

内 容

(七) 植物病毒和植物基因克隆与转化

(八) 植物病理鉴定与检测

(九) 医药及动物基因工程

目 录

119. 邱并生, 田波等, 1992, 虎尾草条点花叶病毒 DNA 克隆对小麦的农杆菌侵染, 科学通报, 37(121):1997-2000。
120. 吴世宣, 张春霞, 张英华, 王革娇, 田波, 1988, 构建具侵染性的花椰菜花叶病毒克隆, 科学通报, 24: 1891-1894。
121. 邱并生, 田波等, 1992, 芜菁花叶病毒外壳蛋白基因的克隆和表达, 微生物学报, 32(2): 145-147。
122. 叶长明, 叶寅, 骆学海, 田波, 范怀忠, 1991, 番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的构建, 植物病理学报, 21(3): 161-164。
123. 叶寅, 徐雷新, 田波, 1991, 一个黄瓜花叶病毒强株系的外壳蛋白基因的合成、克隆、序列分析和表达, 科学通报, 17: 1340-1344。
124. 王晓红, 叶寅, 王苏燕, 田波, 1996, 水稻条纹叶枯病毒基因组含 vRNA2 ORF 片段的克隆、序列分析及其在原核中的表达, 科学通报, 4: 438-441。
125. 邓大纶, 康良仪, 杨希才, 陆师义, 田波, 1992, 水稻普矮病毒基因组第十片段 cDNA 的克隆及其体外转录, 微生物学报, 32(4): 247-252。
126. 叶寅, 楼黎明, 赵丰, 刘怡之, 康良仪, 田波, 1992, 水稻矮缩病毒大外膜蛋白基因的合成、克隆和序列分析, 微生物学报, 32(1): 72-74。
127. 叶寅, 赵丰, 高炬, 田波, 1991, 水稻矮缩病毒小外壳蛋白基因的合成、克隆和序列分析, 中国病毒学, 6(4): 381-384。
128. 赛吉庆, 田波等, 1994, MDMV 外壳蛋白基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达, 中国科学, 24(10): 1060-1066。

129. Sai Jiqing, Tian Bo et al., 1995, Nucleotide sequence of maize dwarf mosaic virus capsid protein gene and its expression in *Escherichia coli*, *Science in China*, 38(3): 313-319.
130. 汪丽琴, 叶寅, 王永潮, 姚启智, 田波, 1992, 天花粉蛋白基因克隆、序列分析及在 *E. coli* 中表达, *自然科学进展*, 5: 402-406。
131. 黎皓, 田波, 1993, 核酸酶抑制剂 Barstar 基因的扩增、克隆和序列分析, *高技术通讯*, 31-33。
132. 刘国胜, 刘玉乐, 李胜国, 黄勇, 叶寅, 康良仪, 田波, 1996, 病原细菌无毒基因 *avrD* 介导的抗赤星病转基因烟草, *植物病毒学报* 26(2), 165-170.
133. Yan Y.T., Wang J.F., Qiu B.S., Tien P., Resistance to rice stripe Virus conferred by expression of coat protein in transgenic Indica rice plants regenerated from bombarded suspension culture, *Virologica Sinica* 12(3): 260-269, 1997.
134. 李胜国, 刘玉乐, 朱峰, 罗玉英, 康良仪, 田波, 基因工程雄性不育烟草及其温度敏感性, *植物学报* 39(3): 231-235, 1997。
135. 李胜国, 刘玉乐, 康良仪, 田波, 1995, 烟草花药特异启动子的克隆、活性测定及雄性不育基因和恢复基因的构建, *农业生物技术学报*, 3(3): 25-32。
136. 李胜国, 刘玉乐, 朱峰, 罗玉英, 康良仪, 田波, 1995, 基因工程雄性不育烟草的获得, *植物学报*, 37(8): 659-660。
137. 王小军, 刘玉乐, Huang Yong, 田波, 1996, 可育的抗除草剂溴苯腈转基因小麦, *植物学报*, 38(12): 942-948。
138. 张晓国, 刘玉乐, 康良仪, 朱英国, 田波, 1997, 水稻花药特异表达基因启动子的扩增及克隆, *武汉大学学报*, 43(4): 480-484。
139. 潘照明, 刘玉乐, 李胜国, 康良仪, 田波, 玉米花药特异启动子 *Zm13* 的克隆及其活性测定, *农业生物技术学报*, 1997, 5(2), 203-204。
140. 罗玉英, 刘玉乐, 李胜国, 田波, TA29-Barnase 不育基因导入对烟草花药绒毡层及花粉发育的影响, *植物学报*, 1997, 39(10),

894-898.

