维普资讯 http://www.cqvip.com

第14卷第2期 中国病毒学 Vol.14 No.2
1999年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1999

(12)
15T-162
Q939.4
S432.4

# 马铃薯Y病毒普通系外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达*

王振东[1] 张 敏[1] 畑谷達児[2] 上田一郎[2]

[1](沈阳农业大学植保系,沈阳 110161)
[2](日本北海道大学农学部植物ウイルス学讲座,日本札幌 060)

**摘 要** 将马铃薯Y病毒普通系($PVY^0$)的外壳蛋白基因克隆到表达质粒 pMAL-c2 中,构建这一基因在大肠杆菌中的表达载体 pMAL-c2-$PVY^0$CP。SDS-PAGE 及 Western blotting 检测结果表明,这一表达载体在 *E. coli* DH5α 中经 IPTG 诱导可表达分子量为 71.8 kDa 的特异性融合蛋白。以 amylose resin 亲合柱层析纯化这一融合蛋白为抗原,免疫家兔制备了效价为 1∶1 024 的特异性抗血清。用该抗血清可通过对流免疫电泳、免疫双扩散及 Western blotting 对 PVY 进行检测。

**关键词** 马铃薯Y病毒普通系,外壳蛋白基因,表达产物,抗血清

马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)是马铃薯Y病毒组的模式成员、分布世界各地,有多个株系分化,主要危害马铃薯及烟草,造成严重经济损失[1]。PVY 粒体呈线条状,含有大小约 10 kb 的单链正义 RNA 基因组,基因组 5′端有一基因组连接蛋白(VPg)及 3′端有一 Poly A,该基因组为一长的开放读框(ORF),可翻译成一个大的聚合蛋白[2]。通过 $PVY^N$(Tobacco veinal necrosis strain)全核酸序列分析,建立了其基因图谱。基因所编码的蛋白自 5′端至 3′端分别是 31K 蛋白、辅助蛋白(Helper component, HC)、胞质内含体蛋白(Cytoplasmic inclusion protein, CI)、基因组连接蛋白(Genome-linked protein, VPg),两个核内含体蛋白(Nuclear inclusion protein)即蛋白酶(Protease NIa)和复制酶(Polymerase NIb)及位于 3′非翻译区上游的外壳蛋白(CP)[2]。本文将报道 $PVY^0$ 外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达,及用表达产物制备特异性抗血清用于 PVY 检测的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒与单克隆抗体 *E. coli* DH5α;含有 $PVY^0$ 外壳蛋白基因的质粒 pGEM7Z-$PVY^0$CP;表达质粒 pMAL-c2 及单克隆抗体 MoAb $PVY^0$-21H05 与 MoAb $PVY^N$-4E7 均由日本国北海道大学农学部植物病毒研究室提供。

1.1.2 酶及试剂 限制性内切酶;连接酶;PCR 试剂盒分别购自 Boehringer Mannheim, Amersham 及日本宝酒造公司。

### 1.2 方法

1.2.1 $PVY^0$CP 基因的 PCR 扩增

1.2.1.1 引物 按文献[3]报道的 $PVY^0$ 序列合成一对 CP 基因引物。为便于克隆,在 5′端引物上设计了

收稿日期:1998-04-20,修回日期:1998-06-29
* 本研究受辽宁博士基金资助

维普资讯 http://www.cqvip.com



EcoRI 位点，在 3′端引物上设计了 PstI 位点。引物序列为：5′端引物 5′-CTC GAA TTC ATG GAT CAC CAT CAA G-3′；3′端引物 5′-CGA CTG CAG TCA CAT GAT CTT GAC-3′。

1.2.1.2 PCR 扩增 以质粒 pGEM7Z-PVY$^0$CP 为模板，用 5′和 3′端引物扩增 CP 基因，PCR 条件为 94 ℃变性 60 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃合成 60 s，扩增 25 个循环。

1.2.2 大肠杆菌表达载体的构建

酒精沉淀纯化 PCR 产物，用 EcoRI 和 PstI 双酶切后插入表达质粒 pMAL-c2 相应切点中转化 *E. coli* DH5α。

1.2.3 重组子的鉴定筛选

碱法提取质粒[4]，用 EcoRI 和 PstI 双酶切及用 2.1.1 项中的两段引物进行 PCR 扩增鉴定重组子。

1.2.4 表达载体的诱导表达

含 PVY$^0$CP 基因表达载体的 DH5α 经 37 ℃摇动培养过夜活化后，取 10 μL 菌液接种到含 0.1 mmol/L IPTG 的 2 mL Rich medium 中，于 37 ℃摇动培养诱导表达 4 h。

