

# 马铃薯 S 病毒外壳蛋白基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

李广存<sup>1</sup> 杨煜<sup>1</sup> 王秀丽<sup>1</sup> 杨元军<sup>2</sup> 毕玉平<sup>1</sup><sup>1</sup> 山东省农业科学院生物中心, 济南 250100; <sup>2</sup> 山东省农业科学院蔬菜研究所, 济南 250100)

**摘要:** 以田间采集的马铃薯病叶中提取的马铃薯病毒 S (PVS) 总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 获取长度为 890 bp 的 *PVS-cp* 的 cDNA, 克隆至 pGEM-T 载体上。酶切回收该基因片段, 并构建了该基因的原核表达质粒 pBV-pvs。SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western 印迹分析表明: *PVS-cp* 基因在大肠杆菌 JM109 中可特异地高效表达分子量约 33kD 的蛋白, 且表达蛋白具有良好的抗原活性。利用该表达产物免疫动物家兔, 获得的抗血清可用于大田马铃薯 S 病毒的快速检测。

**关键词:** 马铃薯; 马铃薯 S 病毒; 外壳蛋白基因; RT-PCR; 序列分析; Western 印迹; 抗血清制备  
**中图分类号:** S 532; S 432.4+1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 04-0517-03

## Cloning of Potato Virus S Coat Protein Gene and Its Expression in *E. coli* JM109

Li Guangcun<sup>1</sup>, Yang Yu<sup>1</sup>, Wang Xiuli<sup>1</sup>, Yang Yuanjun<sup>2</sup>, and Bi Yuping<sup>1</sup><sup>1</sup> Bio-tech. Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China; <sup>2</sup> Vegetable Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

**Abstract:** Total RNA of potato virus S (PVS) was isolated from diseased potato leaves collected in field, The cDNA encoding PVS coat protein (PVS-cp) was amplified by RT-PCR and cloned into the plasmid pGEM-T vector. The expression vector of *PVS-cp* gene was constructed through inserting the cDNA fragment into the expression plasmid pBV220. The results of SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the *PVS-cp* gene highly expressed in *E. coli* JM109 and the molecular size of the expression product was about 33 kD. The product was used as antigen to immunize rabbits and the specific anti-serum can be used to detect PVS rapidly.

**Key words:** Potato; Potato virus S; Coat protein gene; RT-PCR; Sequence analysis; Western blot; Anti-serum preparation

### 1 目的、材料与方

马铃薯 S 病毒 (Potato Virus S, PVS) 分布广泛, 通常可造成减产 10% ~ 20%。其症状潜隐, 难以辨认, 目前主要采用指示植物和 ELISA 等方法进行诊断<sup>[1]</sup>。ELISA 方法快速、方便, 但需要大量抗血清。为研究利用基因工程途径制备该病毒抗血清的可行性, 克隆和分析了 *PVS-cp* 基因, 并进行了该基因的原核表达分析和抗血清制备。

采用 ELISA 方法对采自山东大田的马铃薯叶片进行马铃薯 X、Y、S 和卷叶 (LR) 病毒检测, 只对 S 病毒呈阳性反应的叶片按改进的 Peden 等的方法<sup>[2]</sup>提取病毒粒子: ①取病叶 100 g, 加二倍体积的 0.1 mol/L PBS 缓冲液, 研磨后离心 (5000 g, 20 min); ②上清液经 PEG8000 沉淀并重溶于 0.05 mol/L PBS 缓冲液中, 低速离心去杂后进行 20% 的蔗糖垫离心 (160 000 g, 180 min), 沉淀再次重悬于 0.05 mol/L PBS 缓冲液中; ③再次低速离心去杂后进行 10% ~ 40% 的蔗糖密度梯度离心

收稿日期: 2003-11-17; 修回日期: 2004-02-13

基金项目: 农业部“948”项目 (201047); 山东省科技攻关项目 (99-05)

(100 000 g, 60 min), 收集病毒带; ④重复步骤③, 收集病毒带, 获得纯化的 PVS 病毒粒子。病毒液直接经苯酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀获得病毒总 RNA。

