研 究 简 报
Research Notes

# 甘薯褪绿矮化病毒 RNase3 蛋白的原核表达及抗血清制备

秦艳红， 乔 奇， 王 爽， 张德胜， 王永江， 田雨婷， 张振臣*

（河南省农业科学院植物保护研究所，河南省农作物病虫害防治重点实验室，
农业部华北南部作物有害生物综合治理重点实验室，郑州 450002）

**摘要** 以本实验室保存的重组质粒为模板，利用 PCR 方法扩增获得了甘薯褪绿矮化病毒 SPCSV 的 RNase3 基因，RNase3 基因由 690 个核苷酸组成，编码 229 个氨基酸。将 RNase3 基因克隆到原核表达载体 pET-28a(+)，转化大肠杆菌 BL21(DE3)，经 IPTG 诱导，对诱导产物进行 SDS-PAGE 分析。结果表明，RNase3 在大肠杆菌中能高效表达，融合蛋白分子量约为 26.5 kD。以表达的融合蛋白为抗原，免疫家兔，制备了 SPCSV-RNase3 的特异性抗血清。ACP-ELISA 检测结果表明，制备的抗血清对 RNase3 融合蛋白的效价达 10 万倍。

**关键词** 甘薯褪绿矮化病毒； RNase3 基因； 原核表达； 抗血清

**中图分类号：** S 432.41 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2017298

# Prokaryotic expression of RNase3 of *Sweet potato chlorotic stunt virus* and preparation of its antiserum

QIN Yanhong， QIAO Qi， WANG Shuang， ZHANG Desheng，
WANG Yongjiang， TIAN Yuting， ZHANG Zhenchen

（*Institute of Plant Protection*，*Henan Academy of Agricultural Sciences*，*Henan Key Laboratory of Crop Pest Control*，*Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Southern Part of North China*，*Ministry of Agriculture*，*Zhengzhou* 450002，*China*）

**Abstract** With the recombinant plasmid stored in our laboratory as template，RNase3 gene of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) was amplified by PCR. The full-length RNase3 gene consists of 690 nt and encodes 229 amino acid residues. The RNase3 gene was cloned into expression vector pET-28a(+)for over-expression in prokaryotic cells. The recombinant plasmid pET-RNase3 was transformed into *Escherichia coli* strain BL21(DE3) competent cells. SDS-PAGE result showed that specific fusion protein with the molecular weight of about 26.5 kD was produced after induction by IPTG，indicating that the RNase3 fusion protein was highly expressed in prokaryotic cells. The expressed protein was purified from SDS-PAGE and the antiserum against RNase3 protein was raised in rabbit. ACP-ELISA detection indicated that the titer of RNase3 antiserum was over 1∶100000 against RNase3 fusion protein.

**Key words** *Sweet potato chlorotic stunt virus*； RNase3 gene； prokaryotic expression； antiserum

甘薯是重要的粮食作物、食品加工原料和新型能源作物。我国甘薯种植面积位居世界第一[1]。病毒病对甘薯产业造成很大影响。研究表明，我国甘薯上至少存在甘薯褪绿矮化病毒 *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV)和甘薯羽状斑驳病毒 *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV)等 20 余种病毒[2-6]。SPCSV 与 SPFMV 共同侵染可引起甘薯复合病毒病(Sweet potato virus disease，SPVD)，

**收稿日期：** 2017-08-08 **修订日期：** 2017-10-09
**基金项目：** 国家现代农业甘薯产业技术体系(CARS-10-B13)；河南省农业科学院农业科技创新项目(豫财贸[2015]131-06)；河南省农业科学院优秀青年基金(2016YQ14)；河南省自然科学基金(162300410160)；河南省重点实验室项目(132300413220)
* 通信作者 E-mail：zhangzhenchen@126.com

该病可使甘薯减产 50%～98%,甚至绝收[7]。2010 年,Qiao 等首次报道了 SPCSV 在我国发生[8]。2012 年,张振臣等首次证明我国甘薯上已发生 SPVD[9]。近年来,SPCSV 在我国的发生面积逐渐扩大,在全国范围内迅速蔓延,对甘薯的危害日趋严重,是甘薯上危害最严重的病毒之一。

