

紫藤脉花叶病毒 *cp* 基因在大肠杆菌中的表达及抗血清的制备*梁文星¹, 宋丽敏¹, 黄金光¹, 田国忠², 李怀方¹, 范在丰^{1**}

(1. 中国农业大学植物病理系, 北京 100094; 2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

Expression of the *cp* gene and Antiserum Preparation of Wisteria
Vein Mosaic VirusLIANG Wen-xing¹, SONG Li-min¹, HUANG Jin-guang¹, TIAN Guo-zhong², LI Huai-fang¹, FAN Zai-feng^{1**}
(1. Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Research Institute of Forest Ecology,
Environment and Protection, China Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: The coat protein (CP) gene of the Beijing isolate of *Wisteria vein mosaic virus* (WVMV-BJ) was amplified by RT-PCR, and ligated to the expression vector pET22b(+). The recombinant plasmid pET-WVMVCP was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and then induced by IPTG. It was shown that the CP gene was highly expressed by SDS-PAGE and Western blot analysis. The molecular weight of the recombinant protein was about 34.4 kDa. Antiserum with high specificity was produced after the rabbit was immunized with purified recombinant protein, and the titer was determined to be 1/1024 by micro-precipitation, or 1/8192 by antigen coating plate-ELISA (ACP-ELISA).

Key words: *Wisteria vein mosaic virus*; CP; Prokaryotic expression; Antiserum; ELISA

摘要: 采用 RT-PCR 方法自紫藤脉花叶病毒北京分离物 (WVMV-BJ) 的基因组中分离出其 CP 基因, 连接到原核表达载体 pET22b(+) 上。获得的重组子 pET-WVMVCP 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 用 IPTG 进行诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明, *cp* 基因在大肠杆菌中获得了高效表达, 融合蛋白分子量约为 34.4 kDa。将融合蛋白纯化后免疫兔子, 获得了特异性较高的抗血清。微量免疫沉淀法测定该抗血清的效价为 1/1024, 酶联法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定的效价为 1/8192。

关键词: 紫藤脉花叶病毒; 外壳蛋白; 原核表达; 抗血清; ELISA

中国分类号: S432.4.1; S435.131.4

文献标识码: A

文献编号: 1003-5152(2004)03-0281-04

紫藤作为城市园林绿化美化的重要植物, 在公园、校园、庭院等地普遍种植。但在许多地区, 紫藤花叶病的发生和危害也很普遍。对北京地区的抽样调查发现其平均发病率为 40%, 严重的地点甚至高达 80% 以上。感病紫藤叶片表现花叶、斑驳、黄化、脉明等症^[1]。紫藤脉花叶病的病原为紫藤脉花叶病毒 (*Wisteria vein mosaic virus*, WVMV), WVMV 属于马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*)。该属是种类最多的植物病毒属, 有近 200 种确定和可能的成员^[2], 能侵染茄科、藜科、豆科、禾本科等的多种植

物, 并经常造成重大经济损失。马铃薯 Y 病毒属病毒含一正单链 RNA 基因组, 长约 10000 nt, 基因组只包含一个开放阅读框架 (ORF), 进行表达时先翻译成一大多的多聚蛋白, 再通过自身编码的蛋白酶将多聚蛋白加工成 10 个成熟蛋白^[3]。从多聚蛋白的 N 端到 C 端不同基因产物依次为: P1、HC-Pro、P3、6K1、CI、6K2、NIa-VPg、NIa-Pro、NIb 和 CP。

CP 在病毒的蚜传、远距离传播以及保护病毒的 RNA 不受 RNA 酶分解等中起着重要作用, 同时因为其 N 端区域免疫原性较强, 在不同病毒间变异

收稿日期: 2003-11-13, 修回日期: 2004-01-12

* 基金项目: 科技基础性工作专项资金项目 (2001DEA10004)

作者简介: 梁文星 (1979-), 男, 山东省籍, 在读硕士研究生, 研究方向为植物病毒分子生物学。

** 通讯作者: Corresponding author Tel: (010)62892771, E-mail: fanzf@cau.edu.cn

程度较大,因此,以 CP 为抗原制备抗体进行免疫反应,有助于检测 *Potyvirus* 不同种。本实验针对 WVMV-BJ,应用 RT-PCR 技术扩增了其 *cp* 基因;首次将此基因在大肠杆菌中进行了高效表达,并制备了相应的特异性抗血清,从而为此病毒的血清学检测提供了条件。

