155—161 212346(6)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第12卷第2期 中国病毒学 Vol.12 No.2
1997年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1997

小麦丛矮病毒(WRSV)的近全长cDNA基因文库的构建*

沈加丽 龚祖埙

(中国科学院上海生物化学研究所,上海 200031)

S432.41

提 要 用大肠杆菌Poly(A)聚合酶,在纯化的小麦丛矮病毒的单链基因组RNA3′末端加多聚腺苷酸,以此RNA作模板,12-18寡聚脱氧胸核苷酸作引物,合成cNDA后,分别用限制性内切酶PstⅠ和EcoRⅠ对该cDNA酶切,同时再分别用PstⅠ单酶和SmaⅠ与EcoRⅠ双酶对pUC载体酶切,经连接、转化感受态细胞、筛选和酶切鉴定后,共得到10种不同大小的非定向克隆,其大小之和约14 kb,同时还得到定向克隆47个。已知N蛋白基因3′端含有SacⅠ酶切位点,故在用限制性内切酶SacⅠ对10种插入片段进行分析后发现,仅有约6 kb的插入片段含有SacⅠ位点,再用合成的与WRSVN N蛋白mRNA3′端顺序相同的引物对该克隆进行顺序分析证明,它含有WRSV N蛋白、G蛋白、M蛋白和部分L蛋白基因。对47个定向克隆进行顺序测定后,用DNA顺序分析软件将它与其它几种弹状病毒基因组的3′前导(leader)和5′拖尾(trailer)RNA进行比较后发现,有两个定向克隆分别含有它们的3′前导或5′拖尾的高保守区顺序,构建了一个近全长的小麦丛矮病毒(WRSV)cDNA文库。

关键词 小麦丛矮病毒,植物弹状病毒,多聚腺苷酸化,cDNA文库的构建

小麦丛矮病毒(WRSV)是一种严重危害我国小麦生产的植物弹状病毒。对该病毒的结构蛋白进行的研究表明,它由五种蛋白组成,即大蛋白L、糖蛋白G、核蛋白N、非结构蛋白Ns和膜蛋白M[1],其中L蛋白具RNA聚合酶活力;N蛋白与基因组RNA紧密结合,作为RNA合成的模板,在体外转录系统中,L蛋白催化RNA的合成需要Ns蛋白的参与[1~3]。但有关该病毒基因组的组织、各结构蛋白编码区之间的基因间隔区、结构蛋白编码区、基因组3′末端以及5′末端区的情况尚不清楚。本文报道了WRSV近全长基因组文库的构建和鉴定,这将有助于了解以上有关信息。

材料和方法

1 **病毒** 小麦丛矮病毒(WRSV)病株采自山东省聊城市郊染病的大田,采集中注意挑选病症典型的植株,经去根、洗净后,以200 g一包冻存于-20℃冰箱中。

2 **试剂** PEG 6000、PEG12000、DEPC(焦碳酸二乙酯)、尿素和β巯基乙醇购自Fluka公司;低熔点琼脂糖凝胶、ATP和有关限制性内切酶均购自Promega公司。Superscript[TM] Ⅱ cDNA合成试剂盒、T_4DNA连接酶和大肠杆菌Poly A聚合酶购自GILBCO BRL公司;X-gal和IPTG购自上海华美生物制品公司;异硫氰酸胍、Sarcosyl和普通琼脂糖凝胶购自Serva公司;T_7聚合酶测序试剂盒购自Pharmacia公司;α^{35}S dCTP购自Amer-

收稿日期:1996-09-09,修回日期:1996-10-21
* 本工作受中国科学院八五重点项目基金资助

维普资讯 http://www.cqvip.com

sham 公司;聚丙烯酰胺凝胶购自 Boehringer 公司;其余试剂均为国产。

3 **菌种和载体** pUC19/pUC18 购自上海华美生物制品公司;大肠杆菌 DH 5α 菌株由中国科学院上海植物生理所史瑾博士惠赠。

4 **引物** 引物 1(GCATTCTGGCTTGAGGTTGA)用于序列分析。24 聚反向测序引物(AGCGGATAACAATTTCACACAGGA)购自 Promega 公司。

