

甜菜坏死黄脉病毒 RNA4 cDNA 克隆、序列分析 及其编码蛋白基因在大肠杆菌中的表达*

于嘉林 韩成贵 杨莉莉 李大伟 刘 仪

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

摘 要 以甜菜坏死黄脉病毒(Beet Necrotic Yellow Vein Virus, 简称 BNYVV)内蒙分离物(NM)RNA 为模板, 通过反转录和 PCR 扩增得到了 BNYVV RNA4 基因组的 cDNA 克隆 pGBF6。序列分析结果表明, pGBF6 含有全长 RNA4 cDNA 插入片段, 大小为 1465 个核苷酸, 含有一个 849 个核苷酸的开放阅读框架, 编码产生由 282 个氨基酸组成的分子量为 31kDa 的蛋白。与法国 F2 分离物 RNA4 相比, 其核苷酸序列和由此推导的氨基酸序列同源性分别为 97.1% 和 96.4%, 并在 5' 端非编码区比 F2 分离物缺失了 3 个核苷酸。将 RNA4 编码区 cDNA 克隆到原核表达载体 pFLAG·MAC 上, 获得融合蛋白表达质粒 pFMBF87。所构建的融合蛋白由载体序列编码的 14 个氨基酸和 31kDa 蛋白 C 端的 233 个氨基酸组成。经 IPTG 诱导, Western blotting 分析表明, 该融合蛋白在大肠杆菌中得到高效表达。本文还对内蒙分离物的株系划分进行了讨论。

关键词 BNYVV, RNA4, 序列分析, 原核表达, Western 印迹

甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)是一种由甜菜多粘菌(*Polymyxa betae*)传带的多分体正链 RNA 病毒, 属于真菌传杆状病毒组的可能成员, 引起甜菜丛根病^[1]。自 1978 年以来, 我国先后在内蒙、新疆、宁夏和东北三省等甜菜产区发现了该病害, 对甜菜的产量及含糖量影响十分严重^[2]。近年来, 法国、日本、德国等先后对各自 BNYVV 分离物 RNA 基因组的结构和功能进行了深入的研究^[3]。结果表明, 当用正常 BNYVV(RNA1+2+3+4)连续机械接种时, 基因组中的 RNA3 和 RNA4 可能发生缺失或全部丢失^[3]。这种缺损型 BNYVV(只有 RNA1+2 或 RNA1+2+3 而不含 RNA4)用于真菌传毒试验时, 不能被 *P. betae* 传播或传毒效率大大下降(下降到原来的 1/100~1/1000)。当接种物中重新加入 RNA4 混和后, 缺损型病毒可恢复原有的被真菌传播的效率。这一现象说明, BNYVV RNA4 是介体甜菜多粘菌高效传毒所必需的^[4]。为进一步从分子水平上研究 RNA4 在真菌传播过程中的功能, 我们克隆得到了 BNYVV RNA4 的 cDNA, 并进行了序列分析, 同时构建获得融合表达载体, 在大肠杆菌中表达了 RNA4 编码的蛋白质。

* 国家自然科学基金及“863”青年基金资助项目。

本文于 1996 年 1 月 7 日收到。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3) 株, 质粒 pGEM7Zf(+) 和 pFLAG·MAC 均由本室提供。提纯的 BNYVV 内蒙分离物由梁德林惠赠。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的提取: 取提纯的 BNYVV 300 μ l, 加入等体积抽提缓冲液 (20mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 1%SDS, 200mmol/L NaCl, 5mmol/L EDTA), 再以等体积苯酚/氯仿 (1:1) 抽提 2 次, 氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提 1 次, 取上清。经乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 真空干燥后, 悬浮于 20 μ l 灭菌重蒸水中, -20°C 保存。

