

大麦黄矮病毒 GAV 株系 ORF4 基因在杆状病毒-昆虫细胞系统中的表达及亚细胞定位

Expression and Subcellular Localization of the ORF4 gene of Barley Yellow Dwarf Virus GAV Strain in Baculovirus-insect Cell Expression System

夏宗良^{1,*}, 王美平², 刘全军¹, 王道文³

XIA Zong-Liang¹, WANG Mei-Ping², LIU Quan-Jun¹ and WANG Dao-Wen³

1 河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002

2 河南农业大学图书馆, 郑州 450002

3 中国科学院遗传与发育生物学研究所植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100101

1 College of Life Sciences, Hennan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2 Library of Hennan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

3 The State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

摘 要 根据已报道的大麦黄矮病毒 GAV 株系(BYDV-GAV)相关基因序列,利用 RT-PCR 方法获得 ORF4 基因。在杆状病毒-昆虫细胞系统中,成功表达了 ORF4 和 GFP(绿色荧光蛋白)的融合蛋白(GFP:ORF4),Western blot 检测到目的蛋白的表达。利用激光共聚焦显微镜观察其在细胞中的积累和亚细胞分布,发现 ORF4 基因编码的 17 kD 蛋白(P4)能进入细胞核,并在细胞核膜上聚集。通过对 ORF4 基因编码的 P4 蛋白的 N 端和 C 端缺失突变结合蛋白质的结构预测分析,鉴定出 N 端 α 螺旋结构对于 P4 蛋白的核膜定位是必需的。这些结果为进一步研究 ORF4 基因在黄矮病毒 GAV 系统侵染中的生物学功能奠定了基础。

关键词 大麦黄矮病毒,杆状病毒-昆虫细胞系统,亚细胞定位

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-1107-05

Abstract According to published nucleotide sequences, ORF4 gene of *barley yellow dwarf virus* GAV (BYDV-GAV) was synthesized by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The BYDV-GAV ORF4 gene was expressed in baculovirus-insect cell expression system efficiently, and western blot analysis confirmed its expression product. Confocal laser scanning microscopy showed that GFP:ORF4 fusion protein was associated with the nuclear envelope of insect cells. By expressing the N- and C-terminal regions of ORF4-encoding product (P4) in insect cells combined with structure prediction, it was found that the N-terminal region of P4 containing four α -helices is required for targeting P4 to the nuclear envelope. These results provide a base for biological function of ORF4 gene during systemic infection of BYDV-GAV in host plants further.

Key words barley yellow dwarf virus, baculovirus-insect cell system, subcellular localization

Received: March 7, 2007; Accepted: March 26, 2007.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No.30521001).

* Corresponding author. Tel: +86-371-63555790, E-mail: zongliangxia@yahoo.com

国家自然科学基金项目(No.30521001)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

大麦黄矮病毒(Barley Yellow Dwarf Virus, BYDV)是黄症病毒属(Luteovirus)的代表成员。该病毒依靠介体蚜虫在植株间传播、扩散而引起禾本科作物(小麦、大麦等)的黄矮病^[1,2]。根据蚜虫宿主种类和血清学关系,大麦黄矮病毒可分为 MAV、PAV、SGV、RPV、RMV、GPV、GAV 等株系^[3-5]。其中由麦二叉蚜和麦长管蚜传播的 GAV 近几年成为我国生产上黄矮病流行的主流株系^[6,7]。

最近对 BYDV-GAV 全基因组序列测定的结果显示^[5]:BYDV-GAV 基因组 RNA 为 5.7 kb,有 6 个开放阅读框(ORF),ORF1-ORF6,并且与以前报道的 BYDV 的 PAV、MAV 和 RPV 基因组结构具有较高的相似性。对 BYDV-PAV 的研究表明,ORF4 基因编码的 17kD 蛋白是黄矮病毒在植物中系统感染所必需^[8]。Nass 等^[9]观察到 BYDV-PAV 株系 ORF4 基因编码的 17kD 蛋白和病毒粒子均存在于细胞核内。但目前对 BYDV-GAV ORF4 基因在真核细胞系统中的表达和亚细胞定位等方面的报道还很少。本研究中我们在杆状病毒-昆虫细胞系统中,成功表达了 GAV 株系的 ORF4 和 GFP(绿色荧光蛋白)的融合蛋白(GFP:ORF4)利用激光共聚焦显微镜观察其在细胞中的积累和亚细胞分布。进而通过缺失突变技术,鉴定出影响 ORF4 基因亚细胞分布的结构区域,为进一步研究 ORF4 基因在黄矮病毒 GAV 系统感染中的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、酶、试剂

