

柑橘黄龙病菌亚洲种菌毛装配蛋白基因(PAP)序列分析、原核表达及抗血清制备

李宾宾^{1,2}, 余乃通^{2*}, 杨毅³, 王健华², 张秀春², 刘志昕^{2*}

(1. 海南大学热带农林学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南省微生物学重点实验室/农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口 571101; 3. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海口 571101)

摘要 菌毛装配蛋白(Flp pilus assembly protein, PAP)是一种分泌蛋白,参与细菌菌毛的组装,表达量高。本研究以感染柑橘黄龙病的海南琼海市绿橙叶片为材料提取总DNA,用其菌毛装配蛋白基因(PAP)的特异引物进行PCR扩增,获得该基因的目的片段,序列分析表明海南琼海柑橘黄龙病菌PAP基因与柑橘黄龙病菌亚洲种(GenBank登录号:CP001677.5)PAP基因序列一致。功能预测表明它含有两个与分泌功能相关的CpaC和Secretin结构域。PCR产物通过EcoRV和Xho I双酶切构建重组载体pET32a-PAP。将pET32a-PAP载体转化BL21(DE3)大肠杆菌,经终浓度为1 mmol/L IPTG诱导,目的蛋白主要以包涵体形式表达。目的蛋白经Ni²⁺-NTA层析柱纯化,并作为抗原腹腔免疫小白鼠,获得效价在1:500~1:1 000的多克隆抗血清。Western blot分析表明,PAP多克隆抗血清特异性强;以田间样品总蛋白做抗原时,能特异性检测染病样品。本研究为PAP蛋白功能研究和开发柑橘黄龙病菌的蛋白检测产品提供研究基础。

关键词 柑橘黄龙病; 基因表达; PAP蛋白; 抗血清制备

中图分类号: S 436.66 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018367

Cloning and prokaryotic expression of Flp pilus assembly protein gene (PAP) from *Candidatus Liberibacter asiaticus* and preparation of antiserum against PAP

LI Binbin^{1,2}, YU Naitong², YANG Yi³, WANG Jianhua², ZHANG Xiuchun², LIU Zhixin²

(1. Institute of Tropical Agricultural and Forestry, Hainan University, Haikou 570228 China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of Microbiology/Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou 571101, China; 3. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract Flp pilus assembly protein (PAP) is a secreted protein involved in the assembly of bacterial pili with high-level expression. The total DNA was extracted from the HLB-infected green orange leaves collected from Qionghai city, Hainan province, China. The target fragment of PAP gene was obtained by PCR amplification with specific primers. Sequence analysis showed that the PAP gene is identical with the PAP gene of the *Candidatus Liberibacter asiaticus* (GenBank accession number: CP001677.5). Function prediction of PAP indicated that it contains two domains associated with secretory function, CpaC and Secretin. PCR products were digested by EcoRV and Xho I restriction enzyme and cloned into vector pET32a. The recombinant pET32a-PAP vector was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and PAP was expressed in the form of inclusion bodies under induction by 1 mmol/L IPTG. The PAP fusion protein was purified by Ni²⁺-NTA column and used as an antigen. The mice were immunized intraperitoneally to obtain polyclonal antiserum and the titer was 1:500–1:1 000. Western

收稿日期: 2018-08-22

修订日期: 2018-10-01

基金项目: 海南省重大科技计划项目(ZDKJ2017003);中国热带作物学会青年人才托举工程(CSTC-QN201704)

* 通信作者 E-mail: yunaitong@163.com, liuzhixin@itbb.org.cn

blotting further analysis showed that PAP polyclonal antiserum was specific to PAP protein, which is applicable to field samples detection by ELISA. This study provides a research basis for the function study of PAP protein and the development of protein detection products for HLB.

Key words citrus Huanglongbing; gene expression; PAP protein; antiserum preparation

柑橘黄龙病 citrus Huanglongbing (HLB) 是柑橘类作物一种毁灭性病害, 严重威胁着世界各地柑橘类作物的生产^[1-2]。目前该病害已相继在亚洲、非洲、大洋洲和美洲的 50 多个国家和地区报道, 给柑橘产业造成巨大的经济损失^[1, 3]。中国 19 个柑橘主产区已有 11 个遭受到 HLB 危害^[4]。近年来, 随着海南绿橙等柑橘类产业的快速发展, 柑橘黄龙病也随之而来并快速传播^[5]。柑橘黄龙病的病原是一种专性寄生于植物韧皮部的革兰氏阴性菌, 属韧皮部杆菌属 *Candidatus Liberibacter*, 主要由亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* 和非洲柑橘木虱 *Trioza erythrae* 传播^[6]。目前已报道的有 3 个种, 即亚洲种 *Candidatus Liberibacter asiaticus*、非洲种 *Candidatus Liberibacter africanus* 和美洲种 *Candidatus Liberibacter americanus*^[7]。

细菌分泌蛋白在其侵染宿主, 引起宿主病变等方面起到重要作用^[8-9]。革兰氏阴性菌含有 8 个不同类型 (types I ~ types VIII) 的蛋白分泌系统^[11], 柑橘黄龙病菌含有完整的类型 I 蛋白分泌系统和不完美的类型 III 和类型 IV 蛋白分泌系统^[12]。

