

OYDV 衣壳蛋白表达及其单克隆抗体分析

王永志^{1,2}, 万 千¹, 李小宇¹, 张春雨¹, 刘宝泉¹, 李忠鹏¹, 苏 颖¹, 周雪平^{2*}

(1. 吉林省农业科学院植物保护研究所/农业部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. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘 要:洋葱黄矮病毒(Onion yellow dwarf virus, OYDV)是危害洋葱质量和产量的主要病毒之一。本研究从吉林省农安县的分蘖洋葱种植区分离到一株 OYDV, 通过 RT-PCR 克隆 OYDV 衣壳蛋白(coat protein, *cp*)基因, 构建重组质粒 pET28-OYDV-*cp*, 转化大肠杆菌 Rosetta, 经诱导后表达并纯化, Western-blot 鉴定为 OYDV *cp* 蛋白。与实验室制备的 9 株大豆花叶病毒单克隆抗体进行反应, 得出其中 3 株单克隆抗体(2D3、4F9、4G12)能够识别 OYDV。综上, 本研究首次从分蘖洋葱上分离并鉴定 OYDV, 对 OYDV *cp* 基因进行原核表达, 获得重组蛋白, 并且鉴定到能够识别 OYDV 的单克隆抗体 3 株, 为分蘖洋葱病毒检测提供了抗体材料。

关键词:洋葱黄矮病毒; 衣壳蛋白; 单克隆抗体

中图分类号: S436.33

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2018)02-0026-04

Expression of Coat Protein from Onion Yellow Dwarf Virus and Identification of Its Monoclonal Antibodies

WANG Yongzhi^{1,2}, WAN Qian¹, LI Xiaoyu¹, ZHANG Chunyu¹, LIU Baoquan¹, LI Zhongpeng¹, SU Ying¹, ZHOU Xueping^{2*}

(1. Institute of Plant Protection, 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. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Onion yellow dwarf virus (OYDV) is one of the major viruses that damage the quality and yield of shallot. In this study, OYDV was isolated from the tiller onion plantation in Nongan County, Jilin Province, and the OYDV *cp* gene was cloned by RT-PCR. The recombinant plasmid pET28-OYDV-*cp* was constructed and transformed into Escherichia coli strain Rosetta. Then *cp* was expressed and purified after induction and was identified as OYDV *cp* protein by Western-blot. The reaction analysis of OYDV *cp* protein with 9 monoclonal antibodies against Soybean mosaic virus showed that three monoclonal antibodies (2D3, 4F9, 4G12) could recognize specifically OYDV. In summary, OYDV *cp* was isolated from the tiller onion for the first time. The recombinant *cp* was obtained by prokaryotic expression, and three strains of monoclonal antibody capable of recognizing OYDV were identified, which provided antibody material for the detection of OYDV.

Key words: Onion yellow dwarf virus; Capsid protein; Monoclonal antibody

分蘖洋葱(*Allium cepa* var. *aggregatum*), 又称分蘖葱头, 俗称毛葱、鬼子葱, 为百合科葱属两年生草本植物, 是北方地区特色经济作物^[1], 具有抗癌、抑菌、消炎等保健功能。分蘖洋葱大量出

口欧洲、东南亚和韩国等地, 种植面积逐年增加, 吉林省 2016 年种植面积约为 1 万公顷。本研究发

发现 OYDV 能够侵染分蘖洋葱, OYDV 感染植株后, 存在于感病植株的根、叶和鳞茎等各个部分^[2], 表现为矮化, 叶片伴随局部不规则发黄, 后期整个叶片发黄、向下卷曲、起皱及萎缩等症

状^[3]。尤其是与其它病毒复合感染后, 因鳞茎母体带病毒而垂直传染给后代, 引起种性退化, 产量及品质逐年降低, 直至最后毁种。

洋葱黄矮病毒(Onion yellow dwarf virus, OYDV)

收稿日期: 2017-11-28

基金项目: 吉林省科学技术厅重点项目(20180201013NY); 吉林省创新工程项目(CXGC2017TD007、CXGC2017JQ021)

