

马铃薯 M 病毒衣壳蛋白原核表达和多克隆抗体制备

张春雨¹, 李小宇¹, 万 千^{1,2}, 夏黎明^{1,3}, 王忠伟¹, 王韬远³, 王永志^{1*}

(1. 吉林省农业科学院/东北作物有害生物综合治理重点实验室/吉林省农业微生物重点实验室, 吉林 公主岭 136100; 2. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 3. 芜湖职业技术学院园林园艺学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要:本研究利用 RT-PCR 技术从发病马铃薯植株叶片中克隆马铃薯 M 病毒(Potato virus M, PVM)的衣壳蛋白全长基因, 该基因由 912 个碱基组成。将其亚克隆到表达载体 pET-28b(+) 中后, 转化大肠杆菌菌株 Rosetta。经 IPTG 诱导处理后, 获得的重组蛋白大小约为 33 kDa, 与预期大小一致。经镍离子亲和层析纯化后免疫日本大耳白兔, 制备多克隆抗体, 免疫 4 次后多抗血清效价为 1:64 000。经 ELISA 和 Western blot 分析表明, 多克隆抗体能够特异性的识别 PVM。PVM 多克隆抗体的制备为 PVM 快速检测方法的建立奠定了基础。

关键词:马铃薯 M 病毒; 衣壳蛋白; 表达纯化; 多克隆抗体

中图分类号: S435.32

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2017)03-0027-04

Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of the Potato Virus M Coat Protein

ZHANG Chunyu¹, LI Xiaoyu¹, WAN Qian^{1,2}, XIA Liming^{1,3}, WANG Zhongwei¹, WANG Taoyuan³, WANG Yongzhi^{1*}

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northeast, Ministry of Agriculture/Jilin Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Gongzhuling 136100; 2. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 3. College of Landscape and Dardening, Wuhu Institute of Technology, Wuhu 241000, China)

Abstract: Coat Protein coding gene of Potato Virus M (PVM) was cloned from leaf of infected potato plant by RT-PCR, and it was composed of 912 base pairs. It was subcloned to pET-28b(+), the construct was then transformed into E.coli Rosetta. Induced by IPTG, coat protein was expressed as a 33 kDa protein. After the purification by Ni-NTA resin, the purified protein was used as the antigen to immunize rabbits. The serum titer reached to 1:64 000 after the forth immunization. These anti-serums can recognize specifically natural PVM that was proved by ELISA and Western blot analysis. The preparation of polyclonal antibody against PVM laid a foundation for the establishment of rapid detection method for PVM.

Key words: Potato virus M; Coat protein; Expression and purification; Polyclonal antibody

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)属茄科多年生草本植物,块茎可供食用,是全球第四大重要的粮食作物,仅次于小麦、水稻和玉米^[1-2]。马铃薯是重要的粮菜兼用作物,在我国粮食生产和国民经济发展中占有重要的地位。2015年,我国开始实施马铃薯主粮化战略。

马铃薯病毒病是马铃薯的主要病害,侵染马铃薯的病毒多达 30 多种^[3]。其中马铃薯 M 病毒(Potato virus M, PVM)属于乙型线形病毒科(*Betaflexiviridae*)、香石竹潜隐病毒属(*Carlavirus*),是侵染东北地区马铃薯的主要病毒之一。该病害又名马铃薯小叶病,侵染症状主要表现为由植株心叶长出的复叶开始变小,与下位叶差异明显,小叶常畸形,叶面粗糙^[4],在马铃薯主要种植产区均有发生,常与马铃薯 S 病毒(Potato virus S, PVS)等复合侵染,造成马铃薯减产 15% ~ 45%^[5-8]。

目前,培育脱毒种薯是防治 PVM 的有效方法^[8],脱毒生产过程中需要对病毒进行检测,免疫

收稿日期: 2017-03-31

基金项目: 吉林省农业科学院创新工程项目(CXGC2017TD007)

作者简介: 张春雨(1988-),女,研究实习员,硕士,研究方向:植物病毒病防治。

通讯作者: 王永志,男,博士,副研究员, E-mail: yzwang@126.com

学检测是最常用的方法。通过原核表达病毒的衣壳蛋白(Coat protein, *cp*), 以此为抗原制备高特异性抗体进行免疫学检测是病毒检测的有效途径^[9]。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

