维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷4期 中国病毒学 16(4):369-372
2001年12月 VIROLOGICA SINICA December 2001

番木瓜环斑病毒畸叶株系的CP基因克隆和序列分析*

贺国安,肖火根**,张曙光,李华平,范怀忠

(华南农业大学植物病毒研究室,广东广州 510642)

Cloning and Sequencing of Coat Protein Geng of Malformed Leaf Strain of Papaya Ringspot Virus

HE Guo-an, XIAO Huo-gen**, ZHANG Shu-guang, LI Hua-ping, FAN Huai-zhong

(*Laboratory of Plant Virology, South China Agrricultural Univerrsity, GuangZhou* 5100642, *China*)

Abstract: The coat protein(CP) gene of an isolate of papaya malformed leaf virus(PMaLV), preserved in Plant Virology Laboratory of South China Agricultural University by Luo Xuehai, was synthesized by reverse transcription and polymerase chain reaction(RT-PCR) and cloned into pGEM-T and pGEM-T Easy Vector System(T-vector). The full length of the CP gene was sequenced, and it shown that the CP gene was 861 nucleotides(nt) in length, with 3nt deletion beginning from 66nt as compared with that of Hawaii strain(HA) and Australian strain W of papaya ringspot virus(PRSV). Compared with Ys(yellow ringspot strain)、Sm(severe mosaic strain)、G(Hainan isolate)、HA and W strains of PRSV, the CP gene sequence of PMaLV shared 96%、98%、95%、89% and 89% nucleotide sequence identity respectively. The coat protein encoded by CP gene of PMaLV consisted of 287 amino acids residues, and shared 98%、97%、97%、96% and 95% amino acid identity with those of the five strains respectively. This results of sequence analysis shown conclusively that PMaLV is a strain of PRSV, not a new virus, and we termed it malformed leaf strain(ML) of Papaya ringspot virus.

Key words: Papaya malformed leaf virus; Papaya ringspot virus; Malformed leaf strain of papaya ringspot virus; Coat protein gene

摘要:采用RT-PCR方法合成了本研究室保存的番木瓜畸叶病毒(PMaLV)的外壳蛋白(CP)基因,将其CP基因克隆进Promega公司的pGEM-T and pGEM-T Easy Vector System(简称T-载体),并进行了序列分析。结果表明,PMaLV CP基因核苷酸序列全长为861nt,推导其编码287个氨基酸。与番木瓜环斑病毒(PRSV)美国夏威夷HA株系和澳大利亚W株系的CP基因相比,在第66nt处开始连续缺失3个核苷酸。与PRSV的华南Ys、Sm和G株系以及夏威夷的HA和澳大利亚的W株系相比,其CP基因序列同源率分别为96%、98%、95%、89%和89%。其推导的氨基酸序列同源率分别为98%、97%、97%、96%和95%。此结果表明,PMaLV属于PRSV的一个株系,不是一种新病毒。因此,我们称其为番木瓜环斑病毒畸叶株系(ML株系)。

关键词:番木瓜畸叶病毒;番木瓜环斑病毒;番木瓜环斑病毒畸叶株系;CP基因

中图分类号:S 432.41;S 436.67 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)04-0369-04

收稿日期:2000-10-18,修回日期:2001-04-30

* 基金项目:农业部重点项目"高新技术与基础研究"(4200-C98004);广东省重点科技攻关项目(99M01504G)

作者简介:贺国安(1974年-),男,湖南省临武籍,硕士,现为中山大学生物工程研究中心2000级博士研究生

** 通讯作者:肖火根(1963-),男,江西省吉水籍,教授,博士生导师,主要从事分子植物病毒和植物抗病毒基因工程研究。

Correspondence author. E-mail: huogen@ima.org.sg

维普资讯 http://www.cqvip.com

世界上已报道的危害番木瓜的病毒有番木瓜环斑病毒(*Papaya ringspot virus*,PRSV)等十余种病毒。在华南地区,骆学海等[1]认为,除PRSV外,还存在一种新病毒,称为番木瓜畸叶病毒(Papaya malformed leaf virus,PMaLV),他认为PMaLV在病毒颗粒长度、血清反应方面与PRSV不同,在番木瓜上引起的症状特点为畸叶症。但蔡建和等[2]却认为,华南地区危害番木瓜的病毒只有PRSV一种,PRSV的Vb(沿叶脉变灰白色)株系在番木瓜上和西葫芦上的症状与PMaLV的相同,两者间存在密切的血清学关系,并且两者的病毒粒体大小、寄主范围、介体昆虫及病毒内含体形态等方面也基本相同,因而认为PMaLV即为PRSV的Vb株系。

