

255-263 (9) 435.32 432.4
马铃薯卷叶病毒中国株(PLRV-Ch)复制酶基因结构研究

张鹤龄, 梁成罡, 张彤, 哈斯阿古拉, 赵国芬

(内蒙古大学生物系, 呼和浩特 010021)

摘要:用设计合成的两对特异性引物,以马铃薯卷叶病毒中国分离株 PLRV-Ch RNA 为模板,经反转录 PCR 扩增,将复制酶基因 3'端 0.6 kb 和 5'端 1.2 kb,克隆于 pUC19 中,分别构建了重组质粒 pLR3 和 pLR5,并分五段进行了序列分析。将获得的核苷酸序列及氨基酸序列与国外报导的四个 PLRV 分离株的相应区段的序列同源性进行了比较。结果表明具有高度同源性。文中对核苷酸序列中存在的可能移码序列和其下游的茎环结构或假节结构、以及特征性三次重复区及氨基酸序列中复制酶蛋白 N 端的碱性氨基酸序列以及 C 端区域中包括 GDD 在内的 8 个特征序列进行了讨论。作者发现移码序列上游的三次重复的核苷酸序列可以形成连续折叠的互补双链区和发夹结构,这一结构可能和转译移码有关。此外 PLRV 复制酶蛋白 N 端部分氨基酸序列易变,而 C 端氨基酸序列十分保守,可能和复制酶功能有更重要关系。

关键词:马铃薯卷叶病毒;依赖 RNA 的 RNA 聚合酶;基因克隆;序列分析

中图分类号:S435.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5125(2000)03-0255-09

复制酶

马铃薯卷叶病毒是正链 RNA 的病毒,属黄化病毒组(Luteovirus)^[1]严格虫传,分布广泛,难以控制,侵染马铃薯,能引起大面积减产,历年给马铃薯生产造成巨大损失。PLRV 基因组全长 6.0 kb,有六个读码框架,其中复制酶基因由第三个读码框架 ORF2b 编码,全长约 1.8 kb,编码一个 69 kD 的多肽^[2,3,4]。

Koonin^[5]比较研究了 46 种正链 RNA 病毒的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRp)的结构,并提出其中有 8 个特征性序列及其可能的功能。Prufer 等^[6]和 Kujawa 等^[7]分别研究了 PLRV 复制酶基因中和移码有关的滑动序列及其下游“茎环结构”和“假节结构”。此外,近年来抗病毒基因工程研究表明,复制酶介导的抗性明显优于外壳蛋白介导的抗性。

从 1992 年起,本室陆续报导了马铃薯卷叶病毒的外壳蛋白基因克隆及序列分析^[8],56 kD 蛋白基因克隆及序列分析^[9],基因间隔区克隆和序列分析^[10],和复制酶基因 3'端克隆和序列分析等^[11],本文报告 PLRV 中国株复制酶基因全序列,分析其核苷酸及氨基酸序列特征,并与其他 PLRV 株系进行比较研究。

1 材料和方法

1.1 试剂和酶

反转录试剂盒购自美国 Promega 公司。PCR 试剂盒购自华美生物工程公司。T₄DNA 连接酶, Klenow 聚

收稿日期:1999-04-07,修回日期:1999-10-25

* 基金项目:内蒙自然科学基金资助项目(9610E28)

作者简介:张鹤龄(1931年-),男,籍贯:辽宁沈阳,植物病毒学教授,研究方向为病毒分子生物学

合酶, X-gal, IPTG 等购自美国 Promega 公司, 其它限制性内切酶购自德国 Boehringer Mannheim 公司或华美生物工程公司。

1.2 菌种及质粒

JM109 为本室保存; pUC19 购自华美生物工程公司。

1.3 病毒

由本室保存的分离自马铃薯“紫花白”的马铃薯卷叶病毒中国株(PLRV-Ch)。

1.4 病毒提纯及 RNA 提取

病毒提纯按本室报道的方法^[12]进行, RNA 提取用 SDS-酚法。

1.5 引物设计

根据已报道的苏格兰分离株 PLRV-S RNA 序列^[2]和分两段合成克隆 PLRV 复制酶基因的策略, 设计合成两对引物。引物 I 为复制酶基因 3' 端片段下游引物, 22 mer, 5'-GTGAGCTCCTTCAGTGTTCTTT3', 引物 II 为 3' 端片段上游引物, 27 mer, 5'-TAGGATCCGCGCGCCCAACCGACTGTT-3', 引物 II 的近 5' 端设计有 *Bam*H I 和 *Bss*H II 酶切位点。引物 III 为复制酶基因 5' 下游引物, 27 mer, 5'-TAGGATCCACGCGTGTACTCCTTGTGA3', 引物 IV 为复制酶基因 5' 端片段上游引物, 31 mer, 5'-GAACCATGGGAT-TACGGTCTGGAGAGAGAGG-3'。引物 III 的 5' 端设计有 *Bam*H I 和 *Mlu* I 位点。

