

中国番茄黄化曲叶病毒(TYLCV-CHI) 外壳蛋白基因在大肠杆菌中的 表达及抗血清的制备*

张玉满 王寰宇 刘玉乐

中国科学院微生物研究所,北京 100080

摘要 经 PCR 获得了中国番茄黄化曲叶病毒(TYLCV-CHI)外壳蛋白(CP)基因,并克隆到 pGEM-7Zf(+)载体上. 序列分析表明, TYLCV-CHI 感染番茄或烟草时, CP 基因的核苷酸序列发生变化, 并且在烟草上随感染时间的延长, 突变频率增高. 连接到含有编码 *tRNAarg4* 基因 *argU* 的表达载体 pSBET 后, TYLCV-CHI CP 基因在大肠杆菌中以包含体形式得到大量表达(约 33 ku). 以表达的蛋白作抗原免疫家兔, 制备了抗 TYLCV-CHI CP 的抗血清. ELISA 实验表明, 该血清与抗原特异反应, 血清效价为 1:3000. Western 印迹实验还表明, 该血清除了与感染 TYLCV-CHI 的番茄、烟草有特异免疫反应外, 还与感染南瓜曲叶病、烟草曲叶病的叶片有免疫反应, 表明这些病毒之间有明显的血清学关系.

关键词 中国番茄黄化曲叶病毒 外壳蛋白 表达 抗血清制备

番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)属于双生病毒亚组 III, 是一类粉虱传播的双生病毒. 在国际上, 由 TYLCV 引起的番茄黄化曲叶病是番茄最严重的病害之一, 自从 1964 年发现 TYLCV 以来, 目前已在中东、东南亚、东亚及非洲等众多的国家和地区发现 TYLCV^[1-3]. 蔡健和等在中国广西也发现了 TYLCV, 并从分子水平上证实 TYLCV-CHI 是一种新的粉虱传双生病毒^[4,5]. 目前 TYLCV 仅能被部分提纯, 难以获得有效的血清^[6,7], 使血清学检测技术在该类病毒的使用受到限制. 本研究将 TYLCV-CHI 的外壳蛋白(CP)基因全序列在大肠杆菌中表达, 并以此为抗原制备了效价较高的抗血清, 有利于对 TYLCV-CHI 进行免疫学研究.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒繁殖 以广西南宁地区的感染番茄黄化曲叶病毒的番茄为材料, 经烟粉虱(*Bemisia tabaci*)接种烟草, 温室中繁殖保存. 其他病毒材料, 如感染番茄黄化曲叶病, 南瓜曲叶病, 烟草曲叶病, 赛葵曲叶病, 鳢肠黄脉病, 胜红蓟黄脉病, 豨莶黄脉病的感病叶片直接采自广西南宁.

2000-03-03 收稿, 2000-05-08 收修改稿

* 中国—以色列科学与战略研究开发专项资金合作研究项目(批准号: ZYJ01-03)

1.1.2 菌株和载体 克隆菌株: *E. coli* DH5 α , JM109; 蛋白表达菌株: BL21(DE3). 克隆载体: pGEM-7Zf(+), pBluescript KS; 表达载体: pBV220, pTRXFUS, pET30a, pSBETb^[8], pSBETc^[8]. 其他菌株和载体均由微生物所分子病毒和生物工程实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 TYLCV-CHI CP 基因的克隆 采用 CTAB 方法^[9]从感染 TYLCV-CHI 的烟草幼嫩叶片中提取的 DNA 进行 PCR 扩增. 根据 TYLCV-CHI CP 基因序列^[5]设计并合成引物 1: 5' CGGAATTCATGATTATGGCGAAACGTCC3', 引物 2: 5' CGGGATCCTGAATGGAACAATAGATGT 3'. 为便于克隆, 在引物 5' 端分别引入 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点. PCR 反应液中含 DNA 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.8 μ L, 引物(10 pmol)各 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 U. PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 6 min; 之后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 51 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 将 PCR 产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分析, 经纯化后与 pGEM-7Zf(+)载体连接, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α . 提取质粒, 经酶切检测, 获得重组克隆(p7Z-CP).

1.2.2 序列分析

由大连 TaKaRa 公司测定重组克隆的全序列, 用 DNASIS 和 PROSIS 软件¹⁾进行序列分析.

