

陈 秀, 饶雪琴, 阮小蕾, 等. 香蕉线条病毒 MP 功能域基因的克隆、原核表达及抗血清制备[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 47-52.

# 香蕉线条病毒 MP 功能域基因的克隆、 原核表达及抗血清制备

陈 秀<sup>1,2</sup>, 饶雪琴<sup>2</sup>, 阮小蕾<sup>2</sup>, 李华平<sup>2</sup>

(1 博罗县农业科学研究所, 广东 惠州 516100; 2 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】制备香蕉线条病毒广东分离物(BSV-GD)MP 功能域基因编码蛋白的多克隆抗血清,为 BSV 基因编码蛋白功能的研究提供条件。【方法】对 BSV-GD ORF3 基因氨基酸序列进行生物信息学分析,得出 MP 功能域基因序列,克隆该基因并插入载体 pET-28b(+) 构建原核表达载体,经 IPTG 诱导表达后,采用超声波裂解法进行蛋白可溶性分析,利用组氨酸标签纯化试剂盒对目的融合蛋白进行纯化和回收,然后以纯化的目的蛋白为抗原免疫健康家兔制备其多克隆抗血清;通过 Western-blot 分析该抗血清的特异性,间接 ELISA 法检测该抗血清的效价。【结果和结论】MP 功能域基因在 ORF3 中的序列为 61~311 aa 处,核酸序列长 753 bp。试验克隆了该基因并成功构建了其原核表达载体 pET28b-MP,经 IPTG 诱导 1 h 后表达了相对分子质量约为 30 800 的融合蛋白 6His·MP。可溶性分析表明该融合蛋白以包涵体形式存在,纯化获得了高纯度的目的融合蛋白,以其为抗原成功制备了 BSV-GD MP 功能域基因编码蛋白的多克隆抗血清;分析表明该抗血清具有很强的特异性,其效价高达 204 800 倍以上。

**关键词:**香蕉线条病毒; MP 功能域基因; 原核表达; 抗血清

中图分类号:S432.4<sup>+</sup>1

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2014)02-0047-06

## Prokaryotic expression and antiserum preparation for functional domain of *Banana streak virus movement protein gene*

CHEN Xiu<sup>1,2</sup>, RAO Xueqin<sup>2</sup>, RUAN Xiaolei<sup>2</sup>, LI Huaping<sup>2</sup>

(1 Boluo County Institute of Agricultural Sciences, Huizhou 516100, China;

2 College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:**【Objective】To provide antibody of *Banana streak virus* Guangdong isolate (BSV-GD) and to provide references for the function research of proteins encoded by BSV ORF3 further. 【Method】The MP functional gene sequence was obtained through bioinformatics analysis. The gene was cloned and inserted into the plasmid pET-28b(+) to construct the prokaryotic expression recombinant plasmid. The recombinant vector was induced by IPTG to express the fusion protein 6His·MP. Soluble analysis of the fusion protein was carried out by ultrasonic lysis method. The highly purified protein was obtained by His-tag purification kit. The special polyclonal antibody was generated by immunizing healthy rabbit using the purified protein as antigen. The specificity of antiserum was detected by Western-blot. The antibody titer was determined by indirect enzyme immunoassay. 【Result and conclusion】The analysis showed that the MP functional gene was 61-311 aa of the ORF3 sequence and the nucleotide sequence length was 753 bp. The prokaryotic expression recombinant plasmid pET28b-MP was constructed, and the expressed fu-

收稿日期:2013-04-16 优先出版时间:2014-01-03

优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140103.0828.011.html>

作者简介:陈 秀(1983—),女,博士,农艺师,E-mail:63753448@qq.com;通信作者:李华平(1961—),男,教授,博士,  
E-mail:huaping@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30671358);广东省自然科学基金(C036845)

sion protein 6His · MP was about 30 800 in size. Soluble analysis of the fusion protein indicated that it was an inclusion body. The highly purified target protein was obtained. The special polyclonal antiserum was generated according to the purified protein. The assay suggested that the antiserum had very strong specificity, and the antibody titer was higher than 1: 204 800.

