水稻条纹叶枯病毒分子生物学的研究(2)
——外壳蛋白基因的合成、克隆和表达

邱并生　王晋芳　田　波
(中国科学院微生物研究所，北京 100080)

关键词　水稻条纹叶枯病毒、外壳蛋白、基因表达

水稻条纹叶枯病是水稻的主要病害之一，其病原为水稻条纹叶枯病毒(Rice stripe virus，简称 RSV)。RSV 能侵染水稻、小麦、玉米等 37 种禾本科植物，引起严重减产[1]。1975 年 Koganezawa 首次报道了 RSV 具有分枝线状结构[2]。日本东京大学农学院植物病理实验室对 RSV 做了一系列研究报道，1982 年提出 RSV 是三组分病毒粒子，含有一种分子量为 32 kD 的外壳蛋白及四种单链 RNA[3]，病毒颗粒具有依赖于 RNA 的 RNA 多聚酶的活性[4]，最近在 RSV 中又发现了相应的四种双链 RNA[5]。他们在感染 RSV 的植物中发现了两种主要蛋白——外壳蛋白 (CP) 和一种主要的非结构蛋白 (major NS)，进一步研究提出第三个 RNA 组分编码 CP，第四个 RNA 组分编码 major NS[6]。在我国水稻条纹叶枯病亦广泛流行，并已分离到 RSV (命名为 RSV-C)[7]。目前主要通过防治传毒介体控制病毒的流行。

本文是我们关于 RSV-C 分子生物学研究的系列报道之一。我们以提纯的 RSV 为材料，以外壳蛋白基因为目的进行 cDNA 合成、克隆、外壳蛋白基因筛选及产物分析，已得到 RSV 外壳蛋白基因，为水稻抗病基因工程打下了基础。

一、材料和方法

1. RSV-cDNA 合成和克隆

(1) 病毒来源。纯化的 RSV 由浙江省农业科学院病毒室提供。

(2) RSV-RNA 的提取。主要参照 Toriyama[4,5] 方法进行，提纯的 RSV 经 SDS-酚、蛋白酶K处理，提取总 RNA。

(3) 加 poly A 反应。在 poly A 聚合酶催化下 37℃ 保温 10min 用纸片法[8]分析 poly A 的参入个数。

(4) cDNA 合成。采用 BRL cDNA 合成体系，用 BRL 公司的 cDNA 合成试剂盒分别合成 cDNA 的第一条链和第二条链。经 Agarose 凝胶电泳分析产物的大小。

(5) cDNA 克隆。用 *E. coli* 的 DNA 聚合酶 I 大片段酶将 RSV-cDNA 的两端补齐，用 SmaI 将 pUC19 切成平末端，在 T_4-DNA 连接酶作用下室温反应 4h，重组质粒转化

本文 1990 年 11 月 7 日收到。

E. coli-DH5α[8].

2. 重组克隆的筛选及鉴定

(1) 单菌落电泳. 首先通过快速的单菌落电泳法直接挑选出有别于 pUC19 质粒的重组克隆. 具体方法参看文献[8].

(2) 菌落杂交. 用 γ-^{32}P-ATP 标记 RSV-RNA 5′ 末端作为杂交探针[8]. 杂交过程根据文献[8]中的方法进行.

(3) 酶切分析. 用碱法提取质粒[8]. 所用限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI 系华美生物工程公司产品. 酶切产物在 1.0% Agarose 凝胶电泳上分离检测.

3. RSV 外壳蛋白基因的筛选

(1) 重组克隆的免疫筛选. 为消除非特异性的干扰,用带有 pUC19 的 *E. coli*-DH5α 对 RSV 抗血清进行吸收处理[8]. 将转化菌落分别点在硝酸纤维素膜上, 在含有 Ampicilin 的 LB 平板上培养,然后滤膜分别用氯仿熏 15min, 悬浮于溶菌酶裂解液中(100mmol/L Tris·HCl pH7.8, 150mmol/L NaCl, 5mmol/L $MgCl_2$, 1.5%BSA, 1μg/ml panoreatic DNase, 40μg/ml lysozyme) 室温过夜,经 TNT(10mmol/L Tris·HCl pH8.0, 150mmol/L NaCl, 0.05% Tween20) 处理后, 膜与 RSV 抗血清进行免疫反应, 再用 HRP 标记的A蛋白进行反应,最后底物显色[8].

