

水稻矮缩病毒第 11 号组分基因序列 和编码蛋白的功能分析

肖 锦 李 毅* 全 胜 顾红雅 陈章良

(蛋白质工程及植物基因工程重点实验室 北京大学生命科学学院 北京 100871)

水稻矮缩病毒 (Rice Dwarf Virus-RDV) 广泛分布于中国、日本及东南亚地区，侵染水稻和禾本科其它一些作物，是造成水稻减产的主要原因之一，对农作物危害极大。RDV 属于呼肠孤病毒科^[1] (Reoviridae) 中的植物呼肠孤病毒属 (Phytoreovirus) 成员，其病毒粒子直径 70nm，为 20 面体，有双层外壳蛋白^[2]，无刺突。在自然情况下由黑尾叶蝉 (*Nephrotettix cincticeps*) 或电光叶蝉 (*Resilia dorsalis*) 以持久方式传播并侵染水稻，造成水稻普通矮缩病。RDV 基因组由 12 条双链 DNA 片段组成，除 RNA12 (S12) 以外，其余每一个片段只包含一个开放阅读框架。其中 RNA2 (S2) 和 5 (S5) 编码外层外壳蛋白，RNA8 (S8) 编码内层外壳蛋白，RNA1 (S1)，RNA3 (S3) 和 RNA7 (S7) 编码核心 (core) 蛋白，RNA4, 6, 9, 10, 11, 12 (S4, S6, S9, S10, S11, S12) 编码非结构蛋白^[3~14]。

水稻是我国南方最主要的粮食产物，通过对 RDV 各个组分的克隆及序列分析，可以加强对 RDV 整个基因组功能结构的基础研究，有利于控制水稻矮缩病，提高水稻产量。我们实验室自 1988 年以来先后克隆了 RDVS1、S2、S3、S4^[7]、S5^[8]、6^[9]、7、8^[10~11]、9^[12]、10^[13]、11、和 12^[14] 号基因组分，本文是 S11 基因组分工作的报道。

1 材料和方法

1.1 材料

RDV 原始材料从福建省福州市郊区感病稻田中分离提纯，cDNA 合成试剂盒，Taq DNA 聚合酶，载体质粒 pBluescript，受体菌 *E. coli* DH5α，DNA 序列分析试剂盒，限制酶和 $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP 分别购自 Promega、Biolab、Pharmacia 和 Dupont 公司。

PCR 引物由北大-华美联合实验室合成。

5'引物 5'GGGGATCCGTAAATGAGTGGAACTTAC 3'
BamHI

3'引物 5'ATCATATATGAGTGGGTG 3'

1.2 方法

1.2.1 病毒的分离纯化：将获得的感病植株经无毒叶蝉传毒分离后在水稻幼苗上进行大量繁殖。病毒提纯方法参考高谦等^[10]，即将病叶剪碎，加液氮研磨，再用组织捣碎机加适量抽提缓冲液 (0.1mol/L 磷酸缓冲液, pH6.8, 含 0.01mol/L 抗坏血酸) 充分匀浆，低速离心后取上清用氯仿抽提两次，上清再经聚乙二醇 6000 沉淀，最后再用两次差速离心和一次蔗糖密度梯度离心纯化病毒。

1.2.2 病毒 RNA 的抽提：首先用蛋白酶 K 消化掉病毒外壳蛋白，然后向病毒液中加入等体积饱和酚，55℃ 保温 5min，置冰浴，离心。再用氯仿抽提一次，乙醚去除残留氯仿后，乙醇沉淀，在 1.2% 琼脂糖凝胶上分离 S11，回收纯化，得到双链 RNA 经 DMSO 变性，乙醇沉淀，溶于无 RNAase 的重蒸水中。

本研究属国家科委 863 水稻抗病毒基因工程资助的课题 (863-101)。

* 联系作者。

本文于 1994 年 12 月 2 日收到。

1.2.3 cDNA 合成及 PCR 扩增: 取 2 μ g 经变性处理的单链 RNA 样品与合成的两个特异引物各 2 μ l (20 μ mol/L) 在 70℃下退火, 加入 dNTP, AMV 反转录酶, 合成 cDNA 第一条链。cDNA 第二条链的合成采用 PCR 技术扩增。在 100 μ l 的反应体系中含有 10×PCR 缓冲液 10 μ l, 20 μ mol/L 引物各 5 μ l, 2.5mmol/L dNTP 4 μ l, 100% DMSO 4 μ l, 第一链 cDNA 2 μ l, 2.5 单位 Taq DNA polymerase。扩增条件为 94℃变性 40s, 54℃退火 90s, 70℃延伸 120s, 反应共进行 35 个循环。