前期, 我们从感染 HLB 的海南绿橙中筛选出表达量较高的两个分泌蛋白, 其中 PAP 蛋白 (Flp pilus assembly protein) 与菌毛组装有关^[13]。本研究从感染 HLB 的海南绿橙中扩增出 PAP 蛋白基因, 序列分析表明, PAP 基因与柑橘黄龙病菌亚洲种 (GenBank 登录号: CP001677. 5) 的 PAP 基因序列一致^[14]。对该蛋白进行原核表达及抗血清制备, 得到了特异性强的 PAP 抗血清, 工作效价在 1:500~1:1 000 之间。以田间样品总蛋白做抗原时, 能特异性检测染病样品。本研究制备的 PAP 多抗血清为 PAP 蛋白的功能研究和开发柑橘黄龙病菌的蛋白检测产品提供重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

感染柑橘黄龙病的绿橙叶片采自海南省琼海市, -80℃ 保存; pET32a 载体由本实验室保存; *Escherichia coli* BL21 (DE3) 菌株购自北京全式金

生物技术有限公司; *EcoRV* 和 *Xho I* 购自大连宝生物公司; HS™ MIX 购自东盛生物公司; 植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; BCIP/NBT 底物显色试剂盒、氨苄青霉素 (ampicillin)、isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)、丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷 (tris)、植物蛋白提取试剂盒购自 Solarbio 公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS)、甘氨酸、考马斯亮蓝 R-250 均购自海南爱斯科坦生物公司; PCR 产物回收试剂盒购自 Omega 公司; 碱性磷酸酯酶 (AP) 标记山羊抗小鼠 IgG 购自 Biosharp 生物公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG 购自碧云天生物技术公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据柑橘黄龙病菌 PAP 分泌蛋白基因 (GenBank 登录号: CP001677. 5) 编码区核苷酸序列和 pET32a 载体多克隆酶切位点设计一对特异性引物, PAP-F (5'-CCG GAT ATC TTG CAT CGT AAG CGC CAA AGA G-3', 下划线为 *EcoRV* 酶切位点) 和 PAP-R (5'-CCG CTC GAG TCC TGA CGG GAG GAG AGG AGG-3', 下划线为 *Xho I* 酶切位点), 由深圳华大基因股份有限公司 (BGD) 合成。

1.2.2 总 DNA 的提取及 PAP 基因的克隆

以感染 HLB 的绿橙叶片为材料, 参照天根植物基因组 DNA 提取试剂盒操作说明书提取总 DNA, 用引物 PAP-F 和 PAP-R 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为: DNA 模板 2 μL, 正反引物各 2 μL (10 μmol/L), dNTPs 4 μL, 5×Taq Buffer 10 μL, Taq DNA polymerase 1 μL, 加 ddH₂O 到 50 μL。PCR 程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min 40 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 pET32a-PAP 表达载体的构建

利用 Omega 公司的胶回收试剂盒对 PAP 基因片段进行回收, 将回收的 PAP 基因产物和 pET32a 载体同时进行 *EcoRV* 和 *Xho I* 双酶切, 经 T4 DNA 连接酶将 PAP 基因连接到 pET32a 载体上, 转化大

肠杆菌 DH 5 α 菌株,涂布于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄(Amp)的固体 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜培养进行抗性筛选。挑取平板上的单克隆菌落,利用 PAP-F 和 PAP-R 引物进行菌液 PCR 鉴定,随机选取 3 个片段大小正确的单克隆菌落送往赛默飞世尔科技(中国)有限公司进行双向测序。对测序正确的单克隆菌落提取重组载体,进行双酶切验证。将经过测序和双酶切验证的重组载体命名为 pET32a-PAP。

1.2.4 PAP 蛋白的诱导表达及可溶性分析

对测序正确的重组载体转化 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株,挑取单克隆菌落接种到液体 LB 培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp),37 $^{\circ}\text{C}$ 于 200 r/min 培养过夜。以 1:50 的比例将过夜培养的菌液接种到 150 mL 液体 LB 培养基中(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp),37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 条件下培养,待菌液 OD₆₀₀ 达到 0.6~1.0,加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L,继续培养 6 h。12 000 r/min 离心 5 min,沉淀溶于 15 mL 的 1 $\times$ PBS 缓冲液中,超声波破碎 20 min(连续循环工作 4 s,停止 8 s);12 000 r/min 离心 5 min,将沉淀溶于含 8 mol/L 尿素的 15 mL Lysis buffer 中,然后分别取上清和溶解的沉淀 10 μL 与等量体积的 2 $\times$ SDS loading buffer 混合,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳(90 V, 2 h)。

1.2.5 融合蛋白的纯化

用含 8 mol/L 尿素的 15 mL Lysis buffer 溶解超声波破碎后的沉淀,8 000 r/min 离心除去不溶性物质,上清过 0.45 μm 滤膜,然后通过 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱进行纯化,经 washing buffer 溶液洗去杂蛋白后,用不同浓度的咪唑(50、100、150、200、250 mmol/L)洗脱液进行洗脱,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳检测。将纯化后的蛋白于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.6 抗血清的制备

