

香蕉线条病毒 ORF I 基因的原核表达及抗体制备

何云蔚, 陈 秀, 阮小蕾, 沈文锦, 刘福秀, 李华平

(华南农业大学 植物病毒研究室, 广东 广州 510642)

摘要:利用 PCR 方法从含香蕉线条病毒广东分离物(BSV-GD)部分基因组的质粒中扩增该病毒的 ORF I 基因,将其克隆到 pET-28b(+)原核表达载体中进行了融合表达. SDS-PAGE 电泳发现,目的融合蛋白与预期大小一致,相对分子质量约为 23 000,表达产物主要以不可溶的包涵体形式存在,将其变性溶解后利用 N 端的组氨酸标签进行纯化.以纯化产物为抗原免疫兔子制备了香蕉线条病毒的阳性兔抗血清,Western blot 和 ELISA 分析表明,制备的兔抗血清为香蕉线条病毒的高效特异性抗血清,效价高达 1:51 200.

关键词:香蕉线条病毒; ORF I; 原核表达; 抗血清

中图分类号:S432.1

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)03-0018-04

Prokaryotic Expression of *Banana streak virus* ORF I Gene and Preparation of Its Antiserum

HE Yun-wei, CHEN Xiu, RUAN Xiao-lei, SHEN Wen-jing, LIU Fu-xiu, LI Hua-ping

(Laboratory of Plant Virology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: ORF I gene of *Banana streak virus* Guangdong (BSV-GD) isolate was amplified from a BSV-GD recombinant plasmid by PCR, and the gene was expressed by being cloned into prokaryote expression vector pET-28b(+). The interesting fusion protein was about 23 000 in size by SDS-PAGE analysis. The product was existed in form of inclusion body. It was dissolved by denaturalization, and the purified protein was obtained by using the histidine labeling kit of N-terminus of the protein. The antiserum was obtained by immunizing healthy rabbits with the purified protein. The results from Western blot and ELISA analysis showed that it's a special antiserum of BSV with high titer which was determined to be 1:51 200. This study was a base of the research of BSV including ORF I gene's function and the virus detection.

Key words: *Banana streak virus*; ORF I; prokaryotic expression; antiserum

香蕉线条病是香蕉生产上一种重要的病毒病,可引起叶片和假茎部位产生线条症状,病情严重时,会出现植株矮化,不开花或开花结果果穗小、果实不饱满、产量减少 70%~90%^[1].目前,香蕉线条病在亚洲、非洲、澳洲、美洲等世界香蕉产区均有报道,该病害在我国的华南地区也有发生^[2-3].香蕉线条病的病原物为香蕉线条病毒(*Banana streak virus*, BSV),

属花椰菜花叶病毒科 Caulimoviridae 杆状 DNA 病毒属 *Badnavirus*,基因组编码 3 个开放阅读框,ORF I 和 ORF II 分别编码 2 个功能未知的小蛋白,ORF III 编码 1 个多聚蛋白^[4].本研究对香蕉线条病毒广东分离物(BSV-GD, Genbank 登陆号:DQ451009)的 ORF I 基因进行了原核表达,并以纯化的原核表达产物为抗原制备了相应的特异性抗血清,为进一步研究

收稿日期:2008-09-12

作者简介:何云蔚(1977—),女,博士;通讯作者:李华平(1961—),男,教授,博士,E-mail:huaping@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30671358);国家农业公益性行业科研专项(nyhyzx07-029)

ORF I 编码蛋白的功能奠定基础,并为 BSV - GD 发生情况调查提供条件.

