

# 水稻矮缩病毒大外膜蛋白基因的合成、克隆和序列分析

叶寅楼黎明\* 赵丰 刘怡之 康良仪 田波

(中国科学院微生物所,北京 100080)

水稻矮缩病毒(RDV)普遍分布于我国南方稻区,本世纪60和70年代曾分别在湖南、云南、江西等省流行,损失达3—5成。传毒介体为黑尾叶蝉、电光叶蝉和二条黑尾叶蝉,病毒在虫体内增殖并可经印传播给后代<sup>[1]</sup>。因此这种病毒病不易防治。RDV属于植物呼吸孤病毒组,其基因组为12个dsRNA片段,含有7种蛋白质。日本曾报导了一些dsRNA片段的核苷酸序列及其编码的蛋白,第四片段编码79.8k蛋白<sup>[2]</sup>;第五片段编码一个90k蛋白,可能与病毒复制有关<sup>[3]</sup>;第七片段编码一个60k的核心蛋白;第八片段编码大外膜蛋白<sup>[4]</sup>;第九片段编码小外膜蛋白;第十片段可编码一个小蛋白,其功能不详。我国曾分析了第八片段的部分序列<sup>[5]</sup>,并获得第十片段的克隆及其体外转录产物<sup>[6]</sup>。

近年来病毒外壳蛋白基因作为一种抗病的基因得到广泛承认。RDV的外膜蛋白包括大小两种外膜蛋白,本文报道了RDV大外膜蛋白基因的合成、克隆和序列分析。小外膜蛋白基因的工作也将陆续发表。

## 材料与方 法

### (一) 病毒材料

感染RDV的水稻病叶由浙江省农业科学院病毒研究室提供, -70℃保存。

### (二) 病毒提纯

参照我们以前的方法,水稻病叶加磷酸缓冲液(0.1 mol/L  $K_2HPO_4$ , pH7.2)匀浆,尼龙纱布过滤,滤液加四氯化碳匀浆,PEG-6000沉淀,差速和蔗糖梯度超速离心后,以10mmol/L Tris-Cl (pH8.0)悬浮纯化病毒,4℃保存。

### (三) 病毒核酸的抽提

提纯病毒加Proteinasek, 37℃保温30分钟,酚抽提2次,氯仿-异戊醇(24:1V/V)提纯一次,无水乙醇沉淀,抽干备用。

### (四) 引物的合成和纯化

根据Omura等的资料,合成了引导RDV外膜大蛋白全长基因合成的两个引物:3'-引物(与编码链之3'端序列互补):5'-CTAATTTGGTCG-ATAGTATC-3';5'-引物(与反义链之5'端序列互补):5'-ATGTCACGCCAGATCTGGTT-3'。合成的引物溶于TE中,用无水乙醇沉淀。引物使用前需将其磷酸化。

### (五) cDNA 的合成及 PCR 扩增

取5μg病毒dsRNA,加适量的灭菌无离子水,100℃处理3分钟后,立即置于冰浴中,然后加入引物及反转录酶合成第一链cDNA。其反应条件为:50mmol/L Tris-Cl(pH8.3),75mmol/L KCl, 10mmol/L DTT, 3mmol/L  $MgCl_2$ , 500μmol/L dNTPs, 100ng 3'-引物, 100ng 5'-引物, 500u M-MLV-RTase (BRL)。整个反应体积为50μl,反应在37℃保温1小时。为扩增cDNA,取5μl第一链cDNA产物经过PCL30个循环(按照Promega公司提供的程序),加入的3'-引物与5'-引物各为10pmol/L。每一循环包括94℃变性30秒钟,55℃复性1分钟,72℃合成反应2分钟。PCR扩增完毕,用1%的琼脂糖凝胶电泳检测并以低熔点胶回收扩增片段。

### (六) cDNA 克隆与重组克隆的筛选

克隆载体pUC19以SmaI酶切成平端。载体与双链cDNA的连接转化参照我们以前的方法<sup>[7]</sup>,挑选白色克隆,煮沸法提质粒并限制性酶解电泳检测插入片段以鉴定筛选重组克隆。