按 Joung 报道的 *PVS-cp* 基因序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.u74376>) 设计合成正向引物 P1 和反向引物 P2。P1: 5' ATG CCG CCT AAA CCA GAT CCA AC 3'; P2: 5' AGA TCT GCC TTC ATT GGT TGA TCG 3'。参照 RT-PCR 试剂盒说明书进行基因的扩增: 先于 42℃ 反应 1 h 合成 cDNA, 后于 94℃ 预变性 5 min, 再按 94℃ 45 s, 50℃ 60 s, 72℃ 60 s, 反应 35 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 回收后与 pGEM-T 载体 (Promega, USA) 相连, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, PCR 及酶切鉴定后, 提纯质粒送交大连宝生物公司测序。通过 PC/GENE 软件进行同源序列的比较。酶切回收克隆基因片段, 构建原核表达质粒, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 于 42℃ 诱导表达, 并进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western 印迹分析<sup>[3]</sup>。提取表达蛋白, 参照国际马铃薯中心植物病毒学培训手册<sup>[4]</sup>进行动物免疫制备抗血清并测定其效价。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PVS-cp* 基因的克隆和序列分析

以 PVS 总 RNA 的反转录产物为模板进行 PCR 扩增可得约 0.9 kb 的特异性扩增产物, 且与文献报道的大小一致。PCR 产物序列测定结果 (图 1) 表明: 该序列包含了 *PVS-cp* cDNA 完整的 885 bp 编码序列, 编码 294 个氨基酸。利用 PC/GENE 软件进行同源序列比较发现: 所克隆的 *PVS-cp* cDNA 与已报道的 *PSV-cp* 基因序列高度同源, 其编码的氨基酸序列同源性更高, 均在 93.5% 以上, 且不同分离株的差异也主要位于第 16 位至第 40 位氨基酸上, 其它位置的氨基酸差异不大。因此, 以高度保守的 S 病毒外壳蛋白为抗原制备抗血清应是可行的。

```

ATG CCG CCT AAA CCA GAT CCA ACT AGC TCA GGA GAG ACA CCA CAA GCT ATA CCA CTT GCG
M P P K P D P T S S G E T P Q A I P L A
CCG CCA CCC CGG AAC GTA GAG GAG CAT AAA GTT GGC CCA AGT CAA GGG CAC GGG CAG AAT
P P P R N V E E H K V G P S Q G H E Q N
GAG GAG GCT ATG CTG GAG CAG AGG CTC ATC AGA TTG ATT GAA CTC ATG GCC TCG AAA AGG
E E A M L E Q R L I R L I E L M A S K R
CAC AAT TCA ACA TTG AGC AAC ATC TCT TTT GAG ATA GGT CGG CCC TCG CTT GAG CCG ACC
H N A T L S N I S F E I G R P S L E P T
CCT GAA ATG CGT AGG AAT CCA GAG AAC CCA TAC TCG CGG TTT TCA ATC GAT GAG CTG TTC
P E M R R N P E N P Y S R F S I D E L F
AAG ATG GAA ATC CGA TCT GTG TCC AAC AAC ATG GCG AAC ACC GAG CAA ATG GCA CAA ATC
K M E I R S V S N N M A N T E Q M A Q I
ACT GCT GAC ATC GCT GGA CTC GGG GTC CCC ACT GAA CAC GTT GCA GGG GTT ATA CTG AAA
T A D I A G L G V P T E H V A G V I L K
GTG GTG ATT ATG TGT GCA AGC GTG AGT AGC TCT GTT TAT CTG GAC CCG GCA GGG ACT GTG
V V I M C A S V S S S V Y L D P A G T V
GAG TTC CCA ACA GGC GCA GTG CCC TTG GAC TCG ATC ATT GCA ATC ATG AAG AAT CGC GCG
E F P T G A V P L D S I I A I M K N R A
GGA TTG AGA AAA GTG TGC AGG CTA TAC GCT CCA GTC GTG TGG AAT TAC ATG CTA GTC CAG
G L R K V C R L Y A P V V W N Y M L V Q
AAT AGG CCA CCT TCG GAT TGG CAG GCC ATG GGA TTT CAA TGG AAT GCA CGC TTC GCC GCA
N R P P S D W Q A M G F Q W N A R F A A
TTT GAC ACA TTC GAT TAT GTG ACT AAT GGG GCT GCA GTT CAG CCC GTA GAG GGG CTC ATA
F D T F D Y V T N G A A V Q P V E G L I
CGC AGG CCC ACA CCT GAG GAA ACA ATA GCT CAC AAT GCC CAC AAG AGT ATG GCA ATC GAC
R R P T P E E T I A H N A H K S M A I D
AAA TCG AAC AGA AAT GAG CGA TTG GCT AAC ACT AAT GTT GAG TAC ACT GGG GGG ATG CTT
K S N R N E R L A N T N V E Y T G G M L
GGC GCT GAT ATT GTG CGC AAT CAC CGT AAT GCG ATC AAC CAA TGA
G A D I V R N H R N A I N Q

