中国小麦花叶病毒 RNA2 外壳蛋白通读区及 19 ku 富半胱氨酸基因的克隆、表达及其编码蛋白定位

徐 磊^① 陈剑平^{②*} 叶 荣^① 赵秀云^① 于善谦^①

(^①复旦大学微生物学系, 上海 200433; ^②浙江省农业科学院病毒学实验室, 杭州 310021. * 联系人, E-mail: jpchen@mail.hz.zj.cn)

摘要 应用 RT-PCR 扩增中国小麦花叶病毒(CWMV)外壳蛋白通读区(readthrough, RT) 5'端(RTn)和 3'端(RTc)及 19 ku 的富含半胱氨酸蛋白基因, 分别克隆并在 *E. coli* 中表达, 表达蛋白粗提纯后免疫小鼠, 制备相应的抗血清和单克隆抗体. 用各种抗体检测小麦病叶汁液中 RTn, RTc 和 19 ku 蛋白. 结果表明, RTn 和 RTc 分布在病叶细胞中的 CWMV 病毒粒子表面, 而 19 ku 蛋白则均匀分布于细胞质中.

关键词 中国小麦花叶病毒 外壳蛋白通读区 富含半胱氨酸蛋白基因 原核表达 定位

中国小麦花叶病毒(Chinese wheat mosaic virus, CWMV)是从山东省烟台市郊冬小麦上分离的一种新的双组分单链正义 RNA 病毒^[1], 属于真菌传棒状病毒属(*Furovirus*), 可通过土壤中的禾谷多黏菌(*Polymyxa graminis*)传播^[1,2], 其病毒粒子形态、外壳蛋白分子量、血清学特性和基因组结构都与真菌传棒状病毒属代表种土传小麦花叶病毒(soil-borne wheat mosaic virus, SBWMV)相似, 但 RNA1 和 RNA2 核苷酸序列与 SBWMV 的同源性分别只有 75%和 63%^[2,3]. CWMV RNA1 和 RNA2 各有 3 个可读框(ORFs), RNA1 的可读框分别编码解旋酶、复制酶和运动蛋白. RNA2 可读框分别编码外壳蛋白、通读(readthrough, RT)蛋白和一个 19 ku 富含半胱氨酸蛋白. 外壳蛋白基因以乳白终止子(UGA)结束, 此终止子有一定概率被抑制而产生包含外壳蛋白和通读蛋白的一个 84 ku

的大蛋白^[2]. 由突变株分析法推测, 甜菜西部黄化病毒(beet western yellow virus, BWYV)的 RT 区与病毒粒子组装和介体传播有关^[4,5]. Hehn 等人^[6]认为甜菜坏死黄脉病毒(beet necrotic yellow vein virus, BNYYV)的 14 ku 富半胱氨酸蛋白参与调节外壳蛋白表达及 RNA2 的积累. 为了搞清 CWMV 上述两种蛋白功能, 本文对这两个基因进行了克隆并对所表达的蛋白进行了定位.

1 材料与方法

(i) 病毒纯化和 RNA 抽提. 小麦病叶于 1997 年采自山东省烟台市郊并保存于-80℃. 小麦病叶中病毒提取按文献[1]方法进行. 用蛋白酶消化法及酚-氯仿法从病毒制剂中抽提病毒 RNA, 琼脂糖凝胶电泳分离纯化病毒 RNA2.

