

香蕉束顶病毒复制酶基因克隆及转基因表达

林德球¹ 屈良鹤² 张宏达²

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东广州 510631; 2. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275)

摘要: 以广州市郊获得的香蕉束顶病毒(BBTV)的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增得到香蕉束顶病毒复制酶基因的 1.1 kb DNA。所获得的 DNA 序列与澳大利亚的 BBTV 序列的同源性达 90%, 这部分序列编码香蕉束顶病毒复制酶基因的羧基端。将改造的 BBTV 复制酶基因克隆到 pBI 121 的 CaMV 35S 和 NOS 终止序列之间, 构建表达载体, 并采用基因枪轰击香蕉试管苗生长点组织的方法, 经 PCR 检测和 Western blot 分析, 获得 4 株具有 BBTV 复制酶基因整合表达的 T₀ 代转基因香蕉。转基因植株的抗病性正在检测之中。

关键词: 香蕉束顶病毒; 复制酶基因; 转基因香蕉; 抗病性

中图分类号: Q939.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)02-0142-05

The Cloning of Replicase Gene of Banana Bunchy Top Virus and the Gene Expression

LIN De-qiu¹ QU Liang-hu² ZHANG Hong-ta²

(1. School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The DNA was isolated from banana grown in Guangzhou, which was infected with bunchy top virus. 1.1 kb DNA of replicase of banana bunchy top virus (BBTV) was obtained by PCR using this virus DNA as templates for amplification. The derived DNA of the BBTV replicase was encoded by the C-Terminal of BBTV. It was homologous to 90% with the Australian BBTV. The reformed BBTV replicase was cloned to pBI 121 in the position between CaMV 35S promoter and NOS termination sequence, and a plant expressed carrier was established. Four transgenic platelets with BBTV replicase gene in T₀ generation were detected by PCR and Western blot analysis. The ability of these transgenic banana against bunchy top virus is being investigated.

Key words: Banana bunchy top virus; Replicase gene cloning; Transgenic banana; Disease resistance

香蕉是我国南方主要水果之一, 具有栽培容易、生产周期短、效益高等特点, 是国内消费和出口创汇的一个重要资源。每年世界香蕉产量达 7.6×10^7 t, 但由于各种病害引起的损失约占总量的 50%; 其中以香蕉束顶病最为严重^[1]。目前, 广东香蕉束顶病发生率为 10%–30%, 表现为植株矮缩, 不开花结蕾, 严重影响香蕉生产。

香蕉束顶病研究始于上世纪初, 但至今对发病原因还未有统一的认识^[1-3]。有人认为香蕉束顶病是

由细菌、类菌原体引起^[4]; 但多数研究工作证实香蕉束顶病毒 (BBTV) 主要借带病蘖芽和蕉脉蚜 (*Pentalonia nigronervosa*) 传染^[5,6]。BBTV 的研究相对于香蕉花叶病毒而言进展较慢; 其主要原因是未能找到该病毒的纯化方法。1990 年 Wu 和 Su^[9] 首先提出了 BBTV 的纯化方法, 随后有关 BBTV 的特性、核苷酸组成和 DNA 序列以及香蕉束顶病防治等研究有了很大的进展^[7-11]。在抗病毒植物基因工程方面, Zaitlin 等人^[12] 将烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋

白基因转化到烟草中,并获得高水平表达的转基因烟草植株;进一步工作表明转基因烟草表现出抗 TMV 侵染的抗性,由此确立了抗病毒植物基因工程这一新领域。目前有研究者采用 BBTV 的基因。利用基因工程技术来获得抗 BBTV 的香蕉。本研究报告广州地区 BBTV 复制酶基因的克隆及其转基因表达,为防治香蕉束顶病提供重要途径。

1 材料和方法

材料 质粒 pGEM-T、pBI 121、DH5 α 菌株系为 Promega 公司产品, Taq DNA 聚合酶购于华美公司; BBTV 单克隆抗血清由中国科学院华南植物研究所提供, PCR 引物为:

第一组引物:

① 5' GAGGCTATTCGGCTATGACTG 3'

② 5' ATCGGGAGCGGCGATACCGTA 3'

第二组引物:

③ 5' GGAAGAAGCCTCTCATCTGCTTCAGAG 3'

④ 5' CAGGCGCACACCTTGAGAAACGAAAGG 3'

BBTV 的提取和纯化 按林德球^[9]的方法进行,采用液氮冷冻、差速离心和蔗糖密度梯度离心加以纯化。

BBTV 复制酶基因的克隆及序列分析 参照 Harding 等人测得的 BBTV 复制酶基因序列和 PCR 步骤^[9]进行合成的 PCR 第一组引物在 5' 和 3' 端分别有 *Apa* I 和 *Sac* I 限制性酶切位点及 3 个保护碱基。以 BBTV 的 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,然后用玻璃粉纯化系统加以纯化,并将纯化的 DNA 克隆至 pGEM-T 载体中。用 Wizard DNA 纯化试剂盒对质粒 DNA 加以纯化,然后采用全自动测序系统测定重组质粒的 DNA 序列。

重组体的构建 根据广州地区的 BBTV 复制酶基因序列特点,在合成的第二组引物 5' 端引入 *Bam* H I 酶切位点和起始密码 ATG 及设计 *Sac* I 酶切位点。以 BBTV 的 DNA 为模板,PCR 按 Harding 等人^[9]方法进行。PCR 扩增后,取 5 μ l 经 *Bam* H I 和 *Sac* I 双酶切的 PCR 扩增产物,加入质粒 pBI 121,用 T₄ DNA 连接酶构建重组体,然后转到大肠杆菌的 DH5 α 。

目标 DNA 的扩增 以 BBTV 复制酶基因引物①②,采用 Tag 聚合酶反应试剂盒,扩增 BBTV 复制酶基因的产物。

香蕉转化受体的建立 选取巴西和广东 2 号两个品种的香蕉试管苗为材料,经 0.1% 升汞消毒和无菌水冲洗后切成 50 mm \times 20 mm 小块接入 1 号培养基 (MS+5 mg L⁻¹ 6-BA+1 mg L⁻¹ KT+10 mg L⁻¹ AD (腺嘌呤)+3% 蔗糖,pH 5.8),培养 25 d 后转入 2 号培养基 (MS+2 mg L⁻¹ 6-BA+1 mg L⁻¹ KT+10 mg L⁻¹ AD+3% 蔗糖,pH 5.8),均在 28 $^{\circ}$ C 12 h d⁻¹ 光照,光照强度为 6 000 lx 的光照培养箱中培养 20–25 d。然后转入 3 号生根培养基 (MS+1 mg L⁻¹ IBA+3% 蔗糖,pH 5.8)。

基因的转化 将要转化的质粒 DNA 制成金弹^[10],然后用基因枪轰击香蕉试管苗生长点组织。将轰击后的生长点组织置于 1/2 体积的 2 号培养基上。经黑暗培养 2 d 后,将培养的生长点组织转移到含有 200 μ g ml⁻¹ 卡那霉素(km)的培养基上继续培养至幼芽形成,然后将幼芽切下,置于 3 号培养基上诱导生根。待根系比较发达后转移到温室培养。

转基因植株蛋白的提取及 Western blot 分析 将转基因植株叶片经液氮处理制成粉末后,加入提取缓冲液 (500 mmol/L Tris-HCl, 2% SDS, 0.1% 巯基乙醇,2% 甘油,0.01% 溴酚蓝) 研成匀浆,然后高速离心 (10 000 \times g) 20 min,取上清液进行电泳分析。

