

葡萄卷叶伴随病毒 3 号抗血清的制备及应用

王克双 费菲 吕睦颀 李捷 程玉琴*

(中国农业大学 农学与生物技术学院果树系/北京市果树逆境生理实验室,北京 100193)

摘要 为获得特异性抗血清用于批量检测葡萄苗木中的葡萄卷叶伴随病毒 3 号(*Grapevine leafroll associated virus 3*, GLRaV-3),本研究用含有 GLRaV-3 CP 蛋白基因的载体 pMD18-CP 为模板,PCR 扩增 CP 蛋白基因。将 PCR 产物定向克隆到原核表达载体 pET-28a (+) 上,转化大肠杆菌 BL21(DE3),筛选得到阳性克隆 pET-G3CP。用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达,SDS-PAGE 电泳分析显示,GLRaV-3 CP 在大肠杆菌中得到高效表达。纯化表达产物后免疫家兔制备抗血清。经分析,抗血清效价为 $1/2^{14}$,试验结果显示,此抗血清能用于葡萄植株样品中 GLRaV-3 不同分离物检测。

关键词 葡萄融合蛋白; ACP-ELISA; Western blot; 分离物

中图分类号 O 629.73

文章编号 1007-4333(2012)04-0081-05

文献标志码 A

Preparation and application of antiserum against *Grapevine leafroll associated virus 3*

WANG Ke-shuang, FEI Fei, LÜ Mu-di, LI Jie, CHENG Yu-qin*

(Department of Pomology/Laboratory of Stress Physiology and Molecular Biology for Tree Fruits,

Key Laboratory of Beijing Municipality/College of Agronomy and Biotechnology,

China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The pMD18-CP containing CP gene of *Grapevine leafroll associated virus 3* (GLRaV-3) was used for PCR amplification in order to obtain a specific antiserum for reliable GLRaV-3 diagnosis in routine tests. The PCR products of GLRaV-3 CP gene were cloned into the expression vector pET-28a. The resulted recombinant plasmid pET-G3CP was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE analysis showed that the recombinant GLRaV-3 CP was expressed as a 40 ku inclusion body protein at high level induced by IPTG at final concentration of 1 mmol/L. Antiserum was prepared after the rabbit was immunized with the purified recombinant CP. The antiserum titer was determined to be $1/2^{14}$, and the antiserum was specific and sensitive for different GLRaV-3 isolates detection.

Key words grape; recombinant protein; ACP-ELISA; Western blot; isolate

葡萄卷叶病(Grapevine leafroll disease, GLD)是葡萄上发生最为普遍、危害最为严重的病毒病害之一,严重影响葡萄生产和葡萄酒产业。据报道,葡萄卷叶伴随病毒 1 号(*Grapevine leafroll-associated virus 1*, GLRaV-1)、2 号(GLRaV-2)和 3 号(GLRaV-3)是与该病相关的 3 种最重要病原

物^[1]。GLRaV-3 为长线形病毒科(Closteroviridae)卷叶病毒属(*Ampelovirus*)的典型成员,其基因组为正单链 RNA,编码 12 个可读框(open reading frame, ORF),其中 ORF6(13913~14854nt)编码产物为外壳蛋白,大小约为 35 ku^[2]。基于 CP 基因构建的遗传进化树表明,GLRaV-3 分离物可分成 4-5

收稿日期: 2012-04-28

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-30-bc-1)

第一作者: 王克双, 硕士研究生, E-mail: keshuangwang@sina.com

通讯作者: 程玉琴, 博士, 副教授, 主要从事植物病毒分子生物学及病毒与寄主的分子互作研究, E-mail: chengyuqin@cau.edu.cn

进化支^[3-4]。

血清学作为检测植物病毒的常规方法,以其快速、操作简便、成本低和适合批量样品检测等优点而被广泛应用于葡萄病毒检测中。虽然有商业抗体出售,但其价格昂贵。目前国内外已有利用原核表达 CP 蛋白制备 GLRaV-3 抗血清的报道^[5-6],但对 GLRaV-3 不同分离物的检测效果介绍较少。而且本研究用来原核表达的 GLRaV-3-LN 的 CP 基因与已报道用以制备抗血清的 CP 基因序列同源性均较低;与国内一个分离物 Dawanhong(A F037268)的 CP 基因^[6]核苷酸同源性为 91.7%,与来自智利的一个分离物 CI-766(EU344893)的 CP 基因^[5]核苷酸同源性为 91.4%。从以 CP 基因构建的进化树分析可知,分离物 Dawanhong 和 CI-766 分在第 1 组中,而 LN 分离物分在第 3 组^[4]。

