

# 马铃薯卷叶病毒(PLRV)内蒙古分离物基因间隔区(*IS*)的克隆与序列分析

郭志华<sup>1</sup>, 孙毅<sup>2</sup>, 张效梅<sup>2</sup>, 张健<sup>1</sup>, 白云凤<sup>2</sup>

(1. 山西大学 生物工程学院, 山西 太原 030006; 2. 山西省农业科学院, 山西 太原 030031)

**摘要:** 根据 Genbank 已报道马铃薯卷叶病毒(PLRV)基因组序列, 分析其基因间隔区(*IS*)两端的保守区, 自行设计、合成一对特异性引物, 以 PLRV 内蒙古分离物总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增得到含 PLRV *IS* 的一段 369 bp 的 cDNA, 克隆于载体 pBS-T 中。重组质粒经 PCR 鉴定、酶切分析和核苷酸序列测定, 并进一步与 PLRV 其他分离物的同源序列作比对。结果表明: 克隆的 PLRV 内蒙古分离物的 *IS* 序列与其他全部已发表的 13 个全基因组中的 *IS* 核苷酸序列有很高的同源性, 最高达到 100%, 平均为 97.90%, 高于这 13 个 PLRV 全基因组序列 96.81% 的同源性, 说明 *IS* 序列不仅在 PLRV 的不同株系间比较保守, 而且在 PLRV 的全基因组序列中也是相对保守的。研究结果预示, 将 *IS* 构建成 RNA 干扰型结构导入马铃薯, 将有可能获得抗 PLRV 多种株系且抗性更高的转基因植株。

**关键词:** 马铃薯卷叶病毒(PLRV); 内蒙古分离物; 基因间隔区(*IS*); cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号: S432.4<sup>+</sup> 1; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)06-0019-05

## Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of *IS* Gene of Potato Leaf Roll Virus Inner Mongolia Isolate

GUO Zhi-hua<sup>1</sup>, SUN Yi<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-mei<sup>2</sup>, ZHANG Jian<sup>1</sup>, BAI Yun-feng<sup>2</sup>

(1. Department of Bioengineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Shanxi Academy of Agricultural Science, Taiyuan 030031, China)

**Abstract:** With a pair of specific primers based on Potato Leaf Roll Virus (PLRV) genomic conservative sequence lying on the both side of Intergenic Sequence (*IS*) reported in Genbank, one cDNA fragment (369 bp) containing the *IS* was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using the total RNA of PLRV Inner Mongolia isolate as a template. The fragment was cloned into pBS-T vector and identified by PCR, restrictive enzyme analysis and nucleotide sequence analysis. The cloned *IS* sequence was compared with that of homologous gene of all other 13 available PLRV isolates. The results showed that it had high homology with the other isolates (the highest homology reached 100% of nucleic acid and the average homology was 97.90%, while the homology of 13 PLRV complete genome was 96.81%). The *IS* was not only conservative among PLRV strains but also conservative in the sequences of PLRV complete genome. The result implied that transgenic plant with high resistance to PLRV could be obtained through transferring RNA interfere structure of *IS* into potatoes.

**Key words:** PLRV; Inner Mongolia isolate; Intergenic sequence (*IS*); cDNA cloning; Sequence analysis

马铃薯卷叶病毒(Potato leaf roll virus, PLRV)是马铃薯生产中危害最重的病毒之一, 在世界各产区均有分布。病株叶片边缘以主脉为中心向上卷曲, 病重时呈圆筒状, 叶质厚而脆, 呈皮革状, 植株矮小, 枝叶僵

化, 产量严重下降。PLRV 靠蚜虫(主要是桃蚜(*Myzus persicae*))以持久、循环增殖型方式传播<sup>[1]</sup>, 在寄主植株体内的分布主要局限于维管束内<sup>[2]</sup>。因韧皮部被破坏, 在茎横切面可见黑点, 茎基部和节部更为明显,

收稿日期: 2007-09-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471102); 山西省国际科技合作项目(2007081002)

