

马铃薯 Y 病毒 *p1* 基因的克隆与序列分析

吴兴泉, 陈士华, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉**

(福建农林大学植物病毒研究所, 福建福州, 350002)

The Cloning And Sequence Analysis of The *p1* Gene of *Potato virus Y*

WU Xing-quan, CHEN Shi-hua, WU Zu-jian, LIN Qi-ying, XIE Lian-hui

(Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350008, China)

Abstract: With the specific primers YP1 and YP2 which were designed based on the reported *Potato virus Y* (PVY) *p1* gene sequence, the target gene (0.83kb) was amplified by RT-PCR using the total RNA extracted from PVY infected tobacco plant as templates. The gene was cloned into plasmid and transformed then *E. coli*. DH5 α sequenced. The result of sequence analysis shows it is the PVY *p1* gene. The comparison shows that there are significant differences on the P1 amino acid sequence among the known PVY isolates, the identity ranges from 64% to 94%. Based on P1 amino acid sequence, the PVY phylogenetic tree was established and the isolates of PVY were clustered into many branches.

Key words: *Potato virus Y*; *p1* gene; Sequence analysis

摘要: 利用依据马铃薯 Y 病毒 (PVY) *p1* 基因序列设计合成的一对引物 YP1, YP2, 以带毒烟草总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 方法扩增得到了 0.83kb 的目的条带, 测序结果表明为 PVY *p1* 基因。通过对 PVY P1 蛋白氨基酸序列分析发现 PVY 不同分离物间 P1 蛋白氨基酸序列存在明显差异, 氨基酸序列同源性在 64%~94% 间。依据 P1 蛋白氨基酸序列建立了 PVY 系统关系树并对 PVY 进行了类型分析。

关键词: 马铃薯 Y 病毒; *p1* 基因; 序列分析

中图分类号: S432

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 04-0376-05

马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY) 是马铃薯上最重要的病毒之一, 分布于世界各马铃薯种植区, 可导致马铃薯退化, 降低马铃薯产量, 严重时减产可达 80% 以上^[1]。在我国, 病毒病的为害直接导致我国中部和南部地区马铃薯不能自行留种, 必须从黑龙江省、内蒙古自治区等发病轻的地区调种, 给生产造成了巨大损失^[2]。

可侵染马铃薯的病毒种类很多^[1]。病毒病在马铃薯上所引起的症状表现因病毒种类、株系及寄主品种不同而发生改变。同种病毒可因条件不同产生不同症状, 不同病毒间有时又会产生相似的症状, 致使在生产实践中, 单纯依据症状表现很难对病毒病进行准确的诊断, 必须借助于必要的检测手段。分子生物学技术的发展, 为马铃薯病毒的快速、准

确的分子检测提供了有用的工具。

PVY *p1* 基因位于 PVY 基因组 5'-末端, 不同 PVY 分离物间 *p1* 基因序列及氨基酸序列存在较大的差异性。Aleman *et al.* (1997) 研究发现 PVY *p1* 基因核酸序列同源性最低为 70%, 氨基酸序列同源性最低为 77%, 是 PVY 基因组中的主要变异区^[3]。因此通过对 PVY *p1* 基因序列分析可对 PVY 各分离物进行准确的分子鉴定^[4]。我国对 PVY 的研究报道已很多^[5-8], 但目前尚未见有关 *p1* 基因方面的报道, 因此进行了此项研究。

