维普资讯 http://www.cqvip.com

144—148 15970(9)

第11卷第2期 中国病毒学 Vol.11 No.2
1996年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1996

马铃薯卷叶病毒基因间隔区的克隆及序列分析

董江丽 哈斯阿古拉 张鹤龄 S432.4

（内蒙古大学生物系，呼和浩特 010021）

A

提要 根据已报道的马铃薯卷叶病毒基因组序列，设计合成一对特异性引物，以马铃薯卷叶病毒中国分离株（PLRV-Ch）的 RNA 为模板，反转录合成 cDNA 第一条链，经 PCR 扩增后克隆于 pUC19 质粒中，进一步用 PCR 鉴定、限制酶切分析和序列分析，结果表明：PLRV-Ch 基因间隔区由 197 个核苷酸组成，与国外报道的荷兰 PLRV-N，加拿大 PLRV-C，澳大利亚 PLRV-A，苏格兰 PLRV-S 各株系核苷酸序列具有很高的同源性，同源率依次为 99%、98%、93%、98%。

关键词 马铃薯卷叶病毒，基因间隔区，PCR 扩增，分子克隆，核苷酸序列 序列分析

植物病毒

马铃薯卷叶病毒（Potato Leafroll Virus, PLRV）属黄化病毒组（Luteovirus）[1]，是由蚜虫以持续方式传播的一种病毒，可侵染马铃薯引起植株矮缩、僵化、卷叶、黄化，严重时可使整个植株死亡。由于 PLRV 分布广泛且难以控制，给世界各地的马铃薯生产造成巨大经济损失[2]。因此，PLRV 的有效防治具有重要经济意义。

PLRV 基因组，RNA 全长 6.0 kb，5′端结合有一个病毒基因组结合蛋白（Vpg），3′端无 polyA 结构。基因组有三个非编码区：5′末端非编码区有 174 个核苷酸，3′末端非编码区有 141 个核苷酸，在 ORF2b 和 ORF3 之间有一个基因间隔区，包括 197 个核苷酸。此基因间隔区将基因组 RNA 分为两个编码区：5′编码区，包括 ORF1、ORF2a、ORF2b；3′编码区，包括 ORF3、ORF4、ORF5。

在 PLRV 侵染的细胞内有一个单独表达的病毒 3′端编码区的亚基因组 RNA[3]，它的转录起始位点在距 ORF3 AUG 起始密码上游 40 个核苷酸的鸟嘌呤核苷酸（G）残基处，即 Mayo 等（1989）报道的 PLRV-S RNA 全序列的第 3653 位[4]，PLRV-S 全序列为 5987 个核苷酸，由此推算出 PLRV 亚基因组 RNA 为 2.334 kb。分析比较 PLRV，甜菜西方黄化病毒（BWYV）和大麦黄矮病毒（BYDV）基因间隔区，发现它们长短相近且均有两段保守序列，一段位于 CP 基因起读密码 AUG 上游，另一段位于 PLRV 亚基因组 RNA 转录起始位点处，在转录起始位点的 5′端有 UUAUAUU 序列，此序列和雀麦花叶病毒（BMV）亚基因组启动子的部分序列 UUAUUAUU 十分相似[5]。据此推测，后一段序列可能是 PLRV 亚基因组启动子的组成部分。因此合成、克隆 PLRV 亚基因组基因间隔区，以其反意 RNA 封闭 PLRV 基因间隔区保守序列，有可能干扰 PLRV 亚基因组转录，成为建立抗病毒基因工程的新途径。本文报道 PLRV-Ch 基因间隔区的 cDNA 克隆和序列分析结果，为进一步研究基因间隔区的抗病毒作用奠定了基础。

* 本文于 1995 年 7 月 10 日收到、9 月 27 日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

材料与方法

1 **引物**　根据国外报道的基因组 RNA 全序列[4,6,7]，设计合成两个引物。引物 Ⅰ，3′端(25mer)5′-ATG-GATCCACTCATTAACAATTGAT-3′，在近 5′端设计有 BamH Ⅰ 位点。引物 Ⅱ，5′端(23mer)5′-ACTGAT-CACTGAAGGAGCTCACT-3′，在近 5′端设计有 Bcl Ⅰ 位点。