1.2.3 TYLCV-CHI CP 基因在大肠杆菌中的诱导与表达

将 CP 基因克隆到 pSBETb, pSBETc 表达载体上, 获得重组质粒 pSBETb-CP 和 pSBETc-CP 并转化大肠杆菌 BL21(DE3). 将表达克隆 pSBETb-CP, pSBETc-CP 及其相应的空载体克隆活化后, 用 1 mmol/L IPTG 诱导培养 5~7 h, 离心收集菌体. 向菌体中加入原菌液 1/10 体积的超声缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 2 mmol/L EDTA pH 8.0), 再加入 10 mg/mL 溶菌酶及 1% Triton-X-100, 30 $^{\circ}$ C 放置 15 min 后, 冰浴下采用 JY92-II 超声波细胞粉碎机破碎细胞, 在 12% SDS-PAGE 上分析.

1.2.4 TYLCV-CHI CP 抗血清的制备

将 TYLCV-CHI CP 蛋白经 SDS-PAGE 后, 冰浴下用 0.25 mol/L KCl 染色, 切下特异蛋白带, 在冰上研成匀浆. 以 1 mg/mL 牛血清白蛋白为标准蛋白溶液, 用紫外线吸收法测定免疫抗原的浓度. 免疫分 4 次, 第 1 次皮下注射后, 每隔 7 d 进行一次肌肉注射, 共两次, 13 d 后第 4 次加强免疫. 4 次免疫抗原的浓度分别为: 15, 32, 18, 15 mg/mL.

1.2.5 ELISA 测定

采用直接 ELISA 测定程序(Ag-BSA-Ab-IgG^{HRRP}-OPD), 抗原浓度为 1 mg/mL, 抗血清作系列稀释, PBS 缓冲液为阴性对照, 读取各样品的 $A_{490\text{nm}}$ 光吸收数值.

1.2.6 Western 印迹

对感染番茄黄化曲叶病、南瓜曲叶病、烟草曲叶病、赛葵曲叶病的叶片, 以及番茄黄化曲叶病毒侵染的烟草、烟草曲叶病毒侵染的转基因番茄进行 Western 印迹检测. 抗血清浓度 1:500, 以免疫抗原为阳性对照, 以不相关玉米粗缩病毒为阴性对照. 植物蛋白样品的制备: 取 1.5 g 植物叶片加入 5 mL 提取液(50 mmol/L Tris-HCl, 60 mmol/L Na₂SO₃ pH 8.5), 冰上研磨, 10000 r/min 离心 10 min 后, 将上清液用 PEG20000 透析浓缩至 1/10 体积, 取 10 μ L 样品用于检测. 在 Western blot 中, 使用的 0.45 μ m PVDF 膜为德国 Gelman 产品, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG

1) Hitachi Software Engineering Co., Ltd

为中山公司产品(1:1000),碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 为美国 Vector 实验室产品(1:1000).

2 结果与讨论

2.1 TYLCV-CHI CP 基因的克隆

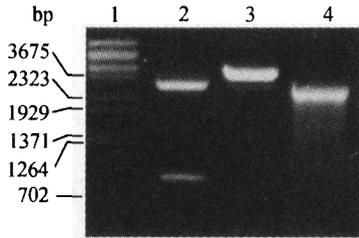


图 1 重组质粒 p7Z-CP 的限制酶图谱
1 分子量表标志; 2 *Bam*H I + *Eco*R I;
3 *Bam*H I; 4 p7Z-CP

以感染 TYLCV-CHI 的烟草 DNA 为模板,经 PCR 得到约 800 bp 的 DNA 片段,将 PCR 扩增产物与克隆载体 pGEM-7Zf 连接并转化大肠杆菌,挑取重组克隆(p7Z-CP),*Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶酶切分析表明,PCR 产物已被插入载体中(图 1).

