

甘薯褪绿矮化病毒外壳蛋白基因的克隆 及在大肠杆菌中的表达

秦艳红, 乔 奇, 张德胜, 田雨婷, 王 爽, 王永江, 张振臣*
(河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南省农作物病虫害防控重点实验室,
农业部华北南部农作物病虫害综合治理重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 克隆甘薯褪绿矮化病毒(SPCSV)外壳蛋白(CP)基因, 构建其原核表达载体, 并在大肠杆菌中进行诱导表达。根据已报道的甘薯褪绿矮化病毒西非(WA)株系基因组核苷酸序列设计引物, 利用 RT-PCR 方法克隆了 SPCSV 四川分离物基因组 RNA2 上 1 902 bp 大小的片段。序列分析表明, 该片段包括部分 *p60* 基因序列、完整的 *p8* 基因和 *CP* 基因(major CP)序列及部分 *mCP* 基因(minor CP)序列。*CP* 基因由 774 个核苷酸组成, 编码 257 个氨基酸残基, 与已发表的 SPCSV WA 株系 Can181-9 分离物相比, 其核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 99.48% 和 99.22%。将 *CP* 基因克隆到原核表达载体 pET-30a(+)上, SDS-PAGE 分析表明, 经 IPTG 诱导, *CP* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得了高效表达, 表达的融合蛋白分子量约为 38 kD, 为 SPCSV 抗血清的制备及其血清学检测技术的建立奠定了基础。

关键词: 甘薯褪绿矮化病毒; 基因克隆; 序列分析; 外壳蛋白; 原核表达

中图分类号: S436.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)06-0085-04

Cloning and Expression of Coat Protein Gene of Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus in *E. coli*

QIN Yan-hong, QIAO Qi, ZHANG De-sheng, TIAN Yu-ting,
WANG Shuang, WANG Yong-jiang, ZHANG Zhen-chen*

(Henan Key Laboratory of Crop Pest Control, IPM Key Laboratory in Southern Part of North China for Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The objective of this study was to clone and analyze the sequence characterization of the coat protein (CP) gene of sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV), and then to construct its prokaryotic expression vector and express its protein in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The primers were designed according to published nucleotide sequence of SPCSV-WA Can181-9 isolate (FJ807785). The partial nucleotide sequence of SPCSV genomic segment RNA2 was cloned by RT-PCR from Sichuan isolate in China and sequenced, which was 1 902 bp in length (KC146844), encompassing part of the *p60* gene, complete *p8* and *CP* genes, and part of *mCP* gene. The results of sequencing showed that the *CP* gene consisted of 774 nt and encoded 257 amino acid residues. The nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of *CP* gene was 99.48% and 99.22% identical to SPCSV-WA Can181-9 isolate (FJ807785), respectively. The *CP* gene was cloned into expression vector pET-30a(+) for over-expression in prokaryotic cells. The result of SDS-PAGE showed that about 38 kD specific fusion protein was produced after induction by IPTG. The CP fusion protein was highly expressed in prokaryotic cells, which provided a foundation for preparation of the poly-

收稿日期: 2013-03-19

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: 秦艳红(1977-), 女, 河南博爱人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: qinyanhong6040@sina.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

clonal antiserum and serology detection of SPCSV in sweet potato or whitefly vectors.

Key words: sweet potato chlorotic stunt virus; gene cloning; sequence analysis; coat protein; prokaryotic expression

甘薯褪绿矮化病毒(sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV)属于长线病毒科(*Closteroviridae*)、毛形病毒属(*Crinivirus*),是甘薯上常见的一种病毒^[1]。当 SPCSV 和甘薯羽状斑驳病毒(sweet potato feathery mottle virus, SPFMV)复合侵染甘薯时,甘薯表现出叶片扭曲、皱缩、畸形、明脉和植株矮化等严重症状,称为甘薯病毒病害(sweet potato virus diseases, SPVD)^[2]。SPVD 对甘薯产量影响极大,引起的产量损失可达 70%~100%^[3-4]。20 世纪 70 年代首先在非洲发现 SPVD 的存在,目前,SPVD 主要分布在非洲和南美的一些国家^[3-6]。根据血清学关系及核苷酸序列,SPCSV 可分为东非株系(East African, EA)和西非株系(West African, WA)^[7]。2010 年, Qiao 等^[8]首先从我国广东省分离到 SPCSV EA 株系。Qin 等^[9]对 SPCSV 在我国的发生和株系类型进行了分析,发现我国甘薯上的 SPCSV 存在 EA 和 WA 2 个株系,其中 WA 株系比 EA 株系分布更为广泛,为我国的优势株系。张振臣等^[10]利用血清学、分子生物学和嫁接传染试验等方法首先明确了 SPVD 在我国的发生情况。

