

烟草丛顶病毒 ORF3 的克隆及原核表达

龙亚芹¹, 左瑞娟¹, 李 凡¹, 赵秀兰², 李 玲¹, 陈海如¹

(1 云南农业大学 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南 昆明 650201;

2 沧源县农业局植保站, 云南 临沧 677400)

摘要:利用 RT-PCR 方法, 自烟草丛顶病毒(*Tobacco bush top virus*, TBTV) 龙陵分离物(TBTV-YLLi)的 RNA 中扩增出 ORF3 目的片段, 并克隆到 pMD18-T 载体上进行序列分析. 结果表明, TBTV-YLLi 的 ORF3 全长 714 bp, 与 TBTV 其他分离物的核苷酸相似性和氨基酸相似性分别为 98.3% ~ 98.6% 和 95.4% ~ 95.8%; 与同属的花生丛簇病毒(*Groundnut rosette virus*, GRV)、豌豆耳突花叶病毒 2 号(*Pea enation mosaic virus-2*, PEMV-2) 和胡萝卜拟斑驳病毒(*Carrot mottle mimic virus*, CMoMV)的核苷酸相似性分别为 65.1%、61.6% 和 49.7%, 氨基酸相似性分别为 36.4%、34.6% 和 16.5%. 将 ORF3 克隆到原核表达载体 pET28a(+) 上, 获得的重组子 pET28-ORF3 转化大肠杆菌 BL21-plysS, 使用终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 在 37 °C 诱导培养 4 h 时, 该融合蛋白表达量最高. 融合蛋白经 Ni²⁺ 亲和柱层析纯化后, SDS-PAGE 电泳表明, 融合蛋白相对分子质量约为 35 000, 与预计的相对分子质量大小相一致.

关键词:烟草丛顶病毒; ORF3; 序列分析; 原核表达

中图分类号: S435.72

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)02-0032-04

Molecular Cloning and Prokaryotic Expression of the ORF3 of *Tobacco bush top virus*

LONG Ya-qin¹, ZUO Rui-juan¹, LI Fan¹, ZHAO Xiu-lan², LI Ling¹, CHEN Hai-ru¹

(1 Key Laboratory for Agricultural Biodiversity for Pest Management of China Education Ministry, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2 Plant Protection Station of Agricultural Bureau of Cangyuan County, Lincang 677400, China)

Abstract: The ORF3 was amplified from RNA of *Tobacco bush top virus* (TBTV) Longling isolate (TBTV-YLLi) by RT-PCR, and the amplified cDNA was then cloned into pMD18-T. The results of sequence analysis indicated that the ORF3 of TBTV-YLLi was consisted of 714 bp, and shared 98.3% to 98.6% nucleotide identities and 95.4% to 95.8% amino acid identities with other TBTV isolates, respectively. Compared with the ORF3 of TBTV with other umbraviruses, the results demonstrated that TBTV had 61.6%, 65.1% and 49.7% nucleotide identities and 34.6%, 36.4% and 16.5% amino acid with *Pea enation mosaic virus-2* (PEMV-2), *Carrot mottle mimic virus* (CMoMV) and *Groundnut rosette virus* (GRV), respectively. The ORF3 was then cloned into pET28a(+), and the recombinant plasmid of pET-ORF3 was then transformed into *E. coli* B121-plysS and induced by IPTG. The fusion protein reached the highest expression level when induced with 1.0 mmol/L IPTG for 4 h at 37 °C. The expressed protein was then purified through Ni²⁺ affinity chromatography column. SDS-PAGE analysis revealed that the expected 35 000 fusion protein was expressed successfully.

