

水稻黑条矮缩病毒第九号基因片段的克隆和表达

李春波 钟永旺 张旭东 魏春红 李 毅*

(北京大学生命科学学院 蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室
北大-耶鲁植物分子生物学及农业生物技术中心 北京 100871)

摘 要 应用 RT-PCR 技术从表现玉米粗缩病症状的玉米叶片中分离克隆了水稻黑条矮缩病毒(Rice black-streaked dwarf virus, RBSDV)的第九号片段 S9(GenBank 登录号 AF540976),并测定了全序列。将该片段的第一个开放读码框(S9-1)在原核表达载体 pET21d 中进行了高效表达,表达产物进行 N 端氨基酸序列测定,与理论推测的序列完全一致。将表达产物纯化后制备了抗体,经 Western blotting 从感病玉米叶片中检测到了该蛋白。

关键词 水稻黑条矮缩病毒 基因组片段 S9 原核表达 Western blotting

中图分类号:Q786 Q939.4 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2003)03-0330-06

水稻黑条矮缩病毒(Rice black-streaked dwarf virus, RBSDV)在我国北方的冀、鲁、陕、晋、辽、津等省(市)区及南方的水稻产区均有分布,对我国主要农作物如水稻、小麦、玉米等均造成较大的危害^[1]。

水稻黑条矮缩病毒是呼肠孤病毒(Reoviridae)科,斐济病毒(Fijivirus)属的成员,同属的还有玉米粗缩病毒(Maize rough dwarf virus, MRDV)和斐济病毒(Fiji disease virus, FDV)。它们的基因组均由 10 条双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)组成,主要由灰飞虱(*Laelophax striatellus fallen*)以持久方式传播。我国报道的水稻黑条矮缩病毒和玉米粗缩病毒均能侵染水稻和玉米,这与国外的报道不一样^[2]。已有的研究表明这两种病毒的基因组有较高的相似性^[3]。目前关于水稻黑条矮缩病毒的分子生物学研究还很少,主要集中在病毒形态、生理生化、全基因组序列克隆方面^[4~6],对基因的功能方面还没有报道。其中 RBSDV 第九号片段(S9)与 MRDV 第八号片段(S8)具有很高的核酸序列相似性,暗示这两个片段可能具有类似的功能。本文报道了 RBSDV S9 的克隆、序列分析、在 *E. coli* 中的高效表达及抗体制备,同时从感病叶片中也检测到 S9 的第一个开放读码框(S9-1)的表达产物,为进一步研究 RBSDV S9-1 蛋白的功能打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料、菌株和质粒 感病玉米叶片由中国农业大学于嘉林教授赠送,采自河南

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2001AA212131);国家杰出人才科学基金(30125004);科技部转基因植物研究与产业化专项(J99-A-010);北京大学 985 计划资助项目

* 通讯作者。Tel 86-10-62759651; Fax 86-10-62754427; E-mail: liyi@pku.edu.cn

作者简介:李春波(1973-)男,山东省安丘市,博士研究生,主要从事病毒的分子生物学研究。

收稿日期:2002-08-30,修回日期:2002-11-19

郑州,存于-70℃,克隆菌株为大肠杆菌 DH5α,测序载体为 pBluescript II SK,原核表达载体采用 pET21d,所有质粒和菌株均为本室保存。

1.1.2 酶与试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等工具酶及 Goat Anti-Rabbit IgG (Fc) Alkaline Phosphatase-Conjugate 均为 Promega 公司产品;反转录试剂盒购自 Life Technologies 公司;其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RBSDV S9 片段的克隆及测序 按照 Chomczynski 和 Yu 的方法^[7,8]从感病玉米叶片中提取总 RNA。以总 RNA 为模板,根据已报道的 MRDV S8 的末端序列设计引物^[10],引物序列为:

forward:5' AAG TTT TTT AGC CTG GAA CTG ACA C 3'

reverse:5' GAC ATC AGC TGT TAG CCG GCT TGA G 3'

总 RNA 经 DMSO 变性后,用 Superscript™ II 逆转录酶(Life Technologies)合成 cDNA 第一链,再以合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR,扩增参数:94℃ 40s,46℃ 40s,72℃ 2min,30 个循环。PCR 产物经 T4 DNA Polymerase 补平后,与经 EcoRV 酶切的 pBluescript SK 连接、转化,详细步骤参考文献[9],蓝白斑筛选得到的阳性克隆进行 DNA 测序。