作者简介: 郭志华(1983-), 女, 山西榆次人, 在读硕士, 主要从事植物抗病病毒研究

通讯作者: 白云凤(1957-), 女, 山西文水人, 研究员, 博士, 主要从事植物基因工程研究工作。

块茎组织表现为导管区网状坏死斑纹,严重影响马铃薯品质。PLRV 是单链正义 RNA 病毒,属黄化病毒组 (*Luteovirus*)<sup>[3,4]</sup>,基因组全长 6 0 kb,以中间一段 197 bp 的基因间隔区 (Intergenic sequence, *IS*) 将其分为 5' 和 3' 两个编码区。5' 编码区 ORF1, ORF2a 和 ORF2b 分别编码 28, 70 kD 蛋白及复制酶。3' 编码区包括 ORF3, ORF4, ORF5, 以亚基因组方式独立表达 23 kD 外壳蛋白、17 kD 蛋白和 53 kD 蛋白<sup>[5]</sup>。Mayo 等<sup>[6]</sup>的研究结果表明, PLRV 亚基因组转录起始位点正处在间隔区第二个保守序列中央,在转录起始位点 5' 端有 UUAUAAU 序列,此序列可能为 PLRV 亚基因组启动子,控制其下游基因的表达。因此克隆 PLRV *IS* 序列,将其导入马铃薯,将有可能阻碍侵入马铃薯体内的 PLRV 亚基因组的表达,使转基因马铃薯获得对 PLRV 的抗病性。近年来, RNA 干扰技术发展迅速,亦为植物抗病毒基因工程提供了新思路。由于 RNA 干扰依赖于序列的同源性<sup>[7,8]</sup>,因此,分析 PLRV 的 *IS* 序列同源性,将为获得 RNA 干扰型抗 PLRV 转基因马铃薯提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

病毒材料为经 DAS-ELISA Kit 检测感染 PLRV 的马铃薯块茎,由内蒙古大学张鹤龄教授惠赠。本试验所用的各种限制性内切酶, M-MLV 反转录酶, T4 DNA 连接酶, RnaseA, Rnasin, dNTP 等购自 TaKaRa (大连宝生物工程有限公司)。Taq DNA 聚合酶、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、克隆载体 pBS-T 购自天根生化科技有限公司。PLRV DAS-ELISA 试剂盒购自山东省农科院生物技术中心。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH-5 $\alpha$  菌株由本实验室保存。其余试剂为国产分析纯。

### 1.2 植物总 RNA 的提取

取经马铃薯卷叶病毒感染的新鲜叶片和茎,采用酸性酚-硫氰酸胍-氯仿法<sup>[9]</sup>提取总 RNA。

### 1.3 引物设计与合成

根据 Genbank 已报道 PLRV 基因组序列,分析其 *IS* 两端的保守区,设计合成一对特异性引物。引物 1: 30 mer, 5'-GCATCGATTCCGACACGATCGTGAGCTCGT-3', 其 5' 端加有 *Cla*I 酶切位点; 引物 2: 27 mer, 5'-GTGGTTACCTGAACCTGTTAGCGCGCCF-3', 其 5' 端加有 *Bst* EII 酶切位点。引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

### 1.4 RT-PCR 扩增 PLRV 基因间隔区 *IS*

以感染 PLRV 的马铃薯叶片总 RNA 为模板,反

转录合成 cDNA 第一链, 25  $\mu$ L 反转录体系包含: 5  $\times$  RTbuffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1.3  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物 22  $\mu$ L, RNasin 1  $\mu$ L, M-MLVRT 反转录酶 1  $\mu$ L, RNA 模板 2  $\mu$ L 和 DEPC 水 12  $\mu$ L。以 *IS* cDNA 第一链为模板 PCR 扩增 PLRV 间隔序列 *IS*。50  $\mu$ L PCR 反应体系包括: 超纯水 35  $\mu$ L, 10  $\times$  PCRbuffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L, 反转录产物 5  $\mu$ L, 天根 Taq DNA 聚合酶 0.3  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物 1 和引物 2 各 2  $\mu$ L。程序设置为: 94  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 45 s, 59  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测后用天根胶回收试剂盒回收。

