烟草蚀纹病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达*

王秀敏[1], 吴云锋[1], 成巨龙[2], 张建新[1], 杨 栋[1], 罗朝鹏[1]
(1 西北农林科技大学 植保学院 植物病毒研究室 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;
2 陕西省烟草研究所, 陕西 西安 710003)

[摘 要] 根据烟草蚀纹病毒(TEV)CP 序列设计合成上下游引物, 利用 RT-PCR 方法获得了 *TEV CP* 基因, 大小为 789 bp。将 *TEV CP* 基因克隆到 pMD18-T Simple Vector, 经 *Eco*R Ⅰ/*Sac*Ⅰ双酶切得到目的片段, 并将其定向插入到 pET30a 载体中构建了原核表达载体 pET30-TEV CP, 重组质粒经 *Eco*R Ⅰ和 *Sac*Ⅰ双酶切鉴定及基因测序验证正确后, 转化大肠杆菌 BL21, 用 IPTG 进行诱导表达。结果表明, *TEV CP* 基因在大肠杆菌中获得了高效表达, 分子量约为 37 ku。以表达产物为抗原免疫家兔, 制备了特异性抗血清, 其效价为 1/1 204。Western blot 检测结果表明, 制备的抗血清可用于检测田间的发病植株。

[关键词] 烟草蚀纹病毒; 外壳蛋白基因; 原核表达; 抗血清
[中图分类号] S432.4+1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)06-0124-04

烟草蚀纹病毒病由烟草蚀纹病毒(Tobacco etch virus, TEV)引起, 是一种世界性的病害。该病毒 1930 年由 Johnson 在美国肯塔基州的烟草上首次分离到, 属于马铃薯 Y 病毒属, 病毒粒子呈弯曲线状, 多为 723 nm×11.5 nm。在田间主要通过蚜虫以非持久性方式传播和机械摩擦传播, 可侵染约 19 科 120 余种植物。烟草蚀纹病毒病在我国各大烟区均有不同程度地发生危害, 陕西烟区发生普遍, 严重影响烟草的质量和产量[1-5]。

目前, 防治烟草蚀纹病毒病最有效的途径是种植抗病品种、药物防治和农业措施等。在选育抗、耐病品种的过程中需要大量的抗血清对烟草蚀纹病毒进行检测。但由于烟草蚀纹病毒的繁殖和提纯比较困难, 在繁殖过程中极易受烟草花叶病毒的污染, 往往不易获得高纯度的病毒粒子, 限制了抗血清的制备。为此, 本试验首次克隆了烟草蚀纹病毒陕西分离物的外壳蛋白基因, 并对其进行了原核表达, 以为该病毒病血清学和分子检测提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

烟草蚀纹病毒毒原采自陕西省泾阳县烤烟田, 烟叶呈典型蚀纹症状, 保存于-70 ℃冰箱。大肠杆菌菌株 JM109、BL21 及表达载体 pET30a, 均由西北农林科技大学植保学院植物病毒研究室保存。pMD18-T Simple Vector 购自日本 Takara 公司, 限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 *Sac*Ⅰ为 MBI 公司产品。凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒为安徽优晶生物工程有限公司产品。辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 为华美生物工程公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计合成 按 *TEV CP* 基因序列[AY787757]设计引物: 上游引物 5′-GC GAATTCA GTG GCA CTG TGG ATG CTG G-3′, 下游引物 5′-GC GAGCTCT GGC GGA CCC CTA ATA GTG-3′。上游引物带有 *Eco*R Ⅰ酶切位点, 下游引物带有 *Sac*Ⅰ酶切位点。

1.2.2 目的片断的扩增 以感染 TEV 的烟草病叶为材料, 参考文献[6]的方法提取 RNA, 以反转录后的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增。反应条件为: 94 ℃变性 3 min; 94 ℃ 1 min, 54 ℃ 50 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 最后 72 ℃延伸 10 min, 4 ℃保存。

1.2.3 原核 pET30a 表达载体的构建 将上述 PCR 扩增产物插入克隆载体 pMD18-T Simple Vector, 转化大肠杆菌 JM109。提取质粒, 经 DNA 测序验证后, *Eco*R Ⅰ/*Sac*Ⅰ双酶切回收目的片段,