2 **病毒增殖和提纯**　PLRV 是在脱毒马铃薯栽培品种"紫花白"中增殖的，病毒粒体经两次蔗糖密度梯度离心提纯，在 H-600 电镜下鉴定其纯度[8]。

3 **病毒 RNA 提取**　用酚－SDS 法[9]提取病毒 RNA。

4 **cDNA 合成和 PCR 扩增**　利用特异性引物 Ⅰ(25 mer)，以 PLRV-Ch RNA 为模板，按照反转录试剂盒说明书方法合成 cDNA 第一条链。PCR 扩增是在 50 μl 反应体系中包括反转录产物 0.5 μl，引物 Ⅰ 和引物 Ⅱ(5 pmol/μl)各 5 min，dNTP(2.5 mmol/L)5 μl，10×Buffer 5 μl，无菌三蒸水 28.5 μl，Taq DNA 聚合酶 1 μl，然后加入 50 μl 石蜡油覆盖，循环 30 次：94 ℃变性 1 min，50 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min. 最后一个循环结束后于 72 ℃保温 10 min.

5 **cDNA 克隆**　用 BamHI 酶切 PCR 产物，然后用低熔点胶回收 cDNA[10]。cDNA 经 5′端加磷反应之后连接于 pUCI9 质粒的 BamH Ⅰ、Sma Ⅰ 双酶切位点，转化大肠杆菌 DH5α，在含氨苄青霉素的平皿上培养，挑取白色菌落，用 Kieser 法筛选重组子。

6 **重组质粒鉴定**　将获得的克隆以碱法提质粒[10]，分别用 PCR 扩增及限制酶切分析鉴定。

7 **核苷酸序列分析**　由北京农业大学生物技术室，用 ABI 370A 型 DNA 自动荧光序列分析仪进行序列分析。

结　　果

1　cDNA 合成和 PCR 扩增

以反转录合成的 cDNA 第一条链为模板，经过 30 个循环的 PCR 扩增，获得了足够量的 0.2 kb 的 cDNA 片段(见图 1)。

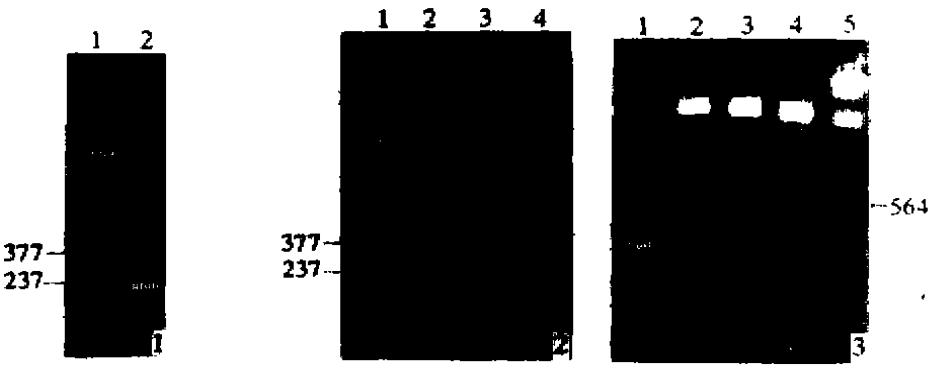

图 1　以 RT-cDNA 为模板的 PCR 产物电泳图

1. PCR marker　　2. PLRV RNA 基因间隔区 RT-PCR 产物。

Fig 1　The electrophoretogram of RT-PCR product

Lane 1: PCR marker　　Lane 2: product of RT-PCR of PLRV RNA intergenic region

维普资讯 http://www.cqvip.com

图2 PCR检测重组质粒

1. PCR Marker

2 $pLRIS_1$ 为模板的 PCR 产物

3. $pLRIS_2$ 为模板的 PCR 产物

4. PLRV RNA 基因间隔区 RT-PCR 产物

Fig 2 Detection of recombinant plasmids by PCR

Lane 1: PCR marker

Lane 2: product of PCR from $pLRIS_1$

Lane 3: product of PCR from $pLRIS_2$

Lane 4: product of RT－PCR of PLRV RNA intergenic region

图3 不同限制酶切分析重组质粒

1. pLRIS1 为模板的 PCR 产物(未酶切)