SPCSV 隶属长线形病毒科 *Closteroviridae* 毛形病毒属 *Crinivirus*,基因组为两条单链正义 RNA,RNA1 编码蛋白主要参与病毒的复制,RNA2 编码蛋白主要负责病毒的包装和运输。RNA1 上编码的 RNase3 蛋白是其基因沉默抑制子,RNase3 蛋白包含一个核糖核酸内切酶结构域和一个双链 RNA 结合结构域,RNase3 可以抑制由正义 RNA 介导的 RNA 干扰(RNAi),在体外,RNase3 可以将 21、22 和 24 nt 的 siRNA 切割成 14 nt,RNase3 的核糖核酸内切酶活性对其沉默抑制活性是必需的[11]。RNase3 蛋白还能够增强 p22 蛋白的沉默抑制活性[12],研究表明,RNase3 单独即可介导 SPCSV 与 SPFMV 等其他病毒的协生作用[11]。目前,对 SPVD 致病机理方面的研究还较薄弱,关于 SPCSV 与 SPFMV 等病毒协生作用的分子机理还不十分清楚,因此,本研究针对 SPCSV 编码的 RNase3 这一重要蛋白,利用原核表达的策略,在大肠杆菌中表达了 RNase3 的融合蛋白,制备了 SPCSV RNase3 的多克隆抗体。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

大肠杆菌 JM109 和 BL21(DE3)菌株,含 RNase3 基因的重组质粒 SPCSV-RNA1-4410-8637-T[10] 和原核表达载体 pET-28a(＋)均由本实验室保存;UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、IPTG 和 SDS 等购自上海生工生物工程有限公司;质粒小量抽提试剂盒购自 Omega 生物科技公司;Ex *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准和蛋白质分子量标准等购自宝生物工程(大连)有限公司;其他常用试剂为国产分析纯。

根据本实验室测定的重组质粒序列[10],设计扩增 RNase3 基因的引物,正向引物 RNase3-*Bam* HⅠ-5F 的序列为 5′-CGTGGATCCATGATTCCGATCTTTTCTGAT-3′),与 RNase3 基因的 1－21 nt 位置对应并引入 *Bam*HⅠ酶切位点,反向引物 RNase3-*Hin*dⅢ-3R 的序列为 5′-GGCAAGCTTTCAATTCAAATTTAGAGCTTCGAC-3′,与 RNase3 的终止密码子附近序列互补并引入了 *Hin*dⅢ酶切位点,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2　方法

#### 1.2.1　SPCSV RNase3 基因的 PCR 扩增

以重组质粒 SPCSV-RNA1-4410-8637-T 为模板,以 RNase3-*Bam*HⅠ-5F 和 RNase3-*Hin*dⅢ-3R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:正、反向引物各 1 μL, 2.5 mmol/L 的 dNTP 混合物 4 μL,10× *Ex Taq* buffer 5 μL,Ex *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL,重组质粒 1 μL,$ddH_2O$ 37.5 μL。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,共 30 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,按照 Axygen 公司 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒的说明书回收目的片段。

#### 1.2.2　SPCSV RNase3 基因原核表达载体的构建及序列测定

将 1.2.1 中的胶回收产物用 *Bam*HⅠ和 *Hin*dⅢ酶切后与相应酶切的 pET-28a(＋)载体连接。将连接产物转化至大肠杆菌 JM109,提取质粒,经 PCR 扩增和酶切筛选出重组质粒,将重组质粒 pET-RNase3 送上海生工生物工程技术有限公司测序以验证阅读框架的正确性。

#### 1.2.3　SPCSV RNase3 蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将读框正确的重组质粒 pET-RNase3 及空载体 pET-28a(＋)转化大肠杆菌 BL21(DE3),挑取单菌落于 2 mL LB 培养液中(含 100 μg/mL Kan),37℃振荡培养过夜,将过夜培养的菌液按 1∶100 稀释到新鲜的 LB 培养液中(含 100 μg/mL Kan),振荡培养至 $OD_{600}$ 达到 0.6 以上,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,于 37℃继续诱导 6～8 h。取 1.5 mL 培养液,经 10 000 r/min 离心 1 min 收集菌体,用 50 μL 灭菌 $ddH_2O$ 悬浮,加入 50 μL 2×的样品缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl,10%甘油,2%SDS,5%巯基乙醇,0.1%溴酚蓝,pH 6.8),颠倒混匀后,煮沸 10 min,用 12.5%的胶进行 SDS-PAGE 分析。

