-PCR product of TMV cDNA and its digestion with *Bam*HI; Lane4&5: pTBS/*Bam*HI, *Eco*RI; Lane6&7: pTBH/*Bam*HI, *Bam*HI & *Cla*I; Lane8&9: RT-PCR product of N14 cDNA and its digestion with *Bam*HI; Lane10&11: pNBS/*Bam*HI, *Bam*HI & *Stu*I; Lane 12&13: pNBH/*Bam*HI, *Eco*RI

2.2.2 5' 和 3' 克隆序列的拼接: 根据参考序列及酶切分析, TMV-Cv cDNA 序列中无 *Pst*I 位点, 而 N14 cDNA 序列无 *Sph*I 位点。因此对新载体 pTBS 先用 *Bam*HI 酶切, 后用 *Pst*I 消化, 再与 3' 克隆序列连接 (pTMV-Cv); 而对 pNBS 先用 *Bam*HI 酶切, 再用 *Sph*I 消化, 后与 3' 克隆序列拼接 (pN14)。重组克隆 pTMV-Cv 用 *Bam*HI 酶切为一条带: 9.1 kb; *Kpn*I 切割为 2 条带: 2.7 kb, 6.4 kb; *Pst*I 酶切为一条带: 9.1 kb; pN14 用 *Bam*HI 酶切为一条带: 9.1 kb; *Sac*I/*Sph*I 切割为两条带: 2.7 kb, 6.4 kb, *Pst*I 酶切也为一条带: 4.5 kb (两个 *Pst*I 位点)。重组质粒作模板, 进行 PCR 扩增, 仍为单一条带: 6.4 kb (图 3)。

### 2.3 克隆基因引物区序列的测定

TMV 和 N14 的引物区序列 (< 50 bp) 测定结果与设计及参考序列完全相同。

### 2.4 体外转录和烟草感染

转录产物在甲醛变性的琼脂糖中电泳。转录混合物经 DNase 消化后, 可见有与对照 RNA (TMV RNA) 大小一致的泳带 (图 4)。说明体外转录合成的 RNA 与病毒基因组 RNA 的分子大小基本一致, 可用于烟草侵染。

pTMV-Cv 和 pN14 的转录产物感染三生烟,3~5 d 出现枯斑,但前者形成的枯斑 1 周后为深褐色,直径为 1~3.5 mm;后者为浅褐色,直径为 2~6 mm。单斑分别转接普通

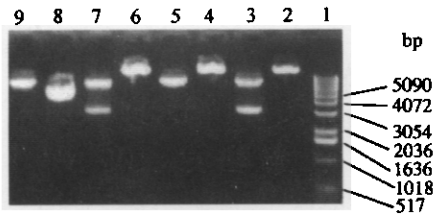


图 3 克隆质粒 pTMV 和 pN14 的酶切分析

Lane 1: 1kb DNA ladder marker; Lane 2~4: pTMV-Cv/*Bam*HI, *Kpn*I, *Pst*I; Lane 5: PCR analysis of pTMV-Cv; Lane 6~8: pN14/*Bam*HI, *Sac*I/*Sph*I, *Pst*I; Lane 9: PCR analysis of pN14

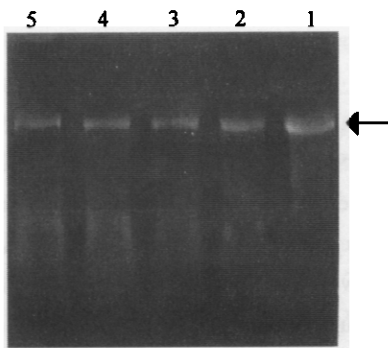


图 4 pTMV 和 pN14 转录产物在甲醛变性的琼脂糖凝胶中的电泳分析

Lane 1: TMV RNA as marker; Lane 2&3: DNase-treated transcriptional mixture of pTMV-Cv; Lane 4&5: DNase-treated transcriptional mixture of pN14

烟,20d 左右,感染 pTMV-Cv 转录物的烟草出现与烟草花叶病毒强毒感染结果相同的典型系统症状:明脉;叶片畸形;花叶皱缩、黄化和形成褪绿斑驳;将此活化状态的克隆病毒转接在三生烟上,3~4 d 同样出现枯斑。而感染 pN14 转录产物的普通烟,7~8 d 内出现明脉等 TMV 感染的早期症状,但 1 周后逐渐消失;之后取其叶片感染三生烟仍可出现

