

# 番木瓜环斑病毒复制酶基因的克隆和序列分析\*

叶长明 陈 谷 黄俊潮 于 湄 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

**摘 要** 用 RT-PCR 技术从 PRV-AL 中分离到复制酶 (RP) 基因, 将基因克隆进载体 pUC18, 用双脱氧链终止法测定了基因序列, 表明其全长为 1 602 bp, 与国内外报道的 HA5-1 YK 和 Sm 的 RP 基因相比, 同源性分别达 82.80%, 95.07% 和 91.83%。

**关键词** 番木瓜环斑病毒, 复制酶基因

**分类号** Q 784

80 年代中期以来, 植物病毒基因工程 (PAGE) 的发展为植物病毒病的防治提供了一和有效途径, 在 PAGE 中应用得较为成功的抗病基因主要是来自病毒本身基因组的外壳蛋白 (CP) 基因和复制酶 (RP) 基因等, 而后者介导的抗病性更强<sup>[1,2]</sup>。

番木瓜环斑病毒 (PRV) 的危害是番木瓜生产的主要障碍, 一直缺乏理想的防治措施。1993 年 Fitch 等获得表达 PRV HA5-1 CP 基因的抗病毒番木瓜品系<sup>[3]</sup>, 叶长明等在国内首次克隆了 PRV 华南优势株系 Ys 的 CP 基因<sup>[4]</sup>, 并转化了番木瓜。为了获得更多的抗性基因, 以提高转基因番木瓜的抗病持久性, 我们进一步克隆了 PRV RP 基因。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 PRV 病叶 (畸叶型, AL) 采自本地田间, 反转录、PCR 和序列分析等试剂购自 GIBCO-BRL, Pharmacia 等公司, 载体、菌种为本室保存。

1.2 方法 ① 病叶总 RNA 提取 采用常规异硫氰酸胍方法。

② RT-PCR 根据 PRV 台湾花叶株系 (YK) 基因组 RNA 的 3' 端序 (含 RP 和 CP 基因)<sup>[5]</sup> 和华南 Ys CP 基因序列<sup>[4]</sup>, 合成了第一链引物 5'-CAGGGTACCT-TACTTAGACTGGTGAACACAT-3' 和第二链引物 5'-CGAGGATCCATGGATAAGTTACACGGCAATCT-3', 为了基因克隆方便和在转基因植物中正确翻译蛋白, 在其 5' 端引入 BamHI 切点 GGATCC 和起始密码子 ATG, 在 3' 端引入 KpnI 切点和终止密码子 TAA。



图 1 PCR 扩增产物的电泳结果

1 DNA markers; 2 RT-PCR product; 3 PCR using total RNA as templates; 4 PCR without templates

Fig. 1 Electrophoresis of PCR amplification product

\* 广州市科委重点资助项目

收稿日期: 1996-05-03 叶长明, 男, 34 岁, 博士

RT-PCR按常规方法进行.反转录条件为: 2 $\mu$ g 总 RNA, 0. 5 $\mu$ g 第一链引物, 100 U SuperscriptII 反转录酶, 50 mmol/L Tris-HCl (pH8. 3), 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, dNTPs 各 1 mmol/L, 10 mmol/L DTT, 反应体积 20 $\mu$ L, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴中反应 30 min. 取 2  $\mu$ L 反转录产物进行 PCR 扩增反应, 反应条件为: 两端引物各 100 ng, 1. 5 U Taq DNA 聚合酶, dNTPs 各 200 $\mu$ mol/L, 10 mmol/L Tris-HCl (pH8. 3), 50 mmol/L KCl, 1. 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 反应体积 50 $\mu$ L, 在 PCR 仪中反应 30 循环, 每循环包括 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 50 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 扩增毕取 5 $\mu$ L 产物电泳检测扩增结果. ③ RP 基因克隆和序列分析 扩增得到的 cDNA 片段用 Bam H 和 KpnI 双酶切后, 与同样双酶切的质粒 pUC 18 的连接, 连接产物转化大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 a, 用 PCR 方法筛选重组克隆. 根据报道<sup>[6]</sup>及酶切得知, 该基因第 33 和 811 bp 各有一 Sad 位点, 利用该位点对基因进行亚克隆, 并采用双脱氧链终止法<sup>[7]</sup>对插入片段进行序列分析.

2 结果与讨论

RP-PCR 产物在电泳胶上显示一条大小约 1 600 bp 的 DNA 带, 与预期的 RP 基因大小相符 (见图 1). 序列分析的放射自显影图的一部分如图 2 所示, 根据放射自显影读出 AL RP 基因全序列为 1 600 2 bp (见图 3), 与报道的 PRV 株系 HA5-1, YK<sup>[5]</sup>和 Sm<sup>[6]</sup>的 RP 基因相比较 (图略), 同源性分别达 82. 80%, 95. 05% 和 91. 83%, 表明所克隆的基因为 PRV RP 基因.

