

水稻条纹病毒两个分离物 RNA4 基因间隔区的序列比较*

魏太云, 林含新, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉

S435.111.4

(福建农业大学植物病毒研究所, 福建省植物病毒学重点实验室, 福州 350002)

S432.41

摘要: 通过 RT-PCR 扩增了我国水稻条纹病毒(RSV)山东济宁(JN)、云南宜良(YL)两个分离物 RNA4 基因间隔区(intergenic region, IR)序列, 并克隆于 pGEM-T easy 载体上。序列分析结果表明: JN、YL 两分离物 RNA4 IR 均由 654 个核苷酸组成, 两者之间的同源率为 92%。JN、YL 两个分离物 RNA4 IR 在 AU 碱基富集处可形成两个明显的发夹结构, 其中一个序列比较保守, 形成的发夹结构稳定; 但另一个由于碱基变异导致所形成的发夹结构的稳定性在各个分离物中差异较大。这些结果说明了我国水稻条纹病毒存在明显的分子变异。

关键词: 水稻条纹病毒; RNA4 基因间隔区; 序列比较

中图分类号: S432.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)02-0156-07

水稻条纹叶枯病是中国、日本、朝鲜及远东地区水稻上的一种重要的病毒病。在我国, 该病从南到北广泛分布于十六个省市, 曾造成严重的损失, 至今仍在云南各地区猖獗危害^[1], 其病原为水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV), 是纤细病毒属(*Tenuivirus*)的典型成员, 其基因组由 4 个 ssRNA 片段组成。除 RNA1 采用负链编码策略外, RNA2、RNA3 和 RNA4 均采取双义编码策略(ambisense coding strategy)。RSV 可能编码的蛋白中, 现已证实 RNA3 负链编码病毒的外壳蛋白(coat protein, CP), RNA4 正链编码病害特异性蛋白(disease-specific protein, SP)^[2-5]。

日本学者根据各分离物的致病性以及 SP 分子量的差异, 已划分出鸿巢、P、N、T、M 等多个株系^[3,6]。其中, T 株系的全序列已测定, M 株系也测定了 RNA3、4 两个片段的序列。RNA4 序列比较发现, T 株系的 IR 比 M 株系多了一个 19 bp 的插入序列, RNA4 IR 存在 U 和 A 碱基富集带及可能的发夹结构^[2,3,8,9]。由于 IR 的发夹结构可能具有终止 mRNA 转录及保持 ssRNA 稳定性的作用, 又易于突变, 所以被认为具有重要的功能^[3,7]。

我国地域辽阔, 地理生态多样性丰富, 各地区的 RSV 之间极可能存在分子变异或株系分化。为此, 本研究选择我国 RSV 的山东济宁(JN)、云南宜良(YL)两个分离物, 通过比较分析其 RNA4 IR 的序列, 为进一步研究我国 RSV 的分子变异或株系分化及 IR 等调控元件在病毒基因组双义表达过程中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒 为本所采自山东济宁、云南宜良、经分离纯化并保存于合系 28 水稻品种上的 RSV JN、YL 两个

收稿日期: 1999-03-03, 修回日期: 1999-07-29

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670489); 福建省自然科学基金资助项目(C97031)

作者简介: 魏太云(1975-), 男, 福建省福清市人, 硕士研究生。研究方向为植物病毒学。

分离物。

1.2 引物 根据 Kakutani 等^[8]报道的 RSV RNA4 的基因序列,设计一对用于扩增 RNA4 IR 的寡聚核苷酸引物,引物由上海植物生理研究所合成,序列如下:

P1:5'CCAACTCTTCTACACAAGAC3'(与 RNA4 5'端 567~587 bp 相对应);

P2:5'GTAGGTGAGATAACCAGTTCC3'(与 RNA4 5'端 1 208~1 228 bp 互补)。

1.3 病毒提纯 参照 Ishikawa 等^[10]的方法,略作修改。

1.4 病毒 RNA 的提取 根据 Toriyama 等^[11]的方法,略作改进。提纯的病毒经 SDS、蛋白酶 K 处理,酚-氯仿抽提得到病毒 RNA,经紫外测定浓度为 0.52 μg/μL。