1.6 cDNA 第一条链合成及 PCR 扩增

分别利用特异性引物 I 和 III, 以 PLRV-Ch RNA 为模板, 按反转录试剂盒提供的方法合成 cDNA 第一条链。以 cDNA 第一条链为模板进行 PCR 扩增, 扩增体系 50 μ L; 无菌三蒸水 36 μ L, 4 \times dNTP (2.5 mmol/L) 5 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, 引物各 1 μ L (250 ng/ μ L), 模板 1 μ L, 石蜡油 40 μ L。96 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 3 min, 加入 Taq 酶 1 μ L (3 u/ μ L)。72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min。然后进行 34 个循环, 循环条件为 92 $^{\circ}$ C 变性 1.5 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2.5 min。最后于 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min, 琼脂糖电泳, 观察扩增结果。

1.7 cDNA 克隆

透析袋回收法^[13]回收扩增片段, 用 Klenow 聚合酶补平^[9], *Bam*H I 酶切, 将酶切产物进行 5' 端磷酸化, 与经 *Bam*H I, *Sma*I 双酶切的质粒连接, 在加有 X-gal, IPTG 及 Amp 的平皿上挑取白色菌落进行筛选。

1.8 重组质粒鉴定

用碱法提取质粒^[13], 分别进行 PCR 扩增并用不同组合的限制性内切酶酶切分析。

1.9 核苷酸序列分析

将获得的 PLRV-Ch 复制酶基因 3' 端 0.6 kb 片段和 5' 端 1.2 kb 片段分别亚克隆到 M13mp 质粒中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分别从两个亚克隆的 3' 端和 5' 端进行序列分析。

2 结果

2.1 目的片段的 RT-PCR 扩增及克隆

先以 PLRV-Ch RNA 为模板, 分别以引物 I 和 III 反转录合成 cDNA 第一条链。再加入双引物, 分别进行 PCR 扩增。1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后, 紫外灯下观察获得了预期大小的两个 DNA 片段。分别克隆于 pUC19 的 *Bam*H I 和 *Sma*I 位点, 得重组质粒 pLR3 和 pLR5。

2.2 重组质粒 pLR3 和 pLR5 酶切分析鉴定和 PCR 鉴定

将重组质粒 pLR3 分别用 *Bam*H I + *Kpn*I, *Pst*I + *Eco*R I 双酶切, 用 *Pst*I 单酶切。再将重组质粒 pLR5 分别经 *Sma*I, *Bam*H I, *Kpn*I, *Bam*H I + *Kpn*I, *Hind*III, *Eco*RI 等酶切。结果证明, 所克隆的片段大小与预期目的片段相同。以重组质粒 pLR3 和 pLR5 为模板分别进行 PCR 扩增, 表明扩增产物与插入的目的基因片段具有相同的特异性。

