

## 芜菁花叶病毒外壳蛋白基因克隆及其在大肠杆菌中的表达<sup>①</sup>

许建平·徐平·陈集双·李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所以, 杭州 310029)

**摘 要** 本文报道采用反转录酶-聚合酶链式反应, 体外扩增芜菁花叶病毒(TuMV)外壳蛋白基因及其克隆, 并在大肠杆菌中获得表达的结果。从杭州市郊区感病的油菜上分离到一株致病力极强的芜菁花叶病毒分离物, 提纯后, 经 50 ng/ml 蛋白酶 K 和 0.5% SDS 处理, 苯酚/氯仿和氯仿抽提两次, 酒精沉淀, 获得了纯化的病毒 RNA。该 RNA 与 oligo(dT)<sub>18</sub> 退火后, 在 AMV 反转录酶的作用下合成了单链 cDNA, 然后加入用以扩增 TuMV-CP 基因的上下游引物, 35 个循环后, 得到了一条长约 0.85 kb 的片段, 将该片段克隆到 pUC18 质粒的 Sal I 限制性酶切位点, 分析了限制性酶切图谱, 分析表明该片段含有 EcoR I 和 Xba I 以及引物设计时带入的 Nco I 三个酶切位点, 该片段克隆到大肠杆菌(*Escherichia coli*)原核表达载体 pKK233-2 质粒的 Nco I 和 Hind III 位点后, 经 IPTG 诱导, 以该病毒的抗血清为第一抗体, Western blot 检测该基因的表达产物, 结果表明该基因的表达产物为 TuMV-CP 蛋白, 因而认为所获得的扩增片段确为芜菁花叶病毒外壳蛋白基因。

**关键词** 芜菁花叶病毒; 外壳蛋白基因; 反转录酶-聚合酶链式反应

**中图分类号** S435.5; S432.4; S482.7

Xu Jianping, Xu Ping, Chen Jishuang, Li Debao (Inst. of Biotech., Zhejiang Agric. Univ., Hangzhou 310029, China)

Molecular cloning of turnip mosaic virus-rape isolate capsid protein gene. Journal of Zhejiang Agricultural University, 1994, 20(4): 363-368

**Abstract** The present paper deals with the results of molecular cloning and expressing in *Escherichia coli* of the gene which encoding the turnip mosaic virus capsid protein. A virulent isolate of TuMV was isolated from *Brassica rape* around the suburb of Hangzhou. The viral RNA was extracted from purified virus what pertreated with 0.5% SDS and 50 ng/mL proteinase K, precipitation by ethanol. First strand of cDNA was synthesized from viral RNA as a template with oligo(dT)<sub>18</sub> primer using AMV reverse transcriptase. A DNA fragment about 0.85 kb was obtained after amplified by polynucleotide chain reaction with artificial synthetic oligonucleotide prime for 35 cycles that denatured in 94 °C for 45s, annealing in 37 °C for 2 mins and synthesized in 72 °C for 3 mins. Extracted by phenol/chloroform and chloroform, the PCR product was cloned into pUC18 plasmid Sal I multiple cloning site and the whole restriction map was analyzed. It was shown that there are three restriction sites on the DNA fragment, Xba I, EcoR I and a Nco I site which was designed on the prime. The fragment was cloned into Nco I and Hind III multiple cloning site of pKK233-2 prokaryotic expression plasmid, after induced by IPTG, the *E. coli* expressed the TuMV capsid protein detected by Western Blotting using TuMV-rape antiserum as first antibody. The results shew that the entire gene encoding the capsid protein has been cloned.

