维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 3期
2002年8月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(3):248-251
August 2002

马铃薯S病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达*

吴兴泉，吴祖建，谢联辉**，林奇英
（福建农林大学植物病毒研究所，福州 350002）

The Clone and Expression of the Coat Protein Gene of Potato Virus S in *E. coli*

WU Xing-quan, WU Zu-jian, XIE Lian-hui**, LIN Qi-ying
(*Plant Virus Institute of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou* 350008, *China*)

Abstract: Based on the PVS coat protein gene sequence (885bp) a pair of specific primers were designed and the coat protein (CP) gene of potato virus S(PVS) was amplitied by RT-PCR. The gene was cloned into pGEX-2T vector and then transformed into *E. coli* DH5α. The gene has high homology (95%) comparing with other isolate genes. The expression vector p2TSCP was constructed. The coat protein gene was expressed in *E. coli* DH5α and a 58kD protein was analysed by SDS-PAGE.

Key words: Potato virus; Coat protein gene; Clone; Expression

摘要：依据马铃薯S病毒(*Potato virus S*, PVS)外壳蛋白(CP)基因序列(885bp)设计合成了两对引物，通过RT-PCR扩增得到长0.8kb的目的片段，将目的片段转入大肠杆菌，酶切鉴定证明得到了含有目的片段的重组子，测定序列结果与其他PVS分离物CP基因的序列比较，发现其核苷酸同源性达95%左右；构建了含PVS CP基因的融合蛋白原核表达载体，并在大肠杆菌中得到表达，SDS-PAGE测定融合蛋白的分子量为58kD。

关键词：马铃薯S病毒；外壳蛋白基因；原核表达
中图分类号：S432　**文章标识码**：A　**文章编号**：1003-5125(2002)03-0248-04

马铃薯病毒是马铃薯生产上非常重要的一类病害，分布于世界各马铃薯产区，常引起马铃薯退化，并影响产量，严重时减产可达80%以上[1]，是马铃薯生产中的主要限制因子。危害马铃薯的病毒很多，以马铃薯命名的就有16种[2]，可侵染马铃薯的病毒则更多，其中最重要的有马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)、马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)、马铃薯X病毒(Potato leafroll virus X, PVX)、马铃薯A病毒(Potato leafroll virus A, PVA)、马铃薯S病毒(Potato leafroll virus S, PVS)等。马铃薯的潜隐病毒马铃薯病毒S(Potato virus S, PVS)是马铃薯上重要病毒之一，分布广泛，在世界各马铃薯种植区均有发生。PVS单独侵染时不表现症状，一般可使马铃薯减产10%～20%[1]。在田间PVS经常与其他病毒混合侵染，当与马铃薯病毒X或马铃薯病毒M混合侵染时，可减产20%到30%。PVS可持续存在马铃薯薯块中，并通过薯块作远距离传播。在田间该病毒传播速度快，传播范围广，既可通过叶片接触传播，也可通过蚜虫传播。一般已通过病毒化验的原种一旦种植在田间便迅速感染PVS，种植一季之后感染率可高达70%，造成严重危害[3]。PVS在我国研究很少，目前尚未见到关于CP基因方面的报导，本文报道了PVS CP基因的克隆及基因的原核表达。

收稿日期：2001-12-31，修回日期：2002-02-06
* 基金项目：国家教育部重点项目(00183)，福建省教育厅重点项目。
作者简介：吴兴泉(1970-)，男，黑龙江省籍，博士生，从事植物病毒分子生物学研究。
** 通讯作者：谢联辉(1935-)，男，福建省籍，教授，中国科学院院士，从事植物病毒学研究。
Correspondence author. Tel: 0591-3789345; E-mail: Xielh@fjau.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌DH5α株系由本所保存,质粒pGEX-2T由本所邵碧英博士惠赠,质粒pGEX-T Easy Vector购自Promega公司。

1.2 工具酶及试剂

试验所用的限制性内切酶、反转录酶、RNA酶抑制剂、Taq DNA聚合酶、Trizol RNA提取试剂盒、dNTP、QIAEX Ⅱ Gel Extraction Kit、马铃薯病毒DAS-ELISA检测试剂盒分别购自上海生工生物技术有限公司、Promega公司和国际马铃薯研究中心。

