

马铃薯 S 病毒衣壳蛋白表达及多克隆抗体制备

王韬远¹, 王永志², 张春雨², 王忠伟², 李 闯², 张胜利³, 李小宇^{2*}

(1. 芜湖职业技术学院, 安徽 芜湖 241003; 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: 马铃薯已成为我国第四大主粮作物, 具有重要的战略意义, 而马铃薯病毒病是主要的病害之一。本研究通过克隆马铃薯 S 病毒 (potato virus S, PVS) 的衣壳蛋白 (*Coat Protein*) 基因, 连接表达载体 pET28b, 转化大肠杆菌, 体外表达纯化出 PVS CP。免疫日本大耳兔, 制备出 PVS CP 多克隆抗体, 其识别重组蛋白的效价为 64 000 倍, 识别病毒的效价为 32 000 倍; 抗体特异性分析表明, 制备的多克隆抗体只识别 PVS, 不识别马铃薯 M 病毒、马铃薯 Y 病毒和马铃薯卷叶病毒。PVS 多克隆抗体的制备, 为马铃薯病毒检测方法提供了技术支持, 为种薯质量的提高奠定了基础。

关键词: 马铃薯 S 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(2022)02-0030-04

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

WANG Taoyuan¹, WANG Yongzhi², ZHANG Chunyu², WANG Zhongwei², LI Chuang², ZHANG Shengli³,
LI Xiaoyu^{2*}

(1. Wuhu Institute of Technology, Wuhu 241003; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100; 3. Jilin Academy of Vegetable and Flower Sciences, Changchun 130000, China)

Abstract: The potato has become the fourth major grain crop in China, with important strategic significance, and potato virus disease is one of the main diseases. In this study, the *Coat Protein* gene of potato virus S (PVS) was cloned, and the expression vector pET28b was ligated into *E. coli* to express and purify PVS CP. The polyclonal antibody against PVS CP was prepared by immunizing Japanese rabbits. The titer of the recombinant protein was 64,000 times and the titer of the recognized virus was 32,000 times. Antibody specificity analysis indicated that the prepared polyclonal antibodies were only recognized by PVS and were not recognized by potato virus M, potato virus Y or potato leaf roll virus. The preparation of PVS polyclonal antibody provides technical support for the detection of potato virus and lays a foundation for the improvement of seed potato quality.

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

2015 年我国确立马铃薯主粮化战略, 马铃薯成为第四大主粮作物。我国现在是世界第一马铃薯生产国, 种植面积占全球 30%, 总产量约占全球产量的 24%^[1]。在马铃薯繁育过程中, 病毒病是主要的病害之一, 严重影响了马铃薯的产量和质

量。马铃薯 S 病毒 (potato virus S, PVS) 隶属于香石竹潜隐病毒属^[2], 分布于世界各马铃薯种植区, 是马铃薯常见的病毒病之一, 可造成马铃薯减产 10%~20%^[3]。田间 PVS 可以通过汁液摩擦传播, 也可以通过蚜虫传播, 远距离传播主要通过马铃薯种薯调运完成。PVS 在田间传播速度快, 脱毒种薯在田间种植时也可被 PVS 迅速侵染, 一季后马铃薯感病率可达 70%, 造成严重危害^[4]。

PVS 内含一条单链正义 RNA, 基因组全长约为 8 500 nt^[5-6], 由 6 个开放阅读框组成 (ORF), 其中 ORF5 位于全长的 7 218~8 102 位, 其编码的氨基酸为衣壳蛋白 (*Coat Protein*, CP)^[7], 在不同的 PVS 分离物中其同源性的 93.2%~95.2%, 保守性

收稿日期: 2019-12-22

基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2019A0981); 芜湖职业技术学院重点科学研究项目 (Wzyz-rzd201906); 吉林省农业科技创新工程 (CXGC2017TD007)

作者简介: 王韬远 (1987-), 男, 讲师, 硕士, 主要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

较高^[8],所以对PVS的核苷酸检测主要以该基因为主。

马铃薯病毒病种类繁多,且无药可治,因此脱毒种薯的应用和推广在马铃薯产业发展中占有至关重要的地位。脱毒种薯的技术核心是病毒检测,基于免疫学原理的酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是常用的一种检测方法^[9-10],而ELISA检测方法的基础是稳定高效的抗体。本研究通过克隆PVS CP基因,构建表达载体,纯化出PVS CP,制备出PVS的多克隆抗体,为PVS的检测方法提供理论支持,为马铃薯种薯的ELISA检测提供稳定高效的生物材料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