作者简介: 王永志(1978-), 男, 副研究员, 博士, 从事分子病毒学研究。

通讯作者: 周雪平, 男, 博士, 研究员, E-mail: zzhou@zju.edu.cn

隶属于马铃薯Y病毒属,是为害洋葱的主要病毒之一,也可以侵染多种其他百合科植物^[4]。OYDV的基因组为单链正义RNA,分子量为 $3.0 \times 10^6 \sim 3.5 \times 10^6$,核酸占病毒粒子重量的5%,基因组的5'端序列结合有基因组连接蛋白(viral protein genome-linked, VPg),3'端具有poly(A)尾^[5-7]。OYDV的基因组含有一个大的开放阅读框,通过蛋白酶裂解成10个成熟蛋白,从N端到C端依次为P1、HC-Pro、P3、6K1、CI、6K2、NIa-VPg、NIa-Pro、NIb和CP^[8-9]。其中CP是结构蛋白,参与病毒的包装、症状表现和胞间长距离运输^[10]。OYDV粒子一般通过蚜虫以非持久方式传播,也可以汁液的摩擦接种传播^[11]。本研究对OYDV *cp* 进行原核表达纯化,并与本实验室制备的9株大豆花叶病毒单克隆抗体进行反应性分析^[12],为今后洋葱黄矮病毒快速检测和抗病育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

分蘖洋葱叶片采自吉林省农安县,1C2、2A8、2C1、2D3、3B8、4F9、4G12、5D2、6E7^[12]共9株单克隆抗体均由实验室制备和保存。

La-Taq DNA聚合酶、1st strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒、限制性内切酶购自TaKaRa, T4 DNA连接酶购自Thermo公司,提取质粒试剂盒购于Tian Gen, Ni^{2+} 离子亲和层析柱购自美国GE公司,HRP标记的鼠源抗体购自Sigma公司。

1.2 OYDV毒株的鉴定

采集分蘖洋葱叶片共9个品系,177个样品,通过通用单克隆抗体4F9酶联免疫吸附(ELISA)初选再通过RT-PCR筛选鉴定阳性毒株。

1.3 OYDV *cp*基因的克隆

根据GENBANK中已知洋葱黄矮病毒的病毒基因序列设计了*cp*基因的特异性引物,上游引物为(下划线处为Nco I酶切位点):5'-AATAATAATC-CATGCGCGGCCAGGGGAGGATG-3';下游引物分别为(下划线处为Xho I酶切位点):5'-AATAATA-ATCTCGAGCATTCTGACTCCAAGCAGAG-3'。以TRIzol法抽提OYDV染病叶片的总RNA,用1st strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒合成cDNA体外第一条链,以此为模板用La-Taq DNA聚合酶扩增*cp*基因。反应程序为:94.0℃预变性5 min, 92.0℃变性10 s, 55.0℃退火30 s, 72.0℃延伸30 s, 进行30个循环;72℃再延伸5 min。PCR产物经琼脂糖

凝胶电泳鉴定,PCR产物纯化试剂盒回收,-20℃保存备用。回收后的PCR产物,与pMD18-T载体16℃作用连接1 h,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,构建重组质粒pMD-OYDV-*cp*。

1.4 原核表达载体的构建

利用Nco I和Xho I分别双酶切重组pMD-OYDV-*cp*和原核表达载体pET-28b,凝胶回收目的片段,将OYDV *cp*基因与pET-28b连接,构建重组质粒pET28b-OYDV-*cp*,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,经双酶切和PCR鉴定后,送往测序公司进行测序。

1.5 重组蛋白的表达与鉴定

重组pET28b-OYDV-*cp*转化大肠杆菌Rosetta,经0.1mM IPTG 37℃诱导2 h,获得重组蛋白,SDS-PAGE电泳分析。

1.6 重组蛋白的纯化及鉴定

将诱导表达后的菌液4℃ 12 000 r/min离心10 min,收集菌体。超声波破碎菌体后将包涵体收集,重组蛋白纯化参照文献[13]。包涵体蛋白经8M尿素充分溶解,利用镍离子亲和层析柱纯化,SDS-PAGE电泳分析。

