

# 鸡蛋花花叶病毒 28.5ku 移动蛋白 基因的克隆与序列分析

邓晓东, 费小雯, 刘志昕, 胡新文, 郑学勤

(华南热带农业大学分院, 热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

## *Cloning and Sequence Analysis of the 28.5 ku Movement Protein of Frangipani Mosaic Virus (FMV)*

Deng Xiaodong, Fei Xiaowen, Liu Zhixin, Hu Xinwen, Zheng Xueqin

(National Key Biotechnology Laboratory of Tropical Crops, CATAS, Haikou 571101)

**Abstract:** Based on conserved regions among genomic RNA of tobamoviruses, a pair of primers spanning the sequence encoding the movement protein were synthesized. A cDNA fragment of 1700bp was thus amplified by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). The fragment was cloned into pGEM-T easy vector and sequenced. DNA sequence analysis showed that the fragment contained a region of 768 nucleotides encoding protein of 256 amino acids of frangipani mosaic virus (FMV) and also partial sequence corresponding to 180 ku and 17.5 ku proteins.

**Key words:** *Plumeria acutifolia*; FMV; Movement protein gene; Sequence analysis

关键词: 鸡蛋花; 鸡蛋花花叶病毒; 移动蛋白基因; 序列分析

中图分类号: Q755; S685.99 文献标识码: A 文章编号: 0578-1752(2000)02-0107-03

鸡蛋花 (*Plumeria acutifolia*) 为热带地区著名的观赏植物, 受鸡蛋花花叶病毒 (frangipani mosaic virus, FMV) 感染后, 其生长发育受到抑制, 并表现花叶的症状<sup>[1]</sup>。FMV 是烟草花叶病毒组 (tobamoviruses) 的成员。病毒基因组与 TMV 类似, 为单链正义 RNA。基因组 5' 端为帽子结构, 3' 端为 tRNA 结构。基因组编码病毒复制、细胞间移动、外壳蛋白等 4 个蛋白。其中 28.5ku 蛋白涉及病毒在细胞间的移动, 并且与病毒 RNA 与植物细胞的胞间连丝相互作用有关<sup>[2]</sup>。

目前, 烟草花叶病毒组的主要成员如 TMV-U1、ToMV、PMMV、TMGMV、CGMMV 等基因组 RNA 的序列, 以及 ORSV 外壳蛋白的核苷酸序列已经报道, 却未见 FMV 各基因序列的报道。对于 FMV 基因组序列的研究, 可以使我们了解它与已知的烟草花叶病毒组其它病毒基因结构的差异, 并为进一步阐明病毒对植物的致病机理, 基因结构差异与寄主关系

收稿日期: 1999-05-05

作者简介: 邓晓东(1969-), 男, 助理研究员, 博士, 从事植物病毒分子生物学研究工作。

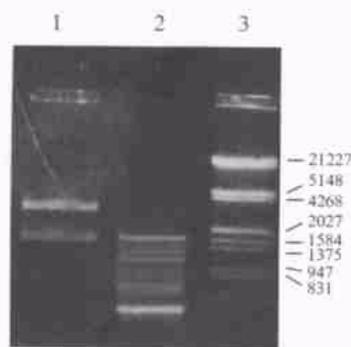
等方面起到积极的作用。为此,作者通过已知保守区序列,首先对移动蛋白基因进行了克隆及序列分析。

## 1 材料与方 法

参照文献[3]的方法,根据已发表的烟草花叶病毒组氨基酸保守区序列,应用序列分析软件设计了一对引物:P1:5'-AAA(G)AAA(G)ATA(C,T)AAC(T)GCC(A,G,T)-3',P2:5'-C(T)TGT(A,C,G)GTC(T)TGA(G)AAC(T)TG-3'。其中,P1对应于TMV180ku氨基酸的1330~1335位,P2对应于TMV外壳蛋白氨基酸的34~38位。用提纯病毒RNA为模板,在简并引物P2引导下,经反转录酶反应合成cDNA第一链,其产物用简并引物P1、P2进行PCR扩增。反应条件为:94℃45s,48℃60s,72℃120s。30个循环之后,72℃10min。低熔点胶回收PCR扩增产物,经乙醇沉淀后,溶于重蒸水中,并与克隆载体pGEM-T easy连接,转化DH5 $\alpha$ ,在含有IPTG和X-gal的平板上培养过夜。选择白色菌落,用碱裂法小量提取质粒,EcoRI酶切后,电泳鉴定重组子。对阳性重组子进行大量提取,纯化。用T7和SP6引物进行正反测序(本实验室ABI377A DNA自动测序仪)。