1 材料与方 法

1.1 材料

提纯的 WVMV 由本实验室保存;菜豆普通花叶病毒 (*Bean common mosaic virus*, BCMV) 抗血清为 Agdia 公司产品;原核表达载体 pET22b(+),大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3) 由本实验室提供;DNA 回收试剂盒购自清华天为时代公司;IPTG、NBT、BCIP 试剂购自 Sigma 公司; λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III 和工具酶购自大连宝生物公司;标准分子量蛋白购自上海丽珠东风生物公司;M-MLV 为 Promega 公司产品。引物根据本实验室已测定的 WVMV-BJ 的 CP 基因的序列设计,由北京赛百盛公司合成,上游引物 WCP5F: 5'-GCC AAG CTT TCT GAT AAA GAT AAA ATG CAA G-3' (下划线部分为 *Hind* III 酶切位点),下游引物 WCP3R: 5'-CGT CTC GAG TCA CTG CGG AGG TCC CAT-3' (下划线部分为 *Xho* I 酶切位点)。

1.2 病毒 RNA 的提取

以提纯的 WVMV 为材料,根据 Dijkstra 等的 SDS-酚仿法^[4]提取病毒的 RNA。

1.3 病毒 CP 基因的扩增

以病毒 RNA 为模板,用引物 WCP3R 进行反转录,42 $^{\circ}$ C 反应 1h^[5]。以反转录产物为模板,用宝生物公司的 Ex Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 3min,94 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 50s,35 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.4 含 *cp* 基因的原核表达载体的构建

PCR 产物用 1% 的琼脂糖进行电泳,与预期大小相符的条带经 DNA 回收试剂盒回收后以 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切。质粒 pET22b(+) 同样用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切。将经酶切处理的 PCR 产物及载体进行连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。经 PCR 扩增和酶切筛选出的重组子进行测序以验证阅读框架的正确性。

1.5 *cp* 基因的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将读框正确的重组子及 pET22b (+) 转化大肠杆菌 BL21,挑取单菌落于 3mL LB 液体培养基中 (含氨苄青霉素 60 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 振动培养过夜后,

按 1:100 稀释到新鲜的 LB 液体培养基中 (含氨苄青霉素 60 μ g/mL),振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.4~1.0,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,继续于 37 $^{\circ}$ C 培养 3~4h。离心收集菌体,加入 1/10 体积样品缓冲液,震荡悬浮,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,用 12% 的胶进行 SDS-PAGE 分析,浓缩胶电压为 8V/cm,分离胶为 15V/cm。考马斯亮蓝 R-250 染色 1h 后,室温摇床上脱色 3h^[6]。

1.6 诱导表达产物的检测及纯化

SDS-PAGE 后,电转移法转膜,丽春红 S 染色检测转移效率。转移后的硝酸纤维素膜先以 5% 的脱脂奶粉封闭,然后分别以 BCMV 抗血清为一抗、碱性磷酸酯酶标记的 A 蛋白为二抗温育,最后用 NBT / BCIP 显色对表达产物进行 Western blot 分析^[7]。收集的菌体用抽提缓冲液重悬,反复冻融 3 次后,12 000g 离心 15min 收集包含体^[5],溶解后进行 SDS-PAGE。将凝胶在染色液中染色后,从中切下目标条带,按 1:1 的比例 (W/V) 加入 0.85% 的生理盐水,于冰浴中研磨,12 000g 离心 10min,上清经 0.85% 生理盐水透析过夜,-20 $^{\circ}$ C 保存^[8]。

1.7 纯化蛋白的定量及抗血清的制备

以牛血清白蛋白标准液为对照,加入考马斯亮蓝 G-250 溶液后,通过测定溶液在 595 nm 的吸光值对纯化产物进行定量^[9]。先耳静脉取血 2mL 制备少量正常血清。向纯化产物中加入等体积的福氏不完全佐剂进行乳化,免疫一只德国大白兔。分五次注射:第一次肌肉注射结合皮下注射,第二次脚垫注射,第三、四次耳静脉注射,第五次肌肉注射,每次免疫剂量约为 0.1mg,每隔 7d 注射一次。最后一次注射 7d 后静脉少量采血测定效价,然后动脉一次性采血,制备的抗血清加入 0.02% 的叠氮化钠,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.8 抗血清效价的测定

将抗血清进行一系列稀释后,以发病紫藤叶片汁液作为抗原包板,用 ACP-ELISA 方法测定血清的效价^[10];同时以提纯的 WVMV 为抗原用微量免疫沉淀法测定抗血清的效价^[10]。

2 结果

2.1 *cp* 的扩增

用设计的 CP 基因特异性引物进行 RT-PCR,扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,可见大小为 850bp 的特异性扩增条带,与预期的大小相符。

