

## 甜菜坏死黄脉病毒 75kDa 通读蛋白 基因 54kDa 片段的克隆及其序列分析

于嘉林 李大伟 杨莉莉 刘 仪

(北京农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

**摘 要** 以甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)内蒙分离物的总 RNA 为模板,通过反转录和 PCR 扩增获得 75kDa 通读蛋白基因 54kDa 片段的目的片段。将其克隆到 pGEM-7Zf(+)上并转化 DH5 $\alpha$  得到了含有完整 54kDa 片段的重组子 pGBW52。采用双脱氧终止法进行序列分析。结果表明内蒙分离物的 54kDa 片段全长为 1509nt,与法国的 F<sub>13</sub> 分离物相比缺失了 3 个核苷酸。其核苷酸序列和由此推导的氨基酸序列的同源性分别为 94.97% 和 96.42%。

**关键词** 甜菜坏死黄脉病毒, 75kDa 通读蛋白基因 54kDa 片段, 克隆, 序列

甜菜丛根病(Rhizomania)是甜菜的一种毁灭性病害,由甜菜坏死黄脉病毒(Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV)侵染所引起<sup>[1,2]</sup>,该病毒是以甜菜多粘菌(*Polymyxa betae*)为传播介体的多分体正链 RNA 病毒,含有 5 条 RNA,依其分子量大小依次称为 RNA1-5,其中 RNA5 仅存在于日本的一些分离物中,在欧洲、美洲和中国的分离物中尚未发现它的存在<sup>[3]</sup>。近年来,法国、日本、德国等对其基因组的结构和功能进行了较深入的研究,目前已完成了 RNA1-4 的全序列分析<sup>[3,4]</sup>。其中 RNA2 基因组上有 6 个开放阅读框(ORF),位于 5' 端的 ORF 编码 21kDa 的外壳蛋白,其琥珀终止密码子 UAG 通读产生一种 75kDa 的蛋白(图 1)。Tamada 等<sup>[5]</sup>发现在连续人工机械接种草本寄主的条件下,75kDa 蛋白的通读区(即 54kDa 片段,核苷酸长度为 1.5kb)易发生自然缺失突变,在此区域发生缺失的 RNA2 突变体和 RNA1+3+4 混合接种时,不能被介体 *P. betae* 所传播,而野生株则可以被传播。Schmitt 等利用体外突变技术对通读区进行人工缺失突变,发现位于外壳蛋白基因终止密码子下游约 350nt 处的短的缺失(109nt)能抑制病毒粒子的装配<sup>[6]</sup>。因此,BNYVV RNA2 基因组上的 75kDa 通读蛋白基因的 54kDa 片段可能至少在

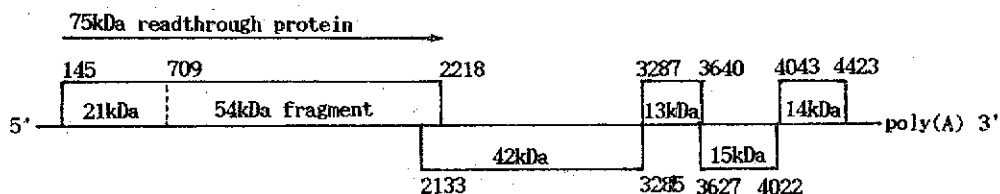


图 1 BNYVV RNA2 基因组的结构

Fig. 1 Genome organization of BNYVV RNA2

介体传播和病毒粒子装配两方面起重要作用。为此,我们克隆了 BNYVV 54kDa 片段,并试图将其转入甜菜,以期获得抗介体传播或抗病毒侵染的转基因甜菜,并为其真菌传播植物病毒的抗病毒基因工程提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 BNYVV RNA 的提取

取 200 $\mu$ l 本室保存的 BNYVV 内蒙分离物的提纯液(由本室韩成贵惠赠),加入 200 $\mu$ l 抽提缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 1% SDS, 200mmol/L NaCl, 5mmol/L EDTA), 以等体积的苯酚-氯仿抽提三次。取水相,经乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,真空干燥后,溶于 20 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, -20℃ 保存。

### 1.2 BNYVV 54kDa 片段的 PCR 扩增<sup>[7,8]</sup>

1.2.1 引物的合成:依据 Bouzoubaa 等<sup>[4]</sup>报道的 BNYVV RNA2 的核苷酸序列,设计并合成两个用于扩增 54kDa 片段的寡核苷酸引物。