通过Western blot方法对纯化后的重组蛋白进行鉴定,含有空载体的大肠杆菌沉淀作为对照,进行SDS-PAGE电泳,转膜(PVDF)后,5%的脱脂奶进行封闭,PBST缓冲液洗膜5 min,一抗为稀释5 000倍的4G12单克隆抗体,二抗为稀释5 000倍的抗鼠酶标抗体,DAB显色液显色。

1.7 OYDV的抗体分析

通过实验室已制备的9株单克隆抗体,对OYDV侵染的分蘖洋葱叶片悬液以及纯化后的*cp*蛋白参照文献[14]进行ELISA鉴定。包被抗原100μg/孔,37℃包被1 h,PBST洗脱3遍;5%脱脂奶200μL/孔37℃封闭1 h,PBST洗脱3遍;一抗1 000倍稀释于封闭液中,100μL/孔37℃作用30 min,PBST洗脱3遍;酶标抗体5 000倍稀释于封闭液中,100μL/孔37℃作用30 min,PBST洗脱6遍,摔板拍干;室温避光条件下OPD显色5 min后,用1 M的H₂SO₄ 100μL/孔终止反应,酶标仪检测OD_{490nm}值,读数。计算出检测值与阴性值之比(P/N值)。当其值≥2.1时,检测结果呈阳性,以“+”记录^[15]。

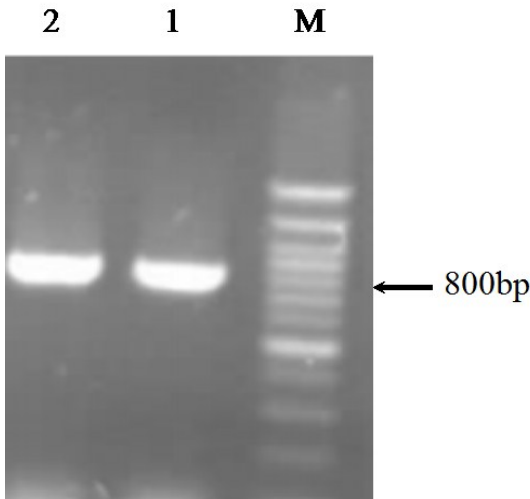
2 结 果

2.1 OYDV田间调查

通过4F9通用单克隆抗体ELISA初选分蘖洋葱阳性毒株45株,RT-PCR鉴定9株阳性毒株。

2.2 OYDV cp基因克隆

TRIzol 法提取 OYDV 染病的分蘖洋葱叶片总 RNA,以反转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明,在 800 bp 左右有 1 条特异性条带,与 OYDV cp 基因大小(771 bp)相吻合(见图 1),回收后连入 pMD-18T 载体中,经双酶切鉴定,产生大小约为 2 700 bp 和 800 bp 两条带。测序结果进行 BLAST 分析克隆的基因为 OYDV cp 基因,并登录到 GenBank 中(登录号:KY347900.1)。



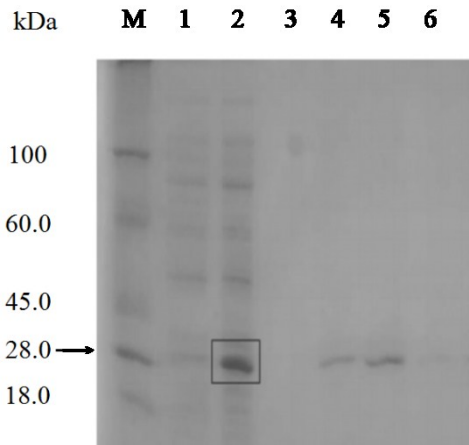
M: 100 bp plus marker; 1, 2: OYDV cp 基因 PCR 扩增产物
图 1 OYDV cp 基因 PCR 扩增产物

