

泡桐丛枝植原体 pPaWB_{Ny}-2-ORF4 编码蛋白的 抗体制备和表达分析

耿显胜, 田国忠, 任争光, 宋传生, 林彩丽*

(中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091)

摘要:以感病泡桐组培苗提取的 DNA 为模板, 采用 PCR 方法扩增 pPaWB_{Ny}-2-ORF4 的部分片段。将目的片段克隆到原核表达载体 pGEX-4T-3, 重组质粒 pGEX-p2ORF4 转化大肠杆菌 Rosseta (DE3) 菌株。IPTG 诱导表达, 分子量约为 38 kDa 的含 GST 标签的融合蛋白得到表达。切胶回收目的蛋白, 免疫大白兔制备抗血清。间接 ELISA 测定抗血清的效价约为 1:4 096, 免疫印迹实验显示: 抗血清能够与原核表达的 GST 融合蛋白发生特异的免疫反应, 与 pPaWB_{Ny}-1-ORF5 的原核表达蛋白无明显的交叉反应。利用制备的抗血清, 在感病泡桐饲毒的茶翅蜡中检测到分子量约为 18 kDa 的蛋白条带, 而在无菌茶翅蜡和感病泡桐组培苗中均未检测到, 表明 pPaWB_{Ny}-2-ORF4 在饲毒的茶翅蜡中表达, 而在感病泡桐组培苗中未表达或表达量低于检测水平。据此推测, 该基因参与茶翅蜡传播泡桐丛枝植原体。

关键词:茶翅蜡; 多克隆抗体; 昆虫传播; 植原体
中图分类号:S718.8 **文献标识码:**A

Preparation of the Polyclonal Antibody Against pPaWB_{Ny}-2-ORF4 of Paulownia Witches' -broom Phytoplasma and Its Expression Analysis

GENG Xian-sheng, TIAN Guo-zhong, REN Zheng-guang, SONG Chuan-sheng, LIN Cai-li

(Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: The pPaWB_{Ny}-2-ORF4 was amplified from genome DNA extracted from infected paulownia plantlets by PCR. The amplified DNA fragments were inserted into the prokaryotic expression vector pGEX-4T-3. The recombinant plasmid pGEX-p2ORF4 was transformed into the *Escherichia coli* Rosseta (DE3) strain. The 38 kDa GST-tagged p2ORF4 fusion protein was expressed efficiently in *E. coli* Rosseta (DE3) induced by IPTG. The fusion protein was purified and injected into a rabbit to raise antiserum. The titer of the antiserum was 1:4 096 determined by indirect ELISA. Western blot analysis showed that the obtained polyclonal antibody could react with GST-tagged p2ORF4 protein but had no reaction with pPaWB_{Ny}-1-ORF5 protein expressed in *E. coli*. Western blot analysis also revealed a specific 18 kDa protein band in *Halyomorpha halys* (Stål) exposure to PaWB-infected paulownia, but not in non-infected *H. halys* and PaWB-infected paulownia. It was inferred that pPaWB_{Ny}-2-ORF4 might be involved in the transmission of *H. halys*.

Key words: *Halyomorpha halys* (Stål); polyclonal antibody; insect transmission; phytoplasma

收稿日期: 2013-03-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目“泡桐丛枝植原体质粒蛋白 p23 及寄主互作蛋白功能研究”(3117062)

