

棉铃虫核型多角体病毒 *orf86* 基因的原核表达、 抗体制备与免疫印迹检测

李坚 刘强 王玉芹 项林平 王敦*

(植保资源与病虫害治理教育部重点实验室 西北农林科技大学 陕西 杨凌 712100)

摘要: 棉铃虫核型多角体病毒(*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HearNPV) *orf86* 是一个功能未知的基因。从 HearNPV 基因组中通过 PCR 得到 *orf86* 基因编码序列, 将其构建于原核表达载体 pGEX-4T-2, 转化大肠杆菌 BL21 获得融合表达产物。融合表达蛋白经分离纯化后免疫新西兰大白兔, 制备其多克隆抗体。用 ELISA 测定结果表明, ORF86 多克隆抗体效价为 $1 : 5.12 \times 10^5$ 。利用该抗体 Western 印迹检测 HearNPV 感染的 HZAM1 细胞, 检测到一个 36 kD 的目的蛋白条带, 与 ORF86 预期大小一致。结果表明该多抗可用于对 *orf86* 编码蛋白的检测和相关功能研究。

关键词: 棉铃虫核型多角体病毒(HearNPV), *orf86* 基因, 原核表达, 多克隆抗体

Prokaryotic Expression, Preparation of Polyclonal Antibody and Immunodetection of HearNPV *orf86*

LI Jian LIU Qiang WANG Yu-Qin XIANG Lin-Ping WANG Dun*

(Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management (Northwest A&F University), Ministry of Education, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: HearNPV *orf86* is a function unknown gene of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV). The coding region of *orf86* was amplified from the HearNPV genome by PCR and then was inserted to the prokaryotic expression vector pGEX-4T-2. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 to express the GST fusion protein in the bacteria. The purified fusion protein was injected into New Zealand rabbits to prepare polyclonal antibody. The titer of the anti-HearNPV ORF86 polyclonal antibodies reached to $1 : 5.12 \times 10^5$ determined by ELISA. A 36 kD protein was identified by Western blot on HZAM1 cells infected by HearNPV using the prepared polyclonal antibody, which the protein size was consistent with the predicted protein size encoded by *orf86*. The results indicated that the polyclonal antibodies against ORF86 was successful prepared and it would facilitate the detection and related study on ORF86.

Keywords: *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV), ORF86, Prokaryotic expression, Polyclonal antibody

棉铃虫核型多角体病毒(*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HearNPV)是杆状病毒科单粒型核型多角体病毒属的成员,对重要的农业害虫棉铃虫 *H. elicoverpa armigera* 具有特异高效的防治效果,作为生物农药已得到规模化生产和利用。HearNPV 有两个分离株 G4 和 C1,已分别完成了全基因组序列的测定和基因组物理图谱的绘制^[1-2]。目前,人们已对 HearNPV 一些基因的功能有所认识,如 *lef-2* 基因^[3]、*P10* 基因^[4]、*chitinase* 基因^[5]、*orf29*^[6]、*orf33*^[7-8]、*orf44*^[9]、*orf83*^[10]、*orf100*^[9]和 *orf107*^[11]。然而 HearNPV 的很多基因功能仍不清楚,有待进一步研究,其中 HearNPV *orf86* 基因截至目前是一个功能未知的基因,也没有研究报道。本研究克隆和表达了 HearNPV *orf86* 基因,并利用纯化的蛋白免疫家兔,制备了多克隆抗体,为进一步研究该基因的功能提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料: 棉铃虫核型多角体病毒(HearNPV)、棉铃虫 HZAM1 细胞系、大肠杆菌 TG1 和 BL21, 表达载体 pGEX-4T-2, 均由西北农林科技大学植保资源与利用教育部重点实验室保存。

1.1.2 试剂: 克隆载体 pGEM-T Easy Vector、T4 DNA 连接酶及相应 Buffer, 购自 Promega 公司。限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker、蛋白质分子量标准为 TaKaRa 公司产品; IPTG、X-gal 为沃尔森产品; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司; 以辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 购自先锋公司; DNA 回收试剂盒为北京天根生物公司产品。