#### 1.2.4　SPCSV RNase3 抗血清的制备和效价测定

1.2.3 中的原核表达产物经 SDS-PAGE 电泳后,将凝胶用预冷的染色液(0.25 mol/L KCl,1 mmol/L

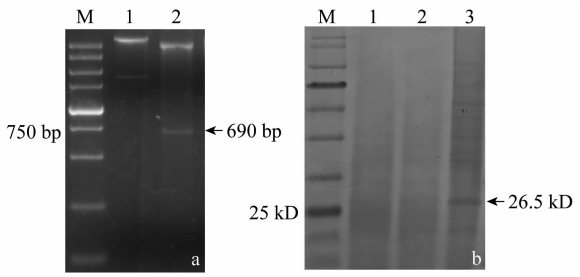
DTT)染色至条带清晰,切下所需的蛋白条带,加入等体积0.85%的生理盐水,于冰浴中研磨。12 000 r/min离心5 min,收集上清即为回收到的蛋白。利用回收的蛋白免疫家兔,经过6次免疫后,获得抗血清。利用ACP-ELISA对抗血清进行效价测定。免疫家兔等工作由郑州博赛生物技术公司协助完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 SPCSV RNase3基因原核表达载体构建及表达产物SDS-PAGE分析

利用PCR扩增获得大小约为690 bp目的条带,将目的片段割胶回收,将胶回收产物和pET-28a(+)质粒分别利用*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ酶切后进行连接,转化大肠杆菌JM109,菌液PCR验证为阳性的样品,提取质粒后再进行酶切鉴定(图1a),并送上海生工生物工程有限公司测序,证明阅读框架正确,表明原核表达载体pET-RNase3构建成功。

将pET-RNase3和pET-28a(+)分别转化至大肠杆菌BL21(DE3)中,利用IPTG诱导表达,分别以未诱导的pET-RNase3和诱导的pET-28a(+)为对照。经过SDS-PAGE分析表明,含有重组质粒的工程菌诱导后可产生大小约为26.5 kD的目的蛋白,而对照没有相应条带(图1b),表明RNase3在大肠杆菌中得到了表达。




a. M: DL5000 DNA分子量标准; 1: pET-RNase3质粒; 2: pET-RNase3质粒经*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ酶切. b. M: 蛋白质分子量标准; 1: pET-28a(+)诱导产物; 2: pET-RNase3未诱导产物; 3: pET-RNase3诱导产物
a. M: DL5000 DNA Marker; 1: Plasmid pET-RNase3; 2: pET-RNase3 digested by *Bam*HⅠ and *Hind*Ⅲ; b. M: Protein marker, 1: Product of pET-28a (+) induced with IPTG; 2: Product of pET-RNase3 without induction; 3: Product of pET-RNase 3 induced with IPTG

**图1 pET-RNase3重组质粒的酶切鉴定及表达产物的SDS-PAGE电泳分析**

**Fig. 1 Enzyme digestion of recombinant plasmid pET-RNase3 and SDS-PAGE analysis of expression products**

### 2.2 SPCSV RNase3抗血清的制备和效价测定

以纯化的重组蛋白作为抗原免疫家兔,经过6次免疫后获得了SPCSV-RNase3的抗血清,以RNase3的融合蛋白为抗原,利用ACP-ELISA对抗血清的效价进行测定,结果表明,抗血清稀释100 000倍后仍能与抗原发生阳性反应(表1)。

**表1 ACP-ELISA测定抗血清的效价[1)]**

**Table 1 The titer of antiserum tested by ACP-ELISA**

| 样品稀释倍数 Dilution multiple of sample | $OD_{405}$ 重复1 Repeat 1 | 重复2 Repeat 2 | 平均 Average | I/H | 检测结果 Detection result |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 000 | 1.552 | 1.274 | 1.413 | 1 333 | 阳性 |
| 3 000 | 1.173 | 1.140 | 1.157 | 1 076 | 阳性 |
| 5 000 | 1.028 | 0.958 | 0.993 | 913 | 阳性 |
| 10 000 | 0.925 | 0.765 | 0.845 | 765 | 阳性 |
| 30 000 | 0.791 | 0.718 | 0.755 | 674.5 | 阳性 |
| 50 000 | 0.645 | 0.618 | 0.632 | 551.5 | 阳性 |
| 100 000 | 0.606 | 0.380 | 0.494 | 413.5 | 阳性 |
| 阳性对照 Positive control | 0.569 | 0.507 | 0.538 | 458 | 阳性 |
| 阴性对照 Negative control | 0.082 | 0.080 | 0.081 | 1 | 阴性 |
| 空白对照 Blank control | 0.080 | 0.080 | 0.080 | — | — |

