

辣椒温和斑点病毒(PMMV)外壳蛋白基因的克隆和序列测定

黄粤* 马荣群 翟晓灵 岳文辉 潘忠强 李梅 崔健 李显日

青岛市农业科学研究院, 青岛市农业生物技术重点实验室, 青岛 266100

Cloning and Sequencing of the Coat Protein Gene in Pepper Mild Mottle Virus

HUANG Yue*, MA Rong-Qun, ZHAI Xiao-Ling, YUE Wen-Hui, PAN Zhong-Qiang, LI Mei, CHUI Jian, LI Xian-Ri

Qingdao Academy of Agricultural Sciences, Key Agribiotech Laboratory of Qingdao, Qingdao 266100

摘要 从本院分离的辣椒温和斑点病毒株系PMMV-QD中提取RNA。根据已有报道的外壳蛋白(CP)自行设计引物P1、P2, 用RT-PCR扩增PMMV-QD的CP基因的cDNA, 插入pMD 18-T载体, 转化感受态受体菌XL1-Blue, 以蓝白斑落筛选转化株, 用PCR检测白色菌落, 确认获得了含cDNA的阳性重组子。序列测定和比较的结果表明该片段确实含有PMMV的CP基因编码区, 此种cDNA与国外报道的PMMV病毒株系核苷酸序列的同源性达到97.7%。

关键词 辣椒温和斑点病毒(PMMV); 外壳蛋白(CP)基因; cDNA; 序列分析

辣椒病毒病害在田间发病极为普遍, 严重影响辣椒的产量和品质, 可以侵染辣椒的病毒有30多种^[1], 而辣椒温和斑点病毒(pepper mild mottle virus, PMMV)是对保护地栽培的辣椒最具有破坏性的病原之一, 在世界范围造成严重的经济损失。这种病毒是正链RNA病毒——烟草花叶病毒组的成员之一, 病毒粒子呈杆状, 可以通过机械接种、农事操作或者种子传毒, 至今尚未发现可以传毒的生物介体。它不侵染番茄; 在烟草中, 当与烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)或番茄花叶病毒(tomato mosaic virus, ToMV)竞争时, 其复制和积累的能力都有减弱^[2]。

国外已经分别在1982、1984和1990年对烟草花叶病毒组3个成员TMV、ToMV、TMGMV(tobacco mild green mottle virus)的核酸全序列作了报道^[3~5], 90年代后, 对PMMV的许多株系也有很多研究。Velasco等^[6]的研究指出, PMMV的RNA基因组含有6357 nt和4个开放可读框。最后的一个可读框编码外壳蛋白(coat protein, CP)。采用病毒CP转基因使植物获得对病毒的抗性的报道已有很多^[7~9], Shin等^[10]也证实PMMV CP基因是筛选辣椒转基因的有用标记, 但在我国尚未见到PMMV分子生物学的报道, 本文的目的是克隆这种病毒包含有编码17.2 kD CP的基因序列, 并与已有报道中的同一类的结果进行比较和分析, 以期能为鉴定PMMV和辣椒抗病育种研究奠定基础。

材料与方法

病毒来自本院分离株系PMMV-QD, 用异硫氰酸胍方法提取病毒RNA^[11]。用大连宝生物工程有限公司的试剂盒[Takara One Step RNA PCR Kit (AMV)]和自行设计的引物P1、P2进行反转录。使用大连宝生物工程有限公司的试剂盒(PCR Fragment Recovery Kit)进行cDNA回收。将回收产物插入载体(pMD18-T), 转化宿主菌——大肠杆菌菌株(XL1-Blue 购于Clontech公司), 以蓝白斑筛选阳性克隆。从白色菌落中提取质粒, 用自行设计的引物进行PCR扩增, 验证这种病毒CP基因的转化效果, 阳性克隆由大连宝生物公司进行序列测定。

结果与讨论

1 引物设计

根据已报道的PMMV的CP蛋白自行设计、合成2个引物P1(5' ATTACTACCGCCGATGCTGAG 3')和P2(5' TGGAGGAAAAACACTACGAG 3'), 二者之间包含这种病毒基因组的5287~6235 nt, 共949 nt。而编码CP的序列是5685~6158 nt, 含有474 nt, 位于P1与P2之间的序列之内。引物的退火温度差为2.5℃; 最佳退火温度为54.1℃。

