

草莓镶脉病毒(SVBV)启动子的克隆及序列分析

倪方锐,李 瑞,李 爽,贾 琳,蒋 磊,宋培培,江 彤

(安徽农业大学 植物保护学院,安徽 合肥 230036)

[摘 要] **【目的】**对草莓镶脉病毒(SVBV)启动子进行序列测定和分析,为进一步研究该启动子稳定表达活性、表达类型及驱动外源基因稳定表达提供理论依据。**【方法】**用 CTAB 法从感染 SVBV 的草莓叶片中提取总 DNA,设计特异性引物扩增 SVBV 启动子,克隆并测序。将 SVBV 启动子与花椰菜花叶病毒属其他成员的启动子核苷酸序列进行比较,并构建其系统关系树,再用 PlantCARE 软件分析 SVBV 启动子序列中的各个作用元件。**【结果】**获得全长为 1017 bp 的 SVBV 启动子。序列比列表明,本研究构建的中国 SVBV 启动子与美国 SVBV 启动子序列相似性最高,达 77.29%。从构建的系统关系树可以看出,中国 SVBV 启动子与美国 SVBV 启动子单独聚成一个亚分支,说明来源于草莓的 2 个 SVBV 启动子亲缘关系最近。另外,SVBV 启动子和花椰菜花叶病毒(CaMV)启动子亲缘关系虽然相对较近,但二者序列相似性较低,说明 SVBV 启动子与 CaMV 35 S 启动子的结构差异较大。进一步分析表明,SVBV 启动子除了具有一般植物启动子的典型作用元件 TATA-box 和 CAAT-box 外,还具有一些与组织特异性表达或诱导表达相关的调节因子。**【结论】**SVBV 启动子具有多种转录顺式作用元件,可能是一个在双子叶植物中具有较强驱动活性的组成型启动子。

[关键词] 草莓镶脉病毒;启动子;克隆;序列分析

[中图分类号] S432.4⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)02-0097-05

Cloning and sequence analysis of promoter of *Strawberry vein banding virus* (SVBV)

NI Fang-rui, LI rui, LI Shuang, JIA Lin, JIANG Lei, SONG Pei-pe, JIANG Tong

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to sequence and analyze the promoter of *Strawberry vein banding virus* (SVBV) to provide theoretical basis for further researching steady expression activities, expression type and stability of driving exogenous gene expression of SVBV promoter. **【Method】** The total DNA was extracted from strawberry leaves infected with SVBV by CTAB method. Specific primer pair was designed to amplify SVBV promoter, and then the promoter was cloned and sequenced. The sequence of SVBV promoter was compared with that of the promoter of other members of *Caulimovirus*, and a phylogenetic tree was constructed based on alignment of the nucleotide sequences of promoters of SVBV and other members of *Caulimovirus*. Functional elements of SVBV promoter was analyzed by software PlantCARE. **【Result】** An 1017 bp full-length sequence of SVBV promoter was acquired. Sequence comparison showed that Chinese SVBV promoter shared the highest sequence similarity (77.29%) with that of the American SVBV. Phylogenetic tree indicated that the Chinese SVBV promoter and the American SVBV promoter clustered into a separate subgroup. It illustrated that the two SVBV promoters derived from straw-

* [收稿日期] 2010-07-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30740033);安徽省科技厅自然科学基金项目(11040606M68);安徽省教育厅自然科学基金重点项目(KJ2009A105, KJ2008A133)

[作者简介] 倪方锐(1983—),男,浙江杭州人,在读硕士,主要从事植物病毒学研究。E-mail: nifangrui@yeah.net

[通信作者] 江 彤(1970—),男,安徽合肥人,副教授,硕士生导师,主要从事植物病毒学研究。

berry had closest relationship. Although the two SVBV promoters had relatively close relationship with CaMV promoters, they shared relatively lower similarity. It means that the structure of SVBV promoter greatly differs from the 35S promoter of CaMV. Further analysis showed that SVBV promoter contained some functional elements related to tissue specific expression and inducible expression besides typical functional elements TATA-box and CAAT-box of general plant promoter. 【Conclusion】SVBV promoter contains various cis-acting elements for transcription, and probably is a constitutive promoter having stronger expression activities in dicotyledons.

