

甜菜坏死黄脉病毒 RNA3 序列分析及 在大肠杆菌中的表达*

李毅 王琰 刘一飞 桑晓文 陈章良

(北京大学生命科学学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

摘要 以 G1 株系的甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV) RNA3 为模板, 以 Oligo (dT)₁₈ 为引物合成 cDNA 第一链, 以 RNA3 特异引物合成 cDNA 第二链。然后将双链 DNA 克隆在 pGEM3zf(+) 载体中。通过限制性内切酶图谱分析, 构建了五个亚克隆, 完成全序列 1776bp 的序列测定(不含 Poly(A) 尾巴)。对核苷酸序列和推测的氨基酸序列分析结果发现, RNA3 含三个开放阅读框架 (ORF), 分别编码三个多肽, 即 P25、P4.6 和蛋白 N。与法国 F2 株系 RNA3 在核苷酸水平上的同源率达 96.8%, 相应的 ORF P25、ORF P4.6 和 ORFN 编码多肽的同源率分别为 93.6%、93.2% 和 92.3%。P25 含一个锌指结构 (zinc finger), 和酸性及碱性区域; 蛋白 N 为疏水蛋白。ORF 以外的两端序列高度保守, 且 3' 端可形成双发卡结构 (double hairpin motif), 说明这段序列在病毒侵染或复制中有十分重要的作用。进一步将 RNA3 cDNA 体外定点突变后使 P25 ORF 与 β -半乳糖苷酶基因位于同一阅读框架以表达 β -半乳糖苷酶和 P25 融合蛋白, 在诱导产物中检测到 β -半乳糖苷酶与 P25 的融合蛋白已在大肠杆菌中得到表达。

关键词 甜菜坏死黄脉病毒, RNA3, 锌指结构, 双发卡结构, 基因表达

甜菜坏死黄脉病毒 (Beet Necrosis Yellow Vein Virus, BNYVV) 是一种基因组为四分体的正链 RNA 病毒, 属真菌传杆状病毒组 (Furovirus group)^[1]。在自然情况下由多粘菌 (*Polymyxa betae*) 介导侵染甜菜根部引起丛根病, 广泛分布于亚、欧、美洲的甜菜种植区^[2], 该病害也已成为我国甜菜生长的严重问题^[3], 造成甜菜减产高达 30% 以上。

BNYVV 基因组中, RNA1 编码病毒复制酶, RNA2 编码外壳蛋白及运输蛋白, RNA3 编码的蛋白参与病毒在根中的复制和转移, RNA4 编码的蛋白参与由土壤多粘菌介导的传播^[4,5]。相对于 RNA1 和 RNA2 来讲, 两个小 RNA 对甜菜的影响还不甚清楚。它们对病毒在人工侵染昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*) 和薯杏 (*Tetragonia expansa*) 叶片及增殖不是必需的, 因而常会发生部分删除甚至全部丢失^[6-9]。因此, 有必要提供一个全长 RNA3 和 RNA4 的稳定来源进行病原性的研究。

应用体外转录的有生物活性的转录产物重组成含有 BNYVV 不同基因组分的分离物, 李毅等^[10]研究了各个组分的功能及对甜菜的致病作用, 发现 RNA3 对甜菜丛根病的症状表现具有决定性作用。由于不同株系的 BNYVV 感染同一品种甜菜可以产生不同症状, 对不同株系 RNA3 的序列分析具有十分重要的意义。通过对多种株系 RNA3 基因序列结构的分析, 可以从分子水平上了解 BNYVV 的致病机制和基因控制病症的机

* 本研究由博士后基金资助。

本文于 1994 年 7 月 27 日收到。

理,为将来病毒的防治和高度抗性植株的获得提供有价值的理论依据。本文报道了 G1 株系的 BNYVV RNA3 的全部序列,对其编码的蛋白导致病症的作用机理做了推测并在大肠杆菌中表达了该蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料及来源

1.1.1 病毒 BNYVV G1 株系采自德国布伦瑞克。

1.1.2 试剂购自下列公司: [α - 32 P]dATP 购自 Dupont 公司;限制性内切酶、T4DNA 聚合酶、第二链 cDNA 合成特异引物: 5'-GCGCAAGCTTAAAATTCAAAATTT-3' 购自 HindIII

