

烟草花叶病毒(普通株中国分离物)及其弱毒疫苗-N14(番茄株)基因组侵染性 cDNA 核苷酸全序列测定与分析

杨 恭 刘相国 邱并生*

(中国科学院微生物研究所分子病毒与生物工程开放实验室 北京 100080)

摘 要 用双脱氧末端终止法对侵染性烟草花叶病毒普通株中国分离物(TMV-vulgar Chinese Isolate, TMV-Cv)和番茄株弱毒疫苗 TMV-N14(Attenuated TMV vaccine strain)基因组 cDNAs 的核苷酸全序列进行了测定,并分析和比较了其基因组的结构和特征。结果表明:普通株基因组(Genbank 接收号:AF165190)为 6395 个核苷酸,4 个功能性开放阅读框架(ORF)分别编码 126kD/183kD 的复制酶、30kD 运动蛋白和 17.6kD 外壳蛋白。弱毒疫苗 TMV-N14 基因组(Genbank 接收号:AF155507)为 6384 个核苷酸,5 个功能性 ORF 分别编码 98.5kD/126kD/183kD 的复制酶、27kD 运动蛋白和 17.6kD 外壳蛋白。与参比序列核苷酸和氨基酸序列比较:普通株核苷酸序列同源率为 99.4%,推断的复制酶与运动蛋白分别有 5 个和 2 个氨基酸残基不同。TMV-N14 核苷酸序列同源率为 99.7%,核苷酸位置 2670~2672 和 5632~5634 分别发生乳石(Opal)突变(UGA)和赭石(Ochre)突变(UAA),推断复制酶有 13 个氨基酸残基发生了变异。

关键词 烟草花叶病毒普通株 弱毒疫苗 TMV-N14 cDNA 测序

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0437-06

植物病毒弱毒疫苗能够保护易感植物体免受强病毒的攻击^[1]。许多学者对这种交叉保护的机理提出了各种假说^[2](1)保护病毒(Protecting virus)占有或用去寄主代谢产物和(或)某种结构,而这些代谢产物和结构对于攻击病毒(Challenge virus)的成功侵染是必须的(2)保护病毒的 RNA 与攻击病毒的 RNA 发生分子杂交(3)保护病毒的外壳蛋白抑制攻击病毒基因组的脱壳和释放(4)保护病毒的存在妨碍攻击病毒的系统运动(5)保护病毒的复制激活寄主的防御机制,由此降解攻击病毒的 RNA。但没有一种假说能够完全说明交叉保护的机制。从分子水平研究植物病毒的致弱机理不但可以帮助搞清其交叉保护机理,而且对植物病毒基因组的改造和研制基因工程疫苗有重要的理论指导意义。

烟草花叶病毒(TMV)为单组分正链 RNA 病毒,其弱毒疫苗 TMV-N14(番茄株, Tomato strain, 下同)是本研究室用亚硝酸对强病毒株诱变后筛选、分离而得到对 TMV 感染有明显保护作用的弱毒株。经过近 20 年的大田使用,对烟草和番茄的保护

增产率达到 20%~30%,遗传性和免疫性均稳定,是研究植物病毒致弱机理的理想材料。因此我们以烟草花叶病毒普通株(U1)和弱毒疫苗 TMV-N14 基因组为原材料,已通过反转录、PCR、重组、体外转录和烟草感染获得了侵染性 cDNA(Infectious cDNA, icDNA)克隆 pTMV-Cv 和 pN14^[3]。本文首次报道我国烟草花叶病毒普通株(TMV-Cv)和弱毒疫苗(TMV-N14)的全基因组核苷酸序列测定和分析结果。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒与常规试剂

大肠杆菌 DH5 α ,克隆质粒 pUC18、pBluescript (M13-KS 及 T7DNA 序列测定试剂盒购自 Pharmacia Biotech, T4DNA 连接酶、限制酶和 DNA 纯化试剂盒购自 TaKaRa(大连)或 Boehringer Mannheim 公司, Taqtrack 测序系统购自 Promega 公司 [α -³⁵S] dATP 购自 DuPont PEN 公司;其他常规试剂为进口分装或国产分析纯。

收稿日期:1999-08-20,修回日期:2000-03-01。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770034)。