1.2.2 反转录和 PCR 扩增: 依据 Bouzoubaa 等^[56]报道的 BNYVV 法国分离物 F2 的 RNA4 序列设计以下引物。引物 1: 5'-GTCAATATACTGACAGAGAACCCTATA-3', 共计 27 个核苷酸, 与 F2 分离物 RNA4 的 3' 端 nt 1441 ~ nt 1467 互补; 引物 2: 5'-GCAAGCTTAAATCAAATCTCAAATATA-3', 共计 27 个核苷酸, 与 F2 分离物 5' 端 nt 1 ~ nt 19 相对应, 并引入 Hind III 位点。以提取的 BNYVV 总 RNA 为模板, 在引物 1 引导下反转录合成 cDNA 第一条链。在 50 μ l 反应体系中加入 5 μ l 10xTaq DNA 聚合酶缓冲液, 4 μ l 50mmol/L MgCl₂, 4 μ l 10mmol/L dNTPs, 0.2 μ g 引物 1, 30 单位 RNasin, 2 μ g RNA 模板和 32 单位 AMV 反转录酶 (promega), 于 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2h。反应结束后, 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5min, 再加入 0.15 μ g 引物 2, 5 μ l 10xTaq DNA 聚合酶缓冲液, 5 单位的 Taq DNA 聚合酶, 并将反应体积放大到 100 μ l。以 70 μ l 石蜡油覆盖液面, 进行 PCR 扩增, 共 35 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 退火 2min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3min, 最后一次循环延至 10min。加入 8 单位 T4 DNA 聚合酶 (promega) 和 1 μ l 10mmol/L dNTPs, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10min, 将所扩增的片段修补成平齐末端。经酚仿抽提, 乙醇沉淀, 回收目的片段。

1.2.3 目的片段的克隆与筛选: 将目的片段插入到 pGEM7Zf(+) 的 Sma I 位点并转化大肠杆菌 DH5 α 。经氨苄青霉素选择培养基筛选, 碱法提取质粒, 选用适当的限制性内切酶酶切鉴定外源片段的插入情况进行亚克隆。基因克隆、连接、转化、质粒提取和限制性内切酶鉴定均参照 Sambrook 等的方法^[7]进行。

1.2.4 序列分析: 采用双脱氧终止法对双链质粒直接测序。利用 Sequenase Version 2.0 测序试剂盒 (United States Biochemical) 和 LKB2202 电泳系统或 ABI-370A 型自动测序仪对目的片段及其亚克隆进行序列测定。

1.2.5 原核表达载体的构建: 利用 Nde I 酶切含有 BNYVV RNA4 cDNA 的重组质粒 pGBF6, XhoI 酶切原核表达载体 pFLAG·MAC, DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow 片段) 分别补平。再用 Kpn I 分别酶切上述质粒后, 将经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离的目的基因片段回收, 并与经酶切的 pFLAG·MAC 质粒连接。转化大肠杆菌 BL21(DE3) 后筛选重组子, 碱法提取质粒 DNA 并进行酶切鉴定。

1.2.6 融合蛋白基因的诱导表达: 将含有 RNA4 31kDa 目的基因片段的融合蛋白表达载体的 BL21(DE3) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 活化过夜后, 按 1:100 稀释加入到 8ml LB 培养基中 (含 Amp 50 μ g/ml, 0.4% 蔗糖), 振荡培养至对数生长中期, 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 继

续诱导 3 ~ 4h。培养液经 1000r /min 离心 1min, 收集菌体, 加入 300 μ l 样品缓冲液 (40mmol /L Tris-HCl, pH6.8, 10% 甘油, 2% SDS, 5% 巯基乙醇, 0.1% 溴酚蓝), 煮沸 10min, 置 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.7 SDS-PAGE 及 Western 印迹分析: 浓缩胶浓度为 4.5%, 分离胶浓度为 12.5%, 电极缓冲液为 25mmol /L Tris-HCl, 192mmol /L 甘氨酸, 0.1%SDS, pH8.3。以 15mA 恒流浓缩, 待溴酚蓝进入分离胶后电流调至 30mA, 电泳 5 ~ 6h。用考马斯亮蓝 R250 染色, 脱色液脱色至背景清晰为止。按照 Towbin 等方法^[3]将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶转移到硝酸纤维素膜(NC)上(60V, 3 ~ 4h)。采用 promega 公司生产的试剂盒并按照其产品说明书进行 Western blotting。BNYVV 31kDa 蛋白 C 端区域专化性抗血清由法国 Louis Pasteur 大学的 K. Richards 博士惠赠。

