

大豆蚜内共生菌 *groEL* 克隆及表达水平分析

徐忠新,王 红,赵奎军,韩岚岚

(东北农业大学 农学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:为了解大豆蚜(*Aphis glycines* Matsumura)传播的大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)与其体内共生菌产生的病毒结合蛋白(GroEL)之间的作用机制,运用 RT-PCR 技术克隆得到大豆蚜内共生菌 *groEL* 基因全序列,把该基因与 pET21b 载体重组后进行原核表达,经 Ni-Agarose His 亲和层析得到纯化的蛋白,并利用荧光定量 PCR 技术分析了饲毒不同时间、不同龄期大豆蚜内共生菌 *groEL* 基因表达量的变化。序列分析表明:大豆蚜内共生菌 *groEL* 基因全长序列为 1 647 bp,编码 548 个氨基酸,推测蛋白分子量和 pI 值分别为 69 kDa 和 5.24,成功构建重组载体 pET21b-GroEL 进行原核表达,Western-blot 鉴定确定为目的蛋白,蛋白可溶性分析发现重组蛋白为包涵体。随饲食 SMV 时间的延长大豆蚜内共生菌 *groEL* 的表达量显著增加,且无翅成虫与有翅成虫内共生菌 *groEL* 的表达量显著高于其它 4 个若虫期。大豆蚜内共生菌 *groEL* 基因能在原核细胞中稳定、正确表达,并且大豆蚜在饲食 SMV 后会诱导其内共生菌 *groEL* 的表达,从而增加 SMV 爆发流行的可能性。

关键词:大豆蚜;大豆花叶病毒;内共生菌;病毒结合蛋白基因;荧光定量 PCR

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.06.0964

Molecular Cloning and Analysis of Expression Levels of *Buchnera groEL* of *Aphis glycines*(*Hemiptera*: *Aphididae*)

XU Zhong-xin, WANG Hong, ZHAO Kui-jun, HAN Lan-lan

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to probe into the mechanism underlying interaction between propagation of mosaic virus (soybean mosaic virus, SMV) by *Aphis glycines* and its *Buchnera*-producing GroEL protein. The full-length *groEL* sequence was amplified from the *Buchnera* of *Aphis glycines* by RT-PCR technique, and the gene was recombined into pET21b and expressed in prokaryotic expression system. Meanwhile purified recombinant protein was obtained by Ni-Agarose His affinity chromatography, the content of SMV in *Aphis glycines* at different time and the changes of expression levels of *groEL* gene after feeding SMV were analyzed using Real-time quantitative PCR technology. The sequence analysis showed that the full-length *Buchnera groEL* sequence of *Aphis glycines* is 1 647 bp in length encoding 548 amino acid residues with the predicted molecular weight 69 kDa and pI 5.24. The built recombinant vector pET21b-GroEL was expressed in prokaryotic expression system, and the recombinant protein was determined as the target protein using western-blot analysis. The *Buchnera groEL* gene expression levels of *Aphis glycines* was increased significantly with the extension of time of feeding SMV, the expression level of *Buchnera groEL* gene expression content in wingless and winged adults were significantly higher than the other four nymphs periods. All these results above showed that *Buchnera groEL* gene of *Aphis glycines* was expressed stably and correctly in *E. coli*, and the expression of *Buchnera groEL* was induced in *Aphis glycines* after feeding on SMV, which increases the possibility of SMV spread in soybean field.

Keywords: *Aphis glycines*; soybean mosaic virus; *Buchnera*; GroEL; Real-time quantitative PCR

大豆蚜(*Aphis glycines* Matsumura)属半翅目(*Hemiptera*)蚜科(*Aphididae*)蚜属(*Aphis*),是栽培大豆的主要害虫之一^[1]。其分布范围很广,在美国、加拿大、日本等地均有发生,已成为一种广受关注的世界性大豆害虫。其携带传播的大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)可引起大豆花叶病^[2-3],造成植株发生黄褐斑、萎缩卷曲、矮化和豆

荚畸形等症状,对大豆的产量和品质造成了严重危害^[4-5]。

昆虫传播病毒的过程与多种蛋白质密切相关,病毒自身的蛋白质、昆虫内共生菌产生的蛋白质等都影响昆虫携带病毒的种类和传播病毒的特性^[6-7]。蚜虫体内由内共生菌产生的 GroEL 蛋白属于原核与真核生物分子伴侣中(cpn60)的多功能型

收稿日期:2014-10-22

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04);公益性行业(农业)专项基金(201103002)。

第一作者简介:徐忠新(1990-),男,硕士,主要从事大豆主要害虫综合防治研究。E-mail: zxxuneau@sina.com。

通讯作者:赵奎军(1960-),男,教授,博导,主要从事大豆主要害虫综合防治研究。E-mail: kjzhao@163.com。

蛋白,可以保护植物病毒在进入蚜虫体内的过程中免遭降解,从而保证植物病毒在蚜虫体内的持久性^[8-9]。如果能够使植物产生 *groEL* 抗体类似物,则有可能中和昆虫体内共生菌的 *groEL* 基因,使之不能携带病毒,从而减少植物病毒病的传播与发生,即预示着可能通过 *groEL* 基因介导进行植物抗病毒育种。Morin S 等^[10]用蚜虫内共生菌 *groEL* 抗血清在烟粉虱携毒之前进行饲喂,发现烟粉虱传播番茄黄花曲叶病 (TYLCV-Is) 的几率下降了 80% 以上。吴云锋等^[11]将禾谷缢管蚜、麦二叉蚜和麦长管蚜放在含有青霉素-蔗糖的薄膜上取食 1 h 后,进行正常饲喂和传毒,发现其传播大麦黄矮病毒的效率均下降。Akad 等^[12]将烟粉虱 GroEL 蛋白在烟草韧皮部特异性表达,使病毒粒子被包裹在 GroEL 蛋白中,从而抑制了病毒的复制和移动,获得了转基因抗病毒西红柿。目前,关于昆虫体内共生菌产生的 *groEL* 原核表达在禾谷缢管蚜、玉米蚜和桃蚜上已有报道^[13-15]。为探讨 GroEL 蛋白在大豆蚜体内的具体功能机制,特别是其与大豆花叶病毒的作用关系,本文研究了大豆蚜饲毒不同时间获取大豆花叶病毒水平及饲毒前后其体内共生菌的 GroEL 表达量的变化情况,为进一步探讨 *groEL* 基因的功能以及利用 *groEL* 基因介导进行抗大豆花叶病毒的育种研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源为大豆蚜 (*Aphis glycines* Matsumura), 采集地为黑龙江省哈尔滨市东北农业大学香坊实习基地,于室内恒温光照培养箱转接饲养扩繁,饲养条件为:温度(25±1)℃、光照(L:D)=14:10、相对湿度(RH)70%。供试大豆品种为合丰 25。