PRSV是马铃薯Y病毒(*Potato virus* Y,PVY)属的成员之一,PVY属病毒分类的重要依据之一是外壳蛋白(Coat protein,CP)基因序列及其编码的氨基酸序列的同源性,同种病毒不同株系的CP基因序列和CP氨基酸序列的同源率一般都在90%以上[3]。目前,国内外已报道了16个PRSV株系或分离物的CP基因核苷酸序列。其中,华南地区的Ys[4]、Sm[5]和G[6]的CP基因序列已报道,它们之间的同源性都在95%以上。因此,为了明确PMaLV是一种新病毒,还是PRSV的一个株系,就需要知道PMaLV的CP基因序列与PRSV各株系的同源率。

1 材料与方法

1.1 材料

毒源为骆学海教授纯化保存于本研究室的PMaLV(果园一号,1997年12月5日存)。JM109大肠杆菌菌株由本研究室保存。植物总RNA采用Wilkins *et al* 方法[7]获得。

1.2 cDNA的合成

P1/P2引物根据本研究室叶长明博士[4]设计,由上海生工生物工程有限公司合成。P1:5'-TTA GTT GGG CAT ACC CAG G-3';P2:5'-ATG TCC AAG GAA GCT GTG GAT-3'。RT-PCR反应参照Langeveld *et al* 方法[8],获得cDNA后,采用宝生物工程公司(TaKaRa)的PCR Fragment Recovery Kit,按照其试剂盒使用说明操作,进行cDNA产物回收和纯化。

1.3 cDNA的合成

P1/P2引物根据本研究室叶长明博士[4]设计,由上海生物工程有限公司合成,P1:5'-TTA GTT GGG CAT ACC CAG G-3';P2:5'-ATG TCC AAG AAT GAA GCT GTG GAT-3'。RT-PCR反应参照Langeveld *et al* 方法[8],获得cDNA后,采用宝生物工程公司(TaKaRa)的PCR Fragment Recovery kit,按照其试剂盒使用说明操作,进行cDNA产物回收和纯化。

1.4 cDNA的克隆和筛选

采用Promega公司的pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems(简称T-载体),按其操作说明进行连接反应。然后参考Sambrook方法[9]将连接产物转化大肠杆菌JM109菌株,挑选白色单菌落,采用菌落直接PCR法快速筛选重组转化子,筛选的重组转化子经扩大培养后,参照Sambrook的碱裂解法[9]抽提质粒DNA,以P1/P2引物进行PCR鉴定和*Eco*R I酶切分析。

1.5 cDNA的序列分析

经酶切可知,插入的目的片段大小约为860bp,采用T7和SP6引物从双链两端进行正反测序,测定3个阳性克隆。序列测定由宝生物工程(大连)公司(TaKaRa Biotech.)完成。测序仪为:ABI PRISM™ 377XL DNA Sequencer。所获得的序列资料通过下列网址进行分析:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/

2 结果

2.1 cDNA的克隆和酶切分析

由于*Taq* DNA聚合酶往往在所有的双链DNA的3'末端再加上一个非模板来源的核苷酸(通常为A),使PCR片段的平端克隆往往效率不高。因此采用Promega公司的T-载体。T-载体多克隆位点的5'末端被加上了一个T核苷酸,便于与PCR片段3'末端的A互补。多克隆位点两边各有一个*Eco*R I酶切位点,便于酶切分析。5个经PCR鉴定含有插入片段的重组质粒经EcoR I酶切,其中有4个能切出一段670bp大小和一段180bp大小的两条带,表明插入的目的片段中,距离5'端约670nt处存在一个*Eco*R I酶切位点,这与其后的序列分析相符。其中一个不能被酶切,可能是一个假阳性菌落(图1)。

