

烟草曲茎病毒复制蛋白基因的原核表达和免疫定位

崔晓峰 李云琴 李桂新 周雪平*

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

摘 要 利用 PCR 方法从烟草曲茎病毒(TbCSV)Y35 分离物的病株中获得复制蛋白(Rep)基因,将其克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1 上获得重组质粒 pGEX-Y35Rep。重组质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3) pLys S 中, IPTG 诱导表达后发现部分 Rep 融合蛋白以可溶性形式表达。利用 GST-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化了 Rep 的融合蛋白,免疫家兔获得 Rep 蛋白的抗体。对 TbCSV 侵染烟草中 Rep 蛋白的亚细胞分布研究发现, Rep 蛋白主要分布于含有细胞核的组份中。利用免疫胶体金技术对感病烟草中 Rep 蛋白进行了定位,发现 Rep 蛋白存在于细胞核内。

关键词 烟草曲茎病毒,复制蛋白,表达,定位

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)06-0745-04

双生病毒是世界范围内广泛发生的一类具有孪生颗粒形态的植物单链 DNA 病毒^[1]。近年来,这类病毒特别是烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播的菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)病毒已在多个国家和地区的作物上造成严重危害^[2]。大多 *Begomovirus* 属病毒包含 DNA-A 和 DNA-B 2 个组份。一些 *Begomovirus* 属病毒,如胜红蓟黄脉病毒(*Ageratum yellow vein virus*, AYVV)、木尔坦棉花曲叶病毒(*Cotton leaf curl Multan virus*, CLCuMV)、秋葵黄脉花叶病毒(*Bhendi yellow vein mosaic virus*, BYVMV)和中国番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl China virus*, TYLCCNV)为单组份病毒(即仅有 DNA-A),通常 DNA-A 单独就能系统侵染,但需要一类新型的卫星 DNA 分子(称为 DNA β)共同侵染才能引起典型症状^[3-6]。DNA β 大小约为 DNA-A 的一半,除茎环结构中保守的 9 碱基序列外,与双生病毒基因组 DNA-A 和 DNA-B 无同源性。DNA β 包裹在病毒粒子中,能被介体烟粉虱传播,并依赖 DNA-A 进行复制^[3]。

烟草曲茎病毒(*Tobacco curly shoot virus*, TbCSV)是本实验室分离的伴随有卫星 DNA β 分子的双生病毒新种^[6,7]。DNA-A 和 DNA β 的侵染性克隆接种后发现, DNA β 能加重 TbCSV 引起的症状(待发表)。为了探索 DNA-A 和 DNA β 的复制机制,我们在大肠杆菌中表达了 TbCSV 复制蛋白(Rep)基因,利用表达蛋白制备了抗体,并将 Rep 蛋白定位于细胞核内。

1 材料和方法

1.1 毒源

TbCSV Y35 分离物采自云南保山地区田间发病的烟草,病株表现植株矮化、茎秆顶部扭曲等症状。

1.2 菌株、质粒和试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存, pGEX-4T-1、GST-Sepharose 4B 亲和层析柱和 GST 多克隆抗体购自 Amersham Pharmacia 公司, pGEM-Teasy Vector 购自 Promega 公司,表达受体菌 BL21(DE3) pLysS 购自 Qiagen 公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等工具酶为 Promega 公司产品。

1.3 TbCSV Rep 基因克隆和原核表达载体构建

根据已测定的 TbCSV Y35 分离物 DNA-A 序列(AJ420318)设计特异性引物 Y35Rep-F(ACGGATC-CATGCCTCAGCCAAGAAAAC, 划线部分为 *Bam*H I 位点)和 Y35Rep-R(CCCTGACTCAACACGACGACTCTG, 划线部分为 *Sal*I 位点),从病株中提取的总 DNA 为模板用 PCR 扩增 Rep 基因。PCR 产物克隆于 pGEM-Teasy Vector 上。用 *Bam*H I 和 *Sal*I 将 Rep 基因从克隆载体上切下并与同样酶切开的 pGEX-4T-1 表达载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 和酶切筛选阳性克隆,并通过序列测定确定 Rep 基因的读码框正确与否。