141. 张晓国, 刘玉乐, 康良仪, 朱英国, 田波, 1998, 水稻雄性不育及其育性恢复表达载体的构建, 作物学报, 24(5): 629-634。
142. 宋俊岐, 邱并生, 王荣, 贺焰, 赵长生, 田波, 1998, 通过表达 ACC 脱氨酶基因控制番茄果实的成熟, 生物工程学报, 14(1): 33-38。
143. 宋俊岐, 王荣, 张永清, 赵长生, 赵春晖, 田波, 1999, 番茄氨基环丙羧酸合酶 5'端的顺式调控元件分析, 自然科学进展, 9(3): 252-258。
144. 张永清, 邱并生, 刘玉乐, 田波, 1992, 番茄 1-ACC 合成酶基因的克隆和部分序列分析, 高技术通讯, 2(11): 19-21。
145. 田波 张振勇 史春霖 杨希才 赵家英 张秀华, 1980, 小麦丛矮病毒的研究, 微生物学报 20(3): 289-295。
146. Tien Po, 1982, Cucumber mosaic virus from cornflower in China, Plant Disease, 66(4): 337-339.
147. 谢浩 郭志刚 田波, 1984, 哈密瓜花叶病流行的研究, 植物保护学报 11(2): 95-99。
148. 舒秀珍 田波等, 1983, 侵染大豆和桑树的烟草坏死病毒, 植物保护学报 10(1): 71-72。
149. 李国玄 田波等, 1985, 引起哈密瓜坏死的两个病毒分离物的鉴定, 植物病理学报, 15(3): 165-170。
150. 刘力, 陈声祥, 陈光哨, 洪益国, 王小凤, 裴美云, 田波, 1990, 我国水稻条纹叶枯病病原性质的研究, 病毒学杂志, 3: 306-311。
151. 洪益国, 裴美云, 王小凤, 田波, 1990, 水稻条纹叶枯病毒分子生物学的研究, 科学通报, 16: 1265-1267。
152. Hong Yiguo, Tian Bo et al., 1991, The study of molecular biology of rice stripe virus (I) — Molecular weight, amino acid composition and property of coat protein, Chinese Science Bulletin, 36(7): 602-605.

153. 裴美云 田波等, 1965, 油菜花叶病毒部分提纯及其若干性质的初步研究, 生物化学与生物物理学报 5(3): 303-310。
154. 邱并生 田波, 1982, 用酶联免疫法测定植物细胞内的病毒, 病毒学集刊 2: 25-30。
155. 谷登峰, 田波等, 1987, 抗黄瓜花叶病毒单克隆抗体细胞株的建立及其抗体鉴定, 微生物学报, 27(2): 128-133。
156. 毋谷穗, 康良仪, 田波, 1988, 用 A 蛋白夹层酶联免疫吸附法对黄瓜花叶病毒的血清学鉴定, 微生物学报, 28(3): 211-215。
157. L.Lange, P. Tien and J. Begtrup, 1983, The potential of ELISA and ISEM in seed health testing, Seed Sci. & Technol., 11: 477-489.
158. Chiu Ben-sin and Tien Po., 1982, Infection of Barley protoplasts with barley stripe mosaic virus detected and assayed by immunoperoxidase, J. Gen Virol., 58, 323-327.
159. 邱并生, 田波, 1982, 大麦条纹花叶病毒对大麦原生质体侵染的测定, 微生物学报, 22(4): 321-326。
160. 中国科学院微生物所植物病毒组, 1977, 油菜花叶病毒 15 侵染烟原生质体的研究, 微生物学报, 17(4): 306-310。
161. 张远征, 樊卫国, 李冬玲, 叶寅, 田波, 1998, 中国小球藻病毒及其分子生物学性质, 微生物学报, 38(3): 176-180。
162. 李传昭, 刘玉乐, 叶寅, 杨文定, 田波, 1995, 胞内随机序列多肽库的构建, 微生物学报, 35(3): 216-218。
163. 李传昭, 田波等, 1998, 表位九肽库的构建及人 IV 型胶原酶特异结合肽的筛选, 生物工程学报, 14(3): 239-245。
164. 王冰, 柯丽华, 江红, 田波, 李传昭, 1998, 从随机噬菌体肽库中筛选抗草鱼出血病病毒多肽的研究, 中国病毒学, 13(4): 351-357。
165. 王冰, 柯丽华, 田波, 1998, 抗草鱼出血病病毒多肽的结构分析, 中国病毒学, 13(4): 358-363。
166. 王学, 田波等, 1998, 人源抗体组合文库的构建及抗甲状旁腺素

相关蛋白单克隆抗体的筛选, 科学通报, 43(21): 2291-2294。

167. 汤健, 阎锡蕴, 刘元义, 田华松, 田波, 1998, IV 型胶原酶人基因工程抗体的研制, 中国科学, 28(3): 277-282。
168. Wang Xue, He Yuxian, Zhou Ying, Liu Shun'ai, Yan Xiyun and Tien Po, 1999, Construction of human combinatorial antibody library and screening of monoclonal antibody Fabs to human immunodeficiency virus type I, Chinese Science Bulletin, 44(4): 352-356.
169. 樊云祯, 高彤, 叶寅, 田波, 1997, 人血小板生成素 cDNA 合成、克隆及序列测定, 生物工程学报 13(4), 350-354。
170. 潘春刚, 田波, 1992, 抗体的生物工程, 中国病毒学, 7(2): 113-117。

虎尾草条纹花叶病毒 DNA 克隆 对小麦的农杆菌侵染*

邱并生 刘玉乐 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

田文中 李良材 李小兵 朱立煌

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

关键词 虎尾草条纹花叶病毒 DNA 克隆、农杆菌侵染、小麦

虎尾草条纹花叶病毒(CSMV)属于双生病毒,其基因组为单链环状DNA。但在被侵染的植物中可形成复制型的病毒双链DNA。寄主植物为单子叶植物的双生病毒有CSMV、玉米线条病毒(MSV)、玉米矮缩病毒(MDV)和马唐线条病毒(DSV)等^[1]。本研究的目的是企图用这类病毒对单子叶植物的侵染性构建禾谷类植物的基因转移载体。

CSMV DNA 的序列已有报道,与MSV、MDV和DSV约有50%的同源性^[1]。虽然MSV、MDV不能用机械的方法侵染植物,但可用一种称谓“农杆菌侵染”(Agroinfection)的技术侵染植物^[2-4],即在Ti质粒T-DNA左右边界序列间插入病毒DNA,利用农杆菌和病毒DNA侵染植物。目前CSMV DNA克隆的农杆菌侵染尚未见报道。本文首次报道了CSMV DNA克隆的农杆菌侵染,并对CSMV DNA的一部分序列的功能进行了研究,这为进一步构建禾谷类作物基因转移载体打下了一定的基础。