表 1 用于 CWMV RNA2 各基因片段 RT-PCR 扩增的引物

引物	方向	位置	序列	长度/nt	退火温度 <i>T_m</i> /℃
rt3	F ^{a)}	858 ~ 863	5'-GTGAATTCGGGATGGCGTCTCGG-3' <i>EcoR</i> I	23	64
rt4	R ^{b)}	1568 ~ 1552	5'-GTGAAGCTTGAACACATGTTAGATCGC-3' <i>Hind</i> III	26	50
rt5	F	1401 ~ 1417	5'-GCGAATTCACACAGGAGTTCCATGC-3' <i>EcoR</i> I	25	54
rt6	R	2605 ~ 2589	5'-GCAAGCTTAGATCCGCCAAAGGCTT-3' <i>Hind</i> III	24	50
cys7	F	2655 ~ 2670	5'-GAGAGCTCTATGACTACTGGTACTCA-3' <i>Sac</i> I	26	50
cys8	R	3179 ~ 3163	5'-GAGGTACCAATTACTCCACACGAGTT-3' <i>Kpn</i> I	26	50
3t10	R	3573 ~ 3556	5'-GGAATTCGGGCCGGTTTACCCAC-3' <i>EcoR</i> I	24	56

a) 正向引物, b) 反向引物

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-6-439>

(ii) RT 和 19 ku 基因片段扩增. 根据 CWMV RNA2 序列^[2]设计引物(表 1), 按图 1 所示的策略进行各基因片段 RT-PCR 扩增. 以抽提的 CWMV RNA2 为模板, 3t10 为引物合成第 1 链 cDNA. RT-PCR (BcaBESTTM RNA PCR ver1.1, TaKaRa 公司)按厂家推荐方法操作. PCR 反应总体积为 50 μ L, 含 30.5 μ L 无 RNase 的水, 10 μ L 5 $\times$ BcaBESTTM 缓冲液, 3 μ L 25 mmol/L MgSO₄, 1 μ L 10 mmol/L dNTPs, 3 μ L cDNA 模板、上下游引物(表 1)各 1 μ L 及 0.5 μ L Taq DNA 聚合酶, 覆盖 50 μ L 无菌石蜡油, 94 $^{\circ}$ C 变性 0.5 min, 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 30 个循环以扩增目的片段.

(iii) 基因片段的克隆与表达. 扩增得到的 PCR 片段用适当酶切后, 分别导入表达载体 pBAD/His A, B 和 C 中, 得到的重组子分别转化 *E. coli* Top10 菌株后, 以 L-(+)-阿拉伯糖诱导表达. 用超声波破碎细胞壁和包涵体, 经 SDS-PAGE 分离纯化表达蛋白.

(iv) 抗血清和单克隆抗体制备. 表达产物的粗纯化物与完全福氏佐剂混合乳化后腹腔注射 BALB/C 小鼠, 以后每周加强免疫一次. 经 2~3 次加强免疫后采血测定效价, 并收获抗血清. 用免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞杂交, 按文献[7]方法制备鼠的单克隆抗体. 抗血清和单克隆抗体效价用 ELISA 方法检测, 方法参见文献[7].

(v) Western 杂交分析. 小麦病叶汁液与等体积凝胶加样缓冲液混合后, 进行 SDS-PAGE 电泳. 蛋白电泳条带经电转移至硝酸纤维膜后, 用获得的各免疫抗体进行杂交反应.

(vi) 胶体金免疫电子显微镜分析. 把膜镍网覆盖在小麦病叶汁液上, 室温吸附 3 min 后用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(PBST, pH 7.0)冲洗数次后, 与抗体稀释液和胶体金耦联羊抗鼠 IgG (Sigma 公司, 金粒子直径为

10 μ m)稀释液于 37 $^{\circ}$ C 分别孵育 1.0 和 1.5 h. 用 PBST 冲洗后, 以 2%磷钨酸染色, 电子显微镜下观察.

小麦病叶切成小片后, 用 2.5%戊二醛-2%多聚甲醛固定过夜, 按常规方法经乙醇梯度脱水、包埋、聚合后, 用超薄切片机切成 50~70 nm 的切片, 载于镍网上, 按上述方法进行的免疫金标记反应. 用醋酸铀和柠檬酸铅双染色后, 于电子显微镜下观察.