Western blot 分析采用硝酸纤维膜转印技术和 3,3' - 二氨基联苯胺显色方法^[10]。

2 结果和讨论

2.1 BBTV 的分离和纯化

经液氮冷冻、差速离心和蔗糖密度梯度离心,从



图 1 模板 DNA 的 PCR 检测

Fig. 1 Detection of mode DNA by PCR

1. 分子量标准 Molecular weight standard; 2, 7, 8. 含 BBTV 的模板 Mode with BBTV; 3, 4, 5, 6. 阴性对照 Negative control

```

A ATATGTCCCGAGTTAGTGCGCCACGTAAGCGCTGGGGCTTATTATTACCCCCAGCGCTCG -60
B --G-----
A GGACGGGACATTTGCATCTATAAATAGACCTCCCCCC CTCCACTACAAGATCATCATCG -120
B -----T-----T-----
A TCGACAGAAATGGCGCGATATGTGGTATGCTGGATGTTACCATCAACAATCCCGCAACA -180
B A-----A-----
A CTACCAGTGATGCGGGATGAGTTTAAATATATGGTATATCAAGTGGAGAGGGGACAGGAG -240
B -----A-----A-----
A GGTACTCGTCATGTGCAAGGATACGTCGAGATGAAGAGACGAAGTCCTCTGAAGCAGATG -300
B -----T--T-----CT-----
A AGAGGCTTCTTCCCAGGCGCACACCTTGAGAAACGAAAGGGGAGCCAAGAAGAAGCACGG -360
B -----A-----G---
A GCGTACTGTATGAAGGAAGATACAAGAATCGAAGGTCCCTTCGAGTTTGGTGCCTTTAAA -420
B T-A-----T-A-----
A TTGTCATGTAATGATAATTTATTTGAAGTCATACAGGATATGCGTGAAACGTATAAACGG -480
B -----T-----C-C--A--
A CCTCTGGAATATTTATATGAGTGTCTTAATACCTTCGGTAGAAGTAAGGATACATTATAC -540
B ---T---G-----T-----C-----A-----
A AGAGTGCAAGCAGAGTTGAATAAAACGAAGGCGATGAGTAGCTGGAAGACATCCTTTAGT -600
B ----A-----A-----A-----GA--T--T-C---
A TCATGGACATCAGAAGTAGAAAATATAATGGCGGAGCCATGTCATCGACGGATTATTTGG -660
B G-T-----G--G--G-----C-----C-----GA-A--A-----
A GTCTACGGCCCAAATTGAGGTGAAGGAAAGACAACCTTATGCAAAACATTTAATGAAGACG -720
B ----T-----G---A-----G-----C-----
A AAGAATGCGTTTTATTCGCCAGGAGGAAAATCATTGGATATATGTAGATTGTATGATTAT -780
B -GA-----T-----C-----A-----C
A GAGGATATAGTTATATTTGATATTCAGATGCAAAGAGGAATATTTAAACTATGCTTTA -840
B -----T-----A-----T-----T-----G---
A TTAGAAGAATTTAAAAATGGAATTATTCAAAGCGGGAAATATGAACCCGTTTTGAAAATT -900
B ----G-----G-----A-----G--A
A GTAGAATATGTTGAAGTCATTGTAATGGCTAACTTCCTTCCGAAGGAAGGAATCTTTTCT -960
B -----C-----
A GAAGATCGAATAAAGCTAGTTGCTTGCTGAACACGCTATGCCAATCGTACACTATGACAA -1020
B -----T-G---T-----A-TA--A-TT-ACAG-G-ACGCT-CG
A AAGGGGAAAAGCAAAGATTCACAAAAGTACGGGGGTTGATTGTGCTATCCTAACGATTA -1080
B -C-----C-CTA-G-----TATC-----G-T---T-----CT
A AGGGCCGCAGGCCCGTCG*AGATGGACGACGCGATC -1116
B -----T-----GAGCA---A---G--A---

```

图 2 BBTV 核苷酸的序列分析

Fig. 2 Analysis of DNA sequence of BBTV

A. 广州 Guangzhou; B. 澳大利亚 Australia

广州地区受香蕉束顶病毒感染的病株中获得直径为 25 nm 的病毒颗粒, 与 BBTV 单克隆免抗血清呈阳性反应, 经作者确定为 ssDNA^[9]。与肖火根^[14]等人报道的 BBTV 由约 1 kb 核苷酸组成的结果相似。