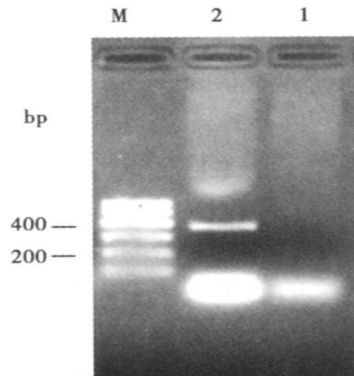
### 1.5 cDNA 克隆及重组质粒鉴定

RT-PCR 扩增的 *IS* 基因片段回收纯化后连接到 pBS-T 载体上, 转化至 *CaCl*<sub>2</sub> 法制备的大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 在含有氨苄青霉素 (Amp) 的平皿上培养, 挑选白色菌落, PCR 菌液和酶切质粒 DNA 鉴定筛选阳性克隆, 并送北京三博远志生物技术有限公司测序。利用美国 NCBI 的序列提交软件工具将测序结果向 NCBI 基因数据库申请登记注册。核苷酸序列同源性采用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站中的 Blastn 及 DNAMAN Version 6 软件进行分析并建立 PLRV 的系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 PLRV *IS* 基因的 RT-PCR 扩增

以带毒马铃薯样品植物总 RNA 为模板, 利用 PLRV 特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 得到 PLRV 间隔序列 *IS*。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 可见 1 条约 368 bp 的特异性扩增带 (图 1)。该片段大小与预期结果一致。



M. DNA marker I; 1. 负对照; 2. RT-PCR 产物

M. DNA marker I; Lane 1. Negative control; Lane 2. Product of RT-PCR

图 1 RT-PCR 扩增 PLRV *IS* 基因

Fig. 1 *IS* gene of PLRV amplified by RT-PCR

### 2.2 PLRV *IS* 的克隆、序列分析与注册

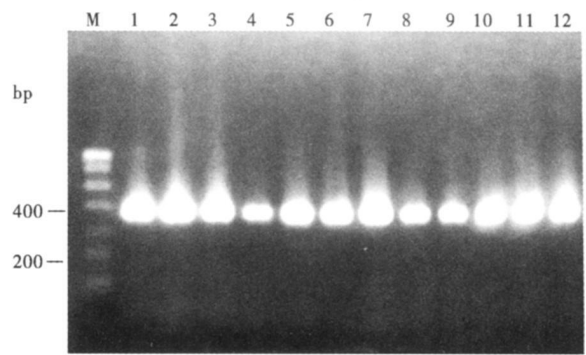
回收 PCR 产物, 与 pBS-T 载体相连, 转化大肠

杆菌 *Escherichia coli* DH5α, 挑取平板上生长的 12 个单克隆, 碱法小量提取质粒。经 PCR 检测和单酶切、双酶切鉴定, 初步筛选阳性重组子(图 2) 进行测序。测序结果表明, 所得目的片段大小为 369 bp, 含有 197 bp 的 IS 序列, 而且在 IS 149 bp 的位置存在 UUAUAUU 的保守序列(图 3)。将测序结果向 NCBI 基因数据库申请登记注册, GenBank 登录号为 EF602302。

### 2.3 IS 的同源性比较和系统进化分析

将本试验克隆到的 PLRV 内蒙古分离物(PLRV- Inner Mongolia) IS 序列(NM IS197) 与 GenBank/ EMBL/ DDBJ 数据库公布的全部 13 个 PLRV 全基因组序列中所包含的 IS 序列进行比对, 并建立系统进化有根树。发现 NM IS197 与其中 8 个的 IS 序列(Egypt isolate AY138970, Australian isolate D13953, Poland isolate X74789, UK isolate NC 001747, Canadian isolate D13954, D00530, 14.2 isolate AF453394 及 strain OP

