

马铃薯 X 病毒黑龙江分离物外壳蛋白基因克隆与序列分析

张 威¹, 白艳菊¹, 申 宇¹, 高艳玲¹, 范国权¹, 耿宏伟¹, 王 魏¹, 孟宪欣²

(1. 黑龙江省农业科学院 植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院 作物育种研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:马铃薯 X 病毒(Potato virus X, PVX)是重要的马铃薯病毒之一,几乎分布于全国所有马铃薯种植区域,严重影响马铃薯的产量和品质。对其建立 RT-PCR 分子检测体系以及对其外壳蛋白(CP)基因进行序列分析尤为重要。根据已报道的 PVX 的核苷酸序列设计合成 1 对引物,以带毒植株总 RNA 为模板,应用 RT-PCR 方法,克隆了 PVX 黑龙江分离物(P2)全长 CP 基因序列。序列分析表明:P2 CP 基因全长 711 bp,编码 237 个氨基酸残基,与 GenBank 中 17 个不同分离物的 CP 核苷酸序列同源性和氨基酸序列同源性为 75.5%~96.3%,氨基酸序列同源性为 89.4%~99.2%。依据 PVX CP 氨基酸序列建立系统进化树,将 PVX 不同分离物划分为两大类群,P2 与 PVX 中国分离物亲缘关系较近,同属于类型 II,表现一定的地域相关性。同时,应用该 RT-PCR 分子检测体系进行马铃薯样品检测。

关键词:马铃薯 X 病毒;外壳蛋白;核苷酸;序列分析;亲缘关系

中图分类号:S435.32

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)08-0001-05

中国是世界上马铃薯生产第一大国,然而整体生产水平却低于世界平均水平,我国现阶段马铃薯平均单产是世界马铃薯种植大国荷兰平均单产的 32%^[1],其中最重要的原因是病毒病的发生严重影响了马铃薯的产业发展。

目前侵染马铃薯的病毒有 36 种^[2]。据报道,我国马铃薯生产田中主要病毒为 PVX、PVY、PVS、PLRV、PVA 和 PVM^[3-4]。其中,马铃薯 X 病毒属的(*Potexvirus*)马铃薯 X 病毒(PVX)很容易通过蚜虫、机械接触等方式传播,并且在田间扩散速度较快,几乎分布于所有马铃薯种植区域。虽然,PVX 单独侵染马铃薯时并不造成严重的减产,一般在 10%~30%,但当 PVX 与侵染马铃薯的其它病毒复合侵染时往往造成更大的经济损失,因此,人们对 PVX 的研究更加关注。

黑龙江省发展马铃薯产业具有得天独厚的地理、气候优势,是我国马铃薯重要产区之一。但随

着马铃薯种植年限的增加病毒病危害愈加严重,对黑龙江省马铃薯产业的发展造成了严重影响。要从根本上解决病毒病危害,选择快速、准确、特异性强的病原检测方法尤为重要。常见的检测技术主要有:指示植物检测、血清学检测、分子生物学检测。指示植物检测方法由于耗时长、症状反应受外界条件影响较大等不利因素,在很大程度上降低了鉴定的准确性;血清学 DAS-ELISA 方法虽是目前马铃薯病毒检测通常采用的方法,但此方法不适合休眠薯块检测,必须进行催芽才能检测。当病毒含量较低时 DAS-ELISA 检测结果往往处于临界状态,很难判断检测结果;RT-PCR 分子检测技术是以病毒核酸为基础的检测方法,该方法可快速、准确地检测到植物组织中的病毒,应用广泛。因此,建立适合黑龙江省病毒株系的分子检测技术,可大幅度提高病毒检测的特异性与灵敏度,并可通过序列分析,从基因水平上明确病毒株系的进化关系。

目前,应用 RT-PCR 方法进行马铃薯病毒检测较多,如:耿宏伟等^[5]应用 RT-PCR 技术检测马铃薯 A 病毒,并验证该 RT-PCR 检测体系的灵敏度为 1 pg 的病毒核酸。但多数研究都缺乏对病毒基因序列的分析。现针对黑龙江省 PVX 株系建立了快速、准确、特异性强的 RT-PCR 分子检测体系,克隆了 CP 基因,并与其它 PVX 分离物进行了同源

