

文章编号: 1000-0615(2002)02-0157-04

虎纹蛙病毒甲基转移酶基因的克隆和分析

苗素英, 李 方, 张 敏, 王晓红, 何建国, 江静波

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 经 PCR 扩增得到虎纹蛙病毒 DNA 甲基转移酶完整基因片段, 并将其克隆到 pUCm-T 载体, 测序可知该基因读码框大小为 642bp, 编码一由 214 个氨基酸组成的、预期分子量为 24.8kD 的多肽。RTV 的 MTase 基因与蛙病毒属的蛙病毒-3 型、叉尾螯病毒和 Regina 病毒的一致性为 96%~97%, 与淋巴囊肿病毒属的比目鱼病毒的一致性为 56%, 从而进一步证明 RTV 蛙病毒的分类地位; 与其它脊椎动物的虹彩病毒一样, 该基因包含原核生物 5' 甲基转移酶的前四个高度保守区而缺少第五个区域, 可能只是构成甲基转移酶的一个亚基; RTV、裂唇鱼病毒和大口黑鲈病毒之间 MTase 基因的一致性与衣壳蛋白基因的差异较大, 说明同一种类的不同基因甚至同一基因的不同区域间演化速率不同, 因此在虹彩病毒的演化研究中选择合适的基因或基因区域极为重要。

关键词: 虎纹蛙病毒; 甲基转移酶; 基因; 结构域; 一致性

中图分类号: S917; Q132.1 文献标识码: A

Molecular cloning and sequence analysis of the *Rana tigrina* ranavirus (RTV) DNA methyltransferase gene

MIAO Su-ying, LI Fang, ZHANG Min, WANG Xiao-hong, HE Jian-guo, JIANG Jing-bo

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The complete gene of RTV DNA methyltransferase (MTase) was amplified, cloned and sequenced. The ORF consists of 642 bp which codes for a protein of 214 aa with a predicted molecular mass of 24.8kD. Sequence analysis of MTase gene shows much higher identity to the species of genus *Ranavirus* (96% - 97%) than to lymphocystis disease virus (56%), the type species of the genus *Lymphocystivirus*, indicating again that RTV was the member of the genus *Ranavirus*; just as the other vertebrate iridoviruses, the MTase gene of RTV contains the first four highly conserved motifs of cytosine MTases but the fifth motif, responsible for DNA binding specificity, is missing; Among the virus of RTV, doctorfish iridovirus and largemouth bass ranavirus, the very different identity between MTase and MCP gene suggests that the gene used as target to estimate the evolution of the iridoviruses should be suitable.

Key words: *Rana tigrina* ranavirus; DNA methyltransferase; gene; motif; identity

虎纹蛙 (*Rana tigrina* Cantor) 是我国南方蛙类养殖的主要品种, 从患病虎纹蛙中分离的病毒根据形态学和细胞培养特征观察以及病毒衣壳蛋白基因的分析, 已确定它在分类上属于虹彩病毒科

收稿日期: 2001-08-02

资助项目: 广东省自然科学基金(990255)

作者简介: 苗素英(1965-), 女, 浙江慈溪人, 讲师, 硕士, 从事水生动物疾病研究。E-mail: miaosy@163.net

(Iridoviridae), 蛙病毒属(*Ranavirus*), 并命名为虎纹蛙病毒(*Rana tigrina ranavirus*, RTV)。在此基础上, 本文进一步对虎纹蛙病毒的 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, MTase), 进行了扩增、克隆、测序和分析。

1 材料和方法

1.1 病毒和细胞

实验用虎纹蛙病毒来自于培养细胞, 用 M-199 培养基上长成单层的鲤鱼表皮瘤细胞系细胞接种病毒, 72 小时后收集细胞培养液、冻融, $1000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15min, 取上清液。

1.2 病毒核酸的提取

病毒核酸的提取按文献^[1]进行, 上清液直接用酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶于双蒸水用作 PCR 反应模板。

