

# 马铃薯 Y 病毒黑龙江分离株外壳蛋白基因克隆及序列分析

耿宏伟<sup>1</sup>, 郭怡璠<sup>2</sup>, 万书明<sup>1</sup>, 范国权<sup>1</sup>, 魏 琪<sup>1</sup>, 高艳玲<sup>1</sup>, 张 威<sup>1</sup>

(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:**为研究马铃薯 Y 病毒的检测方法, 参考 GenBank 中马铃薯 Y 病毒的全基因序列, 应用 Primer 6.0 引物软件设计并合成了一对特异性引物 PVYF、PVYR, 利用 RT-PCR 方法对 PVY 病毒黑龙江分离株 CP 基因进行特异性扩增, 对扩增片段进行序列测定并进行序列比对。结果表明: 引物 PVYF、PVYR 可以扩增出包含 PVY 病毒 CP 基因全长的 cDNA 特异性片段, 序列分析结果表明 PVY 病毒黑龙江分离株 CP 基因与 GenBank 上的 40 个不同 PVY 病毒分离株的 CP 基因氨基酸序列同源性的 92.1%~97.4%, 说明 PVY 病毒 CP 基因保守性较高, 可以用作制备 PVY 病毒血清型检测方法的抗体基因。

**关键词:**RT-PCR; 马铃薯 Y 病毒; 序列分析

**中图分类号:**S532 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)02-0011-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.02.00011

马铃薯 Y 病毒(PVY)是马铃薯病毒病发生并导致马铃薯严重退化的最主要病毒之一, 它广泛存在于马铃薯种植区, 其寄主有茄科、菊科以及豆科植物等, 在马铃薯上可以引起严重花叶或坏死斑点和条纹, 会导致马铃薯种薯质量下降, 影响马铃薯产量, 严重时可使马铃薯减产 80% 以上, 给马铃薯生产造成了巨大损失<sup>[1]</sup>, 同时也在世界范围内造成了严重的经济损失。

PVY 病毒是马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae)马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)的成员, 其病毒粒子呈线状、弯杆形, 大小 730 nm×11 nm, 呈螺旋对称, 螺距 34 nm, 颗粒含有大约 5% 的核酸和 95% 的蛋白质, 血清学反应较明显。PVY 病毒颗粒含有约 10 kb 的单链正义 RNA 基因组, 通过对 PVY 全核苷酸序列进行分析得知, 基因所编码的蛋白自 5' 端至 3' 端分别是辅助蛋白(HC)、胞质内含体蛋白(CI)、基因组连接蛋白、两个核内含体蛋白即蛋白酶和复制酶及位于 3' 非翻译区上游的外壳蛋白(CP), 其中, CP 蛋白是病毒的主要免疫原性蛋白, 保守性也最高<sup>[2-4]</sup>。

对于 CP 基因而言, 我国不同地理来源的分离物存在着很大的差别, 为了明确不同地区分离物的分子差异以及进化关系, 对其进行血清学检测方面的研究, 本研究利用基于分子生物学的 RT-PCR 技术对 PVY 病毒黑龙江分离株 CP 基因进行扩增, 并对扩增片段进行序列测定后与 GenBank 上其它地区分离的 PVY 病毒 CP 基因进行氨基酸序列比对分析, 确定了 PVY 病毒黑龙江分离株 CP 基因与其它地区 PVY 病毒分离株 CP 基因的高度保守性, 为下一步单克隆抗体的制备奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为感染 PVA、PVS、PVY 病毒的阳性样品, 由农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心(哈尔滨)提供。含有 PVY 病毒黑龙江分离株(HLJY1)的马铃薯样品, 采自黑龙江马铃薯主产区。脱毒试管苗, 由黑龙江省脱毒马铃薯工程中心提供<sup>[5]</sup>。试验所用仪器为 ND-1000 型紫外分光光度计、PCR 仪和离心机等。PCR 扩增引物由上海生物工程公司合成。其中, 上游引物 PVA-F: 5'-CAACTCCAGATGGAACAATTG-3'; 下游引物 PVA-R: 5'-CAGGAAAAGC-CAAAATACTTACTGC-3', 其扩增 PVY 病毒片段长度为 1 451 bp。

收稿日期: 2014-11-24

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C201120); 2010 年黑龙江省农业科学院青年基金资助项目; 哈尔滨市科技创新人才资助项目(2014RFQYJ050)