2 结果

2.1 RTn, RTc 和 19 ku 蛋白基因的 PCR 扩增

按照图 1 所示的基因扩增策略, 以 CWMV RNA2 的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 扩增结果见图 2. 用引物对 rt3/rt4 扩增到 711 nt 的 RTn 片段, 用 rt5/rt6 扩增到 1205 nt 的 RTc 片段, 此 RTn 片段的 3'端与 RTc 片段的 5'端重叠 135 nt. 引物对 cys7/cys8 扩增到 524 nt 的 19 ku 蛋白基因, 所有扩增所得片段与预期的片段大小一致.

2.2 RTn, RTc 和 19 ku 蛋白基因的克隆和表达

将 RTn, 19 ku 基因和 RTc 片段分别克隆到原核表达质粒 pBADA, B 和 C 中. 获得的各片段阳性重组子经双酶切鉴定, 表明均分别含有相应的 cDNA 片段.

选择重组子 p6A6(含 RTn 基因片段), p7C14(含有 RTc 基因片段)和 4B16(含有 19 ku 蛋白基因)分别转化 *E. coli* Top10 菌株后, 以 L-(+)-阿拉伯糖为诱导物诱导蛋白质表达. 结果表明, RTn, RTc 以及 19 ku 蛋白基因均在 *E. coli* 体内得到超量表达(图 3), 其中 RTn 基因片段理论蛋白产物长为 237 aa, 加上融合在 5'端同时表达的部分载体序列 47 aa, 所以重组质粒 p6A6 的表达产物应为 31 ku; RTc 基因片段理论蛋白产物长为 402 aa, 同样加上载体序列 47 aa, 所以重组质粒 p7C14 表达产物为 49 ku; 19 ku 蛋白基因理论蛋白产物长为 174 aa, 加上载体序列 43 aa, 所以重组质

图 1 CWMV 有关基因片段扩增策略

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-6-439>

粒 p4B16 表达产物为 24 ku. 它们都与预期的一致.

2.3 RTn, RTc 和 19 ku 蛋白基因表达蛋白的抗体制备

将 RTn, RTc 和 19 ku 蛋白基因原核表达产物经粗纯化后免疫 BALB/C 小鼠, 按时加强免疫并测定抗血清效价, 效价较高后处死小鼠, 取血制备抗血清. 取脾脏获得单克隆抗体. 共获得对 3 种表达蛋白的鼠抗血清、5 株 19 ku 蛋白单抗、5 株 RTn 蛋白单抗和 1 株 RTc 蛋白单抗. 经 ELISA 检测, 这些抗体的效价见表 2. Western 杂交分析表明, 3 种蛋白的抗血清都能与各自表达蛋白反应, RTn 各单抗和相应的蛋白都有强弱不同的反应, RTc 抗血清和单抗也能与表达蛋白反应, 但强度很弱, 19 ku 蛋白各单抗与 19 ku 蛋白则强烈反应(结果未显示).

图 2 RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析
1, 19 ku 蛋白基因(524 nt); 2, RTn(710 nt); 3, RTc(1204 nt)

2.4 RTn, RTc 和 19 ku 蛋白在感病小麦细胞中的定位

应用胶体金免疫电子显微镜分别检测小麦病汁液中各抗体与病毒粒子的反应, 结果表明, RTn 和 RTc 蛋白抗血清耦联的金标颗粒多分布于病毒粒子

图 3 RTn, RTc 和 19 ku 蛋白基因原核表达产物 SDS-PAGE 分析
M 示蛋白分子量标准, 1 示 p4B16, 2 示 pBAD B, 3 示 p4A6, 4 示 pBAD A, 5 示 p7C14, 6 示 pBAD C

表面, 但 19 ku 蛋白抗血清耦联金标颗粒则不能与病毒粒子反应(图 4), 说明 RT 蛋白分布于病毒粒子表面, 而 19 ku 蛋白则没有.