马铃薯感病叶片、大肠杆菌感受态 DH5 α 菌株、Rosetta 菌株、pET-28b(+) 质粒由本实验室保存; 日本大耳白兔购自长春生物制品所; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; cDNA 合成试剂盒、限制性内切酶 Hind III、Xho I 购自 TaKaRa 公司; Easy-Mix DNA 聚合酶购自北京全式金生物公司; 无内毒素质粒小量中提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自天根生化(北京)技术有限公司; T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 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。

1.2 试验方法

1.2.1 PVM *cp* 基因的克隆

根据 GENBANK 中已有的 PVM 病毒设计了 *cp* 基因的特异性引物:

PVM *cp*-s: AATAATAATAAGCTTATGGGT-GATTCAACAAAGAAAG(Hind III);

PVM *cp*-a: AATAATAATCTCGAGTCATTTTC-TATTCCGACTTTCATAATCCC(Xho I)。

TRIzol 法^[10]提取 PVM 侵染的马铃薯叶片总 RNA, 反转录合成 cDNA, 具体方法参考试剂盒说明书。以此为模板, PCR 扩增 *cp* 基因, PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物经凝胶回收后测序。

1.2.2 原核表达载体的构建

测序成功的 PCR 产物和 pET-28b(+) 质粒经 Hind III、Xho I 双酶切后, 凝胶回收目的片段, T4 DNA 连接酶作用下构建重组质粒 pET28b-PVM *cp*, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态, 经双酶切验证后测序。

1.2.3 重组蛋白的表达

将构建成功的重组质粒 pET28b-PVM *cp* 转入大肠杆菌 Rosetta(DE3) 感受态, 挑取单菌落鉴定成功后扩增繁殖。采用不同的 IPTG 浓度、诱导时间、诱导温度, 诱导前测 OD₆₀₀ 值进行诱导表达, 确定最佳诱导条件^[11]。

1.2.4 重组蛋白的纯化和鉴定

采用优化的表达条件进行大量表达, 收集菌体,

反复冻融 3 次, 用 PBS 悬浮菌体沉淀, 8 000 r/min 离心 5 min, 包涵体沉淀用 pH=8.0 含 8 mol/L 尿素的裂解液 37 $^{\circ}$ C 裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清蛋白与 Ni²⁺-NTA 填料结合, 分别用 pH=8.0、6.0 的 8 mol/L 尿素溶液洗涤去杂蛋白后, 用 pH=4.0 的 8 mol/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^[12]。纯化后的重组蛋白用 Western blot 法鉴定^[13], 将诱导前沉淀、诱导后沉淀(包涵体)及纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转入 PVDF 膜, 5% 脱脂奶封闭, TBST 洗膜, 一抗为稀释 2 000 倍的抗 His 标签单克隆抗体, 二抗为稀释 5 000 倍的碱性磷酸酶标记兔抗鼠 IgG。

1.2.5 多克隆抗体的制备及检测

以纯化后的 PVM *cp* 蛋白作为免疫抗原, 与等体积完全弗氏佐剂混合, 充分乳化后对家兔采取 5 点法皮下注射进行基础免疫, 每隔两周以蛋白加入等体积不完全弗氏佐剂加强免疫 3 次, 末次免疫 2 周后采耳血^[13], 提取血清检测效价。

分别以纯化的蛋白(1 μ g/孔)和 PVM 染病叶片总蛋白(10 μ g/孔)为抗原包被酶标板, 血清稀释比例为 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000 共 8 个梯度, 二抗为稀释 5 000 倍的碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG。

多抗的特异性检测: 以马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY)重组衣壳蛋白及 PVY 感染叶片作为阴性对照, Western blot 法检测抗体的特异性。以马铃薯 S 病毒(Potato virus S, PVS)重组衣壳蛋白及 PVS 感染叶片作为阴性对照, 多抗血清为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 间接 ELISA 法检测抗体对同属病毒的特异性。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建及鉴定

成功克隆了 PVM *cp* 基因, 产物回收后测序成功, 大小为 912 bp。将 PCR 回收产物, 与载体 pET-28 b(+) 分别双酶切, 胶回收目的条带, 在 T4 DNA 连接酶作用下构建重组质粒 pET28b-PVM *cp*, 重组经双酶切验证, 产生大小约 5 340 bp 和 912 bp 的两条带, 如图 1 所示。重组质粒经测序分析, 其插入序列为 912 bp, 且开放阅读框正确, 说明重组质粒构建成功。

