

灰飞虱体内共生菌 *Wolbachia* 的 groEL 基因克隆及序列分析

季英华, 史文琦, 程兆榜, 周彤, 林玲, 范永坚, 周益军

(江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014)

[摘要] 利用特异性引物, 首次在国内克隆获得灰飞虱 (*Laodelphax striatellus* Fallén) 体内共生菌 *Wolbachia* 的 groEL 基因全长序列, 其开放阅读框为 1 659 bp, 可编码 552 个氨基酸, GenBank 登录号为: EF 468716, 与已发布的韩国分离物核苷酸一致性达 99.9%, 为进一步研究其与灰飞虱传播水稻条纹病毒的关系奠定了基础。

[关键词] 灰飞虱, 共生菌, *Wolbachia*, 序列分析, groEL

[中图分类号] S435 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)04-0119-05

Cloning and Sequencing of groEL From *Wolbachia* Endosymbiont in *Laodelphax striatellus* Fallén

Ji Yinghua, Shi Wenqi, Cheng Zhaobang, Zhou Tong, Lin Ling, Fan Yongjian, Zhou Yijun

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China)

Abstract: GroEL gene from *Wolbachia* endosymbiont in small brown plant-hopper (*Laodelphax striatellus* Fallén), was amplified by PCR and cloned. The completed nucleotide sequence of the gene was determined, which was the first report in China. It has 1 659 bp nucleotides and encodes 552 amino acids. GenBank accession number is EF 468716. Comparison showed that this gene had 99.9% identities on nucleotides level to DQ 356890, an isolate from South Korea. Based on this sequence, further researches on function of groEL, such as its relation to rice stripe virus transmission, can be carried out.

Key words: *Laodelphax striatellus*, endosymbiont, *Wolbachia*, sequence analysis, groEL

灰飞虱 (*Laodelphax striatellus* Fallén) 是水稻上一种重要的害虫, 近年来由它传播的水稻条纹病毒 (Rice stripe virus, RSV) 在我国稻区大流行, 给当前水稻生产造成了严重的危害^[1]。目前对于该病已有较多研究, 但是对于灰飞虱与水稻条纹病毒之间相互作用的研究还较少, 再加上灰飞虱对水稻条纹病毒为持久型经卵传播, 其传毒机制至今尚未明确。

1986年, Toriyama利用显微镜技术在灰飞虱的雌雄生殖器官内观察到 RSV 病毒颗粒和菌胞, 并推测灰飞虱的成熟卵是通过菌胞的途径获得病毒粒子并将其传递给下一代的^[2]。2001年吴爱忠等人对灰飞虱体内 RSV SP (disease-specific protein) 亚细胞定位研究时也发现: 带毒雌虫卵巢和卵内都观察到菌胞和胶体金; 无毒雌虫卵巢和卵内只观察到菌胞; 雄虫无论带毒与否, 其精子内无菌胞也无胶体金^[3]; 这也暗示了菌胞和 RSV 在经卵传播这个过程中极有可能存在某种协同的关系。

Wolbachia 是迄今已知最广泛存在的昆虫胞内共生菌之一, 自然界中约 16% 的昆虫体内含有该共生菌^[4,5]。邓可京等人 1997 年通过 PCR 的方法检测到灰飞虱体内也含有 *Wolbachia*^[6]。灰飞虱是 RSV 的传播介体, 在其体内, *Wolbachia* 呈母系遗传而垂直传递给后代, RSV 则经卵传递给后代。有研究表明在粉虱、蚜虫等昆虫体内由共生菌产生的 groEL (hsp60 家族的成员) 是一种虫传相关蛋白, 可以保护植物病毒在进入

收稿日期: 2008-01-10

基金项目: 江苏省重大科技攻关 (BE2005301)、国家支撑计划 (2006BAD02A16、2006BAD08A04)、江苏省自然科学基金 (BK2006164)、农业部行业专项 (nyhyzx07-051)、国家自然科学基金 (30300230) 资助项目。

通讯联系人: 周益军, 研究员, 研究方向: 植物病毒学研究。E-mail: yjzhou@jaas.ac.cn

血体腔的过程中免遭降解,从而对病毒起到保护作用,保证了植物病毒的虫传特性^[7-16]。灰飞虱体内 *Wolbachia* 的 *groEL* 功能是什么?是否也是一种虫传相关蛋白?基于这些问题,我们对灰飞虱体内的 *groEL* 基因进行了克隆和测序,为进一步探讨 *groEL* 的传毒相关性等功能及其它相关研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试昆虫