2. Sst Ⅰ单酶切重组质粒

3. BamH Ⅰ单酶切重组质粒

4. HindⅢ、EcoR Ⅰ双酶切重组质粒

5. λDNA/HindⅢ酶切标记

Fig 3 Restriction mapping analysis of recombinant plasmids with different enzymes

Lane 1: product of PCR from $PLRIS_1$, without enzyme treatment

Lane 2: Digested with Sst Ⅰ

Lane 3: Digested with BamH Ⅰ

Lane 4: Digested with HindⅢ and EcoR Ⅰ

Lane 5: λDNA/HindⅢ maker

2 重组质粒的筛选和鉴定

用连接产物转化大肠杆菌 DH5α，从选择性培养基上获得 50 个白色菌落，经过筛选得到 7 个有插入片段的克隆，分别命名为 $pLRIS_1$ － $pLRIS_7$. 经 PCR 检测及限制酶切分析鉴定后，证实所得克隆中均含有反向插入的目的 DNA 片段(见图 2、图 3)。

3 PLRV-Ch 基因间隔区核酸序列分析

核苷酸序列分析结果表明：PLRV-Ch 基因间隔区包含 197 个核苷酸与 PLRV-N, PLRV-C, PLRV-S 基因间隔区核苷酸数目相同，但是 PLRV-A 基因间隔区包含 196 个核苷酸，PLRV-Ch 基因间隔区核苷酸序列与国外报道的 PLRV-N, PLRV-C, PLRV-A, PLRV-S 各株系相应序列比较具有很高同源性，其同源率依次为：99%、98%、93%、98%。(见图 4)

PLRV-Ch	AGGAGCUCAC	UAAAACUAGC	CAAGCAUACG	CGAGUUGCAA
PLRV-N	----------	----------	----------	----------
PLRV-C	----------	----------	---------A-	----------
PLRV-A	----------	-UUG------	----------	----------
PLRV-S	----------	----------	---------A	----------
PLRV-Ch	GCAUUGGAAG	UUCAAGCCUC	GUUACAUCAA	CCGGACAAAA
PLRV-N	----------	----------	----------	-----U----
PLRV-C	----------	----------	----------	----------
PLRV-A	----------	----------	-------A--	----------
PLRV-S	----------	----------	----------	-------U--
PLRV-Ch	UAGAUUAUAA	AUUCUUAGCG	GGAUUUGCUU	UAGGAUUCUC
PLRV-N	-------U--	----------	----------	----------
PLRV-C	----------	----------	------C---	---------U-
PLRV-A	----------	-----A----	----------	C---------U
PLRV-S	----------	----------	----------	C---------
PLRV-Ch	AUCCGCAAUC	CCAUUUUCAG	UAGCCGGUUU	AUAUUUAGUU
PLRV-N	----------	----------	----------	----------
PLRV-C	----------	-- --------	----------	-------U--
PLRV-A	----------	---A------	----------	----------
PLRV-S	----------	----------	----------	-------U--
PLRV-Ch	UACCUAAAGA	UUUCCUCCCA	CGUGCGAUCA	AUUGUUA
PLRV-N	----------	----------	----------	----------
PLRV-C	----------	----------	----------	----------
PLRV-A	----------	------GAU-	----U----U	--C-------
PLRV-S	----------	----------	----------	----------

图4 PLRV-Ch 及其它 4 个已报道的 PLRV 分离株基因间隔区序列比较分析

Fig 4 Comparision of nucleotide sequence of intergenic region of PLRV-Ch with other reported four PLRV isolates