2.2 cDNA的序列分析

序列分析表明,PMaLV CP基因核苷酸序列全长为864bp(含加入的ATG起始密码子),在678bp处有一个EcoR I酶切位点,与酶切鉴定结果一致。推导编码的外壳蛋白有287个氨基酸残基(图2)。PMaLV CP基因的核苷酸序列与番木瓜环斑病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

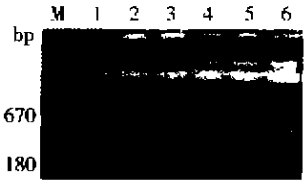

图1　重组质粒酶切鉴定

M,200bp梯度标准;1,阴性对照(T-载体);2-6,待鉴定的质粒DNA。

Fig.1　Identification of recombinant plasmid

M,200bp ladder marker;1,T-vector;2-6,DNA of recombinant plasmid.

(PRSV)华南的Ys、Sm、G株系的同源率分别为96%、98%、95%,与PRSV夏威夷HA和澳大利亚W株系株系的同源率都为89%,其推导编码的氨基酸序列与上述PRSV各株系的同源率分为98%、97%、97%、96%、95%(表1)。

表1　PMaLV、Ys、Sm、G、HA和W株系的CP基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列同源率比较(%)*

Table 1　Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequence of coat protein gene of PMaLV、Ys、Sm、G、HA and W

	PMaLV	Ys	Sm	G	HA	W
PMaLV		96	98	95	89	89
Ys	98		95	95	90	89
Sm	97	97		94	89	89
G	97	97	95		91	90
HA	96	95	95	96		96
W	95	95	95	96	98	

* 对角线上方的是核苷酸序列同源率比较,对角线下方的是推导的氨基酸序列同源率比较。

* Figures above the diagonal refer to comparisons of nucleotide sequence, figures blow the diagonal refer to comparisions of deduced amino acid sequence.

1 [redacted]*TCCAAGAATGAAGCTGTGGATGC*TGGTCTGAATGAGAAGCTTAAAGAAAAAGAAAAACAAAAAGAAGAAAAAGATAAACAAAAGAACAAAAATAATGATGGTACTAG

M S K N E A V D A G L N E K L K E K E K Q K E E K D K Q K N K N N D G T S

111 TGATGGAAACGATGTGTCAACTAGTACAAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCCGGAACTAGTGCGACTTTTACTATTCCGAGGATAAAATCATTCACTGATAA

D G N D V S T S T K T G E R D R D V N A G T S G T F T I P R I K S F T D K

221 GATGATTTTACCAAGAATTAAGGGAAAACTGTCCTTAATTTGAATCATCTTCTTCAGTATAATCCGAAACAAATTGACATCTCAAACACTCGCGCCACTCAATCTCAA

M I L P R I K G K T V L N L N H L L Q Y N P K Q I D I S N T R A T Q S Q

331 TTTGAAAAGTGGTACGAGGGAGTGAGGAATGATTACGGTCTGAGTGATAACGAAATGCAGGTAATGTTAAACGGTTTGATGGTTTGGTGTATCGAAAATGGTACATCTCC

F E K W Y E G V R N D Y G L S D N E M Q V M L N G L M V W C I E N G T S P

441 AGACATATCTGGTGTCTGGGTAATGATGGATGGGGAAACTCAAGTCGATTACCCCATCAAACCTTTGATTGAGCACGCAACTCCTTCGTTTAGGCAGATCATGGCTCACT

D I S G V W V M M D G E T Q V D Y P I K P L I E H A T P S F R Q I M A H F

551 TCAGTAACGCGGCAGAAGCATACATCGCGAAGAGGAATGCAACTGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGAATCAAGAGAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATATGCT

S N A A E A Y I A K R N A T E R Y M P R Y G I K R N L T D I S L A R Y A

661 TTCGATTTCTATGAGGTGAATTCAAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAAGCTGCAGCGCTGCGCAACACTACTCGCAGACTGTTTGGAATGGAC