* 通讯联系人。

1.2 亚克隆构建与序列测定

根据参考序列^[5,6]的基因组结构和酶切位点对 pTMV-Cv 和 pN14 分别进行限制性酶切位点的切割和分析,并用 pUC18 和 pBluescript(M13-)KS 构建亚克隆。操作方法按文献^[4]。

DNA 测序反应使用 M13 正向及反向引物或 T3、T7 引物,测序方法为 T7DNA 聚合酶与 Taq DNA 聚合酶的手动测序(α -³⁵S]dATP 标记)和 377(version 3.0)全自动测序仪的机测(荧光素标记)。

1.3 DNA 序列与基因组结构特点的比较分析

利用 DNASTar 和 ANGIS.GCG 软件包对测定的 DNA 核苷酸序列及其开放阅读框架(ORF)多肽氨基酸序列同源性等作分析和比较。参比序列来自 Genbank,开放阅读框架的命名按 Rosel 等人的命名规则,同源性比较按 Jotun Hein 的方法进行。

2 结果与讨论

2.1 TMV-Cv 和 TMV-N14 cDNA 酶切图谱与亚克隆构建

TMV-Cv 与 TMV-N14 cDNA 的部分限制酶酶切结果表明与参比序列^[5,6]的酶切位点基本相同。以这些酶切位点构建了 TMV-Cv cDNA 亚克隆 16 个,其中 4 个亚克隆以 pBluescript(M13-)KS 为载体,其余以 pUC18 为载体;TMV-N14 cDNA 亚克隆 9 个,均以 pUC18 为载体(图 1)。

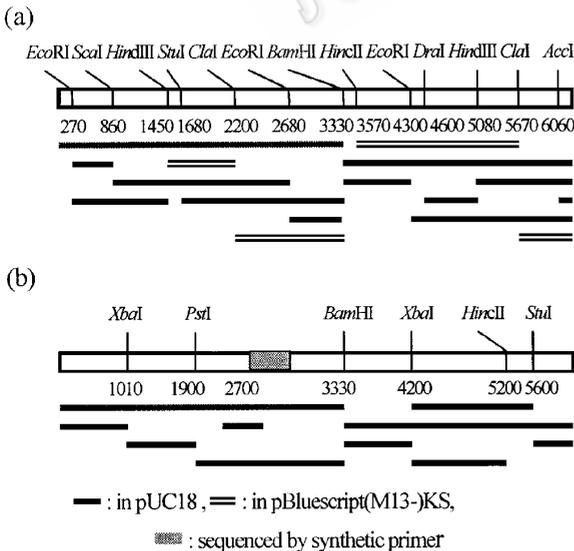


图 1 TMV-Cv(a)和 TMV-N14(b) cDNA 酶切图谱及亚克隆示意图

Fig. 1 Enzyme maps and subclones of TMV-Cv(a) and TMV-N14(b) cDNAs

2.2 TMV-Cv 与 TMV-N14 cDNA 核苷酸序列测定结果与分析

从序列测定的结果(Genbank: AF165190, AF155507)可见, TMV-Cv 和 TMV-N14 cDNA 的核苷酸总数不同,碱基组成的比例也不相同;每个 ORF 的起始密码子均为 ATG,但位点不同;终止密码及其位点有部分不同,因而编码产物的大小也有变化。TMV-Cv 全长 6395bp, 126kD/183kD、30kD(运动蛋白) 17.6kD(外壳蛋白)蛋白分别起始于核苷酸序列 69、4903、5712 位;终止于 3419/4919、5709、6191;终止密码子分别为 TAG/TAA、TAA。TMV-N14 98.5kD/126kD/183kD、27kD(运动蛋白) 17.6kD(外壳蛋白)蛋白分别起始于核苷酸序列 72、4906、5703 位;终止于 2672/3422/4922、5634、6182;终止密码子分别为 TGA/TAG/TAA、TAA(表 1)。

表 1 TMV-Cv 与 TMV-N14 基因组结构

Table 1 Genome structures of TMV-Cv and TMV-N14

	TMV-Cv	TMV-N14
Total genome size	6395nt	6384nt
5' Non-coding region	1~68(68nt)	1~71(71nt)
98.5kD protein cistron (Number of amino acid residues)	—	72~2672 (867 a. a.)
126kD protein cistron (Number of amino acid residues)	69~3419 (1115 a. a.)	72~3422 (1115 a. a.)
183kD protein cistron (Number of amino acid residues)	69~4919 (1615 a. a.)	72~4922(?) (1615 a. a. ?)
Movement protein cistron (Number of amino acid residues)	4903~5709 (267 a. a.)	4906~5634 (241 a. a.)
Coat protein cistron (Number of amino acid residues)	5712~6191 (158a. a.)	5703~6182 (158a. a.)
	6192~6395	6183~6384
3' Non-coding region	(204nt)	(202nt)

