

黄瓜花叶病毒卫星 RNA-1 的 cDNA 合成、克隆及序列分析

张春霞 吴世宣 王革娇 田 波

(中国科学院微生物研究所,北京)

关键词 黄瓜花叶病毒卫星 RNA、cDNA、克隆

1976年 Kaper 等^[1]发现黄瓜花叶病毒(CMV)的某些株系中伴随有小分子的卫星 RNA,它依赖而又抑制 CMV 的复制,可以说是 CMV 的分子寄生虫。它的存在还影响病毒引起的症状,有的可以加重,但大多数情况下明显减轻症状^[2]。因此研究卫星 RNA 的结构和功能在理论上有助于搞清它对其相应的辅助病毒依赖和抑制的本质,我们已大面积应用卫星 RNA 防治 CMV 引起的病害,取得良好效果^[3]。为了进一步发挥卫星 RNA 抗 CMV 的功能,我们拟将卫星 RNA 的 cDNA 引入易感 CMV 的植株,获得抗 CMV 的工程植株。为此首先需要合成和克隆卫星 RNA 的全长互补 DNA(cDNA)。本文详细叙述了卫星 RNA-1 的 cDNA 合成,完整克隆的构建及序列分析。

一、材料和方法

各种限制性内切酶、T₄-DNA 连接酶、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段酶是 BRL, Biolab 或 Boehringer mannheim 产品。反转录酶来自 Boehringer mannheim, γ -³²P-dCTP, α -³²P-ATP 都是购自 Amersham。DNA 合成仪及合成试剂为 Applied Biosystem 产品。四种 dNTP 为 Sigma 公司产品。x-gal, IPTG 购自 BRL。

1. 双链卫星 RNA (dsRNA) 模板的制备 将含卫星 RNA-1 的 CMV 接种于生长 6—8 周的普通烟上,两周后按本实验室以往的方法^[4]提取双链卫星 RNA。

2. 引物的合成及纯化 利用 Applied Biosystem 381A 型 DNA 合成仪合成两个引物: 5'-CCCGGGTCC-TGTATAGG3' 和 5'-GTTTTGTTTGATGG3' 分别与卫星 RNA-1 的“+”“—”链的 3' 末端互补。前者以 PA 代表,后者以 PB 代表。

引物标记按文献[6]方法进行 PAGE 纯化。引物使用前将其 5' 端磷酸化,反应条件与标记时一样,但不加 γ -³²P-ATP, 以非标记的 ATP (2mmol/l) 代替。

3. cDNA 合成 基本按 Collmer 和 Kaper^[5]法进行。取约 10 μ g 的卫星 ds-RNA, 在 7.5 μ l 30% 的二甲亚砷中 100℃ 变性 5 min, 冰中快速冷却。加入 pA 和 pB 各 150pmol 进行反应。反应条件为 50mmol/l Tris-HCl (pH8.0), 10mmol/l MgCl₂, 140mmol/l KCl, 10 mmol/l 巯基乙醇, 500 μ mol/l dATP, dGTP 和 dTTP, 200 μ mol/l dCTP, 40 μ Ci α -³²P-

本文 1988 年 6 月 4 日收到。

dCTP, 50 单位 RNasein, 反转录酶 60 单位, 总反应体积 100 μ l, 42 $^{\circ}$ C 保温 1h, 加 EDTA 至 10mmol/l 终止反应. 酚提取后加 NaOH 至 0.2mol/l, 在 70 $^{\circ}$ C 反应 25min 以降解 RNA, 用盐酸中和. 过 Sephadex G-200 柱除掉引物与盐及合成的小分子 cDNA. 冷冻干燥, 在 10 μ l 的 20mmol/l Tris-HCl (pH8.0), 10mmol/l NaCl, 1mmol/l EDTA, 50% 甲酰胺中 65 $^{\circ}$ C 加热 3min 后在 20 $^{\circ}$ C 下保温 24h 退火. 经二次乙醇沉淀去甲酰胺. 用 E. coli 的 DNA 聚合酶 I 大片段酶将 cDNA 两端补齐, 反应条件为 50mmol/l Tris-HCl (pH7.4), 10mmol/l MgSO₄, 0.1 mmol/l DTT, 50 μ g/ml BSA, 0.25mmol/l dATP, dGTP, dTTP, dCTP, 5 单位大片段酶, 20 $^{\circ}$ C 反应 30min, 加 EDTA 至 10mmol/l 以终止反应, 乙醇沉淀.

