217-221

维普资讯 http://www.cqvip.com

第14卷第3期 中国病毒学 Vol 14 No.3
1999年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1999

小麦黄花叶病毒RNA2 28 kDa蛋白基因的表达及表达产物抗血清的制备*

S432.41 Q939.42

苏 宁** 韩成贵 李大伟 侯占军 邢怡明 于嘉林*** 刘 仪

(中国农业大学生物技术国家重点实验室,北京 100094)

摘 要 根据小麦黄花叶病毒(WYMV)核苷酸序列测定结果,将WYMV RNA 2上的28 kDa蛋白基因克隆到pET11a上,构建了原核表达载体pE2839。SDS-PAGE分析表明,经IPTG诱导,28 kDa蛋白基因在大肠杆菌BL21(DE3)pLysS中得到高效表达。以含表达产物的凝胶为抗原,免疫家兔,首次制备了小麦黄花叶病毒RNA2蛋白特异性抗血清。

关键词 小麦黄花叶病毒,蛋白基因,原核表达,抗血清

小麦黄花叶病是亚洲小麦产区广为流行的一种真菌传病毒病害,七十年代末在我国首次报道[1]。该病害是由小麦黄花叶病毒(wheat yellow mosaic virus, WYMV)侵染所引起的,表现为小麦植株矮化,成穗率低,严重影响小麦产量。由于其传播介体禾谷类多粘菌(*Polymyxa graminis*)为植物根部专性寄生真菌,其休眠孢子抗逆力强,可被释放到土壤中存活多年,所以目前除选择抗病品种外,无其它有效的防治措施。

WYMV为大麦黄花叶病毒属(*Bymovirus*)成员,基因组由长、短两条单链正意RNA构成[2,3]。根据WYMV相近的其他大麦黄花叶病毒属病毒的研究结果,此类病毒RNA2编码两种分子量分别为28 kDa和70 kDa的蛋白,可能与介体的传播有关[2]。本研究在对小麦黄花叶病毒cDNA合成及序列测定的基础上(未发表),将RNA2编码的28 kDa蛋白基因片段克隆到原核表达载体中,获得了高效表达并制备了其相应的特异性抗血清,为今后对28 kDa蛋白的检测和功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌DH5α、BL21(DE3)pLysS和原核表达载体pET11a由本室保存。含有WYMV 28 kDa蛋白基因片段的cDNA重组质粒pGWH44为本室克隆。

1.2 酶及试剂

Western blotting试剂盒购自Promega公司。蛋白分子量标准购自Pharmacia公司。硝酸纤维素膜购自

收稿日期:1998-05-22,修回日期:1998-08-10
* 本课题受到"863"计划和国家自然科学基金(编号:39870028)项目资助(编号:101-04-01-05)
** 现工作单位:中国农科院生物技术中心,北京 100081
*** 通讯作者

维普资讯 http://www.cqvip.com

Schleicher & Schuell 公司。IPTG 等其他化学试剂及各种限制性内切酶或工具酶购自华美生物工程公司。引物由中国科学院微生物所技术室合成。

1.3 PCR 引物合成、基因扩增与表达载体的构建

根据本室对 WYMV RNA2 cDNA 的序列测定结果(GenBank 登录号:AF041041),结合对大麦黄花叶病毒属其他病毒 RNA2 序列的结构分析,分别设计了针对 28 kDa 蛋白编码区上、下游两端序列的引物 P1 和 P2。引物具体序列如下:

引物 P1:5'-TTTCCAGTACTATGGCATCCACCAG-3'与 WYMV RNA2 的 148~173 核苷酸(nt)相对应,并引入一个 ScaⅠ位点。

引物 P2:5'-GGCCTGGATCCTCAGCTCAGCCGAC-3'与 WYMV RNA2 的 940~915 nt 互补,并引入一个 BamHI 位点和一个翻译终止密码子。

利用引物 P1 与 P2,以含有 WYMV RNA2 28 kDa 蛋白基因的 cDNA 重组质粒 pGWH44 为模板进行 PCR 扩增,电泳回收扩增产物后,以 ScaⅠ和 BamHI 双酶切处理。载体质粒 pET11a 用 NdeⅠ酶切,经 DNA 聚合酶Ⅰ Klenow 片段补平后再用 BamHI 酶切。经处理的 PCR 产物及载体进行连接,转化大肠杆菌 DH5α 后筛选重组子,PCR 鉴定含有 28 kDa 蛋白基因的非融合蛋白原核表达载体。

1.4 28 kDa 蛋白基因的诱导表达及 SDS-PAGE 电泳分析

将筛选获得的阳性重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS,挑取单菌落接种于 3 mL LB 液体培养基(含氨苄青霉素 100 μg/mL),于 37 ℃活化过夜后,按 1∶100 稀释加入到 6 mL LB 液体培养基中(含氨苄青霉素 100 μg/mL),振荡培养至 OD_{600} 值为 0.7~0.9,加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,继续于 37 ℃摇床培养 3~4 h。离心集菌后加入 500 μL 样品缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl, pH6.8,10%甘油, 2%SDS,5%巯基乙醇, 0.1%溴酚兰),煮沸 10 min,置 4 ℃备用。