Key words: *Tobacco bush top virus*; ORF3; sequence analysis; prokaryotic expression

收稿日期: 2009-03-26

作者简介: 龙亚芹(1983—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 李 凡(1970—), 男, 教授, 博士, E-mail: fanlikm@126.com

基金项目: 国家自然科学基金(30660101)

烟草丛顶病(Tobacco bushy top disease)是20世纪90年代以来在我国云南省西部地区爆发、流行的一种烟草毁灭性病害^[1],烟草丛顶病由烟草丛顶病毒(Tobacco bushy top virus, TBTv)和烟草扭脉病毒(Tobacco vein distorting virus, TVDV)引起^[2-3]. TBTv为幽影病毒属 *Umbravirus* 确定成员, TBTv 中国分离物的全基因序列长4 152个核苷酸,由4个开放阅读框架(Open reading frame, ORF)组成. 根据预测, ORF1编码一个35 000的多肽,功能未知; ORF2编码相对分子质量约63 000的多肽,可能是病毒的复制酶; ORF3编码相对分子质量约26 000的蛋白,与其他幽影病毒 ORF3 蛋白的相似性为21.0% ~ 38.3%; ORF4编码相对分子质量约27 000的蛋白,推测的 ORF4 编码产物与其他幽影病毒的 ORF4 蛋白有43.4% ~ 62.0%的相似性^[4]. 对其他幽影病毒的研究表明,幽影病毒的 ORF3 编码蛋白具有帮助病毒进行长距离运输以及延长病毒 RNA 稳定性的功能,同时, ORF3 可能在病毒 RNA 的复制中起一定的作用^[5]. 本研究以 TBTv 的 ORF3 为目的基因,构建其原核表达载体,利用 BL21-plysS 表达菌株获得 ORF3 融合蛋白,并对其表达条件进行了优化. 为今后 ORF3 融合蛋白多克隆抗体的制备及 ORF3 的功能研究打下了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

烟草丛顶病样品采自云南省保山市龙陵县(TBTv-YLLi),由云南省烟草科学研究所莫笑晗博士提供,并通过蚜虫和摩擦接种保存于烟草品种 K326 上. 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21-plysS 均为云南农业大学农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室保存. 原核表达载体 pET28a(+)为云南省农业科学院生物研究所张仲凯研究员惠赠. PCR 反应所用试剂和胶回收试剂盒均为北京天根产品,蛋白 Marker 为 IBM 产品,引物合成由上海生工生物工程公司完成, *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、DNA Marker 购自宝生物公司,质粒提取试剂盒购自 Promega 公司, *HisTag* 融合蛋白纯化试剂购自 Merck 公司,其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 TBTv ORF3 的克隆 根据 GenBank 数据库中 TBTv ORF3 的序列及质粒 pET28a(+)的载体图谱,设计特异性引物,上游引物加入 *Bam*H I 酶切位点:5'-CGGGATCCATGTCTACGATCATAAATGT-3',下游引物加入 *Hind* III 酶切位点:5'-CCCAAGCTTTCAC-

CACTTGTTGGTGGT-3',加粗部分即为引入的酶切位点序列. 从烟草丛顶病病叶中提取总 RNA,再反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增. 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,最后 4 $^{\circ}$ C 保存. 将 PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳后,割胶回收 PCR 产物并与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞,然后涂布于含氨苄青霉素(Amp)的 LB/X-gal/IPTG 培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 16 h. 挑取白色菌落,提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定,经鉴定正确的克隆送上海生物工程公司测序.

1.2.2 TBTv ORF3 原核表达载体构建 选择测序正确的 pMD-ORF3 质粒,与表达载体 pET28a(+)分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后,回收酶切产物,胶回收目的片段与线性化的 pET28a(+)载体,用 T4 DNA 连接酶,16 $^{\circ}$ C 连接过夜. 连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,将转化产物涂布于含有 50 mg/L 卡那霉素(Kan)的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜. 在平板上挑取单个菌落,接种于含 Kan 的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜,进行菌落 PCR 鉴定^[6],同时用 Promega 公司质粒提取试剂盒小量制备质粒, *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切后,10 g/L 琼脂糖电泳进行鉴定,经 PCR 和双酶切鉴定正确后,送上海生物工程公司测序,测序结果用 DNAMAN 和 NCBI 中的 Blast 软件分析.