4. cDNA 克隆 载体 pUC12 按碱法提取^[6], 经 CsCl 梯度. 用 SmaI 酶解, 酶解完全后 70 $^{\circ}$ C, 10min 使酶失活.

连接反应: SmaI 酶解的 pUC12 与平头的 ds-cDNA 分别为 400ng 和 30ng, 反应体积 20 μ l, 反应条件为 15mmol/l Tris-HCl, pH7.0, 5mmol/l MgCl₂, 5mmol/l DTT, 0.25mmol/l 亚精胺, 1mmol/l ATP, 100 μ g/ml BSA, 1.25mmol/l 三氯化六氨钴, 三单位 T₄-DNA 连接酶. 22 $^{\circ}$ C 反应 24h.

感受态细胞制备、转化方法及原位杂交方法均按文献^[6]介绍方法进行.

5. 全长克隆的构建 将 BamHI 和 EstEII 双酶切的 a 克隆片段与 HindIII 和 BstEII 双酶切的 b 克隆片段及 BamHI 和 HindIII 双酶切的 pUC12 连接. 连接条件为 40ng(a) + 40ng(b) + 100ng pUC12(B-H^v), 用 1 单位 T₄-DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 反应 5h, 转化及酶切检查方法同前.

6. 序列分析 cDNA 在 M13mp18 和 M13mp19 中的克隆以及单链 DNA 提取双脱氧反应、电泳及放射自显影均按文献^[7]介绍方法进行.

二、结果和讨论

1. 用卫星 ds-RNA 作为模板及其引物合成 我们由 85g 感染烟叶中得到 959 μ g 卫星 ds-RNA 紫外吸收表明, 其最高吸收在 A_{259nm}, 最低吸收在 A_{230nm}, A₂₆₀/A₂₈₀ > 2, 呈典型的 RNA 吸收曲线. 电泳检查表明其主要成分为卫星 ds-RNA. 虽然样品中也含有少量病毒基因组的 ds-RNA, 但我们用与卫星 RNA 正负链互补的寡核苷酸作引物时这些基因组 RNA 的存在并不能生成相应的 cDNA 而干扰卫星 ds-RNA 的克隆.

2. cDNA 合成见图 1 由于卫星 RNA 存在着很广泛的二级结构^[9], cDNA 合成效率不是很高. 不仅如此, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳检查时, 发现补齐的 ds-RNA 的主要一条带的长度不是全长的 cDNA, 原因也可能是由于卫星 RNA 广泛的二级结构造成的.

3. cDNA 的克隆和筛选 克隆载体 pUC12 用 SmaI 切成平头, 然后与补齐的 cDNA 直接用 T₄-DNA 连接酶相连. 虽然平头连接困难大得多, 但可以用加大酶量, 提高反应温度至 22 $^{\circ}$ C, 延长反应时间至 24h 来部分解决. 虽然用末端转移酶给载体和 cDNA 加入互相互补的尾巴, 退火后转化效率较高, 但这种两端带尾的 cDNA 在克隆后进行改造时引起困难. 同时加尾长度掌握不好也造成转化率不高.

将白色克隆分别复制在两张硝酸纤维素膜上及一个 LB 培养皿上, 在 LB 培养基上培养并将 DNA 固定于膜上. 用 ³²P 标记的引物 pA, pB 分别与其进行原位杂交, 结果见图 2. 为了进一步分析与 pA, pB 杂交阳性的克隆, 小量制备其质粒, 在琼脂糖电泳中检查其大小, 然