2.2 BBTV 复制酶基因的 PCR 扩增

以 BBTV 的环状 DNA 为模板检测到有 PCR 扩增产物, 为 1.1 kb 的 DNA 带 (图 1)。与设计的 BBTV 复制酶基因引物扩增的 PCR 产物相符。虽然 PCR 扩增能力在理论上讲经过 30 次的循环反应可使靶 DNA 得到 10^9 倍的扩增, 但实际上约为 10^6 – 10^7 倍增。因此研究结果还表明设计的第一组引物能比较有效地扩增预期产物。

2.3 克隆与分析

图 2 为 BBTV 克隆的复制酶基因的部分 DNA 片段, 经①、②两组引物扩增的 PCR 产物检测, 可以看出广州的 BBTV 与报道的澳大利亚 BBTV 序列^[8]差异仅为 10%, 两者具有较高的同源性, 并且发现大部分差异发生在复制酶基因下游的一段序列中, 而这一高变区序列可作为 BBTV 不同株系的分子鉴定 (图 2)。在进行克隆和转化研究中已成功将③、④两组引物扩增的 PCR 产物转变成为 680 bp 的不完整 DNA 片段, 进而组成选择抗病性的复制酶基因, 插入到 pBI 121 质粒中进行进一步的核苷酸序列分析, 干扰 BBTV 病毒复制, 为转基因抗束顶病香蕉试验提供理论数据和实验材料。

2.4 复制酶基因的整合分析

将用第二组引物扩增的 PCR 产物构建的重组体, 用基因枪法转入香蕉植株中。在含卡那霉素的培养基上培养, 发现转基因香蕉植株能诱导发芽。以转基因香蕉植株中提取的 DNA 为模板进行 PCR 分析, 结果有 4 株显示有目标基因的 PCR 产物 (图 3)。质粒 pBI 121 是常用的植物双元表达载体之一, 含有 *NPTII* 基因, 可使转化的植物细胞和组织能在含卡那霉素的培养基上生长^[13]。我们对在含卡那霉素 (Km) 培养基上筛选获得的阳性克隆质粒 DNA 酶切后进行电泳分析, 表明转基因香蕉植株含有复制酶基因。

2.5 转基因植株的 BBTV 复制酶基因的 Western blot 分析

从转基因植株中提取的蛋白经 Western blot 分

析, 发现在转基因植株中含有 54 kD 蛋白条带; 而对照的植株中则缺乏 (图 4)。据推断, 蛋白源于包括一个开放阅读框架的亚基因结构, 该框架具有重叠的复制酶编码区的羟基末端。该蛋白的作用是使转基因植物对病毒产生免疫性。我们认为转基因植株 54 kD 蛋白的瞬时表达的变异及累积也许干扰了病毒的复制周期, 而抗性蛋白作为一个优势负向突变体会干扰病毒的生活周期^[13]。

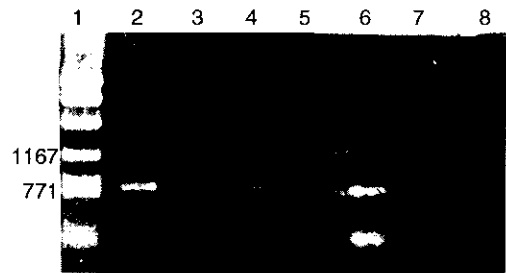


图 3 转基因植株的 BBTV 复制酶基因的整合

Fig. 3 Analysis of BBTV replicase gene of transgenic banana

1. 分子量标准 Molecular weight standard; 2, 4, 6, 7. 转基因植株 Transgenic plant; 3, 5, 8. 未转基因的植株 Non-transgenic plant

