

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2014.10.013

家蚕核型多角体病毒 IE1 的多克隆抗体制备及鉴定^①

董战旗¹, 张 军¹, 胡 楠¹,
鲁 成^{1,2}, 潘敏慧^{1,2}

1. 家蚕基因组生物学国家重点实验室; 2. 农业部家蚕功能基因组和生物学重点实验室, 西南大学, 重庆 400716

摘要: 家蚕核型多角体病毒(BmNPV)*iel* 基因是 BmNPV DNA 复制的必需基因, 其编码的 IE1 蛋白能够反式转录激活杆状病毒早期基因的表达. 为了进一步研究 IE1 蛋白在家蚕核型多角体病毒感染宿主过程中具体的功能, 研究通过 PCR 扩增 BmNPV *iel* 基因片段, 亚克隆到原核表达载体 pET32, 获得重组质粒 pET32-IE1, 经测序正确后, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)表达菌株. 通过 IPTG 诱导融合蛋白原核表达后, 初步纯化收集抗原, 免疫新西兰大白兔, 制备 IE1 多克隆抗体. 应用制备的免疫兔血清进行 Western-blot 分析, 结果显示多克隆抗体能特异识别 BmNPV 的 IE1 和 IE0 蛋白. 免疫荧光结果同样显示 IE1 蛋白定位于宿主细胞核病毒复制中心. IE1 抗体制备的成功为进一步研究 IE1 在病毒感染家蚕中的作用机理奠定了基础.

关键词: 家蚕; 家蚕核型多角体病毒; IE1; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S851.34⁺7.31

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)10-0076-06

家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV)是家蚕(*Bombyx mori*)养殖过程中危害最为严重的病原微生物之一, 每年都给我蚕业发展带来巨大的经济损失^[1]. 1999 年, 随着 Gomi 等人对 BmNPV T3 株全基因组序列的报道, BmNPV 的分子生物学研究在过去二十年得到了较快的发展^[2]. 越来越多的 BmNPV 基因功能的发现, 为家蚕疾病的防治与应用提供了理论基础.

涉及 BmNPV DNA 复制的基因最初是在苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)中通过温度敏感突变体和瞬时复制检测到的^[3]. 实验发现核型多角体病毒 DNA 复制必需有 6 个基因的参与, 这些基因包括 *dnapol*, 解旋酶(*p143*), *lef-1*(晚期表达因子 1), *lef-2*, *lef-3* 和 *iel*^[4]. *iel* 作为杆状病毒早期基因反式转录激活因子, 它可以结合到增强子序列(hr 序列)上. 最近研究表明 AcMNPV IE1 N 端 23 个残基特异性结合到 DNA 复制起点, 且这 23 个残基能够介导 DNA 复制活动和转录激活的磷酸化作用^[5]. Schultz, K. L. 等研究还发现转录激活因子 *iel* 基因能够触动细胞的凋亡反应^[6]. 尽管经过多年的研究已经鉴定了 IE1 的

① 收稿日期: 2013-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31272505, 31172269).

作者简介: 董战旗(1989-), 男, 山西临汾人, 硕士研究生, 主要从事病毒和宿主相互作用方面的研究.

通信作者: 潘敏慧, 教授, 博士生导师.

多种功能,但是随着分子生物学研究水平的发展,IE1 和宿主相互作用机理在蛋白水平上的调控仍需要进一步鉴定.因此,IE1 抗体的制备显得尤为重要^[6].

为了解决这一难题,本研究拟克隆 BmNPV 中 *ie1* 基因,利用原核表达系统,获得 IE1 蛋白,制备免源多克隆抗 IE1 抗体,并且鉴定 Anti-IE1 抗体在宿主细胞中的特异性,旨在为开展 BmNPV 的复制机理和致病机理研究奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

家蚕核型多角体病毒(BmNPV) T3 株, BmN-SWU1 细胞^[7], 原核表达载体 pET32, 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 和 BL21(DE3)均由本实验室保存, 新西兰大白兔购自重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司.

限制性内切酶、DNA Ligation Kit、DNA Marker 和 IPTG 购自日本 TAKARA 公司; PVDF 膜购自 Roche 公司; FITC 和 HRP 标记的山羊抗小兔 IgG 二抗、DAPI 购自碧云天公司; PCR 凝胶回收试剂盒购自 Promega; 超纯质粒提取试剂盒购自重庆鼎国; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 sigma; 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 原核表达质粒的构建

根据对 IE1 蛋白多肽特异性的预测选择 IE1 N 端 400 bp 左右的片段来构建原核表达载体. 以 BmNPV 基因组为模板, 引物 F: CGCGGATCCTGTGATAAACAACAGCCC; R: CCGGAATTCGTCCAAGTATTCGTCCAG(下划线部分为限制性内切酶)进行 PCR 反应. PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 52 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s. 循环扩增 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 结束扩增, 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析.

