

甜菜坏死黄脉病毒 75kDa 通读蛋白 基因构建与表达

于嘉林 李大伟 刘 仪

(北京农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

摘 要 利用 DNA 重组技术, 将甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV) 内蒙分离物的 CP 基因和 54kDa 通读区片段拼接, 构建了 BNYVV 75kDa 通读蛋白基因。序列分析表明, 构建的 75kDa 通读蛋白基因与野生型相比, 只有 4 个核苷酸发生了改变 (包括将 CP 基因的终止密码子 TAG 改造为 ATG), 相应地 2 个氨基酸也发生了改变。将 75kDa 通读蛋白基因及其 54kDa 片段分别克隆到 pJW2 上, 构建了这两个基因的原核表达载体。SDS-PAGE 和 Western blotting 检测结果表明, 75kDa 通读蛋白基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中经温度 (42°C) 诱导后除可特异地表达 75kDa 蛋白外, 还产生两种小蛋白。75kDa 通读蛋白基因的 54kDa 片段只表达出 37kDa 的蛋白。

关键词 甜菜坏死黄脉病毒, 75kDa 通读蛋白基因, 54kDa 片段, 原核表达

甜菜坏死黄脉病毒 (Beet Necrotic Yellow Vein Virus, BNYVV) 是以甜菜多粘菌 (*Polymyxa betae*) 为传播介体的多分体正链 RNA 病毒, 引起甜菜丛根病 (Rhizomania)^(1,2)。位于 RNA2 5' 端的 CP 基因的琥珀终止密码子 UAG 能通读产生一种 75kDa 通读蛋白。据 Tamada 等⁽³⁾和 Schmitt 等⁽⁴⁾研究, 75kDa 通读蛋白在控制介体传毒和病毒粒子装配两方面均起重要作用。为深入研究 75kDa 通读蛋白的功能及探讨利用 75kDa 通读蛋白基因构建抗 BNYVV 基因工程甜菜植株的可能, 本文在分别克隆 BNYVV CP 基因和 54kDa 片段 (编码 75kDa 蛋白的通读区) 的基础上^(5,6), 构建了 75kDa 通读蛋白基因。并分别将 75kDa 通读蛋白基因及其 54kDa 片段在大肠杆菌中进行了表达, 本文首次报道 BNYVV 75kDa 通读蛋白基因在大肠杆菌中的特异表达。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BL21 (DE3) 和温度诱导型原核表达载体 pJW2 由本实验室提供。含 CP 基因的重组质粒 pGC24 由本室姚华建构建⁽⁵⁾, 含 54kDa 片段的重组质粒 pGBW52 由作者构建⁽⁶⁾。

1.2 方法

1.2.1 引物的合成: 依据 Bouzoubaa 等⁽⁷⁾报道的 BNYVV RNA2 的核苷酸序列, 设计并合成引物 D: 5' TGGTTCTACCTTGAAC 3', 用于扩增 3' 末端缺失 17nt 的 CP 基

因。该引物与 BNYVV RNA2 的 694—679nt 互补。

1.2.2 3' 末端缺失 17nt 的 CP 基因的 PCR 扩增: 以 pGC24 为模板, 采用引物 D 和引物 CP-2⁽⁶⁾, 在 PE480 型 PCR 仪上进行扩增, 共进行 30 个循环。每个循环包括: 94℃ 变性 1 分钟, 50℃ 退火 2 分钟, 72℃ 延伸 3 分钟 (最后一个循环的延伸反应延至 10 分钟)。电泳回收目的片段, 再以 T4 DNA 聚合酶将目的片段修补成平齐末端, 苯酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀回收。

1.2.3 75kDa 通读蛋白基因的构建: 质粒提取、酶切、回收、连接和转化均参照 Sambrook 等的方法进行⁽⁸⁾。以 KpnI 酶切 pGBW52⁽⁶⁾, T4 DNA 聚合酶处理成平端, 再和 3' 末端缺失 17nt 的 CP 基因进行连接并转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。碱解法提取质粒, 通过酶切鉴定和 PCR 扩增筛选正向插入的重组质粒。