1 材料与方法

1.1 毒源的获得及扩繁

本试验所用马铃薯 Y 病毒由沈阳农业大学吴

收稿日期: 2002-12-25, 修回日期: 2003-02-19

* 基金项目: 福建省农业厅和国家教育部资助项目 (00183)。

作者简介: 吴兴泉 (1970-), 男, 博士, 现工作单位: 郑州工程学院, 邮编: 450052。wuxingquan2002@hotmail.com

** 通讯作者: Correspondence author.

元华教授惠赠。保存繁殖于普通烟 (*Nicotiana tabacum*)。

1.2 RT-PCR 扩增目的基因

1.2.1 引物设计与合成: 依据 PVY *p1* 基因序列 (824bp) 设计合成了一对引物: 5' 端引物 YP1: 5'-ggatccatggcaacttacatgtcaac -3'; 3' 端引物 YP2: 5'-gaattcactctgagtaa ctctagaacg-3' (划线处分别为 *Bam*H I 和 *Eco*R I 的酶切位点)。用于扩增 *p1* 基因 (824bp)。引物在上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 反转录: 采用 RNA 提取试剂盒 (上海生工生物工程有限公司) 提取带毒烟草叶片总 RNA, 同时提取健康烟草叶片总 RNA 作为对照。在一 1.5mL Eppendorf 管中加入 RNA 提取液 2.5 μ L、引物 YP2 0.5 μ L, 瞬离, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 冰上 5 min; 然后加入反转录酶 0.5 μ L、RNA 酶抑制剂 0.5 μ L、dNTP 0.5 μ L、5 \times 反转录酶 buffer 2.5 μ L, 加 ddH₂O 至 12.5 μ L, 瞬离, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h, 95 $^{\circ}$ C, 5 min 终止反应。

1.2.3 PCR 扩增: 在一 PCR 管中分别加入反转录产物、引物及 PCR 所需试剂进行 PCR 扩增。PCR 反应程序设置: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 48 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 反应 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) 回收。

1.3 PCR 产物的克隆

PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳回收后, 与 pGEM-T 连接 (连接方法参照 Promega 的产品使用说明), 转化通过 CaCl₂ 法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取在加有 IPTG 和 X-Gal 的 LB 平板上生长的白色菌落, 碱法小量提取质粒。载体 pGEM-T 的克隆位点两端均有 *Eco*R I 的酶切位点, 因此以 *Eco*R I 酶切质粒, 取适量酶切产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 分析插入片段的大小。

1.4 序列测定与分析

DNA 序列测定由上海基康生物技术有限公司在 ABI PRISM 377 型 DNA 自动测序仪上进行。采用 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站中 BLAST 进行 DNA 序列分析, 采用 www.ebi.ac.uk 网站中 ClustalW 工具建立 PVY 系统关系树。

2 结果与分析

2.1 PVY *p1* 基因的 RT-PCR 扩增及克隆

利用 PVY 特异性引物 YP1、YP2 进行 PVY *p1* 基因扩增, 得到一条长 0.83kb 的目的片段。扩增产物经纯化后连接到 pGEM-T 载体上。转化后经蓝

白斑筛选、PCR 及酶切鉴定, 证明得到了含有插入片段的重组子 pTYP1 (图 1)。

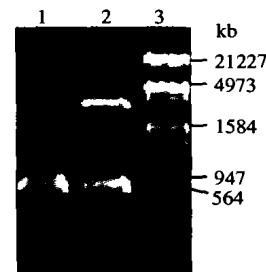


图 1 重组质粒 pTYP1 *Eco*R I 酶切鉴定

泳道 1, PVY P1 基因 PCR 产物; 2, *Eco*R I 酶切后的质粒 pTYP1; 3, λ DNA/*Eco*R I+*Hind*III 核酸标准分子量。

Fig.1 pTYP1 cleaved by *Eco*R I

Lane 1, PCR Product of PVY P1 gene; 2, pTYP1 cleaved by *Eco*R I; 3, λ DNA/*Eco*R I +*Hind*III marker.

2.2 PVY *p1* 基因序列测定及同源性比较

2.2.1 PVY *p1* 基因的序列测定及分析: 对重组克隆进行了序列测定, 结果表明克隆基因片段长 824bp, 编码 274 氨基酸 (GenBank 序列号为 AY095170), 比较分析表明该序列与已知 PVY 分离物 *p1* 基因序列的同源性 94%, 证明扩增得到的基因片段为 PVY *p1* 基因 (表 1)。

2.2.2 PVY 不同分离物 P1 氨基酸序列差异性分析: 对已知的 33 个 PVY 分离物 P1 氨基酸序列进行比较结果表明 PVY 不同分离物间 P1 氨基酸序列存在明显的差异, 同源性在 64%~94% 之间。依据 P1 氨基酸序列建立了 PVY 病毒不同分离物的系统关系树 (图 2)。由图可见依据 PVY P1 氨基酸序列可将 PVY 不同分离物大致分为三种类型: 其中我国 PVY 福建分离物 (Fujian) 与 AJ245556、AJ245554、AJ245555、AJ245558 等 16 个分离物的同源性均在 92% 以上, 而与其他分离物 P1 氨基酸序列同源性均小于 90%, 可明显地划分为一个类型; M38377、AF463399 等 9 个分离物可划分为另一类型; 其余的 7 个分离物组成第三个类型。

