

# 西瓜花叶病毒 *HC-Pro* 基因在毕赤酵母中的分泌表达与功能研究 Research on Secretion Expression in *Pichia pastoris* and Function of the *HC-Pro* Gene of Watermelon Mosaic Virus

张建新<sup>1,2</sup>, 吴云锋<sup>1\*</sup>, 王秀敏<sup>1</sup>

ZHANG Jian-Xin<sup>1,2</sup>, WU Yun-Feng<sup>1\*</sup> and WANG Xiu-Min<sup>1</sup>

1 西北农林科技大学植保学院与陕西省农业分子生物学重点实验室 杨凌 712100

2 河南师范大学生命科学学院 新乡 453007

1 College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

2 College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

**摘要** 利用 RT-PCR 方法扩增出西瓜花叶病毒 *HC-Pro* 的基因, 长度为 1371bp, 并构建了真核表达质粒 pPIC9K-WHC。将重组质粒经 *Sal* I 单酶切后电转化 *Pichia pastoris* GS115 菌株, 经 PCR 鉴定与 G418、MD 和 MM 培养基筛选, 获得 Mut<sup>+</sup>/His<sup>+</sup> 表型高拷贝转化子。经 1% 甲醇诱导 5d 后, SDS-PAGE 检测发酵液上清, 在 66kD 处有一特异蛋白条带表达。Western blot 鉴定表明, 表达蛋白可以和 *HC-Pro* 蛋白抗血清发生结合反应。Far-Western blot 证明该蛋白能与西瓜花叶病毒 CP 蛋白结合, 支持了 *HC-Pro* 蛋白协助传毒的“桥梁”学说。

**关键词** 西瓜花叶病毒, *HC-Pro*, 毕赤酵母, 真核表达

中图分类号 S432.4 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1102-05

**Abstract** *HC-pro* gene of Watermelon Mosaic virus was obtained by RT-PCR was 1371bp in length. It was cloned into pPIC9K, then the eucaryotic recombinant expression plasmid pPIC9K-WHC was constructed. After being linearized with restriction endonuclease *Sal* I, the recombinant plasmid was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The high copy transformants with Mut<sup>+</sup>/His<sup>+</sup> phenotype were selected by RT-PCR and screening on G418, MD and MM medium. Induced by methanol for 5 days, the culture supernatant was analyzed by SDS-PAGE, the results showed that a specific protein with a molecular weight of about 66kD was expressed. Western blot analysis proved that the expression protein could specifically bind to *HC-Pro* polyclonal antibody. Far western blot analysis proved that the expression protein could bind to coat protein, given support to “bridge” hypothesis that *HC-Pro* help aphid transmission of non-persistent viruses.

**Key words** Watermelon Mosaic Virus, *HC-Pro*, *Pichia pastoris*, eucaryotic expression

西瓜花叶病毒(Watermelon Mosaic Virus, WMV)是马铃薯 Y 病毒属重要成员, 此病毒被多种蚜虫以非持久方式传播。该病毒主要危害西瓜和甜瓜, 引起花叶病, 在国内西瓜和甜瓜产区广泛发生, 造成的

损失为 30% ~ 50%, 已经成为制约西瓜和甜瓜高产稳产最主要的因素之一<sup>[1]</sup>, 本研究室在国内首次完成了我国分离物(WMV-Ch)基因组全序列的测定(GenBank 登录号为 DQ399708)。蚜虫在传播此病毒

Received: February 5, 2007; Accepted: April 3, 2007.

This work was supported by the National Natural Sciences Foundation of China (Nos. 39970483, 30270876) and Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT0558).

\* Corresponding author. Tel: +86-29-87091389; E-mail: wuyf@nwsuaf.edu.cn

国家自然科学基金资助(Nos. 39970483, 30270876), 教育部长江学者和创新团队发展计划资助(No. IRT0558)部 http://journals.im.ac.cn

