维普资讯 http://www.cqvip.com

第18卷5期 中国病毒学 18（5）：496—499
2003年10月 VIROLOGICA SINIGA October 2003

水稻矮缩病毒非结构蛋白基因 *S6* 的表达和抗血清的制备*

马中良，杨怀义，田 波**

（中国科学院微生物研究所分子病毒室，北京，100080）

Expression of Non-structural Protein S6 of *Rice dwarf virus* in *E. coli* and Preparation of Its Antiserum

MA Zhong-liang, YANG Huai-yi, TIAN Bo**

(Department of Molecular Virologogy, Institue of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, *China)*

Abstract: *S6* gene of a Chinese isolate of *Rice dwarf virus* (RDV) was amplified by RT-PCR and then cloned into pGEM-Teasy. Sequence analysis showed that its nucleotide sequence had high identity to a Japanese isolate of RDV and contained high percent of rare codons. *S6* gene was expressed in inclusion body with high yield in *E.coli* after being subcloned into expression vector pGEX-6P-1. Immune rabbit with S6 protein obtained the antiserum. The antiserum having a titer of 1∶3000 tested by ELISA can specifically react with the expressed S6 protein. Our study confirmed that the antiserum could be used to detect S6 protein in RDV-infected rice tissues.

Key words: *Rice dwarf virus*; Non-structural protein; Expression; Antiserum

摘要：经 RT-PCR 扩增出水稻矮缩病毒（RDV）中国分离物非结构蛋白基因 *S6*，并克隆至 pGEM-Teasy 载体上。序列分析表明该基因与日本株具有高度同源性，并且含有较高比例的稀有密码子。将 *S6* 基因克隆到表达载体 pGEX-6P-1，并转化大肠杆菌，该基因在大肠杆菌以包涵体形式大量表达。以表达的融合蛋白作抗原免疫家兔，制备抗 S6 蛋白的抗血清，ELISA 测定表明，该血清与抗原共价特异性反应，抗血清的效价为 1:3000. Western blot 印迹实验表明该抗血清能特异性检测 RDV 感染的水稻组织中的 S6 蛋白，因而可作为感染 RDV 的水稻植株的分子手段。

关键词：水稻矮缩病毒；非结构蛋白 S6；表达；抗血清

中图分类号：S432.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5125 (2003) 05-0496-04

水稻矮缩病是我国南方水稻产区较为流行的水稻病毒病害[1-2]，其病原物是水稻矮缩病毒（*Rice dwarf virus*, RDV)。该病毒由叶蝉传毒，属植物呼肠孤病毒属，为双链 RNA 病毒，基因组由 12 片段（Segment, S）组成。我们从感病的水稻叶片中分离纯化了 RDV，克隆了非结构蛋白基因 S6，制备了抗血清，为准确检测水稻中的 RDV 奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

RDV 病毒液由北京大学李毅教授惠赠。pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司，pGEX-6p-1 表达载体购自 Amersham 公司。*Ecoli* DH5α，BL21（DE3）由本室保存。

各种限制性内切酶，*Taq* DNA 聚合酶，碱性磷酸酶(CIAP) 购自 TaKaRa 公司。PVDF 膜为 Gelman 产品，羊抗兔 HRP-IgG 为北京中山生物技术公司产品。其余生化试剂均为分析纯的进口或国产试剂。

1.2 RDV *S6* 基因的克隆及序列分析

RDV 的提纯及总 RNA 的提取按叶寅等方法[3]，

收稿日期：2003-04-27，修回日期：2003-07-02
* 基金项目：国家重大基础研究发展规划项目（G2000016205）；国家自然科学基金（39928006）
作者简介：马中良（1970-），主要从事分子病毒学研究。
** 通讯作者。Corresponding author. E-mail: tienpo@ sun.im.ac.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

