

侵染节瓜的小西葫芦黄花叶病毒 CP 基因的克隆、表达 及其抗血清的制备

宋丽敏 卢彩鸽 梁文星 黄金光 李怀方*

(中国农业大学植物病理系 北京 100094)

摘 要 通过鉴别寄主反应、病毒部分序列测定确定了采自广州白云区表现花叶、斑驳症状的节瓜上的病毒为 ZYMV。采用 RT-PCR 方法扩增和克隆了该病毒的外壳蛋白基因, 连接到原核表达载体 pET-22k(+) 上。获得的重组子 pET-ZCP 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 后, 用 IPTG 进行诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明, CP 基因在大肠杆菌中获得了高效表达, 融合蛋白分子量约为 33.0kD。将融合蛋白纯化后免疫兔子, 获得了特异性较高的抗血清。ELISA 测定其效价为 1/4096。

关键词 小西葫芦黄花叶病毒, 外壳蛋白, 原核表达, 抗血清

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)01-0132-03

小西葫芦黄花叶病毒(*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) 是一种世界上广泛分布的、危害葫芦科作物的最主要的病毒之一^[1]。该病毒可以侵染葫芦科、豆科等 9 个科的多种植物, 侵染葫芦科植物后引起系统花叶、黄化和叶片畸形等症状, 严重时形成蕨叶、果实畸形[^], 从而给生产上造成严重威胁。ZYMV 最先由 Lisa 和 Lecoq 分别在意大利和法国于 1981 年发现和报道。在中国最早于 1989 年在新疆发现^[2]。ZYMV 属于马铃薯 Y 病毒属, 病毒颗粒为弯曲线状^[3], 主要通过蚜虫以非持久性方式传播, 也可种传或机械传播。

病毒的外壳蛋白(CP)在蚜传、远距离传播以及保护其 RNA 不受 RNA 酶分解等中起着重要作用, 同时因其 N 端区域免疫原性较强, 在不同病毒间变异程度较大, 作为抗原进行免疫反应制备抗体, 有助于检测 Potyvirus 不同的种。本实验针对 ZYMV 广州分离物(ZYMV-GZ), 采用 RT-PCR 技术扩增了其 CP 基因, 首次将此基因在大肠杆菌中进行了高效表达, 并制备了相应的特异性抗血清, 从而为此病毒的血清学检测提供了条件。

1 材料和方法

1.1 材料

表现花叶、斑驳症状的节瓜采自广州白云区, 保存于-70℃冰箱。TRIzol 试剂盒购自博大泰克公司, DNA 回收试剂盒购自清华天为时代公司, 原核表达载体 pET-22k(+) 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21(DE3) 由本实验室保存, IPTG、NBT、BCIP 购自 Sigma 公司, DNA Marker 和工具酶购自 TaKaRa 公司, 蛋白质分子量标准为 Promega 公司产品。引物由北京赛百盛公司合成。

1.2 寄主反应测定

用常规汁液摩擦接种法将节瓜上的病毒接种了茄科、葫

芦科、藜科、苋科、豆科、番杏科等 6 科 9 种供试植物, 以健康植株作为对照, 观察并记录症状发生。接种试验重复 2 次。不能明显表现症状的植株, 进一步扩大试验, 并用枯斑寄主检测隐症带毒情况。

1.3 植物总 RNA 的提取

用 TRIzol 试剂盒提取节瓜总 RNA, 将之溶解于 DEPC 处理的水中, -70℃保存备用。

1.4 病毒基因组 3'端部分序列的克隆和测序

以所提的总 RNA 为模板用引物 k13148(5'-TGTCGACAGCC TTGCAAACGGAGTC-3') 进行反转录, 反应体系(10 μ L): 1.5 μ L DEPC 处理的水, 2 μ L 5 \times 反转录缓冲液, 2 μ L dNTP(10mmol/L), 0.5 μ L k13148(12.5 μ mol/L), 3 μ L 病毒 RNA, 40U RNA 酶抑制剂和 100U M-MLV。42℃反应 1h。以反转录产物为模板, 用引物 k13148、k13486(5'-GGATCCAGCTCC ATACATAGCTGAGACAG-3') 进行 PCR 扩增。反应条件: 94℃ 30s, 50℃ 1min, 72℃ 1min, 2 cycles; 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 1min, 30 cycles。将 PCR 产物置于 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 切下凝胶中与预期大小相符的片段, 用 DNA 回收试剂盒回收。后将回收产物与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。碱裂解法提取质粒, 进行酶切和 PCR 验证, 将筛选出的阳性重组子进行测序。

