

番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达^{*}

叶寅¹ 叶长明² 骆学海² 田波¹ 范怀忠²

(1. 中国科学院微生物所 2. 植保系)

摘要 番木瓜环斑病毒 (PRV) 外壳蛋白 (CP) 基因 cDNA 克隆到 pUC 18 上构建成大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达载体。Western blot 检测结果表明该表达载体在 *E. coli* DH5 α 中有两种特异蛋白表达, 分子量为 34 kd 的蛋白与推测的表达产物大小相符, 且与 PRV CP 的一个“组分”大小相似; 而分子量为 16 kd 的蛋白可能是 34 kd 蛋白的降解物或者是 PRV CP 基因不完全表达产物。

关键词 PRV; CP 基因; Western blot

前文^[1]我们报道了 PRV CP 基因的合成、克隆和序列分析。本文报道 PRV CP 基因在 *E. coli* 中表达的结果。

1 材料与方法

1.1 *E. coli* 表达载体构建

从重组有 PRV CP 基因 cDNA 的 pUC 19 上以 KpnI、BamHI 双酶切下 cDNA 片断, 1% 低熔点胶电泳回收。回收的 cDNA 片断与 pUC 18 (KpnI+BamHI) 的连接、转化 *E. coli* DH5 α 以及重组克隆的筛选, 方法同前文所述。^[1]

1.2 Western blot

1.2.1 细菌总蛋白制备 接种阳性克隆于 5 ml LB 液体培养基, 加 IPTG 至 1 mmol/L 以诱导 LacZ 基因表达。37°C 摇床过夜, 收集细菌, 用 TE (10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, pH7.6) 悬浮, 加入等体积 2 \times 上样缓冲液 (0.25 mol/L Tris-Cl, pH6.8, 20% 蔗糖, 0.25% 溴酚蓝, 4% SDS, 10% β -巯基乙醇), 煮沸 10 min, 置冰浴中备用。

1.2.2 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 浓缩胶浓度为 3%, 分离胶浓度 10%, 电泳缓冲液为: 0.1 mol/L Tris-Cl, pH8.45, 0.1 mol/L Tricine, 0.1% SDS。溴酚蓝带在浓缩胶中电压为 100 V, 进入分离胶后电压调至 150 V。电泳完毕, 将胶浸泡在 20% 甘油、1 mol/L Tris-Cl (pH7.5) 溶液中 30 min, 以增强胶的韧性。

1.2.3 电转移 在电转缓冲液 (10 mmol/L NaHCO₃, 3 mmol/L Na₂CO₃, pH9.9) 中将滤纸-电泳胶-硝酸纤维素膜 (0.2 μ m)-滤纸依次铺在电转夹中, 避免出现气泡。350 mA 电转移 15 min, 取出硝酸纤维素膜, 室温下晾干。

1.2.4 免疫反应 用 PBST (0.01 mol/L Na₂HPO₄, 0.01 mol/L NaH₂PO₄, 0.25 mol/L NaCl, 0.05% Tween-20, pH7.2) 浸润硝酸纤维素膜, 加封闭液 (PBST 含 4% BSA) 封闭 1 h。加

^{*} 国家自然科学基金资助项目。

1991-10-07 收稿

PRV 抗血清, 反应 30 min。为避免非特异反应, 对 Sambrook 等 (1989) 的方法加以改进, 预先处理 PRV 抗血清: 收集 100 ml 菌液的菌体, 悬浮在 3 ml TE (pH8.0) 中, 煮沸 15 min, PRV 抗血清用封闭液稀释, 按抗血清量的 1/2 加入细菌裂解液, 室温下放置 4 h。加入 PBST 稀释的羊抗兔-IgG-Ap, 反应 30 min。浸入 Ap 显色缓冲液 (0.1 mol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl₂, 0.1 mol/L Tris-Cl, pH9.5), 加 NBT、BCIP (溶解在二甲基甲酰胺中) 分别至 0.33%、0.11% (W/V), 当出现清晰的紫色带时, 蒸馏水冲洗停止显色。