引物 1: 5'ACCAGTCATCCTGAGTCATCCGGCGGG3'

引物 2: 5'CACCCGGACAAATGCAATTAGCTGCTG3'

其中引物 1 与 BNYVV RNA2 的 2235-2209nt 互补,引物 2 与 BNYVV RNA2 的 698-724nt 相对应,并将原琥珀终止密码子 TAG 改造为起始密码子 ATG。

1.2.2 BNYVV 54kDa 片段 cDNA 的合成:以提取的 BNYVV 内蒙分离物总 RNA 为模板,在引物 1 的引导下,反转录合成 cDNA 第一条链。在 50 $\mu$ l 的反应体系中,加入 5 $\mu$ l 10 $\times$ Taq DNA 聚合酶缓冲液,2.5 $\mu$ l 50mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 4 $\mu$ l 10mmol/L dNTP, 0.1 $\mu$ g 引物 1, 30 单位 RNasin, 6.4 $\mu$ g BNYVV-RNA 和 32 单位 AMV 反转录酶(Promega)于 42℃ 反应 2 小时。

1.2.3 54kDa 片段的 PCR 扩增:将 cDNA 第一条链反应体系于 95℃ 变性 5 分钟,再加入 0.1 $\mu$ g 引物 2, 5 $\mu$ l 10 $\times$ Taq DNA 聚合酶缓冲液, 4 单位的 Taq DNA 聚合酶(华美生物工程公司)并将反应体系扩大到 100 $\mu$ l,再加盖 68 $\mu$ l 的液体石蜡油。然后在水浴锅内进行 PCR 扩增,共进行 30 个循环。每个循环包括:94℃ 变性 2 分钟,42℃ 退火 2 分钟,72℃ 延伸 6 分钟(其中前三个循环和最后一个循环的延伸时间分别延到 20 分钟、15 分钟、8 分钟和 10 分钟)。反应结束后,取 30 $\mu$ l 反应物,加入 8 单位 T4 DNA 聚合酶(Promega)和 1 $\mu$ l 10mmol/L dNTP, 37℃ 和 14℃ 各保温 15 分钟,将所扩增的片段修补成平齐末端,经苯酚-氯仿抽提,乙醇沉淀,回收目的片段。

### 1.3 54kDa 片段的克隆与筛选

基因克隆、连接、转化、质粒提取、酶切均参照 Sambrook 等<sup>[7]</sup>的方法进行。克隆载体 pGEM-7Zf(+)用 SmaI 切成平齐末端再与回收的目的片段连接并转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。经选择性培养筛选,碱解法提取质粒。参考 BNYVV F<sub>13</sub>分离物的酶切图谱,选用适当的限制性内切酶酶切鉴定外源片段的插入情况并进行亚克隆。

### 1.4 序列测定

采用双脱氧终止法对双链质粒直接测序。利用 Sequenase Version 2.0 测序试剂盒(United States Biochemical)并参照其产品说明书进行序列测定。其双链 DNA 碱变性条

件为 37℃ 保温 30 分钟,模板与引物的退火条件为 94℃ 处理 2 分钟后冷却到 35℃ 以下。

## 2 结果与分析

### 2.1 BNYVV 54kDa 片段的 PCR 扩增

根据 BNYVV F<sub>13</sub> 分离物 RNA2 的全序列,75kDa 通读蛋白基因 54kDa 片段起始于 709nt,终止于 2220nt,全长为 1512nt。以 BNYVV 内蒙分离物总 RNA 为模板,经反转录和 PCR 扩增,得到一特异的 1.5kb 的片段,与设计相符(图 2)。

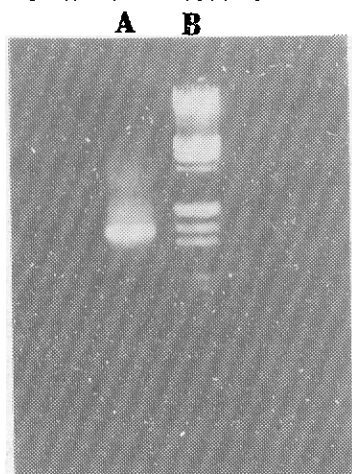


图 2 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2. The agarose gel electrophoresis of PCR products