2.2 PVM *cp* 重组蛋白表达

将重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta(DE3) 感受态, IPTG 诱导表达。经优化, 确定诱导条件为:

IPTG 浓度 0.1% (v/v), 37°C 诱导 3 h。产物经 SDS-PAGE 电泳, 如图 2 所示, 在相对分子量 33 kDa 左右处, 诱导后沉淀中有一条特异性条带, 与预期大小一致。诱导后上清未出现目的条带, 说明重组蛋白主要以包涵体形式存在。

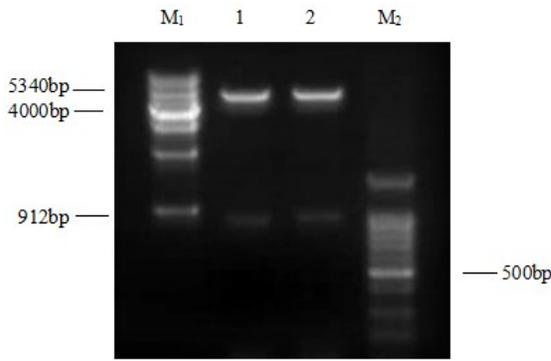


图 1 重组质粒 pET28b-PVM cp 双酶切检测
M₁: 1Kb DNA ladder; 1-2: 双酶切产物; M₂: 100bp DNA ladder

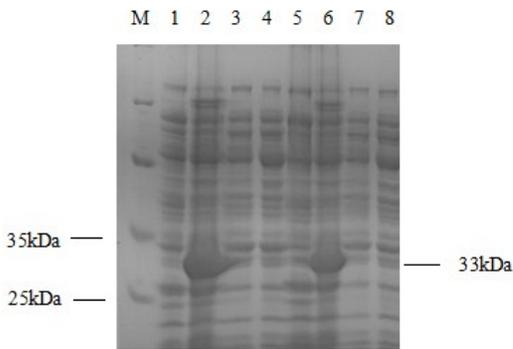


图 2 PVM cp 重组蛋白表达
M: 未预染蛋白分子量标准; 1, 5: 诱导前沉淀;
2, 6: 诱导后沉淀; 3, 7: 诱导前上清; 4, 8: 诱导后上清

2.3 PVM cp 重组蛋白纯化及鉴定

由于 PVM cp 重组蛋白以包涵体形式表达, 将包涵体用高浓度变性剂 (8 mol/L 尿素) 处理后, 经镍离子亲和层析纯化, 如图 3 所示, 从洗脱的第三管开始, 在相对分子量 33 kDa 处得到清晰的条带, 分子

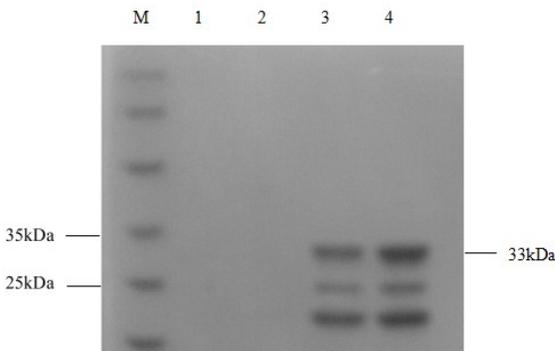


图 3 PVM cp 重组蛋白纯化
M: 未预染蛋白分子量标准; 1-4: 纯化后的 PVM cp

量与 PVM cp 相符, 另外的二条杂带疑似为 PVM cp 降解产物, 可能是纯化过程中蛋白出现降解现象。

以抗 His 标签单克隆抗体为检测抗体, Western blot 方法鉴定纯化后的蛋白, 如图 4 所示, 诱导后沉淀及纯化后蛋白在 33 kDa 处有明显的特异性条带, 表明纯化后所获得的蛋白为 PVM cp 重组蛋白。以纯化后的重组蛋白作为抗原免疫日本大耳白兔, 制备多克隆抗体。