1.5 CP 基因的扩增及其原核表达载体的构建

根据测定的序列重新设计引物。上游引物 ZCP5F 序列为 5'-GCCAAGCTTCGGGCACTCAGCAAACCTG-3'(划线部分为 HindIII 位点); 下游引物 ZCP3R 序列为 5'-GGTCTCGAG CTGCATTGTGTTACACCCCA-3'(划线部分为 Xho I 位点)。以 1.2.3 中提取的质粒为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 1min, 2 cycles; 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 1min, 35 cycles。将 PCR 产物电泳、切胶回收, 用 HindIII

基金项目 科技基础性工作专项资金项目(2001DEA10004); 农业部 948 项目(2001-249)

* 通讯作者。Tel 86-10-62732771; E-mail jplpath@cau.edu.cn

作者简介 宋丽敏(1980-), 女, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为植物病毒分子生物学。E-mail jm-song@sohu.com

收稿日期 2004-06-04, 修回日期 2004-09-13

^ 古勤生. 中国侵染葫芦科作物病毒的检测和 小西葫芦黄花叶病的变异性. 中国农业大学博士学位论文, 2001, 16

和 *Xho* I 双酶切, 质粒 pET-221(+) 同样用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切。将经酶切处理的 PCR 产物及载体进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。碱法提取重组质粒, 经 PCR 扩增和酶切筛选出的重组子进行测序以验证阅读框架的正确性。

1.6 CP 基因的诱导表达和 SDS-PAGE 分析

将读框正确的重组子及 pET-221(+) 质粒转化大肠杆菌 BL21, 挑取单菌落于 3 mL LB 液体培养基中(含氨苄青霉素 60 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜后, 按 1:100 稀释到新鲜的 LB 液体培养基中(含氨苄青霉素 60 μ g/mL), 振荡培养至 OD_{600} 达到 0.4~1.0, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol, 继续于 37 $^{\circ}$ C 培养 3~4 h。离心收集菌体, 加入 1/10 体积样品缓冲液(50 mmol Tris-HCl, 2 mmol EDTA, pH 8.0), 震荡悬浮, 然后加入等体积的 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 200 mmol/L 二硫苏糖醇, 4% SDS, 0.001% 溴酚蓝, 20% 甘油), 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 用 12% 胶进行 SDS-PAGE 分析^[4]。

1.7 诱导表达产物的 Western blot 检测及其纯化、定量

表达产物的 Western blot 分析同 Towbin^[5]的方法, 以抗组氨酸抗体为一抗, 碱性磷酸酯酶标记的 A 蛋白为二抗, 最后用 NBT/BCIP 显色。按照 Hager 等^[6]的方法对凝胶染色后, 从中切下目标条带, 按 1:1 的比例(W/V)加入 PBS 缓冲液(8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.97 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.24 g KH₂PO₄, 定容至 1 L, pH 7.4)于冰浴中研磨, 12000 g 离心 10 min, 取上清, -20 $^{\circ}$ C 保存。参照 Bradford 的方法^[7]对纯化产物进行定量。

1.8 抗血清的制备及其效价的测定

向纯化产物中加入等体积的福氏不完全佐剂(1.5 g 羊毛脂 + 8 mL 石蜡油)进行乳化, 免疫德国大白兔。分 4 次注射: 第 1 次肌肉注射结合皮下注射, 第 2~4 次肌肉加皮下 3 点注射, 每次免疫剂量约为 0.2 mg。最后一次注射 15 d 后采血, 制取的抗血清加入 1% 的叠氮化钠, -20 $^{\circ}$ C 保存。将抗血清进行一系列稀释后, 以发病的节瓜汁液作为抗原, 用 ACP-ELISA 方法测定血清的效价。