2 结果

2.1 cDNA 的合成

以 BNYVV 内蒙分离物总 RNA 为模板, 经反转录和 PCR 扩增, 得到一特异性片段, 长度约 1.4kb, 与设计相符(图 1)。

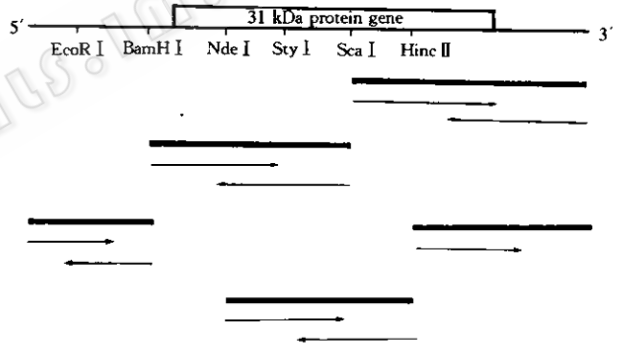
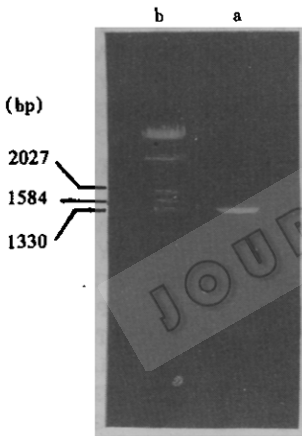


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 The agarose gel electrophoresis of PCR product
a. PCR product; b. λ -DNA /EcoR I+Hind III marker.

图 2 pGBF6 的物理图谱、亚克隆及测序策略

Fig.2 Physical mapping, subcloning and sequencing strategy of pGBF6

2.2 目的片段的克隆

将扩增得到的目的片段经 T4 DNA 聚合酶处理成平齐末端后, 克隆到 pGEM7z(+)
的 Sma I 位点, 经筛选得到重组质粒 pGBF6。经 EcoR I、BamH I、Nde I、Sca I 及 Hinc II 等限制性内切酶酶切分析, 证明目的片段为反向插入, 与法国 F2 分离物相比, pGBF6 插入片段在近 5' 端多了一个 EcoRI 位点, 在 3' 端多出一个 Hinc II 位点, 其余位点相同。