1.2.4 序列测定: 方法同文献 [6]。

1.2.5 原核表达载体的构建: 温度诱导型原核表达载体 pJW2 表达融合蛋白, 起始密码子 ATG 位于 P_RP_L 启动子下游的 NdeI 酶切位点中。将 NdeI 位点中的 ATG 破坏后再插入外源基因则表达非融合蛋白。将 BNYVV 75kDa 通读蛋白基因及其 54kDa 片段分别正向插入 pJW2 P_RP_L 启动子下游, 构建原核表达载体。

1.2.6 外源基因的诱导表达: 含原核表达载体的 BL21 (DE3) 于 30℃ 活化过夜后, 以 1:100 稀释到 10ml LB 培养液中 (含 Amp 50μg/ml), 继续在 30℃ 摇床培养至对数生长中期, 迅速转至 42℃ 摇床培养 4—6 小时, 10 000r/min 离心 1 分钟收集菌体, 加入 80—100μl 样品缓冲液 (40mmol/L Tris-HCl pH6.8, 10% 甘油, 2% SDS, 5% 巯基乙醇, 0.1% 溴酚蓝), 煮沸 10 分钟, 置 4℃ 备用。

1.2.7 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析: 浓缩胶浓度为 4.5%, 分离胶浓度为 12.5%, 电泳缓冲液为 250mmol/L Tris, 192mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS pH8.3。以 15mA 恒流浓缩, 待溴酚蓝进入分离胶后电流调至 30mA, 电泳 5—6 小时。电泳结束后, 用考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色液脱色至背景清晰为止。

1.2.8 Western blotting: BNYVV 75kDa 通读蛋白 C 端区域 (相应的核苷酸编码区域为 1139—2217nt) 专化性抗血清⁽⁴⁾由法国 Louis Pasteur 大学的 K. Richards 博士惠赠, 抗 BNYVV 病毒粒子-IgG 由本实验室彭日荷惠赠。

按 Towbin 等⁽⁹⁾的方法将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶电转移到硝酸纤维素膜 (NC) 上 (60V, 3 小时, 4℃)。Western blotting 采用 Promega 公司的试剂盒并按照其产品说明书进行。

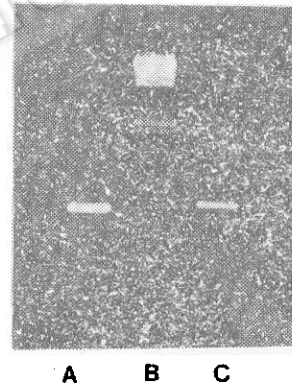


图 1 完整的和 3' 末端缺失 17nt 的 CP 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 PCR products of Intact and 3'-terminal deleted CP gene of BNYVV
A. 3'-terminal deleted CP gene
B. λ /Hind III markers
C. Intact CP gene

2 结果与分析

2.1 3' 末端缺失 17nt 的 BNYVV CP 基因的 PCR 扩增

根据 Bouzoubaa 等⁽⁷⁾发表的 BNYVV F13 分离物 RNA2 的核苷酸序列, BNYVV 75kDa 通读蛋白基因起始于 145nt, 终止于 2220nt, 全长为 2076nt。在 709—711nt 处含有 CP 基因的琥珀终止密码子 UAG, 为了获得 75kDa 通读蛋白基因, 必须对 UAG 进行改造, 作者在克隆 54kDa 片段时已成功地将 709—711nt 处的 UAG 改造为 ATG⁽⁶⁾, 故只要将 CP 基因 3' 末端缺失 17nt 后正向插入 pGBW52 的 KpnI 位点即可构建完整的 75kDa 通读蛋白基因。以 pGC24 为模板, 以引物 D 和引物 CP-2 作为扩增引物进行 PCR 扩增, 得到一特异的片段, 比完整的 CP 基因的 PCR 产物略小, 与设计完全相符 (图 1, 图 2)。