昆虫细胞培养基、昆虫细胞系 *Sf21*、大肠杆菌

E. coli DH10Bac(含 Bacmid 穿梭载体)及转座质粒 pFastBac 均购自 GIBCO 公司。带有大麦黄矮病毒 GAV ORF4 基因的克隆 pGEM-GAVORF4 由本室张彦构建^[10],T4 DNA 连接酶、Taq 酶、限制性内切酶等购自 Promega 公司;其他的常规生化及分子生物学试剂均购自上海生物工程公司。

1.2 引物设计和 PCR 扩增

实验中所涉及的 ORF4 基因及其缺失基因片段 ND 和 CD 均以质粒 pGEM-GAV ORF4 为模板,利用表 1 中相应的引物通过 PCR 扩增获得。核纤层蛋白受体(Lamin B receptor)LBR 基因是以小鼠肌肉组织 cDNA 为模板,利用表 1 中相应的引物 PCR 扩增获得。

1.3 昆虫细胞和洋葱表皮细胞表达载体的构建

常规连接、转化及酶切分析按分子克隆实验手册进行。为了构建 pFastBac-GFP:ORF4、pFastBac-GFP:ND、pFastBac-GFP:CD 和 pFastBac-GFP:LBR,我们先利用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切构建了质粒 pFastBac-GFP(GFP 无终止密码子),然后将 ORF4、ND、CD 和 LBR 片段分别克隆到 *Bam*H I 和 *Not* I 位点,从而获得 pFastBac-GFP:ORF4、pFastBac-GFP:ND、pFastBac-GFP:CD 和 pFastBac-GFP:LBR 4 个昆虫细胞表达重组质粒,这些重组质粒经酶切鉴定和测序证实准确后转化杆状病毒-昆虫细胞表达系统(以本室李剑博士构建的 pFastBac-GFP 为对照^[11])。

为了构建 ORF4:GUS 融合基因的表达载体,ORF4 基因(无终止密码子)通过 *Hind* III 克隆到 pJIT166 载体中,获得 p35S-ORF4:GUS 洋葱细胞表达载体。

表 1 构建昆虫细胞表达载体所用的引物

Table 1 PCR primers used in this study

| Gene | Primer name | Primer sequence | Enzyme sites |
|------|-------------|--|-----------------|
| GFP | GFP F | 5' AGT GAATTCATGGTAGCAAGGGCGAGG 3' | <i>EcoR</i> I |
| | GFPnsc R | 5' TAA GGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATG 3' | <i>Bam</i> H I |
| MP | I-MP F | 5' GAA GGATCC ATGGCCCAAGGAGAGCAA 3' | <i>Bam</i> H I |
| | I-MP R | 5' TCT GCGGCCGCTCACCCTACTCTCCCTG 3' | <i>Not</i> I |
| | O-MP F | 5' GAT AAGCTTATGGCCCAAGGAGAGCAA 3' | <i>Hind</i> III |
| | O-MP R | 5' TGG AAGCTTCCCCTACTCTCCCTGAAT 3' | <i>Hind</i> III |
| ND | I-MP F | 5' GAA GGATCC ATGGCCCAAGGAGAGCAA 3' | <i>Bam</i> H I |
| | I-ND R | 5' GAC GCGGCCGCTCACTTCACCTGAAAGCGCTG 3' | <i>Not</i> I |
| CD | I-CD F | 5' CTAT GGATCCATGTACTCAAGTCTACCAC 3' | <i>Bam</i> H I |
| | I-MP R | 5' TCT GCGGCCGCTCACCCTACTCTCCCTG 3' | <i>Not</i> I |
| LBR | LBR F | 5' GCAT GGATCCATGCCAAGTAGGAAGTTTGTG3' | <i>Bam</i> H I |
| | LBR R | 5' TATG GCGGCCGCTCACTGTAAATGTAGGGAATATGC3' | <i>Not</i> I |

