

烟草花叶病毒运动蛋白 cDNA 的克隆及融合蛋白的表达

李艳利^{1,2} 马中良² 林 杰² 田 波² 杨怀义^{2*}

(¹ 南京医科大学分子生物学系 南京 210029)

(² 中国科学院微生物研究所分子病毒室 北京 100080)

摘 要 从烟草花叶病毒(TMV)中提取总 RNA,通过反转录-PCR(RT-PCR)扩增得到其运动蛋白(MP)的基因,将扩增产物克隆到 pMD-18T 载体上。DNA 序列分析表明,所得到的运动蛋白的基因全长为 807bp (GenBank 接受号 AY300161),与已发表 TMV 序列(GenBank 登陆号为 NC_001367)和同属的番茄花叶病毒(ToMV, GenBank 登陆号为 NC_002692)相比核苷酸的同源性分别为 98.0% 和 80.9%,氨基酸的同源性分别为 99.1% 和 80.0%。将目的片段亚克隆到表达载体 pET-30a 上,并在大肠杆菌 JM109 中诱导表达,诱导 9h 后,融合蛋白表达量最大。诱导后的工程菌超声后经 SDS-PAGE 检测,融合蛋白以可溶形式存在。

关键词 烟草花叶病毒 运动蛋白 cDNA, 融合蛋白表达

中图分类号:Q789 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)02-0182-03

烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)属于烟草花叶病毒属。除 TMV 外,烟草花叶病毒属主要还有番茄花叶病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)、烟草轻绿花叶病毒、芜菁脉明病毒等成员。该属基因组编码 4 个蛋白,大小分别为 126kD、183kD、30kD 和 17.5kD。其中 126kD 和 183kD 蛋白参与病毒的复制,称为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRP);183kD 的蛋白是 126kD 蛋白的阅读框终止子通读的产物;30kD 蛋白参与病毒在寄主细胞间的移动,称为运动蛋白(Movement protein, MP);17.5kD 的蛋白为病毒的外壳蛋白(Capsid protein, CP)。

TMV 的 MP 主要功能是介导 TMV 在临近细胞间的运动(Cell-to-cell movement)^[1],研究表明 MP 定位于胞间联丝(Plasmodesma)^[2]。据推测 MP 可能与细胞骨架的某些因子形成一种核孔复合物,有利于转运 TMV 基因组通过植株的维管系统,侵染整个植株^[3,4]。目前,对于病毒的运动蛋白的高级结构与其功能的关系研究的比较少,本文首先克隆表达了 TMV 的 MP,为后续工作奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 生物材料、酶和试剂

病毒为 TMV U1 株由微生物所邱并生教授惠

赠。ExTaq PCR 试剂盒、反转录试剂盒、限制性内切酶均购自 TaKaRa(大连宝生物工程)公司。其他均为分析纯生化试剂。

1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 JM109, pMD-18T 载体为 TaKaRa(大连)公司产品, pET30a 为 Amersham 产品。

1.3 PCR 引物合成

引物由 TaKaRa(大连)公司合成。上游引物 P1 和下游引物 P2 分别引入 *Eco*R I 和 *Xho* I, 以便正确克隆到表达载体上。

P1 5'-GCCAATCCATGGCTCTAGTTGTTAAAG-3';

P2 5'-CCCTCGAGTTAAAACGAATCCGATTTCG-3'。

1.4 RNA 的提取和 RT-PCR 反应

TMV 总 RNA 的提取按文献[5]进行。RT-PCR 按 TaKaRa(大连)公司反转录试剂盒说明书进行,用 Random 9mer 作为引物。反转录结束后,反应液中加入引物 P1、P2,引物的终浓度为 100pmol, *Taq* 酶 1uL (5U/uL), PCR 条件为:94℃ 5min; 94℃ 50s, 56℃ 50s, 72℃ 55s, 30 个循环, 72℃ 10min。然后用 1% 的琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳,检测扩增结果。

1.5 大肠杆菌表达载体的构建

PCR 扩增产物回收后,用连接试剂 Solution I (TaKaRa)连接到 pMD-18T 载体上。然后转化大肠杆菌 JM109,在含有 100mg/L Ampicilin、40mg/L X-gal