Key words: *Strawberry vein banding virus*; promoter; cloning; sequence analysis

草莓镶脉病毒 (*Strawberry vein banding virus*, SVBV) 是一种粒子等轴状的双链 DNA 病毒, 属花椰菜花叶病毒科花椰菜花叶病毒属^[1-2], 在南北美、欧洲、澳大利亚、日本等多个国家和地区都有分布, 是一种对草莓危害较为严重的潜隐性病毒^[3-5]。在自然条件下, SVBV 既可以通过几种蚜虫以半持久性方式传染, 还可以通过嫁接方式传染^[6]。目前, SVBV 在我国吉林、辽宁、河北、河南省等都有报道, 在栽培品种上的带毒率可达 21%, 已成为危害我国草莓生产的 4 种主要病毒之一^[7-8]。

国际上对 SVBV 的基因组 DNA 进行了初步研究。将 SVBV 的全长 DNA 克隆到质粒 pUC8 上, 得到 SVBV 全长克隆, SVBV 基因组全长 7 876 bp。SVBV 的 2 条单链均是不连续的, 各含 1 个缺口 (nick)^[1]。序列比对发现, 欧洲与北美的 SVBV 外壳蛋白 (CP) 基因序列变异极小, 只有 0.7%, 而中国的 SVBV CP 基因序列变异较大, 达 9.5%^[5]。进一步构建 1.25 拷贝的 SVBV 侵染性克隆, 转化农杆菌浸润接种指示植物, 发病率达 100%^[9]。SVBV 基因组含有 7 个开放阅读框 (ORF), 可能编码 7 个大小不等的蛋白, 其中 ORF I 编码的蛋白与病毒的胞间移动有关; ORF II 编码蛋白与蚜虫传染有关; ORF III 可能编码一个非序列专化性的 DNA 结合蛋白; ORF IV 编码 CP 蛋白; ORF V 编码复制酶蛋白^[10]; ORF VI 可能编码一个反式作用因子, 其与寄主的症状类型、症状严重程度以及病毒与寄主互作的专化性有关^[10-11]。

国内有关 SVBV 的研究报道极少, 仅测定了几个 SVBV 分离物中 CP 基因的不完整序列^[8,12], 而关于其基因组功能及启动子研究国内尚未见研究报道。启动子是基因转录、表达的最重要元件, 花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 35 S 启动子广泛应用于多种双子叶植物转基因工程^[13]。SVBV 和 CaMV 同属于花椰菜花叶病毒属, SVBV 编码的启动子是否具有同样或更高的驱动活力目前尚不清楚。另外,

SVBV 主要侵染草莓, 如果分离的 SVBV 启动子在以草莓为代表的蔷薇科植物上具有强驱动能力, 将可能为植物基因工程提供一个更好的工具。本研究克隆了中国 SVBV 启动子序列, 并对其核苷酸序列进行了初步分析, 为进一步研究该启动子稳定表达活性、表达类型以及驱动外源基因稳定表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病样、菌种与载体 感染 SVBV 的草莓新鲜叶片, 由沈阳农业大学张志宏教授惠赠。大肠杆菌 TG1, 由安徽农业大学植保学院分子病毒实验室保存; 克隆载体 pMD18-T Vector, 购自大连宝生物公司。阳性对照 SVBV 克隆质粒 (pSVBV-E3), 由美国内布拉斯加大学 (University of Nebraska) Drake Stenger 教授惠赠。

1.1.2 试剂 LA Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sal* I 等工具酶, 均购自大连宝生物公司; AxyPrep™ 琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒、AxyPrep™ 质粒 DNA 小量提取试剂盒, 均购自 AXYGEN 生物技术公司; 植物总 DNA 抽提试剂, 由安徽农业大学植保学院分子病毒实验室自备。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 草莓总 DNA 的提取采用 CTAB 法进行^[14]。

1.2.2 引物的设计与合成 从 GenBank 数据库下载 SVBV 全序列 (序列号: NC_001725), 根据启动子两侧的保守序列设计 1 对特异性引物 SP-F: GT-CATCCAAGGTGTTTCGAAAGACC; SP-R: AGT-TGTAAGCAGGGAGGTTCTGTG。引物由上海英潍捷基生物工程公司合成。

