

菜豆荚斑驳病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达

魏晓堂¹, 白桦², 尼秀媚¹, 张京宣¹, 宋涛¹

(1. 山东出入境检验检疫局, 山东青岛 266002; 2. 青岛出入境检验检疫局, 山东青岛 266000)

摘要 [目的]克隆菜豆荚斑驳病毒(BPMV)外壳蛋白(CP)基因,并对其进行原核表达。[方法]利用 RT-PCR 方法克隆 BPMV CP 基因,将其连接至 pMD19-T Simple 载体后对阳性克隆进行测序,检测其与已知病毒外壳蛋白基因序列的同源性;将 CP 基因定向插入双酶切的 pET30a,构建其原核表达载体并转化大肠杆菌 BL-21 表达重组蛋白。[结果]试验克隆得到的 CP 基因大小为 1 122 bp,与 NCBI 中目标基因的相似度达 99% 以上;试验成功构建了原核表达载体 pET30a-BPMV CP,发现重组蛋白在 37 ℃、1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h 条件下表达量最高。[结论]该研究为 BPMV 抗血清的制备与液相芯片检测方法的建立奠定了基础。

关键词 菜豆荚斑驳病毒;外壳蛋白;表达

中图分类号 S643.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)05-01916-02

Cloning and Prokaryotic Expression of Coat Protein Gene from Bean Pod Mottle Virus

WEI Xiao-tang et al (Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong 266002)

Abstract [Objective] The paper was to clone the coat protein (CP) gene from bean pod mottle virus (BPMV) and express it in prokaryote. [Method] The BPMV CP gene was obtained by using RT-PCR method, and it was connected to the pMD19-T Simple vector to sequence the positive clones and detect the homology between the CP gene and the known virus coat protein gene sequence. The CP gene was inserted into the double enzyme digestive pET30a to construct the prokaryotic expression vector, and the recombinant protein was expressed after transformed into *Escherichia coli* BL-21. [Result] The size of the obtained CP gene was 1 122 bp, and the similarity with the NCBI target gene exceeded 99%; the prokaryotic expression vector pET30a-BPMV CP was constructed successfully, and it found that the recombinant protein had highest expression level when it was induced at 37 ℃ for 4 h with 1 mmol/L IPTG. [Conclusion] The study laid the foundation for the preparation of BPMV antiserum and construction of liquid phase chip detection method.

Key words Bean pod mottle virus; Coat protein; Expression

菜豆荚斑驳病毒(Bean pod mottle virus, BPMV) 隶属豇豆花叶病毒科豇豆花叶病毒属,是一种正链 RNA 病毒,其基因组由正链 RNA-1(约 3.6 kb)和 RNA-2(约 6.0 kb)组成,分别包裹在直径为 28 nm 的球状病毒粒体中,其中 RNA-2 编码运动蛋白(MP)和外壳蛋白(CP)^[1]。1948 年,Zaumeier 等在菜豆上首次报道了 BPMV,该病毒主要危害大豆、菜豆等豆科植物,可造成大豆、荚和种子斑驳,甚至坏死,直至植株死亡。受 BPMV 侵染的大豆,易受到拟茎点霉属(*Phomopsis*)真菌的危害,这类真菌侵染大豆后,大豆种子的品质会进一步降低。在美国,BPMV 已引起大豆产量的巨大损失^[2-3],我国目前尚无此病毒的分布。

BPMV 可通过种子进行远距离传播,随着我国进口大豆数量的不断增加,该病毒随大豆传入的风险也将逐步增大。针对该病毒的检测,目前实验室常用方法的主要是血清学和分子生物学检测^[4-6]。随着生物技术的发展,新的检测方法也在不断涌现,如 TaqMan MGB 探针法^[7]、纳米上转换荧光检测法^[8]等。

BPMV 外壳蛋白的克隆与表达是 BPMV 多色微球液相芯片检测技术系列研究之一,利用 BPMV 具有种属特异性的基因序列作为靶基因,克隆其外壳蛋白基因,构建至原核表达载体 pET30a(+),并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,诱导重组蛋白表达,从而为该病毒抗血清的制备与液相芯片检测方法的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株。菜豆荚斑驳病毒 BPMV,购自 CMCC,并经过验证可用。