AF453389) 高度同源, 形成一个大的分支, 与 D13753.1 的同源性达到 100%, 而这 13 个 IS 序列之间的同源性也高达 97.90% (图 4), 表明不同株系 PLRV 的 IS 序列在进化上是高度保守的。



M. DNA marker 1; 1~ 12. 阳性重组子  
M. DNA marker 1; 1~ 12. Positive recombinant vector pBS-T-IS

图 2 PCR 菌液检测阳性重组子 pBS-T-IS  
Fig. 2 Positive recombinant vector pBS-T-IS was identified by PCR

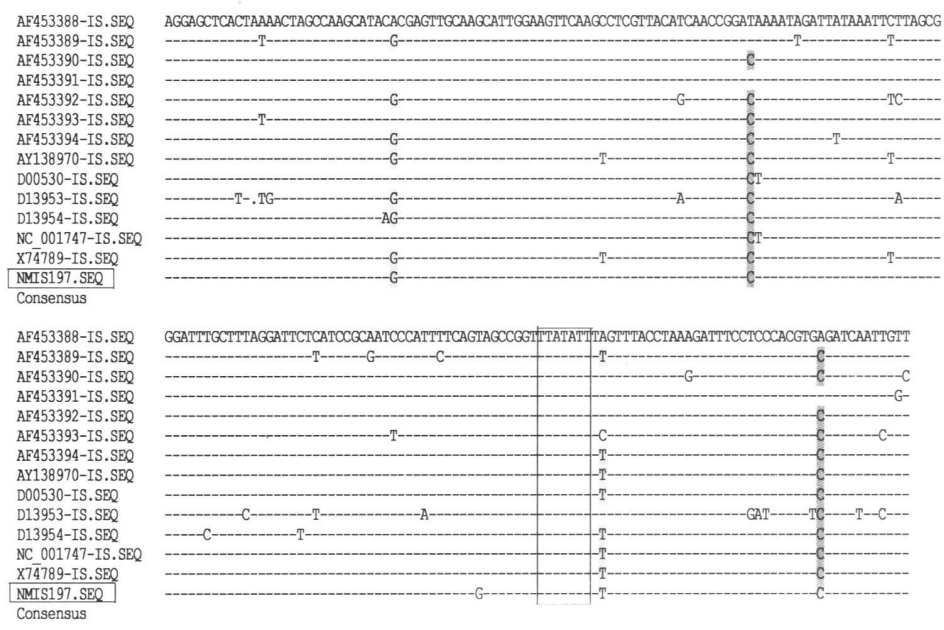


图 3 内蒙古分离物 IS 序列与以报道的 13 组 PLRV 全基因组序列的 IS 的序列比对

Fig. 3 Interval sequence of Inner Mongdia isolate compared with other IS of all 13 available PLRV genome

同时对 GenBank/ EMBL/ DDBJ 数据库公布的全部 13 个 PLRV 的全基因组序列也进行了比对, 结果表明, 其核苷酸序列同源性为 96.81% (图 5), 要低于 IS 序列的同源性, 同时由 PLRV 全基因组同源性建立的系统进化树较由 PLRV IS 同源性建立的进化树有很大差异, 并没有表现出很多株系形成一个很大分支的进化关系, 这很可能是由于全基因组中其他序列的保守性有差异造成的。这进一步表明 IS 序列不仅在 PLRV 的不同株系间比较保守, 而且在 PLRV 的全基因组序列中也是相对保守的。

### 3 讨论

本研究克隆、测定并分析了 PLRV 内蒙分离物基因间隔区 IS 序列。结果显示, PLRV 的 IS 序列在不同分离物之间的同源性很高, 且在 PLRV 全基因组序列中也是相对保守的, IS 中存在高度保守的 UUAUAUU 序列。这似乎表明, IS 作为 PLRV 亚基因组的启动子在进化中保持其序列的保守性, 更有利于高效、稳定地驱动其下游亚基因组的表达, 促进 PLRV 的侵染和繁殖。Mayo 等的研究表明, 在 PLRV