1) $OD_{405}$=在405 nm的光吸收值;I/H=(样品平均吸光值-空白对照平均吸光值)/(健康对照平均吸光值-空白对照平均吸光值)。$OD_{405}$=Absorption value at 405 nm wavelength; I/H=(average absorption value of sample - average absorption value of blank control)/(average absorption value of healthy control - average absorption value of blank control).

## 3 讨论

研究表明,SPCSV可以与多种甘薯病毒发生协生作用,使甘薯的症状加重,其他病毒的含量增加[13-16],RNase3介导了这一过程。表达植物病毒蛋白最常见的就是大肠杆菌表达体系,它具有产量高、成本低、生产周期短、表达稳定等优点,本研究利用原核表达的方法制备了SPCSV-RNase3蛋白的抗血清,该抗血清对RNase3融合蛋白的效价可达100 000以上,可以用于RNase3融合蛋白的检测。

利用纯化的重组蛋白制备多克隆抗体,是目前抗体研究中普遍采用的一种方法,制备的抗体可以用于内源蛋白的表达水平分析、蛋白质的体外互作分析、免疫胶体金定位分析等试验[17]。因此,下一步可以通过Western blot技术利用制备的特异性抗体对RNase3在甘薯不同部位的分布和表达量的差异开展研究;另外,还可以通过酵母双杂交技术筛选与SPCSV-RNase3互作的其他协生病毒蛋白或寄主因子,将表达的融合蛋白应用于RNase3蛋白与其他蛋白的体外互作验证。本研究为后续SPCSV

的致病机理研究提供了材料，为探索新的抗病毒策略奠定基础。

## 参考文献


[1] MA D, LI H M, TANG J, et al. Current status and future prospects of development of sweet potato industry in China [C]// Sweet Potato in Food and Energy Security: Proceedings of China Xuzhou 4th International Sweet Potato Symposium & 4th China-Japan-Korea Sweet Potato Workshop. Xuzhou, China, 2010: 3 - 10.

[2] 乔奇，张振臣，张德胜，等. 中国甘薯病毒种类的血清学和分子检测[J]. 植物病理学报，2012，42(1)：10 - 16.

[3] QIN Y H, LI X C, ZHANG Z C, et al. First report of sweet potato badnavirus A in China [J]. Plant Disease, 2016, 100(4): 865.

[4] WANG Y J, ZHANG D S, ZHANG Z C, et al. First report on *Sweet potato symptomless virus* 1(genus *Mastrevirus*, family *Geminiviridae*) in sweetpotato in China [J]. Plant Disease, 2015, 99(7): 1042.

[5] 李学成，乔奇，秦艳红，等. 甘薯杆状 DNA 病毒 B 的分子检测及外壳蛋白 CP 基因的原核表达[J]. 植物保护学报，2016，43(2)：345 - 346.

[6] QIN Y H, LI X C, ZHANG Z C, et al. First report of *Sweet potato leaf curl Georgia virus* on sweet potato in China[J]. Plant Disease, 2013, 97(10): 1388.

[7] GUTIÉRREZ D L, FUENTES S, SALAZAR L F. Sweet potato virus disease (SPVD): distribution, incidence, and effect on sweet potato yield in Peru [J]. Plant Disease, 2003, 87(3): 297 - 302.

[8] QIAO Q, ZHANG Z C, QIN Y H, et al. First report of *Sweet potato chlorotic stunt virus* infecting sweet potato in China [J]. Plant Disease, 2011, 95(3): 356.

[9] 张振臣，乔奇，秦艳红，等. 我国发现由甘薯褪绿矮化病毒和甘薯羽状斑驳病毒协生共侵染引起的甘薯病毒病害[J]. 植物病理学报，2012，42(3)：328 - 333.

[10] QIN Y H, WANG L, ZHANG Z C, et al. Complete genomic sequence and comparative analysis of the genome segments of *Sweet potato chlorotic stunt virus* in China [J]. PLoS ONE, 2014, 9(8): e106323.

