

水稻矮缩病毒外壳蛋白基因 S8 在昆虫细胞中的表达*

李 胜 刘慧君 陈章良 李 毅**

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘 要: 将水稻矮缩病毒(Rice Dwarf Virus, RDV)外壳蛋白基因 S8 克隆到杆状病毒转移载体 pVL1393 中, 重组转移载体 pVL1393-S8 与线性杆状病毒 RP23. LacZ 共转染草地夜蛾细胞 *sf9*, 经过细胞体内同源重组、PCR 筛选得到重组病毒 RP23-S8。重组病毒 RP23-S8 感染 *sf9* 细胞后, 收集细胞, 并进行 SDS-PAGE 及 Western-blot 检测。结果表明, S8 基因在昆虫细胞中成功表达, 且在感染后 96h 表达量最高。

关键词: RDV, 杆状病毒, 昆虫细胞表达, Western-blot

中图分类号: S432.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 02-0162-05

水稻矮缩病毒(RDV)是水稻普通矮缩病的病源, 主要流行于日本、朝鲜、东南亚及我国南方等水稻产区, 可造成被感染水稻严重减产。RDV S8 基因^[1]的表达产物 P8 是病毒的外层外壳蛋白^[2], 研究表明, P8 对 RDV 侵染植株的严重程度有决定性影响^[3]。Mao^[4]人对水稻矮缩病毒外壳蛋白的不均一性^[5]研究表明 P8 存在翻译后的切割现象, 并推测 P8 在真核体系内表达时可能存在磷酸化、糖基化、豆蔻化等翻译后修饰作用。本文以杆状病毒为载体、以昆虫细胞为宿主的真核表达系统成功地表达了 P8 蛋白, 为今后纯化 P8 蛋白, 进行真核蛋白修饰分析及结晶学研究, 确定其修饰作用和蛋白三维结构, 进一步阐明 RDV 外壳蛋白的三维构象及外壳蛋白的后切割与病毒进入和侵染细胞奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

限制性内切酶及其它工具酶购自 Promega 公司, TNM-FH 昆虫细胞培养基购自 Clontech 公司, 线性化杆状病毒 RP23. LacZ 购自 Pharmingen 公司, Lipofectin 转染试剂、胎牛血清购自 Gibco BRL, PCR 试剂购自华美公司, pGEM-S8^[1]、pVL1393 转移载体、S8 基因 PCR 引物、P8 抗体为本实验室提供, *sf9* 细胞、野生型病毒 AcNPV 由北京大学胡美浩教授赠送。

1.2 重组转移载体 pVL1393-S8 的构建

Hind III 酶切 pGEM-S8 质粒, 经 T4 DNA 聚合酶补平后, *Xba* I 酶切并回收 S8 片断, 与经 *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切的 pVL1393 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选得到重组转移载体 pVL1393-S8 阳性克隆。

* 本研究由国家“863”项目资助(863-103-02-05 及国家自然科学基金资助(39870027))

** 通讯作者

作者简介: 李 胜(1974-), 男, 四川仁寿人, 北京大学生化及分子生物学系 97 级硕士研究生。

收稿日期: 2000-06-13, 修回日期: 2000-08-02

1.3 共转染和重组病毒的纯化

共转染及重组病毒纯化的方法参照 Pharmingen 公司的说明书和《Baculovirus Expression Protocols》。用 PCR 方法鉴别重组病毒,方法参照《Baculovirus Expression Protocols》。

1.4 重组病毒在 sf9 细胞中的表达

按 MOI = 10pfu/cell 的计量感染培养的 sf9 细胞,用不含血清的 TNM-FH 培养基,27℃ 培养 1~6d,不同时间段收集细胞并检测 P8 表达的情况。

1.5 Western-blot 分析

1.5.1 样品制备:将收集的 sf9 细胞经 PBS 缓冲液悬浮,加入等体积 2×磷酸盐缓冲液和 1/10 体积的巯基乙醇,沸水煮沸 10min,自然冷却后离心收集上清,PBS 缓冲液悬浮和 2×上样缓冲液的配制参照《分子克隆手册》。

1.5.2 SDS-PAGE 电泳:分离胶为 10%,浓缩胶为 5%,上样后恒压电泳为 70V,待样品进入分离胶后用 120V,其中 sf9 细胞样品的上样量为 8μL,其他样品上样量为 4μL。

1.5.3 Western blot 分析:SDS-PAGE 电泳后,将胶转移到硝酸纤维素膜上,经 1% BSA 封闭过夜后,将 P8 抗体以 1:500 稀释加入,平缓摇动 4h,PBS 洗三次后加入第二抗体(碱性磷酸化酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体),室温平缓摇动 2h,PBS 洗三次后,加底物显色。

