

葡萄卷叶伴随病毒III CP 基因在 E. coli 中的表达

赵冬兰¹, 朱水芳², 张满良¹, 张成良², 黄文胜²

(1 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨陵, 71210; 2 农业部 植物检疫实验所, 北京 100029)

[摘要] 将葡萄卷叶伴随病毒III的 CP 基因克隆到表达载体 pET-30a 中, 转化大肠杆菌 BL 21, 筛选得到阳性克隆 GB-1, 用 IPTG 诱导使其表达。SDS-PAGE 电泳分析表明, 该 CP 基因在大肠杆菌 BL 21 中得到大量表达。用该病毒的 CP 抗血清通过间接 ELISA 证明所表达的蛋白具有很好的抗原性。

[关键词] 葡萄卷叶伴随病毒III; CP 基因; 基因表达; 基因克隆

[中图分类号] S432

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0088-03

葡萄卷叶病(Grapevine leafroll disease)是葡萄上的重要病毒病害之一。该病在几乎所有的葡萄园中都有发生, 是世界上分布最广和造成损失最大的一种葡萄病毒病^[1]。研究表明, 引起该病的病毒不止一种, 目前国际上承认的已有 5 种, 将其分别命名为葡萄卷叶伴随病毒 I~V (Grapevine leafroll associated-virus 1~5 GLRaV 1~5)^[2]。其中 GLRaV-3 是最主要的一种, 它分布最广泛, 造成的经济损失最大, 且唯一具有自然介体。另外, 该病毒只存在于维管束组织, 又没有草本寄主^[3~5], 也未见有侵染其他植物的报道, 给该病毒的提纯和抗血清制备带来很大困难。美国的 Ling 等^[6,7]报道了该病毒基因 3 端三分之二的核酸序列, 并将其 CP 基因进行克隆和转基因研究。我国尚未见有这方面的报道。本试验将作者已经克隆的 GLRaV-3 CP 基因转入大肠杆菌表达载体 pET-30a, 构建了 GLRaV-3 CP 基因的大肠杆菌蛋白表达克隆。并诱导使其在大肠杆菌中得到大量的表达, 同时还对所表达的蛋白抗原性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 表达载体的构建

试验所选用的表达载体为 pET-30a, BL 21 菌株是 T7 噬菌体 DE3 的溶源菌, 可经 IPTG 诱导合成大量的 T4 RNA 聚合酶, 在它的多克隆位点有限制

性酶 *Nde*I 和 *Bam*H I 的切点, 已有克隆 GK-1 是将 GLRaV-3 CP 基因插入载体 pGEM-3zf 的 *Sma*I 位点, 它在设计引物时也加了 *Nde*I 和 *Bam*H I 2 个酶的酶切位点, 用这两种限制性内切酶分别切割 GK-1 质粒和 pET-30a 质粒, 低熔点琼脂糖回收目的片段粘端连接, 转化新鲜大肠杆菌感受态细胞, 并用双抗性进行筛选。具体操作见文献^[8]。

1.2 表达克隆的分析

将筛选的单菌落划线培养, 用牙签挑取少量划线培养的菌落与 50 μ L 的细菌抽提液悬浮均匀, 然后 100 $^{\circ}$ C 处理 2 min, 立即置于冰上 5 min, 1 000 r/min 离心 1 min。取 1 μ L 上清液做为 PCR 扩增的模板。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 1 min, 53 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环。提取阳性克隆的质粒^[8], 用 *Nde*I 和 *Bam*H I 进行双酶切分析。

1.3 GLRaV-3 CP 基因在大肠杆菌中的表达

取筛选到的阳性克隆的冻存菌 5 μ L, 接入 5 mL 含氯霉素和卡那霉素的 2 $\times$ YT 液体培养基中, 共 2 管, 其中 1 管为对照。37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 3~4 h (OD₆₀₀ 约为 0.3~0.4)。其中 1 管加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 5 h, 对其进行诱导表达。制备表达蛋白包涵体, 见分子克隆实验指南^[8]。用 SDS-PAGE 进行电泳分析。

1.4 表达蛋白抗原性测定

用间接 ELISA 测定表达蛋白的抗原性。所用

[收稿日期] 2000-01-11

[基金项目] 国家“九五”科技攻关项目(96-004-05-08)

[作者简介] 赵冬兰(1973-), 女, 人, 硕士, 现在徐州市农科所工作, 邮编 221121。

GLRaV-3 的 CP 抗血清由美国康乃尔大学朱海英博士提供。试验设有诱导、未诱导、空载体和空白对照 4 种处理, 抗原稀释度为 $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$, $1/10^6$ 和 $1/10^7$, 2 个重复。样品处理: 取培养物 1.5 mL, 6 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体。每管加 0.5 mL 裂解缓冲液, 1 μ L 溶菌酶 (10 g/L), 振荡悬浮后, 静置 30 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 每管加 0.5 mL 洗涤缓冲液, 悬浮 10 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 40 μ L 8 mol/L 尿素溶解。

