

芜菁花叶病毒温州分离物 *HC-Pro* 基因序列分析*

施曼玲¹ 李桂新² 陶小荣²

(杭州师范学院生命科学学院 杭州 310012)¹ (浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)²

摘要: 从浙江温州盘菜上获得芜菁花叶病毒温州分离物 (TuMV-WZ), 病毒提纯后, 经电镜观察, 可发现大量长约 700nm 的线形粒子。利用免疫捕捉 RT-PCR, 通过特异性引物对 TuMV-WZ 的 *HC-Pro* 基因进行 PCR 扩增, 经电泳可见 1.5kb 的特异条带。PCR 扩增产物经过纯化后进行序列测定, 序列长度为 1449 个核苷酸, 编码 482 个氨基酸。其核苷酸序列与已报道的 TuMV 的其他分离物 (Canada, UK1 和 Japanese) 同源率分别为 83.9%、96.5% 和 94.0%, 氨基酸同源率分别为 97.3%、98.8% 和 99.0%。

关键词: 芜菁花叶病毒, *HC-Pro* 基因, 序列, 盘菜

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0026-05

THE SEQUENCE ANALYSIS OF *HC-PRO* GENE OF TuMV-WZ ISOLATE

SHI Man-Ling¹ LI Gui-Xin² TAO Xiao-Rong²

(*Coll. Of Life Science, Hangzhou Teachers'College, Hangzhou 310012*)¹

(*Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029*)²

Abstract: A TuMV isolate (TuMV-WZ) was collected from *Brassica rapa L.* in Wenzhou, Zhejiang Province. Observed under electron microscopy, many linear virions whose lengths were about 700nm could be found. By means of immunotrapping polymerase chain reaction (PCR), TuMV-WZ *HC-Pro* gene was amplified by PCR with special primers. There was a 1.5kb special stripe in 0.8% agarose gel electrophoresis. After being purified, PCR Product was sequenced. The sequence result showed it was composed of 1449 nucleotides encoding a polypeptide of 482 amino acids. Nucleotide homogeneity of *HC-Pro* gene of TuMV-WZ isolate with those of other isolates (Canada, UK1 and Japanese) was 83.9%, 96.5% and 94.0%, respectively. Amino acid percentage similarity of

* 杭州师范学院科学研究基金资助项目 (No. 2001XC320)

浙江省自然科学基金资助项目 (No. 301007)

收稿日期: 2000-08-22, 修回日期: 2000-10-08

TuMV-WZ *HC-Pro* gene with other isolates was 97.3%, 98.8% and 99.0%, respectively.

Key words: Turnip mosaic virus, *HC-Pro* gene, Sequence, *Brassica rapa* L.

芜菁花叶病毒 (Turnip mosaic virus, TuMV) 为马铃薯 Y 病毒属 (Potyvirus) 成员, 病毒粒子是弯曲线形, 长约 720nm, 宽约 12nm。病毒基因组为单链正义 RNA。TuMV 寄主范围很广, 可侵染 20 余科 202 种植物^[1]。TuMV 是重要的作物病毒病原之一, 能侵染包括油料作物在内的多种重要经济作物, 尤其在十字花科植物上引起严重的危害, 并通过蚜虫传播, 给农业生产带来重大损失^[2]。TuMV 所属的马铃薯 Y 病毒属病毒的 RNA 首先翻译出一个巨大多肽, 然后自我切割成数个具有功能的成熟蛋白。根据 TuMV 全序列结果预测该基因组可能编码 10 个蛋白, 其中 *HC* 基因所编码的蛋白称 *HC-Pro* (helper component Proteinase), 分子量为 58kD^[3]。它是一种多功能蛋白, 与蚜虫传毒和寄主病症表现有关, 并具有蛋白酶活性^[4-6]。因此深入研究 *HC-Pro* 基因对防治 TuMV 侵染作物有着现实的意义。

TuMV 在我国分布广泛, 在浙江省发生普遍。本实验的 TuMV-WZ 分离物来自浙江省温州市, 是从矮化呈花叶病症的盘菜病株上获得。为了解 TuMV 在浙江省主要侵染农作物上的致病性差异, 明确 TuMV 基因组, 尤其是 *HC-Pro* 基因的变异情况。本实验对 TuMV-WZ 分离物的 *HC-Pro* 基因进行研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 酶与试剂

所用的 PCR 试剂盒, 购自上海 Sangon 生物工程有限公司, DNA 分子 Marker IV 购自 Boehringer Mannheim 公司。QIA quick Gel Extraction kit 购自 Qiagen 公司, 琼脂糖和反转录酶为 Promega 公司产品, 常规试剂为进口分装或国产分析纯试剂。

