

甜菜坏死黄脉病毒外壳蛋白基因的克隆和序列分析

姚华建 刘 仪 于嘉林 蔡祝南 敖光明 杨莉莉

(北京农业大学国家农业生物技术重点实验室, 北京 100094)

以甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)内蒙分离物的RNA为模板,通过PCR扩增获得外壳蛋白(CP)基因的目的片段。将其重组到pGEM-7zf(+)并转化JM101得到了含有完整CP基因的重组子。采用双脱氧终止法进行序列分析,结果表明CP基因为567nt,与文献[1]报道相比,氨基酸和核苷酸的同源性分别为98.4%和96.7%。

关键词 甜菜坏死黄脉病毒;外壳蛋白基因;序列

甜菜是我国重要制糖工业原料之一。自1978年以来,我国先后在内蒙、新疆、宁夏等地发现了甜菜丛根病(rhizomania),此病害对甜菜的产量及含糖量的影响十分严重^[2]。甜菜丛根病是由甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)引起的,通过甜菜多粘菌(*Polymyxa betae*)传播^[3]。目前还没有理想的方法来防治该病害。Kallerhoff等^[4]利用土壤农杆菌成功地将BNYVV CP基因转到甜菜原生质体中并得到了表达,转基因的原生质体对BNYVV具有明显的抗性。Ehlers等^[5]利用发根农杆菌将BNYVV CP基因转到甜菜组织中并在发状根中检测出了它的表达。通过土壤农杆菌转化甜菜并再生成植株已有成功的报道^[6],这就为培育抗BNYVV的转基因甜菜提供了一个途径。为此,我们拟构建BNYVV CP基因,并将其转入到甜菜中,以期利用基因工程技术防治甜菜丛根病。

材 料 和 方 法

(一)BNYVV的繁殖和提纯

由内蒙甜菜产区的发病田块取样,分离得到BNYVV内蒙分离物。汁液磨擦接种到番杏(*Tetragonia expansa*)上繁殖。BNYVV的提纯按陈小江^[7]的方法进行。提纯的病毒悬浮于硼酸缓冲液中,4℃保存。

(二)BNYVV RNA的提取

提纯的BNYVV经苯酚/氯仿(1:1)反复抽提,上清加2倍体积的无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,干燥,悬浮于重蒸水中,-20℃保存。

(三)BNYVV CP基因的PCR扩增

1.引物的合成:依据Bouzoubaa等^[11]报道的BNYVV RNA2序列,设计并合成了两个引物。引物1(与BNYVV RNA2的720—747核苷酸互补):5' ATTCGA-ATGTGTGCCGTCACCC3',引物2(与BNYVV RNA2的75—94核苷酸相对应):5' GCGAATTCAGGGCCCT-ACTTTAAA3'。

2. BNYVV CP基因cDNA的合成:以提纯的BNYVV内蒙分离物RNA为模板,在引物1的引导下,反转录合成

本文于1992年5月25日收到。

cDNA第一条链。反应条件为: 20 μ l 反应体系中含 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.3, 25 $^{\circ}$ C), 50mmol/L KCl, 4mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.01% (w/v) gelatin, 200 μ mol/L dNTPs, RNasin (Promega) 20u, BNYVV RNA 1.5 μ g, 引物 1 50 pmoles, AMV反转录酶 (Promega) 30u, 42 $^{\circ}$ C 1.5 h。

3. CP基因的PCR扩增: 在BNYVV CP基因cDNA第一条链合成完毕后, 95 $^{\circ}$ C 变性5min, 加入50pmoles 引物 2 和1.5u Taq DNA 聚合酶(华美生物工程公司), 按下列反应条件进行扩增: 100 μ l 反应体系中含 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50mmol/L KCl, 1.5mmol/L $MgCl_2 \cdot$

6H₂O, 0.01% (w/v) gelatin, 200 μ mol/L dNTPs。用100 μ l石蜡油覆盖, 进行30个循环。每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸3 min。扩增完毕后, 加3u的 DNA 聚合酶 I Klenow 片段进行补齐, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查, 回收目的片段。

(四) BNYVV CP基因的克隆和筛选
基因克隆、筛选和质粒提取均参照 Sambrook等^[8]的方法进行。

克隆载体 pGEM-7zf(+)用 Sma I 切成平齐末端和回收的目的片段连接并转化JM101。经选择性培养基筛选, 碱法提取质粒, 电泳和酶切鉴定外源片段的插入情况。

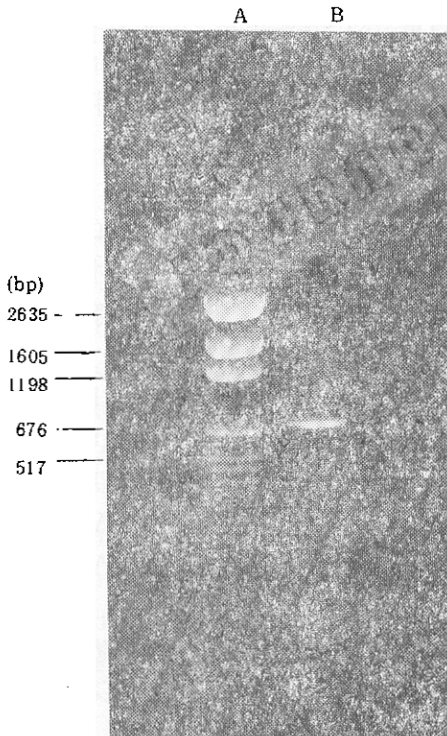


图 1 PCR产物的凝胶电泳

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of PCR products
A. pGEM DNA markers
B. PCR products