### (七) cDNA 序列分析

克隆片段以EcoRI与HindIII双酶切成三个片段:0.34kb, 0.36kb和0.57kb。将这三个片段亚克隆到pUC19上,并以双脱氧终止法直接进行双链DNA双向测序,以测定三个片段的序列。以煮沸法提质粒,质粒(2—3μg)以NaOH(0.2

本文于1991年6月1日收到。

\* 武汉大学本科毕业实习生。

mol/L) 碱变性 (65℃ 保温 30 分钟), 加入 NaAc 方法。  
 (pH5.2) 中和并加入乙醇沉淀、与引物 (Forward Sequencing Primer 或 Reverse Sequencing Primer) 的退火及双脱氧法测序均同于单链模板的

### 结果与讨论

#### (一) RDV 大外膜蛋白基因 cDNA 的合成

```

5'-ATGTCACGCCAGATGTGGTTAGACACAAGTGCTCTOCTTGAAGCCATTTCCGAATATGTGGTTGGGTAAACGGGGATACC 81
  M S R Q N W L D T S A L L E A I S E Y V V R . C N G D T
TTCCTCCGGGCTCACAAACAGGTGATTTTAATGCACCTCTCGAACAATGTTTCACACAGCTCTCAGTTTGGAGCCCTCGATATGTT 162
  F S G L T T G D F N A L S N M F T Q L S V S S A G Y V
AGTGATCCGAGAGTACCTTTCCAAACTATGTCCAATATGTTGGTATCCTTCATCAAGTGGACAGAACCGCTGTGGATACATG 243
  S D P R Y P L Q T M S N M F V S F I T S T D R C G Y M
CTTAGGAAGACTTGGTTCAATAGCGATACCAAGCCATAACGGTTTCAGATGATTTTATTACTGGGTATATTAAGACAGCTCTA 324
  L R K T W F N S D T K P T V S D D F I T R Y I K Q R L
CAAGTCCCAATGTCCGACACTGTTAGACAATGAATAATTTATGTTACAGCCATCAGCTAACCCAAAGCTGTATGAGGCC 405
  Q V P M S D T V R O L N N L S L Q P S A K P K L Y E R
CAAAATGCGATTATGAAGGGTTAGATATACTTATTCTGATCCTATTGAACCATGTAAATTGTTTGGGGTTCGGGGCAG 486
  Q N A I M K G L D I P Y S E P I E P C K L F R V A C Q
ACTGGAACATAACACTAATGGTATACTGGCTAAGCCCCCTGCTCAGCAGCAGCCATTTCTGGTCCCTGAAGAAGGAGA 567
  T G N I P L M G I L A T P P A Q Q Q P F F V A E R R R
ATTCTGTTTGGAAATCGATCTAATGGGCTATTTCAGCTGGGCCATATCAATTTGTTGTTCTGCTTGAACATCAGTGCTA 648
  I L F G I R S N A A I P A G A Y Q F Y Y P A W A S V L
AGTGTCAGTGGTCATATGTTTATTTACAAACTGGTTCTTGGGAAGCAGGATTGCTGGGGCTACTGCAACTGGCCGACAG 729
  S V T G A Y V Y F T N S F F G T T I A A A T A T A A D
GCTGCTACTACATTTACTGTTCCAACTGATGGGAACAATCTCCCTGTCCAAAGGATTCAAGCTTGTGGTCTCACTTGT 810
  A A T T F T V P T D A N N L P Y Q T D S R L S F S L G
GGTGGGAACATCAACCTGGAAGCTGGGTGGCTAAAAACAGGATTTTGTGTCCCAATTGAAGGAGAATTTACGATTTTGGCA 891
  G G N I N L E L G V A K T G F C V A P E G E P T I L A
AATGTTAGCCAAAGCTACTATAAGTTGAATTCGATAAAGTCAAGCCGACATCGATTGATGATTTTCGATGTGTCGACTTT 972
  N H S Q A Y Y T L N S I T Q T P T S I D D F D Y S D * F
TTGACGACTTTCCTGTCGACCTTGGAGCTTGTGGACAGTATGAAATTTTCAGTTATTCATGGAACAGCTGACCAATAAT 1053
  L T T F L S Q L R A C G Q Y E I F S D A M D Q L T N N
TTGATCAGGAAGTATATGGATCCGGCCGCATACCTGGGGTTTGGCATTCAACTCAGCATGGTTTGGATTTTCTGAAAGG 1134
  L I T N Y M D P P A I P A G L A F T S P W F R F S E H
GCAAGACTATTCTCCACTTCAGAAATGTGGACTTGAATATAAGAAAGTTAATAGTACGGCATCTTTGGGTCATCACTTCC 1215
  A R T I L A L Q N V D L N I R K L I V R R L W V I T S
TTAATCCCGATATTGGAAGATACTATCCGACCAAAATTAG-3' 1254
  L I A V F G R Y Y R P N ***

