

葡萄扇叶病毒外壳蛋白基因的克隆, 序列分析及其在大肠杆菌中的表达

管汉成 蔡文启 莽克强

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 通过 RT-PCR 方法把葡萄扇叶病毒 (GFLV) 外壳蛋白基因 (CP gene) 分成两部分扩增, 扩增产物克隆入 pGEM-5Zf (+) 载体, 并通过 Bgl I 位点连接成一完整的外壳蛋白基因, 通过序列分析测得全长外壳蛋白基因为 1512bp, 编码 504 个 AA's, 与国外株系 GFLV-F13 相比, 核苷酸同源率为 88.4%, 氨基酸同源率为 95.8%。并且这一外壳蛋白基因在大肠杆菌 *E. coli* DH-5 α 中得到了表达。

关键词 葡萄扇叶病毒, 外壳蛋白基因, RT-PCR

葡萄扇叶病毒 (Grapevine fanleaf virus, GFLV) 是葡萄病毒危害中引起产量下降的主要病毒之一, 一般罹病葡萄可致果穗松散, 果粒变小, 甜度降低, 严重的可不结果, 国内由于长期无性繁殖及近年来盲目引种导致果园内病毒病发生日趋严重, 可使葡萄减产 20%~80%。

GFLV 属于蠕传多角病毒组 (Nepovirus)^[1], 其基因组由两条线性正义单连 RNA 组成, 组份 1 (RNA1) 包含一个大的开放阅读框架 (ORF), 约 7300 多个核苷酸, 负责编码具有病毒蛋白酶性质和 RNA 聚合酶功能的复合体, 组份 2 (RNA2) 约有 3700 多个核苷酸, 也含有一个 ORF, 其编码产物经具蛋白酶功能的 RNA1 翻译产物剪切加工后形成病毒的外壳蛋白 (Coat protein)^[2]。有的 GFLV 株系还含有一较小的卫星 RNA, 约由 1100 多个核苷酸组成^[3]。

我们从国内罹病葡萄中分离到了一株 GFLV-Gh^[4], 通过 RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) 技术克隆了其外壳蛋白基因 (CP gene), 序列分析后与国外株系的对应核苷酸序列进行了比较, 并在大肠杆菌中得到了表达。

1 材料和方法

1.1 质粒及工具酶

质粒 pGEM-5Zf (+) 购自 Promega, 表达载体 pBV 220 为中国预防医学科学院病毒学研究所张智清等人构建^[5]。限制酶, T4DNA 连接酶, T4DNA 聚合酶等均购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.2 GFLV 的提纯

GFLV 为本实验室分离得到, 摩擦接种繁殖于昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*), 15 d 后采收症状明显的叶片, 参照文献 [4] 提纯病毒。

1.3 GFLV-RNA 提纯及 cDNA 合成

本文于 1994 年 11 月 1 日收到。

RNA的提纯参照文献〔6〕进行, 以提纯的RNA为模板, 以Oligo(dT)为引物, 按Boehringer Mannheim公司cDNA合成Kit说明合成第一链, 经低熔点琼脂糖凝胶碱性电泳后回收cDNA大片段。

1.4 引物合成及PCR反应

参照M. A. Serghini^{〔7〕}报道的GFLV-RNA2序列设计两对引物, 把外壳蛋白基因分成两部分进行PCR扩增。第一对引物为: 1) 5' GCGATATCACCATGGGATTAGCTGGTAGAG, 2) 5'GAGAGATCTGGGCGCAC, 扩增出稍大于1kb的A片段, 第二对引物: 3) 5' GTGCGCCCAGATCTCTC, 4) 5' CAGTCGACACACTGTCGCCACT, 扩增出600多bp的B片段, 其中2、3引物为互补序列, 含有Bgl I位点, 这样克隆时借助这一位点可把两片段还原成完整的外壳蛋白基因, PCR反应条件参照Cetus公司PCR Kit说明, 94℃ 1min, 52℃ 1min, 72℃ 1.5min, 30个循环后72℃保温5min。

1.5 克隆

1.5.1 GFLV外壳蛋白基因中B片段的克隆: 第二对引物的PCR产物(600多bp的B片段)经T4DNA聚合酶补平后, 用T4DNA连接酶连接于经EcoRV切开的pGEM-5Zf(+)载体, 转化*E. coli* DH-5 α , 于含X-Gal和IPTG的氨苄(50 μ g/ml)培养基上37℃培养过夜, 挑选白色克隆, 提取质粒后用Bgl I和Sal I酶切后电泳分析, 选出阳性重组质粒pGB3。

