

烟草花叶病毒南瓜分离物 *CP* 基因的 克隆、序列分析及其原核表达

刘金亮,王凤婷,魏 毅,潘洪玉,张世宏

(吉林大学 植物科学学院,吉林 长春 130062)

摘要:为从分子水平鉴定山东聊城的一表现明显花叶、黄化、蕨叶及果实畸形的南瓜病毒病的病原。采用 RT-PCR 的方法,用 TMV 外壳蛋白(CP) 基因的特异引物,对该样品进行了检测,克隆到的基因序列进行分析,并使其在大肠杆菌中表达。结果表明,从该样品中扩增到了 TMV 的 *CP* 基因,说明该样品受到 TMV 的侵染,首次发现 TMV 自然侵染南瓜。对 *CP* 基因序列测定及分析表明,与 GenBank 上其他 TMV 分离物 *CP* 基因核苷酸序列的同源性为 86.5% ~ 99.0%,推导的氨基酸序列同源性为 93.7% ~ 99.4%。根据完整 *CP* 基因核苷酸序列构建的系统进化树显示:32 个 TMV 分离物可分为 5 个组,其中 TMV-liaocheng 与 Nakron Pathom、Fujian、017 等分离物属于 IV 组。TMV-liaocheng 可能发生过重组。将 TMV-liaocheng *CP* 基因与原核表达载体 pET-22b(+) 连接,在大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 诱导表达出分子量约 20 kDa 的融合蛋白,并用 Ni^{2+} -NTA His·Bind® 树脂纯化,纯化后的蛋白可直接用于制备特异性的抗血清,为准确、快速地检测 TMV 奠定了基础。

关键词: 南瓜; 烟草花叶病毒; *CP* 基因; 序列分析; 原核表达

中图分类号: Q78; S642.4; S432.4⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)05-0006-05

Cloning, Sequence Analysis and Prokaryotic Expression of the Coat Protein Gene of Tobacco Mosaic Virus from Pumpkin Plant

LIU Jin-liang, WANG Feng-ting, WEI Yi, PAN Hong-yu, ZHANG Shi-hong

(College of Plant Sciences, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Tobacco mosaic virus(TMV) is responsible for considerable economic losses in the growing of plant. There is no report that TMV infects pumpkin plant naturally. TMV was detected from one pumpkin(*Cucurbita moschata*) plant in Liaocheng, Shandong Province. The nucleotide sequences of coat protein(*CP*) gene of TMV isolate (TMV-liaocheng) was determined from RT-PCR derived cDNA clones. It was the first report that TMV naturally infected pumpkin. The obtained *CP* gene sequences were compared with sequences of TMV that are available in the GenBank. Results showed that the *CP* gene of TMV-liaocheng shared similarity of 86.5% - 99.0% with those of other TMV isolates at nucleotide acid level, and identity of 93.7% - 99.4% at amino acid level. The phylogenetic tree constructed with the complete nucleotide sequence of the *CP* genes showed that 32 TMV isolates were divided into 5 groups, and TMV-liaocheng, Nakron, Pathom, Fujian and 017 isolates belonged to group IV. There were probably recombination event during the evolution of TMV-liaocheng. It was the first report that TMV infected pumpkin. The *CP* gene of TMV-liaocheng was inserted to expression vector pET22b(+) and transferred into *E. coli* BL21(DE3) pLysS. SDS-PAGE showed that TMV-liaocheng *CP* gene was expressed as a 20 kDa fusion protein when induced with IPTG. The expressed fusion protein was purified through Ni^{2+} -NTA His·Bind® column, and it could be used to immunize the mice for preparing the specific the antibody.

Key words: Pumpkin; Tobacco mosaic virus; *CP* gene; Sequence analysis; Prokaryotic expression

收稿日期: 2010-06-18

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD08A08); 吉林大学博士科研启动基金(4305050102B2); 吉林大学基本科研业务费项目(200903376)

作者简介: 刘金亮(1978-), 男, 山东安丘人, 讲师, 博士, 主要从事植物病毒学与分子植物病理学研究。

通讯作者: 张世宏(1969-), 男, 山东临沂人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事分子植物病理学研究。