3 讨论

可侵染马铃薯的病毒种类繁多, 症状复杂, 这给马铃薯病毒的诊断识别带来极大的困难。目前传统生物学方法在病毒鉴定中仍然使用, 其中观察鉴别寄主在接种后的症状反应是鉴别病毒种类是的主要标准, 另外病毒传播途径、介体昆虫的种类、与已知病毒的交叉保护作用、病毒寄主范围, 体外

保毒期、稀释限点、钝化温度、细胞质内含体形态等生物学指标也可作为病毒鉴定标准^[9-12]。这些方法耗时长,且鉴定有效性较差。血清学方法作为区分相关病毒的主要标准仍是目前最常采用的方法。此方法快速准确,且操作简单,在不需特殊仪器的情况下既可完成,因此更具实用性。

目前普遍认为通过对病毒的基因组结构和序列分析可以真实地阐明植物病毒种的分类^[13]。经过科研人员的多年研究,很多病毒的不同分离物基因序列已经测定,通过对序列的分析比较得出了一些重要的分子生物学分类标准。采用分子生物学手段

鉴定植物病毒的分析方法主要是建立和分析病毒的系统关系树,通过病毒系统关系树可清晰地展示不同种属病毒的进化关系。

本文对 PVY *p1* 基因进行了克隆和序列分析,分析结果表明该基因核苷酸序列及推导的蛋白氨基酸序列在不同分离物间存在非常大的差异。依据蛋白氨基酸序列建立了该病毒不同分离物的系统关系树。研究结果表明依据系统关系树可对病毒不同分离物进行准确的类型划分,为病毒的分子鉴定提供了重要依据。

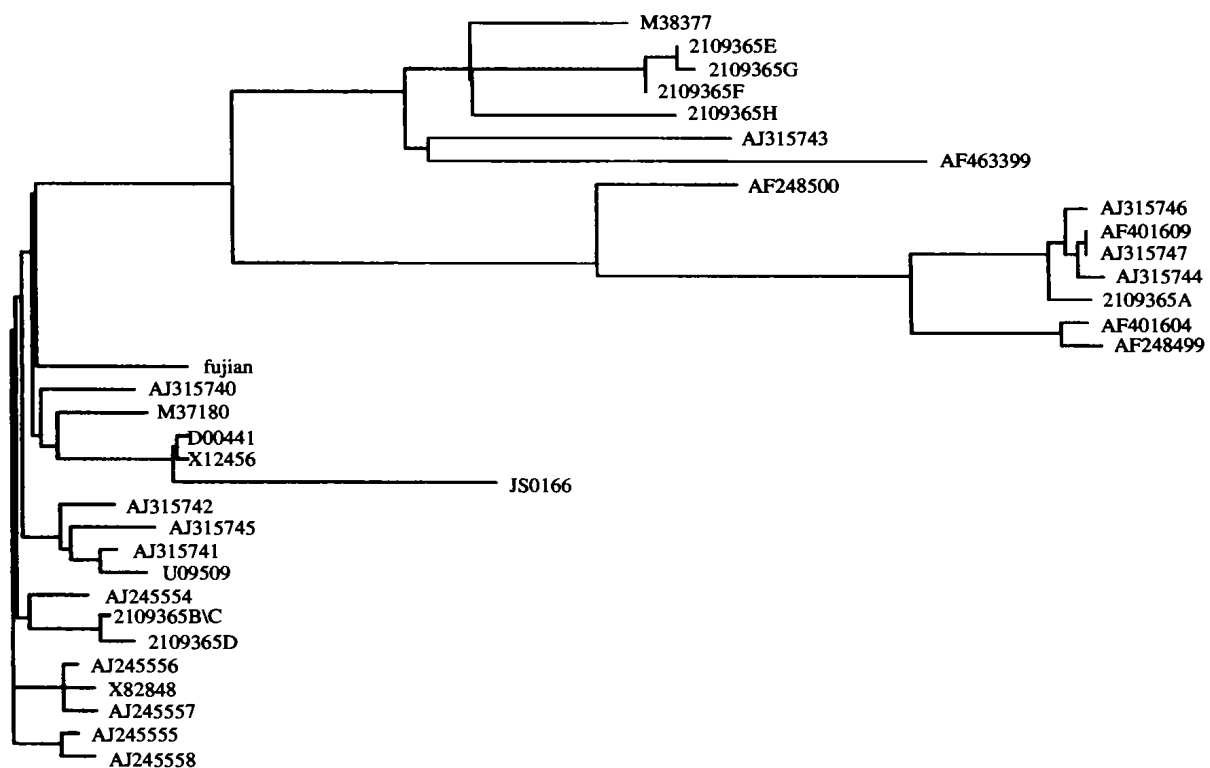


图 2 依据 P1 氨基酸序列建立的 PVY 系统关系树

Fig.2 The phylogenetic tree based on the alignment of P1 amino acid sequence of PVY

Note: The resource of PVY isolates refer to following table.

