

生物技术

烟草蚀纹病毒外壳蛋白基因的克隆 及在毕赤酵母中的表达

王秀敏¹, 吴云锋², 韩烈保¹

1 北京林业大学草坪研究所, 北京清华东路 35 号 100083;

2 西北农林科技大学分子植物病毒研究室, 杨凌 712100

摘要: 利用 RT-PCR 方法获得烟草蚀纹病毒(TEV)外壳蛋白(CP)基因, 大小为 789 bp。经过 *Eco* RI 和 *Not* I 双酶切、定向克隆到 pPIC9K 构建了真核表达载体 pPIC9K-TEVCP。将重组质粒用 *Sal* I 线性化后电转化导入毕赤酵母 GS115 中, 经 PCR 鉴定为阳性的菌落, 利用甲醇进行诱导表达, 筛选出了高效表达菌株 GS115-11 和 GS115-14, 表达的蛋白大小约为 37 kD。表达产物经 SDS-PAGE 凝胶纯化后, 免疫家兔, 制备了特异性抗血清, ELISA 法检测效价为 1:1500。Western blot 结果显示, 制备的抗血清可以用来检测田间的发病植株。

关键词: 烟草蚀纹病毒; 外壳蛋白; 毕赤酵母; 表达

中图分类号: S476.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-5708(2009)01-0061-04

Cloning and expression of *tobacco etch virus* coat protein gene in *Pichia pastoris*

WANG Xiu-min¹, WU Yun-feng², HAN Lie-bao¹

1 Turfgrass Institute of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 Molecular Plant Virus Lab., Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China

Abstract: A TEV CP gene was obtained by means of RT-PCR amplification. The product was digested with restrictive endonuclease *Eco* RI/*Not* I, and inserted into *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K. Recombinant plasmid was linearized with *Sal* I and then transferred into GS115 strain by electroporation. Whether the TEV CP gene was integrated into alcohol oxidase promoter(AOX) locus on yeast chromosome was verified by amplification with special primers. SDS-PAGE result showed that the TEV CP gene was expressed highly in GS115-11 and GS115-14, and the molecular weight of expression product induced with 1% methanol was about 37 kD. The product was used as antigen to immunize the rabbit and the titer of antiserum was 1:1500. Result of Western blot showed that the antiserum can be used to detect diseased tobaccos in the field.

Key words: *tobacco etch virus*; coat protein; *Pichia pastoris*; expression

烟草蚀纹病毒病是一种世界性的病毒病害, 由 Johnson(1930)在美国的肯塔基州烟草上首次分离到, 属于马铃薯 Y 病毒属, 病毒粒子为弯曲线状, 在田间主要通过蚜虫以非持久性方式传播, 也可以种传和机械传播, 可侵染 19 科 120 余种作物。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, 在陕西渭北烟区是仅次于烟草花叶病毒病的一种病毒病害, 严重影响烟草的质量和产量^[1-2]。

目前, 防治烟草蚀纹病毒病最有效的途径是选育抗、耐病品种。在选育过程中需要大量的抗血清对烟草蚀纹病毒进行检测。但是, 烟草蚀纹病毒在繁殖过程中极易受烟草花叶病毒的污染及受温度的限制, 提纯过程中往往不易获得高纯度、高浓度的病毒粒子, 这样就限制了抗血清的制备。因此有必要开辟新的途径生产烟草蚀纹病毒的抗血清。本试验以从陕西烟田病株中分离的烟草蚀纹病毒为研究对象, 首次探讨对其

作者简介: 王秀敏, 女, 博士, 从事植物病毒学研究, Tel: 13520878547,

E-mail: wangxiumin1230@yahoo.com.cn

基金项目: 陕西省烟草病毒病监控技术研究项目(2001KN-4); 西北农林科技大学创新团队项目资助; 国家自然科学基金(30270876)