作者简介: 耿显胜(1982—), 男, 河南信阳人, 博士, 主要从事森林保护方面的工作。

* 通讯作者: 助理研究员, 主要从事植物病原分子互作。Tel: 010-62889284. E-mail: lincl@caf.ac.cn

植原体是一类缺乏细胞壁的植物病原细菌,它造成世界范围内 700 多种植物的病害^[1]。由植原体引起的泡桐丛枝病(*paulownia witches' -broom*, PaWB)在我国分布广泛,为害严重。据调查,全国丛枝病发生面积达 88 万 hm^2 ,每年造成直接经济损失超过 1 亿元。泡桐丛枝病造成苗木死亡,幼树树体生长减弱,成年树木的胸径、树高、材积生长量降低^[2],该病也会导致泡桐木材抗变形能力明显下降和木材力学强度的降低^[3]。植原体主要通过无性繁殖材料的嫁接和繁殖、通过寄生植物造成的侵染植物与非侵染植物间的微管束连接以及通过韧皮部取食的刺吸式口器的昆虫(叶蝉、蜡象、飞虱和木虱等)传播。植原体在介体昆虫中一般以增殖型持续性的方式传播^[4-5],传播植原体的介体多数属于叶蝉科(*Cicadellidae*)、菱蜡蝉科(*Cixiidae*)、木虱科(*Psyllidae*)、飞虱科(*Delphacidae*)、袖蜡蝉科(*Derbidae*)、Menoplidae 和蛾蜡蝉科(*Flatidae*),而目前发现的多于 75% 的传毒介体种属于叶蝉科的角顶叶蝉亚科(*Deltocephalinae*)^[6]。目前报道的传播泡桐丛枝植原体的介体昆虫是蜡科的茶翅蜡(*Halyomorpha halys* (Stål))^[7-9]、盲蜡科的烟草盲蜡(*Cryptopeltis tenuis* (Reuter))^[9]和叶蝉科的小绿叶蝉(*Empoasca flavescens* (Fabricius))^[10-11],而对于这些介体昆虫传播泡桐丛枝植原体的分子机制还缺乏研究。

植物病原细菌的质粒基因通常涉及致病性或寄主专化性^[12],在细菌的生活史中发挥重要的功能。植原体质粒基因与介体昆虫传播有关的报道包括:三叶草绿变植原体中一个 4.8 kb 染色质外 DNA^[13],翠菊黄化丛枝植原体潜在可移动单元 PMU1 中的 *SAP36*^[14],洋葱黄化植原体株系 OY-M 质粒基因 ORF3^[15]。Lin 等^[16]从泡桐丛枝植原体南阳株系中克隆到 2 个质粒,同源性分析发现,pPaWB_{Ny}-1-ORF5 (简称 p1ORF5) 和 pPaWB_{Ny}-2-ORF4 (简称 p2ORF4) 都与 OY-M 植原体质粒上的虫传相关基因 ORF3 具有很高的同源性。本文以感病泡桐组培苗为材料,利用 PCR 扩增了 p2ORF4 基因,制备了抗 p2ORF4 编码蛋白的抗血清。利用制备的抗血清对原核表达的融合蛋白、感病泡桐组培苗提取的蛋白和饲毒茶翅蜡提取的蛋白进行免疫印迹试验,分析了 p2ORF4 在不同材料中的表达情况。本研究将为泡桐丛枝植原体与介体昆虫的分子互作研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

pGEX-4T-3 原核表达载体、含 pET28a-ORF5-5 的大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosseta (DE3) 菌株、健康和感染泡桐丛枝植原体南阳株系的泡桐组培苗由中国林科院森林生态环境与保护研究所植物病理实验室保存。雄性大白兔由中国农业大学养殖场提供,大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 Rosetta (DE3) 菌株购于博迈德生物公司。

质粒提取试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒、2 \times PCR Mix、蛋白质 Marker 和 DNA 分子量标准购于天根生化科技有限公司。限制性内切酶购于大连宝生物有限公司。植物材料 DNA 提取试剂盒、蓝色预染蛋白质 Marker 和 BCIP/NBT 显色试剂盒购自博迈德公司。碱性磷酸酶标记的蛋白 A 购于 Sigma 公司。设计的引物由赛百盛有限公司合成。DNA 序列测定由华大基因有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 p2ORF4 的生物信息学分析 p2ORF4 (GenBank 登录号: EF426473) 编码蛋白使用 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测其分子量和等电点;使用 SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) 进行氨基酸跨膜结构预测;使用 DNAMAN 6.0 软件对 p2ORF4 和 p1ORF5 编码蛋白的氨基酸序列进行比对;GenBank 下载植原体的虫传相关基因,使用 MEGA4.1 软件进行系统发育分析,采用邻位相连法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树。

1.2.2 泡桐组培苗总 DNA 提取和 p2ORF4 的扩增 以泡桐丛枝植原体南阳株系感染的泡桐组培苗为材料,使用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。根据 p2ORF4 序列设计用于特异性 PCR 扩增引物。引物序列为(下划线部分为添加的酶切位点): p2ORF4F-*Bam*H I 5'-GCC GGA TCC TTT AAA TCA ATT CAA GAT AAA AAT A-3', p2ORF4R-*Sal* I 5' - CTG GTC GAC TGT TAG AAC TAA ACA GCC AAT AAC -3'。以提取的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 扩增的产物使用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.2.3 p2ORF4 编码蛋白的原核表达 纯化的 PCR 扩增产物和原核表达载体 pGEX-4T-3 分别使用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切,双酶切的产物纯化后使用 Solution I (pMD-18T Simple 试剂盒)在 12 $^{\circ}\text{C}$ 下连接

