

山西省马铃薯 Y 病毒 *pl* 基因的克隆与序列分析

吴兴泉, 刘晓磊, 陈士华, 曹 成, 陈琼珍, 侯志鹏

(河南省谷物资源转化与利用省级重点实验室 河南工业大学, 河南 郑州 450052)

摘要: 依据马铃薯 Y 病毒基因组序列, 设计合成了 1 对引物, 以从山西省获得的带毒马铃薯叶片总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增得到 852bp 的基因片段并进行了序列测定。BLAST 分析表明, 该 DNA 序列与 PVY N:O 株系 *pl* 基因序列相似性最高可达 99%。

关键词: 山西省; 马铃薯 Y 病毒; *pl* 基因

中图分类号: S532 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)05-0116-03

Cloning and Sequence Analysis of Potato Virus Y *pl* Gene from Shanxi Province

WU Xing-quan, LIU Xiao-lei, CHEN Shi-hua, CAO Cheng, CHEN Qiong-zhen, HOU Zhi-peng

(The Key Lab of Conversion and Utilization of Grain Resource of Henan

Province, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: A pair of specific primers was designed based on the gene sequence of potato virus Y, which amplified a 852 bp DNA fragment from the total RNA of potato leaves infected by PVY collected from Shanxi province by RT-PCR. Sequence analysis showed that the DNA fragment amplified had 99% similarity with that of *pl* gene of PVY strain N:O.

Key words: Shanxi province; Potato virus Y; *pl* gene

我国是一个马铃薯生产大国, 马铃薯种植面积和总产量都位居世界第一, 但单产比世界平均单产低, 与发达国家相比差距更大^[1]。马铃薯病毒病是马铃薯上非常重要的一类病害, 可导致马铃薯退化, 产量降低, 严重时减产可达 80 %以上^[2~4]。可侵染马铃薯的病毒种类繁多, 以马铃薯命名的病毒就多达 16 种^[5], 其中马铃薯 Y 病毒 (potato virus Y, PVY) 是最重要的病毒之一。

山西省 2002 年马铃薯播种面积达 28 万 hm^2 , 占全省粮食作物播种面积的 7% 左右, 鲜薯总产量约 30 亿 kg, 占全省粮食总产量的 6%。但山西省马铃薯种薯质量不高, 脱毒中心大部分技术装备不配

套, 尤其是病毒检测手段缺乏, 生产脱毒种薯质量得不到保证。脱毒种薯生产规模偏小, 供种能力低, 大田种薯超代使用现象普遍, 病毒危害较为严重, 马铃薯退化明显^[5], 限制了山西省马铃薯产业的发展, 而关于山西省马铃薯 Y 病毒的研究报道极少。为此, 特进行了该项研究, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 植物总 RNA 提取试剂盒, dNTPs, RNasin, M-MuLV 反转录酶, M-MLV RT5× Buffer, 10× *Taq* Reaction buffer (TianGen), *Taq* DNA

收稿日期: 2008-10-13

基金项目: 河南省教育厅自然科学基金研究项目(2006210003); 河南工业大学校科研基金项目(07XJC008)

作者简介: 吴兴泉(1970-), 男, 黑龙江克山人, 副教授, 博士, 主要从事植物病理学与分子生物学研究。

Polymerase, D2000Marker, DNA 胶回收试剂盒, pGEM-T 克隆载体, X-GAL、IPTG 等购自 Promega 公司和大连宝生物有限公司。

1.1.2 马铃薯病毒样本的采集 2007 年 5 月在山西省太原市郊获得当地出产的马铃薯种薯样本, 带回实验室经低温诱导后, 于室内种植。

1.2 试验方法

1.2.1 植物总 RNA 的提取 采用植物 RNA 提取试剂盒进行, 方法参照产品说明书。所得 RNA 溶液保存在 -20°C 冰箱中备用。

1.2.2 引物的设计与合成 序列分析: NCBI 调序列, BLAST 和 Clustal 软件进行保守性分析, 设计引物序列为: RT-PCR 检测引物序列: 上游引物 PV-YP1 序列为: $5'-\text{TCATCCTAGGCAACTTACA}-3'$, 下游引物 PVYP1 序列为: $5'-\text{AACCATTGAATCCATAACCCC}-3'$ 。引物由宝赛生物科技有限公司合成。

