

357-360 (9)  
葡萄卷叶伴随病毒Ⅲ外壳蛋白基因的克隆赵冬兰<sup>1</sup>, 朱水芳<sup>2</sup>, 黄文胜<sup>2</sup>, 张满良<sup>3</sup><sup>1</sup>(徐州市农科所, 江苏省徐州市 221121)<sup>2</sup>(农业部植检所, 北京 100029)<sup>3</sup>(西北农业大学植保系, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 根据美国报道的葡萄卷叶伴随病毒Ⅲ(GLRaV-3)CP基因序列, 设计并合成一对引物, 用 IC-RT-PCR 对 GLRaV-3 进行检测, 琼脂糖凝胶电泳表明其大小与预计相符。将其 CP 基因克隆到 pGEM-3zf(+) 中, 经双酶切和序列分析表明所克隆的是 GLRaV-3 CP 基因, 它与美国分离物相应序列同源率为 94.1%。

**关键词:** 葡萄卷叶病毒; GLRaV-3; IC-RT-PCR; CP; 克隆

**中图分类号:** S 432 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)04-0357-04

外壳蛋白基因

S 436-631.1  
S 432.41

葡萄卷叶病(Grapevine leafroll disease)是葡萄上的一种重要的病毒病害。现已研究表明引起该病的病毒不止一种, 目前国际上承认的已有 5 种。葡萄卷叶伴随病毒Ⅲ(Grapevine leafroll associated virus 3, GLRaV-3)是其中最主要的一种, 它分布最广泛, 造成的经济损失最大, 而且也是这几种病毒中唯一具有自然介体的一种病毒<sup>[2]</sup>。另外, 该病毒只存在于维管束组织, 又没有草本寄主, 因此给该病毒的提纯和抗血清制备带来很大困难, 本实验根据生产实际, 为了建立一种快速、灵敏的检测方法, 我们根据国外已报道的美国分离物 GLRaV-3 CP 基因序列, 设计并合成了一对引物, 利用 IC-RT-PCR(Immunocapture-RT-PCR)对该病毒进行了检测并对其外壳蛋白基因进行了克隆。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

秦皇岛动植物检疫局送检的从法国进口的葡萄苗木。现存于农业部植物检疫实验所中心实验室。

### 1.2 GLRaV-3 的 CP 抗血清

美国康乃尔大学的朱海英博士赠送。

### 1.3 引物设计与合成

根据报道的 GLRaV-3 的 CP 基因序列<sup>[3]</sup>, 设计并合成 PCR 的 5'引物(3H)和 3'引物(3C), 为进一步表达该 CP 基因, 设计引物时加上了 *Nde* I 和 *Bam* H I 两个酶切位点。该引物在中科院微生物所合成。3H: 5'-ATCATATGATGGCATTGAACTGAAATT-3'; 3C: 5'-ATGGATCCTATAAGCTCCCATGAATTAT-3'

收稿日期: 1999-07-19, 修回日期: 1999-12-13

作者简介: 赵冬兰(1972年-), 女, 陕西省泾阳县人, 系西北农业大学1999届植物病理学专业硕士毕业生, 研究方向为植物病毒学。

#### 1.4 IC-RT-PCR 参考 Minafra 方法<sup>[4]</sup>

取葡萄叶片 1-2 片,用镊子去掉叶肉,用剪刀将叶脉和叶柄剪碎放入研钵,液氮研磨。加入 1 mL 50 mmol/L 的柠檬酸缓冲液(pH8.3),转入干净的离心管中。4 ℃, 12 000 r/min 离心 5 min。将上清转入另一离心管备用。用 GLRaV-3 的血清包被酶联板后,将上清加入酶联孔中,每孔 200  $\mu$ L, 4 ℃ 诱捕过夜。加入转移 buffer(10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 含 1% Triton X-100), 每孔 40  $\mu$ L, 65 ℃ 处理 5 min 后立即将其转入一离心管中。在诱捕液中加入 100 ng 左右任意质粒 DNA, 帮助病毒核酸沉降。再加入等体积的水饱和酚/氯仿/异戊醇(25/24/1)抽提,将 100  $\mu$ L 诱捕液浓缩为 5  $\mu$ L。取浓缩液 2  $\mu$ L, 引物 3C(20  $\mu$ mol/L)2  $\mu$ L, 加无菌去离子水(DDW)4  $\mu$ L, 在沸水中变性 5 min, 立即置于冰上 2 min, 然后室温放置 30 min, 使引物与病毒 RNA 退火。再将以下试剂加入反转录体系:4  $\mu$ L 5 $\times$  1st strand buffer, 2  $\mu$ L 10 mmol/L dNTP, 2  $\mu$ L 0.1 mol/L DTT, 2  $\mu$ L 0.3 mol/L ME, 1  $\mu$ L M-MLV 反转录酶(200 u), 1  $\mu$ L rRNasin inhibitor (40 u/ $\mu$ L)。将以上试剂在离心管中混匀, 42 ℃ 温育 1 h。PCR 反应在 50  $\mu$ L 体积中进行。按下列体系加样:39.5  $\mu$ L DDW, 5  $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer, 1  $\mu$ L 10 mmol/L dNTP, 1  $\mu$ L 引物 3H(20  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L 引物 3C(20  $\mu$ mol/L), 2  $\mu$ L cDNA 模板, 0.5  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶(5 u/ $\mu$ L)混匀后,加入 50  $\mu$ L 矿物油。循环反应参数为 94 ℃ 1 min, 52.5 ℃ 45 s, 72 ℃ 1.5 min, 循环 40 次,最后 72 ℃ 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后在紫外透射仪上观察。