**Key words:** *Banana streak virus*; movement protein domain; prokaryotic expression; antiserum

香蕉线条病毒 *Banana streak virus* (BSV) 是香蕉上的一种 dsDNA 拟反转录病毒, 属于花椰菜花叶病毒科 Caulimoviridae 杆状 DNA 病毒属 *Badnavirus*<sup>[1]</sup>. BSV 引起的香蕉线条病是香蕉生产上的主要病毒病之一, 发病初期叶片产生连续或不连续的褪绿条斑, 随病情发展, 条斑逐渐变褐坏死, 假茎、叶柄和果穗有时也会出现条纹症状, 不同基因型香蕉植株表现的症状存在差异<sup>[2]</sup>.

BSV 在世界各香蕉产区分布广泛, 造成了一定的经济损失, 严重制约了香蕉种质资源的调运<sup>[3]</sup>, 进而制约了香蕉生产的健康发展. 香蕉线条病在我国台湾、广东、云南、海南等地的香蕉产区已有发生<sup>[4]</sup>, 基于该病害在其他国家香蕉产区已造成较严重的生产危害<sup>[5]</sup>, 因此非常有必要展开这一病害的研究工作.

BSV 具有杆状 DNA 病毒的典型分子特征, 基因组包含 3 个 ORF, ORF1 和 ORF2 编码 2 个小蛋白, ORF3 编码 1 个大的多聚蛋白, 根据同属病毒基因组特征推测此多聚蛋白在蛋白水解酶的作用下分解为运动蛋白 (Movement protein, MP)、外壳蛋白 (Coat protein, CP)、天冬氨酸蛋白酶 (Asepartic protease, AP)、反转录酶 (Reverse transcriptase, RT) 和 RNA 酶 H (RNase H, RH)<sup>[6-7]</sup>. 编码这些蛋白的基因的确切位置、蛋白的大小目前还不清楚.

目前, 对 BSV 的研究主要还是集中在病毒检测<sup>[8-11]</sup>、病毒核酸与寄主基因组整合<sup>[12-14]</sup> 和遗传多样性<sup>[15]</sup> 等方面, 而对 BSV 编码蛋白的生物学功能、BSV 的致病机制等方面还知之甚少, 除 BSV 凯文迪斯株系 *Banana streak virus* Caverdish strain (BSV-CaV) ORF3 和 ORF1 基因间隔区存在启动子序列<sup>[16]</sup> 的报道外, 鲜见其他关于 BSV 基因功能的研究报道.

蛋白抗体在蛋白功能的研究中发挥着重要的作用. BSV 抗血清的制备是相关研究工作开展的重要基础. 前期已对 BSV 广东分离物 (BSV-GD) 的 ORF1 和 ORF2 基因进行了原核表达并获得了其高效价的多克隆抗血清<sup>[17-18]</sup>. 本研究拟对 BSV-GD (GenBank 登陆号为 DQ451009) ORF3 中的 MP 功能域基因进行原核表达并制备其编码蛋白的多克隆抗血清, 为

进一步研究 BSV ORF3 编码蛋白的功能奠定基础, 进而为弄清 BSV 的复制、侵染、致病机制等提供依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

大肠埃希菌 *Escherichia coli* JM109、DH5 $\alpha$ 、Rosseta (DE3) 菌株、原核表达载体 pET-28b (+)、pCAMBIA-BSV 质粒<sup>[19]</sup> 和香蕉植物组织材料由华南农业大学病毒研究室保存. pMD18-T 载体、各种酶购自 TAKARA 公司; DNA 回收试剂盒购自杭州维特洁生物技术有限公司; 多聚组氨酸蛋白纯化试剂盒购自德国 MERCK 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG、His · Bind 树脂、10 K 超滤管为美国 Novagen 公司产品, 购自广州英伟创津生物技术有限公司.