1.5 cDNA 合成及 PCR 扩增 1.0 μg 病毒 RNA 模板和 10 pmol/L 的 3'端引物先在 95 ℃处理 10 min,再按 Promega 公司的 cDNA 合成试剂盒说明书进行 cDNA 第一条链的合成。PCR 扩增是在 50 μL 反应体系中进行,包括反转录产物 2 μL、P1 和 P2(10 pmol/L)各 5 μL、dNTP(每份 10 mmol/L) 1 μL、10×buffer 5 μL、DDW 28 μL、MgCl₂(25 mmol/L) 3 μL、Taq DNA 聚合酶(4 u/μL, MBI 公司产品) 1 μL。采用双退火温度进行扩增:前 5 个循环,94 ℃变性 1 min、30 ℃退火 2 min、72 ℃延伸 2 min;后 25 个循环,除退火温度改为 37 ℃外,其余同前。最后一个循环结束后,72 ℃保温 10 min。

1.6 克隆及测序 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳后,切取目的基因片段,用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN 公司产品)回收后,直接连接于 pGEM-T easy 载体(Promega 公司产品)上的克隆位点,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选、PCR 扩增及 EcoRI 酶切分析鉴定插入片段。DNA 测序由上海基康生物技术有限公司在 ABI 377 型 DNA 测序仪上进行。

1.7 核苷酸序列分析 用 DNASIS 软件(Hitachi software Engineering Co. Ltd)进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增

提取的病毒 RNA 经 RT-PCR 扩增后,RSV 的 JN 和 YL 两个分离物都得到一个长度约为 680 bp 的扩增片段,与预期的 662 bp 的扩增片段相近(图 1)。

2.2 重组质粒的筛选和鉴定

扩增产物经纯化后克隆到 pGEM-T easy 载体上,经蓝白斑筛选、PCR 检测及 EcoRI 酶切分析鉴定后,证实所得到的克隆均为含有插入片段的重组子,JN 和 YL 两个分离物 RNA4 IR 的克隆分别命名为 pTE-JN、pTE-YL,因为 EcoR I 酶切位点分别位于 pGEM-T easy 载体上的 52 nt、70 nt 处,故酶切片段比 RT-PCR 扩增片段长 19 bp,达到 700 bp 左右(图 2)。

2.3 基因间隔区核酸序列分析

核酸序列分析结果表明:JN、YL 两个分离物 RNA4 IR 均含有 654 个核苷酸,与日本报道的 T 分离物 RNA4 IR 核苷酸数目相同,但和 M 分离物 RNA4 IR 相比多了一段 19 bp 的插入片段。插入片段的序列均为 5'CAUAGAAACAUGAGAGUAU3';和 T 分离物的插入片段(5'CAUAGAAACAUGAGAGCAU3')相比有一个碱基的差异。另外,JN 和 T 分离物的插入片段位置均在第 296~314 nt 之间,而 YL 分离物的插入位置在第 299~317 nt 之间(图 3)。DNASIS 软件分析结果表明:JN、YL、T 3 个分离物 RNA4 IR 序列之间的同源率均为 92%,而 JN、YL 与 M 分离物之间的同源率均为 87%左右(图 3)。RNA 二级结构预测分析发现,JN、YL 分离物 RNA4 IR 和 T、M 分离物一样,在 AU 碱基富集处可形成两个明显的发夹结构,其中 JN、T 分离物在第 326~361 nt、YL 分离物在第 329~362 nt、M 分离物在第 313~334 nt(图 3 第一条下划线处)可形成发夹结构,这个区段由于碱基变异较大,形成的发夹结构很不稳定。一般

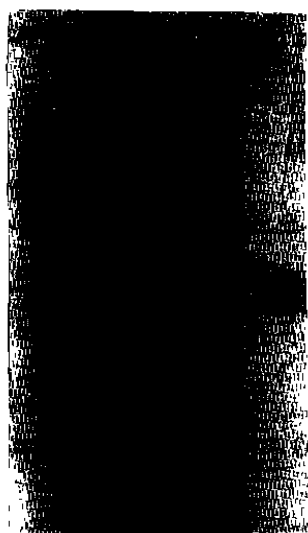


图1 1.5%琼脂糖电泳检测 RT-PCR 扩增结果

M: DNA marker ladder;

1:RSV-JN RNA4 基因间隔区 RT-PCR 产物;

2:RSV-YL RNA4 基因间隔区 RT-PCR 产物。

Fig.1 1.5% Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

M: DNA marker ladder;

Lane 1: product of RT-PCR of RSV-JN RNA4 IR;

Lane 2: product of RT-PCR of RSV-YL RNA4 IR.

