

玉米蚜体内参与传毒的共生菌 *groEL* 基因的克隆和原核表达 *

林 林, 吴云锋 **, 崔晓峰

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨陵 712100)

Cloning and Prokaryotic Expression of *groEL* Gene of
Endosymbiotic Bacterium from *Rhopalosiphum maize*

LIN Lin, WU Yun-feng **, CUI Xiao-feng

(Department of Plant protection, North-West Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: Cloned one virus binding protein from *Rhopalosiphum maize* Yangling biotype through PCR technique, using designed specific primers based on this protein partially sequence. In nucleotide and amino acid sequence levels, this protein was identified as GroEL protein of endosymbiotic bacterium (*Buchnera* sp.) of aphid. The results of nucleotides sequencing indicated that the full length of *groEL* genes (GeneBank accession number is AF387863) is 1647bp and code 548 amino acids. The cloned *groEL* genes of and *Rhopalosiphum maize* were ligated into pBV221, pET30a and pTrcHisA vector for expressing. The results suggested that 63 KDa aim proteins can be expressed using pBV221. When pET-30a used, the expressed fusion proteins have a molecular weight of 69 KDa, and both have a higher expression quantity.

Key words: *Rhopalosiphum maize*; Endosymbiotic bacterium; GroEL; Transmission; Expression vector

摘要: 以玉米蚜杨凌生物型为材料, 设计特异性引物采用 PCR 的方法在国内首先克隆了一种玉米蚜体内参与传毒的共生菌 *groEL* 基因, 序列测定结果表明: 玉米蚜杨凌生物型共生菌 *groEL* 基因全长为 1647bp, 编码 548 个氨基酸, 登录 Genebank, 序列号为 AF387863。构建了该基因的原核表达载体, 用 pBV221 表达出 63KDa 的非融合目的蛋白, 用 pET-30a 表达出 69KDa 的融合蛋白, 二者均有较高的表达量。

关键词: 玉米蚜; 内共生菌; GroEL; 传毒; 表达载体

中图分类号: S433 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2003)-01-0054-04

蚜虫传毒一直是植物病毒病传播的重要方式, 所以也一直是研究的热点和重点。随着研究方法和技术的飞速发展, 对蚜传病毒分子水平上的机制研究已经成为可能并迫切需要解决的问题, 人们渴望通过对其机制的深入了解来达到有效防治病毒病的目的。

对蚜虫体内共生菌的 GroEL 蛋白参与了蚜虫对病毒循环传播的研究国外起步较早^[1], 国内的

研究工作近两年才开始。蚜虫内共生细菌 (endosymbiotic bacterium) GroEL 是蚜虫腹部的菌胞一个专化的脂肪体细胞所捕获的胞内共生菌 (*Buchnera* sp.) 合成的一种蛋白, 又称 symbionin (SymL)。因为其与 *E. coli* 中的 GroEL 蛋白具有很高的同源性, 故也称之为 GroEL 蛋白。它是分子伴侣 cpn60 家族成员^[2]。*Buchnera* GroEL 蛋白不仅存在于细菌细胞内, 它在蚜虫血淋巴中的浓度也很高。已有实验^[3,4] 表明血

收稿日期: 2002-04-01, 修回日期: 2002-04-30

* 基金项目: 国家自然科学基金资助(39970483); 国家 863 青年基金资助(97-137); 国家攀登计划资助(85-31-05-02)

作者简介: 林林(1974-), 女, 在读硕士。

** 通讯作者。Correspondence author. E-mail: wuyf@public.sa.sn.cn

本文研究的基因已在 Genebank 上登录(AF387863)。

淋巴中病毒与内共生菌的 GroEL 蛋白结合可能是昆虫介体循环传播的重要机制。本文报道了玉米蚜中 groEL 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达结果。

1 材料与方 法

1.1 蚜虫

供试玉米蚜 (*Rhopalosiphum maize*) 采自杨凌玉米田 (即为杨凌生物型), 在防虫温室内多代转接并将单头虫克隆五代后, 饲养于玉米上, 收集 3-4 龄期的无翅蚜冻于 -70°C , 备用。

1.2 菌种、质粒与试剂

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3), 克隆载体 pBluescript KS, 表达载体 pBV221、pET-30a 及 pTrcAisA 均由中国科学院微生物所惠赠; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购于 Takara 公司。二抗 (辣根过氧化物酶标羊抗兔) 购于华美生物公司, 硝酸纤维素膜为国产。