SPCSV 是 SPVD 的主要病原之一,为了加强对 SPVD 的预警和控制,防止该病的进一步蔓延危害,有必要建立快速、高效的 SPCSV 检测技术。酶联免疫吸附测定(ELISA)是一种简便、快速、经济的植物病毒病诊断方法,而病毒特异性抗体的制备是该方法应用的前提。因此,本试验利用 RT-PCR 方法,从我国四川的甘薯样品上克隆了 SPCSV WA 株系基因组 RNA2 的 3'端部分序列,通过序列分析和同源性比较,确定其归属地位,在此基础上构建了 SPCSV 外壳蛋白(CP)基因的原核表达载体,使其在大肠杆菌中得到了正确表达,为 SPCSV 抗体的制备奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒样品 甘薯病毒样品采自四川省南充市大田,表现叶片扭曲、皱缩、黄化和植株矮化等症状。样品编号为 G-Chuan-2010-77。

1.1.2 菌株和质粒 pMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);大肠杆菌菌株 JM109、BL21(DE3)和原核表达载体 pET-30a(+)均为本实验室保存。

1.1.3 酶及试剂 UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提

试剂盒、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、IPTG 和 SDS 等均购自上海生工生物工程技术服务有限公司;质粒小量抽提试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;M-MLV 反转录酶、Ex-Taq DNA 聚合酶、BamH I 和 HindIII 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准和蛋白质分子量标准等均购自 TaKaRa 公司;其他常用试剂为国产分析纯。

1.2 SPCSV RNA2 部分序列的克隆和序列测定

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中已登录的 SPCSV WA 株系 Can181-9 分离物 RNA2 核苷酸序列(登录号为 FJ807785)设计引物,正向引物为 SPCSV-CP-5:5'-CGTCTTATGACTGAGAG-TAAATCG-3',反向引物为 SPCSV-CP-3:5'-AAACCACTGTCTAAGAAATTTG-3',用于 SPCSV 基因组 RNA2 部分序列的扩增。引物由 TaKaRa 公司合成。

1.2.2 SPCSV RNA2 部分序列的扩增 以采自四川表现典型 SPVD 症状的甘薯样品 G-Chuan-2010-77 为材料,按照上海生工生物工程技术服务有限公司的 Flash UNIQ 柱式总 RNA 抽提试剂盒的说明书提取感病叶片的总 RNA。

以提取的病叶总 RNA 为模板,利用 TaKaRa 公司的 M-MLV 反转录酶进行反转录。反应体系包括 2 μ L 5 \times RT Buffer, 1 μ L MgCl₂, 1 μ L dNTP 混合物, 0.5 μ L SPCSV-CP-3, 0.25 μ L RNA 酶抑制剂, 0.5 μ L M-MLV 反转录酶, 4.75 μ L 总 RNA, 于 42 $^{\circ}$ C 反应 60 min, 99 $^{\circ}$ C 反应 5 min, 5 $^{\circ}$ C 反应 5 min。PCR 反应体系包括: 1 μ L SPCSV-CP-5 引物, 1 μ L SPCSV-CP-3 引物, 1 μ L dNTP 混合物, 5 μ L 10 \times PCR Buffer, 0.5 μ L Ex-Taq DNA 聚合酶, 5 μ L 反转录产物, 36.5 μ L ddH₂O。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,按照上海生工生物工程技术服务有限公司 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒的说明书回收目的片段。

1.2.3 PCR 产物的序列测定及分析 将纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接,转化大肠杆菌 JM109,提取质粒,经 PCR 和酶切鉴定后获得阳性克隆。将重组质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。利用 BLAST 对测序结果与

GenBank 中的 SPCSV 序列进行比对。

1.3 SPCSV CP 基因原核表达载体的构建

设计用于原核表达载体构建的引物,正向引物 WA-CP-5';5'-GATGGATCCATGGCTGAT-AGCACTAAAGT-3',在上游引入 *Bam*H I 位点;反向引物 WA-CP-3';5'-CGGAAGCTTTCAA-CAGTGAAGACCTGTTC-3',在终止密码子的下游引入 *Hind*III 位点。以 1.2.3 中获得的重组质粒为模板进行 PCR 扩增,割胶回收 PCR 产物,经 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切后,与经同样酶切处理的 pET-30a(+)载体连接。转化大肠杆菌 JM109,提取质粒,对 PCR 扩增和酶切筛选出的重组质粒进行测序,以验证阅读框架的正确性。