1.3 PVS的分离与鉴定

1.3.1 PVS样品采自福建省寿宁县,马铃薯品种:德友一号(米拉),为当地农户多年种植的农家种。取样品植株叶片汁液,1%磷钨钠负染后电镜观察。利用马铃薯病毒DAS-ELISA检测试剂盒进行检测,具体方法按说明书说明。

1.3.2 生物学鉴定及分离纯化 通过接种枯斑寄主苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)对病毒进行鉴定及单病斑分离纯化,接种于普通烟(*Nicotiana tabacum*)上保存备用。

1.4 RT-PCR扩增目的基因

1.4.1 引物设计与合成 依据PVS CP基因设计合成了一对引物(划线处为限制性内切酶*Bam*H Ⅰ和*Eco*R Ⅰ酶切位点),用于扩增PVS CP基因,引物为上海生工生物工程有限公司合成,序列如下:5′端引物(S21):5′-GGATCCATGCCGCCTAACA-GATCC-3′,3′端引物(S22):5′-GAATTCTCATTG-GTTGACGCATT-3′。

1.4.2 病毒RNA的提取 采用Trizol Reagent RNA提取试剂盒提取带毒烟草叶片总RNA,以此作为病毒RNA进行试验,同时提取健康烟草叶片总RNA,作为健康对照。具体方法按试剂盒进行说明。

1.4.3 反转录 在Eppendorf管中加入RNA提取液5μL、引物S22(10μmol/L)1μL,瞬离,95℃变性10min,立即置于冰上5min;然后加入下列物质:反转录酶1μL,RNA酶抑制剂1μL、dNTP 1μL、5×反转录酶缓冲液5μL、ddH_2O 11μL,瞬离37℃反应1h,95℃ 5min终止反应。

1.4.4 PCR扩增 反应体系包括反转录产物2.5μL,引物S21、S22(10μmol/L)各2.5μL、10×Taq酶缓冲液2.5μL,$MgCl_2$(25mmol/L)1.5μL,Taq DNA聚合酶0.5μL,dNTP 0.5μL,ddH_2O 12.5μL。PCR反应程序设置:94℃,10min;后94℃,1min,48℃,2min,72℃,2min,共30个循环;然后72℃延伸10min。PCR产物采用1%琼脂糖凝胶电泳检测,并用QIAEX Ⅱ Gel Extrction Kit(QIAGEN)回收。

1.5 PCR产物的克隆

PCR产物经1%琼脂糖电泳回收后,与pGET-T连接(连接方法参照Promega的产品使用说明),并转化通过$CcCl_2$法制备的大肠杆菌DH5α感受态细胞,挑取在加有IPTG和X-Gal的LB平板上生长的白色菌落,进行质粒酶切。

1.6 重组克隆的酶切鉴定

挑取LB平板上的白色菌落,碱法小量提取质粒,以*Eco*R Ⅰ酶切,取适量酶切产物于1%,琼脂糖凝胶上电泳,分析插入片段的大小。

1.7 DNA序列测定

PVS CP基因序列测定由上海基康生物技术有限公司在ABI PRISM 377型DNA自动测序仪上进行。

1.8 PVS CP基因的原核表达

1.8.1 原核表达载体的构建 在PVS CP扩增片段的ORF起始密码子位置上和扩增片段的末尾位置上通过引物设计引入以*Bam*H Ⅰ酶切位点和*Eco*R Ⅰ的酶切位点,故*Bam*H Ⅰ和*Eco*R Ⅰ双酶切重组质粒pTSCP得到0.8kb的目的片段,回收该片段,与经*Bam*H Ⅰ和*Eco*R Ⅰ双酶切的质粒pGEX-2T连接,并转化*E. coli* DH5α,筛选得到重组质粒p2TSCP。

1.8.2 融合蛋白的诱导表达 从转化平板上挑取含重组质粒的菌落接种于含100μg/mL Amp的LB液体培养基中,37℃振荡培养至$OD_{600}=0.6$左右。培养液中加入IPTG至终浓度为1mmol/L,继续振荡培养3h。取1mL菌液于Eppendorf管中,在台式微量离心机上12 000rpm离心1min。收集菌体,悬浮于50μL 10mmol/L Tris-HCL,pH8.0缓冲液中。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.8.3 蛋白的(SDS-PAGE)检测 加样于15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳。然后用考马斯亮蓝染色。