A. PCR products, B.  $\lambda$  DNA/EcoRI+Hind III marker

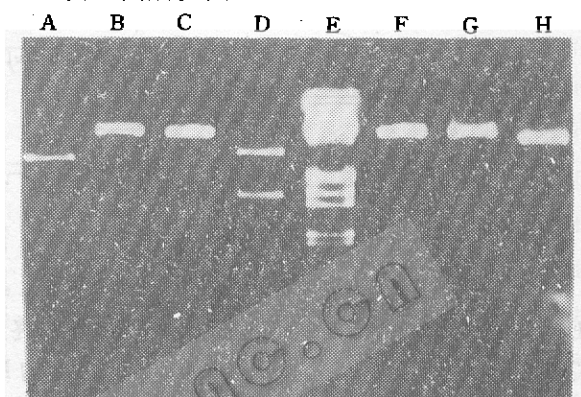


图 3 pGBW52 的限制酶图谱

Fig. 3 Electrophoresis identification of pGBW52 by restriction endonuclease digestion

A. pGBW52, B. ScaI, C. NdeI, D. XbaI+Hind III, E. ADNA/Hind III+EcoRI marker, F. Pst I, G. Bgl II, H. AccI

### 2.2 扩增产物的克隆

扩增得到的 1.5kb 片段经 T4 DNA 聚合酶处理成平齐末端后,克隆到 pGEM-7Zf (+) 的 SmaI 位点。经筛选得到一正向插入的重组质粒 pGBW52。经 AccI、AvaI、BglII、BglII、NdeI、PvuI、PstI 和 ScaI 等限制酶的酶切分析,与 BNYVV F<sub>13</sub> 分离物相比, pGBW52 插入片段中无 ScaI 位点,而在近 5' 端多了一个 AccI 位点,其余位点相同。以 XbaI 和 Hind III 双切 pGBW52 证实重组质粒中插入片段为 1.5kb(图 3)。

### 2.3 亚克隆

酶切结果发现,在插入片段中含有 3 个 AccI 位点。以 AccI 酶切 pGBW52,电泳后用冻融法回收 0.41kb 和 0.28kb 的两个小片段,经 Klenow 片段补平后,分别克隆到 pGEM-7Zf(+ ) 的 SmaI 位点,得到亚克隆 1 和 4。以 AccI+ApaI, AccI+Hind III 分别双酶切 pGBW52,电泳后用冻融法回收 3.39kb 和 3.43kb 的大片段,再用 T4 DNA 聚合酶或者 Klenow 片段处理成平齐末端后,连接得到亚克隆 2 和 3(图 4)。

### 2.4 序列分析

序列分析结果表明,重组质粒 pGBW52 插入片段全长为 1535nt,其中含有编码 BNYVV 内蒙分离物 75kDa 通读蛋白基因 54kDa 片段的 1509nt 的阅读框。因为 54kDa 片段只是 75kDa 蛋白的通读区域,其编码序列中无起始密码子 ATG,为使其能够表达,

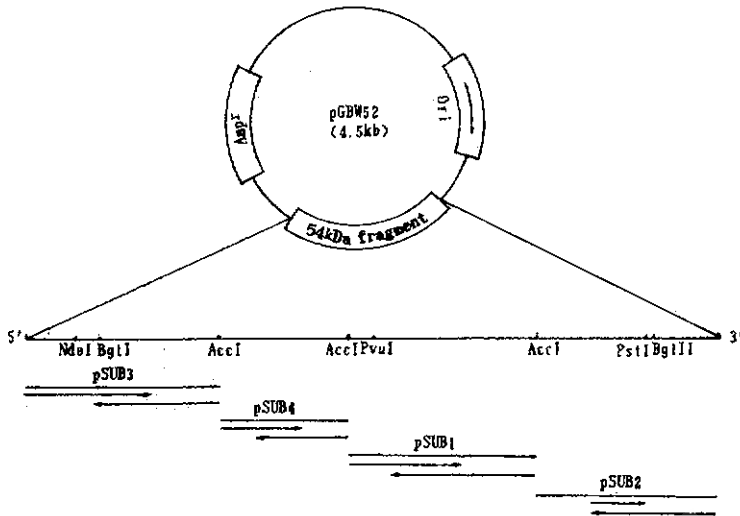


图 4 pGBW52 的物理图谱、亚克隆及测序策略

Fig. 4 Physical mapping, subcloning and sequencing strategy of pGBW52

在其 5' 端引物(引物 2)中将原 CP 基因的琥珀终止密码子改造为 ATG, 序列测定结果证实引进的突变已获成功。与 Bouzoubaa 等报道的 BNYVV F<sub>13</sub> 分离物相应片段的核苷酸序列相比, BNYVV 内蒙分离物的 54kDa 片段在 F<sub>13</sub> 分离物的 2011—2013nt 处缺失了 3 个核苷酸。在全长为 1512nt 的编码区域只有 76 个核苷酸发生了变异(不包括引进的 ATG 突变), 其核苷酸序列的同源性为 94.97%, 由此推导的氨基酸序列与 F<sub>13</sub> 分离物相应片段的同源性为 96.42%(图 5)。