收稿日期: 2007-12-20

外壳蛋白的真核表达,为该病毒病的快速检测及有效防治提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料:烟草蚀纹病毒毒原采自陕西省旬阳县烟田,病原保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。大肠杆菌 JM109、DH5 α 由本实验室保存。毕赤酵母菌(*Pichia pastoris*)菌株 GS115 及辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 为华美生物工程公司。

1.1.2 主要试剂:表达载体 pPIC9K 为 Invitrogen 公司产品。pMD18-T Simple Vector 购自日本 Takara 公司,限制性内切酶 *Eco* RI 和 *Not* I 购自 MBI 公司。蛋白胨、G418 和 YNB(酵母氮碱)为生工生物工程(上海)有限公司产品。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。

1.2 目的基因的扩增

根据 GeneBank 中(AY787757)TEV CP 的基因序列,设计一对扩增该基因的 PCR 引物如下(由北京赛百盛公司合成):上游引物 5'-GCGAATTCAGTGGCACTGTGGATGCTGG-3',下游引物 5'-ATAAGAATGCGGCCGCCTGGCGGACCCCTAATAGTG-3'。上游引物带有 *Eco* RI 酶切位点,下游引物带有 *Not* I 酶切位点。以感染 TEV 的烟草病叶为材料,提取总 RNA^[3],以反转录后的 cDNA 为模板,扩增 CP 基因反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min 后,进入 30 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;60.2 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 表达载体 pPIC9K-TEVCP 的构建

将 PCR 产物插入 pMD18-T Simple Vector 转化宿主菌 JM109。提取质粒,用 *Eco* RI/*Not* I 双酶切,回收目的片段,插入 *Eco* RI/*Not* I 双酶切的 pPIC9K 然后进行连接并转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒后用 PCR 及 *Eco* RI/*Not* I 酶切鉴定,筛选到正向的重组质粒命名为 pPIC9K-TEVCP。

1.4 重组质粒转化酵母宿主 GS115

将酵母菌 GS115 制备成感受态:挑取酵母单菌落,接种至含有 5 mL YPD 培养基的三角瓶中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、250~300 r/min 培养过夜;取 100~500 μL 的培养物接种于 50 mL YPD 中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、250~300 r/min 培养过夜,至 OD₆₀₀ 达到 1.3~1.5;将细胞培养物于 4 $^{\circ}\text{C}$ 3000 g 离心 5 min,用 50 mL 的冰浴冷的无菌水将菌体沉淀重悬;3000 g 离心 5 min,用 25 mL 的冰浴冷的无菌水再次重悬,离心后用 10 mL 冰浴冷的 1 mol/L 的山梨醇溶

液将菌体沉淀重悬;3000 g 离心 5 min,用 2 mL 的冰浴冷的 1 mol/L 的山梨醇溶液将菌体沉淀重悬,其终体积约为 2.5 mL,按照 100 μL /管分装。取出 100 μL 与 10 μL Sal I 单酶切线性化的重组表达载体 pPIC9K-TEVCP 混合,转入 0.2 cm 的预先预冷的电转杯后,冰浴 5 min,以 Bio RadGene Pulser 电转仪于 1.5 kV、25 μF 、200 Ω 条件下电转化,立即向其中加入 1 mL 冰浴的山梨醇,将菌液均匀涂布于事先准备好的 MD/-His 平板,30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 d 后观察。

1.5 高拷贝整合转化子的筛选

参照 Invitrogen 公司试剂盒说明书的方法进行。将 His⁺ 的阳性转化子,用无菌水稀释至 1 OD₆₀₀ 值(1 OD₆₀₀ 相当于 5×10^7 的酵母细胞),然后用 10⁵ 的细胞分别涂布于逐渐增高的 G418 YPD(1.0、2.0、3.0、4.0 g/L)平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱 5 d 后观察。选取具有高 G418 抗性且生长良好的菌株作为表达株,用于后续蛋白的诱导表达。