PCR 产物从琼脂糖凝胶上切胶回收, 经 *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切后过柱回收, 与同样双酶切的 pET32 载体连接, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞. 挑取抗氨苄霉素阳性克隆, 提取质粒并测序鉴定, 验证正确的 pET-32 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞.

1.3 原核表达和 SDS-PAGE

转化菌株 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 次日, 以 1 : 100 的体积比接种至 20 mL 含氨苄霉素(终浓度 100 μ g/mL)的新鲜 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A₆₀₀ 约为 0.6, 分别加 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L 和 1 mmol/L, 继续在 37 $^{\circ}$ C 下诱导表达 3 h, 各取 1 mL 菌液, 12 000 g 离心 5 min, 弃上清, 向沉淀中加入 80 μ L 1 倍的 PBS 和 20 μ L 上样缓冲液, 混匀, 沸水浴加热 10 min, 作为总蛋白样; 其余菌液在 4 $^{\circ}$ C, 12 000 g 离心 15 min, 去上清后冰上加 1 mL 1 倍 PBS 吹打悬浮后移至 1.5 mL 离心管, 冰水混合物上超声波破碎 5~10 min, 10 000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 吸出上清至另一离心管, 取 80 μ L 上清和 20 μ L 上样缓冲液沸水煮 10 min, 沉淀中加 80 μ L 1 倍的 PBS 和 20 μ L 上样缓冲液煮 10 min, 12% 分离胶电泳检测. 将鉴定好的表达 IE1 蛋白的阳性克隆扩大到 400 mL 进行培养.

1.4 多克隆抗体的制备

纯化后的 IE1 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合均匀, 颈部皮下注射给新西兰大白兔(50 μ g/只). 两周后注射弗氏不完全佐剂与蛋白的混合液, 以后每隔两周注射 1 次, 一共免疫 4 次后心脏采血, 收集的血清即为多克隆抗体. 用 ELISA 方法测定其效价.

1.5 Western-blot 分析

取 BmNPV 感染的 BmN-SWU1 细胞中提取的蛋白质样品经裂解后, 加 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,

煮沸 5 min 后离心 5 min, 取上清液进行电泳(分离胶浓度为 12%). 电泳结束后将胶上蛋白质电转移至 PVDF 膜上, 将 PVDF 膜置于封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 TBST)中室温封闭 1 h, 以 1:2 000 稀释比例加入制备的多克隆抗体, 室温孵育 1 h, 用 TBST 洗膜 6 次, 每次 5 min. 以 1:20 000 的比例加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 室温孵育 1 h, 用 TBST 洗膜 6 次, 每次 5 min, 加 ECL 显色^[8].

1.6 免疫荧光分析

将无菌爬片置于 24 孔培养板, 然后按每孔 1×10^5 接种细胞, 28 °C 培养, 然后按特定时间加入病毒. 用 PBS(PH 7.4)洗涤 2 次, 每次 5 min. 预冷的 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min. 0.1% Triton X-100 室温通透 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min. 加封闭缓冲液 37 °C 孵育 1 h, 加入 Anti-IE1(稀释比例 1:200)37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 6 次, 每次 5 min. 按 1:500 加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG, 孵育 37 °C 1 h 后每孔加入 100 μ L DAPI 室温 15 min. 最后取出爬片后固定于载玻片上在共聚焦显微镜下观察.

2 结 果

2.1 *ie1* 基因的克隆及原核表达载体构建

从 BmN-SWU1 细胞中提取 BmNPV 基因组, 用 PCR 扩增出一条特异的 400 bp 左右的 DNA 片段, 其大小与预期的相符. PCR 产物酶切后连接到 pET32 载体上, 获得重组质粒 pET32-IE1, 提取质粒双酶切分析所切片段为 400 bp(图 1). 序列测定结果显示所连接片段核苷酸序列与 *ie1* 基因相同, 表明 *ie1* 原核表达载体构建成功.