No.	Strain	Country	No.	Strain	Country	No.	Strain	Country
M38377	C		2109365E	P2	France	2109365G	P21	France
2109365F	Tu	France	2109365H	SON41	France	AJ315743	C	UK
AF463399	N		AF248500	N	France	AJ315746	N	Russia
AF401609	NTN	North America	AJ315747	N	UK	AJ315744	NTN	USA
2109365A	N	France	AF401604	NTN	Slovenia	AF248499	NTN	France
AY095170	O	China	AJ315740	O	UK	M37180	O	USA
D00441	N	France	X12456	N	France	JS0166	N	France
AJ315742	O	USA	AJ315745	O	Canada	AJ315741	O	Canada
U09509	O	Canada	SJ245554	O	Finland	2109365B/C	LW	France
2109365D	NN	France	AJ245556	O	Finland	X82848	O	Finland
AJ245557	N	Russia	AJ245555	O	Finland	AJ245558	N	UK

表 1 PVY 不同分离物 P1 蛋白氨基酸序列同源性比较
Table 1 The comparison of the P1 amino acid identity of 33 PVY isolates

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1	96	96	96	98	98	95	96	94	95	95	94	94	96	94	95	84	83	82	84	86	83	82	82	77	71	72	71	71	71	71	71	94
2		96	96	96	96	95	96	94	95	95	94	94	96	94	96	82	81	81	82	86	82	80	81	76	71	72	71	71	71	70	71	94
3			98	96	96	95	96	94	96	95	94	94	96	94	95	83	82	82	83	86	82	80	82	76	71	71	71	71	71	71	71	94
4				96	96	94	95	94	95	95	93	93	95	94	94	82	81	81	82	86	81	80	81	75	71	70	70	71	71	71	71	94
5					98	94	95	94	94	95	93	93	95	94	94	83	82	82	83	86	82	81	81	76	71	71	71	71	71	70	71	93
6						94	95	94	94	95	93	93	95	94	94	83	82	81	82	86	82	81	81	76	70	71	70	70	70	70	70	93
7							95	94	94	94	94	94	95	94	94	83	82	82	83	87	82	80	82	75	71	71	72	71	71	70	71	93
8								96	94	97	93	93	95	96	94	83	82	81	82	85	81	82	81	76	71	71	71	70	71	70	71	93
9									94	96	93	94	93	96	93	83	82	81	82	85	81	81	79	77	70	71	70	70	70	70	70	92
10										96	94	94	94	94	93	81	80	80	81	87	81	80	80	74	71	71	70	71	71	70	71	93
11											94	94	95	98	94	83	81	81	82	87	81	81	79	75	70	70	70	70	70	70	70	93
12												100	94	93	82	81	81	82	92	80	79	81	81	74	70	70	70	70	70	70	92	
13													94	94	93	82	81	82	92	80	79	81	74	70	70	70	70	70	70	70	92	
14														94	99	82	81	81	82	86	80	80	82	75	71	72	72	71	71	70	71	94
15															93	82	81	81	82	87	81	80	79	75	70	70	70	69	70	69	70	92
16																82	80	80	81	85	80	79	81	74	70	71	71	70	70	70	70	93
17																	91	90	92	76	91	87	75	82	70	70	69	70	70	69	70	83
18																		99	99	76	90	84	74	81	70	68	68	70	70	69	70	82
19																			98	75	89	84	73	80	69	67	67	69	69	69	69	81
20																				77	91	85	74	82	71	68	68	71	71	70	71	82
21																					77	73	75	68	65	64	64	65	65	65	65	85
22																						83	75	81	71	71	70	71	71	71	71	81
23																							72	81	72	71	70	72	72	72	72	79
24																								69	82	86	87	82	82	82	82	79
25																									68	68	67	69	68	68	68	75
26																										92	91	98	98	98	98	70
27																											98	91	92	92	92	69
28																												90	91	91	91	70
29																													98	97	98	70
30																														99	100	70
31																															99	70
32																																70