第一作者简介: 耿宏伟(1982-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 博士, 副研究员, 从事马铃薯病害分子生物学研究。E-mail: hongwei-geng@163.com。

## 1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及反转录 称取 100 mg 样品叶片,在液氮中迅速研磨成粉末<sup>[6]</sup>,然后加入 1.0 mL TRIZOL 研磨成匀浆组织。按 TRIZOL 植物总 RNA 提取方法提取 RNA,利用无 RNase 的灭菌双蒸水溶解所提取的 RNA 分装备用,于  $-70^{\circ}\text{C}$  冻存。

向 EP 管中首先加入  $1\ \mu\text{L}$   $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的下游引物,  $2\ \mu\text{L}$  模板 RNA(浓度为  $1\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ),于  $95^{\circ}\text{C}$  5 min,  $4^{\circ}\text{C}$  10 min 处理后,分别加入  $4\ \mu\text{L}$   $25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{MgCl}_2$ ,  $4\ \mu\text{L}$   $5\times$  反转录 Buffer,  $2\ \mu\text{L}$  dNTP(浓度为  $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $1\ \mu\text{L}$  反转录酶,  $0.5\ \mu\text{L}$  RNA 酶抑制剂(40 U),利用无 RNase 灭菌双蒸水将总体积调至  $20\ \mu\text{L}$ ,瞬时离心混匀。反应程序为:  $42^{\circ}\text{C}$  60 min,  $95^{\circ}\text{C}$  5 min,  $4^{\circ}\text{C}$  10 min<sup>[7]</sup>。

1.2.2 PCR 扩增及基因克隆 PCR 体系为  $25\ \mu\text{L}$ ,在 EP 管中加入  $2\ \mu\text{L}$  cDNA,  $0.5\ \mu\text{L}$  的上游引物( $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $0.5\ \mu\text{L}$  的下游引物( $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $2\ \mu\text{L}$  dNTP ( $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $2.5\ \mu\text{L}$   $10\times$  PCR Buffer,  $2.0\ \mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ (浓度为  $25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $0.5\ \mu\text{L}$  rTaq DNA 聚合酶( $5\ \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ),  $15\ \mu\text{L}$  灭菌双蒸水。PCR 反应程序:  $92^{\circ}\text{C}$  2 min;  $92^{\circ}\text{C}$  30 s,  $62^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 4 个循环;  $92^{\circ}\text{C}$  30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 5 个循环;  $92^{\circ}\text{C}$  30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 9 个循环;  $92^{\circ}\text{C}$  30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 9 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min,  $4^{\circ}\text{C}$  10 min<sup>[8-10]</sup>。

分别测定所提取 RNA 在 230、260 和 280 nm 的 OD 值,计算  $A_{260}/A_{230}$ 、 $A_{260}/A_{280}$  及 RNA 的浓度,数据统计由 ND-1000 型紫外分光光度计自动生成。

取 RT-PCR 产物  $10\ \mu\text{L}$  在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色后,在凝胶成像仪下拍照,与 DNA Marker 比较,分析产物大小。

1.2.3 TA 克隆及重组质粒的构建 回收 RT-PCR 产物,与 pMD18-T 载体连接,转化于大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中构建重组质粒。待 LB 培养基中形成单菌落,选取若干,并提取质粒,经 PCR 鉴定后用于测序。

1.2.4 序列测定及分析 鉴定后的阳性重组质粒送往上海生物工程公司测序。利用分子生物学

软件 DNASTar 进行核苷酸序列同源性分析及比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 浓度及纯度分析

研究表明,  $A_{260}/A_{230}$  值介于 2.0~2.4,说明盐类小分子的污染较少;  $A_{260}/A_{280}$  值介于 1.8~2.0,说明所提取的总 RNA 中没有蛋白质及其它有机溶剂的污染。本试验所提取的 RNA 样品  $A_{260}/A_{230}$  值为 2.00~2.08,其纯度较高、完整性较好,可用于下一步 RT-PCR。

### 2.2 RT-PCR 结果分析

由图 1 可见,通过引物 PVYF 和 PVYR 的 PCR 扩增,从感染 HLJY1 毒株的马铃薯样品和 PVY 阳性样品中均扩增出一条 1 451 bp 的特异性片段,而脱毒试管样品和感染 PVA、PVS 病毒的阳性样品中未扩增出任何片段,与试验预期结果一致。