1.2 毒源

TuMV-WZ 分离物是在 2000 年 1 月采自浙江省温州市, 从矮化呈现花叶病症的盘菜病株上获得, 经苜蓿色藜单斑分离后繁殖保存于青菜。

1.3 病毒提纯

将 TuMV-WZ 接种于青菜, 15d 后采收病叶, 按周雪平等的方法^[7]提纯 TuMV。

1.4 病毒粒子形态的电镜观察

病毒提纯液经 3% 磷钨酸负染后, 置于 JEOL JEM-1200EX 电镜下观察粒子形态。

1.5 免疫捕捉 RT-PCR (immunotrapping RT-PCR) 扩增

1.5.1 cDNA 合成: 纯化的 TuMV IgG (4 μ g/mL, 浙江大学生物技术所提供) 用包被缓冲液稀释。经 1:25 倍稀释后, 取 100 μ L 加入 0.5mL 的塑料管, 4 $^{\circ}$ C 吸附过夜, 用 PBS 及 dH₂O 洗涤后, 加入 500 μ L TuMV 病叶研磨液 (用 PBS 研磨), 37 $^{\circ}$ C 吸附 3h, 用 PBS 及 dH₂O 洗涤, 加入 9 μ L dH₂O 和 1 μ L PA 引物, 72 $^{\circ}$ C 处理 2min 后置冰上, 然后加入 15 μ L cDNA 合成混合液 (5 μ L ddH₂O, 5 μ L 5 \times RT-buffer, 2.5 μ L 100mmol/L DDT, 1.5 μ L 25 mmol/L dNTP 和 1 μ L 反转录酶), 42 $^{\circ}$ C 合成 1h 后, 72 $^{\circ}$ C 处理 10min。

1.5.2 PCR 扩增: 根据已发表的 TuMV 基因序列, 设计并合成特异性引物:

PA (3' 引物) TAGTCGACTTTTAYGAGYCTCTTGATGCACC

PB (5' 引物) ACGAGCTCAGGATCAARRTCACGARRACAATG

取 cDNA 第一链产物 1 μ L 为模板, 通过 Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 进行 PCR 扩增, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 1min, 94 $^{\circ}$ C 与 56 $^{\circ}$ C 各 30s、72 $^{\circ}$ C 1min 共 30 循环, 最后一轮循环在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10min。

1.6 PCR 产物的纯化

用 Qiagene 公司的 QIA quick Gel Extraction Kit 纯化 PCR 产物。

1.7 PCR 产物的序列测定与分析

用 ABI PRISMIM3700DNA 测序仪进行 PCR 产物的序列测定。测序结果用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 和 DNA star 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 病毒粒子形态的电镜观察

纯化病毒经 3% 磷钨酸负染, 在电镜下可见大量弯曲线形粒子长约 700nm(如图 1)。

2.2 HC-Pro 基因的免疫捕捉 RT-PCR 扩增

利用免疫捕捉 RT-PCR 技术, 以 TuMV-WZ 分离物 RNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 可观察到一条约 1.5kb 大小的扩增条带 (见图 2), 与预期大小相吻合。

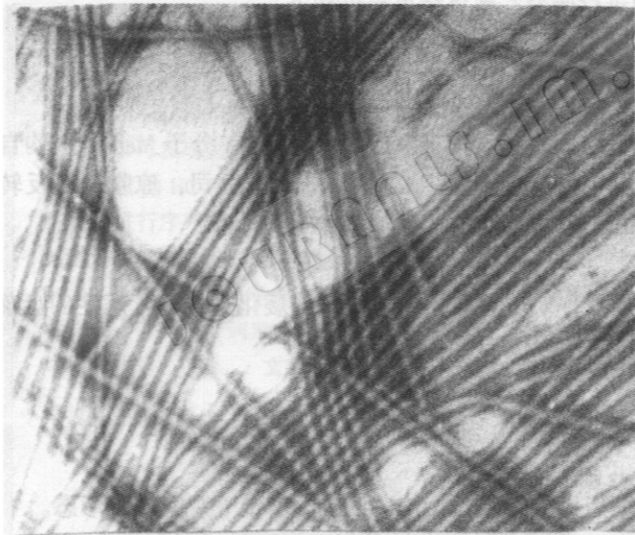


图 1 TuMV-WZ 分离物提纯病毒粒子的电镜观察(48000 \times)

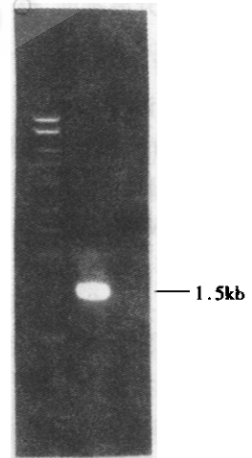


图 2 HC-Pro 基因的 PCR 扩增产物电泳

2.3 HC-Pro 基因的序列测定

经纯化的 TuMV-WZ 分离物的 HC-Pro 基因的 PCR 产物, 用 ABI PRISMIM 3700 DNA 测序仪进行测序, 得到序列长度为 1449 个核苷酸, 可编码 482 个氨基酸, 其核苷酸和氨基酸序列如图 3。

