

香蕉花叶病毒外壳蛋白基因克隆 及表达载体的构建

杜道林^{1,2}, 苏杰¹, 周鹏², 刘志晰², 邓晓东², 郑学勤²

(1. 海南师范学院生物系, 海南海口 571158; 2. 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南海口 571101)

摘要: 从海南大田感染香蕉花叶病的香蕉叶片, 获得香蕉花叶病毒, 提纯其 RNA, 在 AMV 反转录酶作用下合成 cDNA 第一链, 经 PCR 扩增, 获得一约 700 bp 的 DNA 片段, 测序结果显示所克隆的 DNA 片段包含一完整的香蕉花叶病毒株系 (CMV-BHI) 外壳蛋白基因, 长度为 657 bp, 然后将此 DNA 片段, 分别克隆到 pBI121 和 pKHG4 质粒, 构成两个含 CaMV35s 启动子 (5'-端)、NOS 终止子 (3'-端) 和分别含 NPT I 标记基因和 NPT II 及 HPT 标记基因的植物表达载体 (pTBB 和 pTBK)。然后用 γ AHC18 中的 UBI promoter 换下 pBI121 的 CaMV35s promoter, 构成 pBIAH; 再用 CMV-BHI 外壳蛋白基因换下 pBIAH 中 GUS 基因, 构成一含单子叶植物启动子 UBI 和 NPT I 标记基因的植物表达载体 (pTBBU)。从而为 CMV-BHI 外壳蛋白基因在香蕉中表达打下了基础。

关键词: 香蕉花叶病毒; 外壳蛋白基因; 克隆; 测序; 植物表达载体

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)01-0081-04

Cloning and reconstruction of expression vector of the banana mosaic virus coat protein gene

DU Dao-lin^{1,2}, SU Jie¹, ZHOU Peng², LIU Zhi-xin²,
DEN Xiao-dong², ZHENG Xue-qin²

(1. Department of Biology, Hainan Normal College, Haikou, 571158, China; 2. National Key
Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, CATAS, Haikou, 571101, China)

Abstract: A DNA fragment about 700 bp obtained from the first strand of cDNA which synthesized with a viral RNA template extracted from viral particles (CMV-BHI) isolated from propagation host banana in Hainan by using AMV reverse transcriptase and 3'-end PCR primer after 35 PCR amplification cycles. It was cloned into T-Easy vector. The whole DNA sequence was determined and the results showed that the entire gene (657 bp) encoding the coat protein had been cloned. Then two plant expression vectors (pTBB and pTBK) were reconstructed with the coat protein gene being cloned into pBI121 and pKHG4 respectively. And the third plant expression vector (pTBBU) was constituted by UBI promoter digested from pAHC18 exchanging with CaMV 35s promoter of pBI121, and then using 657 bp coat protein gene exchanging the GUS gene. All the three recombinants were screened with endonuclease digesting and DNA dot blot. This found the expression of CMV-

收稿日期: 2000-03-01

作者简介: 杜道林 (1970-), 男, 四川万源人, 博士后, 副教授, 从事植物生态学、植物遗传学研究。

基金项目: 海南省教育厅项目 (Hjjsk9909-1); 农业部生物技术重点项目; 海南省重点扶持学科“生态学”和海南师范学院科研启动基金资助。本文香蕉花叶病毒外壳蛋白基因序列已申报到 GenBank 核酸数据库, 登录号为: AF444352。

BH1 coat protein gene in banana plant.

