

- 7 Barr D J S, V E Handland-Hartmann. Zoospore ultrastructure of *polycytrium plurigibbosum*. Canadian Journal of Botany. 1979, 57(1) : 48~53

## Transmission of Wheat Spindle Streak Mosaic Virus by *Polymyxa graminis* and Inoculum Potential of the Infected Soils

Chen Jianping

(Virology Laboratory, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

Five virus free isolates of *Polymyxa graminis* were purified through sand culture of susceptible wheat cv Yangmai 4 inoculated with selected cystosori from diseased wheat roots which were collected from wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV) infected fields. The virus free *P. graminis* acquired WSSMV by mean of inoculation of the cystosori to the roots of wheat plants bearing WSSMV symptom and then transmitted the virus to the healthy wheat plants after further inoculation. The four isolates of *P. graminis* (2 from wheat and 2 from barley) tested cross infected barley (cvs Zhaoshu 3 and Yanfuaizhao 3) and wheat (Yangmai 4 and Zhemai 1) to give large zoospore production per gram of fresh root ( $10^5/g$ ). Either the three infected soils or the two healthy soils tested had powerful inoculum potential of *P. graminis* and WSSMV, of which, cystosori on bait plants (cv Yangmai 4) growing on soil dilution of 1/3125, even 1/15625, were still observed, meanwhile, WSSMV was detected from the roots of bait plants growing in the soil which were diluted of 1/625, even 1/15625.

**Key Words** *Polymyxa graminis*, Wheat Spindle Streak Mosaic Virus, Isolation, Virus Acquisition, Virus Transmission, Inoculum Potential

384-389

3972(14)

## 甜菜坏死黄脉病毒外壳蛋白基因 在大肠杆菌中的高效表达

姚华建 于嘉林 刘 仪

(北京农业大学国家农业生物技术重点实验室, 北京 100094)

S 432.41

A

**提 要** 将甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)内蒙古分离物的外壳蛋白基因亚克隆到 pJW2 上构建成在大肠杆菌中表达的载体。SDS-PAGE 及 Western blotting 检测的结果表明,该表达载体在大肠杆菌 DH5  $\alpha$  中经温度诱导后特异地表达 21kD 的甜菜坏死黄脉病毒外壳蛋白。经光密度扫描估测,其表达量占大肠杆菌总蛋白的 19.5%

**关键词** 甜菜坏死黄脉病毒, 外壳蛋白基因, 表达

甜菜坏死黄脉病毒是一种由甜菜多粘菌(*Polymyxa batae*)传播的多分体正链 RNA 病毒,被划分为真菌传杆状病毒组(Furovirus)的可能成员,引起甜菜丛根病<sup>[1]</sup>。其病毒粒子形态为直杆状,宽度为 20nm,长度则依据其所包被的 RNA 的长短由 60nm 到 390nm 不等。BNYVV 含有 5 条 RNA,根据分子量大小分别称为 RNA1-5(RNA1: 6.8kb; RNA2: 4.7kb; RNA3: 1.8kb; RNA4: 1.5kb; RNA5: 1.45kb)。其中 RNA5 存在于一些 BNYVV 日本分离物中,而在欧洲、美洲及中国分离物中尚未发现它的存在<sup>[2]</sup>。BNYVV 的寄主范围较窄,主要是侵染藜科植物,由它所引起的甜菜丛根病的典型症状是在病株的主根和侧根上大量增生须根,造成甜菜产量和含糖量的严重下降<sup>[1,2]</sup>。自 1987 年以来,我国先后在新疆、内蒙古和宁夏等甜菜产区发现了甜菜丛根病。该病害给甜菜生产带来了很大的损失<sup>[3]</sup>。

编码 21kD 外壳蛋白的基因位于 BNYVV RNA2 的 5' 端<sup>[4]</sup>。我们已将 BNYVV 内蒙古分离物的外壳蛋白基因进行了克隆和序列分析<sup>[5]</sup>。本文报道 BNYVV 内蒙古分离物外壳蛋白基因在大肠杆菌中表达的载体的构建及其高效表达。

### 材料与方 法

#### 1 大肠杆菌表达载体的构建

ScaI 和 BamHI 双酶切含有甜菜坏死黄脉病毒内蒙古分离物外壳蛋白基因 cDNA 的重组质粒 pGC24<sup>[5]</sup>, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳回收 633bp 的目的片段。pJW2 以 NdeI 进行酶切, DNA 聚合酶 I(klenow 片段)补平后再用 BamHI 酶切,与回收的片段进行连接并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,经含有氨苄青霉素的选择性培养基筛选,碱法提取质粒 DNA 进行酶切鉴定。