PLRV-Ch	UCCAAACUGG	AUUGGGCUGG	CUUUCAACAA	GAUAUCCGUG	AAGCAGUCCA	GUCCCUUGAG	-780
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-A	-----	-----AA	-----	-----	-----	-----	
PLRV-Ch	CUAGACCCUG	GUGUAGGCAU	UCCCUAUUUC	GGUAUUGGCC	UCCCCACACA	CCGAGGAUGG	-840
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----G-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-Ch	GUUGAGGACC	AUAAGCUUCU	CCCAGUGCUC	ACUCAGCUGA	CCUUUGACCG	ACUACAGGGG	-900
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----AA-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-----	-----AA-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-----	-----AA-----	
PLRV-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----AA-----	
PLRV-Ch	AUGUCAGAGG	CCAGCUUCGA	GGUAUUGAGC	GCAGAAGAGC	UGGUUCAAGA	AGGGCUCUGU	-960
PLRV-S	-----G-----	-----U-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----U-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----G-----	-----U-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-A	-----G-----	-----U-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-Ch	GAUCCUAUCA	GACUAUUGU	CAAAGCAGAG	CCCCACAAAC	AGAGCAAAACU	CGAUGAAGGC	-1020
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----U-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-Ch	CGCUACCUCC	UCAUCAUGUC	UGUUUCCUUG	GUGGAUCAAC	UGGUAGCCCG	GGUUCUGUUC	-1080
PLRV-S	-----G-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----G-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-Ch	CAAAAUCAGA	ACAAAAGGGA	AAUUUCCUUG	UGGAGGUCUG	UGCCCUCCAA	ACCCGGUUUU	-1140
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----U-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-----U-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-----U-----	-----	
PLRV-A	-----	-----	-----	-----	-----U-----	-----	
PLRV-Ch	GGCCUUUCA	CUGACACUCA	AACUGCUGAA	UUCUUGGAGU	GUCUUCAAAA	GGUGUUUGGA	-1200
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----C-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-----	-----U-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-----	-----CA-----	
PLRV-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----CC-----	
PLRV-Ch	GGCCCAUCUG	UGGAAGAAUU	GUGUGCGAAU	CACAAGGAGU	ACACCCGCCC	AACCGACUGU	-1260
PLRV-S	-----	-----	-----A-----	-----	-----	-----U-----	
PLRV-N	-----	-----	-----A-----	-----C-----	-----G-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----A-----	-----	-----G-----U-----	-----	
PLRV-A	-----	-----	-----A-----	-----	-----G-----	-----	
PLRV-Ch	UCCGGUUCG	ACUGGUCAGU	CGCGUAUUGG	AUGCUGGAGC	AUAUGAUUG	GAGGUGAGAA	-1320
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----U-----	-----	-----	-----	-----C-----	-----	
PLRV-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-Ch	CGCCUGACAU	UUAUAACAC	CCAGCUCACC	AAGCGCCUUC	GGCGUGCCUG	GUUGAAGUCC	-1380
PLRV-S	-----	-----	-----	-----U-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----U-----	-----	-----	
PLRV-A	-----A-----	-----C-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-Ch	AUAGGAAACU	CCGUCCUGUG	CCUGUCCGAU	GGCACUUUAC	UUGCCCAAAC	UGUUCCCGGU	-1440
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----A-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----U-----A-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-A	-----U-----	-----U-----	-----A-----U-----	-----	-----	-----C-----	

PLRV-Ch	GUGCAAAAGA	GCGGAAGUUA	CAACACAAGU	UCCUCCAACU	CUAGAAUCCG	GGUUAUGGCU	-1580
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	---U-----	---U-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	---U-----	---U-----	-----	-----	
PLRV-A	-----	-U-----	U-U-----	-U-----	-C-----	-----	
PLRV-Ch	GCCUAUCACU	GUGGCGCCGA	CUGGGCAAUG	GCCAUGGGGG	AUGAUGGUCU	CGAAGGCCCC	-1580
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-C-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-C-----	-C-----	
PLRV-A	-----U-	-----	-----G-	-----U-	-----U-	A-----	
PLRV-Ch	AACUCCGACC	UAGAGGAGUA	UAAAACACUA	GGUUUCAAAAG	UCCAGGUAGG	UGGAGAACUC	-1620
PLRV-S	-----	-G-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----U-	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-G-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-A	-----A-	-----	---G-----	-C-----	-----	-----	
PLRV-Ch	GAAUUCUGUU	CACACAUCUU	CAGAAAUCCG	ACCCUCGCCG	UUCGGUCAAA	CAGCAACAAA	-1680
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-----	U-----	
PLRV-A	-----	-----U-	-----	-----	-----U-	U-----	
PLRV-Ch	AUGCUUUACA	AGUUGAUCCA	UGGUUAUAAU	CCGCAAUGUC	GCAAUCCAGA	AGUGAUUCAA	-1740
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-A	-----U-	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-Ch	AACUUAUCUGG	CUGCAGUACU	CUCUGUGCUUG	CAGGAACUCC	GACACGAUCC	UGAGCUCGUU	-1800
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----G-A	-----	-----	
PLRV-A	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	
PLRV-Ch	GCCAAGCUCC	ACCAGUGGUU	GGUUCGAGU	GCCACCACAA	AAGAACACUG	A	-1851
PLRV-S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
PLRV-A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

图 1 PLRV-Ch 复制酶基因核苷酸序列及其与国外四种 PLRV 分离株同源性比较

Fig. 1 Nucleotide sequence of PLRV-Ch replicase gene and the homology comparison with foreign isolats, PLRV-S, PLRV-N, PLRV-C, PLRV-A.