大豆花叶病毒 (SMV) 由南京农业大学农学院作物遗传与种质创新国家重点实验室提供 SC3 毒系。

1.2 主要试剂

低熔点琼脂糖购自 Promega 公司;DL2000 DNA Marker、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶和限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 购自 TaKaRa 公司;pEasy-T1 克隆载体、彩虹蛋白 marker 和 Ni-Agarose His 标签亲和层析柱采购于全式金公司;大肠杆菌 *DH5α*、BL21、pET21b 质粒由本实验室保存,其余试剂为进口或国产分析纯。引物合成与测序由上海生工生物工程技术服务有

限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 大豆蚜内共生菌 DNA 的提取 分别取 100 mg 冰冻于-80℃冰箱内的饲毒与未饲毒大豆蚜,经 400 mL DNA 裂解液[100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0),25 mmol·L⁻¹ EDTA (pH8.0),500 mmol·L⁻¹ NaCl,1% SDS]裂解,之后用酚氯仿抽提法提取虫体基因组 DNA^[16]。提取的 DNA 样品经紫外分光光度计及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后保存于-20℃冰箱中备用。

1.3.2 引物设计 根据崔晓峰等^[15]发表的序列(登录号:AF367248)设计特异性引物。其序列如下(GroELF2 和 GroELR2 下划线分别为 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点):

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3')Primer sequence
GroELF1	CCTGCAGATGGCCGCTAAAGATGAAA
GroELR1	ACGGATCCTTACATTCCACCCATGCC
GroELF2	<u>CGCGGATCCC</u> ATGGCCGCTAAAGATGAAA
GroELR2	<u>CCCAAGCTTTT</u> ATCATCATTCGCCCCATAC
q GroELF3	TCTAAGTGGAGGTTCTGTGATTTC
q GroELR3	TGACTAATACGGCTTTGGATG
18S-F	ATTGACGGAAGGGCACC
18S-R	CGCTCCACCAACTAAGAACG

1.3.3 大豆蚜内共生菌 *groEL* 基因 PCR 扩增 PCR 反应体系为 50 μL,其中 10×PCR buffer 5 μL、dNTPs 4 μL、DNA 模板 3 μL、0.01 mmol·L⁻¹ 的上游和下游引物各 1 μL、*Taq* DNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹) 0.5 μL。扩增条件为 94℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 变性 1 min,54℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环,72℃ 后延伸 10 min,4℃ 保存。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶检测,然后在凝胶成像分析系统中观察并照相,记录结果。

1.3.4 连接、转化与筛选 PCR 扩增产物经 DNA 回收试剂盒纯化后,连接 pMD18-T 载体后转化大肠杆菌 *Escherichia coli* *DH5α* 感受态细胞,涂于含氨苄青霉素的 LB 平板 37℃ 培养过夜,挑取单菌落,提取质粒 DNA,通过菌液 PCR、酶切进行鉴定后测序。

1.3.5 序列分析 用 DNASTar 软件寻找 *GroEL* 核酸序列的 ORF 区,将其翻译为氨基酸序列,利用 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)寻找并下载 *groEL* 基因同源序列。然后利用 Clustal X 1.83 软件进行完全比对后,再用 MEGA 5.05 软件中的 Neighbor-Joining(自举检验数 1 000)方法进行分子系统进化分析。蛋白质分子量、等电

点预测在 Expsy 服务器 (<http://web.expasy.org/computepi/>) 分析。蛋白翻译、基因序列分析及其理化性质预测采用蛋白组学 (<http://web.expasy.org/protparam>) 进行分析。蛋白的功能域预测利用 NCBI 网站的在线工具 Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 信号肽段的预测采用 SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白结构域, 所有参数选择默认值。

1.3.6 诱导、表达和鉴定 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切载体 pET21b 和目的片段 *groEL*, 将回收产物连接并转化于感受态细胞 BL21 中。选取阳性菌株接种于 5 mL LB (含有 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp) 液体培养基中, 37℃, 220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养过夜; 取 1 mL 菌液接种于 100 mL LB (含有 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ amp) 液体培养基中, 37℃, 220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养至 OD 值为 0.6 左右, 加入终浓度 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG (24 $\text{mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 进行诱导表达, 不同诱导温度 (10, 25, 37℃) 和不同饲毒时间 (0, 36, 72 h) 220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下继续振荡培养 6 h。取 1 mL 菌液至离心管中, 室温 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 弃上清, 沉淀重悬于 150 μL 的 1×蛋白上样缓冲液中, 煮沸 10 min, 室温 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 取 15 μL 上清进行 SDS-PAGE (15% 分离胶和 4% 浓缩胶), 检测蛋白的表达。为将重组蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜, 用杂交膜清洗液 TBS 洗涤后, 以配制好的封闭液进行孵育。将一抗 (His-tag 抗体), 抗体反应液 HRP (鼠) 及抗体稀释液混合而成的抗体孵育液加至膜上, 于摇床上以适当速度孵育 40 min, 经洗涤后, 加底物 DAB 显色, 拍照。