1.4 重组 Bacmid DNA 转染昆虫细胞 Sf21

昆虫细胞的继代培养、DH10Bac 的转化和重组 Bacmid DNA 转染昆虫细胞 Sf21 及鉴定等步骤参照 GIBCO 公司的 Bac-to-Bac 实验手册进行。

1.5 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析

重组病毒感染 Sf21 细胞 48~72h 后,用倒置荧光显微镜观察细胞发光情况,待 90% 以上细胞变成绿色细胞时,即可收获细胞。8000r/min 离心收集细胞并用悬浮液悬浮细胞,加等体积上样缓冲液混匀,沸水煮 5min,取 20 μ L 上清作 12.5% SDS-PAGE。电转移法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,使用碱性磷酸酶(AP)偶联的抗 GFP 单克隆鼠抗体和 BCIP/NBT 显色进行 Western blot 检测,并拍照记录实验结果。

1.6 激光共聚焦荧光显微镜观察

为确定 ORF4 及其突变蛋白的亚细胞定位,我们用激光共聚焦荧光显微镜(Olympus)进行观察。对照为一已知细胞质定位的 GFP 蛋白。将感染 48~72h 的细胞,制成临时装片,置于共聚焦荧光显微镜下观察并照相。

1.7 GUS 染色

经基因枪转化的洋葱表皮条,放在 GUS 染色液(100mmol/L 磷酸二氢钠、0.5mmol/L 高铁氰化钾、0.5mmol/L 亚铁氰化钾、1.0mmol/L X-gluc, 50mg/mL DMSO、0.1% Triton X-100)中,37 $^{\circ}$ C 过夜,95%乙醇脱色后,在光学显微镜下(Nikon DIGITAL CAMERA)观察并照相记录。

2 结果与分析

2.1 BYDV-GAV MP 的结构特征分析

利用 META Predict Protein Serve(http://www.embl-heidelberg.de/predict_protein/doc/meta_intro.html)网站,我们对 BYDV-GAV ORF4 编码的 154 个氨基酸序列进行信号肽序列、跨膜区和二级结构特征的预测。结果发现,ORF4 编码蛋白(P4)的 N 端存在 4 个 α -螺旋结构域,其中 α_1 为双亲的 α -螺旋结构域,C 末端富含碱性的氨基酸,无典型的信号肽结构(图 1 和表 2)。

```

MAQGEQGALAQFGEWLWSNPIE PDQNEELVDAQE EEGQLLYLDQQAGLRYSSQS
       $\alpha_1$                                  $\alpha_2$                                  $\alpha_3$ 
TTLRPTPQQSSSVPTFRNAQRFQVEYSSPTTVTRSQTSRLSLSHTRPPLQSAQC
       $\alpha_4$ 
LLNS TLRAHNQPWVATLTHSPSQNQPK PEPNRLTGRSSGRVRF
  
```

图 1 BYDV-GAV ORF4 编码的氨基酸序列

Fig. 1 Amino acid sequence of BYDV-GAV ORF4. The putative four α -helices (α_1 , α_2 , α_3 and α_4) are marked.

表 2 BYDV-GAV ORF4 序列中的 4 个 α -螺旋

Table 2 Four putative α -helices in BYDV-GAV ORF4

| α -helix | Residue position | Sequence |
|-----------------|------------------|---------------|
| α_1 | 4-16 | GEQGALAQFGEWL |
| α_2 | 29-39 | LVDAQE EEGQL |
| α_3 | 42-52 | LDQQAGLRYSS |
| α_4 | 71-81 | TFRNAQRFQVE |

