43 卷 4 期
2003 年 8 月

微 生 物 学 报
Acta Microbiologica Sinica

Vol.43 No.4
August 2003

水稻黑条矮缩病毒第七号片段的 cDNA 克隆及其在大肠杆菌中的表达

钟永旺 周 洁 庄斌全 魏春红 李 毅*

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要:运用 RT-PCR 技术,根据玉米粗缩病毒 S6 的末端序列设计引物,从玉米粗缩病感病材料中克隆得到一条 2.2kb 长的 cDNA 片段,序列分析表明,该片段全长 2193bp,含两个开放阅读框,分别编码 41.0kD 和 36.3kD 的多肽。序列分析结果表明,该 cDNA 片段及其编码产物与水稻黑条矮缩病毒 S7 的 cDNA 序列及编码产物存在最高的相似性,推测该 cDNA 片段为水稻黑条矮缩病毒的 S7 片段,而不是玉米粗缩病毒的 S6。分别将该片段的两个阅读框克隆到原核表达载体 pET21-d 及 pGEX-KG 中,经 IPTG 诱导后,两种蛋白均得到了高效的表达。表达产物回收后制备并得到了高效价的抗血清。

关键词 水稻黑条矮缩病毒,原核表达,RT-PCR,序列分析

中图分类号:Q939.46 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2003)04-0442-06

水稻黑条矮缩病毒(Rice black-streaked dwarf virus, RBSDV)属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)斐济病毒属(Fijivirus),同属的还有斐济病毒(Fiji disease virus, FDV)、玉米粗缩病毒(Maize rough dwarf virus, MRDV)及燕麦不孕矮缩病毒(Oat sterile dwarf virus, OSDV)等。在自然界中,水稻黑条矮缩病毒只能通过携带病毒的飞虱(*Laodelphax striatellus*)以持久性的方式传播[1]。在中国,RBSDV 不但侵染水稻,而且侵染玉米,实际上引发中国玉米粗缩病的病原正是水稻黑条矮缩病毒[2,3]。水稻黑条矮缩病毒的基因组由 10 个双链 RNA(Double-stranded RNA, dsRNA)组成,按照在 PAGE 胶上迁移距离由小到大的顺序依次命名为:S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9 和 S10。目前关于水稻黑条矮缩病毒的分子生物学研究还很不深入,而主要集中在全基因组序列克隆方面。本文报道了水稻黑条矮缩病毒第七号片段的 cDNA 克隆以及在大肠杆菌中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:选用的克隆载体为 pGEM-T easy-vector(Promega);原核表达载体为 pET21-d(+)(Novagen)和 pGEX-KG(Pharmacia);克隆菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α;表达宿主菌株为 *E. coli* BL21(DE3)gold。

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:钟永旺(1975-),男,福建武平人,99 级博士研究生。E-mail:zhyw9@pku.edu.cn

收稿日期:2002-10-09,修回日期:2002-12-06

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.1.2　引物设计:根据以前报道[4]的意大利株系的玉米粗缩病毒 S6(EMBL:X55701)的末端序列设计引物 P1 和 P2,用于 RT-PCR,为了将克隆到的 RBSDVS7 的两个开放阅读框架(ORF)插入到原核表达载体中,根据测得的 S7 序列设计了引物 P3、P4 和 P5。序列如下:

P1:5′-AAG TTT TTT TTC GAC CTG TCT GGA CCA G-3′;

P2:5′-GAC ATC AGC TGC ATT TCG ACC TTG ACA C-3′;

P3:5′-AGG ACC ATG GAT AGA CCT GCT CGA G-3′(含 *Nco* Ⅰ酶切位点);

P4:5′CTG AGT CGA CAG CAG AAG GAG ATG AAA AGA C-3′(含 *Sal* Ⅰ酶切位点);

P5:5′TTT TCC ATG GAT TAC ACT TTA AGT GAT C-3′(含 *Nco* Ⅰ酶切位点)。

1.1.3　感病材料:感病玉米叶片采自河南郑州玉米粗缩病发病区,由中国农业大学于嘉林教授提供。

1.1.4　主要试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、逆转录酶 M-MLV 和 pGEM-T easy-vector 为 Promega 公司产品;*Taq* DNA 聚合酶为 Biostar 公司产品;*Pfu* DNA 聚合酶为 Stratagene 公司产品。