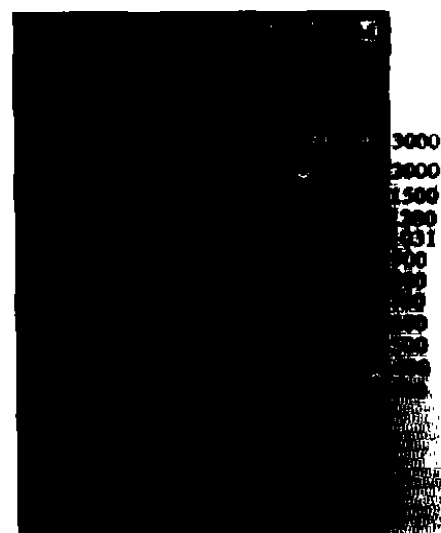


图2 重组质粒的 EcoR I 酶切鉴定

M: DNA marker ladder; 1:pGEM-T easy 载体;

2-3:重组质粒 pTE-JN、pTE-YL;

4: EcoR I 酶切 pGEM-T easy 载体;

5-6: EcoR I 酶切 pTE-JN、pTE-YL。

Fig.2 Identification of recombinant plasmid digested by EcoR I

M: DNA marker ladder;

Lane 1: pGEM-T easy vector;

Lane 2-3: recombinant plasmid pTE-JN、pTE-YL;

Lane 4: pGEM-T easy vector/EcoR I ;

Lane 5-6: pTE-JN/EcoR I , pTE-YL/EcoR I .

而言,发夹结构的最低自由能越低,结构越稳定。JN、YL、M 与 T 四个分离物在这一区段序列所形成的发夹结构所预测的最低自由能(ΔG)分别为 0.84 kj、-3.4 kj、-7.14 kj 和 -36 kj,很明显,这一区段序列所形成的发夹结构中,T 分离物最为稳定。对 T 分离物而言,JN 分离物在第 328 nt 处有 U→G 碱基突变、在第 349 nt 处有 A→U 碱基突变;YL 分离物第 335~336 nt 处有两个 A 碱基缺失突变、在第 349 nt 处有 A→U 碱基突变;M 分离物在第 351 nt 处有 U→C 碱基突变、在第 361 nt 处有 G→A 碱基突变。显然,各个分离物在这一区段序列所形成的发夹结构的稳定性不同是由这些碱基突变所致。JN、YL 和 T 3 个分离物在第 420~463 nt、M 分离物在第 400~461 nt(图 3 第二条下划线处)可形成另一发夹结构,这一段序列比较保守,形成的发夹结构稳定,其最低自由能(ΔG)为 -160 kj,M 分离物在这一区段虽有两个碱基的缺失突变(相对于 T 分离物,在第 448-449 nt 处有 UG 两个碱基缺失突变)但并没有影响其发夹结构的稳定性(图 4)。