1.4 融合蛋白的诱导表达、纯化和抗体制备

含 Rep 基因的重组质粒和 pGEX-4T-1 空载体分别导入 BL21(DE3) pLysS 中,挑取单菌落于 37 $^{\circ}$ C 培养

基金项目: 国家自然科学基金(30370058)、国家杰出青年基金(30125032)

* 通讯作者。Tel: 86-571-86971680 Fax: 86-571-86971498 E-mail: zzhou@zju.edu.cn

作者简介: 崔晓峰(1977-)男,陕西人,博士,从事植物病毒学研究。E-mail: cuixiaofeng2002@yahoo.com

收稿日期: 2004-02-23, 修回日期: 2004-04-20

至 OD_{600} 约为 0.6 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4h 以上,并以空载体和未加 IPTG 的培养物为对照;菌体离心后加入 $1 \times$ SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水中处理 5~10min,12000r/min 离心后取 $10\mu\text{L}$ 上清进行 SDS-PAGE 并利用 GST 多抗进行 Western 印迹分析;为了检测蛋白表达的部位,诱导表达的菌体在 PBS 中重悬浮,加入终浓度 1% 的 Triton X-100 和 $100\mu\text{mol/L}$ 的溶菌酶冰浴处理 20min,超声波破菌后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。

含重组质粒的菌株经大量培养、IPTG 诱导表达后超声波破菌,上清液上 GST-Sepharose 4B 亲和层析柱,并按说明书进行蛋白纯化,纯化的蛋白用 SDS-PAGE 检测纯度,以纯化的 Rep 融合蛋白分 4 次皮下注射免疫家兔,每次 0.5mg,在第 4 次免疫后 7d 采血,通过 Western 印迹分析鉴定抗体的特异性。

1.5 TbCSV Rep 蛋白的亚细胞分布

参照文献 [8,9] 的方法,略有改动。约 2g 病叶于液氮中研磨至粉末,按 2mL/g 的比例加入提取缓冲液匀浆,1000r/min 离心 10min 后产生上清(S1)和沉淀(P1),上清 S1 经 30000r/min 超速离心 20min 后产生上清 S30 和沉淀 P30, S30 用 2 倍体积的丙酮浓缩后溶于 0.5mL ESB 缓冲液(75 mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 1.5 mol/L 尿素, 7.5% 巯基乙醇, 4.5% SDS)中,同量的 S1、P1、S30 和 P30 样品中加入 $6 \times$ SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水中煮沸 5~10min 后进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析。

1.6 TbCSV Rep 蛋白的免疫胶体金标记定位

取呈典型症状的本氏烟(*Nicotiana benthamiana*) 叶片,切成 $1\text{mm} \times 3\text{mm}$ 的小片,用 2.5% 戊二醛 -

2% 多聚甲醛混合液 4℃ 固定 2h 后,用系列乙醇脱水,Lowicryls K4M (Polysciences Inc 产品)树脂低温包埋,Reichert-Jung ULTRACUT E 型超薄切片机切片,超薄切片先与 1:50 至 1:200 倍稀释的 Rep 蛋白抗体反应,后用 1:150 倍稀释的胶体金标记的羊抗兔抗体进行标记,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后在 JEM-1200EX 型透射电镜下观察、拍照。

2 结果和分析

2.1 TbCSV Rep 基因在大肠杆菌中的表达和抗体的制备

利用 PCR 方法从感病植株中扩增得到 TbCSV Rep 基因,将其克隆到 pGEM-Teasy Vector 上,获得重组克隆 pGEMT-Y35Rep;用 BamHI 和 SalI 将 Rep 基因从 pGEMT-Y35Rep 上切下并与 pGEX-4T-1 载体连接,获得重组质粒 pGEX-Y35Rep,序列测定表明 TbCSV Rep 基因已按正确的读码框插入到 pGEX-4T-1 载体上,未产生突变。pGEX-Y35Rep 导入大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS, IPTG 诱导表达后 SDS-PAGE 发现:与空载体和未诱导对照相比, IPTG 诱导表达后含 pGEX-Y35Rep 的样品在分子量约为 66 kD 处多出一条带(图 1),其大小与预期的 GST-Rep 融合蛋白分子量相当,利用 GST 多抗进行 Western 印迹分析,发现 66 kD 的蛋白能与 GST 抗体起特异反应。表明 TbCSV Rep 基因已在大肠杆菌中得到了融合表达。超声波破菌后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测,结果发现 66kD 的特异性条带在上清和沉淀中均存在,这表明用 pGEX-4T-1 表达的 Rep 融合蛋白部分以可溶性形式出现,部分形成包涵体。

