

水稻草矮病毒核衣壳蛋白基因克隆
及在大肠杆菌中的表达*

S435.111.4

S432.41

张春媚, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉

(福建农业大学植物病毒研究所, 福州 350002)

关键词: 水稻草矮病毒; 核衣壳蛋白基因; 表达; 融合蛋白

RT-PCR, 基因克隆, 基因表达

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2000)02-0200-04

水稻草状矮化病于 70 年代曾在南亚、东南亚大面积发生, 给当地的水稻生产造成严重损失, 在我国也有分布^[1]。其病原是水稻草矮病毒(*Rice grassy stunt virus*, RGSV), 为纤细病毒属(*Tenuivirus*)的一个成员, 病毒粒体丝状, 由核衣壳蛋白和基因组 RNA 组成^[2]。基因组含六个 ssRNA 片段, 均为双义编码^[3,4], 其中 RNA5 的毒义互补链编码核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, NCP)^[3]。本文报道应用 RT-PCR 技术获得 RGSV 沙县分离株(RGSV-SX)NCP 基因的 cDNA 克隆, 并得到其在大肠杆菌中的表达产物。

1 材料与方法

- 1.1 病毒分离株 为本所采自福建沙县, 经室内分离纯化, 保存在台中本地 1 号(TN1)上的水稻草矮病毒沙县分离株(RGSV-SX)。
- 1.2 质粒与试剂 质粒 pGEX-2T 为 Pharmacia 产品, pGEM-T easy vector system、AMV 反转录酶及 T4 DNA 聚合酶购自 Promega 公司, Taq 酶及限制性内切酶为 MBI 产品, 回收试剂盒 QIAEX II Gen Extraction Kit 为 QIAGEN 产品, PVDF 膜为 DuPont 公司产品。
- 1.3 引物 根据 RGSV IRR1 分离株(RGSV-IR)的 RNA5 序列^[3]设计: P1(3'端) 5' AGTGT-CATATGGGTAAGTGCAATTTGG 3'(划线处为 *Nde* I 酶切位点), P2(5'端) 5' TCACAGGATCCACTACGCTAAAGGC3'(划线处为 *Bam* HI 酶切位点)。
- 1.4 病毒提纯及 RNA 提取 病毒提纯参照文献[5]和[6]的方法, 略作修改。提纯病毒经 SDS 和蛋白酶 K 处理, 酚/酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀得到病毒 RNA。
- 1.5 NCP 基因的 cDNA 克隆及序列测定 反转录按 AMV 反转录酶使用说明进行, PCR 扩增条件为: 94 ℃ 变性 1 min, 52 ℃ 退火 2 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环。PCR 产物回收、连接、转化及筛选均按常规方法进行, 得到重组克隆 pTNCP。序列测定在 ABI 377 型 DNA 测序仪上进行。
- 1.6 表达载体的构建 质粒 pGEM-T 的克隆位点两侧各有一 *Eco*R I 位点。以 *Nde* I 酶切重组质粒 pTNCP, T4 DNA 聚合酶补平, 再用 *Eco*R I 酶切, 回收 1.0 kb 片段, 与 *Sma* I 和 *Eco*R I 双酶切的质粒 pGEX-2T

收稿日期: 1999-02-04, 修回日期: 1999-05-17

* 基金项目: 福建省科委重点项目(95-Z-4)

作者简介: 张春媚(1970年-), 女, 福建省晋江市人, 助理研究员, 博士。研究方向为植物病毒学。

连接,转化 *E. coli* DH5 α , 筛选得到重组质粒 pGTNCP。

1.7 NCP 基因在大肠杆菌中的表达 含质粒 pGTNCP 的菌株诱导表达按 pGEX-2T 的说明书进行, 设置未转化、转化质粒 pGEX-2T 的 DH5 α 为对照。分别对诱导前后的培养液取样, 于 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳。

1.8 融合蛋白的免疫学鉴定 采用 Western 印迹法, 按文献[7]的方法及 PVDF 膜的说明书进行, 第一抗体 RGSV 抗血清由 Hibino 博士赠送, 第二抗体为 Sigma 公司的羊抗兔 IgG-AP。

