

小麦黄花叶病毒罗田分离物 28kD 蛋白基因的克隆及序列分析

董家红¹, 于嘉林¹, 韩成贵², 方守国¹, 刘 仪¹

(1 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; 2 中国农业大学 植物病理学系, 北京 100094)

摘要:通过 RT-PCR, 获得了小麦黄花叶病毒罗田分离物 28 kD 蛋白基因的 cDNA 克隆 pUW28-10。序列分析结果表明, 小麦黄花叶病毒不同分离物的 28 kD 蛋白基因的核苷酸序列存在一定的差异: 湖北罗田和河南潢川分离物在第 326, 327 和 336 位较四川雅安、江苏扬州及日本分离物缺少 3 个核苷酸(nt), 前两者核苷酸长度为 762 nt, 后三者为 765 nt; 不同分离物核苷酸序列同源性从 92.1% 到 96.9%, 相应的氨基酸序列同源性从 89.8% 到 97.3%。

关键词:小麦黄花叶病毒; 28 kD 蛋白基因; cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)01-0009-03

Cloning and Sequence Analysis of the Gene for 28 kD Protein from Luotian Isolate of Wheat Yellow Mosaic Virus

DONG Jia-hong¹, YU Jia-lin¹, HAN Cheng-gui², FANG Shou-guo¹, LIU Yi¹

(1. State Key Laboratories for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: A cDNA clone (pUW28-10) containing 28 kD protein gene from Luotian isolate of wheat yellow mosaic virus (WYMV) was obtained by RT-PCR. Sequence analysis revealed that nucleotides sequence of 28 kD protein gene varied among different isolates of wheat yellow mosaic virus. 28 kD protein genes of the Luotian and Huangchuan isolates comprised 762 nucleotides (nt) and were less 3 nt than others, located at the site of 326, 327 and 336 nt, respectively. The different isolates shared homologies ranging from 92.1% to 96.9% in nucleotide sequence and 89.8% to 97.3% in amino acid (aa) sequence.

Key words: Wheat yellow mosaic virus; 28kD protein gene; cDNA cloning; Sequence analysis

小麦黄花叶病是一种小麦上的严重病害, 广泛分布于我国长江中下游、淮河和渭河流域。其病原为禾谷多粘菌 (*Polymyxa graminis*) 传播的小麦黄花叶病毒 (wheat yellow mosaic virus, WYMV)^[1~3]。WYMV 属于马铃薯 Y 病毒科 (*Potyviridae*)、大麦黄花叶病毒属 (*Bymovirus*), 是一种二分体单链 RNA 病毒。近年来, 我国和日本陆续报道了不同分离物的基因组核苷酸全序列^[4, 5], 并初步确定了 RNA2 编码两种分子量分别为 28 kD 和 70 kD 的蛋白, 这为从根本上防治该病害而进行分子传毒机制的研究奠定

了基础。推测 28 kD 蛋白可能与病毒的系统侵染以及介体的传播有关, 但仍不十分清楚。本文旨在对不同分离物的 28 kD 蛋白基因进行比较分析, 为从分子水平上阐明 28 kD 蛋白的功能打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

毒源: 小麦黄花叶病病叶采自湖北省罗田县。

载体与菌株: pUCm-T 载体购自上海 Sagon 公司, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 由本室保存。

收稿日期: 2002-05-10

基金项目: 国家自然科学基金 (39870028); 973 项目 (G2000016201)

作者简介: 董家红 (1974-), 男, 云南富源人, 在读博士生, 主要从事分子植物病毒学的研究, 韩成贵为联系作者。

酶及试剂: AMV 逆转酶、T₄DNA 连接酶购自 Promega 公司; 其他酶购自 ITL 公司和 TaKaRa 公司; 其余化学试剂均为国产分析纯。

引物: 根据小麦黄花叶病毒(WYMV) 潢川分离物 RNA2 的序列设计一对引物 WY-24: 5'-AAACCA-CAAACAAAACCGACG-3' (与 RNA2 的 5' 1-18 nt 相对应, 且在 5' 额外加了 3 个 A) 和 WY-7: 5'-GGCCTG-GATCCTCAGCTCAGCCGAG-3' (与 RNA2 的 940-915 nt 互补)^[4], 由上海 Sagon 公司合成。