本研究通过构建 GLRaV-3-LN CP 基因的原核表达载体,并以在大肠杆菌中表达的重组蛋白为抗原制备抗血清,旨在将其应用于 GLRaV-3 不同分离物的检测。

1 材料与方 法

1.1 材 料

含有 GLRaV-3 辽宁分离物(GLRaV-3-LN)CP 蛋白基因的 pMD18-CP 载体^[7]和本研究所用的感染 GLRaV-3 的葡萄植株样品由本实验室保存。原核表达载体 pET-28a(+),大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)、*Taq* 酶和限制性内切酶购自大连宝生物公司。DNA 回收试剂为 AXYGEN 公司产品,IPTG 购自 Sigma 公司。

1.2 方 法

1.2.1 原核表达载体构建

构建 GLRaV-3 CP 原核表达载体 pET-G3CP 的上下游引物分别为:5'-GCGGAATTC-ATGGCATTGAACTGAAATTAGGGC-3'(下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点)、5'-GGGGTTCGAC-GGCTTCTTTTGC AATAGTTGAAAGA-3'(下划线部分为 *Sal* I 酶切位点)。以含有 GLRaV-3-LN CP 蛋白基因的 pMD18-CP 载体为模板,PCR 扩增得到 GLRaV-3 CP 蛋白基因全长的 cDNA 片段。PCR 产物经纯化回收后定向克隆到 pET-28a(+)上,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,提取质粒,经 PCR 扩增鉴定为阳性的重组质粒,送北京三博远志生物技术有限责任公司测序,将测序正确

的克隆命名为 pET-G3-CP。

1.2.2 GLRaV-3 CP 蛋白的诱导表达、SDS-PAGE 分析及纯化

将 pET-G3CP 转化大肠杆菌 BL21,挑取单菌落于 3 mL LB 液体培养基摇培约 12 h,将菌液按 1:100 稀释到新鲜的 LB 液体培养基中,摇培至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37 °C 继续诱导 4 h。取表达产物进行 SDS-PAGE 电泳,显色后切下目标条带,加等体积的 0.9% 生理盐水冰浴研磨,4 °C 放置过夜,离心收集上清。

1.2.3 抗血清制备

在纯化产物中加入等体积的弗氏不完全佐剂,乳化后免疫家兔。共进行 4 次皮下注射,免疫剂量每次约为 0.7 mg。最后一次加强免疫后的 7~10 d 从静脉采血。在制备的抗血清中加入 0.02% 的叠氮化钠,-40 °C 保存。

1.2.4 Western blot 检测抗血清特异性

以纯化的重组蛋白 GLRaV-3 CP(稀释 50 倍)为检测样品,空载体 pET-28a 诱导菌液总蛋白为阴性对照。抗血清稀释 2 000 倍,通过氮蓝四唑(NBT)/5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸(BCIP)显色进行结果判定。

1.2.5 抗血清效价测定和应用分析

用抗原包被酶联板 ELISA(ACP-ELISA)法^[8]分析抗血清效价和其实际应用效果。显色后在酶标仪 405 nm 条件下读数,记录结果。

效价分析时,抗血清按 1/2⁶,1/2⁷,...,1/2¹⁵ 进行梯度稀释,正常血清也按此梯度进行稀释,以纯化的原核表达蛋白(用抗原包被缓冲液作 1/10³ 稀释)为抗原。计算 I/H 值,即(样品的平均吸光值-空白对照的平均吸光值)/(健康对照的平均吸光值-空白对照平均吸光值)。I/H \geq 3,为阳性;I/H<3 为阴性:

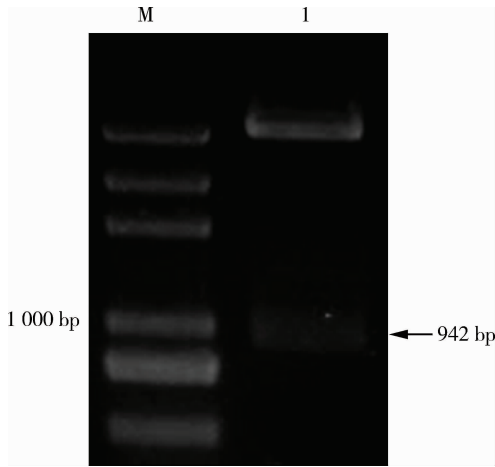
以已知感染 GLRaV-3 不同分离物的葡萄植株样品韧皮部组织(各 0.2 g)为检测样品,以纯化的原核表达蛋白(用抗原包被缓冲液作 1/10³ 稀释)为阳性对照,脱毒葡萄组培苗为阴性对照,进行 ACP-ELISA 进行抗血清实际应用效果分析。抗血清按 500 倍稀释。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体构建