2 结果与分析

2.1 表达克隆结果分析

为了在大肠杆菌中表达 GLRaV-3 的 CP 基因, 对克隆 GK-1 进行了亚克隆。将所克隆的 CP 基因转入表达载体 pET-30a 上。用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam* H I 分别切克隆质粒 GK-1 和载体 pET-30a, 克隆 GK-1 为 2 条带, 其中较小的 1 条 1 kb 左右, 为克隆的目的基因。载体 pET-30a 酶切结果为 1 条 5 kb 左右的带。用低熔点琼脂糖回收目的片段, 再进行连接, 转化大肠杆菌 BL 21, BL 21 细菌具有氯霉素抗性, 质粒 pET-30a 带有卡那霉素的抗性基因, 用

氯霉素和卡那霉素双抗性筛选阳性克隆。再用快速裂解 PCR 和 *Nde* I 与 *Bam* H I 双酶切对克隆进行进一步分析鉴定, 结果得到阳性克隆 GB-1。GB-1 用快速裂解 PCR (见图 1) 和 *Nde* I 与 *Bam* H I 双酶切 (见图 2) 都得到约 1 kb 的特异带, 表明目的基因已克隆至表达载体上。

2.2 克隆化基因表达结果分析

用 IPTG 进行诱导表达后, 提取包涵体蛋白, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳进行检测。结果如图 3 所示。从图 3 可以看出, 经过 IPTG 诱导的细菌, 出现 2 条表达量明显增大的蛋白。由分子质量 Marker 可知, 其中 1 条的分子质量约为 35 000 u, 与 Ling 等^[7]报道的 35 000 u 的 GLRaV-3 的 CP 一致。

2.3 表达蛋白抗原性分析

通过间接 ELISA 对克隆化基因表达蛋白进行进一步分析, 用酶联仪测得结果见表 1。从表 1 可以看出, 经过 IPTG 诱导产生的蛋白 OD₄₉₀ 的值明显高于未诱导的和只含空载体的大肠杆菌蛋白。如果以含空载体的大肠杆菌蛋白作为阴性对照, 根据 $P/N > 2$ 判断, 在稀释度为 $1:10^7$ 时, 诱导蛋白仍呈阳性反应。这说明所表达的蛋白具有很好的抗原性。

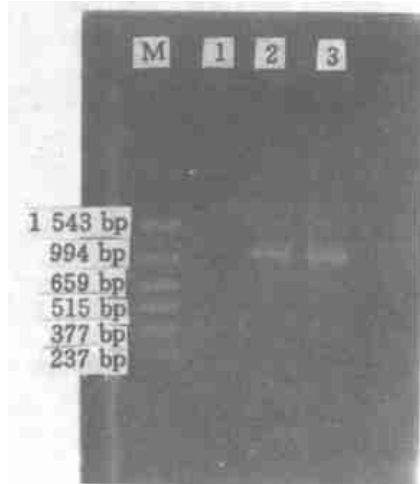


图1 表达克隆 GB-1 PCR 扩增结果
M. PCR Marker; 1 阴性对照; 2~3 PCR 扩增产物

Fig 1 PCR amplification result of expression clone GB-1

M. PCR marker; 1 Negative contrast; 2~3 PCR amplification product

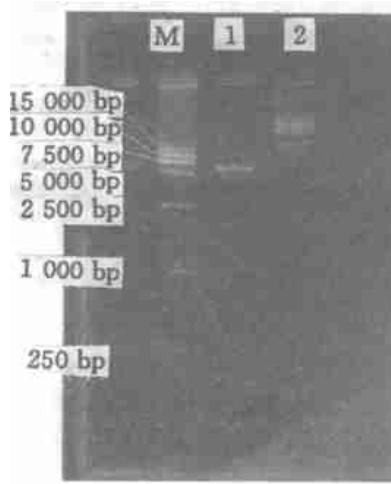


图2 表达克隆 GB-1 重组片段酶切分析
M. DL 1 500 DNA Marker;

1 克隆片段 *Nde* I + *Bam* H I 酶切结果;
2 克隆 GB-1 质粒

Fig 2 Restriction mapping of recombinant fragment of expression clone GB-1
M. DL 1 500 DNA marker; 1 Restriction mapping of clone fragment with *Nde* I + *Bam* H I;

2 Clone GB-1 plasmid

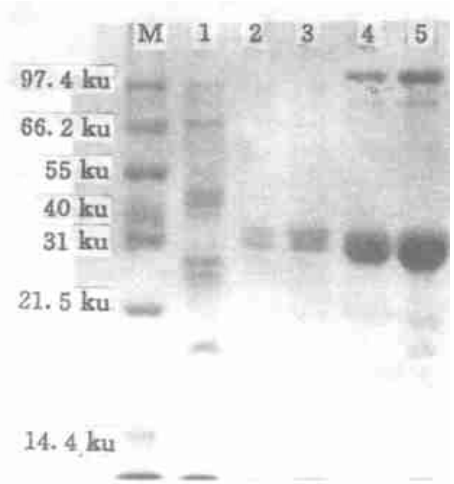


图3 表达克隆 GB-1 诱导表达结果
M. 蛋白质标准分子质量;

