

禾谷缢管蚜体内的病毒结合蛋白基因的克隆与原核表达*

吴云锋¹ 崔晓峰¹ 林 林¹ 周广和²

(¹ 西北农林科技大学 杨凌 712100) (² 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100094)

摘 要 利用一对特异性引物,用 PCR 的方法从禾谷缢管蚜体内扩增出了病毒结合蛋白基因,序列测定结果表明其长度为 1647 bp,编码 548 个氨基酸,与 GenBank 中的禾谷缢管蚜美国生物型 *Buchnera groEL-NT* 核苷酸序列同源性为 97%,氨基酸同源性为 97.4%。构建了 2 个原核表达载体并进行表达得到了 69kD 融合蛋白和 63kD 的非融合蛋白。

关键词 禾谷缢管蚜,内共生细菌,病毒结合蛋白基因,传播

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)04-0448-05

蚜传病毒有 13 个属约 316 种,几乎为害绝大多数农作物并引起严重的病害,如小麦黄矮病、玉米矮花叶病、油菜及十字花科花叶病,瓜类和番茄花叶病等^[1,2]。在田间,蚜虫是这类病害发生和流行的中心环节。据统计全世界约有 193 种蚜虫可以传毒,传毒方式分为持久性、非持久性和半持久性^[3]。禾谷缢管蚜 (*Rhopalosiphum padi*) 以持久性方式传播小麦黄矮病,流行年份发病率一般为 30%~50%,严重的高达 80%~90%,造成减产 20%~30%^[4]。吴云锋等(1994)采用免疫金标记 (immuno-gold) 研究了大麦黄矮病毒在禾谷缢管蚜体内的循环传毒过程,进一步分离纯化了一种与传毒有关的 63 kD 的病毒结合蛋白 (virus binding protein, VBP)^[5],本文报道了对该基因的克隆和在原核中的表达。

1 材料和方法

1.1 蚜虫与病毒

供试禾谷缢管蚜 (*Rhopalosiphum padi*) 采自杨凌小麦田(即定为杨凌生物型),在防虫温室多代转接并将单头虫克隆五代后,饲养于小麦上,收集 3~4 龄期的无翅蚜冰冻于 -70℃ 冰箱,备用。大麦黄矮病毒 (BYDV) GPV 株系保存在小偃 6 号麦苗上。

1.2 菌种、质粒与试剂

大肠杆菌 DH5 α 与质粒 pBluescript KS, 大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株和表达载体 pBV221 由本实验室保存。pET-30(+) 和 pTrecHisA 由中国科学院微生物研究所提供。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购自 Takara 公司, *Taq* DNA 聚合酶为 Promega 公司产品。

1.3 模板 DNA 的提取及 PCR 扩增

参考崔晓峰等人的方法进行。引物设计:根据已测的 VBP 末端序列以及崔晓峰等报

* 基金项目:国家自然科学基金(39970483),国家八六三青年基金(97-137)

作者简介:吴云锋(1960-),男,陕西乾县人,教授,从事植物病毒学方面的研究。E-mail:wuyf@public.xa.sn.cn, 本文所报道的基因在 GenBank 的登录号为 AF387864

收稿日期:2001-09-03, 修回日期:2001-11-09

道的桃蚜的内共生菌 MpBGroEL-YL 序列(在 GenBank 的登录号为 AF367248)设计一对特异物引物,在引物 5'端引入 *Pst* I 酶切位点,引物 3'端引入 *Bam*H I 酶切位点。引物由上海 Sangon 公司合成,其序列如下:

5'引物(SP1): ACCCTGCAGATGGCCGCTAAAGATGTAA

3'引物(SP3): ACGGATCCTTACATTCCACCCATGCC

1.4 克隆与序列分析

将 PCR 产物与 pBluescript KS 连接、转化后筛选阳性克隆,经酶切鉴定和 PCR 鉴定后送上海 Sangon 公司进行序列测定,氨基酸序列推导和同源性比较借助 Blast 软件进行。

