

# 马铃薯卷叶病毒衣壳蛋白原核表达及多克隆抗体的制备

王韬远<sup>1</sup>, 张春雨<sup>2</sup>, 王忠伟<sup>2</sup>, 李 闯<sup>2</sup>, 张胜利<sup>3</sup>, 李建平<sup>2</sup>, 李小宇<sup>2\*</sup>, 王永志<sup>2\*</sup>

(1. 芜湖职业技术学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100; 3. 吉林省蔬菜花卉科学研究所, 长春 130000)

**摘要:**本研究克隆马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)衣壳蛋白( Coat Protein, CP)基因, 改造其密码子, 使其偏好原核表达, 构建 *pCznI-PLRV CP* 重组表达载体, 通过大肠杆菌表达纯化, 经 Western Blot 方法鉴定为 PLRV CP 蛋白, 纯化后的蛋白免疫日本大耳兔, 成功制备 PLRV CP 蛋白多克隆抗体, 识别重组蛋白效价为 128 000 倍, 识别 PLRV 叶片的效价为 32 000 倍, 经 Western Blot 方法分析, 其特异性良好。本研究为 PLRV 检测方法的建立及脱毒种薯的检测提供了必需的生物材料。

**关键词:** 马铃薯卷叶病毒; 衣壳蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S435.32

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)04-0020-04

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

WANG Taoyuan<sup>1</sup>, ZHANG Chunyu<sup>2</sup>, WANG Zhongwei<sup>2</sup>, LI Chuang<sup>2</sup>, ZHANG Shengli<sup>3</sup>, LI Jianping<sup>2</sup>, LI Xiaoyu<sup>2\*</sup>, WANG Yongzhi<sup>2\*</sup>

(1. Wuhu Institute of Technology, Wuhu 241000; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100; 3. Jilin Academy of Vegetable and Flower Sciences, Changchun 130000, China)

**Abstract:** In this study, the potato leafroll virus (PLRV) Coat Protein (CP) gene was cloned, its codon was modified to favor prokaryotic expression, and the *pCznI-PLRV CP* recombinant expression vector was constructed, which was expressed and purified by *E. coli*. The purified protein was identified as PLRV CP protein by Western Blot. The purified protein was immunized with Japanese rabbit, and PLRV CP polyclonal antibody was successfully prepared. The recombinant protein was identified as 128 000 times, and the PLRV leaf was identified as 32 000 times. The specificity was good after Western Blot analysis. This study provides necessary biomaterials for the establishment of PLRV detection method and the detection of virus-free seed potato.

**Key words:** Potato leafroll virus; Coat protein; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody

我国是世界第一大马铃薯生产国, 种植面积占全球 25%, 总产量约占全球的 20%, 随着 2015 年我国提出马铃薯主粮化战略, 马铃薯已成为第四大主粮作物<sup>[1]</sup>。在马铃薯生产过程中, 病毒病是最严重的病害之一, 可以通过种薯传播, 所以脱毒种薯的质量检测在生产繁育中尤为重要。

马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)是马铃薯主要病害之一, 当病毒侵染植株后, 会造成叶片卷曲, 降低光合效率, 严重影响了马铃薯的产量和质量<sup>[2]</sup>。随着分子生物学的快速发展, 人们对 PLRV 的基因组结构及其编码的功能蛋白进行了大量的研究。PLRV 具有 6 个编码区, 其中 ORF3 编码的衣壳蛋白(Coat Protein, CP)与病毒侵染时的包装、稳定性以及在宿主植株体内的传播和移动有关<sup>[3-4]</sup>。由于 *PLRV-CP* 基因的密码子组成不利于其体外原核表达, 本研究通过改造密码子, 使其偏好原核表达, 纯化出 PLRV CP 蛋白, 制备多克隆抗体, 为 PLRV 检测方法的建立提供必需的生物材料。

收稿日期: 2020-04-29

基金项目: 教育部创新发展行动计划(XM-16); 芜湖职业技术学院校级重点项目(wzyzrzd201906)

作者简介: 王韬远(1987-), 男, 讲师, 硕士, 从事植物病虫害防治研究。

通讯作者: 李小宇, 男, 硕士, 副研究员, E-mail: lxyzsx@163.com  
王永志, 男, 博士, 研究员, E-mail: yzwang@126.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

马铃薯卷叶病毒叶片、pCzn1 表达载体、Top10 感受态菌株和 BL21 (Plyss) 表达菌株。

TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司, Ni<sup>2+</sup> 离子亲和层析柱购自美国 GE 公司; Nde I、Xba I 限制性内切酶, cDNA 合成试剂盒均购自 TaKaRa 公司; DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均购自北京天根生化技术有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 PLRV-CP 基因克隆