Biolabs 公司;大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (Klenow 大片段)、T4DNA 聚合酶、cDNA 合成试剂盒、dNTP、T4DNA 连接酶、T4 多核苷酸激酶、鲑鱼精 DNA 购自 Boehringer 公司;DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司;测序引物 (T7, T3, SP6) 购自 Promega 公司;抗 β -半乳糖苷酶-IgG、X-gal、IPTG 等购自 Sigma 公司。

1.1.3 质粒及菌株: pGEM3zf(+) 购自 Promega 公司; pEX3 和 *E. coli* POP2136. XL-Blue, CJ236, MV1190 分别购自 Genofit 公司、Stratagene 公司和 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒的纯化和 RNA 的提取: 病毒的纯化用差速离心和蔗糖密度提纯^[14]。病毒 RNA 抽提则用酚法,即将纯化的病毒溶于 10mmol/L Tris-HCl(pH7.8) 再加入 SDS (终浓度达 1%) 和 EDTA(pH7.8) (终浓度达 100mmol/L), 于 55℃ 水浴中保温 1min 后用等体积水饱和酚抽提两次,最后用乙醇沉淀即得到病毒 RNA^[7]。

1.2.2 cDNA 的合成和克隆: 参考并适当修改 Gubler & Hoffmann 的方法^[14], 以 Oligo(dT)₁₅ 为引物用 AMV 反转录酶合成 cDNA 第一链。cDNA 第二链的合成则是通过大肠杆菌 DNA 聚合酶 I、Klenow 大片段和第二链特异引物 (5'-GCGCAAGCTT-
HindIII

AAAATTCAAAATTT-3') 合成。RNA3 第二链特异引物则是依据法国 F2 株系设计的,位于 5' 末端的 1—14nt 处,并含有一个 HindIII 位点。双链 cDNA 经 HindIII 酶解后克隆到经 HindIII 或 HindIII 和 HincII 酶解的 pGEM3zf(+) 载体上。将上述连接产物转化大肠杆菌 XL1-blue, 经选择培养基 (含 X-gal、IPTG、氨苄青霉素和四环素) 筛选后,煮沸法制备质粒 DNA,电泳和酶切鉴定阳性克隆。

1.2.3 DNA 序列分析: 采用 Sanger 双脱氧法^[14], 用修饰的 T7 DNA 聚合酶进行 DNA 序列分析,实验步骤按照产品说明书中所给的程序进行。

核酸及蛋白序列同源性比较应用 DNASIS 及 EMBL 软件。

1.2.4 体外定点突变: 为了将 RNA3 ORF 编码蛋白 P25 与 β -半乳糖苷酶作为融合蛋白来表达,利用体外突变技术在 RNA3 AUG 下游 (+6nt) 处产生一个 EcoRV 位点,这个位点可以使我们将 RNA3 的 P25 ORF 与 β -半乳糖苷酶基因 3' 端部分 ORF 连在一起并且在同一阅读框架上。

具体方法参考文献[15]。

突变所用的寡聚核苷酸引物的设计和合成: 引物设计为(5'-GCGCCTAAGATATC-
EcoRV

ACCCATGGCGGTAC-3') 位于 RNA3 437-466nt, 含有一个 EcoRV(GATATC)。这个 EcoRV 位点位于 AUG 下游两个三联体密码子处(+6nt)。

定点突变引物用 Bio-Rad 公司 DNA 仪合成,再用 6% 聚丙烯酰胺凝胶纯化,再从胶上洗脱引物,然后离心分离,用乙醇沉淀上清中的 DNA,最后,引物用 T4 DNA 多核苷酸激酶磷酸化。

单链 DNA 的制备: 将 pGB533 转入大肠杆菌 CJ236 细胞,再用辅助噬菌体 M₁₃K07 感染 CJ236 细胞产生单链 U-DNA,然后用 2XYT 培养基(含 100μg/ml 氨苄青霉素和 30μg/ml 氯霉素)培养,再用 PEG 法提取和纯化单链 U-DNA^[4]。

