

商陆抗病毒蛋白基因的克隆、序列分析及在原核中的表达

陈定虎,王锡锋,李莉,周广和

(植物病虫害生物学国家重点实验室,中国农业科学院植物保护研究所,北京 100094)

摘要:从美洲商陆(*Phytolacca americana*)叶片中通过异硫氰酸胍法提取出了完整的总 RNA,经 RT-PCR 扩增出缺失突变型 PAP 基因,将该基因与克隆载体 pGEM(r)-T 相连接,从 SP6 和 T7 两端同时对其进行序列测定,共测得 711 个碱基,与国外报道的 PAP 基因序列相比较,其同源率达 99.6%。同时将该基因克隆至原核表达载体 pET-5a 上,转化大肠杆菌菌株 BL21(DE3)-plysS,在 0.4 mmol/L IPTG 的诱导下表达,经 SDS-PAGE 分析表明,该基因在大肠杆菌中得到了特异性表达,表达蛋白大小为 26ku,与预期值相符。Western blotting 分析发现该表达蛋白与法国 PAP 抗血清有特异反应。琼脂双扩散免疫沉淀法鉴定发现表达蛋白与其自己的抗血清及法国的 PAP 抗血清均能形成免疫沉淀线,且这两条沉淀线在相交处呈融合状态,说明原核表达的该蛋白与法国从商陆叶片中提取出的 PAP 具有高度的同源性,也说明本试验准确克隆到了 PAP 基因且在大肠杆菌中得到了表达。

关键词:美洲商陆; PAP 基因;序列分析;原核表达

The Cloning, Sequencing of Poke weed Antiviral Protein Gene and Its Expression in *E. coli*

CHEN Ding-hu, WANG Xi-feng, LI Li, ZHOU Guang-he

(The State Key Laboratory of the Biology of Plant Disease and Pest, Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094)

Abstract: The total RNA was isolated from poke weed (*Phytolacca americana*) leaves using the method of guanidine isothiocyanate and used as template to amplify the deleted mutant pokeweed antiviral protein (PAP) gene by RT-PCR and then the gene was cloned into pGEM(r)-T vector. The sequencing results showed that PAP gene had 711 nt which has 99.6% identity comparing with the PAP gene nucleotide sequence reported by Lin et al (1991). The IPTG-inducible expression vector containing the PAP gene was constructed and transferred into *E. coli* BL21 (DE3)-plysS. The specific protein was produced after inducing with 0.4 mmol/L IPTG and its molecular weight was 26ku. Thorough testing by using double-diffusion on agar plate and Western blotting the results showed that expression product in *E. coli* is high identity with PAP extracted by a French man from French poke weed leaves. These revealed that PAP gene had been actually achieved and exactly expressed in *E. coli*.

Key words: *Phytolacca americana*; PAP gene; Sequence analysis; Prokaryotic expression

用生物技术方法定向改造作物,可以培育出抗病优质的农作物新品种。近年来试验证明将病毒外壳蛋白基因及复制酶基因等转入植物中表达,可以使植物获得不同程度的抵抗病毒侵染的能力^[1,2]。

但是,这类转基因植物绝大多数都是只针对单个病毒具有一定的抗性,而对多种病毒的复合侵染则无能为力,限制了它们在实际生产中的利用价值;而更为人们所关注的是这类转基因作物的抗病毒基因本

收稿日期:2001-02-06

基金项目:农业部“948”项目(991003)

作者简介:陈定虎(1965-),男,湖北荆州人,博士研究生,从事植物源抗病毒基因工程方面研究。周广和为联系作者, Tel:010-62815936; Fax: 010-62896114; E-mail:zhough@public.bta.net.cn

身就是病毒的基因,由于在自然界植物病毒存在着重组和异源包装的现象,这类转基因作物是否会产生危害性更强的病毒,人们迄今对此类隐患尚无法预料,还需要对其进行长期效应的研究。因此,挖掘具有广谱抗性且来源于植物的抗病毒基因已成为研究的目标。