马铃薯PVS感病叶片、大肠杆菌DH5a感受态细胞、Rosetta表达感受态细胞、pET28b表达载体、6×His标签单克隆抗体均由本实验室保存。

TRIzol试剂盒(15596-026)购自美国Invitrogen公司,cDNA合成试剂盒(6210A)、同源重组试剂盒(639649)均购自TaKaRa公司,胶回收试剂盒(AP-GX-50)购自AXYGEN公司,Ni²⁺离子亲和层析柱(631428)购自上海意泓生物科技有限公司,DAB显色液试剂盒(DA1010)购自北京索莱宝公司。

1.2 PVS CP基因的克隆

对实验室已保存的感染PVS的马铃薯叶片,利用TRIzol试剂盒提取其总RNA,通过cDNA合成试剂盒体外合成cDNA第一条链。根据GENBANK中登记的PVS病毒序列(NC007289)设计CP基因特异性引物(下划线为酶切位点):

PVS-U:

AGGAGATATACCATGCGCCTAAACCAGATCC
(Nco I)

PVS-D:

GGTGGTGGTGCTCGAGTTGGTTTATCGCATTACGC
TGA(Xho I)

以cDNA第一条链为模板,PCR扩增CP基因,PCR反应条件为:94℃预变性1 min,98℃变性30 s,60℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环,72℃再延伸10 min。PCR产物经5%琼脂糖凝胶电泳,观察结果后,目的条带回收并送往吉林省库美生物科技有限公司测序。

1.3 原核表达载体的构建

限制性内切酶Nco I和Xho I双酶切pET28b表达载体,酶切产物经5%琼脂糖凝胶电泳,观察

结果,胶回收试剂盒回收目的条带。通过同源重组试剂盒,PVS CP基因PCR产物与pET28b酶切产物进行连接,转化DH5a感受态细胞,37℃过夜培养,挑取单菌落扩大培养,提取重组质粒,PCR验证是否连接成功并送往吉林省库美生物科技有限公司测序。

1.4 重组载体的表达及纯化

将构建成功的pET28b-PVS CP转入Rosetta表达感受态细胞,37℃过夜培养,挑取单克隆菌落扩大培养,当检测OD₆₀₀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,ddH₂O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。包涵体蛋白通过Ni²⁺离子亲和层析柱进行纯化,8 mol/L尿素对菌体进行溶解,通过调整pH值进行洗脱,最终获得PVS CP。

通过Western blot方法对PVS CP进行特异性分析:纯化后的PVS CP进行SDS-PAGE电泳,100 V恒压转膜,一抗使用6×His标签单克隆抗体,二抗使用辣根过氧化物酶标记的兔源抗体,DAB显色液显色,观察实验结果。

1.5 PVS CP多克隆抗体的制备及分析

将纯化后的PVS CP免疫4只日本大耳兔(编号:602、603、202和204),采用皮下注射和肌肉注射,免疫剂量100 μg/只,半个月免疫一次,免疫3次后,耳部静脉取血检测抗体效价,效价达标后,加强免疫1次,7 d后采集兔血清。通过间接ELISA方法进行多克隆抗体效价检测:将PVS CP和感染PVS的马铃薯叶片粗提物分别包被96孔酶标板,设置阴性对照;一抗使用等比例稀释的多克隆抗体,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;二抗使用碱性磷酸酶标记的羊源抗体,显色液(对硝基苯磷酸二钠)显色,3 mol/L NaOH溶液终止反应,酶标仪读取OD₄₀₅值,根据检测OD₄₀₅值(P值)/阴性OD₄₀₅值(N值)>2.0判定为阳性结果。

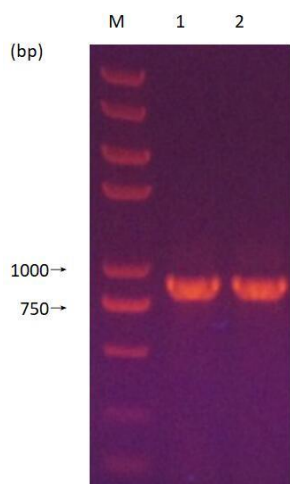
通过间接ELISA方法对制备的多克隆抗体进行特异性分析,抗原选择PVS、马铃薯M病毒(Potato virus M, PVM)、马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)、马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)感病植株叶片和健康植株叶片,0.1 mol/L碳酸盐包被液充分研磨,12 000 r/min离心20 min,提取上清包被96孔酶标板,37℃孵育1 h;检测抗体选择制备PVS多克隆抗体,4 000倍稀释,

37℃孵育1h;酶标抗体使用碱性磷酸酶标记的羊源抗体,37℃孵育1h;显色液(对硝基苯磷酸二钠)显色,3mol/L NaOH溶液终止反应;酶标仪OD₄₀₅读取数据。根据检测OD₄₀₅值(P值)/阴性OD₄₀₅值(N值)>2.0判定为阳性结果。

