

文章编号: 1003-8701(2015)01-0061-03

# 金龟子绿僵菌黏着蛋白 MAD1 原核表达 及其抗体的制备

刘艳微<sup>1</sup>, 孟鑫睿<sup>1</sup>, 路 杨<sup>2</sup>, 李晓宇<sup>2</sup>, 张佳诗<sup>2</sup>,  
李启云<sup>2</sup>, 张正坤<sup>2\*</sup>, 冯树丹<sup>1\*</sup>

(1. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025; 2. 吉林省农业科学院植物保护研究所, 吉林 公主岭 136100)

**摘 要:** *Mad1* 基因存在于金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*), 在侵染昆虫表皮时起到了吸附性作用。为获得高纯度 MAD1 蛋白, 制备多克隆抗体, 以便深入了解其功能, 本研究从金龟子绿僵菌中克隆出 *Mad1* 基因并连接到原核表达载体对其进行表达形式分析, 经 IPTG 诱导及金属螯合层析纯化免疫家兔制备抗体, 最后利用 Western 印记检测抗体特异性。经 Western 印记检测表明抗体特异性极高, 诱导表达及纯化制备出高纯度 MAD1 蛋白产物, 并获得效价为 1:12 800 的多克隆抗体, 为 *Mad1* 基因功能验证及分子检测提供良好的实验材料。

**关键词:** 绿僵菌; *Mad1* 基因; 原核表达; 抗体制备

中图分类号: S482.3

文献标识码: A

DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.01.014

## Prokaryocyte Expression and Antibody Preparation of *Mad1* Gene Came from *Metarhizium anisopliae*

LIU Yan-wei<sup>1</sup>, MENG Xin-rui<sup>1</sup>, LU Yang<sup>2</sup>, LI Xiao-yu<sup>2</sup>, ZHANG Jia-shi<sup>2</sup>,  
LI Qi-yun<sup>2</sup>, ZHANG Zheng-kun<sup>2\*</sup>, FENG Shu-dan<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025;

2. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

**Abstract:** *Mad1* gene was ubiquitously exist in *Metarhizium anisopliae*, and responsible for adhering to insect surface. To obtain high purity protein of MAD1 and its polyclonal antibody for studying the function of *Mad1* gene, it was cloned from *M. anisopliae* by RT-PCR, and then connected into the prokaryotic expression vector for the expression. The protein was induced by IPTG and purified by metal chelate affinity, and then rabbits were immunized for antibody preparation. The specificity of polyclonal antibody were detected by Western-blot and indirect ELISA. The results indicated that high specificity antibody was obtained. The antibody titer was 1:12800, which will give good experimental materials for *Mad1* gene function research and detection.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae*; *Mad1* gene; Prokaryocyte expression; Antibody preparation

昆虫病原真菌是防控自然界害虫的重要手段之一, 主要通过体表附着、体壁穿透、体内定殖三个阶段致死寄主<sup>[1]</sup>。最初的研究发现, 以疏水蛋白(hydrophobins)等所形成的被动吸附作用在虫生真菌侵染寄主的初始附着阶段起着重要作用<sup>[2-3]</sup>,

随着研究的深入, 发现疏水蛋白的被动附着力较弱, 当分生孢子附着到寄主体表后, 伴随孢子吸水膨胀的萌发过程, 疏水蛋白层被降解, 同时形成新的粘附因子<sup>[4-5]</sup>。

金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)是一种防治病虫害的模式菌, 它以活孢子形式吸附到虫体表面后, 大量繁殖菌丝和分生孢子, 同时分泌出草酸钙等引发害虫生病, 4~5 d后即死亡。因此吸附性起到了至关重要的作用。研究发现, 绿僵菌孢子表面的黏着蛋白(adhesin)MAD1在吸附阶段起主要作用<sup>[6-7]</sup>, 随着孢子的萌发, 该基因表达水平增强, 敲除该基因后, 绿僵菌的黏着性则

收稿日期: 2014-08-23

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(C201307)

