

网络出版时间:2015-03-12 14:17 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.04.001
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150312.1417.001.html

新疆加工番茄上南方番茄病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达

张 强,崔百明,郑银英,向本春

(石河子大学 生命科学学院 农业生物技术重点实验室,新疆 石河子 832003)

[摘要] 【目的】克隆南方番茄病毒(STV)的外壳蛋白(CP)基因,构建其原核表达载体并进行诱导表达,为制备检测该病毒的高效价血清提供参考。【方法】利用一步法 RT-PCR 从新疆加工番茄上克隆 STV CP 基因,将其连接到原核表达载体 pET-28a(+)上,获得重组质粒 pET-28a-STV CP。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21 后用 IPTG 进行诱导表达。【结果】成功克隆了 STV CP 基因,其长度为 1 134 bp。构建了原核重组表达质粒 pET-28a-STV CP,其在 1 mmol/L IPTG 诱导下,成功表达出分子质量约 47 ku 的蛋白。【结论】成功克隆了 STV CP 基因,并诱导了 pET-28a-STV CP 重组蛋白的原核表达。

[关键词] 南方番茄病毒;外壳蛋白基因;原核表达

[中图分类号] S432.41

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)04-0118-05

Cloning and prokaryotic expression of coat protein gene of Southern tomato virus from processing tomato in Xinjiang

ZHANG Qiang, CUI Bai-ming, ZHENG Yin-ying, XIANG Ben-chun

(College of Life Science, Key Laboratory of Agriculture Biotechnology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: 【Objective】 This paper aimed to clone the coat protein (CP) gene of *Southern tomato virus* (STV), and construct and express its prokaryotic expression vector, providing reference for preparation and detection of high titer serum of the virus. 【Method】 The STV CP gene was cloned by One-Step RT-PCR and connected with pET-28a(+) to obtain pET-28a-STV CP. Then the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 and induced by IPTG. 【Result】 The STV CP gene was cloned successfully with the size of 1 134 bp and prokaryotic expression vector pET-28a-STV CP was also constructed. The CP protein with molecular weight of 47 ku was highly expressed after being induced by 1 mmol/L IPTG. 【Conclusion】 STV CP gene was successfully cloned, and the expression of recombinant protein was induced successfully.

Key words: Southern tomato virus; coat protein gene; prokaryotic expression

加工番茄属于普通番茄的一种类型,在新疆有“红色产业”之称。近些年,随着种植面积的逐年加大,加工番茄已成为新疆经济的支柱性产业之一,也是新疆经济增长速度最快的产业之一^[1-2]。

加工番茄由于枝繁叶茂、种植密度大、品种抗病能力不一、栽培时间长、连作和重茬地增多等因素,导致其病毒病日趋严重。对加工番茄的病毒病进行调查发现,加工番茄病毒病类型主要有花叶型、蕨叶

[收稿日期] 2013-11-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31260420);国际科技合作与交流专项(20072072)

[作者简介] 张 强(1985—),男,陕西蒲城人,在读硕士,主要从事植物病毒学研究。E-mail: zhangqiang1047@126.com

[通信作者] 郑银英(1975—),女,吉林延边人,副教授,主要从事植物病毒学研究。E-mail: zyybcm@sina.cn

型、条斑型、巨芽型、卷叶型和黄顶型等。侵染加工番茄的主要病毒有黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、番茄花叶病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)、马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)等。在 2006—2010 年,CMV 在新疆北疆加工番茄上的检出率为 21.5%~83.2%;2009—2010 年,ToMV、PVY 在新疆北疆加工番茄上的检出率分别为 96.7%和 24.8%,这些病毒对加工番茄品质和产量产生了严重的影响,同时也造成了较大的经济损失^[3-6]。