1.2 方法^[1,2]

1.2.1 病叶总 RNA 的提取 取 0.5 g 小麦叶片, 在液氮中研碎后加入适量抽提缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 1% SDS, 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA), 再以等体积 50℃ 的苯酚/氯仿 (1:1) 抽提 2 次, 取上清, 经 4 mol/L LiCl 沉淀, 70% 乙醇洗涤, 沉淀溶解于 450 μL 灭菌重蒸水中, 经乙醇再次沉淀, 70% 乙醇洗涤, 沉淀溶解于 40 μL 灭菌重蒸水中, -20℃ 保存备用。设无病的田间小麦为对照。

1.2.2 RT-PCR 以病叶总 RNA 为模板, 加入引物 WY-7 0.5 μg, 用 AMV 逆转酶合成第一链 cDNA。取 10 μL 逆转录产物, 以 WY-24 和 WY-7 (各 0.1 μg) 为

引物进行 PCR 扩增。条件为: 94℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.2.3 PCR 产物的克隆 将所获得的 PCR 产物纯化后连接到 pUCm-T 载体上, 经 PCR 扩增筛选和酶切鉴定, 得到重组质粒 pUW28-10。

1.2.4 序列测定与分析 采用 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 测序试剂盒 (PE) 和 ABI-377 型 DNA 自动测序仪进行序列测定。利用 Beckman 公司 MicroGenie 序列分析软件对序列进行计算机分析, 并比较 WYMV 不同分离物 28 kD 蛋白基因核苷酸及氨基酸序列的差异。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增与 cDNA 克隆

以病叶总 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 获得了 940 bp 的 cDNA 片段。把此片段连接到 pUCm-T 载体, 对获得的 pUW28-10 进行酶切和 PCR 鉴定后, 证实为插入目的外源片段的克隆。