```

图 1 RDV 大外膜蛋白基因 DNA 序列及由此而推测的氨基酸序列

### 与 PCR 扩增

RDV 病毒核酸为双链 RNA。反转录合成 cDNA 前,需变性 dsRNA 为 ssRNA,有人采用 DMSO 变性的方法<sup>[1]</sup>。我们试图以煮沸的方法以变性 dsRNA。将 RDV 总核酸溶于灭菌无离子水中,100℃煮沸 3 分钟后立即置于冰浴。PCR 扩增并电泳分析其合成产物表明,反转录并 PCR 扩增所合成的 cDNA 片断大小为 1.2kb。

### (二) RDV 大外膜蛋白全长序列的测定

在获得 RDV 大外膜蛋白 cDNA 克隆后,直接对重组质粒 DNA 进行双向序列测定以确定 cDNA 片断在 pUC19 上的插入方向。通过对克隆片断的酶切图谱分析表明,克隆片断中包含两个 EcoRI 酶切位点,以 HindIII 与 EcoRI 酶解克隆片断并亚克隆到质粒 pUC19 上。通过对亚克隆片断的序列测定,我们测定了 RDV 大外膜蛋

白的全长序列,其全长序列及由此而推测的氨基酸序列见图 1。与 Omura 等发表的 RDV 大外膜蛋白基因核苷酸序列相比,两者有 65 个碱基差异,但其大外膜蛋白的 420 个氨基酸中只有 10 个氨基酸相异。

### 参 考 文 献

- [1] 陈声祥等:水稻病毒病,第 31—35 页,农业出版社,北京,1985。
- [2] Ishiro Vyeda, et al.:*J. Gen. Virol.*, 71:2217—2222, 1990.
- [3] Nobuhiro Suzuki, et al.:*Nucleic Acid Res.* 17(21—22):8858, 1989.
- [4] Toshihiro Omura, et. al.:*J. Gen. Virol.*, 70:2759—2764, 1989.
- [5] 高 谦等,植物学报,32(1): 13—18,1990。
- [6] 邓大伦等,微生物学报,印刷中。
- [7] 叶寅等,科学通报,36(17): 1340—1344,1991。

## SYNTHESIS, CLONING AND SEQUENCING OF THE MAJOR OUT CAPSID PROTEIN IN RICE DWARF VIRUS

Ye Yin Lou Liming Chao Feng Liu Y chi Kang Liangyi Tian Po

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Rice dwarf virus (RDV) is a major problem in rice production in China. Its genome contains 12 segments of dsRNA while segment 8 encodes the major out capsid protein. Viral dsRNA was separated from purified RDV of a Chinese isolate. The two first strands of cDNA of segment 8 were synthesized with two primers: 3' terminal primer, 5'-ATGTCACGCCA GATCTGGTT-3' and 5' terminal primer, 5'-ATGTC ACGCCAGATCTGGTT-3', and the gene was amplified by PCR. Complete

nucleotide sequence demonstrated that the major out capsid protein gene consists of 1256 base pairs, with 65 bases difference from the result of Japan. Protein sequence of 420 amino acids was deduced, with 10 amino acids differing from that of Japanese isolate.

### Key words

Rice dwarf virus; Major out Capsid Protein; Cloning; Sequencing