Key words: banana mosaic virus; coat protein gene; cloning; sequencing; plant expression vector

香蕉 (*Musa acuminata*) 是世界产量最大的四种水果之一^[1], 香蕉花叶病是危害香蕉生产的两大病毒病害之一^[2], 在我国, 此病于 1974 年在广州市郊首次发现^[3], 此后随组培苗的推广应用而逐年发生严重^[4], 一般发病率为 20%~40%, 个别重病田块高达 80%~90%。

近年来, 植物基因工程技术的飞速发展, 为培育抗病毒植物新品种提供了新的途径, Powell 等将编码烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋白基因用植物表达载体导入烟草和番茄细胞中使之表达, 首次获得了抗 TMV 的转基因烟草和番茄^[5], 此后, 这一策略被广泛应用于其他众多的植物抗病毒品种的培育上, 成为目前培育抗病毒植物最重要的一条途径^[6]。本研究对海南香蕉花叶病毒外壳蛋白基因进行分离克隆和测序, 并将其构建成植物表达载体, 为进一步培育抗花叶病香蕉品种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验采用的菌种为 *E. coli* DH5 α , 质粒为 T-Easy Vector, pBI121, pKHG4, pAHC18。酶和生化试剂购自华美生物工程公司、Promega 公司和 Biolabs 公司。植物材料为大田感染花叶病毒的香蕉叶片和健康心叶烟草幼苗。

1.2 方法

1.2.1 病毒提纯及其 RNA 的纯化 用病叶直接接种法将病毒接种到健康心叶烟草幼苗上^[7], 引起心叶烟草产生花叶病症状, 然后用 Scott (1963) 提取 CMV 程序修改的方法分离病毒, 再用蛋白酶 K 酶解病毒外壳蛋白, 纯化病毒 RNA。

1.2.2 单链 cDNA 的合成 按 Promega 公司的操作说明, 用上述 RNA 抽提物在 25 μ L 的反应体系中, 加 2 μ g Oligo(dT) 和 15U 的 AMV 逆转录酶, 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h。

1.2.3 PCR 体外扩增 用于 PCR 反应的 5' 端和 3' 端引物系根据已发表的相关 cDNA 序列^[8], 以及 PC/Gene 软件分析, 并据 Primer 设计优化原则^[9], 设计并合成一对引物 (引物合成仪为 Beckman Instruments Inc. Oligo 1 000 M DNA Synthesizer)。

Primer1: 5'-CAT $\frac{G^{\wedge}GA TCC}{BamHI}$ ATG GAC AAA
TCT GAA TCA ACC AGT GCT GGT-3'

Primer2: 5'-TGA $\frac{GAG GT^{\wedge}C}{Sac I}$ TCA AAC TGG
GAG CAC CCC TG-3'

在 25 μ L 反应体系中加入 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 加 1 μ L 1.25 mM 上述引物, dNTPs 2.5 mM 2 μ L, Taq 聚合酶 2 U, 补双蒸水至 25 μ L。然后在 PE 2 400 PCR 仪上反应, 热反应循环为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 49 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2 min; 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检查分析。

1.2.4 扩增片段的克隆和重组子的鉴定 PCR 反应产物与 T-Easy Vector 在 T4-DNA Ligase 作用下连接成 T-CMV-BHI-CP (pTB), 然后转化感受态 *E. coli* DH5 α , 在含有 Amp 100 μ g/mL、X-gal/IPTG 的 LB 培养基上培养 12~16 h 后, 挑选白色菌落, 用碱法提取质粒、电泳并对滞后者进行酶切鉴定^[10]。

1.2.5 DNA 序列分析 用正、反引物分别从两端测序, 测序质粒为 T-CMV-BHI-CP (pTB), 用碱法制备及 PEG 法纯化^[10], 测序仪为 PE 公司的 DNA 377 A Sequencer。所得 DNA 片段定名为 CMV-BHI-CP。

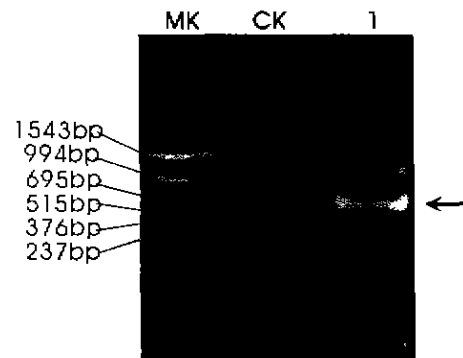


图 1 香蕉花叶病毒外壳蛋白基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 PCR amplification result of banana mosaic virus coat protein gene

MK-PCR Marker; CK-对照 (T-Easy Vector); 1-PCR 产物 (PCR amplification result) (← 所示为香蕉花叶病毒外壳蛋白基因 ← is banana mosaic virus coat protein gene).