用 Western 杂交法检测小麦病叶汁液 19 ku 蛋白的存在, 结果 19 ku 蛋白鼠抗血清和所有 6 个单抗都能与病叶汁液中 19 ku 蛋白起特异性反应, 而与 CWMV 提纯制剂和/或健叶汁液则不反应, 表明只有病叶汁液中存在 19 ku 蛋白, 而在 CWMV 提纯制剂和健叶汁液中不存在此蛋白(图 5). 在 19 ku 蛋白鼠抗血清与病叶汁液反应中, 还出现一条较弱的 38 ku 条带, 这可能是 19 ku 蛋白的二聚体.

应用胶体金免疫电子显微镜检测这 3 种蛋白在病叶组织中的抗原分布, 结果表明, RTn 蛋白和 RTc 蛋白抗血清耦联的金颗粒主要特异地分布于病毒颗粒表面, 也有少数非特异性散布于细胞质中(图 6), 而在健康叶组织中, 只见细胞质中有少数散布的非特

表 2 ELISA 法测定抗体的效价

抗体	RTn 蛋白		RTc 蛋白		19 ku 蛋白	
	单抗名称	效价	单抗名称	效价	单抗名称	效价
鼠抗血清		1 : 25600		1 : 12800		1 : 25600
鼠单克隆抗体 (细胞培养上清)	1G2	1 : 10	3D1	1 : 2	1G12	1 : 2
	2F12	1 : 10			2H4	1 : 32
	4A7	1 : 10			3C12	1 : 32
	4A7	1 : 10			3D12	1 : 32
	4E2	1 : 10			4G3	1 : 2

图 4 用胶体金免疫电子显微镜标记 CWMV 粒子
(a) RTn 蛋白鼠抗血清; (b) RTc 蛋白鼠抗血清; (c) 19 ku 蛋白鼠抗血清

图 5 应用 Western 杂交分析检测小麦病汁液中的 19 ku 蛋白

异性标记(结果未显示). 19 ku 蛋白抗血清耦联的金颗粒均匀分布于病叶细胞质中(图 7), 在健叶细胞质中未见特异性标记(结果未显示).

3 讨论

本研究对中国小麦花叶病毒(CWMV)RNA2 的外壳蛋白通读区的 5'端和 3'端两部分(RTn 和 RTc)及 19 ku 富半胱氨酸基因进行了扩增和克隆, 并成功地进行了原核表达. 由于 RT 的 N 端和 C 端不仅覆盖了整个 RT 全长, 两者还重叠了 45 个氨基酸, 这有利于筛选针对 N 端和 C 端重叠区(即 RT 中部区域)的单克隆抗体, 以研究 RT 中部区域的特殊空间结构. 研究表明, RTn, RTc 和 19 ku 蛋白在 *E. coli* Top10 菌株中

图 6 应用 RTn 蛋白鼠抗血清胶体金免疫电子显微镜标记病组织切片中 RTn 蛋白

图 7 应用 19 ku 蛋白鼠抗血清胶体金免疫电子显微镜标记病组织切片中 19 ku 蛋白

都得到了超量表达并形成不溶的包涵体. 将各表达蛋白粗纯化后制备了鼠抗血清和单克隆抗体. 用 Western 杂交和胶体金免疫电子显微镜对小麦病汁液中及组织细胞中的相关抗原进行了检测, 结果表明, RTn 和 RTc 的抗原特异性分布在病毒粒子的表面, 而 19 ku 抗原主要分布在病细胞质中.

Haerberle 等人^[8]认为甜菜坏死黄脉病毒的通读蛋白位于病毒粒子的一个末端, Cowan 等人^[9]发现马铃薯帚顶病毒通读蛋白集中于解螺旋方向相反的末端, 而我们的研究中未观察到类似现象. 但从一些通读区缺失突变的研究表明, 该蛋白与病毒粒子的装配和介体传播有关^[3]. 以前的研究表明, 真菌传棒状病毒属通读蛋白序列中具有 2 个很大的疏水区, 可能是膜结合区^[3,10], 这 2 个膜结合区可能控制着真菌传毒特性^[11], 从计算机程序分析结果也可以看出, CWMV 通读蛋白第 110 ~ 140 以及 195 ~ 210 位氨基酸为明显的疏水结构区, 暗示了通读蛋白能够结合在内质网或细胞膜上行使功能. 我们根据 RTn 和 RTc 与病毒粒子的密切关系推断, 在 CWMV 中, 通读蛋白也可能起到类似的作用, 但具体的证据有待进一步研究.

