

玉米粗缩病毒基因组第七组份的 cDNA 克隆及序列分析

邓文生 杨希才 张玉满 刘玉乐* 康良仪

(中国科学院微生物研究所分子病毒学与生物工程开放实验室 北京 100080)

摘 要: 从采自中国河北滦城感病的玉米材料中提取玉米粗缩病毒(MRDV)的双链 RNA。根据已知 MRDV 的部分序列设计引物,反转录、PCR 扩增,克隆并测序分析了 MRDV 的第七片段 S_7 cDNA 序列。结果表明, S_7 cDNA 序列全长为 1936bp,与国外所测的 MRDV S_7 的序列长度相等,而且 S_7 包含的两个阅读框(ORF1 和 ORF2)位置无变化。它们的核苷酸和最大开放阅读框(ORF1)同源性分别为 87.7% 和 91.6%。然而,MRDV S_7 的片段与水稻黑条矮缩病毒(RBSDV) S_8 片段的核苷酸和最大开放阅读框(ORF1)有更高的同源性,分别为 95.5% 和 93.5%。

关键词: 玉米粗缩病毒, S_7 , 基因克隆, 序列同源性

中图分类号: Q939.1.46 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2000)05-0488-94

玉米粗缩病毒(MRDV)属植物呼肠孤病毒科斐济(Fiji)病毒属的一种。自然宿主为玉米,高粱和小麦等农作物,传播介体为灰飞虱。MRDV 感染玉米后可引起植株矮化,叶色浓绿等症状,严重者不抽穗,是玉米较严重的病毒病害。目前,防治方法主要以药剂治虫来控制病情。尽管玉米粗缩病毒在我国开展调查和研究已三十多年^[1,2],但大多以病毒的生态、流行与防治研究为主。只有少数报道涉及病毒的形态、基因组、结构蛋白等生理生化的初步研究^[3,4]。已知 MRDV 基因组由 10 个 ds RNAs 的基因片段组成,而这 10 个基因片段各执行什么功能,它们如何协调完成玉米粗缩病毒的侵染、复制、转移等生命活动过程,目前仍不清楚。要解决这些问题就必须从分子水平研究和揭示它的活动规律。至今,只对基因组第六片段(S_6)序列进行过克隆和表达分析^[5],虽然 S_7 、 S_8 、 S_{10} 最近已被克隆测序,但未作表达和功能分析。本文报道来自中国河北滦城 MRDV S_7 片段克隆以及序列分析结果。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

感染玉米粗缩病毒的玉米材料采自中国河北省滦城县。菌种 *E. coli* DH5 α ,载体 pGEM7Z(+)购自 Promega 公司由本研究室保存。限制性内切酶 *Xba*I、*Hind*III、*T4*DNA 连接酶和 RT-PCR 试剂盒购自日本 Takara 宝生物公司。常规试剂为国产分析纯。

1.2 玉米粗缩病毒双链 RNA 的提取

称取感病玉米冻存材料 15g 于研钵中加液氮研成细粉。加 30mL GPS 缓冲液

作者简介: 邓文生(1966-),男,江西永丰人,中国科学院微生物研究所博士,主要从事分子病毒学及生物工程研究

* 通讯作者

收稿日期: 1999-07-15, 修回日期: 1999-10-28 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

(0.2mol/L 甘氨酸, 0.1mol/L Na_2HPO_4 , 0.6mol/L NaCl, pH9.5) 匀浆, 然后加 3.0mL 10% SDS 0.3mL 2-巯基乙醇, 20mL 水饱和酚(0.1% 8-羟基喹啉)和 20mL 氯仿/异戊醇(25:1)继续研磨 30min。匀浆物 6000r/min(Beckman)4℃离心 20min 取水相, 加 1/10 体积 NaOAc 和 2.5 倍体积无水乙醇于 -30℃ 放置 2h, 离心收集沉淀。用 12.6mL GSPS 缓冲液重悬沉淀, 加 7.4mL 无水乙醇, 加 2g 微晶纤维素 4℃ 吸附过夜。离心, 弃上清, 沉淀重悬于含 15% 乙醇的 STE 中。装柱洗脱, 分管收集检测, 合并含核酸部分的收集液, 乙醇沉淀核酸, 沉淀物经 5% PAGE 分析证明含 MRDV 双链 RNA。

