

# 烟草花叶病毒运动蛋白基因的 cDNA 克隆、序列测定及植物转化

余晓红 朱玉贤 应华澄 陈章良

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

植物病毒侵染宿主植物的一个重要过程是通过它在宿主体内的转移和传播,产生病害<sup>[1]</sup>。植物病毒在宿主体内的转移主要有两种方式,一种是通过植物维管组织进行的系统转移,另一种是植物病毒在宿主细胞之间的转移,这种转移是通过植物细胞的胞间连丝实现的。实验表明,病毒自身编码的一种蛋白参与了 this 转移过程<sup>[2,3]</sup>,对烟草花叶病毒(TMV)而言,这种蛋白就是分子量为 30kDa 的运动蛋白<sup>[4]</sup>。

TMV 基因组是一条单链正链 RNA,全长 6395 个核苷酸,它至少编码 4 种蛋白<sup>[5]</sup>。为了探讨运动蛋白在促进病毒通过胞间连丝转移中所起的作用,从另一个方面尝试植物抗病毒育种的新途径,Cooper 等人<sup>[6]</sup>分别将 P30 的完整编码区及缺失突变 5'端与 RNA 结合区的突变基因导入烟草,发现转 P30 基因的植株发病明显快于对照组植株,而转突变 P30 基因的植株对病毒感染具有很强的抵抗作用。为了研究 P30 基因的病毒在感染过程中的作用机制,我们克隆了编码该蛋白的全长 cDNA,进行了序列测定并构建了插入方向相反的植物表达中间载体,分别进行烟草叶片的转化,目前已获得生长良好的转基因植株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒和植物材料:普通株系的 TMV 由中国科学院北京生物研究所提供;烟草“跃进一号”由本校生命科学学院植物发育及分子生物学系赠送。

1.1.2 菌株和质粒:转化受体菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、土壤农杆菌 LBA4404、克隆载体 pBluescript (BS)、中间载体 pE3 和协助质粒 pRK2013 均由本实验室提供。

1.1.3 酶和化学试剂:cDNA 合成试剂盒和 PCR 扩增试剂盒购自 Promega 公司;DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司; $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP 为 Amersham 产品; $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP 为北荆瑞公司产品;限制酶和其它生化试剂购自华美公司、Biolabs 公司和 Promega 公司。

1.1.4 人工寡核苷酸引物:由北京华美生物工程公司合成:5'端引物:5'-ATCTAGATG-GCTCTAGTT-3';5'端引物:5'-GGAGTAGTGATACTGTAAGAC-3'。

### 1.2 方法

1.2.1 基本技术:菌体的培养、质粒 DNA 的提取、酶切、回收、连接及转化均按文献 [8] 方法进行。

1.2.2 病毒 RNA 的提取:稀释的病毒液用水饱和苯酚、苯酚/氯仿、氯仿/异戊醇 (24:1) 各抽提一次,得到的病毒 RNA 溶于重蒸水中。

1.2.3 cDNA 第一链的合成:按照 Promega 公司的说明书进行。

1.2.4 PCR 扩增:按华美公司说明书进行。PCR 循环参数为:变性 (93 $^{\circ}$ C, 30s),退火 (50 $^{\circ}$ C, 1min),延伸 (72 $^{\circ}$ C, 2min),共 30 个循环。用 0.8% 的低熔点琼脂糖凝胶回收 PCR 扩增出的 0.8kb DNA 片段。

1.2.5 扩增产物的克隆:回收的扩增产物在 Mg<sup>2+</sup> 和 dNTP 存在下,经 T4DNA 聚合酶在 37 $^{\circ}$ C 处理 30min,68 $^{\circ}$ C 灭活 10min 后与 EcoRV 切开的 pBS 连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌,用 X-gal 和 IPTG 筛选重组子并进行酶切鉴定,然后用同样的载体作亚克隆。

