维普资讯 http://www.cqvip.com

164-169 15973(12)

第11卷第2期 中国病毒学 Vol.11 No.2
1996年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1996

抗水稻矮缩病毒的反义核酶及复制酶部分序列的合成、克隆及其水稻表达载体的构建

王苏燕 盛 刚 刘伟平 叶 寅 田 波

(中国科学院微生物研究所、北京 100080)

S432.4

A

提要 采用反转录-聚合酶链式反应方法(RT-PCR),在人工合成的引物引导下,扩增出水稻矮缩病毒基因组第一片段(S1)全长序列及第五片段的部分序列(S5Ⅲ),将扩增的片段分别克隆到克隆载体 pGEM7Zf(+)及 pUC19 的 SmaI 位点上,并进行了序列测定。在此基础上,利用 PCR 引入的方法将核酶序列引入到 S5Ⅲ片段反义链上以构成反义核酶基因 S5ⅢR,将 S1 片段 5′端部分序列(S1-1)及 S5ⅢR 基因克隆到植物表达载体 pROKⅡ上,构建成水稻转化载体 pROK-S1-1′及 pROK-S5ⅢR。

关键词 水稻矮缩病毒,反义核酶基因,复制酶基因,水稻表达载体 植物病毒

水稻矮缩病毒(Rice dwarf virus, RDV)普遍分布于我国南方稻区,在日本、朝鲜等地也是一种主要的病原。RDV 属于植物呼肠孤病毒属,其基因组由 12 个 dsRNA 片段组成,目前已全部定序。其中,推测 RNA1 可能编码病毒复制酶;RNA2,5 编码外层外壳蛋白,另有资料也认为 RNA5 编码产物参与了病毒的复制;RNA8,9 编码内层外壳蛋白;RNA7 编码核心蛋白;RNA4,6,10,11,12 编码非结构蛋白[1-11]。

抗病毒植物基因工程的发展为病毒病害的防治提供了一种新手段。目前应用较为普遍的策略有外壳蛋白基因、卫星 RNA、复制酶部分序列及核酶等,以上这些策略在双子叶植物抗病基因工程中进行了较为广泛的研究,转基因工程植株可获得程度不同的抗病性[12]。本研究将 RDV 中推测与复制酶基因有关的部分序列(S1-1)构建到植物表达载体 pROKⅡ上;另外我们又以 S5 部分序列(S5Ⅲ片段)作为核酶作用的底物分子,用 PCR 方法,将锤头型核酶序列引入 S5 片段中,由此构建成反义核酶基因,将构建好的反义核酶序列克隆到植物表达载体 pROKⅡ中构建成水稻转化载体。

材料与方法

1 材料

1.1 病毒样品 感病的水稻病叶由浙江省农科院病毒室陈声祥教授提供,-70℃保存。

1.2 菌株及有关质粒 大肠杆菌 *E. coli* 5α, MC1022,植物表达载体 pROKⅡ均为本实验室提供;克隆载体 pUC19, pGEM7Zf(+)购自华美公司。

1.3 分子生物学试剂 cDNA 合成试剂盒,4×dNTP 购自 Boehringer Mannheim 公司,Taq DNA 聚合酶,限制性内切酶,修饰酶等购自 Promega 公司,T7 DNA 聚合酶序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司,同位素 α-^{35}S-

本文于 1995 年 11 月 19 日收到,1996 年 1 月 29 日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

dATP, α-^{32}P-dCTP 为美国 Dupont 公司产品, PCR 引物由本所技术室合成。

2 方法

2.1 病毒的分离和病毒 RNA 的纯化 病毒的分离参照我们以前的方法[13], 将水稻病叶加磷酸缓冲液(0.1 mol/L Na_2HPO_4, pH 7.2), 匀浆后用四层纱布过滤, 滤液加四氯化碳抽提, PEG-6000 沉淀, 差速和蔗糖梯度超速离心后, 以 10 mmol/L Tris-Cl(pH8.0)悬浮纯化病毒, 4 ℃ 保存, 提纯的病毒加蛋白酶 K, 37 ℃ 保温 30 min 后, 分别用酚, 酚:氯仿, 氯仿各抽提 1 次, 无水乙醇沉淀病毒 RNA, 抽干备用。

