

水稻矮缩病毒第七号基因的序列分析 及在大肠杆菌中的表达*

曲林¹ 李毅^{1,3**} 全胜¹
丁士友¹ Suzuki N² 陈章良^{1,3}

(¹ 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)

(² 秋田县农学院生物技术研究所植物基因工程实验室 日本)

(³ 德·蒙福特大学 英国)

摘要 应用反转录-PCR 技术合成并扩增了水稻矮缩病毒(RDV)中国福建分离物基因组第七号片段(S7)cDNA。将 PCR 产物克隆在载体 pBluescript SK(+)上,进行了亚克隆和序列分析。结果表明克隆片段全长 1578bp,含有一个 1518bp 长的开放阅读框架(ORF),编码一个由 506 个氨基酸组成的理论分子量为 56 000 的蛋白。该片段与 RDV 日本分离物基因组的相应片段相比,在核苷酸及氨基酸水平上的同源率分别为 93.2%和 94.1%。该片段编码的 56 000 蛋白与同属的伤瘤病毒(WTV)基因组第七号片段编码的 57 000 蛋白相比,在靠近 N 端的区域(aa61~aa141)有较高的氨基酸序列同源性。将 RDV S7 cDNA 克隆到原核表达载体 pBV221 上,通过温度诱导在大肠杆菌中得到表达。表达产物占菌体可溶性总蛋白的 13.73%。对表达产物进行了 Western blotting 分析。本工作为进一步纯化 RDV S7 编码蛋白、分析其功能和转化水稻打下了良好基础。

关键词 水稻矮缩病毒,第七号片段,序列分析,表达,小核心蛋白

水稻矮缩病毒(Rice Dwarf Virus,简称 RDV)属呼肠孤病毒科(Reoviridae)植物呼肠孤病毒属(Phytoreovirus)第一亚属^[1],它广泛分布于我国、朝鲜、日本及东南亚各国,是水稻普通矮缩病的病原,在流行年份会造成水稻的严重减产。RDV 在自然条件下由黑尾叶蝉(*Nephotettix cincticeps*)或电光叶蝉(*Recilia dorsalis*)传播,而且能在叶蝉体内复制,随卵传给子代。病毒粒子为直径 70nm 的正二十面体,无刺突,有双层外壳蛋白,内含单拷贝基因组^[2,3]。病毒基因组由 12 条双链 RNA 片段(segment)组成,根据在聚丙烯酰胺凝胶上的迁移率命名为 S1 到 S12。S1 到 S11 每条片段含有一个开放阅读框架(ORF),S12 含有 4 个 ORF^[4]。S1 编码病毒复制酶,S2、S5 和 S8 编码外壳蛋白(capsid protein),S3 编码大核心蛋白(major core protein),S7 编码小核心蛋白(minor core protein),S4、S6、S9、S10、S11 和 S12 编码非结构蛋白^[5~13]。其中 S4 编码的非结构蛋白含有

* 本研究由国家科委863水稻抗病毒基因工程(863-101)和国家自然科学基金(39400026)课题资助。

** 联系作者

本文于 1995 年 10 月 29 日收到。

锌指结构 (Zinc finger motif), 可能参与病毒的复制^[8]。S11 编码的非结构蛋白与组蛋白 H1 和蓝舌病毒的 VP6 蛋白有同源性, 可能具有核酸结合功能^[6]。

鉴于 RDV 对水稻的严重危害, 用基因工程方法获得抗 RDV 的转基因水稻是一项意义重大的课题。随着植物基因工程的发展, 将病毒外壳蛋白基因或病毒基因组的其它成分转入植物以获得抗病毒植株的方法已经在许多农作物上取得成功^[14]。为研究 RDV 的中国分离物基因组序列和基因产物功能并将其基因组成分转入水稻, 我们实验室自 1988 年以来完成了 RDV 中国福建分离物基因组全部片段的克隆和序列分析及第八号片段在大肠杆菌中的表达^[15-21]。本文是第七号片段的克隆、序列分析和在大肠杆菌中表达的报道。

