96,11(1)
1—8
15947(1)
维普资讯 http://www.cqvip.com

第11卷第1期 中国病毒学 Vol.11 No.1
1996年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 1996

马铃薯卷叶病毒(PLRV)基因组研究进展

张鹤龄

(内蒙古大学生物系,呼和浩特 010021)

S432.41

The Advances in PLRV Genome Research

Zhang Heling

(*Inner Mongolia University, Huhehaote* 010021)

关键词 马铃薯卷叶病毒,基因组 植物病毒
Key words Potato Leafroll virus, Genome

马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll Virus, PLRV)属黄化病毒组(Luteovirus)[1],可侵染马铃薯(*Solanum tuberosum* L)引起卷叶、黄化、矮缩、僵化及块茎网状坏死等症状,严重影响马铃薯的产量和品质,是一种世界范围的马铃薯的重要病害[2],此病害的有效防治具有重要经济意义。PLRV是由多种蚜虫以持久性方式传播,不能通过机械传播,在寄主植株内的分布主要局限于维管束内[3]。PLRV粒体为等轴对称,直径24nm。由于PLRV严格由蚜虫传播,寄主体内含量低,难于大量提纯,致使其分子生物学研究进展缓慢。1979年报道PLRV的基因组为RNA,分子量2×10^6,外壳蛋白亚基为26kD[4,5]。Mayo等(1982)报道,PLRV包含具有mRNA活性的RNA,3′端无Poly(A)结构,并且结合有一个分子量约7kD的蛋白,如同其他病毒的基因组结合蛋白(Vpg)[6]。随后在PLRV侵染的细胞内发现了病毒亚基因组RNA[7],但是关于其基因组的结构与功能所知甚少。1988年Miller等报道了黄化病毒组主要成员大麦黄矮病毒(BYDV) PAV株系的RNA序列[8]。同年Veidt等报道了甜菜西方黄化病毒RNA的核苷酸序列[9]。1989年Mayo等报道了PLRV苏格兰株的RNA序列[10],同年Van der Wilk等报道了PLRV-Wageningen株的RNA序列[11]。1990年Keese等报道了PLRV澳大利亚株和加拿大株的RNA全序列[12]。1990年R R Martin等综述了黄化病毒组的进化和分子生物学[13]。但近年来在PLRV基因组结构、基因组转录、基因表达中的转译移码及其机制,超读、框架内部起读等方面均有许多新的研究进展。现将这些主要进展情况分述如下。

1 基因组的结构

1.1 基因组大小、核苷酸组成 核苷酸序列分析表明PLRV各国分离株基因组RNA的核苷酸数目基本一致。加拿大分离株PLRV-C为5883,澳大利亚分离株PLRV-A为5882,荷兰分

本文于1994年7月22日收到,1995年7月31日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

离株 PLRV-N 为 5882。英国苏格兰分离株 PLRV-S 为 5987。但如果除去其 3′端非编码区内多出的 104 个核苷酸残基，则为 5883、和上述三个分离株 RNA 核苷酸数目一致[10~12]。PLRV RNA 的碱基组成为 23%U 和 25%C、28%A 和 24%G，与 BWYV RNA 组成相同[9]，与 BYDV RNA 碱基组成类似，BYDV-PAV 的 RNA 组成为 22%U、24%C、29.5%A、24.5%G[8]。

1.2 开放阅读框架 PLRV RNA 中有 6 个开放阅读框架(ORF)，这些 ORF 是由第一个起读密码到第一个终止密码推测的，其中 ORF3 和 ORF5 则无起读密码，是两个终止密码间的阅读框架，是由超读起始的，关于这一点我们将在下面讨论。这 6 个阅读框架所包含核苷酸数目均大于 300。在 PLRV RNA 中还有数个小 ORF，认为可能在体内不表达。根据 PLRV RNA 序列分析，此 6 个开放阅读框架排列见图 1。