一、材料和方法

1. 病毒、植物、载体和菌种 CSMV为一澳大利亚分离物。受体小麦品种为科冬58, 15-17, 京花1号。载体包括pUC19和pRok II^[5], 菌种为含pRk 2013的E.coli HB 101, 农杆菌LBA 4404(含pAL 4404)和农杆菌A 281。

2. CSMV 双链 DNA 的纯化、酶切分析及克隆 从侵染了CSMV的虎尾草叶片中按文献[4]提取CSMV-dsDNA,并用BamHI, EcoRI, SphI, PstI, KpnI, Hind III进行酶切分析,酶切分析后,用单一切点的BamHI, EcoRI, Hind III, SphI分别单酶切CSMV双链DNA,并分别与载体pUC19重组连接,转化入E. coli DH 5,用电泳初步筛选出含有插入的克隆^[6]。BamHI, EcoRI, Hind III, SphI单酶切的CSMV双链DNA与载体pUC19形成的重组质粒依次编号为12, 31, 41, 74。这些质粒统称pUC19-CSMV。进行一系列的酶切分析筛选鉴定出12号质粒,并绘制出CSMV DNA的酶切图谱(见图1-2),用PstI酶切分析筛选鉴定出31, 41, 74号克隆。

1991-12-17收稿, 1992-05-07收修稿

* 国家863计划生物技术第一主题资助项目

3. 含全长 CSMV DNA 的重组双元载体的构建 用 BamHI, EcoRI, HindIII, SphI 分别单酶切 12, 31, 41, 74 号质粒, 并分别同双元载体 pRok II 重组连接, 转化 E. coli MC 1022。以分子杂交, 酶切, 电泳鉴定出含全长 CSMV DNA 的克隆^[7]。BamHI, EcoRI, HindIII, SphI 单酶切取全长 CSMV 双链 DNA 与双元载体 pRok II 形成的重组质粒依次编号为 2, 8, 16, 19, 统称 Rok II-CSMV。

4. 三亲接合 三亲接合的菌种分别为含 2, 8, 16, 19 号或 pRok II 质粒的 E. coli MC 1022, 含 pRK 2013 的 E. coli HB 101, 农杆菌 A 281 或 LBA 4404。按文献[8]接合。接合子编号为 2L, 8L, 16L, 19L, RL 和 2A, 8A, 16A, 19A, RA, 其中 L 表示受体菌为 LBA 4404, A 表示受体菌为 A 281, L 和 A 前面的数字表示菌体内含的质粒号码, R 表示菌体内的质粒为 pRok II。这些接合子统称农杆菌-T。

5. CSMV DNA 克隆对小麦的农杆菌侵染 (1) 小麦幼苗的制备。科冬 58, 15-17, 京花 10 号品种的小麦种子在 22℃ 潮湿条件下发芽 48h 备用。(2) 农杆菌的活化。所有的农杆菌-T 分别在含 100 µg/ml 的利福平和 50 µg/ml 的卡那霉素的 LB 培养基中 28℃ 培养 48h 后, 低速离心, 收集菌体, 菌体悬浮于 1/20 体积培养体积的 MS 培养基中, 立即使用。(3) 农杆菌侵染和检测。在小麦幼苗的芽尖至胚乳的 4 个不同部位注射 20 µl 活化农杆菌后, 将小麦幼苗种于温室, 同时种对照植物。3 个月后采样, 提取总核酸^[9], 以 CSMV DNA 为探针, 分子原位杂交检测。

二、实验结果

1. CSMV-dsDNA 的酶切分析及克隆 CSMV 新西兰分离物的 DNA 含有 2750 个核苷酸^[10], 酶切分析表明我们用梯度离心纯化的 CSMV-dsDNA 序列中 BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, SphI 各有一个酶切位点, 见图 1-1。用一系列酶酶切分析筛选鉴定出 12 号质粒, 见图 1-2, 并绘制了 CSMV DNA 的酶切图谱, 见图 2。这些结果显示我们纯化的 DNA 的 BamHI, EcoRI, SphI, BglII, PstI, XhoI 的酶切位点与已报道的新西兰 CSMV DNA^[10] 的切点相符, 但 KpnI, HindIII 与后者有差异。新西兰 CSMV DNA 在 580, 1040 位各有一个 KpnI 切点, 我们的仅在 1040 位左右有切点; 新西兰 CSMV DNA 无 HindIII 切点, 我们的 CSMV DNA 在约 300 位左右有切点(见图 2)。可见我们的 CSMV DNA 与新西兰分离物的核苷酸序列很相近, 但有一些差异。

我们得到了 12, 31, 41, 74 号四个克隆, 它们的 PstI 酶切分析筛选鉴定结果见图 1-3。

2. 含全长 CSMV DNA 的重组双元载体的构建 我们获得了 2 号 (BamHI 插入), 8 号 (EcoRI 插入), 16 号 (HindIII 插入), 19 号 (SphI 插入) 四个重组子。菌落杂交结果见图 1-4, 5, 6, 7。