1.2.3 SVBV 启动子的克隆 以提取的草莓总 DNA 为模板, 用引物 SP-F、SP-R 进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系为:10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL,正向引物 SP-F(20 μmol/L) 0.5 μL,反向引物 SP-R(20 μmol/L) 0.5 μL,LA Taq DNA 聚合酶(5 U/L) 0.2 μL,ddH₂O 21.0 μL。PCR 反应条件为:94 ℃ 45 s,53 ℃ 45 s,72 ℃ 80 s,30 个循环。以 PCR 反应中不添加 DNA 模板作为阴性对照。将 PCR 产物用 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳。用 AxyPrep™琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段,将其与 pMD18-T Vector 连接,转化大肠杆菌 TG1,菌落 PCR 筛选阳性克隆。提取的质粒用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定。

表 1 花椰菜花叶病毒属各分离物的启动子序列 GenBank 登录号

Table 1 GenBank accession numbers of promoter sequences of *Caulimovirus* isolates

分离物 Isolate	GenBank 登录号 GenBank accession number	分离物 Isolate	GenBank 登录号 GenBank accession number
BRRV-New Jersey	NC_003138	CaMV-B-S	V00141
CaMV-Xinjiang	AF140604	CERV-Germany	EF513492
CaMV- DH	M10376	DaMV-Russia	EF513491
CaMV-CMV-1	M90543	FMV-M3	X16673
CaMV-G2	V00140	SVBV-USA	NC_001725

2 结果与分析

2.1 SVBV 启动子的 PCR 扩增结果

以草莓总 DNA 为模板,用特异性引物 SP-F、SP-R 进行 PCR 扩增,可以得到 1 条略大于 1 000 bp 的特异性条带(图 1),条带大小和与预期结果一致,说明特异性引物 SP-F、SP-R 可以从感染 SVBV

1.2.4 序列的测定与分析 经菌落 PCR 与双酶切鉴定后的阳性克隆菌液送上海英潍捷基生物公司测序。利用软件 DNAMAN Version 5.22(Lynnon Biosoft,Quebe,Canada)进行序列比对,采用 DNA-MAN 邻近相连法(Neighbor-joining)构建系统关系树。用于序列比较和系统关系树构建的各个花椰菜花叶病毒属分离物的启动子序列 GenBank 登录号见表 1。利用 PlantCARE 软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对启动子各个作用元件进行分析。

草莓的总 DNA 中扩增出 SVBV 启动子。

2.2 SVBV 启动子的克隆

将 PCR 产物纯化后,进行连接、转化,筛选阳性克隆,提取质粒进行双酶切鉴定(图 2),将鉴定后的阳性重组子命名为 pSP。将 SVBV 启动子阳性克隆测序,序列全长 1 017 bp,序列的 GenBank 登录号为:FM999726。

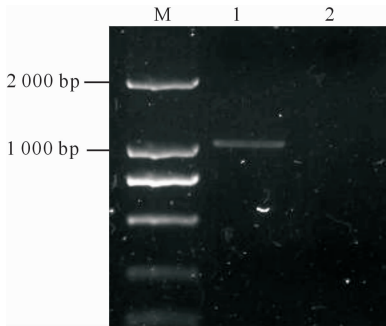


图 1 SVBV 启动子的 PCR 产物

M, DL2000 Marker;1. SVBV 启动子;2. 阴性对照

Fig.1 PCR products of SVBV promoter

M, DL2000 Marker;1. Fragment of SVBV promoter;

2. Negative control

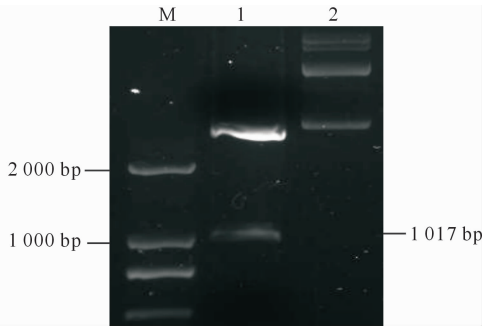


图 2 SVBV 启动子阳性克隆质粒的双酶切鉴定

M, DL2000 Marker;1. 质粒 pSP 双酶切产物;2. 重组质粒 pSP

Fig.2 Identification of plasmid of positive clone of SVBV promoter by digestion with restriction endonuclease enzymes