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨 论

1 PLRV RNA基因间隔区有两个保守区。第一个保守区是紧接CP基因起读密码AUG上游区。分析比较五种PLRV分离株,在这段保守区中只有澳大利亚分离株有6个碱基不同,其它四种分离株序列完全一致。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中央,在转录起始位点的5′端有UUAUAUU序列,此序列和雀麦花叶病毒(BMV)亚基因组启动子的部分序列UUAUUAUU十分相似[3],在大麦黄矮病毒(BYDV),甜菜西方黄化病毒(BWYV)中也有类似序列,因此这一序列可能是所有黄化病毒亚基因组启动子的一部分。分析比较五种PLRV分离株,结果表明此段序列具有很高的一致性。在基因间隔区第157位,PLRV-Ch、PLRV-N、PLRV-A是碱基A,PLRV-C、PLRV-S是碱基U,这很可能是分离株本身的差异。

2 PLRV RNA基因间隔区包含有亚基因组启动子序列,亚基因组独立表达3′端编码区中的外壳蛋白,17kD蛋白,56kD蛋白。克隆这段基因间隔区并将它正向、反向构建到转化载体中,通过转化马铃薯植株,研究正意、反意基因间隔区对PLRV 3′端基因表达的干扰作用,以期建立抗病毒基因工程新途径。另外,PLRV基因间隔区的克隆对研究PLRV亚基因组的转录与表达调控具有重要的理论意义。

参 考 文 献

1 Mathews R E F. Classification and nomen culture of virus. 4th Intrevirology, 1982;17:1~199

2 Smith K M A. Textbook of Plant Virus Diseases. 3rd ed. Longman, London. 1972

3 Mayo M A, Robinson K J, Barker H. In Report of the Scottish Crop Research Institute for 1983. 1984;P.187

4 Mayo M A, Robinson D J, Jolly C A, *et al*., Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. J. Gen. Virol, 1990;70:1037~1051.

5 Tacke E, prufer D, salamin F, *et al*. Characterization of a potato leafroll luteovirus subgenomic RNA; differential expression by internal translation initiation and U A G suppression. J. Gen. Virol, 1990. 71:2265~2272.

6 Van der Wilk F, Huisman M J, Cornenlisen B J C, *et al*. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA. FEBS, 1989;245:51~56

7 Keese P, Martin R R, Kawchuk L M, *et al*. Nucleotide sequence and of an Australian and a Canadian isolate of potato leafroll lutevirus and their relationships with two European isolates. J. Gen. Virol, 1990;71:719~724

8 孟清,张鹤龄,马铃薯卷叶病毒的提纯.病毒学报,1989;3(2):151~155

9 Gould A R. Studies on encapsidated viroid-like RNA. Ⅱ purification and characterization of a viriod-like RNA associated with velvet tobacco mottle virus(VT-MOV) Virology, 1981;108:123~133

10 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T, *et al*. Molecular Cloning. 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

维普资讯 http://www.cqvip.com

The cDNA Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of Potato Leafroll Virus Intergenic Region

Dong Jiangli Hasi Agula Zhang Heling

(*Department of Biology, Inner Mongolia University, Huhehaote* 010021)

Two specific primers were designed and synthesized according to the genomic sequence of PLRV reported in literature. The first strand of cDNA was synthesized by reverse-transcription using RNA of PLRV Chinese isolate (PLRV-Ch) as a template, followed by PCR amplification. The synthesized cDNA was cloned into plasmid pUC19 in DH5α. The cDNA clone was further identified by PCR, restriction enzymes analysis and nucleotide sequence analysis. Tests show that the intergenic region of PLRV-Ch isolate consists of 197 nucleotides, and there is a high homology in nucleotide sequence in comparision with PLRV Netherland isolate(PLRV-N), PLRV Canadian isolate(PLRV-C), PLRV Austrilian isolate(PLRV-A) and PLRV Scottish(PLRV-S). The rate of nucleotide sequence homology is 99%, 98%, 93% and 98%, respectively.

Key words Potato Leafroll Virus, Intergenic region, PCR amplification, Molecular cloning, Nucleotide sequence