

文章编号: 1001-411X (2001) 03-0033-04

香蕉束顶病毒 NS 株系 DNA 组分 6 的克隆及序列分析

何自福, 肖火根, 李华平, 范怀忠

(华南农业大学植物病毒研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 通过常规的基因克隆技术, 对香蕉束顶病毒 NS 株系代表分离物的 DNA 组分 6 进行了克隆和序列分析, 并将该分离物这个组分的序列与先前报道的广州天河分离物(属 NSP 株系)的该组分序列进行比较, 结果表明: 该组分全序列、ORF 及其编码的氨基酸序列在 2 个分离物间的变异率分别为 3.4%、1.7% 和 2.6%, 表明该组分在 2 个株系代表分离物间存在较显著差异, 从而进一步支持了广东 BBTV 存在 2 个株系的结论。此外, NS 株系代表分离物 DNA 组分 6 的全序列、ORF 及其编码的氨基酸序列与澳大利亚分离物的变异率分别为 14.4%、7.5% 和 7.1%。

关键词: 香蕉束顶病毒; NS 株系; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S432.41

文献标识: A

根据生物特征特别是在能否侵染粉蕉 (*Musa pisang-awake*) 的差异上, 笔者鉴定出广东香蕉束顶病毒 (banana bunchy top virus, 简称 BBTV) 的 NSP 和 NS 株系 (分别以广州天河分离物和高州分离物为代表)^[1]。随后, 笔者对上述 2 个分离物的 DNA 组分 1 进行了克隆和序列分析, 结果证明该组分在这 2 个代表分离物间存在显著的差异, 从而支持了广东 BBTV 存在 NSP 和 NS 2 个株系的结论^[2], 对这 2 个株系代表分离物 DNA 组分 3 克隆及序列分析的结果也得到相同的结论^[3]。笔者曾报道了对香蕉束顶病毒广州天河分离物(属 NSP 株系)DNA 组分 6 的克隆和序列分析结果^[4], 在鉴定出广东 BBTV 的 NSP 和 NS 2 个株系后, 笔者又对 NS 株系的代表分离物的 DNA 组分 6 进行了克隆和序列分析, 并将这 2 个序列进行了比较。本文即是这一结果的报道。

1 材料和方法

1.1 材料

EcoR I 酶、*T*4 DNA 连接酶、*T*-载体 (pGEM-T easy vector systems) 和 DNA Wizard 纯化试剂盒均购于 Promega 公司; 氨苄青霉素、低熔点琼脂糖、胰蛋白胨、酵母提取物、X-gal 和 DNA 相对分子质量标准均购自上海生工生物技术工程有限公司; dNTPs (Pharmacia 公司)、CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)、RNA 酶和 IPTG 均购于广

州天象人公司; *Taq* 酶购自广州华美公司。*E. coli* DH 5 α 由华南农业大学遗传工程研究室梅曼彤教授提供。

用 NS 株系的代表分离物(高州分离物)接种的病株作为毒源材料。

1.2 引物的设计

用于扩增 NS 株系代表分离物 DNA 组分 6 的引物 CoPL 和 CoPR 的设计同文献^[2]。同时, 用引物 CoPL 和 P₆₂^[4] 作为中间引物来鉴定含组分 6 的重组质粒。引物序列为:

CoPL 5' ATTACTCGAGCTGGGACGGGACAT 3'
CoPR 5' TATACTCGAGGGTAATAATRKCCCC 3'
P₆₂ 5' GGCGAATTCTAACTTCCATGTCTCT 3'

1.3 病株总 DNA 的提取

用 CTAB 方法^[5] 提取病株的总 DNA, 作为 PCR 模板。

1.4 高州分离物的 DNA 组分 6 的克隆

高州分离物 DNA 组分 6 的克隆、在选择性平板上筛选含重组质粒的克隆、以及用 PCR 和 *EcoR* I 酶切鉴定重组质粒等方法均同文献^[2], 不同的只是用 PCR 的中间引物为 CoPL 和 P₆₂。