RSV-JN	CUCAUUGCAU	AUCACAUUUU	UCCACCCACG	AGUGCUUGCA	LUCUAGAAGU	GGAGCCAGUU	60
RSV-YL	U-U-----	C-----	*-----	-----	-----	-----	
RSV-T	U-U---U---	-----	*-----	A-----	A-----	G-----	
RSV-M	U-U-----	-----	*-----	A-----	A-----	U-----	
RSV-JN	UGGQUUGACC	UUCUUGUGUG	GAGAUACAAG	UAUAUU**AU	AGUCUAAACA	AUGUACAUGA	120
RSV-YL	-----	-----	A-A---G-	---CU---	-----	-----	
RSV-T	-----	A--A--G-	---C**--	-----	A-----	-----	
RSV-M	-----	A--A--G-	---**--	---U---	---U---	---U---	
RSV-JN	UGUUUUUAUCA	CUUAAGCUUG	ACAGCUUGUA	AAUAUUUGUG	LGUGAUUGUG	CGUGUGUAUA	180
RSV-YL	---GUC---	---A---	---U---	-----	-----	U---GC---	
RSV-T	---UC---	---U---	---U---	-----	-----	---G---	
RSV-M	---GU---	---A---	---U---	-----	A-----	---G---	
RSV-JN	UAUAUGU**U	AAUAUAUAAC	UGUACACAGG	UGUGUAGAUG	LAAACACUUG	AAACAAAUAA	240
RSV-YL	---**---	-----	G-----	-----	A-----	G-----	
RSV-T	-G---**-	-G---	-G-U---	-----	A-----	-G-U---	
RSV-M	---AU---	-G---	-C---	-----	A-----	-C---	
RSV-JN	AUAAAUUAU	ACCUAUCAAU	UCAUAUACAU	ACUUGUGAGU	CUUAGCUCCU	CUAUAUAC**	300
RSV-YL	--U-----	U-----	C-----	-----	-----	A-----	
RSV-T	--UG-----	U-----	C-----	-----	-----	AC-----	
RSV-M	-C-----	U-A-----	-----	G-A-----	G-----	C-----	
RSV-JN	<u>ACAUAAGAAAC</u>	<u>AUGAGAGUAU</u>	<u>CAUAUAAGAC</u>	<u>CCAGUGCAAA</u>	<u>AAUACUAAUA</u>	<u>ACUUUGUUUU</u>	360
RSV-YL	-----	-----	C-----	---U---	**-----	-----	
RSV-T	-----	---C---	U---C---	---U---	-----	---A---	
RSV-M	*****	*****	U-----	A-----	U-----	-----	
RSV-JN	<u>UACA<u>U</u>GUCA</u>	<u>AAACUAGAAA</u>	<u>CUGAAAUACC</u>	<u>AAAAACAUG</u>	<u>AGAAAAUAGA</u>	<u>AAAUCAAAAA</u>	420
RSV-YL	C-----	---A--C-	-----	*-----	-----	UG-----	
RSV-T	-----	---A---	-----	*-----	-----	-----	
RSV-M	---A---	---C-A-	-----	*-----	-----	-----	
RSV-JN	<u>CAAUGAAU<u>GG</u></u>	<u>UGCUAACGAC</u>	<u>CACA<u>U</u>CCGGA</u>	<u>UGUGGUGCGU</u>	<u>AGCACCAUUU</u>	<u>UCAUAACA<u>UU</u></u>	480
RSV-YL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
RSV-T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
RSV-M	-----	-----	-----	**-----	-----	G-----	
RSV-JN	AAUCUAUAAC	CUACUAGUAG	CAAAAACACC	CAUAUGCAUG	AAGUGCAUAG	CACUCUCUUA	540
RSV-YL	-----	-----	-----	A-----	-----	U-----	
RSV-T	-----	---U---	-----	-----	C-----	-----	
RSV-M	-----	---U--G-	-----	-----	-----	-----	
RSV-JN	UGGAUUGACU	ACUAUGAUC	CGUGAAUGCA	UAGCAUUCUC	LUGGAAAAAU	GCAGAGCAAA	600
RSV-YL	---C--A--U-	-----	-----	-----	C--A--A--	---G---	
RSV-T	---G-----	---U---	-----	-----	C-----	---G---	
RSV-M	---C-----	---A--U-	-----	-----	A-----	---G---	
RSV-JN	ACAGACCACA	UCAAGUGCGU	AGCACCAGAU	GUUGGCAUAC	LCUGGAACUG	GUUAUCUCAC	660
RSV-YL	-----	-----	---U---	---A---	---A---	-----	
RSV-T	---A-----	---A---	---U---	---A---	---C---	-----	
RSV-M	-----	---*---	---U---	---C-A-	-----	-----	

图 3 JN、YL、T 及 M 4 个分离物 RNA4 基因间隔区序列分析比较
 - : 相同的碱基, * 缺失的碱基。单下划线表示两个可能形成发夹结构的核苷酸的位置。波浪线表示相对于 M 分离物有一段 19 bp 插入序列的位置。T 和 M 两个分离的序列分别引自 Zhu 等(1992)、Kakutani 等(1990)。

Fig. 3 Alignment of nucleotide sequence of RNA4 intergenic region within JN, YL, T, M, 4 isolates

- : same nucleotide, * : missed nucleotide.

Single underlines indicate the nucleotide positions of the two predicted hairpin structures.

Wavy underline indicates the nucleotide positions of 19-base insertion relative to this region of M isolate.

The nucleotide sequences of T and M isolates from Zhu *et al* (1992), Kakutani *et al* (1990).