## 2 结果与讨论

用设计的简并引物进行RT-PCR,1%琼脂糖电泳检查,扩增产物有一主要条带约1700bp(图1),与设计的片段大小相一致。挑选的重组克隆经电泳、酶切分析鉴定(图1),可切下约1700bp的片段,说明PCR产物已插入载体中。阳性克隆经正反双向测序,并用PCgene软件进行序列分析。结果全长1693bp的序列含一个开放的阅读框架,即FMV移动蛋白基因序列。起始于749位ATG,中止于1516位TAG。推导的氨基酸序列共256个氨基酸,分子量为28.5ku(Genebank登记号AF165884),并含部分180ku蛋白和外壳蛋白基因。



1. 重组子经过EcoRI酶切

Digest with EcoRI

2. PCR扩增产物

The products of PCR

3. 分子量标准

$\Delta$ DNA/HindIII + EcoRI

图1 插入片段的酶切鉴定

Fig 1. Identification of the recombinant

烟草花叶病毒基因组表达的蛋白、移动蛋白较其它蛋白的变化大[3],但保守区却有较高的同源性。与CGMMV29KD蛋白相比较,FMV28.5ku蛋白氨基酸序列在COOH端差异较大。序列编码与单核苷酸结合的部位(保守区69~101[2-4])具有很高的同源性(图2)。

对编码部分FMV180ku蛋白氨基酸序列分析,RNA聚合酶区段具有很高的保守性(图3)[3]。

烟草花叶病毒组移动蛋白被认为与病毒在寄主细胞间移动有关,具体过程已基本阐明。自然界烟草花叶病毒组移动蛋白只能在受侵染的植物中分离。有证据表明,从TMV中分离



图 2 FMV 与 CGMMV 移动蛋白保守区比较

Fig. 2 Comparison of conserved amino acid sequences of the 28.5ku movement protein between FMV and CGMMV

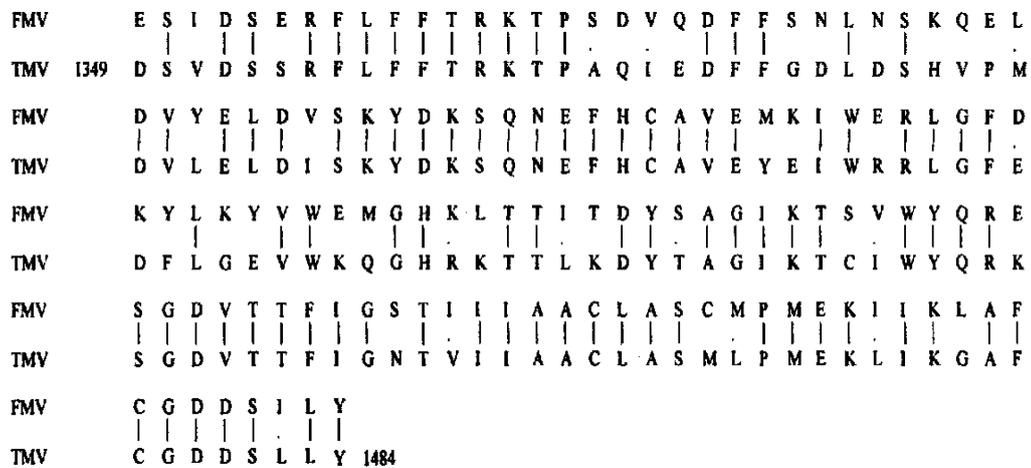


图 3 FMV 与 TMV180ku(1349~ 1484) 蛋白保守区比较

Fig. 3 Comparison of conserved amino acids sequences of the 180 ku protein(1349~ 1484) between FMV and TMV

的移动蛋白分子量较核苷酸推导的约大,这是因为移动蛋白已经过磷酸化等翻译后的加工修饰。

此次分离的 FMV 28.5ku 蛋白基因,为 FMV 全序列的研究打下了基础。由于 TMV 有作为潜在的向植物导入外源基因载体的可能,而烟草花叶病毒组成员有结构的相似性,对于其基因组序列的了解,使得在利用 FMV 亚基因组启动子构建 TMV 植物转化载体上有着重大的意义。

#### 参考文献:

- [1] 库尔斯塔克 E 主编,裴美云译.植物病毒比较诊断指南[M].北京:农业出版社,1991.
- [2] Cytosky V, et al. The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein [J]. Cell. 1990, 60: 637~ 647.
- [3] Alonso E, Garcia-Luque I, et al. Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper [J]. J. Gen. Virol. 1991, 72: 2875~ 2884.
- [4] Saito T, Yamana K, et al. Interval homologies of 30K protein of tobamoviruses [J]. Virology. 1989, 167: 653~ 656.