过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。PCR 检测阳性的克隆送华大基因公司测序,测序验证重组子,序列正确的重组子命名为 pGEX-p2ORF4。

分别取重组质粒 pGEX-p2ORF4 和空载体 pGEX-4T-3,转化大肠杆菌 Rosseta (DE3) 感受态细胞。PCR 筛选的重组子按照 1:100 分别接种到含氨苄青霉素 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和氯霉素 ($34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 LB 液体培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇菌 2.0、2.5、3.0、3.5 h。添加 IPTG 到终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 诱导 5 h。收集菌液 2~3 mL,使用 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 蛋白质提取液提取细菌总蛋白。取 $15 \text{ } \mu\text{L}$ 提取的蛋白在 15% 的 SDS-PAGE 凝胶上电泳分析蛋白质诱导表达情况,扫描仪扫描染色后的 SDS-PAGE 凝胶。

1.2.4 表达产物的纯化和抗体的制备 提取的总蛋白 SDS-PAGE 电泳后,凝胶在蒸馏水中漂洗 2 min,用预冷的染色液 ($0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT) 染色至条带清楚,切下目的条带,加入适量的预冷 0.85% 的生理盐水,在洁净的 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的研钵中研碎, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置过夜。用移液器吸取研磨物到 1.5 mL 离心管中, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,上清即为纯化的融合蛋白。

纯化的融合蛋白溶液与等体积的弗氏不完全佐剂混匀并免疫大白兔,免疫时采用皮下多点注射结合肌肉注射的方法进行。首次免疫之前耳静脉取血 1 mL ,用于阴性对照。第 4 次注射之后 10 d,颈动脉一次性采血。血液在室温下温育 2 h 后, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,上清即为抗血清。

1.2.5 多克隆抗体鉴定

1.2.5.1 免疫印迹鉴定 诱导表达后提取的细菌总蛋白经 SDS-PAGE 分离后转移 PVDF 膜,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下封闭过夜或 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下封闭 1 h。TBST 洗膜 10 min,重复 3 次。加入用 TBST 稀释制备的多克隆抗体 (1:500), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下摇床上温育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。用碱性磷酸酶标记的蛋白质 A (1:2 500 稀释) 孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。BCIP/NBT 显色试剂盒显色 5~15 min,待蛋白膜上条带呈色明显且无明显背景的时候,把膜浸入水中漂洗,停止反应。

含重组质粒 pET28a-ORF5-5 的菌液诱导表达并提取蛋白作为抗原,使用本研究制备的抗血清进行免疫试验,验证 p1ORF5 编码蛋白是否与抗 p2ORF4

编码蛋白的抗体发生交叉反应。试验方法同上一段描述。

1.2.5.2 免疫印迹鉴定 原核表达的融合蛋白切胶纯化,使用核酸仪定量之后,用碳酸盐包被液 ($15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 , $35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 , $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaN_3 ; pH 值 9.6) 稀释成 $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,采用间接 ELISA 实验测定效价,参照林彩丽^[17] 的实验方法。实验中以免疫前兔子血清为阴性对照血清,以制备的抗血清为阳性抗血清。阴性和阳性抗血清用封闭液按 $2^8 \sim 2^{17}$ 倍比稀释,每个浓度的阳性抗血清重复 3 次。酶标仪上测定 OD_{405} 读数,与阴性对照孔 OD 值的比值 $\text{P}/\text{N} \geq 2.1$ 作为判断阳性或确定效价的临界点。

1.2.6 茶翅蟥和感病泡桐组培苗中 p2ORF4 基因的表达分析 于 2012 年 10 月 8 日至 10 月 16 日,在河南省南阳市潦河镇泡桐人工林,使用捕虫网捕捉泡桐树上的蟥象样本。从林业科学研究院内采集感病泡桐病枝,将其剪成约每段 15 cm , $6 \sim 10$ 段病枝为 1 束,病枝的下部裹上沾水的脱脂棉,放在塑料养虫笼中,每笼 1 束。南阳采集的茶翅蟥样本置于养虫笼中,进行为期 7 d 的获毒,在 7 d 中共更换树枝束 3 次。之后将单头蟥象转移到含有饲料和水源的透气组培瓶中恢复饲养 19 d。恢复饲养的茶翅蟥按照 Suzuki 等^[18] 的方法提取总蛋白。以提取的蛋白作为抗原进行免疫印迹试验,免疫印迹试验的方法同 1.2.5.1。

