

## 鸢尾重型花叶病毒泰安分离物全基因组的测定与分析

Cloning and analysis of the complete genomic sequence of *Iris severe mosaic virus* Tai'an isolate唐伟<sup>1,2</sup> 李凡<sup>1</sup> 高瑞<sup>1</sup> 李洪刚<sup>2</sup> 林彦茹<sup>2</sup> 徐晓辉<sup>1\*</sup>

(1. 山东省农业科学院植物保护研究所, 山东省植物病毒学重点实验室, 济南 250100;

2. 山东省植物保护总站, 济南 250100)

Tang Wei<sup>1,2</sup> Li Fan<sup>1</sup> Gao Rui<sup>1</sup> Li Honggang<sup>2</sup> Lin Yanru<sup>2</sup> Xu Xiaohui<sup>1\*</sup>

(1. Shandong Key Laboratory of Plant Virology, Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural

Sciences, Jinan 250100, Shandong Province, China; 2. Shandong Provincial Station of Plant

Protection, Jinan 250100, Shandong Province, China)

鸢尾观赏价值极高,且是制作香水和中药的重要原材料。鸢尾重型花叶病毒(*Iris severe mosaic virus*, ISMV)属马铃薯Y病毒属 *Potyvirus*,是导致鸢尾花叶病的主要病原,广泛分布于我国各鸢尾种植区。近年来随着园艺植物贸易的频繁化与国际化,ISMV可随鸢尾种苗在全球各国间调运,存在广泛扩散的潜在威胁。本研究拟通过扩增 ISMV 泰安分离物全基因组序列,并对该序列特征进行分析,以期了解我国 ISMV 的遗传进化并对该病害的防控提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试病样:于2015—2016年在山东省泰安市采集表现花叶症状的鸢尾样品6份,-80℃保存备用。

试剂及仪器:ISMV DAS-ELISA 试剂盒,美国 AC Diagnostics 公司; M-MLV、RRI、dNTP、MiniBEST Universal RNA Extraction Kit、5'-Race 试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;凝胶回收试剂盒、TransStart FastPfu Fly DNA 聚合酶、pBlunt 载体,北京全式金生物技术有限公司;其它试剂均为国产分析纯。iMark 型酶标仪、My Cycle 型 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司; JY300E 型电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司。

### 1.2 方法

**DAS-ELISA 检测:**将采集的6份鸢尾病样中分别加入 PBS 缓冲液进行研磨,与 ISMV DAS-ELISA 试剂盒提供的阴性和阳性对照按照试剂盒说明书进行操作,待反应终止后,用酶标仪在波长 405 nm 下读数,判断病样携带 ISMV 的情况。

**全基因组序列测定与分析:**从 DAS-ELISA 检测呈阳性反应的鸢尾病样中随机选取 1 份,称取 100 mg,

用液氮磨碎,参照 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 说明书提取 RNA,溶于 DEPC 超纯水中,-80℃保存。3'-Race 操作以提取的 RNA 为模板,以 M4T (5'-GTTTTCCAGTCACGACTTTTTTTTTTTTTTTT-3')为引物进行反转录得到 cDNA,用引物 Nib-Poty(5'-GGNAAYAYAGYGGNCARCC-3')和 M4T 进行 PCR 扩增;再以 ISMV-R1 (5'-CCTGTACG-CAGCAGAGCATATT-3')为引物进行反转录,参考陈炯和陈剑平(2002)方法扩增。25 μL 扩增体系:5× Buffer(Mg<sup>2+</sup> plus)5 μL、2.5 mmol/L dNTP 1 μL、正反向引物各 1 μL、cDNA 1 μL、DNA 聚合酶 0.25 μL、ddH<sub>2</sub>O 15.75 μL。扩增程序:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。5'-Race 操作参照 5'-Race 试剂盒说明书进行。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,克隆、测序后经 DNASTAR 软件拼接、分析,获得的 ISMV 分离物与 GenBank 中 29 个同属病毒,基于多聚蛋白氨基酸序列,利用 Mega 6.06 软件以极大似然法构建系统进化树,Bootstrap 检验 1 000 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 ISMV 的 DAS-ELISA 检测结果

