

## 雀麦花叶病毒外壳蛋白基因原核表达及抗血清制备

### Prokaryotic expression of brome mosaic virus coat protein gene and preparation of antiserum

贺 振 甘海锋 陈 雯 陈夕军 张 坤\*

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

HE Zhen GAN Haifeng CHEN Wen CHEN Xijun ZHANG Kun\*

(School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China)

雀麦花叶病毒(brome mosaic virus, BMV)为正义单链RNA病毒。BMV寄主范围广泛,在波兰等地均有发现(Trzmiel et al., 2015),大多危害禾本科、豆科、茄科等植物,感病植株常表现出褪绿、轻微花叶症状。因此,为减轻BMV造成的经济损失和丰富BMV的检测方式,本研究拟构建BMV的外壳蛋白(coat protein, CP)基因的原核表达载体,在大肠杆菌*Escherichia coli*中表达BMV的外壳蛋白,制备高特异性和高灵敏度的抗血清,以期用于BMV的有效检测与防治。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 材料

供试菌株、材料及培养基:pCass4-Rz-BMV根癌农杆菌*Agrobacterium tumefaciens* EHA105菌株由中国农业大学李大伟教授馈赠;原核表达载体pET28a以及大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、Rosetta菌株均由扬州大学植物病毒学实验室保存;本氏烟种子由本实验室保存并种植;新西兰大白兔由杭州华安生物技术有限公司提供。溶菌肉汤(lysogeny broth, LB)培养基:胰蛋白胨10 g、NaCl 10 g、酵母提取物5 g溶于950 mL蒸馏水中,pH调至7,定容至1 L,121 $^{\circ}$ C高压灭菌20 min。

试剂及仪器:*Bam*H I、*Xho* I限制性内切酶,宝生物工程(大连)有限公司;2 $\times$ High-Fidelity Master Mix,北京擎科新业生物技术有限公司;2 $\times$ Taq Master Mix、FastPure Plasmid Mini Kit试剂盒,南京诺唯赞生物科技有限公司;AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒,康宁生命科学(吴江)有限公司;考马斯亮蓝R-250、PMSF、咪唑、NBT、BCIP、Goat Anti-rabbit IgG/AP,北京索莱宝科技有限公司;Ni $^{2+}$ -NTA亲和层析介质,南京金斯瑞生物技术有限公司;其它试剂均为

国产分析纯。Eppendorf AG 22331 PCR仪,德国Eppendorf公司;培清JS-680B凝胶成像系统,上海培清科技有限公司;DYCP-28A、DYCP-31A型电泳槽,北京六一仪器厂。

##### 1.2 方法

原核表达载体构建及蛋白表达分析:根据pCass4-Rz-BMV的CP基因合成引物BMV-F/BMV-R(5'-CGCGGATCC<sup>*Bam*H I</sup>ATGTCTGACTTCAGGAAC-T-3'/5'-CCGCTCGAG<sup>*Xho* I</sup>CCTATAAACC GGGGTGA-A-3')。按照FastPure Plasmid Mini Kit试剂盒操作说明提取总DNA。PCR反应体系:DNA 1  $\mu$ L、上下游引物各2  $\mu$ L、2 $\times$ High-Fidelity Master Mix 25  $\mu$ L、ddH $_2$ O 20  $\mu$ L。PCR反应条件:98 $^{\circ}$ C预变性2 min;98 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火15 s,72 $^{\circ}$ C延伸15 s,72 $^{\circ}$ C彻底延伸10 min,30个循环。产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离并回收纯化,用*Bam*H I和*Xho* I进行双酶切,与酶切后的原核表达载体pET28a连接。连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 。经菌落PCR验证阳性克隆后,随机挑取3个克隆由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将构建成功的原核表达载体pET28a-CPBMV转化大肠杆菌菌株Rosetta。挑取单菌落接种于50 mL含100  $\mu$ g/mL卡那抗生素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min摇床振荡培养1.5 h。在28 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C下分别诱导表达4~6 h,每个温度各取4 mL菌液分装至2个指形管,其中一管加IPTG至终浓度为1 mmol/L,另一管不加IPTG以作对照。取2 mL产物收集菌体,加入200  $\mu$ L pH 6.8的PBS缓冲液,振荡混匀,取20  $\mu$ L蛋白样品并加入等体积的1 $\times$ SDS上样液缓冲液,煮10 min,12 000 r/min离心10 min,取上清进行SDS-PAGE电泳。通过考马斯亮蓝R-250染色,分析融合蛋白表达情况。

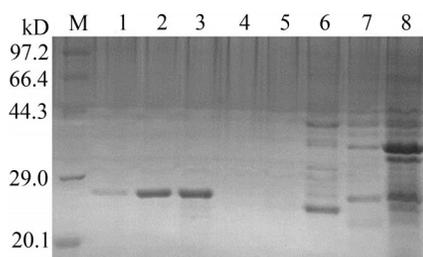
可溶性蛋白分析和Ni柱纯化:通过收集诱导表达4~6 h的菌体,利用PBS缓冲液重悬后,加入蛋白酶抑制剂PMSF至终浓度为1 mmol/L,超声波破碎菌体细胞,将破碎后的悬浮液分装至离心管,4℃、12 000 r/min离心1 h;用PBS缓冲液洗涤琼脂糖树脂5次,取离心上清液,加入1% PMSF过0.5 μm滤膜并通过Ni<sup>2+</sup>-NTA亲和层析柱纯化,随后加入PBS缓冲液冲洗柱子5次,用含有60、80、100、200、300、400 mmol/L的pH 6.8咪唑洗脱缓冲液各洗脱5次,并分别收集不同浓度咪唑洗脱液,置于冰上。