2.2 病毒 cDNA 的合成及 PCR 扩增 引物经磷酸化处理后即可用于 cDNA 的合成和 PCR 扩增 。取适量的病毒总 RNA, 经煮沸变性后加入适当的引物及反转录酶合成第一链 cDNA。其反应条件为 RDV RNA 2 μg, 50 mmol/L Tris-Cl(pH 8.3), 75 mmol/L KCl, 10 mmol/L DTT, 3 mmol/L $MgCl_2$, 500 μmmol/L dNTPs, 100 ng 引物, 500 单位 MMLV-RTase, 总体积为 20 μl, 37 ℃ 保温 1 h。为扩增 cDNA, 取 5 μl 第一链 cDNA 产物经过 30 个 PCR 循环, 加入引物各 10 pmol/L。每一循环包括 94 ℃ 变性 1 min, 54 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物并以低熔点胶回收扩增片段。

2.3 PRC 产物的克隆及序列分析 克隆载体 pUC19, pGEM7Zf(+)以 SmaI 切成平端, 载体与扩增产物的连接、转化参照我们以前的方法[14]。挑选白色克隆小量碱法提取质粒, 经电泳及适当的限制性内切酶酶切, 筛选鉴定重组克隆, 随后以煮沸法提取质粒, 以 T7 DNA 聚合酶序列分析试剂盒直接进行序列分析[15]。

2.4 反义核酶序列的引入 利用 PCR 引入法将具有锤头状核酶序列引入 S5Ⅲ反义链的方法见图 1。

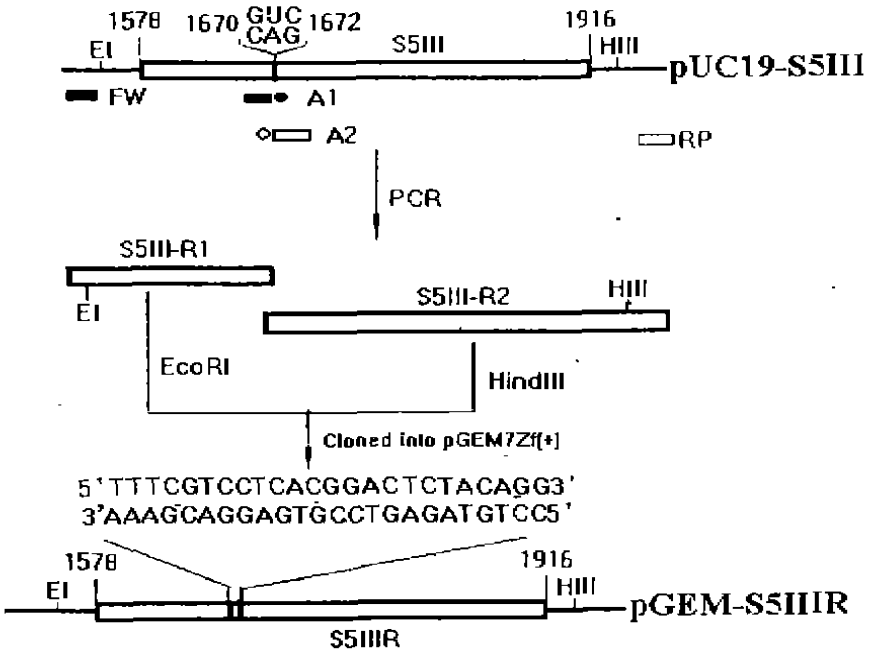

图 1 S5Ⅲ反义核酶序列的引入。FW, M13/pUC 通用引物; RP, pUC 反相引物。EI, EcoRI; HⅢ, HindⅢ; 所示序列为核酶保守序列。

Fig.1 Insertion of ribozyme sequence into S5Ⅲ fragment. FW, M13/pUC universal forward primer; RP, pUC reverse primer, EI, EcoRⅠ, HⅢ, HindⅢ.