1 材料与方法

1.1 材料

香蕉线条病毒(*Banana streak virus*, BSV)阳性植株、含 BSV 部分基因组片断的质粒 pMD-12、克隆和表达所用大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、BL21 (DE3)、原核表达载体 pET-28b(+)均由华南农业大学植物病毒实验室保存、提供;克隆载体 pMD18-T simple vector、DNA 聚合酶、各种限制性内切酶均购自大连宝生物公司;多聚组氨酸蛋白纯化试剂盒购自德国 MERCK 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和 Superecl plus 超敏发光液购自广州捷倍思生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 ORF I 基因原核表达载体构建 根据已知的 BSV-GD ORF I 的序列设计 2 条特异性引物 BFI-1 (5'-GGATCCTATGGTCGAGAAACTTGG-3') 和 BFI-2 (5'-AAGCTTTCATCCCATGAGCTTTCG-3'), 其中 BFI-1 引入 *Bam*H I 酶切位点, BFI-2 引入 *Hind* III 酶切位点. 以质粒 pMD-12 为模板, 经 PCR 扩增后电泳检测扩增结果. 切下含目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶, 利用 DNA 回收试剂盒回收、纯化目的 DNA 片段, 将纯化产物连接到 pMD18-T simple 载体中, 得到重组质粒 pST-BFI. 重组质粒经酶切鉴定后进行测序.

将质粒 pST-BFI 和 pET-28b(+) 分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, 回收目的片段后利用 T4 DNA 连接酶进行连接, 获得目的基因的原核表达载体 pET-BFI. 重组质粒经酶切鉴定后转化到寄主菌 BL21(DE3) 中进行表达.

1.2.2 ORF I 基因的诱导表达 挑取含 pET-BFI 的 BL21(DE3) 单菌落接种到液体 LB(含 Kan 50 μ g/mL) 中, 37 $^{\circ}$ C 下活化过夜后, 按体积比 1:100 比例接种到液体 LB(含 Kan 50 μ g/mL) 中, 37 $^{\circ}$ C 下培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.6 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 于 37 $^{\circ}$ C 下振荡诱导表达. 含重组质粒的寄主菌在终浓度为 1 mmol/L IPTG 的诱导下表达, 分别取诱导时间为 1、2、3 和 4 h 的菌液 1 mL, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集细菌, 用 100 μ L 灭菌蒸馏水重悬, 并加入 100 μ L 2 $\times$ SDS 的凝胶上样缓冲液, 沸水中煮 5 min, 分别取 15 μ L 上样, 进行 SDS-PAGE 电泳

分析.

1.2.3 表达产物的纯化 产物的可溶性分析: 取诱导 4 h 的菌液离心、收集沉淀. 加 1/8 体积的裂解液重悬菌体, 冰浴超声波破碎(功率 400 W, 破碎 15 s, 15 次, 间隔 15 s), 4 000 r/min 离心 10 min, 将上清液小心吸出, 沉淀溶解在 1/8 体积灭菌蒸馏水中, 取上清液、沉淀的溶解液进行 SDS-PAGE 电泳分析.

产物的纯化浓缩: 表达产物如上进行超声波破碎后, 加入含 6 mol/L 尿素的缓冲液重悬沉淀, 冰浴 1 h, 彻底溶解包涵体. 按 MERCK 公司组氨酸标签纯化试剂盒操作说明进行蛋白纯化. 将纯化后的蛋白洗脱液加入 4 mL 的超滤管中, 7 500 r/min 离心 10 min, 收集超滤管底部的蛋白, 析出的变性蛋白颗粒用少量灭菌去离子水冲洗超滤管壁一并收集. 纯化收集物进行 SDS-PAGE 电泳分析.

1.2.4 融合蛋白抗血清的制备 取纯化浓缩的融合蛋白, 混合等体积福氏完全佐剂, 乳化后作为抗原. 取 1 只 2 kg 左右雄性健康大耳白兔, 注射抗原前取兔耳静脉血做空白对照血清, 然后参考邓丛良等^[5]的方法分别进行皮下多点和肌肉混合注射, 共免疫 5 次, 每次各注射 1~2 mL(约含 100 μ g 抗原蛋白)乳化抗原溶液, 免疫间隔期为 7 d, 最后 1 次免疫采用不加佐剂抗原静脉注射, 免疫 7 d 后耳静脉采血, 测定抗血清效价后心脏采血. 将所采的血室温放置, 待自然凝固后放置 4 $^{\circ}$ C 下使凝块收缩, 然后吸取上清液 3 000 r/min 离心 15 min, 弃沉淀取上清, 加入 1 g/L 的叠氮钠, 分装后 -20 $^{\circ}$ C 下保存.