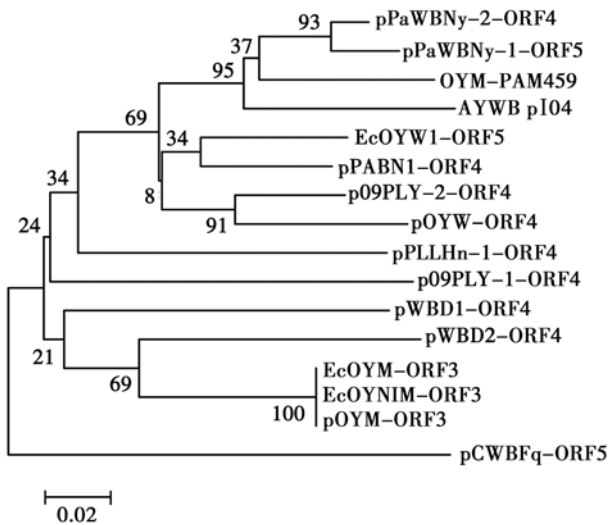
感病组培苗采用直接提取总蛋白和先差速离心富集植原体后提取蛋白的方法提取蛋白。直接提取蛋白的方法是:组培苗在液氮中研磨成粉末,称取约 0.2 g 粉末,加入总蛋白提取液 ($30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 值 6.8), 2% SDS, 6% β -巯基乙醇) 充分混匀,在沸水中加热 5 min, $18\,000 \text{ g}$ 离心 15 min,上清即为提取的蛋白样本。差速离心富集植原体后提取蛋白的方法按以下步骤进行:称取感病泡桐组培苗 5 g ,加入 5 mL 预冷的植原体提取缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液 (pH 值 7.4), $0.35 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.01% β -巯基乙醇, 0.15% 牛血清白蛋白, 2% PVP-10) 充分研磨, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 1 h;研磨液用 4 层纱布过滤,滤液装入 50 mL 离心管, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $1\,500 \text{ g}$ 离心 10 min,取上清;上清在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $18\,000 \text{ g}$ 离心 30 min,沉淀为植原体细胞粗提物。沉淀物采用 Lin 等^[16] 的实验方法提取蛋白,以提取的蛋白质作为抗原进行免

疫印迹试验,免疫印迹试验的方法同 1.2.5.1 节。

2 结果与分析

2.1 p2ORF4 的生物信息学分析

p2ORF4 由 462 个核苷酸组成,编码 153 个氨基酸,ProtParam tool 预测的分子量为 17.5 kDa,等电点为 pI 9.59。SOSUI 软件预测其 N 端和 C 端各具有 1 个 23 个氨基酸的跨膜结构域。使用 DNAMAN 软件对 p2ORF4 和 p1ORF5 的编码蛋白氨基酸序列进行比对,发现二者的同源率为 83.01%。二者在 N-端的 88 个氨基酸残基中只有 1 个差异,在 C-端的 16 个氨基酸残基完全一致。中部的氨基酸差异较大,p2ORF4 的编码蛋白比 p1ORF5 的多出 9 个氨基酸残基。以 MEGA4.1 软件的邻位相连法构建系统发育树(图 1),从系统发育树可以看出:pCWBFq-ORF5 与所有参比的序列具有较远的亲缘关系,而 p1ORF5 和 p2ORF4 间具有最近的亲缘关系,并且它们与 16 SrI 组的 AYWB pI04 和 OYM-PAM459 在一个进化支上。