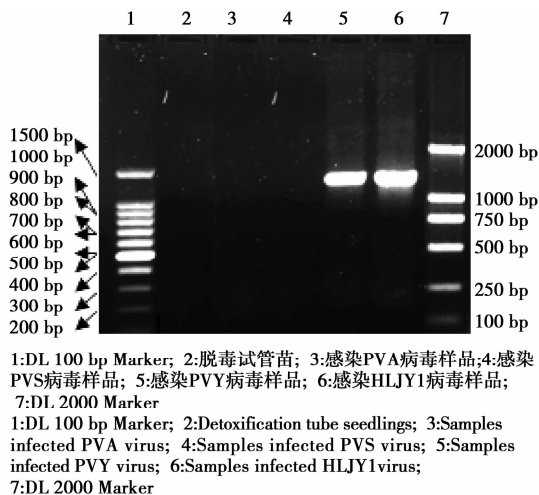


图 1 RT-PCR 特异性电泳图

Fig. 1 Sepcific amplification results

### 2.3 CP 基因氨基酸序列分析

由图 2 可见,应用 DNASTar 软件的 Clustal W 方法,将 HLJY1 毒株的 CP 基因与 GenBank 上发表的 40 个不同区域 PVY 毒株 CP 基因进行序列比对分析。结果表明,HLJY1 毒株的 CP 基因由 267 个氨基酸组成,与其它毒株氨基酸同源性在 92.1%~97.4%。同时,各 PVY 毒株 CP 基因之间的氨基酸同源性高达 90% 以上。说明 PVY 病毒黑龙江分离株 CP 基因与其它地区 PVY 病毒分离株 CP 基因的高度保守性,同时也表明 CP 基因可以用作制备检测 PVY 病毒单克隆抗体的首选基因。



Fig. 2 Homology comparison of encoding amino acid of different PVY strain CP gene

目前,传统生物学手段鉴定马铃薯病毒方法仍在使用,其中观察指示植物在接种病毒后的症状表现是鉴别病毒种类的主要标准之一,此方法稳定但时间长。目前普遍应用的酶联免疫吸附试验(ELISA)方法由于受各种不确定因素影响易出现假阳性,而影响了检测结果的准确性。国际上通用的马铃薯病毒病的鉴定方法是以免疫血清学单克隆抗体为基础的 ELISA<sup>[11-12]</sup>。自 Kohler 和 Milstein 于 1975 年创立单克隆抗体技术以来<sup>[13]</sup>,其日臻成熟,无论是抗原制备、免疫方法,还是从融合的过程直至单克隆抗体杂交瘤细胞的筛选方法,都已积累了十分丰富的经验。利用单克隆抗体建立的 ELISA 方法,有利于对病毒的检测及遗传背景进行分析,从而对抗病育种的研究提供充分而又准确的数据,同时,可利用其开发出稳定可靠的 ELISA 检测产品,且具有很大的应用价值。此外,马铃薯 Y 病毒主要危害马铃薯及烟草等作物,可能造成作物严重的经济损失,因此,马铃薯 Y 病毒的克隆对于选育抗 PVY 感染的作物品种对于该病毒的控制也具有重要的意义。

- [1] 高秀妍,高艳玲,耿宏伟,等.马铃薯Y病毒黑龙江分离物系统鉴定[J].中国马铃薯,2009,23(1):11-14.
- [2] Salazar L F. Potato viruses and their control[J]. International Potato Center, Lima, Peru, 1996:6-16.
- [3] Hu Xiaojun, Alexander V K, Celeste J B, et al. Sequence characteristics of potato virus Y recombinants[J]. Journal of General Virology, 2009, 90:3033-3041.
- [4] Astier-Manificier, Francine Casse-Delbart. Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA[J]. Journal of General Virology, 1989, 70:935-947.
- [5] 白艳菊,李学湛,何云霞,等.优质、低成本工厂化生产马铃薯脱毒试管苗[J].中国农学通报,2001,17(2):82-83.
- [6] 张威,张匀华,李学湛,等.应用RT-PCR分子检测技术快速检测大蒜普通潜隐病毒[J].植物保护,2008,34(1):133-137.
- [7] 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(6):329-331.
- [8] Zhang Y, Guo D, Geng H, et al. Characterization of M-class genome segments of Muscovy duck reovirus S14[J]. Virus Research, 2007, 125:42-53.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Gugerli P. Potato virus A and potato leafroll virus: purification, antiserum production and serological detection in potato and test plants by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) [J]. Journal of Phytopathology, 1979, 96(2):97-107.
- [12] Donald J G, Kristjansson G T, Singh R P, et al. Consecutive ELISA screening with monoclonal antibodies to detect potato virus YN[J]. American Journal of Potato research, 1994, 71(3):175-183.
- [13] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256:495-497.