美洲商陆抗病毒蛋白(poke weed antiviral protein, PAP)具有抑制多种病毒侵染的能力,是从美洲商陆(*Phytolacca americana*)叶片中分离出来的一种单链碱性蛋白,分子量为 29ku^[3,4]。该蛋白属于 I 型核糖体灭活蛋白(ribosome-inactive protein, RIP),具有 RNA N-糖苷酶的活性,能专一地从真核生物核糖体 60S 大亚基的 28S rRNA 特殊位点上切下一腺嘌呤,使其难与蛋白质合成的延伸因子 EF-2 结合,从而阻碍了蛋白质的合成^[5,6]。

最新研究表明,PAP 不但能够对 7 个植物病毒属的成员具有抑制作用^[7,8],而且对真菌、细菌及人类免疫缺陷型病毒(HIV)等都具有一定的抑制效果^[9-11],具有广谱的抗病性。另外研究表明,PAP 的抗病毒活性区与对寄主细胞的毒性区彼此分离^[12],因此可以通过基因改造,去其细胞毒性区而保留其抗病毒活性区,即可以发挥其实际利用价值。本文报道了通过缺失突变的方法,克隆了只对病毒有抑制作用而不干扰寄主植物生长的无毒型 PAP 基因,并进行了序列测定,且在大肠杆菌中进行了表达,为进一步研究其在植物中的表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 美洲商陆种子、菌株及质粒 商陆种子采自中国医学科学院药用植物研究所,宿主菌株 JM110、BL21(DE3)-plysS 由本室提供,载体 pGEM(r)-T 及 pET-5a 购于 Promega 公司。

1.1.2 酶及试剂 限制性内切酶及其它试剂皆为 Promega 公司产品。

1.1.3 PAP 抗血清 由法国 UFR 分子生物学实验室 Philippe Dullieu 博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 商陆叶片总 RNA 的提取 将商陆种子播种于温室,待出苗后 4 周采其叶片,采用异硫氰酸胍方法提取其总 RNA。

1.2.2 引物的合成 根据 Lin Q 等 1991 年^[13]发表的 PAP cDNA 序列,设计出 N、C 端缺失型 PAP 基

因扩增引物,为便于克隆,分别在引物两端引入限制性酶切位点。

5' 引物: CC $\frac{\text{TCTAGA}}{\text{Xba I}}$ $\frac{\text{CATATG}}{\text{Nde I}}$ GTGAATAG
AATCATCTACAA

3' 引物: AA $\frac{\text{GGTACC}}{\text{Kpn I}}$ $\frac{\text{GGATCC}}{\text{Bam HI}}$ TCACCACTT-
GGCACCCTGG

1.2.3 cDNA 合成和 PCR 扩增 利用 RT-PCR 方法克隆缺失突变型 PAP 基因,PCR 条件为 94 °C 1 min,55 °C 2 min,72 °C 1 min,共 35 个循环。

1.2.4 PCR 产物的克隆及序列分析 按照 pGEM(r)-T 载体试剂盒的要求,将 PCR 产物与该载体连接成重组质粒 pT3,然后转化大肠杆菌 JM110,在含有 X-gal 及 IPTG 氨苄青霉素 LB 培养基上,挑选白色菌落,提取其重组质粒,经酶切鉴定确认后,由上海博亚生物公司进行序列测定。

1.2.5 原核表达载体的构建及其表达 将 pT3 用 NdeI 和 BamHI 酶切,回收 711 bp 外源片段,重组到原核表达载体的 NdeI 和 BamHI 酶切位点,获得大肠杆菌表达载体 pET3,然后将其转化大肠杆菌 BL21(DE3)-plysS,以空载体为阴性对照,经 IPTG 诱导表达后,提取菌体进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 Western blotting 分析 将聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质电转移到硝酸纤维素膜(NC)上,脱脂奶粉封闭后,用法国 PAP 抗血清作一抗与 NC 膜上的蛋白杂交,经漂洗后再与碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗血清杂交,然后加碱性磷酸酶底物 NBT/BCIP 进行显色反应 1 min,再用蒸馏水冲洗停止反应。

