

## 甜菜坏死黄脉病毒不同分离物三联基因区及 RNA3 的序列分析

刘德林 李大伟 于嘉林\* 韩成贵

(中国农业大学农业生物技术国家实验室, 北京 100094)

**摘要** 以来自于我国内蒙古、黑龙江和宁夏的 3 个甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)分离物为材料,采用反转录-PCR 方法扩增不同 RNA 组分的基因片段,经 cDNA 克隆和序列测定后,与国外报道的 BNYVV 不同株系和来自于我国不同地区的 BNYVV 分离物之间进行比较分析。结果表明,BNYVV 内蒙呼和浩特分离物(HU)RNA2 中的 42 kD 至 3'端蛋白编码区长度为 2 435 个核苷酸(nt),与法国 F2 分离物、德国 G1 分离物、日本 S 分离物的一致性分别为 97.7%,94.9%,96.2%;而黑龙江(HEI)、宁夏(NIN)和内蒙包头分离物(BAO)RNA3 的 25 kD 蛋白编码区则与以往报道的内蒙呼和浩特分离物(HU)相应片段分别具有 95.4%,93.4%和94.0%的一致性。这些差异进一步证明了在 BNYVV 分离物之间广泛存在的分子变异,并可能与它们的致病能力相关。

**关键词** 甜菜坏死黄脉病毒; RNA2; RNA3; 序列分析

**中图分类号** Q785

### Sequence Analysis of BNYVV RNA2 "Triple Block" and RNA3 Sequence Variation of Different Isolates

Liu Delin Li Dawei Yu Jialin Han Chengui

(State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** The RNA was extracted from purified beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) isolated from Inner Mongolia, Heilongjiang and Ningxia. cDNA fragments corresponding to different RNA genome were cloned and sequenced with RT-PCR, Then compared the sequences between the different strain of overseas and the isolates of different region in China. The results showed that the "the triple block" of RNA2 between HU and F2, G1, S shares 97.7%, 94.9%, 96.2%; and the 25 kD code region of RNA3 between HEI, NIN, BAO and HU shares 95.4%, 93.4%, 94.0%. These sequence data demonstrated that RNA3 variants were widely existed (distributed) in the isolates of BNYVV which may be related with their pathogenicity.

**Key words** beet necrotic yellow vein virus; RNA2; RNA3; sequence analysis

甜菜丛根病(rhizomania)是甜菜的严重病害,广泛分布于我国西北和东北甜菜种植区。该病是由甜菜坏死黄脉病毒(beet necrotic yellow vein virus, BNYVV)感染所引起<sup>[1,2]</sup>。BNYVV 是一种多分体正链 RNA 病毒,含有 4~5 条 RNA 分子,其中 RNA1 和 RNA2 是病毒侵染复制所必需的。RNA1 编码病毒复制酶, RNA2 编码外壳蛋白及运输蛋白, RNA3 编码的蛋白参与病毒在根中的复制和转移, RNA4 编码的蛋白参与由土壤多粘菌介导的传播<sup>[3,4]</sup>。

RNA2 基因组上有 5 个开放阅读框(ORF),除由位于 5'端的 ORF 编码 21 kD 的外壳蛋白,并可在其琥珀终止密码子 UAG 通读时产生一种 75 kD 的蛋白以外,在其下游还有一个由 3 个 ORF 构成,分别编码 42 kD, 13 kD 和 15 kD 蛋白的“三联基因区”(triple-block)。实验表

收稿日期: 2001-07-13

\* 于嘉林,教授,博导,研究方向为植物分子病毒学。联系作者。

明“三联区”蛋白参与病毒在细胞间的移动<sup>[5-7]</sup>。另外,李毅等<sup>[8]</sup>还发现利用体外转录获得的重组 BNYVV 感染甜菜时, RNA3 对甜菜丛根病的症状表现具有决定性作用。由于不同株系的 BNYVV 感染同一品种甜菜可以产生不同症状,对不同来源的 BNYVV 核苷酸序列进行比较分析具有十分重要的意义。通过这项工作,可以从分子水平上了解我国主要甜菜种植区所发生的 BNYVV 分离物之间,以及我国 BNYVV 主要发生类型与国外报道的有关株系的相互关系,并为探讨这些基因在致病过程中的功能机理,指导甜菜品种的国外引进以及甜菜丛根病的防治提供基础性资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 BNYVV RNA 的提取