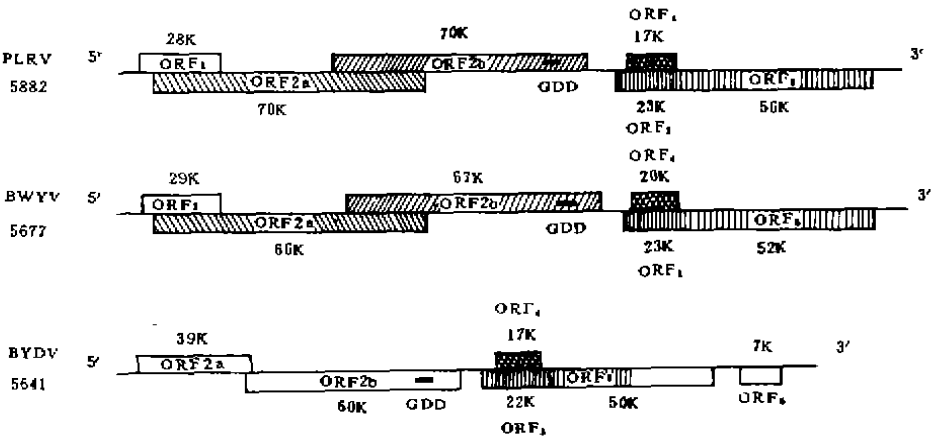

图 1 PLRV 基因组中的开放阅读框架和编码蛋白的分子量[11]及其与 BWYV 和 BYDV 基因组结构比较

Figure 1 The open reading frames (ORF) and encoded proteins of PLRV genome in comparison with that of BWYV and BYDV genomes

根据 PLRV RNA 序列分析确定的上述 6 个 ORFs 的排列方式和甜菜西方黄化病毒(BWYV)十分相似，各阅读框架大小及其重叠区、重叠程度也相似[9]。和 BYDV-PAV 的开放阅读框架相比较[8]，PLRV 的 ORF3、ORF4、ORF5 的排列大小类似 BYDV 的 ORF3、ORF4、ORF5，但 BYDV 基因组在 5′端无 ORF1，在其 3′端有一个 ORF6。

PLRV 基因组的 ORF2a 起读于 ORF1 中，但读不同框架，ORF1/ORF2a 重叠区长为 610 个核苷酸。ORF2b 起读于 ORF2a 中。ORF2a/ORF2b 重叠区长为 582 个核苷酸。ORF4 起读于 ORF3 中第 26 个核苷酸，且终止在 ORF3 中，但读不同框架。ORF5 在 ORF3 的 Amber 终止密码之后起读、读同一个框架[10]。

核苷酸序列比较表明，PLRV 不同分离株的 RNA 核苷酸序列有不同的差异 。PLRV-A 和 PLRV-C 相比，核苷酸序列差异为 6.7%。在 6 个 ORFs 中，以 ORF2a 差异率最高，核苷酸序列为 11.6%，氨基酸序列为 12.2%，其中 935～1557 有 22%的序列变化。ORF3 则最为保守。PLRV 不同地理株相比较，PLRV-C、-N、-S 的序列相近，变异为 2%，三者和 PLRV-A 相比：核苷酸变异为 6.6%～6.8%。可能南半球和北半球 PLRV 分离株有更多的区别。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 非编码区 在PLRV基因组中有3个非编区。PLRV-A,PLRV-C基因组5'端非编码区为70个核苷酸,荷兰分离株为69个核苷酸,英国苏格兰分离株为174个核苷酸,较其他分离株多出104个核苷酸。Luteovirus组5'非编码区5~20个碱基是严格保守的,可能和转译复制有关[12]。

在PLRV基因组3'端ORF5终止密码之后有141个非编码区。此外在ORF2b和ORF3之间有197个基因间隔区。把整个PLRV基因组的6个ORF分为两个编码区。5'编码区(包括ORF1,ORF2a和ORF2b)和3'编码区(ORF3,ORF4和ORF5)。这些非编码区序列之间无明显相似性。和BWYV及BYDV的基因间隔区相比较,PLRV的基因间隔区和其长短相似,且均有两段特别相似的序列。其右侧一段是保守序列UUAUAUU和BMV亚基因组启动子部分序列相似[13]。