2.2 BYDV-GAV ORF4 在杆状病毒-昆虫细胞系统中高效表达

杆状病毒-昆虫细胞系统作为一种真核表达系统,已被广泛用于外源蛋白的高效表达^[11-13]。通过脂质体转染方法在杆状病毒-昆虫细胞系统中表达了 ORF4 和报告基因 GFP 的融合蛋白(pFastBac-GFP:ORF4),以 GFP 为对照。感染 72 h 后,我们通过倒置荧光显微镜观察到 90% 以上的细胞发出绿色荧光。为了证实 ORF4 的表达,我们分别收集了感染 pFastBac-GFP:ORF4 和 pFastBac-GFP 的昆虫细胞,利用碱性磷酸酶(AP)偶联的抗 GFP 单克隆鼠抗体进行 Western blot 分析,结果显示:pFastBac-GFP:ORF4 感染的细胞产物出现一条 43kD 的杂交带,而对照 pFastBac-GFP 感染的细胞产物出现一条 26kD 的杂交带,这与预测的蛋白产物的分子量大小相吻合(GFP 的分子量为 26kD,P4 的分子量 17kD)(图 2)。这一结果证实了 ORF4 在昆虫细胞中能够高效表达,同时也说明 Bacmid 重组质粒构建的正确性。

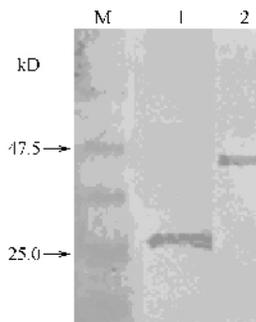


图 2 BYDV-GAV ORF4 在 Sf21 细胞中表达的 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis of expression products of BYDV-GAV ORF4 in Sf21 insect cells. M: protein marker; 1: GFP; 2: GFP:ORF4 fusion protein.

2.3 BYDV-GAV ORF4 定位于昆虫细胞的核膜上

为了研究 ORF4 编码的 P4 蛋白在昆虫细胞中的亚细胞分布,我们在激光共聚焦荧光显微镜下,观察荧光蛋白的表达和定位情况。在 40 倍的物镜下,可以清晰地看到在表达 GFP:ORF4 的细胞中,都有较强的绿色荧光,且聚集在细胞的核膜上(图 3, A 和 B),而对照 GFP 则呈整个细胞质分布(图 3, C 和 D)。

D)。为了进一步证实我们的观察,我们克隆了小鼠中一个已报道定位于细胞核膜上的核纤层蛋白受体基因 *LBR*^[14],并在杆状病毒-昆虫细胞系统中表达了 *LBR* 和 GFP 的融合蛋白(pFastBac-GFP:LBR)。激光共聚焦显微镜观察表明:LBR 确实定位在细胞核膜上,其定位模式与我们的目的蛋白 P4 相同(图 4)。这些实验结果充分表明 P4 是一个核膜定位蛋白,暗示了 BYDV-GAV ORF4 的产物能够进入细胞核,并且在核膜上聚集。

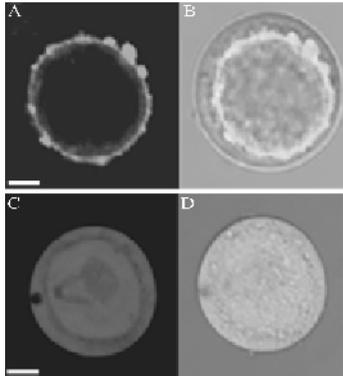


图 3 BYDV-GAV ORF4 与 GFP 的融合基因在昆虫细胞中的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of BYDV-GAV ORF4 in sf21 insect cells

A, B: subcellular localization of GFP:ORF4 in insect cells; C, D: subcellular localization of GFP alone in insect cells. The left panels (A, C) show images under fluorescent-field illumination, and the right panels (B, D) show images under an overlay of bright and fluorescent illumination. Bars = 50 μ m.

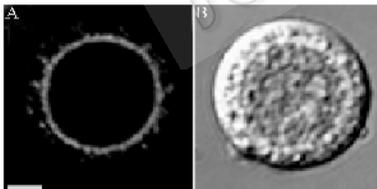


图 4 小鼠的核纤层蛋白基因 *LBR* 与 GFP 的融合蛋白在昆虫细胞中的核膜定位

Fig. 4 Nuclear envelope localization of the mouse *LBR* in sf21 insect cells

A: showing the image under fluorescent-field illumination; B: showing the image under an overlay of bright and fluorescent illumination. Bars = 50 μ m.

