

文章编号 :1003- 8701(2011)06- 0037- 03

东北地区大豆花叶病毒 3 号株系 衣壳蛋白的表达、纯化及单克隆抗体制备

王永志^{1,3}, 苏颖¹, 米丽娟^{2,3}, 张伟¹, 宋淑云¹,
高旭东¹, 刘颖¹, 张正坤¹, 董英山^{1*}, 李启云^{1*}

(1. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 2. 吉林农业大学, 长春 130118;
3. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130122)

摘要:本研究克隆了东北大豆花叶病毒 3 号株系衣壳(CP)蛋白基因, 在大肠杆菌中表达了 CP 蛋白, 通过亲和层析获得了纯化的 CP 蛋白; 制备了 9 株 CP 蛋白单克隆抗体, 中和试验表明, 6E7、2D3、1C2 这 3 株单克隆抗体具有中和作用, 能够阻断病毒的感染。本研究制备的单克隆抗体为大豆花叶病毒检测试剂盒的研制和大豆花叶病毒抗病育种研究打下基础。

关键词:大豆花叶病毒; 衣壳蛋白; 单克隆抗体; 中和活性

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

Expression, Purification and Monoclonal Antibody Preparation of North-eastern Region SMV CP Protein

WANG Yong-zhi^{1,3}, SU Ying¹, MI Li-juan^{2,3}, ZHANG Wei¹, SONG Shu-yun¹,

GAO Xu-dong¹, LIU Ying¹, ZHANG Zheng-kun¹, DONG Ying-shan^{1*}, LI Qi-yun^{1*}

(1. *Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033*; 2. *Jilin Agricultural University, Changchun 130118*; 3. *Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China*)

Abstract: The CP gene of north-eastern region SMV was cloned and the CP protein was expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatograph. 9 monoclonal antibodies against CP protein were prepared, among them 6E7, 2D3, 1C2 can prevent SMV infection. These monoclonal antibodies prepared in study provide ideal biological materials for SMV testing kit and breeding of SMV resistant soybean.

Keywords: SMV; CP protein; Monoclonal antibody; Neutralization activity

大豆花叶病毒病是世界性大豆病害^[1], 我国从南到北均有发生, 长江以南地区比北方严重, 大豆花叶病毒病侵染大豆植株后, 叶片中叶绿素含量及叶质量下降, 叶面积减小, 影响光合面积和光合能力; 植株营养生长受阻、植株矮小, 生长量下降,

单株荚数减少, 流行年份可造成减产 10%~30%, 是造成大豆减产的原因之一。大豆花叶病毒病不仅影响大豆的产量, 还影响大豆的质量, 可造成病株子粒出现褐斑, 严重时病粒率达 50% 以上, 严重降低大豆的商品质量。

大豆花叶病毒(Soybean mosaic virus, SMV)为马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus)成员^[2], 基因组由单链正义 RNA 组成, 长约 10 000 个核苷酸。其编码的多聚蛋白经酶解后产生 10 个成熟蛋白, 从 N 端到 C 端分别为 P1、HC-Pro、P3、6K1、CI、6K2、NIa-VPg、NIa-Pro、Nib 和 CP^[3], CP 蛋白是病毒的

收稿日期: 2011-10-20

基金项目: 农业部转基因专项(2011ZX08004-004)

作者简介: 王永志(1977-), 男, 博士, 从事分子病毒学研究。

通讯作者: 董英山, 男, 研究员, E-mail: ysdong@cjaas.com

李启云, 男, 研究员, E-mail: qyli1225@yahoo.com

衣壳蛋白,对CP蛋白的研究较多,一是可根据CP基因的同源性来鉴定病毒或株系间的亲缘关系,另外可利用CP蛋白进行抗病毒基因工程研究^[4]。本研究制备了9株东北SMV 3号株系CP蛋白的单克隆抗体。通过田间试验证实,其中有3株单克隆抗体具有中和东北SMV 3号、1号株系的特性。为SMV检测试剂盒的研制和大豆花叶病毒抗病育种研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细菌、病毒、细胞和动物

大肠杆菌DH5 α 菌株、Rosseta菌株、大豆花叶病毒3号、1号株系和SP2/0细胞由本实验室保存。BALB/c小鼠、新西兰白兔购自长春生物制品所。

1.1.2 仪器和试剂

台式冷冻高速离心机购置于Sigma公司,恒温摇床购置于上海精宏,CO₂细胞培养箱购置于日本三洋,酶标仪、PAGE电泳仪购置于美国BIO-RAD,洗板机购置于美国Biotek,液氮罐购置于美国MVE。限制性内切酶、反转录酶、T4 DNA连接酶、EX-Tag DNA聚合酶购自大连宝生物公司,IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)、Ni²⁺离子亲和层析柱购自美国GE公司,HRP标记的羊抗鼠美标抗体购自美国KPL公司。