1.5 原核表达

参照崔晓峰等的方法进行。碱法提取表达质粒 pET-30a(+), pBV221 和 pTrcHisA DNA,用 *Eco*R I + *Bam*H I 双酶切质粒 DNA 和带有禾谷缢管蚜体内 VBP 基因的重组质粒 pKSVBP, DNA 胶回收试剂盒回收 DNA 片段。将目的基因与表达质粒连接,转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,挑取阳性克隆, *Eco*R I + *Hind* III 双酶切鉴定插入与否。用 SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况。

2 结果和分析

2.1 禾谷缢管蚜体内病毒结合蛋白基因的克隆

首先在 25 μ L 体系中对影响 PCR 特异性扩增的条件进行了筛选,退火温度从 46 $^{\circ}$ C ~ 58 $^{\circ}$ C,每 3 $^{\circ}$ C 一个梯度共设 5 个梯度; Mg^{2+} 浓度从 1.0 ~ 2.0mol/L,每 0.5mol/L 一个梯度。经优化后的 PCR 反应条件为在 50 μ L 体系中含引物 SP1 和 SP2 各 0.6 μ mol/L,模板 200ng, dNTPs 2.5mmol/L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, Mg^{2+} 5 ~ 6mmol/L, *Taq* 酶 1U,退火温度为 52 $^{\circ}$ C,共进行 35 个循环。采用 PCR 方法从禾谷缢管蚜体内扩增出一条约为 1.65kb 的片段(图 1A)。将目的基因和克隆载体 pBluescript KS 经 *Pst* I + *Bam*HI 酶切、回收、连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,在涂有 Amp、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上,随机挑取 8 ~ 12 个白色克隆,小量培养并提取质粒,经 *Pst* I + *Bam*H I 双酶切鉴定和 PCR 鉴定后证实全长目的片段已连接到 pBluescript KS 载体上(图 1B),命名为 pKSVBP。

2.2 序列分析

将该基因序列进行双向测定,结果得到了一个 VBP 基因的全长序列,大小为 1647 bp。经过 Blast 软件分析,该基因与禾谷缢管蚜美国生物型体内的共生菌(endosymbiotic bacterium, *Buchnera*)groEL 基因(RpBgroEL-AM, U77380)存在 37 个碱基的差异,同源性为 97%, VBP 基因序列在第 1018 处核苷酸比 RpBgroEL-AM 多“AGT”3 个碱基,而在第 1557 处核苷酸比 RpBgroEL-AM 少“ATG”3 个碱基。与桃蚜杨生物型体内共生菌 groEL 基因比较,存在 198 个碱基的差异,同源性为 87.98%。

用 Blast 软件对 VBP 基因进行氨基酸序列推导,结果表明禾谷缢管蚜杨生物型体内的 VBP 蛋白由 548 个氨基酸组成。氨基酸序列与禾谷缢管蚜美国生物型的 RpBGroEL-AM 的氨基酸序列存在 14 个氨基酸差异,同源性为 97.4%;与桃蚜杨生物型体内的 VBP 蛋白的氨基酸序列存在 15 个差异,同源性为 97.26%(图 2)。其中 RpBgroEL-YL 基因中第 543 位核苷酸处多一个“G”,而在 554 位少一个“C”,这导致阅读框的改变,即从 RpBGro

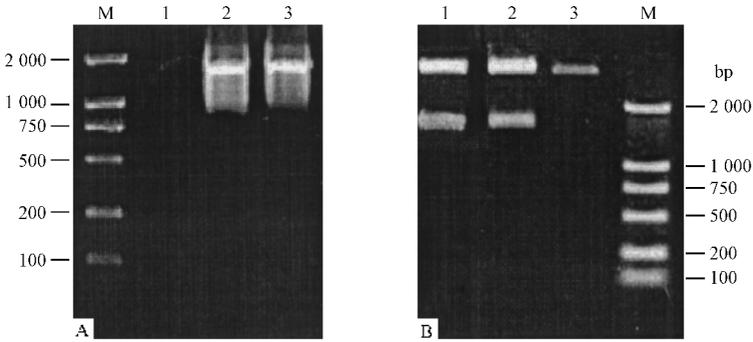


图 1 病毒结合蛋白基因的 PCR 扩增和重组质粒 pKSVP 的双酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification of VBP genes and Pst I + BamH I double enzymes digestion of pKSVP

(A) M :DL2000 Marker ;1 negative control ;2 ;3 :VBP genes.(B) M :DL2000 marker ;1 ;2 pKSVP ;3pBluescript KS.