1.2.4 基因克隆及序列分析: 扩增产物经 T4 DNA Polymerase 补平, 用 1:1 酚氯仿抽提, 乙醇沉淀后, 溶于双蒸水中, 与 EcoRV 切开的 BS 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 。经选择培养基 Ampicillin (X-gal/IPTG) 筛选后, 煮沸法快速筛选重组子并酶切鉴定, 根据酶切图谱进行亚克隆并测序。DNA 序列测定采用 Sanger 双脱氧法, 质粒 DNA 制备用碱法和 PEG 纯化获得。

1.2.5 DNA 序列分析和同源性比较: 应用 HITACHI SOFTWARE ENGINEERING CO. LTD1990 年 DNASIS 软件。

2 结 果

2.1 病毒的纯化和 RNA 的提取和分离

RDV 病毒粒子纯化后在电镜下呈球状, 直径约 70nm, 从纯化病毒悬浮液中抽提病毒总 RNA, 在 1.2% 低溶点琼脂糖凝胶上进行电泳分离, 12 条 RNA 可以分离成 9 条带, 回收第 9 条带, 即含有 RDVS11 组分。

2.2 RDV S11 cDNA 的合成及 PCR 扩增

根据已发表的日本流行株系 S11 的全序列合成 5' 端和 3' 端引物, 5' 端和 3' 端引物分别起始于 1-21nt 和 1019-1036nt, RDVS11 双链 RNA 经 DMSO 变性后, 合成 cDNA 第一条链, 经 PCR 扩增得到一条特异性很强的扩增片段 (图 1), 扩增产物约为 1.1kb, 与 RDV S11 双链 RNA 大小相近。

2.3 扩增产物的克隆、鉴定和序列测定

PCR 产物经克隆、筛选, 根据已发表的 S11 序列的酶切图谱进行酶切鉴定发现, 其中 Bgl II 位点存在, Sal I、Xba I 位点丢失, 另外发现突变出 Acc I 位点 (图 1)。在此基础上进行亚克隆, 继而对这些亚克隆进行序列分析, 全序列见图 2。RDV 中国福建分离物 S11 由 1036 个碱基组成, 比 RDV 日本流行株系相应片段少 31 个碱基, 缺少部分位于日本流行株 588~618nt。与日本流行株系 S11 相比二者核苷酸序列同源率为 90.8%。

RDVS11 开放阅读框架含有 567 个碱基, 编码一个由 189 个氨基酸组成的蛋白 (图 2), 分子量 21kDa, 与 RDV 日本分离物 S11 相应的 ORF 编码的蛋白在氨基酸水平上同源率为 95.2%。

将此蛋白与同组 WTV (Wound tumor virus-WTV) S12 编码的蛋白进行比较, 两者在氨基酸水平上有 26.4% 的同源性 (图 3A)。此外, 还发现此蛋白的氨基酸序列中有 70 个氨基酸 (120~189aa) 与海胆 (*Paracrinus angulosus*) 精细胞中组蛋白 H1 的一部分氨基酸序列 (180~249aa) 有 28.2% 的同源性 (图 3B), 有 103 个氨基酸 (85-187aa) 与蓝舌病毒 (Bluetongue Virus) 第 10 号片段编码的多肽 (VP6) 中的一部分氨基酸序列 (3-106) aa 有 21.2% 的同源性 (图 3C)。VP6 为蓝舌病毒核心中一个小组分。

3 讨 论

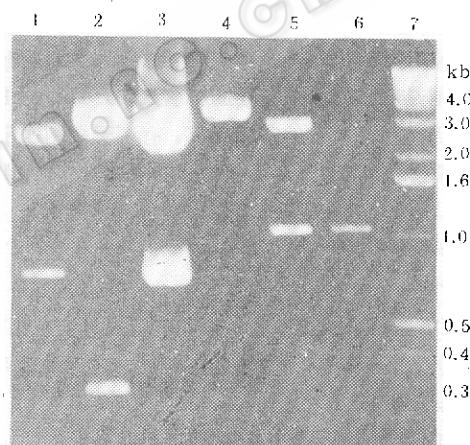


图 1 RDV S11 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳及含 RDVS11 cDNA 重组质粒的酶切图谱