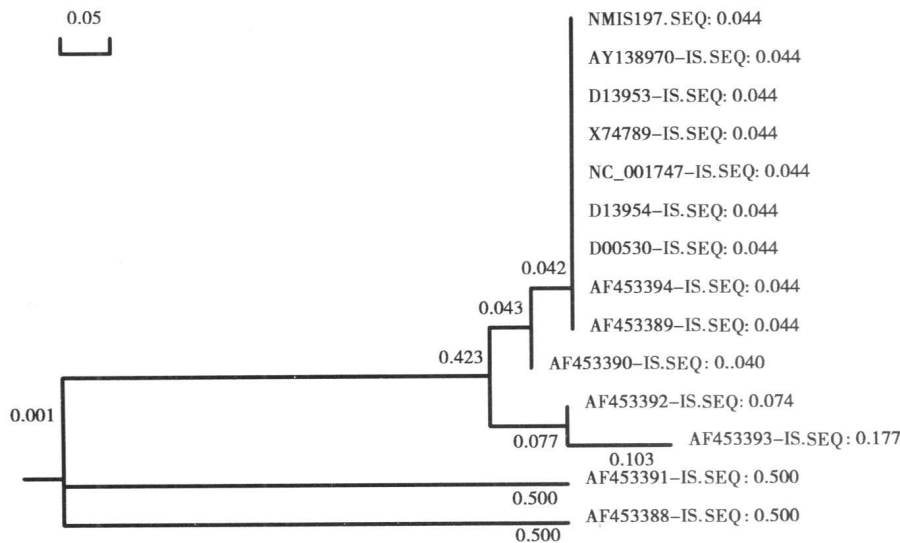


图 4 根据内蒙古分离物 *IS* 与 13 个 PLRV 全基因组中 *IS* 序列同源性建立的系统进化树

Fig 4 Phylogenetic tree of intergenic sequence of Inner Mongolia isolate and all 13 available PLRV complete genome

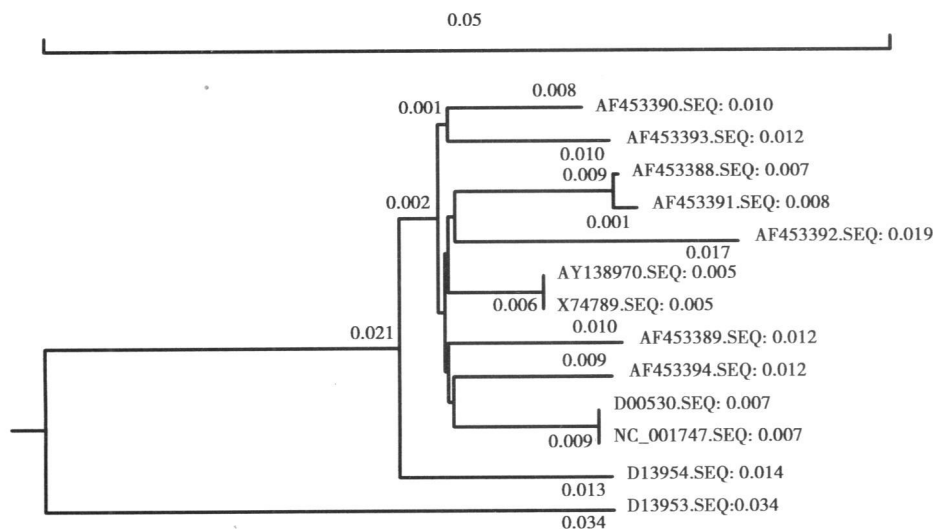


图 5 根据 13 个 PLRV 全基因组序列同源性建立的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of all 13 available PLRV complete genome

