

# 马铃薯 Y 病毒衣壳蛋白的表达、纯化与结晶条件筛选

蒋君梅<sup>1</sup> 杜巧丽<sup>2</sup> 陈美晴<sup>2</sup> 严云龙<sup>1,2</sup> 谢鑫<sup>2\*</sup> 李向阳<sup>1\*</sup>

(1. 贵州大学, 绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室, 贵州大学精细化工研究开发中心, 贵阳 550025;

2. 贵州大学农学院, 农业微生物特色重点实验室, 贵阳 550025)

**摘要:** 为研究马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)衣壳蛋白(coat protein, CP)在体外表达及 CP 重组蛋白的晶体生长条件,通过 *EcoR I/Hind III* 酶切及连接技术构建 pET-32a-PVY CP 原核表达载体,对 PVY CP 的诱导剂浓度进行优化,利用蛋白质纯化及脱盐技术对 PVY CP 进行纯化和脱盐,并分析 PVY CP 重组蛋白的晶体生长条件。结果表明,成功构建了 pET-32a-PVY CP 原核表达载体;PVY CP 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 BL21(DE3)原核表达系统中,于 16℃ 下利用 0.8 mmol/L 异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导表达可获得高浓度的 PVY CP 可溶性蛋白;PVY CP 重组蛋白在二水甲酸镁处理下可生长出棒状结构晶体。

**关键词:** 马铃薯 Y 病毒; 衣壳蛋白; 可溶性蛋白; 表达纯化; 结晶

## Expression and purification of potato Y virus coat protein and screening of crystallization conditions

Jiang Junmei<sup>1</sup> Du Qiaoli<sup>2</sup> Chen Meiqing<sup>2</sup> Yan Yunlong<sup>1,2</sup> Xie Xin<sup>2\*</sup> Li Xiangyang<sup>1\*</sup>

(1. Fine Chemical Research and Development Center; Key Laboratory of Green Pesticides and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education; Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China; 2. Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China)

**Abstract:** In order to study the *in vitro* expression of potato virus Y (PVY) coat protein (CP) and the crystal growth conditions of PVY CP recombinant protein, pET-32a-PVY CP prokaryotic expression vector was constructed using *EcoR I/Hind III* digestion and linking technology, constructing, the concentration of inducer IPTG PVY CP was optimized for the prokaryotic expression system, PVY CP was expressed and purified in large quantities using protein purification and desalting technology, and the crystal growth conditions of PVY CP recombinant protein were analyzed. The results showed that the pET-32a-PVY CP prokaryotic expression vector was successfully constructed. The PVY CP was obtained in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) prokaryotic expression system at 16°C, and 0.8 mmol/L IPTG could induce expression to obtain high purity PVY CP. The PVY CP recombinant protein grew rod-like crystals under the conditions in presence of magnesium formate dihydrate.

**Key words:** potato virus Y; coat protein (CP); soluble protein; expression purification; crystallization

马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)通过蚜虫非持久性或汁液磨擦等方式传播,主要危害如马铃薯及烟草等茄科作物(马丽娜, 2006; 张福莉等,

2013)。PVY 最早由 Smith(1931)在马铃薯中发现,而后由于其传播方式的广泛性迅速在全球蔓延。据报道, PVY 侵染马铃薯时可导致其减产 80% 以上;

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD1700101), 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2022]一般 091), 国家自然科学基金(31960546)

\* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: xiexin2097757@163.com, xyli1@gzu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-13