2 结果与讨论

2.1 PGSV-SX NCP 基因的克隆、序列测定及同源性分析

以 RGSV-SX 的基因组 RNA 为模板, RT-PCR 得到长为 1 027 bp 的包含 NCP 基因的 cDNA 片段。将其与载体 pGEM-T 连接, 得到重组质粒 pTNCP(图 1a)。

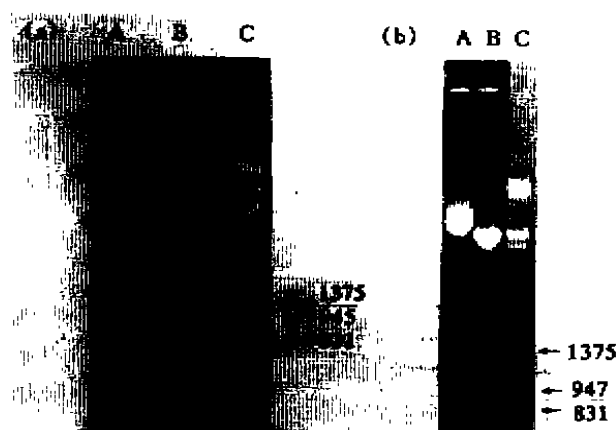


图 1 RGSV-SX NCP 基因的 RT-PCR 产物及重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 RT-PCR of RGSV-SX NCP and analysis of recombinant plasmids

(a): A: pTNCP digested with *EcoRI*; B: RT-PCR product; C: λ DNA/*Hind* III + *EcoRI* marker

(b): A: pGTNCP digested with *EcoRI*; B: pGTNCP digested with *Bam*HI; C: λ DNA/*Hind* III + *EcoRI* marker

序列测定结果表明, RGSV-SX NCP 基因编码区由 978 个核苷酸组成, 与 RGSV-IR NCP 基因相比存在 6 个核苷酸的差异, 序列同源性为 99.4%, 其中仅有 1 处变异引起了氨基酸序列的变化, 氨基酸序列同源性为 99.7% (图 2), 表明两个分离物具有很高的亲缘关系。

2.2 融合蛋白的表达

因载体 pGEX-2T 上的 *Sma*I 位点前有一 *Bam*HI 位点, 故重组质粒 pGTNCP 经 *Eco*RI 酶切将得到约 6 kb 的条带, 而经 *Bam*HI 消化则应得到 5 kb 和 1 kb 两个片段, 电泳结果与预期一致(图 1b)。得到的融合蛋白分子量为 62 kD, 为质粒本身的谷胱甘肽转移酶(GST)分子量(26 kD)和 RGSV-NCP 分子量(36 kD)之和, 也与预期结果一致(图 3), 说明表达载体的构建正确, NCP 基因得到完整表达。

2.3 融合蛋白的免疫学鉴定

Western 印迹分析结果显示, 融合蛋白和提纯病毒的核衣壳蛋白一样, 均与 RGSV-IR 病毒粒体的抗血清有很好的免疫结合, 而作为对照的不含质粒、含 pGEX-2T 的 DH5 α 蛋白均无显色反应(图 4)。可见, 所表达的融合蛋白具有病毒核衣壳蛋白的抗原性。

