

大麦黄矮病毒 GAV 株系外壳蛋白基因在大肠杆菌中的高效表达

常胜军* 马占鸿 王锡锋 李 莉 周广和**

(中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100094)

关键词 大麦黄矮病毒 外壳蛋白基因 表达

中图分类号 TQ93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0400-03

大麦黄矮病毒(BYDV_s)是一种由蚜虫专化性传播的循环非增殖型单链正义 RNA 病毒,是黄症病毒属(Luteovirus)的代表成员。BYDV GAV 是我国的主流株系之一,它与美国的 BYDV MAV 有较强的血清学关系,但美国的 MAV 仅由麦长管蚜传播,而我国的 GAV 除麦长管蚜传播外,还可通过麦二叉蚜传播^[1,2]。近年来,有关麦蚜传播病毒专化性的研究已成为 BYDV 的研究热点^[3]。BYDV 病毒的传播涉及病毒粒子表面成分与蚜虫体内专化性受体的相互作用, BYDV 病毒粒子表面主要成分是 CP,另外一个次要成分是通读蛋白(RTP)^[4-7],要揭示麦蚜传播病毒的专化性机制,获得有功能的 CP 是开展这一工作的基础。

编码 21 kD 外壳蛋白的基因位于 BYDV RNA 的中部。我们已将 BYDV GAV 的 CP 基因进行了克隆和序列分析^[8], CP 全长 600 nt,与 BYDV MAV 相应片段的序列同源性为 97.5%,氨基酸序列同源性为 96.5%。本文报道 BYDV GAV 外壳蛋白基因原核表达载体的构建及其在大肠杆菌中高效表达。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

重组质粒 pGC13(含 BYDV GAV 株系 CP 完整编码基因克隆)由本人构建^[8]。大肠杆菌 BL21(DE3)由北京大学生命科学院李毅教授提供。大肠杆菌 JM109、JM109(DE3)和原核表达载体 pET-5a 购自 Promega 公司。

1.2 试剂和其它材料

硝酸纤维素膜为 Pall Gelman Sciences 公司产品;蛋白质分子量标准购自上海丽珠东风生物技术有限公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、SDS 和 IPTG 购自上海生工生物工程公司;Western blot 试剂盒购自 Promega 公司;BYDV MAV 抗血清由美国普渡大学 Lister 教授惠赠。

1.3 原核表达载体的构建

*Bam*HI 酶切含有 BYDV GAV 外壳蛋白基因 cDNA 的重组质粒 pGC13^[8],1%琼脂糖凝胶电泳回收 600bp 的片段。pET-5a 以 *Bam*HI 进行酶切,与回收的片段进行连接并转化大肠杆菌 JM109,经含有氨苄青霉素的选择性培养基筛选,碱法提取质粒 DNA 进行酶切鉴定插入片段的大小及方向。将筛选出的阳性克隆转入大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中。质粒提取、酶切、回收、连接和转化均参照 Sambrook 等^[9]的方法。

1.4 BYDV GAV 外壳蛋白的诱导表达

含有 BYDV GAV 外壳蛋白基因表达载体的 BL21(DE3)于 37℃ 活化过夜后,1:100 稀释到 50 mL LB 培养基(含 100 μg/mL Amp),继续在 37℃ 摇床培养至对数生长期(OD₆₀₀=0.6),加入 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L,培养 6~8 h。取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中,4000 r/min 离心 1 min,收集菌体,加入 150 μL 上样缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl pH6.8,10%甘油,2% SDS,5% 巯基乙醇,0.1% 溴酚蓝),煮沸 10 min,离心,置 4℃ 备用。

1.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%,电泳缓冲液为 25 mmol/L Tris,250 mmol/L 甘氨酸,0.1% SDS pH8.3。以 8V/cm 恒压进行浓缩,溴酚蓝进入分离胶后电压调至 15 V/cm,电泳 5 h,电泳完毕后,用考马斯亮蓝染色液(考马斯亮蓝 R-250 1.25 g,冰乙酸 46 mL,甲醇 227 mL,加蒸馏水 227 mL)染色过夜,用脱色液(10%冰乙醇,10%甲醇)置脱色摇床上脱色数次,以蛋白条带清晰,背景透明为止。经激光蛋白扫描仪扫描,自动积分仪估测表达效率。

1.6 Western blot 分析

1.6.1 转膜:经 SDS-PAGE 的凝胶在转移缓冲液(25 mmol/L Tris,192 mmol/L 甘氨酸,20%(V/V)甲醇,pH8.3)漂洗,按照 Sambrook 等^[9]的方法将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶转移到硝酸纤维素(NC)膜上(40 V,4 h)。