将诱导产物经 12.5%的 SDS-PAGE 电泳分析,用考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色(脱色液:10%甲醇,10%冰乙酸)至背景清晰为止。

1.3 及 1.4 两项内容所涉及的常规分子生物学技术均参照 Sambrook 的方法[4]。

1.5 抗血清制备及 Western-blotting 检测

参照 Hager 等[5]的方法染色,从凝胶中切下特异性表达蛋白条带,按 1∶1 比例(W/V)加入 PBS 缓冲液(0.14 mol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH_2PO_4, 8.1 mmol/L Na_2HPO_4),于冰浴中研磨。用 PBS 缓冲液适当稀释回收的蛋白混合物后,加入等体积的福氏不完全佐剂(1.5 g 羊毛脂+8 mL 石蜡油)进行乳化。参照 Hames 的方法[6]制备 WYMV 28 kDa 蛋白抗血清,每次免疫剂量为 2.5 mL 乳化抗原溶液(抗原约为 3 mg)。采血后收集的抗血清加入 0.1%迭氮钠,分装后 -20 ℃贮存。

参照 Towbin 等人的方法[7]进行 Western-boltting 检测。

2 结果

2.1 原核表达载体的构建

根据本室对 WYMV RNA2 的序列分析结果(GenBank 登录号:AF041041),28 kDa 蛋白编码区起始于 160 nt,位于一个约 98 kDa 的多肽前体编码区的 5'末端。与相近的大麦黄花叶病毒(BaYMV)和大麦和性花叶病毒(BMMV)的研究结果比较,WYMV 28 kDa 蛋白可能是在 921 nt 上、下游编码的氨基酸 G/S 位点,通过翻译后切割所生成的。因此,本文在引物 P2 中将 922~924 nt 处的核苷酸 TCA 变为 TGA,从而引入一个终止子。并在起始密码子 ATG 上游和引入的终止子 TGA 下游分别引入相应的酶切位点,以便于重组 DNA 操作。

经 PCR 扩增后,获得一个长度约为 8[illegible] 个核苷酸的 DNA 片段,与设计期望长度相符。按

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 所述,该片段及表达载体 pET11a 经酶切、抽提处理后,进行连接并转化大肠杆菌 DH5α。挑取单菌落进行培养并提取重组质粒,经 PCR 鉴定,得到重组质粒 pE2839(见图 1)。

2.2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

将重组质粒 pE2839 转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS,进行诱导表达。取 20 μL 上样,SDS-PAGE 电泳后,考马斯亮蓝染色结果表明:经 IPTG 诱导后,含有重组质粒 pE2839 的菌株可特异地产生一条与 WYMV RNA2 28 kDa 分子量相当的蛋白条带(见图 2)。光密度扫描估测结果显示,28 kDa 蛋白的相对表达量占菌体总蛋白的 10% 以上(结果未表示)。

2.3 抗血清制备和 Western-blotting 检测

经 SDS-PAGE 电泳后,染色回收特异性表达的 28 kDa 蛋白条带。免疫家兔,获得了 WYMV RNA2 28 kDa 抗血清。

利用获得的 28 kDa 蛋白抗血清进行 Western-blotting 分析。结果表明,所获得的抗血清仅与含有重组质粒 pE2839 的大肠杆菌诱导表达产物反应,产生一条清晰的着色带,而与其他对照不发生反应(图 3)。由此可见,所产生的抗血清可以与原核表达的 WYMV RNA2 28 kDa 蛋白特异结合,为特异性抗血清。

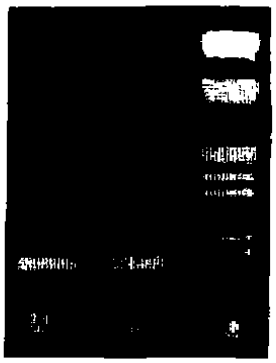

图 1　表达载体 pE2839 的 PCR 鉴定

Fig 1　Identification of pE2839 by PCR

A: Products from pGWH44;
B: Products from pE2839;
C: λ DNA/Hind Ⅲ + EcoR Ⅰ markers.

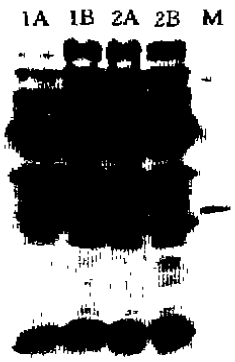

图 2　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig.2　SDS-PAGE analysis of expression products