1.3 RT-PCR 反应

RT-PCR 参照 BcaBest™ RNA PCR Kit 说明书进行。取 2.5 μL MRDV dsRNA。加 1 μL 随机引物混合后, 煮沸 5min, 置冰浴 5min。按照说明书快速调制反应体系总体积 20 μL 。反应体系在 37℃ 温育 1min 后, 15min 内匀速升温至 65℃ 孵育 30min, 反应完毕。煮沸 3min 灭活逆转录酶, 置冰浴待用。

PCR 引物根据已知的 MRDV 第七片段的两端部分序列^[5], 设计如下:

引物 1 5'GCCTTCTAGAAGTTTTTTTCGCACTGTCG3'

引物 2 5'GACTAAGCTTGACAATAGCTGAATTCTCG3'

引物合成用 Beckman oligo 100 m/1000 合成仪合成, 溶于无菌水中配制 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度。取逆转录产物 2 μL , 引物 1 和引物 2 各 1 μL 。其它成分按照 PCR 试剂盒说明调制反应系统总体积为 100 μL 进行 PCR 反应, PCR 热循环条件为 94℃ 50s, 57℃ 50s, 72℃ 2min 30s 共 35 个循环。

1.4 PCR 产物克隆及 Northern 杂交

PCR 产物用低熔点琼脂糖胶回收纯化后, 用限制酶 *Xba*I 和 *Hind*III 酶解, 然后与相同限制性酶酶切的 pGEM7Z(+)载体连接, 连接条件为 20mmol/L Tris-HCl(pH7.6), 100mmol/L MgCl_2 , 10mmol/L DTT, 0.6mmol/L ATP, 0.1 韦氏单位 T_4 DNA 连接酶 16℃ 孵育 4h, 取适量连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。蓝白斑筛选重组子, 碱法提质粒, 限制酶 *Xba*I 和 *Hind*III 酶切, 5% PAGE 检测。

Northern 杂交参照 Northern 点杂交方法进行^[6], 取 MRDV dsRNA 约 0.1 μg /孔在 5% PAGE 上电泳 6h 后, 将一个加样孔电泳胶切下银染, 根据银染胶位置切下需要杂交用的胶, 采用电转法转移核酸至 Zeta 尼龙膜上, 尼龙膜于 90% DMSO 溶液 65℃ 浸泡 30min, 然后于短波紫外光下固定 5min。将酶切鉴定出的阳性克隆进行 PCR 反应, 纯化的 PCR 产物用作探针模板。用随机引物法制备放射性 (α -³²P) 同位素标记的探针, 随后按 Northern 点杂交程序进行杂交。

1.5 序列分析

将酶切及 Northern Blot 鉴定正确的克隆, 用双脱氧终止法测序。序列结果借助计算机 DNA 软件进行分析。

2 结果和讨论

2.1 RT-PCR 和 PCR 产物的克隆

由于 MRDV 为双链 RNA, 而且每个组份分子量都在 5kd 以上, 在热力学上是非常

稳定的分子,常规热变性在 37℃ 反转录极易复性导致 RT-PCR 失败。本实验采用日本 TaKaRa 公司生产的 BcaBestDNA 聚合酶进行 RT-PCR,因为这种聚合酶的最适反应温度是 65℃,特别适用于具有非常复杂的二级结构 RNA 反转录。根据已知的 MRDV 的 S₇ 部分序列设计引物,按照试剂盒说明书进行 RT-PCR 反应,取 5.0μL 在 0.7% 琼脂糖凝胶上电泳,图 1 显示,MRDV 的约 1.9kb 组份已经扩增出来。