* [收稿日期] 2005-12-12
[基金项目] 陕西省烟草专卖局攻关项目(2001KN-4); 西北农林科技大学创新团队项目
[作者简介] 王秀敏(1977-), 女, 山东成武人, 在读博士, 主要从事植物病毒学研究。
[通讯作者] 吴云锋(1960-), 男, 陕西乾县人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: wuyunfeng@cnipm.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

定向插入 *Eco*R Ⅰ/*Sac* Ⅰ 双酶切的原核 pET30a 载体中, 转化大肠杆菌 BL 21 感受态细胞, 用酶切及测序鉴定的方法筛选, 得到重组质粒 pET30-TEV CP。

1.2.4　蛋白的原核表达　从转化板上挑取含重组质粒的单菌落, 37 ℃过夜培养, 以体积比 1∶100 将过夜培养物转接入含有 Kan 的 10 mL LB 液体培养基中, 37 ℃振荡培养 2～3 h 至 OD_{600} 0.5～0.6, 取 1.5 mL 菌液作为未诱导对照, 然后加入 10 μL 200 mg/mL 的 IPTG 储液, 继续振荡培养 4～6 h, 取菌液 12 000 r/min 离心 2 min, 收集菌体沉淀, 加入 50 μL 超纯水、等量的 2×上样缓冲液, 煮沸 10 min, 10 000 r/min 离心, 取上清进行 SDS-PAGE (分离胶浓度为 10%), 考马斯亮蓝 R-250 染色, 0.2 mol/L 氯化钾脱色后观察目的带。

1.2.5　抗血清的制备　从聚丙烯酰胺凝胶上切下目的蛋白条带, 电洗脱、冷冻干燥, 适当稀释后免疫家兔, 制备抗血清。抗血清效价的测定采用试管沉淀法[7]。

1.2.6　Western bolt 分析　(1) 转膜。经 SDS-PAGE 凝胶在转移缓冲液 (25 mmol/L Tris, 192 mmol/L 甘氨酸, 体积分数 20% 甲醇, pH 8.3) 漂洗, 按照 Sambrook 等[8]的方法将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶转移到硝酸纤维素 (NC) 膜上 (40 V, 4 h)。

(2) 封闭。将转移后的 NC 膜用 TBST (4.84 g Tris, 158.48 g NaCl, 0.5 mL Tween-20, 定容至 1 000 mL, pH 7.4) 漂洗, 转入封闭液 (TBST + 5% 脱脂奶粉) 中, 4 ℃封闭过夜。

(3) 第一抗体反应。封闭液中按体积比 1∶500 加入 TEV CP 抗血清 (本实验制备), 室温下孵育 2 h。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。

(4) 第二抗体反应。加入 TBST 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG (稀释度为 1∶1 000), 室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。

(5) 显色。将 NC 膜置于 3′,3′,5′,5′-四甲基联苯胺 (TMB) 显色液中, 加入 100 μL 30% NiCl 和 10 μL 30% H_2O_2, 室温避光反应 5～10 min 直至显色。

2　结果与分析

2.1　*TEV CP* 基因的扩增

RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳, 结果显示 TEV 陕西分离物 *CP* 基因大小为 789 bp (图 1)。将回收后的基因片断插入 pMD18-T Simple Vector, 筛选得到 pMD-TEV CP, 提取其质粒, 测序验证正确后用 *Eco*R Ⅰ/*Sac* Ⅰ 双酶切, 回收目的片段, 定向插入到 *Eco*R Ⅰ/*Sac* Ⅰ 双酶切的 pET30a 载体中, 筛选得到重组质粒 pET30-TEV CP。

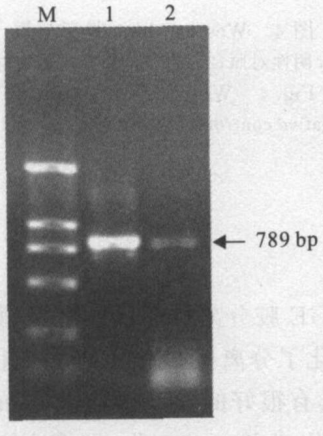

图 1　*TEV CP* 基因的 PCR 扩增结果
M. DNA marker; 1, 2. TEV CP 扩增产物
Fig. 1　PCR amplification of *TEV CP*
M. DNA marker; 1, 2. Amplification of TEV CP