1.6 表达菌株的初步诱导表达

参照 Invitrogen 公司的说明书进行,具体如下:①接种单菌落于 100 mL BMGY 液体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床剧烈震荡(300 r/min)培养,至 OD₆₀₀ \approx 4.0。②离心、收集菌体,用 20 mL BMMY 培养基重悬,30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床剧烈震荡(300 r/min)培养。③每天补加甲醇于培养基中至终浓度 1%,共诱导表达 4 d。④离心后取诱导表达 4 d 上清进行 SDS-PAGE 电泳观察。

1.7 表达蛋白的纯化及抗血清的制备

SDS-PAGE 电泳后,用 0.25 mol/L 氯化钾染色直至白色蛋白带出现,从聚丙烯酰胺凝胶上切下目的蛋白条带,电洗脱、冷冻干燥后,适当稀释后免疫家兔制备抗血清。

1.8 Western blot 分析

①SDS-PAGE:分别以发病植株及未发病植株叶片的提取液^[4]为样品进行 SDS-PAGE。

②转膜:经 SDS-PAGE 的凝胶在转移缓冲液(25 mmol/L Tris,192 mmol/L 甘氨酸,20%(V/V)甲醇,pH 8.3)漂洗,按照 Sambrook 等^[5]的方法将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶电转移到硝酸纤维素(NC)膜上(40 V 4 h)。

③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 1000 mL,pH 7.4)漂洗一下,转入封闭液(TBST+5%脱脂奶粉)中 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。

④第一抗体反应:封闭液中按 1:1500 的比例加入 TEV CP 抗血清,室温下孵育 2 h。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。

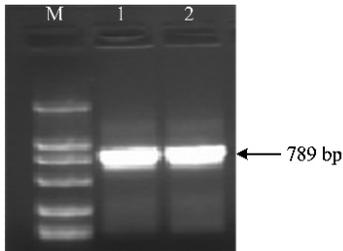
⑤第二抗体反应:加入 TBST 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG(稀释度为 1:1000),室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。

⑥显色:将 NC 膜置于 3', 3', 5', 5'-四甲基联苯胺(TMB)的显色液中,并加入 0.03% NiCl 和 10 μ L 30% H₂O₂, 室温避光反应 5~10 min 直至显色。

2 结果

2.1 TEV CP 基因的 RT-PCR 扩增

提取带毒烟草的总 RNA, oligo(T)₁₈ 反转录后,用设计的 TEV CP 基因特异性的上、下游引物扩增出外壳蛋白基因,1% 琼脂糖电泳结果显示 PCR 产物条带大小约为 789 bp,与预期值大小一致(图 1)。



M: DL2000
1、2: TEV-CP 扩增产物

图 1 TEV-CP 基因的 PCR 扩增

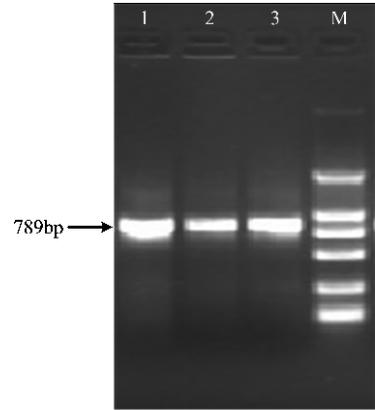
2.2 表达载体 pPIC9K-TEVCP 的构建

构建的重组质粒 pPIC9K-TEVCP 转化 DH5 α ,提取质粒,用 TEV CP 的特异性引物对其进行 PCR 鉴定,扩增出了 789 bp 大小的片段;将重组质粒 pPIC9K-TEVCP 用 *Eco* RI/*Not* I 进行双酶切,得到了 789 bp 大小的目的片段,均与预期结果一致。表明 TEV CP 基因已经连接到表达载体 pPIC9K 上(图 2、3),插入方向及位置完全正确,可以进行诱导表达。