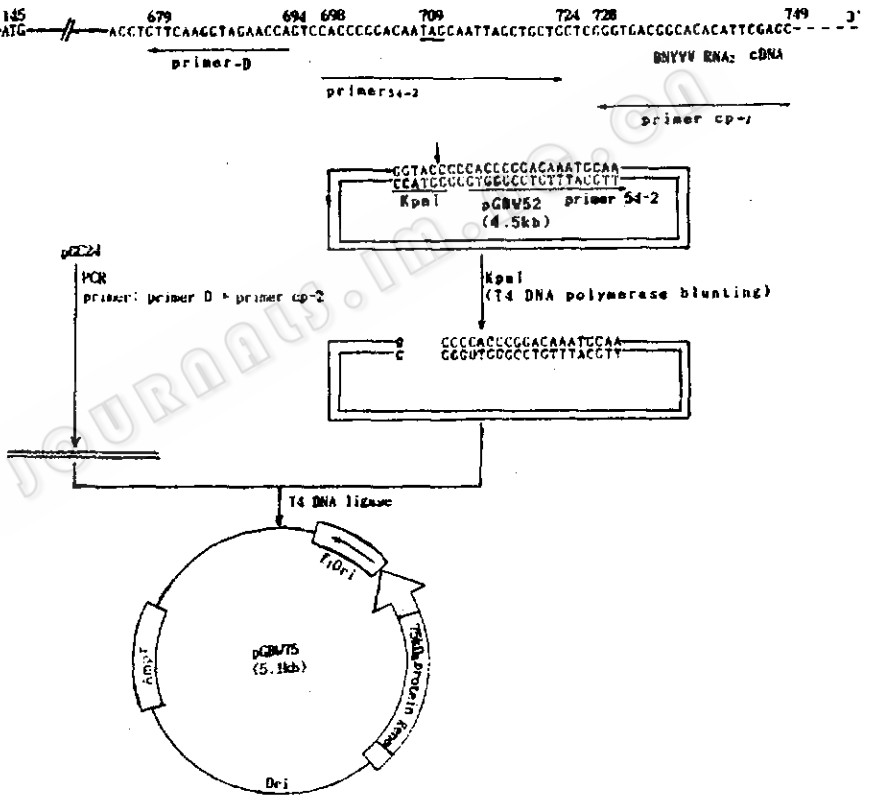


图 2 BNYVV 75kDa 通读蛋白基因构建示意图

Fig. 2 Construction of 75kDa readthrough protein gene from BNYVV

2.2 BNYVV75kDa 通读蛋白基因的构建

将 PCR 扩增出的 3' 末端缺失 17nt 的 CP 基因插入 pGBW52 的 KpnI 位点, 经酶切鉴定和完整的 CP 基因的 PCR 扩增 (只有正向插入者才能扩增出完整的 CP 基因) 筛选, 得到正向插入的重组质粒 pGBW75 (图 2)。以引物 CP-1 (位于连接区域的下游) 为引物, 采用双脱氧终止法对 pGBW75 的连接区域的核苷酸序列进行测定。结果表明 pGBW75

的连接区域符合设计要求，插入片段中含有 75kDa 通读蛋白基因的完整编码区 2073nt。与野生型相比，构建的 75kDa 通读蛋白基因只有 4 个核苷酸发生了改变（包括将 CP 基因的琥珀终止密码子 TAG 改造为 ATG），由此推导的氨基酸序列中只有 2 个氨基酸发生改变，即 184 位的丝氨酸变为苏氨酸，第 189 位的终止密码子变为甲硫氨酸。

2.3 75kDa 通读蛋白基因及其 54kDa 片段原核表达载体的构建

以重组质粒 pGBW75 和 pGBW52 为目的基因来源，按图 3 所示途径分别克隆进入表达载体 pJW2，以酶切鉴定插入片段的大小和方向获得 75kDa 通读蛋白基因及其

54kDa 片段的原核表达载体 pJDW28 和 pJWW10（图 3）。

2.4 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色结果表明：pJDW28 工程菌经 42℃ 诱导后除特异地产生 75kDa 条带和一条比 75kDa 稍小的条带外，还产生一 37kDa 的蛋白条带；pJWW10 工程菌经 42℃ 诱导后只特异地产生 37kDa 的蛋白条带（图 4）。