### 1.2 基因功能域的生物信息学分析

利用蛋白功能域分析软件 PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>) 对 BSV-GD ORF3 的氨基酸序列进行分析; 利用 DNASTar 软件对 BSV-GD ORF3 氨基酸序列与 BSV 其他分离物及同属其他成员的 ORF3 氨基酸序列进行比对分析, 推测 BSV-GD MP 功能域基因的序列.

### 1.3 BSV-GD MP 功能域基因的克隆和原核表达

根据 BSV-GD MP 功能域基因的序列设计引物 petMP-FP: 5'-GTCGACCATACACTATCTATGTTGGT-3'; petMP-RP: 5'-AAGCTTTTAACCAAATCGTATACTCCGTG-3'. 上游引物引入 *Sal* I 酶切位点, 下游引物引入 *Hind* III 酶切位点. 以 pCAMBIA-BSV 质粒<sup>[19]</sup> 为模板, PCR 扩增目的基因, 产物回收后连接到 pMD18-T 载体中, 对重组质粒进行测序鉴定. 利用 *Sal* I 和 *Hind* III 酶切位点将测序正确的 MP 片段连接到 pET-28b (+) 中, 获得目的基因的原核表达载体 pET28b-MP.

将原核表达载体 pET28b-MP 转化到表达菌株 *E. coli* Rosseta (DE3) 中. 挑取阳性单克隆接种到 LB 液体培养基中, 培养至  $D_{600\text{nm}} \approx 0.6$ , 加入 IPTG 至终浓度为  $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下诱导表达. 分别取诱导时间为 1、3、5、7 h 的菌液 1 mL,  $12\ 000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离

心 1 min,收集细菌,用 100  $\mu\text{L}$  灭菌蒸馏水重悬,并加入 100  $\mu\text{L}$  2  $\times$  SDS 的凝胶上样缓冲液,沸水中煮 5 min,分别取 15  $\mu\text{L}$  上样,进行 SDS-PAGE,检测目的蛋白是否表达.

1.4 His 融合蛋白的纯化和浓缩

离心收集诱导菌体,冰浴超声波破碎后 4 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,吸出上清,沉淀溶解在 1/8 体积的灭菌蒸馏水中,分别取上清、沉淀溶解液进行 SDS-PAGE. 同时,将超声波破碎的表达产物按 MERCK 公司组氨酸标签纯化试剂盒操作说明书进行蛋白纯化,将纯化后的蛋白洗脱液加入到 4 mL 的 10K 超滤管中,7 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,收集超滤管底部的蛋白进行 SDS-PAGE.

1.5 His 融合蛋白抗血清的制备

抗原制备:第 1 次注射前取约 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  纯化浓缩的融合蛋白 1 mL,混合等体积福氏完全佐剂,乳化后作为抗原. 第 2 次、第 3 次、第 4 次注射前取约 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  纯化浓缩的融合蛋白 0.5 mL,混合等体积福氏不完全佐剂,乳化后作为抗原. 第 5 次注射前取约 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  纯化浓缩的融合蛋白 0.5 mL 直接作为抗原,不加佐剂.

抗体分离和保存:取 2 kg 左右雄性健康新西兰大白兔,作标记. 注射抗原前取兔耳静脉血作空白血清对照. 参考何云蔚等<sup>[19]</sup>的方法分别进行皮下多点和肌肉混合注射,共免疫 5 次. 每次各注射 1 ~ 2 mL 乳化抗原溶液. 第 1 次免疫后每隔 7 d 免疫 1 次,最后一次免疫采用耳静脉注射,抗原不加佐剂,免疫 7 d 后,耳静脉采血,测定抗血清效价,效价达到要求(5 000 倍以上)则心脏采血,效价不达要求则继续加强注射 1 次,7 d 后测效价,心脏采血. 将所采血样室温放置约 2 h,自然凝固后,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜待凝块收缩,吸取上清液,3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,取上清,加入 1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的叠氮化钠, -20  $^{\circ}\text{C}$  条件保存.