维普资讯 http://www.cqvip.com

选择S5Ⅲ第1670～1672 nt处的GUC位点作为靶位点，设计覆盖全长核酶序列的两个引物：A1：5′-GTGAGGACGAAACGTCCCGTTGGATTCGAAAAGG-3′（与M13/pUC通用正向引物配合引导合成包含核酶5′端部分序列S5Ⅲ-R1）；A2：5′-GGTCTCATCAGGTTGGAGAGACTATGGATATAG-3′（与pUC反向引物配合引导合成包含核酶3′端部分序列的片段S5Ⅲ-R2）。在A1与M13/pUC通用正向引物以及A2与pUC反向引物引导下，PCR合成S5Ⅲ-R1，S5Ⅲ-R2。将S5Ⅲ-R1，S5Ⅲ-R2分别用EcoRⅠ和HindⅢ酶解后，以低熔点琼脂糖凝胶电泳回收并克隆到pGEM7Zf(+)上，筛选得到重组克隆pGEM-S5ⅢR，进行序列分析。

2.5 含反义核酶基因及复制酶基因的水稻表达载体的构建 将目的基因以适当内切酶消解后，以低熔点琼脂糖凝胶回收，与pROKⅡ载体连接，转化MC1022感受态细胞，筛选重组克隆。

结果与讨论

1 RDV S1片段的克隆

RDV S1全长片段合成及克隆策略见图2。根据已发表的日本株系RDV S1全序列[1]。

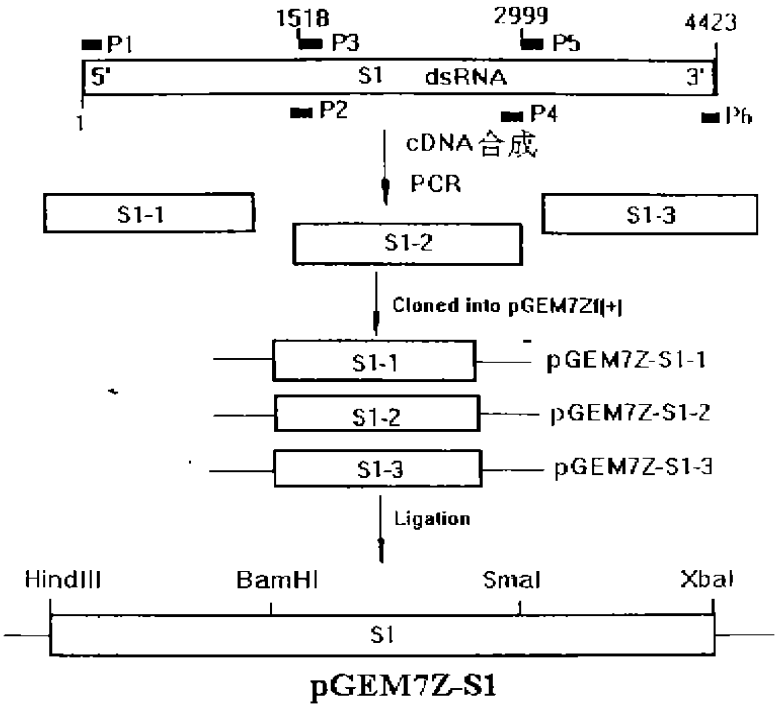

图2 覆盖全长S1序列，cDNA克隆策略

Fig.2 Strategy for cloning of full size S1 segment

合成了三对引物：P1，5′-AGGTCGACGTGCCTGGACTTGATTCGTC-3′；P2，5′-TCTGGATCCGCCCCAGAT-3′（P1和P2扩增出S1第1～1518 nt片段，S1-1）。P3，5′-ATCTGGGGCGGATCCAGA-3′；P4，5′-GGGTGGCGGATAGTATTTCA-3′（P3，P4扩增出S1第1519～2999 nt片段，S1-2）。P5，5′-ACCTCAGTAATTGCTCCA-3′；P6，5′-CTAGATCTGATCG-

维普资讯 http://www.cqvip.com

GCTGATTAACCTAT-3′(P5,P6 扩增出 S1 第 3000～4423 nt 片段,S1-3)。以纯化的 RDV 总 RNA 为模板,在 P1,P6 引物的引导下,经反转录合成 cDNA 第一链,以此作模板,分别在三对引物的引导下经 PCR 扩增出特异的 S1-1,S1-2 和 S1-3 片段。PCR 扩增结果见图 3。将 PCR 产物克隆于 pGEM7Zf(+)载体上,得重组克隆 pGEM7Z-S1-1,pGEM7Z-S1-2,pGEM7Z-S1-3。重组克隆酶切图谱见图 4,5。