供试灰飞虱采自江苏洪泽,经实验室内连续多代筛选后获得的带毒亲合性群体。

1.1.2 试剂

蛋白酶 K 购自南京生兴生物技术有限公司;Taq plus dNTP 购自上海申能博彩生物科技有限公司;限制性内切酶 *EcoR* I *Sal* I 购自 Takara 公司;氨基青霉素 (AMP)、DNA Marker 购自南京基天生物技术有限公司;琼脂糖购自 OXO D 公司;DNA 回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 菌株和载体

大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 为本实验室保存,载体 pMD-18T 购自 Takara 公司。

1.2 方 法

1.2.1 模版 DNA 的提取

取 30 头成虫,无菌双蒸水洗涤 2 次,加入 200 μ L 研磨缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl pH 9.1, 100 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L EDTA, 5 g/L SDS 及 100 μ g/mL 蛋白酶 K),充分研磨,收集匀浆液,65 $^{\circ}$ C 温育 30 min,再加入 55 μ L 8 mol/L 的 KAc,冰浴 30 min 以充分沉淀,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清,加入 2 倍体积无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 2 h 沉淀 DNA,12 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,70%乙醇洗涤 3 次,沉淀悬浮于 100 μ L 的双蒸水中。

1.2.2 引物设计

根据已发表的 *groEL* 基因的序列 (DQ 356890),设计引物,上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列为:

groEL. 1F: 5'-cg gaattc ATG GCT AAC ATA GTA GTA TC-3'

groEL. 1659R: 5'-cg ggatcc TTA GAA TCC ACC CAT TCC-3'

1.2.3 PCR 扩增

PCR 反应体系 25 μ L,分别为:

10 \times PCR Buffer (Mg^{2+}) 2.5 μ L

dNTP (10 mmol/L) 0.5 μ L

Taq Plus (5 U/ μ L) 0.5 μ L

3 Primer (10 pmol/L) 1.0 μ L

5 Primer (10 pmol/L) 1.0 μ L

DNA 2.0 μ L

ddH₂O 17.5 μ L

PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 连接、转化

PCR 回收产物与 pMD-18T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞,培养后筛选阳性克隆,碱裂解法提取质粒,双酶切鉴定。

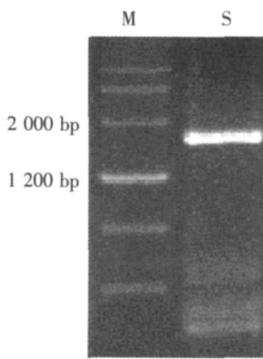
1.2.5 序列测定及分析

序列测定委托上海生工生物工程技术有限公司完成,序列分析使用 ClustaX、Mega3、Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) 等软件完成。

2 结果

2.1 *groEL* 基因的克隆

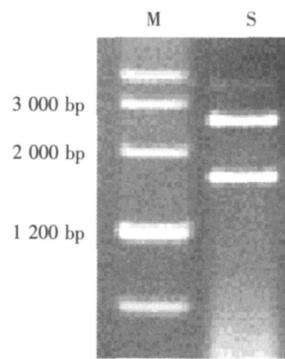
以总 DNA 为模板, PCR 扩增, 1% 琼脂糖电泳检测, 得到惟一一条大小约 1.6 kb 的条带 (图 1), 与目的片段大小一致. PCR 产物纯化后连接到 pMD-18T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞, 挑取单菌落培养, 取部分菌液提取质粒并双酶切鉴定, 结果表明得到的阳性克隆为含有插入目的片段的重组子 (图 2).



M: DNA 相对分子质量标准(DNA Marker III),
S: *groEL* 基因(*groEL* gene)

图 1 *groEL* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR products of *groEL* gene



M: DNA 相对分子质量标准(DNA Marker III),
S: 重组质粒 (recombinant plasmid)

图 2 *EcoRI/SalI* 酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid digested by *EcoRI/SalI*

2.2 序列分析

将重组质粒中的 *groEL* 基因进行序列测定, 获得该基因的全序列, 序列大小为 1659 bp, 可编码 552 个氨基酸, GenBank 登录号为 EF468716. 该序列的成功获得为下一步该蛋白的表达、抗体制备及进一步的细胞定位等研究奠定了基础.