2 结果与分析

2.1 PVS CP基因的克隆

以体外合成的cDNA第一链为模板,设计的特异性引物进行PCR反应,经5%的琼脂糖凝胶电泳后,如图1所示,在880bp处具有一条明显的特异性条带。PCR产物经测序后,与GENEBANK上传的序列进行对比,确定为PVS CP基因。

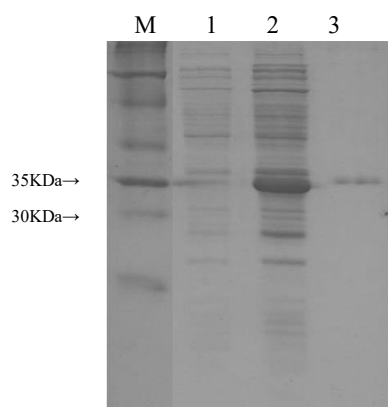


注:M为DNA标准分子量;1和2为PVS CP基因PCR产物

图1 PVS CP基因PCR产物

2.2 PVS CP的表达及纯化

构建成功的pET28b-PVS CP重组载体转入Rosetta表达菌株,IPTG诱导后,进行SDS-PAGE电泳分析,如图2所示,在35KDa处有清晰的特异性条带。经Ni²⁺离子亲和层析柱,收集纯化后的

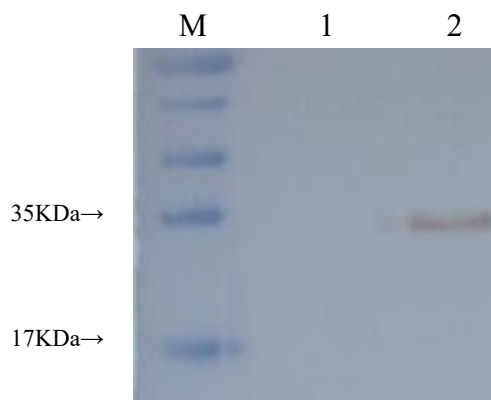


注:M为蛋白标准分子量;1为未诱导菌体;2为诱导后菌体;3为纯化后蛋白

图2 PVS CP蛋白表达及纯化

PVS CP。

纯化后的PVS CP经Western blot方法鉴定,如图3所示,在35KDa处有一条清晰的特异性条带,说明纯化出的为PVS CP。



注:M为蛋白标准分子量;1为大肠杆菌菌体;2为PVS CP

图3 PVS CP western-blot分析

2.3 多克隆抗体效价检测及特异性分析

通过间接ELISA方法,P/N值大于2.0为阳性结果,对PVS多克隆抗体进行效价分析,结果显示(图4):多克隆抗体202效价最高,其识别重组蛋白的效价能达到64 000倍,识别感染PVS植株粗提物的效价能达到32 000倍;多克隆抗体204效价最低,其识别重组蛋白和病毒粗提物的效价均为8 000倍。另外从图4中可以看出,4株多克隆抗体均在4 000倍稀释梯度后,P/N值出现拐点,在实际应用中可以将4株多克隆抗体4 000倍稀释定为抗体工作浓度。