2.3 衣壳蛋白的表达与纯化

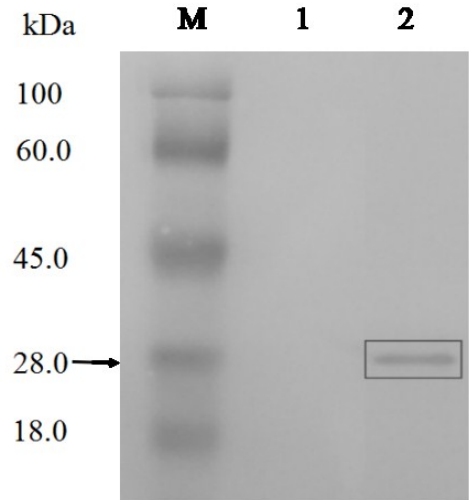
OYDV cp 基因与 pET-28b(+)连接,构建重组质粒 pET28b-OYDV-cp,经双酶切鉴定产生大小约为 5 300 bp 和 800 bp 的两条带,经 PCR 鉴定产生大小约为 800 bp 的一条带,表明重组质粒构建成功。pET28b-OYDV-cp 转化大肠杆菌 Rosetta,经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 电泳发现,在相对分子量 28 kDa 处,沉淀中有 1 条特异性条带。以融合的包涵体形式表达的 OYDV cp 重组蛋白经镍离子亲和层析纯化(见图 2),得到清晰的单一条带,分子量大小与 OYDV cp 重组蛋白相符,说明经过纯化后获得了高纯度的 OYDV cp 重组蛋白。

对纯化后的 OYDV cp 蛋白进行 Western blot 鉴定,结果表明(图 3),PVDF 膜上出现清晰条带,

与目的蛋白大小相符。



M: 蛋白质分子量标准; 1: OYDV cp 蛋白诱导前菌体;
2: OYDV cp 蛋白诱导后菌体; 3-6: 纯化后的 OYDV cp 蛋白
图 2 OYDV cp 蛋白的诱导及纯化



M: 蛋白质分子量标准; 1: 阴性对照;
2: 纯化后的 OYDV cp 蛋白
图 3 OYDV cp 蛋白 Western blot 分析

2.4 OYDV 抗体分析

以 OYDV 染病叶片研磨上清和纯化的 OYDV cp 蛋白为抗原,分别用 9 株单克隆抗体进行 ELISA 分析,如表 1 显示,2D3、4F9、4G12 既能够识别染病叶片,也能够识别重组蛋白,其中抗体 4F9 和 4G12 识别染病叶片的程度高于 2D3。其余抗体检测均为阴性。

表 1 9 株单克隆抗体对病毒悬液、重组蛋白的 ELISA 分析

	1C2	2A8	2C1	2D3	3B8	4F9	4G12	5D2	6E7
OYDV	-	-	-	++	-	+++	+++	-	-
OYDV cp	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	-
阴性对照	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: OYDV: 洋葱黄矮病毒分离物; OYDV cp: 洋葱黄矮病毒衣壳蛋白; -: P/N<2.1; ++: 5≤P/N<10; +++: P/N≥10

3 讨 论

OYDV 隶属于马铃薯 Y 病毒属,该属基因组编码一个多聚蛋白,并通过自身蛋白酶切割后形成至少 10 个功能不同的成熟蛋白,其中衣壳蛋白在病毒的侵染过程中具有重要作用,含有多个抗原决定簇,决定着病毒的抗原性^[16-17]。

本研究使用的单克隆抗体,与天然病毒分离物和体外表达的 cp 蛋白反应有差异,这是由于病毒分离物为天然构象蛋白,体外表达的 cp 蛋白缺少在生物体内的蛋白折叠及修饰,在蛋白结构上两者不一致,导致同一抗体与两种抗原状态的亲和力不同^[18]。