1.2.3 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达 将测序正确的重组质粒命名为 pE28-ORF3,并转化大肠杆菌 BL21-plysS 感受态细胞,涂板、挑取单菌落,在含 Kan 的 LB 培养基摇床中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜. 取重组菌按体积比 1:100 接入含 Kan 的 LB 培养基中,220 r/min、37 $^{\circ}$ C 培养 3 ~ 4 h,加入异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol/L,继续诱导培养 4 h. 离心收集菌体,加入 100 μ L 2 \times SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min,取 15 μ L 进行 120 g/L SDS-PAGE 电泳分析.

1.2.4 原核表达条件的优化 将含有 pET28-ORF3 的 BL21-plysS 以体积比 1:100 接种于含 Kan 的 LB 液体培养液中,37 $^{\circ}$ C 培养 2.5 h 至 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.6 左右,分别加入 IPTG 至终浓度 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.4 和 1.6 mmol/L 诱导,在添加 IPTG 后继续 37 $^{\circ}$ C 诱导培养,并于培养 2、4、6 和 8 h 后分别取样处理,经 12% SDS-PAGE 电泳分析. SDS-PAGE 电泳按文献[7]方法进行,浓缩胶质量浓度为 50 g/L,分离胶质量浓度为 120 g/L,考马斯亮蓝 R-250 染色,甲醇-冰醋酸脱色液脱色,观察结果.

1.2.5 融合蛋白表达形式的鉴定 取菌液 10 mL,

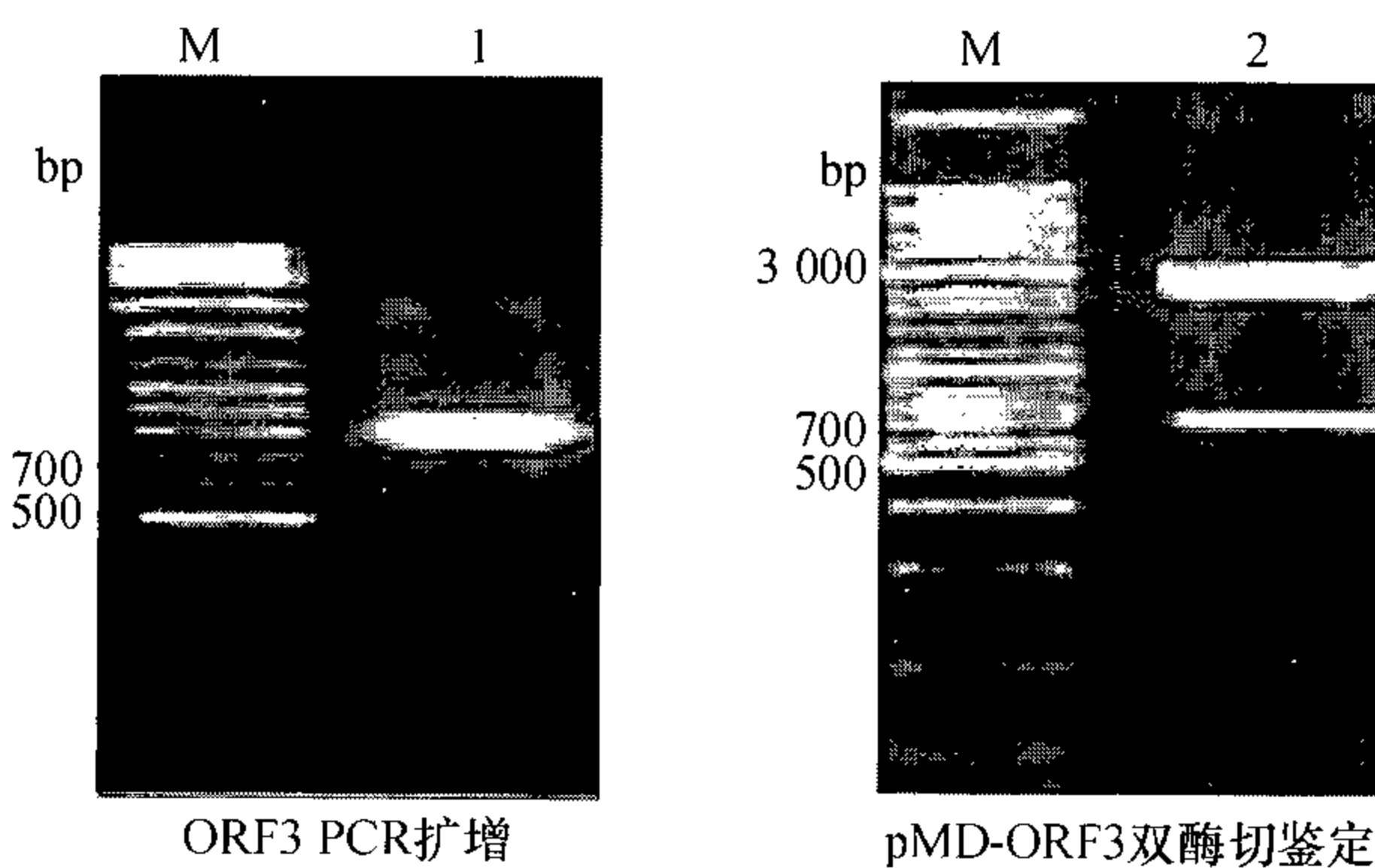
10 000 r/min 离心 5 min, 以菌液体积比 1:10 的 PBS 重悬沉淀, 冰浴下超声波破碎菌体, 离心收集上清和沉淀, 进行 120 g/L SDS-PAGE 分析^[8].