[11] CUELLAR W J, KREUZE J F, RAJAMÄKI M L, et al. Elimination of antiviral defense by viral RNase III [J]. PNAS, 2009, 106(25): 10354 - 10358.

[12] KREUZE J F, SAVENKOV E I, CUELLAR W J, et al. Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing [J]. Journal of Virology, 2005, 79(11): 7227 - 7238.

[13] KARYEIJA R F, KREUZE J F, Gibson R W. Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem limited crinivirus in sweet potato plants [J]. Virology, 2000, 269(1): 26 - 36.

[14] UNTIVEROS M, FUENTES S, SALAZAR L F. Synergistic interaction of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (*Crinivirus*) with carla-, cucumo-, ipomo-, and potyviruses infecting sweet potato [J]. Plant Disease, 2007, 91(6): 669 - 676.

[15] CUELLAR W J, DE SOUZA J, BARRANTES I, et al. Distinct cavemoviruses interact synergistically with *Sweet potato chlorotic stunt virus* (genus *Crinivirus*) in cultivated sweet potato [J]. Journal of General Virology, 2011, 92: 1233 - 1243.

[16] CUELLAR W J, GALVEZ M, FUENTES S, et al. Synergistic interaction of begomoviruses with *Sweet potato chlorotic stunt virus* (genus *Crinivirus*) in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) [J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(5): 459 - 471.

[17] 何龙，羊健，张松柏，等. 水稻 CSN5B 蛋白抗血清的制备及其应用[J]. 生物技术通讯，2016，27(4)：525 - 528.


（责任编辑：杨明丽）

（上接 137 页）


[15] HUNTER W B, ULLMAN DE. Anatomy and ultrastructure of the piercing-sucking mouthparts and paraglossal sensilla of *Frankiniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) [J]. International Journal of Insect Morphology and Embryology, 1992, 21(1): 17 - 35.

[16] FOSTER S, GOODMAN L J, DUCHETT J G. Ultrastructure of sensory receptors on the labium of the rice brown planthopper [J]. Cell and Tissue Research, 1983, 230: 353 - 56.

[17] 孟春梅，郑华，李卫东，等. 果蝇的透射电镜制样方法研究[J]. 电子显微学报，2016，35(4)：365 - 368.

[18] 赵杰军，陈晓鸣，王自力，等. 白蜡虫若虫口器超微结构特征与生态适应性[J]. 动物学研究，2012，33(5)：447 - 454.

[19] 付丙鲜. 灰飞虱触角感觉器的形态、神经结构与发育[D]. 杭州：浙江大学，2012：1 - 110.

[20] 陈柏林，洛向玉，王萃. 玻璃刀制备木材超薄切片的研究[J]. 东北林业大学学报，1996，24(3)：84 - 89.

[21] 张善干，马淑芳，付宏兰，等. 马尾松毛虫雄蛾触角毛状感受器的细微结构[J]. 昆虫学报，1995，38(1)：8 - 12.

[22] BUSCHBECK E K, FRIEDRICH M. Evolution of insect eyes: Tales of ancient heritage, deconstruction, reconstruction, remodeling, and recycling [J]. Evolution: Education and Outreach, 2008, 1(4): 448 - 462.

[23] CHEN Qingxiao, LI Tao, HUA Baozhen. Ultrastructure of the larval eye of the scorpionfly *Panorpa dubia* (Mecoptera: Panorpidae) with implications for the evolutionary origin of holometabolous larvae [J]. Journal of Morphology, 2012, 273: 561 - 571.

[24] CHEN Qingxiao, WEI Yao, HUA Baozhen. Ultrastructural comparison of the compound eyes of *Sinopanorpa* and *Panorpa* (Mecoptera: Panorpidae) [J]. Micron, 2012, 43(8): 893 - 901.

[25] FISCHER C, MAHNER M, WACHMANN E. The rhabdom structure in the ommatidia of the Heteroptera (Insecta), and its phylogenetic significance [J]. Zoomorphology, 2000, 120(1): 1 - 13.

[26] 李剑平. 扫描电子显微镜对样品的要求及样品的制备[J]. 分析测试技术与仪器，2007，13(1)：74 - 77.

[27] 郝宏京，毛同林，李克斌. 肌肉样品在制备过程中不同温度对其反差的影响[J]. 电子显微学报，2002，21(5)：830 - 831.


（责任编辑：杨明丽）