1.2.2 RBSDV S9-1 在大肠杆菌中的表达:

S9-1 基因经 PCR 扩增后,用 Nco I 和 Xho I 进行酶切,表达载体 pET21d 用 Nco I 和 Sal I 酶切(构建流程见图 1),连接、转化、诱导表达等步骤均参考文献[9]。诱导表达后的菌液离心 1min,吸净上清,加入 100μL ddH₂O 悬浮菌体,再加入等体积 2× SDS 上样缓冲液,100℃ 煮沸 5min,进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 表达蛋白的检测分析 将诱导表达后的菌液离心 10min 去上清,加入 5mL TN 缓冲液(150mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris, pH 7.4)进行超声波破碎(JY92-II 型超声细胞破碎仪,宁波新芝科器研究所)(工作 10s,间隔 10s,30 次,功率 400W)。取 1.5mL 裂解液,离心 15min,分离出上清,沉淀用 5mL 8mol/L 尿素溶解。上清和沉淀各取 1.5μL 进行 SDS-PAGE 分析。为了明确我们表达的蛋白就是 RBSDV S9-1 基因编码的蛋白,我们将 SDS-PAGE 中的蛋白样品电转移到 PVDF 膜上,用 ABI-491 型全自动氨基酸序列分析仪进行 N 端测序,实验步骤按照仪器操作手册中的方法进行。

1.2.4 表达蛋白的回收、纯化及抗体制备 将诱导表达后的菌体用 TN 缓冲液(含 1% Tri-

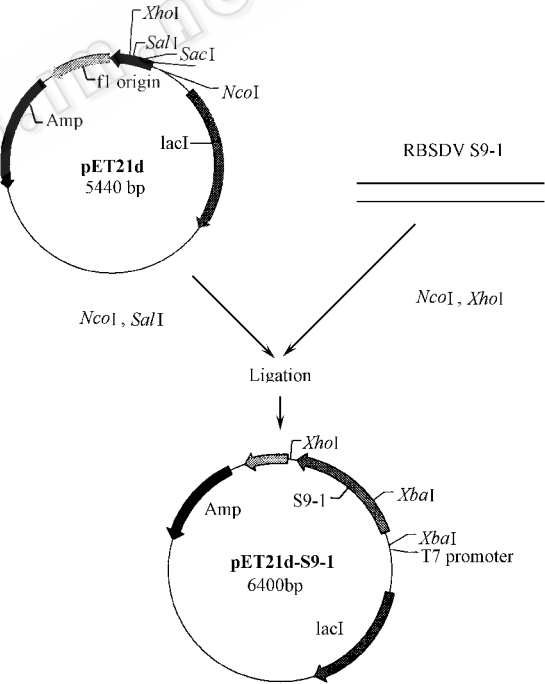


图 1 S9-1 表达克隆的构建

Fig.1 Construction of pET21d-S9-1

ton)重悬,加 30mg 溶菌酶于 - 20℃ 冻存过夜,然后再加入 120μL 1mol/L MgSO₄,600μg DNase I 搅拌 1~2h,用 TN 缓冲液(含 1% Triton)洗涤 2 次,每次 2h,离心后的沉淀用 8mol/L 尿素溶解,进行 SDS-PAGE 分析。电泳结束后用 0.1mol/L KCl 对蛋白胶染色 30min,目的条带处呈现不透明的乳白色条带,切下该条带用研钵磨碎,即为纯化好的蛋白样品。将纯化好的蛋白(约 2.0mg)送到中国科学院遗传研究所实验动物中心制备抗体。

1.2.5 感病叶片免疫印迹检测:将感病玉米叶片用液氮研磨后,每 100mg 加入 200μL 提取缓冲液(Tris-Cl 125mmol/L,SDS 2%,巯基乙醇 10%),13 000 r/min 离心 10min,上清加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液,100℃煮沸 5min 后进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后通过电印迹法把蛋白质转印到 PVDF 膜上,Western blot 检测方法采用 NBT/BCIP 显色法。

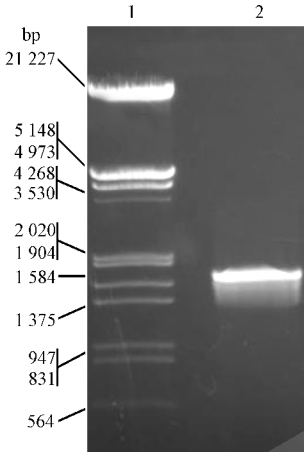


图 2 RBSDV S9 片段的 RT-PCR 结果

Fig.2 RT-PCR of RBSDV S9

- 1. A DNA/ *Hind* III + *Eco* R I Marker;
- 2. RBSDV S9.