对所表达的大豆蚜内共生菌 GroEL 蛋白进行 Western-blot 检测分析 (以未含 DNA 片段质粒的 PET-21b 菌株作为对照)。

1.3.7 目的融合蛋白的纯化 诱导表达后的菌体经超声波裂解后采用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒 (TransGen Biotech) 纯化。将菌体裂解液溶解于 7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素溶液后, 先用平衡缓冲液平衡层析柱, 上样后用平衡缓冲液对层析柱进行洗涤, 经不同浓度的咪唑洗脱液洗脱目的蛋白。

1.3.8 不同龄期及不同接毒时间大豆蚜内共生菌 *groEL* 的差异分析 分别提取健康大豆蚜及饲毒 36, 72 h 的大豆蚜各个龄期若虫、无翅成虫和有翅成虫内共生菌 DNA, 将 DNA 定量后稀释到 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

参照王渭霞等^[17]和谈忠鸣等^[18]方法根据 GroELF1 和 GroELR1 扩增得到的序列设计特异性引物 qGroELF3 和 qGroELR3 进行荧光定量 PCR 分析, 以 18S-R 和 18S-F 作为内参基因 (表 1)。

荧光定量 PCR 采用 Quantity PCR Kit (Bio-Rad) 试剂盒。扩增体系为: 10 μL SYBR, 引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 1 μL , 2 μL DNA 模板, 加灭菌双蒸水至 20 μL 。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 10 s, 54℃ 退火 12 s, 循环 40 次。反应结束后记录 C_T 值, 每个处理 3 次重复。

1.4 数据分析

相对表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行分析^[19]。采用 SPSS 17.0 统计软件单因素方差分析 (ANOVA) 进行数据分析, 采用 LSD 法进行多重比较检验 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 大豆蚜共生菌内 *groEL* 基因的扩增与序列分析

本研究获得的 *groEL* 基因, 全长为 1 647 bp, 共编码 548 个氨基酸, 测序结果在 NCBI 中用 BLAST 进行相似性检索, 与麦二叉蚜杨凌生物型 (*Schizaphis graminu*) *groEL* 基因序列 (GenBank 登录号: AF434719) 的一致性为 89%, 证明为所需目的片段。将该序列命名为 *AgroEL* (GenBank: KJ543522)。

大豆蚜内共生菌 *groEL* 开放阅读框编码推导的蛋白质分子量约为 69 kDa, 理论等电点 pI 为 5.24, 分子式为 $\text{C}_{2500}\text{H}_{417}\text{N}_{703}\text{O}_{812}\text{S}_{24}$, 由 8 210 个原子组成; 脂肪指数为 94.51, 平均疏水特性 (GRAVY) 为 -0.120, 稳定系数为 72.14, 推测该蛋白比较稳定。结构域分析表明, 该基因翻译后的氨基酸序列具有明显的分子伴侣 cpn60 (Chaperonins 60) 的典型特征, 即氨基酸序列中具有 cpn60 signature: AAVEEGV-VaGGG。采用 SMART 在线软件预测大豆蚜 GroEL 编码的氨基酸序列, 发现其含有 1 个 cpn 结构域, 分布在第 23 ~ 525 位氨基酸, 长度为 503 个氨基酸, E 值为 2.4e-124, 有 4 个 LCR 区域 (low complexity region), 由 83 ~ 96, 291 ~ 302, 402 ~ 424, 539 ~ 548 位的氨基酸组成, 有 1 个卷曲螺旋区域由 337 ~ 368 位的氨基酸组成。利用 TMPRED 预测该蛋白可能有 1 个跨膜区域 (TM) 287 ~ 307, 长度为 21 个氨基酸; Signal P 4.0 预测表明, 该蛋白含有长度为 26 个氨基酸的信号肽: MAPAVFLSLPDLRCSLLLLVT-WVFTP。

