

大蒜 E 病毒外壳蛋白基因的原核表达及抗血清制备

林 林 郑红英 陈 炯* 陈剑平

(浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所 浙江省植物病毒重点开放实验室 杭州 310021)

摘 要 设计特异性引物 PCR 扩增了余杭大蒜病样中的大蒜 E 病毒(GarV-E)的全长 CP 基因,构建原核表达载体并在大肠杆菌中过量表达,纯化表达产物后免疫家兔制备抗血清。Western blot 检测结果表明,抗血清与 GarV-E 的 CP 起强的特异性反应。7 个大蒜样品中,内蒙古赤峰市、宁夏银川和甘肃天水等 4 个样品受到 GarV-E 的侵染。试验也证明了田间 GarV-E 编码的 CP 分子量为 35kD,不同于已报道的其他葱 X 病毒属成员的 28kD 外壳蛋白。

关键词 大蒜 E 病毒,原核表达,抗血清制备

中图分类号 S432.41 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2004)04-0533-03

大蒜(*Allium sativum* L.)病毒病害在世界范围内广泛发生,引起作物产量的严重损失和品质下降。这些病毒由于作物的营养繁殖而在球茎中大量积累。要想有效控制这类病毒病害,首先必须建立有效的病原鉴定体系,并明确它们的种类。迄今为止,已有一些和大蒜花叶病症相关的线状病毒被报道,它们常表现为复合侵染。这些病毒至少包括 3 种马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)、2 种麝香石竹潜隐病毒属(*Carlavirus*)成员和新近成立的葱 X 病毒属(*Allexivirus*)属一些成员^[1-3]。其中 *Allexivirus* 属是新近成立的一个植物病毒属,成员为单链正性 RNA 病毒,基因组 RNA 长 8.0~9.0kb,包裹在长度为 700nm~800nm 的线状粒子中,3'-端具有 poly(A)尾,由蚜虫传播,寄主为葱属植物。该属成员基因组结构和 *Carlavirus* 属、马铃薯 X 病毒属(*Potexvirus*)和凹陷病毒属(*Forevirus*)成员相似,不同的是 ORF4 编码蛋白(32~43kD)远大于其他 3 个属 ORF4 编码的 TGB3 蛋白(6~13kD),且没有同源性^[4-6]。

2001 年,我们在浙江余杭大蒜样品中鉴定了一个 *Allexivirus* 属的新成员,命名为大蒜 E 病毒(*Garlic virus E*, GarV-E),并报道了基因组全序列^[7]。本文采用特异性引物 PCR 扩增的方法,获得了 GarV-E 外壳蛋白(Coat protein, CP)的全长基因序列,并原核表达制备了抗血清,Western blot 检测结果表明,抗血清能特异的与 GarV-E CP 反应。

1 材料和方法

1.1 材料

2001~2002 年收集了内蒙古赤峰市红山区(CFH)、新疆吐鲁番地区(TP)、广西柳州市(LZ)、宁夏银川(YC)、甘肃天水地区(TS1 和 TS2)和山东金乡(JX)等 7 个大蒜样品。温室栽种后,采集叶片保存于 -70℃ 备用。

RNeasy Plant Mini 试剂盒和 QIAquick Gel Extraction 试剂盒购自 QIAGEN 公司,M-MLV 逆转录酶购自 Life Technologies 公

司,ExTaq DNA 聚合酶、Nde I 和 BamH I 购自 TaKaRa 公司,pGEM-T 载体购自 Promega 公司,T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司,原核表达载体 pSBET 为德国麻浦植物研究所 Hans-Henning Steinbiss 教授赠送,其余药品试剂均为国产分析纯。

1.2 植物总 RNA 抽提和合成 cDNA 第一链

余杭大蒜样品植物总 RNA 抽提采用 RNeasy Plant Mini 试剂盒,以其为模板,M4-1(5'-GTTTTCCAGTCACGAC(T)₅-3')为起始引物,M-MLV 逆转录酶逆转录合成 cDNA 第一链,方法参照厂家说明。