时需要获得病毒编码辅助成分-蛋白酶(Helper Component Proteinase, HC-Pro)的参与才能完成<sup>[2]</sup>。此蛋白是具有多种功能、如控制病毒的蚜传特性、参与病毒的侵染与复制、病毒编码多聚蛋白的加工剪切、病毒的细胞间和长距离移动以及作为病毒转录后基因沉默(PTGS)的抑制子<sup>[3]</sup>。在 HC-Pro 协助传毒机制的研究中,学者们普遍认可桥梁学说,此学说认为 HC-Pro 的 N、C 端的 K1TC,PTK 两个保守的结构域,分别与蚜虫口针受体和病毒外壳蛋白 DAG 结构域结合<sup>[4,5]</sup>。分离纯化具有功能活性的 HC-Pro 是研究 HC-Pro 协助病毒传播机制的首要工作。然而,采用传统的超速离心纯化方案,一些马铃薯 Y 病毒属成员也是无法获得有功能活性的 HC-Pro<sup>[6]</sup>。随后很多学者采用转基因植物表达体系研究具有生物活性的 HC-Pro 蛋白取得成功<sup>[7]</sup>,但是构建这些植物表达体系需要大量时间且蛋白产率很低。Thornbury 等<sup>[8]</sup>还尝试用大肠杆菌和芽孢杆菌表达系统中表达 HC-Pro,传毒实验证实其无蚜传活性。2004 年,Ruiz-Ferrer 等<sup>[9]</sup>利用毕赤酵母成功表达了烟草蚀纹病毒(TEV)有蚜传特性的 HC-Pro。在研究我国 WMV 基因组基础上,本文成功构建了 WMV HC-Pro 的酵母分泌表达菌株,验证了与 CP 蛋白结合的功能,为进一步研究 HC-Pro 介导的非持久性蚜传分子机制奠定了工作基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

WMV 由本实验室分离鉴定保存于西葫芦上。大肠杆菌 JM109 为本实验室保存,克隆载体 pMD18-T simple 购自 TaKaRa 公司,巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115 和质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。抗生素 G418 购自 Invitrogen 公司;M-MLVase 购自 Promega 公司,Taq DNA 聚合酶,T4 DNA 连接酶和各种限制性内切酶购自 Fermentas 公司,Tryptone, Yeast Extract, Peptone 购自 Oxoid 公司,酵母氮源(YNB)购自 Invitrogen 公司,其他试剂均为国产分析纯;用于酵母表达的 YPD、MD、MM、BMGY 及 BMMY 培养基均按照 Easy select™ *Pichia* expression kit 方法配制。

### 1.2 HC-Pro 基因的克隆

参照 GenBank 中登录的 WMV-Ch HC 基因序列设计特异性引物,上游引物 P<sub>1</sub>: 5'-GGAATTCTCCACACCAGAAGTT-3',下游引物 P<sub>2</sub>: 5'-AAATATGCGGCCGCACCAACCCTGTAA AAT-3',划线

部分为 *Eco*R I 和 *Not* I 位点,用于构建酵母表达载体。用于鉴定外源基因整合的醇氧化酶基因 AOX<sub>1</sub> 通用引物:上游引物:P<sub>3</sub>: 5'-GACTGG TTCCAATTGACAAGC-3',下游引物:P<sub>4</sub>: 5'-GGCAA TGGCATTCTGACATCCA-3'。

参考文献 [10] 的方法提取西葫芦病叶总 RNA,按一下程序进行 cDNA 合成:RNA 模板 5μL,oligo (dT)<sub>8</sub> 引物 0.5μg,DEPC 处理的 ddH<sub>2</sub>O 补足 12μL,70℃水浴 5min。简短离心立即放在冰上,再依次加入 5×M-MLV buffer 5μL,10mmol/L dNTPs 5μL,RNasin 1μL,M-MLVase 1μL,DEPC 处理的 ddH<sub>2</sub>O 补足 25μL,42℃水浴 1h,95℃灭活 5min,准备 PCR 扩增。反应体系如下:cDNA 2μL,10×PCR Buffer 2.5μL,25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2μL,引物 P<sub>1</sub>,P<sub>2</sub> 各 1μL,10mmol/L dNTPS 2μL,Taq DNA Polymerase 0.5(5u/μL)μL,ddH<sub>2</sub>O 13μL。PCR 反应流程为:94℃预变性 3min,32 个循环(94℃变性 1min,60.5℃退火 1min,72℃延伸 1~1.5min),72℃延伸 10min。

### 1.3 重组表达质粒 pPIC9K-WHC 的构建

PCR 产物经 H. Q. & Q. 凝胶回收试剂盒(U-gene 公司)进行纯化后,构建重组克隆载体 pMD18-T-WHC。重组质粒和空 pPIC9K 表达载体用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切,试剂盒回收目的基因的单一一条带。将回收产物按照 3:1 进行 16℃过夜连接,转化大肠杆菌 JM109,采用 Kan 和 Amp 双抗培养基筛选,对于转化克隆进行 PCR 和酶切验证,将验证正确的阳性克隆质粒送交上海 Invitrogen 公司进行序列测定。