抗血清制备及特异性检测:利用纯化的重组蛋白免疫新西兰大白兔并获得抗血清,通过Western blot检测抗血清的特异性。用液氮将BMV侵染的本氏烟叶片与健康本氏烟叶片研磨成粉末,加入适当的1×SDS上样缓冲液,涡旋振荡;沸水加热10 min,12 000 r/min离心10 min;取10 μL上清液进行SDS-PAGE电泳,将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上;随即转入10 mL封闭液(TBST缓冲液+5%脱脂奶粉),37℃反应1 h;抗血清按体积比1:2 000加入封闭液中,37℃反应1 h,1×TBST缓冲液洗脱3次,每次10 min;随后将硝酸纤维素膜加入用TBST缓冲液稀释(体积比1:5 000)的Goat Anti-rabbit IgG/AP二抗,37℃反应45 min;1×TBST缓冲液洗脱3次,每次10 min;避光条件下,将膜放至含有330 μg/mL NBT和165 μg/mL BCIP的碱性磷酸酯酶缓冲液中显色至条带清晰。

## 2 结果与分析

### 2.1 原核表达载体的构建及SDS-PAGE分析

SDS-PAGE电泳显示在26 kD附近出现与预期大小一致的融合蛋白条带(图1),表明pET28a-CP-BMV在大肠杆菌中正确表达。将上清液和沉淀分别取出并进行SDS-PAGE电泳,显示融合蛋白主要以可溶的形式存在。



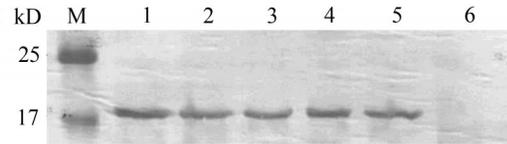
M: Marker; 1-6: 洗脱液中咪唑浓度为400、300、200、100、80、60 mmol/L; 7: 沉淀; 8: 上清液。1-6: The concentration of the imidazole in the eluate was 400, 300, 200, 100, 80, 60 mmol/L; 7: precipitate; 8: supernatant.

图1 在大肠杆菌中表达雀麦花叶病毒CP的SDS-PAGE分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of brome mosaic virus CP expressed in *Escherichia coli*

### 2.2 抗血清特异性鉴定

通过Western blot分析显示,抗血清与BMV侵染的本氏烟叶片提取液有特异性免疫反应,而与健康本氏烟叶片提取液无反应,说明制备的抗血清有非常好的特异性,能够应用于植物样品的检测(图2)。



M: Marker; 1-5: 受雀麦花叶病毒侵染的本氏烟提取液; 6: 阴性对照。1-5: BMV-infected *N. benthamiana* leaf extract; 6: negative control.

图2 雀麦花叶病毒CP抗血清特异性的Western blot分析

Fig. 2 Specificity analysis of brome mosaic virus CP antiserum by Western blot

## 3 讨论

目前,血清学方法在植物病毒检测中仍然是不可缺少的一种技术手段。在抗血清制备过程中,利用病毒的提纯来作为抗原直接免疫动物获得抗血清是当前比较主流的方法,由于受到提纯条件和纯化技术的限制常常会含有寄主蛋白的抗体(王洪星等,2013),受此影响易出现假阳性,因此,本研究通过原核表达BMV CP重组蛋白,利用纯化的蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔获得特异性高的CP抗血清(徐品三等,2017)。获得的抗血清能够高效地特异性检测BMV的发生,为BMV的研究与防治提供了较为方便的条件。

## 参考文献 (References)

- TRZMIEL K, SZYDŁO W, ZARZYŃSKA-NOWAK A, JEŻEWSKA M. 2015. First report of *Brome mosaic virus* (BMV) and *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) co-infection in triticale plants in Poland. *Plant Disease*, 99(9): 1290
- Wang HX, Gong D, Sun YJ, Zhang YL, Wang JH, Liu ZX. 2013. Prokaryotic expression of CP gene of *Sorghum mosaic virus* and preparation of polyclonal antibody. *Biotechnology Bulletin*, (1): 166-171 (in Chinese) [王洪星, 龚殿, 孙玉娟, 张雨良, 王建华, 刘志昕. 2013. 高粱花叶病毒外壳蛋白的原核表达及其抗血清制备. *生物技术通报*, (1): 166-171]
- Xu PS, Song J, Zhang ZY. 2017. Prokaryotic expression of coat protein gene of *Lily mottle virus* and preparation, application of its antiserum. *Journal of Plant Protection*, 44(4): 630-635 (in Chinese) [徐品三, 宋炯, 张郑瑶. 2017. 百合斑驳病毒外壳蛋白基因原核表达、抗血清制备及其应用. *植物保护学报*, 44(4): 630-635]

(责任编辑:王璇)