1.2.5 表达产物的 SDS-PAGE 分析

取培养物 1.5 mL 装入 eppendorf 管中，离心收集细胞，细胞悬浮在 75 μL TE 缓冲液中。取样品 7 μL 加等量上样缓冲液，于 100 ℃变性 5 min，按文献[4]方法进行 SDS-PAGE 电泳。电泳毕，用考马斯亮蓝染色，10% 冰乙酸脱色，干燥胶板后拍照。

1.2.6 表达产物的 Western blotting 分析

1.2.6.1 转膜 SDS-PAGE 后，凝胶放转移缓冲液(25 mmol/L Tris，192 mmol/L 甘氨酸，20%(V/V)甲醇，pH8.3)中漂洗 20 min。按文献[5]方法将蛋白质从凝胶中电转移到硝酸纤维(NC)膜上，电压 100 V，电转移 60 min。

1.2.6.2 封闭 电转移毕的 NC 膜在 50 mL TBST 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，150 mmol/L NaCl，0.05% Tween-20)中漂洗，转入封闭液中(TBST + 1% BSA)中封闭 60 min。

1.2.6.3 第一抗体反应 封闭后的 NC 膜装入小塑料袋中，加用 TBS 稀释的单克隆抗体 MoAb PVY$^0$-21H05 或 MoAb PVY$^N$-4E7(1∶1 000)5 mL 封闭塑料袋，于 37 ℃保温 60 min，取出 NC 膜用 TBST 洗 3 次，每次 15 min。

1.2.6.4 第二抗体反应 NC 膜装入小塑料袋中，加入用 TBS 稀释的羊抗兔-IgG-ALP(1∶800)5 mL，封闭塑料袋，于 37 ℃保温 60 min。同 1.2.6.3 项洗膜。

1.2.6.5 显色反应 装有 NC 膜的塑料袋中加入显色液 5 mL(即 5 mL 碱性磷酸缓冲液中含 25 μL 75 mg/mL 的氮蓝四唑二甲基甲酰胺液和 18.75 μL 50 mg/mL 的 5′-bromo-4-Chloro-3-indoxyl phosphata 二甲基甲酰胺液)，于室温在暗处显色至条带清晰，取出 NC 膜干燥后拍照。

1.2.7 表达产物的纯化

按文献[6]方法进行表达产物的纯化。离心收集诱导表达细胞，用 50 mL 裂解液悬浮细胞后用超声波处理，离心去细胞碎片，上清加 3 倍体积过柱缓冲液，样品过 amylose resin 亲合层析柱，流速为 1 mL/min。用 3 倍床体积的含 0.25% Tween-20 的过柱缓冲液洗床，流速为 1 mL/min。最后用含 10 mmol/L 麦芽糖的过柱缓冲液洗床，流速为 1 mL/min，流出液中含有表达产物，收集备用。

1.2.8 抗血清的制备

以纯化的表达产物为抗原对家兔进行耳静脉免疫注射。每周免疫一次，每次免疫抗原量为 200～250 μg，共免疫 4 次，最后一次免疫注射一周后采血，分离抗血清备用。

1.2.9 抗血清效价测定及 PVY 检测

以表达产物为抗原，用微量沉淀法测定抗血清效价。以感染 PVY 并表现病状的马铃薯叶片汁液为抗原，与所制备的抗血清进行对流免疫电泳，琼脂双扩散及 Western blotting，检测样品中的 PVY。