2.3 PLRV-Ch 复制酶基因核苷酸序列分析

将 PLRV-Ch 复制酶基因 3' 端及 5' 端 cDNA 片段分别亚克隆于 M13mp 质粒中, 用 ABI 370A 型自动序列分析仪测序。复制酶 3' 端 cDNA 片段, 分别从两端进行序列分析, 而且从 3' 端测定两次, 其中两次重复测定碱基 360 个, 三次重复测定碱基 70 余个。5' 端 cDNA 片段的测序分三次进行, 第一次从 5' 端开始, 测定了 434 个碱基, 第二, 三次分别从 3' 端测定 409, 再进一步向 5' 端测定 390 个碱基, 其中重复测定的碱基数约 40 余个。核苷酸序列分析结果见图 1。

2.4 PLRV-Ch 复制酶基因 1851 个核苷酸序列(连同终止密码)与国外 PLRV 分离株复制酶基因^[2,3,14]的序列同源性比较

分析结果表明 PLRV-Ch 复制酶基因与英国分离株 PLRV-S, 荷兰分离株 PLRV-N, 加拿大分离株 PLRV-C 及澳大利亚分离株 PLRV-A 的复制酶基因核苷酸序列同源性分别为 98.8%, 97.7%, 97.8% 和 96.2%。PLRV-Ch RdRp 基因与 PLRV-S 分离株的核苷酸序列同源性

最高,与 PLRV-A 分离株的同源性最低,但均在 96% 以上。

2.5 序列分析结果

在相当于 PLRV-S 株的 1770 nt 左右有一个由 7 核苷酸组成的与移码有关的滑动序列(图 1 中,下面划有横线)UUUAAAU,其下游有一个茎环结构(Prufer et al. 1992)^[6]或“假节结构”(Kujawa et al 1993)^[7](图 1 中下面划有波浪线)。

在移码滑动序列上游相距 5 nt,相当于 PLRV-S 的 1682-1762 位 nt 处有一个 PLRV RNA 特有的连续排列的三次重复序列(见图 1,上面划有横线)和 Mayo 等(1989)报道^[2]是一致的。每段序列由 27 个核苷酸组成。为 PLRV 各分离株所特有。我们推测这种三次重复序列可以形成复杂的结构,构成较紧密连续折叠互补双链结构和发夹结构(图 2)。其作用可能和 -1 移码有关。

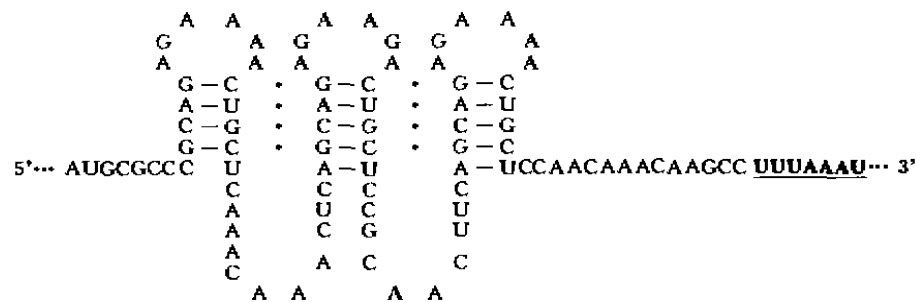


图 2 滑动序列上游连续排列的三次重复序列及其可能形成的连续折叠的互补双链结构和发夹结构。“·”,“—”表示形成氢键的两种可能情况。

Fig.2 Nucleotide sequence repeats of PLRV RNA (1682 - 1762) upstream of the slippery sequence and the possible continuous three folded hairpin structures