2.2 TYLCV-CHI CP 基因序列分析

将 TYLCV-CHI 在烟草上感染不同时间(分别为 1 a 和 3 a)的 CP 基因序列分别与感染番茄的序列对比分析表明,分别有 6 和 9 个碱基序列发生突变;推测氨基酸序列分别有 0 和 4 个位点突变(图 2).在 PCR 过程中,曾采用两种 DNA 聚合酶,得到的 PCR 产物的核苷酸序列完全相同,因此排除了 DNA 聚合酶错配误差.此结果说明 TYLCV-CHI 感染不同植物其 CP 基因序列发生突变,即使在同一植物上,随病毒繁殖时间的延长,核苷酸及氨基酸序列的突变频率也增高.正如已报道的 CLCuV

```

1  ATG GCG AAA(A/G) CGT CCC GCC GAT ATT GTC ATT TCC ACT CCC GCC TCG AAG GTG CGT CGC CGG
1  M  A  K      R  P  A  D  I  V  I  S  T  P  A  S  K  V  R  R  R
61  CTG AAC TTC GAC AGC CCC TAT ACG GGT CGT GTT GCT GCC CCC ACT GTC CGC GTC ACC AGA
21  L  N  F  D  S  P  Y  T  G  R  V  A  A  P  T  V  R  V  T  R
121 AGA CAA ATG TGG TCA AAC AGG CCC ATG TAC CGG AAG CCC ATG ATG TAC CGG ATG TAC AGA
41  R  Q  M  W  S  N  R  P  M  Y  R  K  P  M  M  Y  R  M  Y  R
181 AGC CCT GAT GTT CCA AGG GGT TGT GAA GGC CCA TGT AAA GTT CAA TCA TA(G/G)T GAG GCC CGT
61  S  P  D  V  P  R  G  C  E  G  P  C  K  V  Q  S  V(C/C)  E  A  R
241 CAT GAT GTT TCA CAT ACT GGT AAG GTT ATT TGT GTA TCG GAT GTT ACT CGT GGT AAC GGT
81  H  D  V  S  H  T  G  K  V  I  C  V  S  D  V  T  R  G  N  G
301 ATT ACT CAC CGT GTT GGG AAG AGG TTC TGT GTT AAG(A/A) TCC ATT TAC GTC ATT GGG AAG(A/A)
101 I  T  H  R  V  G  K  R  F  C  V  K      S  I  Y  V  I  G  K
358 ATA TGG ATG GAC GAA AAT ATT AAA G(T/T)T(T/T) AAG AAT CAT ACA AAT ACA GTA ATG TTT
120 J  W  M  D  E  N  I  K      M(F/F)      K  N  H  T  N  T  V  M  F
412 TTT CTT GTT AGA GAT CGA CGT CCA AGT GGT ACT CCT ATG GAT TTC CAG CAA GTC TTT AAT TGT
138 F  L  V  R  D  R  R  P  S  G  T  P  M  D  F  Q  Q  V  F  N  C
475 TAT GAC AAT GAA CCT AGC ACT GCT ACT GTA AAA AAC GAT TTA AGG GAT CGT TTT CAA GTT CGT CGT
159 Y  D  N  E  P  S  T  A  T  V  K  N  D  L  R  D  R  F  Q  V  R  R
541 AAA TTT TAT TCA ACG GTT ACG GGC GAG CAG TAT GCT TGT AAG GAG CAG GCG TTG GTG AAG
181 K  F  Y  S  T  V  T  G  G  G  Q  Y  A  C  K  E  Q  A  L  V  K
601 AGA TTT ATC CGT CTT AAT ACT CAT GTT GTT TAC AAC CAT CAA GAA CAG GCG AAG TAC GAG
201 R  F  I  R  L  N  T  H  V  V  Y  N  H  Q  E  Q  A  K  Y  E
661 AAT CAT ACG GAG AAT GCA TTA TTG TTG TAT(C/C) ATG G(C/C)G T(G/G)T ACT CAT GC(C/G)
221 N  H  T  E  N  A  L  L  L  Y      M  M(A/A)  S(C/C)  T  H  A
709 N(T/A)G(C/G)T AAT CCT GTA TAT GC(G/C) AC(G/A) TTG AAA GTG CGC ATC TAT TTC TAT GAT
237  S      N  P  V  Y  A      T      L  K  V  R  I  Y  F  Y  D
760 TCA CAA ATG AAT TAA TAA
254  S  Q  M  N  *  *

```

图 2 TYLCV-CHI CP 基因的核苷酸及其编码氨基酸序列

方框中的字母表示 TYLCV-CHI 在烟草上繁殖 3 a 后的碱基突变,括号中带下划线的字母表示繁殖 1 a 后的碱基突变,括号中带阴影的字母表示 TYLCV-CHI 侵染番茄

和 TYLCV 基因组 DNA 在植物中随着时间的推移,发生 DNA 缺失、重排、亚基因组的产生、外源 DNA 插入的小环状 DNA 分子等现象^[10,11]. 病毒基因组发生突变可能是为了适应不同的环境而产生的一种演化方式,在此过程中,亚组 III 双生病毒 CP 中较为保守的氨基酸序列 SKVR-RRLNFDSP(第 15~26 位)保持不变.