维普资讯 http://www.cqvip.com



## 2 结果

**2.1 PCR 扩增结果** 经 1% agarose-EB 电泳检测，PCR 产物中含 0.80 kb 的特异性核苷酸片段。结果见图 1。该片段大小与文献[3]报道的 $PVY^0CP$ 基因一致。

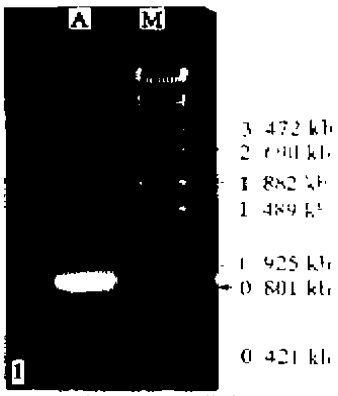


图 1　PCR 产物电泳图谱

A：PCR 产物

M：λ-DNA-StyI marker

Fig. 1　The electrophoresis pattern of PCR products

A：The products of PCR

M：λ-DNA-StyI marker

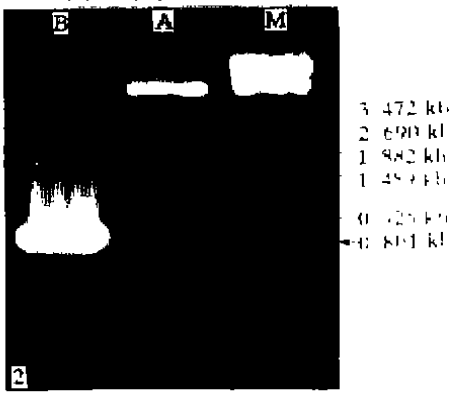


图 2　重组克隆的酶切电泳图谱

A：EcoRI 和 PstI 双酶切

B：PCR 产物

M：λ-DNA-StyI marker

Fig. 2　The electrophoresis endonuclease restriction map of recombinant

A：EcoRI + Pst I cut

B：PCR products

M：λ-DNA-Sty I marker

**2.2 表达载体的酶切及 PCR 鉴定结果** 重组子 DNA 用 EcoRI 和 PstI 双酶切，可切下 0.80 kb 的核苷酸片段，与预期大小一致，结果见图 2。用一对 PVY CP 特异性引物进行 PCR 可扩增出 0.80 kb 的 DNA 片段(图略)，并把这一重组表达载体命名为 pMAL-c2-$PVY^0$CP，其构建策略见图 3。

**2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析** SDS-PAGE 电泳结果表明，含有 pMAL-c2-$PVY^0$ CP 的工程菌 DH5α 经 IPTG 诱导后产生了一条分子量为 71.8 kDa 的特异性蛋白质条带，分子量大小与预期一致，但在对照处理样品中无此条带产生。结果见图 4。

**2.4 表达产物的 Western blotting 分析** 图 5 示表达产物与单克隆抗体 MoAb $PVY^0$-21H05 在 NC 膜上的 Western blotting 结果，含 pMAL-c2-$PVY^0$ CP 的工程菌 DH5α 有特异性杂交条带出现(泳道 A)，其它对照样品无杂交条带出现。同时也用 MoAb $PVY^N$-4E7 在另一块 NC 膜上进行 Western blotting，但无杂交条带出现，于是获得所表达的融合蛋白含有 $PVY^0$ CP 亚基的直接实验证据。

**2.5 抗血清的效价测定及 PVY 检测结果** 微量沉淀法测得抗血清的效价为 1:1 024，用该抗血清可用对流免疫电泳、琼脂双扩散及 Western blotting 检测出马铃薯叶片中的 PVY。结果见图 6(琼脂双扩散和 Western blotting 图略)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