南瓜 (*Cucurbita moschata*) 是重要的葫芦科蔬菜作物,其营养成分丰富且全面,为人们经常食用的瓜菜,且日益受到重视,栽培面积逐年扩大。随着保护地栽培、新品种引进及农业生态气候变化,南瓜病毒病逐年加重,已成为制约南瓜生产的重要因素。到目前为止,已报道的侵染南瓜的病毒有黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、小西葫芦黄花叶病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)、西瓜花叶病毒 (*Watermelon mosaic virus*, WMV)、木瓜环斑病毒 (*Papaya ringspot virus*, PRSV)、南瓜花叶病毒 (*Squash mosaic virus*, SqMV) 和中国南瓜曲叶病毒 (*Squash leaf curl China virus*, SLCCNV) 等^[1-7]。

烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 是烟草花叶病毒属病毒的典型成员,是造成损失最重的病毒之一,其寄主范围非常广泛,能侵染茄科、藜科、苋科、葫芦科等共 30 科 300 多种植物^[8]。近年来,从不同寄主植物上不断分离鉴定到 TMV 的不同株系或分离物。房德纯等^[9]和范国强等^[10]分别从茄子和姜上分离到 TMV,首次报道了 TMV 可自然侵染茄子和姜。黄金光等^[11,12]首次从木犀科植物丁香和锦葵科植物扶桑上分离到 TMV。在葫芦科作物上,国内外学者在甜瓜^[13]、西瓜^[14,15]和黄瓜^[16]上检测到 TMV,尚未见 TMV 自然侵染南瓜的报道。

本研究采用 RT-PCR 方法,利用 TMV CP 基因的特异引物,对采自山东聊城的一表现花叶、黄化、蕨叶及果实畸形的南瓜样品进行了检测,检测到该样品中含有 TMV 病毒,并将克隆到的 CP 基因进行测序分析,与已报道的 TMV CP 基因序列进行了序列同源性比较、系统进化及重组分析。在此基础上构建了 TMV-liaocheng CP 基因的原核表达载体,使其在大肠杆菌中得到了正确表达,并对其进行了纯化。

1 材料和方法

1.1 材料

表现花叶、黄化、蕨叶及果实畸形的南瓜病毒样品采自山东聊城; RNA-solv Reagent 购自 Omega 公司; 反转录酶 M-MLV 购自 Promega 公司; 用于分子克隆的 pMD18-T、PCR 产物回收试剂盒及限制性内切酶等分子生物学试剂均为 TaKaRa 公司产品; 大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞和 Ni²⁺-NTA His•Bind® 树脂购自 Novagen 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 RNA 提取

参照文献^[17]的方法从发病的南瓜叶片上直

接提取其总 RNA。从新鲜的材料中提取总 RNA,称取 0.2 g 样品于干热灭菌的研钵中加液氮研磨,加 1 mL RNA-solv Reagent 剧烈震荡,静置 5 min,12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入 200 μ L 氯仿剧烈震荡 15 s,放置 3 min,12 000 r/min 离心 15 min。取上清,加入 500 μ L 异丙醇,12 000 r/min 离心 10 min。用 75% 乙醇洗涤沉淀,8 000 r/min 离心 5 min。室温晾干沉淀,加入 50 μ L 无 RNA 酶的水溶解沉淀,−80℃ 保存。

1.3 RT-PCR 扩增

以提取的总 RNA 为模板进行反转录,反应体系为 25 μ L。向不含 RNA 酶的 0.2 mL 离心管中加入 8 μ L RNA (约 2 μ g), 1 μ L 25 μ mol/L 引物 TMVCP-R (5′-GAGGGAAAAACACTATGCG TTATC-3′) 和 7.5 μ L 不含 RNA 酶的 ddH₂O, 70℃ 5 min, 迅速冰浴 5 min。然后加入 2 μ L dNTPs (每种 2.5 mmol/L), 5 μ L 5 × M-MLV 反转录酶反应缓冲液, 0.5 μ L 40 U/ μ L RNA 酶抑制剂, 1 μ L 200 U/ μ L M-MLV 反转录酶, 37℃ 1 h。