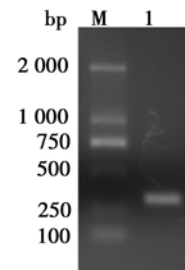


供分析的植原体虫传相关基因包括:泡桐丛枝植原体 pPaWB_{Ny}-2-ORF4 (EF426474)、pPaWB_{Ny}-1-ORF5 (EF426472)、翠菊黄化丛枝植原体 AYWB pI04 (CP000062)、洋葱黄化植原体 OY-W EcOYW1-ORF5 (AB479513)、pOYW-ORF4 (AB056859)、洋葱黄化植原体 OY-ME_{Ec}OYM-ORF3 (AB076263)、OYM-PAM459 (AP006628)、pOYM-ORF3 (AB479514)、洋葱黄化植原体 OY-NIM EcOYNIM-ORF3 (AB097150)、苦楝丛枝植原体 pCWBFq-ORF5 (JF827298)、长春花黄叶植原体 p09PLY-1-ORF4 (HQ332530)、p09PLY-2-ORF4 (HQ332531)、小麦蓝矮病植原体 pWBD1-ORF4 (JX668987)、pWBD2-ORF4 (JX668988)、*Candidatus* Phytoplasma asteris 侵染油菜的株系 pPABN1-ORF4 (HQ637382)、长春花小叶植原体 pPLLHn-1-ORF4 (JN835187)。

图 1 基于植原体虫传相关基因构建的系统进化树

2.2 p2ORF4 片段的 PCR 扩增和原核表达载体的构建

使用引物 p2ORF4F-BamH I /p2ORF4R-Sal I, 以感病泡桐组培苗提取的总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增和电泳检测。结果获得大小约 300 bp 的条带(图 2),与预期的 303 bp 大小一致。纯化的 PCR 产物和 pGEX-4T-3 质粒分别使用 BamH I 和 Sal I 双酶切,双酶切产物纯化后进行连接并转化大肠杆菌 DH5 α 。菌液 PCR 筛选到 14 个阳性克隆,测序发现 1 个克隆 pGEX-p2ORF4 的序列与 Genbank 中 p2ORF4 序列(登录号:EF426473)一致,并且在表达载体中未发生移码,证明 pPaWB_{Ny}-2-ORF4 基因原核表达载体构建成功。



M 泳道:DNA 分子量标准;1 泳道:感病泡桐组培苗

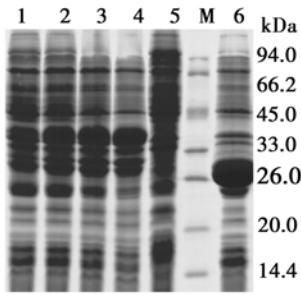
图 2 PCR 扩增 pPaWB_{Ny}-2 ORF4 的 303 bp 序列

2.3 融合蛋白的诱导表达

诱导表达后提取的细菌总蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果发现:含 pGEX-4T-3 空质粒的大肠杆菌 Rosseta (DE3) 菌株诱导后,在 26 kDa 处有 1 条很宽的条带,该条带对应物是表达的 GST 标签蛋白(图 3 泳道 6);而含 pGEX-p2ORF4 重组质粒菌株与含 pGEX-4T-3 空质粒菌株诱导物相比,在约 38 kDa 处多出 1 条条带(图 3 泳道 1~4),该条带对应物的分子量大小与 GST-ORF4 融合蛋白预期分子量一致,证明目的蛋白得到表达。从电泳图 3 看出:在摇菌 2.0、2.5、3.0、3.5 h 后诱导表达,目的蛋白的表达量没有显著差异(图 3 泳道 1~4)。确定合适的目的蛋白表达条件是:37 $^{\circ}$ C 条件下 180 $r \cdot \min^{-1}$ 摇菌 2 h,添加终浓度为 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导 5 h。

2.4 表达产物的纯化和抗体的制备

诱导表达后提取的细菌蛋白 SDS-PAGE 电泳,切胶回收分子量约 38 kDa 的蛋白条带,研磨并纯化目的蛋白。纯化的融合蛋白免疫大白兔制备抗血清,一次性颈动脉采血得到约 20 mL 的血液。血液经离心处理得到抗血清,抗血清超低温冷冻干燥后,



1~4泳道:含 pGEX-p2ORF4 重组质粒摇菌 3.5、3.0、2.5、2.0 h 后添加 IPTG 诱导;5 泳道:含重组质粒 pGEX-p2ORF4 菌液未添加 IPTG 诱导;M 泳道:蛋白质分子量标准;6 泳道:含质粒 pGEX-4T-3 菌液摇菌 2.5 h 之后添加 IPTG 诱导。