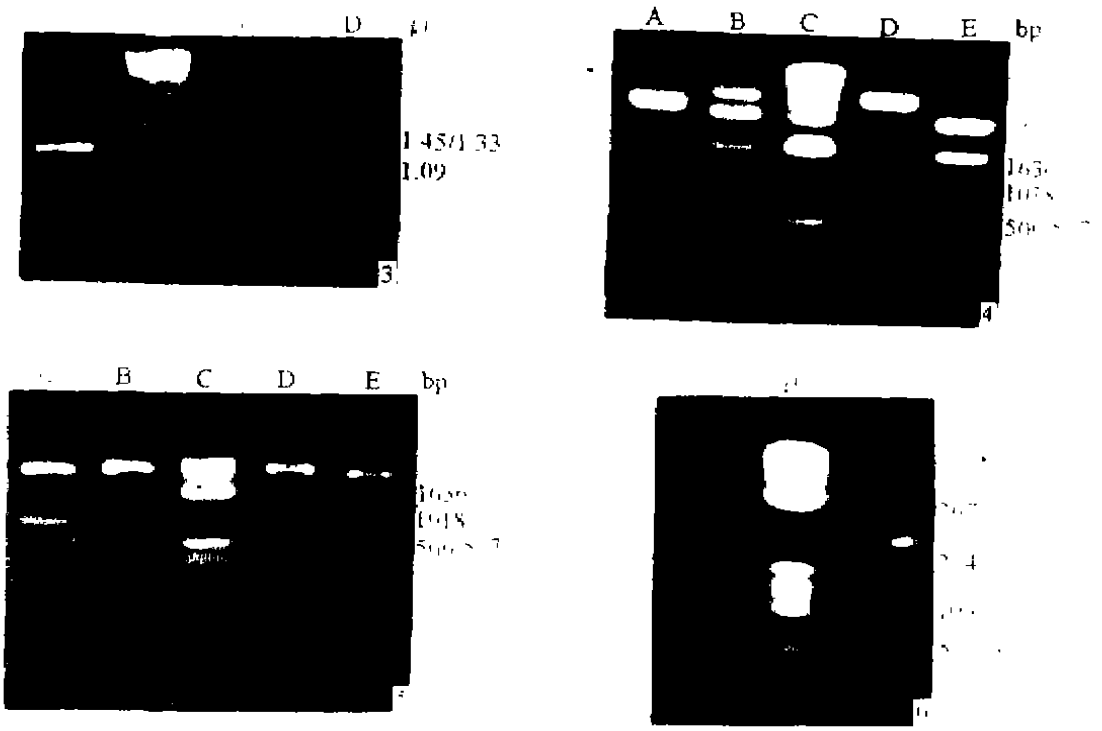

图 3 SI-I,SI-2,S1-3 PCR 产物电泳图谱

Fig 3 Electrophoresis analysis of PCR products(SI-I,SI-2,SI-3). A, SI-3;B, SI-2;C, SI-I;B. Marker:SppI-EcoRI

图 4 pGEM7Z-SI-1,pGEM7Z-SI-2 酶切图谱分析

Fig.4 Restriction analysis of pGEM7Z-SI-I and pGEM7Z-SI-2. A, pGEM&Z-SI-1;EcoRI;B, pGEM&Z-SI-1;BamHI;C, pGEM&Z-S1-2;EcoRI; C, Marker:Ikb ladder;E, pGEM7Z-SI-2;HindⅢ + XbaI

图 5 pGEM7Z-SI-3 酶切图谱分析

Fig.5 Restriction analysis of pGEM7Z-SI-3.

A, KpnI;B, HindⅢ;C, Marker:Ikb ladder;D:EcoRI + SacI;E, BamHI

图 6 S5Ⅲ-R1,S5Ⅲ-R2 PCR 产物电泳图谱

Fig.6 Electrophoresis analysis of PCR products: S5Ⅲ-RI and S5Ⅲ-R2. A, S5Ⅲ-RI;B, S5Ⅲ-R2;B, Marker:pBR322/-HaeⅢ

2 S5 部分序列扩增、克隆和序列分析

根据已发表的日本株系 RDV S5 序列,人工合成一对引物:P1,5′-TCGGCTGGCTTAT-GCTAA-3′(与 S5 片段 5′端 1578～1598 nt 序列相同),P2,5′-GCGTATTAGAGTGGTGAA-3′(与 S5 片段 5′端 1899～1916 nt 序列互补)。以 RDV 总 RNA 为模板,在引物 P1,P2 引导下,经 PCR 扩增出特异的 S5Ⅲ片段,片段大小为 338 bp,位于 S5 距 5′端 1578～1916 nt 的部分序