3. 农杆菌侵染 农杆菌侵染小麦后, 分子原位杂交检测, 农杆菌-T 侵染的植物均有或强或弱的杂交信号, 其中 19A、2A 侵染的植物杂交信号很强, 其它农杆菌-T 侵染的植物杂交信号较弱。同时含同样质粒的农杆菌 A 281 侵染的植物比农杆菌 LBA 4404 侵染的植物杂交信号强。各种对照植物(用含 pRoK II 的农杆菌 A 281[CK₁] 和 LBA 4404[CK₂]) 侵染的植物, 未注射仅沾取了混合农杆菌-T(CK₃) 的植物, 正常植物 (CK₄) 杂交信号均为阴性, 见图 1-8。这些结果表明 CSMV DNA 已存在于农杆菌-T 侵染的小麦中。检测到 CSMV DNA 存在的植物中没有明显的发病症状。

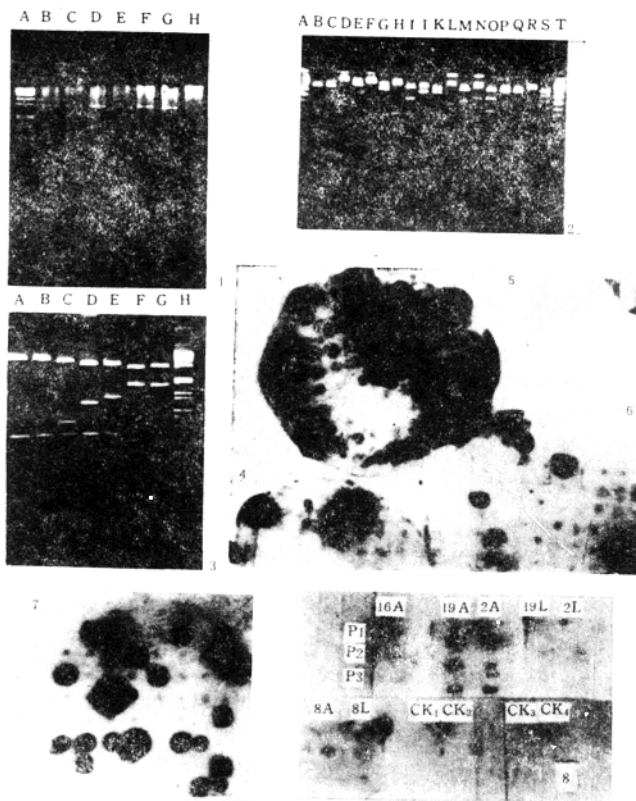


图 1

1——CSMV-dsDNA 酶切分析图谱。A为SppI, B为EcoRI, C为BamHI, D为HindIII, E为PstI, F为KpnI, G为SphI, H为No cut.

2——12号质粒的鉴定的酶切分析图谱。A为SppI DNA EcoRI 酶切片段, B为pUC19-BamHI, C为BamHI, D为BglII, E为BglII+BamHI, F为XhoI, G为XhoI+BamHI, H为PstI, I为PstI+BamHI, J为KpnI, K为KpnI+BamHI, L为SalI, M为SalI+BamHI, N为SphI, O为SphI+BamHI, P为HindIII, Q为HindIII+BamHI, R为EcoRI, S为EcoRI+BamHI, T为SppI DNA EcoRI 酶切片段。

3——12,31,41,74号克隆筛选的PstI酶切分析图谱。A为12号, C为31号, D为41号, E为74号, H为SppI DNA EcoRI 酶切片段。

4,5,6,7——分别为2,8,16,19号克隆的菌落杂交图谱。

8——检测农杆菌侵染小麦品种的分子杂交图谱。P1为科冬58, P2为15-17, P3为京花1号小麦品种。16A, 19A, 2A, 8A, 19L, 8L, 2L 分别为内含相应号码质粒的农杆菌A281或LBA4404, CK1为未注射仅沾取了混合农杆菌-T的植物, CK2, 为正常植物。CK3和CK4分别为内含pROKII的农杆菌A281和LB4404侵染的植物。

三、讨 论

19A 和 2A 侵染过的小麦,用 CSMV DNA 作探针,分子原位杂交有强烈的信号,表明

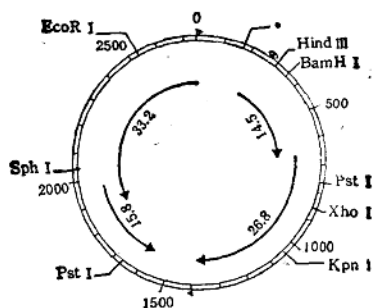


图2 CSMV 可能的编码区^[11]及其酶切图谱
15.8kD ORF 无起始密码,14.5kD ORF 可能不被转录^[11]。病毒(+)链方向为
顺时针方向。*表达此处的序列为 TAATATTAC

有大量的 CSMV DNA 存在于被侵染的小麦中,同时也表明 CSMV DNA 的 BamH I 和 Sph I 位点附近的序列与病毒的复制和侵染的关系不大。

含同样质粒的农杆菌 A 281 侵染的植物比农杆菌 LBA 4404 侵染的植物杂交信号强,表明 A 281 向小麦中转移 T-DNA 的能力比农杆菌 LBA 4404 强。用农杆菌侵染检测农杆菌向单子叶植物转移 T-DNA 的能力是一个有效的方法。我们在检测到 CSMV DNA 存在的植物中均未表现明显的发病症状,我们认为这是由于温室的温度、湿度等条件不是最佳的结果。