南方番茄病毒(*Southern tomato virus*, STV)是最近报道的一种植物 dsRNA 病毒,其基因组全长为 3 437 nt,在正义链上存在部分重叠的 2 个开放阅读框(ORF)。虽然 STV 基因组结构与整体病毒科(Totiviridae)病毒相同,但是两者在氨基酸序列和二级结构上存在很大差异。利用 RNA 依赖 RNA 聚合酶(RdRp)蛋白全序列及保守区进行聚类分析发现,STV 与分体病毒科(Partitiviridae)病毒的亲缘关系较整体病毒科病毒更近。因此,STV 是一种与整体病毒科病毒和分体病毒科病毒均有亲缘关系的植物病毒^[7]。

2011 年,新疆加工番茄出现 STV 感染植株。STV 是严格种传病毒,不能通过摩擦接种和嫁接等方式传播,但可通过品种引进、品种培养和良种繁育等过程传播^[8]。因此,建立快速、准确的病毒检测方法是 STV 病害监控和防治的关键。病毒特异性抗血清的制备和应用是目前病毒检测最有效的手段之一^[9-11]。因此,本研究克隆了 STV 外壳蛋白(Coat protein, CP)基因,构建其原核表达载体,并进行诱导表达,以期制备该病毒检测所需高效价抗血清提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 加工番茄样品 于 2012-08,自新疆石河子蔬菜花卉研究所随机采集加工番茄,样品编号为 S3-13。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 及表达载体 pET-28a(+),由石河子大学农业生物技术重点实验室 319 室保存。克隆载体 pGEM-T Easy Vector,购于 Promega 公司。

1.1.3 酶与试剂 限制性内切酶 *Nco* I、*Bam*H I,购自 Fermentas 公司;*Taq* DNA Polymerase,购自 Roche 公司;*T4* DNA 连接酶、PCR 产物

凝胶回收试剂盒,购自 Promega 公司;质粒提取试剂盒,购自 GENOMED 公司;胰蛋白胨、酵母提取物等,购自上海生工生物工程技术有限公司;Agarose-Molecular Biology Grade,购自 Invitrogen 公司。

1.2 方 法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 上的 STV 全序列(GenBank 登录号:EF442780)设计引物,上游引物 5'-CATGCCATGGCTGGTGTGCG-GAGGTT-3'(下划线部分为 *Nco* I 酶切位点);下游引物 5'-CGCGGATCCACCTCTATCCTTGCGTT-GGG-3'(下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点)。引物预期扩增片段长度为 1 134 bp,由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.2.2 总 RNA 的提取 使用 Invitrogen 公司 TRIZOL Reagent 提取加工番茄叶片的总 RNA。取适量新鲜叶片于 1.5 mL 离心管中,加入 400 μ L TRIZOL,用研磨棒充分研磨,室温放置 5 min,加入 80 μ L 氯仿,振荡 20 s,静置 2~3 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min。取 100 μ L 上清,加入等体积异丙醇,混匀,静置 10 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min。弃上清,加入 500 μ L 体积分数 75%的无水乙醇,混匀,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min,弃上清并收集沉淀,加入 20 μ L DEPC 水,1%琼脂糖凝胶电泳检测后,-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 CP 基因的克隆 使用 Invitrogen 公司 SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA Polymerase 进行一步法 RT-PCR 扩增。反应体系如下:总 RNA 1 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,5 mmol/L MgSO₄ 0.8 μ L,2 \times Reaction Mix 5 μ L,SuperScript III RT/Platinum *Taq* Mix 0.2 μ L,用 ddH₂O 补充至 10 μ L。试验同时设立阴性对照,以 ddH₂O 代替模板进行扩增。反应条件为:55 $^{\circ}$ C 15 min,94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,59 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 90 s,40 个循环;68 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色后在凝胶成像仪上观察结果。使用 PCR 产物凝胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物,与 pGEM-T Easy Vector 载体相连接,构建重组质粒 pGEM-T Easy-STV CP 并转化 DH5 α 感受态细胞,利用蓝白斑试验筛选阳性克隆,提取质粒,经 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定后,送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。质粒测序后,将本研究的 CP 与 NCBI 上已公布的 STV 相关序列进行 BLAST 比对分析。

