

香蕉束顶病毒 NS 株 DNA 组分 5 的克隆和序列分析*

郑耘, 阮小蕾, 李华平**, 肖火根, 范怀忠

(华南农业大学植物病毒研究室, 广州 510642)

Cloning and Sequence Analysis of Component 5 of Banana Bunchy Top Virus NS Strain

ZHENG Yun, RUAN Xiao-lei, LI Hua-ping**, XIAO Huo-gen, FAN Huai-zhong

(Laboratory of Plant Virology; Southern China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The DNA component 5 (DNA-5) of *Banana bunchy top virus* NS strain was cloned and sequenced. It was 1014nts in full length and could code for 146 amino acids. The nucleotide and amino acid sequences of the DNA-5 were compared with those of isolates from Australia, Hawaii, Egypt, and identities of nucleotide and amino acid sequence among these isolates were between 88% ~ 89% and 80% ~ 88% respectively. The secondary structure near the "LXCDE" motif was much different between NS strain and others. It was deduced that efficiency of binding Rb protein would be influenced by this kind of difference.

Key words: *Banana bunchy top virus*; DNA-5 component; Sequence analysis

摘要: 本文利用 PCR 技术扩增得到香蕉束顶病毒(BBTV) NS 株 DNA 组分 5 的全基因, 该基因全长为 1014nt, 具有一个开放阅读框, 编码 146 个氨基酸, 蛋白质二级结构包括 6 个 α -螺旋, 7 个 β -折叠。NS 株系与南太平洋组澳大利亚、夏威夷、埃及分离物 DNA 组分 5 核苷酸和编码的氨基酸序列相比较, 核苷酸序列同源率介于 88% ~ 89% 之间, 氨基酸序列同源率介于 80% ~ 88% 之间。NS 株系与其它分离物在编码成视网膜细胞瘤蛋白(Retinoblastoma protein, Rb)的基元序列“LXCDE”附近的二级结构上表现明显的差异, 推测这种差异可能影响与植物中 Rb 蛋白的结合效率。

关键词: 香蕉束顶病毒; DNA 组分 5; 序列分析

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)03-0311-04

香蕉束顶病是由香蕉束顶病毒(*Banana bunchy top virus*, BBTV)所引致的生产上重要的病害之一。该病毒属于矮缩病毒科(*Nanoviridae*)矮缩病毒属(*Nanovirus*), 核苷酸类型为 DNA, 基因组至少包含 6 个大小约 1 ~ 1.1 kb 单链环状 DNA 组分^[1]。根据已经发表的香蕉束顶病毒组分 1 的核苷酸序列, 在世界范围内将 BBTV 分为两个组(即南太平洋组和亚洲组), 亚洲组中又包括许多分离物和株系, 而其中在我国广东高州和广州分布的 NS 株系和 NSP 株系均属于亚洲组^[2-4]。

目前, 在国外只有澳大利亚已经完成了 BBTV 南太平洋组澳大利亚分离物全部 6 个组分的克隆和序列分析工作^[1,2], 并已查清了香蕉束顶病毒 5 个组分的功能。组分 5 编码复制酶, 组分 6 编码衣壳蛋白, 组分 1 编码运动蛋白, 组分 2 编码的产物含有类似于成视网膜细胞瘤蛋白(Retinoblastoma protein, Rb)结合活性功能的基序“LXCDE”, 推测这一结合活性使 BBTV 在寄主细胞的复制和循环过程中发挥重要作用^[2,3,5,6]。组分 3 编码产物具有细胞核穿梭蛋白的功能, 而只有组分 4 编码的蛋白质的

收稿日期: 2004-11-08, 修回日期: 2005-01-04

* 基金项目: 广东省科技攻关项目(C20209); 国家自然科学基金(39870434)

作者简介: 郑耘(1969-), 男, 新疆乌鲁木齐人, 博士, 主要从事植物病毒检验和检疫, 现在深圳出入境检验检疫局工作。Tel: 0755-25588644, E-mail: zyatgz@163.com

** 通讯作者: 李华平(1961-), 男, 教授, 主要从事植物病理学研究。

Corresponding author. Tel: 020-85281107, Email: huaping@scau.edu.cn

功能尚不清楚^[2]。在国内华南农业大学植物病毒研究室也已经完成了BBTV广东NS株系基因组中5个组分(组分 、 、 、 、)的克隆和测序工作^[4,7-10],现在只有组分 还未克隆和测序。

