

[文章编号]1000-2782(2000)05-0070-06

葡萄卷叶伴随病毒Ⅲ基因的克隆及序列分析

张满良¹, 朱水芳², 赵冬兰¹

(1 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨陵 712100; 2 农业部 植物检疫研究所, 北京 100008)

S436.631.1
Q78

[摘要] 根据葡萄卷叶伴随病毒Ⅲ美国分离物的 GLRaV-3CP 基因序列, 设计并合成了 1 对该病毒的 PCR 引物, 利用 IC-RT-PCR 成功地检查到合适大小的 PCR 产物; 同时将 PCR 产物克隆到中间载体 PGEM-3Zf 上, 转化大肠杆菌 DH5 α 菌株, 筛选阳性克隆。通过双酶切以及序列分析表明, 扩增样品与美国分离物的同源性为 94.1%。

[关键词] GLRaV-3; CP 基因; 克隆; 序列分析

[中图分类号] S463.631.1+9

[文献标识码] A

葡萄卷叶伴随病毒Ⅲ 葡萄卷叶病

葡萄卷叶病(Grapevine leafroll disease)是葡萄上一种重要的病毒病害。现已研究表明引起该病的病毒很多, 目前国际上承认的已有 5 种。葡萄卷叶伴随病毒Ⅲ(GLRaV-3)是其中最主要的一种, 它分布最广泛, 造成的经济损失最大, 而且也是这几种病毒中唯一具有自然介体的一种病毒^[1~3]。国内尚未见对该病毒 CP 基因的 IC-RT-PCR 扩增以及产物的克隆和序列分析的报道, 本研究对 GLRaV-3 基因进行克隆及序列分析, 以为该病毒 CP 基因的表达, 制备高效价的 CP 抗体, 以及为抗 GLRaV-3 转基因葡萄的培育和其分子生物学的深入研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

带有葡萄卷叶伴随病毒的葡萄苗由农业部植物检疫研究所提供。该病毒的 CP 抗血清由美国康乃尔大学赠送。大肠杆菌 *E. Coli* BL21 和质粒 PET-30a 由农业部植物检疫研究所提供。质粒 PGEM-3Zf(+) 购自 Promega 公司。

1.2 IC-RT-PCR 扩增

按文献[4]的方法进行, 但作了部分改进。对经 ELISA 和 ISEM 检测的葡萄卷叶伴随病毒Ⅲ阳性样品的叶片, 去掉叶肉后留叶脉, 加液氮后研粹。为了得到浓度较大的病毒溶液, 先进行抗血清诱捕, 然后进行病毒纯化和浓缩。

1.2.1 cDNA 的合成 根据报道的 GLRaV-3 的 CP 基因序列, 设计并合成 PCR 的 5' 引物(3H)和 3' 引物(3C)。

3H: 5'-A T C A T A T G A T G G C A T T T G A A C T G A A A T T-3'

3C: 5'-A T G G A T C C T A T A A G C T C C C A T G A A T T A T-3'

[收稿日期] 2000-06-27

[基金项目] 国家“九五”重点科技攻关项目(96-004-05-08)

[作者简介] 张满良(1943-), 男, 副教授。

取病毒RNA 2 μL ,引物3C 2 μL ,加灭菌去离子水 4 μL ,在沸水中变性 5 min,立即置于冰上 2 min,然后室温放置 30 min,使引物与病毒RNA退火。再将以下试剂加入反转录体系:稀释5倍的1st strand buffer 4 μL ;10 mmol/L dNTP 2 μL ;0.1 mol/L DTT 2 μL ;0.3 mol/L ME 2 μL ;M-MLV(200 g/L) 1 μL ;rRNasin inhibitor(40 g/L) 1 μL ,将以上试剂在离心管中混匀,42 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。

1.2.2 PCR扩增 PCR反应在50 μL 体积中进行。取离心管编号,按下列体系加样:双氧水 39.5 μL ;稀释10倍的PCR缓冲液 5 μL ;10 mmol/L dNTP 1 μL ;引物3H 1 μL ;引物3C 1 μL ;cDNA模板 2 μL ;Taq DNA聚合酶(5 g/L) 0.5 μL 。混匀后,加50 μL 矿物油。按下列程序运行:

94 $^{\circ}\text{C}$	180 s	1 cycle
94 $^{\circ}\text{C}$	160 s	} 40 cycle
52.5 $^{\circ}\text{C}$	45 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	90 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	300 s	1 cycle

1.2.3 PCR产物分析 用质量分数为1%琼脂糖凝胶电泳。取8 μL PCR产物加1 μL 凝胶加样缓冲液混匀后点样,以3~5 V/cm的电压电泳,直至溴酚兰迁移至2/3处时结束电泳,溴乙锭染色 30 min,紫外灯下观察结果,用宝丽来胶片照像。

1.3 PCR产物的克隆

1.3.1 PCR产物的平端连接 先将引物3H,3C用 T_4 多核苷酸激酶进行磷酸化。100 $\mu\text{mol/L}$ 引物 6 μL ,稀释10倍的 T_4 DNA激酶缓冲液 3 μL ,10 mmol/L ATP 3 μL , T_4 DNA kinase (10 g/L) 1 μL ,DDW 17 μL ,加样后 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h,然后 75 $^{\circ}\text{C}$ 5 min灭活 T_4 DNA (kinase)。用磷酸化引物扩增上述合成的cDNA,扩增程序同上。

质粒PGEM-3Zf(+)用 Sma I线性化,用小肠碱性磷酸化酶(CIP)去磷酸化。取2~5 μg 质粒在20 μL 总体积中,用 Sma I (10 g/L) 1 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 2 h,再加等量的 Sma I,37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h。质量分数为1%琼脂糖电泳检测是否酶解完全,酶解完全的质粒加入5 μL 稀释10倍的CIP缓冲液,1 μL CIP,加蒸馏水至50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,再加1 μL CIP,37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,90 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。加SDS至终质量浓度为5 mg/L,蛋白酶K 10 mg/L,37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,酚抽提 1次,酚/氯仿抽提 1次。乙醇沉淀,适量的TE缓冲液(pH 8.0)悬浮。

磷酸化PCR产物与去磷酸化的质粒按1:1用 T_4 DNA连接酶进行平端连接。取100 ng PCR产物加100 ng去磷酸化的线性质粒,补足灭菌水至总体积为8 μL ,45 $^{\circ}\text{C}$ 5 min立即置于冰上,加入1 μL 预冷至0 $^{\circ}\text{C}$ 的稀释10倍的 T_4 DNA连接酶缓冲液,1 μL T_4 DNA连接酶,于16 $^{\circ}\text{C}$ 连接12~16 h。

1.3.2 氯化钙法制备新鲜大肠杆菌感受态细胞 按文献[5]的方法进行。

1.3.3 连接产物转化大肠杆菌DH 5 α 用Amp⁺和半乳糖苷酶的底物X-gal进行互补筛选。方法是取连接反应产物5 μL 与200 μL 感受态细胞悬液在离心管中混匀,冰浴放置30 min,同时做不加质粒的对照。然后将离心管放置于40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴60 s,迅速取出放到冰上1~2 min。取无菌试管,每管加入800 μL SOC液体培养基,并将200 μL 上述细菌全部转

入试管中,37℃缓慢振荡培养60 min。在每个含100 mg/L Amp⁺的SOB琼脂平板上均匀涂布X-gal(50 g/L)20 μL,然后取上述培养物100 μL均匀涂布于平板上,37℃温箱培养过夜。挑选生长良好的白色单菌落划线于含Amp⁺的LB固体培养基上,37℃温箱培养过夜。

1.3.4 克隆质粒的快速裂解和鉴定 经筛选的白色单菌落先在含Amp⁺的LB培养板上划线培养,备用。挑出少量划线培养的菌落(或单菌落)于50 μL的细菌抽提液中悬浮均匀,然后于100℃处理2 min,立即置于冰上5 min,1 000 r/min离心1 min,取1 μL上清液进行PCR扩增(PCR扩增程序同上)。根据PCR扩增结果挑选特异性好的克隆,进一步分析插入片段的长度以及核苷酸序列。本试验挑选的2个克隆为GK-1和GK-2。