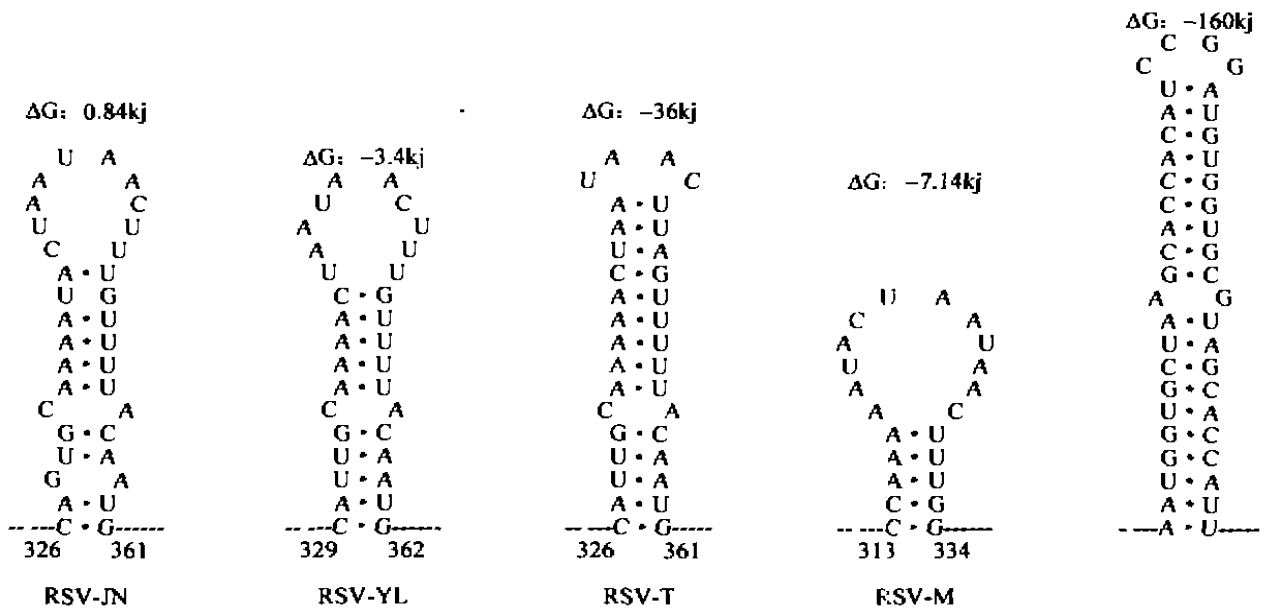


图4 RNA4 基因间隔区内两个可能的发夹结构

(a)四个分离物中稳定性不同的发夹结构,(b)四个分离物共有的、稳定的发夹结构。

·: 茎区的碱基配对, ΔG : 最低自由能。(a)标出发夹结构的核苷酸位置(距5'末端)。T和M两个分离物的序列分别引自 Zhu 等(1992)、Kakutani 等(1990)。

Fig. 4 The two predicted hairpin structures in the RNA4 intergenic region

(a) the hairpin structures different in stability among 4 isolates, (b) the same and stable hairpin structures among 4 isolates.

·: base-pairing in the stem region, ΔG : the lowest free energy. The nucleotide positions were showed (from the 5' termini). The nucleotide sequences of T and M isolates from Zhu *et al* (1992), Kakutani *et al* (1990).

3 讨论

研究结果表明,各分离物 RNA4 IR 序列碱基变异较大,同源率不高,在 AU 碱基富集处可形成两个发夹结构,其中一个序列比较保守,形成的发夹结构稳定,但另一个由于碱基突变造成所形成的发夹结构的稳定性在各个分离物中差异较大。Auperin 等^[7]认为这种发夹结构对间隔区两旁基因编码区转录终止及 ssRNA 稳定性有重要作用。Zhu 等^[3]也提出 RSV RNA4 IR 可能具有高级的结构,且易于突变,认为正是这种复杂的结构是参与病毒功能的重要因素,并提出 RSV RNA4 IR 和病毒的生物学性状包括病症可能相关。而 RSV RNA4 vRNA 上的 ORF 编码病害特异性蛋白被认为是一种与病症有紧密相关的蛋白^[12,13],是否各个分离物正是通过这种稳定性不同的发夹结构,影响 IR 两旁 ORF 的转录终止及 ssRNA 的稳定性,进而导致其生物学性状差异呢?这是值得进一步研究的问题。这个结果启发我们在进行抗病毒转

基因工程的研究中,可采取反义 RNA 策略,以 IR 的反义 RNA 封闭其保守序列及茎-环结构,有可能干扰 RSV 基因组的转录和 ssRNA 的稳定性,进而提高转基因植物的抗性。

RSV RNA4 IR 在某些区段碱基变异较大,变异的原因可能有两点:(1)PCR 扩增时所使用的 Taq DNA 聚合酶缺乏 5' -3' 端矫正功能,大约有 0.25% 的错配率^[14],这种影响显然是微乎其微的;(2)病毒在与寄主的协同进化过程中受环境选择压力的影响。对采自 JN、YL 两个分离物 RNA4 IR 进行了比较,其同源率只有 92%,而它们与 T 分离物 RNA4 相应区段却同样有 92% 左右的同源率,前三个 RSV 分离物 RNA4 IR 与 M 分离物 RNA4 相应区段相比多了 19 bp 的插入序列,都约有 87% 的同源率。这从一个侧面提示了:(1)JN、YL 分离物与 T 分离物的亲缘关系可能比与 M 分离物的亲缘关系更为接近;(2)我国 RSV 各分离物存在分子变异与株系分化。