1.2.5 多克隆抗血清的 Western-blot 及 ELISA 分析 Western-blot 分析: 取 SDS-PAGE 电泳后的凝胶, 通过电转移法将重组蛋白转印于硝酸纤维素膜上, 将目的蛋白的多克隆抗体稀释 500 倍作为一抗, 37 $^{\circ}$ C 下反应 0.5~1.0 h, 洗膜 3 次, 与 5 000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 作用 0.5~1.0 h, 洗膜, 加 Superecl plus 超敏发光液室温作用 3 min, 用 X 光胶片曝光.

效价测定: 参考吴兴泉等^[6]的方法, 抗原浓度为免疫注射时的 1/20, 抗血清稀释度为 1:100~1:51 200, 用间接 ELISA 法进行检测.

工作浓度测定: 取 BSV 的阳性植物材料和健康香蕉组织, 加入 10 倍体积的抗原包被液(含 5 g/L 的酮试剂)进行研磨, 离心后取上清包被酶联板, 抗血清稀释度为 1:100~1:51 200, 用间接 ELISA 法进行检测.

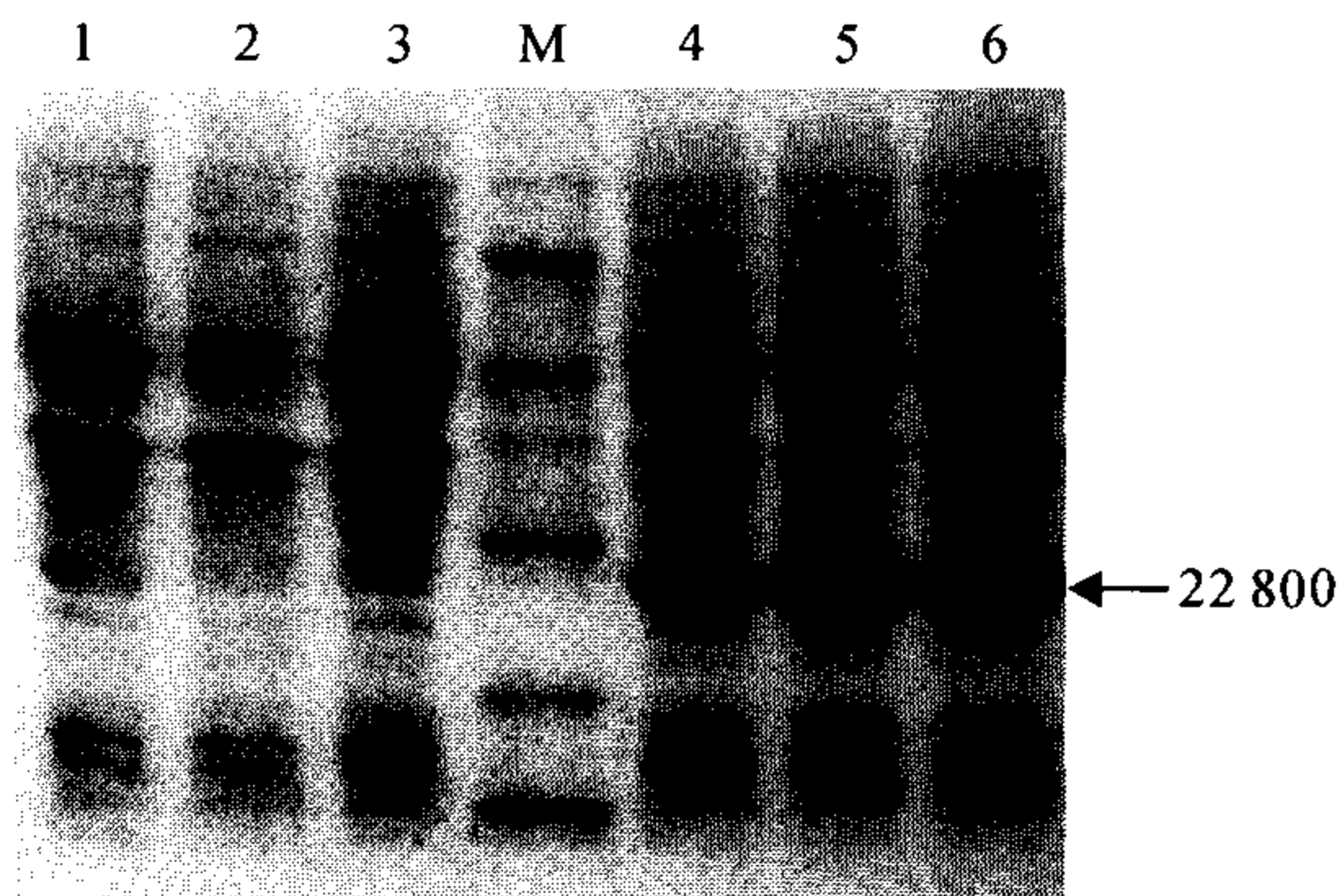