VBP: MAAKDVKFGNEARIKMLRGVNVLADAVKVTLGPKGRNVVLDKSFSGAPSIT 50
 RpBGroEL-AM: MAAKDVKFGNEARIKMLRGVNVLADAVKVTLGPKGRNVVLDKSFSGAPSIT
 MpBGroEL-YL: MAAKDVKFGNEARIKMLRGVNVLADAVKVTLGPKGRNVVLDKSFSGAPSIT
 KDGVSVAREIELEDKFENMGAQMVKEVASKANDAAGDGTTTATLLAQSIVNEGLKAVAAGMNPMDLKRGI 120
 KDGVSVAREIELEDKFENMGAQMVKEVASKANDAAGDGTTTATLLAHSIVNEGLKAVAAGMNPMDLKRGI
 KDGVSVAREIELEDKFENMGAQMVKEVASKANDAAGDGTTTATLLAQSIVNEGLKAVAAGKNPMDLKRGI
 DKAVISAVEELKNLSVPCSDSKAITQVGTISANADEKVGALIAEAMEKVGNDGVITVEEGTGLQNELEV 190
 DKAVISAVEELKNLSVPRSDSKAITQVGTISANADEKVGALIAEAMEKVGNDGVITVEEGTVFKDELEV
 DKAVISAVEELKNLSVPCSDSKAITQVGTISANADEKVGALIAEAMEKVGNDGVITVEEGTGLQNELEV
 KGMQFDRGYLSPYFINKPETGVVELENPYILMADKKISNVREMLPILESVAKSGKPLLIISEDLEGEALA 260
 KGMQFDRGYLSPYFINKPETGVVELENPYILMADKKISNVREMLPILESVAKSGKPLLIISEDLEGEALA
 KGMQFDRGYLSPYFINKPETGIVELENPYILMADKKISNVREMLPILESVAKSGKPLLIISEDLEGEALA
 TLVNSNTRGIVKVA AVKAPGFGDRRKAMLQDISVLTGGSVISEELAMDLEKSTLEDLGGAKRVVINKD 330
 TLVNSNMRGIVKVA AVKAPGFGDRRKAMLQDISVLTGGSVISEELAMDLEKSTLEDLGGAKRVVINKD
 TLVNSNMRGIVKVA AVKAPGFGDRRKAMLQDISILTGGSVISEELAMELEKSTLEDLGGAKRVVINKD
 TIIGGVGEK*QAIQSRISQIQEIQEATSDYDKEKLNERLAKLSGGVAVLKVGAATEVEMKEKKARVEDA 400
 TIIGGVGEKSQAIQSRISQIQEIQEATSDYDKEKLNERLAKLSGGVAVLKVGAATEVEMKEKKARVEDA
 TIIGGVGEKIIT*IQSRISHIRQEIQEATSDYDKEKLNERLAKLSGGVAVLKVGAATEVEMKEKKARVEDA
 LHATRAAVEEGVVAGGGVALVRVAGKISNLRGHNEQNVGIRVALRAMEAPLRQIVSNSGEEPSVVTNNV 470
 LHATRAAVEEGVVAGGGVALVRVAGKISNLRGHNEQNVGIRVRLRAMEAPLRQIVSNSGEEPSVVTNNV
 LHATRAAVEEGVVAGGGVALVRVAGKISNLRGQNEQNVGIRVALRAMEAPLRQIVSNSGEEPSVVTNNV
 KDGGKNGYNAATDEYGD MIDFGILDPTKVTRSA LQYAASVAGLMITTECMVTDLPKEDKTS DASSSPAG 540
 KDGGKNGYNAATDEYGD MIDFGILDPTKVTRIALQYAASVAGLMITTD*MVTDLPKEDKTS DASSSPAG
 KDGGKNGYNAATDEYGD MIDFGILDPTKVTRSA LQYAASVAGLMITTECMVTDLPKEDKSSDSNSSPAG
 GMGGMGMM 548
 GMGGMGMM
 GMGGMGMM

