

利用免疫荧光标记技术分析 TVDV 在介体 蚜虫消化道内的分布*

熊 锋^{1,2#}, 吴 维^{2#}, 毛倩卓², 刘琴利¹, 陈海如¹, 魏太云^{2**}, 李 凡^{1**}

(1. 云南农业大学, 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南 昆明 650201;

2. 福建农林大学 植物病毒研究所, 福建 福州 350002)

摘要:【目的】制备 TVDV CP 蛋白抗血清, 明确 TVDV 侵入蚜虫消化道的部位以及 TVDV 在蚜虫体内的分布。【方法】首先构建原核表达载体 pDEST17-TVDV-CP, 所得载体转化到 *Rocceta* 菌株中诱导表达 TVDV CP 蛋白, 收集目的蛋白免疫小鼠制备 TVDV CP 特异性抗血清。再利用制备的抗血清, 通过免疫荧光技术标记 TVDV, 对 TVDV 在介体蚜虫中的分布解剖观察。【结果】TVDV CP 蛋白在 *Rocceta* 菌株中, IPTG 浓度为 1、0.5、0.2、0.1 mmol/L, 温度为 28 ℃ 都能成功诱导表达; 所得抗血清对 TVDV 侵染蚜虫总蛋白进行 western blot 检测, 检测到大小约 24 ku 特异性条带; 对免疫荧光标记的蚜虫消化道进行共聚焦观察, 在蚜虫中肠上皮细胞检测到标记的 TVDV 荧光信号。【结论】制备了 TVDV CP 特异性抗血清, 明确了 TVDV 分布于介体蚜虫消化道的中肠, 由介体蚜虫以循环方式传播。

关键词: 烟草丛顶病; 烟草扭脉病毒; 免疫荧光; 蚜虫; 中肠

中图分类号: S 435.72

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2018) 02-0208-05

Analysis of the Distribution of TVDV in the Alimentary Canal of *Myzus persicae* by Immunofluorescence

XIONG Feng^{1,2}, WU Wei², MAO Qianzhuo², LIU Qinli¹, CHEN Hairu¹, WEI Taiyun², LI Fan¹

(1. State Key Laboratory of Agricultural Biodiversity for Pest Management of Ministry of Education,

Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Institute of Plant Virology,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: [Purpose] The objective of this study was to generate the specific antiserum of TVDV CP and to study the distribution of TVDV in the alimentary canal of *Myzus persicae*. [Method] The prokaryotic expression vector of pDEST17-TVDV-CP was constructed and transformed into *Escherichia coli* Rocceta to express the coat protein (CP) of TVDV. The specific antiserum of TVDV CP was obtained through immunizing mice with the purified CP proteins. Then, the TVDV CP antiserum was used to immunolabel TVDV in the transmission vector of *M. persicae*. [Result] The TVDV CP

收稿日期: 2017-05-09

修回日期: 2017-05-20

网络出版时间: 2018-04-03

*基金项目: 国家自然科学基金(31571983); 云南农业大学杰出人才专项资助计划(2015JY01); 云南农业大学研究生科技创新项目(2015yk24)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。熊锋(1991—), 男, 湖北孝感人, 硕士研究生, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: 15877963545@163.com; 吴维(1986—), 男, 湖南岳阳人, 讲师, 主要从事植物病毒研究。E-mail: wuwei_19861115@yahoo.com.cn

**通信作者 Corresponding authors: 魏太云(1975—), 男, 福建福清人, 研究员, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: weitaiyun@fjau.edu.cn; 李凡(1970—), 男, 云南凤庆人, 教授, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: fanlikm@126.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201705009](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201705009)

could be induced at 28 °C by 1, 0.5, 0.2 or 0.1 mmol/L IPTG in Rocceta; an about 24 ku protein could be detected using the specific antiserum through analyzing the total protein of TVDV-infected aphids by Western-blot; TVDV were detected in the midgut epithelial cells of *M. persicae* by immunofluorescence. [**Conclusion**] The specific antiserum of TVDV CP was generated; TVDV distributed in the midgut epithelial cells of *M. persicae*, and were transmitted by *M. persicae* in a circulative manner.