2 结果

2.1 鉴别寄主测定

该病毒在 6 科 9 种植物上的症状反应见表 1。该病毒只在葫芦科植物上引起系统症状, 供试藜科、苋科植物均只产生局部症状, 而茄科、豆科、番杏科植物则不产生任何症状。

表 1 ZYMV 在鉴别寄主植物上的症状反应

Table 1 Symptom reaction of ZYMV on indicator plants

Family	Indicator plants	Symptom
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i>	No symptom
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Local lesion
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	Local lesion
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	Local lesion
Tetragoniaceae	<i>Tetragonia expansa</i>	No symptom
Leguminosae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	No symptom
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i>	Systemic mosaic
Cucurbitaceae	<i>Citullus lanatus</i>	Systemic mosaic
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Systemic mosaic

2.2 病毒基因组 3' 端部分序列的扩增

对所提取的总 RNA 进行 RT-PCR, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 含有 1.2 kb 大小的特异性核苷酸片段, 与

预期大小一致。

2.3 PCR 产物的克隆及其序列分析

将回收的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5 α , 提取白色克隆质粒, 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 进行双酶切得到与预期大小相符的 1.2 kb 的片段, 说明 PCR 产物已被插入到 pMD18-T 载体中。经过测序及序列分析表明本研究所克隆的产物全长为 1218 bp, 包括整个 CP 基因及部分 3' 端非编码区和 N1b 基因, 与朝鲜分离物(GenBank 登录号: AY278988.1)的同源性为 93%, 证明了该病毒为 ZYMV。

2.4 CP 基因的扩增及其原核表达载体的构建

以重组质粒为模板, 用引物 ZCP5F 和 ZCP3R 进行 PCR 扩增, 得到一 850 bp 的条带, 将之与载体连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 提取白色克隆质粒, 用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切, 所切下的片段为 850 bp 左右, 与 PCR 产物大小相同, 说明 PCR 产物已经连接到 pET-221(+) 上, 将该重组质粒命名为 pET-ZCP, 测序结果证明阅读框架正确。

2.5 表达产物的 SDS-PAGE 检测和 Western blot 分析

将 pET-ZCP 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 并进行诱导表达, SDS-PAGE 后, 考马斯亮蓝染色结果表明: 经 IPTG 诱导, 含 pET-ZCP 的菌株特异的产生了一条分子量为 33.0 kD 的条带。此条带大小与预期相符(图 1)。Western blot 显示, 抗组氨酸抗血清仅与此 33.0 kD 的诱导表达产物反应, 而与其它条带之间均无反应, 证明此条带即为所需要的产物。

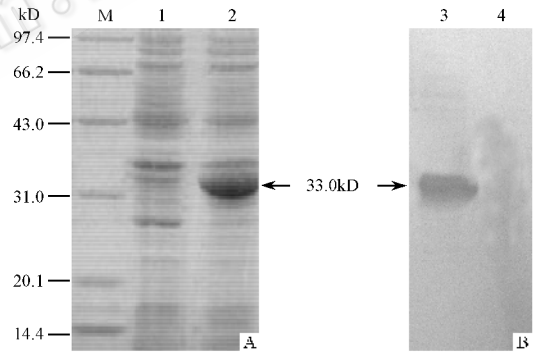


图 1 表达产物的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot 分析 (B)

Fig. 1 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of the gene product expressed

M. Protein Marker; 1. Proteins of *E. coli* cells harboring the expression vector pET-221(+) induced by IPTG; 2. Proteins from *E. coli* cells harboring the recombinant plasmid induced by IPTG; 3. Western blot analysis of the product of pET-ZCP; 4. Western blot analysis of the product of pET-221(+).

2.6 表达产物的纯化和定量

离心收集菌体加入 1/10 体积的样品缓冲液, 震荡悬浮, 然后加入等体积的 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 用 12% 的胶进行 SDS-PAGE 分析, 按照 Hager 等^[6]的方法对凝胶染色后, 对 33.0 kD 的条带切胶回收, 得到纯度较高的表达产物。测定所纯化的表达产物的浓度, 以标准牛血清白蛋白的浓度和 A_{595} 分别为横坐标和纵坐标绘制标准曲线, 对照标准曲线求得浓度为 510 μ g/mL。