水稻草矮病毒是由介体褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)以持久性方式传播的。褐飞虱是一种广泛分布于我国、日本和东南亚各国的远距离迁飞性害虫, 在我国稻区常成群严重发生。虽

```

ATGGGTAAAGTCCAATTTGGAGATGGTCACTGGGCAATAACAAGGAATGGTCTGAT*TTGTTGTCAGAAATATTTTCAAAAATC
M G K V Q F G D G H W A N N K E W S D' L L S E I F S K I
AGAQCATCTATAGATGGATTGCCAATGCTACAGCTGATTTGGCTGCAGGATTGGAGTATCAGGCITTCACCTGAAAAGATT
R A S I D G F A N A T A D L A A G L E Y Q A F N P E K I
TTGAGGAAGTTGATTGCATCCTCAACTTCATTGGATGACTTTGTTAAGGATATGCCGTGACCTCTTGGTGGCCAGGTACACCAGA
L R K L I A S S T S L D D F V K D M R D L L V A R Y T R
GGAAGTACGCTTCTGTTCAATGCTAAAACTCAATTGAGAAAAGCTAAGGATAAGAAGAAGGCAG/AAGCTATTCAGGACTG*ATA
G T S F L F N A K N S I E K A K D K K K A E A I Q V L I
AATAGGTACGGAGTAAAAAAGAATGCTGGAGACAATGCTGTTGATCAAGCCACTTTGGGAAGA*ATAAGTCAAGTGC*GGCATAT
N R Y G V K K N A G D N A V D Q A T L G R I S Q V L A Y
ATGGCATTGAGAGTTGCTTTACAAATCACAGACTATCATAAGCCAATCATACCATGAGACCCAT*AGTACCGTTGATATTAAG
M A L R V A L Q I T D Y H K P I I P L R P I S T V D I K
AATGCTATCATTGATGTTGTTCCACAATTTTATATCTTAAAGCAGATCAACTTGATTCAAAAGACC*ACTCAGAGCCAGCTCTG
N A I I D V V P Q F L Y L K A D Q L D S K T N S E A A L
TATGTAATCCATTGTTGTTACCAAGTCTGTGTCTGAAAGAATCATGACTAAAGCTCAGAAGGA*AAAGCACAGTGTCCACACT
Y V I H L C Y Q V C V S E R I M T K A Q K D K H S V H T
AAGTCAGCAATGATAACACACTGCATGGGTTTGTCAACCTGGCTATOGATAATTCTTCAGTAGTGTCTGATGATAAGATAGCT
K S A M I T H C M G F V N L A M D N S S V V S D D K I A
GGTAGAAGGATGATCTCAGGTCG*GGGGACTACAGGAAAAGCTGCTCTAGATGCCACAGGC*GGGTCATGTATCATTGATGTTGTT
G R R M I S G P W G L Q E T A L D A T G C A C I I D V V
GATTTCTGCTGCAGGGGACACAAAGTAACAGATGCTGTGGCOCCAGTTAGGCTGTTACAGATTAGCTATTGAGTGCATAAAAAGAT
D F C C R G H K V T D A V A P V R L F R L A I E C I K D
ACAAGTCTGTAAGGATGCTGGAGTTAAATTGAAGACTCTGGTTGATAAGTGA
T A D L K D A G V K L K T L V D K *
    
```

图 2 RGSV-SX NCP-cDNA 的核苷酸及编码蛋白的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of NCP-cDNA of RGSV-SX

indicates the difference with the NCP gene of RGSV-IR

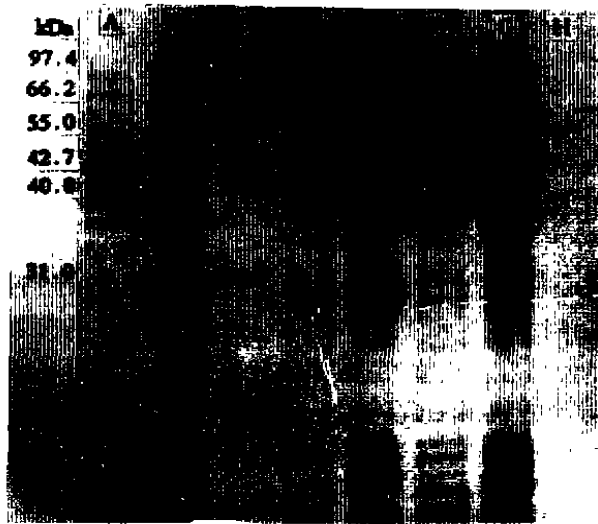


图 3 RGSV-SX NCP 在大肠杆菌 DH5 α 中表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression of RGSV-SX NCP gene in *E. coli* DH5 α
A&B. *E. coli* DH5 α before & after induction; C. Protein marker; D&E *E. coli* DH5 α with pGEX-2T before & after induction; F&G. *E. coli* DH5 α with pGT-NCP before and after induction; H. Purified RGSV-NCP. ← indicates the expressed fusion protein