```

图 1 *PVS-cp* cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *PVS-cp* cDNA

## 2.2 PVS-*cp* 基因的表达及 Western blot 检测

为使 *PVS-cp* 基因在大肠杆菌中高效表达, 本研究对 SD 序列与 ATG 之间的距离进行了适当调整 (8 个 bp), 构建了该基因的原核表达载体 pBV-pvs, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 并于 42℃ 热诱导表达。同时, 所表达蛋白在细菌中以包含体形式存在, 可有效防止细菌蛋白酶的降解。SDS-PAGE 电泳和 Western blot 印迹分析表明 (图 2、图 3): *PVS-cp* 基因在大肠杆菌 JM109 中可特异高效表达 33 kD 蛋白, 且大小与文献报道的一致; 所表达的蛋白确为马铃薯 S 病毒的外壳蛋白, 且该蛋白具有良好的抗原性。

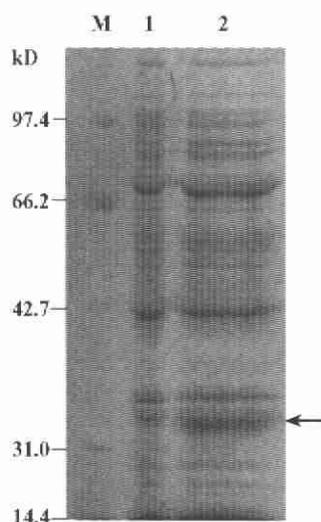


图 2 *PVS-cp* 基因在大肠杆菌中的表达

M. 蛋白质分子量标准; 1. 未经诱导的 pBV-pvs; 2. 诱导 4 h 的 pBV-pvs

Fig. 2 Expression of *PVS-cp* gene in *E. coli* JM109

M. protein marker; 1. Non-induced pBV-pvs;  
2. Induced pBV-pvs for 4 h

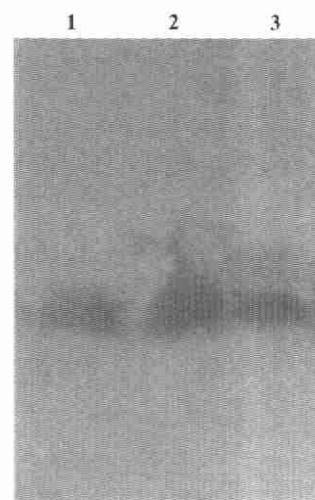


图 3 *PVS-cp* 基因的 Western blot 分析

1-3. 为诱导 4 h 的 pBV-pvs 的 3 次重复

Fig. 3 Western blot analysis of *PVS-cp* gene

1-3. Showed three repeats of induced pBV-pvs for 4 h

## 2.3 PVS 抗血清的效价测定及样本检测

NCM-ELISA 法测得抗血清的效价为 1:1024, 用该抗血清采用 DAS-ELISA 方法及 Western blot 可有效地进行 PVS 检测 (图略)。与用国际马铃薯中心 (International Potato Center, CIP) 的抗血清对比, 二者对于感病植株与健康植株的反应一致, 说明利用基因工程途径制备该病毒抗血清是可行的。同时该方法克服了传统的以提纯的病毒粒子为抗原制备抗血清, 需要网室和温室养殖毒源、费时费力并存在毒源扩散的危险等, 特别是克服了对于马铃薯 S 病毒常潜隐, 难以获得足够的提纯抗原的不足, 并且该法所构建的工程菌株可在超低温条件下长期保存, 随时可诱导表达用于抗血清制备。

## 参考文献:

- Salazar L F. Potato viruses and their control. Lima; International Potato Center, 1996. 214
- Peden K W C, Symons R. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. *Virology*, 1973, 53 (2): 487-492
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南. 第三版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2001. 1236-1239, 1256, 1752
- Salazar L F, Jayasinghe U. Techniques in plant virology. Lima; International Potato Center, 1997. 12-14

## 欢迎订阅 2005 年《植物营养与肥料学报》

《植物营养与肥料学报》为双月刊, 大 16 开本 144 页, 单月 25 日出版, 定价 15 元, 全年 90 元。邮发代号: 82-169。全国各地的邮电局 (所) 可办理订阅。本刊有 2003 年合订本, 每套 60 元 (含邮资); 2004 年合订本, 每套 90 元 (含邮资), 需要者请与编辑部联系。电话: 010-68918653; 地址: 北京中关村南大街 12 号中国农科院土肥所; 邮编: 100081。