1.3 PCR 扩增、T-A 克隆和序列分析

根据已报道的 GarV-E 序列(EMBL 登录号:AJ292230)设计特异性表达引物 GVE-CP(+) (5'-CCATATG AACGACCCACG AAC-3')和 GVE-CP(-) (5'-CGGATCC TTAGAATGTTATCAIT -GGGGG-3')。下划线为添加的限制性内切酶 Nde I 和 BamH I 的识别序列,引物由上海博亚公司合成。以余杭病样第一链 cDNA 为模板,PCR 扩增 GarV-E 全长 CP 基因。PCR 扩增采用 ExTaq DNA 聚合酶,反应体系参照厂家说明,反应条件:94℃ 2min;94℃ 30s,56℃ 30s,72℃ 1min,30 个循环,72℃ 延伸反应 10min 以确保获得全长产物。PCR 扩增产物经 1%(W/V)琼脂糖凝胶电泳分离,切下预期大小条带,用 QIAquick Gel Extraction 试剂盒回收,方法参照厂家说明。纯化产物直接插入 pGEM-T 载体后经上海博亚公司测序验证。

1.4 原核表达载体的构建和诱导表达

载体 pSBET 能表达非融合蛋白。GarV-E 余杭分离物 CP 基因 T 载体克隆质粒和原核表达载体 pSBET 分别用 Nde I 和 BamH I 双酶切,产物经 T4 DNA 连接酶连接后,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21 plysS 菌株,含预期大小质粒的菌经浓度为 0.4~1mmol/L 的 IPTG 诱导 2~6h 后,SDS-PAGE 分离,考

基金项目 国家自然科学基金项目(30200008)、国家杰出青年基金项目(30225031)、浙江省自然科学基金重点项目(ZA0207)

* 通讯作者。Tel: 86-571-86404313; Fax: 86-571-86400481; E-mail: jchen1@mail.hz.zj.cn

作者简介 林 林(1974-),女,陕西周至人,助理研究员,硕士,主要从事植物病毒分子生物学研究。E-mail: lxlinlin@126.com

收稿日期 2003-07-25,修回日期 2004-03-18

马斯亮蓝 G-250 染色检测蛋白表达情况。

1.5 非融合蛋白的纯化和抗血清制备

超声波破碎已鉴定正确表达的菌体, SDS-PAGE 分离, 将凝胶在 0.25mol/L KCl 溶液中染色 30min, 切下目的胶条放入透析袋中电洗脱 2~3h 后, 再于 PBS 溶液中透析 24h 后得到纯化蛋白, 所有操作均在 4℃ 进行。用纯化的蛋白每隔 7d 免疫兔子 1 次, 共 3 次, 每次蛋白注射量约为 200 μ g, 第 3 次免疫后 7~10d 采血, 4℃ 过夜后低速离心取上清。

1.6 Western blot 检测

7 个大蒜样品叶片用液氮研磨后, 每 100mg 加入 200 μ L 抽提缓冲液(125mmol/L Tris-Cl, 2% SDS, 10% 巯基乙醇), 高速离心后取上清加 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 100℃ 煮沸 5min 后作 SDS-PAGE, 电泳结束后通过电转移法将蛋白质转印到硝酸纤维素膜上, 用新制备的抗血清做 Western blot 检测, 采用 NBT/BCIP 显色法。

2 结果

2.1 大蒜 E 病毒外壳蛋白基因的原核表达和抗血清制备

从余杭大蒜样品中成功扩增到 950bp 大小的预期片段, 序列测定表明它为 GarV-E 的全长 CP 基因, 并且与已报道的 GarV-E 基因组相应序列核苷酸同源为 100%。随后构建表达质粒 pSB-GVE CP, 在大肠杆菌 BL21 plys S 中经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 检测表明在 35kD 处出现一条高浓度的诱导表达条带, 与计算机推测的 GarV-E CP 分子量大小一致。诱导时间变化对于非融合蛋白的表达量无显著影响(图 1)。将该片段切胶纯化后免疫家兔, 制备抗血清。