2.4 N 端 α -螺旋结构域对于 ORF4 的核膜定位是必需的

通过前面对 ORF4 的结构特征分析,知道它具有两个重要的功能区域,即 N 端区域(N-terminal Domain, ND)和 C 端区域(C-terminal Domain, CD)。ND 具有 α 螺旋结构域,CD 是富含碱性氨基酸区域。昆虫细胞表达系统中的表达和定位显示,ORF4 能够

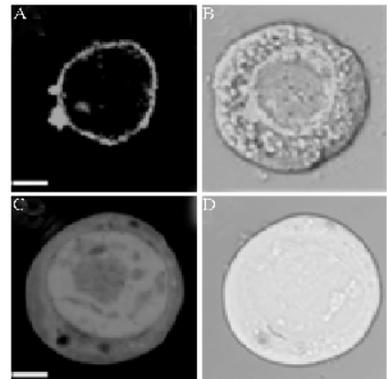


图 5 BYDV-GAV ORF4 N 端和 C 端缺失突变体与 GFP 的融合蛋白在昆虫细胞中的表达

Fig. 5 Subcellular localization of truncated versions of BYDV-GAV ORF4 in sf21 insect cells

A, B: subcellular localization of GFP:ND in insect cells; C, D: subcellular localization of GFP:CD in insect cells. The left panels (A, C) show images under fluorescent-field illumination, and the right panels (B, D) show images under an overlay of bright and fluorescent illumination. Bars = 50 μ m.

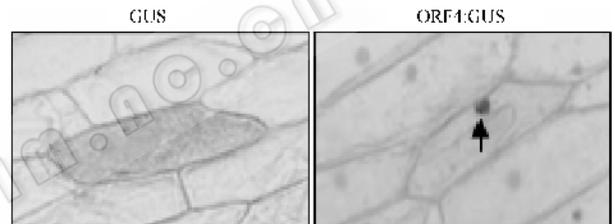


图 6 BYDV-GAV ORF4 与 GUS 的融合基因在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of BYDV-GAV ORF4 in onion epidermal cells

进入核内,并在核膜上有聚集。那么,在 ORF4 的结构中,究竟是 ND 还是 CD 区域影响 ORF4 的核膜定位?

为了回答这个问题,我们分别将 ND 和 CD 基因片段(都带有起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA)克隆到 pFastBac 上,又构建了 pFastBac-GFP:ND 和 pFastBac-GFP:CD 2 个表达载体,经重组 Bacmid 转化昆虫细胞,观察其亚细胞定位。结果显示,表达带有 ORF4-N 端区域的 ND 的细胞与表达野生型 ORF4 具有相同的定位模式,其荧光都聚集在核膜上(图 5, A 和 B),而表达缺失 ORF4-N 端区域 GFP:CD 突变体蛋白则定位发生了明显改变,其荧光呈整个细胞分布,与 GFP 的定位模式相似(图 5, C 和 D)。这一结果表明 N 端 α -螺旋结构域对于 ORF4 的核膜定位是必需的,而 C 端区域对于 ORF4 的核膜定位是不必要的。

3 讨论

17kD 蛋白,可能编码一个运动蛋白(movement protein)参与黄矮病毒在植物中的系统侵染^[8]。与 BYDV-PAV ORF4 基因相比,BYDV-GAV 基因组编码的 ORF4,其产物也是一个 17kD 蛋白,且与 PAV ORF4 基因在氨基酸水平上相似性为 69.9%(序列比较数据未显示)。由此,推测 BYDV-GAV 的 ORF4 基因可能编码一个运动蛋白,但这需要通过运动蛋白缺陷型病毒株系的互补实验验证。由于目前还没有 BYDV 可侵染性全长 cDNA 克隆的报道,因此这一工作尚有些困难。

利用杆状病毒-昆虫细胞系统表达了 GAV 的 ORF4,并观察到 ORF4 能进入细胞核,并在核膜上有聚集。为了进一步验证这一发现,我们利用基因枪介导的瞬时表达系统,在洋葱表皮细胞中表达了 GAV 的 ORF4 与 GUS 的融合基因。组织化学染色结果表明,ORF4 主要定位在细胞核内(图 6)。而且,在我们三次重复实验中,都没有观察到 ORF4 与胞间连丝的结合。