5' AAATCAAATCTCAAATATATATTTGTATTTCCAGTTGATTGTCTGTAACAATTCCAGT	60
TGTTTGTCTGTAACAACAACATTTATGCTTGATCAGCTTTGTAGATCCTTGATTAATCTT	120
ATTTCTATCATTGAATTCGAATTGTTTCTGTTGAGATTCTCTTTACGATTTGTGTGCCA	180
TTTCGTATATTGGAAGACGGGCTGATTCCAGTATTTATTGGTCAGTTTATAGGTGCAGA	240
ACGCTTTTAAGTGAGACCTACGACTGCGTCCGAACCTTAGATTACGAGCCGCGTGATTA	300
ATTGGGTTTGTCACTGGGATCCAGTCTATCAGTAAGGGGTAGTCCGTTGTTGAGACTTAT	360
CTGATTAGTAACATTT ATG GCT GAT GGA GAG ATA TGT CGG TGT CAG GTT	409
M A D G E I C R C Q V	
ACT GAT CCT CCT TTG ATA CGT CAT GAA GAC TAT GAT TGT ACT GCT	454
T D P P L I R H E D Y D C T A	
AGG ATG GTG CAG AAA CGG ATT GAG ATT GGC CCA TTG GGT GTC TTA	499
R M V Q K R I E I G P L G V L	
CTC AAT CTA AAT ATG TTA TTT CAT ATG TCT CGT GTT AGA CAT ATT	544
L N L N M L F H M S R V R H I	
GAT GTT TAT CCG TAT CTG AAT AAT ATT ATG TCT ATT TCG GTG TCG	589
D V Y P Y L N N I M S I S V S	
TTG GAT GTT CCT GTG TCT AGT GGC GTT GGT GTT GGA CGT GTA CGT	634
L D V P V S S G V G V G R V R	
GTT TTA ATA TTT ACA ACT AGT CGT GAA CGT GTT GGT ATA TTC CAT	679
V L I F T T S R E R V G I F H	
GGA TGG CAG GTT GTG CCT GGG TGC TTT CTT AAT GCC CCG TGT TAT	724
G W Q V V P G C F L N A P C Y	
AGT GGT GTT GAT GTT CTG TCT GAT GAG TTA TGT GAA GCT AAT ATC	769
S G V D V L S D E L C E A N I	
ACT AAT ACT TCG GTT TCG TCT GTT GCG ATG TTC AAT GGG TCG TAT	814
T N T S V S S V A M F N G S Y	
AGA CCT GAA GAC GTC TGG ATA CTA TTA CTT ACG TCT AGT ACT TGT	859
R P E D V W I L L T S S T C	
TAT GGT TAT CAT GAT GTT GTT GTT GAT ATA GAA CAA TGT ACA TTA	904
Y G Y H D V V V D I E Q C T L	
CCT TCT AAT ATA GAT GGG TGT GTT TGT TGT TCT GGC GTT TGC TAT	949
P S N I D G C V C C S G V C Y	
TTC AAT GAT AAT CAT TGT TTT TGT GGT CGT CGT GAT AGT AAT CCA	994
F N D N H C F C G R R D S N P	
TTC AAT CCG CCT TGT TTT CAA TTT ATT AAA GAT TGT AAT GAG TTG	1039
F N P P C F Q F I K D C N E L	
TAT GGA ACA AAT GAA ACT AAA CAA TTC ATT TGT GAC CTT GTT GGT	1084
Y G T N E T K Q F I C D L V G	
GAT GAT AAC TTG GAT AGT GTT AAC ACT CTA ACA AAG GAA GGG TGG	1129
D D N L D S V N T L T K E G W	
CGA AGG TTT TGT GAT GTT CTT TGG AAT ACC ACT TAT GGT GAT GTT	1174
R R F C D V L W N T T Y G D V	
GAG TCT CGT ACT TTT GCA CGG TTT CTG TGG TTT GTC TTT TAT CAC	1219
E S R T F A R F L W F V F Y H	
GAT TAG TGGTATTGATGATGTGTTTAGTTATTCGAGATACAAGACTAATAATATGTAT	1277
D	
AATTGTATTATCAACGGGCTCGTTCACAAGCCTCCTTGCTATGGTAAGGTTTATGTGAAC	1337
ACAAAAATATGGCTTATTGGTTATGCTAAACCTCATATCGTATTAATAATATATAAGTTA	1397
AGGTTGAGATGTACTGACTGGGTGTGAAATGTACCAGTCTTTATAGGGTTCTCTGTCACT	1457
ATATTGAC 3'	1465

图3 pGBF6插入片段的核苷酸序列及推导的编码蛋白氨基酸序列

Fig.3 The nucleotide and deduced amino acid sequence of pGBF6 insertion

2.3 克隆片段的序列分析

pGBF6 的酶切图谱、亚克隆和测序策略见图 2。序列分析结果表明, cDNA 克隆 pGBF6 含有 BNYVV 全长 RNA4, 插入片段全长为 1465bp, 含有一个 849bp 的开放阅读框架(ORF)。经计算机推导, 可编码一个由 282 个氨基酸残基组成的 31kDa 蛋白(图 3)。与发表的法国 F2 分离物 RNA4 比较^[9], 5' 端非编码区缺失了 3 个核苷酸, 3' 端非编码区多了 1 个核苷酸, 核苷酸序列的同源性为 97.1%, 由此推导产生的氨基酸序列同源性为 96.4%。