2 结果与分析

2.1 福建省PVS的鉴定与分离

采用福建省寿宁县的马铃薯病毒样品电镜观察为直或稍弯的线条状病毒,可与PVS抗血清产生明显的阳性反应,接种苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)后可产生枯斑反应。通过单病斑分离得到纯化病毒并接种保存于普通烟(*Nicotiana tabacum*)上。

2.2 PVS CP基因的RT-PCR扩增及克隆

以带毒植物总RNA为模板,利用S21与S22这对特异引物进行反转录及PCR扩增,得到了长度约为0.8kb的目的片段(图1)。扩增产物经纯化后克隆到pGEM-T载体上。经蓝白斑筛选、酶切鉴定,得到了含有插入片段的重组子pTSCP(图2)。

图1 RT-PCR扩增PVS病毒CP基因

1、2、4. PVS CP基因PCR产物;3. 健康对照;M. 标准分子量。

Fig.1 PVS CP gene amplified by RT-PCR

1, 2 and 4. PVS CP gene amplified by RT-PCR; 3. Healthy control; M. λDNA/*Eco*R I + *Hin*d Ⅲ marker.

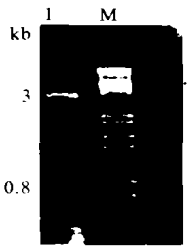

图2 重组质粒pTSCP*Eco*R I酶切鉴定

1. *Eco*R I酶切后的重组质粒pSCP;M. 标准分子量。

Fig.2 pTSCP cleaved by *Eco*R I

1. pTSCP cleaved by *Eco*R I; M. λDNA/*Eco*R I + *Hin*d Ⅲ marker.

2.3 PVS CP基因序列测定及同原性比较

对重组克隆进行序列测定与已知PVS分离物CP基因序列进行比较,发现核苷酸序列同源性达95%以上,氨基酸序列同源性达98.64%,证明成功地扩增得到了马铃薯S病毒外壳蛋白基因。

2.4 PVS CP基因的原核表达

2.4.1 原核表达载体的构建 本实验中,PVS CP基因所选用的载体为用于表达融合蛋白的pGET-2T,长4948bp,具Amp抗性,含有IPTG诱导、高效表达的*tac*启动子,有*Bam*H I、*Sma* I、和*Eco*R I三个克隆位点及适合于三个阅读框架的终止密码子,在克隆位点插入的外源基因可表达成与谷胱甘肽转移酶(glutatione S-transferase, GST)融合的蛋白。以*Bam*H I和*Eco*R I双酶切重组质粒pTSCP得到0.8kb的目的片段,与经*Bam*H I和*Eco*R I双酶切的质粒pGEX-2T连接,并转化*E. coli*DH5α,筛选得到重组质粒p2TSCP,以*Eco*R I/*Bam*H I酶切重组质粒p2TSCP得到5kb的0.8kb两个片段(图3),均与预期结果一致。

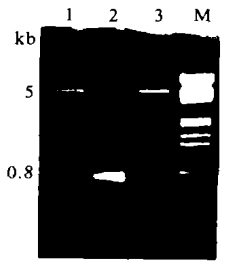

图3 原核表达载体p2TSCP的酶切鉴定

1. *Eco*R I/*Bam*H I酶切pTSCP; 2. PVS CP基因PCR产物; 3. pGEX2T载体;M. 核酸标准分子量。

Fig.3 The p2TSCP expression vector cleaved by enzyme

1. pTSCP cleaved by *Eco*R I/*Bam*H I; 2. PCR product of PVS CP gene; 3. Vector of PGEX-2T; M. λDNA/*Eco*R I + *Hin*d Ⅲ marker.