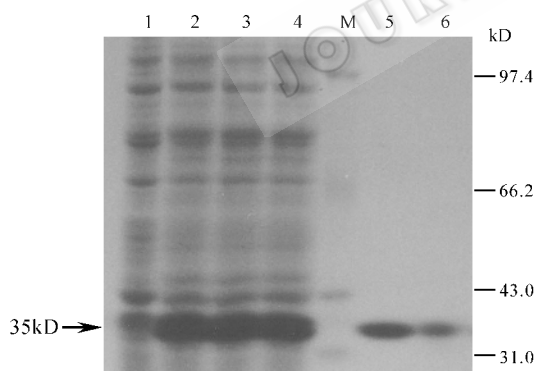


图 1 pSB-GVECP 转化的 BL21 plys S 菌经 IPTG 诱导表达的裂解物 SDS-PAGE 检测及目的蛋白纯化

Fig.1 10% SDS-PAGE analysis of the lysates of pSB-GVECP transformed BL21 plys S induced by IPTG at different times and the purification of the aim protein

1. pSB-GVECP without induced by IPTG was used as the negative control ; 2, 3 and 4. Induced by IPTG for 2, 4 and 6 hours respectively ; M. Molecular weight markers for protein (GIBCO) ; 5 and 6. The purified aim proteins.

2.2 Western blot 检测

Western blot 检测表明, 制备的抗血清与诱导表达的细菌裂解物起强特异性反应, 而与未诱导的细菌裂解物不起反应,

7 个大蒜样品中, 内蒙古赤峰市、宁夏银川和甘肃天水等 4 个大蒜样品反应出现特异性的预期大小条带, 且条带单一, 大小与原核表达产物一致, 其中银川样品反应较弱。广西柳州、新疆吐鲁番和山东金乡大蒜样品与抗血清没有反应(图 2)。

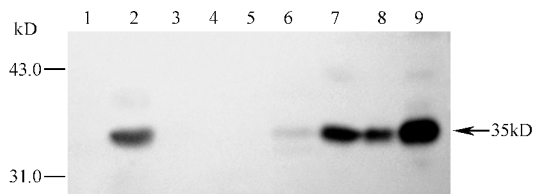


图 2 应用制备的 GarV-E 外壳蛋白抗血清对 7 个大蒜样品作 Western blot 检测

Fig.2 Western blot analysis of 7 garlic samples using the antiserum to GarV-E CP

1. pSB-GVECP without induced by IPTG was used as the negative control ; 2. Garlic from Chifeng city, Neimenggu province ; 3. Garlic from Turpan prefecture, Xinjiang Uygur Autonomous Region ; 4. Garlic from Liuzhou city, Guangxi Zhuang Autonomous Region ; 5. Garlic from Jinxiang city, Shandong province ; 6. Garlic from Yinchuan city, Ningxia Hui Autonomous Region ; 7. Garlic sample 1 from Tianshui city, Gansu province ; 8. Garlic sample 2 from Tianshui city, Gansu province ; 9. pSB-GVECP induced by IPTG was used as the positive control.

3 讨论

病毒特异性抗血清制备的最直接的方法是分离纯化病毒, 用其直接作为抗原免疫实验动物, 但我们的鉴定工作表明, 大蒜样品中病毒种类繁多, 且形态相似, 寄主范围窄, 因此提纯分离病毒非常困难^[1], 特别是 *Allexivirus* 属成员, 迄今为止, 关于它们的普通生物学特征和血清学关系报道仍然很少^[8], 并且该类病毒往往以复合侵染形式存在^[9]。因此通过原核表达的方法来制备这一类病毒的抗血清反而简便实用, 同时也能避免因为病毒复合侵染而导致提纯病毒制备的抗血清存在非特异性反应的问题。GarV-E 的 CP 抗血清的成功制备将有助于我们研究该类病毒的血清学关系。前期计算机分析表明, GarV-E 的 CP 基因长 948 个核苷酸, 推测编码一个含 316 个氨基酸的分子量为 35kD 的 CP, 但类比 *Allexivirus* 属其他成员编码的 CP 大小, 我们推测 CP 基因的翻译更有可能是从开读框的第 2 个 AUG 起始, 这样能产生一个和其他成员大小相似的 28kD(252aa) CP^[7]。但是本文 Western blot 检测结果表明, 田间大蒜样品中 GarV-E 的 CP 实际分子量为 35kD, 显然 CP 基因应该是从其开读框第 1 个 AUG 密码子起始翻译的, GarV-E 的 CP 确实比该属其他已报道成员编码的 CP 分子量大 7kD 左右。