Keywords: tobacco bushy top disease; *Tobacco vein distorting virus*; immunofluorescence; *Myzus persicae*; midgut

烟草丛顶病 (tobacco bushy top disease, TBTD) 由多种病原物复合侵染引起, 是一种对烟草生产带来毁灭性灾害的植物病害。GATES 首次在 1958 年报道该病发生于津巴布韦, 感染了此病害的植株腋芽丛生, 出现顶端优势丧失现象^[1]。随后, 该病害在南非、马拉维、赞比亚等南部非洲国家以及亚洲的巴基斯坦、泰国和中国相继发生, 给烟草生产带来巨大的损失^[2]。1993 年, 烟草丛顶病在云南保山爆发流行, 对当地的烟草生产带来了重大威胁, 该病已成为云南省 20 世纪 90 年代以来唯一导致大面积绝产的烟草病害^[3]。近年来, 烟草丛顶病仍然在云南各个主要烟区零星发生, 但目前中国仅在云南有发生报道^[3]。2014 年在埃塞俄比亚也发现了与云南烟草丛顶病相似的由多种病原物复合侵染引起的烟草病害^[4]。

黄症病毒科 (Luteoviridae) 马铃薯卷叶病毒属 (*Polerovirus*) 的烟草扭脉病毒 (*Tobacco vein distorting virus*, TVDV)^[5-6] 为云南烟草丛顶病的主要病原物之一。自然情况下, 黄症病毒科病毒由蚜虫以持久非增殖方式传播^[7], 病毒被蚜虫取食时, 由蚜虫口针进入肠腔, 肠腔中的病毒由消化道进入血淋巴, 再由血淋巴进入副唾液腺。不同的病毒介体组合中, 病毒在介体昆虫消化道的侵入部位不同, 完成整个循环过程的时间也不同^[7]。TBTD 在田间主要由蚜虫传播, 而且 TVDV 单独能经蚜虫传播, 但 TBTD 其他病原物在缺少 TVDV 的情况下都不能经蚜虫传播, 而与 TVDV 复合侵染时, 都能经蚜虫传播, TVDV 在介导 TBTD 病原物的蚜虫传播中起着重要的作用^[3, 8]。因此, 研究 TVDV 经蚜虫传播的机制, 分析 TVDV 与介体蚜虫的互作关系, 将为有效控制 TBTD 的传播提供重要的参考。本研究通过在大肠杆菌表达菌株中诱导表达 TVDV 的外壳蛋白 (coat protein, CP), 成功获得了 TVDV 的 CP 抗血清, 并利用制备的抗血清对 TVDV 在介体蚜虫

体内进行了定位, 研究结果将为进一步分析 TVDV 在蚜虫体内的侵染循环, TVDV 协助 TBTD 其他病原物进行蚜虫传播的机制等研究提供技术方法和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

烟草丛顶病感病烟株采自昆明市盘龙区, 感病烟株于温室隔离网箱中用蚜虫传毒保存。无毒蚜虫为本实验室养殖的脱毒烟蚜 (*Myzus persicae*)。大肠杆菌 DH5 α 、Rocceta 菌株为本实验室保存。Trizol 试剂, 原核表达载体 pDONR221、pDEST17 购自 Invitrogen 公司。Gateway BP Clonase Enzyme Mix、Gateway LR Clonase Enzyme Mix, Protein A IgG purification kits 购自 Thermo 公司; 通用型 DNA 纯化回收试剂盒 (离心柱型) 购自天根生物科技 (北京) 有限公司; 荧光素粉、phalloidin-FITC 购自 Sigma 公司; 引物 TVDVECPF、TVDVECPR 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 TVDV CP 基因原核表达载体的构建与鉴定

用 Trizol 试剂抽提 TBTD 感染烟株叶片总 RNA 作为模板, 用引物 TVDVECPF: GGG-GACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAATACGGGMGGAG 和 TVDVECPR: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATTTGGGGTTGTGC (正体部分为 TVDV CP 基因序列, 划线部分为重组序列), RT-PCR 扩增出 TVDV CP 基因。用天根通用型 DNA 纯化回收试剂盒回收纯化扩增产物后, 用 Gateway BP Clonase Enzyme Mix 试剂盒克隆到入门载体 pDONOR221, 所得目标载体再转化大肠杆菌 DH5 α 菌株, PCR 筛选阳性克隆, 并测序鉴定。阳性质粒用 Gateway LR Clonase Enzyme Mix 试