2.3 TYLCV-CHI CP 基因在大肠杆菌中的表达

2.3.1 基因编码特性

通常在大肠杆菌中极少用的 AGA, AGG 密码子在基因序列中的出现,会降低该基因在大肠杆菌中的表达,AGA,AGG 含量越高表达越难,尤其在两个以上 AGA 或 AGG 相串联时,容易使基因片段的翻译终止,从而使此基因在大肠杆菌中的表达量极低甚至不能表达^[8]. 在 TYLCV-CHI CP 基因编码的氨基酸中,精氨酸含量高达 10.47%,其中由稀有密码子 AGA, AGG 编码的精氨酸占 3.49%,而且在第 40, 41 位氨基酸位点有 AGA AGA 相串联,这种基因结构增加了 CP 基因在大肠杆菌中表达的难度(该基因曾在几种常用的原核表达载体,如 pBV220, pTRXFUS, pET30a 中均得不到表达,数据未显示),而在有利于富含稀有密码子基因的表达载体(pSBET)上表达成功.

2.3.2 蛋白表达

将 TYLCV-CHI CP 基因分别与 pSBETb, pSBETc 表达载体连接,获得了 CP 基因的大肠杆菌表达克隆(pSBETb-CP, pSBETc-CP). 经 1 mmol/L IPTG 诱导,SDS-PAGE 分析表明获得了一条约 33 ku 的特异蛋白带,其大小符合表达 TYLCV-CHI CP 融合蛋白的理论值 33.14 ku(图 3). 将表达菌体细胞超声破碎后,将上清液和沉淀分别在 SDS-PAGE 上分析,仅在沉淀中含有大量的特异表达蛋白,证明所表达的蛋白以包含体形式存在.

2.4 TYLCV-CHI CP 抗血清的检测

分别对 20, 40, 100, 200, 400, 1 000, 1 600, 2 000, 3 000, 4 000 倍系列稀释的抗血清进行检测(表 1),表明所制备的抗血清与免疫抗原具有特异免疫反应.

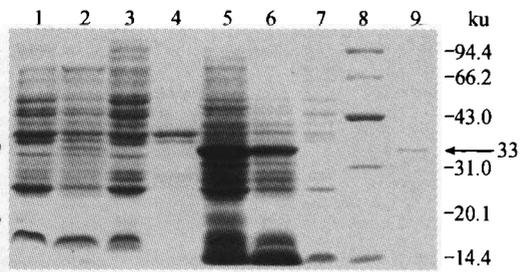


图 3 TYLCV-CHI CP 基因在大肠杆菌中的表达及纯化

1 含 pSBETb 空载体的 *E. coli* BL21(DE3)总蛋白;2 含 pSBETb-CP 的 *E. coli* BL21(DE3)总蛋白;3 超声破碎后 pSBETb 上清液;4 超声破碎后 pSBETb 沉淀;5,6 超声破碎后 pSBETb-CP 沉淀;7 超声破碎后 pSBETb-CP 上清液;8 蛋白标准;9 纯化的 CP 基因表达蛋白

表 1 TYLCV-CHI CP 抗血清的 ELISA 检测结果

血清稀释倍数	20	40	100	200	400	1 000	1 600	2 000	3 000	4 000
$A_{490\text{ nm}}$ 值	0.73	0.89	0.98	1.01	1.05	1.05	1.00	1.03	0.98	0.77

利用制备的 TYLCV-CHI CP 抗血清对番茄黄化曲叶病、南瓜曲叶病、烟草曲叶病、赛葵曲叶病、番茄黄化曲叶病毒侵染的烟草、烟草曲叶病毒侵染转基因番茄进行了 Western blot 检测(图 4),结果表明感染番茄黄化曲叶病、南瓜曲叶病、烟草曲叶病、感染番茄黄化曲叶病的烟草、烟草曲叶病毒侵染转基因番茄的植物材料均与所制备的抗血清有特异免疫反应,而且除南瓜曲叶病反应的蛋白略小之外,其他几种病毒的反应蛋白位置与阳性对照一致,该血清与赛葵