收稿日期:2010-05-22

基金项目:948 资助项目(2008-Z23);马铃薯产业技术体系资助项目(NCYTX-15);农业科技成果转化资助项目(2008 GB2B200084)

第一作者简介:张威(1981-),女,黑龙江省依安县人,硕士,研究实习员,主要从事分子植物病理学研究。E-mail: weizhang_potato@yahoo.com.cn。

通讯作者:白艳菊(1972-),女,黑龙江省嫩江县人,硕士,硕士生导师,副研究员,从事马铃薯病毒分子检测技术研究。E-mail:yanjubai@163.com。

性比较和系统进化树分析,以期明确不同 PVX 株系的进化关系,同时也为 PVX 早期鉴定、病害普查提供快捷的检测手段。

1 材料与方法

1.1 材料

马铃薯病株采自黑龙江省克山县、讷河县、海伦市等马铃薯产区,应用美国 Adgen 公司生产的 PVX 病毒 DAS-ELISA 检测试剂盒检测为阳性的样品,接种到 PVX 的繁殖寄主心叶烟上,置于温室中,当病毒达到高峰期时采收,−70℃ 保存备用。PVX 的阴、阳性对照由黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所提供。

大肠杆菌 *Escherichia coli* GM109 来自该实验室。dNTP 购自北京鼎国生物技术有限公司;pMD18-T 购自 TaKaRa(大连)公司;TaqDNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、*EcoR* I 和 *Sal* I 购自宝生物工程(大连)有限公司;B 型质粒小样快速提取试剂盒和 B 型小量 DNA 片段快速回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司。引物合成及序列测定委托上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 PVX CP 基因的克隆及序列测定

1.2.1 PVX 特异性引物的设计 根据 GenBank 中已报道的 PVX 核苷酸序列,应用引物设计软件 Primer Premier 6.0 设计合成 1 对扩增 PVX CP 基因全序列引物,其序列为:上游引物 X-CP1:5′ ATGTCAGCACCAGCTAGCA -3′,下游引物 X-CP2:5′ TGGTGGTGGTAGAGTGA-CAA -3′。在上游引物中引入 *EcoR* I 酶切位点,下游引物中引入 *Sal* I 酶切位点。

1.2.2 病毒总 RNA 的提取 参考侯义龙等^[6]的方法提取总 RNA,并稍有改动。取 50 mg 感病组织于 1.5 mL Eppendorf 管中,用液氮研磨,加入 600 μL 提取缓冲液(50 mmol·L⁻¹ pH 8.0 的 TrisCl、140 mmol·L⁻¹ NaCl、10 mmol·L⁻¹ EDTA、1% SDS、2% PVP、10 U RNAsin、2% 巯基乙醇,后 2 种现用现加),离心去渣取上清液;加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液,混匀,离心取上清液;再加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)溶液,混匀,离心取上清液;加入 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ 的 NaAc,混匀,−20℃ 放置 3 h 后;离心,弃上清液,沉淀用 70% 乙醇洗 2 次,再用无水乙醇洗 1 次;真空干燥,溶于 40 μL TE 中,−20℃ 保存备用。

2

1.2.3 RT-PCR 扩增 RT-PCR 反转录体系:9.5 U RNasin、45.0 U RTase、1.1 mmol·L⁻¹ dNTP、2.5 μL 5×buffer,总体积为 10 μL。反转录程序设置:42℃ 1 h,95℃ 5 min,4℃ 5 min。

PCR 反应体系:加入 DNA 模板 4.0 μL、上下游引物各 20.0 ng、1.0 U TaqDNA 聚合酶、2.3 μL 10×buffer、2.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.2 mmol·L⁻¹ dNTP,总体积为 25 μL。反应程序设置:92℃ 2 min;92℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 45 s,4 个循环;92℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s,5 个循环;92℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 45 s,9 个循环;92℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 45 s,9 个循环;72℃ 10 min,4℃ 10 min^[7-9]。PCR 产物采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,并用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段。

1.2.4 目的基因的克隆、序列测定与分析 将 PCR 扩增产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上,转化到通过 CaCl₂ 法^[10]制备的 GM109 大肠杆菌感受态细胞中。挑取抗性单菌落,扩繁后,应用 B 型质粒小样快速提取试剂盒提取质粒,利用 *EcoR* I 和 *Sal* I 对重组质粒进行鉴定。PVX 目的片段委托上海生工生物工程有限公司进行测定,采用 DNASTAR 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 PVX CP 基因的 RT-PCR 扩增