2 基因组的表达

曾用兔网织红细胞裂解液和小麦胚提取液体外翻译体系研究PLRV RNA的体外表达[10,15]。多数实验结果均得到两个明确产物:70kD和28kD蛋白。此产物大小和预计的ORF1编码的28kD蛋白及ORF2编码的70kD蛋白相当。此外还可出现少量的125kD蛋白产物,和推断的ORF2a超读后进入ORF2b的转译产物(118k)大小接近。体外转译结果均未能获得基因组3'端编码区阅读框架的产物,包括23kD的外壳蛋白、17kD的蛋白及56kD蛋白。

根据PLRV基因组核苷酸序列分析及基因组体外转译结果提出PLRV基因表达中几个重要问题:ORF2a、ORF2b的转译移码,3'端编码区阅读框架是如何表达的;56kD蛋白如何由CP基因超读;以及编码17kD蛋白的ORF4如何从ORF3中起读等问题。

2.1 PLRV复制酶合成中-1转译移码

2.1.1 -1移码的新型信号

PLRV的ORF2b的一个起读密码AUG位于其5'端上游一个终止密码后的900个核苷酸处,但AUG的5'上游区段看来是被转译了,而且其产物具有与BWVY RNA相应翻译产物类似的氨基酸序列,一直延伸到AUG上游,但并未延伸到5'端的终止密码。比较ORF2b转译产物表明,自PLRV RNA 1960(PLRV-S)核苷酸、BWYV RNA 1770核苷酸之后同源性才开始出现。说明ORF2b是由某些转译ORF2a的核糖体在PLRV RNA的1960核苷酸附近、BWYV RNA的1770核苷酸附近发生框架移码而转译的,并转译到ORF2b之末尾,产生118kD产物[10]。

核糖体移码是各种生物在重叠阅读框架产生一种以上蛋白的常用方法,移码可向两个方向进行。向3'移动,称为+4移码(+4 frameshift),向5'方向移动,称-1移码(-1 frameshift)。PLRV依赖RNA的RNA复制酶是通过-1移码表达的[16]。研究证明,许多反转病毒,冠状病毒IBV等在-1移码位点有一个7核苷酸序列(Heptanucleotide motif)作为滑动序列(Slippery sequences),其碱基构成为XXXYYYN,其中X为AU或G,Y为A或U,N为任意的碱基[17]。Jacks等(1988)提出滑动模型,结合在核糖体P位点XXY位置和A位点YYN位置的两个tRNA在RNA模板上同时向回滑动一个核苷酸,分别结合到XXX.YYY位置,造成核糖体移码[18],此外紧接滑动序列下游的茎环结构对移码效率有重要影响[19]。在

维普资讯 http://www.cqvip.com

PLRV 所有分离株的 ORF2a 和 ORF2b 的重叠区的近 5′端均有 UUUUAAAU 类似 7 核苷酸序列。只有一个苏格兰分离株最后一个碱基是 C[10]。

Prufer 等(1992)研究了 PLRV 德国分离株 PLRV-G 在 UUUAAAU 序列上的 -1 移码机制,以及此滑动位点 5 个核苷酸下游的茎环结构对有效移码的重要影响。Prufer 等将移码区插入 GUS 基因内,构建成嵌合基因,在 pSP65 质粒中体外转录。在马铃薯原生质体内和兔网织红细胞体系内,体外瞬时表达 GUS 基因,确定移码的序列位置,证明 -1 移码出现频率为 1%。用突变的方法将 UUUAAAU 序列缺失或使其中一个碱基被取代,如用 C 取代第 5 位 A,用 C 取代第一位 U。结果表明移码完全终止。证明 UUUAAAU 对 PLRV-1 移码是必需的滑动序列信号。当第 5 位 A 被 C 取代后,所形成的 $tRNA^{His}$显然不能参与移码。进一步说明核糖体移码是 $tRNA^{Leu}$(UUA)和 $tRNA^{Asn}$(AAU)分别在核糖体 P 位点向后滑动造成[16]。

已知的滑动序列有 3 个类型:XXXAAAC、XXXUUUA 和 XXXUUUU[19]。马铃薯卷叶病毒这种 7 核苷酸移码信号 UUUAAAU 代表一种新型移码信号 XXXAAAU[16]。