**Key words** turnip mosaic virus; capsid protein gene; reverse transcriptase-polymerase chain reaction

芜菁花叶病毒是十字花科作物上的重要病原,广泛分布于北美、亚欧大陆以及大洋洲和非洲等地区<sup>[1]</sup>,寄主范围很广<sup>[2]</sup>,生产上造成严重的危害,我国南方地区是导致十字花科作物病毒病的重要病原<sup>[3,4]</sup>,自然界中主要以蚜虫的非持久性方式传播,目前生产上尚无良好的防治措施,转基因工程植株研究的成功给植物病毒病害的防治提供了一条新途径<sup>[5]</sup>,目前国内外对芜菁花叶病毒的研究主要在生物学性状、寄主范围、传播方式、物理性状和株系划分等方面<sup>[7-10,11]</sup>,有人对它的血清学、组织病理学以及病毒颗粒的特性作过研究<sup>[10,11]</sup>,但在病毒基因组的结构、功能和调控机制上,研究不多<sup>[12-13]</sup>,本文主要报道从杭州郊区感病的油菜植株上分离到一株致病力极强的分离物,采用反转录酶-聚合酶链式反应(Rreverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)方法,体外扩增外壳蛋白基因,以及克隆,并在大肠杆菌中获得表达的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从杭州市郊区感病的油菜上分离到的一株致病力极强的芜菁花叶病毒分离物,保存在城青二号大白菜上,并以城青二号大白菜为扩增毒源的材料。实验中常用的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、克隆试剂盒、cDNA 合成试剂盒和碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 均购自 Boehringer Mannheim 公司,聚合酶链式反应试剂盒购自 Perkin-Elmer Cetus 公司,大肠杆菌表达载体 pKK233-2 试剂盒购自 Pharmacia 公司,硝酸纤维素膜为 Amersham 公司产品,碱性磷酸酶底物 NBT 和 BCIP 购自 Promega 公司,宿主菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM 105,标准蛋白质分子量为中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂产品,其它常用试剂均为国产分析纯级试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 病毒纯化、抗血清制备和病毒 RNA 的提取 ①病毒纯化方法:感病的大白菜病叶冷冻至 $-20^{\circ}\text{C}$  20 分钟后,高速组织捣碎器捣碎,加入 10% 氯仿/正丁醇(1:1, v/v)继续搅拌 20 分钟,双层纱布过滤,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 8 000 g 离心 20 分钟取上清,往上清液加入 NaCl 和 PEG-6000 至终浓度分别为 0.1 mol/L 和 4%;沉淀 3 小时,8 000 g 离心 20 分钟取沉淀,沉淀经 0.02 mol/L 磷酸缓冲液悬浮后,12 000 g 离心,取上清,上清液再于 78 000 g,4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 100 分钟,取沉淀,悬浮后于 5%至 40%甘油梯度 78 000 g 离心 2 小时,沉淀物即为纯化的病毒。②芜菁花叶病毒抗血清的制备:取纯化的病毒 1 mg 与等体积的 Freund's 不完全佐剂乳化后,皮内免疫家兔,一个月后,每隔一周用提纯的病毒 0.3 mg 耳静脉加强免疫 2 次,血清效价测定采用环状沉淀法和 ELISA 方法测定。③病毒 RNA 的提取:提纯的病毒液经 0.5% SDS, 50 ng/mL 蛋白酶 K 处理后,用苯酚/氯仿和氯仿各抽提二次;2 倍体积的乙醇沉淀,便得到提纯的病毒 RNA。

1.2.2 聚合酶链式反应(PCR)上下游引物的设计 据文献<sup>[14]</sup>报道,参考了 Potyvirus 病毒组其它病毒外壳蛋白基因的序列,并考虑到今后工作的方便,设计了适用于 PCR 反应的上下游引物,该引物由中国科学院上海细胞生物研究所合成,其序列为:

Primer A: 5'-GCT TCG ACC ATG GCA GGT GAA ACG CTT G-3'

Primer B: 5'-TGT CGA CTT TAT TCC CGG GTC ATA ACC CCT GAA CGC C-3'