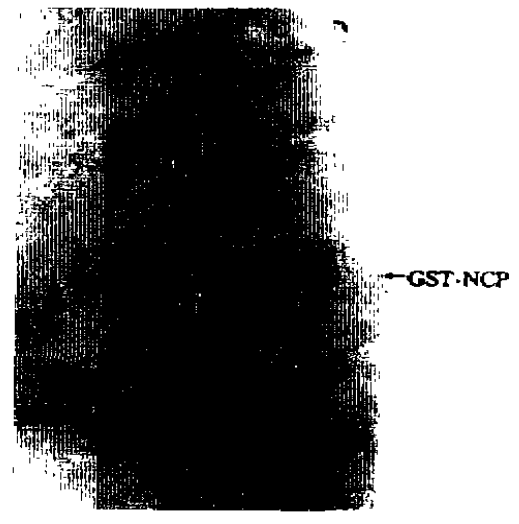


图 4 表达产物的 Western 印迹分析
Fig. 4 Western blot analysis of expressed products
A. DH5 α ; B. Purified RGSV-NCP; C. DH5 α with pGTNCP; D. DH5 α with pGEX-2T

然近年来我国水稻草矮病很少发生,但在东南亚一带仍有分布,因此有可能随传毒介体的北迁而传播蔓延到我国,对我国水稻生产构成潜在威胁,所以建立对水稻草矮病的常规血清学检测技术是十分必要的。但由于RGSV的提纯比较困难,得率很低,因而制约抗原来源。为此我们构建大肠杆菌表达载体,以期获得良好抗原来制备抗血清。目前蛋白纯化和抗血清的制备工作正在进行。

参 考 文 献

- [1] 林奇英,谢联辉,谢莉妍,等.中菲两种水稻病毒病的比较研究 II.水稻草状矮化病的病原学[J].农业科学集刊, 1993, 1(1):203~206
- [2] Ramirez B-C, Haenni A-L. Molecular biology of tenuiviruses, a remarkable group of plant viruses [J]. J Gen Virol. 1994, 75:467~475
- [3] Toriyama S, Kimishima T, Takahashi M. The proteins encoded by *rice grassy stunt virus* RNA5 and RNA6 are only distantly related to the corresponding proteins of other members of the genus *Tenuivirus* [J]. J Gen Virol. 1997, 78:2355~2363
- [4] Toriyama S, Kimishima T, Takahashi M, et al. The complete nucleotide sequence of the *rice grassy stunt virus* genome and genomic comparisons with viruses of the genus *Tenuivirus* [J]. J Gen Virol, 1998, 79:2051~2058
- [5] Hibino H, Usugi T, Omura T, et al. *Rice grassy stunt virus*: a planthopper-borne circular filament [J]. Phytopathol. 1985, 75:894~899
- [6] Toriyama S. Ribonucleic acid polymerase activity in filamentous nucleoproteins of *rice grassy stunt virus* [J]. J Gen Virol, 1987, 68:925~929
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Cloning and Expression in *E. coli* of Nucleocapsid Protein Gene of *Rice Grassy Stunt Virus*

ZHANG Chun-mei, WU Zu-jian, LIN Qi-ying, XIE Lian-hui

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

Abstract: Based on the known RNA sequence of *rice grassy stunt virus*, IRRI isolate (RGSV-IR), the cDNA of nucleocapsid protein (NCP) gene was obtained by RT-PCR, with genomic RNAs of Shaxian isolate (RGSV-SX) as template. The cDNA was then cloned into pGEM-T vector and sequenced. The results showed that the nucleotide sequence between the two isolates was 99.4% identical. A bacterial expression plasmid pGTNCP which produced a fusion protein with molecular weight of about 62 kD was constructed using the cDNA clone and vector pGEX-2T. Western blot analysis showed that the fusion protein reacted strongly with antibodies raised against RGSV particles.

Key words: *Rice grassy stunt virus*; Nucleocapsid protein gene; Expression; Fusion protein