

温州蜜柑萎缩病毒大外壳蛋白基因克隆分析

孙现超^{1,2}, 赵刚¹, 周常勇^{2*}, 青玲¹

(¹西南大学植物保护学院植物病毒学研究室, 重庆 400716; ²国家柑橘工程技术研究中心, 中国农业科学院柑橘研究所, 重庆 400712)

摘要: 利用 RT-PCR 技术从感染温州蜜柑萎缩病毒的叶片中扩增出 SDV 大外壳蛋白(Large coat protein, CPL), 将 CPL 克隆到 pGEM-T 载体后进行测序分析。DNA 序列分析表明, SDV FJ 的 CPL 基因 cDNA 序列全长为 1 329 bp, 编码 443 个氨基酸。与同属其他病毒序列对比分析结果显示, 所得序列与日本报道的 SDV S-58 株系核苷酸和氨基酸同源性最高, 分别为 98.1% 和 98.6%。核苷酸序列与 S-58 相比 25 处发生了替换突变, 其中 T 和 C 之间的替换频率最高, 占绝对优势。

关键词: 温州蜜柑萎缩病毒; 大外壳蛋白; 克隆; 分析

中图分类号: S666.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-9980(2010)03-457-04

Cloning and sequencing of the large coat protein gene of *Satsuma dwarf virus*

SUN Xian-chao^{1,2}, ZHAO Gang¹, ZHOU Chang-yong^{2*}, QING Ling¹

(¹Laboratory of Plant Virology, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716 China; ²National Center of Citrus Engineering and Technology Research, Citrus Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712 China)

Abstract: The large coat protein (CPL) gene of *Satsuma dwarf virus* Fengjie isolate (SDV FJ) was amplified by RT-PCR and cloned into vector pGEM-T. Sequence analysis showed that the cDNA of SDV-FJ CPL was 1 329 bp, encoding a protein of 443 amino acids. Comparison of the sequence with those from other viruses of genus *Sadwavirus* showed high identities (98.1% and 98.6%) of nucleotides and amino acids between SDV FJ and SDV S-58 reported in Japan. Totally, 25 nucleotide differences were found between the CPL of SDV FJ and SDV S-58, among which the mutations between T and C account for a high percentage.

Key words: *Satsuma dwarf virus*; Large coat protein; Clone; Analysis

温州蜜柑萎缩病毒 (*Satsuma dwarf virus*, SDV) 引起的温州蜜柑萎缩病首先在日本报道, 是以日本为主的少数亚洲国家柑橘上的重要病毒病害^[1-2]。该病害可以通过嫁接、汁液和土壤传播, 并通过苗木运输进行远距离传播, 可以危害几乎所有的柑橘属和近缘属的植物^[3-4]。SDV 为双分体病毒, 包含 2 条正单链 RNA 分子: RNA1 和 RNA2。Iwanami 等^[5]对日本株系 S-58 的基因组全序列进行的测定分析, 确定 SDV RNA1 和 RNA2 全长分别为 6 795 bp 和 5 345 bp。2 条 RNA 序列各包括一个开放阅读框 (Open reading frame, ORF)、3' 端非编码区 (3' Non-coding region, 3'NCR)、5' 端非编码区 (5'NCR) 和 poly(A) 尾巴。RNA1 的 ORF 开始于 AUG₃₀₂, 终止于 UAG₆₅₄₇, 编码的前体多聚蛋白可被其本身编码的蛋白酶顺式切

割产生基因组复制所需的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶、蛋白酶等。RNA2 包括 4 725 nt 的 ORF, 起始于 AUG₃₀₃, 终止于 UAA₅₀₅₂, 编码的蛋白切割后包括运动蛋白和大、小外壳蛋白。经对比分析后建议将其定为豇豆花叶病毒科 (*Comoviridae*), 豇豆花叶病毒属 (*Comovirus*) 和线虫传多面体病毒属 (*Nepovirus*) 近缘的新属中的成员^[5]。国际病毒分类委员会在第 8 次报告中又将 SDV 定为新增的温州蜜柑萎缩病毒属 (*Sadwavirus*) 代表种^[6]。我国发生的温州蜜柑萎缩病是由于 20 世纪 80 年代引种过程中无意引入的, 在我国主要危害温州蜜柑。我国的研究人员对该病害的鉴定、发生情况、病毒的生物学特性及引种后的处理等方面做了大量的研究, 对该病害的控制起到了重要的作用^[7-12]。但自病毒传入我国后, 经过长期的

收稿日期: 2009-07-23 接受日期: 2010-03-06

基金项目: 重庆市自然科学基金 (CSTC.2007BB1349); 西南大学博士启动基金 (SWUB2006042)