虽然 Ingo 认为用农杆菌侵染的方法得到转基因单子叶植物几乎是不可能的^[10],但是一些双生病毒包括 CSMV 的 DNA 中有一段序列可能是不被转录的^[10],在我们的实验中,这一段序列的 BamH I 插入(2号质粒)和另一段序列的 Sph I 插入(19号质粒)对病毒的复制和侵染关系不大,这使用农杆菌侵染的方法得到转基因单子叶植物有可能成功。由于农杆菌侵染的受体为完整的植物幼苗,如果农杆菌侵染方法能与单子叶植物转座子系统配合,就有可能得到既能系统侵染又能仅使外源基因整合入单子叶植物染色体的病毒,这样就有可能不经过植物再生而产生转基因单子叶植物,这无疑会对单子叶植物基因工程以巨大的推动作用。

参 考 文 献

- [1] Andersen, M. T. et al., *Virology*, 164(1988), 443—449.
- [2] Grimsey, N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(1986), 3282—3286.
- [3] Grimley, N. H. et al., *Bio/Technology*, 6(1988), 185—189.
- [4] Woolston, C. J. et al., *Plant Molecular Biology*, 1988, PLAN-0491, 1—9.
- [5] Bevan, M., *Nucleic Acids Res.*, 22(1984), 12: 8711—8721.
- [6] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1982.
- [7] Reed, K. C. et al., *Nucleic Acids Res.*, 18(1990), 10:3093.
- [8] 张春霞等,科学通报,34(1989),7: 540.
- [9] Junghans, H. et al., *Biotechniques*, 8(1990), 2: 176.
- [10] Ingo, P., *Bio/Technology*, 8(1990), 6: 535—542.

构建具感染性的花椰菜花叶病毒克隆

吴世宣 张春霞 张英华 王革娇 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

关键词 花椰菜花叶病毒、克隆、感染性

花椰菜花叶病毒 (CaMV) 是双链 DNA 病毒。它特殊的复制特点及其可作为植物遗传工程载体的潜在可能性都引起了人们强烈的兴趣。为了深入进行研究, 首先必须得到有感染能力的病毒基因组的克隆。虽然国外陆续报道了几株病毒基因组的克隆具感染性^[1,2], 但国内迄今未报道过由国内株系得到有感染性的克隆。这里报道以国内分离的新疆株 CaMV 为材料, 将其基因组克隆到大肠杆菌质粒 pUC9 上; 经大肠杆菌扩增后重组质粒经酶切成线状后侵

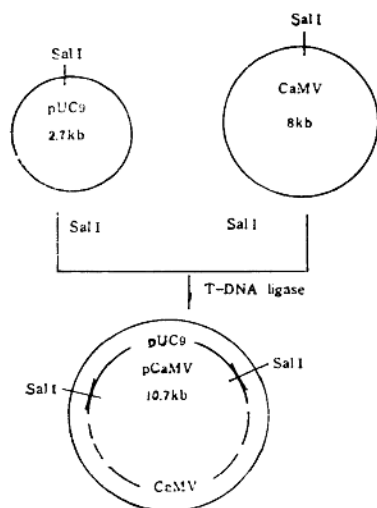


图1 含有完整 CaMV-DNA 基因组重组质粒的构建

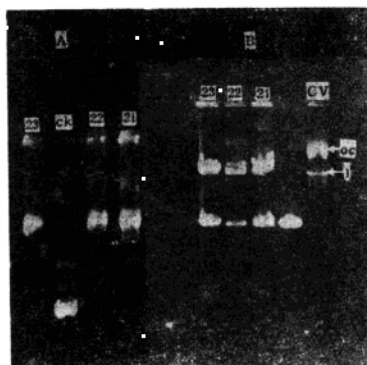


图 2

A. 含有 CaMV-DNA 的重组质粒和对照质粒 pUC9 在 0.7% 琼脂糖凝胶上电泳泳动率的比较。21, 22, 23 分别代表不同的白色克隆, CK 为 pUC9; B. Sal I 酶切后的电泳图谱。21, 22, 23, CK 同 A 所述, CV 为 CaMV-DNA, OC 为其开环形式, l 为其线性形式

染芜菁。由感染症状、电镜观察及其基因组的内切酶图谱分析证明克隆的基因组确有感染性, 并生成与病毒本身感染同样的病毒颗粒及同样的基因组。

本文 1987 年 10 月 31 日收到, 1988 年 7 月 7 日收到修改稿。

一、材料和方法

1. 材料

病毒为花椰菜花叶病毒新疆株 CaMV-XJ^[3]; 芜菁为 *Brassica rapa* cv. just right 质粒 pUC9 自己提取。

2. 方法

(1) 病毒基因组的克隆。接种病毒于长有两片真叶的芜菁上,一个月后,采摘感病的叶片提取病毒与核酸。用限制性内切酶 *Sal*I 分别酶解质粒 pUC9 和 CaMV-DNA。用 T4-DNA 连接酶连接,如图 1 所示。连接后的 DNA 转化 JM107,在含氨苄青霉素的 MacConkey 培养基上保温过夜。含有重组基因的克隆呈白色,非重组克隆呈红色。挑取白色克隆,扩增后提取质粒。

(2) 克隆的分析。在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳上检查重组质粒大小并检查经 *Sal*I 酶切后插入片段的大小。

(3) 侵染性测定。纯化足够量的重组 DNA 质粒。将其中一部分用 *Sal*I 酶切,然后将酶切后及未酶切的重组质粒分别摩擦接种到芜菁叶片上,同时接种 CaMV-DNA 作为对照。

(4) 电镜检测经重组质粒侵染的叶片中病毒粒子的存在及其形态观察。将被克隆 pCaMV21、pCaMV22 侵染的芜菁叶片破碎、匀浆,采用常规方法提取 CaMV,并于电镜下观察。