1.2.6 CaMV35sp-CMV-BHI-CP-Nost-NPT I 融合基因表达载体 (pTBB) 的构建 用 SmaI 消化 pBI 121, 再用 SacI 酶切, 回收大片段, 与 T-CMV-BHI-

CP (pTB) 经 *Apa*I 消化后, 用 T4-DNA Polymerase 补平, 再用 *Sac*I 酶切后回收的小片段, 在 T4-DNA 连接酶作用下连接, 再用连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选获得重组质粒 pTBB。

1.2.7 CaMV35sp-CMV-BHI-CP-Nost-HPT-NPT II 融合基因表达载体 (pTBK) 的构建 T-CMV-BHI-CP (pTB) 经 *Apa*I 消化后, 用 T4 DNA 聚合酶补平, 再以 *Sac*I 酶切, 回收约 700 bp 小片段, 将之与 pKHG4 以 *Sma*I 消化后, 再经 *Sac*I 酶切后回收的大片段连接, 再转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选获得重组质粒 pTBK。

1.2.8 UBIP-CMV-BHI-CP-NPT II 融合基因表达载体 pTBBU 的构建 pBI121 经 *Xba*I 酶切, Klenow 酶补平, 再用 *Hind* II 酶切后回收的约 10 KB 片段与 pAHC18 经 *Bgl* II 消化后, 用 Klenow 酶补平, 再用 *Hind* III 消化后回收的约 1 KB 小片段连成 pBI-AH, 用 *Hind* II / *Sma*I 双酶切鉴定后, 经 *Sma*I 消化,

再用 *Sac*I 酶切后的大片段与 pTB 经 *Apa*I 消化后用 T4-DNA Polmerase 补平, 再用 *Sac*I 酶切后回收的约 9 KB 大片段, 在 T4-DNA 连接酶作用下连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 筛选获得重组质粒 (pTBBU)。酶切和点杂交 (DNA dot blot) 鉴定。

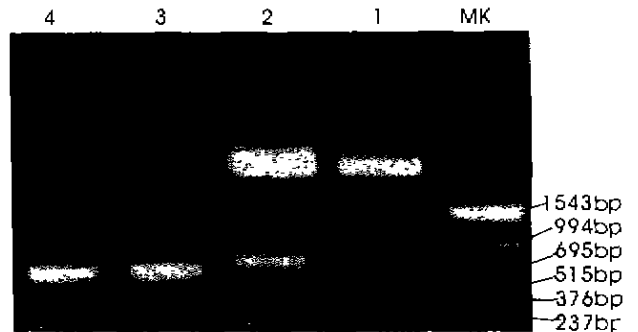


图 2 pTB *Nco*I/*Sac*I 双酶切电泳图
Fig. 2 The result of pTB digested with *Nco*I and *Sac*I
MK-PCR Marker; 1, 2-pTB *Nco*I/*sac*I; 3, 4-CMV-BHI-CP gene.