1.2　RNA 的提取和 RT-PCR 反应

采用异硫氰酸胍法提取感病玉米叶片总 RNA[5],总 RNA 直接用于逆转录[6,7],取约 2μg RNA 99℃变性 2min 后迅速冰浴,按以下反应体系(25μL)进行逆转录:2μg RNA、引物 P1 和 P2 各 20pmol、500μmol/L dNTPs、5μL 5 × M-MLV 逆转录酶反应缓冲液、25U RNasin、200U M-MLV 逆转录酶,42℃ 1.5h。逆转录产物用于 PCR 扩增,扩增用的聚合酶采用 *Taq* DNA 聚合酶与 *Pfu* DNA 聚合酶的混合物(Taq∶Pfu 为 4∶1)。PCR 产物连接到 pGEM-T easy-vector 中,阳性克隆用于测序。

1.3　原核表达

利用引物 P3 和 P4 通过 PCR 扩增得到 RBSDV S7 的 ORF1,PCR 产物经 *Nco* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切克隆到表达载体 pET21d 的上述酶切位点之间,得到原核表达质粒 pET-S71。利用引物 P5 和 P2 可以通过 PCR 扩增得到 RBSDV S7 的 ORF2,PCR 产物经 T4 DNA 聚合酶补平、*Nco* Ⅰ酶切后,克隆到 *Hin*dⅢ酶切和 T4 DNA 聚合酶补平及 *Nco* Ⅰ双酶切的原核表达载体 pGEX-KG 中,使得 ORF2 正好与 pGEX-KG 的 GST(谷胱甘肽 S-转移酶)序列形成融合基因,从而得到原核表达质粒 pGEX-S72。上述原核表达质粒均转入 BL21(DE3)-Gold 中,IPTG 诱导表达[6]。取诱导表达后的菌液离心 1min,吸净上清,加入 200μL 1 × SDS 上样缓冲液,100℃煮沸 5min,取样做 SDS-PAGE 分析[8,9]。

1.4　表达重组蛋白的可溶性分析

50mL 诱导表达后的菌液离心去上清,用 5mL TN 缓冲液(150mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris, pH7.4)重悬,然后进行超声波破碎(工作 10s,间隔 10s,30 次,功率 400W)。取 1.5mL 裂解液,离心 15min,转移出上清,沉淀用 5mL 8mol/L 尿素溶解。上清和沉淀各取 5μL 上样,进行 SDS-PAGE 分析。

1.5　表达产物的 N 末端测序

参照文献[10]中的方法进行。

1.6　表达蛋白的纯化和回收及抗血清制备

300mL 诱导表达后的菌液离心后用 6 mL TN 缓冲液(含 1% Triton X-100)重悬,加

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

30mg 溶菌酶-20℃冻存过夜，然后再加入 120μL 1mol/L $MgSO_4$ 和 600μg DNase 搅拌 1～2h，用 TN 缓冲液（含 1% Triton X-100）洗涤两次，每次 2h，离心后的沉淀用 3mL 8mol/L 尿素溶解，取 1.5mL 上样进行 SDS-PAGE 分离，电泳结束后用 0.1mol/L KCl 对 SDS-PAGE 胶染色 30min，蛋白带呈现出不透明的乳白色条带，切下目的条带用研钵磨碎，1×PBS 悬浮，悬浮液用于接种兔子，制备抗血清（在中国科学院遗传研究所实验动物中心进行）。

1.7 Western blot 检测抗血清[11]

抗血清按照 1∶10000 稀释加入。

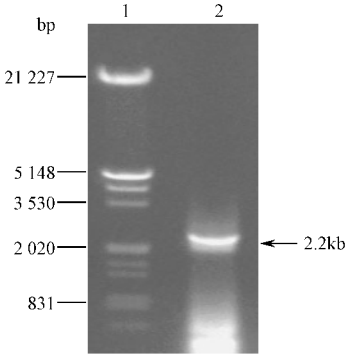

图 1 RT-PCR 分析

Fig.1 Analysis of RT-PCR

1. λDNA/*Hin*dⅢ + *Eco*RⅠ DNA marker；2. RT-PCR product.