2.3 TMV-Cv 和 TMV-N14 cDNA 核苷酸序列与参比序列的比较

TMV-Cv 与普通株朝鲜分离物^[5](TMV-vulgare, Korean isolate),基因组的核苷酸总数相同,碱基组成的同源率在 99% 以上;二者各个 ORF 的起始密码、总数和终止密码相同;仅 126kD/183kD 蛋白和运动蛋白的核苷酸及氨基酸有少量变异(表 2)。

表 2 TMV-Cv 与 TMV-vulgare 基因组结构比较

Table 2 Genome structural comparison of TMV-Cv and TMV-vulgare

	TMV-30	TMV-vulgare	Average sequence homology/%
Total genome size	6395nt	6395nt	99.4
5' Non-coding region	1~68(68nt)	1~68(68nt)	100
126kD protein cistron	69~3419	69~3419	99.5
(Number of amino acid residues)	(1115 a. a.)	(1115 a. a.)	(99.8)
183kD protein cistron	69~4919	69~4919	99.5
(Number of amino acid residues)	(1615 a. a.)	(1615 a. a.)	(99.7)
Movement protein cistron	4903~5709	4903~5709	98.8
(Number of amino acid residues)	(267 a. a.)	(267 a. a.)	(99.3)
Coat protein cistron	5712~6191	5712~6191	100
(Number of amino acid residues)	(158a. a.)	(158a. a.)	(100)
3' Non-coding region	6192~6395 (204nt)	6192~6395 (204nt)	99.9

TMV-N14 与番茄株(强株)日本分离物^[6] (TMV-L Japanese isolate), 基因组的核苷酸总数相同, 碱基组成的同源率也在 99% 以上; 二者各个 ORF 的起始密码和终止密码相同; 但 TMV-N14 由于 2670~2672nt 发生了乳石突变(UGA), 翻译提前终止形成 98.5kD 蛋白, 该乳石突变可被通读, 形

成 126kD 蛋白, 而 183kD 蛋白的形成须通读 UGA 和 UAG, 因而产量可能较少; 此外 TMV-N14 运动蛋白基因在 5634bp 发生的赭石突变(UAA)致使其正常翻译提前终止, 比强株的运动蛋白小约 2kD (表 3)。

表 3 TMV-N14 与番茄强株(TMV-L)基因组结构比较

Table 3 Genome structural comparison of TMV-N14 and TMV-L

	TMV-L	TMV-N14	Average sequence homology/%
Total genome size	6384nt	6384nt	99.7
5' Non-coding region	1~71(71nt)	1~71(71nt)	100
98.5kD protein cistron	—	72~2672	
(Number of amino acid residues)		(867 a. a.)	
126kD protein cistron	72~3422	72~3422	99.6
(Number of amino acid residues)	(1115 a. a.)	(1115 a. a.)	(99.1)
183kD protein cistron	72~4922	72~4922(?)	99.6
(Number of amino acid residues)	(1615 a. a.)	(1615 a. a.?)	(99.2)
Movement protein cistron	4906~5700	4906~5634	100
(Number of amino acid residues)	(263 a. a.)	(241 a. a.)	(100)
Coat protein cistron	5703~6182	5703~6182	100
(Number of amino acid residues)	(158a. a.)	(158a. a.)	(100)
	6183~6384	6183~6384	
3' Non-coding region	(204nt)	(204nt)	100

2.4 由 TMV-Cv 和 TMV-N14 cDNA 推断的 ORF 多肽氨基酸残基序列与参比序列的比较分析

TMV-Cv 与 TMV-vulgare 在 126kD/183kD 蛋白共有 5 个氨基酸变异: 790 :Asp-Asn ;921 :Ala-Thr ;1134 :Ala-Thr ;1199 :Ile-Met ;1530 :Ala-Val(图 2); 可见 TMV-Cv 126kD/183kD 蛋白中丙氨酸的残基数增多, 蛋白的疏水性增强。