1.6 抗血清的 Western-blot 分析

取经 IPTG 诱导的转化了 pET28b-MP 质粒的 *E. coli* Rosseta( DE3) 菌体裂解液进行 SDS-PAGE,以经 IPTG 诱导的未转化重组质粒的 *E. coli* Rosseta( DE3) 菌体裂解液和未经 IPTG 诱导的转化了 pET28b-MP 质粒的 *E. coli* Rosseta( DE3) 菌体裂解液为对照. 取 SDS-PAGE 后的凝胶,直接用 DYY-7 型转移电泳仪将其转印于硝酸纤维素膜上,将硝酸纤维素膜放入可加热封接的塑料袋中用封闭液封闭,按 0.10 ~ 0.15  $\text{mL} \cdot \text{cm}^{-2}$  的量加入经 TBST 稀释的一抗血清(制备的抗血清),排除气泡后密闭袋口,37  $^{\circ}\text{C}$  摇床温育 1 h,然后利用 TBST 洗涤 3 次,将充分洗涤后的膜转入新塑料袋中,加入经 TBST 稀释的酶标二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG),37  $^{\circ}\text{C}$  摇床温育 0.5 ~ 1.0 h, TBST 洗涤 3 次,再用 TBS 洗涤 2 次. 将膜转移到小平皿中,加入新配制的底物液室温作用 3 min,立即用 X 射线胶片压片,曝光适当时间后,定影、显影、冲洗照片.

1.7 抗血清的效价测定

参考邓从良等<sup>[20]</sup>的方法,用间接 ELISA 法进行检测,抗原浓度为免疫注射时的 1/20,抗血清用 0.01% BSA 的 PBST 缓冲液稀释,稀释度为 1:4 ~ 1:204 800,设置机械零孔和空白对照,以免疫前的血清稀释相同倍数作为阴性对照.

2 结果与分析

2.1 BSV-GD ORF3 基因功能域的生物信息学分析

利用蛋白结构域分析软件 PROSITE 结合序列比并对 BSV-GD 的 ORF3 核苷酸序列推导的氨基酸序列进行分析,推测出 MP 功能域在 ORF3 推导的氨基酸序列中位于 61 ~ 311 aa 处,长为 251 aa,核酸序列长为 753 bp. MP 保守结构域氨基酸序列比对结果如图 1 所示.

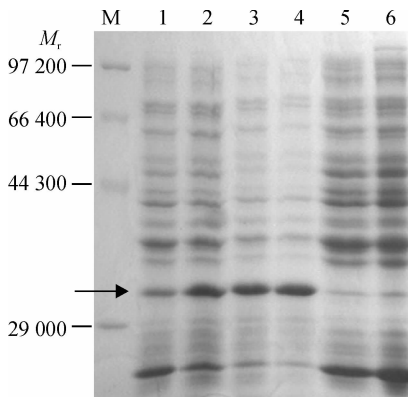
BSV-GD	139	HLGVLQVRIQIMHRTYAGTMALIVFRDTRWTQEGE.EDRSIIGAMEADLSQG	189
BSV-AV	141	HLGVLQVRIQIMHRTYDGTMALVVFRDTRWTQENHQ.DRSIIATMEADLSQG	191
BSV-M	146	HLGVLQVRFQILHRTYAGTMALLVFRDTRWTADD...RSIISAMEVDLAEG	192
BSV-OL	139	HLGVLQVRIQIMHRTYAGTMALIVFRDTRWTQEGEE.GRSIIGAMEADLSQG	189
ComYMV	141	HIGVMLVRIQILHRKFAGTMALIVFRDTRWSDD...RAVLAAMEIDLSEG	187
CSSV	141	HIGILQVRIQILHRQEETMALVVFRDNRWSDGQ...SIFAQMEIDLTKG	187
CYMV	140	HMGIVQVRIQILHRQHEGTTALVVFRDNRWQGDQ...SIFATMELDLTKG	186
KTSV	140	HLGVLQVRIQTMHRAFAGTMALVVFRDTRWTREVSGEDRSIIAAMEVDLSRG	191
SCBV	137	HLGAMAIRIQPLHAAWSGKLA FIVLRDVRNSPP...TTLGAMEVDLSKG	182
TaBV	132	HIGLIMIRVHPLHRRNAGTTALIVPRDIRWNDD...RSIIGTMEIDL SAG	178
DrsBV-HB	135	HVGMVLVRVHALHSRHAGTMALLCLRDRWKSS...RGIIGSMEVDLTAG	181
DrMV	137	HVGMVLVRVHALHSRHAGTMALLCLRDRWKSSRG...IIGSMEVDLTAG	183
Consensus		H G R H G A R D R	ME DL G

