



网络出版日期:2021-06-15

doi:10.7606/j.issn.1004-1389.2021.06.011

网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20210615.1328.008.html>

南芥菜花叶病毒衣壳蛋白的克隆、原核表达和多克隆抗体制备

苏学思^{1,2,3},张玉宝^{1,3},王亚军^{1,3},郭志鸿^{1,3},邱 阳^{1,3},唐国亮^{1,2,3}

(1. 中国科学院 西北生态环境资源研究院, 兰州 730000; 2. 中国科学院大学,

北京 100049; 3. 甘肃省生态与农业综合试验野外科学观测研究站, 兰州 730000)

摘要 为开发百合中南芥菜花叶病毒(*Arabis mosaic virus*, ArMV)的血清学检测技术及研究 ArMV 的致病机理, 原核表达 ArMV 衣壳蛋白(coat protein, CP), 纯化并制备其多克隆抗体。以侵染东方百合杂交品种‘木门’(‘Conca D’or’)的 ArMV 基因组为模板, 克隆 ArMV CP 基因全长, 构建 ArMV CP 基因原核表达载体, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 原核表达 ArMV CP 蛋白, 并以纯化 ArMV CP 蛋白为抗原制备兔抗多克隆抗体, Western blot 鉴定多克隆抗体的特异性。结果表明: 克隆获得百合 ArMV CP 序列(GenBank 登录号: MT323117)全长, 其长度为 1 515 bp, 与已知的 ArMV CP 基因核苷酸序列相似性最高达到 93.6%, 氨基酸序列相似性最高达到 98.2%; SDS-PAGE 表明 CP 蛋白在 *E. coli* BL21(DE3) 中大量表达, 蛋白相对分子质量为 56 ku; Western blot 结果显示抗体能够特异性结合 ArMV CP 蛋白, 具有良好的特异性。

关键词 百合; 南芥菜花叶病毒; 衣壳蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号 Q786

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2021)06-0894-07

南芥菜花叶病毒(*Arabis mosaic virus*, ArMV)属于伴生豇豆病毒科(Secoviridae)豇豆花叶病毒亚科(Comoviridae)线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)成员, 是危害花卉、果树、蔬菜等经济作物的主要病原, 是列入中国进境检疫名录的二类植物病毒^[1]。ArMV 病毒颗粒呈正二十面体结构, 基因组由两条正义单链 RNA 组成, 编码两个开放阅读框(Open reading frame, ORF)^[2]。ORF1 由 2 284 个氨基酸多肽组成, 编码一个多聚蛋白, 经蛋白酶剪切后共形成 6 个成熟的蛋白, 分别为 X1, X2, NTB, VPg, Pro, Pol^[3]。ORF2 包含有 1 083 个氨基酸多肽, 也编码一个多聚蛋白, 剪切后形成病毒的归巢蛋白(Homing protein, HP)、运动蛋白(Movement protein, MP)和衣壳蛋白(Coat protein, CP)^[4]。

ArMV 寄主广泛, 可以侵染约 174 属 215 种植物, 其中如烟草、草莓、葡萄、大豆、番茄等皆为中国广泛种植的重要经济作物^[5]。ArMV 所引起的病毒病症状主要表现为叶片花叶、斑驳、黄

化, 严重则表现为矮化、畸形、坏死等, 显著降低作物的产量和品质^[6]。百合(*Lilium*)是一种集观赏、食用和药用价值于一体的重要经济作物, 近年来被发现是 ArMV 的新寄主^[7-8]。百合感染 ArMV 后, 除叶片和植株表现出上述症状外, 种球部位还会出现坏死斑^[9]。即便寄主相同, 症状也会随着株系、栽培品种、季节以及年份不同而发生变化。

为了有效控制 ArMV 的危害, 并且制定出准确、高效的防治策略, 迫切需要开发出快速高效的病毒检测技术。血清学方法因为特异性强、灵敏度高、检测速度快、大样本检测等优点, 被作为田间最常用的病毒检测方法^[10]。然而提取病毒粒子为抗原的传统方法, 制备抗体存在着特异性差、效价低的问题^[11]。近年来, 运用分子生物学的方法, 构建基因原核表达载体, 诱导表达病毒蛋白, 以此为抗原制备抗体的技术已经发展成熟, 获得的抗体具备很高的特异性和效价, 被广泛应用于植物病毒的抗体制备。