2.2 28kD 蛋白基因的序列分析

测序结果表明, 湖北罗田分离物 28 kD 蛋白基

lt	MASTSSNTYYMDGDFPWRTRDPCAPITRDALPQRISEAWNTVIRHMLSDGDDQSILGR	60
ya	MASTSSNTYYMDGDFPWRTRDPCAPITRDALPQRISEAWNTVIRHMLSDGDDQSILGR	60
yz	MASTSSNTYYMDGDFPWRTRDPCAPITRDALPQRISEAWNTVIRHMLSDGDDQSILGR	60
ja	MASTSSNTYYMDGDFPWRTRDPCAPITRDALPQRISEAWNTVIRHMLSDGDDQSILGR	60
hc	MASTSSNTYYMDGDFPWRTRDPCAPITRDALPQRISEAWNTVIRHMLSDGDDQSILGR	60
	mastssn yymdgdfpwrtrdpgapitrldalpriseawntviirhmlsdgddqsilgr	
lt	DGLPATRFRNAYSGLLPTFTQSLGLPVNRILHAPVSAIEAPLCVDTSYAP.WLYMSNETH	119
ya	DGLPATRFRNAYSGLLPTFTQSLGLPVNRILHAPVSAIEAPLCVDTSYVWHLVMSNETH	120
yz	DGLPATRFRNAYSGLLPTFTQSLGLPVNRILHAPVSAIEAPLCVDTSYVWHLVMSNETH	120
ja	DGLPATRFRNAYSGLLPTFTQSLGLPVNRILHAPVSAIEAPLCVDTSYVWHLVMSNETH	120
hc	DGLPATRFRNAYSGLLPTFTQSLGLPVNRILHAPVSAIEAPLCVDTSYAP.WLYMSNETH	119
	dglpatrfrnaysgllptft qsiglplvnrl lhapvsaieaplcvdtsy wlymsneth	
lt	AYEATRLQPVRTIFIAFNEANGCYLNFFTEMSFOISGANVRAPSRLEQLPDVLGAYPTL	179
ya	AYEATRLQPVRTIFIAFNEANGCYLNFFTEMSFOISGANVRAPSRLEQLPDVLGAYPTL	180
yz	AYEATRLQPVRTIFIAFNEANGCYLNFFTEMSFOISGANVRAPSRLEQLPDVLGAYPTL	180
ja	AYEATRLQPVRTIFIAFNEANGCYLNFFTEMSFOISGANVRAPSRLEQLPDVLGAYPTL	180
hc	AYEATRLQPVRTIFIAFNEANGCYLNFFTEMSFOISGANVRAPSRLEQLPDVLGAYPTL	179
	aye trlqpv rtiafnan ycylnff msfqsiga sr ie lpdvigayptl	
lt	GNLLKTAIYLMRFPEILDAPIPILAKRGVAQFHVITDNRGLPPTWFSMMCGSVSSFVML	239
ya	GNLLKTAIYLMRFPEILDAPIPILAKRGVAQFHVITDNRGLPPTWFSMMCGSVSSFVTL	240
yz	GNLLKTAIYLMRFPEILDAPIPILAKRGVAQFHVITDNRGLPPTWFSMMCGSVSSFVTL	240
ja	GNLLKTAIYLMRFPEILDAPIPILAKRGVAQFHVITDNRGLPPTWFSMMCGSVSSFVTL	240
hc	GNLLKTAIYLMRFPEILDAPIPILAKRGVAQFHVITDNRGLPPTWFSMMCGSVSSFVML	239
	gnllkt iylmr fpeildapiqi kr gva fhvtd nrglpttwfsmcgsvsfv l	
lt	LHNLGNELINGIVG	254
ya	LHNLGNELINGIVG	255
yz	LHNLGNELINGIVG	255
ja	LHNLGNELINGIVG	255
hc	LHNLGNELINGIVG	254
	lhnlg elingivg	

lt: 湖北罗田分离物; ya: 四川雅安分离物 (AJ242490); yz: 江苏扬州分离物 (AJ131982);

ja: 日本分离物 (D86635); hc: 河南潢川分离物 (AF041041); 下同

图 1 WYMV 5 个分离物 28 kDa 蛋白氨基酸序列的比较

因由 762 个核苷酸组成, 与河南潢川分离物^[4]相同, 而与日本^[5]、四川雅安及江苏扬州^[7]分离物不同, 后三个分离物由 765 个核苷酸组成。

同源性比较发现, 湖北罗田分离物 28 kDa 蛋白基因片段与河南潢川、四川雅安、江苏扬州及日本分离物核苷酸序列同源性分别为 94.5%, 93.8%, 95.8% 及 94.5%; 氨基酸序列同源性分别为 92.7%, 97.3%, 96.5% 及 93.7% (表 1)。但湖北罗田和河南潢川分离物在第 326, 327 和 336 位较其余 3 个分离物各缺少 1 nt, 且第 324 和 325 位的碱基不同; 与此相对应, 在氨基酸序列上湖北罗田分离物和中国潢川的第 109 和 110 位间较其余 3 个分离物缺少 1 个氨基酸, 且在第 108-110 位氨基酸存在差异, 由 VVH→APW。罗田分离物的第 157-161 位与四川、江苏及日本 3 个分离物的第 158-162 位氨基酸序列相同, 均为 NVEAF。而潢川分离物的第 157-161 位为 KRRSL, 罗田分离物较其余 4 个分离物仅有 2 个位点的氨基酸存在差异, 即第 79 和 148 位, 分别由 V→I 和 I→T。5 个分离物的 28 kD 和 70 kD 的切割位点均为 G/S (图 1)。