1.3 模板 DNA 的提取

100mg 冰冻的蚜虫于 200 μL TE buffer 中匀浆, 5000 r/min 离心 3min 后, 收集沉淀, 加入 600 μL 裂解 buffer (0.1mol/L NaCl、0.1mol/L EDTA、1% SDS、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K) 于 65°C 水浴中裂解 60min, 冰上放置 5min 后, 5000r/min 稍离心, 上清液分别用酚: 氯仿 (1:1)、氯仿抽提, 冷乙醇沉淀 DNA, 紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和质量。

1.4 PCR 扩增

根据崔小峰、吴云锋等发表的序列设计引物^[5], 并在引物中设计 *Pst* I 和 *Bam*H I 的酶切位点。引物序列如下:

SP1: ACCCTGCAGATGCGCGCTAAAGATGAAA

SP2: ACGGATCCTTACATTCCACCCATGCC

扩增在 25 μL 体系中进行, 内含引物 SPI 和 SP2 各 0.6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、模板 200ng、dNTPs 2.5mmol/L、10 \times PCR buffer 5 μl 、 Mg^{2+} 2.5-3.0mmol/L、TaqDNA 聚合酶 1U, 加水至 25 μL 。PCR 反应条件: 为 94°C 预变性 5min 后, 进行 94°C 1min、 52°C 1min、 72°C 2min 进行 35 个循环的扩增, 最后 72°C 延伸 10min 后, 保存于 4°C 。

1.5 连接、转化与筛选

按 Sambrook (1989)^[6]的方法进行 PCR 产物与 pBluescript KS 的连接、转化和阳性克隆的筛选, 酶切和 PCR 鉴定插入片段的大小和方向。

1.6 序列测定与分析

序列测定由大连宝生物公司进行, 氨基酸序列

推导和同源性比较借助 Blast 和 DNASIS 软件进行。

1.7 原核表达载体的构建与诱导表达

用 *Eco*R I+*Bam*H I 分别从重组质粒 (pKSRM) 上切下目的基因, 将其与相同酶切开的原核表达载体 pBV221 连接, 阳性质粒用 *Eco*RI+*Hind* III 切下目的基因再连接到表达载体 pET-30a 和 pTrcHisA 上。pBVRM 用 42°C 热诱导 1~6h, pETRM 和 pTrcRM 用终浓度 1mmol/L 的 IPTG 诱导 2~6h, SDS-PAGE 检测蛋白的表达。

1.8 Western 检测分析

按 Sambrook (1989, 分子克隆) 和精编分子生物学实验指南的方法进行。一抗为本实验室制备。二抗用 SAR-HRP-IgG (过氧化物酶标羊抗兔抗体), 用 DAB/NICL 显色。

2 结果与分析

2.1 基因克隆

利用设计的特异性引物, 采用 PCR 体外扩增的方法从蚜虫体内扩增出一条约为 1.65kb 的 DNA 片段, 将其连接到质粒载体 pBluescript KS 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 重组质粒经蓝白斑筛选、双酶切鉴定 (如图 1) 和 PCR 鉴定 (如图 2 所示), 证实全长目的片段已连接到 pBluescript KS 载体上, 命名为 pKSRM。

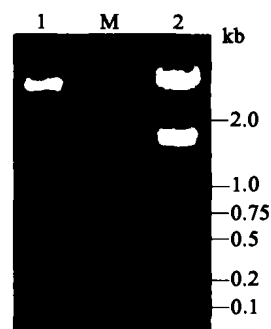


图 1 重组质粒的双酶切鉴定

Fig.1 Recombinant plasmid indentified by *Pst* I/ *Hind* III

1, Negative control; M, Marker; 2, Recombinant plasmid.

2.2 序列分析

序列测定结果表明所获得的玉米蚜杨凌生物型病毒结合蛋白基因包括起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA), 全长为 1647bp, 经联网查询发现其与 GeneBank 中的桃蚜荷兰生物型 (AF003957)、豌豆蚜日本生物型 *Buchnera* groEL 基因长度相同, 同源性分别为 93%和 92%, 与 GeneBank 中的桃蚜杨凌生物型 (AF367248)、禾谷缢管蚜 (AF387864)

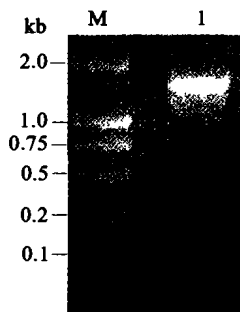


图 2 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 2 Recombinant plasmid indentified by PCR