取纯化后溶于 150 mmol/L 咪唑的 PAP 蛋白溶液 20 μL 与 80 μL 1 $\times$ PBS 缓冲液混合,再与 100 μL 弗氏不完全佐剂混匀,腹腔免疫小白鼠 1 次;而后每隔 7 d 腹腔免疫小白鼠 1 次,共 4 次(使用弗氏完全佐剂)。最后 1 次免疫 4 d 后,对小白鼠进行眼球取血,室温放置 30 min 后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。5 000 r/min 离心 10 min,取上层血清,分装后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。同时,使用 1 $\times$ PBS 缓冲液作为对照免疫小白鼠,即对照血清。

1.2.7 抗体效价检测及特异性检测

使用间接 ELISA 法测定 PAP 多抗血清的效价^[15]。将获得 PAP 多抗血清分别按 1:500、1:1 000、1:5 000、1:10 000、1:50 000、1:100 000 的比例进行稀释。将纯化后的 PAP 蛋白(用包被液 1:1 000 稀释)100 μL 加入到 96 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;1 $\times$ PBST 缓冲液洗涤 3 次,加入 200 μL 的 1% BSA 封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;重复洗涤 3 次,加入 100 μL 稀释后的血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;重复洗涤 3 次后加入 100 μL HRP 标记的羊抗小鼠 IgG (1:3 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;重复洗涤 3 次,随后加入 100 μL TMB 底物显色液,避光条件显色 15 min,最后加入 50 μL 的浓盐酸终止反应,使用酶标仪测定 OD₄₅₀。

取纯化后溶于 150 mmol/L 咪唑的 PAP 蛋白溶液 20 μL 与等量体积的 2 $\times$ SDS loading buffer 混合,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min 变性,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后,将蛋白凝胶和硝酸纤维素膜(NC 膜)预先用转膜液浸泡 5 min,放入半干转膜仪中,电流 1 A 转膜 25 min。转膜完成后用 1 $\times$ TBST 缓冲液清洗 NC 膜 3 次;5%脱脂奶粉封闭液进行封闭 2 h;1 $\times$ TBST 缓冲液清洗 3 次后置于 PAP 多抗血清(1:1 000)孵育 1 h;1 $\times$ TBST 缓冲液清洗 3 次,将其置于碱性磷酸酯酶(AP)标记山羊抗小鼠 IgG 稀释液(1:2 000)孵育 30 min;1 $\times$ TBST 缓冲液清洗 3 次,最后使用 BCIP/NBT 显色试剂盒显色,拍照保存。

采用 Solarbio 公司植物蛋白提取试剂盒提取感染 HLB 的绿橙和对照样品蛋白。将提取的蛋白稀释 1 000 倍(1:1 000)和 2 000 倍(1:2 000)作为抗原,以 1:1 000 稀释的 PAP 多抗血清为一抗,按照上述方法,进行 ELISA 检测。

2 结果与分析

2.1 PAP 基因的克隆及其序列分析

以感染 HLB 的绿橙总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到大小为 1 400 bp 左右,与目的基因大小一致的 DNA 条带(图 1a)。测序结果经 NCBI BLASTn 分析表明,该基因为柑橘黄龙病菌的 PAP 分泌蛋白基因,与 Duan 等^[14]报道的柑橘黄龙病菌亚洲种(GenBank 登录号:CP001677.5)的 PAP 基因序列一致,大小为 1 425 bp,编码 474 个氨基酸,分子量大小为 51.76 kD。

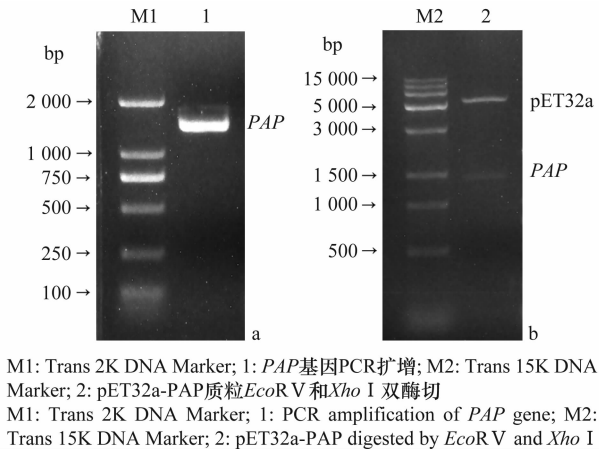


图 1 PAP 基因扩增及 pET32a-PAP 质粒酶切验证

Fig. 1 Amplification of PAP gene and pET32a-PAP double digestion

氨基酸比对分析表明,本研究获得的 PAP 蛋白与柑橘黄龙病菌亚洲种的 PAP 蛋白同源性在 99.5%~100%;与番茄、辣椒和胡萝卜等分离的黄龙病新种(*Candidatus Liberibacter solanacearum*)的 PAP 蛋白同源性在 68.4%~70.1%;与柑橘黄龙病菌非洲种的 PAP 蛋白同源性在 66.6%;与柑橘黄龙病菌美洲种的 PAP 蛋白同源性在 45.8%~46.8%(图 2)。NCBI 保守结构域(NCBI conserved domain)预测分析表明,本研究获得的 PAP 蛋白含有 2 个高度可信的与分泌功能相关的结构域,即 CpaC 结构域(AA₂₂₋₄₇₄)和 Secretin 结构域(AA₂₆₂₋₄₁₉);另外,该蛋白还预测含有 2 个可能结构域(可信度不高,有待进一步确认),即 type_II_gsp 结构域(AA₁₉₄₋₄₂₈)和 IV 结构域(AA₂₃₂₋₄₂₀)(图 3)。