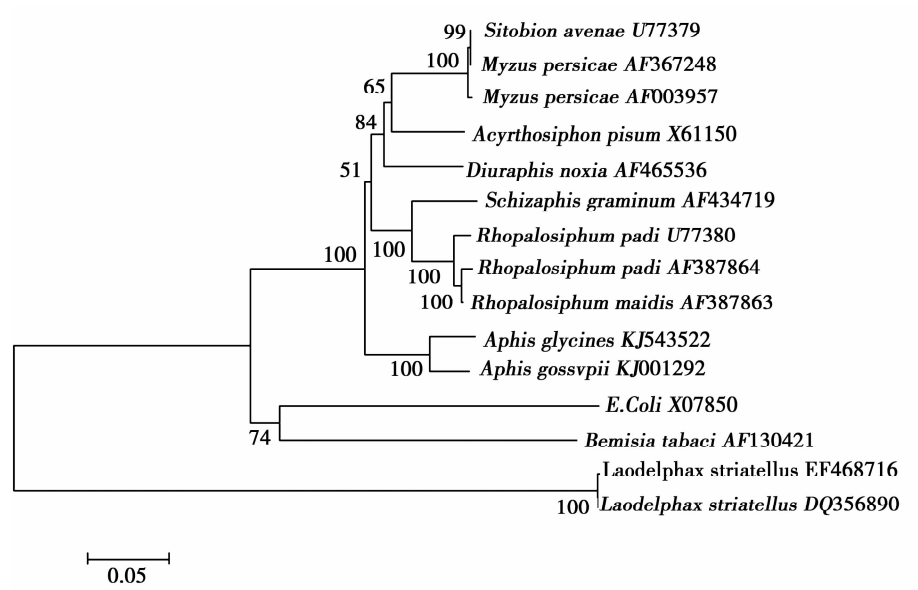
1 ATGGCCGCTAAAGATGTAA¹ATTGGTAAACGAGGCTCGAATTA²AAATGCTTCGCGGAGTTAATGTATTAGCTGAT
1 M A A K D V K F G N E A R I K M L R G V N V L A D
76 GCAGTTAAAGTTACTTTAGGTCCAAAAGGTAGAAATGTAGTTT³AGATAAATCTTTTGGCGCACCTAGTATCACT
26 A V K V T L G P K G R N V V L D K S F G A P S I T
151 AAAGATGGTGTTCAGTAGCTCGCGAGATCGAATTAGAAGATAAATTCGAAAAATATGGGAGCTCAAATGGTGA⁴AA
51 K D G V S V A R E I E L E D K F E N M G A Q M V K
226 GAAGTTGCATCTAAAGCCAATGATGCAGCAGGAGATGGA⁵ACTACAACAGCTACATTACTAGCGCAATCAATAGTG
76 E V A S K A N D A A G D G T T T A T L L A Q S I V
301 AGTAAACCAAAGATTCAAGTGAATACAAAGGTGAGACCAAGAAATTTGCACCGGAAGAAATAAGTAGCATGGTT
101 N E G L K A V A A G M N P M D L K R G I D K A V I
376 AGTGCTGTGAAGAGCTTAAAGTTATCTGTACCTTGTCTGATTCTAAAGCAATTACACAAGTAGGTACTATT
126 S A V E E L K S L S V P C S D S K A I T Q V G T I
451 TCTGCTAATGCTGATGAAAAAGTTGGAGCTTTAATTGCGGAGGCTATGGAAAAAGTAGGTAATGATGGAGTGATT
151 S A N A D E K V G A L I A E A M E K V G N D G V I
526 ACGGTAGAAGAAGGAACAGGTTTACAAAACGAACTTGAA⁶GTGTAAAGGTATGCAGTTTGATCGAGGTTATTTA
176 T V E E G T G L Q N E L E V V K G M Q F D R G Y L
601 TCTCCTTACTTTATTAATAAACAGAACTGGGATTGTGAATTAGAAAA⁷CCATATATTTTAATGGCTGATAAA
201 S P Y F I N K P E T G I V E L E N P Y I L M A D K
676 AAAATTTCTAATGTTCTGTGAATGCTTCCAATATTAGAATCCGTTGCAAAATCTGGA⁸AAACCATTATTAATTATT
226 K I S N V R E M L P I L E S V A K S G K P L L I I
751 TCAGAGGATTTAGAAGGAGAAGCGTTAGCTACCTTAGTAGTCAATTCTATGCGTGGAATTGTGAAAGTAGCCGCT
251 S E D L E G E A L A T L V V N S M R G I V K V A A
826 GTTAAAGCTCCTGGATTGGTGATAGAAGAAAAGCAATGTTACAAGGTATTTCGATTCTAAGTGGAGGTTCTGTG
276 V K A P G F G D R R K A M L Q G I S I L S G G S V
901 ATTCAGAAGAACTAGCAATGGAATTAGAAAAATCTACCTTAGAAGATTAGGACAAGCAAAACGTTGTGTAATC
301 I S E E L A M E L E K S T L E D L G Q A K R V V I
976 AATAAAGATACGACAACATAATTGGTGGTGTGGAGAAAAACATGCCATCCAAGCCGTATTAGTCAAATTCGT
326 N K D T T T I I G G A G E K H A I Q S R I S Q I R
1051 CAAGAAATCAAGAAGCTACTTCTGATTATGATAAAGAAAAGTTAAATGAGCGATTAGCTAAGTTATCTGGTGGT
351 Q E I Q E A T S D Y D K E K L N E R L A K L S G G
1126 GTTGCGGTACTGAAAGTTGGAGCTGCAACAGAAGTGGAATGAAAGAGAAAAAAGCTCGTGTGCAAGATGCTTTA
376 V A V L K V G A A T E V E M K E K K A R V E D A L
1201 CATGCAACTCGAGCTGCTGTAGAGAAGGTGTTGTTGCTGGTGGTGGTGTGCATTAGTACGTGTAGCTAGAAAA
401 H A T R A A V E E G V V A G G G V A L V R V A R K
1276 ATATCCAGTTTACGTGGACAAAATGAAGATCAAAATGTTGGCATTAGAGTGGCTTTACGCGCAATGGAAGCTCCT
426 I S S L R G Q N E D Q N V G I R V A L R A M E A P
1351 TTACGTCAAATCGTTTCAAATCAGGTGAAGAACCTTCTGTAGTAACTAATAATGTAAAAGATGGA⁹AAAGGTAAC
451 L R Q I V S N S G E E P S V V T N N V K D G K G N
1426 TACGGTTATAATGCCGCTACTGATGAATATGGGGATATGATTAATTCGGAATATTAGATCCTACTAAAGTTACA
476 Y G Y N A A T D E Y G D M I N F G I L D P T K V T
1501 AGATCCGCTTTACAATACGCTGCTTCTGTTGCTGGTTAATGATTACAACAGAATGTATGGTAACAGATTACCA
501 R S A L Q Y A A S V A G L M I T T E C M V T D L P
1576 AAAGATGAAAAGTCTTCTGATACAAGCGCTTCTCCTGCCGGTGGAATGGGTGGTATGGGCGGAATGATGTAA
526 K D E K S S D T S A S P A G G M G G M G G M M *

灰色阴影为跨膜区;方框所示为低复杂度(LCR);下划线所示为起始密码子和终止密码子。
Transmembrane region is shaded in grey, low complexity region is boxed, while the initiation codon and terminate codon are underlined.

