

南方水稻黑条矮缩病毒外壳蛋白 p10 的原核表达 和抗血清制备及应用

张蔚明, 刘燕娟, 周倩, 廖晓兰*

(湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV) p10 蛋白由其基因组片段 S10 编码, 根据 SRBSD 海南分离物 S10 序列(EU523360)设计特异性引物扩增编码 p10 蛋白的片段, 并亚克隆至原核表达载体 pET-28a+, 以大肠杆菌 BL21plysS 为宿主菌进行高水平表达, 利用纯化的 p10 蛋白免疫兔子, 制备了 p10 蛋白的特异性抗血清。ELISA 检测显示, p10 蛋白的抗血清可与来自湖南不同地区的白背飞虱病汁液发生强烈的血清学反应, 表明该抗血清适用于田间 SRBSDV 的快速诊断。

关 键 词: 南方水稻黑条矮缩病毒; 原核表达; 抗血清

中图分类号: S435.111.4⁺9; S432.4⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)04-0400-03

Prokaryotic expression of p10 protein of Southern rice black-streaked dwarf *Fijivirus* and preparation and application of its antiserum

ZHANG Wei-ming, LIU Yan-juan, ZHOU Qian, LIAO Xiao-lan*

(College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Protein p10 is encoded by the genome segment S10 of Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV). Based on the sequence of S10 (EU523360), a pair of S10 specific primers were designed and used to amplify the p10 protein-encoding gene. The expected product was subcloned into the expression vector pET-28a+, which was transformed into *Escherichia coli* BL21plysS and expressed at high level. Antiserum specifically against p10 protein was prepared using the purified protein to immunize rabbit. ELISA tests showed that the antiserum against p10 protein could react strongly with fluids from diseased insects, indicating that the antiserum could be used to rapidly diagnose the SRBSDV infection in fields.

Key words: Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV); prokaryotic expression; antiserum

南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)是近年来发现的水稻病毒病新种, 隶属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)斐济病毒属(*Fijivirus*)^[1-2]。有研究^[2]表明, 南方水稻黑条矮缩病毒在自然条件下主要以白背飞虱(*Sogatella furcifera* Horvath)传播, 侵染水稻、玉米、薏米、稗草、白草和水莎草等。2009 年, 湖南省首次发现该病毒; 2010 年, 在湖南主要水稻产区呈流行趋势^[3]。

白背飞虱以持久性方式传播 SRBSDV^[4], 病毒

在虫体内增殖, 虫体一旦获毒, 即终身带毒。在湖南稻区, SRBSDV 初侵染源主要是春季带毒迁入的白背飞虱, 初侵染源扩繁后, 再经白背飞虱传入单季稻或晚季稻秧田或早期本田, 给水稻生产造成严重危害。白背飞虱的带毒率及早春寄主植物的感病率是预测南方水稻黑条矮缩病毒病发生程度的重要依据^[5], 因此有必要建立快速有效的 SRBSDV 检测方法。

收稿日期: 2011-04-27

基金项目: 农业部农业行业科技计划项目(201003031-1); 湖南省科学技术厅项目(2010NK3021)

作者简介: 张蔚明(1973—), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 副教授, 主要从事植物保护研究; *通信作者, Liaoxiaolan88@yahoo.com.cn

SRBSDV 的基因组由 10 条线形的双链 RNA (dsRNA) 片段组成,按照基因组在 PAGE 凝胶上的迁移快慢由上到下依次称为 S1 ~ S10^[6-9],其中 p10 蛋白为基因组 S10 编码的蛋白,同源性比较分析表明,该蛋白为主要的壳蛋白^[10]。利用病毒壳蛋白制备抗血清进行病毒的检测,具有高效、灵敏、特异的特点^[11]。笔者利用原核表达方法表达了 SRBSDV p10 蛋白,并制备了抗血清,ELISA 检测显示,p10 蛋白的抗血清可与不同来源的介体昆虫病汁液发生强烈的血清学反应,表明该抗血清适用于 SRBSDV 的田间快速诊断,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

SRBSDV 的 dsRNA 由植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室保存,携 SRBSDV 的白背飞虱分别采自湖南汉寿、浏阳、常宁、炎陵、芷江、道县、隆回、怀化、洞口、洪江等地。引物由上海生工生物工程有限服务公司合成; *Bam*HI、*Xho*I、*T₄*-DNA 连接酶、胶回收、质粒提取试剂盒、T-载体购自 Takara 公司;表达载体 pET28-a 购自 Promega 公司;羊抗小兔 IgG (碱性磷酸酶共价结合)、5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸 (BCIP) 和氮蓝四唑 (NBT) 购自 Sigma 公司。