1.2.6 DNA 序列测定:采用双脱氧终止法,按 Pharmacia 公司的程序进行。

本文于 1994 年 7 月 5 日收到。

1.2.7 植物表达中间载体的构建: 将克隆在 pBS 上的 MP cDNA 双酶切下来, 分别以正向和反向插入切开的中间载体 pE3 中 CaMV35S 启动子之后, 对重组子进行酶切和 PCR 鉴定。

1.2.8 植物转化: 用三亲交配法将含目的基因的重组中间载体导入土壤农杆菌 LBA4404 之中, 用叶盘法转化烟草<sup>(8)</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 TMV 运动蛋白基因的扩增

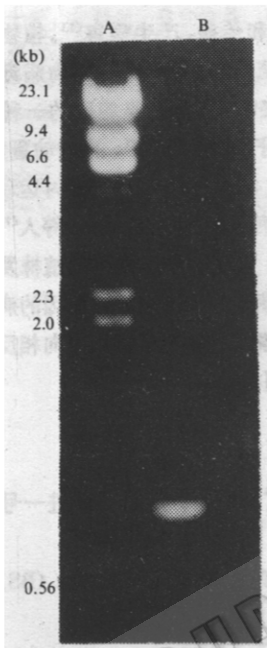


图 1 PCR 产物凝胶电泳

A:  $\lambda$ DNA/HindIII

B: PCR 产物 (约 800bp)

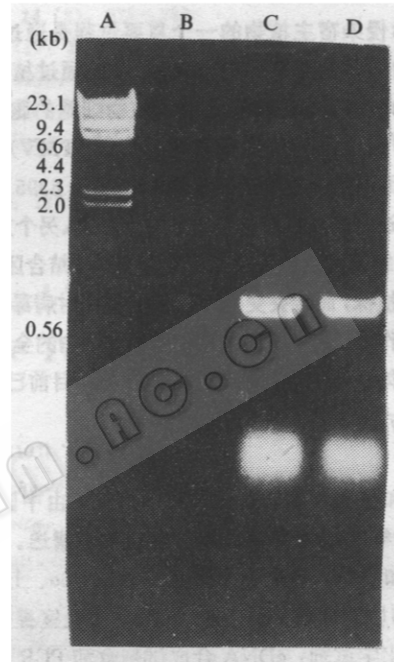


图 3 PCR 鉴定 pYE3 和 pYE12 转化的土壤农杆菌

A:  $\lambda$ DNA/HindIII; B: LBA4404 的 PCR;

C: pYE3 转化农杆菌的 PCR;

D: pYE12 转化农杆菌的 PCR

我们根据 TMV U1 株的全序列<sup>(4,10)</sup>, 合成 PCR 扩增所需要的 5' 及 3' 引物。为便于重组子的筛选, 在 5' 引物中还加入了一个 XbaI 酶切位点。先提取 TMV 总 RNA, 逆转录合成单链 cDNA, 并以此为模板, 用 PCR 法合成了一个特异的约 0.8kb 的 DNA 片段 (图 1), 这与预期的 MP cDNA 长度相符。

### 2.2 扩增产物的克隆和限制酶图谱

PCR 扩增后的产物理论上是平末端的, 可直接进行克隆。但近年内发现 Taq DNA 聚合酶具有转移活性, 常在 PCR 扩增产物末端另加一个或几个碱基, 给平端 DNA 片段直接克隆带来困难<sup>(11)</sup>。我们利用 T4 DNA 聚合酶的外切活性, 用适当的温度处理, 显著提高了 PCR 产物直接克隆的效率。补平的 PCR 产物与载体平端连接后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  株感受态细胞, 在含有 X-gal 和 IPTG 的选择培养基上得到了近百个白色菌落, 挑取 30 个菌落提取质粒 DNA, 进行电泳分析及 XbaI 酶切鉴定, 发现有 3 个质粒含有 0.8kb 的外源片段, 将其中一个重组子命名为 pMP3。构建 pMP3 插入片段的限制性酶切图谱, 并以 pBS 为载体进行亚克隆, 用于核苷酸序列分析 (数据未列出)。