1.2 大豆花叶病毒CP基因的克隆

根据GENEBANK中已有的大豆花叶病毒基因序列设计了CP基因的特异性引物,上游引物5'-atCCATGGatgagattcagaacattga-3'(Nco⁺),下游引物5'-atCTCGAGtgtgaattggactgcattc-3'(Xho⁺)。以TRIzol法抽提大豆花叶病毒感染的大豆叶片总RNA,用M-MuLV反转录酶42 $^{\circ}$ C作用1h合成cDNA第一链,以此为模板用Taq plus DNA聚合酶扩增CP基因。反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性2min;94 $^{\circ}$ C变性15s,56 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸50s,进行30个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸10min。PCR产物经凝胶纯化回收,与pMD18-T载体连接,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,构建重组质粒pMD-CP。

1.3 原核表达载体的构建

Nco⁺和Xho⁺双酶切重组质粒pMD-CP和原核表达载体pET-28a(+),凝胶纯化回收目的片段,将SMV的CP基因与pET-28a(+),连接,构建重组质粒pET28a-CP,分别转化大肠杆菌DH5 α ,经PCR鉴定和酶切鉴定后,送上海博亚

生物技术有限公司测序。

1.4 重组SMV CP蛋白的表达与鉴定

将重组质粒pET28a-CP转化至大肠杆菌BL21(DE3),挑取单个菌落进行鉴定后扩增繁殖,采用不同的IPTG浓度、诱导时间、诱导温度、诱导前测D600nm值、培养基抗生素浓度进行诱导表达,优化诱导条件,比较不同表达载体以及不同表达条件的表达量,确定最佳诱导条件,同时设立含pET-28a(+)空载体的表达菌作为对照。重组蛋白用抗His标签单克隆抗体和HRP标记羊抗鸡IgG做Western-blot鉴定。

1.5 重组SMV CP蛋白的纯化

采用优化的表达条件进行大量表达,收获菌体,冻融3次,用PBS悬浮菌体沉淀,4 $^{\circ}$ C 4500r/min离心10min,包涵体沉淀用3mol/L尿素溶液洗去大部分杂蛋白,4 $^{\circ}$ C 4500r/min离心10min,包涵体沉淀用pH=8.0含8mol/L尿素的裂解液室温溶解1h,4 $^{\circ}$ C 12000r/min离心20min,取上清蛋白与Ni²⁺-NTA填料结合1h,分别用pH=8.0、6.3、5.9的8mol/L尿素溶液洗涤去杂蛋白后,用pH=4.5的8mol/L尿素溶液洗脱目的蛋白,收集洗脱的目的蛋白,进行SDS-PAGE鉴定。用紫外分光光度计测定纯化蛋白的浓度。

1.6 CP蛋白单克隆抗体的制备

单克隆抗体的制备参照《动物免疫学》第二版。

2 结 果

成功克隆CP基因,表达并纯化了CP蛋白(图1)。

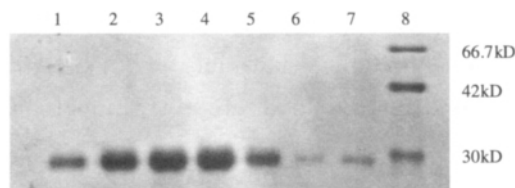


图1 CP蛋白的纯化

1-7:在pH=4.0时不同收集管中纯化的CP蛋白;
8:蛋白质Marker

制备了3B8、2A8、6E7、6B10、4G12、2D3、2C1、5D2和1C2共9株CP蛋白单克隆抗体(图2)。

中和试验分析表明(图3),空白对照组大豆生长状态良好,阴性腹水处理的大豆呈现大豆花叶病典型症状,在4株单克隆抗体6E7、6B10、2D3、1C2中,6E7、2D3、1C2有中和作用,能够不同程度的抑制大豆花叶病毒对植株的感染;单克隆抗体6B10处理组的大豆植株普遍发病,表明6B10