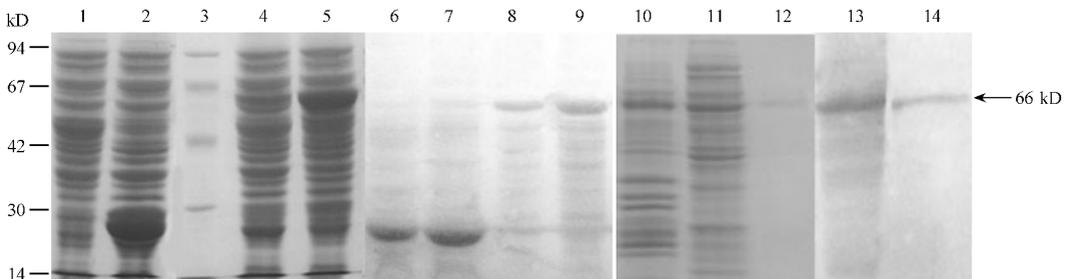


图 1 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析 TbCSV Rep 基因在大肠杆菌 BL21(DE3) pLys S 中的表达

Fig. 1 SDS-PAGE and Western blot analysis of TbCSV Rep gene expression in *Escherichia coli* BL21(DE3) pLys S
1, 2. Expressed from pGEX-4T-1 without and with induction by IPTG, respectively; 3. Protein molecular weight marker; 4, 5. Expressed from pGEX-Y35Rep without and with induction by IPTG, respectively; 6~9, Western blot analysis of protein expressed from pGEX-4T-1 (6, 7) and pGEX-Y35Rep (8, 9) without or with induction by IPTG using polyclonal antibody against GST, respectively; 10, 11. The sonicated supernatant and pellet of expressed protein extracts from pGEX-Y35Rep, respectively; 12. The purified GST-Y35Rep fusion protein; 13, 14. Western blot analysis of expressed soluble proteins from pGEX-Y35Rep and purified GST-Y35Rep using polyclonal antibody against GST-Y35Rep, respectively. The arrow indicates the position of GST-Y35Rep fusion protein.

用 GST-Sepharose 4B 亲和层析柱对表达的 Rep 融合蛋白进行纯化, SDS-PAGE 表明纯化的蛋白为单一条带, 大小约为 66kD, Western 印迹分析表明其能与 GST 抗体起特异性反应。以纯化的蛋白免疫家兔制备多抗, 多抗琼脂双扩散效价为 1:64。用所制备的抗体进行 Western 印迹分析, 结果发现无论表达菌总蛋白还是纯化的 Rep 融合蛋白在约 66kD 处均出现特异的条带(图 1), 表明所制备的抗体能特异检测表达的 Rep 融合蛋白。

2.2 TbCSV Rep 蛋白的亚细胞分布

利用不同的离心力对病叶和健康叶细胞的不同组份进行富集, 提取蛋白进行 Western 印迹分析, 结果发现所制备的 TbCSV Rep 蛋白抗体能从病叶细胞的 S1、S30 和 P30 组份中检测到约 40kD 的蛋白条带, 与预测的 Rep 蛋白分子量大小相当, 而在健康叶细胞组份中不能检测到此条带(图 2)。在亚细胞分布研究中, 一般认为 S1 组份含有植物细胞的总可溶性蛋白, P1 为含有细胞壁蛋白的组份, 而 S30 和 P30 为含有细胞核蛋白的组份^[8,9]。TbCSV Rep 在 S30 和 P30 组份中出现, 表明 Rep 蛋白可能存在于细胞核。

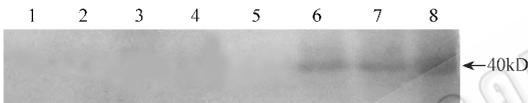


图 2 感病烟草叶片中 TbCSV Rep 蛋白的 Western 印迹分析

Fig.2 Western blot analysis of subcellular distribution of TbCSV Rep protein in infected tobacco leaves

1~4. P1, S1, S30 and P30 subcellular fractions of healthy tobacco plants, respectively; 5~8. P1, S1, S30 and P30 subcellular fractions of infected tobacco plants, respectively. The arrow indicates the position of TbCSV Rep protein.

