

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

隋炯明¹, 何心凤¹, 郭真¹, 李广存², 王晶珊¹, 郭宝太^{1,*}

(¹ 青岛农业大学生命科学学院, 山东省植物生物技术高校重点实验室, 山东青岛 266109; ² 山东省农业科学院蔬菜研究所, 济南 250100)

摘要: 利用 RT-PCR 扩增马铃薯卷叶病毒 (PLRV) 外壳蛋白 (CP) 基因 (PLRV-CP), 回收大小约 630 bp 的特异性扩增片段并进行 T-A 克隆, 测序表明该基因长度为 627 bp, 与已报道的 36 个 PLRV-CP 基因的核苷酸序列的同源性大于 96%。以 pBAD/Thio-TOPO 为起始载体, 构建了 PLRV-CP 基因的原核表达载体 pBAD-LRCP。以 pBAD-LRCP 为模板, 用 PCR 法删除了该基因富含精氨酸稀有密码子的第 52~177 核苷酸, 获得了 PLRV 缺失突变 CP 基因的原核表达载体 pBAD-LRCP-126。用阿拉伯糖诱导工程菌 TOP10 (pBAD-LRCP-126), 获得了 34 kD 的诱导表达的融合蛋白 (重组 CP)。用镍离子亲和层析法从包涵体中纯化出了高纯度的重组 CP, 用纯化的重组 CP 作抗原免疫家兔获得了 PLRV 特异性的抗血清, 间接 ELISA 检测显示效价为 1:12 800。本研究结果为利用重组 CP 作抗原大量制备 PLRV 抗血清奠定了基础。

关键词: 马铃薯卷叶病毒; CP 基因; 缺失突变; 原核表达; 抗血清

中图分类号: S 432.4⁺1; S 532 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2012) 10-1949-09

Prokaryotic Expression of Deletion Mutation *CP* Gene of *Potato leafroll virus* and Preparation of Antiserum

SUI Jiong-ming¹, HE Xin-feng¹, GUO Zhen¹, LI Guang-cun², WANG Jing-shan¹, and GUO Bao-tai^{1,*}

(¹ College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266109, China; ² Vegetable Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: *Potato leafroll virus* (PLRV) coat protein (CP) gene (PLRV-CP) was amplified by RT-PCR, and the specific product about 630 bp was cloned through T-A ligation. DNA sequencing showed that its length was 627 bp, and the homology of nucleotide sequences between the cloned PLRV-CP gene and other 36 previously published ones was above 96%. Using pBAD/Thio-TOPO as initial vector, prokaryotic expression vector of PLRV-CP gene was constructed and named pBAD-LRCP. DNA fragment (52–177 nucleotides) rich in rare codons of arginine was deleted from PLRV-CP gene by PCR using pBAD-LRCP as template, the yielding recombinant plasmid pBAD-LRCP-126 was indeed the prokaryotic expression vector of deletion mutation CP gene of PLRV. After induction of the engineered strain TOP10 (pBAD-LRCP-126) with arabinose, the mutation gene was successfully expressed and

收稿日期: 2012-05-16; 修回日期: 2012-10-08

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (Y2008D43)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: btguo@qau.edu.cn)

34 kD fusion protein (the recombinant CP) was obtained. High-purity recombinant CP was purified from inclusion bodies with nickel affinity chromatography column, and the purified recombinant CP was used as antigen to immune rabbits. Antiserum specific to PLRV was obtained, its titer was 1 : 12 800 in indirect ELISA detection. This research has laid the foundation for preparation of antiserum against PLRV by using recombinant CP as antigen in a large scale.

Key words: *Potato leafroll virus*; CP gene; deletion mutation; prokaryotic expression; antiserum

马铃薯卷叶病毒 (*Potato leafroll virus*, PLRV) 分布广泛、危害严重, 可导致马铃薯减产 80% (Harper et al., 1975), 一直是重点防治对象。

生产中应用马铃薯无毒种薯是克服马铃薯病毒危害的有效措施, 规范的病毒检测可保障脱毒种薯的质量。酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法操作条件相对简单, 适合于大量样品的检测, 但是由于高纯度病毒粒体制备困难, 中国自主研发的马铃薯病毒抗血清还远远不能满足实际需要, 明显影响了 ELISA 检测技术的广泛应用。

利用重组外壳蛋白 (coat protein, CP) 作抗原制备马铃薯病毒的特异性抗血清是一条可行的技术路线, 国内外针对马铃薯 X、Y、S 与 M 等主要病毒 CP 基因的原核表达及利用重组 CP 作抗原制备抗血清的报道已有很多 (王振东 等, 1999; Balogun et al., 2002; 吴兴泉 等, 2003; 李广存 等, 2004; Flowarczna et al., 2008; Cerovska et al., 2010; Cerovska et al., 2012)。马铃薯卷叶病毒在寄主植株内的分布主要局限于维管束内, 且含量很低, 提取纯化特别困难, 因此利用重组 CP 途径制备其抗血清显得尤其必要。