采集的 6 份鸢尾病样中有 4 份与阳性对照均出现黄色的阳性反应,病样 OD<sub>405 nm</sub> 为 2.017~2.135,阳性对照 OD<sub>405 nm</sub> 为 1.989,阴性对照 OD<sub>405 nm</sub> 为 0.178,说明在泰安市采集到的病样中有 4 份携带 ISMV。

### 2.2 ISMV 泰安分离物基因组结构

除去 polyA 尾,ISMV 泰安分离物全基因组序列长为 10 406 nt,GenBank 序列号为 MF385582。其中 5' 非翻译区(untranslated region, UTR)为 126 nt,存

在马铃薯Y病毒保守区 box 'a' (A<sub>19</sub>CAACAC<sub>25</sub>) 和 'b' (C<sub>38</sub>CAAGCA<sub>44</sub>), 3'-UTR 为 238 nt。ISMV 泰安分离物开放阅读框为 9 951 nt, 编码 1 个含 3 316 个氨基酸的多聚蛋白, 被水解酶酶切形成 10 个成熟蛋白, 分别为 P1、HC-Pro、P3、6K1、CI、6K2、NIa-VPg、NIa-Pro、NIb 和 CP, 9 个酶切位点分别为 Y/S、G/G、Q/A、E/A、Q/G、Q/G、E/D、Q/G、E/G。其中 ISMV P3 基因中存在 G<sub>1-2</sub>A<sub>6-7</sub> (G<sub>3 643</sub>AAAAAAA<sub>3 651</sub>) 基序, 通过 +2 移码产生 PIPO。在 ISMV 泰安分离物基因组包含的马铃薯Y病毒属保守基序中, HC-Pro 中 KIGC 替代了 KITC, PTQ 替代了 PTK, CP 中 DAA 替代了 DAG。

### 2.3 ISMV 基因组的一致率分析

ISMV 泰安分离物全基因组序列与 ISMV 北京分离物的核苷酸和氨基酸一致率分别为 92.9% 和 96.0%, 泰安分离物基因组 5'-端比北京分离物多 3 个腺嘌呤。比对泰安分离物和北京分离物的各基因, VPg 的核苷酸和氨基酸一致率最高, 分别为 95.4% 和 100.0%, PI 的最低, 分别为 91.2% 和 91.4%。

### 2.4 ISMV 的系统发育分析

ISMV 与其它 29 个马铃薯Y病毒属病毒聚在一起, 其中 ISMV 与葱黄条病毒 (*Shallot yellow stripe virus*, SYSV) 和洋葱黄矮病毒 (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV) 聚在一个分支, 亲缘关系更近 (图 1)。