质粒提取、酶切、回收、连接和转化均参照 Sambrook 等<sup>[6]</sup>的方法进行。

\* 本文于 1993 年 2 月 2 日收到,5 月 3 日修回

## 2 BNYVV 外壳蛋白的诱导表达

含有 BNYVV 外壳蛋白基因表达载体的 DH5 $\alpha$  于 30℃ 活化过夜后, 1:100 稀释到 2ml LB 培养液中, 继续在 30℃ 摇床培养至对数生长期, 迅速转到 42℃ 摇床培养 4—6 小时, 倒入 1.5ml 的 eppendorf 管中, 10000r/m 离心 30 秒, 收集菌体, 加入 120 $\mu$ l 上样缓冲液 (40mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 10% 甘油, 2% SDS, 5% 巯基乙醇, 0.1% 溴酚兰), 煮沸 10 分钟, 置 4℃ 备用。

## 3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 15%, 电泳缓冲液为 25mmol/L Tris, 192mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS, pH 8.3。以 150V 恒压进行浓缩, 溴酚兰进入分离胶后电压调至 200V, 电泳 5 小时。电泳完毕后, 用考马斯亮兰染色液 (考马斯亮兰 R-250 0.15 克, 冰乙酸 50ml, 异丙醇 125ml, 加蒸馏水至 400ml) 染色过夜, 用 10% 冰乙酸置 37℃ 摇床上脱色数次, 以蛋白质条带清晰, 背景透明为止。经岛津 CS-910 双波长薄层扫描仪扫描, 自动积分仪估测表达效率。

## 4 Western blotting

BNYVV 抗血清由美国农业部 Salinas 农业研究站刘兴业博士惠赠。

4.1 转膜 经 SDS-PAGE 的凝胶在转移缓冲液 [25mmol/L Tris, 192mmol/L 甘氨酸, 20% (V/V) 甲醇, pH8.3] 漂洗, 按照 Towbin 等<sup>[7]</sup> 的方法将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶电转移到硝酸纤维素 (NC) 膜上 (60V, 3 小时)。

4.2 封闭 将转移完毕的 NC 膜在 TBST 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 150mmol/L NaCl, 0.05% Tween20) 中漂洗一下, 转入封闭液 (TBST+1% BSA) 中封闭 30 分钟。

4.3 第一抗体反应 经封闭后的 NC 膜在用 TBST 稀释的 BNYVV 抗血清 (1:1000) 中 37℃ 保温 30 分钟, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5—10 分钟。

4.4 第二抗体反应 加入 TBST 稀释的羊抗兔-IgG-HRP (1:2500), 37℃ 保温 30 分钟, TBST 洗膜 3 次, 每次 5—10 分钟。

4.5 显色 将 NC 膜置于含有 0.05% (W/V) 4-氯-1-萘酚和 0.35% (V/V) 的 30% 过氧化氢的显色液中显色至条带清晰, 将膜放入蒸馏水中漂洗终止显色反应。取出晾干, 拍照。

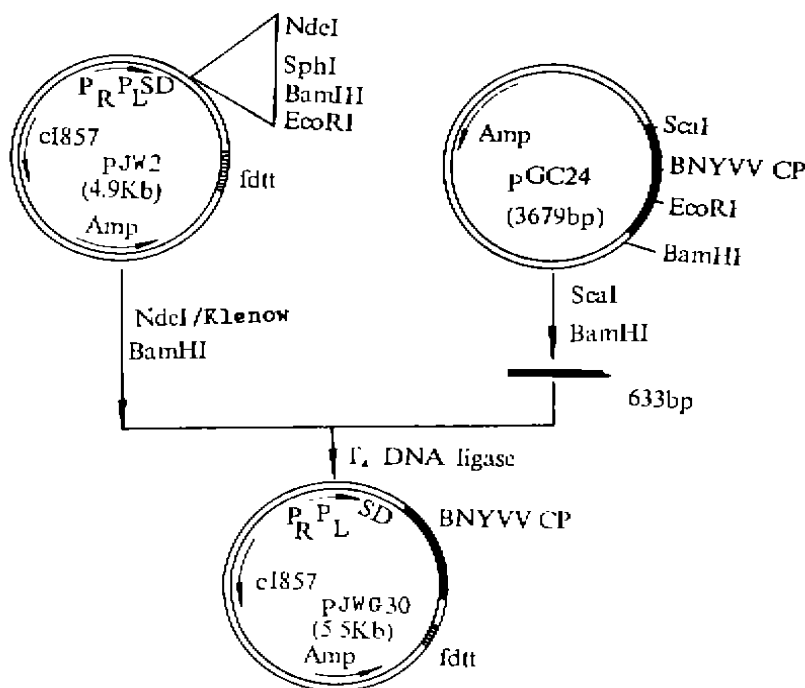


图1 BNYVV 内蒙古分离物外壳蛋白基因表达载体构建

Fig. 1 The construction of coat protein gene expression vector of BNYVV isolate NM