马铃薯卷叶病毒的基因组为正的 ssRNA, 对应的 cDNA 全长 6.0 kb, 内有 6 个 ORF, 其中第 4 个读码框 (ORF3) 是 CP 的编码序列, 长 627 bp, 编码产物为 23 kD 的多肽 (Mayo et al., 1989; van der Wilk, 1989)。PLRV-CP 基因结构特殊, 5'端精氨酸的密码子多为原核表达的稀有密码子且呈连续排列, 因此原核表达非常困难。Lopez 等 (1994) 将 PLRV-CP 基因连接到 β -半乳糖苷酶基因的下流, 使富含精氨酸密码子的区域位于嵌合基因的 3'端, 实现了该基因的融合表达。近期 Pichova 等 (2011) 报道利用特殊的受体菌实现了 PLRV-CP 基因的原核表达并制备了抗血清, 对感染 PLRV 的病叶进行了间接 ELISA 检测, 但制备的多抗特异性差、免疫反应信号弱。PLRV-CP 基因的原核表达及重组 CP 抗血清的研究仍需加强。

本研究的目的是通过缺失突变实现 PLRV-CP 基因的高效原核表达, 并利用重组蛋白作抗原制备出 PLRV 特异性的抗血清, 为马铃薯卷叶病毒抗血清的大量制备及 ELISA 检测试剂盒的组装奠定基础, 为马铃薯无毒种苗规范生产、销售及应用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2007—2010 年在青岛农业大学遗传研究室完成。

感染 PLRV 的马铃薯叶片由山东省农业科学院蔬菜研究所李广存博士提供, 限制性内切酶及 TaKaRa Mutan BEST 基因突变试剂盒为大连宝生物工程公司产品。Ultrafree-DA DNA 纯化回收试剂盒购自 Millipore 公司, pGEM-T easy vector 为 Promega 公司产品。原核表达试剂盒为 Invitrogen 公司产品, 该试剂盒含有线性原核表达载体 pBAD/Thio-TOPO、受体菌 TOP10 及测序引物。大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。

L-阿拉伯糖、蛋白酶抑制剂(PMSF)、蛋白质提取与电泳试剂、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂均为 Sigma 进口分装产品。蛋白质金属亲和层析纯化柱 HiTrap Chelating HP 为 HE Heacthcare 产品。酶标二抗(羊抗兔)购自华美公司, pNPP 为 BBI 产品。

大肠杆菌的培养主要采用 SOB 培养基($20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白胨, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母抽提物, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, pH 7.2), 用前按 $5\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 的比例加入灭菌的 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 溶液。参照文献报道的 PLRV 的 RNA 全序列(Mayo et al., 1989; van der Wilk, 1989)及其外壳蛋白基因序列(Kawachuk et al., 1989), 设计了 5 条 DNA 引物并由上海生工生物工程公司合成。引物的序列为: P1: 5'-ATGAGTACGGTCGTGGTTAAAG-3'; P2: 5'-CTACCTATTTGGGGTTTTGC-3'; P3: 5'-TTTGGGGTTTTGCAAAGCCAC-3'; P4: 5'-TGTTTGTGTACACCACCATG-3'; P5: 5'-ACTGGAGTTCCCGAGGACG-3'。

1.2 方法

1.2.1 PLRV-CP 基因的克隆及其原核表达载体的构建

按照何心凤等(2007)的方法, 以 P1、P2 为引物进行 RT-PCR 扩增, 获得 PLRV-CP 基因的特异性扩增产物。用 Ultrafree-DA DNA 试剂盒纯化回收的 PCR 产物与 pGEM-T easy 载体连接, 连接物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 PCR 及酶切鉴定筛选出阳性克隆, 提取质粒(pGEM-PLRV)作模板, 由上海生工生物工程公司采用 T7 通用引物进行测序。

以 P1、P3(无终止密码子)为引物, 用重组质粒 pGEM-PLRV 作模板进行 PCR, 特异性 PCR 产物直接与原核表达起始载体 pBAD/Thio-TOPO 进行 T-A 连接, 连接产物转化大肠杆菌 TOP10。经酶切鉴定, 再用载体引物 Pv1(5'-TTCCTCGACGCTAACCTG-3')测序, 筛选出构建正确的表达载体, 命名为 pBAD-LRCP。