1.1.3 实验动物: 雄性新西兰大白兔(体质量 2.5-3.0 kg), 由西安交通大学动物实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成: 参照 HearNPV 基因组全序列(GenBank accession No. AF271059)中 *orf86* 基因全长序列, 运用 Oligo 6.0 软件, 设计一对引物, 上下游引物分别引入 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点(下划线部分), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

e86F: 5'-AGGATCCATGCATTGCTTGTGGGTC-3';
e86R: 5'-ACTCGAGCTAGAAAAAACATT-3'。

1.2.2 PCR 扩增: 以 HearNPV 为模板, 以 e86F、e86R 为引物扩增 *orf86*。PCR 反应体系为 25 μ L: 10 \times buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ 2 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, 模板 0.3 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μ L, 灭菌双蒸馏水 16.9 μ L。PCR 扩增按如下条件进行: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物的纯化按 DNA 回收试剂盒说明书进行。

1.2.3 原核表达载体的构建: 将回收的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 克隆载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 TG1; 经序列测定后, 以 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 并将阳性单克隆菌液送上海生工公司测序。以 *Bam*H I 和 *Xho* I 对重组质粒 pGEM-T Easy-ORF86 和表达载体 pGEX-4T-2 同时进行双酶切, 回收并纯化目的片段 *orf86* 和载体片段 pGEX-4T-2, 将目的片段 *orf86* 连接到 pGEX-4T-2, 转化大肠杆菌 BL21, 得到重组表达载体 pGEX-4T2-ORF86, 双酶切鉴定连接正确。

1.2.4 融合蛋白的诱导表达及纯化: 挑取含 pGEX-4T2-ORF86 的单克隆, 37 $^{\circ}$ C 于含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中过夜培养后, 以 1 : 100 转接, 37 $^{\circ}$ C 振荡至 OD₆₀₀ = 0.5。加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导培养 8 h。收集诱导菌体, 用 Glutathione-Sepharose 4B 小颗粒纯化 GST 融合蛋白, 按 GE 公司提供的方法进行: 表达菌经过离心富集, 重新悬浮于 PBS (pH 7.3)。冻融法裂解菌体后离心, 吸取上清用 0.45 μ m 的滤膜过滤, 然后与预处理过的 GST4B 颗粒充分混匀并室温孵育 30 min。500 \times g 离心 5 min, 去除上清, 用 5 倍体积的 Binding buffer 悬浮洗涤 GST4B 沉淀, 500 \times g 离心 5 min, 收集沉淀, 重复 3 次。最后收集的 GST4B 沉淀用 0.5 倍体积的 Elution buffer 悬浮、混匀, 室温孵育 10 min, 离心收集上清液, 重复洗脱步骤 3 次, 合并洗脱液即为纯化的蛋白溶液。纯化的蛋白溶液经过透析除去多余盐分, -80 $^{\circ}$ C 冷冻干燥后, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存用于抗体制备。

1.2.5 ORF86 多克隆抗体的制备: 将纯化后的融合蛋白 GST-ORF86 与弗氏完全佐剂按体积比 1 : 1 混匀后, 皮下多点注射新西兰大白兔。初次免疫后, 每隔 10 d 使用弗氏不完全佐剂与融合蛋白 1 : 1 混匀后注射加强免疫 1 次, 共 3 次。末次免疫后 1 周采血,

分离血清, -70°C 保存。

1.2.6 ORF86 抗血清效价检测: 以纯化的 GST-ORF86 融合蛋白(100 g/孔)包被酶联板, 分别以不同稀释倍数的免疫前兔血清(阴性对照)和免疫后兔血清作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1 : 1000 稀释)为二抗, 用 ELISA 法测定多克隆抗体的效价^[12]。

1.2.7 ORF86 多克隆抗体的 Western 鉴定: 用 Western 印记的方法鉴定 ORF86 多抗血清。用 HearNPV 感染 HZAM1 细胞, 24 h 后收集细胞并抽提总蛋白。每泳道上样 30 μg 细胞总蛋白, 经 10% SDS-PAGE 电泳后, 裁取适当凝胶, 用 Bio-Rad 半干转印仪 15 V、30 min 转移到预先处理过的 PVDF 膜上。转移后的 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭后, 以兔抗 ORF86 抗血清(1 : 500 稀释)为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1 : 1000 稀释)为二抗进行反应, 用 DAB 进行发色显迹。

2 结果

2.1 HearNPV ORF86 基因的克隆和重组质粒 pGEX-4T2-ORF86 的构建

以 HearNPV 为模板, 经 PCR 扩增得到约 1.0 kb 的条带(图 1, 泳道 1), 与目的片段长度相近。PCR 产物经回收后与 pGEM-T Easy 连接, 转化大肠杆菌 TG1, *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切鉴定(图 1, 泳道 2); 回收并纯化 *orf86* 基因片段, 再插入用相同酶消化的原核表达载体 pGEX-4T-2, 转化大肠杆菌 TG1, *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切鉴定得到与预期大小一致的 DNA 片段(图 1, 泳道 3), 表明表达载体构建成功。

