

大豆花叶病毒东北3号株系Nib蛋白表达、纯化及单克隆抗体制备

张淋淋^{1,2}, 李小宇², 张春雨², 尤晴³, 张正坤², 李启云², 张俊华^{1*}, 王永志^{2*}

(1. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 2. 吉林省农业科学院植物保护研究所/东北作物有害生物综合治理重点实验室/吉林省农业微生物重点实验室, 吉林 公主岭 136100; 3. 吉林农业大学, 长春 130118)

摘要:本研究利用PCR方法从大豆花叶病毒阳性叶片中成功克隆出大豆花叶病毒东北3号株系nib基因。序列分析表明,大豆花叶病毒东北3号株系与Ar33株系亲缘关系最近,序列同源性高达99.48%,其次为WS160、G4、G2、L株系,同源性分别为98.97%、94.88%、90.95%、90.35%,与6202-2、6067-1株系亲缘关系最远,分别为83.82%、84%;利用大肠杆菌中表达Nib蛋白,并通过亲和层析获得纯化的Nib蛋白,将纯化的Nib蛋白免疫小鼠,制备了2G3、1D6、6F9和6B2共4株Nib蛋白单克隆抗体,为大豆花叶病毒基因nib的功能研究及抗病育种提供材料。

关键词:大豆花叶病毒;复制酶蛋白;蛋白表达;单克隆抗体

中图分类号: S435.651

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)03-

Expression and Purification of a Nib Protein of the SMV Strain 3 from the Northeastern Regions of China and Preparation of Its Monoclonal Antibody

ZHANG Linlin^{1,2}, LI Xiaoyu², ZHANG Chunyu², YOU Qing³, ZHANG Zhengkun², LI Qiyun², ZHANG Junhua^{1*}, WANG Yongzhi^{2*}

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northeast, Ministry of Agriculture, Jilin Key Laboratory of Agricultural Microbiolog. Gongzhuling 136100; 3. Jilin Agricultural University. Changchun 130118, China)

Abstract: A nib gene of Soybean mosaic virus (SMV) strain 3 in northeastern regions of China was cloned from the SMV-infected soybean leaves. Sequence analysis of the nib gene exhibited the highest of 99.48% similarity with that from Ar33, followed by WS160, G4, G2, and L with 98.97%, 94.88%, 90.95% and 90.35%, respectively. The gene sequence also showed a distant phylogenetic relationship with that from 6202-2 and 6067-1 with 83.82% and 84% of similarity respectively. The recombinant Nib protein was expressed in E.coli and purified using affinity chromatograph. Four monoclonal antibodies against Nib protein, 2G3, 1D6, 6F9 and 6B2 were prepared, by immunizing mice with the purified recombinant Nib protein. The results might lay the foundation for the function investigation of the SMV nib gene and soybean SMV resistance breeding.

Key words: SMV; Nib protein; Protein expression; Monoclonal antibody

大豆花叶病毒病(Soybean mosaic virus, SMV)为世界性大豆病害^[1],我国从南到北均有发生。SMV侵染大豆植株后,会引起大豆植株矮化、叶片皱缩、

花叶、顶枯等症状。流行年份可造成10%~30%的减产,是造成大豆减产的原因之一。大豆花叶病毒病还可造成病株籽粒出现褐斑,严重降低大豆的商品质量。

SMV为马铃薯Y病毒属(Potyvirus)成员^[2],基因组由单链正链RNA组成,长约9600个核苷酸。其编码的多聚蛋白酶解后产生10个成熟蛋白^[3],从N端到C端分别为PI、HC-Pro、P3、6K1、CI、6K2、NIa-Vpg、NIa-Pro、Nib和CP^[4]。Nib区域可编码一RNA依赖型RNA聚合酶(RdRp)^[5],也是所有

收稿日期:

基金项目:吉林省自然科学基金项目(20130101089JC);农业部转基因重大专项(2011ZX08004-004)

作者简介:张淋淋(1989-),女,在读硕士,主要从事植物病理方面的研究。

通讯作者:张俊华,男,教授,博士;E-mail: podozjh@163.com

王永志,男,副研究员,博士;E-mail: yzwang@cjaas.com

SMV 基因组编码的蛋白中最保守的一个,与病毒复制有重要的关系^[6],其复制酶活性与 NIa-Pro 核苷结合能力有关^[7]。在植物细胞内,病毒基因组 RNA 经病毒脱壳而释放,在细胞质内翻译出各种蛋白。负链 RNA 分子的产生是通过 RdRp(NIb)对正链 RNA 分子 3'-末端的识别来介导的,这个过程需要 3'-NTR 有特异的二级结构。一旦负链 RNA 合成了,在 RdRp 的作用下以负单链 RNA 为模板得到正单链的基因组 RNA^[8]。