### 2.3 亚克隆的序列测定

对 pMP3 中的外源片段进行了全序列测定, 发现它含有 1 个 807bp 的阅读框架, 编码 268 个氨基酸。与国外发表的 TMV U1 株运动蛋白基因 cDNA 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列<sup>(6,10)</sup>相比, 其同



段插入经 XhoI 和 EcoRI 双酶切的中间载体 pE3 中。进行反向克隆时,我们将 pMP3 中的外源片段用 EcoRI 和 BamHI 双酶切下来,插入经过 BglII 和 EcoRI 双酶切的 pE3 中。由于 BglII 和 BamHI 是同尾酶,酶切 DNA 后产生相同的粘性末端,这样,MP cDNA 仍能定向插入 pE3 中。

### 2.5 植物转化

用三亲交配法将重组的中间载体导入土壤农杆菌 LBA4404 中,用 PCR 法鉴定转化的土壤农杆菌(图 3)。用转化的土壤农杆菌液侵染烟草叶块进行烟草的转化,目前已获得在筛选培养基上生长良好的转基因小苗。植物体内正向表达运动蛋白基因,将导致病毒运动蛋白在正常植物细胞中的积累,有可能加速病毒核酸在细胞间通过胞间连丝的转运和扩散,由此可建立一个模式系统来研究运动蛋白与胞间连丝的功能及其相互作用。植物体内反向表达运动蛋白基因,意在得到反义 RNA,从而抑制病毒运动蛋白基因的表达,削弱病毒在植物体内通过胞间连丝的转移能力,获得抗病毒植株。由于运动蛋白功能的重要性,目前我们正在用 PCR 法对编码该蛋白基因的 5' 端进行不同的定位突变来研究其 N 端的功能,同时希望转基因植物中突变运动蛋白的大量表达能很好地抑制病毒的转移,从而获得抗病毒性能更好的植株。

### 参 考 文 献

- [1] 袁维著:植物病毒学,北京:科学出版社,1985。
- [2] Atabekov J G, Dorokhov Y L, *Adv Virus Res*, 1984, **29**: 313~364.
- [3] Atabekov J G, Taliansky M E. *Adv Virus Res.*, 1990, **38**: 201~208.
- [4] Hull R. *Annu Rev Phytopathol.* 1989, **27**: 213~240.
- [5] Kamer G, Argos P, *Nucleic Acids Res.* 1984, **12**: 7269~7282.
- [6] Geolet P, Lomonosoff G, Butler P J G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**: 5818~5822.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [8] Horsch R B, Ery J E, Hoffmann N L *et al.* *Science*, 1985, **227**: 1229~1231.
- [9] Meshi T, Ohno T, Okoda Y, *J Biochem*, 1982, **91**: 1441~1444.
- [10] Mead D A, Pey N K, Herrustadt T *et al.* *Bio/Technology*, 1991, **9**: 657~663.

## Molecular Cloning, Nucleotide Sequencing and Plant Transformation of a cDNA Coding for the Tobacco Mosaic Virus Movement Protein

Yu Xiaohong Zhu Yuxian Ying Huacheng Chen Zhangliang

(The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract** RNA was isolated from tobacco mosaic virus (common strain) and was used to synthesize first strand of the cDNA with AMV reverse transcriptase and synthetic oligonucleotides as primers. We obtained a specific 0.8kb DNA fragment by PCR technique. The restriction map of our DNA fragment was analyzed and the entire nucleotide sequence determined after it was cloned into pBluescript. In comparison with data available in the literature, we showed that the entire cDNA coding for the TMV movement protein has been cloned from a Chinese isolate. We found also that it is highly homologous both in DNA and in deduced amino acid sequences to that of previously reported (with 98% identity). The cDNA was inserted into a binary vector in different orientations and transformed into tobacco leaves via the agrobacterium-mediated method. Molecular characterization of regenerated plants verifies its transgenicity.

**Key words** Tobacco mosaic virus, movement protein, molecular cloning, sequence, plant transformation