1 材料和方法

1.1 材料

RDV 毒源材料采自福建省福州市郊区感病稻田。cDNA 合成试剂盒、克隆和测序载体质粒 pBluescript SK (+)、受体菌 *E. coli* DH5 α 、限制性内切酶及其它工具酶购自 Promega 公司。PCR 扩增试剂盒购自华美公司。DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司。 α -³⁵S-dATP 和 α -³²P-dATP 购自 DuPont 公司。PCR 引物由北大-华美公司联合实验室合成。原核表达载体质粒 pBV221 由中国预防医学科学院病毒学研究所侯云德教授惠赠。RDV S7 基因产物 P7 的抗体 rPAb-P7 由日本 Suzuki 教授惠赠。碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒的分离纯化和 RNA 的抽提: 参照文献[21]。

1.2.2 cDNA 合成及 PCR 扩增: 根据已报道的 RDV 日本分离物 S7 的全序列^[9], 设计 PCR 扩增反应的两个引物:

5' 端引物: 5' GCTCATTGGATCCCCGACATGTCTG 3'

BamH I

3' 端引物: 5' TGTTCCGCTGCAGATGGCGG3'

Pst I

以变性的病毒基因组双链 RNA 为模板, 与合成的两条 PCR 引物在 70℃ 下退火, 加入 dNTP、AMV 反转录酶, 合成 cDNA 第一链。以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。反应条件为: 94℃ 变性 1min, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 共 35 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳检查。

1.2.3 基因克隆及序列测定: 将 PCR 产物平头连接到 pBluescript SK (+) 载体的 EcoRV 位点内, 转化大肠杆菌 DH5 α 。在含 IPTG 和 X-gal 的 LB Amp⁺平板上筛选白色菌落, 对筛选到的重组子作酶切鉴定, 得到多个重组阳性克隆。根据 RDV S7 的限制酶切图谱制作亚克隆, 按双脱氧链终止法进行双链质粒测序。

1.2.4 序列分析和同源性比较: 采用 Hitachi Software Engineering Co. Ltd 1990 年 DNASIS 软件。

1.2.5 大肠杆菌表达分析: 用 BamHI 和 Sal I 从阳性重组质粒 pBSR7 上切下 RDV S7

基因,插入原核表达载体 pBV221 的 BamHI 和 Sal I 位点间,将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,在 LB Amp⁺平板上筛选得到重组表达载体,酶切鉴定,命名为 pBVR7。挑取含有 pBVR7 的 DH5 α 菌种接于 LB Amp⁺液体培养基中,37℃ 培养过夜。次日取 300 μ l 菌液转入 3ml 新的 LB Amp⁺液体培养基中,30℃ 培养至对数中期,升温至 42℃ 再培养 4h。取 1.5ml 菌液,离心收集菌体,将沉淀悬浮于 70 μ l 无菌水,加 70 μ l 2 \times 上样缓冲液,煮沸 10min,离心后进行 SDS-PAGE 分析。用考马斯亮蓝 R-250 染色,薄层扫描测定表达产物的含量。Western blotting 检测方法参照文献[22],其中第一抗体为 RDV S7 基因产物 P7 的抗体 rPab-P7(1 : 1000 稀释),第二抗体为碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG(1 : 10000 稀释)。

2 结果

2.1 RDV S7 cDNA 的合成和扩增

根据已发表的 RDV 日本分离物 S7 的全序列^[9],设计合成 5' 端和 3' 端引物。5' 端引物序列位于全序列的 9~32nt,在原序列上改变 2 个碱基,形成一个 BamHI 位点。3' 端引物序列位于全序列的 1567~1586nt,在原序列上改变 1 个碱基,形成一个 Pst I 位点。引入这两个位点是为了便于基因克隆。以 RDV 全基因组 dsRNA 变性后的单链 RNA 为模板,与这两个引物退火,合成 RDV S7 的 cDNA 第一链,再按所设计的反应条件进行 PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检查为单一条带,长约 1.6kb,大小与预期值一致(图 1)。

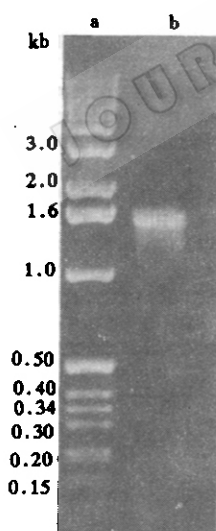


图 1 RDV S7 PCR 产物电泳图
Fig.1 Electrophoresis of PCR product of RDV S7

a. 1kb DNA ladder;
b. PCR product of RDV S7.