2.2 HearNPV ORF86 基因在大肠杆菌中的表达

将鉴定含有重组表达质粒 pGEX-4T2-ORF86 的大肠杆菌 BL21, 用 IPTG 1 mmol/L、 37°C 诱导培养 8 h, 离心收集菌体, 制备蛋白样品。经 SDS-PAGE 电泳结果显示, 与阴性对照 BL21 相比, 转化 pGEX-4T2-ORF86 的 BL21 表达了大小约为 62 kD 的特异性蛋白质条带(图 2, 泳道 2)。pGEX-4T-2 载体携带谷胱甘肽 S 转移酶(GST)标签, 该标签大小为 26 kD, 因此预期融合表达产物为 62 kD 左右。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果与预计表达的蛋白分子量一致。

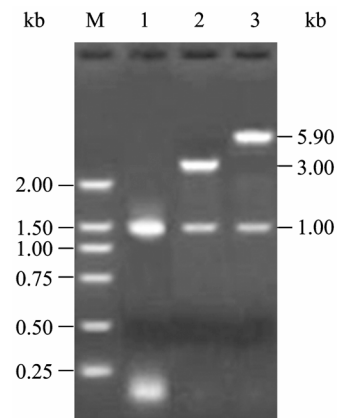


图 1 PCR 产物及重组质粒 pGEM-T Easy-ORF86、pGEX-4T2-ORF86 的酶切鉴定
Fig. 1 PCR product of *orf86*, digestion analysis of the recombinant plasmid pGEM-T Easy-ORF86 and pGEX-4T2-ORF86

注: M: DNA 分子量标样; 1: PCR 产物; 2: *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pGEM-T Easy-ORF86; 3: *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pGEX-4T2-ORF86。
Note: M: DNA marker; 1: PCR product of ORF86; 2: Digestion of pGEM-T Easy-ORF86 by *Bam*H I and *Xho* I; 3: Digestion of pGEX-4T2-ORF86 by *Bam*H I and *Xho* I.

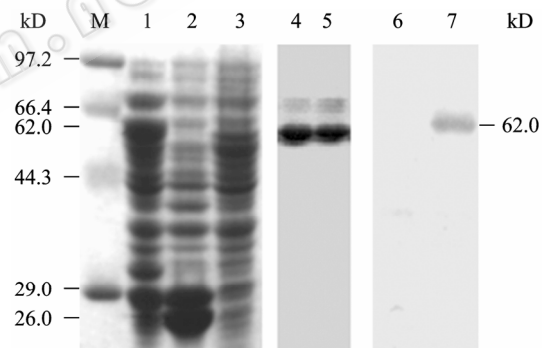


图 2 pGEX-4T2-ORF86 在大肠杆菌 BL21 中的表达
Fig. 2 Bacterial expression of pGEX-4T2-ORF86 in *E. coli* BL21

注: M: 蛋白分子量标准; 1: pGEX-4T2-ORF86(+); 2: pGEX-4T2(+); 3: BL21(-); 4-5: 纯化后的 ORF86-GST 蛋白; 6: BL21(-)的 Western blot 分析; 7: pGEX-4T2-ORF86(+), 的 Western blot 分析。

Note: M: Protein marker; 1: pGEX-4T2-ORF86 in BL21 with IPTG induction; 2: pGEX-4T-2 in BL21 with IPTG induction; 3: BL21(-); 4-5: Purified ORF86-GST fusion protein; 6: Western blot for BL21(-); 7: Western blot for pGEX-4T2-ORF86(+).

2.3 抗血清的效价检测

将重组蛋白 GST-ORF86 作为抗原, 用间接 ELISA 法测定多抗效价。多克隆抗体第一次稀释 1000 倍, 以后采用倍比稀释法, 当稀释到 5.12×10^5 倍时, 待检血清的 OD 值明显大于阴性对照 OD 值的 2 倍, 而且阴性对照无明显的梯度。表明 GST-ORF86