波兰科学院 Kujawa 等(1993)[17]通过点突变使 PLRV 滑动序列 UUUAAAU 转为 UUCGAAU,用^{35}S-半胱氨酸和^{35}S 标记的甲硫氨酸标记移码序列的蛋白,进行体外转译,结果移码转译明显受到抑制。同样证明,PLRV 的 7 核苷酸序列对转译移码是必需的。但也说明保留原来滑动序列中的 AAU 即 $tRNA^{Asn}$对保持移码功能没有明显作用。

2.1.2 关于滑动序列下游结构影响 Prufer 等(1992)提出一个移码区序列模型。由滑动序列及其下游的茎环(Stem-loop)结构组成(见图 2),利用不同缺失片段作模板进行体外转译表明,当缺失茎环下游序列时对移码无影响,当缺失茎环或改变茎环中互补双链茎区近 7 核苷酸碱基为 CGCCG,使互补区二级结构失去稳定性时,均强烈抑制移码[16]。

Kujawa 等(1993)研究了 PLRV 波兰株 PLRV-P 转译移码有关核苷酸序列,提出在 PLRV 7 核苷酸序列下游有一个假结(Pseudoknot)是移码所需要的[17](见图 3)。最近 Garcia 等(1993)报道在 BWYV 的移码区内也有很类似于 PLRV 的假结结构。

2.2 亚基因组及其转录起始位点

2.2.1 亚基因组 RNA Tacke 等(1990)从 PLRV 侵染的马铃薯植株中提取总 RNA,用离子交换层析纯化、转移电泳,用^{32}P 标记的针对 PLRV RNA 不同区域的 cDNA 探针杂交。结果表明 6 kb RNA 可以和所有 cDNA 探针杂交,证明为基因组 RNA。另一个 2.6 kb RNA 只能和 3′探针杂交。进一步用针对 ORF3 及其 5′方向基因间隔区的单链正链 RNA 探针及单链负链 RNA 探针杂交,证明 2.6 kb RNA 为单链、正链 RNA,和 Mayo 等(1989)提到的亚基因组一致,认为是 PLRV 的亚基因组 RNA(sgRNA1)[22]。

Smith 等(1990)用针对 PLRV RNA 3′区和 5′区的探针和 PLRV 侵染的洋酸浆中提取的 RNA 杂交。结果用 3′探针杂交可显示出两条 RNA 带,6.2 kb(基因组)及 2.5 kb(亚基因组)。而用 5′探针杂交只显示出一条 6.2 kb 基因组 RNA 带[21],得到了相同结果。均证实了在 PLRV 侵染的细胞内有一个单独表达的病毒亚基因组 RNA,此 RNA 不被外壳蛋白包壳,不存在于 PLRV 粒体中,初步证明此 sgRNA 1 无 Poly(A)结构,不与寡(dT)-纤维素柱结合。