1.3.5 克隆GK-1和GK-2的分析 质粒的提取按文献[6]的方法进行。插入片段的长度确认是取提纯的质粒DNA 5~10 μg,加入酶BamH I和Nde I各1 μL,缓冲液D 2 μL,加入DDW至总体积20 μL,37℃4 h,电泳检测酶解结果。

1.3.6 核苷酸序列分析 克隆GK-1的核苷酸序列分析由中科院微生物所测试中心完成。

2 结果与分析

2.1 葡萄卷叶伴随病毒IC-RT-PCR扩增

试验用2个引物对经ELISA和ISEM检测的阳性样品进行IC-RT-PCR扩增,产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果扩增出了长1 kb左右的特异性带,与预期结果相一致,而且阴性对照无任何带出现,表明PCR扩增是特异的。

GLRaV-3是1种RNA病毒,在植物中含量很低,只存在于维管束组织,故该病毒很难提取。加上葡萄植株中的多糖和多酚类物质较其他植物高得多,提取的核酸很不干净,常含有许多抑制物质,用一般的RT-PCR方法很难使GLRaV-3的CP基因得到扩增。笔者也试图直接提取核酸进行RT-PCR,结果没有扩增产物。试验所用的IC-RT-PCR(immuno-capture reverse transcription PCR)较一般的RT-PCR方法灵敏度高,而且不用提取核酸。

试验所用的引物3H和3C是根据GLRaV-3的美国分离物的核苷酸序列设计的。选择扩增的片断长度为1 033 bp,包括编码该病毒CP基因的939 bp及其CP基因3'端的I段侧翼序列。为了克隆和表达的需要,笔者设计引物时还加上Nde I和BamH I 2个限制性内切酶的酶切位点。

2.2 PCR产物克隆

样品用磷酸化的引物进行扩增,磷酸化的PCR产物经T₄DNA连接酶平头插入去磷酸化的质粒PGEM-3Zf(+)的Sma I位点,转化可编码缺陷型β-半乳糖苷酶的大肠杆菌DH 5α,用氨苄青霉素(Amp⁺)和半乳糖苷酶的底物X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷)进行筛选。大肠杆菌DH5α编码β-半乳糖苷酶C端部分序列。质粒PGEM-3Zf(+)是由PUC质粒系列衍生而来的,故该质粒也带有1个含有β-半乳糖苷酶基因(LacZ)的调控序列和头146个氨基酸编码信息的大肠杆菌DNA短区段。这个编码区中插入了1个多克隆位点,但它并不破坏阅读框。宿主和质粒编码的片断各自都没有酶活性,但它们可

以融为一体形成具有酶活性的蛋白质。这种现象称为 α -互补。有互补产生的 $lacZ^+$ 细菌在生色底物 X-gal 存在的培养基上生成兰色菌落,然而当外源 DNA 片段插入到质粒的多克隆位点后,不可避免地导致产生无互补能力的氨基端片段,因而带重组质粒的细菌在含 X-gal 的培养基上将形成白色菌落。另外 PGEM-3Zf(+) 还含有 1 个抗氨苄青霉素的基因 (Amp^+),只有含质粒的细菌才能在含有 Amp^+ 的培养基上生长。这样通过 Amp^+ 和 X-gal 对细菌双重筛选,就得到含重组质粒的克隆产物。

试验结果表明,连接体系转化 DH5 α ,并在含有 Amp^+ 和 X-gal 的培养基上生长后得到随机分布的白色和兰色菌落,其中兰色菌落为含有未连接成功质粒的细菌;而不含质粒的对照无任何菌落出现。笔者挑选了 10 个克隆,在含有 Amp^+ 和 X-gal 的培养基上进行划线培养,待长出细菌后用快速裂解 PCR 法进行鉴定,有 2 个克隆扩增出了约 1 kb 的特异带,编号分别为 GK-1 和 GK-2。用裂解法提取质粒 DNA,提取的质粒经紫外分光光度计测其质量浓度分别为 0.24 和 0.38 g/L,二者的纯度均在 1.8 以上。