- 1. Acc I + Pst I , 2. Bgl II + Pst I , 3. Bgl II + Hind III
- 4. Acc I , 5. BarnH I , 6. RDVS11 PCR 产物
- 7. DNA Marker (1kb DNA ladder)

GG TAA ATG AGT GGA ACA TTA CCC TTG GCT ATG ACG GCG AGT GAA TCA	47
M S G T L P L A M T A S E S	14
TTC GTT GGC ATG CAA CTT TTG GCT CAA GAC AAA GAA GTC AAA GCG ACC	95
F V G M Q V L A Q D K E V K A T	30
TTT ATT GCT CTC GAC AGC AAA TTA CCT GCC AAT CTG AAA GTA CCA TAC	143
F I A L D R K L P A N L K V P Y	46
ATG AAA AAT GCT AAA TAT AGA ACT TGT ATT TGT CCA AGT TCA AAC CAT	191
M K N A K Y R T C I C P S S N H	62
TTG GTA GAT GAC TGT GTA TGC GAA GAT GTG ATT ATT GCG TAT ACT GCA	239
L V D D C V C E D V I I A Y T A	78
CAC AGA AAT AAT GCG GTA GCT GCC CTT TTG TAT AGT GAC GGA AAC GTC	287
H R N N A V A A L L Y S D G N V	94
ATA CAC AGG AGC GGT ACT TTG AAA CCC AAA TCC CAA AAT CGG TTT GAT	335
I H R S G T L K P K S Q N R F D	110
TTA CGG GGT TTT TTA ACC AGT GTT AAC CCA GGG GAA AGC TCA AAA GCT	383
L R G F L T S V N P G E S S K A	126
GAA GCC GGC ACC TCG AAA TCC ACG CAA AAA GCG TAC GAC AGG AAG GAT	431
E A G T S K S T Q K A Y D R K D	142
AAG TCC CCT TCT AAA GGC AAA AAT TCA AAG AAA CGT GGT AAA AAA TCT	479
K S P S K G K N S K K G G K K S	158
TCA TCC GAA AGA AAG AGG AAA GAA TAT TCC TCA AAT TCT GAA ACG GAT	527
S S E R K R K E Y S S N S E T D	174
TTG AGT TCT GAC AGT GAT GCC AAT ACT CGC AAA TCA AAG CGT AAG TAA	575
L S S D S D A N T R K S K R K	189
GGC TTG CTA CAT TGC TTC AAA TGA CAA ATA CGA TGC TGA TCC CTT TGT	623
GGA CTC GTA TCT TGC TGC TTG ATC ACG TAG CTT CGT ACT CTT TGT AGT	671
ATG AGG ATG GAT TTA ATT ATC CAA TTT AAG TGA GGT GAC GCT TTT AAC	719
CTC AAT TGA TCA TAT CCT CTT CTC GAT TAT AAG ATC TCA TCT CAT ATG	767
CGT CAT GAG AGT ATC TTA CAA TCA AAA TTA AAT TAC GGG TTA GTG AAC	815
TGA CTT CAT CAC TAT TCT CAT TAT TGA ATG CTA AAT TAT GCT TGT TTC	863
GAA GTC ATT CAG TCG TCG GTC AAC CCC CAC CTG AAA CGG CGT CAA CCG	911
TAG CCG GTC CCG GAA GGG GTC AAC CCC CAC CTG AAA CGG CGT CAA CCG	959
GAG CCT TCC CCC ATG GGC GAA TAT GTC TGG TGA TGT TGG GCA AGT GAC	1007
GAA GCC AAA AAC ACC CAC TCA TAT ATG AT	1036