1~2 GB-1 诱导表达后提取的外壳蛋白;
3~4 GB-1 诱导表达产物;
5 未诱导表达的 GB-1

Fig 3 Induced expression result of expression clone GB-1

M. Protein marker; 1~2 Purified coat protein after inducing expression for GB-1; 3~4 Induced expression product for GB-1; 5 No-induced expression GB-1

表 1 表达蛋白抗原性 ELISA 检测

Table 1 Detected expression protein antigenicity with ELISA

处 理 Treatment	稀释倍数 Dilution multiple				
	1 : 10 ³	1 : 10 ⁴	1 : 10 ⁵	1 : 10 ⁶	1 : 10 ⁷
诱 导 Induced	Overflow	Overflow	2 746	0 994	0 470
未 诱 导 No-induced	2 581	0 717	0 307	0 186	0 236
空 载 体 Empty vector	2 251	0 294	0 281	0 233	0 230
空白对照 Constrast	0 078	0 098	0 096	0 099	0 072

3 讨 论

GLRaV 含有至少 5 种类型的病毒粒子, 侵染系统复杂。其病毒粒子只存在于韧皮部, 而且在植物体内含量很低。国内目前在植物病毒检测中应用最广泛的方法是 ELISA, 因为其操作简单, 而且一次可检测大量的样品。ELISA 需要有特异的抗血清来诱捕病毒。对于葡萄卷叶病毒的检测的主要限制在于必须有高质量的抗血清。由于受病毒含量以及植物组织中抑制物的影响, 要通过提取病毒来制备大量抗血清是很困难的。运用基因工程的方法, 将此病毒的 CP 基因克隆并转化到大肠杆菌中, 并使其在大肠杆菌中大量表达, 然后通过纯化 CP, 制备大量的 CP 抗血清无疑是解决该问题的一个非常好的方法。

葡萄卷叶病毒伴随 IV 是葡萄卷叶伴随病毒中分布最广, 经济意义最大的病毒之一。本试验对其 CP 基因进行了克隆和表达, 为制备高效价的 CP 抗体提供了良好的试验材料。同时也为抗 GLRaV-3 转基因葡萄的培育和其分子生物学的深入研究奠定了基础。

本试验在表达 GLRaV-3 CP 基因时, 出现了 2 条带, 其中 1 条与该病毒的 CP 分子质量相符。另外 1 条较小些, 推测可能有 2 种原因。一是该病毒的 CP 被细菌体内的蛋白酶部分降解, 分子质量变小; 二是在其 CP 基因起始密码子的下游还存在另外一个起始密码子, 它同时也进行了翻译。这尚需进行进一步的研究证实。

[参考文献]

- [1] 薛敦孟, 郑铭西, 柯 冲. 葡萄主要病毒病及病原病毒[J]. 福建果树, 1990, 1: 54- 59
- [2] Boscia D, Greif C, Gugerli P, et al Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative cbsterovirus[J]. Vitis, 1995, 34(3): 171- 175
- [3] Hu, J S, Gonsalves D, Boscia D, et al Use of monoclonal antibodies to characterize grapevine leafroll associated cbsteroviruses[J]. Phytopathology, 1990, 80: 920- 925
- [4] Habili N, Fazeli C F, Ewart A, et al Natural spread and molecular analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in Australia[J]. Phytopathology, 1995, 85: 1418- 1422
- [5] Cristina C, Antonio S. Some characteristics of the transmission of grape vine leafroll associated virus 3 by Planococcus citri Risso[J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103: 373- 378
- [6] Ling K S, Zhu H Y, Dong R F, et al Nucleotide sequence of the 3' terminal two-thirds of the grapevine leafroll-associated virus-3 genome reveals a typical monopartite cbsterovirus[J]. Arch Viro, 1998, 142: 1299- 1307
- [7] Ling K S, Zhu H Y, Alvizo H, et al The coat protein gene of grapevine leafroll-associated-3: cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants[J]. Arch Viro, 1997, 142: 1101- 1116
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1996

Expression of grapevine leafroll associated-Virus-3 coat protein gene in *E. coli*

ZHAO Dong-lan¹, ZHU Shui-fang², ZHANG Man-liang¹, ZHANG Cheng-liang², HUANG Wen-sheng²

(1 College of Plant Protection, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 Plant Quarantine Laboratory, Ministry of Agriculture, Beijing 100029, China)

Abstract In this study, the coat protein gene of GLRaV-3 was cloned into expression vector PET-30a, then translated into *E. coli* BL 21, and the recombinant plasmid was obtained. GLRaV-3 coat protein gene was expressed in *E. coli* through IPTG inducing. And a 35 Ku peculiar protein as expected was showed in SDS-PAGE. The antigenicity of this protein using ELISA was verified as well.

Key words grapevine leafroll associated Virus-3; CP gene; expression; clone