根据已经发表的日本株的序列[4]，设计并合成引物1：5′ ggg*aattc*atggacacacagaaactctttg 3′；引物2：5′ gga*ctgcag*cattacctagacccagtaaaagc 3′。为了便于克隆在引物1和引物2的5'端分别引入 *Eco*R I 和 *Pst* I 位点(斜体部分)。以提取的总RNA为模板，Random 9mers 作引物合成 cDNA 第一链，作为 PCR 模板。PCR 反应为：cDNA 第一链 10 μL, 2.5 mmol/L dNTP 8μL, 引物 (100 pmol) 各 1μL，*Taq* DNA 聚合酶 1U。PCR 的条件为 94℃ 5min; 之后 94℃1 min，47℃ 1 min，65℃ 1.5 min，共 30 个循环，最后一个循环后 65℃延伸 10 min。PCR 产物在 1%琼脂糖上进行电泳，将扩增片段经回收纯化后与 pGEM-Teasy 载体连接，转化大肠杆菌 *E. coli* DH5α，提取质粒，经酶切鉴定，获得重组克隆 (pGT-S6)。由大连 TakaRa 公司测定重组克隆的全序列，用 DNASIS 和 PROSIS 软件 (Hitachi Software Engineering Co, Ltd) 进行序列分析。

1.3 RDV *S6* 基因在大肠杆菌中的诱导和表达

pGT-S6 经 *Eco*R I 酶切，获得 S6 片段，与 pGEX-6p-1(载体已经 *Eco*R I 酶切后，然后用 CIAP 去磷酸化）连接，获得重组克隆 (pZLS6)。*S6* 基因的以 5'端与载体的谷胱苷肽转移酶蛋白（GST）基因的下游相连接。将 pZLS6 和相应的空载体 pGEX-6p-1 转化大肠杆菌 BL21(DE3)，用 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h，离心收集菌体，向菌体中加入 1/10 体积的超声缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 2 mmol/L EDTA pH 8.0)，再加入 10 mg/mL 溶菌酶及 1% Triton X-100, 30 ^{0}C 放置 5 min 后，冰浴下采用 JY92II 超声波细胞粉碎机破碎细胞，在 12%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳分析。

1.4 RDV S6 蛋白的抗血清制备

RDV S6 蛋白与 GST 的融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳后，冰浴下用 0.25 mol/L KCl 染色，切下特异性蛋白带，在冰上研磨成匀浆，以 1 mg/mL 牛血清白蛋白作为标准蛋白，用 Folin-酚法测定抗原浓度。共分四次免疫家兔，每隔 7d 进行一次肌肉注射，第 4 次为加强免疫，4 次免疫抗原的浓度分别为 18、15、14、10 mg/mL。

1.5 抗血清效价的测定

采用直接 ELISA 测定，抗原浓度为 1 mg/mL，抗血清作一系列稀释，磷酸缓冲液(PBS)为阴性对照，在 A_{490nm} 下测定吸收数值。

1.6 Western blot 印迹

对感染了 RDV 的水稻叶片，进行 Western blot 印迹检测，抗血清浓度 1：500，以免疫抗原为阳性对照。水稻叶片总蛋白的制备方法为：取 1g 左右的叶片，加入液氮研磨至粉末，加入 5mL 提取液(50 mmol/L Tris-HCl, 60 mmol/L Na_2CO_3)，10000 r/min，离心 10 min。上清用 PEG20000 浓缩至 1/10 的体积，取 10 μL 用于检测。

2 结果与讨论

2.1 RDV *S6* 基因的克隆

从纯化的 RDV 中，经 RT-PCR 得到约 1.5 kb 的片段。将 PCR 扩增获得的产物与克隆载体 pGEM-Teasy 相连，并转化大肠杆菌，获得重组克隆 pGT-S6。pGEM-Teasy 载体两侧含有 *Eco*R I 位点，引物1含有 *Eco*R I 位点，酶切可得到1.53 kb 的条带(图1，图2)。而 *S6* 基因的5'端的下游 242 bp 处有一个 *Hind* III 位点，因此用 *Hind* III 和 *Pst* I（引物2所含酶切位点）酶切，得到了约 1.3 kb 的条带（图1，图3），酶切试验表明 *S6* 基因已被成功克隆到载体中。

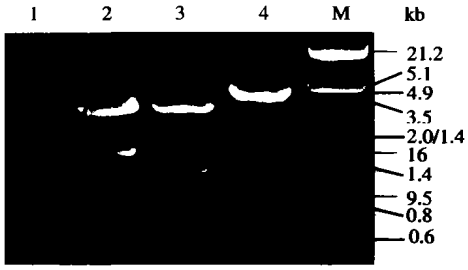

图1 重组质粒 pGT-S6 的酶切分析

Fig.1 Restriction analysis of the pGT-S6

1, pGT-S6; 2, pGT-S6/*Eco*R I; 3, pGT-S6/*Hind* III + *Pst* I; 4, pGT-S6/ *Pst* I; 5, Marker (λDNA/ *Eco*R I + *Hind* III)