参考文献

- [1] Chen J, Chen J P, Adams M J. Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Arch Virol*, 2001, **146**: 1841 - 1853.
- [2] Tsuneyoshi T, Matsumi T, Natsuoka K T, et al. Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three potyvirus species in *Allium* plants. *Arch Virol*, 1998, **143**: 97 - 113.

- [3] Tsuneyoshi T, Matsumi T, Deng T C, *et al.* Differentiation of Allium carlavirus isolates from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. *Arch Virol*, 1998, **143**: 1093–1107.
- [4] Kanyuka K V, Vishnichenko V K, Levay K E, *et al.* Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons. *J Gen Virol*, 1992, **73**: 2553–2560.
- [5] Song S L, Song J T, Kim C H, *et al.* Molecular characterization of the garlic virus X genome. *J Gen Virol*, 1998, **79**: 155–159.
- [6] Sumi S, Matsumi T, Tsuneyoshi T. Complete nucleotide sequences of garlic viruses A and C, members of the newly ratified genus *Allexivirus*. *Arch Virol*, 1999, **144**: 1819–1826.
- [7] 陈 炯, 陈剑平. *Allexivirus* 属的一个新成员——大蒜病毒 E 的基因组全序列测定和系统树分析. *科学通报*, 2001, **40**: 1463–1468.
- [8] van Dijk P, van der Vlugt R A. New mite-borne virus isolates from Rakkyo, shallot and wild leek species. *Eur J Plant Path*, 1994, **100**: 269–277.
- [9] Chen J, Zheng H Y, Antoniw J F, *et al.* Detection and classification of allexiviruses from garlic in China. *Arch Virol*, 2004, **149**: 435–445.

The Prokaryotic Expression of The Coat Protein Gene of *Garlic virus E* and The Antiserum Preparation

LIN Lin ZHENG Hong-Ying CHEN Jiong* CHEN Jian-Ping

(Department of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: Specific primers were designed to be used in amplification of the complete coat protein gene of *Garlic virus E* Yuhang isolate. The expected CP gene was then inserted into the pSBET vector for the prokaryotic expression. The aimed protein was purified and used to immune the rabbit for the antiserum preparation. Western blot analysis confirmed that the antiserum reacted strongly and specifically to the CP of GarV-E. GarV-E was detected in 4 garlic samples from Chifeng, Yinchuan and Tianshui cities respectively. It also revealed that the molecular weight of GarV-E CP was 35kD which was different to other allexiviruses (28kD).

Key words: *Garlic virus E*, Prokaryotic expression, Antiserum preparation

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (3020008); Chinese National Natural Science Foundation for Distinguished Scholars (30225031); Key Project of the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (ZA0207)

* Corresponding author. Tel: 86-571-86404313; Fax: 86-571-864000481; E-mail: jchen1@mail.hz.zj.cn

Received date: 07-25-2003

《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(双月刊)创刊于1953年,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道我国普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、病毒学、免疫学以及生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊可以为您定期发布与微生物学相关的试剂、药品、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,可为您开拓在微生物学领域新的发展空间。本刊科学严谨,信守协议,由中国科学院科学出版社广告部代理广告业务(广告经营许可证:京东工商广字第0034号),编辑部备有最新的期刊简介和报价单,欢迎与我们联系。

通讯地址:100080 北京海淀中关村 中国科学院微生物研究所内 《微生物学报》编辑部

电话:(010)62630422 传真:(010)62554303 电子信箱:actamicro@sun.im.ac.cn

联系人:王晋芳 王 敏