收稿日期:1999-08-02,修回日期:2000-02-28。

基金项目:国家攀登计划(85-31)和植物病虫害生物学国家重点实验室开放课题资助项目(98PD09,99PD03)。

* 中国农业科学院植物保护研究所博士研究生,现为清华大学生物科学与技术系博士后。

** 联系人。

1.6.2 封闭:将转移完毕的 NC 膜在 PBST 缓冲液(8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.24 g KH_2PO_4 , 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.2 mL Tween, 定溶在 1000 mL 蒸馏水中, pH7.4)中漂洗一下,转入封闭液(PBST + 5% BSA)中封闭 1~2 h。

1.6.3 第一抗体反应:经封闭后的 NC 膜在用 PBST 稀释的 BYDV MAV 抗血清(1:500)中 4℃ 孵育 2 h,用 PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。最后用 TBST 缓冲液(150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-Cl, 0.2 mL Tween, 定溶在 1000 mL 蒸馏水中, pH7.5)洗膜 1 次,10 min。

1.6.4 第二抗体反应:加入 TBST 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG(1:7500)室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。

1.6.5 显色:将 NC 膜置于含有氮蓝四唑(NBT)和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(BCIP)的显色液中显色至条带清晰,将膜放入蒸馏水中漂洗终止显色反应。取出晾干,拍照。

2 结果

2.1 大肠杆菌表达载体的构建

以 *Bam*HI 酶切 pGC13 电泳回收 600 bp 目的 DNA 片段与 *Bam*HI 酶切处理的 pET-5a 进行连接(图 1),然后转化、筛选阳性克隆,最后鉴定方向用 *Nde*I 和 *Sma*I 双酶切,其中 pEC5 转化子能产生 600 bp 片段,与预期的结果一致,为正向插入的重组子(图 2)。

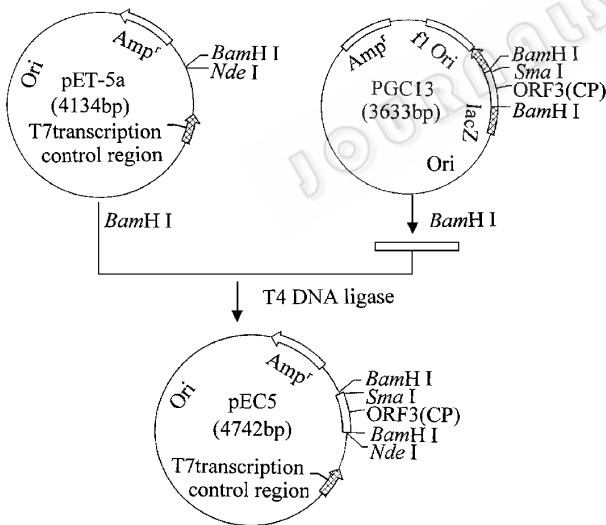


图 1 BYDV GAV CP(ORF3)基因原核表达载体 pEC5 构建示意图

2.2 SDS-PAGE 分析

12% SDS-PAGE 分析的结果表明, pEC5 在 BL21(DE3) 中经 IPTG 诱导后,产生 24 kD 的特异蛋白条带,未经诱导的工程菌和含 pET-5a 的 BL21(DE3) 则没有相应的条带(图 3),说明 CP 基因得到了正确表达。经光密度扫描估测,其表达量占大肠杆菌总蛋白的 19.5%。

为了进一步检验所表达的特异蛋白是否为目的基因的表达产物,以 BYDV MAV 株系抗血清为第一抗体,碱性磷

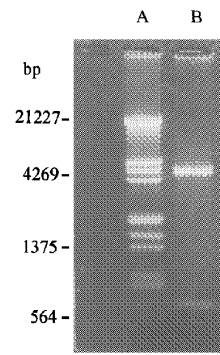


图 2 pEC5 的酶切鉴定

A: DNA molecular marker

B: pEC5 digested by *Nde*I and *Sma*I

酸酯酶标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体,以 NBT 和 BCIP 为显色底物,对 pEC5 的大肠杆菌表达产物进行 Western blot 分析,结果证实 pEC5 经 IPTG 诱导后表达的特异蛋白即为目的基因的表达产物(图 4)。

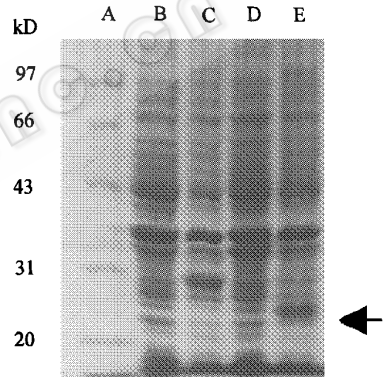


图 3 细菌表达产物 SDS-PAGE 的电泳

A: Molecular markers; B: pET-5a without induction; C: pET-5a induced with IPTG; D: pEC5 without induction; E: pEC5 induced with IPTG (Arrow indicating expressed coat protein)