作者简介: 孙现超, 男, 副教授, 博士, 主要从事植物病毒学及微生物源杀菌剂研究。Tel: 023-68250517, E-mail: sunxianchao@163.com

* 通讯作者。Author for correspondence. Tel: 023-68349007, E-mail: changyong@hotmail.com

环境和寄主适应,其基因序列是否发生了变异,变异情况如何,国内尚未有报道。鉴于温州蜜柑萎缩病毒属近缘的豇豆花叶病毒属中病毒大外壳蛋白(Large coat protein, CPL)基因,是 RNA2 编码的最保守的基因,其氨基酸序列被认为确定新种的标准^[13],我们对采自重庆奉节宫川品种上 SDV CPL 进行了克隆测序,分析了其变异情况及其国外报道株系的亲缘关系,为进一步研究 SDV 分子生物学特性及探索新的防治途径奠定基础。

1 材料和方法

1.1 毒源和试验试剂

温州蜜柑萎缩病毒毒源采自重庆市奉节县田间表现典型船型叶症状的宫川品种植株上,保存在中国农业科学院柑橘研究所柑橘脱毒中心病原圃。受体大肠杆菌 (*Escherichia. coil*)DH5 α 菌株由本实验室保存;PCR 产物纯化试剂盒、pGEM-T Vector 购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶、逆转录酶、dNTPs、氨苄青霉素、DNA marker、IPTG、X-gal、Trizol 等购自大连宝生物公司(TaKaRa)。

1.2 感病叶片总 RNA 的提取

感染 SDV 柑橘叶片总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂盒,具体操作参照说明书。提取的总 RNA 等量分装 3 份,1 份用于甲醛凝胶变性电泳检测其完整性。1 份用于 SmartSpec™ 3000 核酸浓度分析仪分析样品的 RNA 浓度和纯度,1 份保存备用。

1.3 温州蜜柑萎缩病毒 CPL 的克隆

以提取到的总 RNA 为模板进行 RT-PCR。反转录引物为 P2: 5'-GGCCTCGAGAGTCTGGGCGCTC-GAAGTA-3' (划线部分为引入的 *Xho* I 酶切位点),具体操作步骤为:在反应体系中加入 0.5 μ L RNA 酶抑制剂、1 μ L 引物 P2、0.5 μ L DEPC 处理水、2 μ L 总 RNA,快速混匀离心 1 次,72 $^{\circ}$ C 温育 2 min,冰浴 2 min,快速离心,依次加入 2 μ L 5 \times 第 1 链缓冲液、2 μ L DTT(20 mmol \cdot L⁻¹)、1 μ L dNTP 混合物、1 μ L 反转录酶,混匀并快速离心 1 次,42 $^{\circ}$ C 温育 1 h,冰上终止反应,立即分装放置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。以反转录产物为模板,以 P1: 5'-TCGGATCCGGTTATACAGAGTTCTCCG-3' (划线部分为引入的 *Bam*H I 酶切位点)为上游引物,以 P2 为下游引物进行 PCR 扩增,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 1.5 min,72 $^{\circ}$ C 3.5 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经纯化试剂盒纯化后与 pGEM-T Vector 连接,热击法转化到 DH5 α 大肠杆菌中,在 LB/Amp/IPTG/

X-gal 平板上筛选克隆,挑取白色克隆经液体培养后,提取重组质粒 pGEM-CPL,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切鉴定,阳性克隆送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序,测序结果进行 DNASTar 序列分析。

2 结果与分析

2.1 SDV CPL 的克隆

用 Trizol 试剂盒提取感染 SDV 柑橘叶片的总 RNA 经甲醛凝胶变性电泳检测及核酸浓度分析,确定其达到实验要求,以获得的总 RNA 为模板,用引物 P1、P2 进行 RT-PCR,电泳检测可以看到 1 300 bp 位置有目的条带(图 1)。用 DNA 凝胶回收试剂盒回收后,构建重组质粒 pGEM-CPL。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行酶切鉴定,由于 CPL 序列中间有一个 *Bam*H I 酶切位点,所以图 2 显示切下了 1 000 bp 和 300 bp 左右的片段,表明 CPL 已经克隆到 pGEM-T 载体上。

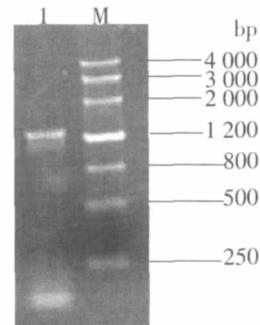


图 1 SDV CPL RT-PCR 扩增

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of CPL gene from SDV FJ
M. DNA marker III; 1. CPL