蛋白对兔抗 ORF86 的多克隆抗体具有很好的免疫原性, 抗体效价为 $1:5.12 \times 10^5$ 。

2.4 ORF86 多克隆抗体特异性的 Western blot 检测

用 HearNPV 感染发病的棉铃虫细胞 HZAM1 总蛋白为材料, 用 ORF86 多克隆抗体进行 Western blot, 以未感染病毒 HZAM1 总蛋白为对照, 检测病毒表达的 ORF86 蛋白。结果显示, 在病毒感染的细胞蛋白可以检测到 ORF86 的表达, 蛋白大小为 36 kD, 与预期 ORF86 编码蛋白大小一致(图 3)。另外还出现了一条大小在 66 kD 的非特异性条带, 对应的未感染细胞也同时出现, 说明该条带并非病毒基因编码产物, 分析原因是因为多克隆抗体达不到单抗的专一性水平所致。

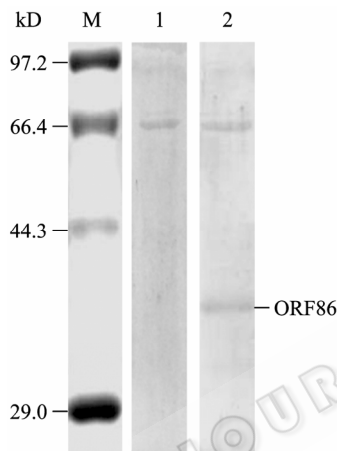


图3 HZAM1 细胞中表达的 ORF86 蛋白的 Western blot 检测

Fig. 3 Western blot analysis of ORF86 expression in HZAM1 cells

注: M: 蛋白分子量标准; 1: HZAM1 细胞总蛋白; 2: 感染 HearNPV 的 HZAM1 细胞总蛋白。

Note: M: Marker; 1: Lysate of HZAM1 cells; 2: Lysate of HZAM1 cells infected with HearNPV.

3 讨论

制备高效价的抗体是研究基因表达和功能的重要条件, 本研究对 HearNPV ORF86 基因进行了原核表达, 并制备了 ORF86 的抗血清, 抗体效价为 5.12×10^5 。Western blot 检测显示, 应用制备的 ORF86 多克隆抗体检测感染病毒细胞的总蛋白, 能够检测到与预期大小一致的蛋白条带, 而对照未感染的细胞没有该条带, 说明该抗体效价和特异性满足后续研究需要。该多抗的制备为进一步深入研究 ORF86 在病毒侵染过程中与宿主因子的相互作用奠

定了基础, 同时, 也为深入研究病毒基因组中其他功能基因的研究提供基础材料。

参考文献

- [1] Chen XW, Ijkel WF, Tarchini R, *et al.* The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*, 2001(82): 241-257.
- [2] Zhang CX, Ma XC, Guo ZJ. Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 2005(333): 190-199.
- [3] Chen XW, Ijkel WF, Dominy C, *et al.* Identification, sequence analysis and phylogeny of the lef-2 gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid baculovirus. *Virus Research*, 1999(65): 21-32.
- [4] Dong CS, Li D, Long G, *et al.* Identification of functional domains required for HearNPV P10 filament formation. *Virology*, 2005(338): 112-120.
- [5] Wang HL, Wu D, Deng F, *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Research*, 2004(100): 179-189.
- [6] Guo ZJ, An SH, Wang D, *et al.* Characterization of Ha29, a specific gene for *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, **38**(3): 354-359.
- [7] Wang D, An SH, Guo ZJ, *et al.* Characterization of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus *orf33* that encodes a novel budded virion derived protein, BV-e31. *Archives of Virology*, 2005(150): 1505-1515.
- [8] 王敦, 严兴成, Shyam Kumar, 等. Bacterial expression and cellular localization in infected host cells of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus *orf33*. *微生物学报*, 2006, **46**(1): 60-62.
- [9] Deng F, Wang RR, Fang MG, *et al.* Proteomics analysis of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus identified two new occlusion-derived virus-associated proteins, HA44 and HA100. *Journal of Virology*, 2007, **81**(17): 9377-9385.
- [10] Wang D, Zhang CX. HearSNPV *orf83* encodes a late, nonstructural protein with an active chitin-binding domain. *Virus Research*, 2006(117): 237-243.
- [11] Pan XY, Long G, Wang RR, *et al.* Deletion of a *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus gene encoding a virion structural protein (ORF107) increases the budded virion titre and reduces *in vivo* infectivity. *Journal of General Virology*, 2007(88): 3307-3316.
- [12] 王敦. 棉铃虫核型多角体病毒(HearSNPV)ORF33、ORF80、ORF81 和 ORF83 基因分析. 浙江大学博士学位论文, 2005.