1.2.7 琼脂双扩散鉴定 在琼脂板上打 3 个小孔,在其中一孔中加入 50 μl 原核表达蛋白,然后在其周围的另外两孔中分别加入 50 μl 法国 PAP 抗血清和表达蛋白抗血清,37 °C 温育 24 h。

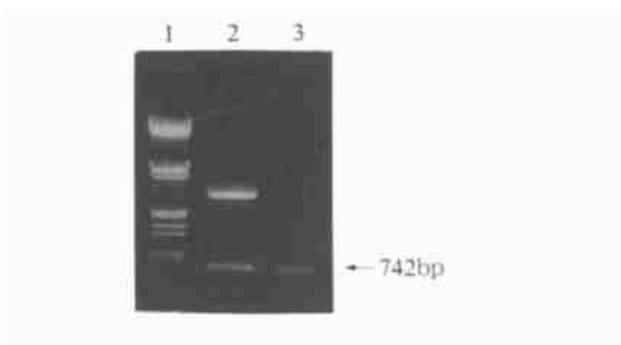
2 结果与分析

2.1 PAP 基因的 PCR 扩增及克隆

以提取的商陆叶片总 RNA 作为 RT-PCR 的模板进行扩增,电泳结果显示为一条均匀的 DNA 条带,大小为 742 bp,与设计要求的预期值一致,将 PCR 产物回收后与 pGEM(r)-T 载体连接得到重组质粒 pT3,经 Xba I 和 Kpn I 双酶切鉴定证明重组质粒 pT3 含有 PAP 基因片段(图 1)。

2.2 PAP 基因序列分析

分别从重组质粒 pT3 的 T7 启动子和 SP6 启动子对克隆的外源片段进行序列分析,结果表明,重组



1. λ DNA/ EcoRI + Hind III; 2. 重组质粒酶切图; 3. RT-PCR 产物
 1. λ DNA/ EcoRI + Hind III; 2. The digested recombination plasmid pT3;
 3. The product of RT-PCR

图 1 RT-PCR 扩增 PAP 抗毒基因及酶切重组质粒 pT3 电泳图

Fig.1 PAP gene amplified by RT-PCR and the agarose gel electrophoresis of the digested recombination plasmid pT3

质粒 pT3 中插入的外源 PAP 基因全长为 711 bp, 与 Lin Q 等 1991 年发表的 PAP cDNA 序列同源性达 99.6%。该基因已在 GenBank 登录, 登录号为 AF338910。

2.3 大肠杆菌表达载体的构建及 PAP 基因在大肠杆菌中的表达

为便于今后研究 PAP 基因在转化植物中的表达, 我们构建了大肠杆菌的表达载体 pET3 (图 2),

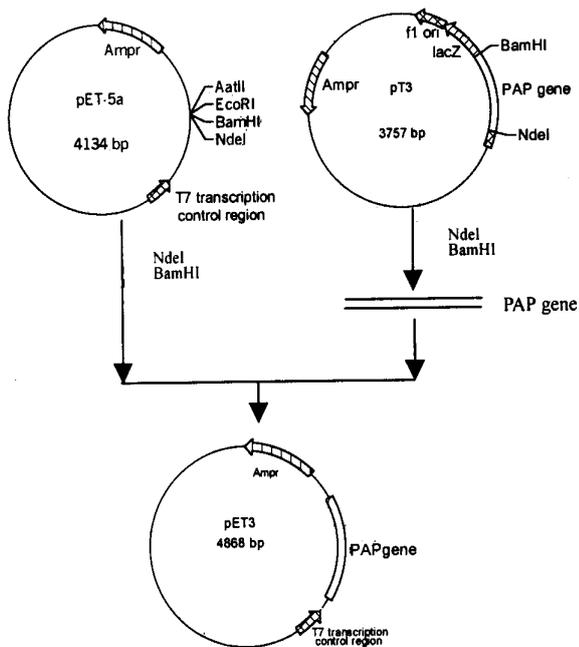
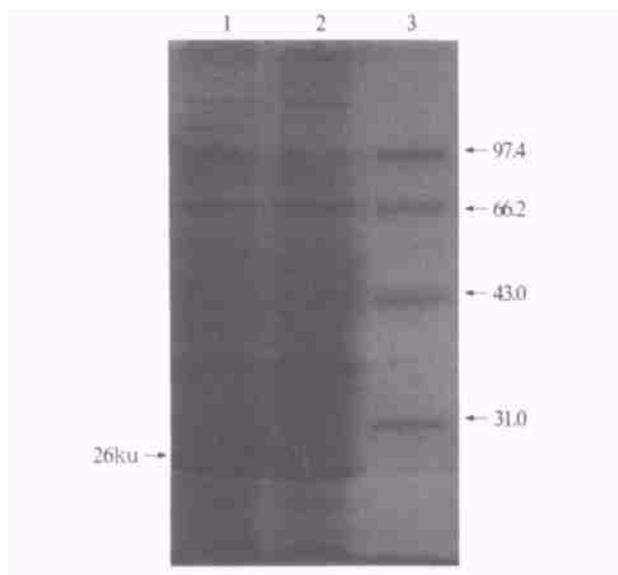