2 结果

2.1 RBSDV S9 cDNA 的合成及 PCR 扩增

根据已发表的 MRDV S8 片段的全序列合成 5'端和 3'端引物,以玉米总 RNA 为模板,用 Superscript™ II 逆转录酶合成 cDNA 第一链,经 PCR 扩增得到一条特异性很强的条带,扩增产物约为 1.9kb,与 RBSDV S9 双链大小相近(图 2)。

2.2 RBSDV S9 的序列分析结果

对 DNA 测序结果进行分析发现,核酸序列(全长 1 900bp, GenBank 登录号 AF540976)与发表的 MRDV S8(意大利株系)的核酸序列相似性为 86.5%,与 RBSDV S9 的核酸序列相似性为 89%。序列分析表明该片段含有两个开放阅读框(ORF),第一个 ORF 从第 52 核苷酸到 1092 核苷酸,编码一个 347 个氨基酸残基组成的多肽,分子量约 40kD,翻译起始点存在 Kozak 序列(AXXXATGA/G);第二个 ORF 从第 1160 核苷酸到 1786 核苷酸,编码一个 209 个氨基酸残基组成的多肽,分子量约 24kD,翻译起始处的序列不符合 Kozak 序列。

与 MRDV S8 的氨基酸序列相似性为 89%(ORF1)和 94%(ORF2),与 RBSDV S9 的氨基酸序列相似性为 92%(ORF1)和 97%(ORF2)。

2.3 RBSDV S9-1 的表达

RBSDV S9 包含两个 ORF,对这两个 ORF 进行原核表达,只有 S9-1 得到了高效表达,结果见图 3(对 S9-2 没有表达的分析另文讨论)。从图中可看出阳性克隆即使不经诱导也有一定的本底表达,而 E、F、G、H、I 等不同阳性克隆的表达存在一定的差异。

2.4 重组表达蛋白分析

对诱导表达后的产物进行分析,发现目的蛋白主要存在于沉淀中,说明 S9-1 表达产物是以不溶的形式(包涵体)存在,结果见图 4。

2.5 表达蛋白的 N 端测序

为了进一步验证表达产物的正确性,我们对表达产物的 N 端进行测序。结果显示开始的 5 个氨基酸(Met-Ala-Asp-Gln-Glu)与序列推测的结果完全一致,证明我们表达的蛋白

是正确的。

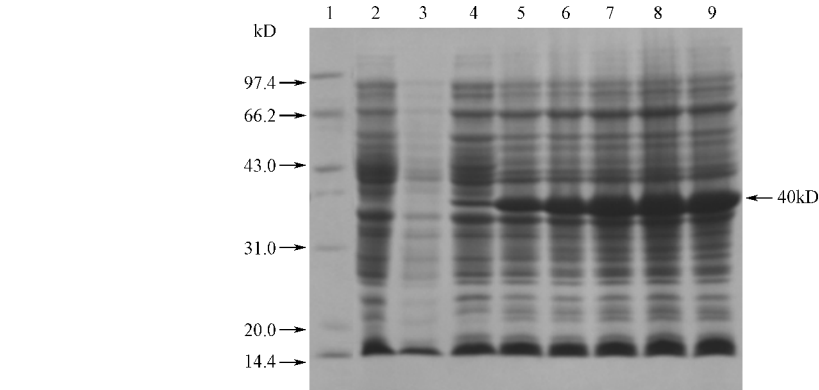


图3 RBSDV S9-1 在 *E. coli* BL21(DE3)表达的 SDS-PAGE 结果

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant RBSDV S9-1 from *E. coli* BL21(DE3)

1. Marker ;2-3. *E. coli* BL21(DE3) pET21d ,induced and not induced by IPTG respectively ;4. *E. coli* BL21(DE3) pET21d-S9-1 ,not induced by IPTG ;5-9. *E. coli* BL21(DE3) pET21d-S9-1 ,induced by IPTG respectively.

