

# 中国南瓜曲叶病毒 DNA A 的克隆及其全序列

殷勤燕 杨怀义 王寰宇 蔡健和\* 秦碧霞\* 田 波

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 对引起我国南瓜曲叶病的病毒分离物 DNA 的克隆和序列分析表明,中国南瓜曲叶病毒 DNA A 由 2741 个核苷酸组成,共编码 6 个开放阅读框(ORF),其中病毒链有 2 个 ORF: AVI(256aa)和 AVX(140aa),AVI 为外壳蛋白基因,病毒链的互补链有 4 个 ORF,ACI(243aa)编码复制酶基因,ACX(134aa)编码反式激活蛋白,ACZ(136aa)和 AC4(172aa),该病毒属于旧世界 Begomoviruses,是一个粉虱传播的联体病毒。

**关键词**: 联体病毒,南瓜曲叶病毒,基因组

中图分类号: Q939.46 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2001)01-0031-04

联体病毒 Geminiviruses 是单链 DNA 病毒,由于它所造成的严重经济损失及特殊的基因组结构,而日益引起人们的广泛注意,特别是对其基因结构的研究更受重视<sup>[1]</sup>。根据基因组结构及寄主范围,联体病毒分为三个亚组:亚组 I(Mastreviruses)、亚组 II(Curteviruses)、亚组 III(Begomoviruses)。Begomoviruses 由粉虱传播,侵染双子叶植物,其基因组有的是双组分,包括 DNA A 和 DNA B,共编码 6-7 个开放阅读框(ORF),有的是单组分 DNA,可编码 6 个 ORFs<sup>[2]</sup>。南瓜曲叶病毒基因组的报道仅见美国(SLCV-E)<sup>[3~5]</sup>,是一个双组分 Begomoviruses,寄主范围较广<sup>[6,7]</sup>,其 DNA A 长度为 2635bp,编码 4 个 ORFs, DNA B 长度为 2604bp,编码 2 个 ORFs。洪益国<sup>[8]</sup>认为中国南瓜曲叶病毒不同于 SLCV-E,是一个新的粉虱传播的联体病毒,并与印度木薯花叶病毒(ICMV)有较近的亲缘关系。本文首次克隆并测序了中国南瓜曲叶病毒(SLCV-CHI)DNA A 的全序列。通过对其序列比较分析,进一步证实 SLCV-CHI 是一个旧世界 Begomoviruses。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒来源

南宁大田中表现曲叶症状的南瓜植株,采取病叶现用或 -20℃ 保存备用。

### 1.2 总 DNA 提取

取 30g 叶片按 Hong Y.G.<sup>[9]</sup>的方法提取南瓜叶片的总 DNA。

### 1.3 PCR 反应

**1.3.1 引物** 根据 SLCV-CHI 外壳蛋白的序列<sup>[8]</sup>,设计并合成了一对背对背引物:

1.5 'CCGGATCCAAGCACTGCAACGGTGAAG3'

2.5 'CGGAATTCCAACGCGATGTGTGAGTC3'

\* 广西农科院植保所

作者简介:殷勤燕(1963-),女,山东褚城人,博士,主要从事植物病毒学研究,现赴美国哈佛大学研修。

收稿日期:2000-03-27,修回日期:2000-06-30

**1.3.2 PCR 反应** :50μL 体积内含 1μL 上述制备的 DNA ,75pmol 引物 ,0.2mmol/L 4 × dNTPs ,1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub> ,50mmol/L KCl ,1mmol/L Tris-HCl( pH8.0 ) ,1.2 个单位的 TaqDNA 聚合酶。反应条件 :首先 94℃ 2min ,55℃ 2min ,72℃ 6min 一个循环 ,再 94℃ 40sec ,55℃ 30sec ,72℃ 4min ,循环 35 次 ,最后 72℃ 延伸 15min。

**1.4 载体及克隆**

低熔点回收 PCR 产物 ,克隆入 pGEM-Tvector ,转化*E. coli* DH5α。

**1.5 测序及序列分析**

克隆的 PCR 产物由 TAKARA Biotechnology 公司测序。在计算机的帮助下 ,对序列结果进行分析并与 GenBank 的相关序列比较。

**2 结果和讨论**

**2.1 SLCV-CHI DNA A 的 PCR 扩增及其克隆**

联体病毒为环状单链 DNA 病毒 ,引物 1 和引物 2 可与 SLCV-CHI 的外壳蛋白( CP )基因特异结合 ,从发生曲叶症状的南瓜叶片总 DNA 中扩增到一约 2.7kb 的特异片段 ,但在健康南瓜叶片中无此扩增。用已知 CP 基因上存在的酶切位点 *Sph*I 和 *Nsi*I 初步鉴定后 ,克隆入 pGEM-Tvector 并测序。此序列已由 GenBank 接收( 登录号 No. AB027465 )。