1.1.2 试剂。植物病毒 RNA 提取试剂盒、One step RNA PCR kit、凝胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、反转录试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 、感受态细胞及大肠杆菌 BL-21(DE3)感受态细胞等均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取、DNA 琼脂糖凝胶回收、PCR 产物纯化等所用试剂盒及克隆载体 pMD19-T Simple、表达载体 pET30a、*Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶、回收蛋白 Ni-NTA 柱均购自天根生化科技(北京)有限公司;试验所用限制性内切酶均购自 NEB 公司(纽英伦生物技术有限公司-北京)。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 提取。取病毒侵染的叶片 5 g,加入 10 ml 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 8.0),再加入 β -巯基乙醇和异丙醇至终体积分数分别为 0.2% 和 10%,研磨至匀浆。在 4 ℃、8 000 g 下离心 10 min,取上清液,加入终体积分数为 1% 的 Triton X-100,在 4 ℃ 下搅拌 1 h,然后于 4 ℃、6 000 g 下离心 20 min,取上清液,加入 NaCl 至终浓度为 0.2 mol/L,再加入 PEG(分子量 6 000 ~ 8 000)至终体积分数为 4%,在 4 ℃ 下搅拌 1 h,然后室温孵育 1 h,8 000 g 离心 30 min,弃上清液,沉淀用 0.5 ml 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.2)悬浮,即为粗病毒液。用植物病毒提取试剂盒提取粗病毒液中 RNA。

1.2.2 cDNA 的获得。取 5 μ g 植物总 RNA 和 1 μ l 随机六聚体引物(0.2 μ g/ μ l),加适量 DEPC-ddH₂O 至 12 μ l,于 70

基金项目 国家质检总局项目(2011HK170)。

作者简介 魏晓堂(1971-),女,山东青岛人,高级农艺师,从事植物检疫方面的研究,E-mail:nxm210@yahoo.cn。

收稿日期 2013-01-06

℃下变性 5 min,冰浴冷却,依次加 4 μl Reaction Buffer、1 μl Ribonuclease inhibitor (20 U/μl)、2 μl dNTPs (10 nmol/L)、25 ℃温育 5 min,加入 1 μl M-MuLV Reverse Transcriptase,42 ℃温育 1 h 后,70 ℃下放置 10 min 灭活反转录酶。反应完毕后,将产物置于冰上冷却,-20 ℃保存备用。

1.2.3 RT-PCR 扩增。利用 GenBank 发表的 BPMV 外壳蛋白基因序列 NP734072.1,设计带有 *Bam*H I 酶切位点的特异性引物,引物合成委托 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司完成。引物序列为(下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点):

BF1: GGATCCATGGAACAAATCTATTCAA

BR1: GGATCCTGAGGAATGGTGCCAAGAA

RT-PCR 反应体系为 50 μl,包含: 10 × *Taq* buffer 5 μl, dNTPs (2.5 nmol/L) 4 μl, BF1 和 BR1 (10 μmol/L) 各 1 μl, 反转录产物 2 μl, *Taq* 酶 0.5 μl, 加 ddH₂O 至 50 μl。反应条件为: 94 ℃预变性 3 min; 94 ℃变性 30 s, 58 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 30 s, 25 个循环; 72 ℃延伸 6 min。PCR 产物利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用凝胶回收试剂盒(TaKaRa, Japan)回收纯化目标带,回收纯化过程参照试剂盒说明进行。

1.2.4 外壳蛋白 PCR 产物与 T 载体连接。将 BPMV CP 基因的 PCR 产物与含 T 末端的 pMD19-T simple 载体连接,连接体系包含(10 μl): pMD19-T simple (50 ng/μl) 1 μl, PCR 产物(30 ng/μl) 4 μl, T4 DNA 连接酶混合物(3 U/μl) 5 μl, 16 ℃下过夜连接,再转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中。