图 1 大豆蚜共生菌内 *groEL* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列
Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *groEL* from *Aphis glycines*

2.2 大豆蚜 GroEL 的系统进化关系分析

利用 MEGA 5.05 对上述 12 种昆虫的 *groEL* 基因进行了系统进化分析(图 2)。结果表明,在选定的 12 种昆虫中,大豆蚜体内共生菌 *groEL* 基因与同为半翅目的棉蚜 *groEL* 基因进化关系较近,而与双翅目、鳞翅目等其他种类的昆虫进化关系较远。



groEL 各基因来源及 GenBank 登录号 (The origin of *groEL* genes and their GenBank accession numbers): 豌豆长管蚜日本生物型 *Acyrthosiphonpisum* (X61150); 大豆蚜 *Aphis glycines* (KJ543522); 烟粉虱以色列生物型 *Bemisiatabaci* (AF130421); 麦双尾蚜 *Diuraphisnoxia* (AF465536); 大肠杆菌 *E. coli* (X07850); 桃蚜杨凌生物型 *Myzuspersicae* (AF367248); 桃蚜荷兰生物型 *Myzuspersicae* (AF003957); 玉米蚜杨凌生物型 *Rhopalosiphummaidis* (AF387863); 禾谷缢管蚜杨凌生物型 *Rhopalosiphumpadi* (AF387864); 禾谷缢管蚜纽约生物型 *Rhopalosiphumpadi* (U77380); 麦二叉蚜杨凌生物型 *Schizaphisgraminum* (AF434719); 棉蚜 *Aphis gossypii* (KJ001292)。

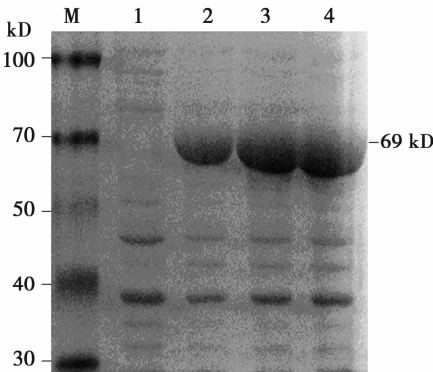
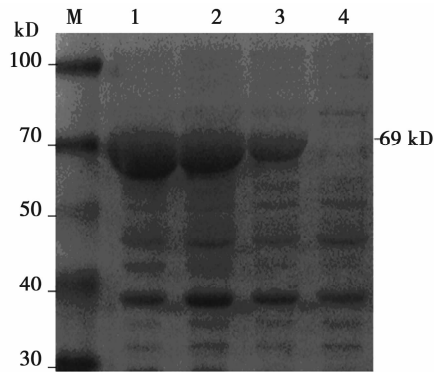
图 2 昆虫 *GroEL* 基因系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic relationships of *GroEL* genes of insects

2.3 大豆蚜共生菌内 *groEL* 基因在大肠杆菌中表达

PET-21b 重组质粒经测序表明,插入片段与克隆序列完全一致,目的基因的开放阅读框与原核表达载体上的 His-Tag 阅读框正确融合。将其转移至 BL21 (DE3) 株系中后,筛选的表达菌株经 0.8 mmol·L⁻¹

的 IPTG 诱导,在相对分子质量接近 69 kDa 处,有一条明显的目的条带,而 pET21b 对照组没有相应的蛋白带出现,SDS-PAGE 电泳显示,通过不同诱导温度和饲毒时间等条件的改变,发现在 10℃ 下进行诱导及饲毒时间 72 h 时,重组蛋白表达较好(图 3 和图 4)。



1: 10℃ 下诱导表达;2: 25℃ 下诱导表达;3: 37℃ 下诱导表达;4: 无诱导剂的对照。
1: 10℃; 2: 25℃; 3: 37℃; 4: Control without IPTG.

图 3 不同温度诱导下大豆蚜 *GroEL* 在 *E. coli* 中的表达
Fig. 3 Expression of *Aphis glycines* *GroEL* under different temperature in *E. coli*

1: 对照;2: 未饲毒大豆蚜诱导表达;3: 饲毒 36 h 诱导表达;4: 饲毒 72 h 诱导表达。
1: Control; 2: Without feeding on SMV; 3: Fed on SMV 36 hours; 4: Fed on SMV 72 h.

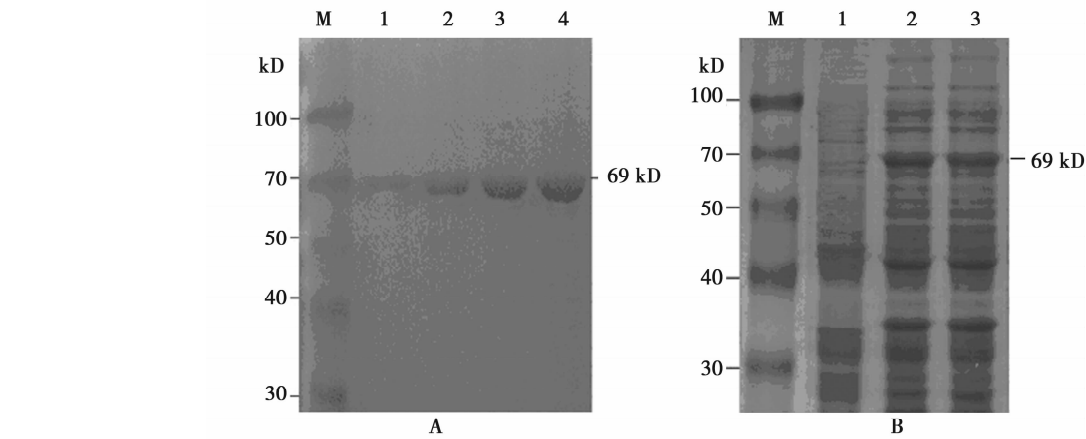
图 4 不同饲毒时间诱导下大豆蚜 *GroEL* 在 *E. coli* 中的表达
Fig. 4 Expression of *Aphis glycines* *GroEL* under different time (feed on SMV) in *E. coli*