2.2 重组质粒的 PCR 和酶切验证

对重组质粒 pET-WVMVCP 用引物 WCP5F 和

WCP3R 进行扩增, 得到 850bp 的条带; 根据以前测序结果, 在 WVMV-BJ 的 cp 内部靠近 C-末端处有 *Pst* I 酶切位点, 用 *Hind* III 和 *Pst* I 双酶切 pET-WVMVCP, 可见 750bp 条带, 与预期大小相符, 说明 cp 已连接到 pET22b(+) 载体上。测序结果证明阅读框架正确。

2.3 表达产物的检测和分析

将 pET-WVMVCP 转化大肠杆菌 BL21, 并进行 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 后, 考马斯亮蓝色结果表明: 含 pET-WVMVCP 的菌株特异地产生了一分子量为 34.4 kDa 的条带。此条带大小与预期相符。由于 BCMV 与 WVMV 间有血清学关系, 因此以 BCMV 抗血清对融合蛋白进行免疫检测。Western blot 显示, BCMV 抗血清仅与此 34.4 kDa 的诱导表达产物反应, 而与其它条带之间均无反应 (图 1), 证明此条带即为所需要的产物。

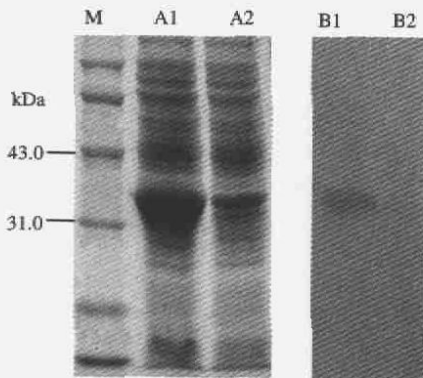


图 1 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.1 The SDS-PAGE and Western blot analysis of the gene product expressed

M, Protein Marker; A1, Proteins from *E. coli* cells harboring the recombinant plasmid pET-WVMVCP induced by IPTG; A2, Proteins of *E. coli* cells harboring the expression vector pET22b (+) induced by IPTG; B1, Western blot analysis of the product of pET-WVMVCP; B2, Western blot analysis of the product of pET22b (+).

2.4 表达产物的纯化及定量

对诱导表达后的菌体反复冻溶, 高速离心后, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE, 证明表达产物主要在沉淀中, 即主要以包涵体形式存在。将分离的包涵体电泳后, 对 34.4 kDa 的条带切胶、研磨、离心、透析, 得到纯度较高的表达产物 (图 2)。以标准牛血清白蛋白的浓度和 A_{595} 分别为横坐标和纵坐标绘制标准曲线后, 测定所纯化的表达产物的浓度为 89.3 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 抗血清的制备及效价的测定

将纯化的重组蛋白作为免疫原免疫大白兔, 五

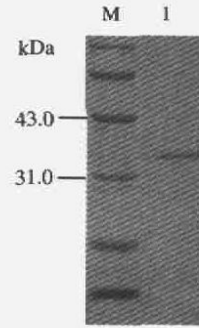


图 2 纯化的重组蛋白

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein
M, Protein Marker; 1, Purified protein.

次注射后获得了 WVMV 特异性的抗血清。以 WVMV 为抗原进行 ACP-ELISA, 结果表明: 抗血清稀释 8192 倍后仍能明显的检测出病毒, 同时抗血清的专化性很强, 与健康的紫藤汁液没有明显的血清学反应 (见表 1)。微量免疫沉淀法测得血清的效价为 1024。

3 讨论

WVMV 在许多国家都有发生^[11-15], 引起一种世界性的病害。此病毒能明显的降低紫藤的生活力特别是开花能力, 影响其观赏性。因此, 对其快速、准确的检测就显得尤为重要。在本实验中, 将 WVMV 的 CP 基因在大肠杆菌中进行了高效表达, 并用纯化的表达产物制备了抗血清。抗血清的制备为 WVMV 的检测以及紫藤花叶病发生规律的研究提供了条件。

DNA 重组技术的发展使得蛋白质的生产进入了一个新的时代。大肠杆菌表达系统具有表达量大、周期短、易操作、成本低、高效性和稳定性等优点, 在科研生产中得到了广泛的应用。控制培养条件, 可使重组蛋白在菌体内主要以包涵体形式存在。包涵体虽然由无活性的蛋白组成, 但包涵体的形成却大大有利于重组蛋白的生产和纯化^[16]: (1) 包涵体具有高密度, 易于分离纯化; (2) 重组蛋白以包涵体的形式存在有效的抵御了大肠杆菌中蛋白酶的降解; (3) 避免了重组蛋白对宿主细胞的毒害作用; (4) 包涵体主要含有重组蛋白, 对其进行分离一般能得到较高纯度的重组蛋白。本实验通过对包涵体进行分离来纯化重组蛋白, 结果获得了大量的纯度较高的重组蛋白, 为抗血清的制备提供了便利条件。