目前,对于大豆花叶病毒主要集中于 *cp* 基因的研究^[9-11],而 *nib* 作为复制酶基因,其蛋白表达及单克隆抗体的制备国内外均未见报道。为了进一步研究 *nib* 基因功能及与寄主互作的关系,本研究利用大肠杆菌表达并纯化了 SMV 的 NIb 蛋白,制备了 4 株能够特异性识别天然 SMV NIb 蛋白的单克隆抗体,与多克隆抗体相比,亲和力强,特异性更高,为大豆花叶病毒的研究提供了重要工具,对分析花叶病毒在大豆植株中的分布和感染路径以及 SMV 的致病机理具有重要作用;另外可作为探针研制 SMV 检测试剂盒,为大豆花叶病毒快速检测提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细菌、细胞和动物

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、Rosseta 感受态细胞、大豆花叶病毒东北 3 号株系与 SP2/0 细胞由实验室保存。BALB/c 小鼠购于长春生物制品所。

1.1.2 仪器和试剂

反转录酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、Taq plus DNA 聚合酶购于大连宝生物公司,HRP 标记的鼠源抗体购于 Sigma 公司,Ni²⁺亲和层析柱购于美国 GE 公司。

1.2 大豆花叶病毒 *nib* 基因的克隆

根据 GeneBank 中已报道的大豆花叶病毒基因序列 (GenBank:KP710869.1) 设计了 *nib* 基因的特异性引物,上游引物为 5'-atCATATGgagatgggttttgatg-3' (NdeI),下游引物为 5'-atCTCGAGctattgta aggacactgattca-3' (XhoI)。利用 TRIzol 法提取感染大豆花叶病毒的大豆叶片总 RNA, M-MuLV 反转录酶 42℃ 反应 1 h,合成 cDNA 第一条链。以其为模板利用 Taq plus DNA 聚合酶扩增 *nib* 基因。反应条件:94℃ 预变性 2 min;98℃ 变性 10 s,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,进行 30 个循环;72℃ 再延伸 10 min。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶

电泳,试剂盒纯化,与载体 pMD18-T 连接,转化大肠杆菌 DH5 α 菌株,构建重组载体 pMD-NIb。

1.3 *nib* 基因的序列分析

将测序后的结果在 NCBI 网站上与基因库中已经发表的序列进行对比,选择大豆花叶病毒不同株系的 *nib* 基因 (GeneBank 序列号及来源如图 2) 作为参比序列,序列测定结果使用 DNAMAN6.0 软件进行序列对比,MEGA5.10 进行系统发育树的建立。

1.4 原核表达载体的构建

NdeI 和 XhoI 双酶切重组质粒 pMD-NIb 和原核表达载体 pET-28a(+),试剂盒纯化回收目的片段,将 SMV 的 *nib* 基因与 pET-28a(+) 载体连接,构建重组质粒 pET28a-NIb,转化大肠杆菌 DH5 α 菌株,经酶切鉴定和 PCR 鉴定后,送上海生工生物技术有限公司测序。

1.5 重组 SMV NIb 蛋白的表达与鉴定

将重组质粒 pET28a-NIb 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株,挑取单个菌落鉴定后扩增繁殖,采用不同的 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间、培养基抗生素浓度、诱导前 OD₆₀₀ 值进行诱导表达,比较不同的表达载体及不同表达条件的表达量,确定最佳诱导条件^[9],SDS-PAGE 电泳分析,考马斯亮蓝染色、脱色后观察表达产物。同时设含空载体 pET-28a(+) 的表达菌作对照。重组后蛋白用单克隆抗体 (抗 His 标签) 和 HRP 标记的 IgG 做 Western-blot 鉴定。

