

# 从云南烟草上检测到的黄瓜花叶病毒亚组 II 分离物<sup>\*</sup>

李 凡<sup>1 2</sup> 周雪平<sup>1</sup> 戚益军<sup>1</sup> 陈海如<sup>2</sup> 李德葆<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

(<sup>2</sup> 云南农业大学云南省植物病理重点实验室 昆明 650201)

**摘 要** 在对云南省烟草病毒病的研究中,分离到一种直径约 26~30nm 的球形病毒。提纯病毒进行的 SDS-PAGE 发现一条 55kD 蛋白带。55kD 蛋白 N-端 10 个氨基酸与 CMV 亚组 II 的 Q 株系外壳蛋白 N-端氨基酸同源性为 100%。以 CMV-Q 抗血清对 55kD 蛋白进行了 Western blot 检测,发现 55kD 蛋白与 CMV Q 株系抗血清有血清学反应。根据已报道的 CMV 亚组 II 外壳蛋白基因序列合成引物,采用 RT-PCR 技术扩增到一条约 0.9kb 的 cDNA 条带,并进行了克隆及序列测定。经 Genbank 比较,发现此 0.9kb cDNA 包含一 657bp 的外壳蛋白基因,其核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与 CMV 亚组 II 分离物有极高的同源性,分别达 97%~98% 和 96%~99%,而与亚组 I 分离物的同源性仅为 75%~76% 和 78%~79%。因此,该球形病毒应为 CMV 亚组 II 的一个分离物,命名为 CMV-YNb。

**关键词**: 球形病毒, 黄瓜花叶病毒, 亚组 II

中图分类号: S432.4 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)04-0346-51

病毒是引起烟草严重病害的一类病原,在云南各烟区都有病毒病的发生,而且常常是多种病毒的复合感染或病毒与其它病原的复合感染。孔宝华等<sup>[1]</sup>多年对云南省主要烟区病毒病的调查研究结果表明,该省烟草病毒以 TMV、CMV 为主要种类,而且多数病株均为 TMV 和 CMV 混合感染,二者复合感染率达 43%,TMV 单独感染率为 21%,CMV 单独感染率约为 3.5%。我们在对云南西部烟区保山烟草病毒病的研究中,发现感病烟株病毒提纯产物经 2% PTA 负染后为大量杆状的 TMV,而经 1% UAc 负染后还发现了少量直径约 26~30nm 的球形病毒(命名为 CMV-YNb)。提纯病毒进行的 SDS-PAGE 发现除 TMV 的 17.5kD 外壳蛋白外,还同时含有一条约 55kD 的蛋白。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒源

感病烟株采自云南省保山市板桥镇烟田,病株于无虫温室无菌土栽培保存。

### 1.2 质粒和受体菌

pGEM-T Easy Vector 为 Promega 公司产品,大肠杆菌 JM109 为本所保存。

<sup>\*</sup> 云南省科委重点基金(95C0081),浙江省自然科学基金委青年科技人才培养专项资金(RC97013)及教育部跨世纪人才基金资助项目

本文报道的基因序列在 EMBL 中的登录号为 AJ242585

作者简介:李 凡(1970-)男,云南凤庆人,云南农业大学讲师,博士,主要从事植物病毒病害研究

收稿日期:1999-06-28,修回日期:1999-10-18

1.3 酶、试剂盒及其它化学试剂

PCR、ProtoBlot® Western Blot AP Systems 试剂盒、Universal Riboclone® cDNA Synthesis System 试剂盒为 Promega 公司产品 ,QIAquick Gel Extraction 试剂盒和 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒为 QIAGEN 公司产品 ,TRIzol® 试剂为 GIBCO/BRL 公司产品。

1.4 55kD 蛋白 N-端氨基酸序列测定及 Western blot 检测

提纯病毒的 SDS-PAGE 及蛋白转膜按李德葆等<sup>[2]</sup>方法进行 ,最后从 PVDF 膜上剪下 55kD 蛋白 ,分别送北京大学和日本 Yokohama 大学进行测序。进行 Western blot 检测转膜时以硝酸纤维素滤膜取代 PVDF 膜。Western blot 检测采用 ProtoBlot® Western Blot AP Systems 试剂盒并按公司提供的产品使用说明书进行。CMV-Q 多抗血清由澳大利亚 Adelaide 大学 J.W.Randles 教授惠赠。