1.5 核苷酸序列测定

用碱裂解法抽提质粒^[6]、Wizard 质粒纯化试剂盒进一步纯化质粒。核苷酸序列测定在 Perkin Elmer 公司 377 型全自动核酸序列分析仪上进行。

收稿日期: 2000-07-14

作者简介: 何自福(1966—), 男, 助理研究员, 博士, 现在广东省农业科学院植保所工作。

基金项目: 国家自然科学基金(39870434); 广东省自然科学基金(980126); 高等学校博士点基金(950503)

2 结果与讨论

2.1 重组质粒的 PCR 和 *EcoR* I 酶切鉴定

在选择性平板上挑选可能含有高州分离物 DNA 组分 6 的重组质粒的克隆, 进行培养, 用碱裂解法小量抽提质粒。然后对每个质粒分别用中间引物 P_{62} 和 CoPL PCR 进行鉴定。取 PCR 结果为阳性的克隆再进行 *EcoR* I 酶切鉴定, 从图 1 可见, 这些重组质粒均被酶切出 1 个 1.0~1.1 kb 的片段, 与预期的大小一致。因此, 这些重组质粒均含相应的目的片段。



1. λ DNA/ *EcoR* I + Hind III marker, 2~4. 待鉴定重组质粒 (recombinant plasmids)

图 1 重组质粒 *EcoR* I 酶切产物的电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis of recombinant plasmids digested by *EcoR* I

2.2 DNA 组分 6 的序列分析

用 M13 正反向引物及 2 个中间引物 (P_{61} 、 P_{62})^[4] 对重组质粒进行测序, 结果表明, 每一克隆的双链核苷酸序列完全互补, 同一分离物的 3 个克隆的序列完全相同。该分离物(属 NS 株系)DNA 组分 6 的序列已登录基因库 (GenBank), 序列编号为 AF238879 (NS 株系代表分离物广州天河分离物 DNA 组分 6 的序列编号为 AF238878)。

对高州分离物 DNA 组分 6 序列分析表明(图 2): 该组分全长为 1 078 nt, 含有 1 个 465 个核苷酸的 ORF, 可潜在编码 154 个氨基酸约 17 400 的多肽。在 ORF 的 5' 端的非编码区, 距起始密码子 243 个核苷酸处有 1 个茎环结构, 其环序列为 11 个核苷酸, 茎序列为 10 个核苷酸; 在茎环结构的 3' 端下游 187 个核苷酸和距起始密码子 46 个核苷酸处有 1 个 TATA 盒 (CTATTAATA)。该组分有 2 个多聚腺苷酸信号 (AATAAA), 分别位于第 726~731 核苷酸和第 761~766 核苷酸处。在 ORF 3' 端的非编码区、距终止密码子下游 132 个核苷酸处有 1 个 15 nt 的富含 GC 区。

2.3 高州分离物 DNA 组分 6 与已报道的序列比较

在根据生物学特性鉴定出广东 BBTV 的 NSP 和 NS 2 个株系后, 笔者对 2 个株系的代表分离物(广州天河分离物和高州分离物)的 DNA 组分 1 和 3 分别进行了克隆和序列分析, 结果都证明: 根据寄主范围来区分上述 2 个株系是正确的。笔者也曾报道了对广州天河分离物 (NSP 株系)DNA 组分 6 的核苷酸序列分析结果^[4], 这里笔者又对 NS 株系的代表分离物(高州分离物)DNA 组分 6 进行了克隆和序列分析, 结果表明: 高州分离物 DNA 组分 6 的全序列比先前报道的广州天河分离物(属 NSP 株系)的少 3 个核苷酸, 两者的同源率为 96.6% (变异率为 3.4%)。高州分离物在第 159 nt、第 841 nt 和第 953 nt 处各缺失 1 nt (图 2)。2 个序列在茎环结构区的 31 nt 中仅环序列中有 1 nt 发生突变, 富含 GC 区的 15 nt、TATA 盒和 poly A 信号完全相同。两者的 ORF (465 nt) 及其编码的氨基酸 (154 aa) 序列的变异率分别为 1.7% 和 2.6% (图 3)。可见, 该组分在 2 个株系代表分离物间也存在较显著的差异, 从而进一步支持了广东 BBTV 存在 NSP 和 NS 2 个株系的结论。