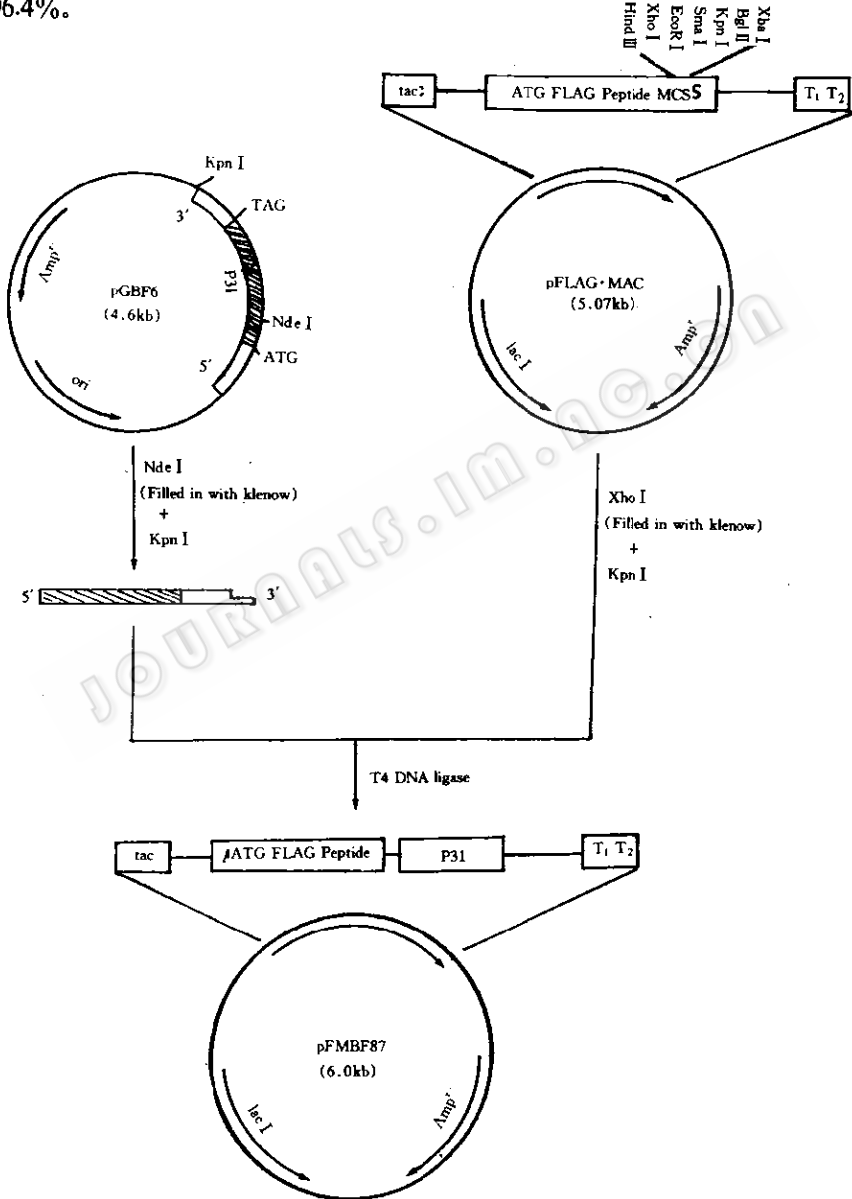


图 4 原核表达载体 pFMBF87 的构建

Fig.4 Construction of the prokaryotic expressing vector pFMBF87

2.4 原核表达载体的构建

以 Nde I 酶切 pGBF6, DNA 聚合酶 Klenow 片段补平后, 再用 Kpn I 酶切, 电泳回收 949bp 的目的片段。与经 Xho I 切开补平后, 再用 KpnI 处理的 pFLAG·MAC 载体连接后, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 筛选并利用酶切鉴定得到重组子 pFMBF87(图 4)。所构建的融合蛋白由载体序列编码的 14 个非病毒氨基酸和 BNYVV RNA4 31kDa 蛋白 C 端的 233 个氨基酸组成。