我国幅员辽阔,各地生态环境千变万化,水稻的耕作制度和品种布局各不相同,这就为 RSV 产生分子变异和株系分化提供了很好的条件。对其进一步的研究将为揭示 RSV 的分子演化规律提供依据。

参 考 文 献

- [1] 林含新,林奇英,谢联辉.水稻条纹病毒分子生物学研究进展[J].中国病毒学,1997,12(3):202~209
- [2] Zhu Y, Hayakawa T, Toriyama S, *et al.* Complete nucleotide sequence of RNA3 of rice stripe virus: an ambisense coding strategy. *J Gen Virol*, 1991, 72:763~767
- [3] Zhu Y, Hayajawa T, Toriyama S. Complete nucleotide sequence of RNA4 of rice stripe virus isolate T and comparison with another isolate and with maize stripe virus [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73:1309~1312
- [4] Takahashi M, Toriyama S, Hamamatst C, *et al.* Nucleotide sequence and possible ambisense coding strategy of rice stripe virus RNA segment 2 [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74(4):769~733
- [5] Toriyama S. Nucleotide sequence of RNA1, the largest genomic segment of rice stripe virus, the prototype of the tenuiviruses [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75:3569~3579
- [6] Hayashi T, Usugi T, Nakano M, *et al.* On the strains of rice stripe virus (1): An attempt to detect strains by difference in molecular size of disease-specific proteins [J]. *Proceeding of the Association for plant Protection of Kyushu. J Gen Virol*, 1989, 35:1~2
- [7] Aupeirin DD, Romanowski M, Galinski M, *et al.* Sequence studies of Pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA [J]. *J Gen Virol*, 1984, 52(2):897~904
- [8] Kakutani T, Hayano Y, Hayashi T, *et al.* Ambisense segment 4 of rice stripe virus possible evolutionary relationship with phoeboviruses and uukuviruses (*Bunyaviridae*) [J]. *J Gen Virol*, 1990, 72(2):465~468
- [9] Kakutani T, Hayashi T, Minobe Y. Ambisense segment 3 of rice stripe virus: the first instance of a virus containing two ambisense segments [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72(2):465~468
- [10] Isikawa K, Omura T, Hibino H. Morphological characteristics of rice stripe virus [J]. *J Gen Virol*, 1989, 70:505~511
- [11] Toriyama S, Watanabe Y. Characterization of single- and double-stranded RNAs in particles of rice stripe virus [J]. *J Gen Virol*, 1989, 70:505~511
- [12] Toriyama S. An RNA-dependent RNA polymerase associated with the filamentous nucleoproteins of rice stripe virus [J]. *J Gen Virol*, 1986, 67:1247~1255
- [13] 林奇田,林含新,吴祖建,等.水稻条纹病毒外壳蛋白和病害特异蛋白在寄主体内的积累[J].福建农业大学学报,1998,27(3):322~326
- [14] Tindali K, Kunkel T. Fidelity of DNA synthesis by the thermus aquatious DNA Polymerase [J]. *Biochemistry*, 1988, 27:6008~6013

Sequence Comparison of Intergenic Region between Two Isolates of Rice Stripe Virus RNA4

WEI Tai-yun, LIN Han-xin, WU Zu-jian, LIN Qi-ying, XIE Lian-hui

(*Institute of Plant Virology of Fujian Agricultural University, Key Laboratory of Plant Virology of Fujian Province, Fuzhou 350002, China*)

Abstract: The RNA4 intergenic regions of two isolates of rice stripe virus (RSV) in China (designated as RSV-JN and RSV-YL) were amplified by RT-PCR and cloned into pGEM-T easy vector. Sequence analysis showed that they were all 654 bp in length, and shared only 92% identity at the nucleotide level. Computer-assisted folding analysis showed that the intergenic region was rich in A and U residues where two distant hairpin structures could be formed. One was highly conserved and stable, but the other was rather unstable because of bases variation. Therefore, there were molecular variation among isolates of rice stripe virus in China.

Key words: Rice stripe virus; RNA4 intergenic regions; Sequence comparison