1.6 重组 SMV NIb 蛋白的纯化

将诱导表达 3 h 后的菌液在 4℃ 6 000 r/min 离心 10 min,收集菌体。菌体超声波破碎后将包涵体表达的 SMV NIb 重组蛋白收集,用 3 mol/L 尿素溶液去除大部分杂蛋白,4℃ 6 000 r/min 离心 10 min,包涵体沉淀用 pH=8.0 的含 8 mol/L 尿素裂解液室温溶解 1 h,4℃ 12 000 r/min 离心 20 min,取上清蛋白与 Ni²⁺-NTA 填料结合 1 h,分别用 pH=8.0、6.0 的 8 mol/L 尿素溶液洗去杂蛋白后,用 pH=4.0 的 8 mol/L 尿素溶液洗脱目的蛋白,收集洗脱的目的蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳分析纯化结果。

1.7 单克隆抗体的制备

经过纯化的 NIb 蛋白,免疫小鼠,制备单克隆抗体,单克隆抗体的制备参照文献 [12] 的标准程序进行。

1.8 Western-blot 检测抗体特异性

将纯化的 NIb 蛋白和未诱导的菌体裂解后的上清进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后将各孔道电泳

胶切割,一部分用于考马斯亮蓝染色观察,另一部分电转移硝酸纤维素膜后与不同株单抗进行Western-blot分析,一抗为稀释1 000倍的单克隆抗体,二抗为稀释5 000倍的鼠源酶标抗体,暗室条件下DAB显色。

2 结果与分析

2.1 *nib*基因的克隆与序列分析

经琼脂糖凝胶电泳分析,结果表明(图1),在1 000~2 000 bp有1条特异性条带,大小约为1 500 bp,与*nib*基因的大小(1 551 bp)相吻合,回收后与pMD18-T载体连接,测序结果表明克隆基因为*nib*基因。将本研究克隆的SMV东北3号株系*nib*基因测序结果与Genebank数据库比对,绘制系统进化树(图2)。分析结果表明,大豆花叶病毒东北3号株系*nib*基因与Ar33亲缘关系最近,序列同源性高达99.48%,其次为WS160、G4、G2、L株系,与6202-2、6067-1株系亲缘关系最远。

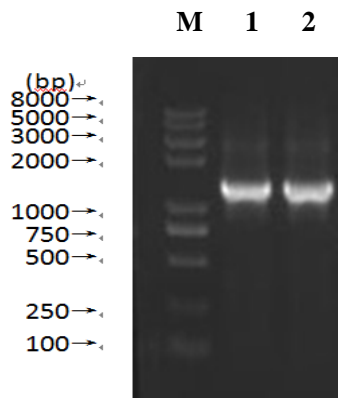


图1 SMV-3 *nib*基因PCR扩增产物
琼脂糖凝胶电泳分析

M: DNA marker; 1 ~ 2: *nib*基因PCR扩增

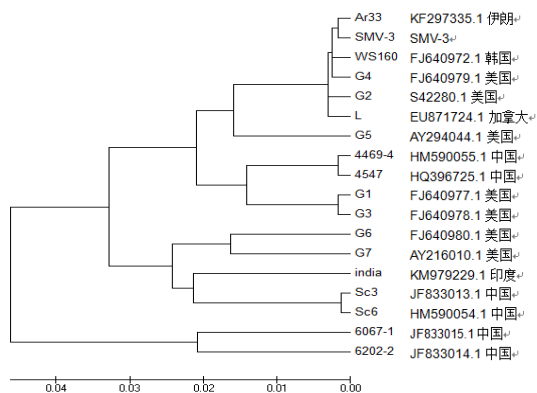


图2 大豆花叶病毒 *nib*基因系统进化树分析

2.2 *nib*基因的蛋白表达

转化pET28-Nib的菌株经由IPTG诱导,SDS-PAGE电泳表明,在相对分子质量(Mr)约57KDa

处,细胞破碎沉淀中有1条特异性条带(图3),而细胞破碎上清与空载体pET28a(+)转化的菌株中没有相应蛋白的表达,由此确定Nib蛋白主要以包涵体形式表达存在于大肠杆菌周质腔内。

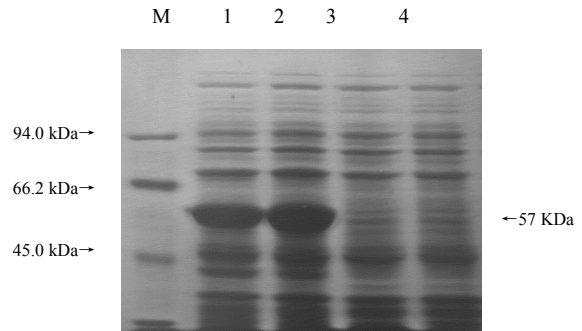


图3 Nib蛋白诱导表达的SDS-PAGE分析

M: 蛋白质 Mr 标准; 1 ~ 2: pET28a-Nib 转化菌诱导后的细胞破碎沉淀; 3: pET28a(+)空载体转化菌诱导后的细胞破碎沉淀; 4: pET28a-Nib 转化菌诱导后的细胞破碎上清