PCR 产物用蛋白酶 K 酶解 30min,用等体积酚/氯仿(1:1)抽提两次,上清加等体积 7.5mol/L NH₄OAc 和两倍体积乙醇沉淀。PCR 产物克隆按照前面描述的方法进行。质粒用限制酶 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切后,在 0.7% 的琼脂糖凝胶中电泳,如图 1 所示,约 1.9kb 的片段已经克隆上。

由于提取的双链核酸中混入其它一些分子量较大的核酸分子。而且已知 MRDV 中的几个组份的 5'端和 3'端具有一定的同源性^[5]。为进一步确定阳性克隆确为 MRDV 中的一个组份克隆。我们以克隆的片段为模板制备探针与 MRDV 的组份作 Northern 杂交,自显影结果表明,MRDV 基因组只显示一条特异杂交带相当于 S₇ 位置(图 2)。

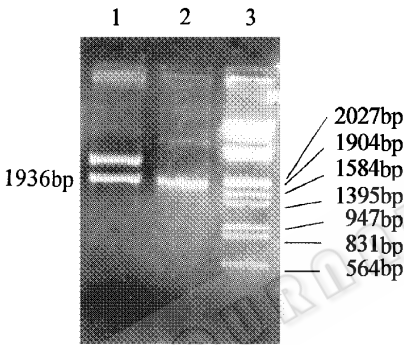


图 1 重组质粒的酶切分析

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of recombinant
Lane1 λ GEM7Z-S7/*Xba*I + *Hind*III Lane2 RT-PCR product ;
Lane3 λ DNA/EcoRI + *Hind*III.

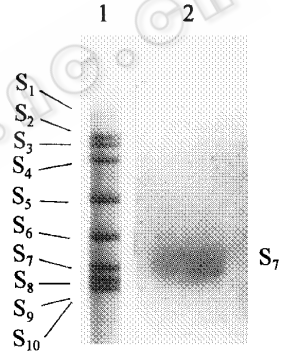


图 2 Northern 杂交检测阳性克隆

Fig. 2 Detection of positive clone by Northern blot
1 MRDV genome 2 Blot result between MRDV genome
and positive clone.

2.2 MRDV 的第七组份序列分析

按照双脱氧终止法测序,然后根据测出的序列合成引物,用步行法继续测序,图 3 为 MRDV 的第七组份全序列,全长共 1936bp,与来源意大利 MRDV 的 S₇ 序列等长。序列分析表明两者有 87.7% 的同源性。通过比较它们包含的全部开放阅读框发现,只有阅读框位于第 25 碱基至 1800 碱基(ORF1)和阅读框位于第 436 碱基至 1800 碱基(ORF2)的翻译起始位点处存在 Kozak 序列(AXXATGA)。而且它们的 ORF1 和 ORF2 位置并未改变。运用 Jotun Hein 方法比较它们的蛋白序列表明,ORF1 的氨基酸同源性为 91.6%(图 4),由此可见,来自中国河北滦城与意大利的 MRDV 可能为同一种病毒的不同株系。饶有趣味的是,MRDV 的 S₇ 与 RBSDV 的 S₈(1927bp)^[7]竟然具有更高的同源性,核苷酸同源性高达 95.5%,最大开放阅读框(ORF1)位置不但没变而且同源性高达 93.5%,这说明 MRDV 的 S₇ 与 RBSDV 的 S₈ 可能起着某种相同的功能。

AAGTTTTTTTCGCACTGTCTAAAGATGACTGGCACCCATGACGACCGATTTCCTTTAAGACTTTTATTCTTCAA 74
 74
 74

CTTATGGAACAAAAACGACCAAACGACCCAATTAACCACCGAAAAACGAAGAAAAGCTAAAACCTCAAACAG 148
 T.....CT.....TC..T.....C.....C.....A...G.....T. 148
C..... 148