1.5 55kD 蛋白的变性试验

55kD 蛋白 SDS-PAGE 前进行如下变性处理 :处理 1 2% SDS ,95 – 100℃ 加热 5min ;处理 2 2% SDS ,95 – 100℃ 加热 10min ;处理 3 2% SDS ,0.1% 巯基乙醇 ,95 – 100℃ 加热 10min ;处理 4 4% SDS ,0.1% 巯基乙醇 ,95 – 100℃ 加热 10min ;处理 5 4% SDS ,0.2% 巯基乙醇 ,95 – 100℃ 加热 10min。

1.6 CMV 亚组 II 分离物 CP 基因的克隆及序列测定

根据 55kD 蛋白 N 端氨基酸测序结果和 Western blot 检测结果 ,结合已报道的 CMV 亚组 II(CMV Q 株系)CP 基因及其部分 5' 端基因间隔区序列<sup>[3]</sup> ,设计合成了一对用于扩增 CMV Q 株系 CP 基因的引物 QCf/QCr(上海 Sangon 公司合成) ,引物序列如下 :

- 5' 端引物 QCf 为 5'-AGAGTCCCGTGTGAGTTGTAA-3' ;
- 3' 端引物 QCr 为 5'-TTAACGTCTTCGGACGCCGGT-3' 。

病毒总 RNA 采用 TRIZOL® 试剂从病毒提纯产物提取 ,具体方法参照戚益军等<sup>[4]</sup>。取病毒 RNA 1μg 与 0.5μg3' 端引物 QCr 充分混匀 ,70℃ 保温 10min 后 ,采用 Universal Riboclone cDNA Synthesis System 试剂盒合成 cDNA 第一链。取 1μL 第一链 cDNA ,用 Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 进行 PCR 扩增。扩增条件为 :94℃ 变性 1min ,65℃ 退火 1min ,72℃ 延伸 1min ,共 35 个循环。最后一轮循环后再 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶分析后 ,割取预期的 0.9kb 左右 DNA 条带 ,用 QIAquick Gel Extraction 试剂盒纯化。纯化后的 DNA 片断采用 pGEM-T Easy Vector System 试剂盒进行连接 ,连接产物转化大肠杆菌 JM109。在含氨苄青霉素的麦康凯平板上挑取白色菌落。抽提质粒 DNA ,PCR 及酶切筛选出具有 0.9kb 左右插入片段的重组子。选取两个重组子 pQC5 和 pQC6 用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒提取质粒 DNA ,然后采用 PE 公司的 ABI PRISM 377 DNA 自动测序仪进行序列测定。

2 结果和分析

2.1 55kD 蛋白 N-端氨基酸序列及其 Western blot 检测

55kD 蛋白分别经北京大学和日本 Yokohama 大学进行了 N 端氨基酸序列测定 ,两次均测了十个氨基酸 ,结果完全一致 ,此 55kD 蛋白的 N 端十个氨基酸序列为 :MDKSGSP-NAS ,经联网查询发现这十个氨基酸序列与 CMV 亚组 II 的 CMV Q 株系外壳蛋白 N 端

氨基酸同源性为 100 %。为了进一步确证 55kD 蛋白与 CMV Q 株系的关系 ,以 CMV-Q 抗血清对 55kD 蛋白进行了 Western blot 检测 ,结果发现 55kD 蛋白与 CMV Q 株系抗血清有血清学反应 (图 1)。

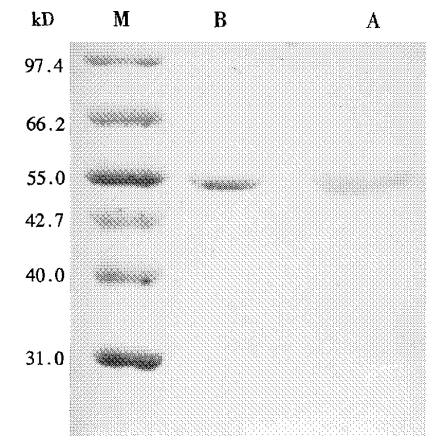


图 1 含有 55kD 蛋白的 CMV-YNb 的 Western blot 检测( Q-CMV 抗血清 )  
Fig.1 Western blot analysis of CMV-YNb with 55kD protein( antiserum against to CMV-Q).  
A. Western blot ; B. Stained with 0.1% Coomassie Blue R-250.