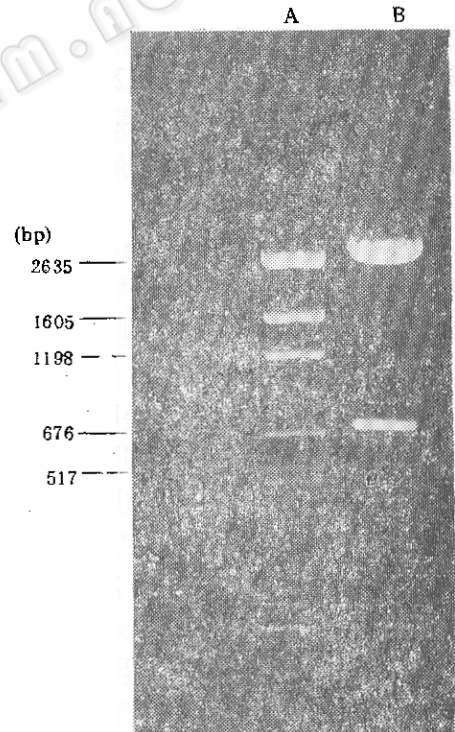


图 2 重组质粒pGC24双酶切的凝胶电泳
Fig. 2. The agarose gel electrophoresis of pGC24 digested
A. pGEM DNA markers
B. pGC24 digested with Xho I and Hind III

结果与讨论

(一) BNYVV CP 基因的PCR扩增

0.8%琼脂糖凝胶电泳检查PCR扩增的结果表明,所扩增的目的片段大小约为680bp(图1),与设计相符。

(二) CP基因的克隆

用 Xho I 和 Hind III 双酶切筛选出的重组质粒,发现 pGC24 含有所需的完整 CP 基因片段(图2)。

(三) 序列分析

序列分析结果表明,重组质粒 pGC24 插入片段全长为679nt(包括46nt人工合成引物),其中含有 BNYVV 内蒙分离物 CP 基因的完整编码区567nt, CP 基因5'端含有74nt的非编码区,3'端含有30nt的非编码区(图3)。经PCR扩增得到的片段的核苷酸序列与 Bouzoubaa 等^[1]报道的 F₁

相应片段的序列的同源性为96.7%。由此序列推出的 BNYVV 内蒙分离物氨基酸序列与 F₁ 氨基酸序列相比较,只有3个不同,同源性为98.4%。这一结果进一步证实了不同来源的甜菜坏死黄脉病毒,尽管在 RNA 组分上会有差异,但它们在血清学上具有高度的同源性的结论^[10]。

由外壳蛋白介导的抗性已在多种转基因的植物上得到了证实^[11]。尽管在甜菜原生质体和发状根中证明了 BNYVV CP 基因的表达^[4,6],但是至今还没有成功地再生出转 BNYVV CP 基因的甜菜植株。我们现已将 BNYVV 内蒙分离物的 CP 基因克隆至 pBI 121, 构建成含有花椰菜花叶病毒 35 S 启动子的中间载体,利用 Lindsey 和 Gallois^[6]的方法通过土壤杆菌 LBA4404 转化甜菜,获得了抗性的不定芽。正在做进一步的转化和筛选,以期选育到抗 BNYVV 的转基因甜菜植株。

参 考 文 献

- [1] Bouzoubaa, S. et al., *J. Gen. Virol.*, 67:1689—1700, 1986.
- [2] 高锦梁等: 植物病理学报, 13(2):1—4, 1983.
- [3] Tamada, T., C. M. I. A. A. B. *Descrip. Plant Viruses*, No. 144, 1975.
- [4] Kallerhoff, J., et al., *Plant Cell Rep.*, 9:224—228, 1990.
- [5] Ehlers, U., et al., *Theor. Appl. Genet.*, 81:777—782, 1991.
- [6] Lindsey, K. and Gallois, P., *J. Exp. Bot.*, 41:529—536, 1990.
- [7] 陈小江: 病毒学报, 2(2):58—58, 1988.
- [8] Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning* (2ed. edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, 1989.
- [9] Titus, D. E., *Protocols and Application Guide* (2ed. edition), Promega Corporation, Madison, 1991.
- [10] Kuszala, M. et al., *Ann. Appl. Biol.*, 109:155—162, 1986.
- [11] Beachy, B. N. et al., *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28:451—474, 1990.

The Cloning and Sequencing of Coat Protein Gene from Beet Necrotic Yellow Vein Virus

Yao Huajian Liu Yi Yu Jialin Cai Zhunan

Ao Guangmin Yang Lili

(National Laboratories for Agrobiotechnology, Beijing Agricultural
University, Beijing 100094)

The beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) isolate NM was isolated from sugarbeet infected with rhizomania in Inner Mongolia of China. The cDNA of BNYVV coat protein (CP) gene was amplified from the extracted RNA of BNYVV isolate NM by using the polymerase chain reaction (PCR), and cloned into pGEM-7zf(+). Its complete nucleotide sequence has been determined by means of Sanger's dideoxy-mediated chain-termination method. The result shows that BNYVV isolate NM CP gene has 567nt. It shares 98.4% and 96.7% identity with CP gene of isolate F₁₃ in terms of amino acid and nucleotide sequence respectively.

Key words Beet necrotic yellow vein virus; coat protein gene; sequence