2 结果

2.1 RT-PCR 得到目的 cDNA

利用引物 P1 和 P2，通过 RT-PCR 的方法从玉米粗缩病感病叶片总 RNA 中扩增得到一个 2.2kb 左右的特异产物（图 1），经回收后克隆到 pGEM-T easy-vector 中，并转化大肠杆菌。阳性克隆用于 DNA 序列测定，序列结果已被 GenBank 收录，序列登录号为：GenBank AY147039。

2.2 序列分析结果

DNA 序列分析结果表明，该 cDNA 产物全长为 2193bp，包含两个大小相近的 ORF，其中 ORF1（42～1130）共编码 362 个氨基酸，编码的多肽的理论分子量为 41.0kD，等电点为（pI）6.02，ORF2（1183～2112）共编码 309 个氨基酸，编码的多肽的理论分子量为 36.3kD，等电点为 4.81。

核苷酸与氨基酸的多序列比较发现，在核苷酸水平上，得到的 cDNA 与报道的 RBSDV S7（EMBL：S63917）有 93.7% 的相似性，而与 MRDV S6（EMBL：X55701）则有 85.3% 的相似性；在氨基酸水平上，ORF1 编码的多肽与 RBSDV 的 P7-1 存在 97.8% 的相似性，而与 MRDV 的 P6-1 存在 92.5% 的相似性；ORF2 编码的多肽与 RBSDV 的 P7-2 存在 96.1% 的相似性，而与 MRDV 的 P6-2 存在 86.4% 的相似性。由进化树分析结果（图 2）可见，克隆得到的 cDNA 片段及其编码产物与 RBSDV 的亲缘关系更近，该 cDNA 片段应为 RBSDV S7，其编码产物分别为 P7-1（ORF1）和 P7-2（ORF2）。

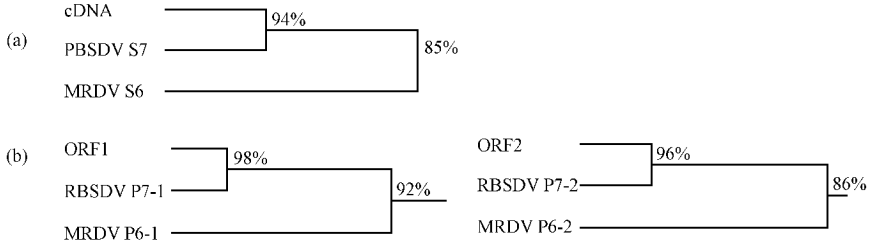

图 2 进化树分析

Fig.2 Phylogenetic analysis

(a) Phylogenetic analysis of cDNA sequences；(b) Phylogenetic analysis of amino acid sequences.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

进一步对氨基酸序列进行 Blast 分析发现,ORF1 编码的蛋白与除上述两种病毒以外的其它呼肠孤病毒成员编码的蛋白之间也有一定的相似性,如该蛋白与同属斐济病毒属的 OSDV 的 Pns7-1 之间存在 29.4% 的相似性,而与可能的斐济病毒属成员[12] NLRV (Nilaparvata lugens reovirus) 的 S10 编码的蛋白之间也有 17.0% 的相似性。这些结果提示该蛋白在呼肠孤病毒某些成员之间可能是保守的,这些相似蛋白可能执行的是相似的功能。但是,对 ORF2 编码的蛋白的 Blast 分析还没有找到在其它病毒中的相似蛋白,暗示该蛋白可能与水稻黑条矮缩病毒及玉米粗缩病毒的某些特性有关。

2.3　RBSDV S7 编码蛋白在大肠杆菌中的表达

分别将 RBSDV 的 ORF1 和 ORF2 克隆到 pET21-d 和 pGEX-KG 上,使得 ORF1 融合于 His-Tag 的 N 端,而 ORF2 则融合于 GST 的 C 端,两个融合基因编码产物的估计分子量分别为:42kD 和 62kD。分别将以上两种重组质粒转化表达宿主 BL21(DE3),经 IPTG 诱导后,在 SDS-PAGE 胶上检测到了目的带,且在对照中并没有这些带,这说明这两种融合基因在大肠杆菌中被诱导表达了(图 3)。将其中对应 ORF1 的带进行了蛋白质 N 端测序,共测得了 N 端的 5 个氨基酸,其序列为:Met-Asp-Arg-Pro-Ala,对照 ORF1 推测的氨基酸序列发现测得的序列与推测的序列完全吻合,证明该蛋白带正是 ORF1 与 His-Tag 的融合基因的表达产物。