图3 SDS-PAGE 分析 p2ORF4 在载体 pGEX-4T-3 中的表达

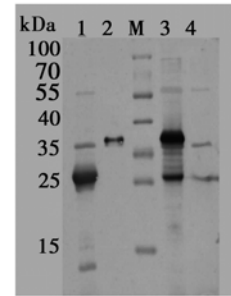
保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

2.5 多克隆抗体的鉴定

2.5.1 免疫印迹鉴定 使用制备的抗血清对原核表达的蛋白进行免疫印迹分析,发现含质粒 pGEX-4T-3 菌液提取蛋白在约 26 kDa 处出现紫色条带(图 4 泳道 1),大小与 GST 蛋白标签一致。含重组质粒 pGEX-p2ORF4 菌液提取蛋白在约 38 kDa 处出现紫色条带(图 4 泳道 3),大小与 SDS-PAGE 观察到融合蛋白一致,表明制备的多克隆抗体与原核表达的蛋白能够发生特异的免疫反应。

以含重组质粒 pET28a-ORF5-5 菌液诱导表达蛋白作抗原进行免疫印迹分析,在膜上的 15 kDa 处未

出现特异条带(图 4 泳道 4),表明制备的抗血清与 p1ORF5 编码蛋白间无明显的交叉反应,抗血清特异性较好。



1 泳道:含 pGEX-4T-3 质粒的菌液添加 IPTG 诱导后提取的蛋白;2 泳道:切胶回收纯化的 ORF4 编码蛋白;M 泳道:蛋白质分子量标准;3 泳道:含 pGEX-p2ORF4 质粒的菌液添加 IPTG 诱导后提取的蛋白;4 泳道:含 pET28a-ORF5 质粒的菌液添加 IPTG 诱导后提取的蛋白。

图4 使用融合蛋白进行 Western blot 鉴定制备的抗血清

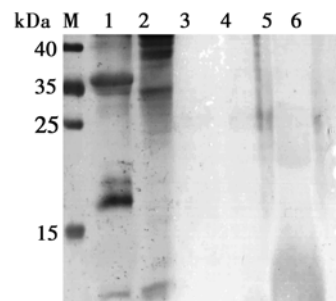
2.5.2 抗体效价的测定 抗血清效价测定结果见表 1。阳性血清行是不同稀释倍数抗血清的 3 个平行试验的 OD_{405} 平均值,阴性血清行是在不同稀释倍数的免疫前兔子血清的 OD_{405} 值。当样本吸光值/阴性吸光值 (P/N) ≥ 2.1 判定为阳性,抗血清在稀释达到 1:4 096 倍时, P/N 值为 2.349 8;而抗血清稀释到 1:8 192 倍时, P/N 值为 1.690 8。因此,其效价是 1:4 096。

表 1 间接 ELISA 法测定抗血清的效价

项目	抗血清的浓度									
	2^8	2^9	2^{10}	2^{11}	2^{12}	2^{13}	2^{14}	2^{15}	2^{16}	2^{17}
阳性血清	0.466 1	0.390 6	0.301 5	0.210 7	0.143 1	0.105 0	0.088 3	0.075 1	0.069 1	0.065 6
阴性血清	0.067 1	0.062 6	0.064 6	0.062 3	0.060 9	0.062 1	0.064 4	0.061 5	0.060 8	0.062 4
P/N	6.946 3	6.239 6	4.667 2	3.382 0	2.349 8	1.690 8	1.371 1	1.221 1	1.136 5	1.051 3

2.6 茶翅蜡和感病泡桐组培苗中 p2ORF4 编码蛋白的表达分析

以饲毒茶翅蜡提取的蛋白质作为抗原,免疫印迹试验发现:在分子量约为 18 kDa 处出现 1 条带(图 5 泳道 1),而在无菌的试虫样本中无该条带(图 5 泳道 2),证明 p2ORF4 在饲毒的茶翅蜡中得到表达。以感病的泡桐组培苗提取蛋白作为抗原和先富集植原体再提取植原体蛋白作为抗原,免疫印迹试验都未能检测到特定的蛋白条带,表明在感病的泡桐组培苗中植原体 p2ORF4 基因未表达。



M 泳道:蛋白质分子量标准;1 泳道:饲毒的茶翅蜡样本提取的蛋白;2 泳道:无菌的茶翅蜡样本提取的蛋白;3 泳道:感病泡桐直接提取的蛋白;4 泳道:健康泡桐直接提取的蛋白;5~6 泳道:感病泡桐富集植原体后提取的蛋白。