1.2.6 融合蛋白大量诱导表达及纯化 在优化条件下, 含重组质粒的菌株经扩大培养, 按照 6 × *His Tag* 亲和层析柱操作说明进行.

2 结果与分析

2.1 ORF3 目的片段的克隆与序列分析

利用 TBTV 的 ORF3 特异性引物进行 PCR 扩增, 电泳结果显示, 在 700 bp 左右有 1 特异性条带, 与预期结果相符(图 1); 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 电泳检测在 700 bp 和 2 600 bp 左右有条带(图 1).



M: DNA Marker DL10000; 1: ORF3 的 PCR 扩增产物. 2: pMD-ORF3 双酶切结果.

图 1 ORF3 PCR 扩增和 pMD-ORF3 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切鉴定电泳结果

Fig. 1 ORF3 amplified by PCR and restriction endonuclease digestion analysis of pMD-ORF3 with *Bam*H I and *Hind* III

将 PCR 和酶切鉴定均正确的质粒进行序列测定, 结果表明, TBTV 龙陵分离物 (TBTV-YLLi) ORF3 (基因登录号 FM242699) 全长 714 bp, 编码 237 个氨基酸. TBTV-YLLi 与目前已报道的 TBTV 中国分离物 (TBTV-Ch, 登录号为 AF402620) 和 TBTV 弥渡分离物 (TBTV-YMDu, 登录号为 FM242700) 的 ORF3 核苷酸相似性为 98.6% 和 98.3%, 氨基酸相似性为 95.8% 和 95.4%. 将 TBTV-YLLi 的 ORF3 与 GenBank 上已登录的幽影病毒属其他成员的 ORF3, 如 PEMV-2 (U03563)、CMoMV (U57305) 和 GRV (Z69910) 进行核苷酸相似性和氨基酸相似性比较分析, 结果表明, TBTV-YLLi ORF3 与 GRV、PEMV-2、CMoMV 的核苷酸相似性分别为 65.1%、61.6%、49.7%, 氨基酸相似性分别为 36.4%、34.6%、16.5% (表 1). 可见, TBTV 与幽影病毒属其他病毒 ORF3 的相似性较低, TBTV 不同分离物间 ORF3 的相似性较高.