TMV-Cv 与 TMV-vulgare 在运动蛋白有 2 个

氨基酸变异: 229 :Asp-Val ;249 :Leu-Phe。

TMV-N14 与 TMV-L 在 126kD/183kD 蛋白共有 13 个氨基酸变异: 34 :Ala-Thr ;335 :Thr-Ala ;349 :Tyr-Cys ;385 :Asn-Ser ;510 :Arg-Lys ;636 :Pro-Ser ;760 :Asp-Asn ;774 :Arg-His ;867 :无义密码-Arg ;895 :Arg-Gly ;1285 :Met-Leu ;1371 :Tyr-Phe ;1376 :Asn-Ser(图 3)。

TMV-N14 与 TMV-L 在运动蛋白除氨基酸残基
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

.....	110
MAYTQTATTSALLDVTYRGNNSLVNDLAKRRLDYDTAVEEFNARDRRPKVNFVSKVISEEQTLIATRAYPEFQITFYNTQNAVHSLAGGLRSLSELEYLMMQIPYGSITYDIGG	110
.....	220
NFASHLFPKGRAYVHCCMPNLDVRDITMRHEGQKDSIELVLSRLEERGKTPVNFQKEAFDRYAELPEDAVCHNTFQTMRHQPMQSGRVYAIALHSIYD1PADEFGAALLRK	220
.....	330
NVHTCYAAHFSENLLEDSSYVNLDEINACFSRDGDKLTFSEFSESTLNHYCHSYSNILKYVCKTYFPASNREYVMKEFLVTRVNTWFCKFSRIDTFLLYKGVAKSVDSSE	330
.....	440
QFYTAMEDAWHYKKTLMCNSERILLEDSSSVNYWFPKMRDMVIVPLFDISLETSKRTRKEVLVSKDFVFTVLNHIRTYQAKALTYANVLSFVESIRSRVIINGVTARSE	440
.....	550
WDVDKSLQLSLSMTFYLHTKLAVLKDDLLISKFSLGSKTVCQHVWDEISLAFGNAPPVSKERLLNRKLIIRVAGDALEIRVPDLYVTFHDRLVTEYKASVDMPALDIRKMK	550
.....	660
EETEVMYNALSELVLRSDKFDVDVFSQMCQSLEVDPMATAAKVIVAVMSNESGLTLTFERPTEANVALALQDQEKASEGALVVTSREVEEPPSMKSGMARGELQLAGLAG	660
.....	770
DHPESYSRNEEIESLEQFHMATADSLIRKQMSIYVYTPKIVQMQKNFIDSLVASLSAAVSNLYKILKDTAAIDLETRQKFGVLDVASKRWLIKPTAKSHAWGVVETIHA	770
.....	880
..... D.	880
RKYHVALLEYDEQGVVTCDNWRRVAVSSBSVVYSDMAKLRTRLRLLRNCEPHVSSAKVVLVDGVPQCGKTEILSRVNFDEDLILVPGKQAAEMIRRRANSSGIIVATKD	880
.....	990
..... A.	990
NVKTVDSPMNFQKSTRQCQKRLFIDEGLMLHTGCNVNLFVITMSLCEIAYVYGDYQIPYINRVSGFPYPAHFVAKLEVDEVETRRITLRCPADVTHYLNRRYEGFVMTSS	990
.....	1100
VKKSVSQEMVGGAAVINPISKPLHGKILFTTQSDKBALLSRGYSVDVHTVHEVQGETYSVSLVRLTPTPVSIAGDSPHVLVALSRHTCSLKYYTVVMDPLVSIIRDLEK	1100
.....	1210
..... A. I.	1210
LSSYLLDMYKVDAGTQ.QLQIDSVFRKSNLAVATPKTGDIDSMQFYDYKCLPGNSTMMNNDVAVTMRITDLSLVKDCIILDMSKSVAAPKDQIKPLIPMVRTAAEMPRQT	1210
.....	1320
GLLENLVAMIKRNFAPPELSGIIIDIENTASLVYDKFFDSYLLKEKRKPKNKVSLFSRESLNRWLEKQEQVTIGQLADFDVVDLPAVDQYRHMIIKAQPKQLDTSIQTEYP	1320
.....	1430
ALQTIYVHKKINAIIFGLFSELTRQLLSDVSSRFLFFTRKTPAQIEDFFGDLDSHVPMVDLELDISKYDKSQNEFHCAVEYEIWRRLGFEDFLGEVWKQGRKTKLKD	1430
.....	1540
..... A.	1540
YTAGIKTCIWIYQRKSGDVTTFIGNTVIIAACLASMLPMEKIIKGAFCGDDSLLYFPKGCPEFDVQHSANLMMWFPAKLFKKQYGYFCGRYVIHHDRGCIYVYDPLKLSK	1540
.....	1617
..... TMV-Cv	1617
LGAKHIKDWEHLEEFRRSLCDVAVSLNNCAYYQLDDAVWEVHKTPAPGFSVYKSLVKYLSDKVLFRLSLFDGSSC. TMV-vulgar	1617