枯斑,与弱毒疫苗 N14 病毒感染的症状完全相同。

实验中分别对 10 个 pTMV-Cv 和 8 个 pN14 克隆子进行了体外转录和感染烟草试验,结果各获得 5 个具有侵染性的克隆。

### 3 讨论

近年来,由于分子生物学技术的全面发展,国外已对 TMV 基因组的结构、功能及其调控有了比较深入的研究,其中以对强弱株病毒(包括各种株系)的外壳蛋白(CP)和运动蛋白(MP)编码区基因进行突变后功能的研究最多,大多数学者认为导致病毒侵染力的症状改变的主要原因是 CP 和 MP 的突变<sup>[12~14]</sup>。CP 编码基因突变(包括缺失、插入等)造成 CP 在数量、结构和功能方面发生的变化引起植物叶绿体与病毒之间的相互作用发生变化,进而使烟草呈现从无到各种程度的黄化或坏死症状<sup>[15,16]</sup>。MP 编码基因的突变不但使 MP 对病毒在植物组织中的运动产生各种调节<sup>[17,18]</sup>,而且也使其在感染的三生烟上形成的枯斑大小发生变化<sup>[19]</sup>。然而,尽管 N14 病毒在感染的普通烟上不表现强毒所感染的系统症状,在三生烟上形成的枯斑与 TMV 有差异,但在未知其 CP 和 MP 编码基因的突变情况以前,我们还无法得出 N14 感染烟草出现的这些症状与其 CP 和 MP 编码基因的突变有关这个结论。另有资料表明<sup>[20]</sup>,非结构蛋白 126 kDa/183 kDa ORF<sub>3</sub> 的突变(尤其是其中 D1 和 D2 区的突变)会影响 30 kDa 蛋白 mRNA 的形成及其翻译,进而改变病毒侵染烟草后在细胞到细胞的运动特征,但这种突变是否与 N14 的致病机理密切相关,我们将在全面测序的基础上,用基因交换和突变的方法构建重组体或突变体,再次转录和感染烟草,以发现和确定致弱的真正基因突变区。

此外,TMV 和 N14 的基因组 5' 端都含有 m<sup>7</sup>GpppG 的帽子结构。但本实验表明,体外转录时,不需另加帽子,就可以获得具有侵染性的 RNA,帽子结构可能对于蛋白质的起始翻译更加重要。在许多必须获得具有侵染性 RNA 的体外转录实验中,也不一定要对转录物加帽,只是无帽子结构的转录物侵染性较低<sup>[8,15,21]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] Kunkel L O. *Phytopath*. 1934, 24:437~466
- [2] Chamberlain E E, Atkinson J D, Hunter J A. *New Zeal J Agr Res*. 1964, 7:480~490
- [3] Grant T J, Costa. *Phytopath*. 1951, 41:114
- [4] 裘维善. 植物病毒学, 北京: 农业出版社, 1964
- [5] 张秀华, 李国玄, 梁锡桐等. 植物病理学报, 1980, 10:109~112
- [6] 田 波, 张秀华, 梁锡桐等. 植物病理学报, 1980, 10:109~112.
- [7] 田 波, 覃秉益, 康良仪等. 植物病毒弱毒疫苗-番茄条斑病疫苗 N14, 武汉: 湖北科学技术出版社, 1985
- [8] Takamatsu N, Ohno T, Meshi T *et al.* *Nucl Acids Res*. 1983, 11:3675~3778
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2 nd Ed, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989
- [10] Koh H K, Song E K, Lee S Y *et al.* *Nucleic Acids Res*. 1992, 20:5474
- [11] Ohno T, Aoyagi M, Yamanashi Y *et al.* *J Biochem*, 1984, 96(6):1915~1923

- [12] Bendahman M, Fitchen J H, ZHANG G M *et al.* *J Virol.* 1997, **71**:7942~7950
- [13] Ares X, Calamante G, Cabral S *et al.* *J Virol.* 1998, **72**:731~738
- [14] Bin L, Stubbs G, Culver J N. *Virology.* 1998, **248**:188~198
- [15] Dawson W O, Bubrick P, Grantham. *Phytopathology.* 1988, **78**:783~789
- [16] Banerjee N, Wang J Y, Zaitlin M. *Virology.* 1995, **207**:234~239
- [17] Oliver M J, Deom C M, De B K *et al.* *Virology.* 1986, **155**:277~283
- [18] Citovsky V, Knorr D, Schuster G *et al.* *Cell.* 1990, **60**:637~647
- [19] Nejidat A, Cellier F, Holt C A *et al.* *Virology.* 1991, **180**:318~326
- [20] Watanabe Y, Morita N, Nishiguchi M *et al.* *J Mol Biol.* 1987, **194**:699~704
- [21] Dawson W O, Beck D L, Knorr D A *et al.* *Proc Natl Acad Sci.* 1986, **83**:1832~1836

## Cloning and Infectivity Analysis of the cDNAs of Tobacco Mosaic Virus (Tomato Strain) and Its Attenuated Virus(N14) Genomes

YANG Gong    QIU Bing-Sheng\*

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** An oligonucleotide primer with SP6 transcription promoter and the other primer with a *Kpn*I site at 5' terminus were used to prepare the cDNAs of tobacco mosaic virus (TMV, Chinese isolate) and its attenuated virus (N14, nitrite-treated mutant, tomato strain) genomic RNAs by RT-PCR. The cDNAs were cut into two fragments by *Bam*HI and first cloned separately then recombined into pUC18 by the restriction endonucleases of *Bam*HI, *Sma*I, *Hinc*II, *Pst*I, *Sph*I. The sequences of 5' and 3' terminal nucleotides (< 50bp) were consistent with the reported references. The infectious clones (pTMV-Cv/pN14) have been obtained and corroborated by *in vitro* transcription with SP6 RNA polymerase and tobacco infection. Necrotic local lesions were observed in *Nicotiana glauca* NN induced by the transcripts from both pTMV and pN14 within 3~5 days after inoculation, systemic symptoms showed in single-lesion infected *Nicotiana glauca cv.* coincided with symptoms of tobaccos infected by TMV and N14.

**Key words** TMV gene, attenuated virus N14 gene, cloning, transcription, tobacco infection