剂盒重组连接, TVDV CP 基因重组克隆入载体 pDEST 17, PCR 鉴定为阳性的质粒即为 TVDV CP 基因的原核表达载体 pDEST17-TVDV-CP。

1.3 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

将阳性重组质粒 pDEST17-TVDV-CP 利用热激法转化 *Rocceta* 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上进行筛选。挑单菌落培养后进行 PCR 鉴定, 阳性菌液用于后续的诱导表达。取阳性菌液按 1:100 (体积比) 转接入含 1% 的氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 和氯霉素 (chloramphenicol, Chl) 的 LB 培养基中, 220 r/min、37 ℃ 振荡培养至 $OD_{600}=0.4\sim0.6$ 后, 菌液加入终浓度分别为 1、0.5、0.1、0 mmol/L 的 IPTG 在 28 ℃ 诱导表达 4~6 h, 收集菌液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.4 Western-blot 检测诱导表达的融合蛋白

收集诱导表达后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳凝胶用湿转法将蛋白转到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜) 上; 转膜后, PVDF 膜于 3% BSA 中室温封闭 2 h 后, 用封闭液按 1:3 000 稀释的 His 鼠抗 37 ℃ 孵育 2 h; TBST 清洗, 用封闭液按 1:20 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 在 37 ℃ 下孵育 2 h; 孵育结束后, 用氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 进行显色^[9]。

1.5 TVDV CP 抗血清的制备及 Western-blot 检测制备抗体的特异性

诱导表达的蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后, KCl 染色并割下目标条带, 目标蛋白经透析收集, 用于免疫试验小鼠, 共免疫 5 次, 每 7 d 1 次。最后 1 次免疫 7 d 后, 收集小鼠血清。

提取 TBTD 感病烟株上取食的蚜虫总蛋白, 用制备的 TVDV CP 抗血清为一抗, 以健康蚜虫总蛋白作为对照, 参照 1.4 节进行 Western-blot 检测所制备抗体特异性。

1.6 TVDV 在蚜虫消化道中的定位

所制备的 TVDV CP 抗血清用蛋白 A 亲和柱纯化 IgG。参照贾东升^[9]的方法, 将所得 TVDV CP IgG 交联荧光素, 制备 TVDV CP 荧光抗体 CP-rhodamin 用于标记 TVDV, 用 phalloidin-FITC 抗体标记蚜虫肌动蛋白 (Actin)。

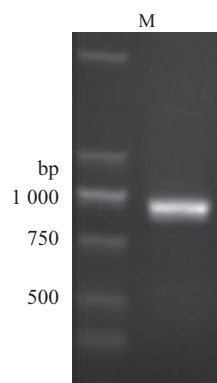
参照 WEI 等^[10]的方法, 对在 TVDV 感病烟株上取食 2 d 以上的蚜虫进行免疫荧光标记。在 1×PBS 中解剖蚜虫消化道, 消化道经固定、渗透后用 CP-rhodamin 与 phalloidin-FITC 于 37 ℃ 孵育

2 h。标记后的蚜虫肠道用共聚焦显微镜进行观察。

2 结果与分析

2.1 TVDV CP 基因原核表达载体的构建与鉴定

以提取的 TVDV 侵染烟株总 RNA 作为模板, RT-PCR 扩增 TVDV 完整的 CP 基因。琼脂糖凝胶电泳检测到大小约 680 bp 的 DNA 片段 (图 1), TVDV CP 基因长 618 bp, 扩增引物两端带有 Gateway 系统重组序列各 30 bp, 因此所扩增片段大小与目的基因大小相符。克隆到入门载体后经测序确认为目的基因, 表达载体命名为 pDEST 17-TVDV-CP。



注/Note: M. Marker; 1. TVDV CP gene.