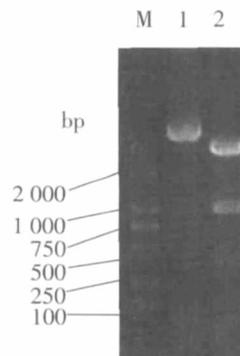


图 2 重组质粒 pGEM-CPL 酶切鉴定

M. DNA marker DL2000; 1. pGEM-CPL; 2. 重组质粒 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of enzyme-digested products of pGEM-CPL

M. DNA marker DL2000; 1. pGEM-CPL; 2. pGEM-CPL digested with *Bam*H I and *Xho* I

2.2 SDV CPL 的序列分析

序列测定表明重庆市奉节县宫川品种上的 SDV CPL 全长序列为 1 329 bp, 推测编码 443 个氨基酸(Genbank 登录号为 GQ227727)。用 DNASTAR 软件对比分析表明,SDV FJ 与日本报道株系 S-58 的 CPL 核苷酸和推测氨基酸同源性分别为 98.1%和 98.6%, 高于同属其他种内株系间的同源性;SDV FJ 与同属的柑橘花叶病毒 (*Citrus mosaic virus*, CiMV) 不同株系^[13]的 CPL 核苷酸和推测氨基酸同源性分别为 74.8%~75.4%和 82.2%~84.1%, 略高于 S-58 与

CiMV 不同株系的 CPL 核苷酸和推测氨基酸同源性;SDV FJ 与同属的脐橙侵染性斑驳病毒^[14](*Navel orange infectious mottling virus*, NIMV) 的 CPL 核苷酸和推测氨基酸同源性分别为 73.1%和 81.5%, 同样高于 S-58 与 NIMV 的 CPL 核苷酸和推测氨基酸同源性(表 1)。以上序列对比分析说明,重庆市奉节县宫川品种上的 SDV 与 S-58 同源性最高,2 者的亲缘关系最近。基于 3 种病毒 CPL 氨基酸序列,用 DNASTAR 软件 CLAST W 对比形成的系统发育树也显示同样结果(图 3)。

表 1 温州蜜柑萎缩病毒属病毒大外壳蛋白核苷酸(右上)和氨基酸(左下)同源性比较

Table 1 Identities of nucleotide (upper right half) and amino acid (lower left half) sequences of the CPL of *Sadwavirus*

株系 Strain	SDVFJ	SDV S-58	CiMV Az-1	CiMV LB-1	CiMV ND-1	CiMV Ci-968	NIMV NI-1
SDVFJ	-	98.1	74.8	75.1	74.8	75.4	73.0
SDV S-58	98.6	-	74.5	74.7	74.2	75.0	72.6
CiMV Az-1	82.5	79.7	-	84.2	96.3	84.7	75.5
CiMV LB-1	84.1	81.9	84.2	-	83.7	96.1	73.5
CiMV ND-1	82.2	75.4	96.3	83.7	-	81.7	74.0
CiMV Ci-968	84.1	74.9	84.7	96.1	81.7	-	73.1
NIMV NI-1	81.5	78.4	75.5	73.5	74.4	73.1	-

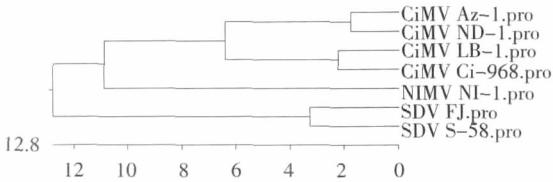


图 3 基于温州蜜柑萎缩病毒属病毒大外壳蛋白氨基酸序列生成发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of CPL genes of *Sadwavirus* constructed based on its amino acid sequence

2.3 SDV FJ 与 S-58 的 CPL 序列间的碱基突变分析

SDV FJ 株系与 S-58 序列对比显示出 25 个碱基发生了突变。其中 2 个为 A-C 突变, 占有突变的 8%; 8 个为 T-C 突变, 占 32%; 8 个为 C-T 突变, 占 32%; 2 个 G-T 突变, 8%; 4 个 G-A 突变, 16%; 1 个 A-T 突变, 占 4%。可以看出, 在所有碱基突变中, T 和 C 之间的替换频率最高, 占绝对优势(图 4)。