2.4 目的融合蛋白的纯化

由图 5A 可以看出,经 Ni-Agarose 柱纯化的大豆蚜 GroEL 蛋白,在 SDS-PAGE 上只呈现单一条带的纯化蛋白。从图 5B 可以看出,上清中没有目的条带,而沉淀中明显有目的条带,说明在原核表达系

统中表达的重组蛋白是一种包涵体蛋白。

同时,对所表达的大豆蚜 GroEL 蛋白进行了 Western-blot 检测分析结果表明,经 IPTG 诱导产生的融合蛋白与 anti-His 抗体发生免疫反应(图 6)。

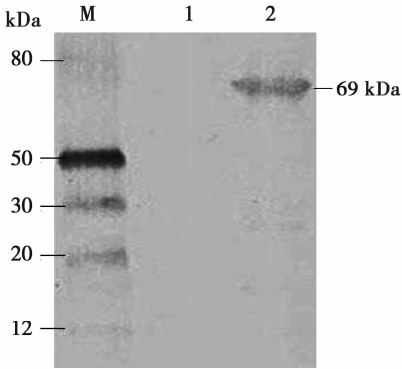


A:M: 标准分子质量蛋白;1~4: 咪唑洗脱液浓度分别为 80,120,160,200 mmol·L⁻¹洗脱的蛋白。B: M: 标准分子质量蛋白;1: 诱导蛋白经超声破碎后的上清;2,3: 诱导蛋白经超声破碎后的沉淀。

M:Protein molecular weightmarker; 1-4: 80, 120, 160 and 200 mmol·L⁻¹ imidazole concentration of protein elution. M:Protein molecular weight marker; 1:Supernatant with ultrasonic disruption after the expression product was induced;by IPTG; 2,3: Deposit with ultrasonic disruption after the expression product was induced by IPTG.

图 5 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 Analysis of recombinant protein by SDS-PAGE



M:标准分子质量蛋白;1: 无诱导剂的对照;2: 大豆蚜 GroEL 蛋白。

M: Protein molecular weight marker; 1: Control without IPTG; 2: The GroEL protein of *Aphis glycines*.

图 6 大豆蚜 GroEL Western-blot 检测

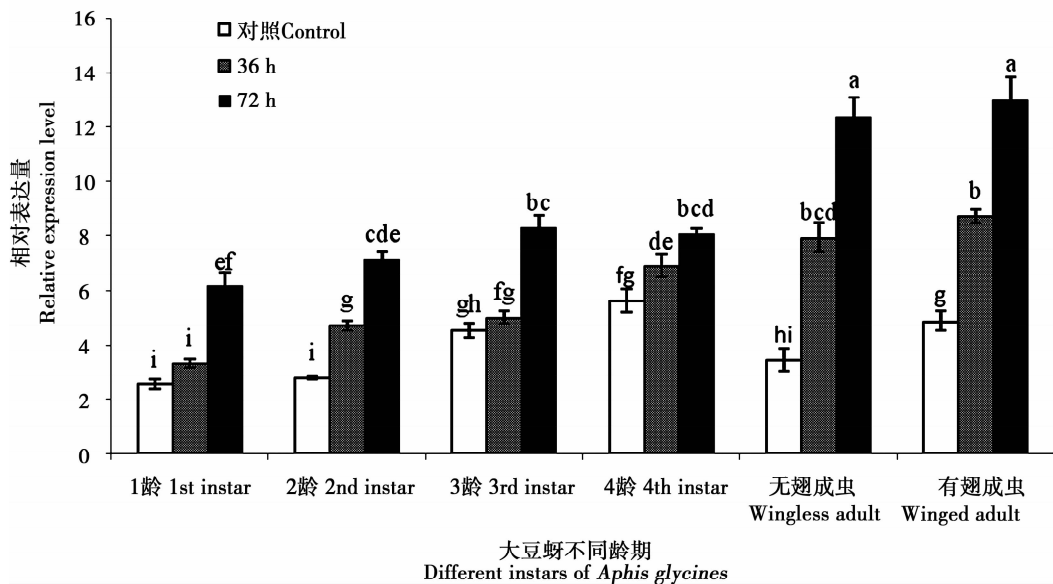
Fig. 6 Western-blot analysis of *Aphis glycines*

2.5 大豆蚜内共生菌内 *groEL* 基因表达量差异的分析

荧光定量 PCR 结果表明(图 7),大豆蚜 1 龄若虫饲毒 72 h 处理后其体内 *groEL* 的表达量显著高于对照组与饲毒处理 36 h 处理的大豆蚜 ($P < 0.05$),分别增加了 2.42 倍和 1.85 倍 ($F = 31.25$, $df = 2, 6$, $P = 0.0007$),后两者无显著性差异;大豆蚜 2 龄若虫在饲毒 72 h、36 h 体内 *groEL* 的表达量

均高于对照组 ($P < 0.05$),别增加了 2.55 倍和 1.51 倍 ($F = 122.578$, $df = 2, 6$, $P = 0.0001$);大豆蚜 3 龄若虫在饲毒 72 h 处理后其体内 *groEL* 表达量显著高于对照组及饲毒处理 36 h 处理的大豆蚜 ($P < 0.05$),分别增加了 1.83 倍和 166 倍 ($F = 38.815$, $df = 2, 6$, $P = 0.0004$),后两者差异不显著;大豆蚜 4 龄若虫在饲毒 72 h、36 h 体内 *groEL* 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$),分别增加 1.43 倍和 1.17 倍 ($F = 11.254$, $df = 2, 6$, $P = 0.0093$),且饲毒 72 h 处理达到极显著水平 ($P < 0.01$);无翅成虫饲毒处理后其体内 *groEL* 基因表达量显著高于对照组,达到极显著水平 ($P < 0.01$),表达量分别增加了 3.59 倍和 1.56 倍 ($F = 59.811$, $df = 2, 6$, $P = 0.0001$);而有翅成虫饲毒处理后其体内 *groEL* 表达量显著高于对照组,达到极显著水平 ($P < 0.01$),表达量分别增加了 2.66 倍和 1.49 倍 ($F = 54.784$, $df = 2, 6$, $P = 0.0001$)。

从处理时间效应来看,随着饲毒时间延长大豆蚜体内 *groEL* 表达量增加显著;从大豆蚜处理龄期来看,无翅成虫与有翅成虫体内 *groEL* 的表达量显著高于其它 4 个若虫期,说明不同处理时间下高龄期大豆蚜体内 *groEL* 表达量增加的趋势高于低龄期。



数据为平均值 ± 标准误;同种颜色柱上不同小写字母表示基因的相对表达水平差异显著 ($P < 0.05$, LSD 多重比较检验)。
Data in the figure are mean ± SE; Different lowercase letters above columns with the same colour indicate statistically significant differences at the 0.05 level (LSD multiplecomparison test).