作者简介: 刘艳微(1988-), 女, 在读硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学。

通讯作者: 张正坤, 男, 博士, 副研究员, E-mail: zhangzhengkun1980@126.com

冯树丹, 女, 博士, 教授, E-mail: sdf6616@163.com

显著降低。本研究主要通过对金龟子绿僵菌的 *Mad1* 基因进行原核表达,纯化并制备多克隆抗体,以期进一步了解其在寄主体内的生长及侵染过程中的分布和定位情况,并为深入了解 *Mad1* 基因的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本实验所需的主要材料:宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3)为北京全式金产品,表达菌 pET-28a 为上海生工产品,金属螯合亲和层析所用  $\text{Ni}^{+2}$ -NTA 为 Promega 公司。

### 1.2 PCR 引物合成

根据金龟子绿僵菌的黏着蛋白 *Mad1* (GenBank: DQ338437.1) 基因序列分析,利用 primer5.0 软件设计一对特异性引物,同时引入 *NcoI*、*HindIII* 两个酶切位点(下划线),正向引物 MAD1FP: 5'-TCCCCCATGGATGAAGTCTGCTCTTTCTGTTGTT-3',反向引物 MAD1RP: 5'-TGCAAGCTTTTACAGAGCGGCGACGAA-3'。

### 1.3 绿僵菌的培养、总 RNA 的提取和 RT-PCR 扩增

取绿僵菌的新鲜孢子接种于 PDA 平板,26℃ 培养 3 d;取菌丝体液氮冻存备用或者立即提取 RNA。总 RNA 的提取操作按照(Chomezynski)等<sup>[8-9]</sup>方法。提取后的总 RNA 经 1% 琼脂糖电泳检测。以 1 μg 总 RNA 为模板,按宝生物公司逆转录试剂盒使用说明进行 cDNA 第 1 链的合成。以绿僵菌菌丝的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应条件: 95℃ 3 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 60 s, 72℃ 10 min, PCR 循环数为 30;循环结束后琼脂糖凝胶电泳进行检测,并切胶回收目的片段,-20℃ 保存备用。

### 1.4 MAD1 载体的构建

回收 PCR 产物,连接到克隆载体 pMD18-T 上, *E.coli* BL21(DE3)转化,挑取多个克隆到含有氨苄青霉素的 LB 中 37℃ 过夜培养。通过 PCR 和双酶切鉴定。将鉴定正确的质粒和空载体 pET-28a 用限制性内切酶 *NcoI*、*HindIII* 同时双切,在 T4 连接酶的作用下,16℃ 连接过夜,次日转化到 *E.coli* BL21(DE3),挑取单克隆扩大培养,送由上海生工测序验证序列。

### 1.5 MAD1 蛋白的表达

将验证正确的重组质粒接种于含有卡那抗性的 LB 培养基中,37℃ 震荡过夜,再以 1:100 的比例转接于 10 mL LB 中,37℃ 培养 3~4 h,待  $\text{OD}_{600}=0.6$  时,加入 1‰ 的 IPTG,37℃ 诱导 3~4 h,离心收

集菌体,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测,鉴定质粒表达情况。

### 1.6 MAD1 蛋白的纯化

按镍离子亲和层析柱试剂盒要求进行纯化,将未纯化的蛋白加入 5 mL 6M 盐酸胍溶解,液氮反复冻融 3 次,12 000 r/min 离心 20 min 取上清。0.45 μm 滤器下过滤,然后注入平衡好的 Ni-NTA-琼脂糖亲和层析柱。经过 10 倍体积的 Ni-Denature-8.0 缓冲液和 Ni-Denature-6.0 缓冲液连续洗脱, Ni-Denature-4.0 缓冲液洗脱时分管收集洗脱液,每管 1 mL。每管取 10 μL 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。

### 1.7 免疫家兔制备抗体及效价测定

将上述目的蛋白从胶上切下,研碎溶于生理盐水,约 1~2 mg/mL。选取成年家兔 2 只,选腹股沟和背部脊柱两侧为注射点,70% 乙醇消毒,每只兔注射 4 个部位,每个部位皮下注射 0.5 mL 抗原。首次注射后的 4 周加强免疫 1 次,此后每 7~10 d 加强免疫一次,加强后的第 10 d 每只兔取血 3 mL,分离血清。取 IPTG 诱导 4 h 后的菌液 1 mL,4℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min,沉淀用 pH 值为 8.0,浓度 1 mmol/L 的 100 μL Tris-HCl 溶解后,用碳酸盐包被液稀释 20 倍作为抗原,纯化后的抗血清按 1:400~1:25 600 倍比稀释,采用间接 Elisa 法参照文献(SAMBROOK J)方法<sup>[10]</sup>进行,进行倍比稀释检测抗体效价。