3	9	15	21	27	33	39	45							
ATG	GAC	AAA	TCT	GAA	TCA	ACC	AGT	GCT	GGT	CGT	AAC	CGT	CGA	CGT
GGT	CCG	CGT	CGT	GGT	TCC	CGC	TCC	GCC	TCC	TCC	TCT	CCG	GAT	CGA
AAC	TTT	AGG	GTC	TTG	TCG	CAG	CAG	CTT	TCG	CGA	CTC	AAT	AAG	ACG
AAA	CCA	CCG	AAG	ATA	GAC	CGT	GGG	TCT	TAT	TAT	GGT	AAA	AGG	TTG
TTG	CTT	CCT	GAT	TCA	GTC	ACG	GAG	TTC	GAT	AAG	AAG	CTT	GTT	TCG
CGC	ATC	CAA	ATT	CGA	GTT	AAT	CCT	TTG	CCG	AAA	TTC	GAT	TCT	ACC
GTG	TGG	GTC	ACA	GTC	CGT	AAA	GTT	CCT	GCC	TCC	TCG	GAC	TTA	TCC
GTT	GCC	GCC	ATC	TCT	GTC	ATG	TTC	GCG	GAC	GGA	GCC	TCA	CCG	GTA
CTG	GTT	TAT	GAG	TAC	GCC	GCA	TCT	GGA	GTC	CAA	GCT	AAC	AAC	AAA
TTG	TTG	TAT	GAT	CTT	TCG	GCG	ATG	CGC	GCT	GAT	ATT	GGT	GAC	ATG
CGT	AAG	ATC	GCC	GTT	CTC	GTG	TAT	TCA	AAA	GAC	GAT	GCA	CTT	ACG
GAC	GAG	TTA	GAT	CTT	CTT	CAT	GTC	ATT	GAG	CAC	CAA	CGC	ATT	CCC
ACG	TCA	GGG	GTG	CTC	CCA	GTT	TGA							

Total number of bases is: 657. DNA sequence composition: 146 A; 176 C; 160G; 175T; 0 OTHER.

图 3 香蕉花叶病毒外壳蛋白基因序列图

Fig. 3 The DNA sequence of coat protein gene of banana mosaic virus

2 结果

2.1 PCR 体外扩增

PCR 体外扩增出一条分子量约 700 bp 的带 (图 1), 与张锡炎等 (1995), 胡天华等 (1992) 报道的 DNA 片段大小基本一致^[7,11]。

2.2 扩增产物的克隆和阳性重组子的鉴定

扩增产物在 T4-DNA 连接酶作用下克隆到 T-Easy Vector 上, 构成 T-CMV-BHI-CP (pTB), 用 *Nco*I/*Sac*I 双酶切, 结果出现一条约 700 bp 大小带 (图 2), 而对照无此带, 说明 PCR 扩增产物已连接到 T-Easy Veeror 上。

2.3 cDNA 全序列测定

正、反向的测序结果显示 657P 的 DNA 片段, 其序列与 CMV 同源性较高 (图 3), 与张锡炎等 (1995) 的 CMV-BH-CP 同源性为 91.8%; 可编码 218 个氨基酸, 与张锡炎等 (1995) 的 CMV-BH-CP 编码氨基酸同源性为 91.28%^[11], 故定其名为 CMV-BHI-CP。

2.4 CaMV35sp-CMV-BHI-CP-Nost-NPT II 融合基因表达载体 (pTBB), CaMV35sp-CMV-BHI-CP-Nost-HPT-NPT II 融合基因表达载体 (pTBK) 和 UBIP-CMV-BHI-CP-Nost-NPT II 融合基因表达载体 (pTBBU) 的鉴定

转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在含 Amp 的固

培养基上挑白色菌落培养,再提取质粒用酶切法和点杂交方法(DNA dot blot)鉴定(图4、5),表明这3种表达载体构建成功。

3 讨论

香蕉花叶病毒从其外壳白基因碱基序列来看,

其与张锡炎等报道的序列同源性达91.8%(编码氨基酸同源性为91.28%),与CMV-C和CMV-Q序列同源性都大于70%。可以认为我们分离的海南这一株系应为CMV株系;同时由于其样品采于不同地点和仅约91%的同源率,可以认为其为一香蕉花叶病毒不同株系。