BNYVV 内蒙呼和浩特分离物(HU)由当地甜菜发病田块分离得到,汁液摩擦接种番杏(*Tetragonia expansa*)进行繁殖。黑龙江(HEI)、宁夏(NIN)和包头(BAO)分离物的病毒则直接来源于病土培育的发病甜菜病根。由提纯的病毒中提取病毒 RNA,提取方法同文献<sup>[6]</sup>。

### 1.2 病毒 cDNA 的合成与克隆

采用 RT-PCR 方法扩增<sup>[6,9]</sup> BNYVV RNA2 和 RNA3 的 cDNA,依据 Bouzoubaa 等<sup>[10]</sup>报道的 BNYVV F2 分离物 RNA2 的核苷酸序列和已知的内蒙呼和浩特分离物(HU)的 RNA3 序列<sup>[11]</sup>,设计并合成下列寡核苷酸引物:

P1: 5'-AAGTACAGCGTAGAACGGGCG-3'

P2: 5'-GATGAGGTCACCTCGTGTGC-3'

P3: 5'-CGCAACTCCCAAATTGAGC-3'

P4: 5'-CAATATACTGAAAACAGACCC-3'

P5: 5'-TCATCATCTAGAGGCCCATATGGGTGATA-3'

P6: 5'-TGAAATTGGGATCCCTCTAATCA-3'

P7: 5'-GTCAATATACTGACAAAGAACCCTACA-3'

其中 P1 与 F2 分离物 RNA2 的 2137~2157 nt 相对应;P2 与 RNA2 的 2691~2709 nt 相对应;P3 与 RNA2 的 3813~3795 nt 互补;P4 与 RNA2 的 4609~4589 nt 互补;P5 与 BNYVV RNA3 428~456 nt 相对应;P6 与 BNYVV RNA3 1100~1122 nt 互补;P7 与 BNYVV RNA3 的 3'末端 1775~1748 nt 互补。

cDNA 的克隆、连接、转化、质粒提取、酶切均参照 Sambrook 等<sup>[6]</sup>的方法进行。克隆载体为 pGEM-7Z 和 PUCmT-Vector。

### 1.3 序列测定与分析

用双脱氧终止法对所得的 cDNA 克隆测序,或采用 PCR 产物直接测序。用 Sequenase Version 2.0 测序试剂盒(US Biochemical),并参照其说明在 ABI-377 型 DNA 自动测序仪上完成。

用 Beckman 公司的 Micro Genie 序列分析软件对序列进行计算机分析,并与 F2<sup>[10]</sup>、G1<sup>[10]</sup>、日本 S<sup>[12]</sup>分离物和已知的内蒙呼和浩特分离物(HU)的 RNA3<sup>[11]</sup>核苷酸进行比较。

## 2 结果

### 2.1 BNYVV RNA 部分基因组 cDNA 的 RT-PCR 扩增

以 BNYVV 内蒙呼和浩特分离物(HU)的总 RNA 为模板,以 P1 和 P4 为引物,经反转录

和 PCR 扩增, 得到特异性的 RNA2 片段, 长度约 2.5 kb, 与设计相符。

用 BNYVV 分离物 HEI、NIN、BAO 提取病毒 RNA, 以 P6 或 P7 为引物反转录合成 RNA3 cDNA 第一链。以第一链为模板, 对 HEI 分离物以 P5、P6; 对 NIN 和 BAO 分离物以 P5、P7 为引物分别进行 PCR 扩增, 获得长度约 0.7 kb 和约 1.3 kb 的 cDNA 扩增产物。