1.2.5 阳性质粒的筛选。提取质粒并用 *Bam*H I 酶切鉴定,将鉴定为阳性的质粒送上海生工生物技术有限公司测序。将所测序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 上进行比对,分析所得片段与已知病毒的外壳蛋白基因序列是否具有同源性。

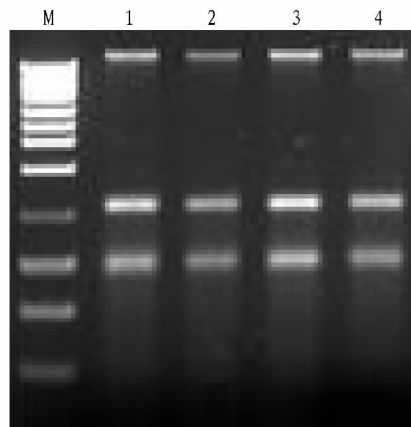
1.2.6 外壳蛋白的表达。重新设计带 6-His 标签的引物,以连有目的片段的阳性质粒为模板进行 PCR,重复上述试验,获得阳性重组质粒 BPMV-pMD19-T simple; 连接至原核表达载体 pET30a, 获得重组质粒 pET30a-BPMV CP, 然后转化大肠杆菌 BL-21 (DE3), 接种于 LB 液体培养基中, 37 ℃活化培养, 使细菌复苏并表达质粒编码的 Amp 抗性基因, 离心后, 将含大肠杆菌的细胞悬浮液涂于含有 X-gal 和 IPTG 的 LB/Amp 平板上, 37 ℃培养至可观察到菌落, 筛选出阳性转化子后, 利用 Ni-亲和柱进行重组蛋白的纯化, 并利用 SDS-PAGE 电泳进行检测。

2 结果与讨论

2.1 菜豆荚斑驳病毒外壳蛋白基因的克隆与序列分析 将提取的病毒总 RNA 用 1% 琼脂糖电泳检测(图 1), 发现 28S、18S 和 5S 3 条带都有出现, 其中 28S 和 18S 2 条带较亮, 且 28S 条带的亮度约为 18S 的 2 倍, 5S 条带较弱, 无其他杂带及蛋白出现, 表明提取的 RNA 质量较好。

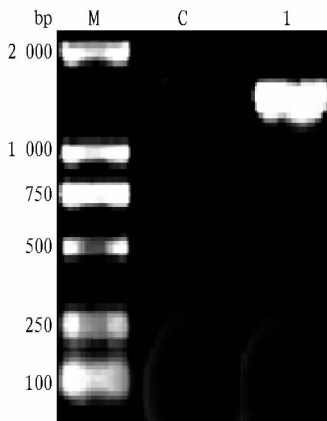
2.2 RT-PCR 产物回收、纯化及克隆 以总 RNA 作为模板, 用特异性引物 BF/BR 进行反转录 PCR 扩增, 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2, 可看出在 1 122 bp 处有明显条带。将 RT-PCR 产物进行凝胶纯化回收, 连接到

pMD-19T simple 质粒载体, 并克隆到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 经过增菌, 收集阳性克隆菌体, 接种至 LB 液体培养基中(含氨苄), 37 ℃培养过夜, 收集菌体, 提取质粒, 进行电泳检测, 阳性质粒经 PCR 验证后, 挑取阳性克隆送测序公司测序, 将测定的 BPMV 外壳蛋白序列在 NCBI 上进行比对 (GenBank 登陆号 AJ269536.1), 与目标病毒的相似度达 99% 以上, 说明该试验已成功克隆了 BPMV CP 基因, 序列长度为 1 122 bp。