互补链 DNA 的合成: 将磷酸化的引物与单链 U-DNA 模板进行退火处理。然后加入 T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶和其它反应底物合成第二链。得到的异质双链 DNA 然后转化入大肠杆菌 MV1190(ung⁺) (含尿嘧啶的母链失活,只有突变链得到复制)经定点突变的重组质粒命名为 pGBM533。

融合蛋白在大肠杆菌中的表达: 将 EcoRV/BamHI 酶切 pGBM533 释放得到的片段克隆到 EcoRV/BamHI 切开的 pEX3 载体中,得到含有 RNA3 ORF 的重组质粒 pEXMB533 转化进大肠杆菌 POP2136 菌株的感受态细胞中。POP 菌株阳性克隆在 2XYT-氨苄青霉素培养基中于 28℃ 培养 16h,再于 42℃ 诱导 2h。用 1 × laemmli 样品缓冲液中提取总蛋白并对总蛋白进行 0.1% SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳和用 β-半乳糖苷酶抗血清进行蛋白的 Western 印迹分析。

Western Blotting 分析: 参考 Burgermeister & Koenig 的方法^[17], SDS-PAGE 电泳后,将蛋白质用 150mA 电转移到硝酸纤维素膜上。硝纤膜于 80℃ 干燥 30min 后,于室温浸于经适当稀释的 β-半乳糖苷酶抗血清保温 2h,经 0.85% NaCl 洗涤后,将膜浸入含 1:2000 稀释的抗 β-半乳糖苷酶-IgG 的抗血清缓冲液中,后用氮蓝唑(nitro blue tetrazolium chloride)和 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(5-bromo-chloro-3-indolyl phosphate)染色。

2 结果和讨论

2.1 BNYVV RNA 的抽提

从纯化的 BNYVV 病毒颗粒中提取出的 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳(含 60% 甲酰胺)检验(图 1),说明 RNA 完整而没有发生降解。

2.2 cDNA 的合成和克隆

用碱性琼脂糖凝胶电泳检验第一链 cDNA 的合成,以确定产物的大小。与标准 DNA 比较发现我们得到的单链 cDNA 的大小从很短到 3kb 不等。

然后进行第二链 cDNA 的合成,再将双链 cDNA 克隆到 pGEM3zf(+) 质粒中得到全长 RNA3 cDNA 的阳性克隆。由于 RNA3 cDNA 内部有一个 HindIII 位点,所以全长 cDNA 经 HindIII 酶解后分别克隆到 HindIII 和 HindIII/HincII 酶解的 pGEM3zf(+) 载体中分别得到 pGB26 和 pGB75,它们分别含有 RNA3 的 5' 和 3' 端

部分序列。最后将由 HindIII 酶切 pGB75 释放出的片段克隆到 HindIII 酶切并脱磷的 pGB26 中,得到的正向阳性克隆命名为 pGB533,即是我们构建的全长 RNA3 克隆(图2)。

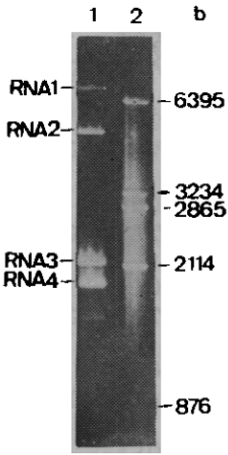


图1 BNYVV 基因组 RNA 在 60% 甲酰胺-1% 琼脂糖凝胶电泳

1. BNYVV 基因组 RNA*;

2. TMV + BMV 基因组 RNA.

(*BNYVV 基因组 RNA 中第 5 条带是 RNA3 的缺失突变体)

Fig. 1 BNYVV genomic RNAs separated electrophoretically in a 60% formamid 1% agarose gel and stained with ethidium bromide

Lane 1. BNYVV genomic RNAs*;

Lane 2. TMV + BMV genomic RNAs.