1.2.4 原核表达载体的构建 用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切阳性重组质粒 pGEM-T Easy-STV CP, 与经同样双酶切的原核表达载体 pET-28a(+), 获得重组质粒 pET-28a-STV CP, 转化 DH5 α 感受态细胞, 利用蓝白斑试验筛选阳性克隆, 提取质粒, 进行 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定。

1.2.5 CP 基因的诱导表达 将重组质粒 pET-28a-STV CP 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取阳性克隆接种于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜活化, 1:100 (体积比) 稀释到 5 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 3 h, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 6 h, 分别于 2, 4, 6 h 取样并离心收集菌体, 加适量的 PBS 裂解液振荡悬浮, 再加等体积 5 \times SDS 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 8 min, SDS-PAGE 电泳检测 CP 的表达情况。试验同时设未经 IPTG 诱导的 pET-28a(+) 载体、经 IPTG 诱导的 pET-28a(+) 载体、未经 IPTG 诱导的 pET-28a-STV CP 重组质粒为对照。

2 结果与分析

2.1 STV CP 基因的克隆与序列分析

提取的总 RNA 经电泳检测, 出现 3 条带, 其中 28S 和 18S 条带较亮, 5S 条带较弱, 但可以用来进行后续试验。一步法 RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, 样品在 1 134 bp 处扩增出明显条带(图 1), 长度与预期扩增结果相符, 而去离子水阴性对照没有扩增出相应的片段。

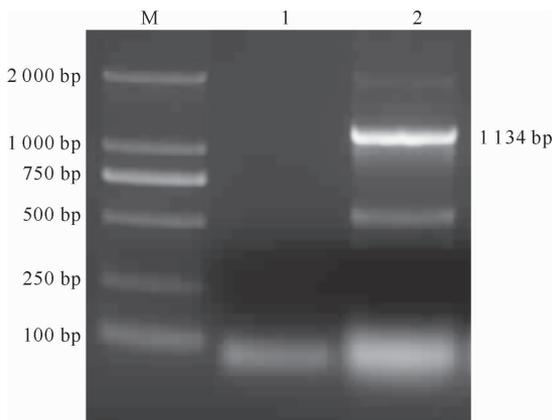


图 1 STV CP 基因的一步法 RT-PCR 扩增

M. DNA Marker DL2000; 1. 阴性对照;

2. CP 基因一步法 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 One-Step RT-PCR amplification of STV CP

M. DNA Marker DL2000; 1. Negative control;

2. Product of STV CP gene

将回收后的 STV CP 与 pGEM-T Easy Vector 连接, 转化筛选获得阳性克隆 pGEM-T Easy-STV CP。本研究的 CP 与 NCBI 上已公布的 STV 相关序列分析结果显示, 序列同源性均在 99% 以上。

2.2 STV CP 基因表达载体的鉴定

重组质粒 pGEM-T Easy-STV CP 用 *Nco* I / *Bam*H I 双酶切, 回收目的片段, 定向插入到 *Nco* I / *Bam*H I 双酶切的 pET-28a(+) 中, 转化筛选获得重组质粒 pET-28a-STV CP。对重组质粒 pET-28a-STV CP 进行 *Nco* I / *Bam*H I 双酶切鉴定, 结果酶切出现约 1 134 bp 的目的片段(图 2), 表明 STV CP 基因已连接至 pET-28a(+) 原核表达载体上。