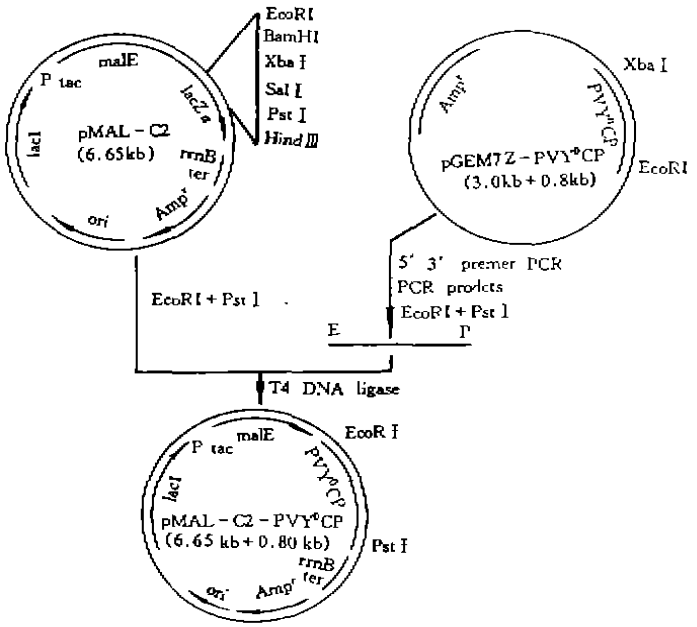


图 3 表达载体 pMAL-c2-PVY$^0$CP 的构建

Fig 3 Construction of expression vector pMAL-c2-PVY$^0$ CP

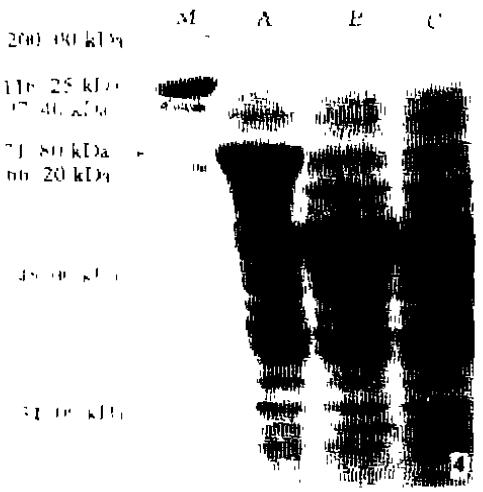


图 4 表达产物的 SDS-PAGE 电泳图谱

M：蛋白分子量标准；A：从含有 pMAL-c2-PVY$^0$ CP 的 *E. coli* DH5α 细胞中提取的可溶性蛋白；B：从含有 pMAL-c2 的 *E. coli* DH5α 细胞中提取的可溶性蛋白；C：从 *E. coli* DH5α 细胞中提取的可溶性蛋白。

Fig. 4 The SDS-PAGE pattern of CBB stained

M: Protein molecular weight standards marker;

A: The soluble proteins extracted from *E. coli* DH5α cell transformed by expression vectors of pMAL-c2-PVY$^0$ CP;

B: The soluble proteins extracted from *E. coli* DH5α cell transformed by pMAL-c2;

C: The soluble proteins extracted from *E. coli* DH5α cell.

## 3 讨论

马铃薯 Y 病毒主要侵染茄科作物、园艺作物、牧草及花卉等，造成严重经济损失。近年来，马铃薯种薯及一些名贵花卉的组织培养快速繁殖产业，正在我国一些农业开发区院所及企业蓬勃兴起，于是便涉及到培养材料及组培苗的带毒检测问题。血清学方法是检测病毒的快速灵敏方法，但需大量高纯度的特异性抗血清。以往多用提纯的病毒粒体为抗原制备抗血清，但有很多弊端。如一些病毒在寄主体内含量较低，难以提纯获得足够的抗原。还有一些病毒分离提纯困难不易得到纯化的病毒粒体，以此为抗原制备的抗血清含有寄主蛋白抗体，通常产生假阳性反应，很难准确判断血清学反应结果。而通过基因工程技术使病毒外壳蛋白基因在原核细胞中表达，以表达产物的抗原制备抗血清，便可克服上述弊端，得到大量高特异性的抗血清。同时所构建的工程菌株可在超低温条件下长期保存，根据需要随时诱导表达用于抗血清的制备，可见这是一条制备抗血清的有效途径。

维普资讯 http://www.cqvip.com



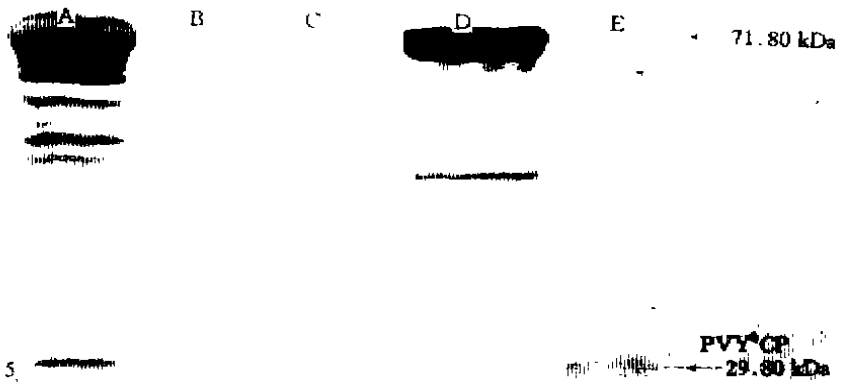


图 5　Western blotting 图谱(单克隆抗体为 MoAb PVY⁰-21H05)
箭头示表达融合蛋白的位置 (71.8 kDa)

A：从含有 pMAL-c2-PVY⁰ CP 的 *E. coli* DH5α 细胞中提取的可溶性蛋白；B：从含有 pMAL-c2-的 *E. coli* DH5α 细胞中提取的可溶性蛋白；C：从 *E. coli* DH5α 细胞中提取的可溶性蛋白；D：从含有 pMAL-c2-PVY⁰ CP 的 *E. coli* JM 109 细胞中提取的可溶性蛋白；E：纯化的 PVY⁰ 蛋白。

Fig. 5　The pattern of Western blotting analysis (PVY⁰ specific MoAb PVY⁰-21H05 was used as a primary antibody)
Arrow indicated the position of expression fusion protein (71.8 kDa)

A: The soluble proteins extracted from *E. coli* DH5α cell transformed by expression vectors pMAL-c2-PVY⁰ CP;
B: The soluble proteins extracted from *E. coli* DH5α cell transformed by expression vectors pMAL-c2;
C: The soluble proteins extracted from *E. coli* DH5α cell; D: The soluble proteins extracted from *E. coli* JM 109 cell transformed by expression vectors pMAL-c2-PVY⁰ CP; E: Purified PVY⁰ proteins.