PCR 反应采用 25 μ L 体系, 含 ddH₂O 14.8 μ L, 10 × PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs (每种 2.5 mmol/L) 2 μ L, 反转录产物 2 μ L, 25 μ mol/L 的 TMVCP-F^[12] (5′-AGTTGTTGATGAGTTCATGGA-3′)、TMVCP-R 各 1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 5 U/ μ L Taq E 0.2 μ L。反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 然后 94℃ 50 s, 50℃ 50 s, 72℃ 1 min, 共 32 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.4 PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物回收后与 pMD18-T 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。提取质粒, 经 PCR 及酶切鉴定筛选重组质粒。每一扩增产物选择 2~4 个克隆的重组质粒送上海博亚有限公司测序。

1.5 序列比较与分析

所得序列利用 Blast 进行检索, 采用 Clustalx1.81、DNASATr 6.0 和 MEGA 4.0 软件对所得核苷酸序列及推导的氨基酸序列与 GenBank 中收录的其他分离物相应序列进行比较, 构建系统进化树。用 RDP-V2 Beta 08 软件对病毒核苷酸序列进行重组分析。

1.6 CP 基因的原核表达

用于原核表达载体构建的 5′-端引物为 P1 (CGGGATCCGATGTCTTACACTATCACTAC) 和 3′-端引物 P2 (AGTCGACAGTTGCAGGACCAGAGGTCC), 在 P1 和 P2 引物中分别引入 BamH I 和 Sal I 酶切位点(下划线部分)。以重组质粒 pMD18-CP 为模板,

P1 和 P2 为引物,进行 PCR 扩增。PCR 产物回收后,按文献 [17] 的方法构建表达质粒 pET-CP,转化 *E. coli* BL21(DE3) pLysS,挑取单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中(含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素),37℃ 活化过夜,1:100 稀释到 10 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃,227 r/min 培养 3 h,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,继续于 30℃ 培养 6 h。离心收集菌体,加适量 TE 溶液(pH 8.0),振荡悬浮,再加入等体积的 2 \times SDS 上样缓冲液,100℃ 煮沸 5 min,SDS-PAGE 电泳检测基因表达情况。

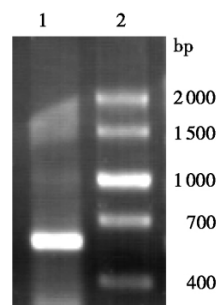
1.7 融合蛋白的纯化

取 100 mL 诱导表达的菌液,经 8 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,于 25 mmol/L Tris-HCl (pH7.0)/150 mmol/L NaCl 缓冲液中反复洗涤 2 次,重悬于 10 mL 的 1 \times Ni²⁺-NTA 结合缓冲液(0.3 mol/L NaCl,50 mmol/L Na₃PO₄,pH8.0,10 mmol/L 咪唑,0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF),1 mmol/L 溶菌酶),冰浴条件下超声破碎菌体,18 000 r/min,4℃ 离心 40 min,弃沉淀,将上清液转移至新离心管中。参考 Novagen 提供的 Ni²⁺-NTA His⁶ Bind[®] 树脂纯化说明进行融合蛋白的纯化。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增结果

经 RT-PCR 扩增,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,从发病的南瓜叶片中扩增到约 570 bp 的目的片段,与预期片段大小一致(图 1)。PCR 产物与 pMD18-T 连接,并转化大肠杆菌 DH5 α ,经筛选和酶切鉴定获得含有目的片段的重组质粒。序列测定和 Blast 检索发现,570 bp 片段包含完整的 TMV CP 480 个核苷酸,表明该样品中含有 TMV,定名为 TMV-liaocheng 分离物。