将该基因序列与 GenBank 数据库中的资源进行 Megablast 分析时, 发现其与 DQ356890 (灰飞虱韩国分离物体内共生菌 *Wolbachia* 的 *groEL* 基因) 的核苷酸一致性 (Identity) 最高, 达到 99.9%; 根据 Megablast 分析的结果, 我们对全库中的数据进行了筛选, 得到 6 条近缘 *Wolbachia* *groEL* 基因全序列, 详细信息见表 1.

表 1 本实验中所涉及的 *groEL* 基因信息

Table 1 Information of *groEL* gene mentioned in this paper

登录号	寄主名称	寄主名称
DQ356890	<i>Laodelphax striatellus</i> (South Korea)	灰飞虱 (韩国)
AB002286	<i>Teleogryllus taiwanensis</i>	台湾鬃魔蟋蟀
AE017196	<i>Drosophila melanogaster</i>	黑腹果蝇
AE017321	<i>Bugia malayi</i> (TRS)	马来布鲁线虫 (马来丝虫)
AJ558023	<i>Dirofilaria immitis</i>	犬恶丝虫
Y09416	<i>Onchocerca volvulus</i>	旋盘尾丝虫

表 2 共生菌 *Wolbachia* *groEL* 氨基酸序列之间的遗传距离

Table 2 Genetic distance among symbiont *Wolbachia* based on amino acid sequence of *groEL*

	EF468716	DQ356890	AB002286	AE017196	AJ558023	Y09416	AE017321
EF468716		0.001*	0.003	0.008	0.010	0.010	0.010
DQ356890	0.001		0.003	0.008	0.010	0.010	0.009
AB002286	0.013	0.013		0.008	0.010	0.009	0.009
AE017196	0.132	0.131	0.129		0.009	0.010	0.009
AJ558023	0.159	0.158	0.155	0.132		0.007	0.009
Y09416	0.165	0.165	0.161	0.138	0.090		0.009
AE017321	0.153	0.153	0.146	0.123	0.135	0.130	

* 对角线上下分别为标准差和遗传距离.

将总共 7 条序列使用 Clustal 软件比对 (Alignment), 将比对后的数据导入 Mega 软件, 使用 Poisson correction 模型计算遗传距离 (表 2), 临近法 (Neighbor-Joining, NJ) 重建系统进化树, 各个分枝的 bootstrap 置信度用 1 000 次自导复制来评价 (图 3), 从而进行系统发育分析。

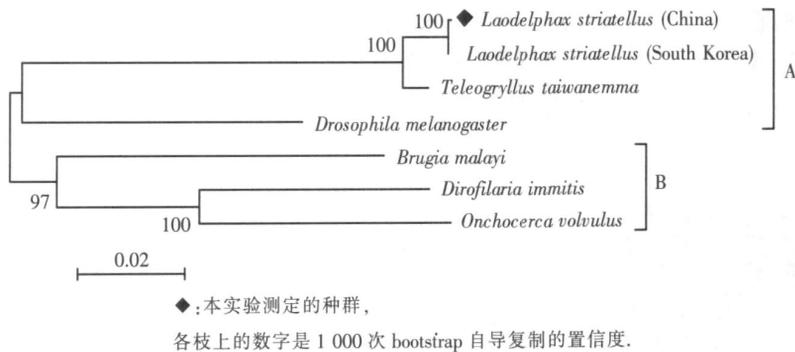


图 3 根据 groEL 序列一致性重建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of 7 isolates based on amino acid sequences identities of groEL

本实验所采用的 7 种共生菌寄主中, AE 017321、AJ 558023、Y 09416 的寄主为线形动物门线虫纲成员; 其余 4 种皆属于节肢动物门昆虫纲, 因此选择 AE 017321、AJ 558023 和 Y 09416 构成的 B 小类群为外群。

由图 3 可以看出, 在类群 A 中, 寄生于灰飞虱中国地理种群和灰飞虱韩国地理种群的 *Wolbachia* 亲缘关系最近, 寄生于台湾魔蟋蟀上的 *Wolbachia* 次之, 寄生于黑腹果蝇上的 *Wolbachia* 最远。在分类学上, 中国地理种群的灰飞虱与韩国地理种群的灰飞虱为同种, 亲缘关系最近; 灰飞虱为半翅目类群, 蟋蟀为直翅目类群, 二者同属外翅亚部渐变态类群, 亲缘关系较近; 而果蝇属于内翅亚部双翅目, 所以亲缘关系较近。传统分类学上的这种亲缘关系更好的验证了基于 *Wolbachia* 的 groEL 基因重建的系统进化树所反映的关系。这一方面暗示了基于灰飞虱体内共生菌 *Wolbachia* groEL 序列而重建的系统进化树能较好的反映寄主的亲缘关系, 可以作为寄主昆虫分类上的一个辅助方法; 另一方面也从分子角度验证了共生菌 *Wolbachia* 与寄主昆虫之间存在较为明显的协同进化关系。