2.2 RDV *S6* 基因的序列分析

将所得到的 RDV *S6* 基因的序列（GenBank AY302568）与日本流行株系相比 (GenBank M91653)[4]，其核酸序列同源性为 97.1%，编码氨基酸序列的同源性为 98.8%，在所有变异的氨基酸密码子中，均不涉及到稀有密码子的改变。说明这些位置上的稀有密码子在进化上具有一定的保守性。RDV 基因组双链 RNA 末端序列也是比较保守的，*S6* 的 5′ 末端序列为 5′ -GGCAAA-3′，3′ 末端为 5′ -CGAU-3′，具有明显的植物呼肠孤病毒基因序列的特征。

2.3 RDV *S6* 基因在大肠杆菌中的表达

诱导含有重组克隆 pZLS6 的大肠杆菌表达。通过实验表明，在 0.1mmol/L IPTG，25℃，诱导 4h，可获得最大量的蛋白表达(数据未显示)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

SDS-PAGE 分析表明，获得约 89.2 kDa 的融合蛋白，与理论上的融合蛋白的分子相符(S6 蛋白 57.3kDa, GST 蛋白 31.5 kDa)(图 2)。将表达菌体细胞超声破碎，上清和沉淀分别在 SDS-PAGE 上电泳分析，仅在沉淀中含用大量的特异性表达的蛋白，说明所表达的融合蛋白以包涵体形式存在。

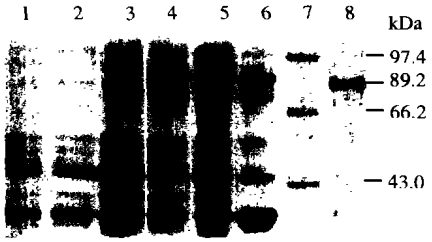

图 2 RDV-S6 在大肠杆菌中的表达和纯化

Fig.2 Expression and purification of RDV-S6 in *E.coli*.

1, *E.coli*(DE3) containing pGEX 6p-1; 2, *E.coli*(DE3) containing pZL 6p-1; 3, Supernant of pZL 6p-1 after ultrason; 4, Pellet washed by Triton X-100; 5, Pellet; 6, Pellet washed by PBS (2mmol/L Urea); 7, Marker; 8, Purified protein.

2.4 RDV S6 蛋白的抗血清检测

对得到的抗血清分别稀释，进行 ELISA 检测(表 1)，表明所制备的抗血清与免疫抗原具有特异性免疫反应。

表 1 RDV-S6 抗血清的 ELISA 检测

Table 1 ELISA test of antiserum for RDV-S6 protein

	Dilution (×)								
	50	100	200	400	1000	1500	2000	3000	4000
A 490nm	0.87	0.95	1.02	1.10	1.08	1.00	1.08	0.96	0.75

利用所制备的抗血清对感染 RDV 的叶片进行 Western 印迹检测,并以正常健康的叶片作对照(图 3)。

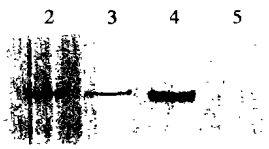

图 3 感病水稻的 Western 印迹

Fig.3 Western blot analysis of RDV-infected rice

1, Tobacco mosaic viron; 2, RDV viron; 3, Infected rice; 4, Purified RDV-S6 protein; 5, Health rice.

由 Western 印迹的结果可以看出只有感染了 RDV 的水稻叶片与制备的抗血清有特异性的免疫反应，对其他病毒如烟草花叶病毒（*Tobacco mosaic virus*）不发生免疫反应，说明我们制备 GST-S6 融和蛋白的抗血清可用于感染 RDV 的水稻的分子检测。

3 讨论

通常 AGA 和 AGG 密码子在序列中出现，会大大降低该基因在大肠杆菌中的表达，这两种密码子编码的氨基酸含量越高表达越困难，尤其是两个 AGA 或 AGG 串联时，容易使基因的翻译提前终止，而使该基因在大肠杆菌中表达量极低或根本不表达[5]。在 RDV-S6 基因编码的氨基酸中，精氨酸的含量高达 5.1%，而稀有密码子 AGA 和 AGG 占精氨酸密码子的 31.8%。所以通过比较我们选择了用 pGEX6P-1 表达载体以融合蛋白的方式表达 S6 基因。与 GST 融合表达的蛋白一般以可溶性蛋白存在。为此，我们实验了各种条件下的蛋白表达情况，包括诱导的温度，IPTG 浓度，时间等(数据未显示)，所得到的蛋白都是以包涵体形式存在.可能是该融合蛋白分子量较大，并且 S6 蛋白含有大量的疏水氨基酸所致。