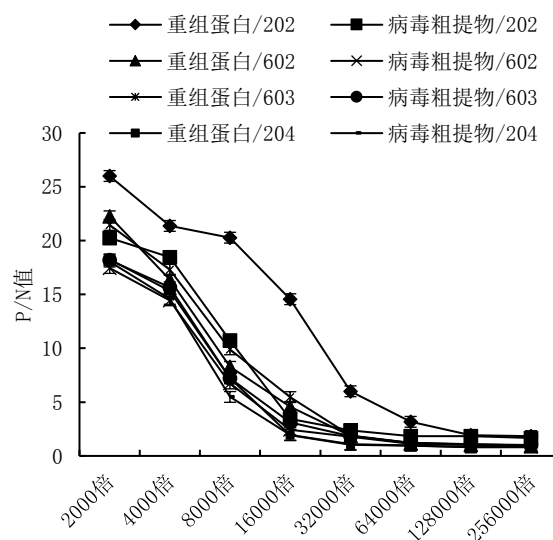


图4 多克隆抗体效价分析

通过间接ELISA方法对制备的多克隆抗体进行特异性分析,如图5所示,图中的红线为P/N值2.0,作为判定标准。当检测抗体使用PVS多克隆

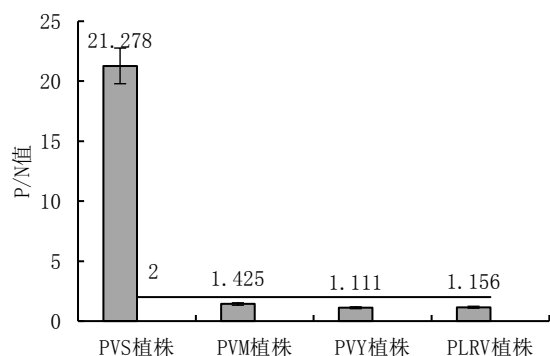


图5 PVS多克隆抗体特异性分析

抗体时,PVS的P/N值21.278,为阳性结果;PVM、PVY和PLRV的检测结果P/N值均低于2.0,为阴性结果。说明制备的PVS多克隆抗体特异性强,只特异性识别PVS,不识别PVM、PVY和PLRV其他马铃薯病毒。

3 讨论

PVS隶属于香石竹潜隐病毒属,同属的PVM也是马铃薯常见的病毒病之一,PVS CP基因与PVM CP基因的同源性较高,本研究在对PVS CP多克隆抗体特异性分析时,选用了PVM病毒粗提物,用以验证多抗的特异性,结果显示,本研究制备的多抗只能特异性识别PVS,不识别同属的PVM,而且也不识别其他马铃薯病毒,弥补了多克隆抗体在特异性方面不如单克隆抗体的不足。在今后的研究中,也可以有针对性地制备能够同时识别PVS和PVM的抗体,这种通用型抗体在实际检测中也有广阔的应用前景^[11-12]。

田间调查时发现,马铃薯病毒病多为复合侵染,这为提纯病毒带来了难度。通过基因工程手段,体外表达目的蛋白可以解决这一难题,在抗原的选择上提供了新的思路^[13-15]。另外,多克隆抗体较单克隆抗体能够识别多个不同位点的抗原表位,检测的稳定性更强^[16]。

由于感染PVS后其症状轻微或隐症,难以在外观上进行辨认,所以对PVS的检测通常采用PCR方法^[17-18]或ELISA方法。PCR检测方法对工作环境、仪器要求苛刻,检测成本高,难以在基层推广;而ELISA检测方法或相关试剂盒操作简单、重复性好、耗时短等特点受到基层工作者或种薯企业的青睐。本研究通过体外表达PVS CP,并制备效价高、特异性强的多克隆抗体,为马铃薯S病

毒检测试剂盒的开发提供了必需的生物材料,为脱毒种薯质量的提高奠定了基础。

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] 谢联辉, 林奇英, 吴祖建. 植物病毒名称及其归属[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 137-142.
- [3] 李济宸, 唐玉华, 谭宗九, 等. 马铃薯病害及其防治[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1992: 129-131.
- [4] 杨文美, 李大同. 马铃薯S病毒的蚜虫传播[J]. 青海大学科技译丛, 1992(27): 34-40.
- [5] Foster G. D. The structure and expression of the genome of carlaviruses[J]. Res. Virol, 1992, 143: 103-112.
- [6] Matousek J, Schubert J, Ptacek J, et al. Complete nucleotide sequence and molecular probing of potato virus S genome[J]. Acta Virol, 2005, 49(3): 195-205.
- [7] Lin Y H, Abad J A, Maroon-Lango C J, et al. Molecular characterization of domestic and exotic potato virus S isolates and a global analysis of genomic sequences[J]. Arch Virol, 2014, 159(8): 2115-2122.
- [8] Gutierrez P A, Alzate J F, Marin-Montoya M A. Complete genome sequence of a novel potato virus S strain infecting Solanum phureja in Colombia[J]. Arch Virol, 2013, 158(10): 2205-2208.
- [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] 严吉明, 崔林开, 叶华智, 等. 转Bt基因植物中杀虫蛋白的酶联免疫检测技术研究Ⅱ. Bt杀虫晶体蛋白抗体的制备[J]. 四川农业大学学报, 2005(2): 163-167.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 吴兴泉, 吴祖建, 谢联辉, 等. 马铃薯S病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达[J]. 中国病毒学, 2002, 17(3): 248-251.
- [14] 李广存, 杨 煜, 王秀丽, 等. 马铃薯S病毒外壳蛋白基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 517-519.
- [15] 乔 宁, 郭宝太, 王晶珊, 等. 马铃薯S病毒CP基因原核表达载体的构建[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2007, 24(3): 159-161.
- [16] 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.
- [17] 庞 博, 刘秀丽, 张金文, 等. 马铃薯4种病毒多重PCR检测体系的建立[J]. 植物保护, 2015, 41(2): 102-107.
- [18] 罗文彬, 李华伟, 汤 浩, 等. 马铃薯5种病毒多重PCR检测技术的建立及应用[J]. 园艺学报, 2015, 42(2): 280-288.

(责任编辑: 刘洪霞)