侵染烟草时可导致其减产20%~50%,而当大面积暴发时将会导致绝收(王玉等,2018)。

PVY的病毒颗粒呈弯曲线状,不具包膜,是正链RNA病毒,基因组全长9.7 kb(Scholthof et al., 2011),该基因组的开放阅读框编码1个大的多聚蛋白,再通过自身编码的蛋白酶将其加工成可行使不同功能的成熟蛋白质(郭兴启等,2003;高芳銮等,2015)。马铃薯Y病毒属*Potyvirus*病毒外围包被着约2 000个衣壳蛋白(coat protein, CP)单元,其起着包被病毒基因组的作用,因此决定了CP可与寄主植物的各成分接触(李恒,2015)。CP在协助病毒核酸复制、帮助病毒进行胞间和长距离的运输、蚜虫传播以及抵御植物抗病毒机制等过程中发挥着重要作用(Liu et al., 2002; Bamunusinghe et al., 2011; Ivanov & Mäkinen, 2012)。CP的积累将会通过WRKY转录因子影响细胞基因的表达,从而影响病毒基因的表达(Huh et al., 2012);且CP和病毒复制相关蛋白互动也会影响病毒在细胞间的移动(Lee et al., 2011)。这些结果都表明PVY CP在侵染植物的过程中起着重要作用。目前,在农业生产中对PVY引起的农作物病毒病缺少有效的防治方法,可以通过选育抗病品种、激发植物自身的防御体系等途径来进行防控(萧凌,2015;李宁等,2018)。但由于培育植物抗病品种的时间长,成本高,而病毒毒株变异较快,使得该防控措施实施难度较大。同时,在PVY寄主植物中对其产生作用的抗病基因很少,或由于当前生物技术的局限性导致抗病基因难以被有效利用等。因此,从不同视角去寻求一种新的防治方法成为当前研究热点。

PVY作为一种严重影响经济作物产量和品质的病毒,尽管野生型PVY晶体结构已经解析(Kezar et al., 2019),但将重组表达的PVY CP作为分子靶标,研究重组表达的PVY CP体外表达、纯化及蛋白质晶体生长条件对基于PVY CP结构研发高效、高选择性的抗病毒剂具有重要意义。因此,本研究拟构建PVY CP重组表达载体、对重组蛋白进行可溶性诱导表达以及结晶生长条件的初步筛选,以期为进一步探索利用PVY CP作为分子靶标研发高效、高选择性的抗植物病毒剂提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株和质粒载体:PVY CP全基因组序列由贵州省烟草科学研究院贾蒙骞馈赠(夏范讲等,

2017);大肠杆菌*Escherichia coli*感受态细胞DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3),北京擎科新业生物技术有限公司;质粒pET32a载体由贵州大学农学院植物病理学教研室所保存并提供。

培养基:LB(Luria-Bertani)固体培养基成分为NaCl 10 g、酵母提取物5 g、胰蛋白胨10 g、琼脂粉16 g,蒸馏水定容至1 L;LB液体培养基为LB固体培养基中不添加琼脂制成。

试剂:*Eco*R I和*Hind* III限制性内切酶,宝日生物技术(北京)有限公司;FastPfu高保真DNA聚合酶、一抗Anti-His、二抗羊抗兔,北京全式金生物技术有限公司;氨苄西林、咪唑、异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、甘氨酸、PBS缓冲液、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),生工生物工程(上海)股份有限公司;琼脂糖凝胶试剂盒及琼脂糖凝胶电泳相关试剂、Solution I连接酶,北京擎科新业生物技术有限公司;蛋白质晶体筛选池液、蛋白质结晶试剂盒(Index、Crystal Screen、SaltRx、PEG/Ion2 Screen和PEG/Ion Screen),美国Hampton Research公司;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳仪、T100™ Thermal Cycler梯度PCR仪,美国Bio-Rad公司;Tanon-3500全自动数码凝胶图像分析系统,上海天能科技有限公司;AKTA™ Pure 25L蛋白纯化系统、Peristaltic pump-1蠕动泵、HisTrap™蛋白纯化镍柱(Ni-NTA)、Desalting蛋白脱盐柱,美国GE Healthcare公司;Centrifuge 5427 R低温离心机,德国Eppendorf公司;ZWYR-D2402恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;JY99-IIDN超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;96孔结晶板,上海迅晶生物科技有限公司;天能5200化学发光检测仪,上海天能科技有限公司;RIS4型恒温晶体柜,美国Formulatrix公司;UV-1200分光光度计,上海美谱达仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PVY CP基因目的片段克隆及原核表达载体构建

为克隆PVY CP保守区域的基因序列,通过NCBI数据库查找PVY CP基因序列,运用多序列比对软件Clustal X对PVY不同株系的CP多序列进行同源性比对,选取保守区域作为PVY CP基因目的序列,使用Primer Premier 5.0软件设计引物PVY CP-F(5'-gaattcATGGGAAATGACACAATCGAT-3')和PVY CP-R(5'-aagcttTCACATGTTCTTCACTCCA-

A-3'), 分别含 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点(小写字母), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以 PVY 全基因组 DNA (NCBI 收录号 KU724101) 作为模板进行 PCR 扩增。50  $\mu$ L 扩增体系: FastPfu 高保真 DNA 聚合酶 1  $\mu$ L、5 $\times$ Buffer 10  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTPs 4  $\mu$ L、PVY 全基因组 DNA 1  $\mu$ L、上下游引物各 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 32  $\mu$ L; 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 32 个循环。将 PCR 扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后切胶回收, 利用回收试剂盒回收纯化 PCR 扩增产物, 将回收纯化产物送北京擎科新业生物科技有限公司测序。

为进一步研究 PVY CP 的体外表达特性, 使用 *EcoR* I/*Hind* III 酶对质粒 pET-32a 进行双酶切, 40  $\mu$ L 酶切体系: pET-32a 质粒 20  $\mu$ L、Green Buffer 4  $\mu$ L、*EcoR* I 2  $\mu$ L、*Hind* III 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ L; 在 PCR 仪中于 37 $^{\circ}$ C 反应 4.5 h, 将酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 将含有目标条带的区域进行切割回收, 用琼脂糖凝胶试剂盒回收; 然后将胶回收产物与 PVY CP 基因扩增目的片段进行连接, 10  $\mu$ L 连接体系: 双酶切 pET-32a 质粒 1  $\mu$ L、PVY CP 基因 PCR 产物 4  $\mu$ L、Solution I 连接酶 5  $\mu$ L; 16 $^{\circ}$ C 连接 3 h; 将连接产物通过 42 $^{\circ}$ C 热激 45 s 转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 将转化所得菌液涂布在含有氨苄西林的 LB 平板上, 于 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~16 h, 挑取单克隆送北京擎科新业生物技术有限公司进行测序验证。

### 1.2.2 PVY CP 序列的生物信息学分析

为了解 PVY CP 的基本表达性质, 对其跨膜性、信号肽、疏水性和可溶性进行分析。采用 TMHMM Server 2.0 在线网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对 PVY CP 跨膜区进行预测; 采用 SignalP 4.1 Server 在线网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 对 PVY CP 的信号肽进行预测; 采用 ProtScale 在线网站 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 对 PVY CP 的疏水性进行预测; 采用蛋白可溶性预测网站 (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>) (Hebditch et al., 2017) 对 PVY CP 的可溶性进行分析。

### 1.2.3 PVY CP 的可溶性表达测定

为明确 PVY CP 的最佳可溶性表达条件, 将重组质粒 pET-32a-PVY CP 于 42 $^{\circ}$ C 热激 45 s 后转入大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3) 中, 将转化所得菌液涂布在含氨苄西林的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~16 h, 随机挑选 3~5 个单菌落分别置于 10 mL LB 液体培养基中于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下摇培 2~

4 h, 当菌液浓度 OD<sub>600nm</sub> 在 0.6~0.8 时取出, 分别加入不同浓度 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 的 IPTG, 16 $^{\circ}$ C 诱导表达 12~16 h, 然后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 条件下离心 2 min 收集菌液, 加入 400  $\mu$ L PBS 缓冲液重悬菌体, 用超声波细胞粉碎机进行细胞破碎, 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 条件下离心 2 min, 取上清液并加入 5 $\times$ Loading Buffer, 100 $^{\circ}$ C 下金属浴 10 min 使蛋白变性, 用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测目标蛋白的表达量, 确定最佳表达条件后, 使用该条件进行 PVY CP 的大量表达。

### 1.2.4 PVY CP 的纯化脱盐和 Western blot 鉴定

将 1.2.3 获得大量表达的 PVY CP 通过低温离心机收集菌体, 加入裂解缓冲液 (30 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L 氯化钠、10% 甘油、0.072% 巯基乙醇, pH 8.0) 进行菌体重悬, 直至搅拌均匀, 在 35% 功率下超声破碎细胞 30 min, 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 条件下离心 30 min, 收集上清液, 去沉淀, 使用缓冲液 A (20 mmol/L 咪唑、30 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L 氯化钠、10% 甘油, pH 8.0) 和缓冲液 B (350 mmol/L 咪唑、300 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L 氯化钠、10% 甘油, pH 8.0) 平衡 HisTrap<sup>TM</sup> Excell 蛋白纯化镍柱, 将上清液通过蠕动泵以 2 mL/min 进行单循环挂柱 2~3 次, 使用 AKTA<sup>TM</sup> Pure 25L 蛋白纯化系统将 HisTrap<sup>TM</sup> Excell 蛋白镍柱中的蛋白洗脱到缓冲液 B 中, 将收集的洗脱液进行 12% SDS-PAGE 分析。通过 SDS-PAGE 分析将含有 PVY CP 的洗脱液于 4 $^{\circ}$ C、4 800 r/min 离心 1 h, 取上清液用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 将过滤后的洗脱液流经至 HisTrap<sup>TM</sup> Desalting 蛋白脱盐柱中, 将其洗脱至 SEC 缓冲液 (300 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L NaCl, pH 8.0) 中, 分别于洗脱 0、24、48 和 72 h 收集相应洗脱液并进行 12% SDS-PAGE 分析, 最终获得纯化脱盐的蛋白。

采用 Western blot 方法验证纯化蛋白。首先取纯化后蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在 250 mA 条件下转膜 90 min, 使用 5% 脱脂奶粉在 37 $^{\circ}$ C 下缓慢振荡封闭 2 h; 加入一抗 Anti-His, 37 $^{\circ}$ C 缓慢振荡孵育 2 h; 用 1 $\times$ PBST 缓冲液洗涤 4 次, 每次 10 min; 加入二抗羊抗兔, 37 $^{\circ}$ C 缓慢振荡孵育 1 h; 用 1 $\times$ PBST 缓冲液洗涤 4 次, 每次 10 min; 加入 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, TMB) 显色, 采用化学发光检测仪检测蛋白表达信号。

### 1.2.5 PVY CP 结晶条件的筛选

为了解 PVY CP 蛋白结晶生长条件, 采用悬滴

法培养晶体。将不含咪唑的PVY CP溶液在4℃、4 800 r/min条件下离心1 h,浓缩其浓度为2 mg/mL,然后在96孔结晶板孔腔内加300 μL结晶液,并将PVY CP溶液分别与参照Index、Crystal Scribe、SaltRx、PEG/Ion2 Screen和PEG/Ion Screen试剂盒说明书配制的结晶缓冲溶液(每个试剂盒包含96种筛选条件)在硅胶片上以1:1的比例混合均匀,将硅胶片悬挂于有结晶液的结晶板孔腔上方,含有混合液的一面向结晶板孔腔内侧,置于20℃恒温晶体柜中等

待晶体生长,定期观察晶体生长状况。

## 2 结果与分析

### 2.1 pET-32a-PVY CP重组表达载体构建

将构建的pET-32a-PVY CP重组质粒进行测序,其测序结果如图1所示,将测序成功的质粒进行EcoR I/Hind III双酶切验证,在约807 bp处有1条明显的目标条带,表明pET-32a-PVY CP重组表达载体构建成功(图2)。

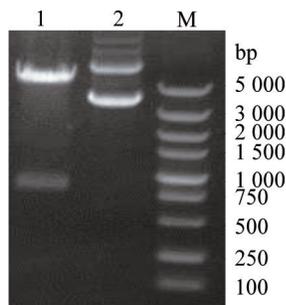
```
ATGGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCA
CGGTAGCATTCAACCAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACAT
CTGGAACACTACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCAAG
AGTAAAGGTGCACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTATGCTCCACAGCAAAT
TGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACATGGTATGAAGCAGTAC
AACTTGCATACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTT
TGGTGCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGG
AGATGAACAAGTCAATACCCGCTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACTTA
GGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAA
AAGGAACCGTATATGCCACGATATGGTTTGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGC
TCGCTATGCTTTTACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAGTGAGGGCTAGAGAGG
CACACATTCAAAATGAAGGCCGACGCTTTAAAATCAGCTCAATCTCGACTTTTCGGATTG
GATGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAAAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTTTC
TCCAAGTATGCATACTACTTGGAGTGAAGAACATGTGA
```