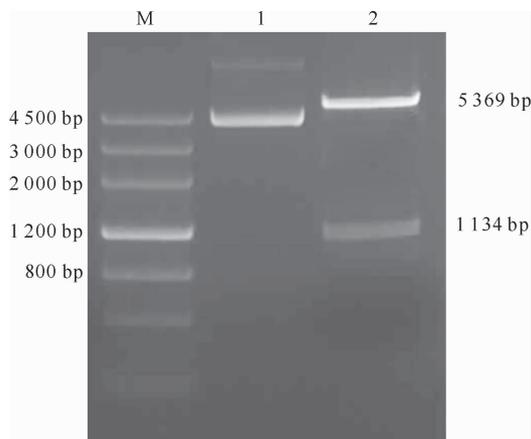


图 2 重组质粒 pET-28a-STV CP 的酶切鉴定

M. DNA Marker III; 1. pET-28a-STV CP 重组质粒;

2. pET-28a-STV CP 重组质粒的 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切产物

Fig. 2 Enzyme digestion of pET-28a-STV CP

with *Nco* I / *Bam*H I

M. DNA Marker III; 1. pET-28a-STV CP;

2. Digestion of pET-28a-STV CP with *Nco* I / *Bam*H I

2.3 pET-28a-STV CP 在大肠杆菌中的诱导表达

取表达产物进行 SDS-PAGE 电泳分析, 发现 IPTG 诱导后泳道中出现 1 条非常明显的蛋白带, 其分子质量约为 47 ku, 与预期融合蛋白大小相符, 且随着诱导时间的延长, 蛋白表达量逐渐增加(图 3)。

3 讨论

在我国, 加工番茄的栽培主要集中在新疆, 并逐渐发展到内蒙古、甘肃、宁夏等地区, 推动了这些地区的经济发展。由于病毒病的普遍发生, 加工番茄的品质和产量受到了严重影响。因此, 病毒病的检测对于预防和控制病毒病具有非常重要的意义。目前, 植物病毒的检测主要有生物学、血清学和分子生

物学等方法。其中,血清学方法因具有快速简便、灵敏度高、检测样品多等优点,而成为应用最为广泛的植物病毒检测技术之一^[12-14]。

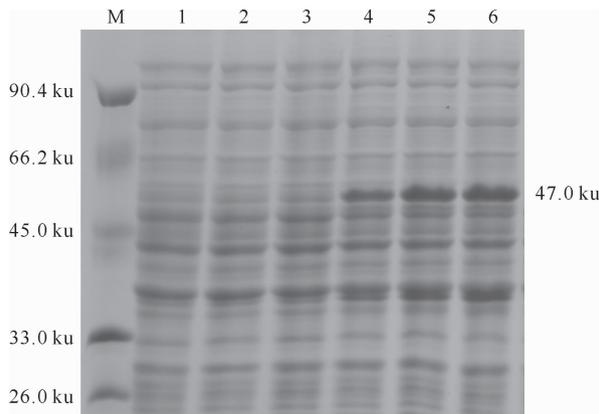


图3 pET-28a-STV CP 表达产物的 SDS-PAGE 电泳

M. 低分子量蛋白 Marker;1. 未经 IPTG 诱导的 pET-28a(+)载体;2. 经 IPTG 诱导的 pET-28a(+)载体;3. 未经 IPTG 诱导的 pET-28a-STV CP 重组质粒;4~6. 分别为 1 mmol/L IPTG 诱导 2,4,6 h 的 pET-28a-STV CP 重组质粒

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression products

M. Low molecular protein Marker;1. pET-28a(+), uninduced;2. Induced pET-28a(+);3. pET-28a-STV CP, uninduced;4-6. Proteins of pET-28a-STV CP induced by IPTG at 2,4 and 6 h, respectively

STV 作为一种新近发现的植物病毒,其在番茄上的致病症状尚不明确。尽管有 STV 与番茄的褪绿、黄化、衰退、果实小等症状相关的报道^[15],但是还未证实其直接相关性。因此,目前对 STV 的检测主要依赖于分子生物学方法。另外,由于现在尚未分离观察到 STV 病毒粒子,所以不能采用以纯化病毒粒子或病毒粗提液作为抗原免疫动物的传统方法来制备其血清学检测所需的抗体^[16]。