注: M. DNA Marker; 1~4 均为提取出的总 RNA。

图 1 菜豆荚斑驳病毒 RNA 的提取



注: M. DL2000 DNA Marker; C. 空白对照; 1. BPMV 外壳蛋白基因。

图 2 BPMV 外壳蛋白基因的 RT-PCR

2.3 原核表达质粒的构建及鉴定 对上述重组质粒进行 *Bam*H I 酶切, 回收目的片段, 定向插入到同样酶切的 pET30a 表达载体中, 筛选得到重组质粒 pET30a-BPMV CP, 用 *Bam*H I 对重组质粒 pET30a-BPMV CP 进行酶切和 PCR 检验, 得到 1 122 bp 的片段(图 3), 说明 BPMV 的 CP 基因已成功转化到 T 载体上, 可进行诱导表达。

2.4 BPMV 外壳蛋白基因的原核表达 将经过酶切验证的阳性表达质粒转入受体菌 BL-21 中, 分别在 30 和 37 ℃培养条件下, 以终浓度 1.0、0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 电泳分析表明(图 4), 当在 37 ℃下培养 4 h, 加入诱导剂 1.0 mmol/L IPTG 时, 病毒外壳蛋白在 BL-21 中的表达量

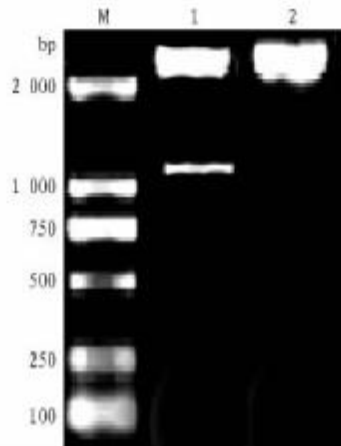
安徽农业科学,1993,21(3):262-264.

- [3] 刘炳林. 棉铃发育与温度研究综述[J]. 陕西气象,1993(4):14-16.
 [4] 徐立华,李大庆,刘兴民,等. 陆地棉棉铃发育机理及影响因素的研究[J]. 棉花学报,1994,6(4):253-255.
 [5] 罗初元. 棉铃发育与环境温度[J]. 江西棉花,1985(2):10-14.
 [6] 魏凤英. 华北农业干旱研究进展[M]. 北京:气象出版社,1997:1-10.

- [7] 吴昊,段沙丽,张玲芳,等. 棉花盲蝻象预报方法研究与应用[J]. 棉花学报,2010,22(1):57-62.
 [8] 魏凤英. 现代气候统计诊断预测技术[M]. 北京:气象出版社,1999:63-65.
 [9] 陈辉,施能,王永波,等. 长江中下游气候的长期变化及其基本态特征[J]. 气象科学,2001,21(1):44-52.

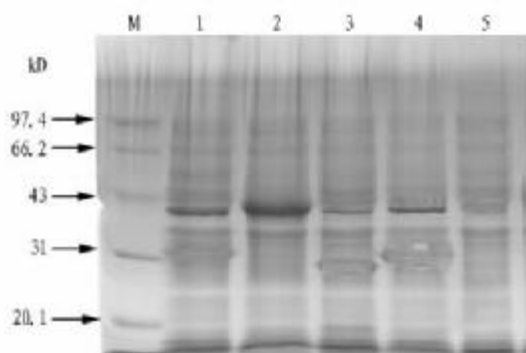
(上接第 1917 页)

最高。而未经 IPTG 诱导的大肠杆菌 BL-21 在此条件下无相应蛋白条带出现。



注: M. DL2000 Marker; 1. 重组质粒对照 pET28-BPMV CP; 2. 重组质粒的酶切产物。

图 3 重组质粒的酶切验证



注: M. 蛋白 Marker; 1. 37 °C、0.5 mmol/L IPTG 条件下的表达; 2. 37 °C、0.5 mmol/L IPTG; 3. 30 °C、0.5 mmol/L IPTG; 4. 30 °C、0.5 mmol/L IPTG; 5. 未经 IPTG 诱导的蛋白表达情况。

图 4 诱导温度和诱导剂浓度对 BPMV CP 表达的影响

3 讨论

该研究利用 RT-PCR 方法成功扩增出了 BPMV CP 基因, 序列测定结果表明, 该序列大小为 1 122 bp, 将测定的序列与 NCBI 上目标病毒的外壳蛋白序列进行比对, 相似度在 99% 以上, 说明该试验已成功克隆了菜豆荚斑病毒的外壳蛋白序列。