1.5.2 GFLV完整外壳蛋白基因的获得: 第一对引物的PCR产物(1kb的A片段)补平后用Bgl I酶解; pGB3经Apa I酶切后补平, 再经Bgl I酶切后与酶切处理过的A片段连接, 转化*E. coli* DH-5 α , 于氨苄培养基上培养过夜后挑选克隆, 质粒经限制酶酶解后电泳分析, 得到阳性重组质粒pGAB5。构建策略见图1。

1.6 亚克隆及序列分析

pGAB5中外壳蛋白基因经不同限制酶酶切出不同大小的片段, 质粒经补平后自连, 转化*E. coli* DH-5 α , 得到含不同长度的GFLV外壳蛋白基因的亚克隆。序列测定参照Promega的Taq Track Sequencing Kit说明进行, 测序方案见图2。

1.7 GFLV外壳蛋白基因在*E. coli*中的表达

1.7.1 GFLV外壳蛋白基因克隆入表达载体pBV220: pBV220质粒经EcoR I酶切后补平, 再以Sal I酶切, 与经EcoRV和Sal I双酶切的GFLV CP gene相连, 转化*E. coli* DH-5 α , 得到阳性克隆pBV220-gCP。

1.7.2 诱导表达及表达产物的SDS-PAGE分析: 参照文献〔5〕进行。含pBV220-gCP的*E. coli* DH-5 α 于30℃摇床培养至OD₆₀₀为0.5, 迅速转至42℃摇床培养6h, 取1.5ml菌液, 离心收集菌体, 加入50 μ l样品缓冲液, 沸水浴5min, 离心后取10 μ l上清液作SDS-PAGE(10%)分析。