(5) pCaMV 及其侵染后的病毒核酸的内切酶图谱分析。将上述 pCaMV21、pCaMV22 侵染的芜菁叶片中提取的病毒用酚抽提出各自的核酸,将其用多种限制性内切酶酶解,进行酶解分析;同时作 pCaMV 重组质粒的酶解分析。

二、结 果

1. 重组克隆的分析 三个重组克隆 DNA 分子大小及插入片段大小的分析结果如图 2 所示。克隆 21,22,23 均被酶解为二条带,其中泳动快的一条带与对照 pUC9 的线形质粒泳动率一致,而泳动慢的一条带正与线状的 CaMV-DNA 泳动率一致。以上结果表明,克隆 21,22,23 中确定含有与 CaMV-DNA 同样大小的插入片段。

2. 侵染性测定 接种两星期后感病植株开始表现症状,首先发现有明显的脉明,紧接着出现褪绿斑,有些叶片卷曲,呈现典型的 CaMV 侵染症状。图 3 显示了经 *Sal*I 酶切后的 pCaMV21, pCaMV22 接种芜菁的感病症状。图 3A 为整个植株的感病情况。左边为 pCaMV21 经 *Sal*I 酶切后侵染的植株,表现明显的感病症状;右边为健株对照。图 3B 显示了叶片的感病情况。中间两片病叶为经 pCaMV21, pCaMV22 侵染的叶片;左边为 CaMV 病毒侵染的叶片;右边为健康对照。

表 1 列出了侵染性测定结果。从表中可以清楚地看出,缓冲液和未经 *Sal*I 酶解的重组质粒 DNA 都无侵染性;CaMV-XJ DNA 和经 *Sal*I 酶解的重组质粒 pCaMV21, pCaMV22 均有侵染性。在接种的植株中侵染率分别为 33%, 50% 和 60%。而经 *Sal*I 酶解的 pCaMV23 接种后未表现症状。由于 CaMV DNA 的感病率只有 33%, 所以酶切后的 pCaMV21, pCaMV22 没有出现 100% 的侵染率可能与人为操作有关。

3. 电镜检测结果 图 4 显示放大 10 万倍的病毒粒子照片。病毒粒子直径为 50nm 左

右,颗粒的形状和大小与已报道的结果一致^[7]。

表1 重组质粒和病毒粒子中 CaMV-DNA 的侵染性测定

DNA	SalI	株数	DNA 量	感病株	病/健
SSc	-	3	0	0	0/3
CaMV	-	3	10 μ g	1	1/3
pCaMV21	-	4	20 μ g	0	0/4
pCaMV21	+	4	20 μ g	2	2/4
pCaMV22	-	4	20 μ g	0	0/4
pCaMV22	+	5	20 μ g	3	3/5
pCaMV23	-	4	20 μ g	0	0/4
pCaMV23	+	5	20 μ g	0	0/5

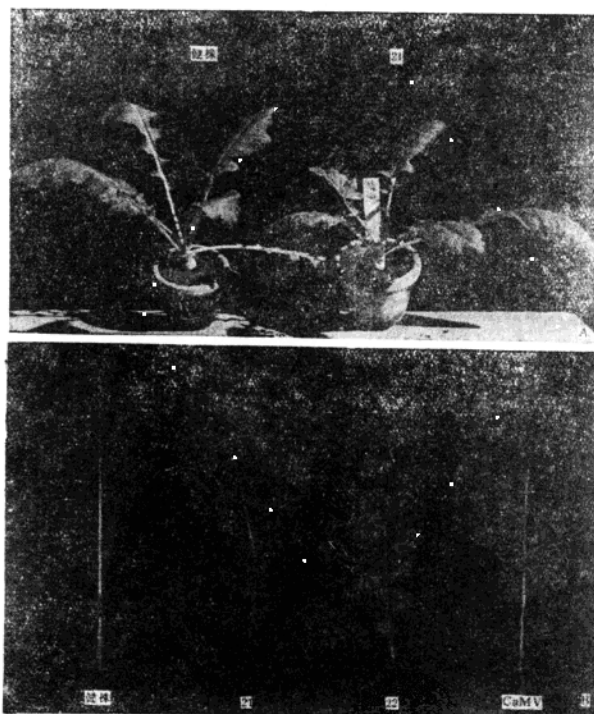


图3 经 SalI 酶切后的 pCaMV 接种而感病的植株及叶片

A. 左为经 21 号克隆侵染而感病的植株,右为健株; B. 中间两片叶片为经 21,22 号克隆侵染后感病的叶片,右边叶片为经 CaMV 侵染而感病的叶片,左边叶片为健叶对照

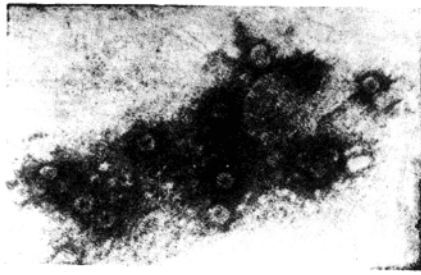


图4 由图3 pCaMV 克隆侵染的病叶提取的病毒粒子电镜照片 ($\times 70\ 000$)

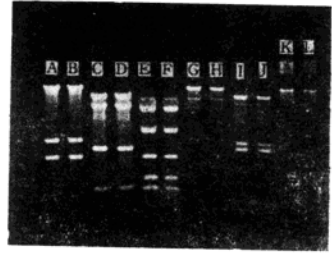


图5 内切酶酶解分析

A, B 分别为 pCaMV21, pCaMV22 经 BglI 酶解; C, D 为 PstI 酶解以上两个克隆; 从 E 到 L 为由此两个克隆侵染后提取的病毒核酸分别被 BglII(E, F), BglII(G, H), PstI(I, J), XhoI(K, L) 酶解结果