维普资讯 http://www.cqvip.com

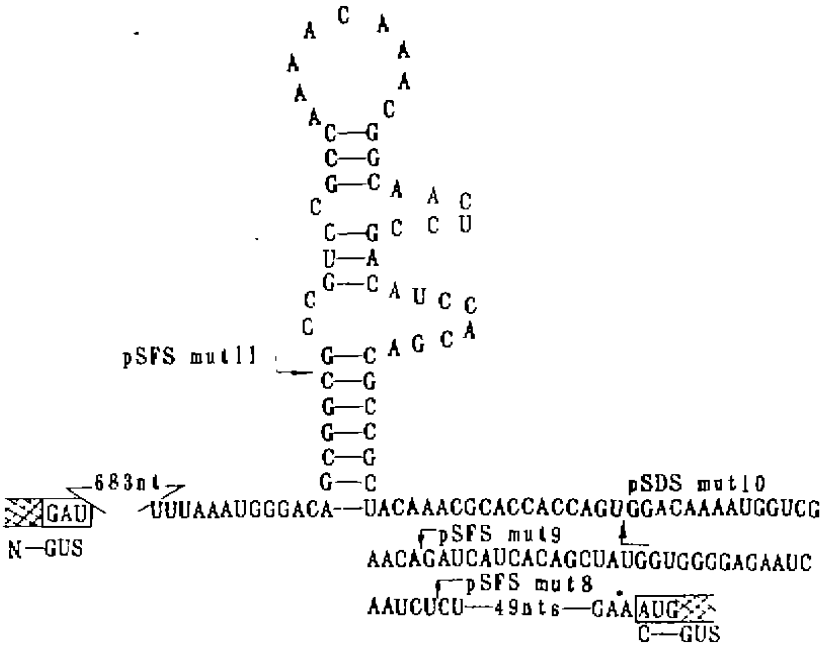

图 2　PLRV RNA 转译中核糖体移码所需下游茎环结构及 pSFS-mut8, pSFS-mut9, pSFS-mut10 和 pSFS-mut11 突变的缺失位点。引自 D. Prufer 等(1992)。

Figure 2　The suspected slippery sequence UUUAAAU and the stem-loop structure immediately down stream of the signal. The specific deletions produced in pSFS-mut 8, pSFS-mut 9, pSFS-mut 10 and pSFS-mut 11 start at the positions indicated by arrows and extented to the same position in the C proximal part of the GUS gene. (From D. Prufer *et al*. 1992)

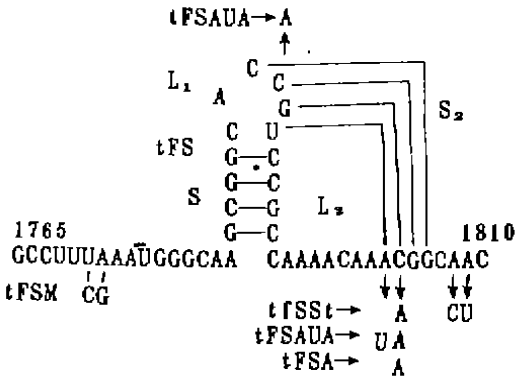

图 3　PLRV 转译移码区 7 核苷酸序列及其下游假结(Pseudoknot)结构及其定点突变碱基。引自 A. B. Kujawa 等(1993).

Figure 3　The RNA pseudoknot structure is located six nucleotides downstream of the slippery site UUUAAAU The positions of the mutations in tFSSt, tFSAUA and tFSA are indicated by corresponding nucleotide changes (From A. B. Kujawa *et al*, 1993)

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2.2 亚基因组 RNA 转录起始位点 E. Tacke 等(1990)用^{32}P 标记 365 bp 长的代表 PLRV 基因间隔区的 BssHII/Pst I DNA 片段作为探针，和 PLRV 侵染的马铃薯中提取的总 RNA 杂交，再通过引物延伸试验，证明 PLRV 德国分离株亚基因组 RNA 转录起始位点在距 ORF3 AUG 起始密码的上游 40 核苷酸的鸟嘌呤核苷酸残基处(G)，即 Mayo 等 (1989)报道的 PLRV RNA 序列的 3653 位。由此推算出 PLRV 亚基因组 RNA 的分子量为 2.334 kb，比 RNA 转移电泳测得的分子量要小[22]。分析比较 PLRV、BWYV 和 BYDV 这一段亚基因组 RNA 起始转录区域和基因间隔区的先导序列发现有两个保守区。第一个保守区是紧接 ORF3 起读密码 AUG 的上游区。第二个保守区是 Mayo 等(1989)提出的、由 27 个核苷酸组成的富含 UUU 的序列。PLRV 亚基因组转录起始位点正处在此保守序列的中央。在转录起始位点的 5′端有 UUAUAUU 序列，此序列和 BMV 亚基因组起动子部分序列十分相似。在其他植物 RNA 病毒的基因间隔区内也有类似的序列[13](见图 4)。因此这一段序列可代表所有黄化病毒亚基组启动子的一部分。如上所述，Mayo 等(1989)报道 PLRV、BWYV 和 BYDV 的基因间隔区内在 PLRV 亚基因组转录起始位点上游 50 个核苷酸处有另一个保守的核苷酸序列。如果 PLRV 亚基因组启动子大小类似于 BMV 启动子(从转录起始位点向上游延长 74 个核苷酸)[23]，这部分保守序列可能也是 PLRV 亚基因组启动子的组成部分。