对于 BBTV DNA 组分 6, 目前报道的只有澳大利亚分离物^[7]。NSP 和 NS 2 个株系代表分离物的 DNA 组分 6 与澳大利亚分离物的变异率分别为 14.3% 和 14.4% (表 1), ORF 核苷酸序列的变异率分别为 8.0% 和 7.5%, 其编码的氨基酸序列的变异率分别为 6.5% 和 7.1% (图 3)。可见, 笔者的 2 个株系 DNA 组分 6 与澳大利亚分离物的差异均较大。这一结果与笔者先前对 DNA 组分 1 和组分 3 的研究结果一致。从而进一步表明广东 NSP 和 NS 株系与澳大利亚分离物间亲缘关系较远。

表 1 高州分离物与已报道的 BBTV 分离物 DNA 组分 6 及氨基酸序列的同源率(%)¹⁾

Tab. 1 The identical ratios of DNA component 6 and amino acid sequences of Gaozhou isolate and the reported BBTV isolates

分离物 isolate	NSP	NS	Aust
NSP		96.6 ²⁾	85.7 ²⁾
NS	97.4 ³⁾		85.6 ²⁾
Aust	93.5 ³⁾	92.9 ³⁾	

1) NS 代表高州分离物, NSP 代表广州天河分离物, Aust 代表澳大利亚分离物^[7]; 2) 为核苷酸序列的同源率, 3) 为氨基酸序列的同源率

NS	<u>ACGACGGGGATTAT</u>	<u>TATTACCCCCGTGC</u>	<u>TGGGGACGGGACATG</u>	<u>ACGTAAGCATAGATT</u>	60
NSP	—	C	—	—	—A—TA—
Aust	—	C	—	—	—C—AG—
NS	ATAATGGGCTTTTA	A*AGCCCATAAAGG	GAAGTGGACGGGGTT	TGAGACATATTTCGA	120
NSP	—	A*—A—GT	—G—G—	—GA—A—A—T—G—	—
Aust	—	TT—*—T—TT	—T—G—	—T*—T—T—A—A—	—
NS	AAGCCCCG*CCTGGA	AAAGGATAAAGTCAC	GTGCCGAA**AATAG	GTGCTTCGCCGCGA	180
NSP	—*—T—A—G—A—	—	—T*—T—	—	—T—
Aust	—T—A—T—T—T—	—	—TT—A—	—	—A—
NS	ACCAAACATAATCAA	AGATGCGTATTCAAT	ACGCAACT**AGGTG	TATTAATAGGGTTGT	240
NSP	—C—A—AAA—A—T—	—	—A—T**—AG—	—	—G—GTT—
Aust	—A—C—TTG—G—T—	—	—T—CGA—TA—	—	—T—TGA—
NS	CTCTGCCGAATAAA*	TCAGAGCGTATGGC*	AA*GCAGAAGCGATG	GATTGGGCAGAACATCA	300
NSP	—T—*—	—T—T—*—*	—	—	—A—
Aust	—A—A—	—A—A—G—G—	—	—	—G—
NS	CAATTCAAGACATGT	ACTCATGGCTGTGAT	TGGAAGACGATATCA	TCCGATTCTCATCTGAA	360
NSP	—A—C—C—T—	—	—C—	—	—T—A—A—
Aust	—C—T—A—C—	—	—A—	—	—G—C—T—
NS	AATCGGCAATATGTA	CCTTGCGCTGACTCA	GGTGCTGGAAGAAC	ACTCCTCGCAAGGTA	420
NSP	—G—T—C—T—T—	—	—A—	—	—AGT—
Aust	—A—A—T—T—A—	—	—G—	TCG—	—
NS	CTTCTTAGATCTATT	GAACCTGTGTTAAAT	GGAAGCTCAAAGGA	AATAATAGGAATGTT	480
NSP	—	—T—	—AA—G—	—	—
Aust	—	—C—	—GC—A—	—	—
NS	CGTGGCTTCTTATAC	GTATCAATCCGAGAC	GATGATGGAGCAATG	CGTCCAGTACTTACA	540
NSP	—C—CT—A—	—A—C—	—T—C—	—	—T—T—
Aust	—A—TC—C—	—G—A—	—C—A—	—	—C—T—