2.6 PLRV-Ch 复制酶氨基酸序列分析

根据核苷酸序列推测的 PLRV-复制酶 616 个氨基酸序列列于图 3。在复制酶的近 N 端有一个由精氨酸、赖氨酸、组氨酸组成的碱性氨基酸区域, KRQLRHPRRRYKP(图中下面划有横线)。可能与结合核酸有关。在第 325 个氨基酸以后有连续排列的正链 RNA 病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶的特征氨基酸序列 I-VII(图中上面划有横线)^[5]。从图 1 和 3 中可见 5 株 PLRV 的 I-VII 特征序列区均较一致,几乎无变化。PLRV-Ch 与国外 4 个 PLRV 分离株: PLRV-S, PLRV-N, PLRV-C, PLRV-A 复制酶氨基酸序列同源性分别为 98.9%, 97.4%, 97.6% 和 95.8%。比较各 PLRV 分离株复制酶 N 端和 C 端的氨基酸序列发现,各分离株 N 端氨基酸变化相对较大,而自 N 端数 325 个氨基酸之后的 C 端氨基酸序列各分离株几乎无变化,具有很强的保守性。而在 C 端这一段保守区内刚好排列有包括 GDD 在内的 8 个复制酶特征序列。

```

GLRSGERGNCN KCARENCSN KLSREDCSVN FSRENCSENKQ AFKWASGTVRI-50
QNKRLRHPER RRYKRTTNGQ NGRTDHHSYG GENQSLGDRG EDSEQGVSES -100
PAEAQTKEAR KAWREEQAKQ FTSYFNAIYK WGAQEGGCFF GFRECGHIPR -150
YYHPRTRGET QWGQKLCQVH PELAEKTAGF GWPKAGSEAE LQSLNLQAAR -200
WLQRAESATI PGAEARKRVI EKTVEAYENC VTNAPLCSLK SKLDWAGFQQ -250
DIREAYQSLE LDAGVGIFYI AYGLPTHRGW VEDHKLLPVL TQLTFDRLQG -300
MSEASFEDMS AEELVQEQLC DFIRLFVKGE PHKQSKLDEG RYLLIMSVSL -350
VDQLVARVLF QNQNKREISL WR SVFSKPGF GLSTDTQTAE FLECLQKVFG -400
APSVEELCAN HKEYTRPTDC SGFDWSVAYW MLEDDMEVRN RLTFNNTQLT -450
KRLRAAWLKC IGNSVLC LSD GTLLAQTVPF VQKSGSYNTS SSNSRIRVMA -500
AVHCGADWAM AMGDDALEAP NSDLEEYKTL GFKVEVGREL EFCSHIFRNP -550
TLAVPVNTNK MLYKLIHGYN PECGNPEVIQ NYLAAVFSVL QELRHDRRLV -600
AKLHQWLVPF ATTKEH -616

```

图3 PLRV-Ch 复制酶氨基酸序列及其中特征序列

Fig.3 Amino acid sequence of PLRV-Ch replicase and the characteristic motifs

3 讨论

据 Koonin^[5]报道,在 46 种正链 RNA 病毒的复制酶结构中共有 8 个 motifs,这 8 个 motifs 分别执行不同的功能,在本报告中的 PLRV-Ch 复制酶 C 端含有 motifs I-VIII,其中包括复制酶特征序列, GDD(motif IV),而且含 8 个 motifs 的复制酶 C 端氨基酸序列保守性很强,各分离株几乎无变化。这种高度保守性可能和复制酶功能有重要关系。PLRV-Ch 复制酶中 8 个 motifs 的保守氨基酸序列与 Koonin(1991)统计的 46 种正链 RNA 病毒复制酶中的各相应保守氨基酸序列是一致的。

RdRp 介导的抗性已成为植物抗病毒基因工程的有效途径。已有报导表明马铃薯卷叶病毒复制酶基因能使转基因马铃薯“Russet Burbank”产生田间免疫水平的抗性^[15]。本文报告的 PLRV 中国株复制酶基因克隆和全序列分析为用复制酶基因转化马铃薯培育高抗 PLRV 的转基因马铃薯栽培种创造了条件。

参 考 文 献

- [1] Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, *et al* (eds) Virus Taxonomy Classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee [R]. Springer Wiew New York. Archives of Virology, 1995(suppl.10)
- [2] Mayo MA, Robinson DJ, Jolly CA *et al*. Nucleotide Sequence of Potato leafroll luteovirus RNA [J]. J Gen Virol, 1989, 70: 1037 - 1051
- [3] Van der Wilk F, Huisman MJ, Cornelissen BJC *et al*. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic

- RNA [J]. FEBS Letters, 1989, 245: 51 - 56
- [4] 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒基因组研究进展[J]. 中国病毒学, 1996, 11(1): 1 - 8
- [5] Koonin EV. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA Viruses [J]. Gen Virol, 1991, 72: 2197 - 2206
- [6] Pruffer D, Tacke E, Schmitz J *et al.* Ribosomal frameshifting in plants: a novel signal directs the -1 frameshifting in the synthesis of the putative viral replicase of potato leafroll luteoviruses [J]. EMBO J, 1992, 11(3): 1111 - 1117
- [7] Kujawa AB, Drugron G, Hulanicka D *et al.* Structural requirement for efficient translational frameshifting in the synthesis of the putative viral RNA-dependent RNA polymerase of potato leafroll virus [J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(9): 2165 - 2171
- [8] 哈斯阿古拉, 施一, 张鹤龄. The cDNA synthesis, molecular cloning and nucleotide sequence of potato leafroll virus coat protein gene [J]. Proceedings of Asia-Pacific Conference on Agriculture Biotechnology, August 20 - 24, 1992, Beijing, China, 153 - 156
- [9] 张荣信, 哈斯阿古拉, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒 56 kd 蛋白基因及 3' 端非编码区克隆和序列分析[J]. 病毒学报, 1997, 13(3): 247 - 254
- [10] 董江丽, 哈斯阿古拉, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒基因间隔区克隆和序列分析[J]. 中国病毒学, 1996(2): 144 - 148
- [11] 梁成罡, 哈斯阿古拉, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒复制酶基因 3' 端克隆和序列分析[J]. 病毒学报, 1997, 13(3): 278 - 282
- [12] 孟清, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒的提纯[J]. 病毒学报, 1987, 3(2): 151 - 155
- [13] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T 著. 金冬雁, 黎孟枫等译. 《分子克隆—实验指南》[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1992
- [14] Kesse P, Martin RR, Kawchuk LM, *et al.* Nucleotide sequence of an Australian and Canadian isolate of potato leafroll luteovirus and their relationships with two European isolates [J]. Gen Virol, 1990, 71: 719 - 724
- [15] Kaniewski W, Lawson C, Loveless J, *et al.* Expression of Potato leafroll virus (PLRV) replicase genes in Russet Burbank potatoes provide field immunity to PLRV [C]. Scientific Program and Abstracts. American Society for Virology. 13th Annual Meeting, Madison, Wisconsin, July 9-13, 1994, P107

Study on the Replicase Gene Structure of Potato Leafroll Virus Chinese Isolate

ZHANG He-ling, LIANG Cheng-gang, ZHANG Tong, HASI Agula, ZHAO Guo-fen

(Department of Biology, Inner Mongolia University, Hohhot, 010021, China)

Abstract: According to the genomic sequence of PLRV-S, two pairs of specific primers were designed and synthesized. The cDNA of the replicase gene of PLRV Chinese isolate (PLRV-Ch) was synthesized and amplified by RT-PCR using the viral RNA as a template. The synthesized 3' and 5' cDNA fragments of PLRV-Ch replicase gene were inserted into pUC 19 and cloned in *E. coli* JM109 and sequenced respectively. The homology of nucleotide sequences between PLRV-Ch and PLRV-S (Scotland, UK), PLRV-N (Netherlands), PLRV-C (Canada), PLRV-A (Australia) are 98.8%, 97.7%, 97.8% and 96.2%, and the homology of putative amino acid sequences are 98.9%, 97.4%, 97.6% and 95.8% respectively. In 5' region of replicase gene a slippery sequence (heptanucleotide motif) for -1 frameshift and its down stream "stem-loop" or "pseudoknot", and upstream nucleotide sequence repeats were found. Authors suggested that the

nucleotide repeat sequences characteristic for PLRV could form a tight successively folded complementary double stranded regions and hairpins. This structure possibly has something to do with -1 frameshift. The amino acid sequence of C terminus region was very conservative unlike the N terminus region in which the amino acid sequence is more diversified. The amino acid domains: motifs I-V in the C-terminus and the basic amino acid sequence region in the N-terminus of RNA-dependent RNA polymerase of PLRV were discussed.

Key words: Potato leafroll virus; RNA dependent RNA polymerase (RdRp); Gene cloning; Gene structure