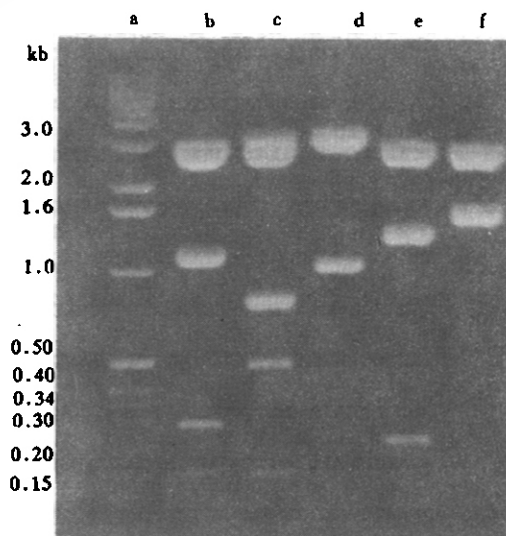


图 2 含有 RDV S7 cDNA 的重组质粒 pBSR7 的限制酶切图谱

Fig.2 Restriction mapping of recombinant plasmid pBSR7 which contains cDNA of RDV S7
a. 1kb ladder DNA marker; b. BamHI+Hind III;
c. BamHI+Hinc II; d. BamHI+EcoRV;
e. Pst I; f. BamHI+Sal I.

<u>GCTCATTTGGATCCCGACATGCTCTGCGATTGTAGGCCTCTGCCTCCTATCGGAAAAAGTCGTT</u>	62
M S A I V G L C L L S E K V V	
TTATCTAGAAGCCTGACAGACGAGGTTTCTAAACTGTATAAATTGAATCGGGGCAACGTCAAAG	126
L S R S L T D E V S K L Y K L N R G N V K	
AACCCCGAAAGTATGCTACTGAACGTATGTCTACACAGTCCAAACCTGTGGCGTTGCAGGTTCC	190
E P R K Y A T E R M S T Q S K P V A L Q V P	
TGTTTCGACAATAATTCTAGACTATAAGGATGAGGATTTTATTAAACAAAACCCAACITATAGT	254
V S T I I L D Y K D E D F I K Q N P T Y S	
GCCATGGATATAATTGGAAGCCCTAGTAATACGGCTCCGCAAACGGCGTTTCAAAGTATAATGC	318
A M D I I G S P S N T A P Q T A F Q S I M	
CGTCTCTATCTGCGCTATTTAATACCCCTTTTCATCCAGGGGGCTTTTCGGCACCGGGTCATATC	382
P S L S A L F N T P F I Q G A F R H R V I S	
AAGTATGGGACCTGAAATTTCATACTTAGTTATGGTCATCGGACCACCAAGTGGTTTTATGGAT	446
S M G P E I S Y L V M V I G P P S G F M D	
ACGCCAATGTATCGTACAGTCAATCATCTGTCCATACTGATGTCAAATGCTGATGTTGACTTGA	510
T P M Y R T V N H L S I L M S N A D V D L	
TTGATATTATCGCTATTAATTTCGACGATGGCTAAAAGCACGAAGTTGGTGTTCGCTTCAACTTT	574
I D I I A I N S T M A K S T K L V F A S T F	
TCAGGCCATGTTGGTTAATGACGTTTATGATAGATGCATGGTTTTGGTTGGGATTTTTTATCT	638
Q A M L V N D V Y D R C M V L V G I F L S	
CAGGCTCTTCCATCTTTCAGAAATTACGTCAATGTACAATCGAAGGGTCTCTCCCTCCGGCTG	702
Q A L P F F R N Y V N V Q S K G S L P P A	