目前已知能感染分蘖洋葱的马铃薯 Y 病毒属病毒只有 OYDV,因此利用本研究鉴定的 3 株单克隆抗体检测为阳性的样品,可以判断为 OYDV 侵染^[19]。

本研究鉴定了 3 株识别 OYDV 的单克隆抗体,与多克隆抗体相比较具有特异性高的特点,其中单克隆抗体 4G12 和 4F9 与 OYDV 反应的亲和力非常高,适合病毒检测及检测试剂的开发。另外,鉴定的单克隆抗体 4G12 和 4F9 能够识别马铃薯 Y 病毒属多个病毒,说明这两个抗体识别的抗原表位在马铃薯 Y 病毒属中具有保守性,本研究又证明该抗体可以识别洋葱黄矮病毒,进一步扩大了该抗体的识别范围。因此,单克隆抗体 4G12 和 4F9 为马铃薯 Y 病毒属的病毒检测、致病机理研究及利用植物抗体技术进行抗病分子育种提供了基础材料^[20]。

参考文献:

- [1] 李曙轩.蔬菜栽培学各论[M].北京:中国农业出版社,1980:12.
- [2] 李金娟,李 唯,栗孟飞,等.3 种大蒜中洋葱黄矮病毒的 RT-PCR 分子鉴定[J].基因组学与应用生物学,2011,30(3):330-335.
- [3] 鲁宇文.侵染大蒜的线状植物病毒的外壳蛋白基因原核表达、抗血清制备及检测应用[D].杭州:浙江大学,2006.
- [4] 许 蕊.三种大蒜病毒的 RT-PCR 及多重 RT-PCR 检测研究[D].兰州:甘肃农业大学,2012.
- [5] Siaw M F, Shahabuddin M, Ballard S, et al. Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of tobacco vein mottling virus RNA[J]. Virology, 1985, 142(1): 134-143.
- [6] Murphy J F, Rhoads R E, Hunt A G, et al. The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase[J]. Virology, 1990, 178(1): 285-288.
- [7] Takahashi Y, Takahashi T, Uyeda I. A cDNA clone to clover yellow vein potyvirus genome is highly infectious[J]. Virus Genes, 1997, 14(3): 235-243.
- [8] Valli A, López-Moya J J, García J A. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family Potyviridae[J]. Journal of General Virology, 2007, 88: 1016-1028.
- [9] Zhang H M, Chen J P, Adams M J. Molecular characterisation of segments 1 to 6 of Rice black-streaked dwarf virus from China provides the complete genome[J]. Archives of Virology, 2001, 146(12): 2331-2339.
- [10] Chen J, Chen J P, Adams M J. Characterisation of some carla- and potyviruses from bulb crops in China[J]. Archives of Virology, 2002, 147(2): 419-428.
- [11] 韦传宝,华俊雅,杨 宇,等.韭葱黄条病毒、洋葱黄矮病毒和胡葱黄条病毒六安分离物 CP 基因克隆及同源性分析[J].广西植物,2012,32(2):231-237.
- [12] 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、纯化及单克隆抗体制备[J].吉林农业科学,2011,36(6):37-39.
- [13] 宋 革,郭玉双,饶黎霞,等.马铃薯 Y 病毒单克隆抗体的制备及其检测应用[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2016(5):517-526.
- [14] 刘 勇,莫笑晗,余 清,等.云南、福建、湖南烟区烟草花叶病主要病毒种类检测及黄瓜花叶病毒亚组鉴定[J].植物病理学报,2006(4):310-313.
- [15] 谢联辉,林奇英.植物病毒学[M].北京:中国农业出版社,2004:26.
- [16] Gao Z, Johansen E S, Thomas C, et al. The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking[J]. Plant Journal, 2004, 40(3):376-385.
- [17] Dunoyer P, Thomas C, Harrison S, et al. A cysteine-rich plant protein potentiates Potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg[J]. Journal of Virology, 2004, 78(5):2301-2309.
- [18] 尤 晴,李小宇,张春雨,等.马铃薯 Y 病毒属三种病毒通用型单克隆抗体的鉴定[J].植物保护,2016,42(6):76-79.
- [19] 张春雨,李小宇,万 千,等.马铃薯 M 病毒衣壳蛋白原核表达和多克隆抗体制备[J].东北农业科学,2017,42(3):27-30.
- [20] 李小宇,张正坤,王秋华,等. Carboxin 抗性基因(Cbx-R)原核表达及多克隆抗体的制备[J].生物技术,2015,25(4):320-323.

(责任编辑:王 昱)