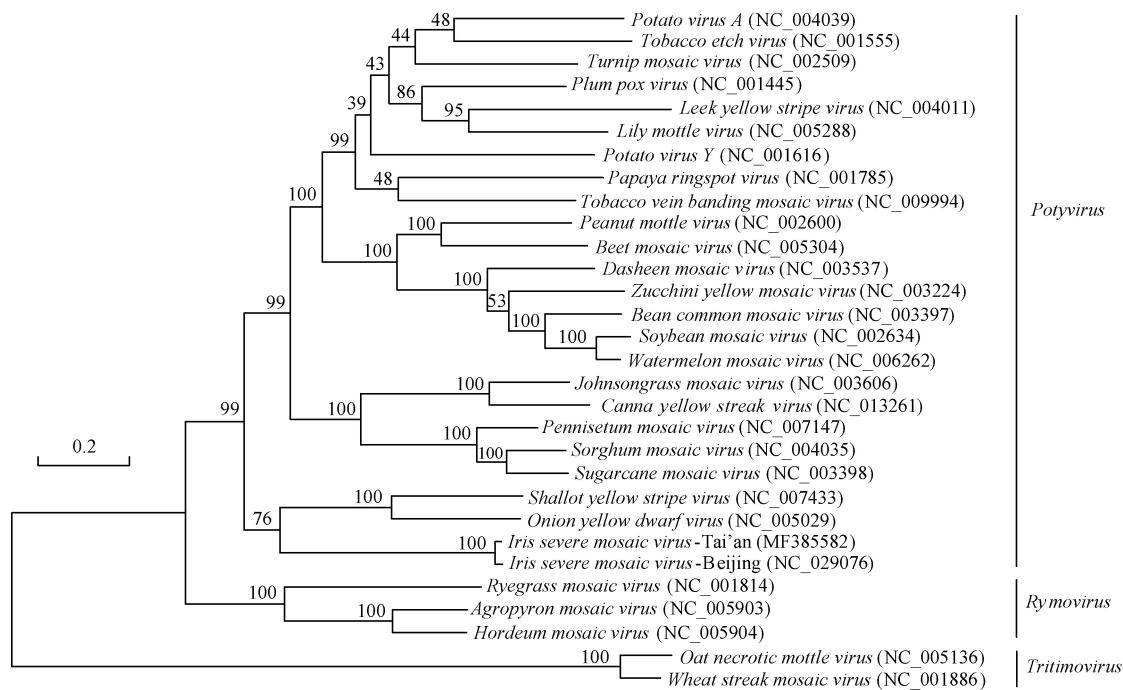


图 1 基于马铃薯Y病毒属多聚蛋白氨基酸序列构建 ISMV 泰安分离物与其相关病毒的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the polyprotein amino acid sequences of ISMV Tai'an isolate and other potyviruses

### 3 讨论

本研究利用马铃薯Y病毒属的兼并引物 PCR 和 RACE 扩增方法获得了 ISMV 的全基因组, 较 Li et al. (2016) 方法操作简单, 成本低。序列分析发现, ISMV 泰安分离物 CP 中的 DAG 变为 DAA, 这与 van der Vlugt et al. (1994) 的推断相同, 而与 Li et al. (2016) 认为 ISMV 北京分离物 CP 的 DAG 变为 TAG 不同。Flasinski & Cassidy (1998) 研究发现, 花生斑驳病毒 (*Peanut mottle virus*, PeMoV) CP 中无 DAG 基序, 但存在 DAA 基序, 且蚜传效率高, 推测与 HC-Pro 中的 CCC 基序变为 ASC 有关。介于 ISMV 中与 CP 互作的 HC-Pro 的 KITC 基序变为 KIGC, PTK 变为 PTQ, 这些变化是否影响 HC-Pro 与 CP 之间的互作, 从而对 ISMV 蚜传造成影响还需要进一步论证。

### 参考文献 (References)

- Chen J, Chen JP. 2002. Determination of genome sequence of potyviruses by degenerated PCR and RACE methods. *Chinese Journal of Virology*, 18(4): 371-374 (in Chinese) [陈炯, 陈剑平. 2002. Potyvirus 属成员基因组全序列的简并引物 PCR 和 RACE 扩增方法. *病毒学报*, 18(4): 371-374]
- Flasinski S, Cassidy BG. 1998. Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. *Archives of Virology*, 143(11): 2159-2172
- Li YQ, Deng CL, Shang QX, Zhao XL, Liu XL, Zhou Q. 2016. The first complete genome sequence of *Iris severe mosaic virus*. *Archives of Virology*, 161(4): 1069-1072
- van der Vlugt CI, Langeveld SA, Goldbach RW. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of the 3'-terminal region of *Iris severe mosaic virus* RNA. *Archives of Virology*, 136(3/4): 397-406

(责任编辑:李美娟)