M, DL2000 Marker;1. Products of restriction digestion

of plasmid pSP;2. Recombinant plasmid pSP

2.3 SVBV 启动子的序列比较及分子进化分析

将本研究克隆的中国 SVBV 启动子(SVBV-China)与 GenBank 已登录的花椰菜花叶病毒属其他成员启动子的核苷酸序列进行相似性比较,结果见表 2。由表 2 可知,SVBV-China 与美国 SVBV 启

动子(SVBV-USA)的核苷酸序列相似性最高,达 77.29%,而与花椰菜花叶病毒属其他成员启动子序列相似性均较低,仅为 18.66%~38.16%,其中与 5 个 CaMV 启动子的序列相似性相对较高,为 37.16%~38.16%。

表 2 中国 SVBV 启动子与花椰菜花叶病毒属其他成员启动子核苷酸序列的相似性 %

Table 2 Nucleotide sequence similarity between Chinese SVBV promoter and other *Caulimovirus* promoters

分离物 Isolates	序列相似性 Sequence similarity	分离物 Isolates	序列相似性 Sequence similarity
SVBV-USA	77.29	CaMV-Xinjiang	38.12
FMV-M3	22.67	CaMV-DH	38.13
CERV-Germany	20.35	CaMV-CMV-1	37.16
DaMV-Russia	18.66	CaMV-G2	38.16
BRRV-New Jersey	29.58	CaMV-B-S	37.55

利用 DNAMAN 软件构建 SVBV-China 与 SVBV-USA 以及花椰菜花叶病毒属其他成员启动子核苷酸序列的系统关系树,结果见图 3。

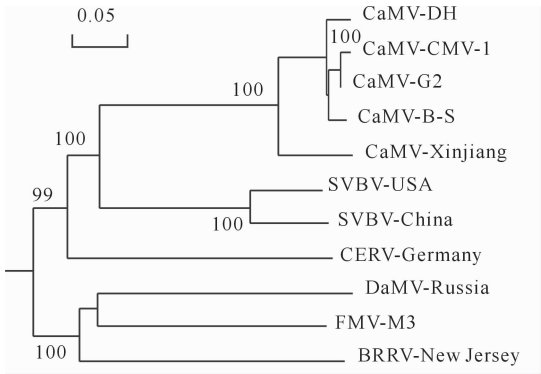


图 3 中国 SVBV 启动子与花椰菜病毒属其他 10 个成员启动子核苷酸序列的系统关系树

Fig. 3 Relationship dendrogram based on the alignment of nucleotide sequences of promoters of Chinese SVBV and 10 other members of *Caulimovirus*

由图 3 可以看出,2 个来源于草莓的 SVBV 启动子和 5 个 CaMV 启动子以及麝香石竹蚀环病毒(CERV-Germany)启动子聚成一个分支,其中 2 个

SVBV 启动子和 5 个 CaMV 启动子亲缘关系相对较近,聚成一个亚分支;而大丽花花叶病毒(DaMV-Russia)、玄参花叶病毒(FMV-M3)和乌饭树红环斑病毒(BRRV-New Jersey)启动子聚成另一个分支。

2.4 SVBV 启动子序列的作用元件分析

用 PlantCARE 软件对 SVBV 全长启动子的核苷酸序列(1 017 bp)进行分析,结果(图 4)显示,在该启动子序列中,与大多数真核启动子一样都存在一些保守基序。翻译起始点上游-40 位和-62 位存在 2 个典型的 TATA -box(TTTTA 和 TATATAA),在上游的多个位点发现了 CAAT-box,分别位于-342,-444,-516,-710,-755,-918 和-933 位。此外,在该序列中还发现一些潜在的植物调节因子,如位于-257 位的 GA-motif(AAAGATGA),位于-666 位的 as-2-box (GAAAATGATG),位于-260 位的 TCA-element(CAGAAAAGA),位于-83 位的 TC-rich repeats(GTTTTCTTCC),位于-556 位的 MBS (TAACTG),位于-545 位的 CCGTCC-box (CCGTCC)和位于-158 位的 GATA -motif (AA-GATAAGACT)。