本研究根据澳大利亚已经发表的BBTV DNA组分5基因序列设计引物,经PCR扩增后克隆得到BBTV广东NS株系DNA组分 的全基因序列,应用分子生物学分析软件查找组分 基因序列上的调控元件,并与国外已发表澳大利亚、夏威夷、埃及分离物和的组分 核苷酸序列进行了比较。

1 材料和方法

BBTV NS株系病株采自广东省高州市曹江镇。选择具有束顶、叶片黄化、叶中脉及支脉上有大量“青筋”等典型香蕉束顶病症状的香蕉苗。

采用CTAB法提取样品总DNA^[4]。

PCR:根据澳大利亚分离物BBTV组分5的序列^[2]设计一对相邻反向引物,扩增BBTV NS株系DNA组分 的全序列。上游引物为:P53 5'-GGTCCATGTCCTCGA GTTA-3';下游引物为:P54 5'-CTACGTTGCCA GCTCA TA-3'。PCR反应体系为:病株总核苷酸0.02μg,10×Taq Buffer 2.5μL,dNTPs(10mmol/L)2.5μL,P₅₃、P₅₄(0.5μmol/L)各1μL,rTaq酶(5U/μL)0.1μL,补充灭菌ddH₂O至25μL。PCR反应条件为:94℃预变性4min;94℃变性1min,55℃退火1min,72℃延伸2min,30个循环;72℃最终延伸10min。反应结束后,0.8%的凝胶电泳检测PCR产物片段的大小及浓度。

PCR片段克隆、重组子鉴定及序列分析:采用PCR产物凝胶回收试剂盒(TaKaRa公司)回收PCR产物中的目的片段,用pMD18-T载体(TaKaRa公司)按生产商推荐的方法进行克隆。在含Ampicillin(Amp)/X-gal/IPTG(均购于华美生物工程公司)的LB平板上随机挑取4个白色菌落进行菌落直接PCR鉴定,以蓝色菌落作阴性对照。碱裂解法小量抽提阳性克隆的质粒,用EcoRI、Hind III(TaKaRa公司)进行双酶切鉴定。取PCR和酶切鉴定均为阳性的克隆,送交上海生物工程公司进行序列分析。为了证实序列可靠性,在第一次测序的基础上,在BBTV组分 序列的中间位置设计一对中间引物,采用Pfu聚合酶(Stratagene公司)对植物总DNA进行了第二次PCR扩增,其扩增产物经纯化后直接进行序列测定。

组分 序列分析:在http://www.ncbi.nlm.

nih.gov网址,完成组分 基因的序列分析和ORF(开放阅读框)查找。

在http://www.ebi.ac.uk/clustalw网址,完成已发表的BBTV组分 基因序列和ORF中的氨基酸序列比较分析。

在http://www.embl-heidelberg.de/predict-protein/predictprotein.html网址,完成组分 基因编码蛋白二级结构的分析。

使用DNASTAR-Protean软件完成蛋白质理化特性的分析。

2 结果与分析

2.1 NS株系组分 的克隆与序列分析

2.1.1 NS株系组分 的PCR扩增:以香蕉束顶病病株总DNA为模板,用一对相邻反向引物P₅₃、P₅₄经PCR反应扩增BBTV NS株系DNA组分 的全基因序列,获得预期约1kb大小的DNA片段,而用健康的香蕉总DNA为模板未扩增出相应的特异带(结果未显示)。

2.1.2 重组质粒的鉴定:在含Amp/X-gal/IPTG LB的平板上筛选出蓝白菌落,随机取9个白色菌落和1个蓝色菌落进行PCR鉴定,结果显示9个白色菌落中有7个能扩增出一条约1kb的DNA带,另外两白色菌落不能扩增出此带,而蓝色菌落也扩增不出此带(结果未显示)。选择其中1个PCR反应为阳性的白色菌落抽提质粒,用EcoRI、Hind III进行双酶切鉴定。该白色菌落能够被酶切产生约1kb大小的片段(图1),表明这个白色菌落为含有目的片段的重组子。

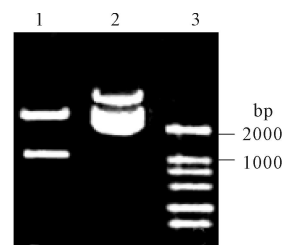


图1 BBTV NS株系重组质粒酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid of BBTV NS

1, Digestion of recombinant plasmid with EcoRI and Hind III; 2, Undigested recombinant plasmid. 3, DL2000 DNA Marker.