图1 含有pET-32a-PVY CP菌落的基因测序

Fig. 1 Gene sequence of recombinant plasmid containing pET-32a-PVY CP

### 2.2 PVY CP的生物信息学分析

PVY CP基因编码267个氨基酸,无跨膜区;编码蛋白无信号肽序列;局部具有较好的亲水性;预测PVY CP标度溶解度为0.501,表明PVY CP基因编码表达的蛋白具有可溶性。



1: 经EcoR I和Hind III酶切后的重组表达质粒; 2: 质粒DNA; M: DNA marker。1: The recombinant expression plasmid digested with EcoR I and Hind III; 2: plasmid DNA; M: DNA marker.

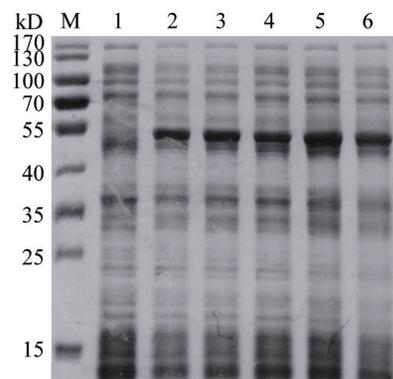
图2 pET-32a-PVY CP重组质粒双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pET-32a-PVY CP recombinant plasmid via double restriction digestion

### 2.3 PVY CP的可溶性诱导表达条件

随着IPTG诱导浓度逐渐增大,PVY CP重组蛋

白的表达量呈上升趋势,当诱导温度为16℃、IPTG诱导浓度为0.8 mmol/L时表达量最高(图3)。



M: 蛋白marker; 1~6: 分别为PVY CP在0、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 mmol/L IPTG诱导下表达的细胞上清液。M: Protein marker; 1-6: supernatant from PVY CP culture after IPTG induction at 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L.

图3 PVY CP的可溶性表达分析

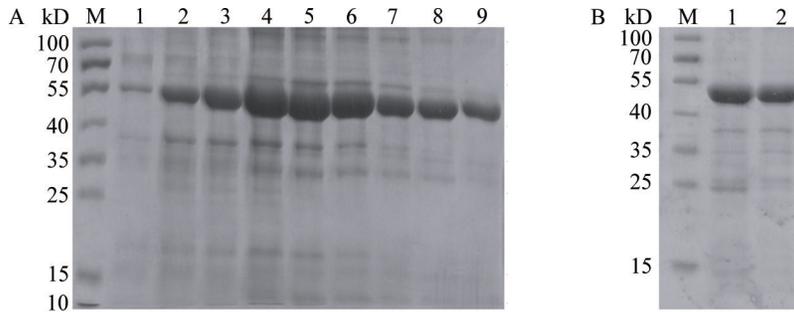
Fig. 3 Soluble expression analysis of PVY CP

### 2.4 PVY CP的纯化与Western blot鉴定

将PVY CP在16℃、0.8 mmol/L IPTG条件下大量诱导表达,纯化结果显示只有1个单峰,将单峰处的溶液取样并进行12% SDS-PAGE验证,结果表明单峰处所出蛋白为PVY CP重组蛋白(图4-A)。将

PVY CP 重组蛋白从咪唑盐溶液中洗脱出来进行 12% SDS-PAGE 验证(图 4-B),证实该蛋白为 PVY CP 重组蛋白;并分别在洗脱 0、24、48 和 72 h 时进行