2.5 Western blotting

为了进一步检验所表达的特异蛋白是否是目的基因的表达产物，以 BNYVV 病毒粒

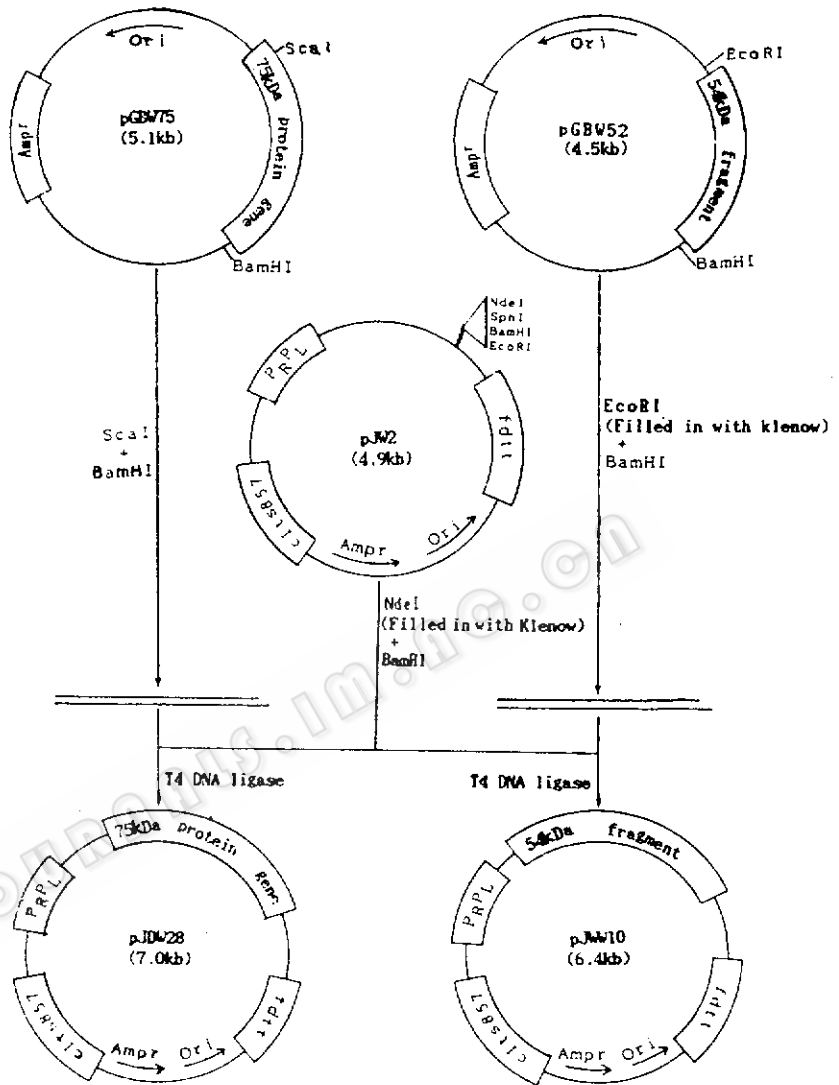


图 3 BNYVV 75kDa 通读蛋白基因及其 54kDa 片段原核表达载体构建示意图

Fig. 3 Prokaryotic expression vectors construction of 75 kDa readthrough protein gene and its 54 kDa fragment from BNYVV

子-IgG 或 BNYVV 75kDa 通读蛋白 C 端区域专化性抗血清为第一抗体, 碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体, 对 75kDa 通读蛋白基因及其 54kDa 片段的大肠杆菌表达产物进行 Western blotting 分析, 结果表明: pJDW28 经 42°C 诱导后所产生的两种大的特异性蛋白 (75kDa 和一种稍小的蛋白) 不仅与 BNYVV 病毒粒子-IgG 起反应, 而且与 75kDa 通读蛋白 C 端区专化性抗血清起反应。37kDa 蛋白不与 BNYVV 病毒粒子-IgG 起反应, 只与 75kDa 通读蛋白 C 端区专化性抗血清起反应, 因此, 37kDa 蛋白应位于 75kDa 通读蛋白的通读区 (图 5)。pJWW10 经 42°C 诱导后特异性产生的 37kDa 蛋白只