Note: 1, AJ245556; 2, AJ245554; 3, AJ245555; 4, AJ245558; 5, X82848; 6, AJ245557; 7, AJ315740; 8, AJ315742; 9, AJ315745; 10, M37180; 11, AJ315741; 12, D00441; 13, X12456; 14, 2109365B/C; 15, U09509; 16, 2109365D; 17, M38377; 18, 2109365E; 19, 2109365G; 20, 2109365F; 21, JS0166-N; 22, 2109365H; 23, AJ315743; 24, AF248500; 25, AF463399; 26, AJ315746; 27, AF401604; 28, AF248499; 29, 2109365A; 30, AF401609; 31, AJ315744; 32, AJ315747; 33, Fujian

参考文献

[1] Hooker W J. 马铃薯病害及其防治[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1992, 129-131.
 [2] 周艳玲, 刘学敏, 孟玉芹. 马铃薯 Y 病毒的检测技术[J]. 中国病毒学, 2000, 14 (2): 89-94.
 [3] Aleman-Verdaguer M E, Goudou-Urbino C, Dubern J, et al. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the

- intraspecies molecular diversity of potyviruses[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78: 1253-1264.
- [4] Tordo V M, Chachulska A M, Fakhfakh H, *et al*. Sequence polymorphism in the 5' RTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA[J]. *J Gen Virol*, 1995, 76 (4): 939-949.
- [5] 王振东, 张敏, 上田一郎. 马铃薯 Y 病毒普通株系外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达[J]. *中国病毒学*, 1999, 4(2): 157-162.
- [6] 张鹤龄, 郭素华, 庞瑞杰. 马铃薯 Y 病毒的研究[J]. *内蒙古大学学报*, 1983, 14 (2): 231-238.
- [7] 李浩戈, 吴元华, 赵绣香. 马铃薯 Y 病毒的 RT-PCR 检测[J]. *沈阳农业大学学报*, 1999, 30(3): 244-246.
- [8] 姚康生, 蔡少华, 贾士荣. 分泌马铃薯 Y 病毒 (PVY) 株系特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立[J]. *中国农业科学*, 1985, 4: 67-72.
- [9] 王劲波, 王凤龙, 钱玉梅, 等. 山东省烟草病毒病原鉴定[J]. *中国烟草科学*, 1998, 1: 26-29.
- [10] Edwardson J R, Inclusion bodies[A]. In: *Potyvirus Taxonomy*[C] (Brunt O W, eds). New York: Springer -Verlag, 1992, 25-30.
- [11] Brunt A A, General properties of potyviruses[A]. In: *Potyvirus Taxonomy*[C] (Monette P, L, Ed). *Research Signpost, Trivandrum*: 1993, 19-28.
- [12] Shukla DD, Ward CW, Brunt AA, "The *Potyviridae*." Wallingford, UK: CBA International, 1994.
- [13] Ward C W, Weiller G, Shukla D D, *et al*. Molecular systematics of the Potyviridae, the largest plant virus family[A]. In: *Molecular Basis of Virus Evolution*[C](Gibbs A J, Calisher C, Garcia-Arenal F, eds). Cambridge University Press, 1995, 477-5.

（上接第 375 页）

5. 收费规定

5.1 在向本刊投寄稿件时, 请向编辑部支付审理费, 每篇 60 元 (英文稿审理费 80 元)。

5.2 稿件一经排版录用, 即向第一作者收取版面发表费。如需提前发表将加倍收取版面费。彩色图版另加制版费和印刷成本费。

5.3 审理费和版面费可通过单位财务部门信汇或邮局汇款。通过邮局汇款时请在汇款单附言栏内注明稿件审理费或版面费, 邮局汇款收款人为《中国病毒学》编辑部。单位财务部门信汇时请一定注明“支付单位名称及“版面费”, 以免延误。信汇户名: 中国科学院武汉病毒研究所; 开户行: 中国建设银行武汉市小洪山分理处, 帐号: 854938010261014460。编辑部可以开具报销收据。

5.4 文章一经刊载, 酌致稿酬, 稿酬中包括光盘版和网站的稿酬在内。本刊将赠送作者样刊一本, 抽印本 10 份。如需额外样刊, 请作者在版面费中增寄所需样刊的费用, 或从稿酬中扣除。