1. CP 基因; 2. DNA Marker V。
1. CP gene; 2. DNA Marker V.

图 1 CP 基因 RT-PCR 扩增产物电泳结果
Fig.1 RT-PCR amplification of CP gene

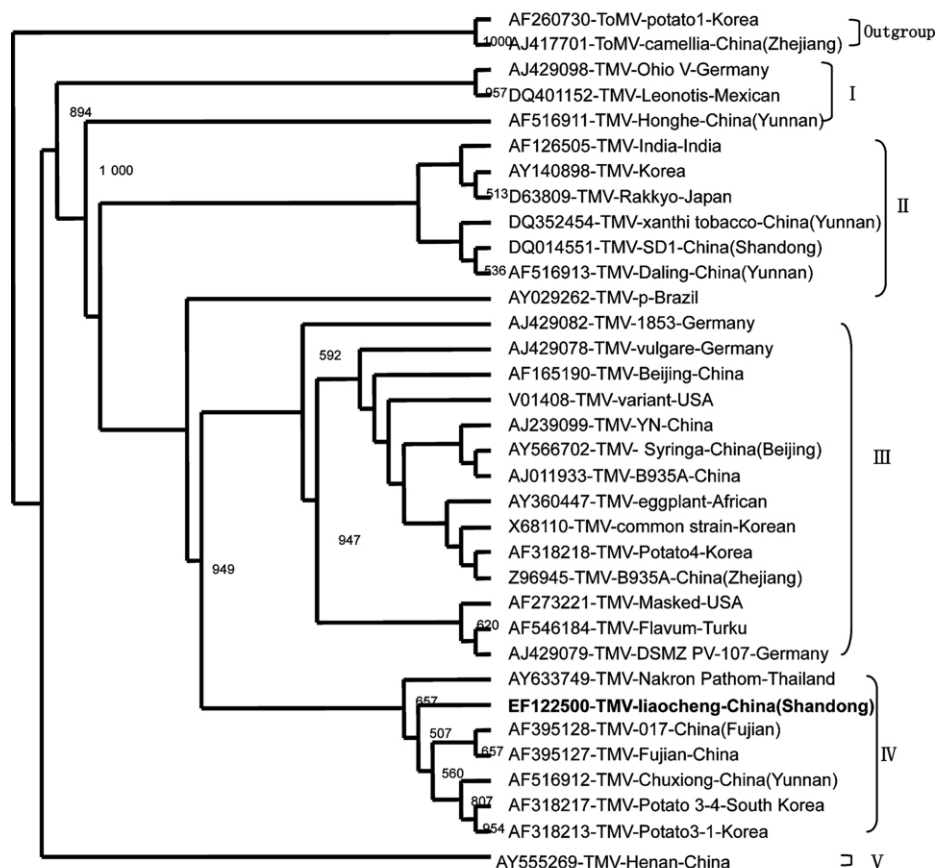


图 2 基于 TMV-liaocheng 与其他 31 个 TMV 分离物 CP 基因核苷酸序列构建的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic analysis of CP gene nucleotide sequences of TMV-liaocheng and other 31 TMV isolates

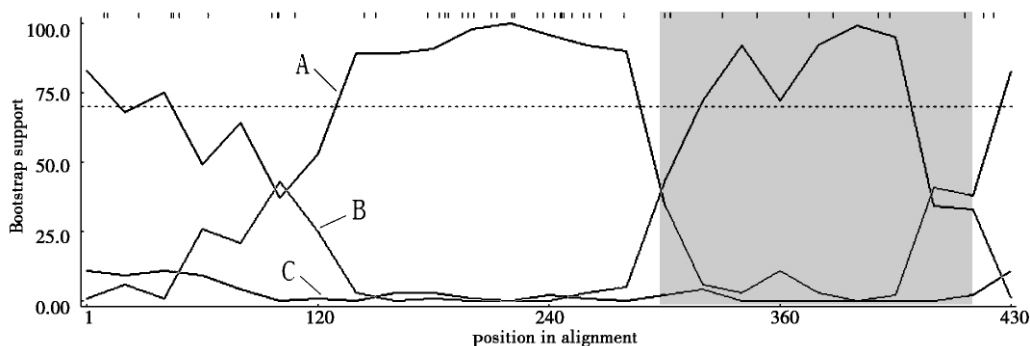
2.2 序列分析

2.2.1 序列同源性分析 TMV-liaocheng 与其他 31 个 TMV 分离物 CP 基因核苷酸序列同源性为 86.5% ~ 99.0%, 氨基酸序列同源性为 93.7% ~ 99.4%, 与福建两分离物 (AF395127 和 AF395128) 同源性最高, 而与河南分离物 (AY555269) 同源性最低。