### 1.8 Western-blot 检测抗体特异性

将纯化的 MAD1 蛋白和菌体未被诱导表达后裂解产生的沉淀进行 SDS-PAGE 电泳并转移至 NC 膜,多克隆抗体以 1:400 稀释进行 Western 印迹,于暗室条件下显影。

## 2 实验结果

### 2.1 重组质粒的 PCR 扩增

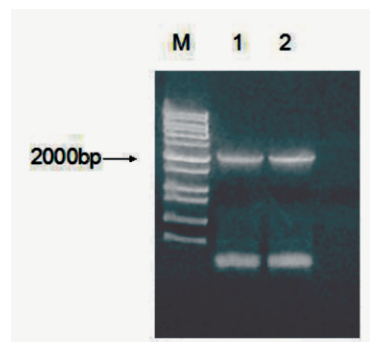


图1 PCR 扩增待表达 MAD1 片段  
M: Marker 1、2: PCR 产物

运用菌落PCR方法利用特异性引物检验克隆质粒的构建情况,在2000 bp处左右可见明显条带,与*Mad1*基因序列长度2140 bp相符(图1),送上海生工公司测序,结果经NCBI比对与目的基因*Mad1*碱基序列一致。

### 2.2 MAD1蛋白的诱导表达

将已构建好的重组质粒转化表达菌株*E.coli* BL21(DE3),经1% IPTG 诱导后,经SDS-PAGE 检测后显示在相对分子量77KD处有1条特异性条带(图2),而上清中无明显诱导表达条带,并且由此确定MAD1蛋白主要以包涵体形式表达存在于大肠杆菌周质腔内。

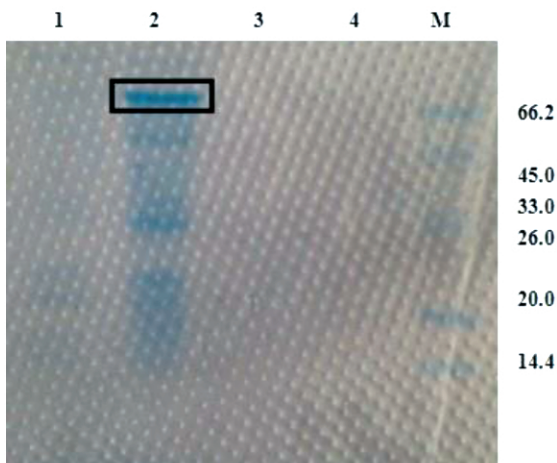


图2 MAD1重组蛋白表达SDS-PAGE电泳分析  
M:蛋白质 marker;1:未经诱导的菌体裂解后产生的沉淀;  
2:菌体被诱导表达后裂解产生的沉淀;  
3:未经诱导的菌体裂解后产生的可溶性上清;  
4:菌体被诱导表达后裂解产生的可溶性上清

### 2.3 MAD1蛋白的纯化

以包涵体形式表达的MAD1蛋白经镍离子亲和层析柱纯化后(图3),在66.2~94.0KD之间得到清晰的单一条带,分子量大小与MAD1蛋白相符,说明经过纯化后获得高纯度的MAD1蛋白。

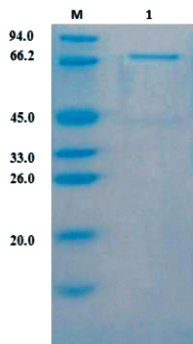


图3 纯化后MAD1重组蛋白的SDS-PAGE电泳分析  
M:蛋白质 Marker;1:纯化后的MAD1重组蛋白

### 2.4 免疫家兔制备多克隆抗体

将纯化得到的MAD1蛋白作为抗原,免疫家兔进行多克隆抗体的制备,并测定其效价。间接ELISA方法测得小鼠的血清效价约为1:12 800以上(表1)。将上述分离得到的MAD1抗血清作为第一抗体,标记的羊抗小鼠IgG作为第二抗体,利用Western-blot方法鉴定MAD1抗血清表达的特异性。如图4所示,Western-blot后的显色结果表明,MAD1蛋白存在于正确的分子量的条带上,而对照组未检测到任何条带。