2.3 *nib*基因的蛋白纯化及鉴定

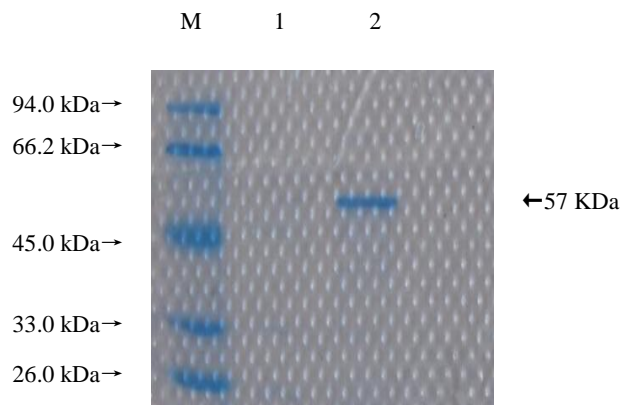


图4 SMV-Nib蛋白纯化的SDS-PAGE分析

M: 蛋白质 Mr 标准; 1: 空载体转化菌诱导后的纯化产物; 2: pET28a-Nib 转化菌诱导后细胞破碎沉淀的纯化产物

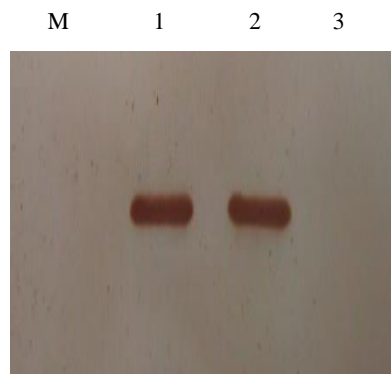


图5 SMV-Nib重组蛋白Western-blot鉴定

M: 蛋白质 Mr 标准; 1 ~ 2: pET28a-Nib 转化菌诱导后细胞破碎沉淀的纯化产物; 3: 空载体转化菌诱导后的纯化产物

以包涵体形式表达的 Nib 蛋白经 Ni²⁺亲和层

析纯化(图4),在相对分子质量(M_r)约57 KDa处得到清晰的单一条带,其分子量大小与NIB蛋白相符,说明经纯化后获得了高纯度的NIB蛋白。Western-blot验证表明重组原核表达载体成功表达出了目的蛋白(图5)。

2.4 单克隆抗体的制备及Western-blot检测

制备了2G3、1D6、6F9和6B2共4株SMV NIB蛋白单克隆抗体。为鉴定单克隆抗体对NIB蛋白的特异性反应,进行Western-blot分析。如图6所示,PVDF膜上出现单一清晰条带,大小约为57KDa,说明制备的4株单克隆抗体均能够特异性识别NIB蛋白。

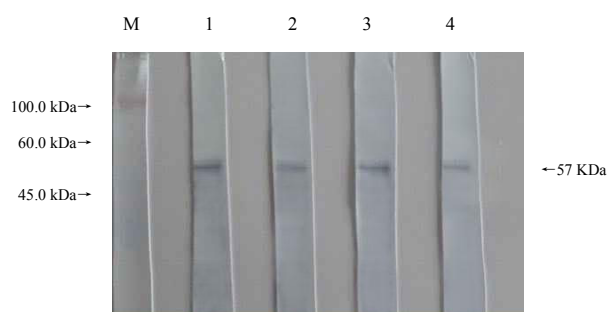


图6 纯化后的NIB重组蛋白Western-blot分析
M:蛋白质 M_r 标准;1-4:单克隆抗体2G3、1D6、6F9、6B2

3 讨论

病毒基因组RNA编码的核内含体大分子量蛋白(NIB),具有RNA复制酶的功能,是马铃薯Y病毒组中3'端突变率较高的一个区域,对其进行RNA复制酶基因介导的抗病性,或病毒与寄主互作关系,都有极为重要的意义。本研究通过对东北大豆花叶病毒3号株系的nib基因序列进行克隆和比对分析。结果表明,大豆花叶病毒东北3号株系与伊朗的Ar33株系亲缘关系最近,序列同源率为99.48%,其次为韩国的WS160株系、美国的G4、G2株系与加拿大的L株系,序列同源性分别为98.97%、94.88%、90.95%、90.35%,与中国的4469-4、4547、Sc3、Sc6、6202-2、6067-1株系亲缘关系反而较远,其中与6202-2、6067-1株系的同源性仅为83.82%、84%。由于马铃薯Y病毒组本身存在变异率高,存在大量的缺失突变、点突变以及一系列重组变异^[13],因此大豆花叶病毒东北3号株系与国内外其他株系在核苷酸序列同源性上存在不同水平的原因和机制还有待进一步研究。

