维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷2期
2002年5月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

17(2):142-144
May 2002

江苏水稻黑条矮缩病毒S10的cDNA克隆序列分析*

王朝辉，周益军**，范永坚，程兆榜，张文荟
(江苏省农业科学院植物保护研究所，江苏 南京 210014)

cDNA Clone and Sequence Analysis of Segment 10 of Rice Black-Streaked Dwarf Fijivirus in Jiangsu

WANG Zhao-hui, ZHOU Yi-jun**, FAN Yong-jian, CHENG Zhao-bang, ZHANG Wen-hui
(*Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*)

Abstract: An isolate of rice black-streaked dwarf Fijivirus originally from Lianyuangng, Jiangsu, China was used to inoculated maize to propagate the virus. Improved single primer amplification technique was adopted to clone the viral genomic dsRNA S10 for sequence determination. The result showed: the full length of S10 is 1 801 bp and has the same organization with MRDV in Italy and RBSDV in Japan. The similarity of nucleotide and predicted protein were 87.5% and 92.6% with MRDV, 93.3% and 96.4% with RBSDV. This study provides a new method for the sequence determination of viral dsRNA.

Key words: Rice black-streaked dwarf Fijivirus; cDNA clone; S10; Sequence analysis

摘要：从来自江苏连云港并在本实验室保存的水稻黑条矮缩病毒接种的病株玉米中提取dsRNA，采用改进的单引物扩增技术获得了病毒基因组片段S10的cDNA克隆并测定了其全序列。结果表明S10全长1 801bp，含有一个ORF，组织结构与日本报道的RBSDV基本一致，核苷酸和推导的氨基酸序列与MRDV的相似性分别为87.5%和92.6%，与RBSDV的相似性分别为93.3%和96.4%。该研究也为病毒dsRNA克隆和序列分析奠定了基础。

关键词：水稻黑条矮缩病毒；cDNA克隆；S10；序列分析

中图分类号：S433　　**文章标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2002)02-0142-03

水稻黑条矮缩病毒(rice black-streaked dwarf Fijivirus, RBSDV)属于呼肠孤病毒科(*Reovirdae*)斐济病毒属(Fijivirus)，基因组由10条双链RNA(dsRNA)组成，主要经灰飞虱(*Laodelphax striatellus* Fallén)以持久性方式传播[1,2]。该病毒由日本首次报道，随后的研究发现它与欧洲报道的玉米粗缩病毒(maize rough dwarf Fijivirus, MRDV)有较高的同源性。20世纪50～60年代我国首次对玉米和水稻上这两种病毒作过报道，90年代后在许多玉米和水稻产区爆发流行，造成严重损失。我国玉米粗缩病病原究竟是玉米粗缩病毒还是水稻黑条矮缩病毒历史上一直存在着争议，但近年来报道的部分地区的分离物序列分析却倾向于水稻黑条矮缩病毒[3-5]，并且各个片段的功能分析，它们如何协调完成侵染、复制及致病机理等方面问题都需要分子水平的研究和整个基因组全序列的测定。本文报道一种dsRNA cDNA的克隆方法及江苏连云港的RBSDV分离株S10的序列分析。

1 材料与方法

1.1 材料

采自江苏连云港玉米粗缩病田边禾本科杂草上的灰飞虱温室内单头接种不同的寄主植物分析验证后作为实验用毒源。该毒源温室内接种发病的玉米作为提取病毒dsRNA的材料。

1.2 水稻黑条矮缩病毒dsRNA的提取

20g感病的玉米叶片于液氮中研成粉末。加

收稿日期：2001-07-27，修回日期：2001-10-18
* 基金项目：江苏省九五重点攻关(BE96386)；江苏省自然科学基金(BJ97132)。
作者简介：王朝辉(1974－)，男，山东招远籍，现为中国农业大学生物学院博士研究生，研究方向为分子病毒学。
** 通讯作者。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com

40mL提取缓冲液(2×STE,1%SDS,1%β-巯基乙醇,0.5mg/mL皂土)匀浆,然后用水饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提两次,上清中dsRNA在含有16%乙醇(v/v)的1×STE中吸附到纤维素粉(CF-11,Sigma)上。装柱后用200mL含16%乙醇的1×STE洗柱,1×STE洗脱dsRNA,异丙醇沉淀,酒精洗涤后溶于1×SET中,10%SDS-PAGE分析验证RBSDV基因组dsRNA,1.5%琼脂糖凝胶电泳分离各片段后用agarose gel DNA extraction kit(Roche)回收S10,并用High pure RNA isolation kit(Roche)纯化。