图 2 RDV 中国福建分离物 S11 片段核苷酸序列及编码蛋白的氨基酸序列

我们克隆到的 RDV 第 11 号片段，对不同的亚克隆进行序列分析发现由 1036nt 组成，与日本流行株系的序列相比，同源性为 90.8%，比日本流行株系在 ORF 下游少 3nt，缺少的部分位于日本株序列 588~618nt。经过 RNA 二级结构分析，缺少部分对 RNA 二级结构影响不大。RDV 各片段都有类似的非编码序列，而 RDV S11 ORF 下游区非常长，占全长 46.4%。RDV 第 12 号片段 S12，无论不同来源，还是相同来源，其电泳迁移率都有变化，进一步分析发现电泳迁移率不同的分离物基因大小还是一样的（1066nt），但 RDVS12 基因序列有一些变异，可以分为两个基因组类型，这些变异只是碱基的替换，并没有缺失或插入，而且同源率在 96%~99%^[17]。而 RDVS11 中国福建分离物与日本分离物之间除了有碱基替换外，还出现了 31 个碱基的缺失，这种差异可能对研究病毒进化及基因非编码区的功能有十分重要的意义。植物呼肠孤病毒组成员有 WTV、RGDV (Rice Gall Dwarf Virus-RGDV)、RDV 的基因组双链 RNA 末端序列都是非常保守的^[18]，我们所测的 S11 序列的末端序列也包括这种保守序列 (5' GGAAA...UGAU3')，这些高度保守的末端序列可能形成某种独特的二级结构，在病毒复制和组装中起重要作用。

(A)	a	MSGTLPLAMTASESFVGMQVLAQDKEVKATFIA--LDRKLPAKLKVPM X	47
	b	NNSTRCTRALKPRTEINPNSMSNKESENVALQTLRVTKDMK-DFLSHRIVGEPPANIKIEYQ	59
	a	KNAKYRTCICPSSNHLDCCVCEDEVIAYTAHRNNAVAALLYSDGNVIHRSGLPKPSQK	107
	b	KIHYRYRTCVCVPSTGHISELCPSGDLILSLGAHRNVIAATVYDVVKNKIKSTTSKAGTSS	119
	a	RFDLRGFLTSVNPGESSKAEAGTSKSTQKAYDRDKDPSKGKNSKGGKKSSSERKRKEY :X . . .	167
	b	TLSLGLSGFQKPKIGSKNNKTMFSQNNSTNESDESGGEGSSLNDLPKSDLINAIMEL	179
	a	SSNSETDLSSSDS DANTRKS KRK	189
	b	ASQGRNNNSKGKGKRGCGR	197
(B)	a	SDGNVIHRSGLPKSQNRFDLRFGLTSVNPGESSKAEAGTSKSTQKAYDRDKDPSKGK	149
	c	AAKKARKAKAAKRKAALAKKAAAKRKAAAKAKKKAKKPKKKAAKKAKKPAKKSPKKAK	210
	a	N-SKGGKKSSSERKRKEYSSNSETDLSSSDS DANTRKS KRK	189
	c	KPAKKSPKKKAKRSPK--KAKKAAGKRKPAAKKARRSPRKAGKRRSPKKARK	261
(C)	a	CICPSSNHLDCCVCEDEVIAYTAHRNNAVAALLYSDGNVIHRSGLPKSQNRFDLRF X : .	114
	d	MSAAILLAPGDVIKRSSEELKQRQIQINLVWD	32
	a	LTSVNPGESSKAEAGTSKS-TQKAYDRDKDPSKGKNSKGGKKSSSERKRKEYSSNSET	173
	d	MESEGGKEDKTEPKEESSKAEGSKDGEGRNRRRAARRKLAGKETTKDAECDRRIHTAVGSGSG	92
	a	DLSSSDS DANTRKS KRK	189
	d	TKGSGERANENANRGDGKVGGGGDADAGVGATGTNGGRWWVLT EEEIARAI ES KYG T KID	152

图 3 RDVS11 中国福建分离物 ORF 编码的多肽与 WTVS12 ORF 编码多肽、

海胆精细胞组蛋白 H1 和蓝舌病毒 VP6 蛋白氨基酸同源性分析

- a. RDV 中国福建分离物 S11 片段 ORF 编码多肽的氨基酸序列
- b. WTVS12 ORF 编码多肽的氨基酸序列
- c. 海胆精细胞组蛋白 H1 的部分氨基酸序列
- d. 蓝舌病毒 VP6 部分氨基酸序列