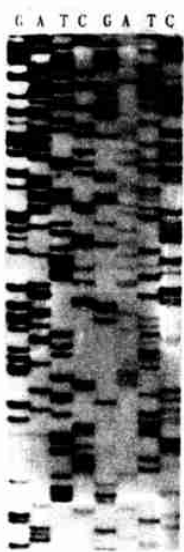


图 2 序列分析胶的放射自显影结果  
Fig. 2 Autoradiography of the sequencing gel

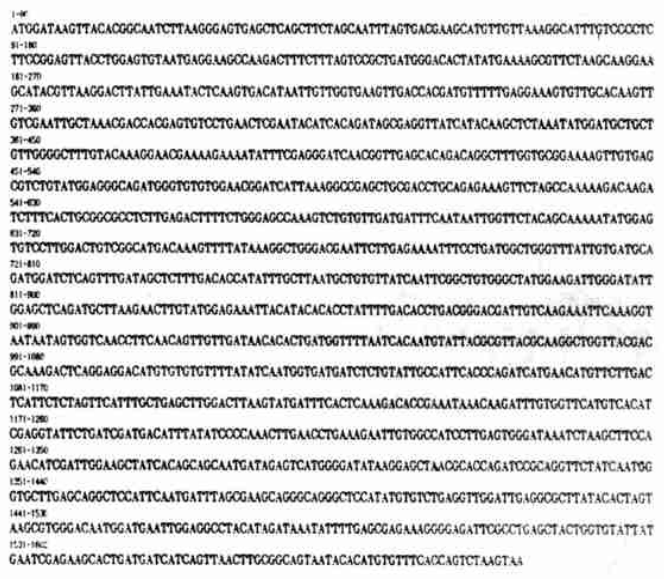


图 3 PRV-AL 复制酶基因序列  
Fig. 3 Replicase gene sequence of abnormal leaf (AL) isolate of papaya ringspot virus (PRV)

有人从华南 PRV Sm (重花叶) 株系克隆了 RP 基因<sup>[6]</sup>, 但由于 RP 基因介导的抗病性专属性较强, 且据我们观察 AL 的危害性更大, 故选择 AL 来克隆 RP 基因.

从现有研究报道来看,在利用 RP 基因介导的抗病性时,必须使基因表达产物丧失原有的功能,否则转基因植物不具有抗病性;使 RP 丧失功能可以通过将基因缩短、加长或突变等途径来实现<sup>[1]</sup>。本研究在克隆 PRV RP 基因时,利用 PCR 技术将原始 RP 基因 5'端缩短 12b,将其 3'端向 CP 基因延伸了 78 bp(在 PRV 基因中 RP 基因和 CP 基因相连),以期使 RP 基因丧失原有功能并赋予转基因番木瓜高度抗病性。我们现已将 RP 基因插入中间载体的 CaMV 35S 启动子和 nos 终止序列之间构建了基因的植物表达载体,分别用冻融法和三亲交配法将植物表达载体导入农杆菌 LBA 4404 形成了二元载体系统,并开始转化番木瓜。

### 参 考 文 献

- 11 Baucombe D. Replicase-mediated resistance: a novel type of virus resistance in transgenic plants. *Trends Microbiol.* 1994, 2: 60~ 62
- 2 Wilson TMV. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *Proc Natl Acad Soc USA*, 1993, 90: 3133~ 3141
- 3 Fitch M M M, Manhardt R M, Gonsalves D. Transgenic papaya from agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. *plant Cell Rep.* 1993, 12: 245~ 249
- 4 叶长明,叶寅,骆学海,等.番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的构建. *植物病理学报*, 1991, 21: 161~ 164
- 5 Wang C H, Bau H J, Yeh S D. Comparison of the nuclear inclusion protein and coat protein genes of fife papaya virus strains distinct in geographic origin and pathogenicity. *Mol Plant Pathol.* 1994, 1205~ 1210
- 2 刘俊军,彭学贤,莽克强.番木瓜环斑病毒复制酶(亚基)基因的克隆、序列分析及植物表达载体的构建. *生物工程学报*, 1994, 10: 283~ 287
- 7 Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5463

## Cloning and Sequencing of Replicase Gene of Papaya Ringspot Virus

*Ye Changming*<sup>\*</sup> *Chen Gu* *Huang Juncao* *Yu May* *Li Baojian*

**Abstract** The replicase (RP) gene of abnormal leaf isolate (AL) of papaya ringspot virus (PRV) was synthesized by reverse-transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR) amplification, and cloned into pUC18. The gene was sequenced by the dideoxy-chain-termination method. Results showed that it was 1 602 bp in length, and shared 82.80%, 95.07% and 91.83% homologies with ones of the strains HA5-1, YK and Sm respectively.

**Keywords** papaya ringspot virus, replicase gene

\* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275