昆虫细胞和洋葱表皮细胞中的表达和定位实验,表明 ORF4 能进入细胞核内。对 GAV ORF4 编码的氨基酸序列进行分析,没有找到典型的核定位信号序列,暗示了 ORF4 可能编码一类新的核蛋白。GAV ORF4 蛋白的 N 端区域负责其核膜定位,而 N 端区域包含四个 α -螺旋结构域。从理论上推测,ORF4 编码的蛋白除了定位在核膜上,也应该能定位在细胞膜上。然而在我们的实验系统中,ORF4 编码的 P4 蛋白只定位于核膜上,而不在质膜上。人类 HIV 病毒编码的附属蛋白 V_{pr},也能够进入细胞核并只定位于核膜,参与核质的信号传递^[15]。由此推测 BYDV-GAV ORF4 编码的 P4 蛋白可能作为一个受体,参与核质间的信号传导,确切的作用机制还需要进一步的研究。

REFERENCES(参考文献)

[1] Rochow WF. Biological properties of four isolates of barley yellow dwarf virus. *Phytopath*, 1969, **59**: 1580 - 1589.
 [2] Rochow WF. Comparative diagnosis of BYDV by serological and aphid transmission tests. *Plant Disease Report*, 1979, **63**: 426 - 430.
 [3] Mayo MA, D 'Arcy CJ. Family Luteoviridae: A Reclassification of Luteoviruses. In: Smith HG, Barker H. eds. *The Luteoviridae*. CABI Publishing: Wallingford, 1999, pp. 15 - 22.

[4] Wang MB, Cheng Z, Keese P, et al. Comparison of the coat protein, movement protein and RNA polymerase gene sequences of Australian, Chinese, and American isolates of barley yellow dwarf virus transmitted by *Rhopalosiphum padi*. *Arch Virol*, 1998, **143**: 1005 - 1013.
 [5] Jin ZB, Wang XF, Chang SJ, et al. The complete nucleotide sequence and its organization of the genome of barley yellow dwarf virus-GAV. *Science in China Ser C Life Sciences*, 2004, **47**: 175 - 182.
 [6] Zhou G, Rochow WF. Differences among five stages of *Schizaphis graminum* in transmission of a barley yellow dwarf luteovirus. *Phytopath*, 1984, **74**: 1450 - 1453.
 [7] Zhou GH(周广和), Zhang SX(张淑香), Rochow WF. Identification of a barley yellow dwarf luteovirus strain transmitted by *Macrosiphum avenae* and *Schizaphis graminum*. *Acta Phytopathologica Sinica(植物病理学报)*, 1986, **16**: 17 - 22.
 [8] Chay CA, Gunasinge UB, Dinesh-Kumar SP, et al. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology*, 1996, **219**: 57 - 65.
 [9] Nass PH, Domier LL, Jakstys BP, et al. In situ localization of barley yellow dwarf virus-PAV 17-kDa protein and nucleic acids in oats. *Phytopathology*, 1998, **88**: 1031 - 1039.
 [10] Xia Z, Zhang Y, Liu K, et al. Preliminary study on the RNA-binding properties of BYDV-GAV and BYDV-GPV movement proteins. In *Barley Yellow Dwarf Disease: Recent Advances and Future Strategies*. Henry M and McNab A, eds. CIMMYT: Mexico DF, 2002, pp. 13 - 15.
 [11] Li J, Wang D. Cloning and *in vitro* expression of the cDNA encoding a putative nucleoside transporter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2000, **157**: 23 - 32.
 [12] Yao N(姚宁), Yao LG(姚伦广), Kan YC(阚云超), et al. Improvement of baculovirus expression system and purification of IL-6 protein expressed in insect cells. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2006, **22**(4): 572 - 580.
 [13] Wang CS(王长松), Liu YS(刘友生), Ge XD(葛晓冬), et al. Expression, purification of humanized truncated LBP in baculovirus expression vector system. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2004, **24**(12): 69 - 73.
 [14] Ellenberg J, Siggia ED, Moreira JE, et al. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol*, 1997, **138**: 1193 - 1206.
 [15] Jenkins Y, McEntee M, Weis K, et al. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol*, 1998, **143**: 875 - 885.