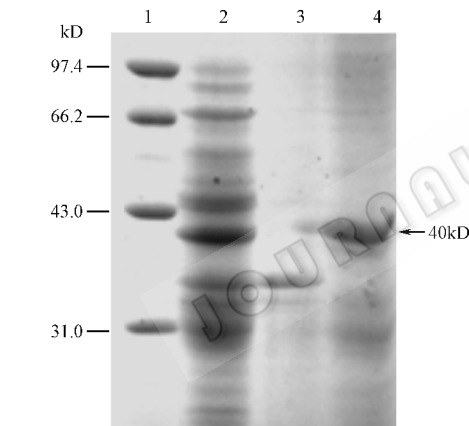


图4 RBSDV S9-1 表达产物的分析

Fig.4 Assay of solubility of RBSDV S9-1 expression product

1. Protein molecular weight marker 2. Expression product of BL21(DE3) pET21d-S9-1 ;3. Supernatant fraction ;4. Precipitation fraction.

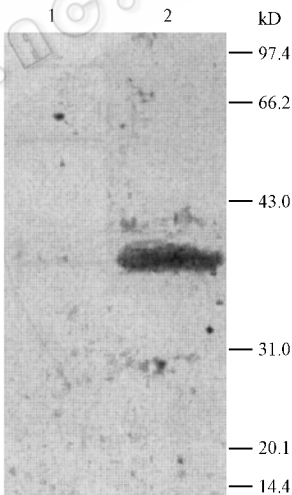


图5 Western blotting 检测感病玉米叶片

Fig.5 Western blotting of infected maize leaves

1. Healthy maize plant ;2. Infected maize plant.

2.6 Western blotting 检测感病叶片

将表达蛋白纯化后,免疫新西兰白兔制备了抗血清。Western blotting 结果证明在感病叶片中检测到约为 40kD 的蛋白,而 S9-1 蛋白的理论分子量为 40kD,因此证明我们的检测到的蛋白就是 S9-1 蛋白。

3 讨论

我们从国内的感病玉米叶片中克隆了 RBSDV 的 S9 片段的全序列,计算机分析发现,

我们从感病玉米叶片克隆的该组分与 MRDV S8 的核酸序列和氨基酸序列的相似性均小于与 RBSDV S9 的相似性,说明在我国河南郑州地区存在的玉米粗缩病是由水稻黑条矮缩病毒引起的,这与方守国等人的结论是一致的^[2]。

目前水稻黑条矮缩病毒的全基因组序列已全部克隆完成,但对他们的功能研究还没有报道。S9 的核苷酸序列二级结构预测结果表明 5'端 60 个核苷酸的二级结构存在发夹结构和茎环结构,与轮状病毒的 5'端 50 个核苷酸形成的二级结构相似,在轮状病毒中 5'端非编码区核苷酸形成的发夹结构和茎环结构对病毒的复制、翻译均起重要作用^[11]。RBSDV S9 5'端非编码区的核苷酸形成的发夹结构是否对 RBSDV S9 复制、翻译起调控作用还有待研究。用原核表达系统对 RBSDV S9-1 进行了高效表达,同时还制备了抗体,这对研究 S9-1 蛋白的功能打下了基础。目前关于 RBSDV S9-1 的功能还未见报道,推测它可能编码病毒的非结构蛋白。我们已把 S9-1 与 GFP 构建成融合基因,通过在植物细胞内的瞬时表达研究 S9-1 在细胞内的定位,进而确定 S9-1 的功能,该工作正在进行当中。