以感染 PVX 的马铃薯叶片总 RNA 为模板,利用 PVX 特异性引物 X-CP1 和 X-CP2 进行反转录和 PCR 扩增,得到长度约为 711 bp 特异性片段,与设计相符(见图 1),而阴性对照无此特异条带。

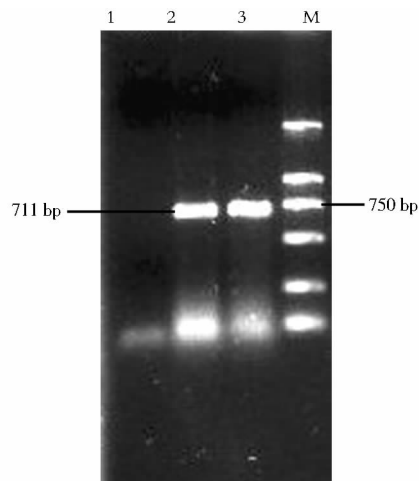


图 1 PVX 的 RT-PCR 扩增结果

1: 阴性对照;2: 阳性对照;3: PVX 的 RT-PCR 产物;
M: DL2000 标准分子量

2.2 PVX CP 基因克隆

为了进一步验证所扩增的目的片段,将其克隆到 pMD18-T 载体后,提取质粒,并进行酶切鉴定。由酶切产物的电泳结果可知(见图 2),重组质粒可酶切出一条大小约 711 bp 的条带,与预期的大小相同,表明外源片段已插入到载体中。

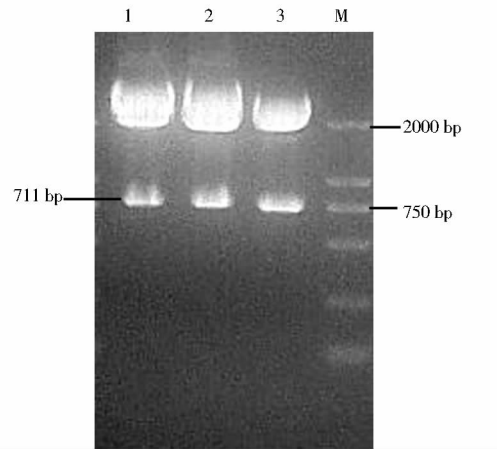


图 2 重组质粒的双酶切鉴定结果

1,2,3:双酶切的重组子;M:DL2000 标准分子量

2.3 PVX CP 基因的序列测定与分析

对重组质粒的插入片段进行序列测定,测序结果经 DNASTAR 软件分析,其长度为 711 bp,可编码 237 个氨基酸,其中 A:203 个、C:202 个、G:165 个、T:141 个,G+C 含量 51.6%。将测得的序列与 GenBank 中不同国家和地区的 PVX 分离物 CP 基因序列进行比较,结果表明,核苷酸序列同源性最高达 96.3%,氨基酸序列同源性最高可达 99.2%,证明成功扩增到 PVX 黑龙江分离物的 CP 基因,将其命名为 P2,在 GenBank 上登录号为 GU373815。

2.4 PVX 不同分离物 CP 核苷酸及氨基酸序列差异分析

对 PVX 的 18 个不同分离物(见表 1)的 CP 核苷酸序列进行同源性比较,结果表明:P2 与 GenBank 中其它 PVX 分离物的 CP 核苷酸序列同源性在 75.5%~96.3%,而 PVX 各分离物的 CP 核苷酸序列同源性在 75.0%~100.0%。根据 CP 核苷酸序列推导对应的氨基酸序列,对 PVX 的 18 个不同分离物 CP 基因的氨基酸序列进行同源性比较分析,结果表明,P2 与 GenBank 中其它 PVX 分离物 CP 氨基酸序列同源性在 89.4%~99.2%,而 PVX 各分离物的 CP 氨基酸序列同源性在 85.5%~100.0%(见表 2)。