S11 含有一个开放读码框架, 但在 5' 末端有两个非常靠近的起始密码子 (AUG), 分别在 6~8nt 和 30~32nt, 较长的 ORF (6~572nt) 编码 189 个氨基酸 (图 2), 分子量 21kDa, 根据 Kozak 保守序列^[15] (在 -3 和 +4 各有一个嘌呤), 第一个 AUG (6~8nt) 不是更受欢迎的起始序列, 而第二个 AUG (30~32nt) 符合 Kozak 保守序列。体外翻译试验表明^[22], 全长 cDNA 转录产物作为模板可以合成两种多肽。但当第一个 AUG 发生点突变时, 大的翻译产物消失, 只能得到更小的产物, 当第一个 AUG 发生缺失时, 小的产物翻译效率很低, 可能是因为缺少 5'-端 11nt 的原因。体内 (*In vivo*) 这两种产物是否表达并不清楚。根据 Kozak 描述^[16], AUG 密码子在 Cap 位置 10nt 中不能被核糖体 40S 亚基有效识别, 所以有可能第一个 AUG 识别效率更低, 因为它位于 6~8nt。

植物呼肠孤病毒第一亚属的 WTV 和 RDV 的基因组成相同, 外壳蛋白氨基酸序列同源性很高^[18]。其中两种病毒在几个基因片段之间有一一对应的关系如 RDVS4-WTVS4、RDVS5-WTVS5、RDVS7-WTVS7、RDVS8-WTVS8、RDVS9-WTVS11 和 RDVS10-WTVS10。我们的结果表明 RDVS11 和 WTVS12 在氨基酸序列水平上有显著的同源率, 且 N 端 0~83aa 之间同源率更高达 39.8%。RDVS11 和 WTVS12 还有相同大小的 5' 非编码区 (图 3A), 在纯化的 RDV 分离物中没有发现分子量与 S11 编码蛋白相同的蛋白质, 认为 RDVS11 与 WTVS12 功能相似是编码非结构蛋白。

RDVS11 编码的多肽与海胆精细胞中组蛋白 H1 有显著的同源性，同源部位是 RDVS11 的 120~189aa 与 H1 的 180~248aa，包括 70 个氨基酸，同源率为 28.2%（图 3B）。对于 RDVS11 来说，这一段区域有很明显的亲水性（图 4），富含碱性氨基酸。RDVS11 编码多肽有规律的亲疏水性氨基酸分布特性及碱性氨基酸排列对肽链折叠和二级结构形成有重要作用。对 H1 来说，这一段区域富含碱性氨基酸，内部含有一段重复序列，可能是一系列不同长度的重复 DNA 编码的，其中 (basic)₂-Pro- (basic)₂ 位于 175~179aa，(basic)₂-Ser-Pro- (basic)₂ 重复 5 次，分别 (basic)₂ 位于 190~195aa、201~206aa、210~215aa、231~236aa、240~245aa，Ala-Lys-Pro-Ala 分别位于 185~189、196~200^[20]。而这种 DNA 及氨基酸序列的重复在 RDVS11 中也可见到。H1 是染色体结构中唯一不组成核小体的蛋白，但是对染色体凝聚有很大作用，其中与 RDV 同源的这部分序列，在蛋白质与蛋白质，DNA 与蛋白质相互作用中起重要作用。另外，RDVS11 编码的多肽与 BTVS10 编码的多肽（VP6）也有一定的同源性，同源部位是 RDVS11 的 85~187aa 与 VP6 的 3~106aa，包括 103 个氨基酸，同源性为 21.2%（图 3C）。VP6 是 BTV 核心蛋白中一个小的组分，与 BTV 其他组分相比，VP6 的氨基酸组成很独特，认为 VP6 在病毒核心中与 RNA 结合^[21]。RDVS11 编码多肽的氨基酸序列与 H1 和 VP6 蛋白氨基酸序列的同源部位都在亲水区域。RDVS11 编码多肽 C 端的亲水性，结合它与 H1 组蛋白以及 VP6 有显著同源性，表明 S11 编码蛋白可能是一种 RNA 结合蛋白。这还有待于进一步用 gel retardation 和 gel shift 方法研究后加以定论。