2.1.3 NS株系组分 的测序:采用相邻反向引物及中间引物分别利用Taq和Pfu酶扩增后测序的结果完全一致。测序结果表明:NS株系组分 核苷酸序列全长为1014nt。该序列在第845~891nt之间为启动子序列,在第219~227nt之间为TA-

TA 框序列,在第 270~272nt 之间为起始密码子序列,第 31~61nt 之间为保守的茎环结构区,在第 923~938nt 之间为富含 GC 的保守共同区;在第 774~780nt 之间为 PolyA 尾序列。该序列已在 GenBank 上登录,接受号为:A Y266417。

2.2 BBTV NS 株系组分 5 序列和国外已发表组分 5 序列的比较

BBTV NS 株系的组分 5 与南太平洋组澳大利亚、夏威夷、埃及分离物的组分 5 序列相比,核苷酸序列同源率介于 88%~89% 之间,氨基酸序列同源率介于 80%~88% (表 1)。而南太平洋组内各分离物组分 5 序列(澳大利亚、夏威夷、埃及分离物)之间核苷酸序列同源率为 98%~99%,氨基酸序列同源率介于 97%~98%。在非编码区,NS 株系与澳大利亚分离物的核苷酸序列的核苷酸序列相比,NS 株系在第 259nt 处有 1 个核苷酸“ A ”和在 919~923nt 之间有 5 个核苷酸“ ACCCC ”发生缺失。

表 1 BBTV 4 个分离物组分 5 核苷酸序列和氨基酸序列同源率比较

Table 1 Comparison of nucleotide and amino acid sequence identities of component 5 of BBTV between each of the two isolates among 4 isolates

Isolate	Hawaii	Australia	Egypt	NS
Hawaii		99 %	98 %	89 %
Australia	98 %		98 %	89 %
Egypt	97 %	98 %		88 %
NS	80 %	80 %	88 %	

Note: Sequences of other isolates (Hawaii, Australia and Egypt) from GenBank. Comparison above the diagonal refer to the full nucleotide sequence. Comparison below the diagonal refer to the amino acid sequence.

核苷酸序列分析还表明: NS 株系、南太平洋组分离物(澳大利亚、夏威夷、埃及)的起始密码子均位于第 270nt 处,但终止密码子有差异: NS 株系的终止密码子在第 707nt 处,澳大利亚和夏威夷分离物的终止密码子均在第 736~738nt,而埃及分离物的终止密码子却在第 659nt 处。这样导致氨基酸序列长度也明显不同。从 BBTV 6 个组分核苷酸和氨基酸序列比较来看^[4,5,7-10],组分 5 是 BBTV 6 个组分中差异最大的一个组分。

尽管组分 5 在不同分离物和株系中其氨基酸序列和长度存在较大差异,但分析发现,在全部组分开放阅读框内均存在一个保守基序“LXCDE”。体内、体外实验已证实该基序具有与 Rb 蛋白结合的功能^[6]。Rb 蛋白是植物体内一种重要的生长调控因子,负责调控植物体内 DNA 的合成^[11]。而组分 5 基因编码的蛋白产物中的基序“LXCDE”与植物

体内 Rb 蛋白结合,直接影响寄主体内与 DNA 复制有关的蛋白的积累,继而改变寄主细胞内环境,向有利于病毒复制的方向发展,使病毒 DNA 得到有效复制^[12,13]。已有两方面的证据确认了“LXCDE”基序在病毒复制中的作用:(1)在“LXCDE”基序中发生点突变的蚕豆矮化病毒在细胞中的复制数量明显减少^[12,13];(2)Rb 蛋白在细胞中的过量表达也同样影响小麦矮缩病毒的复制^[14]。