1.2.2 PLRV-CP 基因的缺失突变

在构建了原核表达载体, 但没能实现 PLRV-CP 基因诱导表达的情况下, 利用突变试剂盒 TaKaRa MutanBEST Kit 对该基因进行了缺失突变。突变包括以 pBAD-LRCP 为模板, 用 P4、P5 进行 PCR 及 PCR 产物的平端化、磷酸化、环化与受体菌 TOP10 的转化等, 具体方法参照试剂盒说明。用 Pv1 引物进行测序, 筛选出目的克隆, 相应的重组质粒命名为 pBAD-LRCP-126, 该质粒实际上就是缺失突变 CP 基因的原核表达载体。

1.2.3 缺失突变 CP 基因的诱导表达及鉴定

将工程菌 TOP10(pBAD-LRCP-126)单菌落接种于 SOB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜震荡培养。将培养物按 1% 的比例接入新配置的含 Amp 的 SOB 液体培养基中, 培养至 OD_{600} 值约为 0.5, 加入 L-阿拉伯糖至终浓度为 0.2%, 继续培养 4 h。取 1 mL 菌液离心后收集菌体, 加等体积蛋白上样缓冲液并混匀, 煮沸 7 min 后离心, 取 20 μL 上清液点样, 于 12% 十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶上电泳。

1.2.4 融合蛋白的提取纯化与定量

收集诱导处理过的菌液, 每管 50 mL, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 弃上清液并称质量, 用提取缓冲液($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0; $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8.0; $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl)重悬细菌沉淀。悬浮液中先加 PMSF 和溶菌酶, 搅拌约 20 min, 再加入去氧胆酸, 放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并不断搅拌。裂解物变粘稠时, 加入 DNase I, 室温放置至裂解液不再粘稠。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 融合蛋白主要以沉淀(包涵体)的形式存在。提取蛋白时, 每克湿重大肠杆菌加 3 mL 裂解液、8 μL PMSF($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、80 μL 溶菌酶($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、4 mg 去氧胆酸与 20 μL DNase I($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

用结合缓冲液 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$, $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑) 悬浮包涵体, 充分混合溶解后, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 。上清液经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 用 HiTrap Chelating HP 亲和层析柱纯化出融合蛋白。用 20% PEG6000 浓缩蛋白液, 然后用蒸馏水透析 24 h , 期间换透析液 3 次, 再用 PBS 透析 24 h , 期间换透析液 3 次。蛋白质的定量采用 Bradford 法。

1.2.5 抗血清的制备及效价测定

初免用 1 mg 融合蛋白作抗原, 蛋白溶液与等体积完全福氏佐剂混匀, 对新西兰大白兔颈背部皮下多点注射。4 周后进行加强免疫, 抗原量同初免, 用不完全福氏佐剂混合, 后腿肌肉注射。第 2 次加强免疫的剂量与注射方法同第 1 次加强免疫, 不加佐剂, 时间间隔 2 周, 同时耳静脉取血试效价。再过 2 周, 进行第 3 次加强免疫, 剂量为每只兔 0.25 mg 。免疫结束 1 周后心脏采血, 效价的测定采用琼脂糖双扩散法与间接 ELISA 法。

1.2.6 PLRV 的间接 ELISA 检测

感染 PLRV 的马铃薯病叶用液氮研磨破碎后, 按 $1:10 \text{ (g:mL)}$ 加入病毒提取缓冲液 (含 2% PVP-40000、1% BSA 的 PBST) 并进一步研磨, 4°C 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后取上清液用于检测。每反应孔加 $150 \mu\text{L}$ 上清液, 4°C 过夜后洗涤, 包被结束后加 $180 \mu\text{L}$ 3% 的 BSA 进行封闭。随后每孔加 $140 \mu\text{L}$ 稀释的抗血清、 $130 \mu\text{L}$ 的酶标二抗稀释液及 $120 \mu\text{L}$ 的底物液 ($0.67 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ pNPP, 11.65% 二乙醇胺), 最后加 $100 \mu\text{L}$ 的 $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ 终止反应。检测过程中, 酶标板温育及洗涤条件主要参照李广存等 (2001) 报道的方法。除目测外, 用 BioTek 公司 Elx800 型酶标仪测定 405 nm 的 OD 值。

2 结果与分析

2.1 PLRV-CP 基因的克隆

以 P1、P2 为引物, RT-PCR 扩增得到大小约为 630 bp 的特异性的产物, 经回收、纯化后进行了 T-A 克隆。针对 PCR 初步筛选出的阳性克隆, *Bam*H I、*Pst* I 与 *Eco*R I 单酶切鉴定显示重组质粒含有 *Bam*H I 与 *Pst* I 的单一切点, 含有 *Eco*R I 的两个切点 (图 1), 结果表明该质粒含有预期的插入片段, 命名为 pGEM-LRCP。