### 1.4 转化及高拷贝转化子的筛选

用 *Sal* I 单酶切线性化重组质粒 pPIC9K-WHC,乙醇沉淀后电转化感受态毕赤酵母 GS115(电击参数:电压 1500V,电容 25μF,时间 4ms),涂布 MD 平板,30℃静置培养 48h 后挑选单克隆,用乙醇氧化酶特异引物,PCR 法鉴定转化子,反应体系同上,反应条件:94℃ 3min,94℃ 1min,55℃ 1min,72℃ 2min,30 个循环,72℃ 10min。阳性菌落点接在 MM 平板上筛选 Mut<sup>+</sup>(Methanol utilization plus)表型的转化子。将筛选得到的 Mut<sup>+</sup>转化子挑单克隆菌落接种至含 4.0mg/mL G418 的 YPD 平板上,30℃静置培养,筛选 Mut<sup>+</sup>/His<sup>+</sup>高拷贝转化子。

### 1.5 重组蛋白的诱导表达和 SDS-PAGE 检测

挑选具有高拷贝数的 His<sup>+</sup>/Mut<sup>+</sup>的毕赤酵母阳性转化子,接种于 5mL BMGY 培养基(每升含 Yeast extract 10g,Peptone 20g,100mmol Potassium

phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB, Glycerol 10g, (4 × 10<sup>-5</sup>%) Biotin) 于 30℃ 摇床 300r/min 震荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 6.0 左右, 离心收集菌体, 转接到装有 50mL BMMY 培养基 (BMGY 培养基中的 1% Glycerol 改为 1% Methanol) 的 300mL 三角瓶中, 继续培养, 每 24h 补加 100% 甲醇于培养基至终浓度为 1%, 诱导表达 5d。离心弃去细胞, 上清用饱和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀, 沉淀用 0.2mol/L pH 7.2 Tris-HCl 悬浮, 透析除盐后进行 SDS-PAGE。

**1.6 表达产物的 Western blot 鉴定**

参照文献 [11] 方法进行。一抗为兔抗 HC-Pro 多克隆抗体 (稀释度为 1:500), (此为本实验室制备)。二抗为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG (稀释度为 1:5000)。

**1.7 Far-western blot 鉴定 HC-Pro 的功能**

Far-western blot 方法参照文献 [12], WMV CP 为 pET30a 原核表达后纯化的产物, HC-Pro 与 CP 4℃ 亲和反应 24h, 其他步骤同方法 1.6。

**2 结果与分析**

**2.1 构建表达载体 pPIC9K-WHC**

以 WMV HC 基因特异引物 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 进行 RT-PCR, PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳结果显示 WMV HC 基因大小为 1371bp (图 1)。将回收后的该基因与 pMD18-T Simple Vector 连接, 转化筛选得到阳性克隆 pMD18-WHC。重组质粒经 EcoR I 和 Not I 双酶切, 定向插入用相同酶切的 pPIC9K 载体中, 经 Amp 和 Kan 双抗平板及菌落 PCR 筛选阳性重组菌株, 重组质粒再经双酶切鉴定 (图 2), 证明成功构建了真核表达载体 pPIC9K-WHC。随后经序列测定显示此载体中的 HC-Pro 基因与 DQ399708 登录序列一致。

**2.2 转化及高拷贝转化子的筛选**

用 Sal I 线性化的重组质粒 pPIC9K-WHC, 电转化感受态毕赤酵母 GS115, 涂布 MD 平板, 用乙醇氧

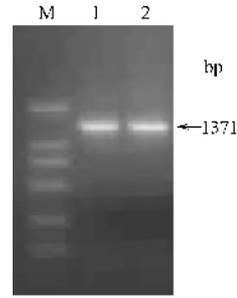


图 1 WMV HC-Pro 基因的 PCR 扩增结果  
Fig. 1 PCR amplification of WMV HC-Pro gene  
M: DL2000; 1, 2: WMV HC-Pro gene.

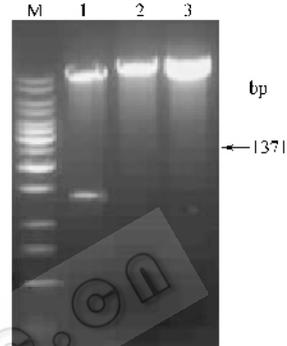


图 2 重组质粒 pPIC9K-WHC 的酶切鉴定

Fig. 2 Digestion of pPIC9K-TEVCP with restrict endonuclease  
M: 1kb DNA ladder; 1: pPIC9K-WHC/EcoR I + Not I; 2: pPIC9K-WHC/EcoR I; 3: pPIC9K/EcoR I.