对表达蛋白的可溶性分析结果表明,两种蛋白均以包涵体的形式存在(图 4)。

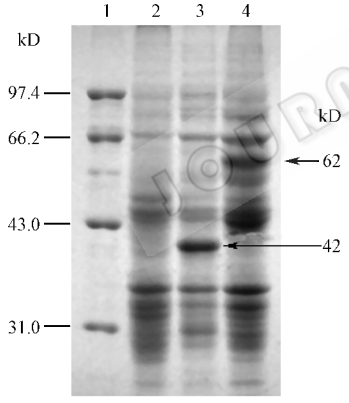

图 3　RBSDV S7 在大肠杆菌中的表达

Fig.3　Expression of RBSDV S7 in *E. coli*

1. Protein molecular weight standard; 2. Induced BL21(DE3); 3. Induced pET-S71/BL21(DE3); 4. Induced pGEX-S72/BL21(DE3).

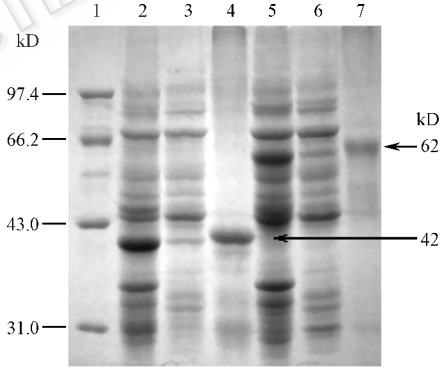

图 4　大肠杆菌诱导表达蛋白的可溶性分析

Fig.4　Solubility analysis of the proteins expressed from *E. coli*

1. Protein molecular weight standard; 2. Total protein from induced pET-S71/BL21(DE3); 3. Supernatant from induced pET-S71/BL21(DE3); 4. Inclusion body from induced pET-S71/BL21(DE3); 5. Total protein from induced pGEX-S72/BL21(DE3); 6. Supernatant from induced pGEX-S72/BL21(DE3); 7. Inclusion body from induced pGEX-S72/BL21(DE3).

2.4　抗血清的鉴定

为了制备上述两种表达蛋白的抗血清,提取它们的包涵体,经 SDS- PAGE 分离后回收目的条带用于免疫家兔,数周后得到了各自的抗血清,得到的抗血清经 Western blot 鉴定,结果表明,两种抗血清均能特异识别相应的蛋白,且具有较高的效价(1:10000),因而可以用于普通的免疫检测实验(图 5)。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

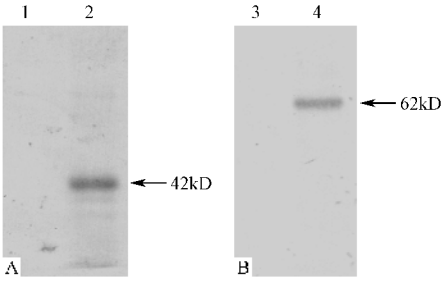

图 5 两种抗血清的 Western blot 检测

Fig.5 Western blot analysis of two antisera

(a):Western blot analysis using anti-serum against P7-1;(b):Western blot analysis using anti-serum against GST-P7-2. 1. Induced BL21(DE3);2. Induced pET-S71/BL21(DE3);3. Induced BL21(DE3);4. Induced pGEX-S72/BL21(DE3).

3 讨论

玉米粗缩病是中国的主要玉米病毒病害之一，长期以来一直都认为中国玉米粗缩病的病原为玉米粗缩病毒，但是最近的一些研究认为引发中国玉米粗缩病的病原是水稻黑条矮缩病毒，虽然这两种病毒在形态结构上几乎相似，但是它们在分子水平上还是存在一些差别。对中国不同地方来源的玉米粗缩病的病原的其中几个组分进行序列分析发现，它们均与国外报道的水稻黑条矮缩病毒基因有着更高的相似性，而与玉米粗缩病毒的相似性要低[2,3]。将克隆得到的中国河南株玉米粗缩病病原组分的 cDNA 序列，分别与国外报道的 MRDV 和 RBSDV 对应组分 cDNA 序列进行比较，结果也表明该组分与 RBSDV 存在更高的相似性，这与其他研究者的结果是一致的。