表 1 不同 PVX 分离物的来源

分离物编号	国家或地区	作物	genbank 登录号
1	中国黑龙江	马铃薯	GU373815
2	中国浙江	马铃薯	AY512654
3	中国浙江	马铃薯	AF535157
4	中国 贵州	马铃薯	EF063709
5	中国北京	水稻	X65015
6	中国北京	马铃薯	U19790
7	中国河北	马铃薯	DQ315386
8	中国山东	马铃薯	AF528555
9	中国福建	马铃薯	AF485891
10	英国	马铃薯	X88785
11	英国	马铃薯	X88786
12	英国	马铃薯	X88781
13	英国	马铃薯	X88782
14	英国	马铃薯	AF493949
15	日本	马铃薯	D87962
16	埃及	马铃薯	AY763582
17	爱沙尼亚	马铃薯	Z29335
18	阿根廷	马铃薯	Z34261

表 2 不同 PVX 分离物 CP 氨基酸序列比对结果

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1		98.3	98.3	98.3	98.7	97.9	97.9	98.3	97.0	90.3	89.4	89.9	90.7	97.0	98.7	97.0	97.9	99.2
2	1.7		88.5	80.5	85.1	83.0	83.4	83.0	83.6	85.7	82.4	99.7	85.1	82.0	82.2	90.6	98.6	85.8
3	1.7	0.0		100.0	98.7	97.9	97.9	98.3	96.6	90.3	89.8	89.9	90.7	97.0	98.7	97.0	97.9	99.2
4	1.7	0.0	0.0		98.7	97.9	97.9	98.3	96.6	90.3	89.8	89.9	90.7	97.0	98.7	97.0	97.9	99.2
5	1.3	1.3	1.3	1.3		98.9	97.9	98.3	97.0	86.7	89.8	86.3	87.1	97.5	99.2	97.1	98.3	99.6
6	2.1	2.1	2.1	2.1	0.8		97.1	97.5	96.2	85.9	89.0	85.5	86.3	96.6	98.3	96.2	97.5	98.7
7	2.1	2.1	2.1	2.1	1.7	2.6		97.5	96.6	89.9	89.4	89.5	90.3	96.6	99.2	96.2	97.5	98.7
8	1.7	1.7	1.7	1.7	1.3	2.1	2.1		96.6	90.3	90.3	89.9	90.8	97.5	98.7	96.6	97.9	99.2
9	3.0	3.5	3.5	3.5	3.0	3.9	3.5	3.5		90.3	89.4	89.9	90.7	95.4	97.0	96.2	96.2	97.5
10	9.9	9.9	9.9	9.9	9.5	10.4	9.9	9.5	9.9		92.8	98.0	99.6	90.3	91.6	91.2	90.7	91.6
11	11.4	11.0	11.0	11.0	11.0	11.9	11.4	10.5	11.4	7.6		93.2	93.2	89.8	90.3	89.4	89.0	90.3
12	10.4	10.4	10.4	10.4	9.9	10.9	10.4	9.9	10.4	2.0	7.1		98.4	89.5	90.7	90.3	89.9	90.7
13	9.5	9.5	9.5	9.5	9.0	9.9	9.5	9.0	9.5	0.4	7.1	1.6		90.7	92.0	91.6	91.1	92.0
14	3.0	3.0	3.0	3.0	2.6	3.5	3.5	2.6	4.8	10.9	11.0	11.4	10.4		97.5	96.6	97.0	97.9
15	1.3	1.3	1.3	1.3	0.8	1.7	0.8	1.3	3.0	9.0	10.5	9.5	8.5	2.6		97.5	98.3	99.6
16	3.0	3.0	3.0	3.0	2.6	3.4	3.4	3.0	3.9	9.5	11.4	9.9	9.0	3.5	2.6		96.6	97.9
17	2.1	2.1	2.1	2.1	1.7	2.6	2.6	2.1	3.9	9.9	11.4	10.4	9.5	3.0	1.7	3.5		98.7
18	0.8	0.8	0.8	0.8	0.4	1.3	1.3	0.8	2.6	9.0	10.5	9.5	8.5	2.1	0.4	2.1	1.3	

注:右上方为序列同源性,左下方为序列变异度。

依据 PVX 的 CP 氨基酸序列建立的系统进化树,可将 PVX 不同分离物划分为两大类群(见图 3):其中 X88781、X88782、X88785 和 X88786 可划分为类型 I, PVX 黑龙江分离物 P2 和其余