通过 TRIzol 方法提取侵染 PLRV 马铃薯叶片的总 RNA, 利用 cDNA 合成试剂盒合成体外第一条链。根据 GENBANK 公布的 PLRV-CP 基因序列, 设计引物: PLRV cp-up: 5'-GGAATTCATATGAGTACCGTTGTTG-3' (下划线为酶切位点 Nde I); PLRV cp-down: 5'-TGCTCTAGATTATTCG-GATTCTGCAG-3' (下划线为酶切位点 Xba I)。以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 具体条件: 94 °C 预变性 5 min, 98 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。5% 的琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物, 胶回收试剂盒回收目的 DNA, 测序验证。

**PLRV-CP 基因优化:** 测序成功的 PLRV-CP 基因进行分析, 在不改变 PLRV CP 蛋白质编码的前提下, 对序列中的密码子进行改造, 重新合成 PLRV-CP 基因, 使其偏好原核表达, 适合在大肠杆菌中表达。

#### 1.2.2 原核表达载体的构建

采用 Nde I 和 Xba I 同时双酶切 PLRV-CP 基因和 pCzn1 表达载体, 胶回收目的片段, 通过 T4 连接酶, 构建 pCzn1-PLRV CP 重组表达载体, 转化 Top10 感受态细胞, 挑取单克隆菌落, 双酶切验证并测序。

#### 1.2.3 重组蛋白的表达及纯化

将构建成功的重组表达载体 pCzn1-PLRV CP 转入 BL21 (Plyss) 表达感受态, 挑取单克隆菌落, 双酶切验证成功后扩大培养, 当 OD<sub>600</sub> 值达到 0.5 ~ 0.6 时, 加入 IPTG 诱导 3 h; 12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, ddH<sub>2</sub>O 重悬菌体, 超声波破碎菌体, 12 000 r/min 离心 10 min, 分别回收上清和菌体, 进行 SDS-PAGE 电泳, 观察重组蛋白表达情况。

包涵体蛋白采用变复性纯化, 裂解液 (20 mmol/L Tris-HCl containing 1 mmol/L PMSF and bacteria protease inhibitor cocktail, pH 8.0) 重悬菌体沉淀, 超声波破碎, 10 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀, 使用包涵体洗涤液 (20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 2 mol/L 尿素, 1 mol/L NaCl, 1% Triton X-100, pH 8.0) 洗涤 3 次, 溶解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L DTT, 8 mol/L 尿素, pH 8.0) 溶解包涵体, 4 °C 过夜后 10 000 r/min 离心 15 min, 提取上清装入透析袋于 20 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0 溶液中透析过夜。将变复性蛋白加入 Ni<sup>2+</sup> 离子亲和层析柱, 收集洗脱液, 进行 SDS-PAGE 电泳, 观察重组蛋白纯化情况。

#### 1.2.4 重组蛋白的鉴定

采用 Western Blot 方法, 对纯化后的重组蛋白进行鉴定。PLRV CP 蛋白经 SDS-PAGE 电泳, 恒压转膜, 一抗使用 6×His 标签的单克隆抗体, 37 °C 孵育 1 h, 二抗使用辣根过氧化物酶标记的酶标抗体, 37 °C 孵育 1 h, DAB 显色液进行显色。

#### 1.2.5 PLRV CP 蛋白多克隆抗体的制备及分析

将纯化后的 PLRV CP 蛋白免疫日本大耳兔, 采用皮下多点注射和肌肉注射, 每只免疫 100 μg 重组蛋白, 免疫 4 次后, 耳缘静脉采血, 通过间接 ELISA 方法进行效价检测。PLRV CP 蛋白和 PLRV 叶片粗提物分别包被 96 孔酶标板, 设置阴性对照, 一抗为不同稀释度的血清, 稀释梯度为: 2 000 倍、4 000 倍、8 000 倍、16 000 倍、32 000 倍、64 000 倍、128 000 倍和 256 000 倍, 二抗为碱性磷酸酶标记的酶标抗体, BCIP/NBT 显色液进行显色, 读取 OD<sub>405</sub> 酶标值, 根据检测 OD<sub>405</sub> 值 (P 值)/阴性 OD<sub>405</sub> 值 (N 值) > 2.0 为阳性结果, 分析 PLRV CP 蛋白多克隆抗体的效价。

采用 Western Blot 方法进行特异性分析, 阴性对照选用 BL21 (Plyss) 表达感受态细胞和马铃薯健康叶片粗提物, 与 PLRV CP 重组蛋白和 PLRV 叶片粗提物同时进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后, 一抗采用 1 000 倍稀释的多克隆抗体, 4 °C 震荡孵育过夜, 二抗采用辣根过氧化物酶标记的酶标抗体, 37 °C 孵育 1 h, DAB 显色液显色, 观察目的条带的特异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 PLRV-CP 基因克隆及优化

以反转录体外合成的第一条链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 如图 1 所示, 在 620 bp 处有清晰的