无中和活性。

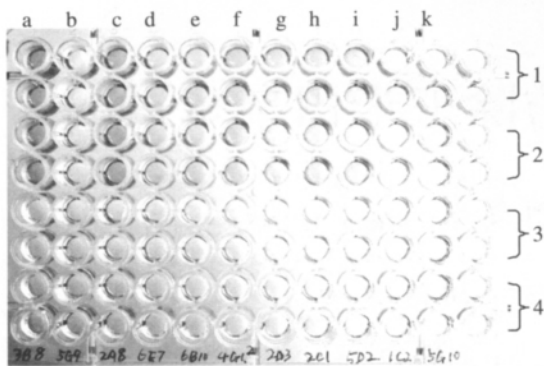


图 2 CP 蛋白单克隆抗体的 ELISA 鉴定

- 1: 包被的重组 CP 蛋白;
 - 2: 包被的 SMV 感染大豆叶片总蛋白;
 - 3: 包被的重组羊痘病毒 p32 蛋白;
 - 4: 包被的正常大豆叶片总蛋白;
- a- k; 分别是单克隆抗体 3B8、5G9、2A8、6E7、6B10、4G12、2D3、2C1、5D2、1C2、5G10。

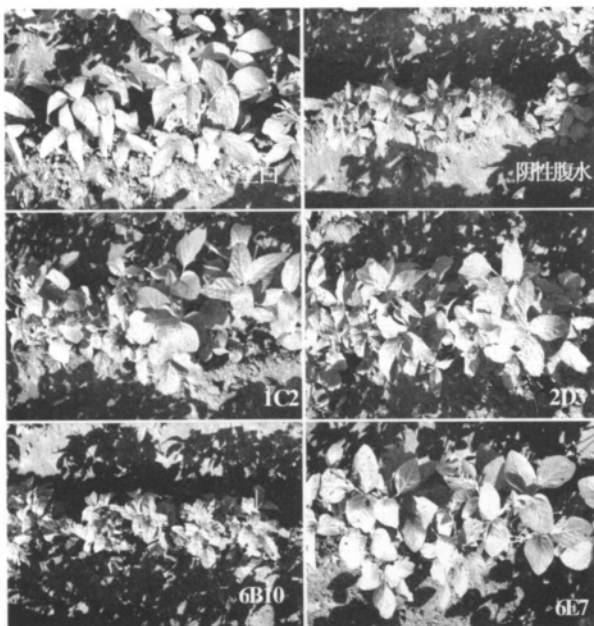


图 3 单克隆抗体 6E7、6B10、2D3、1C2 的中和活性分析

3 讨 论

本研究利用大肠杆菌表达并纯化了 SMV 的 CP 蛋白^[5],制备了 9 株能够特异性识别天然 SMV CP 蛋白的单克隆抗体,这些单抗的制备,为 SMV

的研究提供了重要工具,可以用来分析 SMV 在大豆植株中的分布和 SMV 感染路径以及 SMV 的致病机理。可以利用这些抗体作为探针,研制 SMV 的检测试剂盒^[6]。

本研究通过田间的接毒试验,鉴定出 6E7、2D3、1C2 具有中和活性。植物抗体(Plantibody)是近年来提出的新概念,是在植物中表达的动物源性抗体^[7-8]。植物抗体已经应用到植物的抗病育种中^[9],本研究鉴定的中和活性单克隆抗体可以应用到大豆的抗花叶病毒育种当中。

参考文献:

- [1] De Jaeger G, De Wilde C, Eeckhout D, et al. The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance [J]. *Plant Mol. Biol.*, 2000, 43(4): 419-428.
- [2] Giritch A, Marillonnet S, Engler C, et al. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(40): 14701-14706.
- [3] Floss DM, Falkenburg D, Conrad U. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview[J]. *Transgenic Res.*, 2007, 16(3): 315-332.
- [4] Larrick JW, Yu L, Chen J, Jaiswal S, et al. Production of antibodies in transgenic plants[J]. *Res Immunol*, 1998, 149(6): 603-608.
- [5] Conrad U, Fiedler U. Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity [J]. *Plant Mol Biol.*, 1998, 38(1-2): 101-109.
- [6] Conrad U, Manteuffel R. Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells[J]. *Trends Plant Sci.*, 2001, 6(9): 399-402.
- [7] Jobling SA, Jarman C, Teh MM, et al. Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments[J]. *Nat Biotechnol.*, 2003, 21(1): 77-80.
- [8] Nickel H, Kawchuk L, Twyman RM, et al. Plantibody-mediated inhibition of the Potato leafroll virus P1 protein reduces virus accumulation[J]. *Virus Res.*, 2008, 136(1-2): 140-145.
- [9] Boonrod K, Galetzka D, Nagy PD, et al. Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance [J]. *Nat Biotechnol.*, 2004, 22(7): 856-862.