## 结果与讨论

### 1 大肠杆菌表达载体的构建

序列分析结果表明,重组质粒 pGC24 插入片段在 BNYVV 外壳蛋白基因起始密码子 ATG 上游 6nt 处有一个 ScaI 位点<sup>[5]</sup>,以 ScaI 和 BamHI 双酶切 pGC24,回收含有完整 BNYVV 内蒙古分离物外壳蛋白基因的 633bp 片段,与酶切处理的 pJW2 进行连接,转化,筛选得到重组子 pJWG30(图 1)。



图 2 pJWG30 的酶切鉴定

- A. pGEM DNA markers
- B. pJWG30 EcoRI 酶切
- C. pJWG30 BamHI 酶切

Fig. 2 pJWG30 was digested with EcoRI (lane B) and BamHI (Lane C), pGEM-DNA markers was applied in lane A.

EcoRI 酶切 pJWG30 产生 5.3kb 和 223bp 两个片段, BamHI 酶切 pJWG30 产生 5.5kb 的片段(图 2),与预期的结果一致。

### 2 SDS-PAGE 分析

15%SDS-PAGE 分析的结果表明, pJWG30 在 DH5 $\alpha$  中经 42℃ 诱导后,高效表达 21kD 的蛋白,与 BNYVV 外壳蛋白的分子量相符(图 3)。光密度扫描估测的结果显示,相对于时间 1.83 的外壳蛋白表达峰的积分面积占总积分面积的 19.5%,所以,表达的蛋白量占菌体全蛋白的 19.5%(图 4)。

### 3 Western blotting

Western blotting 的结果进一步证实, pJWG30 经 42℃ 诱导后表达的蛋白即为 21kD 的 BNYVV 外壳蛋白(图 5)。

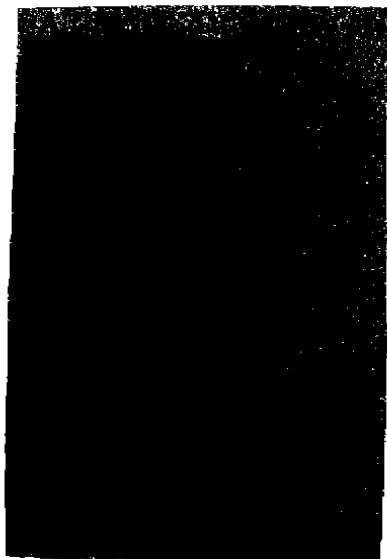


图3 SDS-PAGE分析

A. pJWG30 诱导后(箭头所指为表达蛋白)

B. pJWG30 诱导前

C. pJW2 诱导后

D. pJW2 诱导前

E. 蛋白质分子量标准+BNYVV(上样量均为 15 $\mu$ l)

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of coat protein gene products expressed with pJWG30

A. pJWG30 induced at 42 $^{\circ}$ C

B. pJWG30 without induction

C. pJW2 induced at 42 $^{\circ}$ C

D. pJW2 without induction

E. Molecular markers+BNYVV

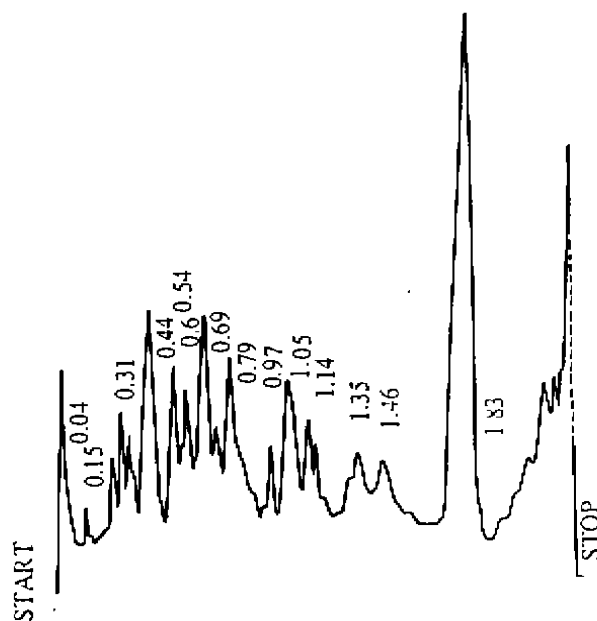


图4 pJWG30表达产物SDS-PAGE的扫描结果(箭头所指为外壳蛋白表达峰)