(*The fifth band in lane 1 represents a partially deleted RNA3)

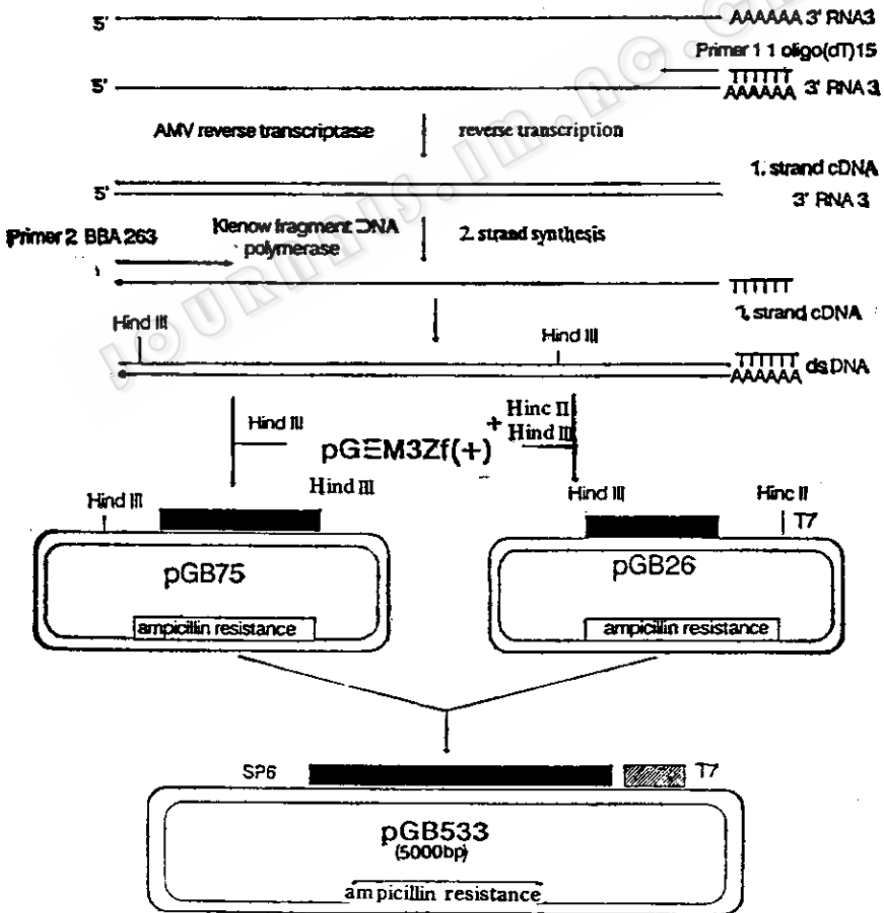


图2 RNA3 cDNA 合成及克隆策略

Fig. 2 Schematic representation of BNYVV RNA3 cDNA synthesis and cloning

2.3 G1 株系 RNA3 的序列分析及与 F2 株系 RNA3 的同源性比较

根据 pGB533 质粒的酶切图谱分析,对外源片段进行了不同酶切片段的亚克隆。通过五个亚克隆(图 3)的 DNA 序列分析,得到了完整的 RNA3 序列(图 4)。该片段全长 1776bp (不含 poly(A) 序列),此外 3'端还有 poly(A)₂₅ 序列,与发表的 F2 株系 RNA3 序列进行比较,同源率达 96.8%。

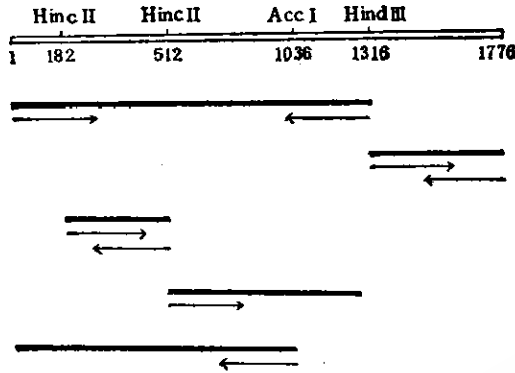


图 3 pGB533 的物理图谱及亚克隆策略

Fig. 3 Physical mapping and DNA sequencing strategy of pGB533

RNA3 的 5' 端 250 个核苷酸与 3' 端 350 个核苷酸与 F2 株系相比高度保守。另外,nt1709-1776 与 F2 株系相应区段一样可被折叠成二级结构,为双发卡结构 (double hairpin motif) (图 5),推测这段序列含有复制酶进行负链 RNA 合成的识别位点,推测有重要的生物学功能^[16,17]。RNA3 5' 和 3' 端的序列对病毒的复制、翻译和包装是必不可少的^[17,18]。在感染的根及叶子的总 RNA 提取中可以检测到一个 RNA3 基因组分突变体,它由 RNA3 的 3' 端 nt1232-1776 部分 poly(A) 结构指导合成。由于缺乏 5' 端保守序列,所以不被包装进病毒颗粒。Jupin 等人于 1990 年报道在 5' 端和 3' 端保守区之间有删除的转录产物可以被高效扩增和包装,删除了 75% 中心序列的病毒依旧存活^[16,17]。由此得出结论, RNA3 两端的序列可能是控制病毒复制和包装的重要的顺式作用元件。