以上各步骤之间用 PBST 洗膜 3×10 min, 各处理均在室温下脱色摇床上轻轻摇动。

1.2.5 电泳胶处理 电转后, 胶片用考马斯亮蓝染色, 脱色, 照相。

2 结果与讨论

2.1 *E. coli* 表达载体构建

重组 pUC 19 经序列分析证明 PRV CP 基因与载体 LacZ 基因 α -多肽序列表达方向相反^[1]。而亚克隆到 pUC 18 上的 PRV CP 基因的表达方向与载体 LacZ 基因 α -多肽序列的阅读方向一致, 而且两者阅读框架相吻合 (见图 1)。由此推测插入有 PRV CP 基因的载体表达产物是包含一段 α -多肽的融合蛋白。

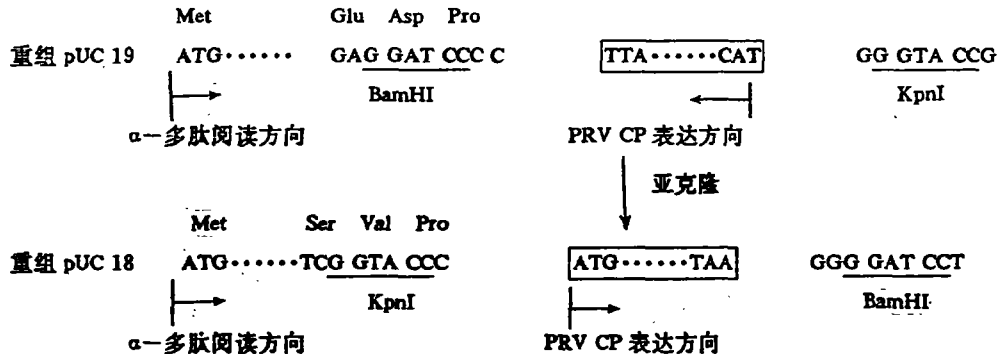


图 1 PRV CP 基因插入 pUC 18 的 SmaI 位点构成能够在 *E. coli* 中表达融合蛋白的载体

2.2 Western blot

Western blot 检测结果见图 2。插入 pUC 18 上的 PRV CP 基因在 *E. coli* 中获得显著表达, 可以检测到两种特异蛋白。根据表达产物分子量大小推测 34 kd 蛋白是一种融合蛋白, 即连有一段 α -多肽的 PRV CP, 或者是融合蛋白的加工产物。34 kd 表达产物与 PRV CP 的一个“组分” (34 kd) 大小一致, 而比 36.5 kd CP 小得多。关于 PRV CP 的组分与大小目前尚未定论, 不同来源的 PRV 或同一来源的 PRV 存放一段时间后, CP 在 SDS-PAGE 胶上出现 1~3 条带, 大小在 28~36.5 kd 之间。这可能是株系特异性或 CP 发生降解的结果。需要指出的是, PRV RNA 并不含独立的 CP 基因, 即 CP 是由前体蛋白加工而来^[4-5], 这样不同株系的 CP 从前体蛋白上切割部位可能不同, 从而造成 CP 分子量的差异。我们根据 Quemada 等 (1990) 报道的 PRV-P 标系 CP 基因序列^[3], 采用 PCR 扩增技术合成了加有起始密码子 ATG 的完整 CP 基因 (长 861 nt)。该基因编码的 CP 分子量计算值为 32.5 kd 加上一段 α -多肽, 与实际检测的 34 kd 基本相符, 说明合成的 PRV CP 基因能在 *E. coli* 中有效表达。

由图 2 还可看出, 另有一种 16 kd 的特异蛋白表达。多次重复检测结果相同。而该蛋白分子量远比 PRV CP 小, 其产生的原因尚不清楚, 推测是 34 kd 蛋白的降解产物或者是 CP