克隆 GK-1 和 GK-2 用引物 3H 和 3C 扩增,均得到大小约 1 kb 的带,与样品的 IC-RT-PCR 扩增结果一致(图 1)。另外克隆 GK-1 和 GK-2 经插入片段 2 端的酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶解后均能切下 1 kb 左右的带。

2.3 克隆的核苷酸序列

为了确证克隆的片断为 GLRaV-3 的 CP 基因,笔者对克隆 GK-1 的 1 端进行了序列分析,结果表明 PCR 产物在插入到质粒 PGEM-3Zf(+) 的 SP6 启动子下游的 *Sma* I 位点时,插入方向为 3'→5'。进一步分析表明,克隆 GK-1 用 SP6 启动子 1 端测序,共测插入片断 478 nt,其中在 45 个位点上发生突变,没有缺失和插入,与美国分离物(Am-i)比较有 94.1% 的同源性(图 2)。

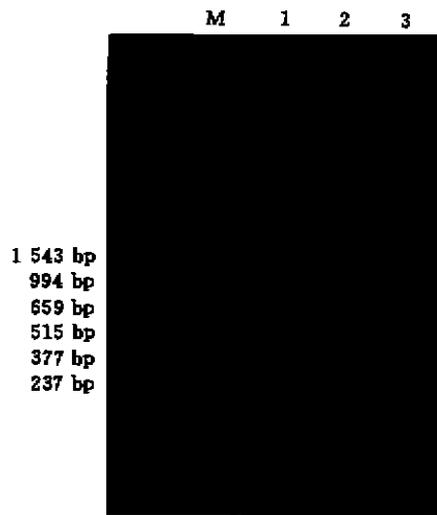


图 1 GLRaV-3 克隆片断 PCR 扩增结果 M. PCR Maker; 1. GK-1 PCR 产物; 2. GK-2 PCR 产物; 3. 阴性对照

GK-1	TATAAGCTCCCATGAATTATCAAT	T	AAAGGTAAAT	GC	TT	TA	AAA	A	TTTT	A	50			
Am-i		A		AT	CT	T	C							
GK-1	ACC	G	ATTTAT	G	GAC	T	TCGATCGTA	A	CTA	G	TTCTTTTGCAATAGTTG	A	AAG	100
Am-i		G		A	A		G	C				G		
GK-1	AC	A	TT	A	TGTAA	T	GTGTT	G	TCAGCCGT	C	ACCGTCTT	A	TTTCTAAACGCCTG	150
Am-i		G	G		G	A		G		G	T			
GK-1	T	TGTC	TAGCTAAATTCCA	C	GCTAATATTGCGTCGTT	A	TTGAACAGATCA	T					200	
Am-i	C			T		T		G						
GK-1	ACGTCGGACGAACGCA	A	TCTATCGTGTACGG	G	AAGAATTCGGTGGTACT								250	
Am-i			G		A									

GK-1	CC[G]TGCTGTGCCATAACCTT[T]TC[A]TTCTTCACTAG[C]TTACCATTCA[AT]GT	300
Am-i	A C C T T	
GK-1	CGCCGTGATGAAGGTTGGTGT[A]AAGTA[A]GCTAGATACTGCCTTACCGGT	350
Am-i	G C	
GK-1	TTTC[G]TA[G]CCCGTCGAAGC[C]GCAGCTTGTTTAATGCAATCATAACACCCA[T]	400
Am-i	A A A A C	
GK-1	ACCGCGTATATCTTCTTTCCATCATC[A]GT[C]TCTAT[A]TAGTC[G]AACTCTTT	450
Am-i	G T G A	
GK-1	GAACTC[T]GTCTGAAGACGATGT[G]AAGAA[A]	478
Am-A	C A C	