参 考 文 献

- [1] 陈景堂,池书敏,刘志增,等. 玉米粗缩病(MRDV)研究现状及展望. 玉米科学,2000,8(3):76~78.
- [2] Fang S, Yu J, Feng J, *et al.* Identification of rice black-streaked dwarf fijivirus in maize with rough dwarf disease in China. *Arch Virol*, 2001, **146**:167~170.
- [3] Azuhata F, Uyeda I, Kimura I, *et al.* Close similarity between genome structures of rice black-streaked dwarf and maize rough dwarf viruses. *J Gen Virol*, 1993, **74**(Pt 7):1227~1232.
- [4] 郑巧兮,陆惠华,章蓓,等. 我国玉米粗缩病毒的核酸及结构蛋白的研究. 生物化学与生物物理学报,1985,17(5):587~593.
- [5] Zhang H M, Chen J P, Adams M J. Molecular characterization of segments 1 to 6 of rice black-streaked dwarf virus from China provides the complete genome. *Arch Virol*, 2001, **146**:2331~2339.
- [6] Isogai M, Uyeda I, Lee B C. Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10. *J Gen Virol*, 1998, **79**(Pt 6):1487~1494.
- [7] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**, 156~159.
- [8] Yu L, Li Y, Gu G, *et al.* A fast, sensitive and specific method for rice dwarf virus detection by northern blot hybridization. *Acta Virol*, 1999, **43**:361~365.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] McMahon J A, Dale J L, Harding R M. Taxonomic implications for Fijiviruses based on the terminal sequences of Fiji disease fijivirus. *Arch Virol*, 1999, **144**:2259~2263.
- [11] Patton, J T. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol*, 1995, **76**(Pt 11):2633~2644.

Cloning and Expression of S9-1 Gene of Rice Black-streaked Dwarf Virus in *Escherichia coli*

Li Chunbo Zhong Yongwang Zhang Xudong Wei Chunhong Li Yi*

(The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering,
College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract : The cDNA of RBSDV S9 was amplified by RT-PCR using the total RNA of infected maize leaves as the template, and then the PCR product was cloned into pBluescriptII SK. After the DNA sequence was determined, the S9-1 gene was subcloned into *E. coli* expression vector pET-21d. SDS-PAGE analysis revealed that a 40 kD protein was highly expressed. N-terminal sequence analysis confirmed the 40 kD protein was S9-1 protein. Antiserum was prepared using the purified protein. Western blotting indicated that S9-1 protein could be detected in the infected maize leaves.

Key words : Rice black-streaked dwarf virus, S9-1, Cloning and expression, Western blotting

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2001AA212131); Chinese National Science Fund for Outstanding Scholarshi(30125004); National R. & D. Project of Transgenic Crops ; Ministry of Science and Technology of China (J99-A-010)

* Corresponding author. Tel 86-10-62759651 ; Fax 86-10-62754427 ; E-mail : liyi@pku.edu.cn

Received date 08-30-2002

2003 年中国微生物学会学术年会暨八届三次理事大会将于 12 月召开

由中国微生物学会主办、广东省微生物学会及广东省微生物研究所承办的“2003 年中国微生物学会学术年会暨八届三次理事会理事大会”定于 2003 年 12 月 6~9 日在广东省珠海市召开。此会是中国微生物学界的一次盛会,会议在我国沿海经济发达地区召开,将为全国从事微生物学科研究、开发工作者提供一次进行学术交流和展示各自研究成果的极好机会。同时将对该地区微生物学科的发展产生重要影响。会议期间将召开中国微生物学会第八届三次理事大会。会议热忱欢迎中国微生物学会会员和全国微生物工作者参加,并进行微生物新技术交流和新成果展示。会议热忱欢迎与微生物学有关的生产厂家、公司赞助会议并前往会场展示自己的产品。

会议主题 迎接挑战——新世纪微生物学工作者的使命

主要内容 1. 学术年会,会议邀请知名专家、教授进行大会专题报告和分组(基础、工、农、医学和兽医微生物学)学术交流。

2. 中国微生物学会第八届三次理事大会,商议学会改革发展。

3. 进行微生物新技术交流和新成果展示活动。

4. 会议将进行论文摘要统一审稿。

联系方式 :

通讯地址 北京市海淀区中关村北一条 13 号 中国微生物学会办公室

邮政编码 100080

电话/传真 010-62554677

E-mail csm@sun.im.ac.cn

联系人 尹 畅

或 : 通讯地址 广东省广州市先烈中路 100 号 广东省微生物学会

邮政编码 510070

电 话 020-87668134 或 020-37656328

传 真 020-87601587

E-mail : wsw@gis.sti.gd.cn

联系人 李良秋 李秀红