TGGCCGCTTGCTTAAACACTCCCATTAAAGGAATTATTCTCGATGGGCTCTGGTAAACGTAGACC	766
V A A C L N T P I K E L F S M G S G K R E P	
GTTGGCGCTGGAATTTAGAAAGGATAATGAGGGGCAATGCCTTGGCATTGTTCTTCCCAAAGGG	830
L A L E F R K D N E G Q C L G I V L P K G	
CATGAGGGAGATACCCATCATCCCGCTATCCTGCTGTTTTTATTAAAGTGAAGTGAAGCTTCT	894
H E G D T C S R Y P A V F I N E S E P F	
CTGATGAAGAGCGTTCTGAGCTGTCCAAACTCAAACGAACAGACCCGGACGCGTATGAGAAGCT	958
S D E E R S E L S K L K R T D P D A Y E K L	
CTATTCTGAAACGATCTCTAAGCAGTCTCTGACGGATCGTATGGGAATAGGGTAATTATTCT	1022
Y S E T I S K H V S D G S Y G N R V I I S	
CATAAAATGTCAAGATTATCAAATGGGGGAGTCAAGATAATTGGAAGATTCAAGATATCTGACT	1086
H K M S R L S N G V K I I G R F K I S D	
TCAATACTGTGAAGAAGAAATTTATCCTCGCGACCTGGCGAGGTAGATTCTGCAAAGGAGCAATG	1150
F N T V K K N L S S R P G E V D S A K E Q W	
GGAAGCTTTGTCCGGTAACGGCTTGGTGACGGACAACAACACTTCCATGCTTCATGACAAAATA	1214
E A L S G N G L V T D N N T S M L H D K I	
TTAGACACCATCACCTCTAATAAGCCAGGGGTGGTACTTAGAGATGTGAATAAGAAATCTGATA	1278
L D T I T S N K P G V V L R D G N K K S D	
ATATAGTGGTTTGCTTTAAAAATGGCTTCCCAAACAAGAAGCATTCTTACTGCAGTTGACTAA	1342
N I V V C F K N G F P N K K H S L L Q L T K	
AAATGGAATATCAGTTGTGAGTTTGGATGAATTGACTGATGCTGGTATCCTCGTGGAGTCTACA	1406
N G I S V V S L D E L T D A G I L V E S T	
GGACAGATAGGGTTTCGTAGATCCCCGAAAGCTTTGGCAAATAAGCTCTCCTCCTTTAAGGGAC	1470
G P D R V R R S P K A L A N K L S S F K G	
GGAAAGTAACTCTTGATGTTGACAATATGTCAACGGAAGCGCTCATACAAAAGCTGTCAACTTT	1534
R K V T L D V D N M S T E A L I Q K L S T L	
<u>ATGACTAGCTTTTGATCATTACGACCGCCATCTGCAGCGGAACA</u>	1578