表1 抗血清效价测定

| 稀释倍数   | 免疫后D值(P) | 免疫前D值(N) | P/N   |
|--------|----------|----------|-------|
| 400    | 3.868    | 1.652    | 2.341 |
| 800    | 2.107    | 0.886    | 2.378 |
| 1600   | 1.432    | 0.667    | 2.147 |
| 3200   | 1.134    | 0.329    | 3.447 |
| 6400   | 0.792    | 0.187    | 4.235 |
| 12 800 | 0.599    | 0.157    | 3.815 |
| 25 600 | 0.224    | 0.129    | 1.736 |

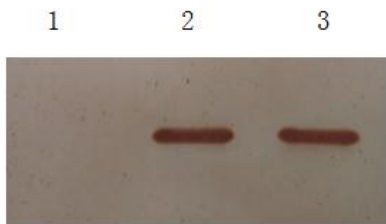


图4 纯化后的MAD1重组蛋白western-blot分析  
1:空白对照;2、3:纯化后的MAD1重组蛋白

## 3 讨论

金龟子绿僵菌孢子表面的黏着蛋白*Mad1*基因不仅仅对增加绿僵菌孢子在寄主昆虫表面吸附性起作用,还通过调控*septin*等基因的表达水平影响绿僵菌的孢子萌发和菌丝发育,生物测定表明该基因为毒力基因<sup>[7]</sup>。迄今为止,关于基因的研究主要集中于分子水平,而基因往往需要通过其产物的表达及目的蛋白的功能反应来揭示作用。相较于真核表达系统,原核表达系统更适合工业化生产<sup>[11]</sup>。本研究对*Mad1*基因进行了原核表达,并免疫家兔,制备了多克隆抗体,经过Western-blot和ELISA检测,抗体效价达到1:12 800。该抗体可用于基因工程菌株的筛选,同时,可利用其对绿僵菌进行*Mad1*基因表达量的(下转第75页)

## 2 结果与分析

由表3可知,皖东黄牛股二头肌肌肉组织中Fe、Zn的含量极显著高于腰大肌和背最长肌( $P<0.01$ ),K的含量显著高于腰大肌( $P<0.05$ );背最长肌中Mg的含量显著高于股二头肌( $P<0.05$ );腰大肌、股二头肌、背最长肌中的钙、磷均无明显差异( $P>0.05$ )。

表3 皖东黄牛肌肉中部分矿物元素含量

| 元素       | 腰大肌                        | 股二头肌                        | 背最长肌                        |
|----------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Mg(μg/g) | 670.38±88.75 <sup>ab</sup> | 641.28±112.31 <sup>ab</sup> | 702.17±111.12 <sup>ab</sup> |
| Fe(μg/g) | 82.83±20.70 <sup>b</sup>   | 160.08±63.20 <sup>a</sup>   | 96.54±29.17 <sup>b</sup>    |
| K(μg/g)  | 432.46±86.18 <sup>ab</sup> | 485.33±39.16 <sup>ab</sup>  | 466.75±35.45 <sup>ab</sup>  |
| Zn(μg/g) | 49.21±5.31 <sup>b</sup>    | 81.96±28.57 <sup>a</sup>    | 57.96±19.66 <sup>b</sup>    |
| Ca(μg/g) | 862.21±126.84              | 846.83±163.92               | 881.71±170.71               |
| P(%)     | 0.099±0.019                | 0.110±0.012                 | 0.123±0.007                 |

注:同行间不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ ),字母相同或不标者为差异不显著( $P>0.05$ )

## 3 讨论

皖东黄牛主要分布在安徽省东部沿江淮分水岭丘陵地带,体型中等偏大,躯干结实,胸部宽深,腰围较大,尻部长度适中,稍倾斜,四肢较细短;毛色有黄、褐两种,其特征是鼻孔周围为马蹄状白色。善爬坡、耐粗饲,对当地的自然生态因素适应能力强,据凤阳县志记载皖东黄牛在当地至少有500年养殖历史。