1.2.3 体外扩增芜菁花叶病毒外壳蛋白基因及扩增产物的克隆 ①体外扩增芜菁花叶病毒外壳蛋白基因, 纯化的病毒 RNA 和引物 oligo(dT)<sub>18</sub> 退火后, 在反转录酶 AMV 的作用下, 合成单链 cDNA, 加入上下游引物后在 Perkin-Elmer Cetus DNA 热循环仪上体外扩增 TuMV 的外壳蛋白基因, 其反应条件为 94 °C 变性 45 秒, 37 °C 退火 2 分钟, 72 °C 合成 3 分钟, 反应共进行 35 个循环, 最后一个循环中, 合成时间延长至 10 分钟, PCR 产物经苯酚/氯仿 (1:1, v/v), 氯仿各抽提一次后, 2 倍体积乙醇沉淀, 溶于双蒸水中。②PCR 产物的克隆: 扩增产物经 T4 DNA 聚合酶处理后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 连接入预先经酶切和 CIP 处理过的 pUC18 质粒载体中, 转化大肠杆菌 JM105 感受态细胞后, 在含有氨苄青霉素和 X-gal/IPTG 的平板上筛选阳性重组子, 对筛选到的阳性重组子 pTU18 进行酶切分析, 包括分析其酶切图谱。

1.2.4 芜菁花叶病毒外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达及检测 ①表达载体的构建: 含有插入片段的 pTU18 质粒用 *Nco*I 和 *Hind*III 双酶酶切后, 低熔点琼脂糖回收相应含有 PCR 产物的片段, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 14 °C 下连接到 CIP 预处理的 pKK233-2 质粒相应位点, 重组质粒转化感受态大肠杆菌 JM105, 在含有氨苄青霉素的平板上筛选转化子, 并对转化子进行鉴定, 筛选含有正确外源插入片段的重组子, 并将其命名为 pKTU233-2 质粒。②阳性重组子的诱导表达: 诱导表达的方法主要按文献<sup>[14]</sup>的方法进行, 将含有阳性重组子的大肠杆菌 JM105, 接入含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 5 mL LB 培养基中培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.5, 加入 IPTG 浓度至 1 mmol/L, 继续培养 6—12 小时, 此培养物即可进行表达产物的检测。③表达产物的 Western-blotting 检测: 培养物经 5 000 g 离心 5 分钟后, 500 μL 生理盐水悬浮, 加入上样缓冲液 500 μL, 煮沸 5 分钟, 进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳后按文献<sup>[15]</sup>进行转移和检测显色剂为 NBT 和 BCIP。

## 2 结 果

### 2.1 病毒的纯化和 RNA 的提取

纯化的 TuMV 经 2% 磷酸钨负染后, 在电镜下可见稳定均一的线性颗粒, 没有其它形式颗粒的病毒存在 (图 1), 制成的抗血清环状沉淀法测得效价为 1:1 024, ELISA 测得的效价为 1:2 048 以上。

提纯的病毒按上述方法提取 RNA 在岛津 2201 紫外扫描仪上检测具有较高的浓度和纯净度, 可用于反转录反应 (图 2)。

### 2.2 RNA 的反转录和 PCR 的体外扩增

纯净的 RNA 约 5 μg, 反转录为单链 cDNA 后, 加入引物 A 和 B, 反应 35 个循环后, 经 1% 琼脂糖电泳, 检查扩增结果 (图 3) 发现在扩增产物中有一条长约 0.85 kb 的 DNA, 这与大多 Potyvirus 组病毒外壳蛋白基因大小一致, 也与我们在设计引物时的计算结果一致。



图 1 提纯的病毒形态  
(2% PTA 负染 60KX)