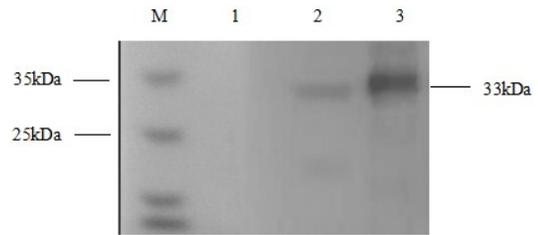


图 4 纯化后蛋白 Western blot 鉴定
M: 蛋白分子量标准; 1: 诱导前沉淀;
2: 诱导后沉淀; 3: 纯化后蛋白

2.4 多克隆抗体的效价检测

以纯化后的重组蛋白及天然病毒蛋白分别作为抗原包被酶标板, 免疫 4 次后获得的兔源抗体血清稀释比例为 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000 共 8 个梯度, 采用间接 ELISA 法测定效价。结果如图 5 所示, 设定 P/N 值大于 2 为阳性, 结果显示制备的 PVM cp 兔抗血清效价达到 1:64 000, 且识别天然蛋白效价达到 1:32 000。

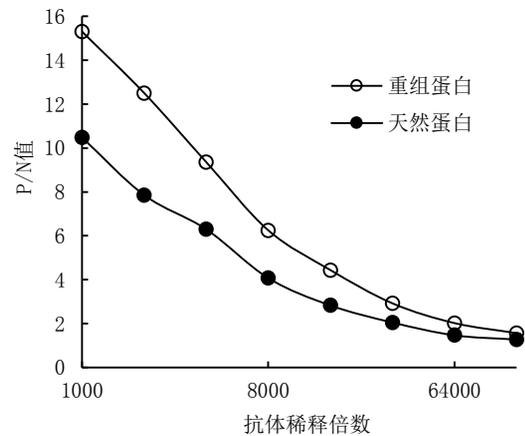


图 5 PVM cp 多抗效价检测

2.5 多克隆抗体特异性检测

对多克隆抗体的特异性进行 Western blot 分析, 以本实验室纯化的马铃薯 Y 病毒 (Potato virus Y, PVY) 重组衣壳蛋白及 PVY 感染叶片作为阴性对照, 如图 6 所示, 在 33 kDa 处多抗血清能够识别特异性条带。多抗血清在识别天然病毒蛋白时有

单一明显条带且位置正确。阴性对照无检测条带。

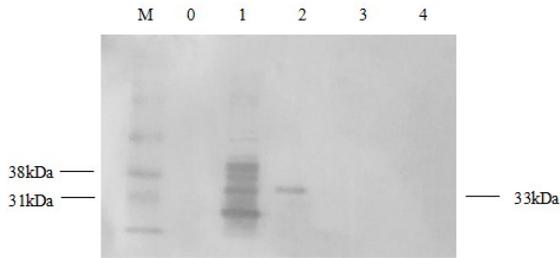


图6 Western blot 检测多抗特异性

M: 蛋白分子量标准; 0: 空白; 1: 重组 PVM 衣壳蛋白;
2: PVM 感染叶片总蛋白; 3: 重组 PVY 衣壳蛋白;
4: PVY 感染叶片总蛋白

马铃薯 S 病毒 (Potato virus S, PVS) 与 PVM 为同属病毒, 且常复合侵染植株, 是我国马铃薯种植区的主要病毒^[14]。比对 PVS *cp* 与 PVM *cp* 的碱基同源性和蛋白同源性为 54.9%, 蛋白同源性为 56.1%。为进一步检测 PVM 多抗的特异性, 利用间接 ELISA 法检测 PVS 重组衣壳蛋白及感染叶片, 结果均呈阴性, 说明制备的多抗血清特异性好。

3 讨论

目前国内马铃薯病毒检测主要依赖国外生产的试剂盒, 检测成本较高^[5]。国内制备的多克隆抗体主要采用病毒纯化技术, 由于 PVM 在马铃薯中常以复合侵染形式存在, 病毒纯化需大量获得 PVM 纯毒源, 难度较大, 对质量要求较高^[4, 15], 且制备的多抗血清效价不高, 无法媲美国外试剂盒水平, 是试剂盒国产化亟待解决的难题。利用原核表达病毒的衣壳蛋白基因能够快速富集高纯度的重组病毒衣壳蛋白作为抗原制备抗体, 是制备马铃薯病毒抗体的有效途径^[16]。

