

水稻矮缩病毒小外壳蛋白基因的合成、  
克隆和序列分析

叶寅 赵丰 高炬· 田波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

S435.111.4  
S432.41

## 提 要

从感染水稻矮缩病毒(RDV)的水稻叶片中分离纯化了RDV。用人工合成的寡核苷酸为引物,合成了长度为1.0kb的小外壳蛋白基因。经PCR扩增后,克隆至pUC-19载体上。以双脱氧链终止法测序得到其全长序列,同已发表的RDV日本分离物小外壳蛋白基因序列相比有很高的同源性。

关键词: 水稻矮缩病毒 小外壳蛋白基因 PCR 序列分析

水稻矮缩病毒(Rice Dwarf Virus, RDV)为双链球形病毒<sup>[1]</sup>,是我国水稻产区流行的水稻矮缩病病原。近年来随着分子生物学的发展,利用病毒外壳蛋白基因作为抗病基因的手段之一已得到广泛认同,RDV的外膜包括大、小两种外壳蛋白,分别由基因组中12个dsRNA片段的第八片段和第九片段编码。本文继本实验室获得RDV第十片段cDNA克隆<sup>[2]</sup>大外壳蛋白基因克隆<sup>[3]</sup>的工作后,报道RDV小外壳蛋白基因的合成、克隆及序列分析的结果。

## 材 料 与 方 法

**一、病毒核酸的提纯** 感染RDV的水稻材料由浙江农科院病毒研究室提供。病叶加磷酸缓冲液(pH7.2)匀浆、尼龙沙布过滤后,滤液加等体积四氯化碳混摇,2分钟后离心(8000r/m×15min),上清加入PEG-6000至终浓6%,混匀并静置4小时,离心(7500r/m×20min)沉淀病毒颗粒,沉淀悬于磷酸缓冲液中,加入2%Triton X-100,搅拌1小时后高速离心(10000r/m×10min),上清加到20%蔗糖垫上,25000r/m离心1小时后,沉淀悬浮于10mmol/L Tris·Cl pH8.0中,得到纯化病毒。用ProteinaseK-酚法,提纯病毒核酸。病毒溶液加入保温缓冲液(200μg/ml proteinase K(以25mmol/L Tris-Cl, pH7.6配制), 100mmol/L NaCl, 7.5mmol/L EDTA, 2.5% SDS)于37℃保温30分钟后,酚抽提2次,氯仿-异戊醇(24:1)抽提一次,无水乙醇沉淀,抽干备用<sup>[4]</sup>。

**二、引物的合成和纯化** 根据Uyeda等(1989)<sup>[4]</sup>资料,合成了RDV小外壳蛋白全长基因

本文于1991年7月14日收到,1991年9月14日修回

\* 中国医学科学院药物研究所

的两个引物: 3'引物(与编码链之3'端序列互补), 5'-TCAGACTGAGGGTGGAGTC-3'; 5'-引物(编码链5'端序列), 5'-ATGGGTAAGCTCCAAGATGG-3', 引物使用前需磷酸化。

**三、cDNA的合成及PCR扩增** 5 $\mu$ g病毒 dsRNA, 100 $^{\circ}$ C煮沸3分钟后立即置冰浴以变性 dsRNA。加入引物及反转录酶合成cDNA第一链<sup>[11]</sup>, 产物经PCR 30个循环(promega程序), 3'、5'引物各为1pmol, 每一循环包括95 $^{\circ}$ C变性30秒钟, 55 $^{\circ}$ C复性1分钟, 72 $^{\circ}$ C延伸2分钟, 反应结束后, 以1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段并以低熔点胶回收。

**四、cDNA克隆与重组克隆的筛选** 克隆载体pUC-19以SmaI酶切成平端。与双链cDNA连接及转化E.coli DH5(参照我们以前的程序<sup>[5]</sup>)挑选白色克隆, 煮沸法少量提取质粒, 限制性内切酶酶切, 电泳检测筛选插入片段为1.0kb的重组子。