转录起始位点 5' 端有 UUAUAUU 的序列, 此序列与 BMV 亚基因组启动子部分序列十分相似, 在其他植物 RNA 病毒的基因间隔区也有类似序列。这些结果表明基因间隔区对于植物病毒的增殖具有普遍重要的作用, 进一步研究病毒基因间隔区的功能并探索其抗病毒机制从而建立一种由基因间隔区介导的 RNAi 抗病毒的新途径。

病原衍生的抗性 (Pathogen-derived resistance, PDR)<sup>[10]</sup> 已有效地用于植物抗病毒基因工程, 转基因包括病毒外壳蛋白、移动蛋白、复制酶基因的全序列或部分序列及其反义基因<sup>[11]</sup>, 转基因植物获得了对相关病毒的抗性, 特别是病毒基因的 RNA 干扰型结构使转基因植物获得抗病程度相对更高<sup>[12-15]</sup>。但是 RNA 干扰效应依赖于序列的同源性, 因此把 RNA 干扰用于植物抗病毒基因工程, 选择病毒全基

因组中最为保守的序列是至关重要的。将高度保守的 *IS* 构建成 RNA 干扰型结构, 转基因马铃薯将有可能获得对 PLRV 更高的抗性。并且, PLRV *IS* 的 RNA 干扰型结构导入植物体后不能翻译成蛋白质, 规避了传统转病毒正义、反义基因或基因片段潜在的同源重组、异源包装及协生作用的生物风险。

#### 参考文献:

- [1] KOJ IMA M. Purification and electron microscopy of Potato Leafroll Virus [J]. Virology, 1969, 39: 162-171.
- [2] 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒 (PLRV) 基因组研究进展[J]. 中国病毒学, 1996, 11(1): 1-8.
- [3] Robert R, Martin Paul K, Keese Mark J, et al. Evolution and molecular biology of Luteoviruses [J]. Phytopathology, 1990, 28: 341-363.
- [4] Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxon-

- omy classification and nomenclature of viruses, Report of the International Committee [ J ]. Archives of Virology, 1995, 10: 187- 192.
- [ 5 ] Mayo M A, Robinson K J, Barker H. In Report of the Scottish Crop Research Institute for 1983[ R ]. 1984: 187.
- [ 6 ] Mayo M A, Robinson D J, Jolly C A, *et al.* Nucleotide of potato leafroll Luteovirus RNA[ J ]. Gen Virol, 1990, 70: 1037- 1051.
- [ 7 ] Tenllado F, Díaz Ruiz J R. Double strand RNA-mediated interference with plant virus infection[ J ]. J Virology, 2001, 75 ( 24 ): 12288- 12297.
- [ 8 ] Mueller E, Gilbert J, Davenport G, *et al.* Homology-dependent resistance, transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing[ J ]. Plant, 1995, 7: 1001- 1013.
- [ 9 ] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual( 3<sup>rd</sup> ed ) [ M ]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [ 10 ] Sanford J C, Johnston S A. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome[ J ]. Theor Biol, 1985, 113: 395- 405.
- [ 11 ] 白云凤, 赵晋锋, 郑 军, 等. 反义外壳蛋白基因介导的抗 SCMV 转基因玉米研究[ J ]. 作物学报, 2006, 33 ( 5 ): 661- 665.
- [ 12 ] Smith N A, Singh S P, Wang M B, *et al.* Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs[ J ]. Nature, 2000, 407: 319- 320.
- [ 13 ] Wang M B, Abbott D C, Waterhouse P M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus[ J ]. Mol Plant Pathol, 2000, 1 ( 60 ): 347- 356.
- [ 14 ] Missiou A, Kalantidis K, Boutlal A, *et al.* Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y ( PVY ) through RNA silencing [ J ]. Molecular Breeding, 2004, 14: 185- 197.
- [ 15 ] 白云凤, 杨红春, 曲 琳, 等. 抗甘蔗花叶病毒的无标记反向重复转基因玉米[ J ]. 作物学报, 2007, 33 ( 6 ): 973- 978.