矿物元素与生物体的各项生理机能有着密切的联系,对生物体有极其重要的生理和病理学意

义,微量元素在体内缺乏或过多都会导致多种疾病<sup>[2]</sup>。Zn是上百种酶的活性中心,又是胰岛素的成分,缺Zn会引起代谢功能的紊乱,免疫功能下降。Fe是红血球中血红素的重要成分,对造血有重要的作用。Ca是骨骼和牙齿的主要成分。Mg在保护人体心血管、预防心脏病等方面具有积极的作用。K对维持细胞的兴奋性、机体肾脏的正常功能均有重要的作用<sup>[3]</sup>。

皖东黄牛不同部位肌肉中Mg、Fe、K、Zn、Ca、P矿物元素含量与已报道的青海湖牦牛肉中所含相应矿物元素<sup>[4]</sup>比较,皖东黄牛肌肉中富含Mg、Ca,而Zn、Fe的含量明显偏低。牛肉中矿物元素含量的高低与其品种、所处的地理位置、气候及牛所采食的饲料植物中矿物元素和土壤中矿物元素的含量有直接关系,皖东黄牛处于丘陵地带,所处环境地区盛产石灰石,且以放牧为主,饲料中不添加任何矿物元素及微量元素,从而导致了Ca、Mg含量高,而Zn、Fe含量低的现象。

矿物元素在不同部位肌肉中的分布与沉积存在很大差异,这与不同部位肌肉生理功能、组织结构差异有关,其分布与沉积机制及各矿物元素间的相互作用,还需要进一步的深入研究。

### 参考文献:

- [ 1 ] 强 刚,曹发魁,高发奎. PAL饲料添加剂对鸡蛋鸡肉中微量元素含量的影响[J]. 甘肃科技,2005,21(2):172-174.
- [ 2 ] 苗 健,高 琦,许思来. 矿物元素与相关疾病[M]. 郑州:河南医科大学出版社,1997:7-8.
- [ 3 ] 杜炳旺,何 洋,余家冰,等. 贵妃鸡肌肉及肝脏中八种矿物质元素的测定与分析[J]. 家禽科学,2008,11(1):10-14.
- [ 4 ] 朱喜艳. 青海牦牛肉与日本牛肉中矿物元素含量的对比分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2010(8):33-34.
- [ 5 ] Rev Microbiol, 2001(55): 625-646.
- [ 6 ] Larissa BARELLI, Israel Enrique PADILLA- GUERRERO et al. Differential expression of insect and plant specific adhesin genes, Mad1 and Mad2, in Metarhizium robertsii[J]. fungal biology, 2011(115): 1174-1185.
- [ 7 ] Wang C S, St Leger R J. The MAD1 adhesin of Metarhizium anisopliae links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants[J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(5): 808-816.
- [ 8 ] Chomezynski P, Brar A K. Single- step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform extraction[J]. Analytical Biochemistry, 1987(162): 156-159.
- [ 9 ] 张 洁. 一种改良的真菌总RNA提取方法[J]. 山西农业科学, 2011, 39(12): 1272- 1273, 1276.
- [ 10 ] Sambrook J, Fritsch E F, Mani Atis T. Molecular Cloning[M]. New York: Cold Spring HarborLaboratory Press, 1989.
- [ 11 ] 郭广君,吕素芳,王荣富. 外源基因表达系统的研究进展[J]. 科学技术与工程, 2006, 6(5): 582-587.
- [ 1 ] Clarkson J M, Charnley A K. New insights into them echanisms of fungal pathogenesis in insects[J]. Trends Microbiol, 1996(4): 197-203.
- [ 2 ] Holder D J, Keyhani N O. Adhesion of the entomopatho-genic fungus Beauveria (Cordyceps) bassiana to substrata[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(9): 5260-5266.
- [ 3 ] Shuren F H J and Wessels J G H. Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of Schizophyllum commune: homologies with a gene not regulated by mating type genes[J]. Gene, 1990, 90(2): 199-205.
- [ 4 ] 吕丁丁,李增智,王成树. 虫生真菌分子致病机理及基因工程改造研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 443-449.
- [ 5 ] Wosten H A. Hydrophobins: multipurpose proteins[J]. Annu