## 2.2 扩增产物的克隆与序列测定

扩增得到的 RNA2 片段经 *EcoR* I 酶解后得到 1.5 kb 和 0.9 kb 的片段。将 0.9 kb 片段经 T<sub>4</sub> DNA 聚合酶处理成平齐末端后, 克隆到 pGEM-7Zf(+) 的 *Sma* I 位点。经筛选得到一个正向插入的重组质粒。剩余片段则利用合成引物 (P2、P3) 进行 PCR 产物直接测序。结果表明, 所得 BNYVV RNA2 片段包括了构成“三联基因区”的全部核苷酸, 长度为 2 435 个核苷酸。

将得到的 RNA3 cDNA 产物连接到 PUCmT-Vector 上, 经序列分析测定, 不同分离物插入片段的核苷酸长度有所差别, 其中, BNYVV 内蒙包头、黑龙江和宁夏分离物的序列长度分别为 660 bp, 660 bp 和 663 bp。

## 2.3 不同 BNYVV 分离物的序列比较分析

**2.3.1 RNA2“三联基因区”片段** 序列分析表明, BNYVV 内蒙呼和浩特分离物 RNA2 的“三联基因区”与法国的 F2、德国的 G1、日本的 S 相比, 其核苷酸序列同源性分别为 97.7%、94.9% 和 96.2%。对内蒙呼和浩特分离物的 42 kD 蛋白基因编码区的核苷酸序列与 F2、G1 和 S 相比较, 其一致性分别为 98.4%、96.2% 和 96.3%。同时对这一区段的酶切位点进行比较分析 (表 1) 表明 BNYVV 内蒙呼和浩特分离物与国外报道的典型株系均有一定的差异。

表 1 BNYVV 内蒙呼和浩特分离物“三联基因区”与 F2、S 和 G1 分离物间酶切位点比较

项目	<i>Bgl</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Mlu</i> 113 I	<i>Mst</i> I	<i>Sac</i> I	<i>Sau</i> I	<i>Sst</i> I	<i>Bst</i> D102 I	<i>Bsu</i> 36 I	<i>Cvn</i> I
F2	—	—	—	+	—	+	—	+	+	+
S	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+
G1	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+
HU	+	+	+	—	+	—	+	—	—	—

注: (+) 为存在的酶切位点; (—) 为不存在的酶切位点。

**2.3.2 RNA3 25 kD 蛋白编码区序列分析** 将本研究所得 BNYVV 内蒙包头 (BAO)、黑龙江 (HEI) 和宁夏 (NIN) 分离物的 RNA3 25 kD 蛋白编码区序列与以前报道的内蒙呼和浩特分离物 (HU)、法国 F2、德国 G1、日本 S 分离物的 RNA3 25 kD 编码区 (长度皆为 660 bp) 的序列相比较可见, 国内外不同分离物之间 RNA3 25 kD 编码区的序列均存在一定的差异, 变异幅度接近 (表 2)。

表 2 BNYVV 物不同分离物 RNA3 25 kD 蛋白编码区序列比较

项目	BAO	HEI	NIN	HU
F2	95.9	96.8	96.4	95.5
S	96.1	97.7	95.0	96.5
G1	94.8	98.2	94.4	95.6
HU	94.7	96.7	95.5	
NIN	94.2	96.0		
HEI	96.1			

但其中宁夏分离物在此编码区的 483 nt 以后插入了 3 个核苷酸 (TCG)。

## 3 讨 论

根据对 RNA2“三联基因区”至 3' 端核苷酸序列和 42 kD 蛋白编码区序列的比较, 可以推断内蒙呼和浩特分离物 HU 与法国分离物 F2 的同源性关系较近。而已得到的内蒙呼和浩特分离物 RNA2 75 kD 通读蛋白的核苷酸序列<sup>[13]</sup>则表明其与德国分离物 G1 一致性更近。但通

过对其酶切位点(表1)的比较则显示内蒙呼和浩特分离物HU与日本S、德国G1的关系较近。说明内蒙呼和浩特分离物与国外报道的典型A株系(F2)和B株系关于此“三联基因区”核苷酸的差异是否会引起病毒在细胞间移动的变化,还有待于进一步的研究。