M. Marker; 1. Recombinant plasmid.

的同源性分别为 94% 和 97%。分析比较玉米蚜和不同 groEL 基因的同源性, 发现玉米蚜和禾谷缢管蚜为同一个属, 它们的同源性为最高达 97%, 和桃蚜、豌豆蚜在不同属, 所以其同源性略低, 这表明 groEL 基因的同源性与其共生蚜虫的亲缘性呈正相关。比较它们的碱基差异, 发现在第 1557 处核苷酸比禾谷缢管蚜美国生物型少 ATG 3 个碱基, 这与禾谷缢管蚜杨凌生物型 (AF387864) 的核苷酸报道结果是一致的。玉米蚜杨凌生物型内共生菌 groEL 基因在 GenBank 的登录号为 AF387863。

2.3 蛋白质的氨基酸序列推导

利用计算机软件进行 *Buchnera* groEL 基因编码氨基酸的推导, 结果表明玉米蚜 *Buchnera* groEL 基因编码 548 个氨基酸。由于密码子具有兼并性, 有些碱基的变化并不引起氨基酸的改变, 所以其编码蛋白质的同源性要高于核苷酸序列的同源性。在 Gen Bank 上用 Blast 对其与同源序列进行比较, 玉米蚜内共生菌 *Buchnera* GroEL 与桃蚜杨凌生物型 *Buchnera* GroEL 蛋白有 14 个氨基酸不同, 序列同源性为 97.4%, 它们分别是第 6 位 E→V、第 111 位 M→K、第 212 和 294 的 V→I、第 308 的 D→E、第 326 的 N→S、第 341 的 QA→HT、第 348 的 Q→H、第 428 的 I→T、第 432 的 H→Q、第 530 的 T→S 以及第 532 的 AS→SN; 与同一个属的禾谷缢管蚜杨凌生物型 GroEL 蛋白仅有 5 个氨基酸不同, 同源性为 99.1%, 其变化分别为: 第 6 位的 E→V、第 264 的 M→T、第 298 的 R→P、第 328 的 V→G 以及第 332 的 G→S。与其它 GroEL 的同源性也均在 80% 以上。

2.4 玉米蚜共生菌 groEL 基因在大肠杆菌中的表达

利用原核表达的载体 pBV221、pET-30a 和 pTrcHisA 构建了含目的基因的 3 个原核表达载体: pBVRM, pETRM 和 pTrcRM, 转化大肠杆菌 BL21

(DE3), 挑取阳性克隆培养, 菌体经裂解后 SDS-PAGE 检测。对于 pBV221 载体, 42℃ 热诱导 1-6h, 与未诱导对照相比, pBVRM 在 63kDa 处表达出一条蛋白带(如图 3 中箭头所指), 这与预测的目的基因表达产物分子质量相当, 初步表明目的基因已经

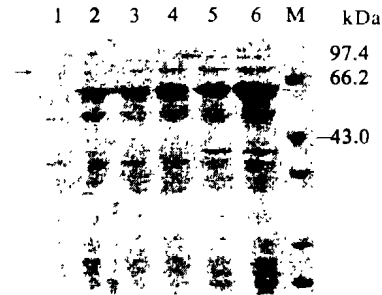


图 3 原核表达载体 pBVSG 诱导表达的 SDS-PAGE 检测
Fig.3 The SDS-PAGE analysis of expression vector pBVRM
Protein marker

1. pBVRM/CK; 2. pBVRM/1h.

表达; pET-30a 和 pTrcHisA 载体分别用终浓度 1mM 的 IPTG 诱导 1-6hr, SDS-PAGE, 检测发现与未诱导对照相比, 含目的基因的表达载体 pETRM 在 69ku 处多出一条蛋白带(图 4 中箭头所指), 其可能为 *Buchnera* groEL 基因的融合表达产物, 因 *Buchnera* groEL 表达产物分子量为 63kDa, 加上 pET-30a 载体上融合表达的 6×His、凝血因子(thrombin)、肠激酶(enterkinase)等, 此蛋白带分子量与预期的融合蛋白的分子量相当, 在不同诱导时间下目的基因均有表达。对于 pTrcHisA 载体, 经挑取多个克隆、多次不同时间、不同受体菌的诱导均未见特异带, 也许是其表达产物产量太低所以用 SDS-PAGE 检测不出来。

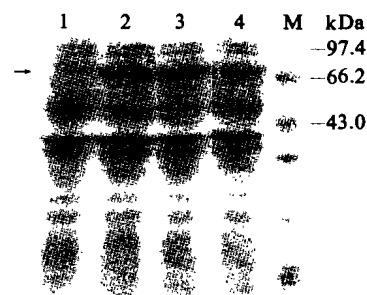


图 4 原核表达载体 pETRM 诱导表达的 SDS-PAGE 检测
Fig.4 The SDS-PAGE analysis of expression vector pETRM
1, pETRM/CK; 2, pETRM/2h; 3, pETRM/4h; 4, pETRM/6h; M, Protein marker.