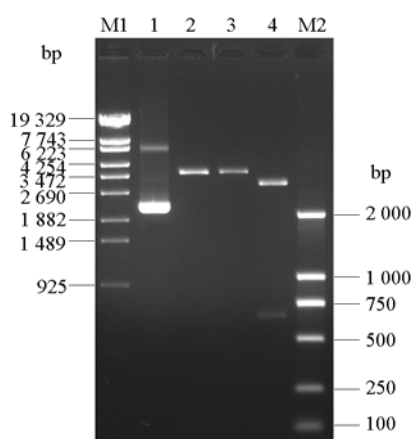


图 1 重组质粒 pGEM-LRCP 的酶切图谱

Fig. 1 Restriction pattern of recombinant plasmid pGEM-LRCP

M1: λ -EcoT14 I DNA marker; M2: DL2000 DNA marker; 1: pGEM-LRCP;
2: pGEM-LRCP/ *Bam*H I; 3: pGEM-LRCP/ *Pst* I; 4: pGEM-LRCP/ *Eco*R I.

测序结果表明插入片段为 *PLRV-CP* 基因, 长 627 bp, 该 cDNA 的序列及其编码的氨基酸见图 2。本研究中克隆的基因与已报道的 36 个 *PLRV-CP* 基因的核苷酸序列的同源性介于 96.81%~99.84%, 其中与河北分离物 (DQ315385)、云南分离物 (DQ309064) 的同源性分别为 99.68%与 99.36%。

```

1      ATGAGTACGGTCGTGGTTAAAGGAAATGTCAATGGTGGTGTTACAACAACCAAGAAGGCGA
1      M S T V V V K G N V N G G V Q Q P R R R
61     AGAAGGCAATCCCTTCGCAGGCGCGCTAACAGAGTTCAGCCAGTGGTTATGGTCACGGCC
21     R R Q S L R R R A N R V Q P V V M V T A
121    CCTGGGCAACCCAGGCGCGCAAGACGTAGAAGAGGAGGCAATCGCCGCTCAAGAAGAACT
41     P G Q P R R R R R R R G G N R R S R R T
181    GGAGTTCCCGAGGACGAGGCTCAAGCGAAACATTCGTGTTACAAAGGACAACCTCATG
61     G V P R G R G S S E T F V F T K D N L M
241    GGCAACTCCCAAGGAAGTTTCACCTTCGGGCGGAGTCTATCAGACTGTCCGGCATTCAAG
81     G N S Q G S F T F G P S L S D C P A F K
301    GATGGAATACTCAAGGCCTACCATGAGTATAAGATCACAAGCATCTTACTTCAGTTCGTC
101    D G I L K A Y H E Y K I T S I L L Q F V
361    AGCGAGGCTCTTCCACCTCCTCCGGCTCCATCGCTTATGAGTTGGACCCCATGCAAA
121    S E A S S T S S G S I A Y E L D P H C K
421    GTATCATCCCTCCAGTCCTACGTCAACAAGTTCCAAATTACGAAGGGCGGCGCAAAACT
141    V S S L Q S Y V N K F Q I T K G G A K T
481    TATCAAGCGCGATGATAAACGGGTAGAATGGCAGGATTCTTCTGAGGATCAGTGCCGG
161    Y Q A R M I N G V E W H D S S E D Q C R
541    ATACTGTGGAAGGAAATGGAAAATCTTCAGATACCGCAGGATCCTTCAGAGTCACCATC
181    I L W K G N G K S S D T A G S F R V T I
601    AGGGTGGCTTTGCAAAACCCCAATAG
201    R V A L Q N P K *
```

图 2 *PLRV-CP* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸

富含精氨酸密码子的序列用下划线标记。

Fig. 2 Nucleotide sequence of *PLRV-CP* gene and the deduced amino acids

DNA sequence rich in arginine codons was underlined.

2.2 *PLRV-CP* 基因原核表达载体的构建

以 P1、P3 为引物的 PCR 扩增产物与线性原核表达载体 pBAD/Thio-TOPO 的连接产物转化受体菌获得了抗性菌落。重组质粒经 *Bsp*1407 I 与 *Nde* I 单酶切后, 电泳图谱上都只有一条 DNA 带, 大小与重组质粒中线性条带对应 (图 3, II、III), *Bsp*1407 I 和 *Nde* I 双酶切图谱上有两条带, 一条大小为 2 000 bp, 另一条是 3 000 bp (图 3, IV), 酶切结果表明重组质粒中只有 *Bsp*1407 I 和 *Nde* I 的单一酶切点符合预期, 且 *PLRV-CP* 基因与载体正向连接, 测序结果进一步表明了表达载体构建的正确性, 命名为 pBAD-LRCP。