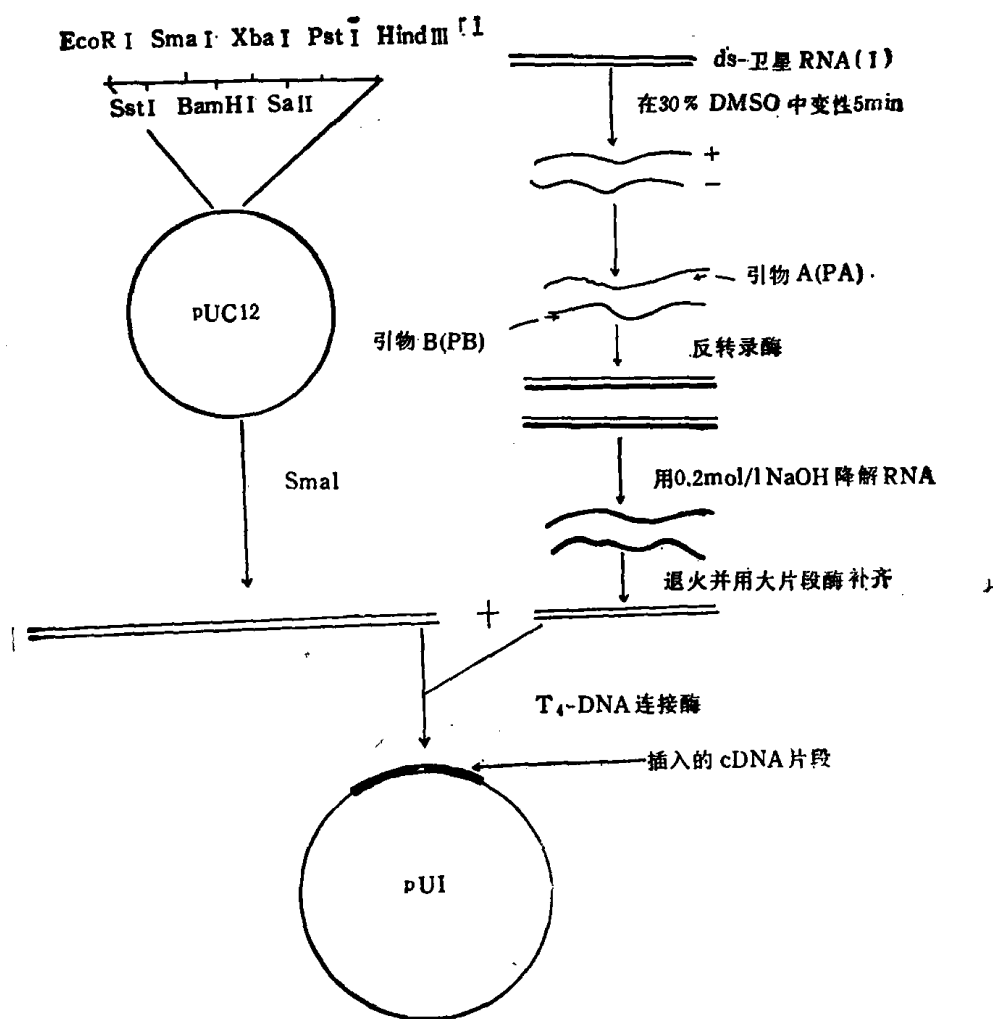


图1 卫星 cDNA 的合成与克隆示意图

后选择插入较大的克隆,用位于其两端的 pUC12 上的内切酶切割,检查插入片段的大小。

4. 完整的 cDNA 克隆的构建 我们挑选了分别与 pA, pB 杂交阳性的克隆 a 克隆与 b 克隆。用卫星 RNA-1 的 cDNA 上所具有的单一内切酶切点 BstEII 和载体上的内切酶 EcoRI 和 HindIII 分别切割,根据切割片段的大小推导出其方向如图 3 所示。由于 a 克隆含有 3' 端 cDNA, 方向与 pUC12 一致, 因此用 BstEII 与 BamHI 酶切产生 a 片段。b 克隆