2.2 原核表达载体的构建

测序结果表明,3 个单克隆菌中的 PAP 基因插入片段大小正确,碱基无缺失、突变发生,且编码框无移位。双酶切验证如图 1b 所示,特异性获得酶切后的 PAP 基因和 pET32a 载体片段。将经过测序和双酶切验证的重组载体命名为 pET32a-PAP,作为后续原核表达的重组质粒。

2.3 PAP 蛋白的原核表达及可溶性分析

将 pET32a-PAP 重组载体转化 BL21 (DE3)表达菌,挑取转化平板上的单克隆菌落接种到含氨苄的 LB 液体培养基进行诱导表达,分离上清和沉淀进行可溶性分析。12% SDS-PAGE 凝胶电泳表明,与未诱导的重组菌相比,经 1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后的重组菌在分子量大小约 70 kD 处,出现一条

清晰的蛋白条带(图 4a),与预测的 PAP 融合蛋白 70.73 kD 大小基本一致,即 PAP 融合蛋白。可溶性分析结果表明,PAP 目的蛋白主要以沉淀形式(包涵体)表达(图 4b)。

2.4 融合蛋白纯化

由于 PAP 融合蛋白含有 His 标签,可经过 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱纯化。将含有 PAP 融合蛋白的包涵体沉淀溶解,用不同咪唑浓度的洗脱液洗脱纯化,最后用 SDS×PAGE 分析该蛋白在不同咪唑浓度洗脱液中的分布情况。结果如图 5 所示,经 50 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱后,Ni²⁺-NTA 亲和层析柱上的杂蛋白可除去大部分;再经 100 mmol/L 和 150 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱后,大部分 PAP 融合蛋白从 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱中洗脱下来,而在 200 mmol/L 和 250 mmol/L 咪唑的洗脱液中分布很少。由此可见,经不同咪唑浓度的洗脱液洗脱后,PAP 融合蛋白主要分布在 100 mmol/L 和 150 mmol/L 咪唑的洗脱液中,且在 150 mmol/L 咪唑的洗脱液中浓度更高,于-20℃保存,备用。

2.5 PAP 多抗血清效价及特异性

以纯化后的 PAP 融合蛋白(1:1 000 稀释)为抗原,对不同 PAP 多抗血清进行稀释,通过 ELISA 方法对 PAP 多抗血清进行效价测定。结果(图 6)表明,与对照血清相比,PAP 多抗血清在稀释 500 倍和 1 000 倍时,PAP 多抗血清呈明显的阳性反应(判断标准为 PAP PcAb 的 OD₄₅₀/PBS PcAb 的 OD₄₅₀>2.1);而 PAP 多抗血清在稀释 5 000 倍以上均无阳性反应。Western blot 结果分析表明,PAP 多抗血清能与纯化后的融合蛋白起特异性反应,无其他明显杂带(图 7)。田间样品 ELISA 检测结果显示,PAP 多抗血清能特异性区分染病绿橙和对照样品(表 1)。

表 1 田间样品 ELISA 检测¹⁾

Table 1 ELISA detection of field samples

蛋白提取液稀释倍数 Diluted protein extract	450 nm 吸光度 OD ₄₅₀ value	
	绿橙病样 Infected sample	对照样品 Control sample
1:1 000	3.283	0.261
	3.227	0.276
	3.399	0.280
1:2 000	3.301	0.269
	3.232	0.278
	3.319	0.271

1) 染病样品 OD₄₅₀/对照样品 OD₄₅₀>2.1。
Infected sample OD₄₅₀/control sample OD₄₅₀>2.1.