1.2.3 反转录 利用 RNA 提取试剂盒提取样品总 RNA, 取一 Eppendorf 管, 加入样品 RNA $5\mu\text{L}$, $3'$ 端引物 $1\mu\text{L}$, dd H₂O $4\mu\text{L}$, 置于 95°C 下变性 10min, 立即取出置于冰上放置 5min。再依次加入: $5\times\text{M-MuLV}$ 反转录酶缓冲液 $5\mu\text{L}$, 40mmol/L dNTPs (每种 10mmol/L) $1\mu\text{L}$, RNasin ($40\text{U}/\mu\text{L}$) $1\mu\text{L}$, M-MuLV 反转录酶 ($20\text{U}/\mu\text{L}$) $1\mu\text{L}$, 加入 DEPC 处理过的 ddH₂O $7\mu\text{L}$ 。上述反应物于 37°C 水浴 1h, 95°C 灭活 5min, -20°C 保存备用。

1.2.4 聚合酶链式反应 取一 Eppendorf 管, 依次加入: 反转录产物 $2.5\mu\text{L}$, 上、下游引物各 $2.5\mu\text{L}$, dNTP $1.0\mu\text{L}$, $10\times\text{Buffer}$ $2.5\mu\text{L}$ (含 MgCl_2), Taq DNA 聚合酶 $0.5\mu\text{L}$, ddH₂O $13.5\mu\text{L}$ 。退火温度为 37°C 。PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 目的基因的克隆 本试验所用的克隆载体为 Promega 公司的 pGEM-T Easy Vector System, 长 3018bp , 具有 Amp 抗性, 可用于蓝白斑筛选。

PCR 扩增获得的目的基因经琼脂糖凝胶电泳后, 采用 DNA 胶回收试剂盒进行纯化, 与 pGEM-T Easy 载体连接后, 采用 CaCl_2 法将重组质粒转入大肠杆菌感受态细胞。选取白色菌落培养后, 采用碱裂解小量提取法提取质粒 DNA 并进行酶切鉴定。

1.2.6 目的基因的序列测定与分析 目的基因的序列测定在大连宝生物工程有限公司进行, DNA 序

列采用分析工具 BLAST 进行。

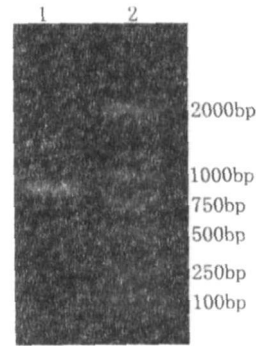
2 结果与分析

2.1 马铃薯总 RNA 的提取

利用植物总 RNA 提取试剂盒对带病毒马铃薯叶片总 RNA 进行提取, 电泳检测结果可知, RNA 提取效果较好。

2.2 PVY *pl* 基因的克隆

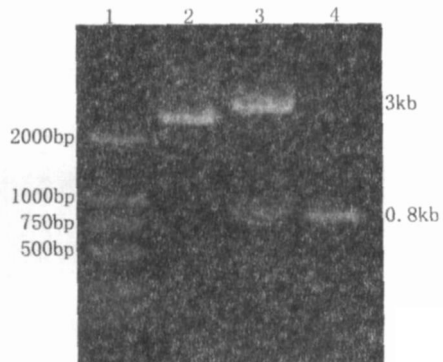
2.2.1 RT-PCR 扩增 PVY *pl* 基因 以从病毒马铃薯叶片中提取获得的总 RNA 样本为模板, 以依据马铃薯 Y 病毒 *pl* 基因序列设计合成的 PVYP5 和 PVYP3 为引物, 进行 RT-PCR 以扩增马铃薯 Y 病毒 *pl* 基因中 852bp 长的 cDNA 片段, 结果如图 1 所示。从图 1 可以看出, RT-PCR 扩增产物与预期的 PCR 产物大小一致, 而健康对照无任何扩增产物。



1. 带毒马铃薯 RT-PCR 产物; 2. DL2000 Marker

图 1 山西省马铃薯样品的 RT-PCR 扩增结果

2.2.2 RT-PCR 产物的克隆 将 RT-PCR 产物与载体连接后转入大肠杆菌, 提取阳性克隆的质粒 DNA, 酶切鉴定后琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2。由图 2 可知, RT-PCR 产物已经成功转入大肠杆菌。



1. 未酶切的质粒载体; 2. 重组质粒酶切产物; 3. *pl* 基因 TR-PCR 产物; 4. DL2000 Marker

图 2 重组质粒酶切鉴定结果

2.2.3 RT-PCR 扩增产物序列测定与分析
对从山西省马铃薯样本中 RT-PCR 扩增获得的 DNA 片段进行了序列测定 (GenBank 序列号为

EU675327), 结果表明, 该 DNA 片段全长 852bp, 可编码 282 个氨基酸的蛋白质, 具体序列:

核苷酸序列: tcatccatggcaacttacacatcaacaatccagtttggttcattgaatgcaaaactccatactacccgctcctttgg
gctagtgcggggaacgagaagttcaaccaccactgaccccttcgcaagtttgagatgcagcttagtcgcgattacgaaggcaagagt
ttgcaactattcgaaatccaagaatggtactgtgatcgatacaagactgatgtccagattgcgcgattcaaaagaagcgcgaggaaa
gagaaagagaggaatataatttccaaatggctgcgtcaagtgtgtgcgaagatcactattgctggtggagagccaccttcaaaactgaatc
acaagtgcggagggtgtcatccacacaactccaaggatgcgcacagcaaaaacatcacacgcaaagtgacggagggacaaatga
accaccttatcaagcaggtgaagcaaatatgtcaaccaaaaggagggtctgttcaactgattagcaaaaaagtacatatgttactataaaga
agttttgggatcacatcgcgagtcgttgcactgcacatatgagaggtttacgaaagagagtggaacttccggtgtgtaaatggaccgttg
cgtctacagcatctgccaggacggacaagtggaccaaccaagttcgtgctactgatctacgaagggcgatagtgaggttatattgagtaa
tactaatctcaaaggaaactttgggagaagctcggagggcctattcatagtgcgtgggtgcacgaaggaaaaatctatgatgcacgttcca
aggttactc aaggggttatggattcaatggtt

氨基酸序列: MATYTSTIQFGSIECKLPYSPAPFGLVAGKREVSTTTDPFASLEMQLSAR LRRQEFATIRTSKNGTC
MYRYKTDVQIARIQKKREEREREYNFQMAASSVVSKITIAGGEPPSKLESQVRRGVIHTTPRMRTAKTYHTPKLTEGQ
MNHLIKQVKQIMSTKGGSVQLISKSTYVHYKEVLGSHRAVVTCTAHMRGLRKRVDFRCKWTVVRLQHLARTDKWT
NQVRATDLRKGDGVLSTNLKGNFRSSEGLFIVRGSHEGKIYDARSKVTQGVMDSMV

利用 NCBI 网站中 BLAST 软件对 *pl* 基因序列进行分析, 结果表明, 其 1~6bp 为 PVY 基因组 5' 非编码区序列, 7~831bp 为 *pl* 基因序列, 832~852bp 为 *HC-pro* 基因部分序列 (下划线部分)。

利用 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站中 BLAST 工具对该病毒 7~831bp 的 *pl* 基因进行分析, 结果表明, 该基因序列与已公布的 PVY *pl* 基因的序列相似性均在 91% 以上, 其中与 N:O 株系和 N 株系的序列相似性最高, 可达 99%。说明所得 DNA 片段确为 PVY *pl* 基因片段, 其株系分化为 N:O 或 N (表 1)。

表 1 山西省马铃薯 Y 病毒 *pl* 基因序列 BLAST 部分结果

序列号	特征描述	最大相似性 (%)
AY745494.1	PVY N:O 株系 Mb146 分离物多聚蛋白基因, 部分序列	99
AY745491.1	PVY N:O 株系 Mb112 分离物全基因组序列	99
EU675325.1	PVY 信阳分离物多聚蛋白基因, 部分序列	99
EF026076.1	PVY N:O 株系全基因组序列	99
AY745492.1	PVY N:O 株系 L56 分离物全基因组序列	99
EF016294.1	PVY NTN 株系 v942490 分离物全基因组序列	99
AY745495.1	PVY N:O 株系 Mb55 分离物多聚蛋白基因, 部分序列	99
AJ584851.1	PVY N 株系 SASA 207 分离物分离物全基因组序列	99

3 讨论

尽管山西省的马铃薯种植面积较大, 但由于山西省马铃薯种薯质量不高, 脱毒种薯质量得不到保证, 致使马铃薯病毒危害较为严重, 马铃薯退化明显。然而, 关于山西省马铃薯 Y 病毒的相关研究报道却较少。本试验对山西省马铃薯 Y 病毒 *pl* 基因进行了克隆, 通过核酸序列分析, 初步明确该病毒为 PVY N:O 株系或 PVY N 株系, 可为对该病害的防治提供理论依据。

参考文献:

[1] 魏延安. 世界马铃薯产业发展现状及特点[J]. 世界农业, 2005(3): 29—32
[2] Hooker W J. 马铃薯病害及其防治[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1992: 129—131
[3] 吴兴泉, 陈士华, 吴建, 等. 分子生物学技术在马铃薯病毒检测中的应用[J]. 中国马铃薯, 2003(3): 175—179
[4] 吴兴泉, 陈士华, 陈涛, 等. 河南省马铃薯 Y 病毒的分子检测与鉴定[J]. 河南农业科学, 2007(10): 64—66
[5] 王亚平. 山西马铃薯产业现状与发展对策[J]. 种子科学, 2002(5): 262—263