2 结果与分析

2.1 BSV ORF I 基因原核表达载体构建与鉴定

从含 BSV ORF I 基因的质粒上扩增到目的片段, 连接到克隆载体 pMD18-T simple 中, 获得 pST-BFI 重组质粒, 经测序鉴定正确后, 利用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 将其克隆到表达载体 pET-28b (+) 中, 构建了目的基因的原核表达载体 pET-BFI, 经酶切鉴定正确后, 转化到寄主菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 中。

2.2 ORF I 基因的原核表达及产物纯化

收集经 1 mmol/L IPTG 诱导若干小时的含有重组质粒的寄主菌 *E. coli* BL21 (DE3), 以经诱导的不含质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 和含 pET-28b (+) 的 *E. coli* BL21 (DE3), 及未经诱导的含重组质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 为阴性对照。以上产物的 SDS-PAGE 电泳分析结果表明, 与阴性对照相比, 含 pET-BFI 质粒的菌株可特异性地表达出 1 条相对分子质量约为 23 000 的目的蛋白, 目的蛋白的产量与诱导时间无明显正相关(图 1)。



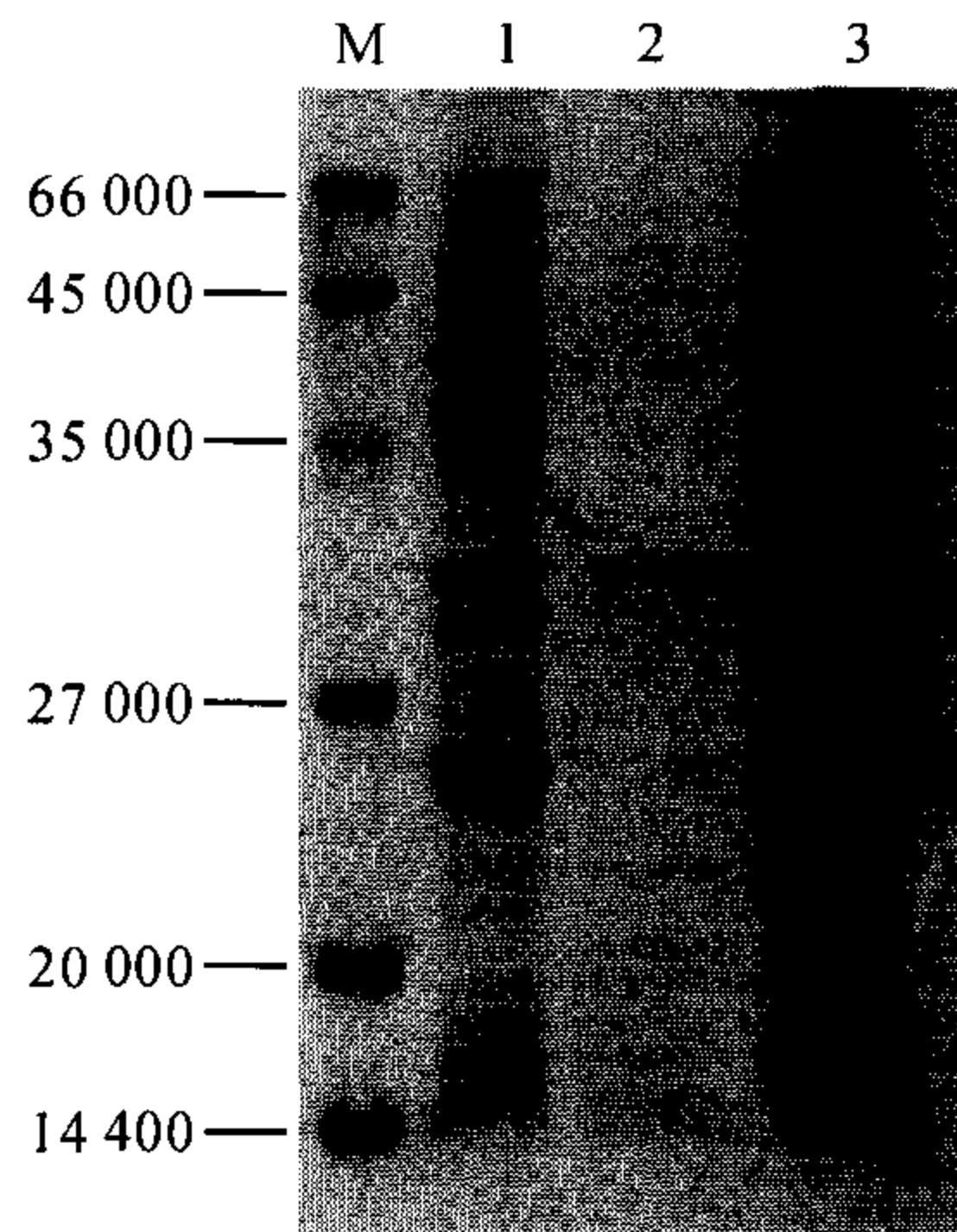
1: IPTG 诱导的 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 全蛋白; 2: IPTG 诱导的含有 pET-28b (+) *E. coli* BL21 (DE3) 全蛋白; 3: 未诱导的含有 pET-ORF I 的 *E. coli* BL21 (DE3) 全蛋白; 4~6: IPTG 诱导 1, 2, 3 h 含有 pET-ORF I 的 *E. coli* BL21 (DE3) 全蛋白; M: 为中范围相对分子质量蛋白 Marker (从上到下其大小依次为 126 300、97 200、56 800、44 300、27 400、16 100、9 400)