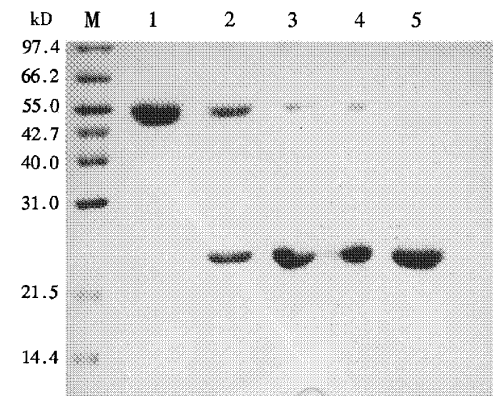


图 2 55kD 蛋白的变性试验  
Fig.2 Denaturing electrophoresis of the 55kD protein.  
M. Protein markers( kD );1. 2 % SDS ,95℃ ~ 100℃ for 5min ;2. 2 % SDS ,95℃ ~ 100℃ for 10min ;3. 2 % SDS ,0.1 % mercaptoethnaol ,95℃ ~ 100℃ for 10min ;4. 4 % SDS ,0.1 % mercaptoethnaol ,95℃ ~ 100℃ for 10min ;5. 4 % SDS ,0.2 % mercaptoethnaol ,95℃ ~ 100℃ for 10min.

2.2 55kD 蛋白的变性试验

从 55kD 蛋白 N-端氨基酸序列及其 Western blot 检测结果 ,发现此 55kD 蛋白与 CMV 亚组 II 的 CMV Q 株系外壳蛋白关系较为密切 ,CMV Q 株系外壳蛋白约 27kD ,而我们发现的球形病毒( CMV-YNb )的蛋白分子量约为 55kD ,是 27kD 的两倍。为此我们进行了 55kD 蛋白的变性试验 ,发现当逐渐增加变性条件如提高 SDS 浓度或/和增加巯基乙醇浓度以及增加煮沸时间等处理 ,55kD 蛋白逐渐降解 ,相应的约 27kD 蛋白的量逐渐增加(图 2)。因此推测此 55kD 蛋白可能为 CMV-YNb 27kD 外壳蛋白的二聚体 ,但资料查询却未发现极为同源的 CMV 亚组 II 分离物的外壳蛋白有二聚体现象。

2.3 CMV 亚组 II 分离物 CP 基因的分离克隆及序列分析

为了进一步探明所发现的 CMV-YNb 与 CMV 亚组 II 的 CMV Q 株系的关系 ,根据已报道的 CMV Q 株系 CP 基因序列 ,选择与 CMV 亚组 ICP 基因 5'端和 3'端有较大差异的区域 ,设计合成了用以扩增 CMV Q 株系 CP 基因的引物 ,采用 RT-PCR 技术 ,从病毒提纯产物总 RNA 模板中扩增到一条约 0.9kb 的 DNA 条带 ,与引物设计相符。对此 0.9kb DNA 扩增产物进行了克隆 ,经过一系列筛选鉴定后选出两个重组子 pQC5 和 pQC6 进行正反向序列测定 ,结果表明此 cDNA 全长 907 个碱基 ,去除 5'端引物和 3'端引物后的 cDNA 全长 865 个碱基( EMBL 登录号为 AJ242585 )。经联网查询发现 ,此 cDNA 的 5'端含 197 个核苷酸的基因间隔区 ,中间的 657 个碱基为一编码 218 个氨基酸的 CP

基因 3'端为含 11 个核苷酸的部分非编码区(图 3)。此 CP 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与 CMV 亚组 II 分离物有极高的同源性,分别达 97%~98% 和 96%~99%,而与亚组 I 分离物的同源性仅为 75%~76% 和 78%~79%(表 1,图 4)。计算机分析此 CP 基因推导的氨基酸组成的外壳蛋白分子量约为 27kD,其 N-端氨基酸序列与 55kD 蛋白 N 端氨基酸序列测定结果完全一致,与我们推测的 55kD 蛋白可能为 CMV-YNb 27kD 外壳蛋白的二聚体相符。

3 讨论

黄瓜花叶病毒(CMV)由于自然突变、不同株系基因组之间的再重组和卫星 RNA 的作用,使得 CMV 株系繁多,寄主范围十分广泛,至少可以侵染 85 科约 865 种植物<sup>[14]</sup>。

表 1 CMV-YNb 与 CMV 两亚组中其它株系 CP 基因核苷酸和氨基酸序列的同源性

Table 1 The CP nucleotide and amino acid sequences identities between CMV-YNb with other strains belonging to CMV subgroup II or subgroup I

Subgroup	Strain	Homology/%		Reference
		Nucleotide	Amino acid	
Subgroup II	Q	98	99	5
	R	98	98	6
	Sn	98	98	7
	WL	98	97	8
	Trk7	97	96	9
	XB	97	96	10
Subgroup I	Fc	76	78	11
	Fny	76	78	12
	Ny	76	78	7
	O	75	79	13