2.2.2 系统发育关系分析 利用 TMV-liaocheng 分离物与 GenBank 上 31 个 TMV 分离物的 CP 基因序列构建系统进化树, 以番茄花叶病毒 (Tomato mosaic virus, ToMV) 的 CP 基因作为外组 (图 2)。从系统进化树中可以看出, 这 32 个分离物可以分为 5 个组, 其中 TMV-liaocheng 与泰国 Nakron Pathom、福建 Fu-

jian 和 017、云南 Chuxiong、韩国 Potato3-4 和 Potato3-1 分离物亲缘关系最近, 从而形成 IV 组, 组内的核苷酸序列同源性为 97.7% ~ 100%; 河南 Henan 分离物与其他 31 个分离物核苷酸同源性最低 (85.2% ~ 88.5%), 单独形成 V 组。同样, 来自中国的 13 个分离物在各个组中均有分布, 表现出中国 TMV 具有丰富的遗传多样性。

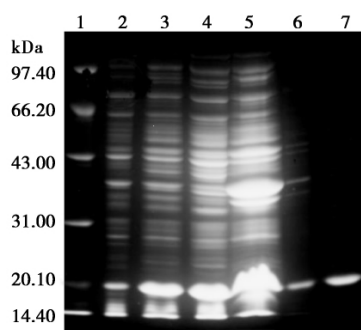
2.2.3 重组分析 用 RDP2 软件对这 32 个 TMV 分离物 CP 基因序列进行重组分析, 发现 TMV-liaocheng 分离物可能存在重组现象。TMV-liaocheng 的 301 ~ 457 bp 可能来源于山东 SD1 分离物, 而其余部分可能来源于印度 India 分离物 (图 3)。



A. DQ014551-TMV-SD1-China(Shandong) —EF122500-TMV-liaocheng-China(Shandong) ; B. AF126505-TMV-India-India—DQ014551-TMV-SD1-China(Shandong) ; C. AF126505-TMV-India—EF122500-TMV-liaocheng-China(Shandong) .

图 3 利用 RDP 中的 BOOTSCAN 软件对 TMV-liaocheng 分离物分析发现该分离物可能在 CP 3'-端存在重组

Fig.3 Recombinant analysis of the TMV-liaocheng by BOOTSCAN of RDP. Recombination might have occurred 3' terminus of its CP gene



1. 蛋白分子量标准; 2. pET-22b(+) 空载体诱导产物 (沉淀菌体); 3, 4. pET-CP 诱导产物 (上清); 5. pET-CP 诱导产物 (沉淀菌体); 6, 7. pET-CP 诱导产物 (纯化)。

1. Protein Marker; 2. Product of pET-22b(+) induced to express (precipitation) ; 3, 4. Expressed pET-CP as fusion protein(supernatant) ; 5. Expressed pET-CP as fusion protein(precipitation) ; 6, 7. Expressed pET-CP as fusion protein(purified) .

图 4 表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测

Fig.4 SDS-PAGE results of prokaryotic expression of CP gene

2.2.4 CP 基因的原核表达及融合蛋白的纯化 将已构建好的表达重组子 pET-CP 转化 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, 并进行诱导表达。根据表达载体 pET-22b(+) 自身起始密码子位置、C 端 His₆ 标签序列, 推知表达的融合蛋白的分子量为 19.909 kDa。将

诱导表达的蛋白 (沉淀和上清) 及纯化蛋白经 SDS-PAGE 电泳检测, 结果表明, 在 20 kDa 处出现一条特异性蛋白带, 与预期大小一致 (图 4), 表明 CP 蛋白在大肠杆菌中得到了正确表达。诱导表达的菌液离心 (6 000 r/min, 5 min) 后, 在上清和沉淀中均含有目的蛋白, 说明诱导蛋白以包涵体和可溶性蛋白两种形式存在。

3 结论与讨论

本研究利用 RT-PCR 方法从表现病毒病症状的南瓜样品中检测到 TMV, 并从核苷酸序列水平上对该分离物进行了鉴定。由于 TMV 株系的划分没有明确统一的标准, 已经划分的株系大多依据生物学症状。对于该研究中 TMV-liaocheng 分离物属于哪一株系需要对该分离物结合生物学和血清学验证后确定, 其生物学特性及分子致病机制还有待于进一步研究。国内外关于 TMV 在葫芦科作物上的报道较少。Webb^[13] 从甜瓜上分离到了引起甜瓜产生坏死性雀斑的 TWV 分离物 (TMV-MNFV); 李向东等^[14] 通过生物学和血清学的方法首次分离到侵袭