**五、cDNA序列分析** 克隆质粒用HindIII酶切后得到长度约为0.42kb和0.58kb的两个片段, 分别亚克隆至pUC-19载体上, 以双脱氧核苷酸链终止法, 直接用双链DNA测定其cDNA序列, 质粒DNA(2-3 $\mu$ g)在0.2mol/L NaOH溶液中65 $^{\circ}$ C变性5分钟, 加入NaOAc(pH5.2)中和并乙醇沉淀, 模板和引物(正向引物和反向引物)一起退火后, 按T7序列试剂盒(Pharmacia)提供的程序测序。

## 结果与讨论

### 一、cDNA合成及PCR扩增

合成cDNA经PCR扩增后, 电泳检测PCR扩增片段长度为1.0kb(见图1)。

### 二、cDNA克隆

回收PCR扩增产物, 将其克隆到pUC19上, 插入cDNA的克隆片段用HindIII酶切, 得到0.42kb和0.58kb两个片段(图2)。表明cDNA上有两个HindIII酶切位点。分别回收以上两个片段并亚克隆到pUC19上。

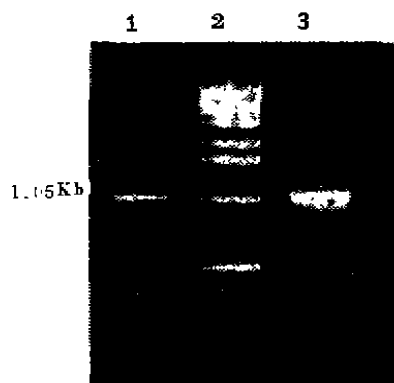


图1 cDNA经PCR扩增后1.2%琼脂糖凝胶电泳结果  
1,3: 两次cDNA扩增样品;  
2: 分子量标准(1kb DNA Ladder, BRL)

Fig.1 1.2% Agarose gel electrophoresis of cDNA of the minor capsid gene in RDV after PCR amplification. 1, 3: cDNA sample of two separated viral RNA isolation, 2: molecular weight marker (1kb DNA ladder BRL)

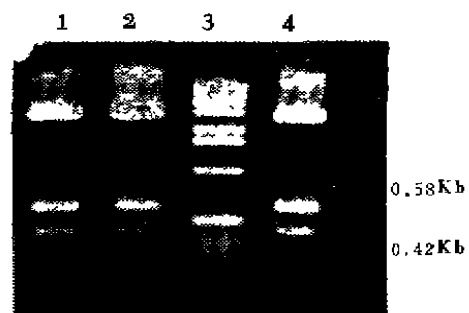


图2 重组克隆经HindIII酶切后1.2%琼脂糖凝胶电泳结果  
3, 分子量标准(同上)

Fig.2 1.2% agarose gel electrophoresis of digested cDNA with HindIII from selected clones, 3, molecular weight marker(as above).