CAAATCTACATCAAACCCCAATTTGGTATCCCCTTCAATTACTGAGTATGCTGAACAGATATCAGACGAATTT 222
 T...T.AC.T..G.....C.....A.....C..... 222
T.....A..... 222

GCTAAGGCTCGAAAACCGATTTTACTCCCGACT-CAAATATTTCCGCTTTCCTAGACTTGAACGATTTTCA 295
 T.....C.....A.....CA..TT.G-.....C.....A...A.....T. 295
A.....T.....T..A.-.....CA.... 295

ACAG-AACAGGCTCTTACCCTG-ATTTGTTTCAGTAATCCAATC-AAATACCTCGGATTTTAACTCTTCATGCC 366
C.....-C....T.....-...T..T..C....G..T.....T 366
 ...C.....T.....C.....G..... 369

GATGTTCAATGCATTTAGATTCTCCCACTGTTGATCATTATATAAATTGAAGAGAAATCATAAAATGAG 440
T.T.....C....C.....C..... 440
 443

TTTGTGATGAACTCAATCAAATTTGACTTCCCGAATGTTAACTGGCCAAATTTGTAAGACTGAGACTAATGATC 514
AG.....A.TA..A.....TC.....A..C.....C. 514
--.....A..C..A.....-T.....A..... 514

TTGCGGAACGTTTTGAAACTTATTACTTTGACCCTAGATGTGAAAGAACAGCATTGGATTTTTGAAGAGAACC 588
 .A..T.....T.....C..A.....A.....T.....A...T 588
 ...A.....C.....T.....A...G. 588

GCCATTGTAAGATTTGAATCTTATCTTATAAATACAACAATGATTTAACACTGTGACAACGTGAAAAATTACC 662
 ...C...T..G.....T.....T.....G..A..... 662
C.....C.....A..... 662

TGTTTGGGCTTCTCATTTAATAGCTCGTATGAACGTTGAAAATGTTTCTTTACCATTGGAAATTAGTTGTAGTG 736
AT..C.....G.....A.....C..... 736
 .A.....GA.....A..... 736

CAATCAATCCCACCAACATTTGCTGTTATAGTTCCTTAAAAATGCTAAAACCAATGTGACAAGAGGCAGATTC 810
T..T.....A.....T.G.....C..A.....T 810
A..C.....T..... 810

TGGACTGTGTTGGACGATGAACGTGACTTTTTATCCATTAACCAGATATTCAAGCGATTGAATTTGACGTAA 884
T...T.....C...TG.....T...T.G...T.A...T..... 884
C.....C.....C...TG.....T...C..... 884

TTCCGTGACCACTGCTGGCAACTTAAGACATGTTTTAAACAATGTTTAAACATTAGGGCAACCTTTCGCCTTCG 958
 ...T..A...GT.....A..T..GC.....C..T..T.....C..... 958
A..C.....C..... 958

ACCCACTTGACTATTCCCTTTAAACTTAACTTACTTGAAACAGGGTTATCTCCATTAGATGACGTTGTGACCATT 1032
T.....G..C.....TC.....TC.G.....T... 1032
T.....C.....A..... 1032

AGATTGAAAGGTTTGCCTGCTGTGTTCAAAGAAGGACAGGATGTTCAAATTTATTGGTAATAAAGGAGTAGGTAA 1106
A...T.....T.....C..... 1106
AC.....G..... 1106

GTCTGAAATTTGGCGCAATGTTAGCAGAACGATATCCCCATCTTTTAGTTGTTGATAGTGATGATTATGGCAGGT 1180
TA.....G..T...T...T.....CA.....GT.....T... 1180
 A..A...A...T.....G.....T.....T... 1180