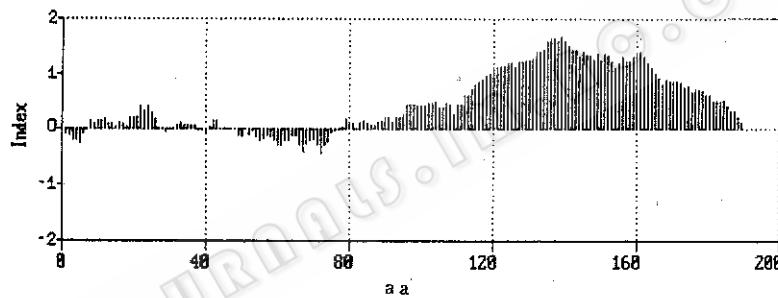


图 4 RDV 中国福建分离物基因组 S11 编码蛋白的氨基酸序列疏水性分析

致 谢 作者非常感谢由凌涛先生，梁晓文小姐，敬群小姐和李小华小姐的大力帮助。

参 考 文 献

- [1] Methews R E F. Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses, 1985.
- [2] Inoue H, Timmins P A. Virology, 1985, 147: 214~216.
- [3] Suzuki N, Tanimura M, Watanabe Y et al. Virology, 1992, 190: 240~247.
- [4] Suzuki N, Watanabe Y, Kusano T et al. Virology, 1990, 179: 455~459.
- [5] Nakashima K, Katutani T, Minobe Y. J Gen Virology, 1990, 71: 725~729.
- [6] Uyeda I, Suda N, Yamada N et al. Intervirology, 1994, 37: 6~11.
- [7] 赵晓岚, 李 穗, 刘一飞等. 微生物学报, 1996, 36: 1~11.
- [8] 李 穗, 李 穗, 陈章良等. 应用基础及工程学学报, 1994, 2 (2): 1~8.
- [9] 刘一飞, 李 穗, 陈章良等. 病毒学报, 1994, 10: 246~250.
- [10] 高 谦, 欧阳新, 陈章良等. 植物学报, 1990, 32: 13~18.
- [11] 李 穗, 李 穗, 陈章良等. 病毒学报, 1995, 11: 56~62.
- [12] 曲 林, 李 穗, 朱玉贤等. 病毒学报, 1995, 11: 271~275.
- [13] 储瑞银, 张 旭, 陈章良等. 植物学报, 1993, 35: 115~120.
- [14] 李 穗, 薛志宏, 陈章良等. 病毒学报, 1994, 10: 339~345.
- [15] Kozak M. Nucleic Acids Research, 1981, 9: 5233~5252.
- [16] Kozak M. Nucleic Acids Research, 1987, 15: 8125~8148.
- [17] Murao K, Suda M, Uyeda I et al. J Gen Virology, 1994, 75: 1843~1848.

- [18] Kudo H, Uyeda I, Shikata E, et al. J Gen Virology, 1991, **72**: 2857~2866.
- [19] Anzola J V, Dall D J, Xu Z et al. Virology, 1989, **171**: 222~228.
- [20] Walter N S, Marie S, Petronella L, de G et al. Eur J Biochem, 1980, **104**: 559~566.
- [21] By A Fukusho, Yu Y, Yamaguchi S et al. J Gen Virology, 1989, **70**: 1677~1689.
- [22] Suzuki N, Harada M, Kusano T. J Gen Virology, 1991, **72**: 2233~2237.

Nucleotide Sequence of Rice Dwarf Virus Genome Segment S11 and Function Analysis of S11 Encoded-protein

Xiao Jin Li Yi Quan Sheng Gu Hongya Chen Zhangliang

(The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering,

College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract The cDNA of Rice Dwarf Virus (RDV) Fujian isolate genome segment S11 was synthesized and amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR product was cloned into pBluescript M13(—). The complete nucleotide sequence of RDV genome segment S11 was determined. S11 is 1036 nucleotide in length and contains a single large open reading frame (ORF) which begins with the first AUG codon (6 to 8nt) and extends to 567nt, encoding a polypeptide with 189 amino acids in length. This fragment has 90.8% identity in nucleotide sequence and 95.2% in amino acid sequence with RDV Japanese strain S11. The segment S11 of Fujian isolate lacks 31 nucleotide downstream of the ORF compared with the RDV Japanese isolate S11. Amino acid sequences comparison of protein encoded by RDVS11 and WTVS12 shown 26.4% homology. It was suggested that RDV S11 encode a nonstructural protein. Amino acid sequence comparisons of protein encoded by RDV genomic segment 11 with histone H1 protein in sea urchin and VP6 of Blue tongue virus (BTV) have shown significant homology among these three proteins. Hydrophobicity analysis found that the carboxyl-terminal of protein encoded by RDV genomic segment 11 is highly hydrophilic. Taking all of these results in consideration, S11 encoding protein might be a RNA-binding protein.

Key words Rice Dwarf Virus, segment 11, sequence analysis, RNA-binding protein