5 **小麦丛矮病毒(WRSV)核衣壳的制备和纯化** 按本实验室方法制备[4]。纯化的核衣壳经电镜和 SDS-PAGE 电泳鉴定后再用于全长基因组 RNA 的抽提和制备。

6 **病毒全长单链基因组 RNA 的抽提和纯化** 参考文献[5,6]。取上述纯化的核衣壳,用 PEG 12000 反透析浓缩到小体积(约 2 mL)后,加入五倍体积的 Solution D(含 4 mol/L 异硫氰酸胍、0.5% Sarcosyl 和 25 mmol/L 柠檬酸钠 pH7.0)、终浓度为 1% 的 β-巯基乙醇、6 倍体积的水饱和酚和 1/2 体积的氯仿/异戊醇(24:1),在混匀器上剧烈振荡后置 4 ℃ 冰浴中,20min 后于 4 ℃、14,000 r/min 离心 20 min,吸出上层水相,用等体积的水饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提后,重复离心,取上层水相,再重复上述抽提直到界面上无蛋白层,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAC(pH5.2)和 0.6 倍体积的水饱和的异丙醇,混匀后放置 -20 ℃ 至少 4 h 以上,然后于 4 ℃、14,000 r/min 离心沉淀核酸,用 70% 乙醇洗涤后干燥。将此粗 RNA 溶解在 200 μL 经 DEPC 处理的重蒸灭菌水中。上述粗 RNA 经 1% 低熔点琼脂糖凝胶、6 V/cm 恒压下电泳 1 h 后,割胶回收目的条带、经 65 ℃ 熔胶 5 min 后,加入等体积的水饱和酚抽提后离心,取上层水相,再分别用等体积的水饱合酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提一次后,加 1/10 体积的 3 mol/L NaAC(pH5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀,放 -20 ℃ 过夜,次日离心沉淀核酸后用 70% 乙醇洗涤、干燥后溶于经 DEPC 处理过的灭菌重蒸水中。此 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后再用于多聚腺苷酸化。

7 **病毒全长单链基因组 RNA3′端的多聚腺苷酸化** 参考文献[7]。取上述纯化的病毒全长单链基因组 RNA 约 6 μg 并按次序加入下列各试剂:10 mmol/L ATP 1.25 μL、5 × PolyA 聚合酶缓冲液 10 μL(含 250 mmol/L Tris-HCl pH7.9、1.25 mol/L NaCl、50 mmol/L $MgCl_2$ 和 12.5 mmol/L $MnCl_2$)和大肠杆菌 PolyA Polymerase (1.6 U/μL)0.5 μL,最后用经 DEPC 处理并灭菌的重蒸水补至总体积为 50 μL,混匀后于 37 ℃ 恒温水浴中保温 30 imn。反应液经等体积的水饱和酚、酚/氯仿异戊醇(25:24:1)和氯仿异戊醇(24:1)抽提后离心,取上清,加 1/10 体积的 3 mol/L NaAC(pH5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇于 -20 ℃ 沉淀过夜。次日离心沉淀核酸后用 70% 乙醇洗涤和干燥后溶解于 6 μL 经 DEPC 处理过的灭菌重蒸水中用于 cDNA 的合成。

8 **全长 cDNA 的合成** 根据 GIBCO BRL 公司 Superscript™ Ⅱ cDNA 合成试剂盒的合成程序和要求,在上述基因组 3′端加 Poly A 后的 RNA 中加入寡聚 $dT_{(12-18)}$ 2 μL,混匀后在 70 ℃ 变性 10 min 并立刻放入 4 ℃ 冰浴中 2 min 以上,再经短暂离心后,依次加入各相应试剂,合成 cDNA 的第一和第二链,最后加入 T_4DNA 聚合酶使 cDNA 两末端完全为平头。

9 **cDNA、pUC19 载体限制性内切酶 Pst Ⅰ 单酶切及 Sma Ⅰ/EcoR Ⅰ 双酶切的制备、连接、DH5α 感受态细胞的制备、转化和筛选** 均按参考文献进行[8]。酶切后的 cDNA 用于连接和转化感受态 DH5α 细胞。转化后的感受态细胞涂于含氨苄青霉素、X-gal、IPTG 的 LB 平板上,37 ℃ 恒温培养 16~18 h 后,挑选白色菌落用小规模抽提质粒的方法进行酶切鉴定。