以本实验室保存的 pMD18-CP 为模板进行 GLRaV-3 CP 蛋白基因的 PCR 扩增。将 PCR 产物

用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后定向克隆到载体 pET-28a(+), 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒。将重组质粒 pET-G3CP 进行酶切验证, 得到一条 942 bp 左右的目的条带(图 1)。说明 CP 蛋白基因已连接到 pET-28a(+)载体上。随后的测序结果表明阅读框正确。



M 为 DNA 分子量标准; 1 为酶切产物。

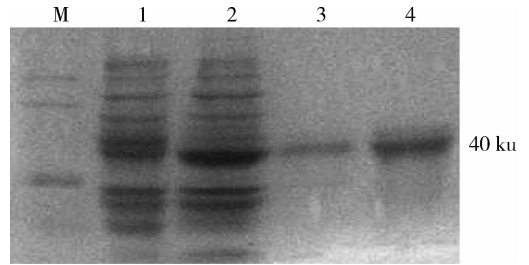
图 1 酶切验证 GLEaV-3 CP 原核表达载体 pET-G3CP

Fig. 1 Restriction analysis of expression vector pET-G3CP

2.2 原核表达产物的 SDS-PAGE 分析、纯化及定量

将原核表达载体 pET-G3CP 转入大肠杆菌菌株 BL21, 用终浓度为 1 mM 的 IPTG 进行诱导表达。由于载体自身带有组氨酸标签, 且这些碱性氨基酸可使融合蛋白在 SDS-PAGE 电泳中迁移变

慢^[9], 从而导致融合蛋白分子量出现偏差而大于 CP 蛋白本身的分子质量(约 35 ku)。因此电泳显示在大小约 40 ku 附近出现 1 条特异性蛋白条带(图 2)。这个分子量与我们预期大小一致, 说明外源蛋白在大肠杆菌中得到了正确表达。切胶纯化回收蛋白后, 用分光光度计测定纯化蛋白在 260 和 280 nm 处的吸光值(OD), 并计算蛋白浓度。结果表明, $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ 的比值为 1.14, 纯化后的蛋白浓度为 0.65 mg/mL。



M 为蛋白分子量标准。1 为 pET-G3CP 未经 IPTG 诱导后产物; 2 为 pET-G3CP 经 IPTG 诱导后产物; 3~4 为纯化蛋白。

图 2 GLEaV-3 CP 表达产物及纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Analysis of recombinant plasmid pET-G3 CP by restriction with *EcoR* I and *Sal* I

2.3 抗血清的制备及其效价测定

将回收纯化后的蛋白免疫家兔获得 GLRaV-3 CP 抗血清, 然后以纯化的原核表达蛋白为抗原进行 ACP-ELISA 分析抗血清效价。结果表明: 制备的抗血清在稀释 1/2¹⁴ 时, I/H 的比值为 3.7, 仍呈阳性反应(表 1)。

表 1 GLRaV-3 CP 抗血清效价测定

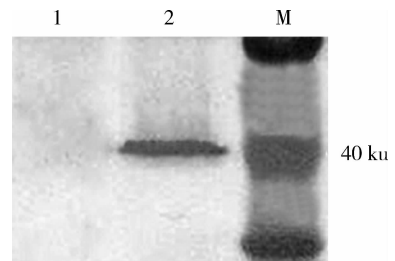
项目	抗血清稀释倍数										正常血清	阴性对照
	1/2 ⁶	1/2 ⁷	1/2 ⁸	1/2 ⁹	1/2 ¹⁰	1/2 ¹¹	1/2 ¹²	1/2 ¹³	1/2 ¹⁴	1/2 ¹⁵		
抗原	1.207	1.145	0.964	0.763	0.640	0.471	0.323	0.243	0.212	0.167	0.110	0.073
I/H 值	30.4	28.7	23.8	18.5	15.2	10.7	6.7	4.6	3.7	—		