维普资讯 http://www.cqvip.com

列。将 PCR 产物克隆于 pUC19 的 SmaI 位点上，获得重组质粒 pUC19-S5Ⅲ，序列分析鉴定所获得的 S5Ⅲ片段。

3 反义核酶序列的引入及表达载体的构建

选择 S5Ⅲ片段中位于 1670～1672 nt 处的 GUC 位点作为锤头型核酶特异切割靶分子的识别位点，按图 1 所示的步骤以 pUC19-S5Ⅲ为模板扩增出含核酶序列的 S5Ⅲ-R1，S5Ⅲ-R2 两片段，PCR 扩增产物见图 6，将 S5Ⅲ-R1，S5Ⅲ-R2 分别用 EcoRI，HindⅢ酶解后克隆到载体 pGEM7Zf(+)上，筛选得到重组克隆 pGEM-S5ⅢR。经序列分析验证，核酶序列已引入到 S5Ⅲ片段中。由于此法扩增得到的含核酶序列的基因，在核酶活性保守区两边与靶分子配对的侧翼序列很长，5′端为 90 nt，3′端为 248 nt，这一长的互补序列同时又起到反义 RNA 的作用，因此，引入了核酶序列的基因被称为反义核酶基因。将该重组序列克隆用 XbaⅠ和 SacⅠ酶切后补平，与 pROKⅡ(SmaI)连接、转化、筛选得到重组克隆 pROKⅡ-S5ⅢR，这里，S5ⅢR 的插入方向与 pROKⅡ上的 35S 启动子的转录方向相反(图 7A)。

4 RDV 复制酶部分序列的表达载体的构建

将 pGEM-S1-1 进行序列分析确证后，合成一个含终止密码子引物 P2′，P2′除含一终止密码子外，其他与 P2 引物相同：5′-TCTGGATCCGCCCCAGATTAGAT-3′。利用 P1 和 P2′扩增出与 S1-1 相同大小的片段 S1-1′(含终止密码子)。将 S1-1 克隆于 pGEM7Zf(+)上，序列分析后将 S1-1′克隆到植物表达载体 pROKⅡ上，得到重组克隆 pROKⅡ-S1-1′(图 7B)。

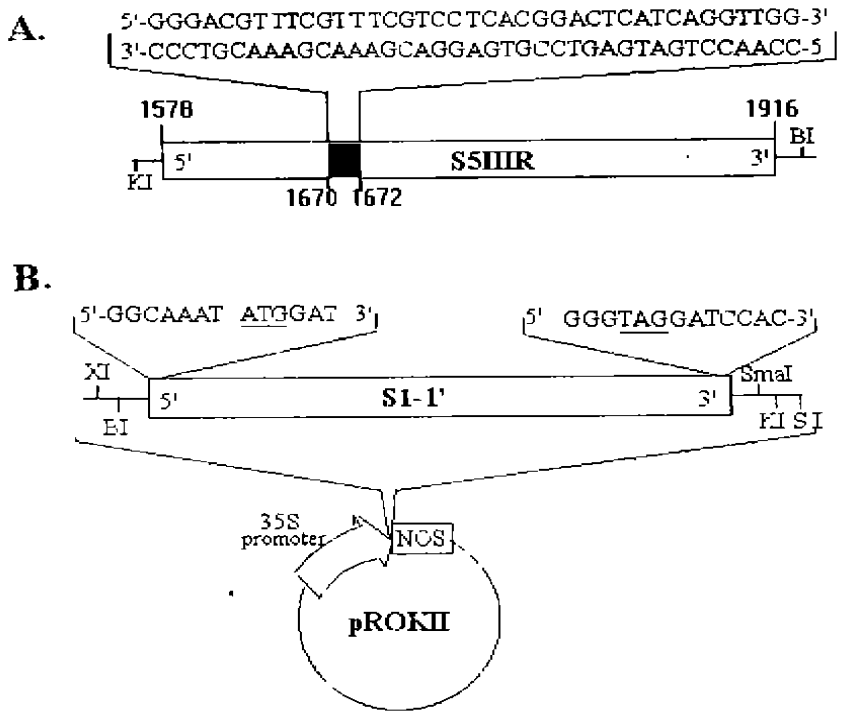

图 7 植物表达载体 pROKⅡ-S5ⅢR(A)和 pROKⅡ-S1-1′(B)

Fig.7 Plant expression vectors pROKⅡ-S5ⅢR(A) and pROKⅡ-S1-1′(B)

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 Suzuki N, Tanimura M, Watanabe Y, *et al*. Molecular analysis of rice dwarf phytoreovirus segment 1: Interviral homology of the putative RNA dependent RNA polymerase between plant-and-animal-infecting reoviruses. Virology, 1992;190:240～247.