三、RDV小外壳蛋白基因全序列的测定

以双脱氧链止法直接进行质粒 DNA 的双向序列分析以确定亚克隆插入片断的序列而获得 RDV 小外壳蛋白的全长序列 (见图 3)。其基因由 1056 个核苷酸组成, 由此推测编码 351 个氨基酸。与已报道的 RDV 日本分离物小外壳蛋白序列相比, 两者的核苷酸序列的同源率为 94%, 而由核苷酸序列推测出的氨基酸序列的同源率为 95%。

```

5'-ATGGGTAGCTCCAAGATGGAAAGGACATTAAGGGGATCAAGGACGGGATTACCAGCTTTCAAGATTACAAGCTTGGTAAGCTGGACAGGGGGGCTCAATGGCCATCAACACATTGGAT 1-120
M G K L Q D G I A I K H I N D A I T T F K H Y K L G E L E Q G G S H A I N T L S

AAGTGGGGGGCCAGTTGGGCTGGCTTGGCCAGCCATCTGGGAAATGGTTAATACAGACTTCATCCATCTTGGGTTTATGAAGTTATGATGATGATTTGCTACTACTGGAAAGTT 121-240
N Y H A N V G L A W P A I L W N C L I N T S S E L G F K K F N I D I A T Y W E Y

GGTCTTTGACTCTCTGCTGAGCGTCGGTGTAGAGATCTTCACTGACGTTGATTTGATTATATACTAAGAGCTGCTTACATTTGGCTCTTAAGACAAAGATTTCGCAATTGCA 241-360
G A F T L L G S V G D E D P F T D V D L I Y Y K T C L L L G L K D N D F L Q F F

GAGGATTTGCTTATGAGGGGAAATGCTTTCTGGAGGGGCACTGGATGAATGCTAGGGTGGACATGCTCACTGGTGTCCACAAATATTGAAGACAATAGGTTTTCAGGATGCAATCTATA 361-480
E E F A Y E A N S P L E A Q S N H A R V D N L Y G V B N I E D K Y V F R H Q S I

TCTAAGTTTCTGAAGCTTACTATACTGCTTCAGAGAGGCTTCTTATTGACCAGATTTATAAAGCCTGATGACTCCAAAGGAGTCAATCTTGAAGTGGGAACTGCTGAAAGCTCAGTC 481-600
S K F L K A T T Y A S E D Y A Y L Y G P I K P D D S K E S I L S A E L L K A Q V

ACATCGAGGTGCTAGGGCTGGCCAGTTGATCAACCACAAAATTCAGAGTACATTAATTGTAAGGATTTGGGAGTACGGCAATTTGGGGAGGGGCTTGGCTTACACTCAGGAT 601-720
Y S E V L R V R N L I Y T K I Q K T I N L T E C S Q L P F R F H A A L S Y T Q D

TGGATTTGATGGGGGGTGGGGGCTGCAGCTTGGGAGGCTGACACACTGATGATGAAATGGGTCAGTAAAGCTGGGCTGAGCACACCAAGTGAAGTAAAGGTTTGGATGAGCCA 721-840
Y D V D G G Y P A A L P Q P D T T D D E S P V T K P G F S T P Y V S K G Y D E F

GAGGAGGGGAGATGATAGGTAGAAAGGGAGGACTTGGAAAGATCTCATCTAAGGAGTTTCTCTGGGAAATGTAAGGGGAGAGGCTTACTGCTTCTTTGGAGGATGATAGAT 841-960
E D E E I I N K Y D T S K D A P S K A V S S G H V Y T P T G I P A F L E D D S

GAGATGCAATGCTGAGGGGCTTGCATGATTACTTAAGGAGGGAAATGAGAGCAACTTGCAGCTGTCAGTGGGACTGCCAGGCTCAGTCTGA 961-1056
E N D A P D C F N D Y I T R E Y E N H F D L S Q L G L A P S V ***
    
```

图3 RDV小外壳蛋白基因的DNA序列及由此而推测的氨基酸序列  
 Fig. 3 Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of RDV genome segment 9 (the minor capsid protein gene)

## 参 考 文 献

- [1] Fujh-Kawate, I, et al., 1970, *J Mol Biol*, 51: 247—253.  
[2] 邓大纶等, 1991微生物学报, 印刷中。  
[3] 叶寅等, 1991, 微生物学报(印刷中)。  
[4] Uyeda, I, et al. 1989, *J Gen Virol*, 70: 1267—1300.  
[5] 叶寅等, 1991, 科学通报, 17。

## The cDNA Cloning and Nucleotide Sequence of the Minor Capsid Gene of Rice Dwarf Virus

Ye Yin et al

(*Beijing Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Rice Dwarf Virus was isolated and purified from infected rice leaves. The cDNA of the minor capsid gene was synthesized with synthetic oligonucleotides as primers and amplified by PCR. The cDNA sequence of the minor capsid gene was determined and has high homology to that of Japanese isolate.

**Key words,** Rice Dwarf Virus    Minor capsid gene    PCR  
Sequence