相比之下,克隆病毒的一段基因并进行表达,以表达产物作为抗原制备抗体,克服了传统方法的各种困难,其表现出的特有优势也极大地促进了以免疫学为基础的病毒检测技术在病毒监控和防治中的应用。大肠杆菌表达体系是植物病毒界表达蛋白最常用的表达系统,它具有成本低、周期短、产量高、表达稳定等特点。因此,本研究采用在大肠杆菌中克隆表达重组蛋白功能最强大的 pET 系统来进行 STV CP 基因的原核表达,这可使外源蛋白 C 端与载体上的 6 个组氨酸相融合,以方便、快捷地通过 His Bind 柱提取获得融合蛋白。与切胶回收获得目的蛋白的方法相比,该方法所获目的蛋白可缩短后续试验抗血清制备过程,且减少了反复 SDS-PAGE

电泳对蛋白空间结构的破坏^[17-18]。

本研究克隆了南方番茄病毒的 CP 基因,构建了其原核表达载体,并成功地进行了诱导表达,这为进一步制备 STV 特异性抗血清和建立间接 ELISA 检测方法提供了材料,为快速、准确调查 STV 在新疆等地区的分布、危害情况及加工番茄产业的健康发展具有积极的促进作用。

[参考文献]

- [1] 都业娟,许文博,向本春,等. 侵染新疆加工番茄的中国番茄黄化曲叶病毒 DNA-A 的基因组特征 [J]. 植物病理学报,2011,41(4):393-398.
Du Y J, Xu W B, Xiang B C, et al. Genomic characterization of *Tomato yellow leaf curl China virus* infecting processing tomato in Xinjiang [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2011, 41(4): 393-398. (in Chinese)
- [2] 姜玉霞,向本春,安仙丽,等. 新疆加工番茄上番茄花叶病毒的分子鉴定 [J]. 新疆农业科学,2008,45(3):484-489.
Jiang Y X, Xiang B C, An X L, et al. Identification on molecular of *Tomato mosaic virus* of processing tomato in Xinjiang [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2008, 45(3): 484-489. (in Chinese)
- [3] 都业娟,石宝萍,李成亮,等. 加工番茄病毒田间发生情况及毒原的分子检测 [J]. 植物保护,2013,39(4):110-115.
Du Y J, Shi B P, Li C L, et al. Incidence and molecular detection of virus on processing tomato in the field [J]. *Plant Protection*, 2013, 39(4): 110-115. (in Chinese)
- [4] 常波,向本春,刘升学,等. 新疆加工番茄条斑坏死病原黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的克隆与序列分析 [J]. 石河子大学学报:自然科学版,2006,24(4):410-414.
Chang B, Xiang B C, Liu S X, et al. Cloning and sequence analysis of coat protein gene of cucumber mosaic virus isolate from stripe and necrosis virus of processing tomatoes in Xinjiang [J]. *Journal of Shihezi University: Natural Science*, 2006, 24(4): 410-414. (in Chinese)
- [5] 程朝玲,向本春,崔百明,等. 新疆石河子、伊宁地区黄瓜花叶病毒株系分化 [J]. 植物保护学报,2013,40(2):115-120.
Cheng C L, Xiang B C, Cui B M, et al. The CMV strains differentiation of processing tomato, pumpkin and peppers in Shihezi and Yining [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2013, 40(2): 115-120. (in Chinese)
- [6] 程朝玲,向本春,崔百明,等. 新疆石河子南瓜和加工番茄 CMV 卫星 RNA 与 RNA3 序列分析 [J]. 西北农业学报,2013,22(5):83-90.
Cheng C L, Xiang B C, Cui B M, et al. Analysis of cucumber mosaic virus satellite RNA and RNA3 sequence of processing tomato and pumpkin in Shihezi of Xinjiang [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2013, 22(5): 83-90. (in Chinese)
- [7] Sabanadzovic S, Valverde R A, Brown J K, et al. Southern tomato virus: The link between the families Totiviridae and Partitiviridae [J]. *Virus Research*, 2009, 140: 130-137.