2.4.2 融合蛋白的诱导表达 由p2TSCP表达得到的融合蛋白GST-SCP前半部为质粒本身的谷胱甘肽转移酶(GST),后半部SCP为PVS-CP基因编码的蛋白。GST蛋白分子量为26kD,而从PVS-CP的核苷酸序列推导的SCP蛋白分子量为32kD,故融合蛋白的分子量应为58kD。由SDS-PAGE图谱可知,表达的融合蛋白的分子量确实在58kD左右(图4),说明表达载体的构建正确,GST-SCP蛋白得到完整表达。

维普资讯 http://www.cqvip.com

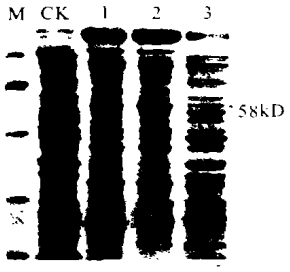

图 4　PVS CP 基因原核表达蛋白 SDS-PAGE 电泳

1、2, *E. coli*.(含 p2TSCP)诱导后的全蛋白;3, *E. coli*.(含 p2TSCP)未经诱导时的全蛋白;CK, *E. coli*. 诱导后的全蛋白;M, 分子量标准。

Fig. 4　SDS-PAGE of protein exressed by PVS gene in *E. coli*.

1 and 2, Protein of the induced *E. coli*. with p2TSCP;3, Protein of the noninduced *E. coli*. with p2TSCP; CK, Protein of *E. coli* without p2TSCP; M, Protein marker.

3　讨论

我国由北向南马铃薯带毒率依次增高,造成我国中部和南部地区不能自行留种,须从东北、内蒙古等发病轻的地区调种,给生产造成了巨大损失。福建省地处我国东南部,马铃薯病毒病危害严重,但目前 PVS 仅在我国黑龙江省、青海省和内蒙古自治区曾有报道[4~7],而在病毒病危害严重的福建省等南部地区却未见报道。本文通过生物学方法和免疫学方法对福建省马铃薯上 PVS 进行了鉴定和分离纯化,证实 PVS 在福建省马铃薯上广泛存在,为当地马铃薯病毒的防治工作提供了一定的理论依据。

我国马铃薯病毒病的研究工作主要集中于马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY)[8]、马铃薯卷叶病毒((Potato leafroll virus, PLRV)[9]马铃薯 X 病毒(Potato virus X, PVX)等几种病毒上,对 PVS 的研究报道极少,主要对该病毒的免疫学检测技术作了一些工作,尚未见到关于此病毒的分子生物学方面的研究。通过分子生物学手段克隆病毒外壳蛋白基因,将其在原核细胞中诱导表达,产生病毒外壳蛋白或融合蛋白,以表达产物为抗原可制备得到具有高特异性的抗血清[10]。这种方法不但克服了传统免疫学方法中制备抗血清时的种种弊端,而且可以根据需要随时诱导转化菌表达产生大量抗原,用以制备高特异性的抗血清,是一项值得推广的技术。

参考文献

[1] 李济宸,唐玉华,谭宗九,等.马铃薯病害及其防治[M].石家庄:河北科学技术出版社,1992.129-131.

[2] 谢联辉,林奇英,吴祖建.植物病毒名称及其归属[M].北京:中国农业出版社,1999.137-142.

[3] 杨文美,李大同.马铃薯 S 病毒的蚜虫传播[J].青海大学科技译丛,1992,27:34-40.

[4] 崔荣昌,李芝芳,李晓龙,等.应用酶联免疫吸附试验法鉴定几种主要马铃薯病毒[J].植物保护学报,1989,16:193-197.

[5] 孟　清,张鹤龄,宋波符.应用 Dot-ELISA 检测 PVX、PVY、PVS[J].中国病毒学,1993,8:365-372.

[6] 白艳菊,李学湛,吕典秋,等.应用 DAS-ELISA 法同时检测多种马铃薯病毒[J].中国马铃薯,2000,14:144-145.

[7] 朱国春,朱国庆.用 DTBA 方法检测马铃薯病毒[J].马铃薯杂志,2000,14:60-61.

[8] 周艳玲,刘学敏,孟学芹.马铃薯 Y 病毒的检测技术[J].中国病毒学,2000,14:89-94.

[9] 张　彤,哈斯阿古拉,张鹤龄,等.用逆转录聚合酶链式反应检测马铃薯卷叶病毒[J].病毒学报,1996,12:190-192.

[10] 王振东,张　敏,上田一郎,等.马铃薯 Y 病毒普通系外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达[J].中国病毒学,1999,157-162.