F D F Y E V N S K T P D R A R E A H M Q M K A A A L R N T T R R L F G M D

771 GGCAGTGTCAGTAACAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACALAGTGAAGATGTCAACAGAGACATGCACTCTCT*CCTGGGTATGCGCAACTAA*

G S V S N K E E N T E R H T V E D V N R D M H S L L G M R N -

图2　PMaLV CP基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列图

注:斜体字母与P1/P2引物相对应的序列;▨为加入的ATG起始密码子;□为*Eco*R I酶切位点。基因序号:324950。

Fig.2　Nucleotide and deduced amino acid sequence of coat protein gene of PMaLV

Note: The italic letters are sequence corresponding to the P1/P2 primers; ▨ Added ATG code; □ Site of *Eco*R I. Bankit: 324950.

3　讨论

关于华南地区番木瓜病毒的毒源种类,骆学海等[1]认为,除PRSV外还可能存在一种番木瓜畸叶病毒(Papaya malformed leaf virus, PMaLV),蔡建和等[2]却认为,华南地区危害番木瓜的病毒只有PRSV一种,并认为PMaLV就是华南PRSV的Vb株系。另外,肖火根等人[10]的研究表明,Vb的潜育期与PMaLV相同,PMaLV与华南PRSV的Ys株系和夏威夷PRSV的HA_{5-1}株之间的血清学关系密切,至于在番木瓜上的症状,Ys和PMaLV之间的差异也不显著,在温度较低(10℃-20℃)时,Ys也能引致叶片畸形,因而他也认为PMaLV是PRSV的Vb株系。

为了从分子生物学上明确PMaLV是一种新病毒还是PRSV的一个株系,本研究克隆了PMaLV的

维普资讯 http://www.cqvip.com

外壳蛋白(CP)基因并进行了序列分析。CP基因序列分析表明,PMaLV与PRSV国内Ys、Sm和G株系的同源率都达95%以上,其中与Sm株系的同源率最高,达98%;与夏威夷HA株系和澳大利亚W株系的同源率也近达90%(表1)。其推导的氨基酸序列相互之间的同源率更高,都达95%以上(表1)。由此表明,骆学海保存的PMaLV应属于PRSV的一个株系,而不是一种新的病毒,这与前人[2,10]根据生物学和血清学得出的观点一致,因此,我们建议把PMaLV称为番木瓜环斑病毒畸叶株系(PRSV ML株系)。至于PRSV ML株系是否为Vb株系,还需对蔡建和等[2]保存的Vb毒源进行CP基因序列分析后才能作出最后的结论。

参考文献

[1] 骆学海,范怀忠.番木瓜畸叶病毒新发现的一种番木瓜病毒[J].华南农业大学学报,1988,9(3):79-80.

[2] 蔡建和,范怀忠.华南番木瓜病毒及环斑病毒株系的调查鉴定[J].华南农业大学学报,1994,15(4):13-17.

[3] Shukla DD, Ward CW. Identification and classification of potyviruses on the basis of CP sequence data and serology[J]. Arch. Virol, 1989, 108: 170-200.

[4] 叶长明,叶寅,骆学海,等.番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的构建[J].植物病理学报,1991,21(3):161-164.

[5] 刘俊君,彭学贤,莽克强.番木瓜环斑病毒学分离物(Sm)外壳蛋白基因克隆及序列分析[J].微生物学报,1991,18(6):350-351.

[6] 龚洁敏,郑学勤,潘乃,等.番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的cDNA克融合全序列测定比较[J].植物学报1993,35:416-421.

[7] Wilkins TA, Smart LB. Isolation of RNA from plant tissue[A]. Paul A Krieg. A laborototy guide to RNA; Isolation, analysis, and synthesis [C]. New York: Wiley-Liss Inc., 1994, 21-41.

[8] Langeveld SA, Dore Jm, Memelink J, *et al*. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers[J]. J Gen Virology, 1991, 72: 1531-41.

[9] Sambrook, J., Fritsch, EF, Maniatis, T. *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[10] 肖火根,范怀忠.番木瓜斑病毒的生物学和血清学研究[J].华南农业大学学报,1994,15(3):50-54.