收稿日期:2020-05-07 修回日期:2021-01-28

基金项目: 陇原青年创新创业人才(团队)项目(2020-339); 兰州市人才创新创业项目(2019-HLJC-9); 兰州市城关区科技计划(2019-6-2)。

第一作者: 苏学思, 男, 硕士研究生, 研究方向为植物病毒学。E-mail: suxuesi18@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 张玉宝, 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为植物病理学。E-mail: zyubao@lzb.ac.cn

病毒基因组分析表明,ArMV 无包膜蛋白(Envelope protein,ep),其 CP 蛋白在维持病毒生存及病毒侵染寄主的过程中发挥着关键性作用^[2]。目前,国内关于 ArMV CP 蛋白原核表达的研究,均是以部分 CP 基因为对象,在分析 CP 蛋白的结构和功能时存在不足^[12-13]。因此,选择克隆 ArMV CP 基因全长,诱导表达出具备完整结构和功能的 CP 蛋白,将为研究 ArMV 的致病机理奠定基础。

本研究从感染 ArMV 的百合中克隆 ArMV CP 基因全长,构建 ArMV CP 基因的原核表达载体,转化 *E. coli* BL21(DE3),经 IPTG 诱导表达,获得大量高纯度的 ArMV CP 蛋白,并以此为抗原制备高特异性的多克隆抗体,以期为 ArMV 的血清学检测技术开发和致病机理研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

带毒东方百合杂交品种‘木门’(‘Conca D’or’)叶片采自中国科学院西北生态环境资源研究院皋兰生态与农业综合试验站($36^{\circ}13'N, 103^{\circ}47'E$),经 RT-PCR 检测^[8,14],获得分别感染百合无症病毒(*Lily symptomless virus*, LSV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、百合斑驳病毒(*Lily mottle virus*, LMV)、车前草花叶病毒(*Plantago asiatica mosaic virus*, PlAMV)和 ArMV 的百合样品,−70 ℃保存。

植物总 RNA 提取试剂盒(RNAprep Pure Plant Kit)购自天根生化科技(北京)有限公司;植物蛋白提取试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司;质粒微量抽提试剂盒(E. Z. N. A.® Plasmid DNA Mini Kit I)购自 Omega 公司;逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit)、DNA 回收试剂盒(Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit)和克隆载体 pMDTM19-T 购自宝生物工程(大连)有限公司;Ni-NTA 预装重力柱(Ni-NTA Pre-Packed Gravity Column)和 NBT/BCIP 碱性磷酸酶显色试剂盒(蓝色)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;*E. coli* DH5α 和 *E. coli* BL21 (DE3)菌株以及表达载体 pET-28a(+)由甘肃省寒区旱区逆境生理与生态重点实验室保存。

1.2 引物设计与合成

根据已经公布的百合 ArMV CP 基因序列(GenBank 登录号:KJ481187)设计合成特异性引

物。为便于表达克隆化基因,分别在正向和反向引物上添加 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点,引物序列如下(下划线表示引入的酶切位点):

正向引物: 5'-GGATCCGGTCTTGCTGG-TAGAGGTTCTG-3'

反向引物: 5'- CTCGAGAACTTTAAAG-CATGTTCTTCCGTA-3'

以上引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 ArMV CP 基因的 PCR 扩增

使用植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,以提取的总 RNA 为模板,按照试剂盒说明逆转录合成 cDNAs,然后 PCR 扩增 ArMV CP 基因。PCR 扩增条件为:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,53 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 80 s,循环扩增 30 次;72 ℃延伸 7 min。扩增完毕,PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段通过 DNA 回收试剂盒纯化。

1.4 重组克隆载体的构建

纯化片段连接 T 载体,转化 *E. coli* DH5α。用质粒微量抽提试剂盒提取质粒,PCR 筛选阳性克隆。阳性质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 切割,15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,将酶切及凝胶电泳鉴定为阳性的质粒送交北京擎科新业生物技术有限公司测序,证实序列正确后命名为 pMD19-T-ArMV。将测序获得的 CP 序列提交 GenBank,借助 BLAST、ClustalW 和 DNASTar 软件进行序列比对、分析以及 ArMV CP 蛋白的抗原表位预测。