图 7 *groEL* 在大豆蚜不同龄期相对表达水平
Fig. 7 Expression level of *groEL* in different instars of *Aphis glycines*

3 结论与讨论

随着全球气候的变暖,外来生物入侵加剧^[20],植物病毒病的发生也日趋严重。尤其是近年来由褐飞虱(*Nilaparvatalugens*)传播的水稻矮缩病毒病(rice dwarf virus, RDV)和由烟粉虱(*Bemisiatabaci*)传播的番茄黄化曲叶病毒病在世界范围内暴发流行^[21-22],给各国的农业生产造成了巨大损失。研究显示,昆虫体内存在大量内共生菌,其在体内为昆虫提供必须的氨基酸、蛋白质等物质。GroEL 蛋白是一种昆虫内共生菌编码的与传毒密切相关的蛋白质,由昆虫腹部一种专化的脂肪体细胞所包含的胞内共生菌合成^[23]。研究表明,GroEL 蛋白在昆虫的可持续性循环传播病毒的过程中,起到保护病毒粒子能顺利通过昆虫的血淋巴而不被降解的作用^[24-25]。Edelbaum 等^[26]去除共生菌或使用抗生素处理蚜虫后,进入血淋巴中的病毒与 GroEL 蛋白结合后将会被蛋白酶类物质降解,蚜虫将不能传播病毒甚至失去生存能力。

本研究克隆了大豆蚜体内 *groEL* 的序列全长(1 647 bp),构建表达载体并得到约 69 kDa 的目的融合蛋白,结果显示该基因在大肠杆菌中能够稳定、高效表达并得以纯化,可在短期内获得大量具有生理活性的目的蛋白。利用荧光定量 PCR 技术检测了不同发育龄期饲毒与未饲毒大豆蚜体内 *groEL* 相对表达水平差异。结果显示,无论饲毒 36 h 还是 72 h 大豆蚜体内 *groEL* 的表达量均显著差异,

即在其获取病毒的状态下 *groEL* 表达量明显高于该生物型在非获毒状态下的表达量。在饲毒 36 和 72 h 两种状态下,饲毒 72 h 处理的大豆蚜体内 *groEL* 的表达量均显著高于饲毒 36 h 处理的大豆蚜。这表明,在大豆蚜获取病毒的过程中可能诱导了其体内相关传毒蛋白的表达,从而形成了一种类似协同效应的调节机制在大豆花叶病毒通过大豆蚜体内的过程中起到保护作用,从而保证病毒在运输过程中免于被降解,进而保证了病毒的高效传播。这一研究结果的发现,更好地解释了近年来伴随着大豆蚜在全国部分地区爆发蔓延而日益严重的大豆花叶病毒病的发生^[27]。另外,张洁等^[28]用感染水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)的水稻病株对传毒介体白背飞虱进行处理后,发现白背飞虱体内可溶性糖、蛋白质等能源物质含量显著增加,可能会导致其迁飞能力提升,增加了 SRBSDV 暴发流行的可能性,推测这可能是由于对照组大豆蚜接毒处理后其体内的 GroEL 等蛋白含量显著增加,这和本研究结果是一致的。

蚜虫的唾液中检测到类似 GroEL 蛋白的分子存在,其结果与大肠杆菌分子伴侣 GroEL 蛋白参与多肽的折叠、蛋白的组装和转位等过程分析相似,而大蚜虫 GroEL 蛋白是否还参与其体内病毒传播的其他过程有待于进一步验证。*groEL* 的研究不但为了解该基因在大豆蚜体内参与病毒传播的作用机制奠定基础,而且可以通过 *groEL* 基因介导进行植物抗病毒育种。