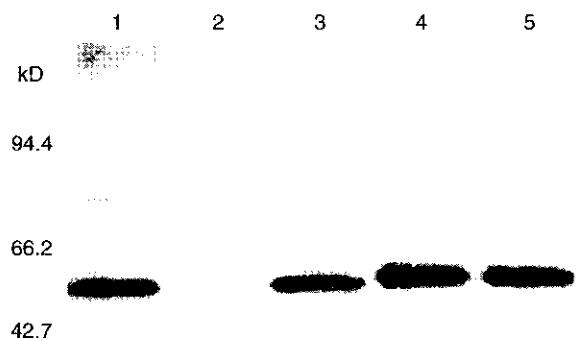


图 4 转基因植株的 BBTV 复制酶基因表达的 Western blot 分析

Fig. 4 Expression of BBTV replicase of transgenic plants by Western blot analysis

1. 阳性对照 Positive control; 2. 未转基因植株 Non-transgenic plant; 3, 4, 5. 转基因植株 Transgenic plant

参考文献

- [1] Dale J L. Banana bunchy top: an economically important tropical plant virus disease [J]. *Adv Virus Res*, 1987, 33:301–325.
- [2] Magee C T P. Transmission studies on the banana bunchy top virus [J]. *J Aust Inst Agri Sci*, 1940, 6:109–110.
- [3] Su H J, Wu R Y. Characterization and monoclonal antibodies of the virus causing banana bunchy top [A]. In: *Abstract of the Fifth International Congress of Plant Pathology* [C]. Kyoto, 1988. 60.
- [4] Cai W Q (蔡文启), Xu S H (徐绍华), Song C H (宋春华), et al. Purification and characterization of banana bunchy top virus [J].

- Acta Microbiol Sin (微生物学报), 1997, 37:252-287. (in Chinese)
- [5] Wu R Y, Su H J. Purification and characterization of banana bunchy top virus [J]. *J Phytopathol*, 1990, 128:153-160.
- [6] Sun M L (孙茂林), He C Y (和春育). Identification of banana bunchy top virus by enzyme linked immunoadsorbent assays [J]. *Southwest China J Agri Sci (西南农业学报)*, 1990, 3:70-79. (in Chinese)
- [7] Burns T M, Harding R M, Dale J L. The genome organization of banana bunchy top virus analysis of six ssDNA components [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76:1471-1482.
- [8] Harding R M, Burns T M, Hafner G, et al. Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74:323-328.
- [9] Lin D Q(林德球). Purification and nucleic acid identification of banana bunchy top virus in Guangzhou [J]. *Chin J Trop Crops (热带作物学报)*, 2001, 22(2):13-16. (in Chinese)
- [10] Harding R M, Burns T M, Dale J L. Virus-like partite associated with banana bunchy top disease containing small single-stranded DNA [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72:225-230.
- [11] La P(腊平), Cai W Q(蔡文启), Fang R X(方荣祥). Cloning and sequencing of banana bunchy top virus genome component I [J]. *Chin J Virol (病毒学报)*, 2000, 16(2):158-161. (in Chinese)
- [12] Golemboski D B, Lomonossoff G P, Zaitlin M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 6311-6315.
- [13] Xie Y Q(谢迎秋), Liu Y L(刘玉乐), Zhu Z(朱祯). CaMV 35S of LIR in CLCuV and its expression in host plant [J]. *Sci China (Series C)(中国科学 C 辑)*, 2000, 30(3):225-232. (in Chinese)
- [14] Xiao H G(肖火根), John H, Li H P(李华平), et al. Sequence analysis of a Chinese isolate of banana bunchy top virus [J]. *Chin J Virol(病毒学报)*, 1999, 15:55-63. (in Chinese)
- [15] Lin D Q(林德球). The Cloning and sequencing of replicase gene of banana bunchy top virus and its expression in transgenic banana and the selection of disease-resistant wild banana species [D]. Guangzhou:Zhongshan University, 1999. (in Chinese)
- [16] Baker E H. Relationship between transcript production and virus resistance in transgenic tobacco expressing potato leaf roll virus CP gene [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 13:54-62.