Fig. 1 Virus particles negative stain by 2% PTA, 60KX



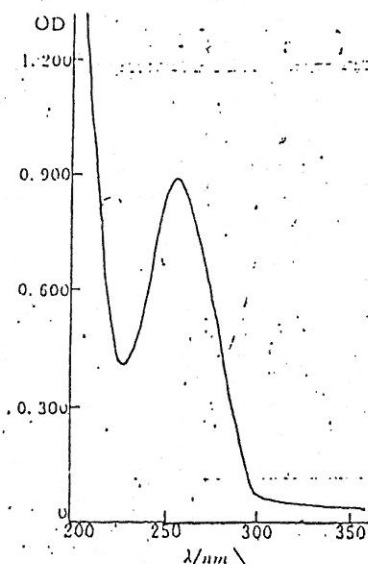


图2 提纯的RNA紫外扫描图谱

Fig. 2 The UV-absorbent of purified TuMV-RNA

### 2.3 PCR产物的克隆及重组子的筛选与鉴定

PCR产物在T4 DNA连接酶的作用下与Sal I酶切后的pUC 18质粒连接构成重组质粒,该重组质粒转化感受态大肠杆菌JM 105后,在含有X-gal/IPTG和氨苄青霉素的平板上筛选到数十个重组子,对其中的一个重组子再次进行PCR鉴定,确定重组质粒含有PCR产物.该重组子酶切结果发现,在插入片段中含有EcoR I和Xba I以及设计引物时带入的Nco I三个酶切位点,其图谱如(图4)所示,将该质粒命名为pTU 18.

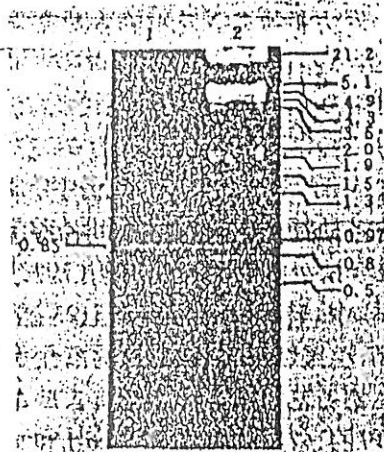


图3 1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis (1%) of PCR product

1. PCR产物 PCR product

2. 核酸分子量标记(λ DNA/Hind III + EcoR I)

Marker λDNA/Hind III + EcoR I

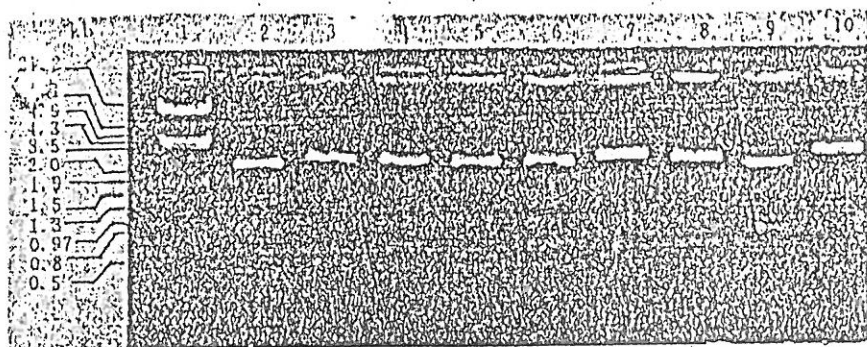
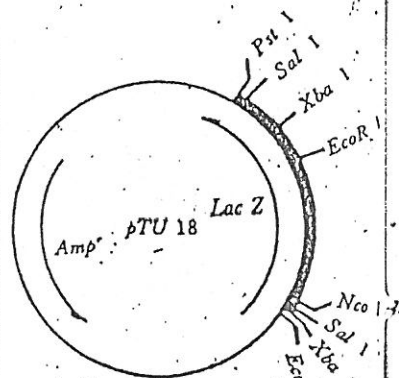


图4 pTU18质粒限制性酶切图谱(1%琼脂糖)

Fig. 4 The restriction map of pTU18 (1% agarose)

1. Marker(λ DNA/Hind III + EcoR I) 2. Nco I + Pst I 3. Nco I + EcoR I 4. Nco I + Xba I  
5. Pst I + EcoR I 6. Pst I + Xba I 7. EcoR I 8. Xba I 9. Sal I 10. Hind III