1. BL21(DE3)/pET11a;
2. BL21(DE3)/pE2839.
A. Non-induced; B. Induced;
M Protein markers (94, 67, 43, 30, 20, 14 kDa).

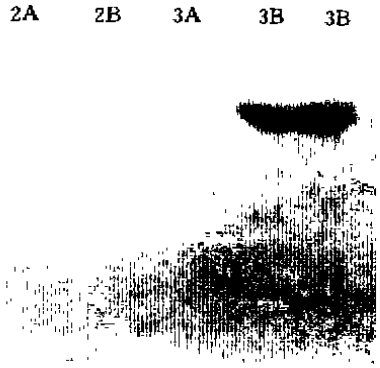

图 3　利用 28 kDa 蛋白抗血清进行 Western-blotting 分析

Fig.3　Western-blotting analysis using antiserum against 28 kDa protein

1. BL21 (DE3); 2. BL21 (DE3)/pET11a; 3. BL21(DE3)/pE2839.
A. Non-induced; B. Induced.

3　讨论

利用表达载体 pET11a 构建的 WYMV RNA2 28 kDa 蛋白原核表达载体 pE2839 为非融合蛋白,由于表达产物中不含有任何植物蛋白,经 SDS-PAGE 进一步纯化后可以作为良好的抗原来制备相应的特异性抗血清。

小麦黄色花叶病毒为大麦黄花叶病毒属(*Bymovirus*)的成员之一,与马铃薯 Y 病毒属

维普资讯 http://www.cqvip.com

(*Potyvirus*)同属于马铃薯Y病毒科(*Potyviridae*)[8]，WYMV除含有二分体基因组并被真菌传播以外，其他方面与马铃薯Y病毒属存在许多相似之处。除日本关于WYMV基因组序列的报道外(GenBank登录号:D86634，释放时间:1998年6月11日)[9]，本室独立完成了小麦黄花叶病毒RNA1和RNA2的序列测定。经过分析表明:WYMV RNA2编码产生多聚蛋白，其可能的切割点及由此产生的成熟蛋白与*Potyvirus*属病毒的HC-Pro下游区域具有很高的结构相似性和序列保守性[10]，WYMV RNA2编码的多聚蛋白也是在G/S处被切割成两种蛋白(28 kDa和70 kDa)[11]。关于28 kDa蛋白的功能仍不清楚，根据28 kDa蛋白与HC-Pro的序列相似性，推测28 kDa蛋白可能与HC-Pro功能相似，即与介体传播及多聚蛋白的切割有关。另外，Davidson于1991年通过构建缺失切割位点来进行的体外翻译实验，也从另一个方面证实，大麦黄花叶病毒RNA2 28 kDa具有蛋白酶功能[12]。28 kDa蛋白通常伴随病毒粒子出现，但并不是共价结合在病毒粒子上，或许28 kDa蛋白在病毒的复制和移动中是必需的。28 kDa蛋白的功能还有待进一步研究来证实。本研究所制备的28 kDa蛋白抗血清为进一步研究该蛋白的功能奠定了基础。

参 考 文 献

1 于善谦，陈仲宜，徐来升等. 发生在我国的小麦黄花叶病. 植物保护学报，1986，13(4)：217～219

2 Kashiwazaki S, Minobe Y, Omura T *et al*. Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA1. J Gen Virol, 1990, 71: 2781～2790

3 Kashiwazaki S, Minobe Y, Hibino H. Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA2. J Gen Virol. 1991, 72: 995～999

4 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

5 Hager, D A, Burgess R R. Elution of proteins from sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel, removal of sodium dodecyl sulfate and renaturation of enzymatic activity. Analytical Biocheminstry, 1980, 109: 76～86

6 Hames, B D, Rickwood, D. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. 2nd edtion. Oxford University Press, 1990.

7 Towbin, H. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. PNAS USA, 1979, 76: 4350～4354

8 Murphy, F A, Rychlik, W. Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committe on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag Wien. 1995.

9 Namba S, Kashiwazaki S, Lu X *et al*. Complete nucleotide sequence of wheat yellow mosaic bymovirus genomic RNAs. Arch Virol, 1998, 143: 631～643

10 Carrington J C, Cary S M, Parks T D. A second proteinase encoded by a plant *Potyvirus* genome. EMBO Journal. 1989, 8: 365-370

11 Krausslich, H G. Viral proteinase. Annual Review of Biochemistry, 1988, 57: 701～754

12 Davidson A D, Prols M. The nucleotide sequence of RNA2 of barley yellow mosaic virus. J G Virol. 1991, 72: 989～993

维普资讯 http://www.cqvip.com

Overexpression of 28 kDa Protein Encoded by Wheat Yellow Mosaic Virus RNA2 in *E. coli*

Su Ning　Han Chenggui　Li Dawei　Hou Zhanjun
Xing Yiming　Yu Jialin　Liu Yi

(*State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing* 100094)

Abstract　With polymerase chain reaction (PCR) a fragment encoding the 28 kDa protein of wheat yellow mosaic virus (WYMV) RNA2 was amplified and constructed into plasmid of pET11a for prokaryotic expression. BL21 (DE3) of *E. coli* transformed with the recombinant plasmid of pE2839 was induced to specifically express the 28 kDa protein in high level. The expressed 28 kDa protein was purified from SDS-polyacrylamide gels and the antiserum against the protein was raised in rabbit. In Western-blotting analysis, the antiserum reacted with the 28 kDa protein.

Key words　Wheat yellow mosaic virus, Protein gene, Prokaryotic expression, Antiserum