图 3 CMV-YNb 部分 5' 端基因间隔区、CP 基因和部分 3' 端非编码区核苷酸及其 CP 基因编码的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence of partial 5' intergenic region, coat protein gene and partial 3' noncoding region and deduced amino acid sequence of CMV-YNb

CMV-YNb	MDKSGSPNASRTSRRRRPRRGSRSA-SGADAGLRALTQQMLRLNKTLAGRPTLNHPTFV
CMV-Q	MDKSGSPNASRTSRRRRPRRGSRSA-SGADAGLRALTQQMLRLNKTLAGRPTLNHPTFV
CMV-XB	MDKSESTNASRTSRRRRPRRGSRSA-SGADAGLRALTQQMLRLNKTLAGRPTLNHPTFV
CMV-Fny	MDKSESTSAGRNRRRRRPRRGSRSAPSSADANFRLVSQLSRLNKTLAGGRPTLNHPTFV
CMV-YNb	GSSECKPGYTFTSITLKPPEIEKGSYFGRRLSLPDSVTDYDKKLYSRIQIRINPLPKFDS
CMV-Q	GSSECKPGYTFTSITLKPPEIEKGSYFGRRLSLPDSVTDYDKKLYSRIQIRINPLPKFDS
CMV-XB	GSSECKPGYTFTSITLKPPEIEKGSYFGKRLSLPDSVTDYDKKLYSRIQIRINPLPKFDS
CMV-Fny	GSERCRPGYTFTSITLKPPIIDRGSYYGKRLLLPDSVTEYDKKLYSRIQIRVNPLPKFDS
CMV-YNb	TVWVTVRKVPSSSDLVAAIASAMFGDGNSPVLVYQY AASGVQANNKLLYDLTEMRADIGD
CMV-Q	TVWVTVRKVIPSSSDLVAAIASAMFGDGNSPVLVYQY AASGVQANNKLLYDLSEMRADIGD
CMV-XB	TVWVTVRKVPSSSDLVAAIASAMFGDGNSPVLVYQY AASGVQAYNKLLYDLTEMRADIGD
CMV-Fny	TVWVTVRKVPASSDLVAAIASAMFADGASPVLVYQY AASGVQANNKLLYDL SAMRADIGD
CMV-YNb	MRKYAVLVYSKDDKLEKDEIVLHVDVEHQRIPI SRMLPT
CMV-Q	MRKYAVLVYSKDDKLEKDEIVLHVDVEHQRIPI SRMLPT
CMV-XB	MRKYAVLVYSKDDKLEKDEVVLHVDVEHQRIPTSRMLPT
CMV-Fny	MRKYAVLVYSKDDALETDELVLHVDIEHQRIPTSGVLPV

图 4 CMV-YNb CP 基因与其它 CMV CP 基因的氨基酸序列比较

Fig. 4 Comparison of the coat protein gene amino acid sequences of CMV-YNb, CMV-Q and CMV-XB belonging to CMV subgroup II, CMV-Fny belonging to CMV subgroup I. Bold regions indicate identical amino acids.

CMV 株系鉴定的依据和方法较多,包括生物学、血清学、外壳蛋白肽链图谱、核酸杂交和核苷酸序列分析等。而核酸杂交和核苷酸序列分析是鉴定 CMV 株系最可靠的方法,特别是核苷酸序列分析。根据这些方法,目前绝大多数 CMV 分离物可以分成两个亚组即亚组 I 和亚组 II<sup>[3,15,16]</sup>。我国已报道的 38 科 120 多种植物上分离的 CMV,除徐平东报道在厦门的芭蕉和西蕃莲上发现的 XB 和 Pef 分离物为亚组 II 的分离物外<sup>[10]</sup>,其余均属亚组 I,说明亚组 II 在我国发生较少。我们在云南省烟草上分离到的 CMV-YNb,经外壳蛋白 N 端氨基酸序列测定、血清学鉴定和 CP 基因的序列分析,证明为 CMV 亚组 II 的一个分离物,这也是我国烟草上首次报道发现的 CMV 亚组 II 分离物。CMV-YNb 在烟草上引起花叶、坏死和矮化等症状,是生产上一个不可忽视的病原。CMV 亚组 II 的外壳蛋白分子量约为 27kDa,而用常规 SDS-PAGE 电泳测得 CMV-YNb 的外壳蛋白亚基分子量为 55kD,此 55kD 蛋白可能为 27kD 蛋白的二聚体,因为当提高变性剂中 SDS 浓度或/和增加巯基乙醇浓度以及增加煮沸时间等处理时,55kD 蛋白可转变为 27kD 蛋白。CMV-YNb 易形成二聚体的原因不详,其生物学意义也有待进一步研究。