2 实验结果

2.1 重组转移载体 pVL1393-S8 的构建及鉴定

将 RDV S8 基因克隆在 pVL1393 载体中,使之处于多角体蛋白启动子(polh)控制之下,筛选得到 S8 基因编码方向与多角体蛋白启动子方向一致的重组转移载体 pVL1393-S8(图 1),经 EcoR I 酶切、1% 琼脂糖电泳结果显示 pVL1393-S8 出现大小为 800bp、与 pGEM-S8 相对应的条带,证明 S8 基因已成功克隆到 pVL1393 载体中(图 2)。

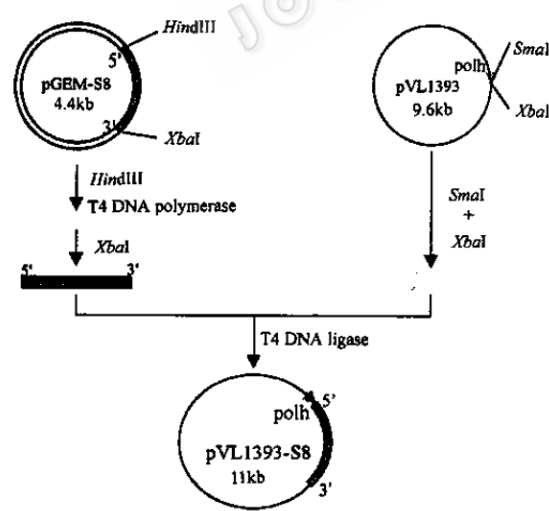


图 1 重组转移载体 pVL1393-S8 的构建

Fig.1 Construction of recombinant transfer vector pVL1393-S

■:S8 gene encoding sequence;
→:Polyhedrin gene promoter.

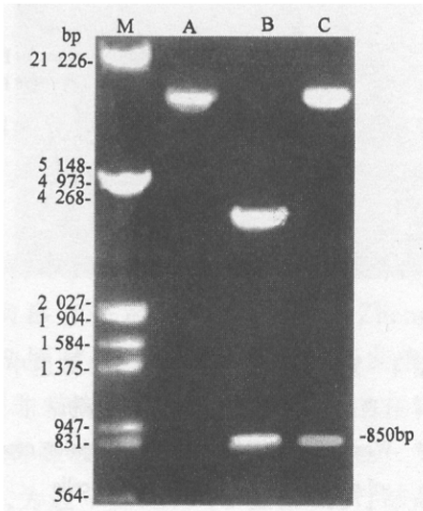


图 2 重组转移载体 pVL1393-S8 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction endonuclease digestion of recombinant transfer vector pVL1393-S8

M:λDNA/EcoRI + Hind III marker; A:pVL1393/EcoRI;
B:pGEM-S8/EcoRI;C:pVL1393-S8/EcoRI.

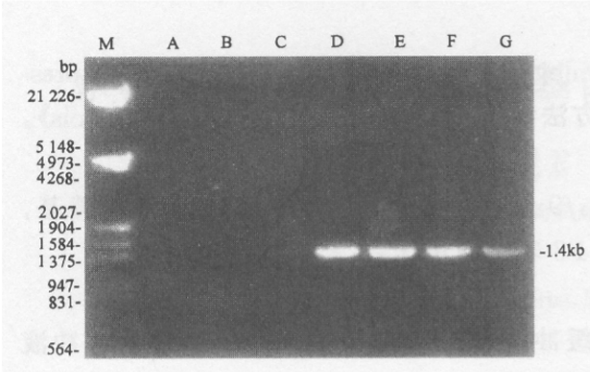


图 3 重组病毒 DNA 的 PCR 分析

Fig.3 PCR analysis of recombinant viral genomic DNA
M:λDNA/*Eco*R I + *Hind* III marker; A~C:Negative control;
D:Positive control; E、F、G:Recombinant virus RP23-S8.

分别收集感染 RP23-S8、AcNPV 和未感染病毒的 *sf*9 细胞,经 10% SDS-PAGE 后,用 P8 抗血清以 1:500 稀释作第一抗体,碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 作第二抗体,进行 Western blot 分析。结果证实,S8 基因成功表达(图 4)。

2.4 RP23-S8 在 *sf*9 细胞中不同时间段的表达量检测

收集 RP23-S8 感染 *sf*9 细胞后不同时间的细胞,经 10% SDS-PAGE 后,Western-blot 检测。结果显示,病毒感染 *sf*9 细胞后 96h 表达量最高(图 5)。