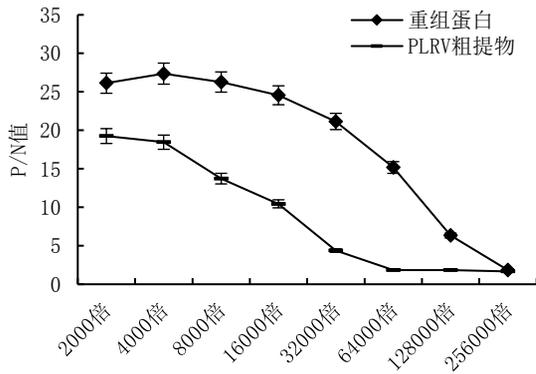


图7 PLRV CP蛋白多克隆抗体效价检测

32 000倍。

通过 Western Blot 方法,结果显示(图8),制备的多克隆抗体能够特异性识别 PLRV CP 重组蛋白和 PLRV 叶片粗提物,而阴性对照未发现条带,说明制备的多克隆抗体特异性强。



M: 蛋白标准分子量; 1: 大肠杆菌; 2: 马铃薯健康叶片; 3: PLRV CP 蛋白; 4: PLRV 叶片

图8 PLRV CP蛋白多克隆抗体 Western blot 分析

### 3 讨论

马铃薯在栽培过程中,经常会出现多种病毒共同侵染的情况,所以提纯单一的天然病毒难度大,另外,PLRV 主要分布在寄主植株中的维管束内,含量低,提纯病毒更加困难<sup>[5]</sup>。采用基因工程方法,将目的病毒基因编码的蛋白质通过大肠杆菌进行体外表达和纯化,可以解决上述难题。基因工程可以表达植物病毒中不同的功能蛋白,其制备的抗体靶标性更强。

PLRV CP 蛋白很难表达,其基因的密码子组成不利于体外表达,另外还含有 2 个针对原核表达体系使用频率低于 20% 的稀有密码子 CUA,本研究在不改变编码蛋白质的前提下,对密码子进行优化,使其在大肠杆菌中顺利表达。其他学者通过基因工程方法也顺利表达出 PLRV CP 蛋白,

隋炯明等<sup>[6-7]</sup>通过敲除 PLRV-CP 基因富含精氨酸稀有密码子的第 52-177 核苷酸,获得缺失突变体,并成功在原核体系中表达;牛倩雅等<sup>[8]</sup>利用插入分子伴侣与冷激蛋白基因 *cspA* 的启动子,提高了 PLRV-CP 基因的水溶性表达。

目前已有大量研究利用抗体技术来检测植物病毒,其成本低,检测速度快,适合在基层工作中运用<sup>[9-11]</sup>。马铃薯在田间生产中,病毒病没有药物可以防控,脱毒种薯质量就成为马铃薯生产中的关键,本研究利用体外表达纯化 PLRV CP 蛋白制备的多克隆抗体,对马铃薯脱毒种薯的检测提供必需的生物材料,为 PLRV 的检测方法奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 卢肖平. 马铃薯主粮化战略的意义、瓶颈与政策建议[J]. 华中农业大学学报(社会科学版), 2015(3): 1-7.
- [2] 哈斯阿古拉,施一黎,张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因的合成、分子克隆和全序列分析[J]. 中国病毒学, 1992, 7(4): 432-435.
- [3] Kaplan I B, Lee L, Ripoll D R, et al. Point mutations in the potato leafroll virus major capsid protein alter virion stability and aphid transmission[J]. Journal of General Virology, 2007, 88(6): 1821-1830.
- [4] Lee L, Kaplan I B, Ripoll D R, et al. A surface loop of the potato leafroll virus coat protein is involved in virion assembly, systemic movement, and aphid transmission[J]. Journal of Virology, 2005, 79(2): 1207-1214.
- [5] 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒(PLRV)基因组研究进展[J]. 中国病毒学, 1996, 11(1): 1-8.
- [6] 隋炯明,何心凤,郭真,等. 马铃薯卷叶病毒缺失突变 CP 基因的原核表达及抗血清的制备[J]. 园艺学报, 2012, 39(10): 1949-1957.
- [7] 张健建,隋炯明,盖树鹏,等. 马铃薯卷叶病毒 CP 基因的突变及其原核表达[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(8): 11-14.
- [8] 牛倩雅,辛佳,王晶珊,等. 马铃薯卷叶病毒 CP 基因水溶性原核表达的研究[J]. 中国蔬菜, 2015(12): 28-32.
- [9] 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.
- [10] 王永志,万千,李小宇,等. OYDV 衣壳蛋白表达及其单克隆抗体分析[J]. 东北农业科学, 2018, 43(2): 26-29.
- [11] 李小宇,张春雨,张伟,等. 大豆花叶病毒间接 ELISA 检测方法的建立及应用[J]. 东北农业科学, 2019, 44(1): 22-27.

(责任编辑:刘洪霞)