2.5 融合蛋白基因在大肠杆菌中的表达

含有 pFMBF87 重组质粒的工程菌经 IPTG 诱导后, 样品经 SDS-PAGE 分离, 可产生一条约 27kDa 的蛋白质条带。为验证此蛋白是目的基因的表达产物, 以 BNYVV 31kDa 蛋白 C 端区域专化性抗血清为一抗, 碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 进行 Western 印迹分析, 结果见图 5。经 IPTG 诱导的 pFMBF87 工程菌表达产物中, 在位于 27kDa 处有一条明显的特异性条带, 而只含有空载体的 BL21(DE3) 经诱导后和未经诱导的 pFMBF87 工程菌对照表达产物中均无此条带。说明 pFMBF87 工程菌经诱导能够表达产生分子量约为 27kDa, 含有 BNYVV 31kDa 蛋白 C 端区域的融合蛋白。

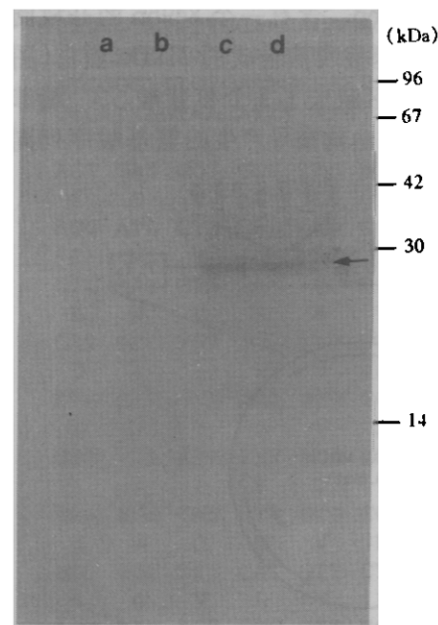


图 5 pFMBF87 表达产物的 Western 印迹分析

Fig.5 Western blotting detection of expression products from pFMBF87

a. pFLAG·MAC induced with IPTG; b. pFMBF87 without induction; c.d. pFMBF87 induced with IPTG (arrow points the fusion protein).

3 讨论

对于 BNYVV 不同分离物的株系划分, Kruse 等^[9]利用 RT-PCR 方法, 对来自世界各地的 BNYVV 分离物进行了限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP) 分析, 将 BNYVV 划分成 A 和 B 两个主要株系群, 最近 Koenig 等^[10]用 RT-PCR 单链二级结构多态性 (Single-strand conformation polymorphisms, S' S' C' P) 分析方法, 将 BNYVV 划分成 A、B 和 P 型株系群, 其中 P 型株系仅发现于法国的 Pithiviers 地区, 并认为中国的内蒙分离物属于 A 型亚株系或者一个新株系。本文所报 BNYVV 内蒙分离物 RNA4 序列分析和酶切鉴定结果表明, RNA4 5' 端非编码区与法国的 F2 分离物(属 B 型)相比缺失了三个核苷酸, 且存在 EcoR I、Hinc II 等 A 型株系特异的酶切位点。另外根据对内蒙分离物 RNA3 全长 cDNAs 酶切鉴定结果, 它不存在属于 B 型株系特异的 EcoRI、BamHI 和 Sty I 酶切位点(于嘉林等, 待发表); 姚华建等^[11]对 BNYVV 外壳蛋白基因序列分析结果表明存在属于 A 型特征的 Sca I、EcoR I 酶切位点, 而不存在 B 型特征的 Xma I 位点(表 1)。同时, 于嘉林等^[12]对 BNYVV RNA2 基因组中 54kDa 蛋白基因片段以及 ORF4 的序列分析结果与法国 F2 分离物比较, 也存在缺失和移码现象。这些结果与 R.