图 1 BSV-GD 与其他 Badnavirus ORF3 基因序列推导的氨基酸序列中的 MP 保守结构域氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of BSV-GD and other Badnavirus movement protein domain consensus sequences in ORF3

## 2.2 BSV-GD MP 功能域基因的原核表达

将 PCR 扩增到的 BSV-GD MP 功能域基因克隆到 pMD18-T 载体中,重组质粒测序结果表明目的基因序列与原序列完全一致。*Sal* I 和 *Hind* III 双酶切质粒,将目的基因连接到原核表达载体 pET-28b(+) 中,构建目的基因的原核表达载体 pET28b-MP,并转化表达菌株 *E. coli* Rosseta(DE3),于 37 °C 经 IPTG 诱导表达。BSV-GD MP 功能域基因的编码部分含有 251 个氨基酸,载体上的 His 标签部分为 17 个氨基酸,预期可表达相对分子质量大小为 30 800 的蛋白产物。收集经 IPTG 诱导若干小时的含有重组质粒的菌体,以经诱导 5 h 的未转化重组质粒的 *E. coli* Rosseta (DE3) 菌体及未经诱导的含重组质粒的 *E. coli* Rosseta (DE3) 菌体为阴性对照,以菌体裂解产物为上样样品进行 SDS-PAGE,结果表明含 pET28b-MP 重组质粒的菌株经 1 ~ 7 h 诱导后均可特异性地表达出与预期相当大小的目的蛋白,目的蛋白的表达量在 5 h 内趋于恒定,5 h 后表达产量迅速降低(图 2)。



M:低相对分子质量蛋白 Marker;1~4:含重组质粒 pET28b-MP 的 *E. coli* Rosseta (DE3) 分别诱导 7、5、3、1 h 的裂解产物;箭头示表达的目的蛋白;5:未经诱导的含重组质粒的 *E. coli* Rosseta (DE3) 裂解产物;6:经诱导的未转化重组质粒的 *E. coli* Rosseta (DE3) 裂解产物

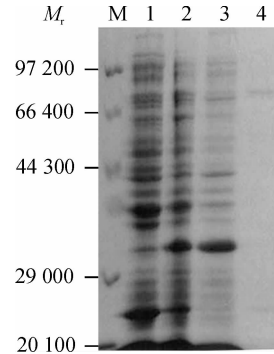
图 2 含 pET28b-MP 的 *E. coli* Rosseta(DE3) 表达产物

Fig. 2 Analysis of prokaryotic expression products of His-MP gene by SDS-PAGE

## 2.3 融合蛋白 6His · MP 的纯化

将表达菌液经超声波处理,分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE,结果表明融合蛋白主要以包涵体的形式存在于菌体沉淀物中,上清中几乎没有目的蛋白(图 3)。利用 His · Bind 树脂对 6 × His 融合蛋白进行分离、纯化。纯化的融合蛋白经 SDS-PAGE 分析,结果显示单一的目的条带(图 4),表明获得了