TTTTGGTAATGTTGCTTAATTTAGTTCCTTCATTGTTTAAAAATTTGATTTTGAATTAACGAAGAACTTTTA 1254
C.A.....C.....G...C.....C.....G..AC.C 1254
 ...A.....A.....G.....A.....G 1254

ACCGAAGAAATTTATTTTCAAGCTATGCTGATTTTATCAAAGCTAAACAACTGAAGATATTTCACTTCAAAC 1328
 ..T..C...G.C..C.....C...C.....T.....GATT.....C.C.....TGC.. 1328
 ..T.....T.....T.....G.....G..... 1328

GATTTTGTAGTATGTAATGGAAGGAATAATTCTTCCAAACACCATTGAGAGTGGAGAAGCTAATGAGGAAGTTA 1402
 A.....T.....CA...T..T..AG.A.GT...A.T...T.....C.. 1402
C.....G.....A..... 1402

TTTTAGACATTTTTAATCGTGTTTTTCATAGCATCCAAGGTTCTAAATTTATTGGATATCGTAAGTTCATGATT 1476
 ...G...GG.....A.....C..T..A.....G.....T..... 1476
C 1476

GAATATACACGCTCTGATGTACACTAATTTTAACAAGAGTCAAACCTGTGCATTTTCGTTCACTCGTATTGTGAGTT 1550
C.....T.A...T.....C..T...C.....C.....T..A..C.....C. 1550
T.G.....C..T.....A.. 1550

ATCGTTCGTTCCCTCATTCTTTGGCTTATATTACTTTTATACAGTAGTTACAACCTCAGCTGTGTTAAATGTTGTTTC 1624
C..C.....T.....AC..... 1624
 G..A.....AC.G..... 1624

CTAGAAACGGACAAGTAGAATGCAGTTCCTCAAAGATGATGGCCAATACGCTACTTCATCATTTTTACGAAAGG 1698
 .C...T...A.....A.C.....C..CT.....C.....A 1698
G...T.....TT.....A 1698

TATACTTCTAATATGAATCCAACACCAGTATTCTTGTGTTTCTTATTCTTTGGTTTAAACAAAGGTTTAAACGT 1772
C.....C.....C.....C.....T..A..C..A.....G.....A...T.. 1772
C..T...T..... 1772

TCTAAAAGCTGCATCTATTATTGTGTAACATCACTATGCTTTTGTGAAGAATATCATGTCCTTTTAGGGTTTCGA 1846
 .T.G...T..G.G.....T...TT.G.T...T...GT..... 1846
T.....C..... 1837

CTCGTATAAAGGTGTTTCAGTCCAATGTCTTGATGGCAGACTAGGTCGATTTTGTGATTCTAGTGAAGTGTGCGA 1920
A.....G..... 1920
A..... 1920

GAATTCAGCTATTGTC	1	1936
.....	2	1936
.....	3	1927

图 3 MRDV S₇ 片段全序列的同源性分析

Fig. 3 The homogeneity analysis of the full length squence of MRDV S₇

1 :MRDV Heibei strain ; 2 :Italy strain ; 3 :RBSDV.