将工程菌 TOP10 (pBAD-LRCP) 的菌液用不同浓度诱导物、不同处理时间和培养温度进行基因表达的诱导, SDS-PAGE 显示提取的蛋白中没有预期的融合蛋白。由于没能实现诱导表达, 所以, 以 pBAD-LRCP 为模板, 采取朝背离方向进行 PCR 扩增的方法, 对 *PLRV-CP* 基因进行了缺失突变。测序结果表明已从 *PLRV-CP* 基因中成功删除了富含精氨酸密码子的第 52~177 核苷酸 (126 bp, 图 2 中带有下划线的序列), 没有其它核苷酸的变化, 突变符合预期。突变后获得的质粒命名为 pBAD-LRCP-126, 该质粒实际上就是突变后的 *CP* 基因的原核表达载体。

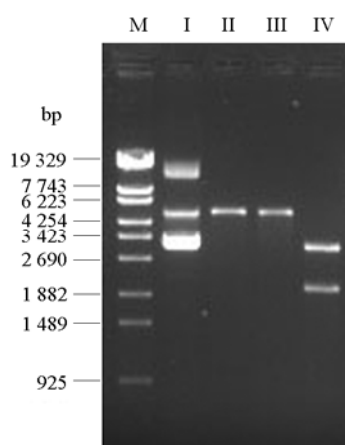


图 3 重组质粒 pBAD-LRCP 的酶切图

Fig. 3 Restriction pattern of recombinant plasmid pBAD-LRCP

M: λ -EcoT14 I DNA marker; I: pBAD-LRCP; II: pBAD-LRCP/ *Bsp*1407 I;

III: pBAD-LRCP/ *Nde* I; IV: pBAD-LRCP/ *Bsp*1407 I + *Nde* I.

2.3 融合蛋白的鉴定、提取与纯化

经 0.2% L-阿拉伯糖诱导，突变基因表达结果见图 4，在 34 kD 处有一条明显的诱导表达的蛋白质条带（图 4，II、IV），未加入阿拉伯糖诱导的处理中无此条带（图 4，I、III）。本研究中采用了融合表达的策略，预期的融合蛋白为 34 kD，实际结果与预期相符，表明该蛋白是 PLRV 缺失突变 CP 基因正确表达的融合蛋白（重组 CP）。

用溶菌酶法提取细菌蛋白，重组 CP 主要存在于沉淀部分，以包涵体形式存在，上清液中很少。用含 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素的结合缓冲液溶解包涵体，然后用 Ni^{2+} 亲和层析的方法进行纯化，得到了单一的目的条带（图 5，III），结果表明获得了高纯度的重组 CP。

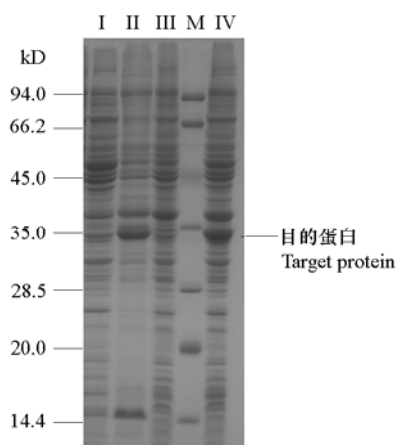


图 4 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白 marker; I、III: 对照（无诱导）;

II、IV: 阿拉伯糖诱导。

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the fusion protein

M: Protein marker; I, III: Without induction;

II, IV: Induction with arabinose.

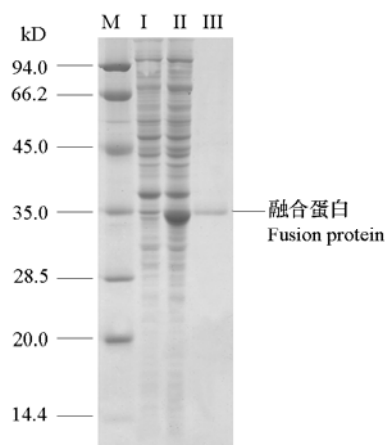


图 5 融合蛋白的纯化结果

M: 蛋白 marker; I: 对照（无诱导）; II: 0.2%阿拉伯糖诱导;

III: 纯化的目的蛋白。

Fig. 5 Purification of the fusion protein

M: Protein marker; I: Without induction; II: Induction with

0.2% arabinose; III: Purification of target protein.