2.4 RNA3 编码的蛋白及其可能的功能分析

全序列含有三个开放阅读框架 (ORF)。其中第一个 ORF (447-1106nt) 由 657 个核苷酸组成,编码一个由 219 个氨基酸残基组成的多肽,分子量为 25kD,与 F2 株系相应蛋白的氨基酸序列同源率为 93.6%。第二个 ORF (1054-1233nt) 由 177 个核苷酸组成,编码一个由 59 个氨基酸残基组成的多肽,即蛋白 N 与 F2 株系相应蛋白的氨基酸序列同源率为 93.2%。第三个 ORF (1276-1395nt) 由 120 个核苷酸组成,编码一个由 39 个氨基酸残基组成的多肽,分子量为 4.6kD,与 F2 株系相应蛋白的氨基酸序列同源率为 92.3%。

在三个阅读框架中,ORFN 与 ORFP25 重叠,ORFN 起始于 ORF P25 3' 端部分,由于核糖体不易接近,其翻译起始受到一定程度的阻碍,在正常情况下仅有微量表达,用基因融合的手段检测不到,一旦去掉上游序列,N 蛋白即被高效翻译^[18]。

10 20 30 40 50 60
 5' AAAATTCAAATTTACCATTACATATTGGTATTTATTTACCCCTCAGTTGGTGATATATGT
 70 80 90 100 110 120
 GAGGACGCTAGCCTGTTGGGTTTCCTGACCGACCAATCCAAGCGAGCTTAATCCAAGTA
 130 140 150 160 170 180
 CCTCGTCTCAAATTGAGTGTCAAGTGAATAAGCATAGTGACCCCATCGTTTCAGGGTAGT
 190 200 210 220 230 240
 TGACGGCTATTAATAGACATATTACAAACGCTTCTCTTTATTTATCACCAACATGGGATG
 250 260 270 280 290 300
 TAATGTTTATGCGTGACGCTACGGCCGCATTGTAAAATTAGTGGTTTTGAATTTCTATTCT
 310 320 330 340 350 360
 TTCGGAATATACAAGGTTTAAAGACCAGCATTGGGGTTAAAAATTTTAAACCTTACTA
 370 380 390 400 410 420
 TCTTTAACTAGTAACTCGAACTCGATTTATATTACAGATTTTAAATATCAAGTTGTTGTGT
 430 440 450 460 470 480
 TTTCTGATCATCATTAAAGTGACCGTCATGGGTGATATATTAGGCGCAGTTTATGATTAG
 M G D I L G A V Y D L G
 ORF P25
 490 500 510 520 530 540
 GGCACAGACCTTACCTAGCACGGCGTACGGTTTATGAGGATCGTTTGATTCTTAGCACAC
 H R P Y L A R R T V Y E D R L I L S T H
 550 560 570 580 590 600
 ATGGTAATATCTGTCGGGCTATTAACCTGTAACTCACGATAATCGTACTACACTGGTGT
 G N I C R A I N L L T H D N R T T L V Y
 610 620 630 640 650 660
 ATCACAATAATACTAAACGCATAAGGTTTCGTGGATTATTGTGTGCTCTTCATGGGCCTT
 H N N T K R I R F R G L L C A L H G P Y
 670 680 690 700 710 720
 ATTGTGGGTTTCGTGCCTTATGTAGAGTAATGTTATGTTCTCTACCTCGTTTGTGTGACA
 C G F R A L C R V M L C S L P R L C D I
 730 740 750 760 770 780
 TCCCTATCAATGGAACTCGCGACTTTGTTGCAGATCCTACCAGACTCGACAGCTCTGTTA
 P I N G T R D F V A D P T R L D S S V N
 790 800 810 820 830 840
 ATGAGTTGCTGGTTTCTAATGGTCTCGTCATCCACTATGATCGTGTTCATCATGTTCCCT
 E L L V S N G L V I H Y D R V H H V P L
 850 860 870 880 890 900
 TACACACTGATGGTTTGAAGTTGTAGATTTCACGACTGTCTTTCGTGGTCCCTGGAAACT
 H T D G F E V V D F T T V F R G P G N F
 910 920 930 940 950 960
 TTCTTTTGCCTAATGCAACAAATTTCCCTCGGCCAACCACAACCGATCAGGTTTACATGG
 L L P N A T N F P R P T T T D Q V Y M V
 970 980 990 1000 1010 1020
 TGTGTTTGGTAAACACGGTTAATTGTGTGTTACGTTTTGAGTCCGAACCTTACAGTGTGGG
 C L V N T V N C V L R F E S E L T V W V