VPTQIFSAFTRLETIFNRTGSYPDLFS-----NPIKYLGFLEMPDVSMHLDSPTVDHSYYNLRNKHMSFDE-	142
A.S.....F.....-	142
...SNIFRLP...H..SN---R.LPCICSVTQS.....AS	144
LQSNLTSRMLTGQIVKTETNDLAEERFETYFFDPRCERTSIGFLKRTAIVRFEFLSYKYNDLTLSEREKLPVWA	216
.E...I...I.....S.K..F.....T.....M.....	216
IKF...N--VNC.....S.....M.....I..	216
SHLIARMNVENVSLPLEISCSAINPTQHFAVIVLKNAKTNVTRGRFWTVLDDERDFLSIKTDIQAI EFERN SVT	290
...I.....V...L.S.V.....	290
...K.....V...L.....	290
TAGNLRHVLNCLTLGEPFAFDPLDYSFKLNLEETGLSPLDDVVTIRLKGLLRVFKEGQDVQIIGNKGVGKSEI	364
V.....D.....	364
.....D.....	364
GAMLAERYPHLLVVDSDDYGRFLVMLLNLVPSLFKNFDFEINEELLTEEIYFQAMSDFIKAKQTEDISLQTI FE	438
.T.....I..EY.....S.....D.V.....I...T..C...	438
.V.....V.....	438
YVMEGIILPNTIESGEANEVILDIFNRVFHSIQGSKFIGYRKEMIEYTRLMYTNFNKSQTCHFVHSYCELSFV	512
.....I...VG.S.V...A...R...I.....	512
.....V...T.....S.....	512
PHSLAYITLYSSYNSAVLNVVPRNGQVECSSSKMMANTLLHHFYERYTSMNPTPVFLFSYFFGLTKGLNVLKA	586
.....I..NP.....	586
.....	586
ASIIV. 1	592
SA.... 2	592
S..... 3	592

图 4 MRDV S₇ 最大开放阅读框蛋白序列的同源性分析

Fig. 4 The homogeneity analysis of protein squence for the largest ORF in the MRDV S₇

1 :MRDV S₇ Heibei strain ; 2 :MRDV S₇ Italy strain ; 3 :RBSDV S₈.

参 考 文 献

- [1] 陈道茂. 浙江农业科学, 1965, 5: 400.
 [2] 陈巽祯. 中国植病学会 1981 年会议论文摘要集, 1981, 148.
 [3] 郑巧兮, 沈菊英, 龚祖垠. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16(6): 571~576.
 [4] 郑巧兮, 陆惠华, 章 蓓, 等. 生物化学与生物物理学报, 1985, 17(5): 587~593.
 [5] Marzachi C, Boccardo G, Nuss D. *Virology*, 1991, 180: 518~526.
 [6] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作. 北京: 北京大学出版社, 1995. 282~283.
 [7] Azuhata F, Uyeda I, Kimurra I, et al. *J Gen Virol*, 1993, 74(12): 227~1232.

cDNA CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF THE SEVENTH SEGMENT OF MAIZE ROUGH DWARF VIRUS GENOME

Deng Wensheng Yang Xicai Zhang Yuman Liu Yule Kang Liangyi

(Open Laboratory of Molecular Virology and Biotechnology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: The double strand RNA of maize rough dwarf virus (MRDV) was prepared from the maize samples showing symptoms which was from the Luanchen county of Hebei province of China. The primers were designed according to the known sequence of MRDV, the cDNA sequence of the seventh segment of MRDV was obtained by RT-PCR, the S_7 sequence was analyzed by computer after sequencing. The results showed: the full length of the S_7 cDNA is 1936bp and equal to that of the S_7 cDNA from abroad, the two open reading frame (ORF1 and ORF2) contained in the S_7 segment are also unchanged. In comparison with the S_7 segment from Italy, the homology of S_7 nucleotide is 87.7% and the homology of ORF1 amino acid sequence is 91.6%. However, the MRDV S_7 segment and the rice black stripe dwarf virus S_8 segment showed 95.5% nucleotide identities and 93.5% ORF1 amino acid identities.

Key words: Maize rough dwarf virus, S_7 , Gene cloning, Sequence homology

《微生物学报》近况通报

本刊编辑部于 1999 年 11 月查询了中国科技信息所信息分析中心期刊检索结果,《微生物学报》总被引次数 334,影响因子 0.359,即年指标 0.079,自引总引比 0.11,地区分布数 17,基金和资助论文比例 0.66,指标综合加权评分 49.53。被国际六大检索系统中《CA》《苏联文摘杂志》等收录。

另据中国科学引文数据库 1998 年最新数据统计,在被引频次最高的中国科技期刊 500 名排行表中,本刊名列第 68 位,并连续五年(1994~1998)入围中国科技期刊《引文频次百名表》。