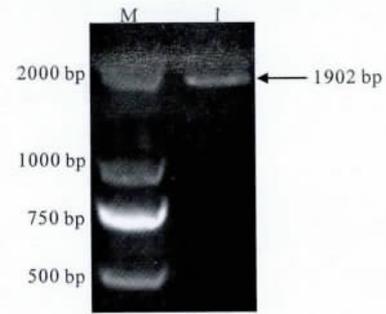
1.4 SPCSV CP 蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将读框正确的重组质粒及空载体分别转化大肠杆菌 BL21(DE3),挑取单菌落于 3 mL LB 培养基中(含 kan 100 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜后,按 1:100 稀释到新鲜的 LB 培养基中(含 kan 100 μ g/mL),振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.4~1.0,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续于 37 $^{\circ}$ C 培养 6~8 h。离心收集菌体,加入 1/10 体积样品缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl,pH 值 6.8,10%甘油,2% SDS,5% 巯基乙醇,0.1% 溴酚蓝),振荡悬浮后,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。用 12.5% 的凝胶进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果与分析

2.1 SPCSV RNA2 部分序列的克隆和序列测定结果

以发病的甘薯叶片总 RNA 为模板,经 RT-PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到长度约为 1.9 kb 的 PCR 产物(图 1)。克隆 PCR 产物后进行测序发现,目的片段长 1 902 bp(GenBank 登录号为 KC146844),包括部分 *p60* 基因序列、完整的 *p8* 基因和 CP 基因(major CP)及部分 *mCP* 基因(minor CP)序列。序列分析表明,SPCSV 四川分离物的 CP 基因大小为 774 bp,编码 257 个氨基酸残基。核苷酸和氨基酸一致性分析表明,该分离物 CP 基因与 SPCSV WA 株系 Can181-9 分离物(GenBank 登录号为 FJ807785)的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 99.48% 和 99.22%,与 SPCSV EA 株系广东分离物(GenBank 登录号为 HM773432)的核苷酸和氨基酸序列一致性分别为 71.06% 和 78.21%,说明四川分离物属于 SPCSV WA 株系。

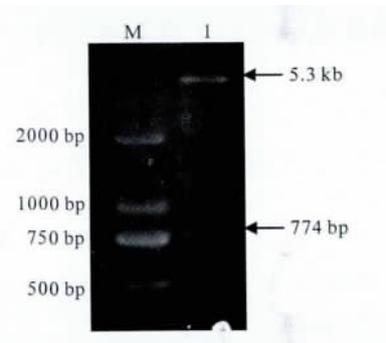


M. DNA 分子量标准 DL2000; I. PCR 产物

图 1 SPCSV RNA2 部分序列的 RT-PCR 产物

2.2 SPCSV CP 基因原核表达载体构建的检测

将 CP 基因与 pET-30a(+)载体连接,重组质粒经 PCR 鉴定,扩增出一条大小为 774 bp 的目的条带,与预期结果相符;将重组质粒进行 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切鉴定,得到大小分别为 5.3 kb 和 774 bp 的 2 条带(图 2),表明 SPCSV CP 基因的原核表达载体 pETCP 构建成功。

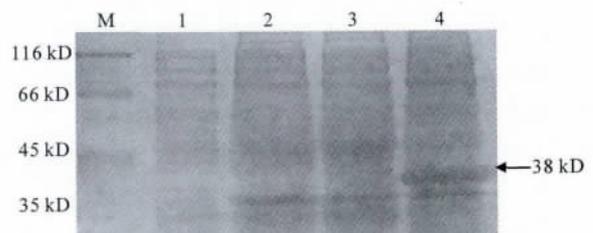


M. DNA 分子量标准 DL2000; I. 酶切产物

图 2 pETCP 的酶切验证

2.3 SPCSV CP 蛋白在 *E. coli* 中的诱导表达

将重组质粒 pETCP 转入大肠杆菌 BL21(DE3)中,挑选单菌落,利用 IPTG 进行诱导,对表达产物进行 SDS-PAGE 分析表明,含重组质粒 pETCP 的工程菌在约 38 kD 处出现一特异蛋白质条带,与预期的大小相符(图 3),表明 SPCSV CP 基因在大肠杆菌中得到了正确表达。



M. 蛋白质分子量标准; 1. pET-30a(+)未诱导; 2. pET-30a(+)诱导; 3. 重组质粒 pETCP 未诱导; 4. 重组质粒 pETCP 诱导

图 3 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

(下转第 120 页)

一致。这一方面与蒙古黄芪异花授粉的繁殖方式^[3]有关,即同一植株的种子,其母本相同而父本不同,从而造成子代个体间在遗传上的差异性;另一方面,R型和G型蒙古黄芪虽在形态上存在明显差异,但遗传上的分化不甚明显^[4],因而作为其子代的有纹和无纹种子在遗传上的分化亦不明显,一种表型种子的个体和另一表型种子具有更近的遗传关系。

研究结果同时表明,有纹和无纹2种表型种子在遗传上亦存在一定的分化,聚类图中表现为部分表征群或亚表征群的种子都由同一表型的种子构成。这与其2种表型种子的母本,即G型和R型植株在遗传上具有一定的分化有关^[4]。可见,2种表型种子与其母本之间仍具有一定的遗传一致性。