WP_015452435	RYLQRIFFTMMSIFSSNPSVAKLPPIKEAN	AAVINSDVETKGRKISTGLNKVITLQVVDQVLSDPDKADVVHSPRTMYLFGKRVGQANVIL	: 101
WP_031934866	RYLQRIFFTMMSIFSSNPSVAKLPPIKEAN	AAVINSDVETKGRKISTGLNKVITLQVVDQVLSDPDKADVVHSPRTMYLFGKRVGQANVIL	: 101
WP_103846919	KNFKQILMLFVIFSSNPLLAQSKLVGAKN	ASTTHGDSALTSGKINILGKRVILHPSRQDVLSDPDKADVVHSSKTYVIFGKSVGQANVIL	: 101
WP_034442505	KNFKQILMLFVIFSSNPLLAQSKLVGAKN	ASTTHGDSALTSGKINILGKRVILHPSRQDVLSDPDKADVVHSSKTYVIFGKSVGQANVIL	: 101
WP_013461548	KNFKQILMLFVIFSSNPLLAQSKLVGAKN	ASTTHGDSALTSGKINILGKRVILHPSRQDVLSDPDKADVVHSSKTYVIFGKSVGQANVIL	: 101
WP_076969131	KNFKQILMLFVIFSSNPLLAQSKLVGAKN	ASTTHGDSALTSGKINILGKRVILHPSRQDVLSDPDKADVVHSSKTYVIFGKSVGQANVIL	: 101
WP_047264076	KYFLRLIFTLSIFSPFDSLVAFLPPIDGKN	MYVINSYADIKSKRSVGLNKVILRPSVQDVLSDPDKADVVHSSKTYVIFGKIDQGANVIL	: 101
PTL86496	INLQRIFVVLVVFIFITSLRLREYANSVGLKNKSAVIRKQVSVLVEPLSDVLSVDPKMSKJYSVNTYVIFGKIDQGANVIL		: 106
AGA65276	MGIFFLQADNFYNNK	SVIRVRLSEIRDRANISGLYRALVITFPDDQVLSVDPKADVVTRSSIMTYLFGKRVGQANVIL	: 82
WP_081583181	MNSLRQIFNIRIFISAFYILGIFPQADNFYNNK	SVIRVRLSEIRDRANISGLYRALVITFPDDQVLSVDPKADVVTRSSIMTYLFGKRVGQANVIL	: 104
AHA27599	MLPSSLSKPLSNSSV	VEKPIVIRKESLQTNKRTITGLDAVILLEPLDSDVLSVDPKMSKJYSVNTYVIFGKIDQGANVIL	: 89
WP_007556848	INILQRIFVVFIFLPSSLSKPLSNSSV	VEKPIVIRKESLQTNKRTITGLDAVILLEPLDSDVLSVDPKMSKJYSVNTYVIFGKIDQGANVIL	: 101
WP_113216453	MFKTSNKAGHSALALFAPSAPGLPLDLPAPFLRTSQAFASGDSITVITAGCTKRMKRLGNALVVDLPADAHILVSDPKMADATRTISRTYVIFGKIDQGANVIL		: 110
WP_015452435	IGHDGKQMLNDLIERDIAHLEMTLRRFIADSNIREMVSITVVLGAVRTIQDSQRAVELSETIFSQSGR	NQYANSSS-KKVMNLLNLAGD	: 194
WP_031934866	IGHDGKQMLNDLIERDIAHLEMTLRRFIADSNIREMVSITVVLGAVRTIQDSQRAVELSETIFSQSGR	NQYANSSS-KKVMNLLNLAGD	: 194
WP_103846919	IGHDGKQLNDLIERDINLEMTLRRFISGNSHIVEMLSQNLVLGIGVRTIQDSQRAVELSNMFSNDRN	NLYNKATSGSKVINLLNLAGD	: 195
WP_034442505	IGHDGKQLNDLIERDINLEMTLRRFISGNSHIVEMLSQNLVLGIGVRTIQDSQRAVELSNMFSNDRN	NLYNKATSGSKVINLLNLAGD	: 195
WP_013461548	IGHDGKQLNDLIERDINLEMTLRRFISGNSHIVEMLSQNLVLGIGVRTIQDSQRAVELSNMFSNDRN	NLYNKATSGSKVINLLNLAGD	: 194
WP_076969131	IGHDGKQLNDLIERDINLEMTLRRFISGNSHIVEMLSQNLVLGIGVRTIQDSQRAVELSNMFSNDRN	NLYNKATSGSKVINLLNLAGD	: 195
WP_047264076	IGHDGKQLNDLITVEHDVYLBAFLRRFIPDSKINIREMVSITVVLGAVRTIQDSQRAVELAETVFAKHRSV	NNIGNHNRSQVINLLNLAGD	: 198
PTL86496	IGHDGKQLNDLITVEHDVYLBAFLRRFIPDSKINIREMVSITVVLGAVRTIQDSQRAVELAETVFAKHRSV	NNIGNHNRSQVINLLNLAGD	: 198
AGA65276	FGANGKLLNMVRIERDIGNBANLRRFIPDSNISTEIVSDIVLIGVRTIQDSQRAVELANAFIKGGEATTQASAGQS	LSLQEDRRVSTVNNLLLEGD	: 186
WP_081583181	FGANGKLLNMVRIERDIGNBANLRRFIPDSNISTEIVSDIVLIGVRTIQDSQRAVELANAFIKGGEATTQASAGQS	LSLQEDRRVSTVNNLLLEGD	: 208
AHA27599	FGDKKQLNLEVNIERDAYTLQNNLRRFIPDSNISTEIVSDIVLIGVRTIQDSQRAVELANAFIKGGEATTQASAGQS	MLKVECS	: 170
WP_007556848	FGDKKQLNLEVNIERDAYTLQNNLRRFIPDSNISTEIVSDIVLIGVRTIQDSQRAVELANAFIKGGEATTQASAGQS	MLKVECS	: 182
WP_113216453	FGDKKQLNLEVNIERDAYTLQNNLRRFIPDSNISTEIVSDIVLIGVRTIQDSQRAVELANAFIKGGEATTQASAGQS	MLKVECS	: 220
WP_015452435	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSKRFAADFGGKFVSEG	GDPSIKGVLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 299
WP_031934866	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSKRFAADFGGKFVSEG	GDPSIKGVLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 299
WP_103846919	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSKRFAADFGGKFVSEG	GDPSIKGVLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 299
WP_034442505	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSKRFAADFGGKFVSEG	GDPSIKGVLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 298
WP_013461548	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSKRFAADFGGKFVSEG	GDPSIKGVLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 297
WP_076969131	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSTGT-QFGGSLGAQG	ADFAITLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 296
WP_047264076	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSTGT-QFGGSLGAQG	ADFAITLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 300
PTL86496	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSTGT-QFGGSLGAQG	ADFAITLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 296
AGA65276	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSTGT-QFGGSLGAQG	ADFAITLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 296
WP_081583181	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSTGT-QFGGSLGAQG	ADFAITLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 318
AHA27599	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSTGT-QFGGSLGAQG	ADFAITLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 276
WP_007556848	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSTGT-QFGGSLGAQG	ADFAITLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 288
WP_113216453	QVTLKVTIAEVRDLKQIQFQHSITGSGSPSTGT-QFGGSLGAQG	ADFAITLDRFSEINLHILERTAIRTLAEPTLTAISGASPSFGGHLKIVS	: 328
WP_015452435	SSTGATSVTHDYGVLHFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 406
WP_031934866	SSTGATSVTHDYGVLHFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 406
WP_103846919	VNGTSTIPHDYGVLHFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 404
WP_034442505	VNGTSTIPHDYGVLHFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 404
WP_013461548	VNGTSTIPHDYGVLHFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 403
WP_076969131	VNGTSTIPHDYGVLHFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 402
WP_047264076	RNGVANSSHKYGVSLFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 406
PTL86496	KQGGSTFTEQYGVLDFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 402
AGA65276	KNGTINQIFREGVGLHFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 405
WP_081583181	KNGTINQIFREGVGLHFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 427
AHA27599	SNGKPSIQSHKYGVSLFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 379
WP_007556848	SNGKPSIQSHKYGVSLFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 391
WP_113216453	KQGGSTFTEQYGVLDFTPTVLSVPRIGRLRIQTEVSEPIGVNAGDM	SYTRRADITVELPSGGTINLAGLKDDIQQKRGVPLSKIPILGALFRNSFRRE	: 433
WP_015452435	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	identity	: 474
WP_031934866	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	99.5%	: 474
WP_103846919	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	70.1%	: 472
WP_034442505	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	69.6%	: 472
WP_013461548	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	69.2%	: 471
WP_076969131	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	68.4%	: 471
WP_047264076	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	66.6%	: 472
PTL86496	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	54.3%	: 470
AGA65276	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	48.4%	: 473
WP_081583181	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	46.5%	: 495
AHA27599	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	45.8%	: 477
WP_007556848	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	46.8%	: 459
WP_113216453	ETEHTIATPVLKPVAMRDLSPDDNYEDAKAFLFNVRNKIYQPIAESEVQGNKYKIGFIYK	501.42.1%	: 501

