

Fdn-I 在 ToMV 侵染前后烟草体内表达分析

孙现超^{1,2} 李勇² 周常勇^{1,3*} 青玲¹ 杨水英¹

(1.西南大学植物保护学院, 重庆 400716; 2.中国科学院微生物研究所, 北京 100101; 3.国家柑桔工程技术研究中心, 中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

植物病毒的侵染过程是非常复杂的,除了病毒自身的蛋白还需要很多宿主蛋白的参与。对已知与病毒相互作用的寄主蛋白进行可溶性表达并制备其特异性抗体,检测病毒侵染前后该寄主蛋白的表达情况,对研究病毒与宿主蛋白的相互作用,认识植物病毒的致病机理和植物的抗病机制有重要意义。本实验室应用酵母双杂交系统以 TMV 同属的番茄花叶病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV) CP 作为“诱饵蛋白”对接毒后普通烟草的 cDNA 文库进行了筛选。实验得到一个与 CP 相互作用的阳性克隆,对该克隆进行测序分析,明确其 cDNA 长度为 615 bp,含有一个长度为 435 bp 的开放阅读框,预测编码一个由 144 个氨基酸组成的蛋白,分子量为 15.3 kDa。将核酸序列和蛋白序列同时在 GenBank 上进行比对,结果所得 cDNA 序列与普通烟草叶绿体铁氧还蛋白 I (Fd AY552781) 有 99% 的同源性。我们的序列比 Fd AY552781 在 5' 端多了 22 个碱基,3' 端多 175 bp,其中 3' 端主要多了 3' 非翻译区部分,且编码的蛋白与 Fd AY552781 编码的蛋白只有第 118 位氨基酸发生了突变 (G-D)。所以我们认为我们的序列是一个比已知序列 Fd AY552781 更完整的铁氧还蛋白序列。将 cDNA 序列命名为普通烟草铁氧还蛋白 I (简称: Fdn-I)。为进一步明确其相互作用在病毒侵染寄主产生花叶症状中的作用,我们以 Fdn-I 全长 cDNA 为模板,用 PCR 扩增 Fdn-I,克隆至原核表达载体 pEGX-6p-1,构建 Fdn-I 与 GST 融合表达载体 pEGX-Fdn-I,重组质粒转化原核表达菌株 BL21,优化 GST-Fdn-I 可溶性表达条件后大量表达蛋白,用 GST 亲和层析法纯化获得可溶性 GST-Fdn-I 蛋白,免疫家兔制备多克隆抗体。ELISA 测定抗体效价,Western 印迹法检测 ToMV 侵染前后烟草叶片内 Fdn-I 的表达情况。结果表明在温度为 28℃,IPTG 诱导浓度为 0.3 mmol/L 条件下表达出大小为 41.3 kDa 的可溶性融合蛋白。纯化获得约 4mg 可溶性蛋白,免疫家兔制备了效价为 1/6 400 的多克隆抗体。Western 印迹结果表明 Fdn-I 在 ToMV 侵染后烟草叶片内含量明显低于其在健康烟草叶片内的含量。