3 讨论

在烟粉虱和蚜虫体内, 有研究表明共生菌 groEL 参与了病毒的传播, 可能是一种虫传相关蛋白。灰飞虱是水稻条纹病毒的主要传播介体, 其传毒机制是什么, 共生菌 *Wolbachia* 的 groEL 在其中起到的作用是什么? 至今尚未有报道。目前内共生菌还不能人工连续继代培养, 因此直接对其组成成分或者代谢产物进行研究难度很大, 通过基因克隆及体外蛋白表达的方法可以绕过该瓶颈, 不失为一个好方法, 玉米蚜、禾谷缢管蚜、烟粉虱等昆虫体内的 groEL 都有过原核表达的报道^[13, 15, 16]。本研究首次对中国灰飞虱体内共生菌 *Wolbachia* 的 groEL 基因进行了克隆和测序, 为下一步对其进行体外蛋白表达、抗体制备, 进而研究其细胞定位, 明确其与 RSV 在灰飞虱种群内经卵传播的作用机理奠定了基础。

通过图 3 可以看出 *Wolbachia* groEL 的系统进化树能较好的反映其寄主的系统进化关系, 但是 groEL 毕竟是一类比较保守的基因, 在昆虫的分类和进化研究上有其自身的局限性。若能从中找到更合适的基因, *Wolbachia* 就可以更广泛的用于其寄主的分类和进化研究, 而 *Wolbachia* 又是一类分布极为广泛的细胞内共生菌, 因此这种方法今后可能会广泛的应用于昆虫乃至节肢动物的分类, 并为其提供有益的佐证。

[参考文献]

- [1] 谢联辉, 魏太云, 林含新, 等. 水稻条纹病毒的分子生物学 [J]. 福建农业大学学报, 2001, 30 (3): 269-279.
- [2] Toriyama S. Rice stripe virus: prototype of a new group of viruses that replicate in plants and insects [J]. Microbiological Sciences, 1986, 3 (11): 347-351.
- [3] 吴爱忠, 赵艳, 曲志才, 等. 水稻条叶枯病毒 (RSV) 的 SP 蛋白在介体灰飞虱内的亚细胞定位 [J]. 科学通报, 2001,

46(14): 1 183-1 186

- [4] Werren J H. Biology of *Wolbachia*[J]. Annual Review of Entomology, 1997, 42: 587-609.
- [5] Werren J H, Guo L R, Windsor D W. Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 1995, 62: 147-204.
- [6] 邓可京, 杨琰云, 胡成业. 灰飞虱共生菌 *Wolbachia* 引起的细胞质不亲和性 [J]. 复旦学报:自然科学版, 1997, 36(5): 500-506
- [7] Akad F, Dotan N, Czosnek H. Trapping of tomato yellow leaf curl virus and other plant viruses with a *groEL* homologue from the whitefly *Bemisia tabaci*[J]. Archives of Virology, 2004, 149(8): 1 481-1 497.
- [8] Akad F, Eybishtz A, Edelbaum D, et al Making a friend from a foe: expressing a *groEL* gene from the whitefly *Bemisia tabaci* in the phloem of tomato plants confers resistance to tomato yellow leaf curl virus[J]. Archives of Virology, 2007, 152(7): 1 323 - 1 339.
- [9] Douglas A E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*[J]. Annual Review of Entomology, 1998, 43: 17-37.
- [10] 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
- [11] Hogenhout S A, Van der Wilk F, Verbeek M, et al Potato leafroll virus binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic *groEL* homologue[J]. Journal of Virology, 1998, 72(1): 358-365.
- [12] Morin S, Ghanim M, Zeidan 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.
- [13] 林林, 吴云锋, 崔晓峰. 玉米蚜体内参与传毒的共生菌 *groEL* 基因的克隆和原核表达 [J]. 中国病毒学, 2003, 18(1): 54-57.
- [14] 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, 2002, 17(1): 65-72
- [15] 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
- [16] 谭周进, 谢丙炎, 肖启明, 等. 烟粉虱内共生菌 *groEL* 基因的原核表达条件研究 [J]. 微生物学通报, 2005, 32(4): 57-61.

[责任编辑:孙德泉]