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TTCACTCTGGTTTGTATACAGGTGATGTTTTAGATGTGGATAATAATGTTATTCAAGAGC
 H S G L Y T G D V L D V D N N V I Q E P
 M W I I M L F K S
 ORF PN
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CTGGACCTGTTGATGATGATGGTTAGAGTTATCACAATTTCAACAACACACTTATTGGTG
 L D V L M M M I R V I T I S T T H L L V
 G R V D D D G *
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TGTTGTTCTGTTACACCATTTGAAAGTTTAATAATTGTCTCAATTCGATTGTTGATCTGG
 C C S V T P F E S L I I V S I R L L I W
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 TTGGGACAATTATTTTATTTTCTTTGGTGTAATGCTCCGAAGACGTTAAACTACACGTG
 L G Q L F Y F L L V *
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 ATTCACGGTGTTCGATGAGAAGATTGTTTAAACGGTGTTACGTTGTGTACCTTTAAGCTT
 M R R L F N G V T L C T F K L
 ORF-P46
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 TCTTCTCATTTTACCACATGTGATGATTGTAGCCTGTGGGTTGTTATGTGGACAATTATG
 S S H F T T C D D C S L W V V M W T I M
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GTTACTTATTTGTAAATGATAAAGAGTGTGCGGTCAGCGACTTTATGCGAGTGGGAGTAG
 V T Y L *
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TTGTGTTATTACTACTATTCTGGTTCGTATAAAGATCCTTGACGGCGGCATCGTGGGTTT
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 CACAGCCGGTTACATGGTGTTCCCGTCCGTTTACGAAGGTTTAACTGTGAGCCTTGTATT
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 TTACGAATACACAGTTTTTATCTTAACAGGCTCGTTCACAAGCCTCCTTTTACATTAAGT
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 TTAAAGGTTTATGTGGACACAAAATATGGCTTATTGGTTATGCTAAACCTCATATCATG
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 TTATAATATTCGTTTCATATTATAATTAAGGTTAAGATGTACTGACTGGGTGTGAAATGT
 1750 1760 1770
 ACCAGTCCTTGTAGGGTTCTTTGTCAGTATATTGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 A 3'

图4 BNYVV G1 株系 RNA3 DNA 序列及推测编码蛋白的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide acid sequence and its deduced amino acid sequence of BNYVV
G1 strain of RNA3

研究表明, RNA3 对叶部症状的表现有决定性作用。目前已报道的症状类型包括黄斑 (yellow spots, YS)、枯斑 (necrotic spots, NS) 和较弱的症状, 即退绿斑 (chlorotic

们将 RNA3 基因 cDNA 3' 末端用 *AccI*/*XbaI* 酶切删除得到 pGB Δ A/X533 并将该质粒转入 CJ236 细胞后,用辅助噬菌体 M13K07 感染 CJ236 细胞,则产生大量单链 U-DNA。电泳检测(结果见图 6)后再合成互补链 DNA。得到异质双链 DNA 后转入大肠杆菌 MV1190(ung⁺),使含 U 单链不能复制,而使突变链得到增殖。得到我们需要的突变体后,再用 *NruI*/*Bam*HI 酶切 pGB533,将释出包含病毒 RNA 3' 端序列克隆到 *NruI*/*Bam*HI 酶切的 pGBA/X533 质粒中得到具有定点突变质粒 pGBM533,突变效率高达 70%。