参 考 文 献

[ 1 ] 孔宝华,杨洋川,顾刚,等.云南农业大学学报,1995,10(2):180.  
[ 2 ] 李德葆,周雪平,许建平,等.基因工程操作技术.上海:上海科学技术出版社,1996.140~151.  
[ 3 ] Palukaitis P, Roosinck M J, Dietzgen R G, et al. Adv Virus Res, 1992, 41: 281~348.  
[ 4 ] 戚益军,周雪平,李德葆,等.应用与环境生物学报,1999,5(1):69~72.  
[ 5 ] Davies C, Symons R H. Virology, 1988, 165: 216~224.  
[ 6 ] Carrere I, Tepfer M, Jacquemond M. Arch Virol, 1998, 143: 141~155.  
中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 7 ] Anderson B J , Boyce P M , Blanchard C L . *Gene* ,1995 ,**161**( 2 ) 293~294.
- [ 8 ] Quemada H , Kearney C , Gonsalves D , *et al.* *J Gen Virol* ,1989 ,**70**( 5 ) :1065~1073.
- [ 9 ] Salanki K , Thole V , Balazs E , *et al.* *Virus Res* ,1994 ,**31**( 3 ) 379~384.
- [ 10 ] 徐平东 ,周仲驹 ,林奇英 ,等 . *病毒学报* ,1999 ,**15**( 2 ) :164~171 .
- [ 11 ] Shintaku M . *J. Gen Virol* ,1991 ,**72**( 10 ) 2587~2589.
- [ 12 ] Owen J , Shintaku M , Aeschleman P , *et al.* *J Gen Virol* ,1990 ,**71**( 10 ) 2243~2249.
- [ 13 ] Haykawa T , Mizukami M , Nakajima M , *et al.* *J Gen Virol* ,1989 ,**70**( 2 ) 499~504.
- [ 14 ] Murphy F A , Fauquet C M , Bishop D H L , *et al.* *Virus Taxonomy* . Springer-verlag wien , New York , 1995 341~347.
- [ 15 ] Rizzo T M , Palukaitis P . *J Gen Virol* ,1988 ,**69** :1777~1787.
- [ 16 ] Wahyuni W S , Dietzgen R G , Hanada K , *et al.* *Plant Pathol.* 1992 ,**41** 282~297.

## DETECTION OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS SUBGROUP II ISOLATE FROM TOBACCO PLANTS IN YUNNAN PROVINCE

Li Fan<sup>1 2</sup> Zhou Xueping<sup>1</sup> Chen Hairu<sup>2</sup> Qi Yijun<sup>1</sup> Li Debao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Biotechnology , Zhejiang University , Hangzhou 310029 )

(<sup>2</sup> The Provincial Key Lab . on Phytopathology of Yunnan Province , Yunnan Agricultural University , Kunming 650201 )

**Abstract** : One of the spherical virus ( designated as CMV-YNb ) was isolated from the tobacco plants in Yunnan province. SDS-PAGE showed that this virus contained one polypeptide with molecular weights of 55kD. The polypeptide was submitted to automated Edman degradation , and found the 10 amino acid sequence of the N-terminus of 55kD protein shares 100 % identity with amino acid sequence of coat protein of CMV-Q , which is belong to CMV Subgroup II. Western blot analysis also showed that this 55kD protein was serological related to CMV-Q. A 0.9kb cDNA fragment was amplified by RT-PCR from the RNA template of CMV-YNb with the QCf/QCr primer pair , which was designed according to the CP gene sequence of CMV-Q. The cDNA fragment was then cloned and sequenced. The fragment comprises 865bp ( EMBL accession number : AJ242585 ) , including a 197bp of 5 ' intergenic region , 657bp of CP gene encoding 158 amino acids and a 11bp of 3 ' partial non-coding region. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of CMV-YNb CP gene with that of CMV strains belonging to Subgroup II , and that of CMV strains belonging to subgroup I showed 97 % ~ 98 % and 96 % ~ 99 % , 75 % ~ 76 % and 78 % ~ 79 % identities , respectively. With these data , we made a conclusion that the CMV-YNb is an isolate of CMV Subgroup II.

**Key words** : Spherical virus , Cucumber mosaic virus , Subgroup II