表 1 TBTV-YLLi 与 TBTV 其他分离物及幽影病毒属其他成员的 ORF3 核苷酸 (右上) 和氨基酸序列 (左下) 相似性比较

Tab. 1 Identities for nucleotide (upper right) and amino acid (lower left) of TBTV-YLLi ORF3 with other TBTV isolates and other members of the umbraviruses %

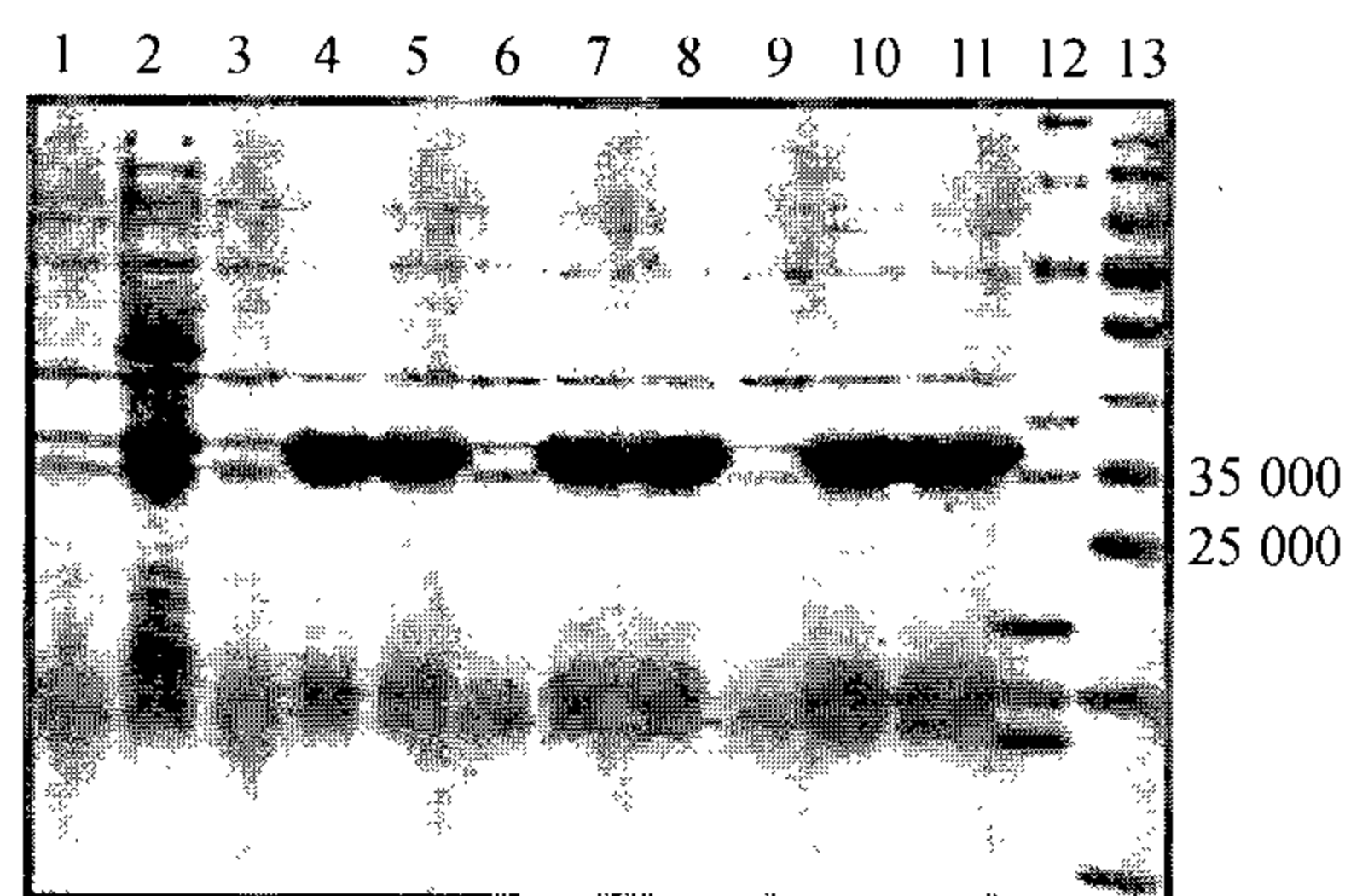
分离物	TBTV-YLLi	TBTV-YMDu	TBTV-Ch	PEMV-2	CMoMV	GRV
TBTV-YLLi		98.3	98.6	61.6	49.7	65.1
TBTV-YMDu	95.4		99.7	62.2	49.4	64.8
TBTV-Ch	95.8	99.6		62.3	49.6	65.0
PEMV-2	34.6	36.4	36.4		51.4	61.0
CMoMV	16.5	16.9	16.9	20.6		47.4
GRV	36.4	36.0	36.0	32.8	20.6	