2.3 TbCSV Rep 蛋白的免疫胶体金标记定位

利用 TbCSV Rep 蛋白抗体对感病烟草和健康烟草叶片进行免疫胶体金标记定位, 结果发现胶体金颗粒分布在感病细胞的细胞核内, 而在健康烟草叶片细胞中几乎没有胶体金颗粒的出现(图 3)。在用免疫前血清和未加一抗进行标记的对照中, 无论是感病细胞还是健康细胞, 其细胞核仅分布极少数的胶体金颗粒, 表明所用胶体金的非特异性吸附极少, 也表明 Rep 蛋白存在于感病烟草组织的细胞核。

3 讨论

双生病毒的基因组结构较为简单, 但其复制及转录调控却相当复杂。该过程不仅涉及病毒自身编码蛋白, 还与寄主蛋白因子密切相关。就病毒而言,

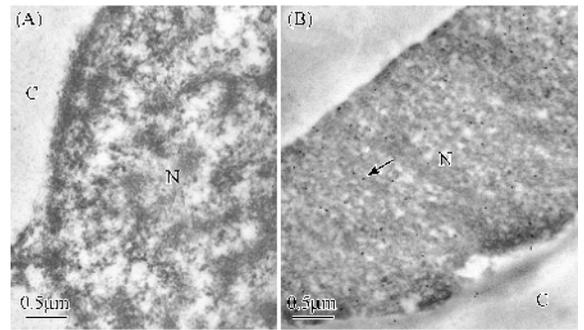


图 3 感病烟草细胞中 TbCSV Rep 蛋白的免疫胶体金标记定位

Fig. 3 Immuno-gold labeling for TbCSV Rep protein with polyclonal antibody against TbCSV Rep fusion protein in infected tobacco cells

A: The cell nucleus of healthy tobacco plant; B: The cell nucleus of infected tobacco plant; C: Cytoplasm; N: Nucleus. The arrow indicates the gold particle.

Rep 蛋白是复制必不可少的^[10]。Rep 蛋白是一个多功能蛋白, 具有 DNA 结合、起始位点裂解和连接和 ATP 依赖的拓扑异构酶活性^[10,11]。

卫星 DNA β 依赖辅助病毒进行复制, 但其不含有双生病毒所具有的 CR 区^[12]。为了弄清 DNA β 的复制机理, 需要利用 Rep 蛋白与 DNA β 进行体外的结合试验。通常认为, 病毒的复制蛋白是较难在大肠杆菌中表达而获得活性蛋白。我们曾利用 pQE-30a、pBV221、pTrcHisA、pET-30a、pET-32a 和 pBADHis 等原核表达载体在 M15、BL21(DE3)pLys S 和 TOP10 等 *E. coli* 菌株中表达 TYLCCNV 和 TbCSV 的 Rep 蛋白, 但均未获得表达。在用 GST 融合的 pGEX-4T-1 表达 TYLCCNV Rep 基因时, 表达的 Rep 融合蛋白在大肠杆菌中形成包涵体。而 TbCSV Rep 融合蛋白的部分表达产物是可溶性的, 这为进一步利用此蛋白研究 DNA β 的复制机理提供了可能。

双生病毒的复制是在植物细胞核中进行的, Rep 蛋白除参与复制外, 还与 PCNA、RBR1 等细胞周期 (Cell cycle) 因子互作而调控植物的细胞周期^[13,14]。Hanley-Bowdoin 的研究小组在对番茄金色花叶病毒 (TGMV) Rep 蛋白的研究中认为, TGMV Rep 蛋白在烟草中的含量很低, 通常不超过总蛋白的 0.05%, 在植物中较难检测^[13]。在 TbCSV Rep 蛋白的亚细胞分布研究中, Rep 蛋白能从含总可溶性蛋白的 S1 组份中较容易被检测, 其含量可能较 TGMV Rep 蛋白高。TbCSV Rep 主要存在于含有细胞核成分的 S30 和 P30 组份中, 这也与 TGMV Rep 蛋白的亚细胞分布相一致^[13]。我们通过免疫胶体金标记将 TbCSV Rep 蛋白定位在细胞核内, 因而推测 TbCSV