2.3 TEV CP 在酵母中的诱导表达及表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

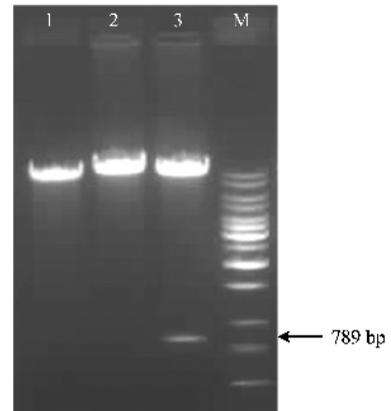
经过 MD⁻/His 的初步筛选后,再用 G418 筛选高拷贝克隆,结果共获得了 100 个克隆(4 mg/mL 的 G418 平板生长)。随机挑取 6 个克隆,提取基因组,进行 PCR 反应,均能扩增出 789 bp 大小的特异性片段,表明 TEV CP 确实已整合到了酵母的染色体上。将几个阳性菌株用甲醇诱导表达后,筛选出了具有高 G418 抗性且生长良好的菌株 GS115-11 和 GS115-14,将两者作为表达菌株,甲醇诱导培养 4 d 后离心取上清进行 SDS-PAGE 电泳分析,发现在泳道中有一条非常明显的蛋白带,大小约为 37 kD,比预期值 29.6 kD 要大;而空菌株无该条带及其它条带出现(图 4),表明用毕赤酵

母成功表达了 TEV CP 蛋白,可作为抗原制备高特异性的抗血清。



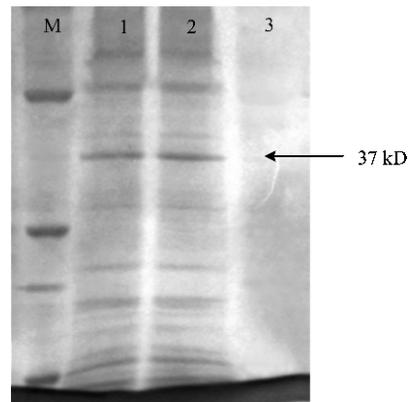
M: DL2000
1、2、3: 阳性克隆

图 2 重组质粒 pPIC9K-TEVCP 的 PCR 鉴定



M: 1 kb DNA ladder 1: pPIC9K/*Eco*RI
2: pPIC9K-TEVCP
3: pPIC9K-TEVCP/*Eco*RI-*Not*I

图 3 重组质粒 pPIC9K-TEVCP 的酶切鉴定



M: marker (14.4-97.6kD)
1、2: 表达的蛋白 3: 空菌株

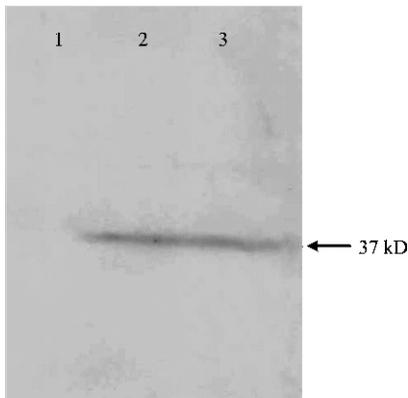
图 4 TEV-CP 蛋白在 *Pichia pastoris* 表达的 SDS-PAGE

2.4 表达蛋白的纯化与抗血清制备

SDS-PAGE后,从胶上割下目的蛋白条带,电洗脱冷冻干燥后,每次以300 μg蛋白的剂量免疫家兔,获得了TEV抗血清,采用ELISA法测其效价为1:1500。

2.5 Western blot的分析结果

用发病植株提取液为样品,在约37 kD处可见清晰的单一阳性反应条带,而未发病植株提取液的则无该条带的出现(见图5),表明制备的TEV抗血清特异性强,可以用来检测田间感染烟草蚀纹病毒病的烟草植株。