2.2 原核表达载体构建和鉴定

重组表达质粒 pET-ORF3 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后, 在 700 bp 左右有一特异性条带, 与预期结果相符. 以单菌落为模板, 经菌落 PCR 鉴定, 结果显示在 700 bp 处有 1 条明显特异条带. 重组表达质粒 pET-ORF3 测序表明, 与 pMD-ORF3 质粒中的原序列完全一致. 表明目的片段已正确插入 pET-28a(+) 表达载体, 鉴定确认的质粒经测序验证, 读码框正确.

2.3 ORF3 的诱导表达

经 IPTG 诱导的 pET-ORF3 菌体在相对分子质量大小约 35 000 处有一明显的特异蛋白条带, 即表达的 ORF3 融合蛋白相对分子质量约为 35 000 (图 2), 与预期大小一致.



1: 未诱导的含 pET-28a(+) 空载体的 BL21-plysS; 2: 诱导的含 pET-28a(+) 空载体的 BL21-plysS; 3: 未诱导的 BL21-plysS; 6, 9: 未诱导的 pET-ORF3 菌体总蛋白; 4, 5, 7, 8, 10, 11: 诱导的 pET-ORF3 菌体总蛋白; 12, 13: 蛋白质相对分子质量标准.

图 2 pET-ORF3 在大肠杆菌中的诱导表达结果

Fig. 2 Induced expression of pET-ORF3 in BL21-plysS

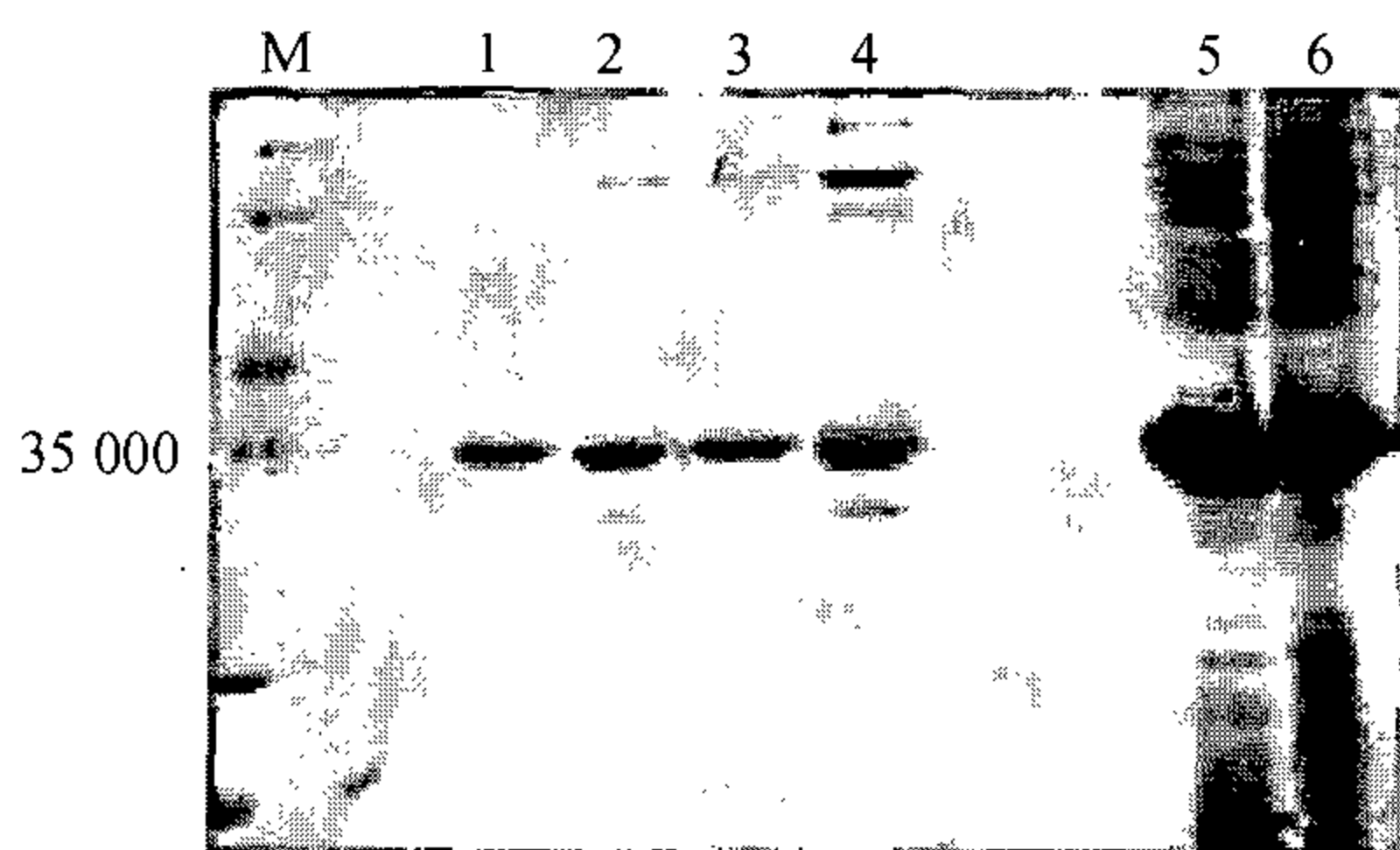
2.4 pET-ORF3 原核表达条件的优化和诱导表达蛋白体的鉴定