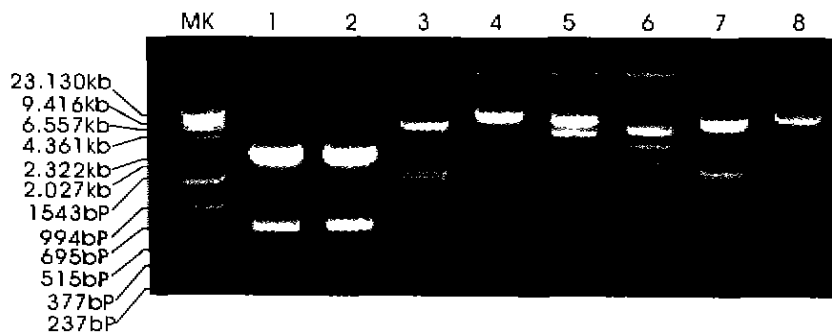


图4 三种表达载体酶切鉴定图

Fig. 4 Testing of the three expression vectors digested with endonucleases

MK-PCR Marker-λDNA/Hinc III; 1-pTB/NotI+SacI; 2-pTB/NotI+SacI; 3-pTBB/NotI+SacI; 4-pTBB/XbaI+SacI; 5-pTBBU/NotI+SacI; 6-pTBBU/PstI+SacI; 7-pTBK/NotI+SacI; 8-pTBK/HindIII.

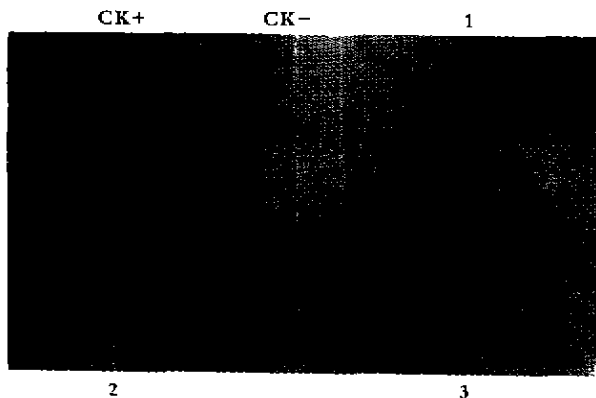


图5 三种表达载体点杂交图

Fig. 5 Dot blotting of the three expression vectors
CK⁺-CMV-BH-CP gene; CK⁻-nontransgenic plant; 1-pTBB; 2-pTBK; 3-pTBBU.

三种表达载体的构建成功为通过基因转化技术培育抗花叶病香蕉品种提供了坚实的基础,虽然CaMV35p在单、双子叶植物中皆能启动表达,但对单子叶植物来说,用单子叶植物基因表达启动子UBI的表达载体pTBBU。一般认为单子叶植物对卡那霉素不是太敏感,所以我们不仅构建了卡那霉素标记表达载体pTBB和pTBBU,还构建了既含卡那霉素又含潮霉素选择标记的表达载体pTBK。

为了方便基因表达载体构建,在设计扩增基因

引物时,刻意在5'端和3'端分别设计上适当的酶切位点(如本研究引物1的BamHI位点,引物2的SacI位点),可为后续工作创造便利条件。

参考文献:

- (1) 符气浩,王 锋. 世界香蕉生产与贸易——兼论海南香蕉生产前景[J]. 海南大学学报(自然科学版), 1994, 12(1): 80-84.
- (2) 黄朝豪,李增平,谢 昌,等. 海南香蕉花叶病的研究[J]. 热带作物学报, 1995, 16(1): 70-76.
- (3) 高乔婉. 香蕉花叶病侵染源研究[J]. 华南农业大学学报, 1992, 13(3): 40-52.
- (4) 谢联辉,周仲驹,林奇英,等. 香蕉花叶病在福建的发生及其病原[J]. 福建省植物病理学会(学术讨论会)论文摘要汇编, 1991, 2-3.
- (5) Powell Abel P, Nelson R S, De B, *et al.* Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene [J]. *Science*, 1986, 232: 738-743.
- (6) 杜道林,刘志昕,郑学勤. 病毒与植物抗病基因工程[J]. 海南师范学院学报, 1998, 11(1): 102-107.
- (7) 胡天华,吴 琳,刘 玮,等. 黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的DNA克隆和全序列测定比较[J]. 科学通报, 1989, (21): 1 652-1 655.