化酶特异引物, 菌落 PCR 法鉴定整合到酵母基因组上的转化子 (图 3), 转化效率约 70%。扩增产物经琼脂糖电泳分析, 出现 1863bp 大小电泳条带 (pPIC9K 上 492bp 的质粒序列加插入外源 1371bp 的基因序列) 的即为酵母阳性转化子。阳性菌落点接在 MM 平板上筛选 Mut<sup>+</sup> 表型的转化子。将筛选得到的 Mut<sup>+</sup> 转化子挑单克隆菌落接种至含 G418 的 YPD 平板上, 30℃ 静置培养, 筛选出 4 个高拷贝转化子。

**2.3 表达产物 SDS-PAGE 和免疫学鉴定结果**

重组酵母菌株经 1% 甲醇诱导 120h, 样品浓缩透析后经 SDS-PAGE 电泳显示在 66kD 处有较强的

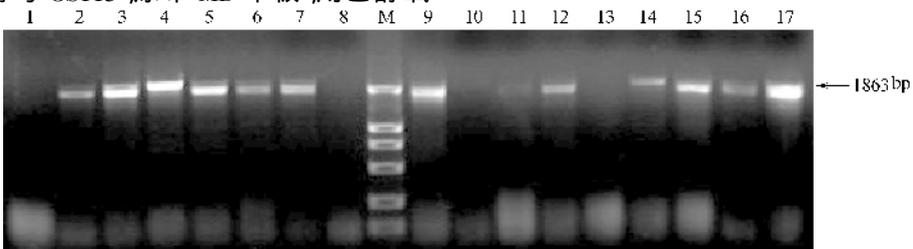


图 3 PCR 法鉴定阳性转化子表型

Fig. 3 Phenotype identification of positive transformants of *Pichia pastoris* GS115 by PCR  
M: DL2000 maker; 2~7, 9, 11, 12, 14~17: positive transformants with HC-Pro gene; 1, 8, 10, 13: transformants without HC-Pro gene.

表达的蛋白条带,而 pPIC9K 空载体转化的酵母和没有经甲醇诱导的重组酵母没有此条带(图 4)。电泳图谱经扫描、电脑软件 BandsScan 分析表明,表达的目的蛋白(120h)占总分泌蛋白的 60%。在 Western blot 试验中,在约 66kD 处可见清晰的单一阳性反应条带,而用 pPIC9K 空载体转化的酵母细胞的表达上清则无该条带的出现,表明在毕赤酵母中成功表达了 HC-Pro 蛋白(图 5)。

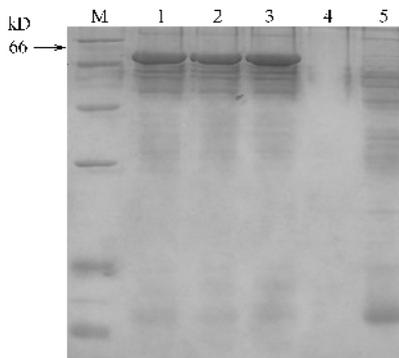


图 4 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of the induced expression products by SDS-PAGE  
M: middle MW protein marker(97.6kD - 14.4kD); 1~3: positive yeast strain induced by methanol; 4: blank yeast strain induced by methanol; 5: positive yeast strain non-induced by methanol.

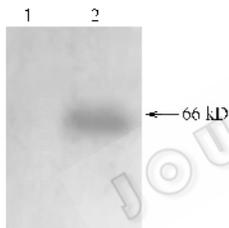


图 5 诱导表达产物的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blot of induced expression products

1: positive yeast strain induced by methanol; 2: blank yeast strain induced by methanol.

## 2.4 HC-Pro 的功能鉴定

WMV CP 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶封闭过夜,然后与表达的 HC-Pro 4℃ 反应 24h,洗脱后和 HC-Pro 的一抗和辣根过氧化物酶标二抗孵育,显色后发现相应位置 37kD 处出现条带(图 6A),而同时做的没有用 HC-Pro 反应对照未出现相应条带(图 6B),这不但验证了 HC-Pro 能与 CP 结合的功能,也是首次报道体外表达的 HC-Pro 表现出与植物内分离的野生的有同样的生物活性。