针对以上情况,农业生产实践中可以采取隔离和多代人工选择措施,使表型一致的蒙古黄芪在遗传上稳定下来,从而为优良品种培育提供更多的遗传素材。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版

(上接第 87 页)

3 结论与讨论

本研究从我国四川甘薯样品上克隆了 SPCSV WA 株系基因组 RNA2 3'端 1.9 kb 大小的核苷酸序列,包括部分 *p60* 基因序列、完整的 *p8* 基因和 *CP* 基因(major CP)序列及部分 *mCP* 基因(minor CP)序列。该序列与已发表的 SPCSV WA 株系 Can181-9 分离物(GenBank 登录号为 FJ807785)相比,核苷酸序列一致性为 99.21%,其与已发表的 SPCSV EA 株系 m2-47 (GenBank 登录号为 HQ291260)和 Uganda 分离物(GenBank 登录号为 AJ428555)的核苷酸一致性分别为 67.07%和 67.43%。说明四川分离物属于 WA 株系,而且核苷酸序列高度保守,推测该病毒可能是由于种薯调运或引种传入我国,由于该病毒在我国发生时间较短,可能还未发生较大变异。甘薯是无性繁殖作物,病毒可通过种薯和种苗进行远距离传播,因此,建立高效、快速的血清学检测方法对病毒的预警和防控尤为重要。本研究首次在大肠杆菌中高效表达了 SPCSV 的外壳蛋白,为制备 SPCSV 特异性抗血清学、建立 SPCSV 准确、快速的检测技术奠定了良好基础。

参考文献:

[1] Martelli G P, Agranovsky A A, Bar-Joseph M, et al. The family Closteroviridae revised[J]. *Archive of Virology*,

(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:283.

- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社,2002:876.
- [3] 谢小龙,王溪森,赵利,等. 陇西栽培蒙古黄芪原植物形态多样性研究[J]. *安徽农业科学*,2004,32(6):1203-1204.
- [4] Xie X L, Hu Y P, Wang L, et al. Genetic diversity in three morphological types of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao as revealed by inter simple sequence repeat markers[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(18): 4490-4494.
- [5] 李强栋,孟林,毛培春,等. 不同居群马蔺种质材料同工酶酶谱特征分析[J]. *草地学报*,2012,20(1):116-124.
- [6] 暴朝霞,黄宏文. 板栗主栽品种的遗传多样性及其亲缘关系分析[J]. *园艺学报*,2002,29(1):13-19.
- [7] 谢小龙,胡延萍,赵旭东,等. 陇西栽培蒙古黄芪酯酶同工酶数量分析[J]. *中国科学院研究生院学报*,2007,24(4):525-529.
- [8] 卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析软件[M]. 2 版. 北京:电子工业出版社,2002:311.

2002,147:2039-2044.

- [2] Untiveros M, Fuentes S, Kreuzer J. Molecular variability of sweet potato feathery mottle virus and other potyviruses infecting sweet potato in Peru[J]. *Archive of Virology*, 2008,153:473-483.
- [3] Gutiérrez D L, Fuentes S, Salazar L F. Sweet potato virus disease (SPVD): Distribution, incidence, and effect on sweet potato yield in Peru[J]. *Plant Disease*, 2003, 87: 297-302.
- [4] Njeru R W, Mburu M W K, Cheramgoi E, et al. Studies on the physiological effects of viruses on sweet potato yield in Kenya[J]. *Annals of Applied Biology*, 2004,145:71-76.
- [5] Gibson R W, Mpembe I, Alicai T, et al. Symptoms, aetiology and serological analysis of sweet potato virus disease in Uganda[J]. *Plant Pathology*, 1998,47:95-102.
- [6] Schaefer G A, Terry E R. Insect transmission of sweet potato disease agents in Nigeria[J]. *Phytopathology*, 1976, 66:642-645.
- [7] Clark C A, Davis J A, Abad J A, et al. Sweet potato viruses: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases[J]. *Plant Disease*, 2012, 96:168-185.
- [8] Qiao Q, Zhang Z C, Qin Y H, et al. First report of sweet potato chlorotic stunt virus infecting sweet potato in China[J]. *Plant Disease*, 2011, 95:356.
- [9] Qin Y H, Zhang Z C, Qiao Q, et al. Molecular variability of sweet potato chlorotic stunt viruses (SPCSV) and five potyviruses infecting sweet potato in China[J]. *Archive of Virology*, 2012, DOI 10. 1007/s00705-012-1503-8.
- [10] 张振臣,乔奇,秦艳红,等. 我国发现由甘薯褪绿矮化病毒和甘薯羽状斑驳病毒协生共侵染引起的甘薯病毒病害[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(3):328-333.