2.4 抗血清的制备与 PLRV 的间接 ELISA 检测

用重组 CP 免疫两只新西兰大白兔获得了两份抗血清, 在琼脂糖双扩散中, 抗血清和提纯的重组 CP (抗原) 反应产生明显而单一的沉淀线, 效价分别为 1:128 和 1:256。对效价高的抗血清进一步用间接 ELISA 方法测定, 按 A/C (重组 CP 抗血清反应平均值/对照抗血清反应平均值) 为 2 的标准判断, 效价为 1:12 800 (表 1)。结果显示重组 CP 具有良好的免疫原性与反应原性, 即获得了重组 CP 的特异性抗血清。

表 1 抗血清效价的测定
Table 1 Titer detection of the antiserum

吸收值 OD ₄₀₅	抗血清的稀释度 Dilution of antiserum						
	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600
A	0.411	0.342	0.314	0.309	0.302	0.298	0.249
A/C	2.96	2.46	2.26	2.22	2.17	2.14	1.79

注: A 为重组 CP 抗血清反应孔的平均值, C 为对照抗血清反应孔的平均值 (0.139)。

Note: A is the average value of well of recombinant CP antiserum; C is the average value of well of control antiserum (0.139) .

利用制备的抗血清对感病叶片进行间接 ELISA 检测, 反应孔颜色变黄, 病叶汁液有较强的阳性反应, 在抗血清稀释度小于 1:400 时, A/C 大于 2.0 (表 2)。健康叶片的汁液没有颜色变化, 呈阴性反应。结果表明利用重组 CP 制备的抗血清可用于 PLRV 的检测, 已获得了 PLRV 特异性的抗血清。

表 2 马铃薯病叶的间接 ELISA 检测
Table 2 Indirect-ELISA detection of the potato diseased leaves

吸收值 OD ₄₀₅	抗血清的稀释度 Dilution of antiserum					
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1 600
A	0.178	0.157	0.149	0.137	0.125	0.117
A/C	2.83	2.49	2.36	2.17	1.98	1.85

注: A 为重组 CP 抗血清反应孔的平均值, C 为健康马铃薯叶片 (阴性对照) 反应孔的平均值 (0.063)。

Note: A is the average value of well of recombinant CP antiserum; C is the average value of well of potato healthy leaf (negative control) .

3 讨论

3.1 PLRV-CP 基因的原核表达

本研究中克隆了 PLRV-CP 基因, 并以 pBAD/Thio-TOPO 为起始载体构建了该基因的原核表达载体 pBAD-LRCP, 基因的表达受强启动子 P_{BAD} 驱动。虽然对诱导物阿拉伯糖的浓度、诱导温度与时间等参数进行了改变和优化, 但没能实现 PLRV-CP 基因在受体菌 TOP10 中的诱导表达, 没获得重组 CP。用试剂盒中的受体菌 LMG194 进行该基因的表达也没有检测到预期的表达蛋白, 该受体菌适用于毒性蛋白基因的低水平表达研究, 结果表明检测不到重组 CP 是基因没有表达所致。

Lopez 等 (1994) 将 PLRV-CP 基因插入具有强启动子的原核表达载体, 没有诱导出表达产物, 推测该基因 5' 端富含精氨酸稀有密码子是在大肠杆菌中不能表达的主要原因; 在将 PLRV-CP 基因连接到 β -半乳糖苷酶基因下游, 使 PLRV-CP 基因的编码序列处于融合基因 3' 端的情况下, 表达出了 139 kD 的融合蛋白。Pichova 等 (2011) 利用特殊的受体菌实现了 PLRV-CP 基因的原核表达, 因为该受体菌含有额外的质粒, 这种质粒带有 AGA、AGG、CGG 等精氨酸稀有密码子对应的 tRNA

基因。本研究中将 PLRV-CP 基因的第 52~177 核苷酸删除后,突变基因可顺利地在大肠杆菌 TOP10 中高效率表达,结果表明是该片段抑制了 PLRV-CP 基因的原核表达。

PLRV-CP 基因第 52~177 核苷酸这段序列编码 42 个氨基酸残基,其中精氨酸残基有 21 个,占 50%,精氨酸密码子非常密集。从图 2 可以看出这段序列中精氨酸密码子连续出现,且有 5 个、7 个精氨酸密码连续排列的情况。另外,这些密码子大多为 AGA、AGG、CGA 等稀有编码,且稀有密码子也呈连续性排列。精氨酸稀有密码子的出现及其连续排列会使翻译减慢、受阻甚至中断,这可能是 PLRV-CP 基因原核表达困难的主要原因。本实验室用人工合成的方法将该 126 bp 片段中的稀有密码子突变成高频利用密码子,实现了突变基因在 TOP10 中的表达(张健建等,2010),研究结果表明稀有密码子是抑制表达的因素。后续的研究发现表达不稳定,很难用于重组 CP 的大量制备,表明同义密码子的连续排列仍是抑制该基因原核表达的重要因素。