1.5 重组原核表达载体的构建

pMD19-T-ArMV 质粒和 pET-28a(+)质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 切割,回收目的片段,16 ℃连接过夜。连接产物转化 *E. coli* DH5α,涂布平板。挑取单克隆过夜培养,PCR 筛选阳性克隆。提取质粒,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 切割,鉴定正确后命名为 pET-28a-ArMV。未经酶切处理的重组质粒作为阴性对照。

1.6 ArMV CP 蛋白的原核表达

阳性质粒 pET-28a-ArMV 转化 *E. coli* BL21 (DE3),接种至含有 50 μg/mL Kana 的 LB 液体培养基,37 ℃培养过夜。次日按 1:100 接种于相同培养基,37 ℃培养至 OD₆₀₀ 达到 0.7 时添加 1.0 mmol/L IPTG 诱导,37 ℃振荡培养,分别于 3、4、5、6、7 h 收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳。未

插入目的片段的空质粒诱导蛋白和未经 IPTG 诱导的重组菌蛋白作为阴性对照。

按相同的培养条件,诱导培养 1 L 菌体。菌体经 0.01 mol/L PBS 溶液悬浮、超声破碎、离心后,取上清。按照 Ni-NTA 重力柱操作指南纯化目的蛋白。

1.7 ArMV CP 多克隆抗体的制备

用 1 mg/mL 的 ArMV CP 纯化蛋白作为免疫原免疫新西兰大白兔。初次免疫中,将 1 mg 纯化蛋白和完全弗氏佐剂等量混合均匀,进行皮下多点注射。两周后进行增强免疫,将等体积的抗原和不完全弗氏佐剂充分混匀,进行皮下多点注射。每间隔两周进行 1 次增强免疫,第 4 次增强免疫 1 周后颈动脉采血,分离得到抗血清。收集到的血清借助饱和硫酸铵沉淀法和 DE52 阴离子交换柱层析法进行纯化,从而获得兔抗 ArMV 多克隆抗体 IgG。

1.8 ArMV CP 多克隆抗体的鉴定

称取 0.1~0.2 g 分别感染 LSV、CMV、LMoV、PlAMV 及 ArMV 的百合叶片组织,加入液氮研磨,按照植物蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离后,15 V 恒压转移至 PVDF 膜,转膜后移入 1% 酪蛋白封闭液中,4 ℃过夜封闭。以制备的 ArMV CP 多克隆抗体作为一抗(1:10 000),AP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗(1:20 000),通过 NBT/BCIP 碱性磷酸酶显色试剂盒(蓝色)显色。

2 结果与分析

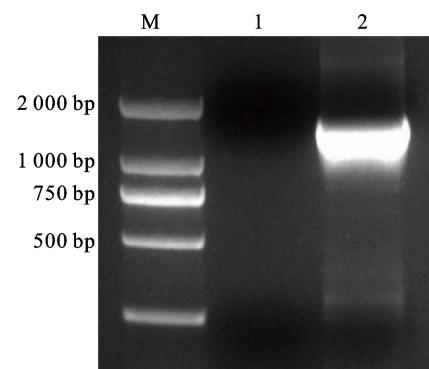
2.1 ArMV CP 基因的克隆

以侵染东方百合杂交品种‘木门’(‘Conca D’or’)的 ArMV 的基因组 RNA 为模板,PCR 扩增 ArMV CP 基因。电泳检测结果显示,得到的扩增片段大小为 1.0~2.0 kb,符合预期(1 515 bp)(图 1)。将扩增的 ArMV CP 序列克隆于 pMD-19T 载体,测序结果显示 ArMV CP 序列的长度为 1 515 bp,编码 505 个氨基酸组成的 CP 蛋白,推测蛋白质相对分子质量为 56 ku。NCBI 上提交克隆所得序列,获得的登录号为 MT323117。

2.2 ArMV CP 基因的序列分析

将克隆的百合 ArMV CP 基因与 GenBank 中不同分离物的 ArMV CP 基因核苷酸及氨基酸序列进行比较。BLAST 结果表明,百合 ArMV CP 基因的核苷酸和氨基酸序列均与采自波兰的