参考文献

- [1] Liu J, Wu K M, Hopper K R, et al. Population dynamics of *Aphis glycines* (Homoptera: Aphididae) and its natural enemies in soybean in Northern China[J]. Annals of the Entomological Society of America, 2004, 97(2): 235-239.
- [2] 郭井泉, 张明厚. 大豆花叶病毒(SMV)主要介体及其传毒效率研究[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 55-62. (Guo J Q, Zhang M H. Study on the important of soybean mosaic virus and their transmission efficiencies[J]. Soybean Science, 1989, 8(1): 55-62.)
- [3] Hohn T. Plant virus transmission from the insect point of view [J]. American Academy of Sciences, 2007, 104 (46): 17905-17906.
- [4] 王素云, 暴祥致, 孙雅杰, 等. 大豆蚜虫对大豆生长和产量影响的试验[J]. 大豆科学, 1996, 15(3): 243-247. (Wang S Y, Bao X Z, Sun Y J, et al. Study on effect of population dynamics of soybean aphid (*Aphis glycines*) on both growth and yield of soybean[J]. Soybean Science, 1996, 15(3): 243-247.)
- [5] Wu T L, Ma X H, Yao L M, et al. Identification of soybean resources of resistance to aphids[J]. Agricultural Sciences in China, 1996, 8(8): 979-984.
- [6] Ishikawa H. Characterization of protein species synthesized *in vivo* and *in vitro* by an aphid endosymbiont[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1984, 14(4): 417-425.
- [7] Power A G. Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(4): 336-340.
- [8] Gray S M, Banerjee N. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63(1): 128-148.
- [9] 谭周进, 肖启明, 谢丙炎, 等. 昆虫内共生菌及其传病毒相关 *groEL* 蛋白[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(5): 498-501. (Tan Z J, Xiao Q M, Xie B Y, et al. Insect endosymbionts and their protein GroEL relation to transmitting viruses[J]. Letters in Biotechnology, 2004, 15(5): 498-501.)
- [10] Morin S, Ghanim M, Zei D M, et al. A *groEL* homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus [J]. Virology, 1999, 256(1): 75-84.
- [11] 吴云锋, 林林, 崔晓峰. 麦二叉蚜体内病毒结合蛋白基因的克隆和原核表达[J]. 病毒学报, 2002, 18(3): 275-278. (Wu Y F, Lin L, Cui X F, et al. Cloning and prokaryotic expression of virus binding protein gene from *Schizaphis graminum* [J]. Chinese Journal of Virology, 2002, 18(3): 275-278.)
- [12] Akad F, Dotan N, Czosnek H. Trapping of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and other plant viruses with a *groEL* homologue from the whitefly *Bemisia tabaci*[J]. Archives of Virology, 2004, 149(8): 1481-1497.
- [13] 吴云锋, 崔晓峰, 林林, 等. 禾谷缢管蚜体内的病毒结合蛋白基因的克隆与原核表达[J]. 微生物学报, 2002, 42(4): 448-452. (Wu Y F, Cui X F, Lin L, et al. Cloning and prokaryotic expression of virus binding protein gene from *Schizaphis graminum* [J]. Chinese Journal of Virology, 2002, 42(4): 448-452.)
- [14] 林林, 吴云锋, 崔晓峰. 玉米蚜体内参与传毒的内共生菌 *groEL* 基因的克隆和原核表达[J]. 中国病毒学, 2003, 18(1): 54-57. (Lin L, Wu Y F, Cui X F. Cloning and prokaryotic expression of *groEL* gene of endosymbiotic bacterium from *Rhopalosiphum maidis*[J]. Virologica Sinica, 2003, 18(1): 54-57.)
- [15] 崔晓峰, 吴云锋, 林林, 等. 桃蚜体内与病毒结合的共生菌 *Buchnera GroEL* 基因的克隆和序列分析[J]. 中国病毒学, 2001, 17(1): 69-72. (Cui X F, Wu Y F, Lin L, et al. Cloning and sequence analysis of *Buchnera GroEL* gene from endosymbiotic bacterium of *Myzus persicae*[J]. Virologica Sinica, 2001, 17(1): 69-72.)
- [16] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
- [17] 王渭霞, 罗举, 赖凤香, 等. 水稻褐飞虱内生共生细菌 *Arsenophonus* 的鉴定和系统分析[J]. 昆虫学报, 2010, 53(6): 647-654. (Wang W X, Luo J, Lai F X, et al. Identification and phylogenetic analysis of symbiotic bacteria *Arsenophonus* from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2010, 53(6): 647-654.)
- [18] 谈忠鸣, 李志峰, 吴斌, 等. 基于 *GroEL* 基因的实时荧光定量 PCR 检测恙虫病东方体方法的建立及评价[J]. 中国人兽共患学报, 2014, 30(11): 1121-1124. (Tan Z M, Li Z F, Wu B, et al. Establishment and evaluation of real-time PCR assay for detection of *Orientia tsutsugamushi* based on the *GroEL* gene[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2014, 30(11): 1121-1124.)
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression-data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Wan F, Zhang G, Liu S, et al. Invasive mechanism and management strategy of *Bemisia tabaci* (*Gennadius*) biotype B: Progress report of 973 Program on invasive alien species in China[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2009, 52: 88-95.
- [21] Chen H, Chen Q, Omura T, et al. Sequential infection of rice dwarf virus in the internal organs of its insect vector after ingestion of virus[J]. Virus Research, 2011, 160(1-2): 389-394.
- [22] Zhang T, Luan J B, Qi J F, et al. Begomovirus-whitefly mutualism is achieved through repression of plant defences by a virus pathogenicity factor[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(5): 1294-1304.
- [23] Douglas A E. Nutritional interactions in insect-microbial symbiosis; Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*[J]. Annual Review of Entomology, 1998, 43: 17-37.
- [24] Hogenhout S A, Vander W F, Verbeek M, et al. Potato leafroll virus binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic *GroEL* homolog[J]. Journal of Virology, 1998, 72: 358-365.
- [25] Hogenhout S A, Vander W F, Verbeek M, et al. Identifying the determinants in the equatorial domain of *Buchnera GroEL* implicated in binding potato leafroll virus[J]. Journal of Virology, 2000, 74: 4541-4548.
- [26] Edelbaum D, Gorovits R, Sasaki S, et al. Expressing a whitefly *GroEL* protein in *Nicotiana benthamiana* plants confers tolerance to tomato yellow leaf curl virus and cucumber mosaic virus, but not to grapevine virus or tobacco mosaic virus[J]. Archives of Virology, 2009, 154(3): 399-407.
- [27] Michael J S, Jennifer S T, Bartph J T. Plant mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods [J]. Annual Review of Entomology, 2005, 51: 663-89.
- [28] 张洁, 秦小娃, 郑雪, 等. 饲食感染 SRBSDV 的水稻植株对传毒介体白背飞虱相关能源物质含量的影响[J]. 环境昆虫学报, 2013, 35(5): 597-602. (Zhang J, Qin X W, Zheng X, et al. Effects of SRBSDV - infected rice on the accumulation of energy substances of the virus vector, *Sogatella furcifera*[J]. Journal of Environmental Entomology, 2013, 35(5): 597-602.)