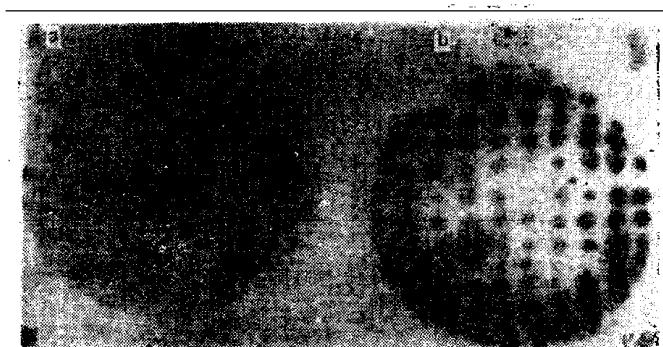


图2 原位菌落杂交图谱

a. 与 ^{32}P 标记的 pA 杂交放射自显影图; b. 与 ^{32}P 标记的 pB 杂交放射自显影图

含 5' 端 cDNA, 方向与 pUC12 相反, 因此用 BstEII 和 HindIII 酶切产生 b 片段。将 a 片

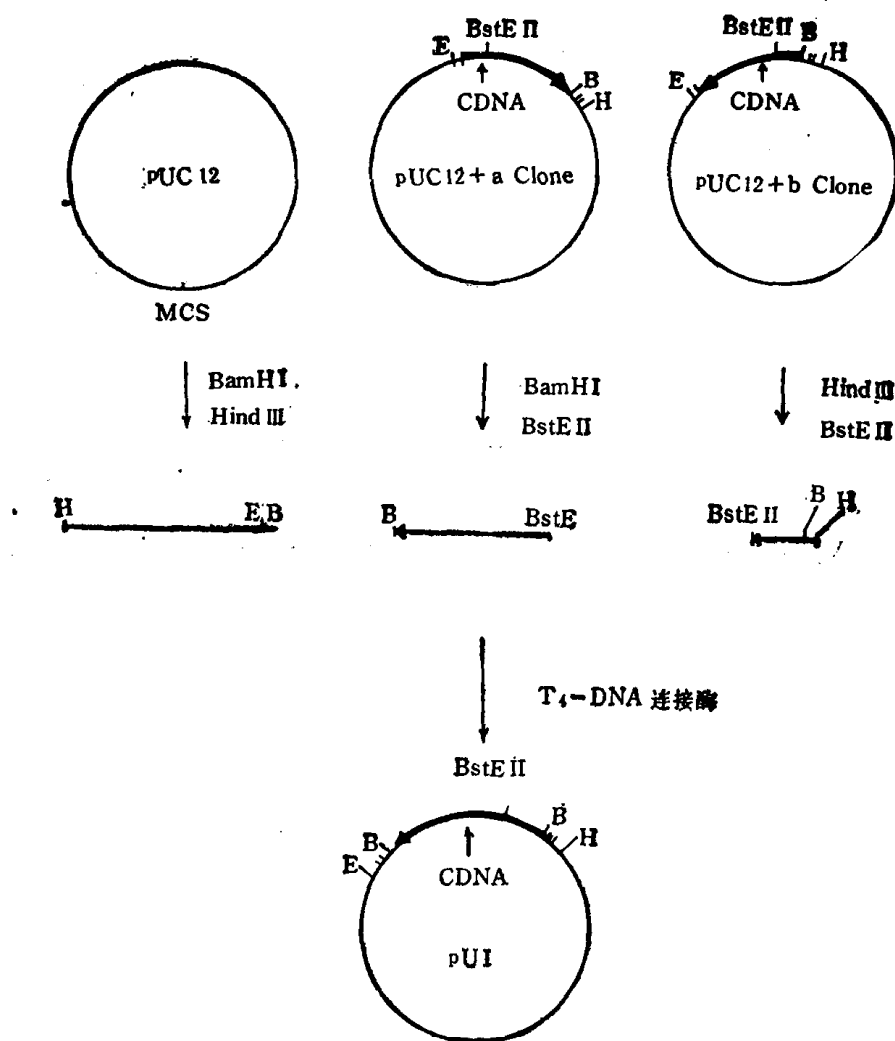


图3 完整的卫星 cDNA 克隆的构建

段、b 片段及 BamHI, HindIII 酶切的 pUC12 连接,得到完整的 cDNA 克隆,称 pUI. 除分子杂交外,酶切分析也证明其大小确与完整的 cDNA 大小一致.

5. 序列分析 为进一步证实所得到的 pUI 为完整的克隆,我们用双脱氧法进行了序列分析. 首先将含 cDNA 克隆的片段分别克隆到 M13mp18和19上,然后用通用引物分别与其进行退火,进行序列分析. 序列分析结果表明,整个序列确和已发表的卫星 RNA-1 型序列一致^[8]. 这充分表明了确实得到了完整的卫星 RNA cDNA 克隆. 这为进一步研究和利用此卫星 RNA 开辟了广阔的前景.

参 考 文 献

- [1] Kaper, J. M., Tousignant, M. E., Lot, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72(1976), 1237—1243.
- [2] Waterworth, H. E., Kaper, J. M., Tousignant, M. E., *Science*, 204(1987), 845—847.
- [3] Tien P. et al., *Ann. Appl. Biol.*, 111(1987), 143—152.
- [4] 杨希才等, *微生物学报*, 26(1986), 2:120—126.
- [5] Collmer, C. W., Kaper, J. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 135(1986), 290—295.
- [6] Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., in *Molecular Cloning*, 1982.
- [7] BRL Inc., *BRL User Manual. M13 Cloning/'Dideoxy' Sequencing Manual*, 1980.
- [8] Collmer, C. W. et al., *Virology*, 127(1983), 230—234.
- [9] Gordon, K. H. J., Symons, R. H., *Nucleic Acids Res.*, 11(1983), 947—960.