图 3 RDV 中国福建分离物 S7(cDNA)的核苷酸序列及推测编码蛋白的氨基酸序列
(划线部分为引物序列)

Fig.3 Nucleotide sequence of RDV Chinese Fujian isolate S7 (cDNA)and deduced amino acid sequence
(The sequence of PCR primers are underlined)

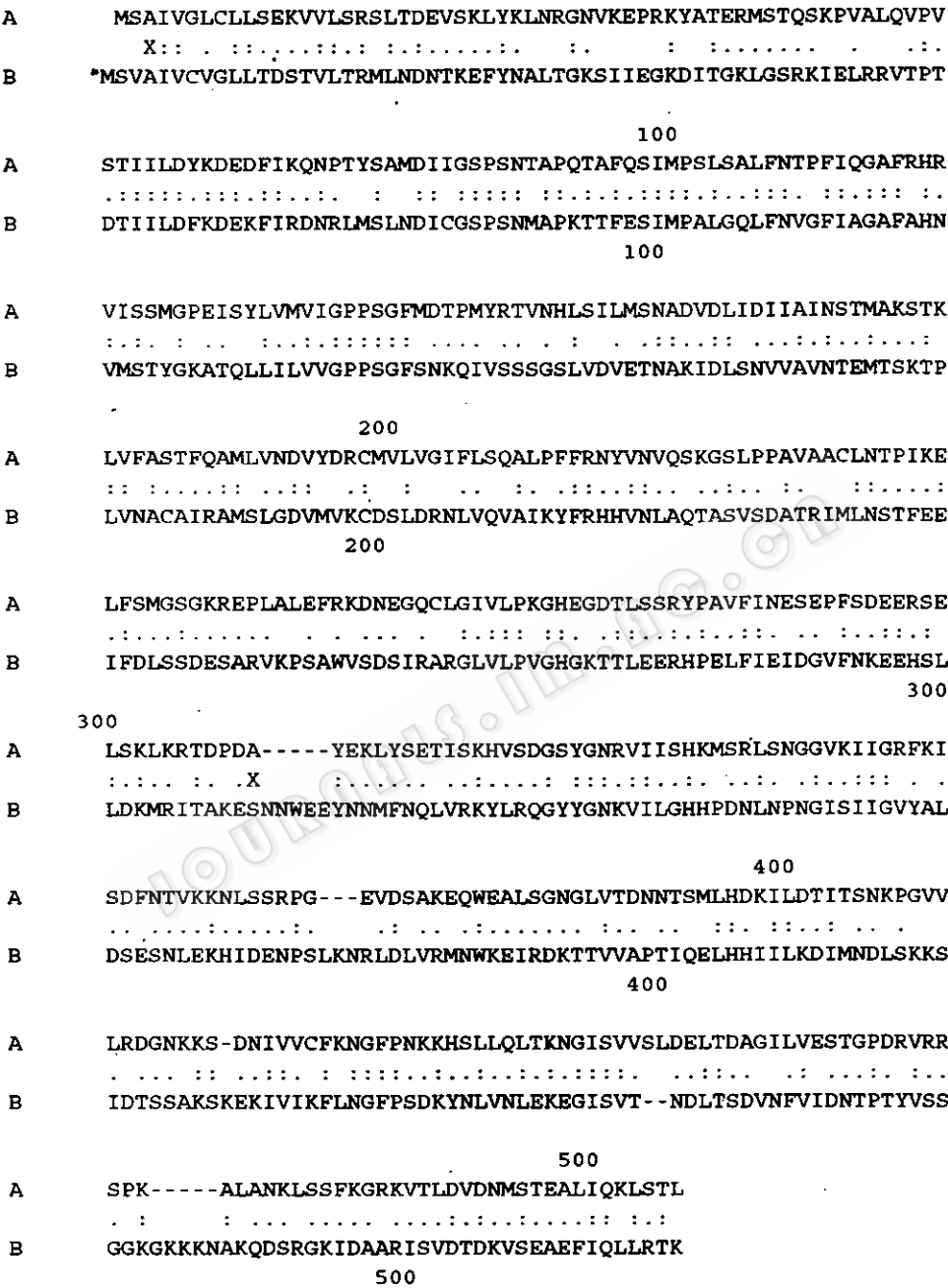


图 4 RDV 中国福建分离物 S7 编码的 56 000 蛋白(A)与 WTV S7 编码的 57 000 蛋白(B)的氨基酸序列同源性比较

Fig.4 Amino acid sequence similarity of 56 000 protein encoded by RDV Chinese Fujian isolate S7 (A)and 57 000 protein encoded by WTV S7(B)

2.2 扩增产物的克隆和序列分析

将 PCR 扩增产物平头插入到载体质粒 pBluescript SK (+) 的 EcoRV 位点中, 筛选得到多个重组质粒。利用基因内的酶切位点制备 4 个亚克隆, 对其进行 DNA 序列分析 (图 2)。RDV S7 序列测定结果表明, 克隆片段全长 1578bp, 含有一个 1518bp 长的开放阅读框架, 编码一个由 506 个氨基酸组成的蛋白, 理论分子量为 56 000 (图 3)。与 RDV