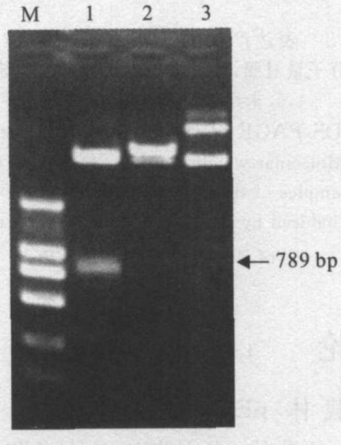

图 2　重组质粒 pET30-TEV CP 的酶切鉴定结果
M. DNA marker; 1. *Eco*R Ⅰ/*Sac* Ⅰ 双酶切 pET30-TEV CP; 2. *Eco*R Ⅰ 酶切 pET30-TEV CP; 3. pET30-TEV CP
Fig. 2　Enzyme digestion of pET30-TEV CP with *Eco*R Ⅰ/*Sac* Ⅰ
M. DL2000; 1. Digestion of pET30-TEV CP with *Eco*R Ⅰ/*Sac* Ⅰ; 2. DIgestion of pET30-TEV CP with *Eco*R Ⅰ; 3. pET30-TEV CP

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 原核表达载体的构建与鉴定

用 *Eco*RⅠ/*Sac*Ⅰ对重组质粒 pET30-TEV CP 进行双酶切,得到大小为 789 bp 的目的片段(图 2)。对表达载体 pET30-TEV CP 进行序列分析,结果确证 TEV CP 插入方向及位置完全正确,可以进行诱导表达。

2.3 TEV CP 在大肠杆菌中的诱导表达

将带有表达载体 pET30-TEV CP 的 BL21 培养 4 h 后,离心,取上清,经 SDS-PAGE 电泳分析发现,在泳道中有 1 条非常明显的蛋白带,大小约为 37 ku,未经诱导的含有重组表达质粒的菌株未产生此条带(图 3)。表明用原核载体成功表达了 TEV CP 蛋白。

2.4 抗血清的制备

以诱导表达的特异蛋白条带为抗原,适当稀释后免疫家兔,获得了 TEV 抗血清。试管沉淀法测定的抗血清效价为 1/1 024。

2.5 Western blot 的鉴定结果

以发病植株提取液为样品,在 37 ku 处可见清晰的单一阳性反应条带,而未发病植株提取液无该条带(图 4),说明制备的抗血清可用于检测田间发病植株。

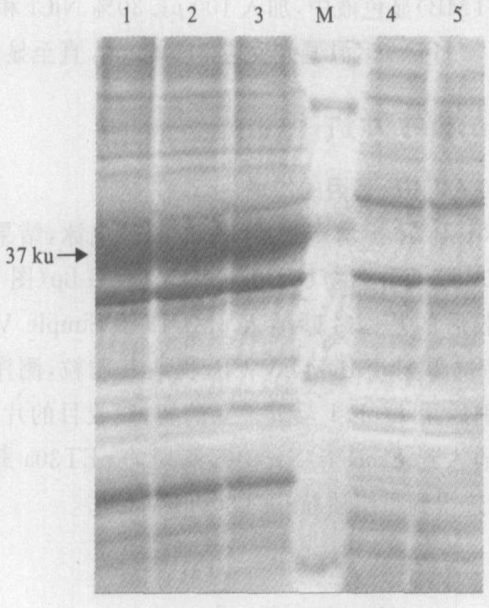

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳图谱

M. 分子量对照;1~3. IPTG 诱导后表达的蛋白;4,5. 未经 IPTG 诱导表达的蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE of the expressed protein in *E. coli*

M. Molecular weight marker (14.4-97.6 ku); 1-3. Samples of the pellets of BL21/pET30-TEV CP induced by IPTG; 4,5. Negative control of BL21/pET30-TEV CP