图 2 原核表达载体 pET3 的构建策略

Fig.2 Strategy for comparison of prokaryotic expression vector

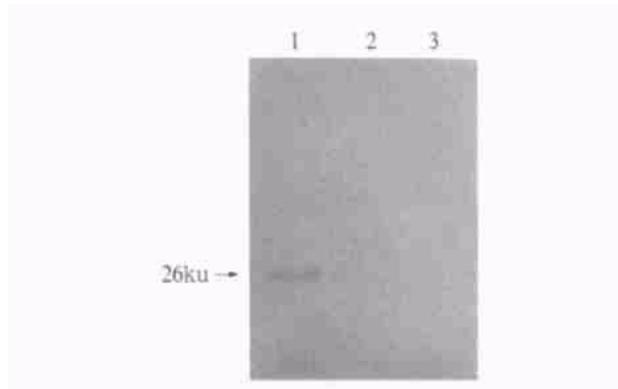
pET3 转化大肠杆菌菌株 BL21 (DE3)-plysS, 经 0.4 mmol/L IPTG 诱导后, 提取菌体进行 SDS-PAGE 分析, 发现在 26ku 处有一特异性的表达蛋白带, 其分子量大小与预期值一致, 而未经诱导的 pET3 则无特异带 (图 3), 经 Western blotting 分析, 只有特异蛋白带与法国 PAP 抗血清发生亲和反应 (图 4), 再经琼脂双扩散鉴定, 发现两种血清都能与表达蛋白反应产生沉淀线, 且两线交接处为融合状 (图 5), 这说明克隆的 PAP 基因在大肠杆菌中得到了正确的表达。



1. 表达载体诱导; 2. 表达载体未诱导; 3. 蛋白质分子量标准 (ku)
 1. pET3 induced with IPTG; 2. pET3 without induction; 3. Protein Marker (ku)

图 3 原核表达 PAP 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of PAP expressed product in *E. coli*

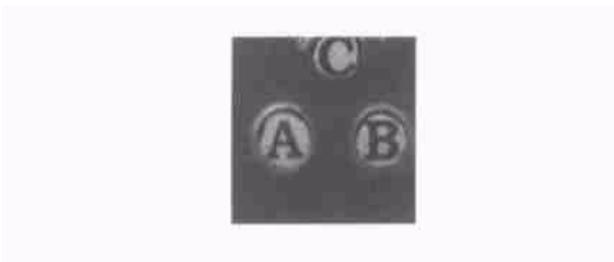


1. 诱导表达; 2. 未诱导表达; 3. 空载体

1. pET3 induced with IPTG; 2. pET3 without inductin; 3. pET without PAP gene

图 4 pET3 表达产物的 Western blotting

Fig.4 The Western blotting of product expressed with pET3



A:法国 PAP 多抗血清; B:自制原核表达 PAP 蛋白抗血清; C:提纯的原核表达 PAP 蛋白

A: Antiserum against PAP from France; B: Antiserum against PAP expressed in *E. coli*; C: Purified PAP expressed in *E. coli*