及其伴随的卫星 DNA β 的复制也是在核内进行的。进一步我们将利用表达的 TbCSV Rep 蛋白在体外与 DNA β 进行结合试验,确定卫星 DNA β 与 Rep 结合的部位点及专化性,探索卫星 DNA β 的复制机理。

参 考 文 献

- [1] Harrison B D , Robinson D J . Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminivirus (Begomoviruses). *Annu Rev Phytopathol* , 1999 , **37** : 369 - 398 .
- [2] Moffat A S . Plant pathology : geminivirus emerges as serious crop threat . *Science* , 1999 , **286** : 1835 .
- [3] Saunders K , Bedford I D , Briddon R W , *et al.* A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease . *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 , **97** : 6890 - 6895 .
- [4] Briddon R W , Mansoor S , Bedford I D , *et al.* Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease . *Virology* , 2001 , **285** : 234 - 243 .
- [5] Jose J , Usha R . Bendi yellow vein mosaic disease in India is caused by association of a DNA β satellite with a begomovirus . *Virology* , 2003 , **305** : 310 - 317 .
- [6] Zhou X P , Xie Y , Tao X R , *et al.* Characterization of DNA β associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A . *J Gen Virol* , 2003 , **84** : 237 - 247 .
- [7] 谢 艳 , 周雪平 , 张仲凯 , 等 . 从云南分离的烟草曲顶病毒为菜豆金色花叶病毒属的一个新种 . *科学通报* , 2001 , **46** : 1459 - 1462 .
- [8] Deom C M , Schubert K R , Wolf S , *et al.* Molecular characterization and biological function of the movement protein of *Tobacco mosaic virus* in transgenic plants . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1990 , **87** : 3284 - 3288 .
- [9] von Arnim A , Frischmuth T , Stanley J . Detection and possible functions of African cassava mosaic virus DNA B gene products . *Virology* , 1993 , **192** : 264 - 272 .
- [10] Hanley-Bowdoin L , Settlage S B , Orozco B M , *et al.* Geminiviruses : Models for plant DNA replication , transcription , and cell cycle regulation . *Crit Rev Plant Sci* , 1999 , **18** : 71 - 106 .
- [11] Orozco B M , Miller A B , Settlage S B , *et al.* Functional domains of a geminivirus replication protein . *J Biol Chem* , 1997 , **272** : 9840 - 9846 .
- [12] 李正和 , 谢 艳 , 李桂新 , 等 . 云南番茄曲叶病是由烟草曲茎病毒引起的 . *病毒学报* , 2002 , **18** : 355 - 361 .
- [13] Hanley-Bowdoin L , Elmer J S , Rogers S G . Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1990 , **87** : 1446 - 1450 .

Prokaryotic Expression and Immuno-localization of Replication Protein Gene of *Tobacco curly shoot virus*

CUI Xiao-Feng LI Yun-Qin LI Gui-Xin ZHOU Xue-Ping*
(Institute of Biotechnology , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

Abstract : The replication protein (Rep) gene of *Tobacco curly shoot virus* (TbCSV) Y35 isolate was obtained from the infected tobacco plants by PCR and cloned into expression vector pGEX-4T-1 to generate the recombinant plasmid pGEX-Y35Rep . The recombinant plasmid was introduced into *Escherichia coli* strain BL21(DE3) pLys S , and TbCSV Rep fusion protein was expressed with induction by IPTG and some products were soluble . The Rep fusion protein was purified with GST-Sepharose 4B affinity chromatography and its polyclonal antibody was produced in a rabbit . Studies on subcellular distribution of TbCSV Rep protein in infected tobacco leaves revealed that Rep protein mainly exists in the fractions containing the nucleus . Immuno-gold labeling with the antibody against Rep fusion protein also indicated that Rep protein localized in the nuclei of infected tobacco cells .

Key words : *Tobacco curly shoot virus* , Replication protein , Expression , Localization