Fig. 4 Densitometric scanning of pJWG30 products on SDS-PAGE

BNYVV 的分离提纯比较困难,往往不易得到很纯的病毒粒子,这就限制了大量抗原的来源。我们所构建的 BNYVV 内蒙古分离物外壳蛋白基因大肠杆菌表达载体 pJWG30 含有 cI857 抑制子基因和入噬菌体  $P_R P_L$  启动子。cI857 抑制子基因的产物在 30 $^{\circ}$ C 时可结合到  $P_R P_L$  启动子上,从而阻止启动子的开放;当温度升高到 42 $^{\circ}$ C 时,cI857 基因产物失活,  $P_R P_L$  启动子开放,位于启动子下游的 BNYVV 外壳蛋白基因得以表达。因此,pJWG30 适合于在多种大肠杆菌宿主菌中经 42 $^{\circ}$ C 诱导后高效地表达非融合的 BNYVV 外壳蛋白。经过纯化的外壳蛋白可以作为良好的抗原来制备抗血清。这种利用基因工程技术生产难以分离提纯的病毒外壳蛋白的方法将是解决常规血清学方法检测病毒时抗血清供求矛盾的一个有效途径。

## 参 考 文 献

- 1 Tamada T. Beet Necrotic Yellow Vein Virus. C. M. L. /A. A. B. Description of Plant Virus, 1975, No. 144
- 2 Richards K E, Tamada T. Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus. Annu Rev Phytopathology, 1992, 30 : 291—313
- 3 高锦梁, 邓峰, 刘仪. 在我国发生的甜菜坏死黄脉病毒. 植物病理学报, 1983, 13(2) : 1—4
- 4 Bouzoubaa S, Ziegler V, Beck D, et al. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-2. J Gen Virol, 1986, 67 : 1689—1700
- 5 姚华建, 刘仪, 于嘉林, 等. 甜菜坏死黄脉病毒外壳蛋白基因的克隆和序列分析. 生物工程学报, 1993, 9(2) : 147—151
- 6 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T, et al. Molecular Cloning, 2nd ed. New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 Towbin H, et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76 : 4350—4354

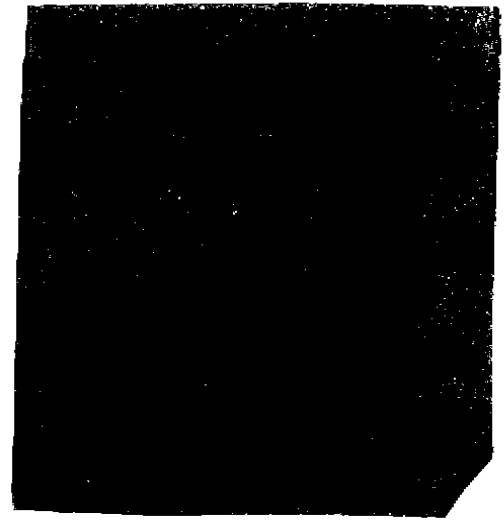


图5 pJWG30 表达产物的 Western blotting

A. pJW2 表达产物

B. D. 和 E. pJWG30 表达产物

C. BNYVV 外壳蛋白(上样量均为 5 $\mu$ l)

Fig. 5 The Western blotting of products expressed with pJWG30 (lane B, D and E), pJW2 (lane A). The coat protein of BNYVV was applied in lane C.

## The High-level Expression of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Coat Protein Gene in Escherichia coli

Yao Huajian, Yu Jialin Liu Yi

(National Laboratories for Agrobiotechnology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

The temperature-inducible expression vector containing the beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) isolate NM coat protein gene was constructed and transferred into *E. coli* DH5  $\alpha$ . High-level expression of the specific protein was achieved by temperature induction. The results of SDS-PAGE and Western blotting show that the expression product which accumulates 19.5% of the total cellular proteins estimated by Shimadzu CS-910 scanning is 21kd BNYVV coat protein.

Key words BNYVV, Coat protein gene, Expression