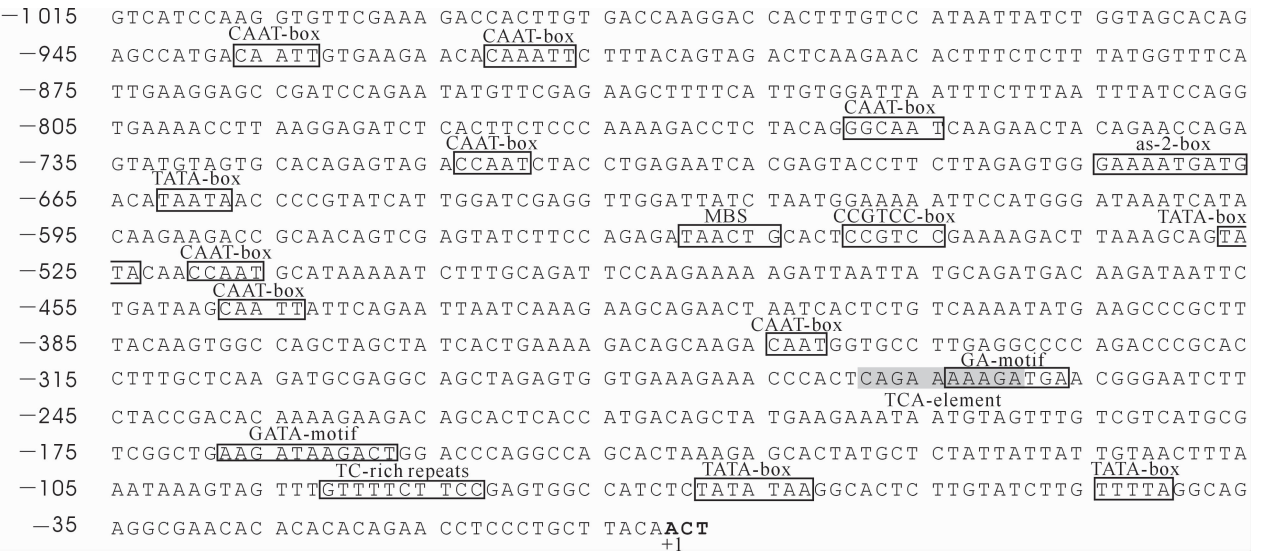


图 4 中国 SVBV 启动子各作用元件的分析结果

+1 表示 SVBV 启动子转录起始位点

Fig. 4 Analysis of functional elements of promoter of Chinese SVBV

+1 denotes transcription initiation site of SVBV promoter

3 讨 论

本研究克隆了 SVBV-China, 序列比对结果表明, SVBV-China 与 SVBV-USA 序列的相似性最高, 为 77.29%。从构建的系统关系树发现, SVBV-China 与 SVBV-USA 单独形成一个亚分支, 说明来源于草莓的 2 个 SVBV 启动子亲缘关系最近, 但由于 2 个 SVBV 启动子地理来源不同, 在长期独立进化过程中发生了一定程度的变异。因此在后续的研究中, 可以根据 2 个不同地理来源的 SVBV 启动子功能元件的差异, 进一步构建相应的缺失突变体, 以探讨 SVBV 启动子驱动下游基因表达活性以及表达类型的差异。

从本研究构建的系统关系树可以看出, SVBV 启动子与 CaMV 35 S 启动子的亲缘关系相对较近, 这说明 SVBV 启动子在结构与功能上可能与 CaMV 35 S 启动子有相似之处。但从序列比对结果来看, SVBV 启动子与 CaMV 35 S 启动子的序列相似性只有 37.16%~38.16%, 说明 SVBV 启动子与 CaMV 35 S 启动子的结构差异较大, 相应启动子的驱动强度和表达类型也可能具有较大差异, SVBV 启动子可能具有 CaMV 35 S 启动子不具备的特有功能。