WP_015452435.1, WP_031934866.1为*Candidatus Liberibacter asiaticus*类型II/Ⅲ分泌系统蛋白; WP_103846919.1, WP_034442505.1, WP_013461548.1, WP_076969131.1为*Ca. Liberibacter solanacearum*类型II/Ⅲ分泌系统蛋白; WP_047264076.1为*Ca. Liberibacter africanus*类型II/Ⅲ分泌系统蛋白; PTL86496.1为*Ca. Liberibacter europaeus*菌毛装配蛋白CpaC; AGA65276.1为*Liberibacter crescens* BT-1类型II/Ⅳ分泌系统分泌的RcpA/CpaC蛋白; WP_081583181.1为*Liberibacter crescens*类型II/Ⅲ分泌系统蛋白; AHA27599.1为*Ca. Liberibacter americanus* str. Sao Paulo Flp菌毛组装蛋白CpaC; WP_007556848.1为*Ca. Liberibacter americanus*类型II/Ⅲ分泌系统蛋白; WP_113216453.1为*Rhizobiales bacterium*类型II/Ⅲ分泌系统蛋白

WP_015452435.1, WP_031934866.1: Type II/Ⅲ secretion system proteins from *Candidatus Liberibacter asiaticus*; WP_103846919.1, WP_034442505.1, WP_013461548.1, WP_076969131.1: Type II/Ⅲ secretion system proteins from *Ca. Liberibacter solanacearum*; WP_047264076.1: Type II/Ⅲ secretion system protein from *Ca. Liberibacter africanus*; PTL86496.1: Pilus assembly protein CpaC from *Ca. Liberibacter europaeus*; AGA65276.1: Type II/Ⅳ secretion system secretin RcpA/CpaC, Flp pilus assembly from *Liberibacter crescens* BT-1; WP_081583181.1: Type II/Ⅲ secretion system protein from *Liberibacter crescens*; AHA27599.1: Flp pilus assembly protein CpaC from *Ca. Liberibacter americanus* str. Sao Paulo; WP_007556848.1: Type II/Ⅲ secretion system protein from *Ca. Liberibacter americanus*; WP_113216453.1: Type II/Ⅲ secretion system protein from *Rhizobiales bacterium*

图2 柑橘黄龙病菌 PAP 同源蛋白的多重序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment of *Candidatus Liberibacter asiaticus* PAP and selected homologous proteins