10 **cDNA 的序列分析** 用双脱氧法末端法[9]对抽提质粒进行双链测序。含有大小约 6 kb 的克隆用引物 1 测定,其中部分序列由上海植物生理研究所核酸自动测序仪测定;定向克隆用 Promega 购买的反向 24 聚引物测定,测序方法按 Pharmacia T_7 聚合酶测序试剂盒进行。

结 果

1 **全长基因组 RNA 的纯化和 cDNA 的合成** 利用蛋白质的强烈烷基化试剂异硫氰酸胍抽提单链 RNA 的方法,成功地得到了 WRSV 全长单链基因组 RNA,利用此 RNA 合成的 cDNA

维普资讯 http://www.cqvip.com

的大小、在 1% 琼脂糖凝胶电泳中的迁移位置与 WRSV 基因组 RNA 几乎相同，见图 1。

图 1　病毒全长单链基因组 RNA 及合成的近全长 cDNA
M：λ DNA/Hind Ⅲ 分子量 marker；　1：病毒全长单链基因 RNA；
2：合成的近全长 cDNA。
Fig. 1　The full－length ssRNA and synthesized near full－length cDNA
M：λ DNA/Hind Ⅲ marker；
1：The full－length genomic ssRNA
2：The synthesized near full－length cDNA

合成的 cDNA 经 Pst Ⅰ 酶切，与载体连结和转化 DH5α 细胞后，小规模制备的质粒经酶切鉴定后共得到 10 种大小不同的插入片段，它们中最大的约 6 kb，最小的约 0.5 kb，各插入片段的总和近 14 kb，见图 2。

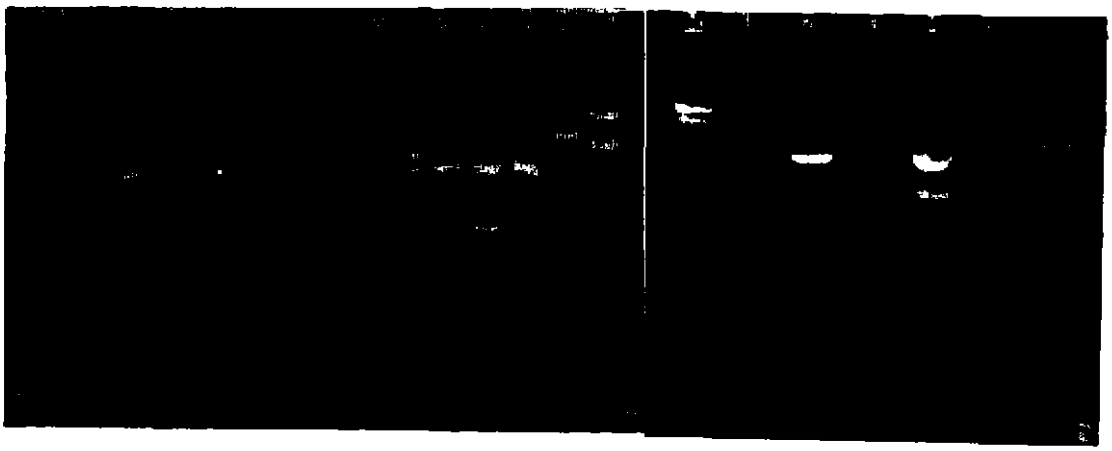

图 2　限制性内切酶 Pst Ⅰ 对 10 种大小不同插入片段的鉴定
M1：λ DNA/Hind Ⅲ 分子量 marker，
M2：λ DNA/Hind Ⅲ + EcoR Ⅰ 分子量 marker
P：pUC19/Pst Ⅰ　1～10：10 种不同大小的插入片段
Fig. 2　Identification of 10 kinds of inserts in different size by restriction enzyme Pst Ⅰ
M1：λ DNA/Hind Ⅲ marker，
M2：λ DNA/Hind Ⅲ + EcoR Ⅰ marker，
P：pUC19/Pst Ⅰ
1～10：10 kinds of inserts in different size cut by restriction enzyme Pst Ⅰ