本研究用 PlantCARE 软件分析发现, SVBV 启动子除了具有一般植物启动子的典型作用元件, 如 TATA-box 和 CAAT-box 之外, 另外还具有一些与双子叶植物组织特异性表达或诱导表达相关的调节因子, 其中 CCGTCC-box 是拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 调节分生组织细胞内基因特异性表达的顺式作用元件^[15]; as-2-box 是普通烟 (*Nicotiana. tabacum*) 芽组织特异性表达的顺式作用元件, 并且与光刺激诱导基因表达有关^[16-17]。因此, 这 2 个瞬时作用元件可能对双子叶植物的分生组织特异性表达有驱动活性。此外, GATA-motif 是拟南芥诱导表达的光效应元件^[18]; MBS 是拟南芥 MYB 蛋白的结合位点, 与基因在干旱胁迫下的诱导表达有关^[19]; TC-rich repeats 是普通烟基因表达的顺式作用元件, 与植物的各种防卫机制和胁迫应答机制有关^[17]; TCA-element 是甘蓝 (*Brassica oleracea*) 的转录顺式作用元件, 与水杨酸的诱导表达有关^[20]。因此, SVBV 启动子具有多种转录顺式作用元件, 推测其可能是一个在双子叶植物中具有较强驱动活性的组成型启动子。

[参考文献]

- [1] Stenger D C, Mullin R H, Morris T J. Isolation, molecular cloning, and detection of *Strawberry vein banding virus* DNA [J]. *Phytopathology*, 1988, 78: 154-159.
- [2] 洪 健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 40-42.
Hong J, Li D B, Zhou X P. Classification atlas of plant viruses [M]. Beijing: Scientific Press, 2001: 40-42. (in Chinese)
- [3] Petrzik K, Mráz I, Duli? -Markovi? I. Quarantine *Strawberry vein banding virus* firstly detected in Slovakia and Serbia [J]. *Acta Virologica*, 1998, 42(2): 87-89.
- [4] Ratti C, Pisi A, Autonell C R. First report of *Strawberry vein banding virus* on strawberry in Italy [J]. *Plant Disease*, 2009, 93(6): 675.
- [5] Vašková, D H, Špak J, Petrzik K. Variability in sequence of *Strawberry vein banding virus* [J]. *Biologia Plantarum*, 2006, 50(4): 660-666.
- [6] Morris T J, Mullin R H, Schlegel D E, et al Isolation of a caulimovirus from strawberry tissue infected with *Strawberry vein banding virus* [J]. *Phytopathology*, 1980, 70: 156-160.
- [7] 肖 敏, 张志宏, 代红艳, 等. PCR 检测草莓镶脉病毒的稳定性研究 [J]. *果树学报*, 2005, 22(5): 483-487.
Xiao M, Zhang Z H, Dai H Y, et al. Enhancing the stability of detection of *Strawberry vein banding virus* by PCR [J]. *Journal of Fruit Science*, 2005, 22(5): 483-487. (in Chinese)
- [8] 周厚成, 李思源, 何水涛, 等. 草莓镶脉病毒的 PCR 检测及特异片段的序列分析 [J]. *果树学报*, 2005, 22(3): 286-288.
Zhou H C, Li S Y, He S T, et al. Detection of *Strawberry vein banding virus* by PCR and sequence analysis of specific fragment [J]. *Journal of Fruit Science*, 2005, 22(3): 286-288. (in Chinese)
- [9] Mahmoudpour A. Infectivity of recombinant *Strawberry vein banding virus* DNA [J]. *Journal of General Virology*, 2003, 84: 1377-1381.
- [10] Petrzik K, Benes V, Mráz I, et al. *Strawberry vein banding virus*- definitive member of the genus caulimovirus [J]. *Virus Genes*, 1998, 16(3): 303-305.
- [11] Ryabova L A, Pooggin M M, Hohn T. Viral strategies of translation initiation: ribosomal shunt and reinitiation [J]. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2002, 72: 1-39.
- [12] 隋 春, 吴禄平, 张志宏. 利用 PCR 技术检测草莓镶脉病毒 [J]. *园艺学报*, 2003, 30(1): 82-84.
Sui C, Wu L P, Zhang Z H. Detection of *Strawberry vein banding virus* in strawberries by PCR [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(1): 82-84. (in Chinese)
- [13] Benfey P N, Ren L, Chua N H. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development [J]. *The EMBO Journal*, 1990, 9(6): 1677-1684.