图 2 禾谷缢管蚜体内 VBP 基因与 GroEL-AM 和 MpBGroEL-YL 的氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of the amino acid of VBP a) GroEL-AM from of *Rhopalosiphum padi* as well as MpBGroEL-YL. im. ac. cn

EL-AM 中第 182 ~ 185 的“ VF₁ (Val-Phe-Lys-Asp) 突变为“ GLQN (Gly-Leu-Gln-Asn); VBP 基因核苷酸序列第 1018-1020 位处缺少“ ACT ” 3 个碱基, 因而在 VBP 第 340 个氨基酸残基少一个“ Ser ”, 核苷酸第 1557-1559 位多出“ ATG ” 3 个碱基, 这使蛋白序列中第 519 个氨基酸残基“ Asp ”突变为“ Glu ”, 第 520 个残基多出一个“ Cys ”; 另外的氨基酸改变包括, 第 291(T → C) 412(C → T) 789(A → T) 1052-1053(GT → CC) 1117(C → T) 1330-1131(CG-GC) 1507(A → T) 的改变使第 97 位氨基酸残基(His → Gln) 138(Arg → Cys) 267(Met → Thr) 351(Arg → Pro) 379(Val → Gly) 444(Arg → Ala) 503(Thr → Ser) 发生改变(图 2)。

2.3 VBP 基因的原核表达载体的构建

用 *Eco*R I + *Bam*H I 从克隆载体 pKSVBP 上切下含 VBP 基因的 DNA 片段, 与相同限制酶切开的原核表达载体 pBV221、pET-30a 和 pTrcHisA 连接, 转化 BL21(DE3)。 *Eco*R I + *Bam*H I 酶切鉴定证实目的基因已插入到 pBV221 的多克隆位点内并具有正确的读框, 将含有 VBP 基因的阳性克隆分别命名为 pBVPR、pETPR 和 pTrcPR。

pBVPR 载体经过 42℃ 热诱导 2、4、6h, 表达菌经培养, 裂解, 用 SDS-PAGE 检测表达量。结果表明与未诱导对照相比, pBVPR 在 63 kD 处表达出一条蛋白带, 这与预测的目的基因表达产物分子量相当(图 3A), 表明目的基因已经表达, 但表达量较低。pET-30a 和 pTrcHisA 载体分别用终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 2、4、6h, SDS-PAGE 检测发现与未诱导对照相比, pETPR 在 69 kD 处多出一条蛋白带(图 3B), 其可能为 VBP 基因的融合表达产物, 在不同诱导时间下目的基因均有表达, 在诱导 4h 时表达量最高, 含目的基因的载体 pTrcPR 经多次不同时间的诱导均未见融合蛋白的表达。

3 讨论

在国内, 我们首次从禾谷缢管蚜体内克隆出病毒结合蛋白 VBP 基因, 该基因全长序列有 1647bp。经查询 GenBank, 发现其与禾谷缢管蚜美国生物型 RpBgroEL-AM 基因序列(U77380) 和桃蚜杨凌生物型 groEL 基因序列(AF367348) 不管是在核苷酸还是氨基酸水平上同源性均很高。由此, 有理由推测 VBP 可能就是 RpBgroEL 或是其家族中的一类, 在此暂定为 RpBgroEL-YL, 在 GenBank 中登录号是 AF387864。