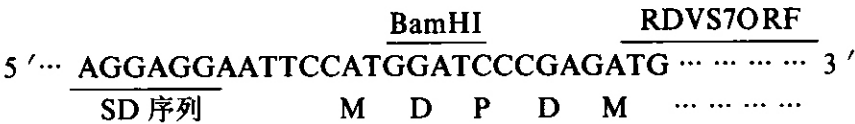


图 5 重组融合蛋白 N 端的非病毒氨基酸序列

Fig.5 N-terminal nonviral amino acid sequece of recombinant fusion protein

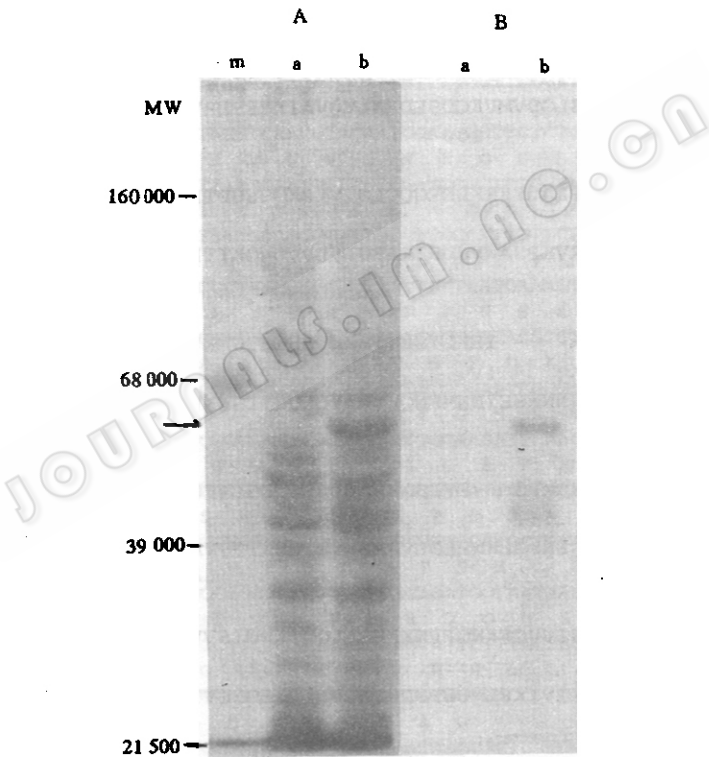


图 6 RDV S7 编码的 56 000 蛋白在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析 (A) 及 Western blotting 检测 (B)

(A 和 B 在同一块聚丙烯酰胺凝胶上, 但 B 的上样量是 A 的 1 / 30)

m. 标准分子量蛋白 (160 000, 68 000, 39 000, 21 500); a. 含有空载体 pBV221 大肠杆菌 DH5α, 42℃ 诱导 4h;

b. 含有重组质粒 pBVR7 大肠杆菌 DH5α, 42℃ 诱导 4h.

Fig.6 SDS-PAGE (A) and Western blotting analysis (B) of the RDV S7-coded 56000 Protein expression in *E. coli*. (A and B are on the same polyacrylamide gel, but only one thirtieth of samples were applied in B compared with A) m. molecular weight standard (160000, 68000, 39000, 21500); a. DH5α (pBV221) induced at 42℃ for 4h; b. DH5α (pBVR7) induced at 42℃ for 4h.

日本分离物基因组相应片段^[10]比较,核苷酸的同源率为 93.2%,推测编码蛋白的氨基酸的同源率为 94.1%。此片段编码的蛋白与同亚属的伤瘤病毒(Wound Tumor Virus,简称 WTV)基因组第七号片段编码的 57 000 蛋白^[23]有 32.3%的氨基酸同源率。同源部分主要集中在靠近 N-端的 aa61~aa141 区域,这个区域同源率为 59%(图 4)。在这段高度同源区中,RDV 中国福建分离物 S7 与日本分离物 S7 只有 2 个氨基酸的差异,即 aa68 和 aa120 位(中国福建分离物 S7 中分别为 Asp 和 Val,日本分离物 S7 中分别为 Asn 和 Ile),而 WTV S7 相应位置上的氨基酸与 RDV 中国福建分离物 S7 相同(图 4)。所以在这段同源区内,我们得到的同源率稍高于日本分离物的报道^[9]。

2.3 表达载体的构建和在大肠杆菌中的表达分析

将 RDV S7 基因从 BamHI 和 Sal I 位点克隆到原核表达载体 pBV221 中,构建成大肠杆菌高效表达载体 pBVR7。RDV S7 基因的起始密码子 ATG 与表达载体的起始密码子 ATG 在同一阅读框架内(图 5)。这样表达的蛋白是 N-端融合了 4 个非病毒氨基酸的重组蛋白。