图5 pPaWBny-2-ORF4 编码蛋白的表达分析

3 结论与讨论

本研究从感病泡桐中 PCR 扩增了质粒 pPaWB_{Ny-2} 的 ORF4 基因,并首次制备了其编码蛋白的多克隆抗体,多克隆抗体的鉴定发现其具有较高的效价,并与 p1ORF5 编码蛋白无明显的交叉反应,故本研究制备的抗血清可以用于植原体质粒基因功能分析、病菌检测和用于 p2ORF4 编码蛋白与介体昆虫茶翅蜡的互作研究。

在已测定的 30 多个完整的植原体质粒中,已注释或验证了 *Rep*、*dnaG*、*ssb* 基因参与质粒的自我复制,而 *cop* 基因控制质粒的拷贝数。除此之外,植原体质粒编码的绝大部分蛋白是膜蛋白或分泌蛋白,它们可能在植原体和寄主的互作及植原体的介体传播中发挥重要作用。本研究对感病泡桐组培苗差速离心富集植原体,利用富集植原体的初提纯物提取蛋白质,再使用该提取蛋白作为抗原,也不能检测到杂交信号,证明 p2ORF4 在感病泡桐中未表达或表达水平很低。本研究还发现,p2ORF4 与之前研究报道的 p1ORF5 的编码蛋白都在昆虫体内有很高的表达量,而在感病泡桐中没有检测到明显的表达,这与 Ishii 等^[19]发现的日本洋葱黄化植原体质粒编码的 ORF3 在介体昆虫细胞中表达水平也高于寄主植物相一致。据此推测,p2ORF4 可能在潜育期中与介体昆虫茶翅蜡互作,进而为植原体在介体昆虫体内存活或在介体传播中发挥重要功能。

介体传播病菌分为获毒、潜育期和传毒 3 个阶段^[20]。在潜育期,介体昆虫虽不能够传播植原体,但植原体与介体昆虫在不同的位点上发生互作,可能是介体昆虫传播植原体的一个重要环节。Galletto 等^[21]通过研究 *Euscelidius variegatus* Kirschbaum 对菊花黄化植原体 (chrysanthemum yellows phytoplasma, CYP) 的传播特性,认为介体昆虫传毒能力的变化依赖菊花黄化植原体在 *E. variegatus* 中的分布。Jia 等^[22]认为,传毒介体的特异性和介体的传毒能力决定于病毒在介体昆虫的不同组织中引起的传播屏障。*Candidatus* Phytoplasma asteris 的 OY 菌系的细胞膜蛋白 Amp 能够与 3 种介体昆虫 *Macrostelus strifrons*、凹缘菱纹叶蝉 (*Hishimonus sellatus* Uhler) 和拟菱纹叶蝉 (*Hishimonoides sellatifomis* Ishihara) 的微丝结合,但不能与试验中的 2 种非介体的微丝结合,表明植原体被介体昆虫特异性传播与 Amp-微丝复合体的形成有关^[18]。Galletto 等^[23]也发现,CYP 的细

胞膜蛋白 Amp 能够与介体昆虫的肌动蛋白互作,这种互作涉及植原体的内化和在介体昆虫中的运动;同时也发现,Amp 能够与分布在昆虫细胞膜上 ATP 酶的 α 和 β 亚基互作,推测中肠和唾液腺上分布的 ATP 酶可能是 Amp 的受体。洋葱黄化植原体株系 OY-NIM 的质粒 pOYNIM 与 OY-M 的质粒 pOYM 相比缺乏 2 个阅读框 ORF3 和 ORF4 (编码单链 DNA 结合蛋白),试验表明 ORF3 编码的膜蛋白在细胞膜的界面上与介体昆虫互作^[19,15]。为了进一步验证泡桐丛枝植原体的 p2ORF4 和 p1ORF5 在茶翅蜡传播植原体过程中的作用,需要明确与其互作的分子和互作机制。在茶翅蜡体内是否存在与 p2ORF4 和 p1ORF5 互作的类似于与其他植原体或螺原体上发现的昆虫微丝、糖蛋白等互作蛋白,将可通过免疫亲和层析、Far-western 等方法加以验证。