1.2 方 法

1.2.1 原核表达载体 pET28-p10 的构建与鉴定

根据已发表的 SRBSDV 海南分离物基因组片段 S10 的序列 (EMBL/DDBJ/GenBank 数据库登录号为 EU523360),设计 2 条引物, p10-1: 5'-CGCGGAA TGGCTGACATAAGACTTGACATA-3'; p10-2: 5'-CCGCTCTCTGGTGACTTTATTTAACACAAC-3'。为了便于克隆和鉴定,在引物 p10-1 和 p10-2 中分别加入了 *Bam*HI 和 *Xho*I 识别位点。原核表达载体的构建和鉴定参照文献^[12]的方法。

1.2.2 外源基因的诱导表达及抗血清制备

将含有目的基因的表达载体 pET-p10 转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) *plys*S 菌株中诱导表达^[13]。15% SDS-PAGE 电泳检测后,参照 Invitrogen 蛋白纯化方法纯化表达的 p10 蛋白,纯化的蛋白经检测后免疫兔子,免疫 3 次,采集抗血清。

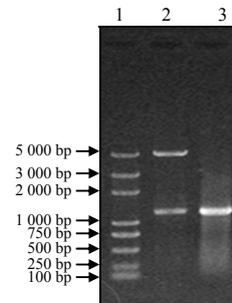
1.2.3 ELISA 检测

以制备的 p10 抗血清为抗体,参照文献^[14],用间接 ELISA 方法检测白背飞虱样品。

2 结 果

2.1 表达载体 pET28-p10 的构建

以 SRBSDV 的 dsRNA 为模板,按照 TaKaRa One-step RT-PCR 试剂盒说明进行 RT-PCR 反应。用引物对 p10-1 和 p10-2 可以特异地扩增得到长约 1 700 bp 的预期片段,回收纯化后连接至 T-载体 (promega) 转化 TG1,进行测序验证。鉴定正确后,构建表达载体 pET28-p10 (图 1)。结果表明,构建的表达质粒含有完整的目的片段,并且有正确的开放阅读框。



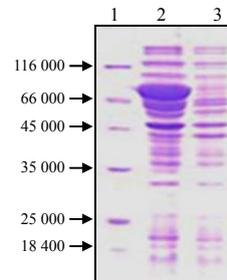
1 Marker; 2 质粒 pET28-p10 的 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切鉴定; 3 质粒 pET28-p10 的 PCR 鉴定。

图 1 pET28-p10 质粒的双酶切和 PCR 检测鉴定

Fig.1 Identification of pET28-p10 by restriction enzyme digestion and PCR

2.2 p10 蛋白表达的诱导及优化

将表达载体 pET28-p10 转化大肠杆菌 BL21 *plys*S, 挑取单克隆进行液体培养,并用 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 检测,在约 71 000 处出现 1 条高浓度的诱导表达条带 (图 2, 第 2 泳道),与预测的大小基本一致。



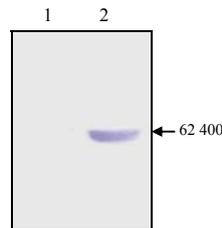
1 Marker; 2 诱导后的含 pET28-p10 的宿主菌; 3 诱导后的仅含 pET-28a+空载体的宿主菌。

图 2 SDS-PAGE 分析 p10 蛋白的原核表达

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the lysates of *E. coli* BL21 *plys*S transformed with pET28-p10 and induced by IPTG for 3 h

2.3 Western blot 检测

p10蛋白纯化后(图片未显示)制备抗血清,用其进行Western-blot检测,结果(图3)显示,按1:5000稀释的抗血清与IPTG诱导的空载体转化的细菌裂解物无任何可检测的信号(图3,第1泳道),但与相应原核表达的62400蛋白呈现出强烈的信号(图3,第2泳道),且没有其他杂带和背景,表明所制备的抗血清具有高度的特异性,可以用于SRBSDV的田间检测。