1.3 cDNA克隆

采用改进的单引物扩增技术[6]克隆cDNA。连接反应:50μL的反应混合物中含有50mmol/L Tris-Cl(pH7.5),10mmol/L $MgCl_2$,10mmol/L DTT,1mmol/L ATP,0.006%BSA,0.8μmol/L,引物1 5'-PO_4-GTACT AGTCG ACGCG TGGCC-NH_2-3',1~10ng纯化的S10 dsRNA,10U T_4 RNA连接酶(TaKaRa)。10℃的条件下连接16h。混合物用High pure RNA isolation kit(Roche)纯化。反转录:8.5μL纯化的带有引物1的dsRNA中加入1.5μL DMSO 99℃变性1min后迅速冰浴3min,混合物中再加入4μL 5×反转录缓冲液,1.5μL dNTP,1μL引物Primer Ⅱ GGCCA CGCGT CGACT AGTAC,0.5μL RNase抑制剂和200 U M-MLV反转录酶,加0.1%DEPC处理的双蒸水至20μL。反应42℃2h,70℃ 15min。PCR:反应体系中含有2mmol/L $MgCl_2$,0.15mmol/L dNTP,6%DMSO,0.4mmol/L引物Ⅲ CACGCG TCGAC TAGTA CAAG 0.4mmol/L引物Ⅳ CACGCG TCGAC TAGTA CGAC(黑体部分是根据保守序列设计的锚定碱基),2μL cDNA溶液,1×EX Taq缓冲液和2U EX Taq(TaKaRa),总体积100μL。反应条件是94℃变性2min,40个循环;94℃ 50sec,56℃ sec,72℃2min。最后72℃延伸10min。

1.4 PCR产物克隆及Northern杂交

PCR产物经琼脂糖回收纯化*Hin*d Ⅲ酶切初步验证后连接到pMD 18-T载体(TaKaRa)上,转化*E.coli*,DH5α,蓝白斑筛选重组子,碱裂解法提取质粒,*Sal* Ⅰ酶切,1%琼脂糖电泳分析。RBSDV基因组dsRNA在10%SDS-PAGE上电泳30h,EB染色Bio-Rad凝胶成像系统记录条带位置后转移核酸于尼龙膜上,80℃固定2h的杂交膜在50%DMSO中煮沸10min变性dsRNA。纯化的PCR产物用DIG PCR标记用作探针。按DIG DNA杂交检测试剂盒介绍的方法杂交检测。

1.5 序列测定

酶切及杂交验证的阳性克隆委托TaKaRa公司测序。

2 结果及讨论

2.1 cDNA克隆

由于T_4 RNA连接酶具有连接带有$-PO_4$或-OH末端的寡核苷酸片段到带有-OH或$-PO_4$的dsRNA末端的功能,因此可以在未知序列dsRNA末端连接上一段合成的寡核苷酸,再以与其互补寡核苷酸为引物RT-PCR获得cDNA。引起玉米粗缩病的MRDV和RBSDV末端都有保守的5'AAGUUUUUU…UGUC3',而单引物扩增法克隆dsRNA时根据两端保守序列在PCR引物上加上锚定碱基可以获得长片段的克隆[6],因此本实验中PCR所用的引物在包含了大部分连接于dsRNA 3'末端的寡核苷酸互补序列的情况下又根据上述保守的末端序列引入三个锚定碱基,以获得全长的cDNA克隆。病毒基因组S10 RT-PCR结果如图1所示,获得片段大小约为1.8kb,与报道的RBSDV相符。

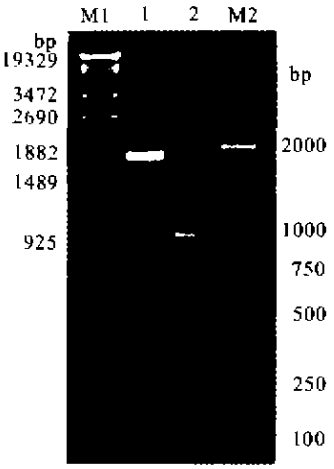

图1 cDNA *Hin*d Ⅲ酶切

Fig 1 Digestion of cDNA by *Hin*d Ⅲ

M1,λ-*Eco*T14 1 digest;1,PCR product;2,cDNA/*Hin*d Ⅲ;M2,DNA marker

应用RT-PCR-RFLP可以分析诊断病毒的分子变异[7],因此实验根据日本报道的RBSDV S10,意大利报道的MRDV S10和国内的其它分离物都含有*Hin*d Ⅲ酶切位点,并且其数目和位置有一些差

维普资讯 http://www.cqvip.com

异，用 *Hin*d Ⅲ酶切来初步验证分析获得的 PCR 产物。如图 1 所示，酶切后共出现 4 条带，大小与推导的类似，由此可以推知该 cDNA 片段可能是病毒基因组 S10，并含有 3 个 *Hin*d Ⅲ酶切位点。片段连接到载体上筛选阳性克隆（如图 2 所示），命名为 pMR-S10。

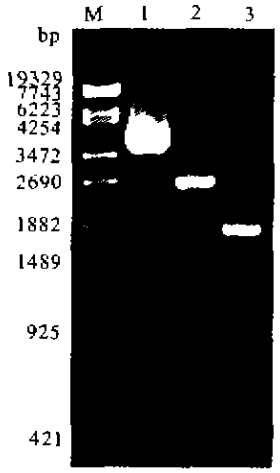

图 2 阳性克隆质粒检测图谱

Fig.2 Plasmids profiles of the positive clone

M, λ-*Eco*T14 I digest; 1, pMR-S10/*Sal*I; 2, pMD-18T; 3, PCR product.