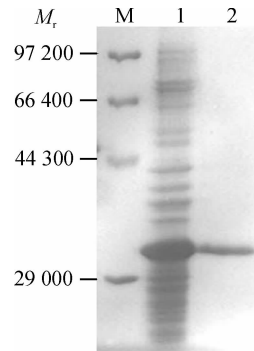
较纯的目的蛋白。



M:低相对分子质量蛋白 Marker;1:未诱导的转化菌全蛋白;2:诱导的转化菌全蛋白;3:诱导菌液经超声裂解后的沉淀物;4:诱导菌液经超声裂解后的上清液。

图 3 SDS-PAGE 进行融合蛋白 6His · MP 的可溶性分析

Fig. 3 Soluble analysis of fusion protein 6His · MP by SDS-PAGE



M:低相对分子质量蛋白 Marker;1:未纯化的蛋白(诱导菌液经超声裂解后的沉淀物);2:纯化的 His 融合蛋白。

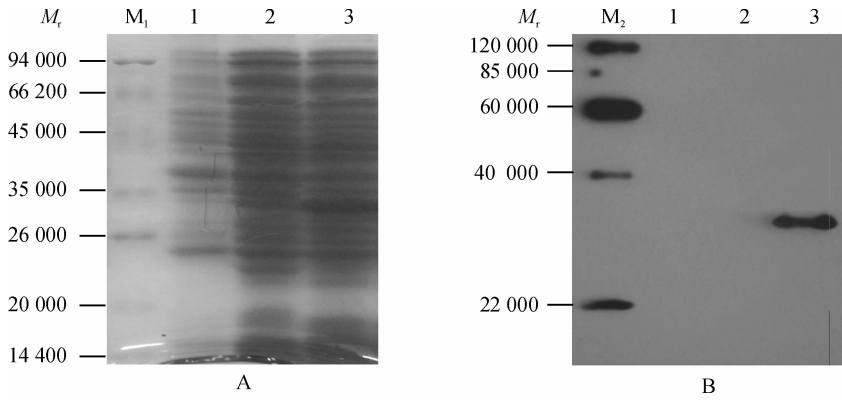
图 4 纯化融合蛋白 6His · MP 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of the purified fusion protein 6His · MP by SDS-PAGE

## 2.4 融合蛋白 6His · MP 抗血清的制备、特异性检测及效价测定

以纯化的融合蛋白 6His · MP 为抗原免疫新西兰大白兔,获得了含多克隆抗体的血清。将所制备的多克隆抗血清按 1:4 000 稀释,对诱导培养的含重组质粒的 *E. coli* Rosseta (DE3) 全蛋白进行 Western-blot 检测,结果显示在目的蛋白的位置有明显杂交带(图 5),说明制备的抗血清能够与目的蛋白发生抗原-抗体识别反应,且特异性很强,为专化性抗血清。

用间接 ELISA 法测定抗血清效价,将抗血清按稀释至 1:204 800 时,仍具有明显的阳性反应(表 1),说明融合蛋白 6His · MP 在大白兔体内具有良好的免疫性,所制备的抗血清效价在 204 800 倍以上。



M<sub>1</sub>:低相对分子质量蛋白 Marker, M<sub>2</sub>:EasyWestern 蛋白 Marker;1: IPTG 诱导的 *E. coli* Rosseta (DE3) 全蛋白;2:未诱导的转化 pET28b-MP 的 *E. coli* Rosseta (DE3) 全蛋白;3:IPTG 诱导的转化 pET28b-MP 的 *E. coli* Rosseta (DE3) 全蛋白.

A:SDS-PAGE 对照,B:Western-blot 分析.

图 5 6His · MP 融合蛋白抗血清的 Western-blot 分析

Fig.5 Analysis of anti-fusion protein 6His · MP by Western-blot

表 1 间接 ELISA 法测定融合蛋白 6His · MP 抗血清的效价

Tab. 1 Determination of titer of anti-fusion protein 6His · MP by indirect ELISA

抗血清 稀释倍数	$D_{492\text{ nm}}$		比值 <sup>2)</sup>
	抗血清	对照 <sup>1)</sup>	
100	1.290	0.312	4.135
200	1.246	0.307	4.059
400	1.233	0.303	4.069
800	1.223	0.302	4.500
1 600	1.102	0.181	6.088
3 200	1.020	0.115	8.870
6 400	1.010	0.093	10.860
12 800	0.997	0.085	11.729
25 600	0.932	0.076	12.263
51 200	0.915	0.066	14.864
102 400	0.899	0.059	15.343
204 800	0.613	0.051	12.026

1) 对照为未免疫血清;2) 抗血清和对照的  $D_{492\text{ nm}}$  的比值.