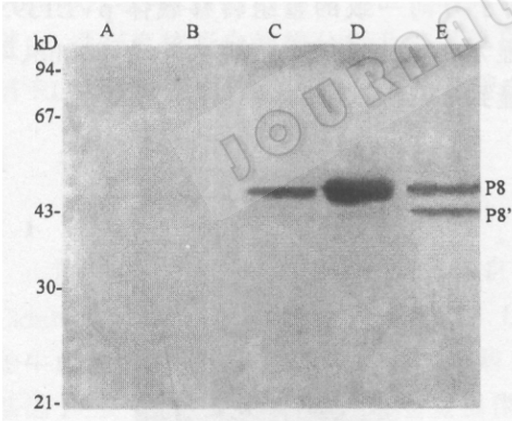


图 4 重组病毒 RP23-S8 在 *sf*9 细胞中表达产物的 Western blot 分析

Fig.4 Western-blot analysis of the expression product of recombinant RP23-S8 in *sf*9 cells

A: *sf*9 cells not infected by virus; B: *sf*9 cells infected by AcNPV; C: Purified RDV virus; D: *sf*9 cells infected by RP23-S8; E: *E. coli* expression products of pBVP8.

2.2 重组病毒 RP23-S8 的纯化

将 pVL1393-S8 和 RP23. LacZ 经 Lipofectin 介导共转染状态良好的 *sf*9 细胞,经 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 有限稀释感染 *sf*9 细胞、PCR 检测筛选 3 轮后得到重组病毒 RP23-S8。分别收集感染 RP23-S8、AcNPV 和未感染病毒的 *sf*9 细胞,提取细胞总 DNA,经 *Xba* I 酶切后 PCR 分析,1% 琼脂糖凝胶电泳,结果证实 RP23-S8 中含有与 pVL1393-S8 一样大小、约 1.4kb 的 S8 基因片断(图 3)。

2.3 重组病毒 RP23-S8 表达产物的 Western-blot 分析

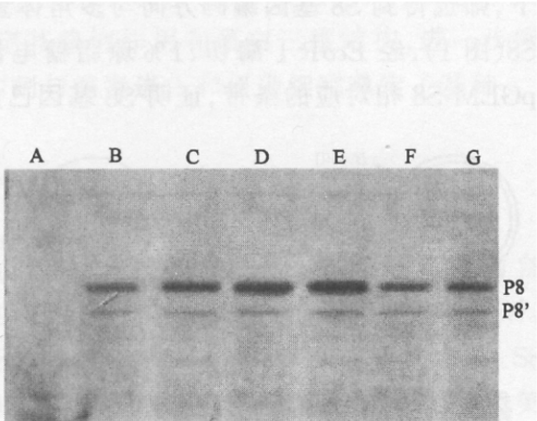


图 5 RP23-S8 在 *sf*9 细胞中不同时间段表达产物的 Western blot 分析

Fig.5 Western-blot analysis of the expression product of recombinant RP23-S8 in different time of PI

A: *sf*9 cells;
B~G: The time of *sf*9 cells infected by RP23-S8 was 1, 2, 3, 4, 5 and 6 d, respectively.

3 讨论

由于以杆状病毒为载体、昆虫细胞为宿主的真核表达系统较原核表达系统有其诸多优点^[6],比如蛋白表达可溶性好;具备真核生物蛋白质翻译后修饰所必需的酶系统,能有效地进行蛋白质翻译后的各种加工(如转运、分泌、糖基化、磷酸化、脂酰化等);所表达蛋白的抗原性、酶活性等生物学功能与天然蛋白极为相似等等,已越来越为人们所重视。而以 *E. coli* 细胞为表达体系的原核表达系统所表达的产物则多以包含体形式存在,需经过体外变复性处理后才能得到具有生物活性的产物^[7],产物活性一般比天然蛋白低,且没有进行任何修饰^[8~10]。

RDV 是水稻矮缩病的病源,可造成被感染水稻的严重减产。其 S8 基因的表达产物 P8 是病毒颗粒的外层外壳蛋白,对 RDV 侵染植株的严重程度有决定性影响。本实验室的 Mao Z J 等人^[4]对 RDV P8 的不均一性研究结果表明 P8 存在翻译后的切割现象,并证明 RDV 的 P8' 的 P8 的切割产物的 N 端,其切割位点为 Asp³⁶² - Pro³⁶³,分析结果表明其切割位点处于两个强疏水性氨基酸之间,并处于 β -turn 之中,与哺乳动物呼肠孤病毒 Type3(ReoSeo3)的外壳蛋白 $\mu 1$ 的切割位点极为相似^[11],推测 P8 可能与 ReoSeo3 或其他一些非囊膜病毒那样,与细胞膜有融合作用,进而促进病毒进入细胞,提高病毒的感染力。本文在 sf9 细胞中表达 S8 基因的产物,经 Western-blot 分析显示出一条主带和四条副带,与 Mao Z J 等^[4]的结果吻合。