2.5 Western 检测结果

Western 检测一抗稀释 1:500, 二抗稀释 1:

1000,在融合蛋白 pETRM 和非融合蛋白 pBVRM 均有明显的杂交带出现,进一步说明特异蛋白带即为目的蛋白。结果见图 5。

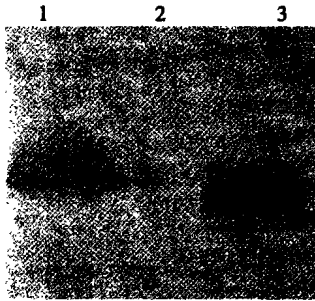


图 5 表达产物的 Western 检测

Fig. 5 The western blot analysis of the expressed protein
1, pETRM; 2, Negative control; 3, pBVRM.

3 讨论

蚜虫体内广泛存在内共生菌,类似 GroEL 蛋白的分子存在于几乎所有的蚜虫属中。用抗生素处理蚜虫干扰内共生菌蛋白的合成,结果蚜虫传毒效率降低^[2]。蚜虫内共生菌在体内为蚜虫的生存提供必须的氨基酸、维生素等物质^[3]。去除内共生菌后蚜虫将不能生存也不能传播循环持久性病毒,因为进入血淋巴中的病毒只有与内共生菌 GroEL 结合才能免于被血淋巴中的蛋白酶类降解从而维持其持久性。蚜虫共生菌 GroEL 蛋白为分子伴侣 cpn60 家族成员^[2],已知大肠杆菌分子伴侣 GroEL 蛋白参与多肽的折叠、蛋白组装、转位等过程^[9],在蚜虫唾液中检测到类似 *Buchnera* GroEL 的分子存在,因而可能与病毒从血淋巴到附唾液腺 (ASG) 的转运有关^[7]。

玉米蚜在田间能传播多种病毒,但是很少传播大麦黄矮病毒。而配体结合实验表明 BYDV-PAV 对其非介体玉米蚜的内共生菌 GroEL 也表现了强的亲和性,进一步研究表明其亲和性与 GroEL 蛋白是否来源于介体并不相关。然而不被蚜虫循环传播的植物病毒对 GroEL 蛋白不表现亲和性。本研究以玉米蚜杨凌生物型为材料,用 PCR 方法在国内外首先从其体内扩增出与蚜虫传毒相关蛋白的

groEL 基因,通过序列测定、在国际基因库中进行同源性比较、氨基酸序列推导与比较,认为蚜虫内共生菌的 groEL 基因以及其编码的蛋白的同源性与其寄主蚜虫的亲缘远近呈正相关。而其不同介体内共生菌 GroEL 蛋白的氨基酸变化在蚜虫传毒过程中的作用有待于进一步研究。在此基础上,对 groEL 基因在大肠杆菌中进行表达并得到了其融合表达产物和非融合表达产物并进行了 western 检测分析。这些工作为进一步研究玉米蚜在传毒过程中 GroEL 蛋白的生物学意义以及它在蚜虫循环传播植物病毒过程中的作用奠定了基础^[7,8]。

参考文献

- [1] Gray S M, Banerjee N. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal virus[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63 (1):128-148.
- [2] Van den Heuvel J F J M, Verbeek M, van der Wilk F. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae* [J]. *J Gen Virol*. 1994, 75: 2559-2565.
- [3] Douglas A E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera* [J]. *Annu Rev Entomol*, 1998, 43:17-37.
- [4] Baumann P, Baumann I, Lai C Y, et al. Genetics, Physiology and evolutionary relationships of genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49: 55-94.
- [5] 崔晓峰, 吴云峰, 林 林, 等. 桃蚜体内与病毒结合的共生菌 *Buchnera* groEL 基因的克隆和序列分析 [J]. *中国病毒学*, 2002, 17: 69-72.
- [6] J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [7] Filichdin S A, Brumfield S, Filichdin T P, et al. In vitro interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus [J]. *J Virol*, 1997, 71: 569-577.
- [8] 吴云峰, 周广和. 非持久性病毒传播机制的研究进展 [J]. *中国病毒学*, 1996, 11(4):496-300.
- [9] Hogenhout S A, van der Wilk F, Verbeek M, et al. Identification the determinants in the equatorial domain of *Buchnera* GroEL implicated in binding Potato leafroll virus[J]. *J Virol* 2000, 72 (10): 4541-4548.
- [10] 吴云峰. 蚜虫传毒机制的研究 [D]. 陕西杨凌:西北农业大学, 1994.