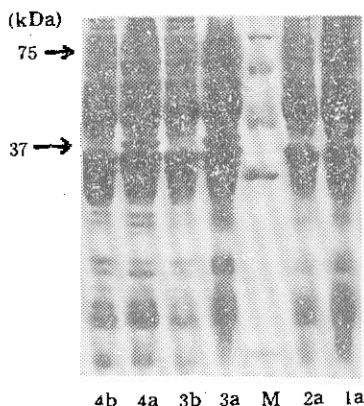


图 4 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expression products

M. Pharmacia low MW protein markers

1. BL21 (DE3), 2. pJW2, 3. pJDW28, 4. pJWW10
a. Induced at 42°C for 4–6h b. Without induction

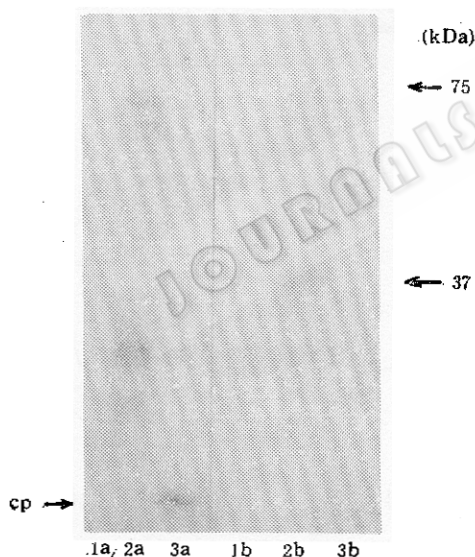


图 5 pJDW28 表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of expression products from pJDW28

a. BNYVV virion-IgG

b. Specific antiserum against the C-terminal portion (nucleotides 1139–2217) of 75kDa readthrough protein

1. pJDW28 (without induction)

2. pJDW28 (induced at 42°C for 4–6h)

3. Purified BNYVV

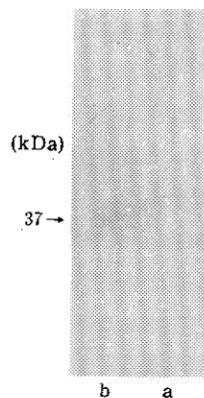


图 6 pJWW10 表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 6 Western blotting analysis of expression products from pJWW10

a. Without induction

b. Induced at 42°C for 4–6h

与 75kDa 通读蛋白 C 端区专化性抗血清起反应, 进一步证实 37kDa 蛋白即为 54kDa 片段的表达产物 (图 6)。

3 讨 论

在大肠杆菌中表达 BNYVV 75kDa 通读蛋白本文是首次报道。75kDa 通读蛋白基因在大肠杆菌中的成功表达,有以下几个原因:(1)选用具 PrP_L 启动子的高效原核表达载体 pJW2。(2)75kDa 通读蛋白基因的起始密码子 ATG 距上游的 SD 序列 (AAGGAG) 只有 15nt。(3)采用低蛋白酶活性的大肠杆菌 BL21 (DE3) 作为受体菌。BL21 (DE3) 株系适于高效表达外源基因,该株系不仅缺乏 ompT 外膜蛋白酶基因,而且还缺乏 Lon 蛋白酶基因^[9],此两种蛋白酶均能降解自包涵体释放的外源蛋白。由于 BL21 (DE3) 缺乏降解外源蛋白的蛋白酶,因而也提高了外源蛋白(尤其是不稳定的 75kDa 通读蛋白)的产量。曾将 pJDW28 和 pJWW10 分别转入大肠杆菌的 DH5 α 株系,SDS-PAGE 和 Western blotting 均检测不到外源基因的表达。