NS	GTACCATTGGAGGA	TATGGATATCATAAT	GATTCTATTATTTC	GAAGGGAAGGGAAA	600
NSP	—T—	—	—C—	—	—
Aust	—C—	—	—T—	—	—
NS	GTTGAATGTGATATA	TCATCAGATTATGTT	GCGCCAGAAAGTAGAT	TGGAGCAGAGACATG	660
NSP	—	—	—A—G—C—	—	—
Aust	—	—	—G—A—	—	—
NS	CAAGTTAGTATTAGT	AACAGCAACAACGT	AATGAATCATGTGAT	CTGAAGTGTATGTT	720
NSP	—	—	—C—	—	—
Aust	—	—	—T—	—	—
NS	GTTGTCGTTAAGA	<u>ATAAAGGAATAAACAG</u>	ATGTGCTGTAATGAT	<u>CATTAATAAAACTTA</u>	780
NSP	—	—A—C—A—	—A—T—	—	—AG—
Aust	—	—C—A—T—	—T—A—	—	—CT—
NS	ATTTCATGTAATTG	ATAGTTGTATAAAAC	ATACAACACGCTATG	ACAAACGGGGAAAAA	840
NSP	TT—AAT—T—	—	—G—	—C—A—GG—AAAAA—	—
Aust	TA—GG—*—A—	—	—A—	—A—T—AA—ACGCT—	—
NS	*TGAAAATC*AGGG	GT***TGATTTGTTCT	ATAGTATCGCTTAAG	GGCCGCAGGGCGTT	900
NSP	A—A—C*—G—	***—T—TTC—A—	—	—	—
Aust	*—C—GT—C—	—ATC—A—AGT—T—	—	—	—
NS	GAAAAATAATAATCG	AATTATATACGATTG	ATAATAATCAGAGAT	ACATGAT*AGGATA	960
NSP	G—	—T—A—G—	—A—	—A—C—AG—	—
Aust	*	—A—T—A—	—T—	—G—C—**—	—
NS	*TATAAACATAAACG	AACTATATGGCTGTA	TAAAAT*AAAAGAAG	CA*TATAATATAAAA	1020
NSP	*—G—G—	—G—T—	—T—TTA*—G—G—	C—*—TA—T—T—	—
Aust	A—A—A—	—C—G—	—C—TAAT—A—T—	—T—A—AC—A—A—	—
NS	TATGTATTCTAATCT	CTGATTGGTGCAGAG	AGTAGCCCCACTAAC	TTTGTGTTAGTGGAA	1080
NSP	—A—T—	—G—AA—AGT—CA—	—T—	—TTA—T—A—T—GA—	—
Aust	—A—A—	—T—GA—GAA—GG—	—C—	—AAA—G—G—G—AG—	—
NS	ATGTCGGATGACGT	G	1096	—	—
NSP	—	G	—	—	—
Aust	—	A	—	—	—

NS 代表高州分离物, NSP 代表广州天河分离物, Aust 代表澳大利亚分离物⁷; 茎环结构的序列下划线, 环序列斜体, 启始密码子和终止密码子加框, TATA 盒及多聚腺苷酸信号用黑体并下划线, 富含 GC 区下波浪线, - 表示该核苷酸在 3 个分离物间都相同, * 表示该处核苷酸缺失. NS, NSP and Aust respectively represents Gaozhou isolate, Guangzhou-Tianhe isolate and Australia isolate. The sequence of stem-loop structure was underlined, and loop sequence was italicised. Start code and stop code were boxed. TATA box and poly A signals was blacked and underlined. GC-rich region was underlined in wave-line, -represents the nucleotide same among the three isolates, * represents deletion.