# 红花花瓣总 RNA 提取方法的比较研究

张 雪<sup>1,2</sup>, 官丽莉<sup>1,2</sup>, 韩怡来<sup>2</sup>, 杨 晶<sup>1,2</sup>, 杜林娜<sup>1,2</sup>, 李校堃<sup>1</sup>

(1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

**摘要:**红花花瓣富含多糖、多酚和花色素苷等次生代谢产物,严重影响花瓣总 RNA 的提取。为探索适合红花花瓣总 RNA 的提取方法,以 4 种红花不同时期的花瓣为材料,通过对 4 种 RNA 提取方法,即 RNA 提取试剂盒、RNAiso Plus 试剂法、改良的 CTAB 法和 SDS 法进行比较研究。结果表明:RNAiso Plus 试剂法效果最好,提取的总 RNA 完整性好,纯度高、浓度高。通过 RT-PCR 验证,所提取的 RNA 达到基因克隆和实时定量 PCR 等分子生物学实验要求。

**关键词:**红花;总 RNA 提取;RNAiso Plus 试剂法

**中图分类号:**S532 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)02-0014-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.02.0014

红花(*Carthamus tinctorius* L.)是我国传统的中草药,又叫草红花、金红花,为一、二年生菊科植物红花的管状花,又是新型的油用植物和工业用植物,经济价值高,具有较大的开发潜力,是我国各地都有待开发的经济作物。红花黄色素(safflor yellow,

SY)是红花的主要有效成分之一,是以红花花瓣为原料,利用现代生物技术提取而成的天然色素。研究表明,红花黄色素具有扩张血管、改善心肌供血、抑制血小板聚集、抑制血栓形成、修复血管内皮损伤及抗氧化等多种药理作用<sup>[1-5]</sup>,被广泛应用在冠心病、高血压、脑梗塞、抗肿瘤、糖尿病并发症和慢性肾病等疾病上<sup>[6]</sup>。本课题前期研究发现,红花花瓣在不同开花时期红花黄色素含量不同,然而对于这种变化的分子机制尚不明确,相关工作有待进一步开展。

从不同的组织和器官当中提取出纯度高、完整性好的 RNA 是进行 Northern 分析、实时定量 PCR、cDNA 文库构建和转录组测序等许多分子生物学研究的必要前提<sup>[7]</sup>。但是由于植物的种类繁

收稿日期:2014-10-13

**基金项目:**国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2011AA100606);国家自然科学基金资助项目(31201237, 31101172);吉林省科技厅中青年领军人才及优秀创新团队资助项目(20111815);教育部博士点基金-青年教师基金资助项目(20122223120002)

**第一作者简介:**张雪(1988-),女,吉林省长春市人,在读硕士,从事植物生物反应器研究。E-mail:383237154@qq.com。

**通讯作者:**李校堃(1964-),男,吉林省长春市人,博士,教授,博士生导师,从事生物反应器与药物开发研究。E-mail:xi-aokunli@163.com。

## Cloning and Sequences Analysis of Heilongjiang Isolate Potato Virus Y CP Gene

GENG Hong-wei<sup>1</sup>, GUO Yi-fan<sup>2</sup>, WAN Shu-ming<sup>1</sup>, FAN Guo-quan<sup>1</sup>, WEI Qi<sup>1</sup>, GAO Yan-ling<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>

(1. 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:** For the research of potato virus Y, pair of primers PVYF, PVYR were designed according to the complete genome of potato virus Y (PVY) in GenBank, the PVY CP gene was amplified from strain isolated from Heilongjiang. After that, the information of amino acid sequences with computer technology was studied. The RT-PCR results showed that the primers could be amplified the CP gene fragment. The analysis of sequence result showed that the CP gene amino acid homology of Heilongjiang isolate and other 40 isolates of PVY in GenBank were 92.1%~97.4%, CP gene was highly conserved that could be used as antibody gene to detect the PVY virus.

**Keywords:** RT-PCR; potato virus Y; sequences analysis

(该文的作者还有申宇、张抒、邱彩玲、董学志,单位同第一作者,麻琳,单位为黑龙江省现代农业示范区管理委员会)