(下转第13页 Continue on page 13)

植物。我们在研究该区植物遗存的同时,还对古木层中的孢粉进行了分析,从孢粉资料看,该区有青冈(*Cyclobalanopsis* sp.)、栲(*Castanopsis* sp.)和石楠(*Phonitua* sp.)等常绿木本植物;有椴树、枫香和槭树(*Acer* sp.)等落叶木本植物;此外,尚有大量的菊科(Compositae)、禾本科和莎草科等草本被子植物和蕨类植物(有关孢粉资料将另文发表)。虽然我们获得的有关该区历史植被的资料不全,但从植物遗存中的木本植物的习性,以及孢粉资料,笔者认为观音湾古木层历史植被类型属于亚热带常绿、落叶阔叶混交林植被。由于在群落内出现了荆三棱和金鱼藻等水生植物,说明在群落内的局部地段可能有沼泽地。同河姆渡植物遗存研究结果相似,这说明当时的气候较现代更温暖湿润^[1]。有关该区历史植被的较为详细的种类组成,有待今后进一步研究进行补充。

总之,这些果实与种子等植物遗存的发现,以及今后对古木层的进一步发掘和研究,将为探讨该

区历史植被和历史植物区系以及古气候变化,提供更多的植物学证据。

参考文献:

- [1] 孙立广, 谢周清, 沈显生, 等. 浙江朱家尖观音湾古木层的发现及其意义[J]. 自然杂志, 2000, 22(6): 354—357.
- [2] 章绍尧, 丁炳扬. 浙江植物志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993.
- [3] 中国植被编委会. 中国植被[M]. 北京: 科学出版社, 1981. 10—30.
- [4] 浙江省博物馆自然组. 河姆渡遗址动植物遗存的鉴定研究[J]. 考古学报, 1978, (1): 95—105.
- [5] 孙湘君, 杜乃秋, 陈明洪. “河姆渡”先人生活时期的古植被、古气候[J]. 植物学报, 1981, 23(2): 146—151.
- [6] 安徽植物志编写组. 安徽植物志[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社; 北京: 中国展望出版社, 1985. 1992.

图版说明

图版 I

1-南酸枣(×4); 2-苜蓿属(×35); 3-野山楂(×27); 4-茄属(×60); 5-荆三棱(×45); 6-金鱼藻属(×27); 7-朴树属(×27); 8-忍冬属(×27)。

图版 II

1,2-樟(×12: 1 外观, 2 断面); 3-山胡椒属(果核碎片, ×16); 4-乌柏(×12); 5,6-鹅耳枥属(×24: 5 外观, 6 断面); 7-椴树属(×10); 8-浙江紫薇(×10)。

Explanation

Plate I

1-*Choerospondius axillaris* (×4); 2-*Medicago* sp. (×35); 3-*Crataegus cuneata* (×27); 4-*Solanum* sp. (×60); 5-*Scirpus yagara* (×45); 6-*Ceratophyllum* sp. (×27); 7-*Celtis* sp. (×27); 8-*Lonicera* sp. (×27)

Plate II

1,2-*Cinnamomum camphora* (×12: 1 surface, 2 section); 3-*Lindera* sp. (pieces of fruit-pit, ×16); 4-*Sapium sebiferum* (×12); 5,6-*Carpinus* sp. (×24: 5 surface, 6 section); 7-*Tilia* sp. (×10); 8-*Lagerstroemia chekiangensis* (×10).

(上接第 84 页 Continue from page 84)

[8] Thomas J. White. PCR Protocols[M]. Academic Press Inc. (America). 1990. 85—86.

[9] 朱平. PCR 基因扩增实验手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 57—61.

[10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. (金冬雁, 黎

孟枫, 等). 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 16—34.

[11] 张锡炎, 伍世平, 刘志昕, 等. 香蕉花叶病毒外壳蛋白基因的分离测序和比较[J]. 热带作物学报, 1995, 16(增刊): 13—18.