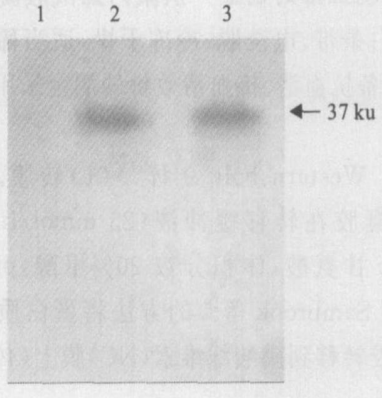

图 4 Western blot 鉴定结果

1. 阴性对照;2. 阳性对照;3. 发病植株

Fig. 4 Western blot analysis

1. Negative control; 2. Positive; 3. Infected plant

3 讨 论

表达载体 pET30a 是带有多克隆位点(Polylinker)的载体,多克隆位点的下游含有寡聚组氨酸标签,其可使外源蛋白 C 端与载体上 6 个组氨酸融合,便于通过 His Bind 柱提取重组蛋白。本实验通过 PAGE 胶分离目的蛋白、电洗脱的方法获得抗原,这简化了分离抗原蛋白的程序并节省了成本,且该抗原具有很好的免疫原性;制备的抗血清效果好、特异性强,为下一步工作,即筛选抗、耐病品种奠定了基础[9-12]。

[参考文献]

[1] 成巨龙,马长德. 烟草蚀纹病毒的鉴定与主要特性研究[J]. 中国烟草学报,1997,3(4):20-26.

[2] 王秀敏,郝兴安,吴云锋,等. 陕西烟草病毒病毒原鉴定及种群区系分布[J]. 烟草科技,2005(8):38-42.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[3] 张满良, 魏宁生. 陕西渭北地区烟草病毒病的毒原鉴定[J]. 中国烟草, 1991(1): 21-27.
[4] 王秀敏, 吴云锋, 成巨龙, 等. 陕西省咸阳市、商州市烟草病毒病毒原鉴定初报[J]. 西北农业学报, 2003, 12(1): 139-141.
[5] 李惠琴, 冯崇川. 陕西省烟草蚀纹病毒病及其发生特点的研究[J]. 河南农业大学学报, 1995, 29(3): 293-297.
[6] 于　翠. 番茄花叶病毒(ToMV)和黄瓜花叶病毒(CMV)单克隆抗体制备及 ToMV 在烟草上致病分子机理研究[D]. 浙江杭州: 浙江大学, 2004: 45.
[7] 吴云锋. 植物病毒学原理与方法[M]. 西安: 西安地图出版社, 1999.
[8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
[9] 李广存, 毕玉平, 王秀丽, 等. 花生条纹病毒外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达[J]. 花生科技, 1999(增刊): 251-253.
[10] 常胜军, 马占鸿, 王锡锋, 等. 大麦黄矮病毒 GAV 株系外壳蛋白基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 400-402.
[11] 姚华建. 甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)外壳蛋白基因的克隆及表达[D]. 北京: 北京农业大学, 1993: 25-48.
[12] 宋丽敏, 卢彩鸽, 梁文星, 等. 侵染节瓜的小西葫芦黄花叶病毒 CP 基因的克隆、表达及其抗血清的制备[J]. 微生物学报, 2005, 45(1): 132-134.

Cloning of tobacco etch virus cp gene and prokaryotic expression in *E. coli*

WANG Xiu-min[1], WU Yun-feng[1], CHENG Ju-long[2], ZHANG Jian-xin[1], YANG Dong[1], LUO Zhao-peng[1]

(1 *Plant Virology Laboratory of College of Plant Protection, Shaanxi Key Laboratory for Agriculture Molecule Biotechnology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
2 *Shaanxi Tobacco Research Institute, Xi'an, Shaanxi* 710003, *China*)

Abstract: Coat protein (CP) gene of tobacco etch virus was cloned into pMD18-T simple vector by means of RT-PCR amplification, which were cleaved with restrict endonuclease *Eco*R Ⅰ/*Sac* Ⅰ and inserted into pET30a. We constructed the expression vector of pET30-TEV CP which was cleaved with *Eco*R Ⅰ/*Sac* Ⅰ and gene sequenced exactly, and then transformed into BL21 host strain of *E. coli*. The target protein was induced by IPTG and the molecular size of expression product was about 37 ku. The product was used as antigen to immunize the rabbit and the titer of antiserum was 1∶1 204. Western blot showed that the preparated antiserum can be used to detect the tobaccos infected TEV.

Key words: tobacco etch virus; coat protein; prokaryotic expression; antiserum

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net