图 1 RT-PCR 扩增 TVDV CP 基因

Fig. 1 RT-PCR amplification of TVDV CP gene

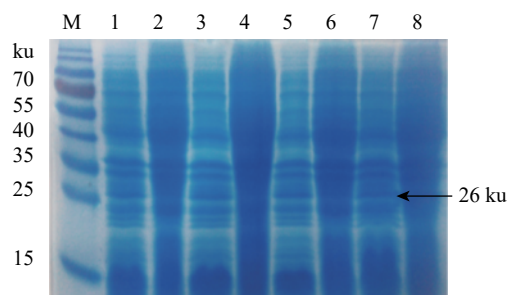
2.2 Western-blot 检测诱导表达的融合蛋白

将原核表达载体转入 *Rocceta* 菌株进行诱导表达, 收集诱导表达后的总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色检测 (图 2), 同时用 Western-blot 进行检测 (图 3)。TVDV 的 CP 蛋白预测大小为 23 ku, 融合的 6×His 标签约 3 ku, 则融合表达的 CP 蛋白约 26 ku。IPTG 浓度为 1、0.5、0.1 mmol/L 时都能检测到与预期蛋白大小相符的条带, 且 Western-blot 也能检测到相应条带, 而对照无相应条带, 表明 TVDV 的 CP 蛋白被特异性诱导表达。

2.3 Western-blot 检测所制备的 TVDV CP 抗体的特异性

分别以在 TBTD 染病烟株上饲毒的蚜虫及健康蚜虫总蛋白为样品, 以制备的 TVDV CP 抗血清为一抗进行 Western-blot 检测。从饲毒蚜虫总蛋白样中可以检测到 1 条约 23 ku 蛋白条带, 大小与预期大小相符, 而健康蚜虫蛋白样品中无条

带(图4), 以上结果表明制备的抗体能特异性检测 TVDV 的 CP 蛋白, 可用于后续的免疫荧光标记试验。



注: M. 蛋白 Marker; 1、3、5、7. IPTG 浓度分别为 1、0.5、0.2、0.1 mmol/L 诱导; 2、4、6、8. 未加 IPTG 诱导的对照; 下同。

Note: M. protein Marker; 1, 3, 5, 7. induced by 1, 0.5, 0.2, 0.1 mmol/L IPTG respectively; 2, 4, 6, 8. no inducal by IPTG; the same as below.

图2 SDS-PAGE 分析 TVDV CP 蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis for the expression of TVDV CP in *E. coli* Rocceta

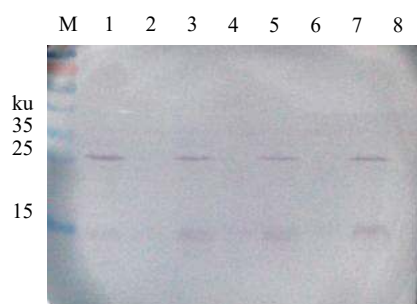
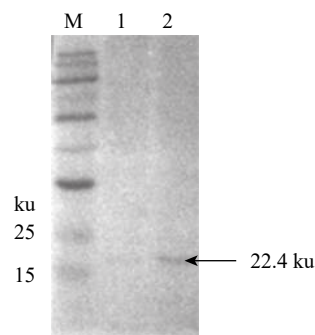


图3 Western-blot 分析 TVDV CP 蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig. 3 Western-blot analysis for the expression of TVDV CP in *E. coli* Rocceta



注: M. 蛋白 Marker; 1. 无毒蚜虫; 2. 带毒蚜虫。

Note: M. protein Marker; 1. nonviruliferous aphids; 2. viruliferous aphids.