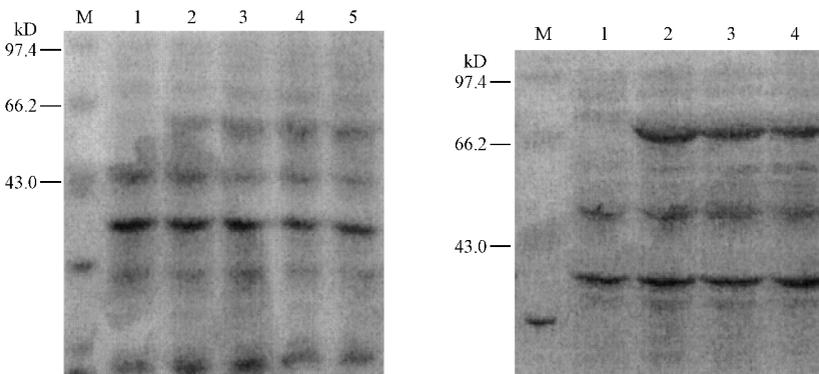


图 3 原核表达载体 pBVPR 和 pETPR 表达产物的 SDS-PAGE 检测

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expressed proteins in vector of pB VPR and pETPR

A : M : Protein marker ; 1 : pBVPR/CK 2 : pBVPR/2h 3 ~ 4 : pBVPR/4h 5 : pBVPR/6h.

B : M : Protein marker ; 1 : pETPR/CK 2 : pETPR/2h 3 : pETPR/4h 4 : pETPR/6h. <http://journals.im.ac.cn>

蚜虫内共生菌在体内为蚜虫的生存提供必须的氨基酸等物质。*Buchnera* GroEL 由蚜虫腹部的菌胞——一种专化的脂肪体细胞所包含的胞内共生菌(*Buchnera* sp.)合成^[6]。吴云锋、周广和等先让蚜虫在薄膜上取食青霉素-蔗糖溶液,1 小时后,进行正常饲毒和传毒,结果发现用抗生素处理过的禾谷缢管蚜、二叉蚜和麦长管蚜传播大麦黄矮病毒的特性与传毒率降低。推测其原因可能是青霉素杀伤了蚜虫体内共生菌和干扰共生菌蛋白的合成引起的,影响了病毒的循环持久性传播,因为进入血淋巴中的病毒只有与内共生菌的 *Buchnera* GroEL 结合后,病毒从血淋巴到附唾液腺(ASG)的转运才能免于被降解。RpBgroEL-YL 变异在蚜虫循环传毒尤其是在传播 BYDV 株系 GPV、GAV 等过程中的生物学意义有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Gray S M ,Banerjee N. *Mol Biol Rev* ,1999 **63** (1) :128 ~ 148 .
 [2] Van den Heuvel J F J M ,Verbeek M van der Wilk F. *J Gen Virol* ,1994 **75** :2559 ~ 2565 .
 [3] Harris K F. *A dvance in virus reseach* ,1983 **28** :113 ~ 137 .
 [4] 王锡锋,常胜军,周广和.植物病理学报,1999 **29** (4) :309 ~ 313 .
 [5] 吴云锋,魏宁生,周广和.西北农业学报,1999 **28** (4) :5 ~ 7 .
 [6] Douglas A E. *Annu Rev Entomo* ,1998 **43** :17 ~ 37 .

Cloning and Prokaryotic Expression of Viral Binding Protein(VBP) Gene From Endosymbiotic Bacterium of *Rhopalosiphum padi* *

Wu Yunfeng¹ Cui Xiaofeng¹ Lin Lin¹ Zhou Guanghe²

(¹ Northwest Scie-Tech University of Agriculture and Forestry ,Yangling 712100 ,China)

(² Institute of Plant Protection ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Beijing 100094 ,China)

Abstract : Viral binding protein gene from *Rhopalosiphum padi* Yangling biotype was amplified by PCR method and then cloned. The complete nucleotide sequence of the gene was determined. It has 1647 nucleotides encoding 548 amino acids. Comparison showed this gene has 97% identity on nucleotide level with *Buchnera* groEL-AM gene of *Rhopalosiphum padi* American biotype, while has 97.4% identity on amino acid level was found between this two genes. The VBP gene was ligated into pBV221 and pET30a expression vector and expressed the aim protein 63kD and 69kD.

Key words : *Myzus persicae* , Endosymbiotic bacterium , Virus binding protein , Transmission