

吴保为,吴家琪,胡玉洁,等. 朱顶红褪绿环斑病毒云南君子兰分离物 S 序列的克隆及分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(14):38-41.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.14.010

朱顶红褪绿环斑病毒云南君子兰 分离物 S 序列的克隆及分析

吴保为, 吴家琪, 胡玉洁, 贾志强, 高 雪, 刘雅婷

(云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201)

摘要:利用 RT-PCR 以及 ELISA 对采自云南省昆明市的君子兰样品进行鉴定,确定了其病原物为朱顶红褪绿环斑病毒(hippeastrum chlorotic ringspot virus, HCRV)。这是首次在君子兰(*Clivia miniata*)中检测到番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*)病毒,为明确其序列特征,设计了 HCRV S RNA 全序列扩增引物,进一步克隆了该分离物的 S RNA 全基因组序列,并进行了序列分析。结果表明,HCRV-CM 分离物 S RNA 全长 2 749 nt (GenBank 登录号:KY484836),与已报道的 HCRV 基因结构一致。基于核壳体蛋白 N 基因序列的系统进化分析显示 HCRV-CM 与来自云南的 HCRV 株系聚为一支,说明 HCRV-CM 与 HCRV 云南分离物亲缘关系较近。

关键词:朱顶红褪绿环斑病毒;君子兰;基因克隆;序列分析

中图分类号: S436.81 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)14-0038-03

朱顶红褪绿环斑病毒(hippeastrum chlorotic ringspot virus, HCRV)属于布尼亚病毒科(Bunyaviridae)番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*),是 2013 年在中国云南省发现的番茄斑萎病毒属新种^[1-2]。该病毒主要通过蓟马进行传播,能够系统侵染朱顶红、烟草、番茄、辣椒、蜘蛛兰等多种经济作物,引起植物出现坏死、褪绿、同心环纹等症状,危害严重^[3]。HCRV 为三分基因组,3 段单链 RNA 序列从小到大分别为 S RNA、M RNA、L RNA,其中 S RNA 序列含有 2 个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF),其正向编码 444 aa 的非结构蛋白(NSs),相关研究表明,tospoviruses 编码的 NSs 蛋白可能在病毒复制、转录、抑制 RNA 沉默中起重要作用^[4]。S RNA 反向编码 275 aa 的核壳体蛋白(N),核壳体蛋白是研究 *Tospovirus* 病毒时,普遍最先获得的病毒序列,其序列特异性极高^[5],因此,通常都是利用比对核壳体蛋白 N 基因的相似性来检测与鉴定 *Tospovirus* 的病毒^[6]。

目前,针对 HCRV 的研究较少,NCBI 等数据库中已经公布的 HCRV S RNA 全基因组序列仅有 2 个,而且其常见寄主主要集中在蜘蛛兰、番茄等植物上,本研究通过大量野外采样调查,发现了新的 HCRV 寄主——君子兰,通过对该病毒君子兰分离物的 S RNA 进行克隆,测序及序列分析,获得了 1 个完整的 HCRV S RNA 基因组序列,为进一步开展 HCRV 研究提供了理论基础。

收稿日期:2017-01-26

基金项目:国家自然科学基金(编号:31471828,31260451);国家级大学生创新项目(编号:201510676002);云南农业大学研究生创新项目(编号:2015yk16)。

作者简介:吴保为(1988—),男,湖北黄冈人,硕士,主要从事植物与病原物的互作研究。E-mail:wubaowei250@163.com。

通信作者:刘雅婷,博士,教授,主要从事植物病原微生物与寄主互作研究。E-mail:liuyating66@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

病毒样本于 2016 年 7 月 11 日采自云南省昆明市云南农业大学的君子兰叶片,保存至 -80 °C 超低温冷冻冰箱中。

1.2 试剂

TransZol Plant 试剂盒、pEASY-T1 载体、T1 感受态细胞、Fast Pfu 酶、Buffer 及 dNTP、Taq 酶、SuperMix 酶购自北京全式金生物技术有限公司;胶回收纯化试剂盒,购自北京百泰克生物技术有限公司;dATP、Marker 购自北京天根生化科技有限公司;TSWV、INSV、IYSV、WSMoV&GBNV、GRSV&TCSV 抗体,购自美国 Agdia 公司;HCRV、TZSV、CCSV、CaCV 抗体,由笔者所在课题组制备;PrimeScriptTM III 1st strand cDNA Synthesis Kit 购自 TaKaRa 公司;其他常规试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 方法

1.3.1 样本鉴定

1.3.1.1 ELISA 检测 利用笔者所在课题组构建的 ELISA 血清学鉴定体系,使用了 9 种抗体对君子兰样本进行了鉴定。其中 5 种抗体(TSWV、INSV、IYSV、WSMoV&GBNV、GRSV&TCSV)使用的是双抗夹心法(DAS-ELISA),另外 4 种抗体(HCRV、TZSV、CCSV、CaCV)使用的是间接法(ID-ELISA)。参照对应方法说明书操作。

1.3.1.2 RT-PCR 检测 RNA 提取:应用北京全式金公司的 RNA 提取试剂盒对君子兰样本进行 RNA 提取。RT-PCR:RT 使用的 TaKaRa 公司的 RT 试剂盒,PCR 使用的是北京全式金公司的 SuperMix 酶。利用 6 对特异性引物及 1 对通用引物 J13/UHP(表 1)进行 PCR 扩增。

1.3.2 RNA 提取、RT-PCR 利用 TransZol Plant 多糖多酚 RNA 提取试剂盒提取君子兰样本的总 RNA。

利用 PrimeScriptTM II 1st strand cDNA Synthesis Kit 合成样本 cDNA 的第一条链。

表1 RT-PCR检测所用引物信息

引物名称	序列(5'→3')
TSWV - NP - F	CACACTTAAGCAAGCACAAGCA
TSWV - NP - R	ACCCTAAGAAACGACTGCGC
HCRV - NP - F	CACAATAAACACACAAACA
HCRV - NP - R	CTTCCTAAGTAAACACCAT
CCSV - NP - F	TFCAACAAATGCGGCTA
CCSV - NP - R	TGCAAAGTGGCTAAAGT
TZSV - NP - F	TGGTTAAAAAGACAGATCATTGCT
TZSV - NP - R	CTACTTGCCAACATGTCTAACGTC
INSV - NP - F	CCCAAAATCAATAGTAGC
INSV - NP - R	AGGAGAACATAGTCAAGC
CaCV - NP - F	ACGGCTCGACTCACACTTCT
CaCV - NP - R	CGGGATCCATGTCTAACGTC
J13	CCCGATCCAGAGCAAT
UHP	CACTGGATCCTTTTGTTTTTGTTTTTG

病毒分离物的 S RNA 全序列的扩增引物 HCRV - S (F: 5' - AGAGCAATCGAGGTATAAACAAATAATCATACAC - 3'; R: 5' - AGAGCAATCGAGGTATAAACATAAATTCTGAAC - 3') 由笔者所在课题组利用 Primer 5.05 设计,并用 oligo 7 对设计的引物进行分析,引物序列送至铂尚生物技术有限公司进行合成。利用 FastPfu 高保真酶,以合成的 cDNA 第一条链为模板,利用引物 HCRV - S 进行 PCR 扩增。50 μ L PCR 反应体系:cDNA 1 μ L,上下游引物各 1 μ L, FastPfu 1 μ L,buffer 10 μ L, dNTP 4 μ L, ddH₂O 32 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 1 min;95 $^{\circ}$ C 20 s,50 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min;4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应完成后,取 5 μ L 产物进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 产物胶回收纯化及加 A 反应 利用 DNA 胶回收试剂盒对上一步获得的目的条带进行切胶回收,从而得到纯化过的 PCR 产物,产物 -20 $^{\circ}$ C 保存。利用 dATP、buffer、Taq 酶对纯化后的 S RNA 序列 PCR 产物进行加 A 反应。10 μ L 加 A 体系:PCR 产物 7 μ L, Taq 酶 1 μ L,buffer 1 μ L,dATP 1 μ L。加 A 反应程序:72 $^{\circ}$ C 30 min。

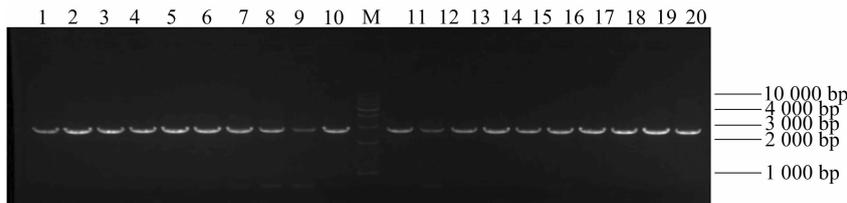


图2 HCRV-CM 分离物 S RNA 序列菌液 PCR 电泳结果

2.3 HCRV - CM 分离物 S RNA 序列分析

2.3.1 序列特征 从 NCBI 数据库中下载首个公布的 HCRV S RNA 全序列 HLS1 - 2 S RNA (GenBank 登录号:JX833564.1),利用 DNASTar 进行序列比对,本研究分离的 HCRV - CM 的 S 序列 (GenBank 登录号:KY484836) 与其一致性为 98.7% (表 2)。

2.3.2 HCRV - CM 系统进化分析 从 NCBI 数据库下载所有已公布的 HCRV 病毒的核壳蛋白 N 基因序列,与本研究获得的 N 基因序列保存在一起,通过 Mega 6.06,利用邻接法 (Neighbor - Joining, NJ) 构建基于 S RNA 序列编码的 Np 基因的系统进化树。从系统进化树可以看出,本研究获得的病毒分离物 HCRV - CM 的 Np 基因与分离自云南省的 HCRV

1.3.4 病毒分离物 S 序列的克隆和转化 将纯化并加 A 后的 PCR 产物连接到 pEASY - T1 载体上,导入到 T1 感受态细胞中,通过蓝白斑筛选挑取白色单菌落,通过菌液 PCR 筛选出阳性重组子,将 3 个阳性重组子的菌液送至铂尚生物技术有限公司进行测序。

1.3.5 病毒分离物序列处理 利用 MEGA 软件对测序公司返回的序列进行人工处理,去掉序列 2 端的载体序列,去掉序列 3' 端的 A,从而获得病毒分离物的 S RNA 全基因组序列。

1.3.6 病毒分离物 S 序列分析 利用 Mega 6.06, DNASTar, Lasergene v7.1 等序列分析软件,从序列特征、系统进化分析等方面,对获得的病毒分离物 HCRV - CM S RNA 全基因组序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 HCRV - CM 病毒分离物 S 序列 RT - PCR 扩增

以采集到的云南君子兰叶片为材料提取总 RNA, RT 获得 cDNA,以其为模板,用设计的 HCRV S 全序列扩增引物扩增出大小约为 2 749 bp 的特异性条带 (图 1)。

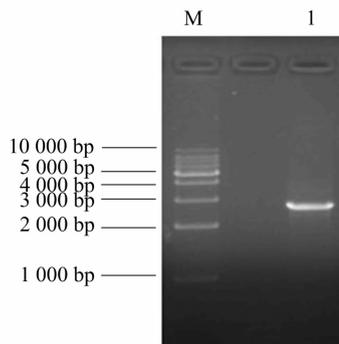


图1 HCRV-CM 分离物 S 全序列 PCR 扩增结果

2.2 HCRV - CM 分离物 S 序列克隆转化

共挑取 20 个单菌落,利用 T1 载体通用引物 M13 F/R,通过菌液 PCR 筛选阳性重组子。电泳结果显示,挑取的 20 个单菌落均为阳性重组子 (图 2)。

的 Np 基因序列聚为一支 (图 3)。

3 讨论

Tospovirus 病毒扩增迅速,近年来,该属新增的病毒不断增多,寄主范围也不断加大,根据 ICTV 公布的信息,Tospovirus 已经有 11 个确定种。云南省气候类型多样,植被资源丰富,为病毒提供了广泛的寄主条件。目前,云南已经报道了 6 种 Tospovirus 病毒,分别是番茄斑萎病毒 (tomato spotted wilt virus, TSWV)^[7]、凤仙花坏死斑病毒 (impatiens necrotic spot virus, INSV)^[8]、花生环斑病毒 (groundnut ringspot virus, GRSV)^[9]、番茄环纹斑点病毒 (tomato zonate spot virus,

表 2 HCRV - CM 与 HLS1 - 2 分离物核糖核酸和氨基酸序列一致性比对

HCRV 序列	GenBank 登录号	S RNA		5' - UTR		NSs			IGR		Np			3' - UTR	
		nt	nt (%)	nt	nt (%)	nt	nt (%)	aa (%)	nt	nt (%)	nt	nt (%)	aa (%)	nt	nt (%)
HLS1 - 2	JX833564.1	2 724		72		1 332			443		825			52	
HCRV - CM	KY484836	2 749	98.7	72	100	1 332	98.6	98.0	449	97.7	825	99.2	98.5	71	100

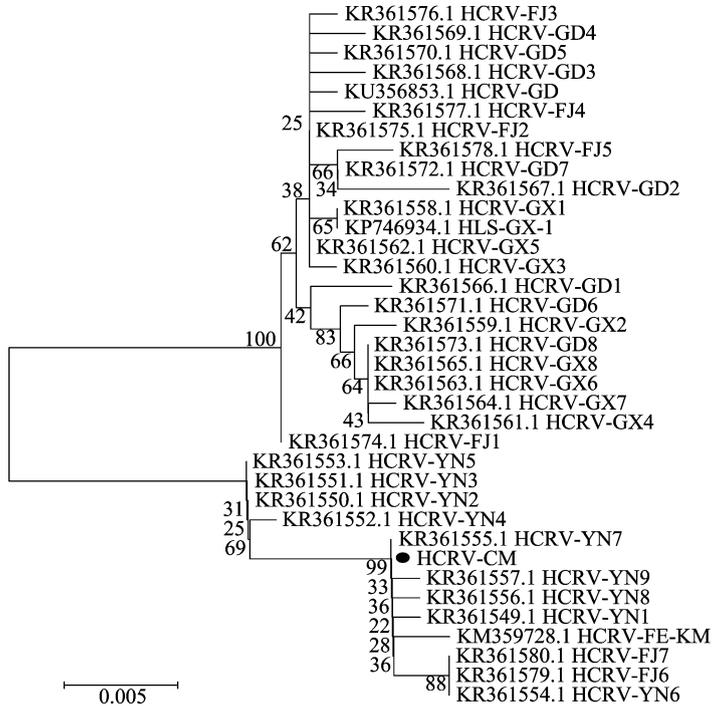


图 3 HCRV - CM 与其他 HCRV 分离物核壳蛋白基因序列系统进化树

TZSV)^[10]、马蹄莲褪绿斑病毒 (calla lily chlorotic spot virus, CCSV)^[11]、朱顶红褪绿环斑病毒 (hippeastrum chlorotic ringspot virus, HCRV)。HCRV 是 2013 年在云南省发现的 *Tospovirus* 新种,其寄主范围仅集中在几种常见的 tospoviruses 寄主中,仍有众多的植物寄主未被发现。本研究利用 RT - PCR 以及 ELISA 技术在云南农业大学校园内的君子兰上检测到该病毒,并克隆了该病毒分离物的 S RNA 全基因组序列,对其序列特征以及分类地位进行了分析,为后续进一步研究 HCRV 提供了基础。此外,研究 HCRV 寄主范围具有极其重要的意义,通过了解其寄主的扩张以及范围的增大,可以及时探究该病毒的危害。

本研究获得的 HCRV - CM 分离物表明君子兰 (*Clivia miniata*) 是 *Tospovirus* 新的寄主,HCRV - CM S RNA (GenBank 登录号:KY484836) 在序列结构上与全球首次公布的 HCRV HLS1 - 2 分离物的 S RNA 基本一致,其编码的 2 个蛋白 NSs、Np,以及非编码区、IGR 区,与 HLS1 - 2 S RNA 的一致性都在 90% 以上,仅 3'UTR 区域在碱基数目上相差较大,HCRV - CM 的 S RNA 的 3'UTR 相比 HCRV HLS1 - 2 多了 19 个碱基。在对 NCBI 数据库中已公布的 Np 序列进行系统进化分析,发现本研究分离的 HCRV - CM 株系与来自云南省的 HCRV 分离物聚为一支,来自广东、广西和福建的 HCRV 株系聚为另一支,株系明显存在按照地理进行分布的迹象。

参考文献:

[1] Dong J H, Yin Y Y, Fang Q, et al. A new tospovirus causing chlorotic

ringspot on *Hippeastrum* sp. in China [J]. *Virus Genes*, 2013, 46 (3): 567 - 570.

[2] Xu Y, Lou S G, Li X L, et al. The complete S RNA and M RNA nucleotide sequences of a hippeastrum chlorotic ringspot virus (HCRV) isolate from *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb in China [J]. *Archives of Virology*, 2013, 158 (12): 2597 - 2601.

[3] Xu Y, Lou S G, Li Q F, et al. Molecular characterization of the hippeastrum chlorotic ringspot virus L. segment and its protein [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159 (10): 2805 - 2807.

[4] 郑宛瑜,董家红,苏晓霞,等. 番茄斑萎病毒属病毒非结构蛋白 NSs 的生物信息学分析 [J]. *西南农业学报*, 2014, 27 (2): 646 - 651.

[5] 刘雅婷,李正跃,郑元仙,等. *Tospovirus* 属病毒的 ssRNA - S 链的比对分析 [C]// 中国植物病理学会 2009 年学术年会论文集. 2009.

[6] Margaria P, Ciuffo M, Pacifico D, et al. Evidence that the nonstructural protein of tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the TSW gene [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007, 20 (5): 547 - 558.

[7] Hu Z Z, Feng Z K, Zhang Z J, et al. Complete genome sequence of a tomato spotted wilt virus isolate from China and comparison to other TSWV isolates of different geographic origin [J]. *Archives of Virology*, 2011, 156 (10): 1905 - 1908.

[8] Zhang Q, Ding Y M, Li M. First report of impatiens necrotic spot virus infecting *Phalaenopsis* and *Dendrobium* orchids in Yunnan Province, China [J]. *Plant Disease*, 2010, 94 (7): 915.

[9] Ding M, Luo Y Q, Fang Q, et al. First report of groundnut yellow spot virus infecting *Capsicum annuum* in China [J]. *Journal of Plant*

张丽君,王英,张燕,等. 小分子海洋抗菌肽鲨素 I 里氏木霉表达系统构建[J]. 江苏农业科学,2018,46(14):41-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.14.011

小分子海洋抗菌肽鲨素 I 里氏木霉表达系统构建

张丽君¹, 王英², 张燕¹, 简琛¹, 金刚¹, 代建国¹

(1. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东深圳 518055; 2. 广州城市职业学院食品系, 广东广州 510405)

摘要:为实现鲨素 I 基因的高效表达,以对鲨素 I 敏感度较低的里氏木霉为宿主,构建鲨素 I 里氏木霉表达系统。根据里氏木霉偏爱密码子优化合成鲨素 I 基因,构建鲨素 I - 里氏木霉组成型表达载体 pAN - PSGT - Tac,经 PEG 介导转化至里氏木霉原生质体,PCR 法鉴定重组子基因型。基因型鉴定和基因测序检测显示,鲨素 I 基因成功重组到里氏木霉基因组 DNA 上,因此本研究成功构建了鲨素 I 里氏木霉表达系统。

关键词:抗菌肽;鲨素 I;重组载体;里氏木霉;表达系统

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)14-0041-04

阳离子抗菌肽 (antimicrobial peptide, AMP) 鲨素 I (tachypleusin I) 由 Nakamuro 等首次从中国鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 血细胞分离纯化制得^[1],分子量为 2 263 u,一级结构由 17 个氨基酸残基构成,含有 2 个二硫键;二级结构呈典型的反平行 β -折叠结构,疏水的氨基酸残基定位于平面一侧,分子中 6 个阳离子氨基酸残基主要分布在分子的尾部。鲨素 I 具有抗菌^[2]、抗真菌^[3]、抗病毒^[4]、抑制肿瘤细胞增殖和诱导癌细胞分化^[5]以及显著调控动物肠道微生物菌群^[6]的功能,极具潜在广泛的应用价值。然而,天然鲨素 I 来源非常受限,人工合成价格非常昂贵,因此基因重组制备成为规模化获取鲨素 I 的重要途径。

鲨素 I 对常见基因工程宿主的广泛和强烈的抑杀活性^[7-8]使其高效表达异常艰难,融合表达虽可降低鲨素 I 对工程宿主的抑杀活性,但因特异性蛋白酶价格昂贵和后续切割精度难以保证而无法得到有效应用。因此,从天然微生物筛选得到耐受鲨素 I 抑杀的宿主以提高鲨素 I 的表达效率值得期待。本课题组比较了鲨素 I 对大肠杆菌 (BL21)、枯草芽

孢杆菌 (WB800、BS168)、酵母菌 (GS115)、小球藻和丝状真菌里氏木霉 (QM9414) 等常见工程宿主的抑杀活性,发现丝状真菌里氏木霉对鲨素 I 的耐受能力最强^[7-8]。迄今为止,抗菌肽能否在里氏木霉中获得有效表达尚未见相关报道。本研究拟构建鲨素 I - 里氏木霉表达系统,探索鲨素 I 在此表达系统中的表达效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 里氏木霉表达载体 pAN - PSGT 和里氏木霉 (QM9414),均由深圳大学刘刚教授惠赠;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Competent Cell JM109,购自大连 TaKaRa 公司。
1.1.2 试剂 质粒快速提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒、DNA 连接试剂盒、Trizol 试剂盒和两步法 RT-PCR 试剂盒以及蛋白质 Marker,均购自 TaKaRa 公司;溶壁酶、氨苄青霉素和潮霉素,均购自 Sigma 公司;Not I、Sfi I 酶和 X-gal,均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 天然鲨素基因 (Tac) 序列的人工合成 从 GenBank 中获得鲨素 I 的碱基序列,根据丝状真菌里氏木霉偏爱密码子优化其序列;在其 5'端和 3'端分别加上 Not I 和 Sfi I 酶酶切位点,并补齐宿主中信号肽的部分序列,设计目的基因序列如下:

5' - GGCCTTCTTGCCACAGCTCGTGCTAAGTGGTGCTT-CCGCGTCTGCTACCGCGCATCTGCTACAGGCGATGTCGCTA-AGCGGCCGC - 3',该序列全长 87 bp,委托大连宝生物公司人工合成。

1.2.2 鲨素 - 里氏木霉表达载体构建 pAN - PSGT 全序列 9 710 bp,包括 Pgpd 启动子序列 (2 129 bp)、潮霉素抗性基因 *php* 序列 (1 023 bp)、终止子序列 TtrpC (770 bp)、PUC18 中从 SALI 到 ECORI 之间的序列 AP (2 648 bp)、gpd 启动子序列 (1

收稿日期:2017-02-03

基金项目:国家自然科学基金 (编号:30800793、31272474);广东省自然科学基金 (编号:S2011020005160、S2011020004453);广东省高职院校珠江学者计划 (2012);广东省高校高层次人才项目 (2012、2013);广东省广州市属高校科研计划 (编号:2012A141);广东省深圳市基础研究重点项目 (编号:JC200903180711A、JC201105201191A);深圳职业技术学院青年创新项目 (编号:2210K3070024)。

作者简介:张丽君 (1975-),女,河北石家庄人,博士,副教授,主要研究方向为抗菌肽表达。Tel: (0755)26019165;E-mail: c7zlj@szpt.edu.cn。

通信作者:代建国,博士,教授,主要研究方向抗菌肽耐药性。Tel: (0755)26019165;E-mail: jgdai@263.net。

Pathology,2007,89(2):305.

[10] Dong J H, Cheng X F, Yin Y Y, et al. Characterization of tomato zozonate spot virus, a new tospovirus in China [J]. Archives of Virology,2008,153(5):855-864.

[11] Liu Y T, Lu X P, Zhi L, et al. Calla lily chlorotic spot virus from spider lily (*Hymenocallis litteralis*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) in the South - West of China [J]. Journal of Phytopathology,2012,160(4):201-205.