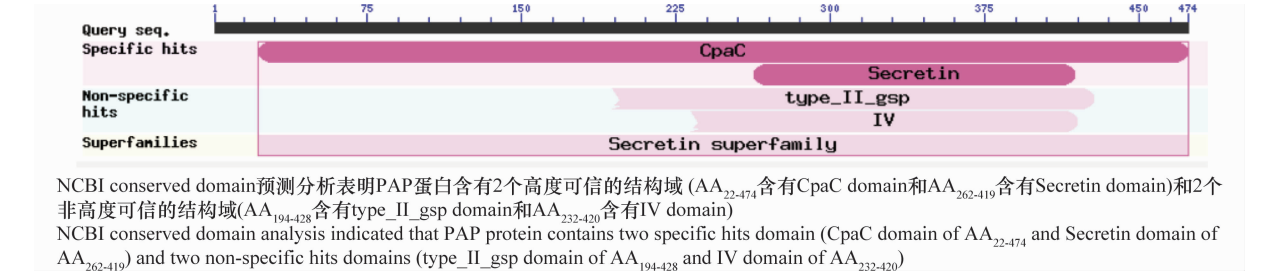


图 3 柑橘黄龙病菌 PAP 蛋白结构域预测

Fig. 3 Domain prediction of *Candidatus Liberibacter asiaticus* PAP protein

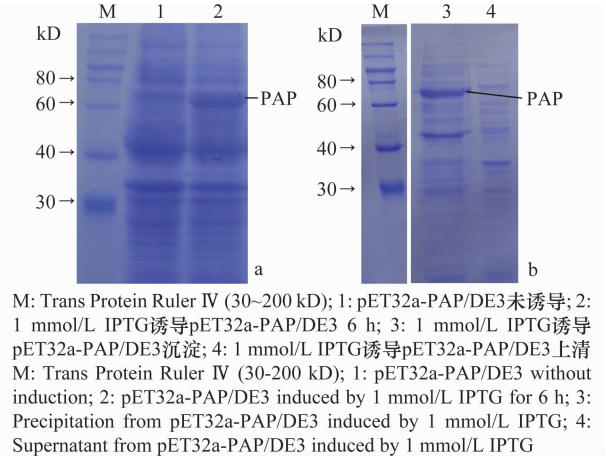


图 4 PAP 融合蛋白的原核表达及可溶性分析

Fig. 4 Prokaryotic expression and solubility analysis of PAP fusion protein

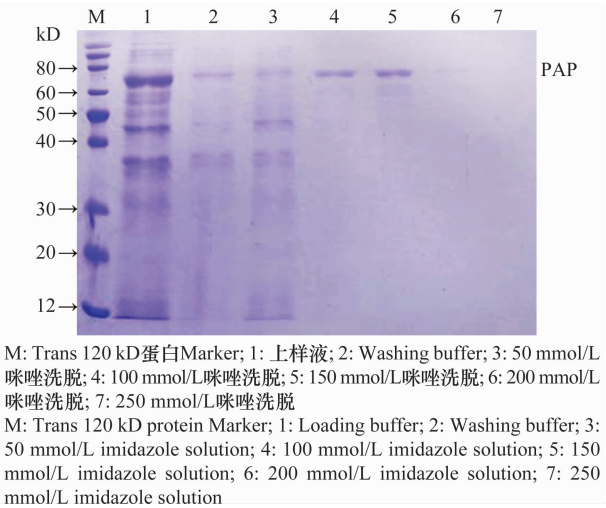


图 5 不同浓度咪唑溶液对 PAP 融合蛋白的洗脱

Fig. 5 PAP fusion protein purification by different concentrations of imidazole solution

3 讨论

前期,Li 等通过 PCR,qPCR 和 RT-qPCR 的方法从感染 HLB 的海南绿橙样品中筛选出 2 个表达量高的柑橘黄龙病菌分泌蛋白,408 和 PAP。这两

个蛋白均参与菌毛的组装^[13]。将 PAP 蛋白基因构建到 GV1300 植物双向表达载体,通过农杆菌注射烟草进行瞬时表达,共聚焦显微镜观察表明,在烟草保卫细胞的微纤维丝观察到绿色荧光,说明 PAP 蛋白可能与调控保卫细胞的宿主蛋白相互作用,帮助病原菌穿过保卫细胞以达到入侵植株的目的。但是,柑橘黄龙病菌具体的侵染过程和机理有待进一步研究。