收稿 2004-06-10 修定 2004-11-01

*E-mail: huangyuehy@sohu.com, Tel: 0532-7892652

2 RNA 提取

所提取到 PMMV-QD 的 RNA 紫外吸收值 (OD₂₆₀/OD₂₈₀) 为 1.97, 分子量主要集中在 100~3 000 bp 位置(图1)。

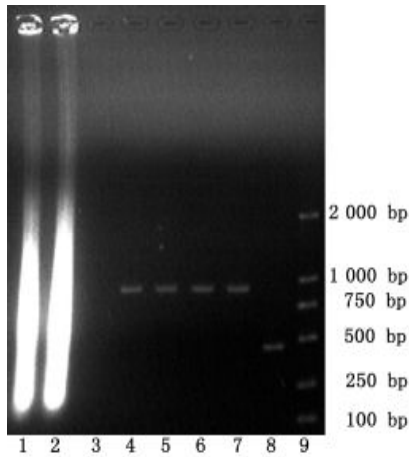


图1 PMMV-QD RNA 及其 CP 基因 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

1、2: 病毒 RNA 提取物; 3: 阴性对照; 4~7: 反转录成的 cDNA; 8: 试剂盒自带阳性对照(462 bp); 9: 分子量标记 DL2000。

进行反转录后进行琼脂糖凝胶电泳(图1)。从图1来看, 反转录的 cDNA 分子量与预期的反转录扩增片段 949 bp 相符合。

从琼脂糖凝胶中回收 cDNA, 与 T 载体连接后转化宿主菌 XL1-Blue, 在含有 X-Gal、IPTG 和 Amp 的 L- 琼脂平板上进行蓝白斑筛选。选到 7 个白色菌落, 从中提取质粒进行 PCR 检测。结果(图2)表明, 7 个菌落的重组质粒均含有这种病毒的 CP 基因。

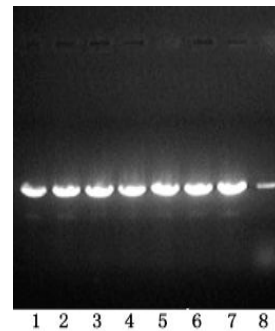


图2 PCR 检测重组质粒的 DNA 插入片段

1~7: 7 个白色菌落质粒 DNA 为模板; 8: 反转录的 cDNA 为模板。

3 编码 PMMV-QD CP cDNA 区域的克隆

以病毒 PMMV-QD 的总 RNA 为模板, 以 P1、P2 为引物, 用 Takara One Step RNA PCR Kit(AMV)

4 核酸序列

提取重组质粒 DNA, 对插入片段进行序列测定, 结果(图3)表明, 序列共有 949 nt, 与设计

```

5' AT TAC TAC CGC CGA TGC TGA GAG AAA TGT TTG GCA AGT TTT AGT
TAA TAT TAG AGG TGT TGC CAT GGA AAA GGG TTT CTG TCC TTT ATC
TTT GGA GTT TGT CTC AGT TTG TAT TGT ACA CAA ATC CAA TAT AAA
ATT AGG CTT GAG AGA GAA AAT TAC TAG TGT GTC GGA AGG AGG ACC
CGT TGA ACT TAC AGA AGC AGT TGT TGA TGA GTT CAT CGA ATC AGT
TCC AAT GGC TGA CAG ATT ACG TAA ATT TCG CAA TCA ATC CAA GAA
AAG AAG TAA TAA GTA TGT AGG TAA GAG AAA TGA TAA TAA GGA TGT
GAA TAA GGA AAG GAA GCT GTT TGA TAA GGT TAG AAT TGG GCA GAA
CTC GGA GTC ATC GGA CGC CGA GTC TTC TTC GTT TTA ACT ATG GCT
M A
TAC ACA GTT TCC AGT GCC AAT CAA TTA GTG TAT TTA GGT TCT GTA
Y T V S S A N Q L V Y L G S V
TGG GCC GAT CCA TTA GAG TTA CAA AAT CTA TGT ACT TCG GCG TTA
M A D P L E L Q N L C T S A L
GGT AAT CAG TTT CAA ACA CAG CAG GCT AGA ACT ACG GTT CAA CAG
G N Q F Q T Q Q A R T T V Q Q
CAG TTC TCT GAT GTG TGG AAG ACC ATA CCG ACC GCT ACA GTT AGA
Q F S D V W K T I P T A T V R
TTT CCT GCT ACT GGT TTC AAA GTT TTT CGA TAT AAT GCC GTG CTA
F P A T G F K V F R Y N A V L
GAT TCT CTA GTG TCG GCA CTT CTC GGA GCC TTT GAT ACT AGG AAT
D S L V S A L L G A F D T R N
AGG ATA ATA GAA GTA GAA AAT CCG CAA AAT CCT ACA ACT GCC GAG
R I I E V E N P D N P T T A E
ACG CTT GAT GCG ACG AGG CCG GTA GAT GAT GCG ACG GTG GCC ATT
T L D A T R R V D D A T V A I
AGG GCC AGT ATA AGT AAC CTC ATG AAT GAG TTA GTT CGT GGC ACG
R A S I S N L M N E L V R G T
GGA ATG TAC AAT CAA GCT CTG TTC GAG AGC GCG AGT GGA CTC ACC
G M Y N Q A L F E S A S G L T
TGG GCT ACA ACT CCT TAG ACA TGA TGG TGT AAA TAA GTT GGA CGA
M A T T P
ACG TTA AAC GTC CGT GGC GAG TAC GAT AAC TCG TAG TGT TTT TCG
CTC CAB'
    
```