计算机分析表明, 富含半胱氨酸的 19 ku 蛋白是一个弱碱性蛋白. 这是大多数锌指蛋白的重要特征. 胶体金免疫电子显微镜观察表明, 这种蛋白主要分布在细胞质中. 因此, 该蛋白有可能在病毒复制中与外壳蛋白表达和 RNA2 的积累有关. GCG 软件分析此蛋白的二级结构是 β -折叠-转角- α -螺旋, 类似于同类富含半胱氨酸的锌指结构, 但由于 BLAST 结果没有发现 CWMV 19 ku 蛋白序列与已知经典锌指、LIM 或 SRCR 结构区域序列有较高的同源性, 无法以同源

建模方法推测其三维结构, 只有采用同功(能)建模法. 目前正在收集其他已知富含半胱氨酸的 19 ku 蛋白的空间结构数据.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39970482)、浙江省青年科技人才专项资金(批准号: RC9604)、浙江省自然科学基金(批准号: 399421)、浙江省重点实验室专项资金(批准号: 01107557)和浙江省科技厅“十五”重大攻关(批准号: 11102181)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Ye R, Zheng T, Chen J, et al. Characterization and partial sequence of a new furovirus of wheat in China. *Plant Pathology*, 1999, 48: 379 ~ 387
- 2 Diao A, Chen J, Ye R, et al. Complete sequence and genome properties of Chinese wheat mosaic virus, a new furovirus form China. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1141 ~ 1145
- 3 Diao A, Chen J, Gitton F, et al. Sequence of European wheat mosaic virus and Oat golden stripe virus and genome analysis of the genus furovirus. *Virology*, 1999, 261: 331 ~ 339
- 4 Brault V, Mutterer J, Scheidecker D, et al. Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellow virus minor capsid protein on virus accumulation in plant and on transmission by aphids. *J Virology*, 2000, 74(3): 1140 ~ 1148
- 5 Mutterer J D, Stussi-Garauch C, Michler P, et al. Role of the beet western yellow rive virus read-through protein in virus movement in *Nicotiana clerelanid*. *J Gen Virol*, 1999, 80: 2771 ~ 2778
- 6 Hehn A, Bouzoubaa S, Bate N, et al. The small cysteine-rich protein P14 of beet necrotic yellow vein virus regulates accumulation of RNA2 in *cis* and coat protein in *trans*. *Virology*, 1995, 210: 73 ~ 81
- 7 Chen J, Torrance L, Cowan G H, et al. Monoclonal antibodies detect a single amino acid different between the coat proteins of soil-borne wheat mosaic virus isolates: Implications for virus structure. *Phytopathology*, 1997, 87: 295 ~ 301
- 8 Haerberle A, Stussi-Garand C, Schmitt C, et al. Detection by immunogold labeling of P75 readthrough protein near an extremity of beet necrotic yellow vein virus particles. *Archives of Virology*, 1994, 134: 195 ~ 203
- 9 Cowan G H, Torrance L, Reavy R. Detection of potato mop-top virus capsid readthrough protein in virus particles. *J Gen Virol*, 1997, 78: 1779 ~ 1783
- 10 Bahrai Z, Sherwood J L, Sanborn M R, et al. The use of monoclonal antibodies to detect wheat soil-borne mosaic virus. *J Gen Virol*, 1988, 69: 1317 ~ 1322
- 11 Adams M J, Antoniw J, Mullins J, et al. Plant virus transmission by plasmodiophorid fungi is associated with distinctive transmembrane region of virus-encoded proteins. *Archive of Virology*, 2001, 146: 1139 ~ 1154

(2001-12-03 收稿, 2002-01-28 收修改稿)