4. pCaMV 及其侵染后的病毒核酸的内切酶图谱分析

图5显示了酶解后琼脂糖电泳的结果: A和B分别为 pCaMV21 和 pCaMV22 被 BglI 酶解后的结果。根据序列分析^[1]可知其在 CaMV-DNA 上有一个切点, 在 pUC9 上有两个切点, 所以产生三条带。二个克隆产生的片段大小完全一样, 说明这两个克隆中 CaMV-DNA 在 pUC9 上连接的方向一致。C, D 是 PstI 切断二个克隆的结果, 同样证实了上述结论。从 E 到 L 为由此两个克隆侵染后提取的病毒 DNA 分别被 BglII(E, F), BglII(G, H), PstI(I, J), XhoI(K, L) 酶解的图谱。所有这些结果都和已知 CaMV 的序列结果相符^[1]。因此可以得出结论, pCaMV 克隆侵染后生成的病毒核酸与原来病毒核酸是一致的。

三、讨 论

我们在大肠杆菌质粒中克隆了完整的 CaMV 基因组, 通过症状、病毒颗粒的电镜观察及其核酸的酶切图谱分析, 证实了两株克隆确实含有完整的有 CaMV 活性的基因组。这为以后研究其结构和功能, 改造突变成弱毒疫苗及改造成为外源基因载体都打下了良好的基础。至于 pCaMV23 为什么没有侵染性原因并不清楚。根据以前序列分析另一个也无侵染性的 CaMV 克隆发现在基因组中多了一段重复顺序^[4]来看, 很可能此重组质粒中 CaMV 基因组发生了某种突变, 此外也不排除接种技术上的原因。

致谢: 王小凤同志提供病毒毒源和芜菁种子, 并提供了很多有价值的建议, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Howell, S. H., Walker, L. L., Dudley, R. K., *Science*, **208**(1980), 1265—1267.
- [2] Lebeurier, G., Hohn, T. and Hohn, B., *Gene* 1980, 12: 139—146.
- [3] 王小凤、谢德贞、徐绍华、袁美云, 微生物学报, **20**(1980), 4: 365—369.
- [4] 方荣祥等, 病毒学报, **1**(1985), 3: 247—255.

芜菁花叶病毒外壳蛋白基因的克隆和表达

邱井生 王晋芳 王小凤 沈学军 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

芜菁花叶病毒 (Turnip Mosaic Virus, TuMV) 属于马铃薯 Y 病毒组, 其基因组为单链 RNA, 寄主范围广, 能侵染 20 个科的双子叶植物^[1]。在我国 TuMV 的分布遍及各地, 是危害油菜、白菜、萝卜等十字花科作物的主要病毒。目前尚无有效的防治手段。转基因植物的研究为植物抗病育种提供了一条有利途径。本实验成功地合成了 TuMV-RNA 的 cDNA, 以 pUC19 为载体进行了外壳蛋白基因的克隆。Western Blot 分析结果表明, 第 30 号重组克隆在大肠杆菌中有 TuMV 外壳蛋白产物的表达。

材 料 和 方 法

(一) TuMV-cDNA 合成和克隆

1. 病毒的提纯: 将 TuMV (北京郊区大白菜分离物) 繁殖在芥菜上作为提取材料, 参照 Choi^[2]的方法, 经差速离心和 Cs₂SO₄ 梯度离心得到提纯的病毒样品。

2. TuMV-RNA 的提取: 主要依据 Toriyama^[3,4]方法进行。提纯的 TuMV 经蛋白酶 K 和 SDS-酚处理, 提取 RNA。

3. cDNA 合成: 根据 TuMV-RNA 3' 末端具有 poly(A) 的特点, 以 oligo(dT) 作引物, 用 BRL 公司的 cDNA 合成试剂盒分别合成 cDNA 的第一条链和第二条链, 加入 EDTA 到 20mmol/L 终止反应, 琼脂糖凝胶电泳分析产物大小。

4. cDNA 克隆: 用 *E. coli* 的 DNA 聚合酶 I 大片段酶将 cDNA 两端补齐, 用 SmaI 将 pUC19 切成平端, 在 T₄-DNA 连接酶作用下室温反应 4 小时。重组质粒转化 *E. coli* DH5 α 。具体方法详见文献^[5]。

(二) 重组克隆的筛选及鉴定

1. 菌落杂交: 以 γ -³²P-ATP 标记 TuMV-RNA 5' 末端制备杂交探针, 杂交方法按 Shah^[6]方法进行。

2. 重组质粒的检查: 采用快捷法^[7]提取质粒, 用 EcoRI 和 BamHI 进行酶切, 经 1% 琼脂糖

凝胶电泳分离检测插入片段。

(三) TuMV 外壳蛋白基因的筛选

1. 重组克隆的免疫筛选: 首先用带有 pUC19 的 *E. coli* DH5 α 对 TuMV 抗血清进行非特异性吸收处理^[8]。将阳性克隆菌点在硝酸纤维素膜上, 在含有 Ampicillin 的 LB 平板上培养, 用氯仿熏透膜 15 分钟, 后悬于裂解液 (100mmol/L Tris-HCl pH7.8, 150mmol/L NaCl, 5mmol/L MgCl₂, 1.5% BSA, 1 μ g/ml 牛胰 DNase, 40 μ g/ml 溶菌酶) 中室温过夜, 经 TNT (10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 150mmol/L NaCl, 0.05% 吐温 20) 处理后, 与 TuMV 抗血清进行免疫反应, 最后采用碱性磷酸酶系统进行显色^[9]。