#### 1.5 外壳蛋白基因的克隆

主要参考朱水芳的方法<sup>[1]</sup>。引物 3H、3C 用 T4 Polynucleotide kinase 进行磷酸化,用磷酸化引物进行 IC-RT-PCR 扩增,扩增程序同上。质粒 pGEM-3zf(+)用 *Sam*I 线性化,用小肠碱性磷酸化酶(CIP)去磷酸化。磷酸化 PCR 产物与去磷酸化的质粒按 1:1 用 T4 DNA Ligase 进行平端连接。取 100 ng PCR 产物,100 ng 去磷酸化的线性质粒,补足灭菌水至总体积为 8  $\mu$ L, 45 ℃ 5 min 立刻置于冰上,加入 1  $\mu$ L 预冷至 0 ℃ 的 10 $\times$  T4 DNA Ligase buffer, 1  $\mu$ L T4 DNA Ligase, 于 16 ℃ 连接 12-16 hr。氯化钙法制备新鲜大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 用 Amp 和半乳糖苷酶的底物 X-gal 进行互补筛选。并对获得的阳性克隆进行双酶切分析和序列分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 GLRaV-3 的 IC-RT-PCR 结果

本实验选择扩增的片段长度为 1 033 bp, 包括编码该病毒 CP 基因的 939 bp 及其 CP 基因 3'端的一段侧翼序列。结果扩增出了约 1 kb 左右的特异性带,与预期结果相一致,而且阴性对照无任何带出现,见图 1,表明 PCR 扩增是特异的。

### 2.2 外壳蛋白的克隆结果分析

本试验得到的两个阳性克隆分别为 GK-1 和 GK-2。克隆 GK-1 和 GK-2 用引物 3H 和 3C 扩增,均得到大小约 1 kb 的带,与样品的 IC-RT-PCR 扩增结果一致,克隆 GK-1 和 GK-2 经插入片段两端的酶 *Nde*I 和 *Bam*HI 双酶解后均能切下 1 kb 左右的带(图 2)。为了确证克隆的片断为 GLRaV-3 的 CP 基因,对克隆 GK-1 的一端进行了序列分析,结果表明 PCR 产物在插入到质粒 pGEM-3zf(+ )的 SP6 启动子下游的 *Sma*I 位点时,插入方向为 3' $\rightarrow$ 5'。进一步分析表明,克隆 GK-1 用 SP6 启动子一端测序,共测插入片段 478 nt,其中在 45 个位点上发生突变,没有缺失和插入,与 Ling 等<sup>[3]</sup>报道的美国分离物(Am-i)比较,具有 94.1% 的同源性(图 3)。通过克隆的核苷酸序列分析表明,所克隆的片断为 GLRaV-3 的 CP 基因。

## 3 讨论

葡萄植株中含大量的多糖和多酚类物质,提取核酸困难;加之该病毒在植物体内含量极

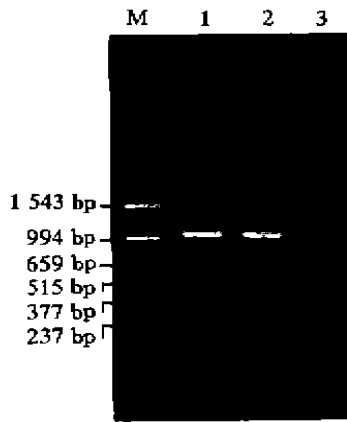


图 1 GLRaV-3 的 IC-RT-PCR 扩增结果  
Fig. 1 Amplification of GLRaV-3 CP by IC-RT-PCR  
M, PCR Marker (1543, 994, 659, 515, 377, 237);  
1-2, Amplified product; 3, Negative control