基因不完全表达产物。

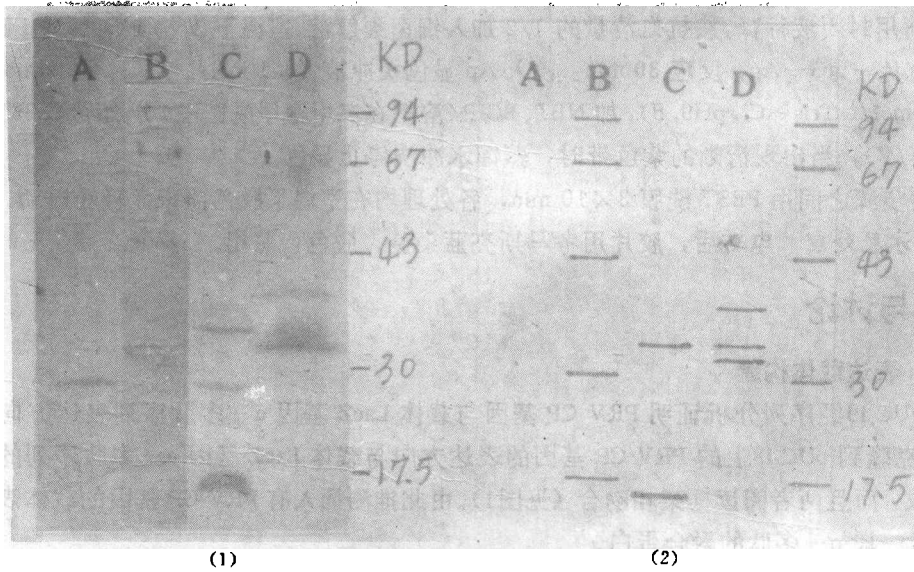


图2 PRV CP基因在 *E. coli* 中表达的 Western blot 结果

(1) A. 阳性对照 B. 蛋白质分子量标准 C. PRV CP 基因的表达 D. PRV CP
(2) 根据 (1) 的手画图

在基因构建和表达的基础上,我们将 PRV CP 基因 cDNA 插入 pRoK I 的 35S 启动子和 nos 终止序列之间,构建成 PRV CP 基因的植物表达载体 pRPC,通过三菌融合将 pRPC 导入根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404,与其中的 pAL4404 构成双元载体系统,并开始转化番木瓜。

参 考 文 献

- 1 叶长明等. 番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的构建. 植物病理学报, 1991, 21 (3): 1~4
- 2 叶寅等. 一个黄瓜花叶病毒强株系的外壳蛋白基因的合成、克隆、序列分析和表达. 科学通报, 1991, 36 (17): 1340~1344
- 3 Quemada H, et al. The nucleotide sequences of the 3' -terminal regions of papaya ringspot virus strains W and P. J. Gen. Virol. 1990, 71: 203~210
- 4 Nagel J & Heibert E. Complementary DNA cloning and expression of the papaya ringspot potyvirus sequences encoding capsid protein and a nuclear inclusion-like protein in *Escherichia coli*. Virology, 1985, 143: 435~441
- 5 Purcifull D E, et al. Papaya ringspot virus. Descriptions of Plant Virus, 1984, NO. 292
- 6 Sambrook J, et al. Preparation of *E. coli* lysates for absorption of anti-*E. coli* antibodies. Molecular Cloning (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989. 12, 26

EXPRESSION OF PAPAYA RINGSPOT VIRUS
CAPSID PROTEIN GENE IN *E. coli*

Ye Yin¹ Ye Changming² Luo Xuehai² Tian Po¹ Fan Huaizhong²

(1. Institute of Microbiology, Academia Sinica, 2. Plant Protection department)

Abstract *E. coli* DH5 α was transformed by pUC 18 recombined with PRV CP gene cDNA. Western blot showed that two novel proteins were expressed from the recombinant, one with MW34 kd conformed in size to the predicted expression product, and approximated that of a PRV CP "fraction", the other protein was probably a cleavage product of the 34kd protein or one resulting from partial expression of the PRV CP gene.

Key words PRV; CP gene; Western blot