2. Western Blot 分析: 将直接免疫筛选得到的阳性克隆菌体悬于蛋白裂解液 (2% SDS, 5% 硫酸乙醇, 62.5mmol/L Tris, 10% 甘油, 0.05% 溴酚蓝) 中煮沸 10 分钟, 离心后的上清液进行 SDS-PAGE 分离蛋白, 将蛋白电转移到硝酸纤维素膜上。转移缓冲液为 10mmol/L NaHCO₃, 3mmol/L Na₂CO₃ (pH9.9), 350mA 转移 30 分钟, 免疫及显色反应与直接免疫筛选相同。

结 果 和 讨 论

(一) cDNA 合成和克隆

合成的 cDNA 经 1.4% 碱性琼脂糖电泳和放射自显影分析, 表明第一和第二条链的大小在 0.30—3kb。通过载体 pUC19 转化后获得白色克隆。

以 TuMV-RNA 为探针, 挑选出 300 多个白色转化菌进行菌落杂交, 其中有 39 个杂交斑点为强阳性。此结果证明这 39 株克隆菌含有 TuMV-cDNA。

(二) TuMV 外壳蛋白基因的表达

在硝酸纤维素膜上进行直接免疫筛选的结果, 只有第 30 号重组克隆出现了显色斑点。对该

本文于 1991 年 4 月 9 日收到。

克隆进行 Western Blot 检测,结果膜上出现了一条与 TuMV 外壳蛋白同样大小 (27000 Dalton) 的显色带(见图1),从而确证了第30号克隆含有 TuMV 外壳蛋白的基因。

在用 EcoRI 和 BamHI 对重组质粒进行酶切分析时发现第30号克隆能产生两个片段,这表明插入到 pUC19 中的 TuMV-cDNA 片段中含有此限制性内切酶位点,于是我们分别用 EcoRI 和 BamHI 对第30号进一步作酶切分析,结果仅有 EcoRI 可将 TuMV-cDNA 切成大小分别为 0.60kb 和 0.35kb 两个片段(见图2)。

本实验的结果表明我们已经获得能表达 TuMV 外壳蛋白基因的克隆,对植物抗病基因工程打下了基础。TuMV 外壳蛋白基因的序列分析正在进行中。

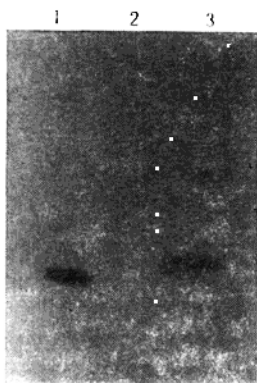


图1 Western Blot 分析 TuMV 外壳蛋白基因在 *E. coli* DH5 α 中的表达

1. TuMV 外壳蛋白; 2. *E. coli* DH5 α ;
3. 含有外壳蛋白基因的重组克隆(第30号克隆)

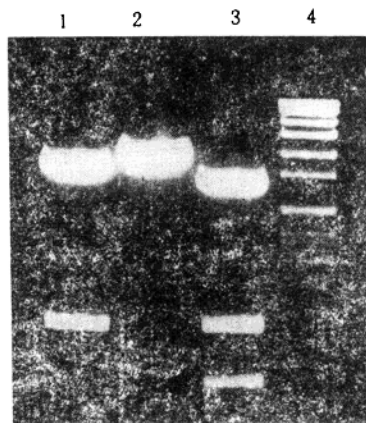


图2 第30号重组质粒酶切电泳图谱

1. EcoRI 单酶切; 2. BamHI 单酶切; 3. EcoRI + BamHI 双酶切; 4. 标准分子量(枯草芽孢杆菌噬菌体 Sppl DNA 的 EcoRI 酶切片段)

参 考 文 献

- [1] 复旦大学生物系植物病毒研究室(译): 植物病毒志, 第一集, 第21—23页, 上海科学技术出版社, 上海, 1981年。
- [2] Choi, J. K. et al.: *Ann. Phytopatho Soc. Japan*, 43: 440—448, 1977.
- [3] Toriyama, S. et al.: *J. Gen. Virol.*, 67: 1247—1255, 1986.
- [4] Toriyama, S. et al.: *J. Gen. Virol.*, 70: 505—511, 1989.
- [5] Stanton, B. G.: *Plant Molecular Biology Manual*, PMAN-A7/39—41, Kluwer Academic Publishers, London, 1988.
- [6] Shah, D. M. et al.: *Science*, 233: 478—481, 1986.
- [7] Sorghini, M. A.: *Nucleic Acids Res.*, 17(9): 3604, 1988.
- [8] Sambrook, J. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

CLONING AND EXPRESSION OF COAT PROTEIN GENE OF TURNIP MOSAIC VIRUS

Qiu Bingsheng Wang Jinfang Wang Xiaofeng Shen Xuejun Tian Po

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Turnip mosaic virus (TuMV), a member of the potyvirus group, and considered to be the main virus that cause severe disease of crucifer plants, such as *Brassica Campestris*, *B. Pekinensis*, *Raphanus Sativus* etc. The RNA was extracted from TuMV, purified by differential centrifugation and CsSO₄ density gradient centrifugation, using oligo-dT as a primer to synthesize cDNA, which was then cloned into vector pla-

smid pUC19. It has been shown by immunological screening and Western Blot analysis that the No. 30 clone expressed the coat protein gene product. The sequence analysis of coat protein gene is in progress.

Key words

Turnip mosaic virus; Coat protein;
Gene expression