图 1 BSV-ORF I 基因原核表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Analysis of prokaryotic expression products of BSV-ORF I by SDS-PAGE

将含目的基因的寄主菌菌液经超声波裂解、SDS-PAGE 分析后表明: 重组蛋白主要以包涵体的形式存在于菌体沉淀物中(图 2)。利用 6 mol/L 尿素对其进行变性溶解后, 用镍离子亲和树脂纯化回收带 6 × His 标签的 BSV ORF I 融合蛋白。纯化产物经超

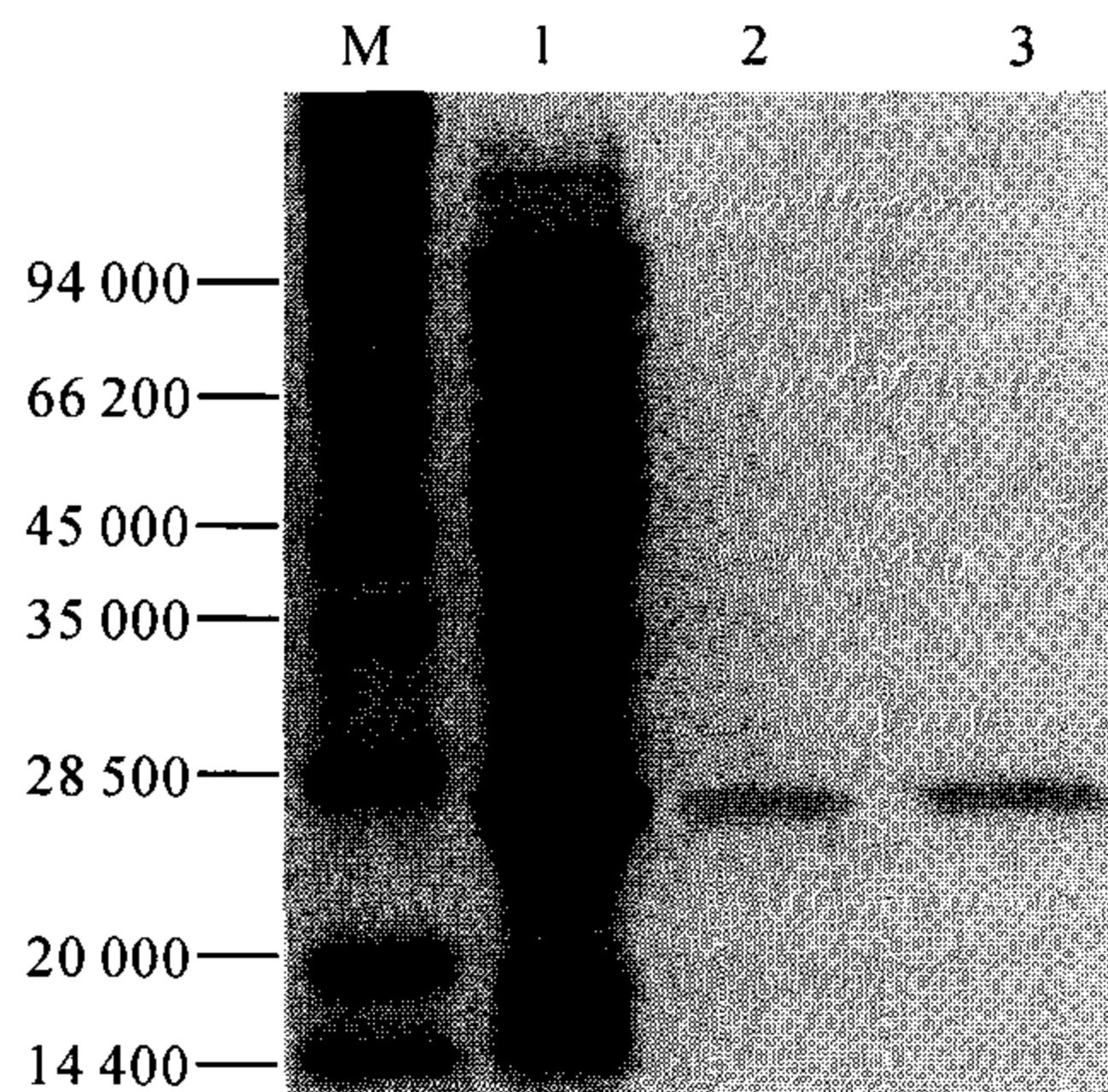
滤浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 可观察到较纯目的蛋白条带(图 3)。



1: 细胞裂解后沉淀物; 2: 细胞裂解上清液; 3: 未经超声波处理的细胞; M: 中范围相对分子质量蛋白 Marker

图 2 融合蛋白 His BFI 可溶性分析(SDS-PAGE 电泳图)