2.2 重组蛋白原核表达和 SDS-PAGE 电泳

原核表达载体 pET32-IE1 导入大肠杆菌 BL21(DE3)中, 挑取单克隆于 LB 液体培养基中培养, 并用 0.2 mmol/L 和 1 mmol/L IPTG 分别诱导表达后, 进行 SDS-PAGE 分析, 与未诱导对照组对比, 结果显示含重组质粒的菌液在 44 kDa 处左右处出现一条较高浓度的特异诱导表达条带(pET32 融合标签大概 18 kDa, IE1 大概 13 kDa, 因为 IE1 N 端是以二聚体的形式存在, 所以融合蛋白分子大小为 44 kDa). 实验结果与预期的 IE1 融合蛋白分子量相当, 表明 BmNPV *ie1* 基因已经在大肠杆菌 BL21(DE3)中融合表达(图 2).

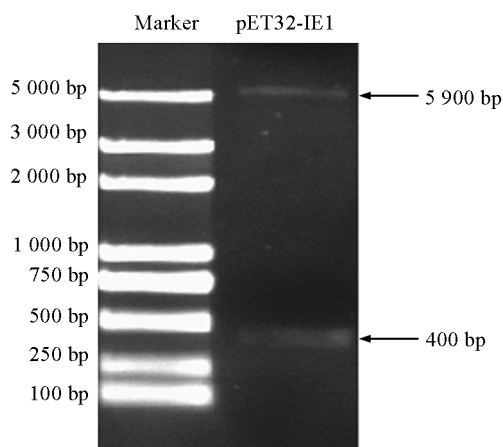


图 1 重组质粒 pET32-IE1 酶切图谱

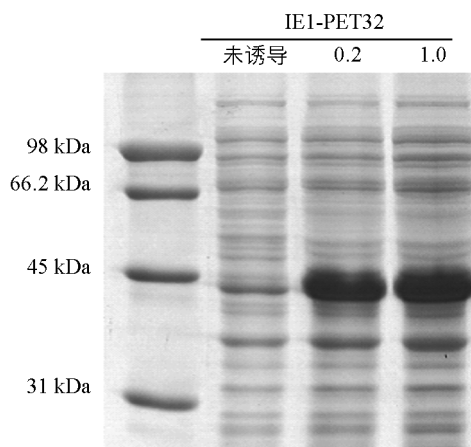


图 2 SDS-PAGE 检测 pET32-IE1 融合蛋白表达

2.3 Western blot 分析

使用镍柱进行亲和纯化, 纯化后原核表达 IE1 蛋白免疫 4 次新西兰大白兔后, 采血并进行效价检

测,经硫酸铜法检测,抗 IE1 效价达到三万四.为了验证制备抗体的特异性,我们采用 Western blot 对 BmNPV 感染后的 BmN-SWU1 细胞蛋白进行检测,结果显示 IE1 抗体能够特异性识别两条蛋白大小相近的条带,与预期的结果相同(IE1 蛋白和另一个早期表达蛋白 IE0,如图 3).我们分析可能是因为 IE0 是 IE1 的一部分,它从一个较大的已剪切的 mRNA 翻译得来,这对我们后续的实验结果并没有影响^[9].说明多克隆抗体 Anti-IE1 可以特异的识别 IE1 蛋白.

2.4 免疫荧光分析

为了验证 Anti-IE1 能否在细胞中特异的对 IE1 蛋白进行核定位研究,我们对 BmNPV 感染后的 BmN-SWU1 细胞进行 IE1 核定位分析,结果表明 IE1 抗体能够特异的识别 IE1 蛋白,并定位于 BmN-SWU1 细胞核内(图 4).以上结果充分说明 IE1 抗体可以用于以后的免疫荧光分析.

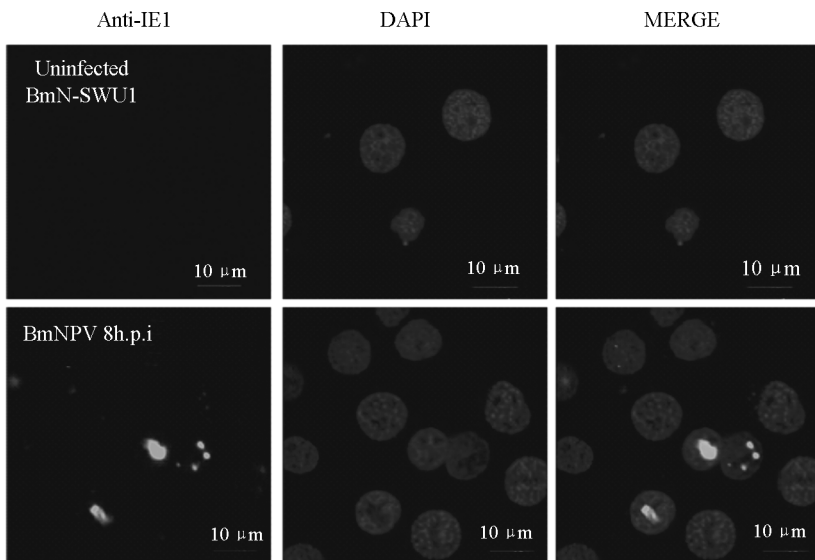
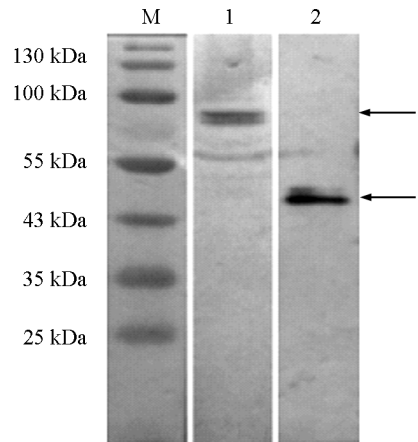