2 Uyeda I, Kudo H, Takahashi T, *et al*. Nucleotide sequence of rice dwarf phytoreovirus genome segment 2: Completion of sequence analysis of rice dwarf virus. Intervirology, 1994;37:6～11.

3 Suzuki N, WatanabeY, Kusano T, *et al*. Sequence analysis of rice dwarf phytoreovirus segmen S3 transcript encoding for the major structural core protien of 114kDa. Virology, 1990;179:455～459.

4 Suzuki N, Watanabe Y, KusanoT, *et al*. Sequence analysis of rice dwarf phytoreovirus segment S4, S5 and S6: comparison with the equivalent wound tumor virus segment. Virology, 1990;179:446～454

5 Nakashima K, Kakutani T, Minobe Y. Sequence analysis and product assignment of segment 7 of the rice dwarf virus genome. J Gen Virol, 1990;71:725～729

6 Omura T, Ishikawa K, Hirano H, *et al*. The outer capsid protein of rice dwarf virus encoded by genome segment S8. J Gen Virol, 1989;70:2759～2764

7 Uyeda T, Kudo H, Takahashi T, *et al*. Nucleotide sequence of rice dwarf virus genome segment 9. J Gen Virol, 1989;70:1297～1300

8 Omura T, Minobe Y Tsuchizaki T, Nucleotide sequence of segment S10 of the rice dwarf virus genome. J Gen Virol, 1988;69:227-231

9 Suzuki N, Harada M, Kusano T. Molecular analysis of rice dwarf phytoreovirus segment S11 corresponding to wound tumor phytoreovirus segment 12. J Gen Virol, 1991;72:2233～2237

10 Suzuki N, Sugawara M, Kusano T. Rice dwarf phytoreovirus segment S12 transcript is tricistronic *in vitro*. Virology, 1992;191:992～995

11 Suzuki N, Watanabe Y, Kusano T, *et al*. Nuclotide sequence of rice dwarf virus Segment 5. Nucleic Acid Res, 1989;17(21～22):8858

12 Wilson T M A. Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. Proc Natl Acad Sci USA, 1993;90:3134～3141

13 叶寅,楼黎明,赵丰,等.水稻矮缩病毒大外膜蛋白基因的合成、克隆和序列分析.微生物学报,1992;32(1):72～74

14 叶寅,徐雷新,田波.一个黄瓜花叶病毒强株系的外壳蛋白基因的合成,克隆,序列分析和表达,科学通报,1991;36(17)1340～1344

15 Yie Y, Wei Z Y, Tien P. A simplified and reliable protocol for plasmid DNA sequencing: fast miniprep and denaturation. Nucleic Acid Res, 1993;21(2):361

Construction of Rice Expression Vectors Including Antisense Ribozyme and Partial Sequence of Replicase from Rice Dwarf Virus

Wang Suyan Sheng Gang Liu Weiping Yie Yin Tine Po

(*Institute of Microbiology, CAS, Beijing* 100080)

The whole sequence of RDV S1 fragment and partial sequence(S5Ⅲ) of RDV S5 fragment were synthesized and amplified by the method of reversed transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Each amplified product was then cloned into pGEM7Zf(+)or pUC19 at the SmaI site, and sequenced. Based on these results, a hammer-head ribozyme sequence was introduced into antisense chain of S5Ⅲ fragment to construct antisense ribozyme gene S5ⅢR. Rice transformation vector pROK-S1-1′ and pROK-S5ⅢR were constructed by inserting S5ⅢR gene and 5′-end sequence of S1 fragment(S1-1′) into plant expression vector pROKⅡ.

Key words RDV, Anti-sense ribozyme, Replicase gene, Rice expression vector