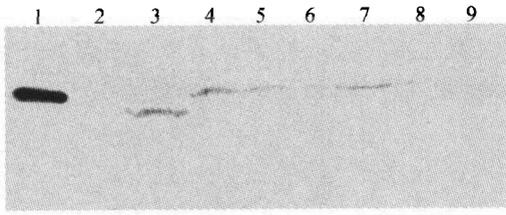


图 4 感病植物与 TYLCV-CHI CP 抗血清的 Western blot 结果

1 阳性抗原(表达纯化的 TYLCV-CHI CP); 2 阴性对照(感染玉米粗缩病毒 MRDV 的玉米); 3 感染南瓜曲叶病毒 SqLCV 的南瓜; 4 感染 TYLCV-CHI 的番茄; 5 感染烟草曲叶病毒 TblCV 的烟草; 6 感染 TYLCV-CHI 的烟草; 7, 8 感染 TblCV 的番茄; 9 感染赛葵曲叶病毒 MaLCV 的赛葵

赛葵黄脉病的病毒与番茄黄化曲叶病毒没有血清学关系。

曲叶病及不相关玉米粗缩病毒没有反应,说明番茄黄化曲叶病毒,烟草曲叶病毒以及南瓜曲叶病毒之间具有相同或相似的抗原决定簇,此结果证实了刘玉乐等报道的 TYLCV-CHI, SqLCV-CHI 和 TblCV-CHI CP 编码的氨基酸序列具有较高同源性的结果^[5]。Roberts 等也曾报道粉虱传双生病毒具有抗原相关性^[12],在不同病毒之间,外壳蛋白上的一些抗原决定簇可能相同或相似, DNA 顺序较为保守,特别在相同地区不同的双生病毒之间更是如此^[2,4,13-15],这可能与粉虱传播介体有关。在 Western blot 实验中,还曾多次检测鳢肠黄脉病,胜红蓟黄脉病和豨荛黄脉病叶片,均没有反应(数据未显示),说明引起鳢肠黄脉病、胜红蓟黄脉病、豨荛黄脉病的病毒与番茄黄化曲叶病毒没有血清学关系。

致谢 本所王文惠老师协助完成抗血清的制备,特此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Nakhla M K, et al. *Plant Virus Control*. Minnesota: APS Press, 1998. 565
- 2 Czosnek H, et al. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl virus. *Archives of Virology*, 1997, 142(7): 1 391
- 3 刘玉乐,等. 一种非洲番茄黄化曲叶病毒 DNA 的克隆. *自然科学进展*, 1998, 8(3): 297
- 4 蔡健和,等. 番茄曲叶病及其血清学和 PCR 测定. *微生物学报*, 1995, 35(5): 394
- 5 刘玉乐,等. 中国番茄黄化曲叶病毒——双生病毒的一个新种. *中国科学, C 辑*, 1998, 28(2): 148
- 6 Chiemsombat P, et al. Tomato yellow leaf curl virus in Japan are serologically identical. *Ann Phytopath Soc Japan*, 1991, 57: 595
- 7 Credi R, et al. Association of a geminivirus with a severe disease of tomato in Sicily. *Phytopath Medit*, 1989, 28: 223
- 8 Schenk P M, et al. Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare Arg tRNAs. *Biotechniques*, 1995, 19(2): 196
- 9 Doyle J J, et al. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 1987, 19, 11
- 10 Liu Y L, et al. Defective forms of cotton leaf curl virus DNA-A that have different combination of sequence deletion, duplication, inversion and rearrangement. *J Gen Virol*, 1998, 79: 1501
- 11 殷勤燕,等. 中国番茄黄化曲叶病毒小环状 DNA 分子的发现与证实. *科学通报*, 2000, 45(5): 528
- 12 Roberts I M, et al. Serological relationships and genome homologies among geminiviruses. *J Gen Virol*, 1984, 65: 1723
- 13 Thomas J E, et al. Production of monoclonal antibodies to African cassava mosaic virus and differences in their reactivities with other whitefly-transmitted geminivirus. *J Gen Virol*, 1986, 67: 2739
- 14 Swanson M M, et al. Genome affinities and epitope profiles of whitefly-transmitted geminiviruses from the America. *Ann Appl Biol*, 1992, 121: 285
- 15 Padidam M, et al. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *J Gen Virol*, 1995, 76: 249