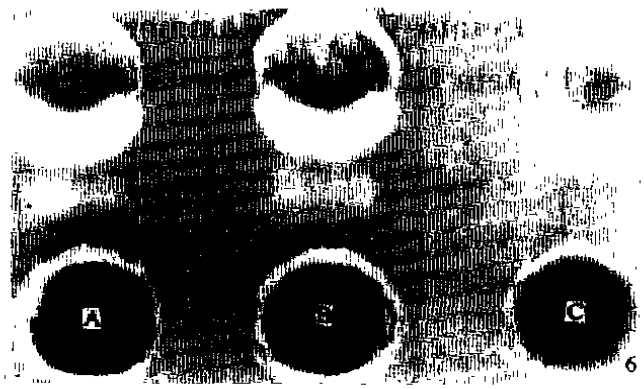


图 6　对流免疫电泳反应

1. 上排孔：用表达产物制备的抗血清；
2. 下排孔：A 和 B 为从感染 PVY 的马铃薯叶片中榨取的汁液，C 为健株马铃薯叶片汁液。

Fig. 6　Immunoelectrophoresis reaction

1. Up lane: PVY⁰ antiserum prepared by expression products in *E. coli*;
2. Down lane: The sap extracted from PVY infected potato leaf (A, B) and healthy potato leaf sap(C).

维普资讯 http://www.cqvip.com



本研究采用的表达载体 pMAL-c2 是个带有多克隆位点(Poly linker)的载体。多克隆位点的上游含有 malE 基因，可编码产生 42 kDa 的麦芽糖结合蛋白(maltose-binding protein, MBP)，因此外源基因以融合蛋白形式表达，一般情况下表达率可达到细胞总蛋白的 20～40%，且表达产物极易通过亲合层析纯化，多数情况下所表达的病毒融合蛋白不影响其免疫原性和反应原性。本研究所构建的表达载体 pMAL-c2-PVY$^0$ CP 在 *E. coli* DH5α 及 JM 109 中都能用 IPTG 诱导表达，所表达的融合蛋白为 71.8 kDa(42 kDa+29.8 kDa)。在 DH5α 中，表达率可达细胞总蛋白的 30% 左右，IPTG 诱导表达最适时间为 4 h，诱导表达时间短于 4 h 或长于 4 h 都有表达率下降趋势。本研究制备的抗血清可用对流免疫电泳、琼脂双扩散及 Western blotting 进行 PVY 鉴定，为各种植物材料中 PVY 的检测提供了具有使用价值的特异性抗血清。

## 参 考 文 献


1 Ward C W, Shukla D D. Taxonomy of potyviruses current problems and some solutions. Intervirology, 1991, 32: 269～296

2 Jose L R, Sonia L, Juan A G. Review article, highlights and prospects of potyvirus molecular biology. J Gen Virol, 1992, 73: 1～16

3 Bravo-Almonacid F, Mentaberry A N. Nucleotide cDNA sequence coding for the PVY$^0$ coat protein. Nucl Acids Res, 1989, 17: 4401～4405

4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 18.47～18.55

5 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 4350～4354

6 Ausubel F M, Brent R, Kingston K E *et al*. Expression and purification of maltose-binding protein fusions. In: Ausubie FM ed. Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing and Wiley-Interscience. 1991. 16.6.3～16.6.6


# The Expression of Potato Virus Y Common Strain (PVY$^0$) Coat Protein Gene in *Escherichia coli*


Wang Zhendong[1] Zhang Min[1] Tatsuji Hataya[2] Ichiro Uyeda[2]

[1](*Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang* 110161)

[2](*Laboratory of Plant Virology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Supporo* 060, *Japan*)



**Abstract** The IPTG-inducible expression vector pMAL-c2-PVY$^0$ CP contaning coat protein (CP) gene of potato virus Y common strain (PVY$^0$) was constructed by cloning PVY$^0$ CP gene into plasmid pMAL-c2 and transferred into *E. coli* DH5α. The results of SDS-PAGE and Western blotting show that the specific fusion protein with Mr 71.8 kDa was expressed in *E. coli* DH5α by IPTG induction. The fusion protein expressed was separated by amylose resin affinity chromatography and injected into rabbit to prepare antiserum. The titer of antiserum is 1∶1 024 detected by micro-precipitation. The antiserum is useful for identification of PVY in plant materials.



**Key words** PVY common strain, Coat proteins, Expression products, Antiserum