图4 Western-blot 检测 TVDV CP 蛋白抗体的特异性

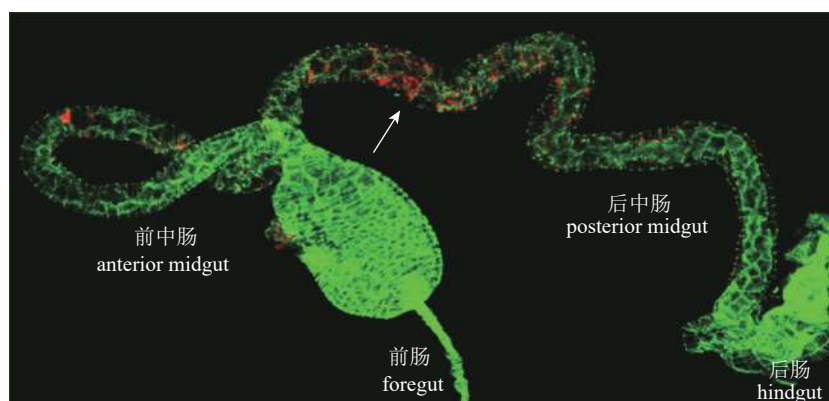
Fig. 4 Western-blot detecting the antibody specificity against TVDV CP

2.4 TVDV 在蚜虫消化道中的分布

解剖在 TVDV 感病烟株上取食 2 d 以上的蚜虫消化系统, 经固定、渗透后, 用标记肌动蛋白 (Actin) 荧光抗体 phalloidin-FITC (绿色) 标记蚜虫消化道骨架, 用 CP-rhodamin (红色) 标记 TVDV。共聚焦显微镜下, 在蚜虫消化道中肠上皮细胞检测到大量特异性的红色荧光(图5), 而蚜虫消化道的前肠、后肠等上皮细胞中未检测到红色荧光, 表明 TVDV 在获毒蚜虫中分布于消化道中肠上皮细胞。

3 讨论

本研究通过在大肠杆菌 Rocceta 菌株中诱导表达 TVDV CP 蛋白并收集蛋白免疫小鼠, 成功获得 TVDV CP 抗血清; 同时, 利用制备的抗血



注: 红色. TVDV; 绿色. actin

Note: red. TVDV; green. actin

图5 TVDV 在蚜虫消化道的分布

Fig. 5 The distribution of TVDV in alimentary canal of aphid

清对 TVDV 在介体蚜虫体内进行了定位。

原核表达载体 pDEST17 在 Rocceta 宿主菌中, 用不同的 IPTG 溶于 28 ℃ 都能诱导出 TVDV CP 蛋白的表达, 而把 pDEST 17 载体转化到表达菌株 BL 21, 在不同的 IPTG 溶度及不同的温度如 16、25、28、37 ℃ 都无法检测到 CP 蛋白的表达。同时, 把 CP 基因构建到原核表达载体 pET28a 并转化到 BL 21 中, 也检测不到 CP 蛋白的表达, 以上结果表明 TVDV CP 蛋白在 BL21 菌株中不表达 (未发表数据)。分析 TVDV CP 蛋白氨基酸序列发现, CP 蛋白含大量稀有密码子, 而 Rocceta 菌株含有内源表达稀有氨基酸的质粒, 这可能是 CP 蛋白能在 Rocceta 菌株中表达的原因。

TVDV 为黄症病毒科马铃薯卷叶病毒属成员, 黄症病毒由蚜虫以循环非增殖方式传播。通过免疫荧光标记, TVDV 定位于蚜虫消化道中肠上皮细胞, 说明 TVDV 由介体蚜虫以循环方式传播, 不同于非循环型, 病毒只能停留在介体口针或前肠^[11]。TVDV 只定位于蚜虫的中肠, 与另外两种马铃薯卷叶病毒属成员——甜菜西方黄化病毒 (*Beet western yellow virus*, BWYV) 和马铃薯卷叶病毒 (*Potato leafroll virus*, PLRV) 一样, 病毒都定位于介体蚜虫中肠^[12-13], 而不同于大麦黄矮病毒 (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV)、禾谷类黄矮病毒 (*Cereal yellow dwarf virus*, CYDV)、大豆矮缩病毒 (*Soybean dwarf virus*, SbDV), 这些病毒定位于介体的后肠^[7, 14], 以及南瓜蚜传黄化病毒 (*Cucurbit aphid-borne yellow virus*, CABYV) 定位于介体的中肠与后肠^[15]。在 BWYV 的通读结构域 (readthrough domain, RTD) 与 CABYV RTD 编码区互换的实验中发现: 用 CABYV RTD 替换了 BWYV RTD 后, 该重组病毒侵入介体消化道的部位与 CABYV 相同, 同样用 BWYV RTD 替换了 CABYV RTD 后, 该重组病毒侵入介体消化道的部位与 BWYV 相同, 病毒进入介体消化道的部位与其 ORF5 编码蛋白有关^[16]。TVDV 的 RTD 与 PRLV、BWYV 的 RTD 氨基酸同源性高达 63.2% 和 57%; 因此, 这 3 种病毒的 RTD 可能具有类似的功能。