1.3 PCR 扩增反应

1.3.1 引物

用于 MTase 扩增的引物为 MTF 和 MTR, 其核苷酸序列分别对应于蛙病毒-3 型(FV3) MTase 基因的 1007~ 1023nt 和 1666~ 1682nt^[2], 引物的序列如下: MTF: 5' CGTTACTAAAACGCAATG3' MTR: 5' TGACAGTCGTTACGAGC3'

1.3.2 PCR 反应

50 μL 体系中含 $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH9.0, $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 , 1% Triton X-100, $200\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, 引物 MTF 和 MTR 和 $0.75\mu\text{mol}$, *Taq* Plus DNA 聚合酶 2.5U 和病毒 DNA 模板适量, 设空白对照和阴性对照。扩增反应在 PTG-100TM 热循环仪上进行, 循环参数为 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min, 35 个循环后, 在 72°C 中延伸 10min。PCR 相关试剂均购自上海生工。

1.4 PCR 产物纯化和克隆

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 采用 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工) 纯化, 与 pUCm-T 载体连接, 连接物转化 DH5 α 感受态细胞, 用氨苄青霉素抗性和蓝白斑筛选阳性克隆, 并进行酶切鉴定。

1.5 DNA 序列测定和分析

克隆片段采用 M13+ 和 M13- 通用引物进行双向测序, 测序由上海生工生物工程公司完成。核苷酸序列分析采用的是 Blast、Genedao 和 DNASTar 软件。本实验所用的其他虹彩病毒参比序列取自 GenBank。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物及其克隆

采用 MTF 和 MTR 引物进行 PCR 扩增, 扩增产物电泳结果可见一明显条带, 分子量约为 650bp(图 1-a), 与预期的大小相近。PCR 产物纯化、连接、转化后的阳性克隆, 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 结果与预期一致(图 1-b)。

2.2 MTase 基因序列

重组质粒经 M13 通用引物双向测序, 可知插入片段为 677bp, 其中虎纹蛙病毒的 MTase 基因的读码框大小为 642bp。由此推断, 该基因编码一个由 214 个氨基酸组成的多肽链(图 2), 其分子量为 24.8kD, 等电点为 8.95。

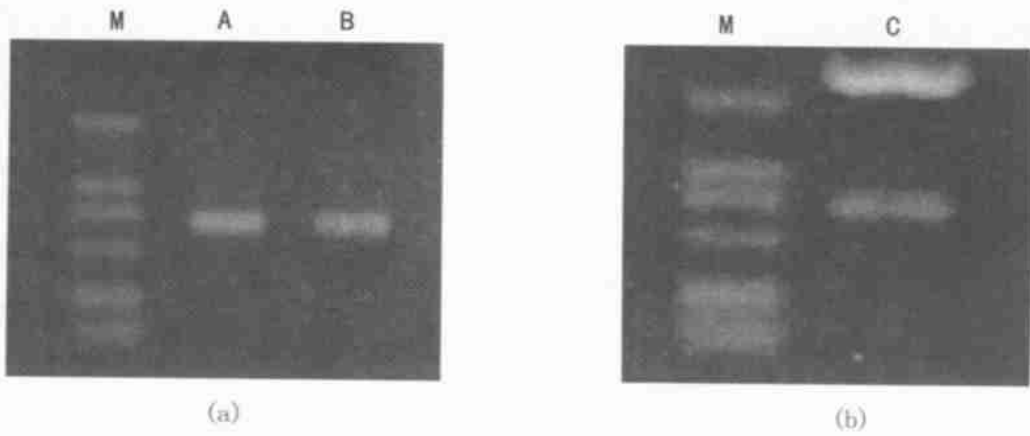


图1 虎纹蛙病毒甲基转移酶 PCR 扩增产物(a)及其重组质粒酶切鉴定(b)结果

Fig. 1 The results of PCR products (a) and its restriction pattern of recombinant plasmid (b) of RTV MTase gene
M为分子量标准(2000, 1000, 750, 500, 250, 150bp), A、B为PCR扩增产物, C为EcoR I和Hind III酶切结果