Fig. 2 Soluble analysis of fusion protein His BFI by SDS-PAGE



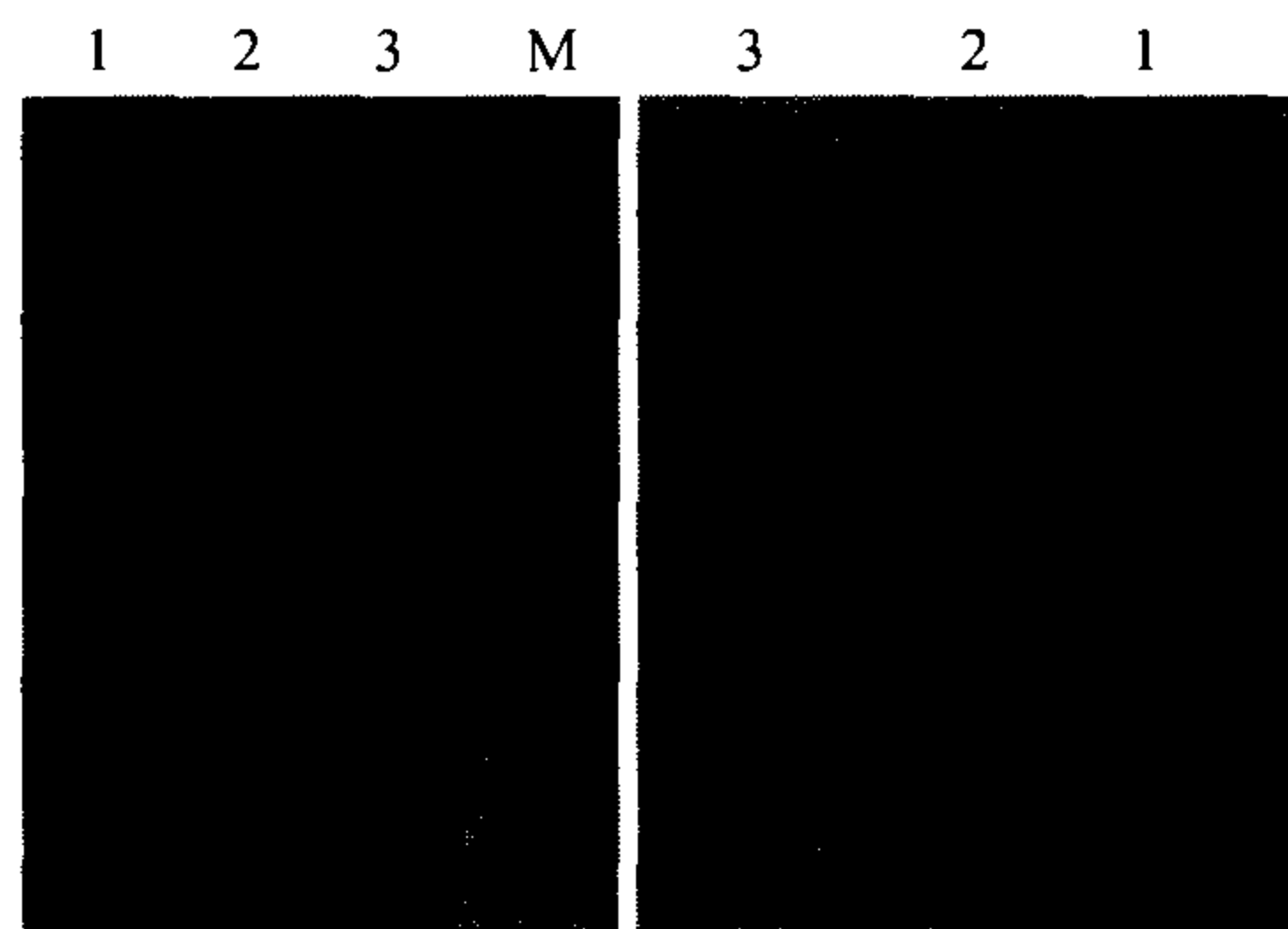
1: 未经纯化的全蛋白; 2, 3: 亲和层析收集液; M: 低相对分子质量蛋白 Marker

图 3 融合蛋白 His ORF I 纯化后 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of the purified fusion protein His ORF I by SDS-PAGE

2.3 多克隆抗血清的 Western-blot 及 ELISA 分析鉴定

将所制备的多克隆抗血清作为一抗进行 Western-blot 分析, 结果(图 4)表明, 以纯化蛋白的包涵体制备的抗血清可特异性与表达的重组蛋白产生反应。间接 ELISA 测定结果表明, 以稀释的重组蛋白为抗原, 将抗血清稀释 51 200 倍时, 仍有明显的阳性反应。将抗血清作系列梯度稀释后, 以感染 BSV 香蕉叶片的汁液为抗原进行间接 ELISA 测定, 抗血清进行 1:400 ~ 1:3 200 稀释时表现明显的阳性反应。



A: SDS-PAGE 分析

B: Western-blot 分析

1: IPTG 诱导的 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 全蛋白; 2: 未诱导的含有 pET-ORF I 的 *E. coli* BL21 (DE3) 全蛋白; 3: IPTG 诱导的含有 pET-ORF I 的 *E. coli* BL21 (DE3) 全蛋白; M: 低相对分子质量蛋白 Marker