表 1 WYMV 5 个分离物 28 kDa 蛋白基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列同源性 %									
分离物	潢川		雅安		扬州		日本		
	核苷酸	氨基酸	核苷酸	氨基酸	核苷酸	氨基酸	核苷酸	氨基酸	
罗田	94.5	94.5	93.8	97.3	95.8	96.5	94.5	93.7	
潢川			92.3	93.3	93.5	92.5	92.1	89.8	
雅安					94.7	98.4	93.6	95.7	
扬州							96.9	96.5	

氨基酸序列的差异性比较显示 (图 2), 罗田分离物与扬州和雅安分离物的同源性较高, 与日本分离物的同源性其次, 而与潢川分离物的同源性偏低。潢川分离物与其他分离物氨基酸序列的差异性均较大。

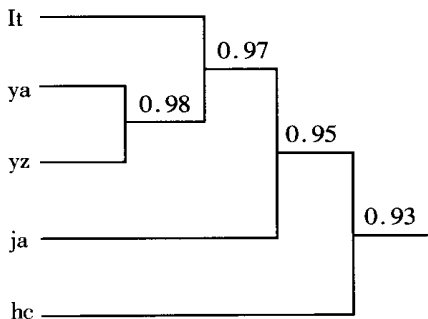


图 2 WYMV 5 个分离物 28 kD 蛋白氨基酸序列的亲缘关系比较

3 讨论

根据推测 28 kD 蛋白可能参与病毒的运动^[4], 但其确切的功能仍不清楚。并且 28 kD 蛋白基因的核苷酸及氨基酸序列上的差异性可能是来源不同的分离物在致病性上差异的基础之一, 氨基酸序列比较显示, 大于 18 氨基酸的几个分离物的共有序列有 4 段, 尤其是近 N 端有 27 氨基酸, 这些共有序列可能是 28 kD 蛋白正常功能所必须。在第 108-110 位, 罗田分离物和潢川分离物有共同的氨基酸序列, 潢川分离物的第 157-161 位氨基酸序列为 KRRSL, 而罗田分离物在同样的位置则与其他 3 个分离物的第 158-162 位相同为 NVEAF, 罗田分离物不同于其他 4 个分离物, 介于潢川与日本、雅安和扬州之间 (图 1)。潢川分离物的 28 kD 蛋白基因的核苷酸及氨基酸序列与其他 4 个分离物的差异性较大, 在进行 CP 基因分析时, 也得到同样结果^[6]。对于 28 kD 蛋白基因与病毒的运动及致病性的关系有待进一步研究。

参考文献:

[1] 李大伟, 韩成贵, 于嘉林, 等. 中国小麦黄花叶病毒 (WYMV) 分布的 RF-PCR 鉴定[J]. 植物病理学报, 1997, 27(4): 303-307.

[2] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南第二版[M]. 北京: 科学技术出版社, 1989.

[3] 侯庆树. 真菌传小麦病毒病研究中几个问题的研讨[J]. 植物病理学报, 1993, 23(2): 97-99.

[4] 于嘉林, 晏立英, 苏宁, 等. 小麦黄花叶病毒基因组核苷酸序列分析[J]. 中国科学(C 辑), 1999, 29(6): 639-644.

[5] Namba S, Kashiwazaki S, Lu X, *et al.* Complete nucleotide sequence of wheat yellow mosaic bymovirus genomic RNAs[J]. Arch Virol, 1998, 143: 631-643.

[6] Han Cheng-gui, Li Da-wei, Yu Jian-lin, *et al.* Wheat yellow mosaic virus widely occurring in wheat in China[J]. Plant Disease, 2000, 84: 627-630.

[7] Chen J, Chen J P, Yang J P, *et al.* Differences of cultivar response and complete sequence analysis of two strains of wheat yellow mosaic bymovirus in China[J]. Plant Pathology, 2000, 49, 370-374.