含有重组表达载体 pBVR7 的大肠杆菌 DH5 α 经过 42℃ 热诱导,产生了对照(含有空载体 pBV221 的大肠杆菌 DH5 α)所没有的特异表达产物。在 SDS-PAGE 凝胶上可见明显的表达产物条带,测得分子量约为 57 000(图 6),与理论分子量 56 000 基本一致。薄层扫描结果表明,表达的重组蛋白占菌体可溶性总蛋白的 13.73%。Western blotting 检测结果也显示在硝酸纤维素膜上与 SDS-PAGE 凝胶上特异产物条带相应的位置上出现了特异的蛋白杂交带(图 6),说明 RDV S7 基因确实在大肠杆菌中成功地得到表达。

3 讨论

采用反转录-PCR 技术获取目的基因,简单快速而且特异性强。本文没有从 RDV 基因组中分离第七号双链 RNA 片段,而是直接以变性的病毒全基因组 RNA 为模板与特异性引物退火,合成 RDV S7 cDNA 第一链后采用 PCR 扩增。结果表明只要引物的特异性足够强,这种方法是行之有效的。同时在设计 PCR 引物时引入合适的酶切位点,为后来的定向克隆提供了方便。

伤瘤病毒(WTV)与 RDV 同属植物呼肠孤病毒属第一亚属,它们的基因组组成方式相同,氨基酸序列也有很高的同源性。WTV 和 RDV 的第七号片段(S7)都编码病毒核心蛋白,Nakashima 等在比较二者的氨基酸同源性时发现同源部分主要集中于靠近 N-端的区域(aa61~aa141)^[9]。本文实验结果除证实这一点外还指出在该区域中 RDV 中国福建分离物 S7 与 WTV S7 氨基酸同源率略高于 RDV 日本分离物与 WTV S7 之间的同源率,这进一步证实了该区域是高度保守的。我们推测这个区域可能是该蛋白的一个重要的功能区。

RDV S7 编码的蛋白已经被证实为病毒的小核心蛋白,但对它的功能了解很少,只是推测它可能参与病毒 RNA 的复制^[9],因此有必要得到大量的 RDV S7 基因表达物以研究其功能。迄今为止国内外尚未见用大肠杆菌表达系统高效表达 RDV 蛋白的报道。1994 年,Suzuki 等采用杆状病毒载体在家蚕细胞中成功地表达了 RDV 日本分离物的 S3 到 S11 以及部分的 S1 和 S2 编码的蛋白^[24]。Suzuki 等认为大肠杆菌表达系统不适用

于 RDV 蛋白的大量表达。我们曾尝试在 Trc 启动子调控下在大肠杆菌中以融合蛋白形式表达 RDV 的一些片段,但未能实现高效表达。以这种形式表达的 RDV S8 编码的外壳蛋白含量较低,仅能以 Western blotting 检测到表达产物的存在^[17]。本文选用表达载体 pBV221,成功地实现了 RDV S7 基因在大肠杆菌中的高效表达。

表达载体 pBV221 是 pBV220^[25]的衍生质粒,它包括 λ 噬菌体阻遏蛋白温度敏感性 CI_{ts}857 基因,串联的 P_RP_L 启动子,根据计算机设计人工合成的 SD 序列及多克隆位点,以及大肠杆菌 rrnB 核糖体基因转录终止信号 rrnBT₁T₂。SD 序列到起始密码子 ATG 之间距离为 6bp。由于 CI_{ts}857 基因产物在较低温度(30℃)下强烈抑制 P_RP_L 启动子下游基因的转录,所以这是一个控制严密的表达系统,尤其适合于表达对宿主细胞有毒害的蛋白。以上条件都为 RDV S7 基因产物在大肠杆菌中的大量合成提供了保证。本文实验结果表明,选用合适的表达载体可以实现 RDV 蛋白在大肠杆菌中的高效表达。本工作为进一步分离、纯化表达产物和分析其功能打下了良好基础。

我们已经将 RDV S7 cDNA 以正反两个方向克隆到水稻中间载体上,用这两个载体转化水稻,试图获得表达 RDV S7 编码蛋白及含有 RDV S7 反义 RNA 的两种基因工程水稻。目前已经利用抗生素筛选到阳性水稻植株,正在对这些植株进行各项检测和抗病毒试验。