图 2 高州分离物与已报道的 BBTV 分离物的 DNA 组分 6 序列的比较

Fig. 2 Comparison of DNA component 6 of Gaozhou isolate and the reported BBTV isolates

NS	MDWAESQFKTCTHGC	DWKT	ISSDSSEN	RQYVPC	VDGAGR	NTPRK	VLLRSIEAV	FNGSF	KGN	NRNVRGFLY	VSI	RDD
NSP	-----	T-----SE-----	-----KS-----	-----K-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Aust	-----	K-----AD-----	-----DS-----	-----S-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NS	GAMRPVLT	TV/PFGGYGYHND	FYYFEG	KGKVECD	ISSDYY	APEVDWSR	DMEV	SISNSNNC	NESCDL	KCYVV	CSLRIKE	-----
NSP	A-----I-----G-----	-----	-----	-----EV-----	-----	-----	-----	-----	-----S-----	-----	-----	-----
Aust	E-----I-----H-----	-----	-----	-----GI-----	-----	-----	-----	-----	-----L-----	-----	-----	-----

NS 代表高州分离物 Gaozhou isolate, NSP 代表广州天河分离物 Guangzhou-Tianhe isolate, Aust 代表澳大利亚分离物 Australia isolate⁷; — 表示该氨基酸在 3 个分离物间相同 the amino acid same among the three isolates.

图 3 高州分离物与已报道的 BBTV 分离物的 DNA 组分 6 编码的氨基酸序列的比较

Fig. 3 Comparison of the amino acid sequences encoded by DNA component 6 of the Gaozhou isolate and the reported BBTV isolates

参考文献:

[1] 何自福, 李华平, 肖火根, 等. 香蕉束顶病毒株系生物学特性的研究[J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 50—55, 62.

[2] 何自福, 李华平, 肖火根, 等. BBTV 两个株系 DNA 组分 1 的克隆及序列分析[J]. 植物病理学报, 2000, 30(4): 364—369.

[3] 何自福, 肖火根, 李华平, 等. BBTV 两个株系 DNA 组分 3 的克隆及序列分析. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 1—4.

[4] 何自福, 李华平, 肖火根, 等. 香蕉束顶病毒 DNA 组分 6 的克隆及序列分析[J]. 病毒学报, 2000, 16(2): 185—188.

[5] XIE W S, HU J S. Molecular cloning, sequence analysis and detection of banana bunchy top virus in Hawaii [J]. Phytopathol, 1995, 85: 339—347.

[6] SAM BROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989. 16—34.

[7] BURNST M, HARDING R M, DALE J L. The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components[J]. J of Gen Virol, 1995, 76: 1471—1482.

Cloning and Sequencing of DNA Component 6 of BBTV NS Strain

HE Zi-fu, XIAO Huo-gen, LI Hua-ping, FAN Huai-zhong (Faan Hwei-Chung)

(Laboratory of Plant Virology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: By regular gene cloning techniques, DNA component 6 of the representative isolate of BBTV (banana bunchy top virus) NS strain was cloned and sequenced. The sequence was compared with the sequence of DNA component 6 of Guangzhou-Tianhe isolate (belong to NSP strain) reported. The results showed that the variance ratios of full sequence of the component 6, the ORF nucleotide sequence and its encoding amino acid sequence between the two isolates were 3.4%, 1.7% and 2.6% respectively. Results in the experiment showed that the differences of the component between the two representative isolates of the NSP and NS strains respectively were significant, and that further supported that there were NSP and NS strains of Guangdong BBTV. In addition, the variance ratios of the full sequences of the component, the ORF nucleotide sequences and its encoding CP amino acid sequences were 14.4%, 7.5% and 7.1% respectively between the Gaozhou isolate and the Australia isolate.

Key words: banana bunchy top virus (BBTV); NS strain; gene cloning; sequencing

【责任编辑 周志红】