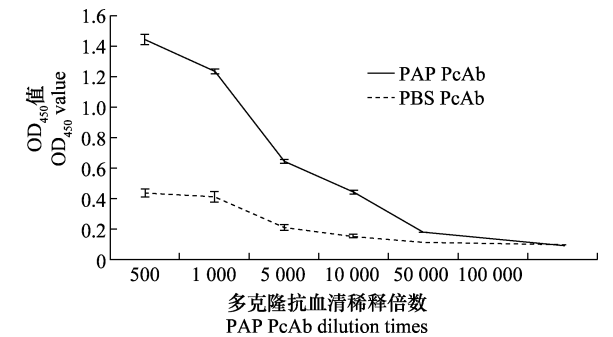


图 6 PAP 多抗血清效价检测

Fig. 6 Titer detection of PAP antiserum

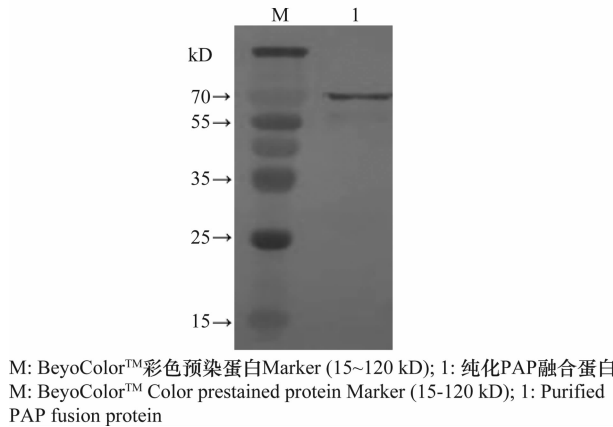


图 7 Western blot 检测 PAP 抗体的特异性

Fig. 7 Specificity test of PAP polyclonal antibody by Western blot

目前,柑橘黄龙病的有效检测方法包括 PCR^[16]、环介导等温扩增技术(LAMP)^[17]、荧光定量

PCR^[18]、重组酶聚合酶扩增方法(RPA)^[19]等诊断技术。虽然柑橘黄龙病菌相关蛋白基因的单克隆和多克隆制备已有报道^[12, 20-22],但是目前尚无商业化的蛋白检测产品。PAP蛋白是柑橘黄龙病菌的分泌蛋白,是菌毛蛋白的重要组成成分,它的含量是病菌含量的几千甚至是几万倍以上。本研究使用该蛋白进行抗体制备,不但丰富了制备HLB蛋白检测产品的选择,同时使用该蛋白制备的单克隆抗体或多克隆抗体产品具有更高的效价和灵敏度。

柑橘黄龙病病菌根据病原的传播媒介、序列特征和热敏性等可分为亚洲种、非洲种和美洲种。根据PAP蛋白基因的序列分析,感染海南绿橙的柑橘黄龙病菌为亚洲种,与我国其他地区柑橘类作物上报道的柑橘黄龙病菌属于一个种。因此,使用本研究制备的抗体不但能用于海南绿橙黄龙病的检测,也可用于我国其他柑橘类黄龙病的检测。

参考文献

- [1] ARREDONDO V R, DELGADO ORTIZ J C, BELTRÁN B M, et al. A review of techniques for detecting Huanglongbing (greening) in citrus [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2016, 62(10): 803–811.
- [2] CEVALLOS-CEVALLOS J M, FUTCH D B, SHILTS T, et al. GC-MS metabolomic differentiation of selected citrus varieties with different sensitivity to citrus Huanglongbing [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 53(4): 69–76.
- [3] DA G J, DOUHAN G W, HALBERT S E, et al. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2016, 58(4): 373–387.
- [4] 谭锦. 中国柑橘黄龙病病原菌原噬菌体遗传多样性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [5] WU Xuhui, MENG Chunliang, WANG Guihua, et al. Rapid and quantitative detection of citrus Huanglongbing bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' by real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification assay in China [J]. Physiological & Molecular Plant Pathology, 2016, 94: 1–7.
- [6] GOTTFWALD T R, GRAÇA J V D, BASSANEZI R B. Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact [J]. Plant Health Progress, 2007: 0906–01.
- [7] BOVÉ J M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus [J]. Journal of Plant Pathology, 2006, 88(1): 7–37.
- [8] ABBY S S, CURY J, GUGLIELMINI J, et al. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes [J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6: 1–21.

- [9] GUGLIELMINI J, NÉRON B, ABBY S S, et al. Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(9): 5715–5727.
- [10] CLARK K, FRANCO J Y, SCHWIZER S, et al. An effector from the Huanglongbing-associated pathogen targets citrus proteases [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1718.
- [11] COSTA T R, FELISBERTO-RODRIGUES C, MEIR A, et al. Secretion systems in gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights [J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(6): 343–359.
- [12] 侯卫真. 柑橘黄龙病 Serralysin 蛋白的表达纯化及两种重要病原的分子检测[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [13] 李宾宾, 杨毅, 刘志昕, 等. 柑橘黄龙病菌(*Candidatus Liberibacter asiaticus*)分泌蛋白基因 DNA 含量及其 RNA 表达量关系分析 [C]//中国植物病理学会 2018 年学术年会论文集. 2018.
- [14] DUAN Yongping, ZHOU Lijuan, HALL D G, et al. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, 22(8): 1011–1020.
- [15] 余乃通, 冯团诚, 王健华, 等. 香蕉束顶病毒海口分离物 Rep 基因的克隆、原核表达、抗血清制备及检测[J]. 植物保护, 2011, 37(4): 38–43.
- [16] LI Wenbin, HARTUNG J S, LEVY L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(1): 104–115.
- [17] OKUDA M, MATSUMOTO M, TANAKA Y, et al. Characterization of the *tufB-secE-nusGrplKAJL-rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification [J]. Plant Disease, 2007, 89(7): 705–711.
- [18] ARRATIA-CASTRO A A, SANTOS-CERVANTES M E, ARCELEAL Á P, et al. Detection and quantification of '*Candidatus Phytoplasma asteris*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' at early and late stages of Huanglongbing disease development [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2016, 38(4): 411–421.
- [19] QIAN Wenjuan, LU Ying, MENG Youqing, et al. Field detection of citrus Huanglongbing associated with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' by recombinase polymerase amplification within 15 min [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(22): 5473–5480.
- [20] 高玉霞. 柑橘黄龙病 PCR 检测引物比较及其外膜蛋白抗体的研制[D]. 赣州: 赣南师范学院, 2015.
- [21] YUAN Qing, JORDAN R, BRLANSKY R H, et al. Development of single chain variable fragment (scFv) antibodies against surface proteins of '*Ca. Liberibacter asiaticus*' [J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 122: 1–7.
- [22] LIU Huawei, ATTA S, HARTUNG J S. Characterization and purification of proteins suitable for the production of antibodies against '*Ca. Liberibacter asiaticus*' [J]. Protein Expression & Purification, 2017, 139(5): 36–42.