诱导表达的产物进行 SDS-PAGE 电泳, 并经考马斯亮蓝染色后发现, 当诱导温度为 20 °C 时, 蛋白表达效率很低, 25 °C 及以上时蛋白表达量明显增强, 以 37 °C 诱导的表达量最高; 37 °C 诱导下, 1 ~ 4 h 内随诱导时间增加蛋白表达量逐步增加, 4 h 后蛋白表

达量增加不明显;在不同诱导温度下,表达形式主要以包涵体形式为主.目的蛋白在 IPTG 为 1.0 mmol/L 下表达量最大.

2.5 重组蛋白的纯化

在优化条件下,将含重组质粒 pET-ORF3 的大肠杆菌菌株 BL21-plysS 在 37 °C 培养 2.5 h 后,以 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 37 °C 诱导培养 4 h,并根据产品说明书用 His-Bind 琼脂糖凝胶亲和纯化法对表达的融合蛋白进行纯化. SDS-PAGE 表明,纯化的蛋白条带相对分子质量约为 35 000,与预计的大小相一致.



M:蛋白质相对分子质量标准;1~4:纯化后蛋白;5~6:未纯化的蛋白.

图3 ORF3 融合蛋白纯化结果

Fig.3 Analysis of the purified expressed protein of ORF3

3 讨论

烟草丛顶病最早于 1958 年在津巴布韦发生,目前该病仅在南部非洲及亚洲的部分国家有发现,烟草丛顶病是国内报道的第一个由幽影病毒属成员引起的病害^[1].一直以来对烟草烟草丛顶病病原物的分子生物学方面的研究报道较少.对 TBTV 基因功能的研究将有助于在分子水平上揭示 TBTV 致病性和寄主体内扩散的机制.目前幽影病毒属中,仅对花生丛簇病毒(GRV)的相关 ORF 开展了功能分析研究^[9].对幽影病毒属不同成员的序列分析表明,TBTV 与其他病毒的核苷酸和氨基酸相似性相对较低,而 TBTV 不同分离物间在进化上可能与其地理分布有关.