2.4 TuMV-WZ 分离物的 HC-Pro 基因与已报道的 TuMV 其他分离物的核苷酸及氨基酸序列比较

TuMV-WZ 分离物的 HC-Pro 基因的核苷酸及其所推导的氨基酸序列与在 Gene Bank 上所登录的 TuMV 另外的分离物 Canada (登录号 D10927), UK1 (登录号 NC- 002509)

和 Japanese (登录号 D83184) 相比较, 核苷酸序列的同源率为 83.9% ~ 96.5%, 氨基酸序列的同源率为 97.3% ~ 99% (见表 1 和图 4)。

1 GTCACAAGATTGTGCACCTTTAGTGCAGCAGGAGCCAACTTCTGGAAAGGCITTGACAGATGTTTTCGCGCATACCGTAGTGACAATCGGGA
H K I V H F S A A G A N F W K G F D R C F L A Y R S D N R R
92 GCATACATGCTATTCCAGGTTAGATGTTACTGAGTGGCGGGAAGTGGCAGCACTGATGTGTTTGGCTAGTGTCCCATCGCGAAAGATAACC
H T C Y S G L D V T E C G E V A A L M C L A M F P C G K I T
183 TGCCCTGACTGTGTAACAGATAGTGAAGTATCCCAAGGACAAGCAAGCGGACCCATCTATGAAGCACAGGTTAAAGCCAGCTGGCGATGTICA
C P D C V T D S E L S Q G G Q A S G P S M K H R L T Q L R D V I
274 TCAAGTCAAGCTACCCACGCTTCAAGCATGCAAGTACTGGACAGTATGAGCAATCACTGAGCAGTGCAACGAGAGAACTACCAAGA
K S S Y P R F K H A V Q I L D R Y E Q S L S A N E N Y Q D
365 TTTGCGAGAAATCCAGAGTATAAGCGATGGAGTTGAGAAGCTGCATTCCACACGTCACCAAGCTAAAAGCAATATTGATCAAAAGGGGCC
F A E I Q S I S D G V E K A A F P H V N K L N A I L I K G A
456 ACAGCGACAGGGGAGGAATTCCTCGCAGGCCAAGAACTTACTCGAGATAGCAGGATACCTGAAGAACAGAACTGAGAACATTGAGAAGG
T A T G E E P S Q A T K H L L E I A R Y L K N R T E N I E K G
547 GTTCACTGAAGTCTCTCGCAACAGATTTCCGAAAGCGCACATCAACCCCACTAATGTGGATAACCAGCTCGATAGAAATGGAAA
S L K S F R N K I S Q K A H I N P T L M C D N Q L D R N G N
638 TTTCTATGCGGTGAGACAGGATACCATGCAAAAGCATTCTTCAGCACTACTTTGAATAAATCGATCCAAAGCAAGGCTACACCCATAC
F I W G E R G Y H A K R F F S N Y F E I I D P K Q G Y T Q Y
729 GAGACAAGAGTGTACCAAAATGGGTACGGAACCTTGCAATCGGCAAACTAATAGTCCCAAGAACTTCCAAGTTTAAAGAGCCAGATGA
E T R V V P N G S R K L A I G K L I V P T N F E V L R D Q M K
820 AAGGCGAACCGGTAGAACCATACCCAGTAAACAGTGGAGTGTGAGCAAGTTACAGGGTCACTTCCTCCATGCAATGTTGTGTGTAACAA
G R P V E P Y P V T V E C V S K L Q G D F V H A C C C V T T
911 AGAATCAGGGGACCCAGTCTTGTCTGAAATAAAAATGCCAACCAACCCACTAGTGTGATGGCAACAGCGGCGATCCAAAGTACATAGAT
E S G D P V L S E I K M P T K H H L V I G N S G D P K Y I D
1002 CTCCTGAGTACGAGGAAATAAATATACATAGCAAAAGAAAGTATTGTGTACATCAACATCTTCCCTAGCTATGCTAGTGAATGTCAAAG
L P E I E E N K M Y I A K E G Y C Y I N I P L A M L V N V K E
1093 AATCGCAGGCAAGGAGTTCAAGAACTGTTAGGACAACTAGTGTGGCAACTTGGCAAGTGGCCACTCTGTGTAGATGTAGCAACCGC
S Q A K E F T K V V R D K L V G E L G K W P T L L D V A T A
1184 TTGTTATTTCTGAAGGATTTTACCAGAGCTTGCTAACCCGGAATGCCACCGATGTTAGTGGATCATAAAGCAAGATATTTCATGTC
C Y P L K V F Y P D V A N A E L P R M L V D H K T K I I H V
1275 GTTGATTCATATGGTCACTGTCAACTGGATATCACTGCTTAAGCAAACTGTGGAACTCAATTAATTCACCGAGTGAATTTGG
V D S Y G S L S T G Y H V L K T N T V E Q L I K P T R C N L E
1366 AATCAAGCTTGAAGCACTACCGGTTCGAGGAAACAGAGTGGGAGCACTCATGGAGCCAGCATAGATGATCCACAGTTGG
S S L K H Y R V G G T E W E D T H G A S N I D D P Q L