图 2 TMV-Cv 与 TMV-vulgar(朝鲜分离物)126kD/183kD 复制酶氨基酸残基同源性分析

Fig.2 Homology analysis of the predicted 126kD/183kD replicase amino acid residues in TMV-Cv and TMV-vulgare

基数不同外,无替代变异发生。预测的等电点分别为 9.248 和 7.998。TMV-N14 运动蛋白等电点变大表明其在 pH7.0 时,带正电较多,因此其在植物体中的功能可能发生了一定的变化,可能对 TMV-N14 的致弱有重要作用,这些尚需实验证实。

2.5 TMV-Cv 与 TMV-N14 复制酶基因终止密码子 UAG 和 UGA 的渗漏与通读

烟草花叶病毒复制酶(126kD)编码基因的翻译终止子 UAG,早已被证实可通读为酪氨酸(Tyr)。因为有实验表明^[7]在正常烟草组织细胞浆及叶绿体中发现一定数量的无义抑制 tRNA^{Tyr},通过反密码子 GΨA 识别终止密码 UAG 及其 3'端的基本序列 CAUUA 而获得通读, TMV-Cv 和 TMV-N14 分别在 3420~3426 和 3423~3429 处存在该序列,因而可以通读出 183kD 蛋白,这种通读的效率可达到 30%~40%。

弱毒疫苗 TMV-N14 复制酶基因由于在 2670~2672 发生乳石突变(UGA),产生 98.5kD 蛋白,该 UGA 是否可被通读而产生 126kD/183kD 蛋白? Karir^[8]和 Carster^[9]先后证明在烟草中带有反密码子 C_mCA 或 GCA 的无义抑制 tRNA^{Trp}或 tRNA^{Cys}可以通读 UGA 为色氨酸(Trp)或半胱氨酸(Cys),这种通读的机制虽然没有发现规律性的 mRNA 序列,但在终止密码上下游的氨基酸残基序列似乎有某种特征(表 4)。

从 6 个含有 UGA 终止密码的植物病毒 mRNA 序列分析可见,其通读的氨基酸序列结构为 Ξ×××*R×××,其中无义密码 5'端以碱性氨基酸(K,R)居多(表 4)。tRNA^{Trp}在烟草组织细胞浆和叶绿体中的通读效率分别为 20%~25%和 12%,而 tRNA^{Cys}在同样组织中的通读效率为 1.2%~3%和 5%。因此,RNA^{Trp}的通读效率比 RNA^{Cys}要明显高。