- [8] 苏海娣,梁学超,崔百明,等. 新疆加工番茄上一种类似南方番茄病毒的分子检测 [J]. 石河子大学学报:自然科学版,2013,31(3):271-275.
Su H D,Liang X C,Cui B M,et al. Molecular detection of a virus similar to Southern Tomato Virus of processing tomato in Xinjiang [J]. Journal of Shihezi University: Natural Science, 2013,31(3):271-275. (in Chinese)
- [9] 王健华,王运勤,吉训聪,等. 植物病毒检测技术研究进展 [J]. 热带农业科学,2005,3(25):71-75.
Wang J H,Wang Y Q,ji X C,et al. Advances on techniques for detection of plant virus [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture,2005,3(25):71-75. (in Chinese)
- [10] 朱常香,宋云枝,王玖玖,等. 烟草环斑病毒外壳蛋白基因的原核表达及抗血清的制备 [J]. 植物病毒学,2005,20(4):434-437.
Zhu C X,Song Y Z,Wang W W,et al. Cloning and expression of the coat protein gene of tobacco ringspot virus and preparation of virus-specific antiserum [J]. Virologica Sinica,2005,20(4):434-437. (in Chinese)
- [11] 王亚娇,任堂雨,刘 艳,等. 小麦矮缩病毒外壳蛋白基因的原核表达、抗体制备及应用 [J]. 植物病理学报,2013,43(4):362-367.
Wang Y J,Ren T Y,Liu Y,et al. Antiserum preparation of wheat dwarf virus using coat protein expressed in *Escherichia coli* and its application [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2013,43(4):362-367. (in Chinese)
- [12] 杜智欣,李桂芬,马 洁,等. 两种抗原制备黄瓜花叶病毒多克隆抗体的比较研究 [J]. 植物检疫,2013(3):40-44.
Du Z X,Li G F,Ma J,et al. Comparative identification for two polyclonal antibodies to M strain of cucumber mosaic virus by using two kinds of antigens [J]. Plant Quarantine,2013(3):40-44. (in Chinese)
- [13] Martin R,James D,Lévesque C. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management [J]. Annual Review of Phytopathology,2000,38:207-239.
- [14] 朱常香,王玉军,郭兴启,等. 烟草蚀纹病毒外壳蛋白基因的克隆、原核表达及抗血清的制备 [J]. 植物保护学报,2005,32(4):362-366.
Zhu C X,Wang Y J,Guo X Q,et al. Cloning and prokaryotic expression of coat protein gene of Tobacco etch virus and preparation of viral-specific antiserum [J]. Acta Phytophylacica Sinica,2005,32(4):362-366. (in Chinese)
- [15] Sabanadzovic S,Ghanem-Sabanadzovic N A,Valverde R A. A novel monopartite dsRNA virus from rhododendron [J]. Arch Virol,2010,155:1859-1863.
- [16] 李晓鹏,王连春,彭杰军,等. 香石竹斑驳病毒外壳蛋白基因的原核表达及抗血清制备 [J]. 云南农业大学学报,2013,28(1):32-35.
Li X P,Wang L C,Peng J J,et al. Prokaryotic expression and antiserum preparation of the coat protein gene of *Carnation mottle virus*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2013,28(1):32-35. (in Chinese)
- [17] 秦云霞,曾华金,刘志昕,等. 黄瓜花叶病毒 CP 基因原核表达及抗血清的制备 [J]. 中国生物工程杂志,2004,24(8):73-76.
Qin Y X,Zeng H J,Liu Z X,et al. Efficient expression of coat protein gene of cucumber mosaic virus and preparation of viral-specific antiserum [J]. China Biotechnology,2004,24(8):73-76. (in Chinese)
- [18] 郭 颂,张福兴,怀 晓,等. 樱桃病毒 A 北京分离物外壳蛋白的原核表达及抗血清制备 [J]. 植物病理学报,2010,40(6):568-573.
Guo S,Zhang F X,Huai X,et al. Prokaryotic expression of coat protein of cherry virus A isolate Beijing and preparation of the polyclonal antiserum [J]. Acta Phytopathologica Sinica,2010,40(6):568-573. (in Chinese)