本研究用纯化的NIB蛋白作为免疫原,经细胞融合、筛选、克隆与腹水制备,共获得4株NIB蛋白特异性单克隆抗体。自1982年西德科学家

首次成功研制烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)单克隆抗体以来^[14],单克隆抗体在植物病毒学上也得到广泛的应用。目前已应用在植物病毒的检测、植物病毒种下分类级别的划分、植物病毒抗原决定簇的鉴定、作为探针分析病毒非结构蛋白的功能等方面^[15]。近年来,国内关于SMV单克隆抗体的制备也陆续有报道,王永志等^[9]制备了9株SMV CP蛋白单克隆抗体,为大豆花叶病毒的研究提供了重要工具,而nib作为复制酶基因,是所有SMV基因组编码蛋白中最保守的一个^[16],其单克隆抗体特异性更高,亲和力更强,为进一步研究大豆花叶病毒奠定了基础。

参考文献:

- [1] De Jaeger G, De Wilde C, Eeckhout D, et al. The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance[J]. Plant Mol Biol, 2000, 43(4): 419-428.
- [2] Giritch A, Marillonnet S, Engler C, et al. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with non-competing viral vectors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(40): 14701-14706.
- [3] Vance V B, Beachy R N. Translation of soybean mosaic virus RNA in vitro: evidence of protein processing[J]. Virology, 1984, 132(2): 271-281.
- [4] Adams M J, Antoniw J F, Beaudoin F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae[J]. Molecular Plant Pathology, 2005, 6(4): 471-487.
- [5] Jeremy A, Bruenn. Relationships among the positive strand and double strand RNA viruses as viewed through their RNA dependent RNA polymerase[J]. Nucleic Acid Research, 1991, 19(2): 217-228.
- [6] Kekarainen T, Savilahti H, Valkonen J P T. Functional genomics on Potato virus A: virus genome-wide map of sites essential for virus propagation[J]. Genome Res, 2002(12): 584-594.
- [7] Puustinen P, Mäkinen K. Uridylylation of the Potyvirus VPg by viral replicase NIB correlates with the nucleotide binding capacity of VPg[J]. J Biol Chem, 2004, 279(37): 38103-38110.
- [8] 李向东,于晓庆,古勤生,等. 马铃薯Y病毒属病毒基因功能研究进展[J]. 山东科学, 2006, 19(3): 1-6.
- [9] 王永志,苏颖,米丽娟,等. 东北地区大豆花叶病毒3号株系衣壳蛋白的表达、纯化及单克隆抗体制备[J]. 吉林农业科学, 2011, 36(6): 37-39.
- [10] 陈文华,韦传宝,贾玉成,等. 大豆花叶病毒CP基因原核表达与抗血清制备[J]. 生物技术通报, 2009(10): 98-101.
- [11] 蔡春梅,姜骁,赵春梅,等. 中国大豆花叶病毒SC7外壳蛋白基因的序列测定及其与美国株系的比较[J]. 病毒学报, 2014, 30(5): 489-494.
- [12] 李晨阳,王弋,古艳丽,等. EV71结构蛋白VP1的原核表达及VP1单克隆抗体的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(9): 956-959.

- [13] 刘俊军,彭学贤,莽克强.大豆花叶病毒 *nib* 基因的 cDNA 克隆和序列分析[J].中国科学(B辑),1994,24(3):265-271.
- [14] Doem C M . The 30-kilodalton gene product of Tobacco mosaic virus potentiates virus movement[J].Science, 1982(237): 389-394.
- [15] 韩 英,任艳玲,廖咏梅.单克隆抗体在植物病毒学中的应用[J].广西农业生物科学,2007,26(增刊):142-144,149.
- [16] 孙浩华,薛 峰,陈集双.大豆花叶病毒研究进展[J].生命科学,2007,19(3):338-345.

(责任编辑:范杰英)