核苷酸序列测定结果表明,BNYVV黑龙江、宁夏和包头分离物的RNA3与呼和浩特分离物的RNA3 25 kD编码区的相比,其一致性分别为96.7%,95.5%和94.7%。根据黑龙江、宁夏和包头分离物序列的两两比较,可以看出宁夏分离物明显地与其他分离物有较大差异,而黑龙江分离物与其他分离物的一致性则较近。它们同时与F2,G1和S分离物25 kD序列相比较时,发现中国境内的各分离物都与日本S分离物亲源关系较近,黑龙江分离物序列与G1分离物最接近,为98.2%(表2)。

甜菜坏死黄脉病毒的RNA3不仅是甜菜丛根病症形成的决定因子,而且还与病毒在根组织中的扩展有关。Tamada根据BNYVV接种番杏表现的病斑类型,将BNYVV分为同心环(CR)、黄斑(YS)、褪绿斑(CS)和坏死斑(NS)4个类型<sup>[14]</sup>。现已知,产生YS症状需要RNA3基因组上的25 kD蛋白表达;含有内部缺失RNA3的BNYVV则引起严重的坏死枯斑(NS),即NS症状是由N蛋白的表达引起的。ORF N起始于25 kD蛋白基因的3'末端,在全长RNA3上仅有微量表达,但可通过上游序列翻译激活<sup>[15]</sup>。在BNYVV RNA3基因组所编码的3种蛋白中,25 kD蛋白在不同分离物间比N蛋白和4.6 kD蛋白存在更大变异。至于这种变异与BNYVV对甜菜的致病性的相互关系,以及各分离物25 kD蛋白的表达产生的生物学效应,尚待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 高锦梁,邓峰,刘仪,等.在我国发生的甜菜坏死黄脉病毒病.植物病理学报,1983,13:1~4
- 2 Richards K E, Tamata T. Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus. *Ann Rev Phytopathol*, 1992, 30:291~313
- 3 Canova A. Appunti di patologie della barbabietola. *Informatore Fitopatologica*, 1959,9:390~396
- 4 Tamada T, Shirako Y, Abe H, et al. Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *J Gen Virol*,1989,70:3399~3409
- 5 Schmitt C, Ezequiel B, Gerard J, et al. *In vitro* mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA2: evidence that a domain of the 75 kD readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*,1992,89:5715~5719
- 6 Niesbach-klosgen U, Guilley H, Jonard G, et al. Immunodetection *in vivo* of beet necrotic yellow vein virus encoded proteins. *Virology*,1992,178:52~61
- 7 Gilmer D, Bouzoubaa S, Hehn A, et al. Efficient cell to cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA2. *Virol*,1992,189:40~47
- 8 李毅,王琰,刘一飞,等.甜菜坏死黄脉病毒RNA3序列分析及在大肠杆菌中的表达.微生物学报,1995,35:410~420
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989
- 10 Bouzoubaa S, Guilley H, Jonard G, et al. Nucleotide sequence analysis of RNA-3 and RNA-4 of beet necrotic yellow vein virus, isolates F2 and G1. *J Gen Virol*,1985,66:1553~1564
- 11 李大伟,于嘉林,等.甜菜坏死黄脉病毒内蒙RNA3序列分析及编码25 kD蛋白基因在大肠杆菌中的表达.病毒学报,1998,14:165~171
- 12 Saito M, Kiguchi T, Kusume T, et al. Complete nucleotide sequence of the Japanese S of beet necrotic yellow vein virus RNA and comparison with European isolates. *Arch Virol*,1996,141:2163~2175
- 13 于嘉林,李大伟,刘仪.甜菜坏死黄脉病毒75 kD通读蛋白基因构建与表达.生物工程学报,1995,11:6~12
- 14 Richards K E, Tamata T. Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus. *Ann Rev Phytopathol*,1992,30:291~313
- 15 Jupin I, Guilley H, Richards K E, et al. Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J*,1992,11:479~488