13 个分离物可划分为类型 II, 类型 II 与类型 I 中各分离物的 CP 氨基酸序列同源性在 85.5%~92.0%。P2 与 PVX 中国分离物表现较近的亲缘关系,表现一定的地域相关性。

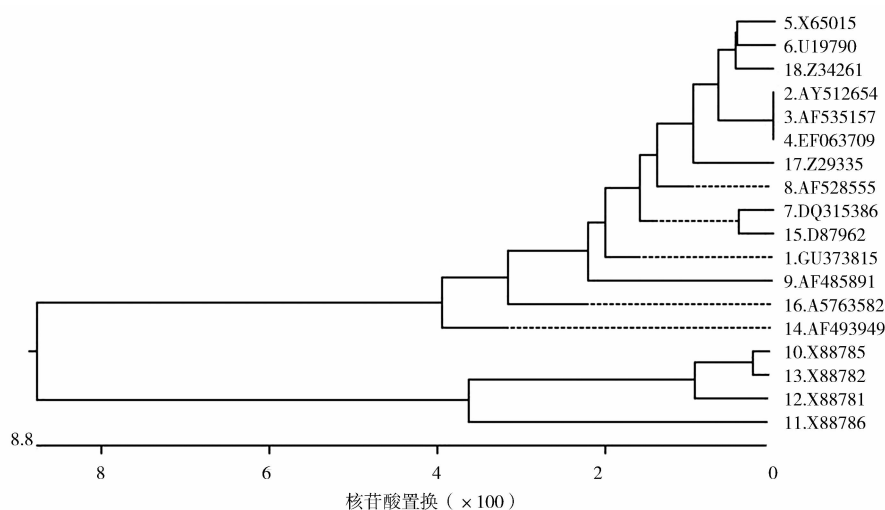


图3 不同PVX分离物CP氨基酸序列遗传进化树状图

2.5 应用 PVX 的 RT-PCR 分子检测体系进行样品检测

应用建立的 PVX 的 RT-PCR 体系对感染 PVX 的马铃薯样品进行 RT-PCR 扩增均得到了长度约为 711 bp 特异性片段。同时,应用该检测体系对感染有 PVX 的马铃薯休眠薯块进行检测,结果得到长度约为 711 bp 特异性片段,阴性对照和水对照均无此特异条带。

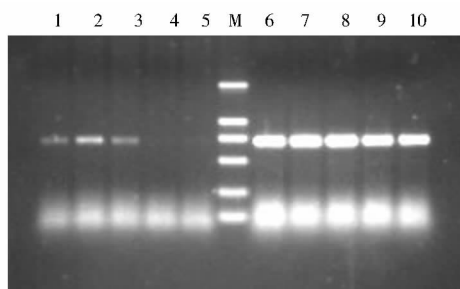


图4 马铃薯样品PVX的RT-PCR电泳结果

1,2:马铃薯休眠薯块 RT-PCR 产物;3:阳性对照;4:阴性对照;5:水对照;M:DL2000 标准分子量;6,7,8,9,10:马铃薯样品 TR-PCR 产物

3 结论与讨论

该试验建立了 PVX 黑龙江分离物的 RT-PCR 分子检测体系以检测马铃薯休眠薯块中的 PVX 病毒,克服了 DAS-ELISA 检测方法将薯块

进行催芽的繁琐程序;同时,应用该体系对感染 PVX 的马铃薯样品进行了 RT-PCR 扩增均得到了长度约为 711 bp 的特异片段。可见,PVX 黑龙江分离物的 RT-PCR 分子检测体系的特异性和灵敏度都很高,重复性很好,可以用于大批量样品的检测。

同时,通过克隆 P2 的全长 CP 基因序列,并对 PVX 的 18 个不同分离物的 CP 基因进行了同源性比较和系统进化树分析,结果表明:P2 与 GenBank 中其它 PVX 分离物的 CP 核苷酸序列同源性在 75.5%~96.3%,氨基酸序列同源性在 89.4%~99.2%。依据 PVX 的 CP 氨基酸序列建立的系统进化树,将 PVX 不同分离物划分为两大类群:P2 与 PVX 中国分离物表现较近的亲缘关系,表现一定的地域相关性。