图 3　限制性内切酶 Sac Ⅰ 对 N 蛋白 cDNA 和约 6 kb 插入片段质粒的酶切鉴定
M：λ DNA/Hind Ⅲ 分子量 marker　1：pUC19 质粒
2：pUC 19/Sac Ⅰ　3：含有 N 蛋白 cDNA 的质粒
4：含有 N 蛋白 cDNA 的质粒/Sac Ⅰ
5：含有约 6 kb 插入片段的质粒
6：含有约 6 kb 插入片段的质粒/Sac Ⅰ
Fig. 3　Identification of 6kb insert and plasmid containing cDNA of N protein by Sac Ⅰ
M：λ DNA/Hind Ⅲ marker　1：pUC 19 plasmid
2：pUC 19/Sac Ⅰ　3：plasmid containing cDNA of N protein
4：plasmid cotaining cDNA of N protein cut by Sac Ⅰ
5：plasmid inserted about 6kb
6：plasmid inserted about 6kb cut by Sac Ⅰ

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 N蛋白基因克隆的鉴定 以前研究表明，在N蛋白基因cDNA克隆的末端含有SacⅠ的酶切位点(结果待发表)，我们用SacⅠ对所有得到的cDNA克隆进行酶切鉴定，发现只有约6 kb的克隆质粒含有SacⅠ的位点，见图3。可以初步肯定它含有N蛋白基因的cDNA。用根据N蛋白mRNA3′端核苷酸序列合成的引物1对该克隆质粒进行序列测定，结果证明此克隆质粒的确含有N蛋白基因的cDNA，见图4。

GCATTCTGGCTTGAGGTTGAAGGTAATTCCATGACCGACCAACAGGCTCCAAGCAAGCT

图4 6 kb插入片段的克隆含有与N蛋白cDNA相同的顺序

Fig.4 The same sequence both in 6 kb insert and in mRNA of N protein

3 cDNA平头末端分析 用PstⅠ单酶切对cDNA进行克隆的同时，我们还分别用EcoRⅠ加SmaⅠ双酶切的方法，对cDNA的两个平头末端进行了定向克隆，此时的两个平头末端分别为3′或5′端。此两端经序列测定。用计算机对经过测序的47个定向克隆质粒的3′前导(leader)或5′拖尾(trailer)区cDNA同源性分析后，发现有两个定向克隆分别与其它弹状病毒的3′前导(leader)和5′拖尾(trailer)的高保守顺序有同源性，见图5。

讨 论

小麦丛矮病毒(WRSV)是我国第一个发现的植物弹状病毒。弹状病毒的基因组由一条负链性质的RNA构成，其大小虽在植物或动物弹状病毒间稍有差异，但一般均在11～18 kb范围内。WRSV的RNA基因组大小约为14～16 kb之间[10]。从我们合成的cDNA电泳迁移位置的比较和经限制性内切酶PstⅠ酶切后，获得10个外源插入片段的克隆，其大小总和也在14 kb左右，因此可以认为，我们在病毒全长基因组RNA3′末端进行多聚腺甘酸化后再进行cDNA的合成，可以获得比较满意的结果，得到近全长的cDNA基因文库。这一方法与过去中感染病毒的宿主细胞中先抽提纯化总mRNA，合成总cDNA克隆后，再用标记的病毒RNA基因组或病毒结构蛋白的基因进行阳性克隆的筛选相比较[11～13]，不仅工作量小，而且同时能获得非结构蛋白编码区的片段和信息。当然这一方法的前提是必须获得病毒基因的全长基因组。

用计算机软件Sequence Analysis Version 3.00，对已测定的47个定向克隆插入片段的序列，和已知的植物弹状病毒苦苣菜黄脉病毒(SYNV)、莴苣坏死黄化病毒(LNYV)以及动物弹状病毒水泡性口膜炎病毒(VSV)的3′前导RNA(leader)和5′拖尾(trailer)的基因组RNA序列分析比较后发现[7]有两个定向克隆分别与它们基因组的3′前导(leader)和5′拖尾(trailer)的高保守区有同源性，序列比较见图5，但均未能测到用于cDNA合成的寡聚dT_{12-18}引物，可能是由于cDNA在合成第二链时没有能进行到底合成全长的互补链，因而在T_4DNA聚合酶的磨平反应中被降解，因此推测所获得的cDNA3′和5′两端也许还缺少为数不多的核甘酸。