P8 经氨基酸序列分析,发现存在 2 个糖基化位点(aa121~124;NLSL;aa301~304;NRSQ),10 个磷酸化位点(aa32~35;TTGD;aa73~76;TSTD;aa75~77:TDR;aa94~97:TVSD;aa115~117;TVR;aa127~129:SAK;aa141~147:KGLDIPY;aa243~246:TAAD;aa317~320:TSID;aa379~381:SER)和 7 个豆蔻酰化位点(aa30~35;GLTTGD;aa162~167;GQTGNI;aa194~199:GIRSNA;aa232~237:GTIIAG;aa274~279;GGNINL;aa282~287;GVAKTG;aa368~373;GLAFTS)。

我们推测 P8 在真核体系内表达时可能存在磷酸化、糖基化、豆蔻酰化等翻译后修饰作用。S8 基因在杆状病毒表达系统内的成功表达,将为研究 P8 翻译后的加工和修饰作用提供良好的条件。

P8 对 RDV 侵染植株的严重程度有决定性影响,本实验室的 Zheng H H 等人^[12]已将 RDV S8 基因转入水稻,并表明这种水稻植株对病毒有一定的抗性。此外,Zheng H H 等^[13]将 RDV 外壳蛋白 S8 蛋白和主要核心蛋白 S8 同时导入水稻组织中进行共表达,结果发现在转基因水稻中 S8 和 S3 均得到了表达,而非常有意思的是这两个蛋白在转基因水稻中可以组装成类似于 RDV 粒子双层结构的病毒粒子(virus like particles - VLP)。RDV 外壳蛋白在杆状病毒表达系统内的成功表达,为进一步纯化 P8 蛋白、进行结晶学研究确定其三维结构以及为研究 RDV 的组装奠定了基础,可能将对阐明 RDV 感染机制,及研究 P8 与病毒侵染机制的关系提供很有价值的信息。

致谢 蔡国林、俞立、汪敏参加部分工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 李 玮, 李 毅, 陈章良, 等. 病毒学报, 1995, 2: 109~115.
- [2] Omura T, Ishikawa K, Hirano H, *et al.* *J Gen Virol*, 1989, 70: 2759~2764.
- [3] Omura T, Takahashi Y, Tomiyama M, *et al.* *Ann Phytopath Soc Japan*, 1993, 59: 438~140.
- [4] Mao Z J, Li Y, Chen Z L, *et al.* *Arch Virol*, 1998, 143: 1831~1838.
- [5] Suzuki N, Sugawara M. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2239~2342.
- [6] 朱玉贤、李 毅. 现代分子生物学. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [7] Xu H, Li Y, Mao Z J, *et al.* *Virology*, 1998, 240: 267~272.
- [8] Zhang F J, Li Y, Lin Y F, *et al.* *Acta Virologica*, 1997, 41(3): 161~168.
- [9] 李 毅、徐 洪、程明非, 等. 北京大学学报(自然科学版), 1998, 34(2~3): 332~341.
- [10] 曲 林, 李 毅, 陈章良, 等. 微生物学报, 1996, 36(5): 335~343.
- [11] Jayaswriya A, Nibert M, Fields B. *Virology*, 1988, 163: 591~602.
- [12] Zheng H H, Li Y, Yu Z H, *et al.* *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 522~527.
- [13] Zheng H H, Yu L, Wei C H, *et al.* *J Virology*, 2000, 74(20): 9808~9810.

EXPRESSION OF RICE DWARF VIRUS OUTER COAT PROTEIN GENE(S8) IN INSECT CELLS*

Li Sheng Liu Huijun Chen Zhangliang Li Yi**

(Department of Biotechnology, College of Life Science, Beijing Univ., Beijing, 100871, China)

Abstract: Outer coat protein gene(S8) of RDV was cloned into the transfer vector pVL 1393 to construct a recombinant vector pVL1393-S8. The recombinant vector pVL1393-S8 and the linear baculovirus RP23. LacZ were cotransfected into *sf9* cells to produce the recombinant virus RP23-S8. RP23-S8 infected *sf9* cells were collected and analysed by SDS-PAGE and Western-blot. The results showed that the S8 gene of RDV was expressed in *sf9* cells and the expression level of *sf9* cells was higher between 72~96h after infected.

Key words: Rice Dwarf Virus, Baculovirus, Expression in insect cells, Western-blot

* Project of Chinese National Programs for high Technology Research and development(863-103-13-02-05), Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39870027)

** Corresponding author