1: 阴性对照
2、3: 感染的植株

图5 western blot分析

3 讨论

目的基因有活性的高效表达是制备有应用价值抗血清的重要前提。在植物病毒界表达蛋白的方式最常见的就是大肠杆菌表达体系,它具有产量高、成本低、生产周期短的特点,但胞内高水平表达的外源蛋白大多以不溶解、无活性的包涵体形式存在,包涵体需要经过彻底的变性后再复性,才能恢复活性。而目前由包涵体中提取高水平、高比活的目标蛋白的最大问题是回收率极低,大部分目标蛋白在复性过程中析出丢失,最终效应就是相对降低了蛋白表达水平。为了获得有活性的蛋白和高特异性的抗血清,我们更换了表达系统,选用了酵母表达体系对TEV CP进行了表达。

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)基因表达系统是一种新型的外源基因表达系统,兼有原核细胞良好的可操作性及真核表达系统的许多优点,如进行蛋白质的加工、折叠、转录后修饰等,毕赤酵母利用甲醇作为唯一的碳源,它有2个乙醇氧化酶基因AOX1和AOX2,该基因具有很强的启动活性,毕赤酵母表达系统正是利用该启动子来启动外源蛋白的表达。表达载体通过同源重组整合入酵母基因组而随同酵母染色体一起复制^[6]。

本实验所用的pPIC9K是分泌表达载体,采用Sal I单酶切使表达载体线性化,转化宿主菌GS115整合入酵母染色体的His4位点(位于AOX1位点的下游),通过G418筛选获得多拷贝转化子,筛选出的表达菌株性质稳定。本试验利用该系统成功表达了分泌性TEV CP蛋白,并以此为抗原制备了高效价的抗血清。这不仅克服了传统制备抗血清时的种种弊端,而且所制备的抗血清特异性强,在检测时不易出现假阳性,可以快速、准确地检测TEV,为田间TEV的检测奠定了基础。

参考文献

- [1] 魏宁生,张荣. 烟草蚀纹病毒(TEV)生物学及理化特性的研究[J]. 中国烟草,1989(1):1-6.
- [2] 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.
- [3] 于翠,胡东维,董家红,等. 烟草花叶病毒和番茄花叶病毒在含N基因烟草上的症状差异是由运动蛋白基因决定的[J]. 中国科学C辑,2004,34(3):210-215.
- [4] Mahmood T, Rush C M. Evidence of cross-protection between beet soilborne mosaic virus and beet necrotic yellow vein virus in sugar beet[J]. Plant disease, 1999, 83(6):521-525.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning[M]. 2ed edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY,1989.
- [6] 樊建勇,王刚,刘玉峰. 毕赤酵母表达系统[J]. 国外医学·预防、诊断、治疗用生物制品分册,2003,26(5):217-219.
- [7] 石海英,张俊艳,李世访. 大麦黄矮病毒外壳蛋白基因和运动蛋白基因酵母表达载体的构建[J]. 韶关学院学报,2004,25(12):70-74.
- [8] 华惠,周思翔,王正荣. 外源基因在巴斯德毕赤酵母中的表达[J]. 国外医学·生物医学工程分册,2003,26(3):112-117.
- [9] 韦宇拓,汪嵘,杜丽琴,等. 合成耐高温α-淀粉酶基因在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达[J]. 中国生物工程杂志,2005,25(1):65-69.
- [10] 姚斌,张春义,王建华,等. 高效表达具有生物活性的植酸酶的毕赤酵母[J]. 中国科学(C辑),1998,28(3):237-243.
- [11] 吴丽娟,蒋建新,朱佩芳,等. 酵母表达系统及其应用[J]. 生命的化学,2003,23(1):46-49.
- [12] Shixuan Wu, Geoffrey J, Letchworth. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol[J]. Drug discovery and genomic technologies, 2004, 3(1):151-153.
- [13] 蔡欣,段聚宝,邹民吉,等. 一种快速鉴定重组酵母克隆的方法[J]. 军事医学科学院院刊,2000,24(2):151-152.
- [14] 奥斯伯,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖,王海林,译. 北京:科学出版社,1996:888-897.
- [15] 陈定虎,王锡锋,李莉,等. 美洲商陆抗病毒蛋白真核表达载体的构建及在毕赤酵母中的表达[J]. 农业生物技术学报,2003,11(2):183-186.