图 2 克隆 GK-1 与美国分离物(Am-i)的序列比较

克隆的核苷酸的序列分析表明, 试验所克隆的片段为 GLRaV-3 的 CP 基因。

3 讨 论

GLRaV 至少含有 5 种类型病毒粒子。病毒粒子只存在于韧皮部, 而且含量很低。常规的血清学检测及免疫电镜观察, 其灵敏度和可靠性远小于分子生物学方法。

随着 GLRaV 研究的深入, 其分子生物学方面的研究也迅速发展起来。近年来有许多用 RT-PCR 检测 GLRaV 的报道^[7,8]。因葡萄组织中含有较多的多糖和多酚类物质, 其核酸很难提取, 或提取的核酸因不纯或含有抑制物质而不能做为 PCR 扩增的模板。大多数报道都是通过提取病毒特有的 dsRNA 后, 进行 RT-PCR 扩增。本试验用 IC-RT-PCR 的方法, 快速准确地对葡萄卷叶伴随病毒 III 进行了分子生物学检测, 这在国内尚属首次。该方法灵敏度高, 又免去提取核酸的过程, 有广泛的应用前景。尤其对那些在植物体内含量低, 核酸提纯较困难的病毒。

GLRaV-3 CP 基因的序列分析表明, 与美国的研究结果有 45 个位点发生突变, 这种差异是否因不同病毒株系所引起, 还有待进一步研究。

本试验又对 GLRaV 病毒的 CP 基因进行了克隆。方法的建立为该基因的表达、制备高效价的 CP 抗体, 以及为抗 GLRaV-3 转基因葡萄的培育和其分子生物学的深入研究打下基础。

为以后 CP 基因表达的需要, 试验设计引物时增加了 *Nde* I 和 *Bam*H I 2 个酶的酶切位点, 以便构成表达系统, 使克隆化基因独自得到表达。

[参考文献]

- [1] 薛敦孟, 郑铭西. 葡萄主要病毒及病原病毒[J]. 福建果树, 1990, (1): 54—59.
- [2] Marrelli Q P. Handbook for detection and diagnosis[M]. Rome: ICVG, FAO, 1993.
- [3] Boscia. Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closterovirus[J]. *Vitis*, 1995, 34(3): 171—175.
- [4] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [5] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南(第 2 版)[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1996.
- [6] 陈章良. 植物基因工程研究[M]. 北京: 北京大学出版社, 1993.
- [7] Habili N, Fazeli C F. Natural spread and molecular analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in Australia [J]. *Phytopathology*, 1985, 85: 1418—1422.

- [8] Donald J M, Johnson C. Incidence of four imported viral pathogens in canadian vineyards[J]. *Plant disease*, 1996, 80(8): 955-958.

Gene clone and nucleotid sequence analysis of grapevine leafroll virus-3

Zhang Man-liang¹, Zhu Shui-fang², Zhao Dong-lan¹

(¹ College of Plant Protection, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; ² Institute of Plant Quarantine, Ministry of Agriculture, Beijing 100008, China)

Abstract: A pair of primers were designed and synthesized based on the nucleotide sequence of coat protein of GLRaV-3 from America. By IC-RT-PCR method, the expected size PCR products were amplified. This product was cloned into vector PGEM3Zf, then translated into *E. Coli* BL21, and the recombinant plasmid has been obtained. The nucleotid sequence analysis of PCR products showed 94.1% of the nucleotid sequence is identical with nucleotid sequence of coat protein of GLRaV-3 from America.

Key words: GLRaV-3; CP gene; clone and sequence analysis

· 简 讯 ·

“自流式树干注药技术研究”通过省级鉴定

经过课题组近 10 年的努力攻关,由西北农林科技大学无公害农药服务中心博士生导师张兴教授主持的“自流式树干注药技术研究”日前通过成果鉴定。由省科委、省农业厅组织和主持的鉴定委员会认为,该成果达到同类研究的国际领先水平。

自流式树干注药技术以植物化学保护原理为指导,以农药使用无公害为目标,以多种施药技术的研究分析为基础,依据流体力学和植物体内液流传导规律及相关病虫害生物学特性、发生规律和为害特点研制而成。该课题组研制的自流式树干注药器,属国内外首创,并获国家专利。在国内外首次提出“注干液剂”的概念,并成功研制出杀虫注干液剂、营养注干液剂和防病注干液剂等系列产品。该技术适用范围广、操作安全简便;不污染环境;不受地理环境的限制和气候变化的影响;果实中无药剂残留。

鉴定专家认为,该研究构思新颖,切合生产实际,是一套易于生产、经营、使用、推广的“傻瓜”技术,使一些常规难以防治的树木病虫害的综合治理成为可能。

(温晓平 供稿)