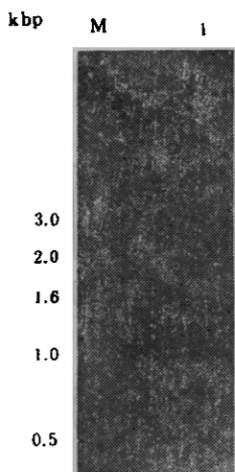


图 6 用大肠杆菌 CJ236 株系和辅助噬菌体获得的 pGB Δ A/X533 单链 DNA

1. pGB Δ A/X533 单链 DNA; M. 标准分子 DNA(1kb DNA Ladder)

Fig. 6 The single-stranded DNA prepared with CJ236 and helper phage from plasmid pGB Δ A/X533

Lane 1. Single-stranded DNA of pGB Δ A/X533;
M. 1kb DNA Ladder.

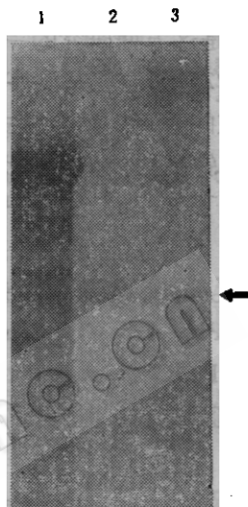


图 7 部分 β -半乳糖苷酶与 BNYVV RNA3 编码 P25 融合蛋白的 Western 印迹分析,一抗为 β -半乳糖苷酶抗血清

1. PEX3 空载体转入寄主菌 POP236 诱导后的总蛋白; 2,3.用 PEXMB533 转入寄主菌后诱导表达总蛋白(箭头指的是 β -半乳糖苷酶和 P25 的融合蛋白)。

Fig. 7 Western blot of the expressed partial β -galactosidase and P25 fusion protein incubated with antiserum against β -galactosidase
Lane 1. Total proteins extracted from POP236 transformed with PEX3 vector; Lane 2 and 3. Total proteins extracted from POP236 transformed with pEXMB533 (arrow points the fusion protein).

2.6 β -半乳糖苷酶-P25 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将改造好的 RNA3 cDNA 外源片段克隆进表达载体 pEX3 中,与 β -半乳糖苷酶基因融合,再转化入 POP236 菌株的感受态细胞中。

0.1% SDS~10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,再用考马斯亮蓝染色分析,或者电转移到硝酸纤维素膜上用 β -半乳糖苷酶抗血清进行免疫染色(图 7)。

结果表明在大肠杆菌中表达的融合蛋白在 SDS-PAGE 上的与标准分子量蛋白比较后分子量约为 75kD,与理论值 70000 比较吻合。理论值是通过 *EcoRV*/*Bam*HI 酶切缩短的 β -半乳糖苷酶基因 cDNA(45000) 和 ORF P25(25000) 推算出来的。用 β -半乳

糖苷酶抗血清进行蛋白 Western 印迹分析得到的结果与上述 SDS-PAGE 分析结果相吻合。融合蛋白的数量在 42℃ 诱导 2h 后达到最高水平, 延长诱导时间并不能增加融合蛋白的量, 反而减少。所以表达的融合蛋白可能对细菌细胞具有毒性作用^[21]。

从 8ml 细菌培养物中得到的融合蛋白表达产物的浓度范围是 3~4μg/ml, 这是通过染料结合点分析估计得来的^[21]。

利用此融合蛋白已制备出多抗, 为进一步研究 RNA3 编码的 P25 蛋白在感染组织中的分布以及与细胞组份和结构的相互作用, 并由此进一步阐明 P25 的致病机理打下了基础。