2.4 抗血清特异性分析

Western blot 检测抗血清异性, 结果显示, 表达的重组蛋白能特异地与制备的抗血清发生反应而形成杂交带, 而阴性对照则无条带(图 3)。条带位置也在在 40 ku 左右, 大于 CP 蛋白本身的分子质量, 原因也是由于载体的组氨酸标签所致。

2.5 抗血清的应用效果分析

在前期工作中, 构建了基于 CP 基因的遗传进化树, 发现 GLRaV-3 中国分离物分属于 4 个进化支(结果正在整理发表)。选取已知分别感染了



M 为蛋白分子量标准; 1 为空载体 pET-28a 诱导菌液总蛋白; 2 为 pET-G3CP 纯化产物。

图 3 GLRaV-3 CP 抗血清 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of GLRaV-3 CP antiserum

GLRaV-3 不同分离物的 20 个葡萄植株样品,其中包括感染 GLRaV-3-LN 的葡萄品种“金星无核”。以这些分离物的 CP 基因全序列构建的遗传进化树(将 Dawanhong 和 CL-766 分离物 CP 基因及在其他文献^[3-4]中共用的一些分离物 CP 基因作为参考序列)(图 4)可以看到,这 20 个分离物可分成 4 组(图 4)。根据文献^[4]对 GLRaV-3 分离物分组的定义,3~15 号样品中的 GLRaV-3 分离物与 Dawanhong、CL-766 分在第 1 组,16~18 号样品的分离物与葡萄牙分离物 Touriga Nacional-2(HQ401019)和南非分离物 GP18(EU259806)分在第 2 组,19~20 号样品的分离物与南非分离物 PL-20(GQ352633)分在第 3 组,21、21 号样品分离物与葡萄牙分离物 Terrantez da Terceira(HQ401015)分在第 4 组。

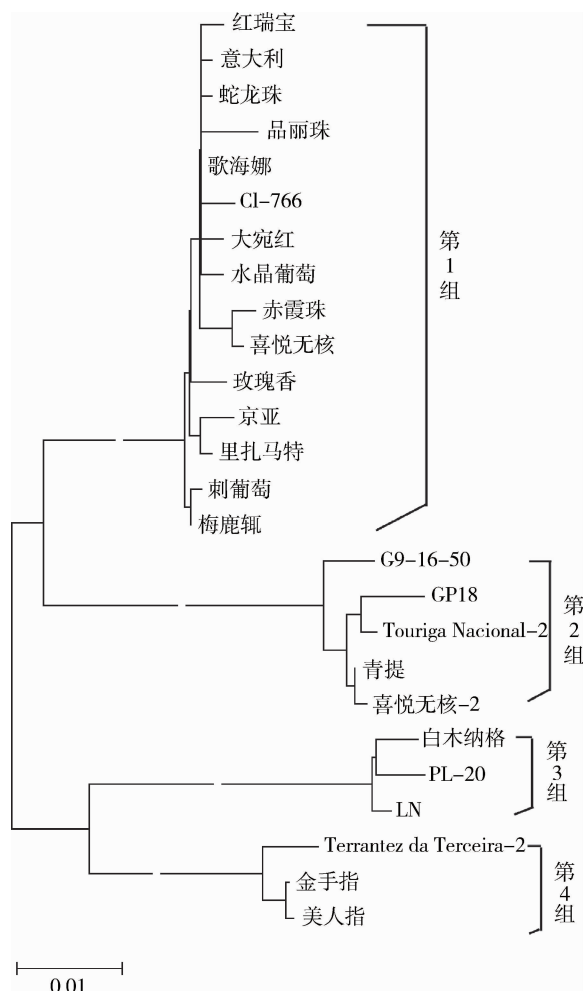


图 4 20 个 GLRaV-3 分离物 CP 基因的遗传分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of GLRaV-3 CP nucleotide sequences from 20 different isolates

为了分析制备的抗血清是否适用于检测不同的 GLRaV-3 分离物,我们对这 20 个葡萄样品进行 ACP-ELISA 检测,结果表明,这 20 份样品均呈阳性反应,与我们原来的分子检测(RT-PCR)结果一致,而阴性对照则不呈阳性反应。表明该抗血清能应用于田间样品的 GLRaV-3 不同分离物的检测(表 2)。