图 4 共聚焦显微镜分析 BmNPV 感染 BmN-SWU1 后, Anti-IE1 检测 IE1 蛋白在细胞中的定位



M: 泳道为蛋白分子 Marker;

1: 泳道为内源性蛋白检测; 2: 泳道为融合蛋白检测.

图 3 Western Blot 分析多克隆抗体 Anti-IE2 的特异性

3 讨论

ie1 基因是杆状病毒 ORF 中最早发现功能的基因之一,随着分子生物学技术的发展,对 IE1 的功能解析越来越透彻,发现 IE1 涉及到从转录激活 DNA 复制, DNA 损伤, 细胞凋亡等一系列调控^[10-12].这就标志着 IE1 在宿主细胞调控方面有着很重要的作用,因此在今后对杆状病毒调控宿主功能的解析将会是未来研究的方向, IE1 抗体将会在一系列的基础研究中起着关键的作用,鉴于目前市场上还没有发现有杆状病毒 IE1 的抗体制备,我们尝试制备 IE1 多克隆抗体.

本研究通过对 *ie1* 的原核表达制备出 Anti-IE1 抗体,在原核表达的过程中我们还发现 IE1 N 端以二聚体的形式存,在这也正好印证了以前的研究结果^[5].同时对 Anti-IE1 抗体在蛋白水平进行了检测,我们发现 Anti-IE1 能够检测到两条特异的条带,分别是 IE0 和 IE1,并且亚细胞定位分析发现 IE1 定位于细胞核

内 BmNPV DNA 复制中心, 这一结果从侧面证实 IE0 是 IE1 的一部分^[13]. 因为 IE1 功能的特殊性, 其能在转录水平和翻译水平充当病毒极早期基因检测的标志, 为以后的研究工作提供了很大的帮助^[14]. 并且 IE1 蛋白只定位于细胞核内的病毒 DNA 复制中心, 也能为将来研究病毒基因的细胞定位以及研究 BmNPV 复制机制提供帮助^[15].

最近研究表明 IE1 参与细胞凋亡反应, 由于凋亡反应涉及很多蛋白通路的调控, 若没有特异性的抗体对病毒宿主相互作用的研究将无法进行下去^[16-17]. 因此制备特异性的 IE1 抗体不但能够帮助我们更进一步制备 IE1 单克隆抗体提供借鉴, 而且将会为 IE1 功能解析以及抗病毒的研究提供很重要的帮助.

参考文献:

- [1] JIANG L, XIA Q. The Progress and Future of Enhancing Antiviral Capacity by Transgenic Technology in the Silkworm *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 48: 1-7.
- [2] GOMI S, MAJIMA K, MAEDA S, et al. Sequence Analysis of the Genome of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(Pt 5): 1323-1337.
- [3] PEARSON M, BJORNSON R, PEARSON G, et al. The *Autographa Californica* Baculovirus Genome: Evidence for Multiple Replication Origins [J]. *Science*, 1992, 257(5075): 1382-1384.
- [4] OKANO K, VANARS DALL A L, MIKHAILOV V S, et al. Conserved Molecular Systems of the Baculoviridae [J]. *Virology*, 2006, 344(1): 77-87.
- [5] TAGGART D J, MITCHELL J K, FRIESEN P D, et al. A Conserved N-terminal Domain Mediates Required DNA Replication Activities and Phosphorylation of The Transcriptional Activator IE1 of *Autographa Californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus [J]. *J Virol*, 2012, 86(12): 6575-6585.
- [6] SCHULTZ K L, WETTER J A, FIORE D C, et al. Transactivator IE1 is Required for Baculovirus Early Replication Events That Trigger Apoptosis in Permissive and Nonpermissive cells [J]. *J Virol*, 2009, 83(1): 262-272.
- [7] PAN M H, CAI X J, LIU M, et al. Establishment and Characterization of An Ovarian Cell Line of The Silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Tissue Cell*, 2010, 42(1): 42-46.
- [8] ZHANG J, HE Q, ZHANG C D, et al. Inhibition of BmNPV Replication in Silkworm Cells Using Inducible and Regulated Artificial MicroRNA Precursors Targeting the Essential Viral Gene *lef-11* [J]. *Antiviral Res*, 2014, 104C: 143-152.
- [9] CHISHOLM G E, HENNER D J. Multiple Early Transcripts and Splicing of the *Autographa Californica* Nucleopolyhedrovirus IE-1 Gene [J]. *J Virol*, 1988, 62(9): 3193-3200.
- [10] NAGAMINE T, SUZUKI T, DOHMAE N, et al. Co-Expression of Four Baculovirus Proteins, IE1, LEF3, P143, and PP31, Elicits a Cellular Chromatin-Containing Reticulate Structure in the Nuclei of Uninfected Cells [J]. *Virology*, 2011, 417(1): 188-195.
- [11] KAWASAKI Y, MATSUMOTO S, NAGAMINE T, et al. Analysis of Baculovirus IE1 in Living Cells: Dynamics and Spatial Relationships to Viral Structural Proteins [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 12): 3575-3583.
- [12] NAGAI S, ALVES CAF, KOBAYASHI M, et al. Comparative Transient Expression Assay Analysis of Hycu-hr6-and IE1-Dependent Regulation of Baculovirus gp64 Early Promoters in Three Insect Cell Lines [J]. *Virus Res*, 2011, 155(1): 83-90.
- [13] DAI X, WILLIS L G, HUIJSKENS I, et al. The Acidic Activation Domains of the Baculovirus Transactivators IE1 and IE0 are Functional for Transcriptional Activation in Both Insect and Mammalian Cells [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 3): 573-582.
- [14] KOVACS G R, GUARINO L A, SUMMERS M D, et al. Novel Regulatory Properties of the IE1 and IE0 Transactivators Encoded by the Baculovirus *Autographa Californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus [J]. *J Virol*, 1991, 65(10):

5281—5288.

- [15] PATHAKAMURI J A, THEILMANN D A. The Acidic Activation Domain of the Baculovirus Transactivator IE1 Contains a Virus-Specific Domain Essential for DNA Replication [J]. *J Virol*, 2002, 76(11): 5598—5604.
- [16] PRIKHODKO E A, MILLER L K. The Baculovirus PE38 Protein Augments Apoptosis Induced by Transactivator IE1 [J]. *J Virol*, 1999, 73(8): 6691—6699.
- [17] PRIKHODKO E A, MILLER L K. Induction of Apoptosis by Baculovirus Transactivator IE1 [J]. *J Virol*, 1996, 70(10): 7116—7124.

Preparation and Verification of Polyclonal Antibody of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* IE1

DONG Zhan-qi¹, ZHANG Jun¹, HU Nan¹,
LU Cheng^{1,2}, PAN Min-hui^{1,2}

1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Key Laboratory for Sericulture Functional Genomics and Biotechnology of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV). *ie1* gene is essential for viral DNA replication, and the IE1 protein encoded by it can transcriptionally transactivate the expression of the early genes of baculovirus. In order to further study the specific function of IE1 protein in the process of BmNPV infection, we amplified the BmNPV *ie1* gene fragment by PCR and subcloned it into the prokaryotic expression vector pET32, thus obtaining the recombinant plasmid pET32-IE1. After pET32-IE1 nucleotide was correctly sequenced, it was transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3). After the prokaryotic expression of fusion protein with IPTG induction, the antigen was preliminarily purified and was then used to immunize New Zealand white rabbits to prepare the polyclonal antibody. Western-blot analysis of the immune rabbit serum showed that the polyclonal antibody specifically identified the expression of IE0 and IE1 protein. Immunofluorescence results also showed that the IE1 protein was located at the viral replication center of the infected cell. The successful preparation of the IE1 antibody has laid a foundation for the further study of the mechanism of IE1 gene during viral infection of the host.

Key words: *Bombyx mori*; *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*; IE1; prokaryotic expression; polyclonal antibody