### 3 讨论与结论

利用体外表达蛋白为抗原制备病毒的抗血清这一技术已被广泛应用,但是抗原的制备方法要根据具体情况确定.目前用体外表达产物制备抗原通常有 2 种方法:一是利用 Ni<sup>2+</sup> 树脂亲和层析法纯化带标签的融合蛋白,该法的优点是得到的目的蛋白纯度高,利于制备特异性强的抗血清,该法的缺点是 Ni<sup>2+</sup> 树脂价格相对昂贵,另外纯化蛋白比较耗时;二是直接从聚丙烯酰胺凝胶上切下表达产物制备抗血清,该法的优点是简便、经济,缺点是回收得到的表

达产物中可能含有宿主菌的蛋白成分而降低抗血清的特异性,另外胶块如果研磨不够细,则会损害兔子的健康.本研究采用的是第 1 种方法,目的是为了得到目的蛋白的特异性抗血清,同时获得纯度高的目的蛋白,可进一步用于后续蛋白功能的研究.如果只是为了快速获得蛋白抗血清,则建议采用第 2 种方法.

抗血清的制备是相关蛋白生物学功能研究工作开展的重要基础.前期已对 BSV-GD 的 ORF1 和 ORF2 基因进行了原核表达并制备了其编码蛋白的高效价多克隆抗血清,为 ORF1 和 ORF2 编码蛋白的功能研究奠定了基础<sup>[17-18]</sup>,而 ORF3 编码蛋白在 BSV 的侵染和复制中起着更复杂、更重要的作用,所以研究 BSV ORF3 基因编码蛋白的功能显得尤为重要.本研究制备了 BSV ORF3 中 MP 功能域基因编码蛋白的高效价抗血清,为进一步研究 BSV ORF3 编码蛋白的功能奠定了基础.MP 功能域基因编码蛋白的抗血清可用于 BSV 编码的 MP 蛋白的亚细胞定位、MP 蛋白在寄主细胞和组织的定位、病毒运动方式、运动机理和寄主抗病性等多方面的研究.本研究已着手利用制备的 MP 功能域蛋白抗血清开展感病香蕉组织蛋白提取物的检测、BSV-GD 编码的 MP 蛋白的亚细胞定位及其在寄主细胞和组织的定位等方面的研究,这对 BSV 运动机理的了解将会是一个突破性进展.

BSV-GD 基因组测序结果表明基因组全长 6 950 bp,共含有 3 个开放阅读框,ORF3 全长为 5 130 bp,编码 1 709 个 aa<sup>[21]</sup>.本研究对 ORF3 氨基酸序列的生物信息学分析表明其氨基酸序列含有 5 个功能位点,依次是植物病毒运动蛋白保守序列、运动锌指环