除上述 126 bp 序列之外,PLRV-CP 基因中还有少量分散存在的精氨酸稀有密码子,但没有影响表达。本实验室在用 pBAD/Thio-TOPO 载体及受体菌 TOP10 表达马铃薯 S 病毒 CP 基因时,表达非常顺利,未曾发现表达困难。PVS-CP 基因也有 AGA 等精氨酸的稀有密码子,但数量少、也不呈连续排列。零散存在的稀有密码子不构成表达的障碍。

3.2 重组 CP 多克隆抗体的制备与应用

经缺失突变后,PLRV-CP 基因可在大肠杆菌中高效率、大量表达,利用镍离子亲和层析法可获得高纯度重组 CP,包涵体的溶解则是影响重组 CP 纯化、回收率的主要步骤。本实验室利用重组 CP 制备 PVS-CP 的抗血清时,研究结果表明复性获得的重组 CP 作抗原,制备的抗血清的效价明显提高。针对 PLRV,复性后的重组 CP 作抗原是否可提高抗血清的效价,也值得研究。

DAS-ELISA 特异性强、准确性高,是重要的 ELISA 检测法。有报道,采用重组 CP 途径制备的马铃薯 X 病毒(Cerovska et al., 2010)、马铃薯 Y 病毒(Flowarczna et al., 2008)的多克隆抗体达不到 DAS-ELISA 的要求,制备的马铃薯帚顶病毒(PMTV)的多抗甚至不能包被酶标板(Helias et al., 2003)。Pichova 等(2011)利用马铃薯卷叶病毒重组 CP 制备的抗血清只能用于病叶的间接 ELISA 检测,且特异性差、免疫反应信号弱。研究发现用重组 CP 制备的天竺葵环带斑病毒的多克隆抗体也存在不能用于 DAS-ELISA 检测的问题(Gulati-Sakhuja et al., 2009)。

本研究中利用镍离子亲和层析获得的高纯度重组 CP 进行大剂量免疫家兔获得了 PLRV 的特异性抗血清。本实验室李楠楠等(2011)用 Protein G 从制备的抗血清中纯化出抗体并经过碱性磷酸酶标记后,纯化抗体与酶标记抗体可用于 PLRV 的 DAS-ELISA 检测,制备的多抗达到了 DAS-ELISA 检测的要求,为利用重组 CP 大量制备 PLRV 抗血清及组装 DAS-ELISA 检测试剂盒提供了技术基础。CP 基因的原核表达是简单的操作,而 PLRV-CP 基因表达困难是一个例外,重组 CP 的提取与纯化、免疫剂量及程序的确定、抗体的纯化与标记等则是复杂的过程,多克隆抗体的质量及应用效果更可能取决于这些后续过程。

References

- Balogun O S, Xu L X, Teraoka T, Hosokawa D. 2002. Effects of single and double infections with potato virus X and tobacco mosaic virus on disease development, plant growth, and virus accumulation in tomato. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 241 - 248.
- Cerovska N, Moravec T, Pichova H, Hoffmeisterova H, Folwarczna J. 2010. Production of polyclonal antibodies to *Potato virus X* using recombinant coat protein. *Journal of Phytopathology*, 158: 66 - 68.
- Cerovska N, Moravec T, Pichova H, Hoffmeisterova H, Dedic P. 2012. Production of polyclonal antibodies to the recombinant *Potato virus M* (PVM) nonstructural triple gene block protein 1 and coat protein. *Journal of Phytopathology*, 160: 251 - 254.