Quillet 等^[10], Niesbach-Kl \ddot{o} sgen 等^[11], Tamada 等^[3] 和 Schmitt 等^[4] 在检测感染 BNYVV 的番杏 (*Tetragonia expansa*) 病叶和昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*) 病叶中的 75kDa 通读蛋白时,都观察到在感病叶片中除 75kDa 通读蛋白外,还存在数目不等的比 75kDa 小的蛋白,并认为这些小蛋白是不稳定的 75kDa 通读蛋白的降解产物。pJDW28 经 42 $^{\circ}$ C 诱导后除特异地表达 75kDa 通读蛋白外,还产生一种比 75kDa 稍小的蛋白和 37kDa 蛋白。因此比 75kDa 稍小的蛋白和 37kDa 蛋白也可能是 75kDa 通读蛋白的降解产物。但 Western blotting 结果证实,37kDa 蛋白位于 75kDa 通读蛋白的通读区,由于病毒的外壳蛋白要比 75kDa 通读蛋白的通读区要稳定得多,37kDa 蛋白也有可能不是 75kDa 通读蛋白的降解产物,而是其它原因所形成。比如,在 75kDa 通读蛋白基因上有多个 ATG 与第一个起始密码子 ATG 处于同一相位,原核表达的复杂性可能导致同一基因从不同的位点同时起始,从而形成一个基因有多种蛋白表达产物的现象。

关于 BNYVV 54kDa 片段在大肠杆菌中的表达,只有 Niesbach-Kl \ddot{o} sgen 等^[11] 在大肠杆菌中表达了 54kDa 蛋白的 C 端区域(相应核苷酸区域为 1139—2217nt),尚没有表达完整 54kDa 蛋白的报道。作者构建的原核表达载体 pJWW10 经 42 $^{\circ}$ C 诱导只表达 37kDa 蛋白,未能表达出完整的 54kDa 蛋白,其原因正在进一步研究之中。

参 考 文 献

- [1] 高锦梁等. 植物病理学报, 1983. 13: 1—4.
- [2] Richards K *et al.* Ann Rev phytopathol. 1992. 30: 291—313.
- [3] Tamada T *et al.* J Gen Virol, 1991. 72: 1497—1504.
- [4] Schmitt C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 1992. 89: 5715—5719.
- [5] 姚华建等. 生物工程学报, 1993. 9: 147—151.
- [6] 于嘉林等. 生物工程学报, 1995. (印刷中).
- [7] Bouzoubau S *et al.* J Gen Virol, 1986. 67: 1689—1700.
- [8] Sambrook J *et al.* Molecular Cloning; a Laboratory Manual (2nd ed.), 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [9] Towbin H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 1979. 76: 4350—4354.
- [10] Quillet L *et al.* Virology. 1989. 172: 293—301.
- [11] Niesbach-Kl \ddot{o} sgen U *et al.* Virology, 1990. 178: 52—61.

Construction and Expression of 75kDa Readthrough Protein Gene from Beet Necrotic Yellow Vein Virus

Yu Jialin Li Dawei Liu Yi

(National Laboratory for Agrobiotechnology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Using DNA recombinant technique, coat protein (CP) gene and 54kDa fragment from beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) RNA2 were ligated to construct 75kDa readthrough protein gene. Comparing with wild-typed 75kDa readthrough protein gene, 4 nucleotides of constructed 75kDa readthrough protein gene were replaced, including CP amber termination codon TAG to ATG. Corresponding, 2 amino acids were changed. The temperature-inducible expression vectors containing 75kDa readthrough protein gene or its 54kDa fragment were constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) respectively. The results of SDS-PAGE and Western blotting show: (1) specific expression of 75kDa readthrough protein gene was achieved by temperature induction. Two smaller proteins, one is 37kDa, were also observed. (2) only a 37kDa protein from 54kDa fragment was expressed. This is the first report about specific expression of BNYVV 75kDa readthrough protein gene in *E. coli*.

Key words Beet necrotic yellow vein virus, 75kDa readthrough protein gene, 54kDa fragment, expression in *E. coli*