## 2.4 芜菁花叶病毒外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达及检测

含有外源片段的  $pTU$  18 质粒,经  $Nco$  I 和  $Hind$  III 双酶切后,低熔点琼脂糖回收目的片段,并将其连接到  $pKK233-2$  质粒的相应位点,转化大肠杆菌 JM 105 后,在含有氨苄青霉素的平板上得到数十个重组子,经分析,证明插入片段确为 PCR 产物后,进行诱导表达。

诱导表达后的大肠杆菌经 Western-blotting 检测表达产物(图 5),发现该片段能正确地表达芜菁花叶病毒的外壳蛋白,证明我们所获得的产物确为芜菁花叶病毒的外壳蛋白基因。

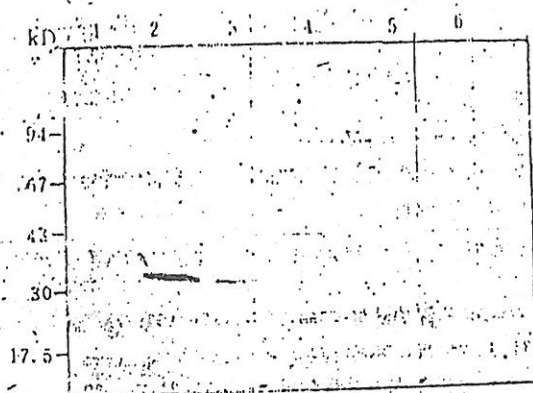


图 5 Western blotting 检测  $pKTU$  表达产物

Fig. 5 Western blotting detect the expressed protein of  $pK$ - $TU$  plasmid

1. 蛋白质标准分子量 Protein molecular weight marker

2. 新鲜提纯的 TuMV 制备的外壳蛋白 Virus CP protein produced from fresh purified virus

3-4 含有  $pKTU$  质粒的 JM 105 经 IPTG 诱导及未诱导的产物

The bacteria containing  $pKTU$  induced by IPTG and CK

5-6 含有  $pKK233-2$  质粒的 JM 105 经 IPTG 诱导及未诱导的产物

The bacteria containing  $pKK233-2$  plasmid induced by IPTG and CK

## 3 讨论

RNA 在反转录中,纯度是十分重要的,反应体系中如有杂质离子和杂质蛋白存在,不仅会改变反应体系的缓冲性能,而且对反转录酶的活性有较大的影响,经提纯的 RNA,紫外扫描后呈典型的核酸吸收,说明 RNA 的纯度是好的,这为反转录反应提供了基础。

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是近几年发展起来的一种非常快速、简便而有效的基因克隆和基因检测方法,是国内外分子生物学、医学、法医检测的重要工具之一。该方法不仅快速,而且可以人为地根据各自工作的需要设计引物,并可实现定点突变。由于 TuMV-CP 基因没有自己的起始密码 ATG,因而在设计引物时,加入了起始密码 ATG,同时还引入了有利于今后工作,如基因克隆、原核表达、构建植物表达载体所必须的  $Sma$  I,  $Sal$  I,  $Nco$  I 等酶切位点。 $Nco$  I 中含有 ATG 可作为原核表达载体  $pKK233-2$  的克隆位点,而  $Sal$  I 既可作为构建植物表达载体的克隆位点,又和  $Nco$  I 的识别序列共同形成了真核生物中 mRNA 高效表达起始密码前所必需的特征引导序列 5'-ACCATGG-3'<sup>[16]</sup>,反向引物中,设立了 5'-AATAAA-3'这一特异的 mRNA 转录终止信号,这样,在所设计的引物中,包含了起始密码和转录终止密码,同时又包含了真核生物中高效表达所需的特异性前导序列。