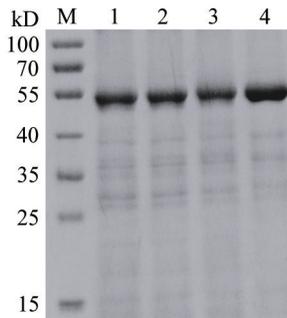
取样,经 12% SDS-PAGE 验证发现该蛋白较稳定(图 5)。Western blot 结果显示纯化蛋白为 PVY CP 重组蛋白(图 6)。



A: PVY CP 的紫外吸收峰图,1~9 为 PVY CP 蛋白在不同峰值时的纯化液; B: 脱盐 PVY CP 浓缩后的表达量,1~2 为 PVY CP 经洗脱咪唑后的纯化液; M: 蛋白 marker。  
A: UV absorption peak diagram of PVY CP, 1~9 are PVY CP protein purification solutions at different peaks; B: concentrated expression of desalinated PVY CP, 1~2 are the purified solutions of PVY CP protein after eluting imidazole; M: protein marker.

图 4 PVY CP 蛋白经 Ni-NTA(A)和脱盐柱(B)纯化后的 SDS-PAGE 结果

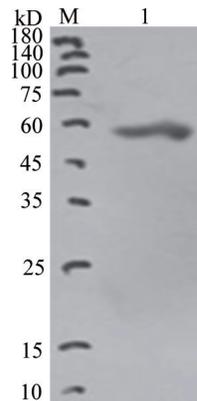
Fig. 4 SDS-PAGE results of PVY CP purified with Ni-NTA (A) and desalting column (B)



1~4: 分别为 PVY CP 在洗脱 72、48、24、0 h 时的剩余量; M: 蛋白 marker。1~4: Remaining amount of PVY CP at 72, 48, 24, 0 h after eluting; M: protein marker.

图 5 PVY CP 在不同时间点的降解量

Fig. 5 The degradation of PVY CP at different time points



M: 蛋白 marker; 1: PVY CP 重组蛋白。

M: Protein marker; 1: PVY CP fusion protein.

图 6 PVY CP 重组蛋白的 Western blot 分析

Fig. 6 Western blot analysis of PVY CP fusion protein

## 2.5 PVY CP 蛋白结晶条件筛选

在所有筛选的 Index、Crystal Screen、SaltRx、PEG/Ion2 Screen 和 PEG/Ion Screen 的晶体生长条件中,只在 Index 试剂盒中 15 号条件(pH 7.5 的 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid, HEPES)+0.5 mol/L 二水甲酸镁)下生长出棒状晶体(图 7),其他筛选条件下均无晶体产生。

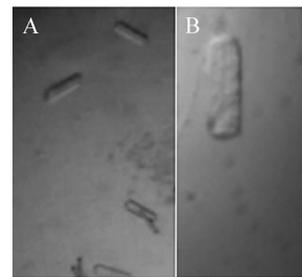


图 7 Index 试剂盒 15 号条件下 PVY CP 重组蛋白生长 7 d(A)和 49 d(B)的晶体形态

Fig. 7 Crystal morphology of PVY CP fusion protein grown for 7 d (A) and 49 d (B) under the no. 15 condition of Index kit

## 3 讨论

马铃薯 Y 病毒属病毒虽然只编码 1 个多聚蛋白,但该多聚蛋白所分解的成熟蛋白在植物体生命周期中发挥的功能却极其复杂,而且大部分属于多功能性蛋白(Lefkowitz et al., 2018)。CP 作为一种结构蛋白,目前已有很多研究证明其在病毒的整个

生命周期中具有极其重要的作用,如参与病毒传播(Blanc et al., 1997)、复制、扩增和抗性(Scholthof et al., 2011; Spoustová et al., 2013)等重要过程。正是由于CP在植物体各个生命过程中均发挥着作用作用,决定了该蛋白的结构相对保守(苗艳梅和赵敏, 2019)。