(2) Western blot 分析. 经菌体直接免疫筛选的阳性克隆菌转接于含 Ampicilin 的LB 培养基中培养,对数生长期加入 IPIG (0.3mmol/L) 继续培养 4h, 离心收集菌体,加蛋白裂解液 (2%SDS, 5% 巯基乙醇, 62.5mmol/L Tris, 10% 甘油, 0.05% 溴酚蓝), 100℃ 煮沸 10min, 离心,取上清液进行 SDS-PAGE 分离蛋白. 电转移将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,转移缓冲液为 10mmol/L $NaHCO_3$, 3mmol/L Na_2CO_3 (pH9.9), 350mA 转移 30min, 膜与 RSV 抗血清反应,再用碱性磷酸酶标记的羊抗兔反应,底物显色[8].

4. RSV 外壳蛋白基因分析 提取表达菌的质粒, 分别用 EcoRI、BamHI、HindIII、PstI、SacI、KpnI、SphI、SalI 等进行酶切分析. RSV-RNA 经乙二醛变性电泳后, 转移到尼龙膜上[8],以表达菌的质粒作为探针确定外壳蛋白基因在 RSV 基因组中的位置. 序列分析在 Applied Biosystems 370A DNA 序列分析仪上进行.

二、结果和讨论

1. cDNA 合成和克隆

(1) 在 RSV-RNA 3′ 末端添加 polyA 的长度. 用纸片法测定 RNA 的掺入放射活性, 计算每个 RNA 分子上添加 AMP 的平均个数. 结果表明在 RSV-RNA 3′ 末端平均加了 63 个 AMP 分子.

(2) cDNA 合成与克隆. 加 poly A 的 RNA 经羟甲基汞变性后, 合成 cDNA. 经 1.4% 碱性琼脂糖电泳、放射自显影分析, 第一条链和第二条链大小为 0.5—3.0kb (见图 1). 经计算产量约为 0.5μg. 转化后获得 500 多个白色克隆.

(3) cDNA 克隆分析. 挑取近 300 个白色克隆,进行单菌落琼脂糖凝胶电泳, 通过与克隆了 pUC19 的对照菌作比较,从中选出 150 个有较大插入的重组菌. 以 RSV-RNA 为探针, 对这 150 个克隆菌进行菌落杂交,其中有 50 个杂交斑点为强阳性, 这证明了这些克隆中插入

了 RSV-cDNA 片段。接着，我们用 EcoRI 和 BamHI 对这 50 个重组质粒进行酶切，结果表明(见图 2) 它们均含有从 0.35—1.3kb 大小不等的插入片段。

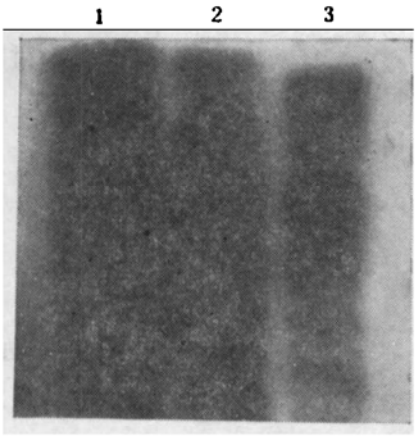

图 1 RSV-cDNA 经 1.4% 碱性琼脂糖凝胶电泳后放射自显影图谱

1.第一条链；2.第二条链；3.标准分子量 (末端标记的 SppI + EcoRI)

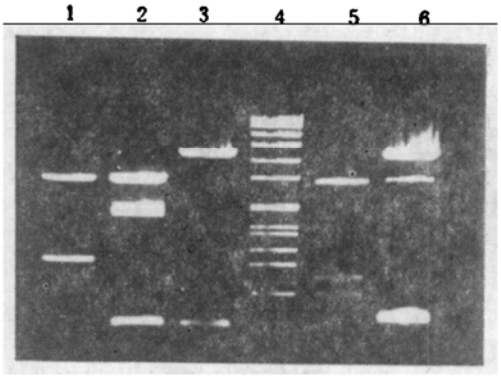

图 2 重组质粒经 EcoRI 和 BamHI 酶切琼脂糖凝胶电泳图

1、2、3、6.为重组质粒；4.标准分子量 (SppI + EcoRI)；5. 146 号重组质粒

2. RSV 外壳蛋白基因的免疫筛选 接种重组克隆于硝酸纤维素膜上进行直接免疫筛选，结果只有 146 号克隆出现了显色斑点，将 146 号菌挑入培养液中进行扩增，抽提蛋白，经 SDS-PAGE 电泳分离， Western blot 检测，膜上出现了一条与 RSV 外壳蛋白同样大小 (31.5kD) 的显色带 (见图 3)，证明 146 号确实有 RSV 外壳蛋白基因。