基金项目:国家 973 项目(G2000016205);江苏省博士后基金

* 通讯作者。E-mail: yanghy@sun.im.ac.cn

作者简介:李艳利(1971-),女,河南新乡人,讲师,主要从事病毒与疾病的研究。E-mail: liyl@njmu.edu.cn

收稿日期:2003-06-06,修回日期:2003-09-20

和 10mg/L IPTG 的 LB 平板选择培养后,挑取白色菌落,并提取质粒鉴定。用 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切阳性质粒,回收小片段,连接到同样双酶切的 pET-30a 上,并转化大肠杆菌 JM109,得到的重组质粒命名为 pET-30a-mp。

1.6 DNA 序列分析

由 TaKaRa(大连)公司测定重组克隆的全序列,用 DNASIS 和 PROSIS 软件(Hitachi Software Engineering Co., Ltd)进行序列分析。

1.7 融合蛋白表达的检测

将含有质粒 pET-30a-mp 的工程菌按文献 6 的方法处理,略做改动。具体方法简述如下:当 JM109(pET-30a-mp)培养至 OD_{600} 为 0.3 时,加入终浓度为 0.1mmol/L 的 IPTG 诱导表达。诱导一定时间后,收集菌体,用原培养液 1/10 V 的灭菌去离子水[含 2mmol/L PMSF, 1/10 V 的 TE (10mmol/L Tris·Cl, pH8.0), EDTA 1mmol/L]重新悬浮,并在冰浴条件下超声后,12000r/min 离心 10 min 后,沉淀用同样体积的上述水溶解。分别取等量的上清和沉淀溶解液进行 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE 参照文献 7 进行。

2 实验结果

2.1 目的片段的 PCR 扩增

根据 Morozov 等^[8]报道的基因序列设计引物,考虑到 MP 能在表达载体上有正确的读码框,分别在 5'端和 3'端引入 *Eco* R I 和 *Xho* I 位点。以 TMV 的总 RNA 为模板,使用 Random 9mer 为引物合成 cDNA 第一链,经 PCR 扩增得到特异性片段,琼脂糖电泳检测扩增片段长度为 807bp,与理论推测值一致。

2.2 大肠杆菌表达载体的构建和分析

将 PCR 扩增得到的特异性片段与 pMD-18T 载体连接后,对得到的白色菌落进行鉴定。用 *Eco* R I 和 *Xho* I 酶切得到目的片段约 800bp。通过序列分析可知 5'端 200bp 有一 *Hind* III 位点, pMD-18T 载体的 *Hind* III 在基因的 3'下游,因此用 *Hind* III 酶切得到约 600bp 的片段。说明克隆得到的基因是所要的 MP 基因。用 *Eco* R I 和 *Xho* I 酶切表达载体 pET-30a-mp 得到 800bp 的目的片段,说明目的片段已克隆到表达载体上。

2.3 DNA 序列分析

将所克隆到的序列进行序列测定,该基因全长为 807bp,与已发表的 TMV 序列(GenBank: NC_001367)比较,核苷酸的同源性为 98.5%,氨基酸的同源性为 99.1%。与同属的番茄花叶病毒

(ToMV, GenBank: NC_002692)相比核苷酸的同源性达 80.9%,氨基酸的同源性达 80.0%。本文所克隆并发表的 TMV 氨基酸序列(209~217)为 KFRSRTGKK,而 ToMV 的相同位置为 KFRTKSSKR,二者碱性氨基酸比例很高,并且序列基本保守,可能是核定位信号。

2.4 融合蛋白 SDS-PAGE 检测结果和分析

从 SDS-PAGE 的结果可见经 IPTG 诱导后,大肠杆菌 JM109(pET-30a-mp)培养 0.5h 时即有表达,当诱导 9h 时,融合蛋白的表达量最大(图 1 中 1 和 7 泳道)。并且融合蛋白主要以可溶状态存在上清中,而在超声后的沉淀中极少(图 1 中 8 和 9 泳道)。



图 1 MP 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.1 SDS-PAGE analysis of expression of MP in *E. coli*

M. Low molecular weight marker 1~7. Different induced time for MP expression: 1. Before induce; 2. 0.5h after induce; 3. 1 h; 4. 3h; 5. 5.5h; 6. 7h; 7. 9h. 8. Supernatant after sonication. 9. Pellet after sonication.