表 2 ACP-FLISA 检测 GLRaV-3 不同分离物

样品号	样品名	OD ₄₀₅
1	脱毒组培苗	0.144
2	纯化的重组蛋白	1.758
3	里扎马特	0.541
4	品丽珠	0.460
5	梅鹿辄	0.639
6	歌海娜	0.639
7	京亚	0.456
8	赤霞珠	0.336
9	红瑞宝	0.558
10	意大利	0.458
11	刺葡萄	0.666
12	水晶葡萄	0.387
13	喜悦无核	0.416
14	玫瑰香	0.492
15	蛇龙珠	0.372
16	喜悦无核 2	0.540
17	青提	0.544
18	G9-16-50	0.540
19	白木纳格	0.428
20	金星无核(LN)	0.609
21	美人指	0.404
22	金手指	0.522

注:3~15、16~18、19~20、21~22 号样品中的 GLRaV-3 分离物分别属于第 1、2、3 和 4 进化支。

3 讨论

GLRaVs 可通过同翅目昆虫粉蚧(mealybug)和介壳虫(soft scale)传播^[10-11],最近有报导 GLRaV-7 还可通过菟丝子(*Cuscuta campestris*)传播^[11],但这些传播方式可能对 GLD 的流行影响不

大。GLRaVs 主要通过带毒苗木、无性繁殖材料的调运和与带毒砧木嫁接进行传播。在我国,由于缺乏有效监控的葡萄苗木调运和交换,导致 GLD 发生十分普遍。目前无有效药剂防治植物病毒病,采用无病毒苗木是控制葡萄病毒传播的有效措施。而这项措施的实现,需要制备大量高效、特异性抗血清用于日常批量苗木的病毒检测。

不同的 GLRaV-3 分离物其 CP 基因序列存在着较大差异^[3-4],这可能会导致抗血清在实际使用时灵敏度降低而呈假阴性。ACP-ELISA 检测结果显示,本研究制备的抗血清对分属于 4 个不同进化支的 GLRaV-3 不同分离物均呈阳性反应,表明该抗血清可大量应用于葡萄生产中,尤其是在葡萄苗木进出口检疫、种苗调运检疫,以及脱毒苗生产,以达到控制病毒传播危害的目的。

参 考 文 献

- [1] Martin R R, Eastwell K C, Wagner A, et al. Survey for viruses of Grapevine in Oregon and Washington[J]. *Plant Disease*, 2005, 89: 763-766
- [2] Ling K S, Zhu H Y, Gonsalves D. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Grapevine leafroll-associated virus 3*, type member of the genus *Ampelovirus*[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85: 2099-2102
- [3] Gouveia P, Santos M T, Eiras-Dias J E, et al. Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of grapevine leafroll-associated virus 3 obtained from Portuguese grapevine varieties [J]. *Arch Virol*, 2010, 156: 413-420
- [4] Jooste A E, Maree H J, Bellstedt D U, et al. Three genetic grapevine leafroll-associated virus 3 variants identified from South African vineyards show high variability in their 5'UTR [J]. *Arch Virol*, 2010, 155: 1997-2006
- [5] Engel E A, Girardi C, Escobar P F, et al. Genome analysis and detection of a Chilean isolate of *Grapevine leafroll associated virus-3*. *Virus Genes*, 2008, 37: 110-118
- [6] 徐章逸, 王国平, 刘亚萍, 等. 葡萄卷叶伴随病毒 23 外壳蛋白的原核表达及其特异性抗血清的制备. *植物病理学报*, 2010, 40 (2): 129-134
- [7] 王萌, 费菲, 周涛, 等. 葡萄卷叶伴随病毒 2 号和 3 号辽宁分离物部分基因组的序列分析. *植物病理学报*, 2009, 39(5): 449-457
- [8] 田波, 裴美云. *植物病毒研究方法(上)*. 北京: 科学出版社, 1987
- [9] 唐威华, 张景六, 王宗阳, 等. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因. *植物生理学报*, 2000, 26(1): 64-68
- [10] Cabaleiro C, Segura A. Field transmission of *Grapevine leafroll associated virus 3* (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant Disease*, 1997, 81: 283-287
- [11] Cid M, Pereira S, Cabaleiro C, et al. Presence of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in primary salivary glands of the mealybug vector *Planococcus citri* suggests a circulative transmission mechanism. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 118: 23-30
- [12] Mikona C and Jelkmann W Replication of Grapevine leafroll-associated virus-7 (GLRaV-7) by *Cuscuta* Species and its transmission to herbaceous plants. *Plant Disease*, 2010, 94: 471-476

责任编辑: 王燕华