结构(典型的病毒外壳蛋白结构)、天冬氨酸蛋白酶位点、反转录酶功能域位点、RNA 酶 H 功能域位点, 得出了 BSV-GD 编码 MP 的基因的较确切的位置, 克隆了含 MP 功能域的基因, 构建了该基因的原核表达载体, 将该载体转化大肠杆菌并诱导表达了 N-端带 His 标签的目的蛋白, 回收得到了高纯度的目的蛋白, 以纯化的目的蛋白为抗原免疫健康家兔制备了高效价、专化性的多克隆抗血清, 为 BSV ORF3 编码蛋白的功能研究和 BSV 运动机理的研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] GAYRAL P, ISKRA - CARUANA M L. Phylogeny of *Banana streak virus* reveals recent and repetitive endogenization in the genome of its banana host (*Musa* sp.) [J]. *J Mol Evol*, 2009, 69(1): 65-80.
- [2] WAMBULWA M C, WACHIRA F N, KARANJA L S, et al. The influence of host and pathogen genotypes on symptom severity in banana streak disease [J]. *Afr J Biotechnol*, 2013, 2(1): 27-31.
- [3] LHEUREUX F, LABOUREAU N, MULLER E, et al. Molecular characterization of banana streak acuminata Vietnam virus isolated from *Musa acuminata siamea* (banana cultivar) [J]. *Arch Virol*, 2007, 152(7): 1409-1416.
- [4] ZHUANG Jun, WANG Jianhua, ZHANG Xin, et al. Molecular characterization of *Banana streak virus* isolate from *Musa acuminata* in China [J]. *Viro Sin*, 2011, 26(6): 393-402.
- [5] DANIELLS J W, GEERING A D W, BRYDE N J, et al. The effect of *Banana streak virus* on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia [J]. *Ann Appl Biol*, 2001, 139(1): 51-60.
- [6] HOHN T, FUTTERER J. The proteins and functions of plant pararetroviruses: Knowns and unknowns [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1997, 16(1): 133-161.
- [7] VERMA R, MUNGEKAR D, GAIKWAD P, et al. Molecular characterization of *Banana streak virus* isolate from banana cultivar Kanchi kela of ABB genotype [J]. *J Mycol Plant Pathol*, 2012, 42(1): 124-127.
- [8] SHARMAN M, THOMAS J E, DIETZGEN R G. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana [J]. *J Virol Methods*, 2000, 89(1/2): 75-88.
- [9] GREGOIRE L P, MARIE-LINE I C, ISABELLE A. Improved detection of episomal *Banana streak virus* by multiplex immunocapture PCR [J]. *J Virol Methods*, 2006, 137(1): 7-13.
- [10] JAMES A P, GEIJSKES R J, DALE J L, et al. Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect *Banana streak virus* that also discriminates between integrated and episomal virus sequences [J]. *Plant Dis*, 2011, 95(1): 57-62.
- [11] PENG Jun, FAN Zaifeng, HUANG Junsheng. Rapid detection of *Banana streak virus* by loop-mediated isothermal amplification assay in South China [J]. *J Phytopathol*, 2012, 160(5): 248-250.
- [12] HARPER G, HULL R, LOCKHART B, et al. Viral sequences integrated into plant genomes [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2002, 40: 119-136.
- [13] GEERING A D W, POOGGIN M M, OLSZEWSKI N E, et al. Characterisation of Banana streak Mysore virus and evidence that its DAN is integrated in the B genome of cultivated *Musa* [J]. *Arch Virol*, 2005, 150(4): 787-796.
- [14] GAYRAL P, NOA-CARRAZANA J, LESCOT M, et al. A single *Banana streak virus* integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus [J]. *J Virol*, 2008, 82(13): 6697-6710.
- [15] HARPER G, HART D, MOULT S, et al. *Banana streak virus* is very diverse in Uganda [J]. *Virus Res*, 2004, 100(1): 51-56.
- [16] REMANS T, GROF C P L, EBERT P R, et al. Identification of functional sequences in the pregenomic RNA promoter of the *Banana streak virus* Cavendish strain (BSV-CaV) [J]. *Virus Res*, 2005, 108(1/2): 177-186.
- [17] 何云蔚, 陈秀, 阮小蕾, 等. 香蕉线条病毒 ORF I 基因的原核表达及抗体制备 [J]. *华南农业大学学报*, 2009, 30(3): 89-91.
- [18] 何云蔚, 陈秀, 阮小蕾, 等. 香蕉线条病毒 ORF II 基因的原核表达及抗体制备 [J]. *植物病理学报*, 2009, 39(1): 100-103.
- [19] 何云蔚, 阮小蕾, 陈秀, 等. 香蕉线条病毒侵染性克隆的构建 [C] // 彭友良, 朱有勇. 中国植物病理学会 2009 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 351-352.
- [20] 邓丛良, 韩丽娟, 燕照玲, 等. 白草花叶病毒 CP 基因在大肠杆菌中的表达及抗血清的制备 [J]. *植物病理学报*, 2005, 35(5): 442-445.
- [21] 谢丽君, 何云蔚, 陈秀, 等. 香蕉线条病毒广东分离物基因组序列测定和特征分析 [C] // 彭友良, 康振生. 中国植物病理学会 2007 年学术年会论文集. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2007: 267-269.

【责任编辑 霍欢】