图 5 琼脂免疫双扩散分析

Fig. 5 The analysis of agar immune double diffusion

3 讨论

自从 1925 年发现商陆提取液可抑制 TMV 感染的 70 多年来,特别是 1980 年成功分离提纯商陆抗病毒蛋白以来,对商陆抗病毒蛋白的研究日益引起人们的重视。1993 年美国新泽西州 Rutgers 大学 Nilgun E. Tumer 等将 PAP 基因成功地转入烟草和马铃薯,获得了转基因植株,转基因植株对马铃薯 X 病毒(PVX)和马铃薯 Y 病毒(PVY)具有很高的抗性^[15]。目前国内相关工作仍处于起步阶段,中国科学院昆明植物研究所曾从商陆中分离出抗真菌的粗蛋白,但由于技术问题未能深入研究。由于玉米矮花叶病毒(MDMV)是马铃薯 Y 病毒属的成员,与 PVY 具有较高的相似性,用 PAP 基因对玉米进行遗传转化就完全有可能获得抗 MDMV 的转基因植株,再通过田间试验示范,应用于玉米制种、繁种田,增强玉米对矮花叶病的抗性,以控制其流行危害。本研究已获得了去除对植物有害部分的缺失型 PAP 基因,为构建植物表达载体和对玉米进行遗传转化奠定了良好的基础。

为了能全面地研究 PAP 的结构和功能,在试验过程中共设计了 3 对引物,第一对引物为扩增全长 PAP 基因,第二对引物为扩增 PAP C 端缺失型(去毒型)基因,第三对引物为扩增 PAP N、C 端缺失型(去信号肽及去毒型)基因。经序列分析发现 3 种 PCR 扩增产物与国外报道的核酸序列相比,其同源性最高达 99.9%,但在第 478 处的碱基皆为 G,而国外报道的为 A,分析其原因一是在反转录 cDNA 时该处碱基渗入有误,二是 PAP 基因在此处发生了突变。

References :

- [1] Beachy R N, et al. Coat-protein mediated resistance against virus infection. *Ann. Rev. Phytopath.* 1990, 28:451 - 474.
- [2] Golemboski D B, et al. Plants transformed with a tobacco mosaic nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87(16): 6311 - 6315.
- [3] Irvin J D. Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1975, 169: 522 - 528.
- [4] Irvin J D, et al. Pokeweed antiviral protein: ribosome inactivation and therapeutic applications. *Pharmacol. Ther.* 1992, 55: 279 - 302.
- [5] Endo Y, et al. The site of action of 6 different ribosome-inactivating proteins from plants on eukaryotic ribosomes: the RNA N-glycosidase activity of the proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 150: 1032 - 1036.
- [6] Hartley M R, et al. Single chain ribosomes inactivating proteins from plant depurinate *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *FEBS Lett.* 1991, 290: 65 - 68.
- [7] Chen Z C, et al. Effects of pokeweed antiviral protein PAP on the infection of plant viruses. *Plant Pathol.* 1991, 40: 612 - 620.
- [8] Tomlinson J A, et al. The inhibition of infection by cucumber mosaic virus and influenza virus by extract of *Phytolacca americana*. *J. Gen. Virol.* 1974, 22: 225 - 232.
- [9] Aron G M, et al. Inhibition of herpes simplex virus multiplication by the pokeweed antiviral protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980, 17: 1032 - 1033.
- [10] Olson M, et al. Ribosomal inhibitory proteins from plants inhibits HIV-1 replication in acutely infected peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1991, 7: 1025 - 1030.
- [11] Zarlign J M, et al. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal antibodies. *Nature*, 1990, 347: 92 - 95.
- [12] Tumer N E, et al. C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibit viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 3866 - 3871.
- [13] Lin Q, et al. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the antiviral protein from *Phytolacca americana*. *Plant Molecular Biology*, 1991, 17: 609 - 614.
- [14] Chomczynski P, et al. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium, thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162: 156 - 159.
- [15] Jennifer K, et al. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993: 7089 - 7093.