2 结果及分析

2.1 RT-PCR反应

以合成的cDNA第一链为模板, 第一对引物扩增出1kb左右靠近GFLV外壳蛋白基因5'端的A片段, 第二对引物扩增出近0.7kb靠近外壳蛋白基因3'端的B片段。

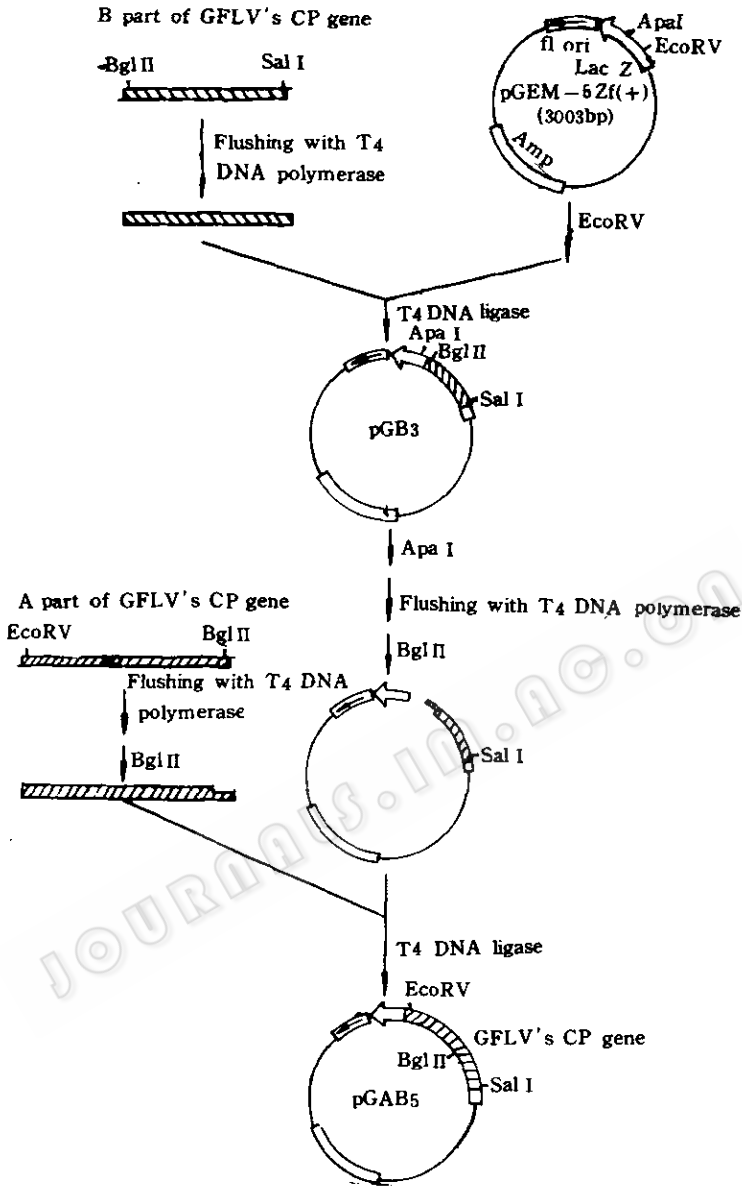


图1 GFLV 外壳蛋白基因的克隆策略

Fig. 1 The cloning strategy of GFLV's CP gene

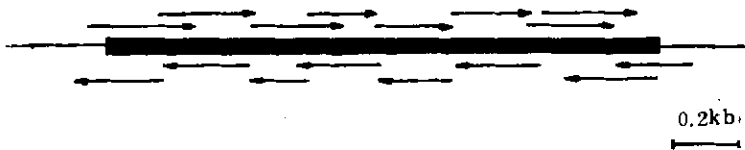


图2 pGAB5 的测序策略

Fig. 2 Sequencing strategy of pGAB5

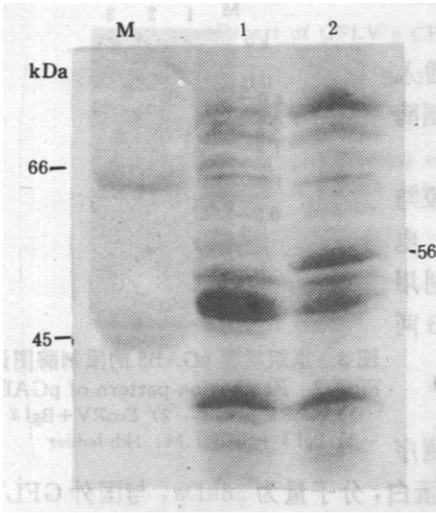


图 5 GFLV 外壳蛋白基因在大肠杆菌中表达后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of GFLV's CP expressed with pBV220-gCP in *E. coli*

F13 株系相同⁽⁷⁾。两种株系在编码区的核苷酸同源率为 88.4%，基因的差异主要是由碱基 A 与 G，C 与 T 之间的变换引起的。所编码的外壳蛋白氨基酸同源率为 95.8%，明显高于前者，说明外壳蛋白的保守性比其编码基因高。与 F13 株系相比，Gh 株系在 3' 非编码区的 1567nt 处缺失了 3 个核苷酸，但两种株系在 3' 端都含有三个串联的终止密码子，表现为一强的翻译终止效应（见图 4）。

2.4 外壳蛋白基因在 *E. coli* DH-5 α 中的表达

菌体经上样缓冲液处理后，上清液经 SDS-PAGE 分析，考马斯亮蓝染色结果见图 5。可看到经 42℃ 诱导后，表达出一条 56kDa 的蛋白条带，与 GFLV 的外壳蛋白分子量相符，表明在 *E. coli* DH-5 α 中得到了表达。

致谢：方荣祥研究员给予本文合理的建议和指导，特致谢意。

参 考 文 献

- [1] Bret A M, Morris-Krsinich, Forster R L S *et al.* Virology, 1983, 130: 523~526.
- [2] Margis R, Ritzenthaler C, Reinbolt J *et al.* J Gen Virol, 1993, 74: 1919~1926.
- [3] Pinck L, Fuchs M, Pinck M *et al.* J Gen Virol, 1988, 69: 233~239.
- [4] 蔡文启, 郭德银, 徐绍华等. 植物病理学报, 1990, 20 (2): 99~105.
- [5] 张智清, 姚立红, 侯云德等. 病毒学报, 1990, 6 (2): 111~116.
- [6] Fuchs M, Pinck M, Etienne L *et al.* Phytopathology, 1991, 81 (5): 559~565.
- [7] Serghini M A, Fuchs M, Pinck M *et al.* J Gen Virol, 1990, 71: 1433~1441.

The Cloning, Sequence Analysis and Expression in *Escherichia coli* of Coat Protein Gene of Grapevine Fanleaf Virus

Guan Hancheng Cai Wenqi Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Fragments of 5' end and 3' end of GFLV's coat protein gene (CP gene) were amplified separately through RT-PCR. The two products were cloned into vector pGEM-5Zf (+) and ligated into a whole CP gene via Bgl I restriction site. The DNA sequence of this gene has been determined, which contains 1512bp and encodes 504 amino acid residues. Comparison with strain GFLV-F13 shows 88.4% homology in nucleotides, and 95.8% similarity in amino acid residues. This CP gene has got expression in *E. coli*.

Key words Grapevine fanleaf virus (GFLV), coat protein gene, RT-PCR