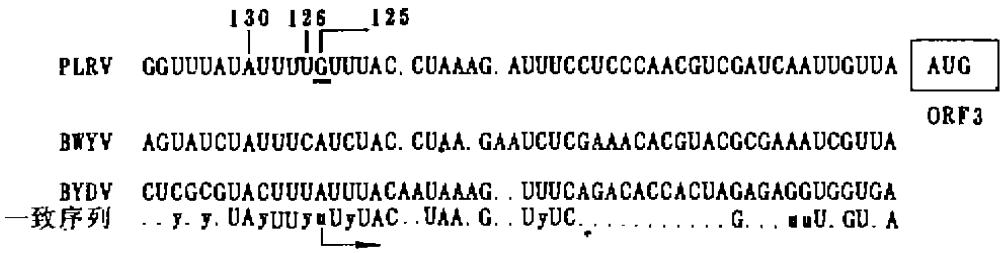

图 4 PLRV 基因组间隔区亚基因组转录起始位点及其上、下游保守序列。引自 E Tacke(1990)。

Figure 4 The start position of subgenomic transcription and the upstream and downstream conserved sequences (From E. Tacke *et al.*, 1990)

然而 Miller 等(1991)报道 PLRV 英国株亚基因组 sgRNA1 的 5′端位于 ORF_3 起始密码子上游-212 核苷酸处，在复制酶基因 ORF_{2b}的 3′端内[24]。

2.3 外壳蛋白基因 Amber 终止密码 UAG 对 56kD 表达的抑制

Tacke 等(1990)将 PLRV CP 基因和 ORF5 前面 21 个核苷酸和 GUS 基因融合，用 35S 启动子，以 5′引物 UP 和 3′引物 DP，用 PCR 方法从 CP 基因内部切除大部分序列，以防止影响 GUS 表达。构建成为 CP-20 氨基酸-UAG-7 个 56kD N 端氨基酸－GUS 的嵌合基因。为有效地阻遏和 tRNA 的相互作用，在 UAG 终止密码上游保留 18bp 原来序列、下游保留 21bp 原来序列。另外用 GCC 代替 Amber 终止密码 UAG，作为 GUS 基因表达的阳性对照。在马铃薯和烟草原生质体中作瞬时表达。测定 GUS 基因表达结果，UAG 超读率为 0.9～1.3%，和预期

维普资讯 http://www.cqvip.com

相似。说明56kD蛋白由ORF3超读，并阅读同一个框架，但CP基因通过Amber终止密码UAG对56kD蛋白表达的阻遏作用，使其表达量大大减少。反映出融合蛋白表达的调控作用。一般只在寄主细胞内或蚜虫体内复制时才需要释放ORF5产物，这种56kD蛋白可能存在于提纯病毒粒体的表面，并和蚜虫传播有某种关系[22]。

2.4 基因内部起读

PLRV的ORF4的起读密码AUG位于ORF3起读密码AUG下游22个核苷酸处，在ORF4第一个AUG下游6个核苷酸处出现第二个AUG起读密码[10,22]。ORF4是在ORF3中起读的，但读不同框架。由于起读位点前后不具有动植物核糖体识别的有关的相似序列，因此ORF4转译的可能机制是内部启动。为研究内部起读效率，Tacke等(1990)用270bp Sac Ⅰ/BssHⅡ cDNA片段，其中包括PLRV ORF3 ORF4 5'端部分和上游部分基因间隔区序列，用绿豆核酸酶处理和GUS基因重组，构建成CP-GUS融合基因，在CP AUG之后保留20个氨基酸。用Klenow酶处理和GUS基因连接组成17k-GUS，在17k AUG后保留20个氨基酸。分别构建在35S起动子下游，以GUS作为报道基因在马铃薯和烟草原生质体中作瞬时表达试验，结果表明尽管17k-GUS的AUG在下游，但17k-GUS表达活性比CP-GUS大7倍。令人意外的是17k-GUS表达活性较野生型GUS活性还要高[22]。其原因可能是在17k-GUS中第二个AUG起读密码很接近最适转译起始优选序列。这种17kD-GUS高效表达情况可能不一定反映体内实际积累情况。17k蛋白可能具有高度的周转率。如果用单一特异性抗体，进一步研究17kD蛋白在感病毒植物或转基因植物中的分布，当能有助于此问题的阐明。