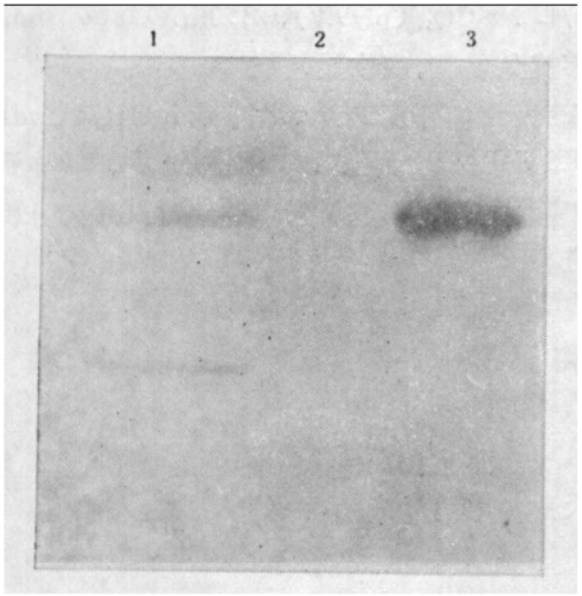

图 3 Western blot 分析 RSV 外壳蛋白基因在 *E. coli*-DH5α 中的表达

1. 146 号克隆；2. *E. coli*-DH5α；3. RSV外壳蛋白

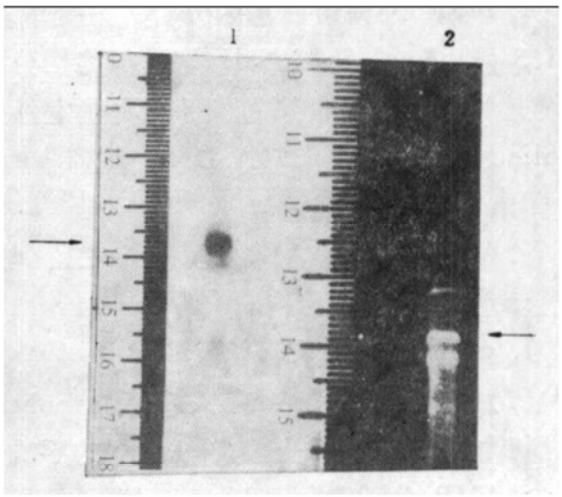

图 4 Northern blot 分析外壳蛋白基因在 RSV 基因组中的位置

1.以 RSV 外壳蛋白基因作探针的杂交图；2.乙二醛变性 RSV-RNAs 的琼脂糖凝胶电泳图

3. RSV 外壳蛋白基因分析 在用 EcoRI 和 BamHI 对重组质粒进行酶切时发现 146 号克隆能产生两个片段，这表明插入到 pUC19 中的 RSV-cDNA 片段中有限制性内切

酶位点，于是我们用一系列限制性内切酶对 146 号进一步做酶切分析，结果仅有 EcoRI 和 SacI 可将 RSV 外壳蛋白基因切成两个片段，分子量分别为 0.7、0.6kb. 和 1.1、0.2kb. 以 146 号重组质粒作为探针经 Northern blot 分析，结果表明与 RSV-RNA 第三组分有明显的杂交带(见图 4)，这与 Hayano[6] 报道的结果相符. 序列分析结果表明，在 EcoRI 酶切后的 0.7kb 片段中有一段 (GAGTTCTTCGAAGACGA) 也与 Hayano 所用外壳蛋白基因的混合探针 (GARTTYTTYGARGAYGA，R 为嘌呤 A、G; Y 为嘧啶 C、T) 相符. 在 0.6kb 片段中有一段 (5′ GTCTGGGTAATAAA) 与 Kakutani[9] 报道中所测出的 RSV-RNA 第三组分 3′ 端序列 (UUUAUUACCCAGAC 3′) 相符.

参 考 文 献

[1] Toriyama, S., *CMT/AAB Description of Plant Virutes*, 2 (1983), 269.
[2] Koganezawa, H. et al., *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 41 (1975), 148—154.
[3] Toriyama, S., *J. Gen. Virol.*, **61** (1982), 187—195.
[4] Toriyama, S., *J. Gen. Virol.*, **67** (1986), 1247—1255.
[5] Toriyama, S. et al., *J. Gen. Virol.*, **70**(1989), 505—511.
[6] Hayano, Y. et al., *Virology*, **177**(1990), 372—374.
[7] 陈光堉，植物保护学报，**11**(1984)，73—78.
[8] Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, 2nd edition, 1989.
[9] Kakutani, T. et al., *J. Gen. Virol.*, **71**(1990), 1427—1432.