$pKK233-2$  是专为表达真核基因而设计的高效原核表达载体,利用该载体已经成功的表达了许多病毒和真核基因,如  $\lambda$  噬菌体的 cI 基因,肝炎病毒 I 型的 D 糖蛋白,小鼠肾上腺皮质激素 I<sup>[14]</sup>,该质粒上含有高表达 trc 启动子, LacZ 核糖体结合位点和很强的 rrnB 转录终止子,利用该质粒我们成功地表达了 TuMV-CP 基因。

芜菁花叶病毒是十字花科作物上的重要病原,它属于 Potyvirus 组病毒,该组病毒的外壳蛋白基因运用于抗病毒基因工程也有一些成功的报道,在所有的转基因植株中许多是烟草,番

茄、马铃薯等作物,因而开展十字花科作物抗病毒基因工程研究,不仅在理论上,而且现实意义上都十分重大,我们实验室已经建立了一套完整的大白菜等十字花科作物原生质体成株技术<sup>[17]</sup>,我们期望构建成植物表达载体,将该基因导入十字花科作物,培育出具有应用价值的作物新品系。

### 参考文献

1. Green S K, Deng T C. Turnip mosaic virus strains in cruciferous hosts in Taiwan. *Plant Disease*, 1985, 69, 28-31
2. 朱培坤, 陆妙康, 王鸣岐等. 芜菁花叶病毒在上海市郊区蔬菜等植物上分布范围的血清学测定. *植物病理学报*, 1984, 14(2), 101-106
3. 王拱辰. 浙江油菜花叶病毒类型研究. *微生物学报*, 1978, 18(4), 298-309
4. 李丽丽, 黄早花, 王圣玉等. 华中地区油菜病毒的毒源种类血清学诊断. *中国油料*, 1978, 4, 52-55
5. 方小平, 李丽丽, 黄早花等. 油菜芜菁花叶病毒 CR2 株系的提纯及其特性. 见: 黄可训主编. 首届全国中青年植物保护工作者学术讨论会论文集. 北京: 中国科学技术出版社, 1992, 113-118
6. Powell-Abel P A, Nelson R S, De B. *et al.* Delay of disease development in transgenic plant that express the tobacco mosaic virus coat protein. *Science*, 1986, 232, 738-743
7. 李德葆, 周家坝, 萝卜花叶的病毒类群和复合病侵染的研究初报. *植物保护学报*, 1964, 3(2), 155-163
8. 裴维藩, 梁训生. 京津大白菜病毒病的类型及其分布. *植物病理学报*, 1963, 6(2), 169-177
9. 徐来升, 牛宏舜, 黄永珍等. 芜菁花叶病毒——崇明大白菜分离株的鉴定. *植物病理学报*, 1983, 13(2), 21-29
10. 朱海英, 裴维藩. 大白菜病毒病主要病原芜菁花叶病毒的研究. *植物病理学报*, 1989, 19(1), 1-5
11. 李彦勇. 应用间接酶联免疫吸附技术对芜菁花叶病毒血清学关系的研究. *植物病理学报*, 1984, 14(4), 219-224
12. Shields S A, Willson T M A. Cell-free translation of turnip mosaic virus RNA J. *Gen. Virol.*, 1987, 68, 169-181
13. Tremblay M F, Nicolas O, Sinha R C. *et al.* Sequence of the 3'-terminal region of turnip mosaic virus RNA and capsid protein gene J. *Gen. Virol.*, 1990, 71, 2769-1772
14. Shimizu Y, Takabayashi E, Yano S. *et al.* Molecular cloning and expression in *Escherichia Coli* of the cDNA coding for rat lipocortin I (Calpactin I) Gene, 1988, 65, 141-147
15. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *et al.* Molecular cloning-A laboratory manual, 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
16. Kozak M. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translations of rat preproion saline *in vivo*. *Nature*, 1984, 308, 241-246
17. 李世君, 孟 征, 李德葆. 大白菜无病毒叶肉原生质体再生. *生物工程学报*, 1992, 8(3), 249-254