[参考文献]

- [1] GATES L F. A virus causing axillary bud sprouting of tobacco in Rhodesia and Nyasaland[J]. *Annals of Applied Biology*, 1962, 50: 169. DOI: [10.1111/aab.1962.50.issue-1](https://doi.org/10.1111/aab.1962.50.issue-1).

- [2] DAVIS D L, NIELSEN M T. Tobacco-production, chemistry and technology[M]. Oxford: Blackwell Science, 1999: 198.
- [3] 李凡, 吴建宇, 陈海如. 烟草丛顶病研究进展[J]. *植物病理学报*, 2005, 35(5): 385. DOI: [10.3321/j.issn:0412-0914.2005.05.001](https://doi.org/10.3321/j.issn:0412-0914.2005.05.001).
- [4] ABRAHAM A D, MENZEL W, BEKELE B, et al. A novel combination of a new umbravirus, a new satellite RNA and potato leafroll virus causes tobacco bushy top disease in Ethiopia[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(12): 3395. DOI: [10.1007/s00705-014-2202-4](https://doi.org/10.1007/s00705-014-2202-4).
- [5] MO X H, CHEN Z B, CHEN J P. Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of Tobacco vein distorting virus[J]. *Virus Genes*, 2010, 41: 425. DOI: [10.1007/s11262-010-0524-1](https://doi.org/10.1007/s11262-010-0524-1).
- [6] ANDREW M K, MICHAEL J A, ERIC B C, et al. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. New York: Elsevier Academic Press, 2012: 1144.
- [7] GRAY S, GILDOW F E. Luteovirus-aphid interactions[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2003, 41: 539. DOI: [10.1146/annurev.phyto.41.012203.105815](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.012203.105815).
- [8] 刘芳. 烟草丛顶病病原物的种类多样性[D]. 昆明: 云南农业大学, 2014.
- [9] 贾东升. SRBSDV 和 RRSV 在介体飞虱体内的侵染机理[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [10] WEI T, KIKUCHI A, MORIYASU Y, et al. The spread of Rice dwarf virus among cells of its insect vector exploits virus-induced tubular structures[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(17): 8593. DOI: [10.1128/JVI.00537-06](https://doi.org/10.1128/JVI.00537-06).
- [11] BRAULT V, UZEST M, MONSIEU B, et al. Aphids as transport devices for plant viruses[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2010, 333(6/7): 524. DOI: [10.1016/j.crv.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.04.001).
- [12] GARRET A, KERLAN C, THOMAS D. Ultrastructural study of acquisition and retention of potato leafroll luteovirus in the alimentary canal of its aphid vector, *Myzus persicae* Sulz[J]. *Archives of Virology*, 1996, 141: 1279. DOI: [10.1007/BF01718830](https://doi.org/10.1007/BF01718830).
- [13] REINBOLD C, GILDOW F E, HERRBACH E, et al. Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through *Myzus persicae*[J]. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 1995. DOI: [10.1099/0022-1317-82-8-1995](https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1995).
- [14] GILDOW F E, DAMSTEEGT V D, STONE A L, et al. Virus-vector cell interactions regulating transmission specificity of soybean dwarf luteoviruses[J]. *Journal of Phytopathology*, 2000, 148(6): 333. DOI: [10.1099/0022-1317-82-8-1995](https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1995).
- [15] REINBOLD C, HERRBACH E, BRAULT V. Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*[J]. *Journal of General Virology*, 2003, 84: 3473. DOI: [10.1099/vir.0.19415-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.19415-0).
- [16] BRAULT V, PERIGON S, REINBOLD C, et al. The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(15): 9685–9693. DOI: [10.1128/JVI.79.15.9685-9693.2005](https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9685-9693.2005).

责任编辑: 何承刚