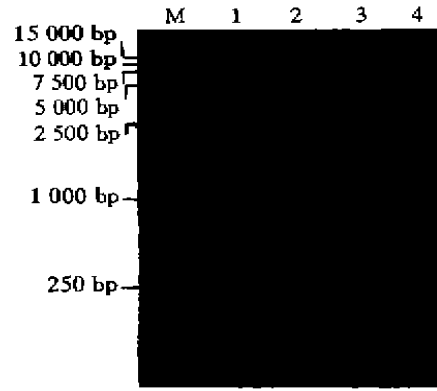


图 2 GLRaV-3 克隆重组片断分析  
Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of clone GK-1 and GK-2  
M, DL15000 Marker (15000, 10000, 7500, 2500, 1000, 250);  
1-2, Products of restriction endonuclease GK-1 and GK-2; 3-4, Plasmid of clone GK-1 and GK-2

GK-1	TATAAGCTCGCCATGAATATCAATTTAAAGGTAAATGCTTTAAAAATTTTA	. 50
Am-1	A AT CT T C	
GK-1	ACCGATTATGGACTTCGATCGTAACCTAGTTCTTTTGCACATGTTGAAG	100
Am-1	A A A G C G	
GK-1	ACATTATGTAATTTGTGTGTCAAGCCGTCAACCGTCTTATTTCTAAACCGCTG	150
Am-1	G G G A G T G	
GK-1	TTTGTCTAGCTAAATCCACGCTAATATGCGTCTGTTATTGAACAGATCAAT	200
Am-1	C T G G	
GK-1	ACGTCGGACGAAACGCAATCTATCGTGTACCGGAAGAATTTGGGTGACT	250
Am-1	G A	
GK-1	CCGTGCTGTGCCATAACCTTTTCATTTCATCACTAGCTTACCATTCAATGT	300
Am-1	A C G T GG	
GK-1	CGCCGTGATGAAGGTTGGTGTAAAGTAAAGCTAGATACTGCTTACCGGTT	350
Am-1	G C	
GK-1	TTTCTTAGCCCGTCAAGCCATCAGCTTGTTTAATGCAATCAACACCCAT	400
Am-1	A A A A C	
GK-1	ACCGGTATATCTTCTTCCATCATCAGTCTCTATATAGTCCGAACTCTTT	450
Am-1	G T G A	
GK-1	GAACTCTGTGGAAGACGATGTGAAGAAA	478
Am-1	C A C	

图 3 克隆 GK-1 与美国分离物 (Am-1) CP 序列比较

Fig. 3 Comparison of the CP sequences of clone GK-1 and Am-1

低,给检测工作带来很大困难。研究过程中曾采用一般 RT-PCR,但未得到扩增产物。建立一种快速、准确、灵敏的检测方法非常必要。本研究选取该病毒的 CP 基因作为扩增对象,应用 IC-RT-PCR 扩增出 GLRaV-3 的 CP 基因,该方法较一般 PCR 更为灵敏,而且不用提取核酸,有着广泛的应用前景。这对于象 GLRaV-3 这类病毒含量低,且核酸提取不易的病毒非常适用。同时将该病毒的 CP 基因克隆到载体 pGEM-3zf(+)中,这为该基因的表达及 CP 抗血清的制备提供了材料,并为进一步研究打下基础。

### 参 考 文 献

- [1] 朱水芳. 几种果树类病毒和植原体的分子生物学研究 博士论文[D]. 北京, 中国农业大学, 1997
- [2] Habili N, Fazeli C F, *et al.* Natural spread and molecular analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in Australia [J]. *Phytopathology*, 1995, 85:1418 - 1422
- [3] Ling K S, Zhu H Y, *et al.* The coat protein gene of grapevine leafroll-associated clostero virus-3; cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants [J]. *Arch. Virol*, 1997, 142:1101 - 1116
- [4] Minafra A, Hadidi A. Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification [J]. *Journal of Virological Methods*, 1994, 31, 325 - 334
- [5] Ling K S, Zhu H Y, *et al.* Nucleotide sequence of the 3'-terminal two-thirds of the grapevine leafroll-associated virus-3 genome reveals a typical monopartite clostero virus [J]. *Journal of General Virology*, 1998, 79:1299 - 1307

## Cloning of Grapevine Leafroll Associated Virus 3 Coat Protein Gene

ZHAO Dong-lan<sup>1</sup>, ZHU Shui-fang<sup>2</sup>, HUANG Wen-sheng<sup>2</sup>, ZHANG Man-liang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(Xuzhou Agricultural Research Institute, Xuzhou, Jiangsu, 221121 China)

<sup>2</sup>(Plant Quarantine Lab of Agricultural Department, Beijing, 100029 China)

<sup>3</sup>(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling Shanxi, 712100 China)

**Abstract:** A pair of primers were designed and synthesized based on the nucleotide sequence of coat protein gene of GLRaV-3 from America. The expected size of CP gene of GLRaV-3 was amplified by IC (Immuno-capture)-RT-PCR method. The CP gene of GLRaV-3 was cloned into pGEM-3zf(+) vector and sequenced. The nucleotide sequence was compared with American isolate. Result showed that their homology was 94.1%.

**Key words:** Grapevine leafroll virus; GLRaV-3; IC-RT-PCR; CP; Clone