1	TGT TAC TAA AAC GCA	<u>ATG</u>	AGG ATA CTG GAT ATT TTC AGC GGT ACA CAC TCT GTG CCC AAA	60
1			M R I L D I F S G T H S V P K	15
61	GCC TGC GCC CAG AGA GAG GGT TGG TCG TGC GTC ACG GTG GAC CTG GCC GAC FCT GAC TAT			120
16	<u>A C A Q R E</u>		G W S C V T V D L A D S D Y	35
121	AAT GTG GAC GTC CTC GAG TGG GAC TAT ACC AAA GAC CTG AAG CCC AGA GAG TTC GAT GTG			180
36	<u>N V D V L E W D Y T K D L K P R E F D V</u>			55
181	GTG TGG GCC AGT CCC CCG TGC AGG TAC TTT AGC AAG CTC AGG GAG AGC AAC ATA GGC AGG			240
56	<u>V W A S P P C R Y F S K L R E S N I G R</u>			75
241	GGA GGC ATG ACC AAG AAG AGC GTC AAG GAG GAC CTC GAG ACC AAG GGC CTC CCG CTG CTC			300
76	<u>G G M T K K S V K E D L E F K G L P L L</u>			95
301	AGG AGA GCC ATG GAG ATC ATT GCA TAC CTC CAG CCC AAA AAG TTT ATC GTA GAG AAT CCC			360
96	<u>R R A M E I I A Y L Q P K K F I V E N P</u>			115
361	GAC ACG GGT CGC ATG AAA GAG TAC ATG ACA GAG TTG CCT CAC FAC GTC GTC GAC FAC TGC			420
116	<u>D T G R M K E Y M T E L P H Y V V D Y C</u>			135
421	GCC TAC TCT GAC TGG GGC TAC AGA AAG AGG ACC AGG CTA TGG ACA AAC ATC GAG GGG TTC			480
136	<u>A Y S D W G Y R K R T R I W T N I E G F</u>			155
481	GTA CCC AAG ATG TGC GCG GGG AAG GAA TAT TGT CCC AAC ATG GAG AGG AAT CCT ICT TCG			540
156	<u>V P K M C A G K E Y C P N M E R N P S S</u>			175
541	GGA CGG TGG AGG CAC GTA CTG GCC ACA GAC GCC GGA GGC AGG GGT AGG AAG GGA ACC ACG			600
176	<u>G R W R H V L A F D A G G R G R K G I T</u>			195
601	AGG AGG TTG AGG TAC AGG GTC CCG CCT GCC ATG ATC TTG GAG CTG TTG GAC CTG TGC	<u>TGA</u>		660
196	<u>R R I R Y R V P P A W I I E I L D L C</u>		*	214
661	GCT CGT AAC GAC TGT CA			677

图2 虎纹蛙病毒甲基转移酶基因序列

Fig. 2 The DNA nucleotide and deduced amino acid sequence of the RTV MTase gene
下划线依次为甲基转移酶四个高度保守区(iv ⑤v ⑥)

2.3 MTase 基因分析

采用 Blast 软件对 MTase 基因进行一致性分析,结果显示,RTV 的 MTase 基因氨基酸全序列与 FV3 的一致性较高,为 96%;与比目鱼病毒(LCDV-1)的一致性为 56%。部分序列的比较结果,RTV 的 MTase 基因与叉尾病毒(*European catfish iridovirus*, ECV)、Regina 病毒(*Regina ranavirus*)、裂唇鱼病毒(*Doctofish iridovirus*, DFV) 和大口黑鲈病毒(*Largemouth bass virus*, LMBV) 的一致性分别为 97%、96%、66% 和 64%。

虎纹蛙 MTase 基因结构域分析表明,该基因具有原核生物 5' 胞嘧啶甲基转移酶五个高度保守区的前四个区域,即 iv、 v 、 II 。缺少 I 区和 II 与 I 区之间的长可变区。