参 考 文 献

- [1] Methews R E F. Classification and Nomenclature of Viruses. Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses, 1985.
- [2] Inoue H, Timmins P A. *Virology*, 1985, **147**: 214~216.
- [3] Kawano S. *J Fac Agric Hokkaido Univ*, 1984, **61**: 408~418.
- [4] Suzuki N, Sugawara M, Kasano T. *Virology*, 1992, **191**: 992~995.
- [5] Suzuki N, Tanimura M, Watanabe Y *et al.* *Virology*, 1992, **190**: 240~247.
- [6] Uyeda I, Sada N, Yamada N *et al.* *Intervirology*, 1994, **37**: 6~11.
- [7] Suzuki N, Tanimura M, Watanabe Y *et al.* *Virology*, 1990, **179**: 455~459.
- [8] Suzuki N, Watanabe Y, Kusano T *et al.* *Virology*, 1990, **179**: 446~454.
- [9] Nakashima K, Kakutani T, Minobe Y. *J Gen Virology*, 1990, **71**: 725~729.
- [10] Omura T, Ishikawa K, Hirano H *et al.* *J Gen Virol*, 1989, **70**: 2759~2764.
- [11] Uyeda I, Kudo H, Takahashi T *et al.* *J Gen Virol*, 1989, **70**: 1297~1300.
- [12] Omura T, Ishikawa K, Hirano H *et al.* *J Gen Virology*, 1988, **69**: 227~231.
- [13] Suzuki N, Harada M, Kusano T. *J Gen Virology*, 1991, **72**: 2233~2238.
- [14] 刘进元,余荔华. 生物工程进展, 1994, **14**: 31~34.
- [15] 李 玮,李 毅,陈章良,等. 应用基础与工程学报, 1994, **2**: 1~8.
- [16] 刘一飞,李 毅,陈章良,等. 病毒学报, 1994, **10**: 246~250.
- [17] 李 玮,李 毅,陈章良,等. 病毒学报, 1995, **11**: 56~62.
- [18] 储瑞银,张 旭,陈章良,等. 植物学报, 1993, **35**: 115~120.
- [19] 李 毅,刘一飞,陈章良,等. 病毒学报, 1994, **10**: 339~345.
- [20] 曲 林,李 毅,陈章良,等. 病毒学报, 1995, **11**: 270~274.
- [21] 高 谦,欧阳新,陈章良,等. 植物学报, 1990, **32**: 13~18.
- [22] Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: USA Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [23] Anzola J V, Xu Z, Nuss D L. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**: 3300.
- [24] Suzuki N, Sugawara M, Kusano T *et al.* *Virology*, 1994, **202**: 41~48.

[25] 张智清, 姚立红, 侯云德. 病毒学报, 1990, 6: 111~116.

SEQUENCE ANALYSIS AND EXPRESSION IN *E. COLI* OF SEGMENT 7 OF RICE DWARF VIRUS GENOME*

Qu Lin¹ Li Yi^{1,3,*} Quan Sheng¹ Ding Shiyu¹

Suzuki N² Chen Zhangliang^{1,3}

(1 *The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences,*

Peking University, Beijing 100871)

(2 *Laboratory of Plant Genetic Engineering, Biotechnology Institute, Akita Prefectural College of Agriculture,*

Ohgata, Akita 010-04, Japan)

(3 *De Montfort University, The Gateway Leicester, LE1 9BM, UK*)

Abstract The cDNA of segment 7 (S7) of Rice Dwarf Virus (RDV) genome of Chinese Fujian isolate was synthesized and amplified by RT-PCR. The PCR product was cloned into pBluescript SK (+) and sequenced. The cloned segment is 1578bp in length, contains an single open reading frame with relative molecular weight of 56 000. Comparison of nucleotide and amino acid sequence between this segment and that of RDV genome of Japanese isolate showed 93.2% and 94.1% homology, respectively. The RDV S7 coded 56 000 protein has high amino acid identity in the region near N-termini (aa61-aa141) to the 57 000 protein encoded by segment 7 of the Wound Tumor Virus (WTV) genome. The RDV S7 cDNA was cloned and highly expressed in pBV221 in *E. coli*. The expressed recombinant RDV S7 - coded protein accounted for 13.73% of the total soluble cell proteins and further analyzed by Western blotting.

Key words Rice Dwarf Virus, Segment 7, Sequence analysis, Expression, Minor core protein

* This work was supported by 863 grants (863-101) of National Science and Technology Committee and National Science Foundation of China (39400026).

* * To whom correspondence should be addressed.