表 1 BNYVV 内蒙分离物与 A、B 型株系的酶切位点比较

Table 1 The comparison of specific restriction sites among BNYVV NM isolate and A, B strains

株系	RNA4 (nt 87 ~ 1301)				RNA3 (nt 50 ~ 1268)				RNA2 (nt 19 ~ 1088)		
	Apa I	Bsp	1286I	EcoRI	HincII	BamHI	EcoRI	StyI	EcoRI	ScaI	XmaI
NM 分离物	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
A 型	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
B 型	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+

* 注: (+) 为存在的酶切位点; (-) 为不存在的酶切位点。

Note: +, restriction enzyme site is present; -, restriction enzyme site is not present.

Koenig 等人对 BNYVV 的分型结果较为吻合, 说明我国 BNYVV 内蒙分离物与 A 型株系亲缘关系较近, 应属于 A 型的亚株系或者是一个新的株系。

参 考 文 献

- [1] Putz C, Merdinoglu D, Lemaire O *et al.* *Review of Plant Pathology*, 1990, 69(5): 247 ~ 254.
- [2] 高锦梁, 邓 峰, 翟惠琴, 等. *植物病理学报*, 1983, 13(2): 1 ~ 4.
- [3] Richards K E, Tamada T. *Ann Rev. Phytopathol*, 1992, 30: 291 ~ 313.
- [4] Tamada T, Abe H. *J. Gen Virol*, 1989, 70: 3391 ~ 3398.
- [5] Bouzoubaa S, Guilley H, Jonard G *et al.* *J Gen Virol*, 1985, 66: 1553 ~ 1564.
- [6] Bouzoubaa S, Ziegler V, Beck D *et al.* *J Gen Virol*, 1986, 67: 1689 ~ 1700.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd. edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4350 ~ 4354.
- [9] Kruse M, Koenig R, Hoffinan A *et al.* *J Gen Virol*, 1994, 75: 1835 ~ 1842.
- [10] Koenig R, Luddecke P, Haeblerle A M. *J Gen Virol*, 1995, 76: 2051 ~ 2055.
- [11] 姚华建, 刘 仪, 于嘉林, 等. *生物工程学报*, 1995, 9(2): 147 ~ 151.
- [12] 于嘉林, 李大伟, 杨莉莉, 等. *生物工程学报*, 1995, 11(2): 133 ~ 138.

cDNA CLONING, SEQUENCING AND EXPRESSION OF RNA4 FROM BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS

Yu Jialin Han Chenggui Yang Lili Li Dawei Liu Yi

(National Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract With beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) NM isolate from Inner Mongolia, the full length RNA4 cDNA was amplified by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR), and cloned into pGEM7zf(+) to obtain the recombinant plasmid pGBF6. The sequence analysis showed that the RNA genome has 1465 nucleotides and contains a single open reading frame of 849 nucleotides, which encoded a 31kDa protein consisted of 282 amino acids. Comparing with the French F2 isolate, it shows 97.1% identity in terms of nucleotide with 3 nucleotides deletion at its 5' noncoding region and 96.4% homology of deduced amino acids respectively. The expression vector pFMBF87 was constructed by plasmid pFLAG · MAC and part of the coding region. The IPTG-inducible fusion protein is consist of C-terminal 233 amino acids of the 31kDa protein encoded by BNYVV RNA4 besides a flag peptide of 8 amino acids at the N terminal. With induction of IPTG, a 27kDa protein was specifically expressed in *E. coli* in high level and its affinity to BNYVV RNA4 antibodies was identified by Western blot. The relationship of BNYVV NM to other strain groups was discussed in this paper as well.

Key words BNYVV, RNA4, Sequence, Prokaryotic expression, Western blot