**2.2 SLCV-CHI DNA A 的全长序列及其 ORFs**

SLCV-CHI DNA A 病毒链的全长核苷酸序列共 2741bp ,其中 730 个 A、591 个 C、600 个 G、820 个 T。它包含了联体病毒的保守序列 TAATATTAC 及已知的 SLCV-CHI 的外壳蛋白序列。与已发表的 LSCV-CHI 的核苷酸序列同源性为 99% ,氨基酸同源性为 99% ,说明此 PCR 产物是中国南瓜曲叶病毒特有的。计算机对其序列分析表明 LSCV-CHI DNA A 至少编码 6 个 ORF( 见表 1 )。同其它旧世界 Begomovirus 一样 ,病毒链编码 2 个 ORFs :AV1 和 AV2 ,其中 AV1 编码一个 256aa 的外壳蛋白 ,这与洪益国的结果一致<sup>[8]</sup>。病毒链的互补链编码 4 个 ORFs :AC1、AC2、AC3 和 AC4( 图 1 )。其中 AC1 为复制酶基因 ,长为 729bp( 243aa ) ,A、C、G、T 的百分含量为 26.6% ,21.6% ,21.9% 和 29.9% ; AC2 为反式激活蛋白。

表 1 中国南瓜曲叶病毒的开放阅读框架

Table 1 The ORF of SLCV-CHI

ORF	Virus sense strand			Complementary sens strand		
	AV1	AV2	AC1	AC2	AC3	AC4
nucleotide number	768	450	729	402	408	526
amino acid number	256	150	243	134	136	172
molecular weight	29465	16229	27559	15173	15898	19484
site : begin	280	6	2230	1596	1457	828
end	1047	455	1502	1195	1050	313

**2.3 SLCV-CHI 与其它联体病毒的核苷酸序列比较**

SLCV-CHI DNA A 的全序列比较显示 LSCV-CHI 与印度番茄曲叶病毒 DNA A ( ToLCV-In1 ) 的同源性最高为 85.82% ,与 ToLCV-In2 DNA B 的同源性为 84.89% ,

与 Angled luffa 曲叶病毒( LuLCV-Ang )的同源性为 84.604%。SLCV-CHI 与亚洲地区联体病毒有较近的亲缘关系 ,而与其它地区的联体病毒亲缘关系较远 ,与美国南瓜曲叶病毒 SLCV-E DNA 序列的同源性仅为 62.3% ,所以 ,它完全不同于 SLCV-E。据此全序列构建的分子进化树( 见图 2 )进一步表明 SLCV-CHI 为一旧世界的 Begomociruse。

2.4 LSCV-CHI 与其它联体病毒的氨基酸序列比较

联体病毒的 CP 基因是高度保守的 ,在旧世界联体病毒中 ,其氨基酸同源性已达 92%。而在新世界联体病毒中 ,LSCVE ,TGMV 和 BGMV 的 CP 基因氨基酸同源性高于 90% ( Lazarowitz 1991 )<sup>[11]</sup>。洪益国认为中国南瓜曲叶病毒的 CP