3 讨论

影响外源基因在大肠杆菌中表达的因素很多,包括启动子强度,SD 序列,转录终止序列,SD 序列至起始密码子 ATG 之间的距离,目的基因 5' 端密码子使用频率,宿主菌种类,转录出的 mRNA 的稳定性及二级结构,表达产物的稳定性及诱导条件等。姚华建等报道^[11],利用原核表达载体 pBV220 构建了甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)外壳蛋白基因的重组质粒,在大肠杆菌 DH5 α 中得到了高效表达。作者也曾构建了 BYDV GAV CP 与 pBV220 的重组质粒,并转入 DH5 α 中进行表达,SDS-PAGE 和 Western blot 均未检测到表达蛋白,优化条件,更换菌株均无效。后将原核表达载体换成 pET-5a,用公司推荐的表达菌株 JM109(DE3) 进行表达,结果也没表达,但将表达菌株 JM109(DE3) 换成 BL21(DE3) 后, BYDV GAV CP 的原核表达载体 pEC5 得到了高效表达。

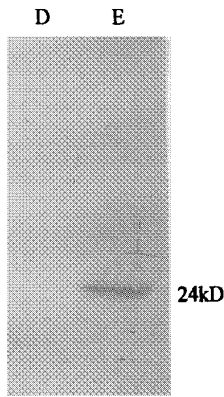


图 4 pEC5 表达产物的 Western blotting

D :Without induction

E :Induction with IPTG

BYDV_s 在植物里仅局限于韧皮部,细胞内病毒粒子含量很低,使之难于提纯,这就限制了大量抗原的来源。我们所构建的 BYDV GAV 外壳蛋白基因大肠杆菌表达载体 pEC5 含有 T7 噬菌体启动子控制的翻译区域,当培养体系中没有诱导物 IPTG 时,T7 RNA 聚合酶基因不表达,T7 噬菌体启动子不启动。当加入 IPTG 后,T7 RNA 聚合酶基因表达,T7 噬菌体启动子开放,位于启动子下游的 BYDV GAV CP 基因得以表达。经过纯化的外壳蛋白可以作为良好的抗原来制备抗血清,也可用于 CP 功能的研究。pET-5a 的 T7 启动子下游有 3 个酶切位点:Nde I ,Bam HI 和 EcoRI。插入 BamHI 和 EcoRI 表达的是融合蛋白,插入 Nde I 表达的是非融合蛋白。本文中,CP 基因插入 BamHI 酶切位点,与载体的 11 个氨基酸形成融合蛋白,故而 SDS-PAGE 中出现在 24 kD 的位置,CP 本身大约 21 kD 左右。

参 考 文 献

- [1] 周广和,张淑香,钱幼亭.中国农业科学,1987,20:7~12
- [2] 周广和,张淑香.植物病理学报,1986,16:17~21
- [3] Allen Miller W ,Lada Rasochova. *Annu Rev Phytopathol* ,1997 ,35 :167~190
- [4] Baher I ,Lamb J ,Mayo M A *et al* . *Journal of General Virology* ,1990 ,71 :2251~2256
- [5] Brault V ,Van den Heuvel JFJM ,Verbeek M *et al* . *The EMBO Journal* , 1995 ,14 :650~659
- [6] Veidt I ,Lot H ,Leiser M *et al* . *Nucleic Acids Research* ,1988 ,16 :9917~9932
- [7] Vincent J R ,Lister R M ,Larkins B A. *Journal of General Virology* ,1991 ,72 :2347~2355
- [8] 常胜军,王锡锋,马占鸿等.病毒学报,1999,15(4):368~371
- [9] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning* (2ed edition) ,Cold Spring Harbor Laboratory ,Cold Spring Harbor NY ,1989
- [10] 姚华建,刘 仪.甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)外壳蛋白基因的克隆及表达,北京农业大学博士学位论文,1993,p.25~48

High-level Expression of BYDV GAV Coat Protein Gene in *Escherichia coli*

Chang Sheng-Jun Ma Zhan-Hong Wang Xi-Feng Li Li Zhou Guang-He

(The State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and insect Pests ,The Institute of Plant Protection ,
The Chinese Agricultural Academy of Science ,Beijing 100094)

Abstract The IPTG-inducible expression vector containing the BYDV GAV coat protein gene was constructed and transferred into *E. coli* BL21(DE3). High-level expression of the specific protein was achieved by IPTG induction. The results of SDS-PAGE and Western blotting show that the expression product which accumulates 19.5% of the total cellular proteins estimated by scanning is 24 kD BYDV GAV coat protein plus eleven amino acids of pET-5a.

Key words BYDV GAV coat protein gene expression