### 3 讨 论

甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)是一种多分体正链 RNA 病毒, RNA1 编码的 237kDa 蛋白可能与病毒的复制酶有关, RNA3 不仅与症状的形成有关, 而且还与病毒在根组织中的扩展有关, RNA4 则控制 *Polymyxa batatae* 传播 BNYVV 的效率<sup>[3]</sup>。无论是汁液摩擦接种还是以 *P. betae* 为介体的自然传播, RNA1 和 RNA2 都是侵染所必需的, 而 RNA3 和 RNA4 在连续人工机械接种时很可能会产生丢失或内部缺失。姚华建等<sup>[9]</sup>和崔星明等(待发表)已经分别克隆了 BNYVV 内蒙分离物 and 新疆分离物的 CP 基因, 序列分析表明, 在全长为 567nt 的 CP 基因内, 两个分离物只有一个核苷酸的变异, 与法国 F<sub>13</sub> 分离物的 CP 基因的核苷酸序列相比, 同源性高达 96.7%。这一结果证实, 地理位置相距甚远的不同分离物虽然 RNA 组分可能有差异, 但病毒的外壳蛋白基因却具有高度同源性, 因而血清学上也具有高度稳定性。与 F<sub>13</sub> 相应片段的核苷酸序列相比, BNYVV 内蒙分离物的 54kDa 片段缺失了 3 个核苷酸, 分析其原因可能是由于所采用的 BNYVV 内蒙分离物已在番杏(*Tetragonia expansa*)上连续人工机械接种数代所导致的自然缺失突变<sup>[5]</sup>, 也可能是不同分离物的本身所固有的差异。对 BNYVV 内蒙分离物 RNA2 基因组上 ORF4(编码 42kDa 蛋白)3' 端进行部分序列分析发现有移码现象, 在 15 个核苷酸区域之内比 F<sub>13</sub> 相应片段多出 3 个核苷酸(梁德林硕士论文, 待发表)。因而也说明在 BNYVV RNA2 基因组上, 除 CP 基因有高度稳定性外, 其它区域在不同分离物之间可能有较大差异。