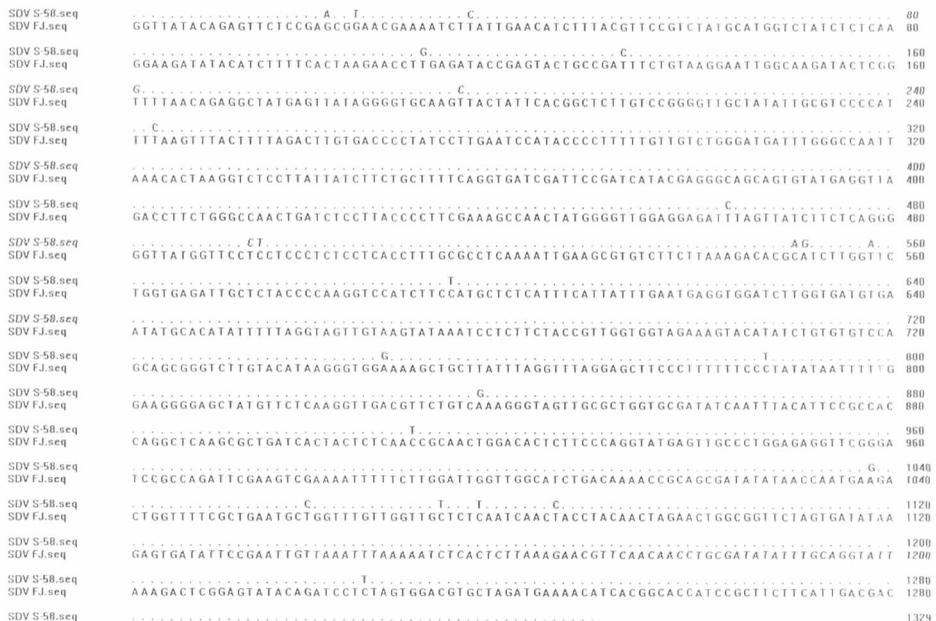


图 4 SDV FJ 与 S-58 的 CPL 序列对比分析

Fig. 4 Comparison of the amino acid sequence of CPL of SDV FJ and S-58

3 讨 论

生存和适应是生物进化的核心与基石,在长期的进化历程中,各地生态环境千变万化,这就为植物病毒产生分子变异和株系分化提供了良好条件。我们克隆 SDV FJ 的 CPL 序列,与日本报道 S-58 株系的 CPL 相比发生了 25 处的碱基突变,在氨基酸水平上 6 处发生了突变,说明来源于日本的 SDV 在自奉节官川品种样品中,经过 20 a 的环境适应发生了分子变异。但这些变异对病毒的生物学特性有什么影响目前还不清楚,需要我们将保存的 SDV 与 S-8 株系进行接种比较。

植物病毒株系间存在着干扰现象是利用弱毒株系预防强毒株系的基础。在柑橘上,利用柑橘衰退病毒弱毒株系防治柑橘衰退病已经进行了长期的研究。对比 CTV 弱毒株 CTV1 和 CTV11 与强毒株 CTV6 和 CTV42 的 P20 基因发现弱毒株与强毒株之间的基因突变多为 T-C 间的转换。CTV 弱毒株系间,T-C 之间的突变类型出现频率也最高^[15]。我们保存的 SDV FJ 与 S-58 的 CPL 序列比较显示,T-C 之间的突变占 64%,处于绝对优势。那么这种高频率 T-C 之间的突变是否普遍存在于 SDV 在不同地区的分离物之间,不同分离物之间是否因这一类型的突变造成致病性差异,从而产生可以用来进行交叉保护的弱毒株,这需要我们进一步采集不同柑橘产区,不同柑橘品种上发生的 SDV 毒源,分离纯化,进行序列和致病性分析,明确基因差异与病毒致病性之间的关系。

参考文献 References:

- [1] ZHOU Chang-yong, ZHAO Xue-yuan, JIANG Yuan-hui, HE Xin-hua. Identification of satsuma dwarf disease of satsuma mandarin[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 1990, 12(4): 346-348. 周常勇, 赵学源, 蒋元晖, 何新华. 温州蜜柑萎缩病的鉴定[J]. 西南农业大学学报, 1990, 12(4): 346-348.
- [2] ZHOU Chang-yong. Satsuma dwarf disease of satsuma mandarin[J]. China Citrus, 1991, 20(2): 35-37. 周常勇. 温州蜜柑萎缩病[J]. 中国柑桔, 1991, 20(2): 35-37.
- [3] CHEN Jian-min, ZHANG Jiang-bao, YIN Xian-yuan, MAO Zheng-rong. Affection of satsuma dwarf disease on the tree body, output and fruit quality of premature satsuma mandarin[J]. Citrus of Zhejiang Province, 1999, 16(2): 46-47. 陈健民, 张江保, 尹献远, 毛正荣. 温州蜜柑萎缩病对早熟温州蜜柑树体、产量和果实品质的影响[J]. 浙江柑桔, 1999, 16(2): 46-47.
- [4] ZHOU C Y, ZHAO X Y, JIANG Y H, HE X H. The occurrence of Satsuma dwarf virus in China[C]. Proceeding of 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists, Riverside, USA,