参 考 文 献

1 Matthews R E F Classification and nomenclature of viruses, Inetervirology; 1982, 17: 1 – 199

2 Smith K M A Textbook of Plant Virus Diseases (Second edition). 1957; 368 – 375

3 Harrison B D. Potato leafroll virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Virus. 1984; No. 291

4 Takanami Y, Kubo S Nucleicacids of two phloem-limited viruses; tobacco necrotic dwarf and potato leafroll Journal of General virology. 1997. 44: 853 – 856

5 Rowhani A, Stace-Smith R Purification and Characterization of potato leafroll virus. Virology. 1979; 98: 45 – 54

6 Mayo MA, Barker H, Robinson DJ, *et al* Evidence that potato leafroll virus is positive – stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate. Journal of General Virology 1982; 59: 163 – 167

7 Mayo MA, Robinson DJ, Barker R. In Report of the Scottish Crop Research institute for 1983. 1984: 187

8 Miller WA, Waterhouse PM, Gerlach WL Sequence and organization of barley yellow dwarf virus genomic RNA. Nucleic Acids Research, 1988; 16: 6097 – 6111

9 Veitt J, Lot H, Leister M, Schedecker D *et al*. Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. Nucleic Acids Research. 1988; 16: 9917 – 9932

10 Mayo MA, Robinson DJ, Jolly CA, *et al*. Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. Journal of General Virology. 1989; 70: 1037 – 1051

11 Van der Wilk F, Huisman MJ, Cornelissen B J C, *et al*. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA. FEBS lett. 1989; 245: 51 – 56

12 Keese P, Martin RR, Kawchuk LM, *et al*. Nucleotide sequence of an Australian and a Canadian isolate of potato leafrollvirus and their relationships with two European isolates. Journal of General Virology, 1990; 71: 719 – 724

13 Marsh LE, Dreher TW, Hall TC. Mutational analysis of the core and modulator sequences of the BMV RNA3 subgenomic pro-

维普资讯 http://www.cqvip.com

moter. Nucleic Acids Research, 1988;16:981 - 995

14 Martin RR, Keese PK, Young MJ, *et al*. Evolution and Molecular biology of luteoviruses Annual Review of Phytopathology, 1990;28:341 - 363

15 Miller WA, Dreher, TW, Hall TC. Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA *in vitro* by internal initiation of (-) sense genomic RNA. Nature, 1985;313:68 - 70

16 Prufer D, Tacke E, Schmitz J, *et al*. Ribozomal frameshifting in plants: a novel signal directs the -1 frameshift in the synthesis of the putative viral replicase of potato leafroll luteovirus. The ENBO Journal, 1992;11:1111 - 1117

17 Kujawa AB, Drugeon G, Hulanicka D, *et al*. Structural requirements for efficient translational frameshifting in the synthesis of the putative viral RNA - dependent RNA polymerase of potato leafroll virus. Nucleic Acids Research, 1993;21:2165 - 2171

18 Jacks T, Madhani HD, Marsiarz FR, *et al*. Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag - pol region Cell, 1988;55:447 - 458

19 Hatfield DL, Oroszlan S. Trends. biochem, Sci, 1990;15:186 - 190

20 Davies JW. Molecular Plant Virology, vol. Ⅱ Boca Roton: CRC press, 1985.

21 Smith OP, Harris KF. Potato leafroll virus 3'genome organization: sequence of the coat protein gene and identification of a viral subgenomic RNA. Phytopathology, 1990;80:609 - 614

22 Tacke E, Prufer D, Salamini F, *et al*. Characterization of a potato leafroll luteovirus subgenomic RMA: differential espression by internal translation initiation and UAG suppuession. Journal of General Virology. 1990;71:2265 - 2272

23 French R, Ahlquist P. Characterization and engineering of sequences controlling *in vitro* synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA. Journal of Virology, 1988;62:2411 - 2420

24 Miller, JS, Mayo MA The location of the 5' end of the potato leafroll luteovirus subgenomic coat protein mRNA. J Gen Virology, 1991; 72:2633 - 2638