3 讨论

虹彩病毒是一类大型 DNA 病毒,可感染脊椎动物和无脊椎动物。宿主为脊椎动物的虹彩病毒, CpG 二核苷酸序列中胞嘧啶 5' 端的高度甲基化是其基因组的一个重要特征^[3,4,5]。这种甲基化现象广泛存在于真核、原核生物中,迄今为止病毒中仅发现某些 DNA 病毒有此现象。一般认为,甲基化主要是为了保护病毒 DNA 免受宿主细胞酶切,也与 DNA 复制、重组、修复及基因的表达有关^[2,6]。

Posfai 等^[6]通过研究 13 种细菌的 DNA 5' 胞嘧啶甲基转移酶基因序列,发现该酶的氨基酸序列有十个保守区,其中五个区域高度保守,这五个区域依次是 iv、 v 、 II 和 I 。在 II 和 I 区之间还有一长可变区。MTase 基因的前四个高度保守区(即 N 末端)与甲基转移的功能有关,负责将 S-腺苷甲硫氨酸分子上的甲基转移到靶序列上;而 I 区和长可变区是用于靶序列的识别。本文研究的虎纹蛙病毒的 MTase 基因与已知完整序列的其它虹彩病毒^[2,7]一样,仅具有 N 末端的四个高度保守区,无 S 末端的长可变区和 I 区。因此已知的甲基转移酶基因可能只是其中的一个亚基,其活性的体现尚需另一亚基的参与。

本文扩增、克隆和分析的 RTV MTase 基因的读码框大小为 642bp,编码 214 个氨基酸,其氨基酸序列与蛙病毒属的病毒如 FV3、ECV 和 Regina 病毒的一致性较高,为 96%~97%;与淋巴囊肿病毒属的 LCDV-1 的一致性相对较低,为 56%,这进一步说明 RTV 为蛙病毒属的成员。上述病毒之间 MTase 基因的一致性与衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)相近,但 RTV、DFV 和 LMBV 之间 MTase 的一致性与 MCP 的差异较大,如虎纹蛙病毒 MCP 基因的 3' 端与 DFV 和 LMBV 的一致性分别为 97% 和 81% (待发表),而 MTase 基因与 DFV 和 LMBV 的一致性仅为 66% 和 64%,再结合 Mao 等^[8]5' 端 MCP 基因的研究结果(FV3 与 DFV 的一致性为 77%),说明虹彩病毒 MTase 基因和 MCP 基因之间甚至同一基因的不同区域,其一致性的差异可以很大,因此,选用什么指标作为虹彩病毒演化研究的分子标记显得极为重要。

参考文献:

- [1] Oshima S, Hata J, Segawa C, et al. A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: application to the red sea bream iridovirus[J]. *Anal Biochem*, 1996, 242: 15- 19.
- [2] Kaur K, Rohozinski J, Gootha R. Identification and characterization of the frog virus 3 DNA methyltransferase gene[J]. *J Gen Virol*, 1995, 76: 1937- 1943.
- [3] Willis D B, Granoff A. FV3 DNA is heavily methylated CpG sequences [J]. *Virol*, 1980, 107: 250- 257.
- [4] Wagner H, Simon D, Wemer E, et al. Methylation pattern of DNA of fish lymphocystis disease virus[J]. *J Virol*, 1985, 53: 1005- 1007.
- [5] Eaton B T, Hyatt A D, Hengstberger S. Epizootic haematopoietic necrosis virus: purification and classification[J]. *J Fish Dis*, 1991, 14: 157- 169.
- [6] Posfai L, Bhagwat A, Posfai G, et al. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferase[J]. *Nucl Acids Res*, 1989, 17: 2421- 2435.
- [7] Tidona C A, Schnizler P, Kehm R, et al. Identification of the gene encoding the DNA (cytosine 5) methyltransferase lymphocystis disease virus[J]. *Virus Genes*, 1996, 12: 219- 229.
- [8] Mao J H, Hedrick R P, Chinchar V G. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses [J]. *Virol*, 1997, 229: 212- 220.