目前，RBSDV 的全基因组序列已有报道[2,3,13~15]，但是对各个基因组分的编码产物的功能的了解还很少。目前认为，RBSDV S10 编码的是病毒的外壳蛋白，而 S8 编码的是核心蛋白，S7 与 S9 则各自编码两个非结构蛋白[16]。更深入的了解还有待于通过生物化学、分子生物学以及细胞学等方法进行大量的研究。本研究成功得到了 S7 组分的两个开放阅读框的原核表达产物，并制备了相应的抗血清，这为开展下一步的研究打下了良好的基础。

致谢 感谢中国农业大学于嘉林教授和方守国博士提供了感病玉米材料。

参 考 文 献

[1] Shikata E, Kitagawa Y. Rice black-streaked dwarf virus: its properties, morphology and intracellular localization. *Virol*, 1977, **77**:826~842.

[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] Zhang H M, Chen J P, Lei J L, *et al*. Sequence analysis shows that a dwarfing disease on rice, wheat and maize in China is caused by rice black-streaked dwarf virus. *Euro J Plant Pathol*, 2001, **107**:563~567.

[4] Marzachi C, Boccardo G, Nuss D L. Cloning of the maize rough dwarf virus genome: molecular confirmation of the plant-reovirus classification scheme and identification of two large nonoverlapping coding domains within a single genomic segment. *Virol*, 1991, **180**:518~526.

[5] Chomezynski P, Sachi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem*, 1987, 162:156~159.

[6] 李 玮，李 毅，张 旭，等. 水稻矮缩病毒基因组第八号片段编码区的 cDNA 克隆及序列分析. 病毒学报，1995，**11**(1):56~62.

[7] 肖 锦，李 毅，全 胜，等. 水稻矮缩病毒基因组第十一号组分基因序列和编码蛋白的功能分析. 生物工程学报，1996，**12**(3):361~366.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[8] Xu H, Li Y, Mao Z J, *et al*. Rice dwarf phytoreovirus segment S11 encodes a nucleic acid binding protein. *Virol*, 1998, **240**: 267 ~ 272.

[9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Mannual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. Press, 1989.

[10] 张龙翔, 吴国力. 高级生化实验选编. 北京: 高等教育出版社, 1989. 1 ~ 6, 23 ~ 29.

[11] 李　胜, 刘慧君, 陈章良, 等. 水稻矮缩病毒外壳蛋白 S8 在昆虫细胞中的表达. 微生物学报, 2001, **41**(2): 162 ~ 166.

[12] Nakashima N, Koizumi M, Watanabe H, *et al*. Complete nucleotide sequence of the Nilaparvata lugens reovirus: a putative member of the genus Fijivirus. *J Gen Virol*, 1996, **77**(1): 139 ~ 146.

[13] 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**(7): 1227 ~ 1232.

[14] Uyeda I, Azuhata F, Shikata E. Nucleotide sequence of rice black-streaked dwarf virus genome segment 10. *Proc Jpn Acad*, 1990, **66**: 37.

[15] 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.

[16] 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**(6): 1487 ~ 1494.

cDNA Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Rice Black-streaked Dwarf Virus Segment 7

Zhong Yongwang　Zhou Jie　Zhuang Binquan　Wei Chunhong　Li Yi*

(*College of Life Sciences*, *Peking University*, *Beijing* 100871, *China*)

Abstract: Using primers designed from the terminal sequences of maize rough dwarf virus S6, a 2.2 kb cDNA fragment was amplified by RT-PCR from maize plants showing maize rough dwarf disease. Sequence analysis shows that the full length of this cDNA is 2193bp. It contains two open reading frames that encoded two polypeptides with molecular weight of 41.0kD and 36.3kD, respectively. Results of multi-sequences alignment suggest that, this cDNA sequence has significant similarity to rice black-streaked dwarf virus S7, much higher than to MRDV S6. The ORFs were cloned into expression vectors, pET21-d (ORF1) or pGEX-KG (ORF2), respectively, and then transformed to BL21(DE3)-gold. After induction with IPTG, both proteins were highly expressed. The recombinant proteins were purified and high titer antisera of these two proteins were prepared.

Key words: Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV), RT-PCR, Expression in *Escherichia coli*, Sequence analysis

---

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA212131); Chinese National Science Fund for Outstanding Scholarship (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: 10-09-2002

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn