

番茄斑萎病毒 N 基因克隆及其植物表达载体的构建

吴兴海^{1*}, 陈长法¹, 余冬冬¹, 王英超¹, 封立平¹, 王亚茹²

(1. 山东出入境检验检疫局, 青岛 266002; 2. 陕西师范大学, 西安 710062)

摘要: **目的** 对从云南楚雄番茄染病材料上得到病毒分离物进行鉴定, 建立病毒 N 基因植物表达载体, 以便进行抗病育种研究。**方法** 利用 RT-PCR 技术克隆得到 N 基因, 全长 777 bp, 将克隆得到的 TSWV-N 基因连接至质粒 pBI121 重组植物表达载体 pBI121-TSWV-N。**结果** TSWV-N 基因与 NCBI 上已登记的番茄斑萎病毒中国云南分离物同源性达到 97%~100%。**结论** 所分离病毒确为番茄斑萎病毒, 包含有 TSWV-N 基因的植物表达载体构建成功。

关键词: 番茄斑萎病毒; N 基因; 植物表达载体

Cloning of N gene of *Tomato spotted wilt virus* and construction of its plant expression vectors

WU Xing-Hai^{1*}, CHEN Chang-Fa¹, YU Dong-Dong¹, WANG Ying-Chao¹,
FENG Li-Ping¹, WANG Ya-Ru²

(1. Shandong Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;
2. Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

ABSTRACT: Objective To detect and identify the virus from infected tomato plants in Chuxiong, Yunnan province, and construct the recombinant plasmid with the gene N for expressing in plant. **Methods** The nucleotide sequences of nucleocapsid protein (N) gene of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) were determined by RT-PCR with the length of 777 bp. Then the cloned TSWV-N gene was connected to pBI121-TSWV-N, which was the recombinant plasmid plant expression vector of pBI121. **Results** Compared with sequences of corresponding viruses from Yunnan in China that were available in the GeneBank, the N gene of TSWV-Chuxiong shared similarity of 97%~100% at nucleotide level, were ligated into the plant expression vectors, PBI121. **Conclusion** The virus was identified as TSWV, and the recombinant plasmid was constructed successfully by restriction enzyme analysis.

KEY WORDS: *Tomato spotted wilt virus*; N gene; plant expression vector

1 引言

番茄斑萎病毒(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)广泛分布于世界各地的温带、亚热带及热带地区, 侵

染 82 科 900 多种单、双子叶植物, 危害蔬菜、花卉及多种粮食作物如番茄、辣椒、马铃薯、花生、葛芭、豌豆、烟草、菊花、银莲花、百日草、大岩桐、大丽花及仙客来等^[1-4], 对许多经济作物及庭院植物造成严

*基金项目: 山东省科技专项(2011SDH204)、国家质检总局科技计划项目(2012IK281、2013IK173、2009IK254)、山东出入境检验检疫局科技计划项目(SK201308)

Fund: Supported by Scientific Research Projects of Shandong Province (2011SDH204), Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2012IK281, 2013IK173, 2009IK254) and Scientific and Technological Project of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (SK201308)

*通讯作者: 吴兴海, 副教授, 主要研究方向为食品农产品安全检测。E-mail: wuxinghaiciq@163.com

*Corresponding author: WU Xing-Hai, Associate Professor, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: wuxinghaiciq@163.com

重损失。据报道^[5], 感染该病毒曾造成 80%的花生损失、50%~90%的莴苣死亡, 而在法国和西班牙等欧洲国家, 随着介体西花蓟马的定殖与扩散, 该病能够对番茄、辣椒及银莲花产生毁灭性危害, 损失可达 100%。目前, 番茄斑萎病毒已在我国四川、广州、云南等^[6,7]多省存在, 随着西花蓟马和番茄斑萎病毒越来越频繁地交叉侵染, 以及二者的快速变异性带来的防治困难, 该病毒已成为我国番茄生产上的重要限制因子。

番茄斑萎病毒 N 基因(TSWV-N)是指该病毒编码核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N)的核苷酸序列, 又名外壳蛋白基因(coat protein, CP), 作为保守程度较高的序列, 通常被用于进行病毒的分子生物学检测和鉴定。在防治、减少该种病毒对我国番茄及其他寄主种植业的冲击破坏上, 番茄斑萎病毒 N 基因的克隆及其植物表达载体的构建主要有两方面的意义, 一是有助于建立番茄斑萎病毒的快速检测方法, 通过及时诊断和提前介入并快速处理, 另外一方面植物表达载体的成功构建对于下一步开展抗病基因工程育种, 有效地在传播源头上遏制病毒的扩散, 在最短的时间内切断病毒传播链, 提高产量水平将具有重要的意义。

2 材料和方法

2.1 材料与试剂

染病番茄材料采自云南楚雄。大肠杆菌 DH5 α 和根癌农杆菌 EHA105 由本实验室保存; T4 DNA 载体与植物表达载体 pBI121 由本实验室保存; *Bam*H I、*Sac* I、T4-ligase 和 *Taq* 酶均购于大连宝生物工程技术有限公司; 质粒提取试剂盒购于 Omega 公司; 植物 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司; DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购于北京百泰克公司, 逆转录 DNA 第一链合成试剂盒、PCR MIX 购自北京 TIANGEN 公司。

2.2 方法

2.2.1 植物总 RNA 的提取

取染病及健康番茄叶片和果实 100 mg 左右, 利用植物 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, -80 °C 冷冻保存备用。

2.2.2 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)

引物序列: 通过比较 GenBank 中 TSWV 不同株系的核衣壳蛋白基因序列, 在保证扩增的兼并性和通用性的前提下, 在序列中挑选 TSWV 核衣壳蛋白基因(N 基因)全长序列引物, 确定其引物序列为:

TSWV-CP1: 5'-TT(G)AAGCAAGTTCTGC(T)A(C)A GTTTT-3'; TSWV-CP2: 5'-ATGTC(T)T(C)A(T)AG GTTAAGCTCACT-3'。

cDNA 的合成: 将模板 RNA 在冰上解冻, 根据逆转录试剂盒说明配制反应混合液, 将模板 RNA 加入到混合液中, 彻底混匀, 涡旋振荡时间不超过 5 s, 简短离心以收集管壁残余液体。37 °C 孵育 60 min。

PCR 反应: 扩增体系: 2 \times Buffer 12.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μ L, 上、下游引物各 1 μ L (10 pmol/ μ L), DNA 模板 1 μ L, 无菌超纯水补充至 25 μ L。

循环参数: 94 °C 预变性 1 min, 94 °C 变性 40 s; 退火温度设为: 53 °C, 时间 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 循环扩增反应 36 次; 最终延伸 10 min。

PCR 产物电泳鉴定及测序: 配制 1% 琼脂糖凝胶, 放入 TAE 电泳缓冲液的电泳槽中。用 DNA Marker 做分子标记, 在 130 V 条件下电泳 30 min, 置凝胶成像仪进行分析。将含扩增特异片段 PCR 产物送往华大基因有限公司进行测序。

2.2.3 载体的构建

将 PCR 电泳片段进行回收, 并和 T4 DNA 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 中, 提取质粒, 命名为 TSWV-N-T。*Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切 PCR 产物, 同时用两种酶双酶切 pBI121。从 2% 琼脂糖凝胶中回收纯化 pBI121 的大片段, 经连接、转化、鉴定出改造后的质粒 pBI121-TSWV-N。

2.2.4 新载体导入农杆菌

制备农杆菌 EHA105 感受态细胞, 在感受态细胞中加入重组质粒 5 μ L, 轻轻混匀, 冰浴 30 min, 液氮速冻 1 min, 迅速移至 37 °C 水浴 3 min, 加入 400 μ L LB 液体培养基, 28 °C 轻摇培养 3 h。6000 r/min 离心 5 min。弃去上清液, 重悬菌体后涂布于含 20 mg/L 利福平和 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 28 °C 黑暗倒置培养 2 d。挑取单菌落, 接种到含利福平和卡那霉素的液体 LB 培养基中, 28 °C, 150 r/min 培养 48 h, 菌液用于保存或转化。

3 结果与分析

3.1 RT-PCR 扩增及序列分析

经 RT-PCR 扩增, 得到预期大小的约 777 bp 的片段(图 1)。对含有目的片段 PCR 产物进行克隆测定, 并登录 GeneBank 进行 BLAST 检索。序列比对分析结果显示, 该分离物与 TSWV 云南分离物同源性达到

98~100%, 可编码 258 个氨基酸, 证实该 PCR 产物为 TSWV 的 N 基因。根据所测 N 基因序列, 采用 MEGA 4.0 构建了 TSWV 楚雄分离物与日本、韩国、台湾、美国、澳大利亚、德国、土耳其、新西兰、委内瑞拉及昆明、南京分离物的系统进化树, 发现楚雄分离物(已申请 NCBI 序列登记号)与日本、韩国、德国、澳大利亚分离物及国内分离物关系较近, 聚为 1 个大的分支(图 4)。

3.2 重组质粒构建的鉴定结果

PCR 方法扩增 TSWV-N 基因, 并和 T4 DNA 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 中, 提取质粒, 命名为 TSWV-N-T。将 TSWV-N-T 质粒和 pBI121 载体经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, 回收所需片段并通过 T4 连接酶连接, 构建好的连接产物转化大肠杆菌 DH5a, 经 Kan 平板筛选阳性克隆, 提取质粒 DNA 并进行酶切和 PCR 鉴定, 结果如图 2、3 所示。酶切和 PCR 均证明重组质粒的构建成功。

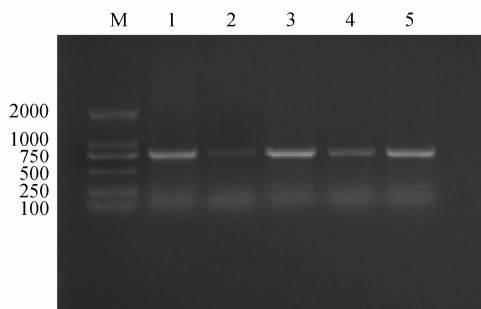


图 1 PCR 获得 TSWV-N 基因

Fig. 1 Obtained TSWV-N gene fragments via RT-PCR
M: DL2000 Marker; Lane 1~5: The product of PCR

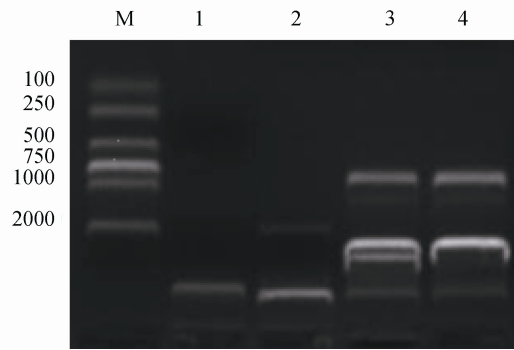


图 2 双酶切 pBI121 和 TSWV-N-T 质粒

Fig. 2 Double-enzyme digestion identification of pBI121 and TSWV-N-T gene fragment
M: DL2000; 1: pBI121; 2: products of double -enzyme digestion of pBI121; 3, 4: products of double -enzyme

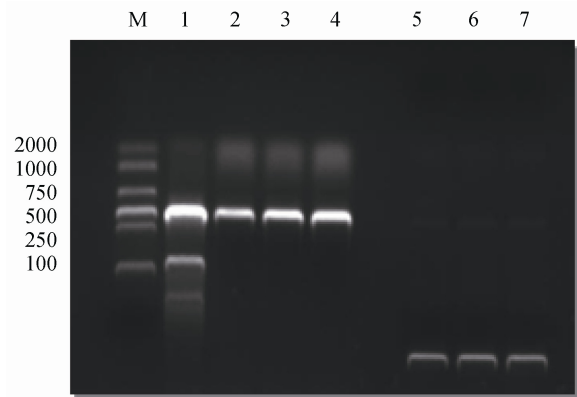


图 3 重组质粒 pBI121-TSWV-N 酶切和 PCR 鉴定

Fig. 3 Enzyme digestion and PCR identification of double -enzyme pBI121-TSWV-N the recombinant plasmid pBI121-TSWV-N

M: DL2000; 1: PCR product of TSWV-N-T; 2-4: PCR product of pBI121-TSWV-N; 5-7: product of digestion of TSWV-N-T

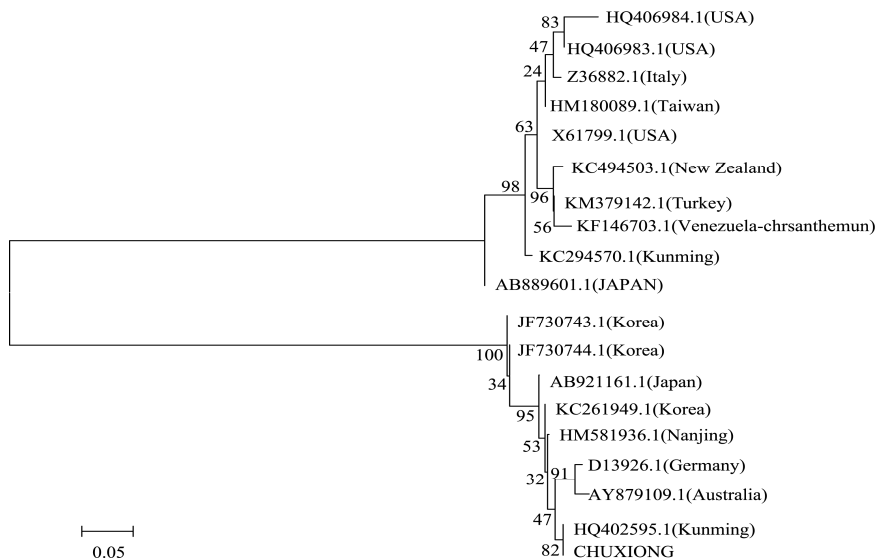


图 4 根据 TSWV N 基因构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of nucleocapsid gene sequences of Tomato Spotted Wilt Virus isolates

4 结论与讨论

国内外关于番茄斑萎病毒 N 基因克隆及序列比对分析研究开展较多^[7-9], 尹跃艳等^[7]对 21 个 TSWV 昆明分离 N 基因序列进行克隆分析, 构建系统进化树, 发现昆明分离物与韩国分离物聚为 1 支, 而在 21 个分离物中, 鬼针草分离物与其它分离物聚为不同分支。近年来, 番茄斑萎病毒以其广泛的寄主范围和造成的巨大经济损失已被列为世界危害最大的十种植物病毒之一, 是布尼亚病毒科唯一侵染植物的番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*)的病毒, 分布于世界各地, 由于传播途径广泛难以防治, 对许多作物及植物造成巨大经济损失。从 20 世纪 90 年代起, 在番茄抗病病毒基因工程的发展过程中, 我国研究者进行了很多探索与研究, 取得了一些重要的突破^[10]。汪志渊等^[11]将黄瓜花叶病毒的 CP 基因导入番茄, 其后代的田间抗病性在自然条件下, R2~R5 代转化植株的防病效果达 57%~79%。转化植株的产量比对照人工接种的高 10~60 倍, 比自然发病的增加 5 倍以上。彭宏等^[12]开展了利用 GroEL 基因和 dsRNA 介导的转基因番茄抗番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf virus, TYLCV)的研究, 构建了 TYLCV 的反向重复序列植物表达载体, 转入番茄后获得了抗病毒植株。但目前, 尚未有抗 TSWV 的转基因番茄开发研究成功的报道^[13]。本研究成功构建了用于超量表达 TSWV 外壳蛋白的过表达载体 pBI121-TSWV-N 并导入农杆菌, 为今后侵染性克隆载体的构建应用与抗番茄斑萎病毒的转基因品系的育成以及深入研究该病毒基因在番茄中的具体调控机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Parrella G, Gognalons P, Gebre-Selassie K, *et al.* An update of the host range of Tomato spotted wilt virus [J]. *J Plant Pathol*, 2003, 85: 227-264.
- [2] 许泽永, 陈冲荣, 晏立英. 几种重要花生病毒研究新进展[J]. *植物病理学报*, 2004, 34(1): 1-7.
Xu ZY, Chen KR, Yan JY. Progress on research of some major viruses infecting peanut [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2004, 34(1): 1-7.
- [3] Inoue T, Sakurai T, Sakai J. Characteristics of tomato spotted wilt virus isolates from aomori and iwate prefectures [J]. *Ann Rep Soc Plant Protect North Japan*, 2004, 55: 190-193.
- [4] 张仲凯, 方琦, 丁铭, 等. TSWV 与 TMV 复合侵染大花蕙兰的细胞病理[J]. *西南农业学报*, 2007, 增刊: 155-159.
Zhang ZK, Fang Q, Ding M, *et al.* The cytopathology of cymbidium faberi infected by both tomato spotted wilt virus and tobacco mosaic virus[J]. *Southwest China J Agr Sci*, 2007, Suppl: 155-159.
- [5] 朱秀娟, 张治军, 吕要斌. 接种番茄斑萎病毒番茄植株对西花蓟马生物学特性的影响[J]. *应用昆虫学报*, 2011, 48(3): 518-523.
Zhu XJ, Zhang ZJ, Lv YB. The effects of tomato plants inoculated by tomato spotted wilt virus on biological characteristics of western flower htrips [J]. *Chin J Appl Entomol*, 2011, 48(3): 518-523.
- [6] Dong JH, Yin YY, Xu XY, *et al.* First report of tomato spotted wilt virus in tomato and tobacco in China [J]. *J Plant Pathol*, 2010, 92(4S): 107-122.
- [7] 尹跃艳, 董家红, 徐兴阳, 等. 昆明番茄斑萎病毒不同分离物基因遗传多样性分析[J]. *西南农业学报*, 2013, 26(1): 159-162.
Yin YY, Dong JH, Xu XY. Genetic diversity of isolates of tomato spotted wilt virus in Kunming [J]. *Southwest China J Agr Sci*, 2013, 26(1): 159-162.
- [8] 邱树亮, 王孝宣, 杜永臣, 等. 番茄斑萎病毒 TSWV 的鉴定及抗病种质的筛选[J]. *园艺学报*, 2012, 39(6): 1107-1114.
Qiu SL, Wang XX, Du YY, *et al.* Identification of tomato spotted wilt virus and screening for resistant sources in tomato [J]. *Acta Horticult Sin*, 2012, 39(6): 1107-1114.
- [9] 唐前君, 孙书娥, 刘勇, 等. 番茄斑萎病毒核衣壳蛋白基因的克隆与分析[J]. *植物保护*, 2010, 36(5): 65-69.
Tang QJ, Sun S, Liu Y, *et al.* Cloning and sequence analysis of the nucleoprotein genes of Tomato spotted wilt virus isolates from Yunnan [J]. *Plant Protect*, 2010, 36(5): 65-69.
- [10] Van K, Goldbach R, Kormelink R. Tomato spotted wilt virus S-segment mRNAs have overlapping 3imds containing a predicted stem-loop structure and conserved sequence motif [J]. *Virus Res*, 2005, 110: 125-131.
- [11] 汪志渊, 吴汉章, 薛宝娣, 等. 转 CMV-CP 基因番茄后代的田间抗病性[J]. *南京农业大学学报*, 1997, 20(1): 39-42.
Wang ZY, Wu HZ, Xue B. Resistance of CMV-CP transgenic tomato to CMV in selfed progenies [J]. *J Nanjing Agr Univ*, 1997, 20(1): 39-42.
- [12] 彭宏. 利用 GroEL 基因和 dsRNA 介导的转基因番茄抗 TYLCV 的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009: 37-42.
Peng H. Groe gene and double-strand RNA mediated virus

resistance to TYLCV in tomato [D]. Nanjing: Nanjing Agr Univ, 2009: 37-42.

[13] Mehdi S, Sudhakar DW. Tomato breeding for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV): an overview of conventional and molecular approaches [J]. Czech J Genet Plant Breed, 2008, 44 (3): 83-92.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



吴兴海, 副教授, 主要研究方向为食品农产品安全检测。
E-mail: wuxinghaiciq@163.com

~~~~~

“果蔬贮藏保鲜与加工”专题征稿函

改革开放以来, 我国水果蔬菜种植业得到突飞猛进的发展, 但是, 由于长期以来我国重视采前栽培、病虫害的防治, 却忽视采后。产地基础设施和条件缺乏, 不能很好地解决产地果蔬分选、分级、清洗、预冷、冷藏运输、加工等问题, 致使果蔬在采后流通过程中的损失相当严重。另一方面, 我国果蔬产品缺少规格化、标准化管理, 年出口量和销售价格均较低。此外, 人们对果蔬的消费需求正由“数量消费”向“质量消费”转变, 即要求新鲜、方便、营养、安全的洁净果蔬商品。

鉴于此, 本刊特别策划了“果蔬贮藏保鲜与加工”专题, 由沈阳农业大学食品学院院长孟宪军教授担任专题主编, 围绕**果蔬采收与包装、果蔬贮藏保鲜技术、果蔬加工前处理、果蔬加工方法、工艺、技术、果蔬的营养与品质等**或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2015 年 3 月份出版。

本刊编辑部及孟宪军教授特邀请各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2015 年 2 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部