图3 重组质粒中插入的 cDNA 片段的碱基序列及推导的氨基酸序列
方框表示引物序列; 下划线表示 CP 基因序列。

的PCR引物之间所包含的预期碱基数目完全相同。

我们所克隆的cDNA编码CP的位置是398~872, 该序列5'端为一个起始密码子ATG, 编码Met, 3'端为一个终止子TAG, 474个碱基编码157个氨基酸残基(图3)。

用BLAST程序查询GenBank中的同源序列, 将本文中的PMMV-QD与其他几个病毒株系比较(表1), 可以看到, 碱基序列同源性最高的达97%, CP氨基酸序列同源性最高的为100%, 证明我们分离到的病毒确为辣椒温和斑点病毒。

表1 PMMV-QD的cDNA核酸序列及推测的CP氨基酸序列与其它病毒株系的比较

GenBank 编号	重合位置	CP编码区同源性	cDNA区同源性	氨基酸序列同源性
AB000709	1~949	462/471	928/949 (97.7%)	157/157 (100%)
AB069853	1~949	462/471	928/949 (97.7%)	157/157 (100%)
M81413	1~949	461/471	926/949 (97.6%)	157/157 (100%)
AJ308228	1~949	446/471	897/949 (94%)	152/157 (96.8%)

在表1中, 此种病毒的几个株系CP的氨基酸序列同源性比核酸序列的同源性高。其原因从表面上看是遗传密码兼并性造成的, 更进一步说, 在生命活动中起功能作用的蛋白质在这种病毒的变异和进化过程中比核酸更加稳定。Rodriguez-Cerezo等^[12]指出此种病毒是高度稳定的进化群体。从我们的实验结果也可以看到, PMMV-QD的CP氨基酸序列与AB000709^[13]、AB069853^[14]、M81413^[15]完全相同, 只是在核苷酸序列上存在差异, 再次说明PMMV是进化上相当稳定的病毒。

另外, 从核酸序列推测得到PMMV-QD的17kD的CP氨基酸组成与Velasco等^[6]和向本春等^[16]分离到的毒株的氨基酸组成不同, 其原因值得进一步探讨。

参考文献

- Villalon B. Breeding pepper to resist virus disease. Plant disease, 1981, (65): 557~562
- Wetter C, Conti M. Pepper mild mottle virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 1988, no 330
- Goelet P, Lomonmssoff G, Butler PJG et al. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. Proc Nat Acad Sci USA, 1982, 79: 8518~8522
- Ohno T, Aoyagi M, Yamanashi Y et al. Nucleotide sequence of the tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. J Biochem, 1984, 96: 1915~1923
- Solis I, Garcia-Arenal F. The complete nucleotide sequence of the genomic RNA of the tobamovirus tobacco mild green mosaic virus. Virology, 1990, 177: 553~558
- Velasco L, Janssen D, Ruiz-Garcia L et al. The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a pepper mild mottle virus (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance in pepper. J Virol Methods, 2002, 106: 135~140
- Nejidat A, Beachy RN. Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses. Mol Plant Microbe Interact, 1990, 3(4): 247~251
- Tenllado F, Garcia-Luque I, Serra MT et al. *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the 54-kDa region of the pepper mild mottle tobamovirus replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection. Virology, 1995, 211(1): 170~183
- Lim PO, Ryu JS, Lee HJ et al. Resistance to tobamoviruses in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of pepper mild mottle virus (Korean isolate). Mol Cells, 1997, 7(3): 313~319
- Shin R, Han JH, Lee GJ et al. The potential use of a viral coat protein gene as a transgene screening marker and multiple virus resistance of pepper plants coexpressing coat proteins of cucumber mosaic virus and tomato mosaic virus. Transgenic Res, 2002, 11(2): 215~219
- Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenolchloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162: 156~159
- Rodriguez-Cerezo E, Moya A, Garcia-Arenal F. Variability and evolution of the plant RNA virus pepper mild mottle virus. J Virol, 1989, 63(5): 2198~2203
- Kirita M, Akutsu K, Watanabe Y et al. Nucleotide sequence of the Japanese isolate of pepper mild mottle tobamovirus. Ann Phytopathol Soc Jpn, 1997, 63: 373~376
- Hagiwara K, Ichiki TU, Ogawa Y et al. A single amino acid substitution in 126-kDa protein of pepper mild mottle virus associates with symptom attenuation in pepper; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain, C-1421. Arch Virol, 2002, 147(4): 833~840
- Alonso E, Garcia-Luque I, Cruz A de la et al. Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. J Gen Virol, 1991, 72: 2875~2884
- 向本春, 谢浩, 崔星明等. 新疆辣椒轻斑病毒的分离鉴定. 病毒学报, 1994, 10(3): 240~245