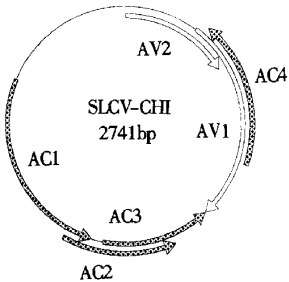


图 1 中国南瓜曲叶病毒基因组结构示意图  
Fig. 1 The gene structure of SLCV-CHI

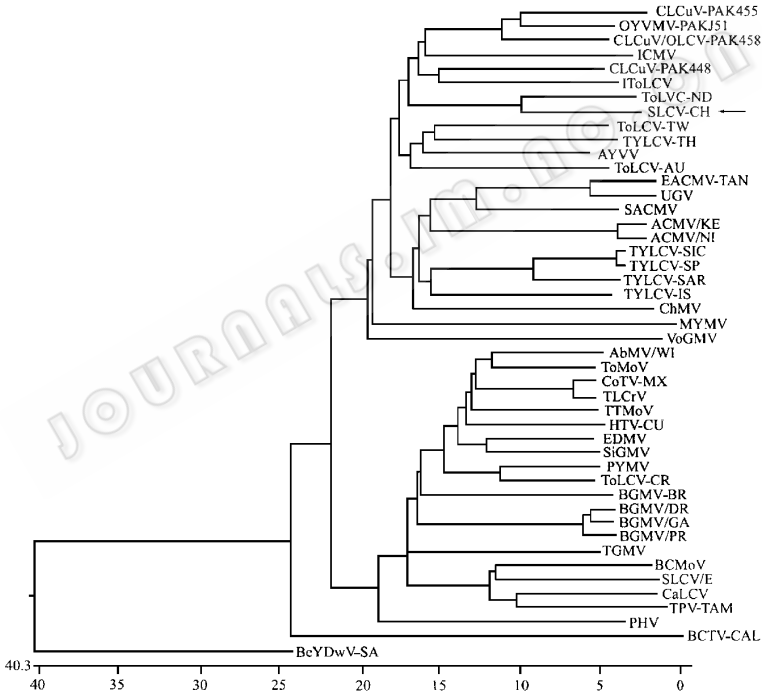


图 2 中国南瓜曲叶病毒的发育树

Fig. 2 The Phylogenetic tree of SLCV-CHI

基因与 ICMV 的同源性为 90%<sup>[8]</sup> ,我们的实验结果表明它与 ToLCV-In1 ,ToLCV-In2 , LuLCV-Ang 的同源性较高 ,为 90% ~ 91% ,而与 Mastrevirus、Curtevirus 的同源性更低 ,分别为 54% ~ 60%和 40% ~ 49%。复制酶基因 AC1 是互补链的 4 个 ORFs 中最保守的 ORF ,它与 TolCV-In 的同源性最高 83% ,而与美国南瓜曲叶病毒的同源性仅为 56% ,AC4 则是联体病毒 ORF 中保守性最低的 ,中国南瓜曲叶病毒 AC4 氨基酸的同源性在 38% ~ 69%( 见表 2 )。

表 2 中国南瓜曲叶病毒 ORF 氨基酸与其它一些联体病毒的同源性比较

Table 2 The amino acid identity between LSCV-CHI and other geminivirus

	Begomovirusse								Curtoviruses
	Old World				New World				
	ToLCV-In1	ToLCV-In2	ToLCV-Ang	TLCV	BDMV	PYMV	TGMV	BGMV	
AC1	83	81	80	79	55	58	59	60	49
AV1	91	91	91	90	41	40	39	40	–
AC2	64	67	–	67	48	46	51	48	32
AC3	80	83	83	84	–	40	–	44	40
AC4	69	70	69	–	68	69	69	69	–
AV2	80	76	76	68	–	–	–	–	–

氨基酸的同源性比较与核苷酸的同源性比较的结果基本一致 ,中国南瓜曲叶病毒与印度番茄曲叶病毒的亲缘关系较近 ,属于旧世界 Begomovirusse。

参 考 文 献

[ 1 ] Czosnek H , Laterrot H. *Archives of Virology* ,1997 ,**142** :1391~1406.

[ 2 ] Davies G L. *Critical Reviews in Plant Sciences* ,1992 ,**11**( 4 ) :327~349.

[ 3 ] Cohen S , Duffus J E , Larson R C *et al.* *Phytopathology* ,1983 ,**73**( 12 ) :1669~1673.

[ 4 ] Robert F. *Plant Disease* ,1981 ,**65**( 1 ) :75~76.

[ 5 ] Dodds J A , Lee J G , Nameth S T *et al.* *Phytopathology* ,1984 ,**74** :221~225.

[ 6 ] Lazarawitz S C , Lazdins I B. *Virology* ,1991 ,**180** :58~69.

[ 7 ] Lazarowitz S G. *Virology* ,1991 ,**180** :70~80.

[ 8 ] 洪益国 ,蔡健和 ,王小凤 ,等 .中国科学( B 辑 )1994 ,**24**( 6 ) :608~613.

[ 9 ] Hong Y G , Robinson D J , Harrison B D *J Gen Virol* ,1993 ,**74** :2437~2443.

[ 10 ] Malla P , Roger N B , Caude M F. *J Gen Virol* ,1995 ,**76** :249~263.

[ 11 ] Lazarowitz S G , Lazdins I N. *Virology* ,1991 ,**180** :58~69.

CLONING AND SEQUENCING OF CHINESE SQUASH LEAF CURL VIRUS

Yin Qinyan Yang Huaiyi Wang Huanyu Cai Jianhe Qin Bixia Zhang Zhongze Tien Po  
( Dept. of Molecular Virology and Bioengineering , Inst. of Microbiology ,CAS , Beijing 100080 , China )

**Abstract** : Sequence analysis of virus isolation DNA of Squash leaf curl disease shows that Squash Leaf Curl Virus ( SLCV-CHI ) contains 2741nt , which encode six Open Reading Frames( ORFs ). Two of them are on virus sense strand :AV1 ( 256aa ) and AV2 ( 140aa ). AV1 encode coat protein. The other of ORFs are on complementary sense strand :AC1 ( replicase gene , 243aa ) , AC2 ( transactivtor , 134aa ) , AC3 ( 136aa ) and AC4 ( 172aa ). The virus belongs to one number of begomoviruses from old world.

**Key words** : Geminiviruses , Squash leaf curl viruse , Genome