Rosano & Ceccarelli(2014)指出,在蛋白原核表达过程中,细菌表达菌株、诱导温度和诱导剂IPTG浓度均能对表达结果产生影响。本研究通过PCR技术获得了pET-32a-*PVY CP*融合表达载体,该融合表达载体可表达大量可溶性CP蛋白,1 L大肠杆菌可融合表达1~5 mg 纯化后的PVY CP,表达后的蛋白在缓冲溶液中很稳定。此外,本研究还构建了重组表达载体pET-28a-*PVY CP*,由于没有促溶标签,大部分PVY CP均在沉淀中,以包涵体的形式存在,而在pET-32a-*PVY CP*重组表达载体中,s-tag促进了PVY CP的表达(另文发表)。本研究通过对PVY CP蛋白可溶性表达条件进行筛选,最终获得相对分子质量约为55 kD的可溶性蛋白。关祥斌等(2008)对烟草上的马铃薯Y病毒CP进行原核表达探索,发现重组表达菌株均为大肠杆菌BL21(DE3)pLysS,这与本研究中PVY CP表达菌株相同,且经过分析PVY CP主要以单体的形式存在,利用His抗体验证也得到了相同结果。随后以单体的形式进行了晶体培养,在Index试剂盒第15号条件下,即在pH 7.5的0.1 mol/L HEPES、0.5 mol/L 二水甲酸镁条件下,长出多颗晶体,晶体为棒状,随即对Index试剂盒第15号条件进行优化,调整沉淀剂0.5 mol/L 二水甲酸镁浓度、pH和替换HEPES盐为PBS或Tris-HCl,并进行优化组合,获得了直径大小为0.15 cm的晶体(另文发表),研究结果将为进一步培养高分辨率晶体提供参考。

### 参 考 文 献 (References)

- Bamunisinghe D, Seo JK, Rao ALN. 2011. Subcellular localization and rearrangement of endoplasmic reticulum by bromemosaic virus capsid protein. *Journal of Virology*, 85(6): 2953–2963
- Blanc S, López-Moya JJ, Wang RY, García-Lampasona S, Thornbury DW, Pirone TP. 1997. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a *Potyvirus*. *Virology*, 231(1): 141–147
- Gao FL, Chang F, Shen JG, Xie LH, Zhan JS. 2015. Complete genome analysis of a PVY<sup>NTN-NW</sup> recombinant isolate from Yulin of China. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(2): 270–279 (in Chinese)
- [高芳鑫, 常飞, 沈建国, 谢联辉, 詹家绥. 2015. PVY<sup>NTN-NW</sup> 榆林分离物的全基因组序列测定与分析. *中国农业科学*, 48(2): 270–279]
- Guan XB, Wang F, Feng ZQ, Jiang SJ. 2008. Cloning, prokaryotic expression of the full-length ORF of PVY CP gene isolated from infected tobacco plants. *Journal of Henan Agricultural University*, 42(3): 337–340 (in Chinese) [关祥斌, 王枫, 冯振群, 蒋士君. 2008. 烟草马铃薯Y病毒外壳蛋白基因全长ORF的克隆与原核表达. *河南农业大学学报*, 42(3): 337–340]
- Guo XQ, Li H, Zhang JD, Zhu XP, Wang HG. 2003. Evidence for rna-mediated resistance to PVY<sup>N</sup> in tobacco plants transformed with the viral coat protein gene. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 9(4): 372–376 (in Chinese) [郭兴启, 李茜, 张杰道, 竺晓平, 王洪刚. 2003. 表达马铃薯Y病毒外壳蛋白基因的转基因烟草抗病机制. *应用与环境生物学报*, 9(4): 372–376]
- Hebditch M, Carballo-Amador MA, Charonis S, Curtis R, Warwicker J. 2017. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*, 33(19): 3098–3100
- Huh SU, Choi LM, Lee GJ, Kim YJ, Paek KH. 2012. *Capsicum annuum* WRKY transcription factor d (CaWRKYd) regulates hypersensitive response and defense response upon *Tobacco mosaic virus* infection. *Plant Science*, 197: 50–58
- Ivanov KI, Mäkinen K. 2012. Coat proteins, host factors and plant viral replication. *Current Opinion in Virology*, 2(6): 712–718
- Kežar A, Kavčič L, Polák M, Nováček J, Gutiérrez-Aguirre I, Žnidarič MT, Coll A, Stare K, Gruden K, Ravnikar M, et al. 2019. Structural basis for the multitasking nature of the potato virus Y coat protein. *Science Advances*, 5(7): e3808
- Lee CC, Ho YN, Hu RH, Yen YT, Wang ZC, Lee YC, Hsu YH, Meng M. 2011. The interaction between bamboo mosaic virus replication protein and coat protein is critical for virus movement in plant hosts. *Journal of Virology*, 85(22): 12022–12031
- Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1): 708–717
- Li H. 2015. Physiological studies on the interaction between PVY HC-pro, CP and tobacco chloroplast proteins. PhD thesis. Beijing: China Agricultural University (in Chinese) [李恒. 2015. PVY HC-Pro和CP蛋白与烟草叶绿体蛋白互作的生理功能研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学]
- Li N, Yao MH, Wang F, Yin YX. 2018. Review of potato virus Y (PVY) on pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecular Plant Breeding*, 16(3): 813–820 (in Chinese) [李宁, 姚明华, 王飞, 尹延旭. 2018. 辣椒抗马铃薯Y病毒(PVY)研究进展. *分子植物育种*, 16(3): 813–820]
- Liu SJ, He XH, Park G, Josefsson C, Perry KL. 2002. A conserved capsid protein surface domain of cucumber mosaic virus is essential for efficient aphid vector transmission. *Journal of Virology*, 76(19): 9756–9762