1 诱导的不含pET28-p10菌株;2 诱导表达的含pET28-p10 菌株。

图3 Western blot 分析 pET28-p10 原核表达产物

Fig.3 Analysis of p10 protein by western blot

2.4 p10 抗血清在检测 SRBSDV 中的应用

分别以采自湖南10个地区的白背飞虱为样品,并以发病症状明显的水稻植株为阳性对照,以人工饲养于实验室无毒的白背飞虱为阴性对照,利用p10抗血清,采用间接ELISA方法进行SRBSDV的检测。结果显示,单头飞虱病样汁液经10倍稀释后均可与稀释1000倍的p10抗血清产生强烈的血清学反应,表明由原核表达蛋白所制备的p10抗血清适于SRBSDV的检测。

3 讨论

笔者通过原核表达的方法获得南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)p10蛋白,并制备了特异性针对p10的抗血清^[15-17],方法较为简单可行,Western blot检测结果表明,抗血清具备很高的特异性。ELISA检测显示,该抗血清能够与采集自湖南各地的介体白背飞虱之间发生强烈的血清学反应。以人工饲养的带水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)的灰飞虱为同源对照,数据显示该样品也发生强烈的血清学反应,这可能是由于普通水稻黑条矮缩病毒病(RBSDV)S10与南方水稻黑条矮缩病毒病(SRBSDV)S10在氨基酸水平上存在较高的同源性,两者的血清学的关系较近的缘故。

参考文献:

- [1] Zhang Heng-mu, Yang Jian, Chen Jian-ping, et al. A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus[J]. Arch Virol, 2008, 153: 1893-1898.
- [2] ZHOU Guo-hui, WEN Jing-jung, CAI De-jiang, et al. Southern rice black-streaked dwarf virus: A new proposed *Fijivirus* species in the family Reoviridae [J]. Chinese Science Bulletin, 2008, 53: 3677-3685.
- [3] 湖南南方水稻黑条矮缩病发生警报[EB/OL]. http://www.Ampcn.com/news/detail/59663.asp, 2010-06-04.
- [4] 周国辉, 温锦君, 蔡德江. 呼肠孤病毒科斐济病毒属一新种: 南方水稻黑条矮缩病毒[J]. 科学通讯, 2008, 53(20): 2500-2508.
- [5] 刘万才, 刘宇, 郭荣. 南方水稻黑条矮缩病毒病发生现状以及防控对策[J]. 中国植保导刊, 2010, 30(3): 3613-3615.
- [6] Nakashima N, Koizumi M, Watanabe H, et al. Complete nucleotide sequence of the *Nilaparvata lugens* reovirus: A putative member of the genus *Fijivirus*[J]. J Gen Virol, 1996, 77: 139-146.
- [7] Hatta T, Francki R I. Morphology of Fiji disease virus[J]. Virology, 1997, 76(2): 797-807.
- [8] Soo H M, Handley J A, Maugeri M M, et al. Molecular characterization of Fiji disease *Fijivirus* genome segment 9 [J]. J Gen Virol, 1998, 79 (12): 3155-3161.
- [9] Wang Qiang, Yang Jian, Zhou Guo-hui, et al. The complete genome sequence of two isolates of Southern rice black-streaked dwarf virus, a new member of the genus *Fijivirus* [J]. J Phytopathol, 2010, 158: 733-737.
- [10] 白逢伟, 曲志才, 沈大棱, 等. 水稻黑条矮缩病毒基因组组分10 编码的外壳蛋白基因的克隆及表达[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2002, 41(2): 217-221.
- [11] 谢联辉, 林奇英, 吴祖建, 等. 中国水稻病毒病的诊断、监测和防治对策[J]. 福建农业大学学报: 自然科学版, 1994, 23 (3): 280-285.
- [12] 李春波, 钟永旺, 李毅, 等. 水稻黑条矮缩病毒第九号基因片段的克隆和表达[J]. 微生物学报, 2003, 43(3): 331-334.
- [13] 周爱萍, 韩蕾, 徐纪茹, 等. 结核杆菌DnaA 蛋白的原核表达及免疫血清的制备和检测[J]. 西安交通大学学报, 2011, 32(1): 50-53.
- [14] 徐宜为. 免疫检测技术[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1991: 158-183.
- [15] 林林, 郑红英, 陈炯, 等. 大蒜E病毒外壳蛋白基因的原核表达及抗血清制备[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 533-535.
- [16] 孙丽英, 徐佳凌, 方守国, 等. 水稻黑条矮缩病毒玉米分离物基因组S8和S9的序列分析及其原核表达[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(3): 306-311.
- [17] 羊健, 张恒木, 陈剑平, 等. 水稻黑条矮缩病毒p8蛋白的表达及抗血清的制备[J]. 植物保护学报, 2007, 34(6): 253-256.

责任编辑: 罗慧敏