西瓜的 TMV 分离物(W-SX);王杰等^[15]用同样的方法鉴定出侵染西瓜的 TMV 分离物(XC-3)。陈洁云^[16]通过生物学测定结合电镜观察从黄瓜上分离到一 TMV 分离物。该研究首次发现 TMV 自然侵染南瓜,在生产上,为有针对性的防治南瓜病毒病提供科学指导,尤其是为南瓜抗病毒育种提供可靠的理论依据。

本研究在大肠杆菌中高效表达了 TMV-li-aocheng 的外壳蛋白,发现其表达量非常高,这可能与密码子的偏好性有关^[18]。传统方法利用提纯病毒制备的抗血清中含有寄主蛋白的抗体,容易导致假阳性反应,而且一些病毒难以提纯,很难获得高纯度的病毒,通过原核表达的外壳蛋白制备抗血清简便,而且特异性强,因此,本研究所纯化的高效表达的蛋白为制备 TMV 特异性抗血清提供材料,并为准确、快速地检测 TMV 奠定了基础。

参考文献:

- [1] 吕佩珂,苏慧兰,高振江,等. 中国现代蔬菜病虫原色图鉴[M]. 呼和浩特: 远方出版社,2008.
- [2] 古勤生,田延平,彭 斌,等. 基于外壳蛋白基因序列对 3 种葫芦科作物病毒的分子分析[J]. 植物病理学报,2008,38(4): 357-363.
- [3] 刘金亮,邵云华,张广民,等. 小西葫芦黄花叶病毒山东南瓜分离物的分子特性[J]. 植物病理学报,2009,39(5): 96-100.
- [4] 陈洁云,陈集双,柴立红,等. 两种葫芦科病毒的分子检测和致病性研究[J]. 植物病理学报,2003,33(5): 449-455.
- [5] 蔡伟和,洪益国,黄福新. 中国南瓜曲叶双生病毒的生物学、血清学和分子杂交的研究[J]. 中国病毒学报,1994(3): 222-224.
- [6] 杨国慧,张仲凯,崔崇士. 番木瓜环斑病毒南瓜分离物外壳蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 植物保护学报,2007,34(3): 273-276.
- [7] 刘卫荣,向本春. 西瓜花叶病毒 2 号新疆昌吉分离物外壳蛋白基因核苷酸序列分析[J]. 植物病理学报,2008,38(6): 576-581.
- [8] Zaitlin M H, Israel W. Tobacco mosaic virus(type strain) [C]// CMV/AAB Description of Plant Viruses. No. 151. Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute of Applied Biologists, 1975.
- [9] 房德纯,王振东. 茄子上烟草花叶病毒的分离与鉴定[J]. 沈阳农业大学学报,1994,25(3): 259-263.
- [10] 范国强,王教义. 侵染姜的烟草花叶病毒的鉴定[J]. 山东农业大学学报,1999,30(3): 249-255.
- [11] 黄金光,邓丛良,范在丰,等. 烟草花叶病毒丁香分离物的分离与鉴定[J]. 植物病理学报,2004,34(3): 215-222.
- [12] 黄金光,田国忠,范在丰,等. 侵染扶桑的烟草花叶病毒分离物鉴定[J]. 植物病理报,2004,30(3): 33-37.
- [13] Webb R E. A strain of the tobacco mosaic virus isolated from muskmelon [J]. P L Dis Rept, 1966, 50(1): 49-52.
- [14] 李向东,朱汉城,刘焕庭,等. 侵染西瓜的烟草花叶病毒的鉴定[J]. 山东农业大学学报,1996,27(2): 181-184.
- [15] 王 杰,张大伟,范卫红,等. 侵染西瓜的烟草花叶病毒(TMV)的生物学种类鉴定[J]. 安徽农业科学,2003,31(6): 972-974,982.
- [16] 陈洁云. 葫芦科植物病毒研究[D]. 杭州: 浙江大学,2003.
- [17] 刘金亮,于晓庆,田延平,等. 潍坊萝卜中芜菁花叶病毒分离物的分子特性及 CP 基因的原核表达[J]. 园艺学报,2006,33(1): 84-88.
- [18] Dedeo M T, Duderstadt K E, Berger J M, et al. Nanoscale protein assemblies from a circular permutant of the Tobacco mosaic virus [J]. Nano Letters, 2010, 10: 181-186.