..... A	110
MAYTQTATSSALLETVRGNNTLVNDLAKRRLYDTAVDEFNARDRRPKVNFQVSEEQTLIATKAYPEFQITFYNTQNAVHSLAGGLRSLELEYLMMQIPYGS�TYDIGG	110
..... 220	220
NFASHLFKGRAYVHCCMPNLDVRDITMRHEGQKDSLEYLSRLERGNKHVPNFQKEAFDRYAEMPNEVCHDTFQTCRHSQECYTGRRVYAIALHSIYDIPADEFGAALLRK	220
..... 330	330
NVHVCYAAHFSENLLEDSHVNLDEINACFQRDGRDLTFSFASESTLNYSHSYNIKYVCKTYFPASNREVVYKFEFLVTRVNTWFCFKFSRIDTFLLYKGVAAHKGVDSE	330
..... T..... Y..... N.....	440
QFYKAMEDAWHYKKTILAMCNSERILLEDSVVNYWFPKMRDMVIVPLFDISLETSKRTRKEVLVSKDFVYTVLNHIRTYQAKALTYSNVLSFVSESIRSRVITINGVTARSE	440
..... R.....	550
WDVDKSLQLSLSMTFFLHTKLAVLKDLDLISKFALGPKTVSQHVWDEISLAFGNAPPKIKERLINRKLKIKITENALEIRVPDLYVTFHDLRVSEYKMSVDMPLVDIRKKM	550
..... P.....	660
EETEEMYNALSLSLVKNSDKFDVDFVFSQMCQSLEVPMTAAKVIIVAVMSNESGLTLTFEQPTANVALALQDSEKASD GALVVTSRDVEEPSIKGSMARGELQLAGLSG	660
..... D.....	770
DVPESYTRSEEIESLEQFHMATASSLIHKQMCSTVYTGPLKVVQMKNFIDSLVASLSAAVSNLVKILKDTAAIDLETRQKFGVLDVASKRWLVKPSAKNHAWGCVVETHA	770
..... R..... *	880
RKYHVALLEHDEFGIITCDNRRRVAYSSSESVVSDMAKRLRLRLLKDGEPHVSSAKVVLVDGVPKCGKTKELSRVNFEDLILVPGQAEMIRRRANASGIIIVATKD	880
..... R.....	990
NVRTVDSFLMNYGKGARCFKRLFDIEGLMLHTGCVNPLVEMSLCDIAYVYGDGTQQIPYINRVIGFPYPAHFALKEVDEVETRRTTLRCPADVTHFLNQRVEGHVMCTSS	990
..... 1100	1100
EKKSVSQEMVSGAASINPVSFKPLKGLITFTQSDKEALLSRGYADVHTVHEVQGETYADVSLVRLTPTPVSIARDSPHVLVLSRHTKSLKYYTVVMDPLVSIIRDLEK	1100
..... 1210	1210
VSSYLLDMYKVDAGTQQLQVDSVFKNFNLVFAAPKGTGDISDMQFYFDKCLPGNSTLLNNYDAVTMKLTDISLVNKDCTLDMSSKVAAPKDVKPTLIPMVRTAAEMPRQT	1210
..... M.....	1320
GLLENLVAMIKRNFNSPELSGVVDIENTASLVVDKFFDYSLLKEKRPKNFSPFSRESLNRWIAKQEQTIGQLADFDVLDPAVDQYRHMKAQPKQKLDLSIQTEYP	1320
..... Y..... N.....	1430
ALQTIYVYHSKKINAFGLPFSSELTRQLDSDSSRFLFFTRKTPAQIEDFFGDLDSHVPMVLELDVSKYDKSQNEFHCAVEYEIWRRLGLEDFLAEBWKQGHKRTTKLD	1430
..... 1540	1540
YTAGIKTCLWYQRKSGDVTTFIGNTVIIASCLASMLPMEKLIKGFAPCGDSSLYPFKGCEYDPDIQQAANLMWNFEAKLFKKQYGYFCGRYVHHDRGCIYVYDPLKLSK	1540
..... TMV-N14	1617
LGAKHIKDWDLHEEFRRSLCDVAESLNCCAYYTLQDDAVGEVHKTAPPGSFYKSLVKYLSDKVLFRLFLDGGSSC. TMV-L	1617

图3 TMV-N14与TMV-L(日本分离物)98.5kD/126kD/183kD复制酶氨基酸残基同源性分析

Fig.3 Homology analysis of the predicted 98.5kD/126kD/183kD replicase amino acid residues in TMV-N14 and TMV-L

表4 具有UGA终止子的部分不同植物病毒基因组通读区序列分析

Table 4 Natural UGA read-through sites in some different plant viruses

Virus	Genus	Sequence of the read-through region									Reference
TRY (RNA-1)	Tobravirus	E	T	V	L	*	R	F	R	S	[10]
PEBV (RNA-1)	Tobravirus	D	A	M	K	*	R	C	R	S	[11]
SBWMV (RNA-1)	Furovirus	E	L	T	K	*	R	F	G	S	[12]
PCV (RNA-1)	Furovirus	E	Q	T	K	*	R	F	G	S	[13]
SBWMV (RNA-2)	Furovirus	E	G	S	S	*	R	D	G	V	[12]
TMV-N14 (RNA)	Tobamovirus	E	M	I	R	*	R	A	N	A	
		GAG	AUG	AUC	AGA	UGA	AGA	GCU	AAU	GCG	

要产生183kD蛋白,必须对98.5kD和126kD蛋白连续通读,按tRNA^{Tyr}和tRNA^{Trp}的最大通读效率计算,为10%,产量较少,因而功能活动可能微弱。此外UGA的渗漏终止不但使126kD蛋白的翻译提前