到目前为止，RDV 基因组的 12 个片段的核苷酸序列已经全部测出[6~7]，但是相关基因编码的蛋白的功能尚很少了解[8~10]。Kimura 等人认为 S6 编码的蛋白是决定 RDV 在水稻中的致病能力的决定因子[11]，但有待进一步证实. 我们目前的工作为确定 S6 蛋白在 RDV 侵染及自身繁殖中的作用奠定了一定基础。

参考文献

[1] Han S, Wu Z, Yang H, *et al*. Ribozyme-mediated resistance to rice dwarf virus and the transgene silencing in the progeny of transgenic rice plants [J]. Transgenic Res, 2000, 9:195-203.

[2] 高谦，欧阳新，刘玮,等. 水稻矮缩病毒(RDV) 基因组 cDNA 的克隆和部分序列分析[J]. 植物学报，1990，32: 13-18.

[3] 叶寅，赵丰，高炬,等. 水稻矮缩病毒小外壳蛋白基因的合成、克隆和序列分析[J]. 中国病毒学，1991，6: 381-383.

[4] Suzuki N, Watanabe Y, Kusano T, *et al*. Sequence analysis of rice dwarf phytoreovirus genome segments S4, S5, and S6: comparison with the equivalent wound tumor virus segments [J]. Virology, 1990, 179: 446-454.

[5] Schenk P M, Baumann S, Mattes R, *et al*.. Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *E.coli* using T7 RNA polymerase and rare ArgtRNAs [J]. Biotechniques, 1995, 19: 196-198

[6] Uyeda S, Masuta C, Uyeda I.. The C-terminal region of the P3 structural protein of rice dwarf phytoreovirus is important for P3-P3 interaction [J]. Arch Virol, 1999, 144: 1653-1657.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[7] 李毅，陈章良. 水稻病毒的分子生物学[M]. 北京：科学出版社，2001. 150-169.

[8] Mao Z J, Li Y, Xu H, *et al* The 42K protein of rice dwarf virus is a post-translational cleavage product of the 46K outer capsid protein [J]. Arch Virol, 1998, 143: 1831-1838.

[9] Omura T, Yan J, Zhong B, *et al*. The P2 protein of rice dwarf phytoreovirus is required for adsorption of the virus to cells of the insect vector [J]. .J Virol, 1998, 72: 9370-9673.

[10] Uyeda S, Masuta C, Uyeda I. The C-terminal region of the P3 structural protein of rice dwarf phytoreovirus is important for P3-P3 interaction [J]. Arch Virol, 1999, 144: 1653-1657.

[11] Kimura I, Minobe Y, Omura T. Changes in nucleic acid and a protein component of rice dwarf virus particles associated with an increase in symptom severity [J]. J Gen Virol, 1987, 68: 3211-3215.

《畜牧兽医学报》2004 年征订启事

《畜牧兽医学报》是中国畜牧兽医学会主办，《畜牧兽医学报》编委会、中国农业科学院畜牧研究所编辑出版的全国性的畜牧兽医学术刊物。创刊于 1956 年 7 月，读者对象为大、专院校的师生和各级畜牧兽医生产、科研工作者等。刊登较高水平的学术论文和专业研究报告以及对生产实践具有指导性、启发性的文章。本刊为全国中文核心期刊、中国自然科学核心期刊，并被国内外重要引文数据库及文摘性期刊收录。本刊连续三届获全国畜牧兽医优秀期刊一等奖。

《畜牧兽医学报》为双月刊，120 页，每期定价 20.00 元。全国各地邮局均可订阅，邮发代号：82-453；国内统一刊号：CN11-1985/S；国外代号：BM446；广告经营许可证：京海工商广字第 0326 号。编辑部地址：北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学畜牧所《畜牧兽医学报》编辑部；邮政编码：100094；电话：010-62815987。E-mail：xmsyxb@263.net