3 讨论

我们在大肠杆菌中表达的 MP 融合蛋白以可溶形式存在,这与 Brill 等^[6]的结果不同,他们得到的融合蛋白以包含体的形式存在。融合蛋白以可溶形式表达,为纯化奠定了基础。高表达量的蛋白为以后研究其高级结构,结构与功能的关系创造了条件。同时我们还克隆表达了同属黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)的运动蛋白,也以可溶形式表达(结果另文发表)。

TMV 的运动蛋白与 TMV 在植株体内扩散密切相关^[9],且 MP 的功能是高度保守的, Wu 和 Zhou^[10]的研究表明 ToMV 的 MP 可以替代 TMV 的 MP。序列分析表明它有类似黄瓜花叶病毒(CMV)的运动蛋白 2b 有核定位信号^[11]。2b 是基因沉默的抑制因子^[12],另外,马铃薯 X 病毒(*Potyvirus*, PVX)运动蛋白也是病毒编码的抑制因子^[13]。现在已经知道,CMV 的 2b 蛋白不仅具有抑制植物自我保护的基因

沉默作用,进而侵染植物,而且对于病毒本身在植株体内的长距离运输(Long distance transportation)也是必不可少的^[14],所以 CMV 的寄主极广。

TMV 的 MP 蛋白无论在基因的保守区和功能都与 CMV 的 2b 蛋白有相似性, TMV 的 MP 是否具有抑制转录后基因沉默的功能,目前正在研究中。

参 考 文 献

[1] Carrington J C , Kassachau K D , Mahajan S K , *et al.* Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* ,1996 **8** : 1669 – 1681.

[2] Ding B , Haudenschild J S , Hull R J , *et al.* Secondary plasmodemata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* ,1992 **4** : 915 – 928.

[3] McLean B G , Zupan J , Zambryski P. Tobacco mosaic virus movement protein associates with cytoskeleton in tobacco cell. *Plant Cell* , 1995 **7** 2101 – 2114.

[4] Ghoshroy S , Lartery R , Sheng J , *et al.* Transport of proteins and nucleic acids through plasodesmata. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* ,1998 ,**48** 591 – 602.

[5] 叶 寅 ,赵 丰 ,高 炬 ,等.水稻矮缩病毒小外壳蛋白基因的合成、克隆和序列分析. *中国病毒学* ,1991 **6** : 381 – 383.

[6] Brill L M , Nunn R S , Kahn T W , *et al.* Recombiant tobacco mosaic

virus movement protein is an RNA-binding , α -helical membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ,**97** : 7112 – 7117.

[7] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular cloning. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989.

[8] Morozov S Y , Denisenko O N , Zelenina D A , *et al.* A novel open reading frame in tobacco mosaic virus genome coding for a putative small , positively charged protein. *Biochimie* ,1993 ,**75** 659 – 665.

[9] Bendahane M , Szecsi J , Chen L , *et al.* Characterization of mutant tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell to cell movement. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2002 **99** 3645 – 3650.

[10] Wu J J , Zhou X P. Effect of replacing the movement protein gene of *Tobacco mosaic virus* by that of tomato mosaic virus. *Virus Res* , 2002 ,**87** 61 – 67.

[11] Lucy A P , Guo H S , Li W X , *et al.* Supression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J* 2000 ,**19** :1772 – 1680.

[12] Brigneti G , Voinnet O , Li W X , *et al.* Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana* . *EMBO J* ,1998 **17** 6739 – 6746.

[13] Voinnet O , Lederer C , Baulcombe D C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana* . *Cell* ,2000 ,**103** :157 – 167.

[14] Ding S W , Li W S , Symons R H. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J* ,1995 **14** 5762 – 5772.

Cloning of Movement Protein cDNA of Tobacco Mosaic Virus
and Its Expression in *Escherichia coli*

LI Yan-Li^{1 2} MA Zhong-Liang² LIN Jie² TIEN Po² YANG Huai-Yi^{2*}

(¹ Department of Molecular Biology , Nanjing Medical University , Nanjing 210029 , China)

(² Department of Molecular Virology and Bioengineering , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : The movement protein gene was obtained by RT-PCR from the total RNA of *tobacco mosaic virus* and cloned to pMD-18T vector. Its length was 807 bp , compared with TMV and ToMV in GenBank , the identities of neucleotides and amino acids were 98.5% , 80.9% and 99.1% 80.0% respectively. The target fragment was subcloned to pET-30a , an expression vector. The fusion protein was expressed in the stain JM109 of *Escherichia coli* . The highest amount of expression time of the fusion protein which was solvent after sonication , was 9h after inducing.

Key words : *Tobacco mosaic virus* , Movement protein , cDNA , Fusion protein expression