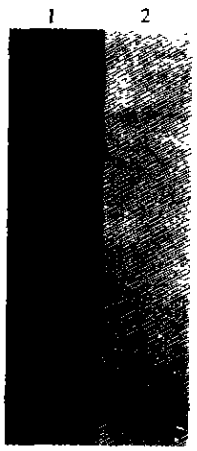

图 3 cDNA 探针与基因组片段 Northern 杂交

Fig.3 Northern blot of viral genomic segments by cDNA probe

1, viral dsRNA; 2, blot result

实验中采用杂交法来进一步证实获得的产物是病毒基因组的 cDNA 片段，结果如图 3 所示。由杂交条带位置及强度可以断定获得的片段就是病毒基因组 S10 的 cDNA。也表明了本实验中采用的改进的单引物扩增法克隆 RBSDV 和 MRDV 基因组 dsRNA 的可行性。

2.2 序列测定与分析

委托 TaKaRa 公司采用步行法测定了 S10 的 cDNA 全序列，并登录 Genbank 数据库，登录号为 AY039835。该 cDNA 全长 1 801bp，在 402nt，1 327nt和 1 474nt 处含有 *Hin*d Ⅲ酶切位点。序列分析表明所测的病毒分离物 S10 在总长度、G/C 含量、非编码区长度和开放阅读框（ORF）等基因组织形式与报道的 RBSDV 基本一致，核苷酸序列和推导的氨基酸序列同源性比较发现其与日本的 RBSDV（D00606）更接近，分别为 93.3% 和 96.4%，与意大利的 MRDV（L76560）相对远一些，分别为87.5% 和 92.6%。因此，根据以往的研究报道[8~11]和本研究 S10 全序列比较认为：如果 RBSDV 和 MRDV 是两种病毒那么本实验获得的江苏分离物应该是 RBSDV 而不是 MRDV，并且近年来我国其它地区的分离物的序列与 RBSDV 的同源性也都高于 MRDV[3~5]，根据这些结果可以认为江苏省内的玉米粗缩病病原和水稻黑条矮病病原都只是 RBSDV，而不存在 MRDV。

参考文献

[1] Boccardo G, Milne R G. Plant reovirus group[J]. CMI/AAB Descriptions of plant viruses, 1984, set18 No 294: 1－8.

[2] Shikata E. Rice black-streaked dwarf virus[J]. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses[J]. 1974, Set8 No 135: 1－4.

[3] Fang S, Yu J, Feng J, *et al*. Identification of rice black-streaked dwarfFijivirus in maize with rough dwarf disease in China[J]. Arch Virol, 2001, 146: 167－170.

[4] Zhang H, Lei J, Chen J. Adwarf disease on rice, wheat and maize in different region of China is caused by rice black-streaked dwarf virus(RBSCV)[A]. In: Zhou GH and Li HF(eds.). Proceedings of the first Asian conference on plant pathology[M]. Beijing: China Agricultural Scientech, 2000.

[5] 邓文生，杨希才，张玉满. 玉米粗缩病毒基因组第七组分的 cDNA 克隆及序列分析[J]. 微生物学报, 2000, 40: 489－494.

[6] Attoui H, Billoir F, Cantaloube J F, *et al*. Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes[J]. Journal of Virological Methods, 2000, 89: 147－158.

[7] 杜志强，周广和，马占鸿，等. RT-PCR-RFLP 在大麦黄矮病毒检测中的应用[J]. 病毒学报, 2000, 16: 83－85.

[8] 周益军，范永坚，程兆榜，等. 江苏省玉米病毒病研究 I. 玉米粗缩病的发生与病原的初步鉴定[J]. 江苏农业学报, 1998, 14(4): 246－248.

[9] 王朝辉. 玉米粗缩病病原及检测方法研究[D]. 南京：南京农业大学, 2001.

[10] 吴淑华，王朝辉，范永坚，等. 江苏省玉米粗缩病病原病毒的 RT-PCR 检测[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(4): 369－372.

[11] 王朝辉，周益军，范永坚，等. 应用 RT-PCR 斑点杂交法和 SDS-PAGE 检测水稻黑条矮缩病毒[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(4): 24－24.