我们过去的工作已证明WRSV含有5种病毒结构蛋白，即L(140 kD)、G(67 kD)、N(46 kD)、Ns(42 kD)和M(19 kD)[14,15]。同时根据WRSV在寄主细胞的细胞质中复制的特点，它属于以水泡性口膜炎病毒(VSV)为代表的弹状病毒第一亚组，故WRSV应与VSV的基因组结构相同或相似，即3′端为前导RNA，然后依次是病毒结构蛋白基因N、Ns、M、G、L和5′端的拖尾，见图6。

维普资讯 http://www.cqvip.com

5'拖尾(trailer)

VSV(NJ)　3'.....AUUAACAUUAUUACCAAAAAAACAGAAGCA-5'

VSV(IND)　3'... ..AAUAAAAAAUAGACCAAAACACCAGAAGCA-5'

LNYV　3'.....UGAAAAACUAAAAUAAUAGCAGGCA-5'

SYNV　3'.....CUAACAAGACUCGAAAACAGAGA-5'

WRSV　3' .. UUAAGCGAGUAUCAACAAAAAGAGGGUGAUAGAU

AACAUAGUGUGUCAAAUACUGUCCAAACAGUAUAUAGGAU

CCAGCCUCAGGUGUUUCGACAUCGG-5'

3'前导(leader)

VSV(NJ)　3'-UGCUUCUGUUUUUUUGGUAAGAAUGUUAAU.....UUGU.. ..5'

VSV(IND)　3'-UGCUUCUGUUUGUUUGGUAAUAAUAGUAAU.....UUGU. .. .5'

LNYV　3'-AAUGCCUGUUAUUAUCUUCUUUUUUUA. .. .. CUUU. ... 5'

SYNV　3'-UCUCUGUCUUUUGAGUCUUUUUAUGUUAGUGG..UUUUGGUUGU.. .. -5'

WRSV　3'-UAAGUAACUCGCAACGAUUCUUAUAAGGCCCUGAACUUUUCCGACAACGU

AAAUGUUUCUU . ... .UUUUGGUUACACCGG. .. .5'

图 5　WRSV 基因组 RNA5′拖尾和 3′前导序列与其它弹状病毒的比较

Fig. 5　Comparison of the 5′ trailer and 3′leader of the genomic RNA of WRSV with the same region of other rhabdoviruses

维普资讯 http://www.cqvip.com

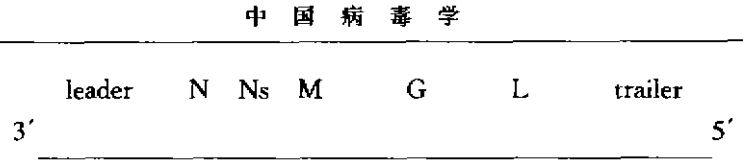

图6 WRSV可能类似VSV的基因组结构

Fig.6 The possible genomic organization of WRSV similar to VSV

业已证明N蛋白的序列中含有Sac I酶切位点(结果待发表),所以含有6 kb的插入片段的克隆应含有全部或部分N蛋白基因的cDNA直至部分G或全部G及部分L蛋白的序列,但根据5种病毒结构蛋白分子量所推算的基因大小总和仅为9 kb左右。而已知其它弹状病毒的3′前导和5′拖尾RNA以及基因间隔区长度的总和不应超过1 kb,但WRSV的基因组RNA在14～16 kb左右,因此WRSV很可能也和其已知的几种动植物弹状病毒一样,存在有非结构蛋白基因的编码区,但该编码区的位置是否也像另一种植物弹状病毒莴苣坏死黄化病毒(LNYV)一样位于M和Ns之间,则尚待确定。