植物病害的流行需要易感植物、病原体 and 传播途径,只有三者同时存在,病害才会流行。目前还没有鉴定到高度抗病的泡桐品种,也没有鉴定到抵抗植原体的基因。加上全球变暖和气候的变化,促进冷敏感的介体昆虫的活动,使植原体病害呈现上升的趋势^[1];所以,控制植原体的介体昆虫是控制植原体病害流行的一种有效的方法。本研究制备的抗血清可用于植原体与介体昆虫茶翅蜡的互作研究,而对植原体与介体昆虫的互作、介体昆虫的种群动态和取食行为等方面的研究,将会促进发展更有效的控制植原体病害流行的策略。

参考文献:

- [1] Namba S. Phytoplasmas; A century of pioneering research [J]. Journal of General Plant Pathology, 2011, 77:345-349
- [2] 金开璇. 泡桐丛枝病对泡桐立木生长影响的研究 [J]. 林业实用技术, 1980(5): 25-26
- [3] 陈育民. 丛枝病对泡桐叶片解剖构造生理生化及材性的影响 [J]. 西北林学院学报, 1992, 7(4): 50-57
- [4] Hogenhout S, Oshima K, Ammar E D, et al. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects [J]. Molecular Plant Pathology, 2008, 9(4): 403-423
- [5] Frost K E, Willis D K, Groves R L. Detection and variability of aster yellows phytoplasma titer in its insect vector, *Macrostelus quadrilineatus* (Hemiptera: Cicadellidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2011, 104(6): 1800-1815
- [6] Weintraub P G, Beanland L. Insect vectors of phytoplasmas [J]. Annual Review of Entomology, 2006, 51: 91-111
- [7] Shiozawa H. Transmission of Paulownia Witches' Broom by Sting Bugs *Halyomorpha mista* UHLER [J]. Japan Plant Protection, 1986, 4: 45-50

- [8] 邵平绪,洪瑞芬,全德全,等. 泡桐丛枝病传病昆虫研究(1) 茶翅蜡传病试验及电镜观察[J]. 山东林业科技,1981(2): 42-43
- [9] 金开璇,梁成杰,邓丹荔. 泡桐丛枝病传毒昆虫研究(1) [J]. 林业科技通讯, 1981(12): 23-24
- [10] 郑文锋,宋晓斌,任锁堂,等. 泡桐丛枝病病原及传毒途径的研究[J]. 陕西林业科技,1990(1): 23-25
- [11] 罗 飞,朱水芳,张成良,等. 泡桐丛枝病媒介昆虫体内植原体的检测和鉴定[M]. 北京:中国农业出版社,1998:280-283
- [12] Vivian A, Murillo J, Jackson R W. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals [J]. Microbiology, 2001, 147: 763-780
- [13] Denes A S, Sinha R C. Alteration of clover phyllody mycoplasma DNA after in vitro culturing of phyllody-diseased clover[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1992, 14(3):189-196
- [14] MacLean A M, Sugio A, Makarova O V, et al. Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants[J]. Plant Physiology, 2011, 157: 831-841
- [15] Nishigawa H, Oshima K, Kakizawa S, et al. A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line[J]. Gene, 2002, 298: 195-201
- [16] Lin C L, Zhou T, Li H F, et al. Molecular characterisation of two plasmids from paulownia witches'-broom phytoplasma and detection of a plasmid encoded protein in infected plants[J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 123:321-330
- [17] 林彩丽. 泡桐丛枝病植原体质粒分子特征及其编码蛋白功能研究[D]. 北京:中国农业大学, 2008
- [18] Suzuki S, Oshima K, Kakizawa S, et al. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(11): 4252-4257
- [19] Ishii Y, Kakizawa S, Hoshi A, et al. In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region [J]. Microbiology, 2009, 155:2058-2067
- [20] Purcell A H. Insect vector relationships with procaryotic plant pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 1982, 20:397-417
- [21] Galetto L, Nardi M, Saracco P, et al. Variation in vector competency depends on chrysanthemum yellows phytoplasma distribution within *Euscelidius variegatus* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2009, 131:200-207
- [22] Jia D S, Chen H Y, Mao Q Z, et al. Restriction of viral dissemination from the midgut determines incompetence of small brown planthopper as a vector of Southern rice black-streaked dwarf virus[J]. Virus Research, 2012, 167:404-408
- [23] Galetto L, Bosco D, Balestrini R, et al. The major antigenic membrane protein of "*Candidatus* Phytoplasma asteris" selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper vectors[J]. PLoS ONE, 2011, 6(7): e22571