本试验利用原核表达 PVM *cp* 免疫动物筛选获得高效价、高特异性的多抗血清, 经筛选获得的抗血清能够识别天然病毒, 且效价较高, 检测 PVM 感病叶片, 效价为 1:32 000。在抗体特异性检测试验中, 制备的抗血清作为一抗进行间接 ELISA 检测, 能够准确检测出阳性样品, 不识别其他病毒, 包括同属、亲缘性较高的病毒 PVS, 与 RT-PCR 及基因芯片检测结果 100% 相符。在间接 ELISA 过程中作为一抗识别抗原的过程可在室温中进行, 最终的显色结果依然很明显, 说明制备的抗血清与病毒结合的能力很强, 可以应用于

病毒的快速检测, 如检测试剂盒、试纸条的研发^[17]。

参考文献:

- [1] Qu Dong-yu, Xie Kai-yun, Jin Li-ping, et al. Development of potato industry and food security in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 91(2): 358-362.
- [2] 张正坤, 鲁新, 李建平, 等. 东北地区马铃薯甲虫监测与入侵风险分析[J]. *吉林农业科学*, 2012, 37(2): 42-44.
- [3] 吴兴泉, 时妍, 杨庆东, 等. 我国马铃薯病毒的种类及脱毒种薯生产过程中病毒的检测[J]. *中国马铃薯*, 2011, 25(6): 363-366.
- [4] 范国权, 白艳菊, 高艳玲, 等. 马铃薯 M 病毒提纯技术及抗血清制备[J]. *植物保护学报*, 2010, 37(5): 479-480.
- [5] 张威, 白艳菊, 文景芝, 等. 马铃薯 M 病毒生物学特性研究[J]. *东北农业大学学报*, 2017, 48(1): 1-6.
- [6] 范国权, 白艳菊, 高艳玲, 等. 我国马铃薯主产区病毒病发生情况调查[J]. *黑龙江农业科学*, 2014(3): 68-72.
- [7] Huimin Xu, Jeanette D'Aubin, Jingbai Nie, et al. Genomic variability in potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in speed potatoes[J]. *Virology Journal*, 2010, 25(7): 2-7.
- [8] 黄萍, 颜谦, 丁映, 等. 贵州省马铃薯 S 病毒的发生及防治[J]. *贵州农业科学*, 2009, 37(8): 88-89.
- [9] Wang B, Ma Y, Zhang Z, et al. Potato virus in China[J]. *Crop Protection*, 2011(30): 1117-1123.
- [10] 吴兴泉, 陈士华, 吴祖建, 等. 马铃薯 X 病毒 CP 基因的原核表达及特异性抗血清的制备[J]. *郑州工程学院学报*, 2003, 6(24): 25-28.
- [11] 王永志, 苏颖, 米丽娟, 等. 东北地区大豆花叶病毒 3 号株系衣壳蛋白的表达、纯化及单克隆抗体的制备[J]. *吉林农业科学*, 2011, 36(6): 37-39.
- [12] 张淋淋, 李小宇, 张春雨, 等. 大豆花叶病毒东北 3 号株系 NIB 蛋白表达、纯化及单克隆抗体制备[J]. *东北农业科学*, 2016, 41(3): 62-66.
- [13] 李小宇, 张正坤, 王秋华, 等. Carboxin 抗性基因 (CbXR) 原核表达及多克隆抗体的制备[J]. *生物技术*, 2015, 25(4): 320-323.
- [14] 宋革. 马铃薯 S 病毒和马铃薯 Y 病毒单克隆抗体的制备及应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [15] 李楠楠, 左玉玲, 隋炯明, 等. 重组 CP 多克隆抗体在马铃薯卷叶病毒 DAS-ELISA 检测中的应用[J]. *华北农学报*, 2011, 26(6): 85-88.
- [16] 宋志成, 费新敏, 杨煜, 等. 马铃薯 A 病毒重组 CP 多克隆抗体的制备及其在 DAS-ELISA 检测中的应用[J]. *华北农学报*, 2017, 32(1): 41-46.
- [17] 杨帅, 闵凡祥, 高云飞, 等. 马铃薯晚疫病菌高灵敏性 PCR 检测技术研究[J]. *东北农业科学*, 2016, 41(4): 79-85.

(责任编辑: 王昱)