植物病毒表达蛋白的最常用方式是大肠杆菌表达体系, 它具有产量高、成本低、生产周期短、表达稳定不易变异的特点。pET30a 融合表达载体为 IPTG 诱导型, 是普遍使用的原核表达载体, 表达产物 N 端带有 6-His 尾巴的融合蛋白, 因此实际表达的蛋白比推导出的分子量大 7 kD 左右, 但便于利用 Ni-亲和柱进行重组蛋白的纯化^[9]。该研究利用该方法成功构建了 BPMV 原核表达载体, 并优化了体外诱导条件, 以 37 °C、1.0 mmol/L IPTG、4 h 条件下诱导可高效表达外壳蛋白, 只要进一步大量表达、纯化重组蛋白即可制备特异性抗血清, 并为准确、快速地利用强特异性抗血清检测 BPMV 奠定了基础。近年来, 许多病毒抗血清的制备采用原核表达的方法, 如李矮缩病毒^[10]、葡萄 A 病毒^[11]、樱桃病毒 A^[12]、苹果茎沟病毒^[13]、苹果褪绿叶斑病毒^[14]等。该技术与酶联免疫吸 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 方法相比, 具有周期短、成本低、制备的抗血清特异性强等优点。

参考文献

- [1] 洪健,李德葆,周雪平. 植物病毒分类图谱[M]. 北京:科学出版社, 2001.
 [2] GIESLER L J, GHABRIAL S A, HUNT T E, et al. Bean pod mottle virus a threat to US soybean production[J]. Plant Disease, 2002, 86: 1280-1289.
 [3] HOPKINS J D, MUELLER A J. Effect of bean pod mottle virus on soybean yield[J]. Journal of Economic Entomology, 1984, 77(4): 943-947.
 [4] KARTAATMADIA S, SEHGAL O P. Quantification of Bean Pod Mottle Virus in plant-tissue by Dot Immunobinding Assay[J]. Phytopathology, 1987, 77(12): 1765.
 [5] GU H C, CLARK A J, DE SA P H, et al. Diversity among isolates of Bean Pod mottle virus[J]. Phytopathology, 2002, 92(4): 446-452.
 [6] 魏梅生, 相宁, 张春泉, 等. 菜豆荚斑多病毒的 RT-PCR 检测[J]. 大豆科学, 2005, 24(4): 317-319.
 [7] 闻伟刚, 谭钟, 张吉红, 等. 应用 TaqMan MGB 探针技术检测菜豆荚斑病毒[J]. 植物保护学报, 2009, 36(1): 51-54.
 [8] 张明哲, 李可, 周宏斌, 等. 一种快速检测菜豆荚斑病毒的新方法[J]. 植物保护学报, 2012, 39(1): 91-92.
 [9] 张建新, 刘起丽, 吴云锋. 西瓜花叶病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2008, 36(4): 117-123.
 [10] 陈立伟, 宗晓娟, 王文文, 等. 李矮缩病毒外壳蛋白基因克隆及原核表达研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(12): 177-181.
 [11] 王建辉, 刘晓, 度德慧, 等. 葡萄 A 病毒四川分离物的外壳蛋白基因克隆与原核表达[J]. 园艺学报, 2008, 35(7): 967-972.
 [12] 郭颂, 张福兴, 怀晓, 等. 樱桃病毒 A 北京分离物外壳蛋白的原核表达及抗血清制备[J]. 植物病理学报, 2010, 40(6): 568-573.
 [13] 宋艳芬, 郑银英, 李丽娜, 等. 苹果茎沟病毒外壳蛋白基因的原核表达及抗血清的制备[J]. 果树学报, 2010, 27(5): 752-756.
 [14] 蔡瑜, 向本春, 度德慧, 等. 苹果褪绿叶斑病毒库尔勒分离物外壳蛋白基因的克隆、原核表达及特异性抗血清的制备[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(4): 533-537.