- 1993: 349-351.
- [5] IWANAMI T, KONDO Y, KARASEV A V. Nucleotide sequences and taxonomy of Satsuma dwarf virus[J]. Journal of General Virology, 1999, 80: 793-797.
- [6] HONG Jian, ZHOU Xue-ping. The universal system of virus taxonomy in the 8th ICTV report[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(6)(SL.): 1-9. 洪健, 周雪平. ICTV 第八次报告的最新植物病毒分类系统[J]. 植物病理学报(增刊), 2005, 35(6): 1-9.
- [7] ZHOU Chang-yong, ZHAO Xue-yuan, JIANG Yuan-hui, GONG Zu-xiang, WU Jian-hua, CHEN Zuo-yi. Study on the purification techniques for Satsuma dwarf virus[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 1991, 13(1): 92-95. 周常勇, 赵学源, 蒋元晖, 龚祖项, 吴建华, 陈作义. 温州蜜柑萎缩病毒的提纯法研究[J]. 西南农业大学学报, 1991, 13(1): 92-95.
- [8] ZHOU Chang-yong, ZHAO Xue-yuan, JIANG Yuan-hui, HE Xin-hua. Distribution of Satsuma dwarf disease of Satsuma mandarin[J]. Journal of Plant Protection, 1993, 20(2): 123-127. 周常勇, 赵学源, 蒋元晖, 何新华. 温州蜜柑萎缩病的分布鉴定[J]. 植物保护学报, 1993, 20(2): 123-127.
- [9] ZHOU Chang-yong, ZHAO Xue-yuan, JIANG Yuan-hui. Annual change of ELISA values of Satsuma dwarf virus in different parts of satsuma bulling and of Citrus tristeza virus in different parts of sweet orange seedling[J]. Virologica Sinica, 1994, 9(3): 239-244. 周常勇, 赵学源, 蒋元晖. 温州蜜柑萎缩病毒和柑桔衰退病毒在苗木各部位分布的全年分析[J]. 中国病毒学报, 1994, 9(3): 239-244.
- [10] ZHOU Chang-yong, JIANG Yuan-hui, ZHAO Xue-yuan, HE Xin-hua. On Satsuma dwarf virus-free technique[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1994, 24(1): 10-13. 周常勇, 蒋元晖, 赵学源, 何新华. 温州蜜柑萎缩病毒脱毒方法研究[J]. 植物病理学报, 1994, 24(1): 10-13.
- [11] ZHOU Chang-yong, ZHAO Xue-yuan, JIANG Yuan-hui. Purification of Satsuma dwarf virus (SDV), production of SDV antiserum and its application[J]. Chinese Journal of Virology, 1996, 12(1): 55-61. 周常勇, 赵学源, 蒋元晖. 温州蜜柑萎缩病毒提纯与抗血清制作及其应用[J]. 病毒学报, 1996, 12(1): 55-61.
- [12] GAO Yan-ling, ZHOU Chang-yong, WANG Xue-feng, ZHOU Yan, LIU Ying. RT-PCR detection of Satsuma dwarf virus[J]. Journal of Plant Protection, 2006, 33(2): 136-139. 高艳玲, 周常勇, 王雪峰, 周彦, 刘英. 应用 RT-PCR 检测温州蜜柑萎缩病毒[J]. 植物保护学报, 2006, 33(2): 136-139.
- [13] HU J G, ZHOU T, LIU L F, PENG B, LI H F, FAN Z F, GU Q S. The genomic sequence of a Chinese isolate of Squash mosaic virus with novel 5' conserved ends[J]. Virus Genes, 2009, 38: 475-477.
- [14] IWANAMI T, KONDO Y, MAKITA Y, AZEYANAGI C, IEKI H. The nucleotide sequence of the coat protein genes of Satsuma dwarf virus and Navel orange infectious mottling virus[J]. Archives of Virology, 1998, 143: 405-412.
- [15] LING Q, ZHOU C Y, ZHOU Y, WANG X F, LI Z A, SUN X C. Molecular Variation among P20 Genes of Citrus tristeza virus encoding RNA silencing suppressor[C]. Program and abstracts of 2008 11th international citrus congress, 2008: 242.