本实验以纯化的重组蛋白来制取抗血清, 与传统的以提纯的病毒制取抗血清的方法相比具有以

表 1 ACP-ELISA 测定抗血清的效价

Table 1 Titer of antiserum determined by ACP-ELISA

Dilution of antiserum	Antigen (1:10 diluted)	Antigen (1:100 diluted)
1/1024	1.661	0.800
1/2048	0.882	0.430
1/4096	0.483	0.216
1/8192	0.245	0.117
1/16384	0.139	0.068
Negative control	0.050	0.040
Blank control	0.009	0.006

下优点：(1) 只需将含有重组质粒的菌株诱导表达即可获得大量重组蛋白，而提纯病毒相对来讲需大批寄主植物，且周期长；(2) 纯化的重组蛋白不含寄主植物的任何成分，所制取的抗血清特异性强。而提纯病毒含有或多或少的寄主成分，所制取的抗血清需用健康植物的汁液进行吸附，操作麻烦；(3) 只需少量的重组蛋白即可获得效果较好的抗血清（本实验用量约为 500 μ g），而用提纯的病毒来制备抗血清则用量较大（至少数毫克），对一些在寄主体内含量较低或较难提纯的病毒来讲，要获得此数量的病毒相当困难。

本研究采用多种免疫途径相结合的免疫方法。由于兔的脚掌活动量较大，脚垫注射可使蛋白释放较完全，皮下和肌肉注射加福氏佐剂的抗原可使抗原缓慢释放，静脉加强注射可刺激抗体较大幅度上升，这样多种途径结合可使免疫作用完全、高效^[10]。

测定抗血清效价有多种方法，如试管沉淀反应、微量沉淀反应、免疫扩散反应等，但其均具有一定的局限性。除微量沉淀反应外，本实验还采用 ELISA 方法测定抗血清的效价，操作简单，灵敏度高。而且由于紫藤叶片中病毒含量较低^[14]，所测得的效价完全可以作为病毒检测中抗血清的稀释倍数来用。因此，用 ELISA 方法来测定抗血清的效价相对而言更具有实用性。

参考文献

- [1] Clover G R G, Tang Z, Smales T E, *et al.* Taxonomy of *Wisteria vein mosaic virus* and extensions to its host range and geographical distribution [J]. *Plant Pathology*, 2003, 52:92-96.
- [2] Van Regenmortel M H V, Fauquet C W, Bishop D H L, *et al.* Virus Taxonomy [M]. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. New York San Diego, Academic Press, 2000.
- [3] Carrington J C, Fred D D, Oh C H. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing[J]. *EMBO J*, 1990, 9:1347-1353.
- [4] Dijkstra J, de Jager C P. Practical Plant Virology, protocols and exercises[M]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 1998, 308-311.
- [5] 孙丽英. 水稻黑条矮缩病毒基因组片段 S3 和 S9 编码蛋白的表达分析[D]. 北京中国农业大学, 2003, 20-30.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual [M], 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989, 885-889.
- [7] Towbin H. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application [J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1979, 76: 4350-4354.
- [8] Hager D A, Burgess R R. Elution of proteins from sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel, removal of sodium dodecyl sulfate and renaturation of enzymatic activity [J]. *Analytical Biochemistry*, 1980, 109:76-86.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
- [10] 张凤丽. 烟草局限 TMV 侵染期间病毒、PR-1 蛋白及钙离子的动态分布 [D]. 北京: 中国农业大学, 1996, 10-24.
- [11] Bos L. The identification of three new viruses isolated from *Wisteria* and *Pisum* in The Netherlands, and the problem of variation within the potato virus Y group [J]. *Neth J Plant Path*, 1970, 76:8-46.
- [12] Brack J. A Prague isolate of wisteria vein mosaic virus [J]. *Biologia plantarum*, 1980, 22: 465-469.
- [13] Briertley P, Lorentz P. Wisteria mosaic and peony leaf curl, two diseases of ornamental plants caused by viruses transmissible by grafting but not by sap inoculation [J]. *Plant Dis Repor*, 1957, 41: 691-693.
- [14] Conti M., Lovisolo O. Observations on a virus isolated from *Wisteria floribunda* DC in Italy [J]. *Rivista di patologia Vegetale Serie IV*. 1970, 5: 115-132.
- [15] De Beni P V. Ricerche sui virus delle piante. Virus scheda VI: Maculatura clorotica delle Glicine (*Wisteria sinensis* Sweet) [J]. *Ricerca Scientifica*, 1964, 4: 21-24.
- [16] 冯小黎. 重组包含体蛋白质的折叠复性 [J]. *生物化学与生物物理学进展*, 2001, 28: 482-485.