由于 TBTV 的基因组不含编码外壳蛋白(Coat Protein, CP)的 ORF,无法通过提纯病毒颗粒来制备病毒的抗血清,因此,本文通过克隆 TBTV 的 ORF3,使其在原核细胞中高效表达,为将来以表达产物为抗原制备用于 TBTV 检测和功能分析的抗血清奠定了基础.

影响外源基因表达的因素很多,为了提高表达产量,本文主要摸索了诱导表达时 IPTG 的浓度、诱导温度和诱导时间 3 个因素. IPTG 浓度对表达量的影响与表达载体和宿主菌种有关,目前一般报道认为 IPTG 浓度为 0.1 ~ 1.0 mmol/L^[10-11],本文的 3 次重复试验结果表明, pET-ORF3 载体转化大肠杆菌 BL21-plysS, IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L 时,蛋白的表

达量最大.

该蛋白 N 端融合了 6 个连续组氨酸,这种表达方式的目的在于简化蛋白纯化工作.组氨酸的咪唑环可以与 Ni²⁺ 结合,而 6 个连续组氨酸的存在使得目的蛋白与螯合 Ni²⁺ 的层析介质之间的结合更为牢固.含高浓度咪唑的缓冲液可以与融合蛋白竞争 Ni²⁺,使得结合在层析介质上的目的蛋白被洗脱下来^[7].据此原理,将诱导后的菌体超声波破碎,回收包涵体并溶解过滤,滤液经 His Bind 层析柱,洗脱后脱盐浓缩.纯化样品经 SDS-PAGE 检测,纯化蛋白基本达到电泳纯.由于每毫升亲和层析介质理论上可吸附 10 mg 融合蛋白,因而这种纯化方式具有简便、快速及处理量大等优点.

本研究成功构建了烟草丛顶病毒 ORF3 的原核表达载体 pET-ORF3,并在大肠杆菌中表达,对其表达条件进行优化,为接下来蛋白的大量表达纯化及抗体制备奠定了相应的基础.

参考文献:

- [1] 李凡,吴建宇,陈海如.烟草丛顶病研究进展[J].植物病理学报,2005,35(5):385-391.
- [2] GATES L F. A virus causing axillary bud sprouting of tobacco in Rhodesia and Nyasaland[J]. Ann Appl Biol, 1962,50:169-174.
- [3] COLE J. Isolation of tobacco vein distorting virus from tobacco plants infected with aphid-transmissible bushy top[J]. Phytopathology,1962,52:1312.
- [4] MO X H, QIN X Y, WU J, et al. Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of tobacco bushy top virus[J]. Arch Virol,2003,148:389-397.
- [5] 李凡,林奇英,陈海如,等.幽影病毒属病毒的研究现状与展望[J].微生物学报,2006,46(6):1033-1037.
- [6] JOSEPH S, DAVID W R. Molecular cloning, a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001.
- [7] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,译.3版.北京:科学出版社,2002.
- [8] 徐璐,范学政,王琴,等.猪瘟病毒石门株 E2 基因 4 个抗原结构域的原核表达[J].中国农业科学,2006,39:814-818.
- [9] TALIANSKY M E, ROBINSON D J. Molecular biology of umbraviruses: Phantom warriors[J]. Journal of General Virology,2003,84:1951-1960.
- [10] 谢芝勋,邓显文,刘加波,等.禽呼肠孤病毒广西分离株 δ₃ 基因的克隆和表达[J].中国预防兽医学报,2005,27(3):167-170.
- [11] 狄旭,刘长征,陈松森,等.人甲状旁腺素(1-34)衍生物在大肠杆菌中表达、纯化及其生物学活性[J].中国生物化学与分子生物学报,2005,21(2):227-233.

【责任编辑 周志红】