致谢 作者衷心感谢李小华小姐在论文打印过程中给予的大力协助。

参 考 文 献

- [1] Shirako Y, Brakke M K. *J Gen Virol*, 1984, 65: 119~127.
- [2] Tamada T. *CMI/AAB. Description of Plant Viruses*, 1975, No. 144.
- [3] Gao J L, Deng F, Zhai HQ et al. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1983, 13: 1~4.
- [4] Canova A. *Inf Fitopatol*, 1959, 9: 390~396.
- [5] Tamada T, Abe H. *J Gen Virol*, 1989, 70: 3391~3398.
- [6] Kuszala M, Ziegler V, Bouzoubaa S et al. *Ann Appl Biol*, 1986, 109: 155~162.
- [7] Burgermeister W, Koenig R, Weich H et al., *J Phytopathol*, 1986, 115: 229~242.
- [8] Koenig R, Burgermeister W, Weich H et al. *J Gen Virol*, 1986, 67: 2043~2046.
- [9] Lemaire O, Merdinoglu D, Valentin P et al. *Virology*, 1988, 162: 232~235.
- [10] 李 毅, 魏春红, 田 波, 等. 中国科学(B辑), 1994, 24(9): 948~956.
- [11] Koenig R, Lesemann DE, Burgermeister W. *Phytopathologische Zeitschrift*, 1984, 111: 244~250.
- [12] Gubler U, Hoffmann B J. *Gene*, 1983, 25: 263.
- [13] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. *PNAS*, 1977, 74: 5463~5467.
- [14] McClary J A, Witney F, Geisselsoder J. *Biotechniques*, 1989, 7(3): 282~288.
- [15] Burgermeister W, Koenig R. *Phytopathologische Zeitschrift*, 1984, 111: 15~25.
- [16] Jupin I, Richards K, Jonard G et al. *Virology*, 1990, 178: 273~289.
- [17] Bouzoubaa S, Niesbach-Klosgen U, Jupin I et al. *J Gen Virol*, 1990, 72: 259~266.
- [18] Jupin I, Guillely H, Richards K et al. *EMBO Journal*, 1992, 11: 479~488.
- [19] Daubert S. *Plant-Microbe Interact*, 1988, 8: 317~325.
- [20] Van Loon L C. *Adv Virus Res*, 1987, 33: 205~255.
- [21] Diener T. *The Viroids*. New York: Plenum Press. 1987.
- [22] Derg J M. *J Biol Chem*, 1990, 265: 6513~6516.
- [23] Foyer C H, Dujardyn M, Lemoine Y. *Plant Physiol Biochem*, 1989, 27: 751~760.
- [24] Putz C, Vuittenez A. *J Gen Virol*, 1980, 50: 201~204.
- [25] Morozov S, Lukashova L I, Chernov B K. *FEBS Letters*, 1987, 213: 438~442.
- [26] Stegemann H, Frankens H, Macko V. *Zeitschrift für Naturforschung Teil C*, 1973, 28: 722~723.

cDNA CLONING, SEQUENCING AND EXPRESSING IN *E. COLI* OF RNA3 OF BEET NECROSIS YELLOW VEIN VIRUS*

Li Yi Wang Yan Liu Yifei Liang Xiaowen Chen Zhangliang
(The National Laboratory for Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College
of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract The RNA genome was purified from beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) (G1 strain) and full length double-stranded cDNA of RNA3 was synthesized by using the RNA3 as template, and oligo(dT)₁₂ and RNA3-specific primer. The double-stranded cDNA was cloned into pGEM3zf(+) and generated recombinant plasmid pGB533. Determination of the nucleotide sequence of the cDNA fragment shows that RNA3 is 1776nt in length and it contains three open reading frames (ORFs), which encode two proteins with molecular weights of 25kD, 4.6kD and a polypeptide with 59 amino acids in length called protein N. The nucleotide sequence shows homology of 96.8% with that of F2 strain. As for the deduced amino acid sequence, ORF P25, ORFN and ORF P4.6 have homology of 93.6%, 93.2% and 92.3%, respectively. Analysis of the amino acid sequence indicate a zinc finger in P25, and also extremely acidic and basic domains. Protein N is extremely hydrophobic. 5' and 3' extremities of RNA3 are highly conserved. A double hairpin motif is present at the 3' extremity of RNA3, which is essential during encapsidation and replication of the virus. After site-directed *in vitro* mutagenesis, authors have succeeded in expression of the β -galactosidase-P25 fusion protein in *E. coli*.

Key words Beet necrosis yellow vein virus, RNA3, Zinc finger, Double hairpin motif, Gene expression

* The work was supported by post doctoral fellowship.