- Folwarczna J, Plchova H, Moravec T, Hoffmeisterova H, Dedic P, Cerovska N. 2008. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of potato virus Y. *Folia Microbiol*, 53 (5): 438 - 442.
- Gulati-Sakhuja A, Sears J, Nunez A, Liu H Y. 2009. Production of polyclonal antibodies against *Pelargonium zonate spot virus* coat protein expressed in *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. *Journal of Virological Methods*, 160: 29 - 37.
- Harper F R, Nelson G A, Pittman U J. 1975. Relationship between leafroll symptoms and yield in netted gem potato. *Phytopathology*, 65: 1242 - 1244.
- Helias V, Jacquot E, Guillet M, Hingrat Y L, Giblot-Ducray D. 2003. Production of recombinant potato mop-top virus coat protein in *Escherichia coli* and generation of antisera recognising native virus protein. *Journal of Virological Methods*, 110: 91 - 97.
- He Xin-feng, Guo Bao-tai, Li Guang-cun, Yang Yu, Wang Xiao-jie, Bi Yu-ping. 2007. RT-PCR amplification of PLRV coat protein gene. *Chinese Potato Journal*, 21 (4): 197 - 199. (in Chinese)
- 何心凤, 郭宝太, 李广存, 杨煜, 王晓杰, 毕玉平. 2007. 马铃薯卷叶病毒 CP 基因的 RT-PCR 扩增. *中国马铃薯*, 21 (4): 197 - 199.
- Kawachuk L M, Martin R R, Rochon D M. 1989. Identification and characterization of the potato leafroll virus putative coat protein gene. *J Gen Virol*, 70: 793 - 788.
- Li Guang-cun, Wang Xiu-li, Yang Yuan-jun, Li Shu-tong, Bi Yu-ping, Salazar L F, Wang Yi. 2001. Improvement and notice of DAS-ELISA in detection of potato viruses. *Chinese Potato Journal*, 15 (5): 305 - 307. (in Chinese)
- 李广存, 王秀丽, 杨元军, 李成彤, 毕玉平, Louis F Salazar, 王毅. 2001. 马铃薯病毒检测中 DAS-ELISA 的改进及注意问题. *中国马铃薯*, 15 (5): 305 - 307.
- Li Guang-cun, Yang Yu, Wang Xiu-li, Yang Yuan-jun, Bi Yu-ping. 2004. Cloning of potato virus S coat protein gene and its expression in *E. coli* JM109. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (4): 517 - 519. (in Chinese)
- 李广存, 杨煜, 王秀丽, 杨元军, 毕玉平. 2004. 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. *园艺学报*, 31 (4): 517 - 519.
- Li Nan-nan, Zuo Yu-ling, Sui Jiong-ming, Gai Shu-peng, Fan Lian-mei, Li Guang-cun, Guo Bao-tai. 2011. Application of polyclonal antibody against the recombinant CP to the DAS-ELISA detection of potato leafroll virus. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 26 (6): 85 - 88. (in Chinese)
- 李楠楠, 左玉玲, 隋炯明, 盖树鹏, 樊连梅, 李广存, 郭宝太. 2011. 重组 CP 多克隆抗体在马铃薯卷叶病毒 DAS-ELISA 检测中的应用. *华北农学报*, 26 (6): 85 - 88.
- Lopez L, Muller R, Balmori E, de la Riva G, Ramirez N, Doreste V, Lopez M, Perez S, Oramas P, Selman-Housein G. 1994. Molecular cloning and nucleotide sequence of the coat protein gene of a Cuban isolate of potato leafroll virus and its expression in *Escherichia coli*. *Virus Gene*, 9 (1): 77 - 83.
- Mayo M A, Robinson D J, Jolly C A, Hyman L. 1989. Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. *J Gen Virol*, 70: 1037 - 1051.
- Pichova H, Moravec T, Dedic P, Cerovska N. 2011. Expression of recombinant potato leafroll virus structural and non-structural proteins for antibody production. *Journal of Phytopathology*, 159: 130 - 132.
- van der Wilk F, Huisman M J, Cornelissen B J, Huttinga H, Goldbach R. 1989. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA. *FEBS Letters*, 245: 51 - 56.
- Wang Zhen-dong, Zhang Min, Hataya T, Uyeda I. 1999. The expression of potato virus Y common strain (PVY0) coat protein gene in *Escherichia coli*. *Virologica Sinica*, 14 (2): 157 - 162. (in Chinese)
- 王振东, 张敏, 谷达, 上田一郎. 1999. 马铃薯 Y 病毒普通系外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达. *中国病毒学*, 14 (2): 157 - 162.
- Wu Xing-quan, Chen Shi-hua, Wu Zu-jian, Lin Qi-ying, Xie Lian-hui. 2003. The clone and expression in *E. coli* of the coat protein gene of potato virus X. *Journal of Zhengzhou Institute of Technology*, 24 (2): 25 - 28. (in Chinese)
- 吴兴泉, 陈士华, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 2003. 马铃薯 X 病毒 CP 基因的原核表达及特异性抗血清的制备. *郑州工程学院学报*, 24 (2): 25 - 28.
- Zhang Jian-jian, Sui Jiong-ming, Gai Shu-peng, Song Xi-yun, Guo Bao-tai. 2010. Mutation and prokaryotic expression of potato leafroll virus coat protein gene. *Journal of Northeast Agricultural University*, 41 (8): 11 - 14. (in Chinese)
- 张 Jian-jian, 隋炯明, 盖树鹏, 宋希云, 郭宝太. 2010. 马铃薯卷叶病毒 CP 基因的突变及其原核表达. *东北农业大学学报*, 41(8): 11 - 14.