近年来,许多研究证明,PVX 的 CP 基因在决定 PVX 与植物抗病基因互作方面起重要作用。CP 可作为激发子使马铃薯产生 HR、ER(极端抗病性)反应,CP 基因核苷酸序列的变化(所编码氨基酸序列的变化)导致不同的寄主症状反应类型^[11-12]。因此,该研究对 PVX 的 CP 基因序列的分析将有助于对 PVX 的分类研究。也为进一步扩增 PVX 的基因组全序列、了解 PVX 的变

异与环境之间的关系、致病性分化等奠定基础^[13-15]。

参考文献:

- [1] 张威,白艳菊,高艳玲,等. 马铃薯主产区病毒病发生情况调查[J]. 黑龙江农业科学,2010(4):71-73.
- [2] Slack S A, German T L. Disease caused by viruses and viroids[J]. Phytopathology Society,2001,8(1):57-62.
- [3] 李芝芳. 中国马铃薯主要病毒图鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2004.
- [4] 库尔斯塔克. 植物病毒比较诊断指南[M]. 裴美云,译. 北京:农业出版社,1991.
- [5] 耿宏伟,白艳菊,范国权,等. 应用 RT-PCR 技术检测马铃薯 A 病毒[J]. 中国马铃薯,2009,23(6):329-332.
- [6] 侯义龙,张开春,吴禄平,等. 果树组织中总 RNA 提取的新方法[J]. 沈阳农业大学学报,2002,33(2):122-125.
- [7] Zhang Yun, Guo Dong-chun, Lin Ming, et al. Characterization of M-class genome segments of Muscovy duck reovirus S14[J]. Virus Research,2007,125:42-53.
- [8] Rouis S, Lafaye P, Jaoua-Aydi L, et al. Cloning and expression of functional single-chain Fv antibodies directed against NIa and coat proteins of potato virus Y[J]. Journal of Virological Methods,2006,137:1-6.
- [9] Nie X, Singh R P. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods,2000,86:179-185.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(上、下册)[M]. 3 版. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等. 译. 北京:科学出版社,2002.
- [11] Goulden M G, Kohm B A, Cruz S S, et al. A feature of the coat Protein of potato virus X affects both induced virus resistance in potato and viral fitness[J]. Virology,1997,231:35-42.
- [12] 曲静,朱常香,温孚江,等. 一个马铃薯 X 病毒分离物的外壳蛋白基因序列分析与株系鉴定[J]. 植物保护学报,2003,30(4):358-364.
- [13] Atreya C D. Application of genome sequence information in potyvirus taxonomy[J]. Archives of Virology,1992,5:17-23.
- [14] Brunt A A. The general properties of potyvirus[J]. Archives of Virology,1992,5:3-16.
- [15] Tsuneyoshi T, Sumi S. Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassay[J]. Phytopathology,1996,86:253-259.

Cloning and Sequences Analysis of CP Gene of Potato Virus X Heilongjiang Isolate

ZHANG Wei¹, BAI Yan-ju¹, SHEN Yu¹, GAO Yan-ling¹, FAN Guo-quan¹,
GENG Hong-wei¹, WANG Wei¹, MENG Xian-xin²

(1. Plant Virus-free Seeding Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Potato virus X(PVX) is the important virus disease in potato, distributing nearly in all the potato planted area, can affect the yield and quality of potato seriously, so erecting RT-PCR molecule detecting system and CP sequence analysing are important. A pair of primers was designed based on the reported CP gene of PVX the whole CP gene sequence of PVX Heilongjiang isolate was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). The analysis of sequence showed that: The CP gene of P2 was made up of 711 nucleic acids, coding 237 amino acids. The CP nucleic acid sequence homology of P2 and other 17 isolates of PVX in GenBank was between 75.5%~96.3%, the CP amino acid sequence homology was between 89.4%~99.2%. The phylogenetic tree which established based on PVX CP amino acid was clustered into two groups, P2 has nearer sibship with the isolates of China, both in II group, they represented region correlation. Finally, using the RT-PCR detection system to detect potato virus.

Key words: potato virus X; coat protein; amino acids; sequence analysis; sibship

欢迎刊登广告信息