图 3 TuMV-WZ 分离物 HC-Pro 基因核苷酸和氨基酸序列

表 1 TuMV-WZ 分离物与其他 TuMV 分离物的核苷酸及氨基酸的同源性 (%)

分离物	WZ	Canada	UK1	Japanese
WZ		97.3	98.8	99.0
核苷酸同源性	Canada	83.9	97.3	97.3
	UK1	96.5	85.2	98.5
	Japanese	94.0	84.1	95.1
氨基酸同源性				

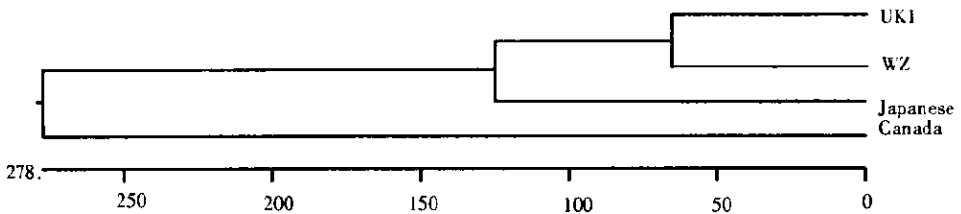


图 4 TuMV-WZ 分离物与其他分离物的 HC-Pro 基因的核苷酸序列同源图

3 讨论

HC-Pro 基因所表达的蛋白是一个多功能蛋白, 它与蚜虫传毒、病毒在植物体内的移动、病毒复制以及病症的表现密切相关。HC-Pro 基因是一个同源二聚体^[8], 它的 N

端部位与病毒的复制以及蚜虫传毒有关。C端能自动与相邻的P3蛋白断开, *HC-Pro*蛋白的中间部分与病毒在植物体内的长距离移动有关^[9], 因此深入研究 *HC-Pro* 基因的结构特征及变异情况, 有助于揭示植物与病毒的互作机理。本实验利用免疫捕捉 RT-PCR 技术成功地扩增了 TuMV 的 *HC-Pro* 基因。该方法合成 cDNA 同时, 各种试管及试剂无需作特殊处理, 因而操作方便简单, 是一种较理想的方法^[10]。本实验通过对 TuMV-WZ 分离物的 *HC-Pro* 基因序列的测定, 与登录在 Gene Bank 上的 TuMV 的其他分离物 (Canada, UK1 和 Japanese) 的序列相比较, 同源性较高, 核苷酸同源率为 83.9% ~ 96.5%, 氨基酸同源率为 97.3% ~ 99%。TuMV-WZ 分离物的 *HC-Pro* 基因与 UK1 株系的同源率最高, 高达 96.5%, TuMV-WZ 与 UK1 是否同一株系, 还有待于对基因组的其他序列比较后, 才能有定论。

致谢 本实验得到了浙江大学生物技术研究所周雪平教授的指导和帮助, 在此表示衷心感谢!

参 考 文 献

- [1] Stace S, Tremaine J H. *Phytopathology*, 1970, **60**: 1785 ~ 1789.
- [2] 史 锋, 于晓虹, 张耀洲. *浙江农业学报*, 1999, **11** (2): 59 ~ 62.
- [3] Carrington J C, Herndon K L. *Virology*, 1992, **187**: 308 ~ 315.
- [4] Cronin S, Verchot J, Haldeman-cahill R, *et al.* *The Plant Cell*, 1995, **7**: 549 ~ 559.
- [5] Kasschau K D, Carrington J C. *Virology*, 1995, **209**: 268 ~ 273.
- [6] Blanc S, Ammar E D, Sandra G L, *et al.* *J. Gen Virol*, 1998, **79**: 3119 ~ 3122.
- [7] 周雪平, 陈集双, 李德葆, 等. *微生物学通报*, 1994, **21** (3): 184 ~ 186.
- [8] Guo D, Merits A, Saarma M. *J Gen Virol*, 1999, **80**: 1127 ~ 1131.
- [9] Wang R Y, Powell G, Hardie J, *et al.* *J Gen virol*, 1998, **79**: 1519 ~ 1524.
- [10] Zhou X P, Xie Y, Zhang Z K, *et al.* *Acta virologica*, 2001, **45**: 45 ~ 50.