图4 融合蛋白 His ORF I 的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

Fig. 4 Analysis of fusion protein His ORF I by SDS-PAGE and Western-blot

3 讨论

自香蕉线条病毒被鉴定以来,有关其抗血清的研究也相继展开.因 BSV 株系间存在较大的血清学差异,一些株系间不发生交叉反应^[7-8].目前为止,还没有我国的 BSV 分离物血清学方面的研究报道,华南农业大学植物病毒研究室在对 BSV 研究中曾尝试使用国外的 BSV 抗血清对 BSV-GD 进行检测,但是效果不理想,可能 BSV 广东分离物与国外分离物也存在较大血清学差异.序列比对分析发现 BSV-GD 与国外已报道 SBV 基因组序列及氨基酸序列变异很大(结果未显示),该结果进一步支持了上述推测.本研究所制备的 BSV 抗血清可特异地检测到我国的 BSV-GD 分离物,对开展国内 BSV 的研究有重要意义.

传统抗血清制备中,常以感病的植物组织为材料提纯病毒,免疫动物.这种方法不仅程序繁琐,而且由于杆状病毒在寄主植物组织中含量极低,不易获得大量高纯度的病毒粒子.本研究利用纯化后的 BSV ORF I 原核表达产物作抗原,不仅可简便快速地制备大量 BSV ORF I 的融合蛋白,而且由于表达产物中不含 BSV 寄主植物组织的成分,以此为抗原得到的抗体有较好的专化性,因而用血清学方法检测 BSV 时不易出现假阳性,可以快速、准确地用于该病毒的检测.

目前对 BSV 的研究已相继开展,但对其基因功能的研究还鲜见有报道. Cheng 等^[9]对同属的鸭跖草黄斑驳病毒(*Commelina yellow mottle virus*, CoYMV)

的研究发现,其 ORF I 编码蛋白与病毒粒子前体的形成有关,而 BSV 与 CoYMV 存在着较高的氨基酸同源性,相应的基因是否存在类似的功能?为了研究 BSV ORF I 基因编码蛋白,本研究成功地对该基因进行了体外表达,并利用其制备了多克隆抗血清,同时华南农业大学植物病毒研究室已开展 BSV 侵染性克隆的研究,在两者基础上,期望通过侵染性克隆中 ORF I 基因的突变、功能互补等试验对 ORF I 基因功能进行进一步地分析.

参考文献:

- [1] DAHAL G, ORTIZ R, TENKOUANO A, et al. Relationship between natural occurrence of *Banana streak badnavirus* and symptom expression, relative concentration of viral antigen, and yield characteristics of some micropropagated *Musa* spp. [J]. *Plant Pathology*, 2000, 49: 68-79.
- [2] HARPER G, DAHAL G, THOTTAPPILLY G. Detection of episomal *Banana streak badnavirus* by IC-PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 1999, 79: 1-8.
- [3] 费继锋, 肖火根, 周国辉, 等. 广东省首次发现香蕉线条病毒 [J]. *福建农业大学学报*, 2001, 30 (增刊): 84-86.
- [4] HARPER G, HULL R. Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA [J]. *Virus Genes*, 1998, 17 (3): 271-278.
- [5] 邓丛良, 韩丽娟, 燕照玲, 等. 白草花叶病毒 CP 基因在大肠杆菌中的表达及抗血清的制备 [J]. *植物病理学报*, 2005, 35 (5): 442-445.
- [6] 吴兴泉, 陈士华, 吴祖建, 等. 马铃薯 X 病毒 CP 基因的原核表达及特异性抗血清的制备 [J]. *郑州工程学院学报*, 2003, 24 (2): 25-28.
- [7] LOCKHART B E L, OLSZEWSKI N E. Serological and genomic heterogeneity of *Banana streak badnavirus*: Implications for virus detection in *Musa* germplasm [M] // GANRY J P. *Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests*. Montpellier: CIRAD-FLHOR, 1993: 105-113.
- [8] THOTTAPPILLY G, DAHAL G, LOCKHART B E L. Studies on a Nigerian isolate of *Banana streak badnavirus*: purification and enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Annals of Applied Biology*, 1998, 132 (2): 253-261.
- [9] CHENG J, LOCKHART B E, OLSZEWSKI N E. The ORF I and II proteins of *Commelina yellow mottle badnavirus* are virion-associated [J]. *Virology*, 1996, 223: 263-271.

【责任编辑 周志红】