## 3 讨论

巴斯德毕赤酵母系统作为一种新型外源基因表达系统,具有许多优良的特点<sup>[13]</sup>,毕赤酵母更接近

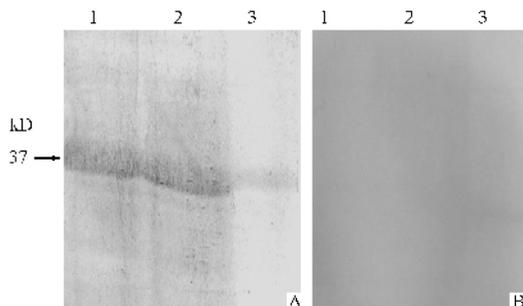


图 6 诱导表达产物的 Far-western blot 功能分析

Fig. 6 Function analysis of induced expression products by Far-western blot

A: results of coat protein binding with HC-Pro; B: results of coat protein binding without HC-Pro. 1, 2: lanes with coat protein; 3: blank lanes without coat protein.

高等真核细胞,表达的外源性目的蛋白可正确折叠和进行糖基化作用,因此具有天然蛋白所应有的生物学活性;培养要求条件低,繁殖速度快,能进行高密度培养;目的基因整合在染色体上具有高稳定性并可形成外源基因的多拷贝整合,且不会因为糖基化价键的问题而引起抗原抗体反应;同时可高表达分泌型功能性外源目的蛋白,因此能有效克服复杂性造成的蛋白损失;毕赤酵母极少分泌自身蛋白,在其培养液中除目的蛋白外,几乎不含任何其他蛋白,易于纯化。

本文首次构建了 WMV HC-Pro 真核表达质粒,获得了大量 Mut<sup>+</sup>/His<sup>+</sup> 表型和高拷贝表达活性的菌株,成功表达出了具有生物活性的分子量约为 66kD 的 HC-Pro 蛋白。由于受酵母表达系统对外源蛋白糖基化修饰作用和分泌肽不能完全切割,表达出的蛋白较病毒自身 HC-Pro 蛋白分子量<sup>[10,11]</sup>。通过本文的研究发现毕赤酵母表达系统作为研究植物病毒基因功能的有利工具,必将发挥更大的作用。同时本研究成功表达了具有生物活性的 HC-Pro 蛋白,为利用免疫印迹手段获得蚜虫体内 HC-Pro 受体蛋白,进一步明确非持久性蚜传分子机制奠定了工作基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Wei NS(魏宁生), Wu YF(吴云锋). Study on virus diseases of watermelon and melon in Shaanxi province. *Shaanxi Journal of Agricultural Science*(陕西农业科学), 1993, 2: 11 - 12.
- [2] Govier DA, Kassanis BA. Virus-induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. *Virology*, 1974, 61: 420 - 426.
- [3] Plisson C, Drucker M, Blanc S, et al. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 23753 - 23761.

- [ 4 ] Blanc S , Lopez-Moya JJ , Wang R , *et al.* A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* , 1997 **231** :141 – 147.
- [ 5 ] Peng YH , Kadoury D , Gal-On A , *et al.* Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus : effects on aphid transmission and binding to purified virions. *Journal of General Virology* , 1998 **79** :897 – 904.
- [ 6 ] Wang RY , Pirone TP. Purification and characterization of turnip mosaic virus helper component protein. *Phytopathology* , 1999 **89** :564 – 567.
- [ 7 ] Carrington JC , Freed DD , Oh CS , *et al.* Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *The European Molecular Biology Organization ( EMBO )* , 1990 **9** :1347 – 1353.
- [ 8 ] Thornbury , DW , van den Heuvel JFJM , Pirone TP. Expression of potyvirus proteins in insect cells infected with a recombinant baculovirus. *Journal of General Virology* , 1993 **74** :2731 – 2735.
- [ 9 ] Ruiz-Ferrer V , Goytia E , Martínez-García B , *et al.* Expression of functionally active helper component protein of Tobacco etch potyvirus in the yeast *Pichia pastoris* . *Journal of General Virology* , 2004 **85** :241 – 249.
- [ 10 ] Wang XM( 王秀敏 ) , Wu YF( 吴云锋 ) , Cheng JL( 成巨龙 ) , *et al.* Clone and prokaryotic expression of coat protein gene of tobacco etch virus. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry( 西北农林科技大学学报 )* 2006 **34** ( 6 ) :124 – 127.
- [ 11 ] Sambrook J , Russell DW. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* . 3<sup>rd</sup> ed , New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002.
- [ 12 ] Seddas P , Boissinot S , Strub JM , *et al.* Rack-1 , GAPDH3 , and actin : proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid. *Virology* , 2004 **325** :399 – 412.
- [ 13 ] Cereghion JC , Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *FEMS Microbiology Reviews* , 2000 **24** :45 – 66.