2.3 BBTV NS 株系和国外分离物已发表组分 5 基因编码蛋白的比较

除 NS 株系外,国外已克隆 BBTV 分离物组分 5 的基因所编码的蛋白质的理化性质和二级结构见表 2。通过比较发现 NS 株系和澳大利亚分离物、夏威夷分离物、埃及分离物组分 5 基因编码的蛋白在理化性质方面差别不大,最主要的差别是二级结构(-螺旋、-折叠)在数量和位置上的差别。其中应该引起注意的是,在活性功能基序“LXCDE”的位置附近不同分离物二级结构的排列顺序不同。NS 株系组分 5 基因编码的蛋白有 1 个 - 折叠,1 个 - 螺旋;而澳大利亚分离物、夏威夷分离物有 3 个 - 折叠串连在一起,埃及分离物有 2 个 - 折叠连在一起。这种空间位置结构可能会影响该功能基序和 Rb 蛋白的结合效率,从而影响病毒在寄主体内的复制。

表 2 不同 BBTV 分离物组分 5 编码蛋白的比较

Table 2 Comparison of predicted protein encoded by BBTV DNA-

Isolate	Number of Amino acids	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point	Number of - helices	Number of - helices	Number of electric charge (pH=7)
Australia	161	18.97	4.57	4	8	-9.08
Hawaii	161	18.94	4.57	4	8	-8.25
Egypt	129	15.22	4.68	4	6	-7.06
NS	146	17.32	4.73	6	7	-8.91

NS 株系和南太平洋组分离物的在生物学上的主要差异,主要表现在寄主范围和症状差异上^[3,15]。是否不同株系和分离物间组分 5 的氨基酸序列和空间的变化导致这些差异有待今后进一步研究证实。

参考文献

- [1] Burns T M, Harding R M, Dale J L, *et al.* Evidence that banana bunchy top virus has a multiple component genome[J]. Archives of Virology, 1994, 137(3/4): 371-380.
- [2] Burns T M, Harding R M, Dale J L, *et al.* The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components[J]. J Gen Virol, 1995, 76: 1471-1482.

- [3] Karan M, Harding R, Dale J, *et al.* Evidence for two groups of banana bunchy top virus isolates[J]. *J Gen Virol*, 1994, 75: 3541-3546.
- [4] 何自福,李华平,肖火根,等. BBTV 两个株系组分 I 的克隆和序列分析[J]. *植物病理学报*, 2000, 30(4):364-369.
- [5] Raktam W, Gregory J. Functional analysis proteins encoded by banana bunchy top virus DNA -4 to -6[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81:299-306.
- [6] Marie N, Aronson A, Meyer D, *et al.* A Nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1 [J]. *J Virol*, 2000, 74: 2967-2972.
- [7] 何自福,肖火根,李华平,等. BBTV 两个株系组分 3 的克隆和序列分析[J]. *农业生物技术学报*, 2000, 9:145-148.
- [8] 何自福,李华平,肖火根,等. 香蕉束顶病毒中国分离株 DNA-6 的基因克隆和序列分析[J]. *病毒学报*, 2000, 16:185-188.
- [9] 徐春香,肖火根,李华平,等. 香蕉束顶病毒 DNA 组分 2 的克隆与序列分析[J]. *植物病理学报*, 2002, 32:189-190.
- [10] 徐春香,李华平,肖火根,等. 香蕉束顶病毒 DNA 组分 4 的克隆及序列分析[J]. *病毒学报*, 2001, 17:288.
- [11] Xie Q, Sanz-Burgos A, Hannon GJ. Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins[J]. *EMBO J*, 1996, 15:4900-4908.
- [12] Frederick A, Dick E S, Nicholas J, *et al.* Mutagenesis of the pRB pocket reveals that cell cycle arrest functions are separable from binding to viral oncoproteins [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:3715-3727.
- [13] Li L, Saunders K, Thomas C. Bean yellow dwarf virus RepA, but not Rep, binds to maize retinoblastoma protein, and double-stranded DNA in vitro [J]. *J Gen Virol.*, 1999, 80: 1265-1270.
- [14] Xie Q, Suarez-lopez P. Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication [J]. *EMBO J*, 1995, 14:4073-4082.
- [15] 何自福,李华平,肖火根. 香蕉束顶病毒株系生物学特性的研究[J]. *植物病理学报*, 2001, 31:50-55, 62.