

甘薯卷叶病毒江苏分离物基因组全长序列测定 及其外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达

乔贞贞¹, 秦艳红^{2,3}, 乔奇^{2,3}, 张德胜^{2,3},
田雨婷^{2,3}, 高洁¹, 张振臣^{2,3*}

(1. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130000; 2. 河南省农业科学院 植物保护研究所,
河南 郑州 450002; 3. 河南省农作物病虫害防治重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了制备甘薯卷叶病毒(SPLCV)的特异性抗体, 克隆了甘薯卷叶病毒江苏分离物 SPLCV(JS : XZ : 3-2)的全长基因, 并对其基因结构及分子变异情况进行分析, 同时对外壳蛋白(CP)基因进行了克隆和表达。利用 PCR 方法扩增并克隆了 SPLCV(JS : XZ : 3-2)的全基因组, 测序分析表明, SPLCV(JS : XZ : 3-2)基因组全长为 2 834 bp, 含有 6 个开放阅读框架, 与已发表的 SPLCV 其他分离物相比, 全基因组核苷酸序列相似性为 82.7%~94.4%。其中, CP 基因由 765 个核苷酸组成, 共编码 254 个氨基酸残基。SPLCV CP 基因核苷酸序列与其他分离物的相似性在 89.2%~90.6%, 其中与 SPLCV 美国分离物(HQ333135)的相似性最高, 为 90.6%; 与日本分离物(AB433788)的相似性最低, 为 89.2%; 与中国大陆分离物(FJ515896)CP 基因的核苷酸序列相似性为 90.2%。将 SPLCV CP 基因克隆到原核表达载体 pGEX-4T-3 上, 获得重组质粒, 经 IPTG 诱导表达、SDS-PAGE 分析得到了大小约为 54.3 kD 的融合蛋白条带, 说明 CP 基因在大肠杆菌中得到了高效表达。

关键词: 甘薯卷叶病毒; 基因组序列; 外壳蛋白基因; 原核表达

中图分类号: S435.311 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)04-0086-04

Sequencing of Sweet Potato Leaf Curl Virus Genome and Expression of Coat Protein Gene in *E. coli*

QIAO Zhen-zhen¹, QIN Yan-hong^{2,3}, QIAO Qi^{2,3}, ZHANG De-sheng^{2,3},
TIAN Yu-ting^{2,3}, GAO Jie¹, ZHANG Zhen-chen^{2,3*}

(1. Faculty of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130000, China;
2. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
3. Henan Key Laboratory of Crop Pest Control, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The complete genome of sweet potato leaf curl virus (SPLCV) isolate JS : XZ : 3-2 from Jiangsu province was amplified by PCR. Analysis of the genomic sequence showed that the genome of SPLCV(JS : XZ : 3-2) was composed of 2 834 nt and included six open reading frames (ORFs). Compared with other isolates previously reported, the nucleotide sequence identity of the complete genome was 82.7%–94.4%. The CP gene consisted of 765 nt and encoded 254 amino acid residues. The nucleotide sequence of CP gene was 89.2%–90.6% identical to other isolates previously reported. The highest identity was 90.6% with the USA isolate(HQ333135) and the lowest identity was 89.2% with the Japan isolate(AB433788). The nucleotide sequence of CP gene was 90.2% identical to the China isolate(FJ515896). The CP gene was cloned into the expression vector pGEX-4T-3 for over-expression in prokaryotic cells. The SDS-PAGE result

收稿日期: 2011-11-29

基金项目: 国家甘薯产业技术体系建设项目(CARS-11-B-07)

作者简介: 乔贞贞(1987-), 女, 河南焦作人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物病毒学。E-mail: qiaozhenzhen1987@163.com

* 通讯作者: 张振臣(1964-), 男, 河南延津人, 研究员, 博士, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: zhangzhenchen@126.com

showed that a specific fusion protein about 54.3 kD was produced after induction by IPTG.

Key words: sweet potato leaf curl virus (SPLCV); complete genomic sequence; coat protein gene; prokaryotic expression

甘薯卷叶病毒(sweet potato leaf curl virus, SPLCV)是侵染甘薯的主要病毒之一,可引起甘薯叶片上卷、叶脉变黄、植株矮化等症状,对甘薯产量影响较大,一般可造成 26%~63% 的产量损失^[1]。SPLCV 属于双生病毒科(Geminiviridae),菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)病毒,由白粉虱以持久方式传播^[2]。SPLCV 基因组为单链环状 DNA 分子,大小约为 2.8 kb,含有 6 个开放阅读框架(ORF),病毒链上编码 AV1 和 AV2,互补链上编码 AC1、AC2、AC3 和 AC4,其中 AV1 ORF 编码病毒的外壳蛋白(CP)。

目前,美国、日本、以色列、西班牙等国已有 SPLCV 发生的报道^[3]。2006 年,Luan 等^[4-5]首先在我国甘薯上发现了 SPLCV 的存在,并对其全基因组序列进行了测定。但有关 SPLCV 在我国甘薯上的发生、分布及变异情况还不清楚。因此,在大肠杆菌中表达该病毒的 CP 基因,制备特异性抗体,建立快速高效的血清学检测技术,将有助于 SPLCV 的检测和防治。本试验针对 SPLCV 的江苏分离物 SPLCV(JS:XZ:3-2),利用 PCR 方法克隆了其全长基因,完成了序列测定,并首次在大肠杆菌中高效表达了其 CP 基因,为抗体的制备及血清学检测方法的建立奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 病毒材料

甘薯病毒样品采集自江苏省徐州市农业科学院试验田,其症状表现为叶缘上卷,植株矮化。该样品编号为 JS:XZ:3-2。

1.2 菌株及载体

大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS、TG1 以及原核表达载体 pGEX-4T-3 由河南省农作物病虫害防治重点实验室保存,克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。

1.3 酶及试剂

DNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒、DNA T4 连接酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司,AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒、卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(Amp)、甘氨酸、丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、IPTG 等购自上海生工生物工程有限公司,其他常用试剂均为国产分析纯。

1.4 SPLCV 江苏分离物基因组的克隆和序列测定

1.4.1 引物设计

利用文献[5]中设计的 SPLCV 的简并引物 BM-V (5'-KSGGGTCGACGTCAT-CAATGACGTTTAC-3') 和 BM-C (5'-AAR-GAATTCATKGGGGCCCAARARRGACTGGC-3') 扩增 SPLCV(JS:XZ:3-2) 的 DNA-A 近全长基因序列。根据测定的近全长序列再设计一对引物 SPLCV-short-5' (5'-CAGAAGGGAGATTGGACATCGCAG-3') 和 SPLCV-short-3' (5'-AATGTCATGGATCCGCTGCGC-3'), 用于扩增 SPLCV 近全长序列短缺的部分,经序列拼接后即可获得 SPLCV DNA-A 的全长序列。引物均由 TaKaRa 公司合成。

1.4.2 PCR 扩增 利用 DNA 提取试剂盒提取感病甘薯叶片的总 DNA,以总 DNA 为模板,分别利用 BM 正反向引物和 SPLCV-short 正反向引物对样品进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系(50 μ L)为:总 DNA 2.5 μ L,10 \times Ex Taq buffer 5 μ L,正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L,Mg²⁺ (25 mmol/L) 0.75 μ L,Ex Taq (5 U/ μ L) 0.25 μ L,ddH₂O 35.5 μ L。

PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸(BM 引物 PCR 延伸 3 min,SPLCV-short 引物 PCR 延伸 30 s),共 30 个循环;最后一次循环后,72 $^{\circ}$ C 补平 10 min。

1.4.3 序列测定及分析 PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后,利用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段。将回收片段与载体 pMD19-T 连接,转入大肠杆菌 TG1 中,经蓝白斑筛选和菌液 PCR 验证获得阳性克隆,送 TaKaRa 公司完成序列测定。利用软件 BLAST、DNAMAN 和 ORF Finder 对序列进行分析和拼接。

1.5 SPLCV CP 基因原核表达载体的构建

1.5.1 引物设计 根据分析确定的 SPLCV(JS:XZ:3-2)CP 基因序列设计引物:正向引物 SPLCV-CP5 (5'-AAGTCGACATGACAGGGCGAATTC-CCGTTTC-3'),引入了酶切位点 *Sal* I;反向引物 SPLCV-CP3 (5'-GCGCTCGAGTTAATTATTATGTGAATCAT-3'),引入了酶切位点 *Xho* I。

1.5.2 PCR 扩增及重组表达载体的构建 以 1.4.3 中获得的近全长基因片段(由 BM 引物扩增)连接转化的质粒为模板,利用 SPLCV-CP 正、反向引物进行 PCR 扩增。使用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Xho* I 对纯化所得 PCR 产物进行处理,然后与经同样酶处理的 pGEX-4T-3 载体连接,转入大肠杆菌 TG1 中,以碱解

法提取质粒,通过 PCR 和酶切鉴定筛选阳性克隆。

1.6 SPLCV CP 基因的诱导表达和 SDS-PAGE 分析

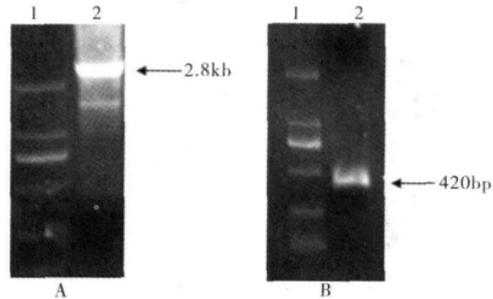
重组质粒经测序验证正确后,将其转入大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 中。在含有 Amp 的 LB 平板上挑取单菌落,接入 3 mL 含有 Amp(100 μg/mL)的 LB 培养基中,37 °C 活化过夜,按 1 : 100 的比例接入 10 mL 含 Amp(100 μg/mL) 的 LB 培养基中,180 r/min 振荡培养 2~3 h 至菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.6 左右。取 1 mL 菌液作为对照,剩余菌液中加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L,以 120 r/min 的低转速诱导过夜。取 1.5 mL 培养液,经 8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体,加入 50 μL SDS-PAGE 样品缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl,2% SDS,5% 巯基乙醇,10% 甘油、0.1% 溴酚蓝,pH 值 6.8),煮沸 10 min,离心后取上清,制备 12.5% 的凝胶进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果与分析

2.1 SPLCV 江苏分离物基因组全长序列的测定及分析

以感病甘薯叶片总 DNA 为模板,使用 BM 引物经 PCR 扩增,得到一条约 2.8 kb 的目的条带;使用 SPLCV-short 引物 PCR 扩增所得目的片段约为 420 bp,均与设计相符(图 1)。将目的片段分别克隆到 pMD19-T 载体上进行序列测定,经序列拼接后可知,SPLCV (JS : XZ : 3-2) DNA-A 序列全长为

2 834 bp。其与已发表的 SPLCV 其他分离物的 DNA-A 核苷酸序列相似性为 82.7%~94.4%,其中,与中国大陆分离物 CN-SH(EU309693)相似性最高,为 94.4%。经过序列分析,SPLCV(JS : XZ : 3-2)基因组共含有 6 个 ORF,其中,CP 基因由 765 个核苷酸组成,共编码 254 个氨基酸残基。利用 DNAMAN 和 BLAST 软件进行序列比较分析(表 1),SPLCV(JS : XZ : 3-2)的 CP 基因与已发表的 SPLCV 其他分离物相比,核苷酸序列相似性在 89.2%~90.6%,其中与美国分离物 US : SC : 377-23 (HQ333135) 的相似性最高,为 90.6%,与日本分离物 JP. Ky (AB433788) 的相似性最低,为 89.2%,而与中国大陆分离物 F-p1 (FJ515896) CP 基因的核苷酸序列相似性为 90.2%。推导的 CP 氨基酸序列相似性为 94.1%~97.2%。



A. SPLCV 近全长基因片段; B. SPLCV 全基因序列的短缺部分; 1. DNA marker DL2000; 2. PCR 产物

图 1 SPLCV 近全长基因和短缺片段的 PCR 扩增产物

表 1 SPLCV 不同地区分离物 CP 基因氨基酸序列和核苷酸序列的相似性对比

SPLCV 分离物编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	*	97.2	96.9	94.1	95.3	95.3	95.7	94.9	96.1	94.9	94.1	95.7	94.9	96.1	94.9
2	90.6	*	98.8	95.3	96.5	96.5	96.9	95.7	96.9	95.3	94.5	96.9	96.1	96.9	96.1
3	90.3	99.2	*	95.3	96.1	96.1	96.5	95.7	96.9	94.9	94.1	96.5	95.7	96.5	96.1
4	89.3	89.8	89.7	*	98.4	98.4	98.4	96.9	96.9	96.5	91.3	98.4	97.2	94.5	95.3
5	89.9	90.5	90.3	96.0	*	100	99.6	96.5	98.0	96.1	92.5	99.6	98.4	94.9	96.5
6	90.2	90.1	89.9	97.0	97.1	*	99.6	96.5	98.0	96.1	92.5	99.6	98.4	94.9	96.5
7	90.2	91.5	91.4	96.7	97.4	96.5	*	96.9	98.4	96.5	92.9	100	98.8	95.3	96.9
8	90.3	89.8	89.7	94.7	93.1	94.0	94.3	*	97.6	97.2	91.7	96.9	97.2	96.9	96.9
9	89.7	89.7	89.7	96.1	95.4	95.7	95.7	95.4	*	96.5	93.3	98.4	98.0	95.7	97.6
10	89.7	90.9	90.9	94.7	92.9	94.1	95.3	92.9	93.9	*	91.3	96.5	96.9	95.3	95.7
11	90.3	91.9	91.9	86.8	88.1	87.8	88.2	86.1	86.8	87.5	*	92.9	92.1	92.5	92.1
12	89.2	89.9	89.9	96.1	96.3	96.0	97.4	93.9	95.0	94.3	87.8	*	98.8	95.3	96.9
13	90.1	90.5	90.5	96.6	97.1	96.6	97.5	94.3	95.3	95.0	88.0	97.4	*	95.3	97.2
14	89.9	89.9	89.9	89.8	90.2	89.9	90.9	90.0	89.3	90.5	91.5	89.4	94.5	*	95.3
15	89.9	89.9	89.9	94.7	93.6	94.6	94.8	94.9	95.6	93.6	86.1	93.7	94.1	89.7	*

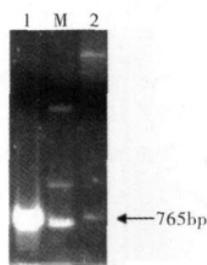
注:对角线之上为不同地区分离物 CP 基因氨基酸序列的相似性,对角线之下为核苷酸序列的相似性。编号代表的分离物为:1. SPLCV(JS : XZ : 3-2);2. US : SC : 377-23(HQ333135);3. US : SC : 646B-11(HQ333138);4. CE-[BR : For1] (FJ969832);5. RS1-[BR : Tav1] (FJ969833);6. RS2-[BR : Mac1] (FJ969835);7. Eastern China (FJ176701);8. F-p1 (FJ515896);9. CN-SH (EU309693);10. RL7 (EU267799);11. BCKV (FN432356);12. JP. Ky (AB433788);13. J-508 (FJ560719);14. Merremia N4 (DQ644563);15. BG6 (EF456744)。

2.2 SPLCV CP 基因原核表达载体的构建

使用正向引物 SPLCV-CP5 和反向引物 SPLCV-CP3 对 SPLCV 近全长基因片段转化所得的

质粒进行 PCR 扩增,得到的目的条带大小约 765 bp。将其连接到表达载体 pGEX-4T-3 上,转入大肠杆菌 TG1 中,提取的质粒经 PCR 及 Sal I 和

Xho I 双酶切鉴定后(图 2),送往公司测序,分析结果证明阅读框架正确。说明 SPLCV CP 基因的原核表达载体 pGEX-SPLCVCP 构建成功。

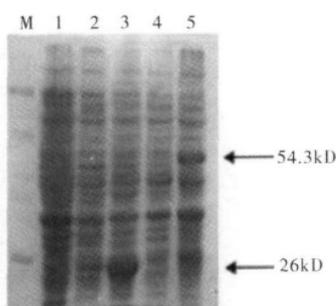


1. pGEX-SPLCVCP 的 PCR 验证结果; M. DNA marker DL2000;
2. 重组质粒 pGEX-SPLCVCP 的双酶切(*Sal* I + *Xho* I)验证结果。

图 2 重组质粒 pGEX-SPLCVCP 的 PCR 验证和酶切验证结果

2.3 SPLCV CP 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

pGEX-4T-3 载体含有 GST 标签,诱导产生的蛋白大小约为 26 kD,经过 DNASTAR 分析,SPLCV CP 基因翻译蛋白大小约为 29.25 kD。因此,可以计算出 CP 基因携带 GST 标签在大肠杆菌中表达的融合蛋白的大小约为 54.25 kD。含重组表达载体的工程菌经 IPTG 诱导后,进行 SDS-PAGE 分析,结果表明,含 pGEX-4T-3 空质粒的工程菌诱导产生了约 26 kD 的蛋白条带,未经诱导的含重组质粒的工程菌则没有相应的条带,而含有重组质粒的大肠杆菌经过 IPTG 诱导后可产生 54.3 kD 左右的目的蛋白条带(图 3),说明 pGEX-SPLCVCP 得到了正确表达。



M. 蛋白 marker; 1. BL21(DE3) pLysS 经 IPTG 诱导;
2. 转入空质粒 pGEX-4T-3 的 BL21(DE3)pLysS 未经诱导;
3. 转入空质粒 pGEX-4T-3 的 BL21(DE3)pLysS 经 IPTG 诱导;
4. 转入重组质粒 pGEX-SPLCVCP 的 BL21(DE3)pLysS 未经诱导;
5. 转入重组质粒 pGEX-SPLCVCP 的 BL21(DE3)pLysS 经 IPTG 诱导

图 3 重组质粒 pGEX-SPLCVCP 表达产物的 SDS-PAGE 分析

3 讨论

本研究成功测定了 SPLCV 一个江苏分离物的全基因组序列,并首次在大肠杆菌中高效表达了 SPLCV 的外壳蛋白基因,为进一步制备该病毒的抗血清,建立高效的血清学检测方法奠定了良好基础。目前对甘薯病毒病害最有效的防治方法是种植脱毒

甘薯,建立高效的病毒检测技术可为脱毒甘薯的培育提供技术支撑。在 SPLCV CP 表达研究过程中发现,SPLCV CP 的表达不是十分稳定,本研究先后采用原核表达载体 pET28a 和 pET30a,表达效果均不理想。使用载体 pGEX-4T-3 后,在 IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L,温度为 37 °C 条件下诱导过夜,CP 基因才获得了较为理想的表达。因此,需要进一步优化表达条件并且分析基因中是否存在稀有密码子的干扰,以便增加蛋白的表达产量。

研究表明,双生病毒容易通过突变和重组等方式产生遗传变异,导致新株系或新病毒的产生^[6-7]。根据菜豆金色花叶病毒属 (*Begomovirus*) 病毒种的划分标准,DNA-A 全基因序列相似性低于 89% 可划分为一个新种^[8]。本研究克隆的江苏分离物 SPLCV(JS: XZ: 3-2)全长基因序列与中国分离物 CN-SH (EU309693)的相似性最高,为 94.4%,与其他分离物的相似性均低于 89%,说明 SPLCV(JS: XZ: 3-2)与 CN-SH 为同一个种,与其他分离物可能属于不同的种。目前,河南省农作物病虫害防治重点实验室正在对全国不同地区的 SPLCV 进行检测和基因组序列测定,有望进一步明确我国甘薯上 SPLCV 的分布及分子变异情况。

参考文献:

- [1] Clark C A, Hoy M W. Effects of common viruses on yield and quality of Beauregard sweetpotato in Louisiana[J]. *Plant Disease*, 2006, 90(1): 83-88.
- [2] Lotrakul P, Valverde R A, Clark C A, et al. Detection of a geminivirus infecting sweet potato in the United States[J]. *Plant Disease*, 1998, 82(11): 1253-1257.
- [3] Zhang S C, Ling K S. Genetic diversity of sweet potato begomoviruses in the United States and identification of a natural recombinant between sweet potato leaf curl virus and sweet potato leaf curl Georgia virus[J]. *Arch Virol*, 2011, 156: 955-968.
- [4] Luan Y S, Zhang J. First report of sweet potato leaf curl virus in China[J]. *Plant Disease*, 2006, 90(8): 1111.
- [5] Luan Y S, Zhang J, Liu D M. Molecular characterization of sweet potato leaf curl virus isolate from China (SPLCV-CN) and its phylogenetic relationship with other members of the Geminiviridae[J]. *Virus Genes*, 2007, 35: 379-385.
- [6] Harrison B D, Robinson D J. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses)[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1999, 37: 369-398.
- [7] 郭小建,张光明,冯飞,等. 双生病毒基因组变异的研究进展[J]. *河南农业科学*, 2011, 40(5): 8-10.
- [8] Fauquet C M, Stanley J. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems[J]. *Annals of Applied Biology*, 2003, 142: 165-189.