- Ma LN. 2006. The interaction between *Myzus persicae* (Sulzer) and hosts & tobacco mosaic viruses. Master thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [马丽娜. 2006. 烟蚜与寄主、烟草花叶病毒相互作用的研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Miao YM, Zhao M. 2019. Potato virus Y virus coat protein function. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, (3): 165-168 (in Chinese) [苗艳梅, 赵敏. 2019. 马铃薯Y病毒属病毒外壳蛋白功能. 黑龙江农业科学, (3): 165-168]
- Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5: 172
- Scholthof KBG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, et al. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9): 938-954
- Smith KM. 1931. On the composite nature of certain potato virus diseases of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective methods of transmission. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Containing Papers of a Biological Character*, 109(762): 251-267
- Spoustová P, Synková H, Valcke R, Čeřovská N. 2013. Chlorophyll a fluorescence as a tool for a study of the *Potato virus Y* effects on photosynthesis of nontransgenic and transgenic *Pssu-ipt* tobacco. *Photosynthetica*, 51(2): 191-201
- Wang Y, Huang XD, Wei DF, Wen L, Yang JT, Chen XZ, Tian YP. 2018. Prokaryotic expression of *Potato virus Y* coat protein and preparation of antiserum. *Shandong Agricultural Sciences*, 50(1): 111-114 (in Chinese) [王玉, 黄显德, 魏代福, 温亮, 杨举田, 陈秀斋, 田延平. 2018. 马铃薯Y病毒衣壳蛋白的原核表达及抗血清制备. 山东农业科学, 50(1): 111-114]
- Xia FJ, Guo YS, Jia MA. 2017. Full sequence cloning and phylogenetic analysis of *Potato virus Y* predominant strains collected from tobacco field in Guizhou Province. *Journal of China Agricultural University*, 22(7): 34-39 (in Chinese) [夏范讲, 郭玉双, 贾蒙骛. 2017. 贵州烟田马铃薯Y病毒优势株系全序列克隆及系统进化分析. 中国农业大学学报, 22(7): 34-39]
- Xiao L. 2015. New pesticides for virus disease prevention and control. *Pesticide Market News*, (6): 48 (in Chinese) [萧凌. 2015. 病毒病防控新型农药. 农药市场信息, (6): 48]
- Zhang FL, Liu TT, Li CC. 2013. The detection of CMV, PVY in aphid (*Myzus persicae*) from five tobacco regions of Guizhou Province. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 32(2): 101-105 (in Chinese) [张福莉, 刘童童, 李创创. 2013. 贵州五烟区烟蚜CMV、PVY带毒率检测. 山地农业生物学报, 32(2): 101-105]

(责任编辑:李美娟)