小麦丛矮病毒的近全长基因文库的构建,对进一步研究该病毒基因组的结构、特别是非结构蛋白基因编码区及基因间隔区的结构,以及它们对结构蛋白基因的转录和全长基因组的复制机制的阐明,均有重要的意义。

参 考 文 献

1 孙伟,龚祖埙,曹天钦.小麦丛矮病毒的依赖于RNA的RNA聚合酶.中国科学B辑,1987,9:940～946

2 孙伟,龚祖埙,曹天钦.小麦丛矮病毒的L、Ns和N蛋白在病毒RNA的体外转录过程中的作用.中国科学B辑,1988,2:155～161

3 Sun wei and Gong Zu Xun. *In vitro* studies on the nucleocapsid－associated RNA polymerase of Wheat Rosette Stunt Virus. Intervirology, 1988, 29(3):154～161.

4 郑巧兮,徐伟军,朱本明等.小麦丛矮病毒核衣壳的分离及其核酸、蛋白质组成的研究.生物化学与生物物理学报,1983,15(6):561～567

5 Groppe J C, Morse D E. Isolation of full－length RNA templates for reverse transcription from tissues rich in RNase and proteoglycans Analytical Biochem, 1993, 210(2):337～341

6 Chomczynski P, Sacchi N. Single－step method of RNA isolation by acid guanidinium. Analytical Biochem, 1987, 162(1):156～159

7 Wetzel T, Dietzgen R.G, Dale J L. Genomic organization of Lettuce Necrotic Yellow Rhabdovirus. Virology, 1994, 200(2):401～412

8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al*. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

9 Haltiner M, Kemper T, Tjian R. A novel strategy for construcing clustered point mutations. Nucleic Acids Research, 1985, 13(3):1015～1025

10 孙伟,彭海,龚祖埙.小麦丛矮病毒核酸的研究.病毒学报,1986,2(1):60～64

11 McGeoch D J, Dolan A. Sequence of 200 nucleotides at the 3′－terminus of the genome RNA of Vesicular Stomatitis Virus, Nucleic Acids Research, 1979, 6(10):3199～3211

12 Tordo N, Poch O, Erimine A, Primary structure of leader RNA and nucleoprotein gene of the rabies genome: segmented homology with VSV. Nucleic Acids Research, 1986, 14(6):2671～2683

维普资讯 http://www.cqvip.com

13 Zuidema D, Heaton L A, Hanau R. *et al*. Detection and Sequence of plus-strand leader RNA of sonchus yellow net viurs, a plant rhabdovirus. Proc Natl Acad. Sci, 1986, 83(14):5019~5023

14 龚祖埙、郑巧兮 小麦丛矮病毒的部分提纯、抗血清制备及其蛋白质组分的研究. 生物化学与生物物理学报, 1985, 17(2):248-252

15 郑巧兮, 龚祖埙, 小麦丛矮病毒糖蛋白(G蛋白)的研究. 病毒学报, 1985, (1):55~59

Construction of a Near Full-length cDNA Library of Wheat Rosette Stunt Virus(WRSV)

Shen Jiali Gong Zuxun

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai* 200031)

A near full-length cDNA library of Wheat Rosette Stunt Virus (WRSV) was constructed. Purified viral RNA was polyadenylated by *E. coli* poly(A) polymerase. The poly(A)-tailed RNA was used as a template complementary to oligo dT(12-18) primer for cDNA synthesis. The cDNA was separately digested with restriction enzymes Pst I and EcoR I/Sma I. The pUC19 plasmid was digested with the same enzymes to poduce the both cohesive-ends, or one blunt and the other cohesive-ends respectively. Ten inserts with different sizes were obtained and the total size of them reached approximately 14 kb. One insert of near 6 kb length was identified as the insert containing the N protein gene and covering the Ns, M, G, genes as well as a part of L gene. The cDNA inserts with orientated-direction were sequenced and the sequence was compared to 5′ and 3′ ends of the genomic RNAs of two other plant rhabdoviruses, SYNV and LNYV using computer assisted searching method with the Software Sequence Analysis Version 3.00.

Key words Wheat Rosette Stunt Virus, Plant Rhabdoviridae, Polyadenylation, Construction of cDNA library