终止形成98.5kD蛋白,并在其下游出现一个小的ORF,编码一个25.6kD的蛋白,其功能可能类似于126kD下游54kD蛋白^[14]。因此,与烟草花叶病毒强株(普通株或番茄株)相比,TMV-N14复制酶基

因的突变所形成的 98.5kD/126kD 蛋白和 25.6kD 蛋白可能是病毒侵染普通烟草后,既能复制却不表现系统症状而且能保护宿主免受攻击病毒侵染的主

要原因。这种复杂的机制是病毒与寄主之间相互作用的结果,有待实验证明。

参 考 文 献

- [1] Po T(田波),Xiu-hua C(张秀华). *Seed Sci and Technol* ,1983 ,**11** :969~974
- [2] Lu B,Stubbs G,Culver J N. *Virology* ,1998 ,**248** :188~198
- [3] 杨 恭,邱井生. *生物工程学报* 2000 ,**16**(2) :207~210
- [4] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. *Molecular Cloning ,A Laboratory Manual* 2nd Ed ,Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Press ,1989
- [5] Koh H K,Song E K, Lee S Y *et al.* *Nucleic Acids Res* ,1992 ,**20**(20) :5474
- [6] Ohno T,Aoyagi M,Yamanashi Y *et al.* *J Biochem* ,1984 ,**96**(6) :1915~1923
- [7] Zerfass K,Beier H. *Nucleic Acids Res.* ,1992 ,**20**(22) :5911~5918
- [8] Zerfass K,Beier H. *The EMBO J* ,1992 ,**11**(11) :4167~4173
- [9] Urban C,Beier H. *Nucleic Acids Res.* ,1995 ,**23**(22) :4591~4597
- [10] Hamilton W D O,Boccaro M,Robinson D J *et al.* *J Gen Viro* ,1987 ,**68** :2563~2575
- [11] MacFarlane S A,Taylor S C,King D I *et al.* *Nucleic Acids Res* ,1989 ,**17** :2245~2260
- [12] Shirako Y,Wilson T M. *Virology* ,1993 ,**195** :16~32
- [13] Herzog E,Guilley H,Manohar S K *et al.* *J Gen Viro* ,1994 ,**75** :3147~3155
- [14] Carr J P,Marsh L E,Lomonosoff G P *et al.* *Mol Plant Microbe Interact* ,1992 ,**5**(5) :397~404.

Complete Nucleotide Sequences and Genome Structure of Two Chinese Tobacco Mosaic Virus Isolates Deduced from Full-length Infectious cDNA Clones

YANG Gong LIU Xiang-Guo QIU Bing-Sheng*

(*Department of Molecular Virology and Bioengineering ,Institute of Microbiology ,
The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080*)

Abstract The complete nucleotides of two Chinese tobacco mosaic virus (TMV) isolates ,TMV-Cv (vulgare strain) and TMV-N14 (an attenuated virus originated from a tomato strain) ,were determined from their respective full-length infectious cDNA clones and compared with published TMV sequences. The genome structure of TMV-Cv contained 6395 nucleotides in which four functional open reading frames (ORF) ,coding for replicase (126kD/183kD) ,movement protein (MP ,30kD) and coat protein (CP ,17.6kD) respectively ,could be recognized. TMV-N14 contained 6384 nucleotides in its genome. In contrast to TMV-Cv ,five functional ORFs encoding the replicase 98.5kD/126kD/183kD ,MP (27kD) and CP (17.6kD) ,respectively ,were detected in the TMV-N14 genome. TMV-Cv is 99% homologous to a Korean TMV isolate belonging to the vulgare strain at the nucleotide level. TMV-N14 is 99% homologous to a highly virulent Japanese isolate TMV-L (tomato strain) at the nucleotide level. In TMV-N14 ,one opal nulation (UGA) occurred in the replicase gene and one ochre mutation (UAA) in the MP gene. The former mutation created a potential ,additional ORF within the replicase gene ,the latter reduced the size of the MP to 27kD. In addition ,there were also 13 amino acid substitutions in the replicase gene of TMV-N14 when compared to that of TMV-L. Collectively , these changes may have significant implications in the attenuation of the virulence of TMV-N14.

Key words TMV-Cv ,attenuated vaccine strain TMV-N14 ,cDNA ,sequencing