ATG CAA TTA GCT GCT GCT CGG GTG ACG GGA CAC ATT CGA GCG GCS AAG 48	ATT GAT ATT GAA ACT GTC TTG CTC GAG AGG CGT ATA AAT TTG KAA XAG 272
CGG GCA CTA TTA TAT CCT GGT GAT AGT CCC GAG TGG GTT GGT TGG AAA 92	TTG CTC CTT GAA GAA GCA GAG CTA GAA CGA CGA GAG CGA DAT MGT ACT 288
CAT TTC TAT GCT GCT CCA GCA TAT GAT GTG TAC GAT VGG P P L 144	ATG ATT GCT GAT GAA GAA CAG AGA ACA TTG CTA CAT AAG LCG CRA AGT 304
GAT ATT ATT AAC GGC AAA TTG GCT GCT GAT GAT ATC GGC GGT CTT GTT 162	TCT AGG GTT GAA GCA ACT CAT GCA GTT GCC AAA GGC CAA GCT GAT GCT 320
ACT CCT ACA CCG GCA TCC TCA CAT GCT GCT CTT TTT GAA GTT TCT GAG 240	CGG GCA GCT GTT GCT ATG GCT GCT CTT TCT TCG AAG GAA GCT AAT GAT 336
GAA GTT GAG CAG GCA AAT AAG AAT AGT CTA TGG CTA ACA GTT GGA LTTG 288	TAC GAT AGT AAG ATC CTT TTT GAC AGG TCT TCT AAA GAA CAG GAA LTTG 352
CTA TTA GCT GCT TTG GCA VTT GGG ATT GGT GTA GCT GAT TAT CAT AAG 312	CGT TTG CCG GAA CTC TTA VTT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT 368
AAG AAG CTC CRA AGT AGA TTA CGT GAG TTA AAA TTG CTA TGG GCG CTT 384	TAT GTT CAC ACT GGT TTA CRA GGT GGT GCG CRA TTG GCT GGA GCT AAG 392
ACT GGT GGG TCT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT 432	GCT GTT GGT GAT ATG CTC CTA GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT 456
CGT GCT ACA GAT ACT GTT AGT TGG GGA ACC ACT CTT TCA GAG CAT VTT 480	GTG TCT AGT GGT GCT AAT ATT GGT TCT GCT TCA CAG AGT TGG ACT CBT 496
GCT GCA GCT CCG TCA GGA TTA CCG CAC CRA CTT GCT GAT ACT CAT AGT 528	GCT COT AGT GCA TCA CAA CCT TTG TCA TCG GTT GGT GGT TCT ACT COT 544
GGA CTT CCG GCA GCA TCG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 560	GCT GTT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT 576
GCT GTA GTG TAT GAT TCG ACT GGT AAG AGT GAT TTA TTT TAT ACT VTT 608	AAT AGT AAT GCA GTT TCT GCT GGT AGA TCT ACT AAT AAT GGT AAT AGT 624
AGA GAG TTT GTT GGG GTG TTT AAC GGT GAA TTT GAA GGG CTT ATA GAG 672	AAT TTT TGG TCT AAA TTG CBT GTT GGT GAA GGA TGG TCC AAG TAC AGC 688
CTG TTA GAG TCA CCG GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 720	GTA GAA CCG GCG GCG ACA AGG GCG CAA AAG GCA ATC GTG CTT CCA GCG 736
AGA GAC ACT GCT ATT GAT CCG TAT GAA TCT CAA GAA AAC TAC GAT CBT 768	CTT CCG TCT GCT CCG GCG GAA TGA 800

图 5 BNYVV 内蒙分离物 75kDa 通读蛋白基因 54kDa 片段的核苷酸序列和由此推导的氨基酸序列及与 F<sub>13</sub> 分离物相应序列的比较

Fig. 5 The nucleotide and deduced amino acid sequences of 54kDa fragment of 75kDa readthrough protein gene from BNYVV isolated from Inner Mongolia of China and the comparison of sequences with those of BNYVV F<sub>13</sub> isolate.

From top to bottom, The amino acid and nucleotide sequences of 54kDa fragment from BNYVV isolated from Inner Mongolia, the nucleotide and amino acid sequences of the same fragment from BNYVV F<sub>13</sub> isolate (the identical nucleotides and amino acids are indicated with "+" and "\*" respectively).

## 参 考 文 献

- (1) 高锦梁等. 植物病理学报, 1983, 13(2), 1-4.
- (2) Putz C *et al.* Review of Plant Pathology, 1990, 69(5), 247-254.
- (3) Richards K E *et al.* Annu Rev. Phytopathol, 1992, 30: 291-313.
- (4) Bouzoubaa S *et al.* J Gen Virol, 1986, 67: 1689-1700.
- (5) Tamada T *et al.* J Gen Virol, 1991, 72: 1497-1504.
- (6) Schmitt C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 5715-5719.
- (7) Sambrook J *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- (8) Ehlers U *et al.* Theor Appl Genet, 1991, 81: 777-782.
- (9) 姚华建等. 生物工程学报, 1993, 9(2), 147-151.

## Cloning and Sequencing of 54kDa Fragment of 75kDa Readthrough Protein Gene from Beet Necrotic Yellow Vein Virus

Yu Jialin Li Dawei Yang Lili Liu Yi

(National Laboratory for Agrobiotechnology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract** The RNAs was extracted from purified beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) isolated from Inner Mongolia of China. The first strand of cDNA encoding 54kDa fragment of 75kDa readthrough protein was synthesized from viral RNA template using reverse transcription, and 1.5kb fragment was obtained after 30 PCR amplification cycles. The restriction map of the target fragment cloned into pGEM-7Zf(+) and its whole sequence has been analyzed. The result shows 54kDa fragment of 75kDa readthrough protein gene of BNYVV isolated from Inner Mongolia of China has 1509nts. Comparaing with published F<sub>13</sub> isolate, this fragment was deleted with 3nts and shares 94.97% and 96.42% homology in terms of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence respectively.

**Key words** Beet necrotic yellow vein virus, 54kDa fragment of 75kDa readthrough protein gene, cloning, sequence