2.7 抗血清的制备和效价的测定

将纯化的重组蛋白作为免疫原, 采用肌肉结合皮下 3 点的注射方法免疫大白兔, 4 次注射, 15 d 后取血获得了 ZYMV

特异性的抗血清。以 ZYMV 为抗原进行 ACP-ELISA, 结果表明血清稀释 4096 倍后仍能明显的检测出病毒, 同时抗血清的专化性很强, 与健康的植物汁液没有明显的免疫反应(表 2)。微量免疫沉淀法测得血清的效价为 1/1024。

表 2 ACP-ELISA 测定抗血清的效价

Table 2 Titer of antiserum determined by ACP-ELISA

Dilution of antiserum	Antigen(1:10 diluted)
1/512	0.961
1/1024	0.538
1/2048	0.293
1/4096	0.181
1/8192	0.119
Negative control	0.086
Blank control	0.077

3 讨论

小西葫芦黄花叶病毒病害为一种世界性的病害, 在美国、澳大利亚以及亚洲、欧洲的许多国家都有发生。我国自从 1989 年在新疆发现 ZYMV 开始, 到目前已在许多地区的葫芦科作物上引起了很大的经济损失。但是该病毒在我国一直没有引起重视, 尤其是在南方地区。对该病毒及引起病害的文献报道也比较少, 因此对该病毒的发生和分布及其经济为害的重要性缺乏应有的认识。本研究首次发现 ZYMV 侵染节瓜, 为当地节瓜病毒病的防治提供一定的理论依据。

ZYMV 侵染葫芦科植物造成严重的损失, 因此能及时对其进行检测鉴定就显得尤为重要。本研究通过分子生物学方法克隆了病毒外壳蛋白基因, 并将其在原核细胞中诱导表达, 以表达产物为抗原制备得到具有高特异性的抗血清, 为 ZYMV 的检测鉴定提供基础。与传统的以提纯的病毒制备抗

血清方法相比, 本研究所用的方法具有以下优点(1)只需将含有重组质粒的菌株诱导表达即可获得大量重组蛋白, 而提纯病毒相对来讲需大批寄主植物, 且周期长(2)纯化的重组蛋白不含寄主植物的任何成分, 所制取的抗血清特异性强, 而提纯病毒含有或多或少的寄主成分, 所制取的抗血清需用健康植物的汁液进行吸附, 操作麻烦(3)只需少量的重组蛋白即可获得效果较好的抗血清, 而用提纯的病毒来制取抗血清则用量较大, 对一些在寄主体内含量较低或较难提纯的病毒来讲, 要获得此数量的病毒是比较困难的。

参 考 文 献

- [1] Desbiez C, Lecoq H. *Zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Pathology*, 1997, **46**: 809-829.
- [2] 郑光宇, 董涛. 在新疆发生的小西葫芦黄花化花叶病毒的研究初报. *植物病理学报*, 1989, **21**: 72.
- [3] Brunt A A, Crabtree K. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. 1997.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 885-889.
- [5] Towbin H. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 4350-4354.
- [6] Hager D A, Burgess R R. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel, removal of sodium dodecyl sulfate and renaturation of enzymatic activity. *Analytical Biochemistry*, 1980, **109**: 76-86.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248-254.

Cloning, expression of the CP gene and antiserum preparation of *Zucchini yellow mosaic virus* infecting *Benincasa hispida* Cogn. var. chieh-qua How

SONG Li-min LU Cai-ge LIANG Wen-xing HUANG Jin-guang LI Huai-fang*

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: A Guangzhou isolate of ZYMV infecting *Benincasa hispida* Cogn. var. chieh-qua How was identified by indicator tests and partial sequence amplification. The coat protein (CP) gene of this virus was amplified by RT-PCR, and ligated to the expression vector pET-22k(+). The recombinant plasmid pET-ZCP was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and then induced to express by IPTG. It was showed that the CP gene was highly expressed by SDS-PAGE and Western blot analysis. The molecular weight of the recombinant protein was about 33.0kD. Antiserum with high specificity was produced after the rabbit was immunized with purified recombinant protein, and the titer was determined to be 1/4096 by antigen coating plate-ELISA (ACP-ELISA).

Key words: *Zucchini yellow mosaic virus*, CP, Prokaryotic expression, Antiserum