R14_3 分离物(MH316599)的相似性最高,分别为 93.6% 和 98.2%;与其他分离物的核苷酸序列相似性为 81.6%~93.5%,氨基酸序列相似性为 92.2%~97.6%;与已注册的 7 个百合分离物(AB279741、KJ481182、KJ481183、KJ481184、KJ481185、KJ481186 和 KJ481187)相比,核苷酸序列相似性为 89.4%~90.2%,氨基酸序列相似性达到 95.5%~96.4%。



M. DNA Marker; 1. 阴性对照; 2. ArMV CP 基因的 PCR 结果

M. DNA Marker; 1. Negative control; 2. PCR product of ArMV CP gene

图 1 PCR 扩增 ArMV CP 全长基因

Fig. 1 PCR amplification of full-length ArMV CP gene

借助 DNASTar 软件分析百合 ArMV CP 蛋白的二级结构、亲水性和柔韧性,并预测其抗原表位(图 2);将 71 个不同分离物的 ArMV CP 蛋白氨基酸序列进行 ClustalW 比对,获得 ArMV CP 中相似性达到 90% 的保守位点。在抗原性指数较高(指数 ≥ 0)的区域,选取亲水性好(指数 ≥ 0)且具有 β 转角或无规则卷曲结构的区域作为潜在的抗原表位(氨基酸数 ≥ 4),对比抗原表位和保守位点的氨基酸组成,发现抗原表位所包含的 61 个氨基酸中保守位点占据 85.2%,表明 ArMV CP 蛋白的抗原表位保守。

2.3 重组原核表达载体的构建

pET-28a 重组质粒经 PCR 扩增得到约 1.5 kb 的条带,长度与 ArMV CP 基因全长保持一致(1 515 bp)。用 BamH I 和 Xho I 切割 pET-28a 重组质粒,电泳检测结果显示,重组质粒被切割成两条带,分别与 PCR 产物(1.5 kb)和 pET-28a 质粒(5 kb)的大小一致(图 3)。

2.4 ArMV CP 蛋白的原核表达

阳性质粒 pET-28a-ArMV 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株,经 1.0 mmol/L IPTG 诱导,SDS-

PAGE 分析,观察到目的蛋白有明显表达(图 4)。但随着诱导时间从 3 h 增加到 7 h,目的蛋白表达

量没有显著变化。

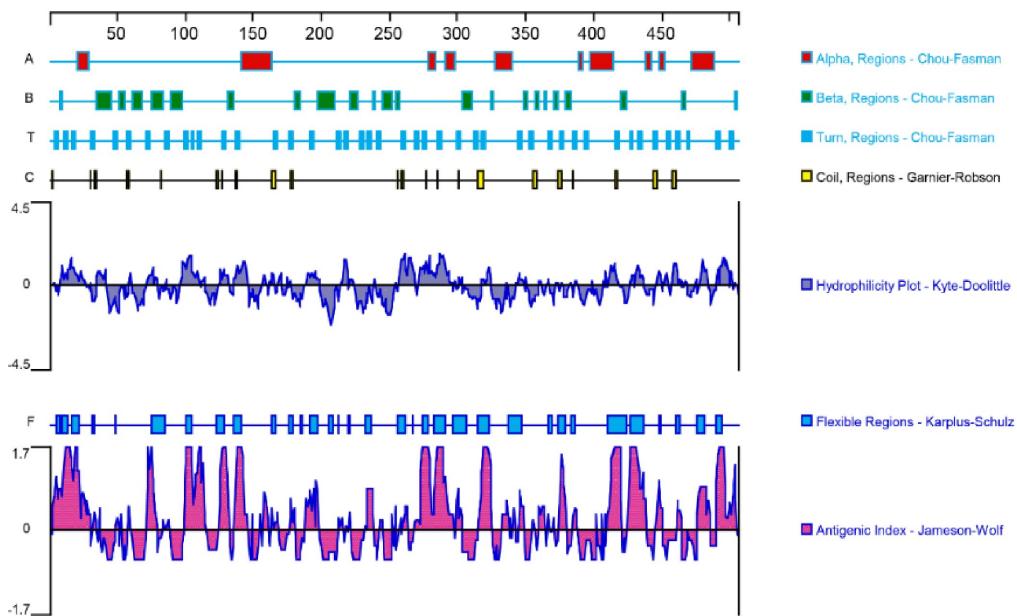
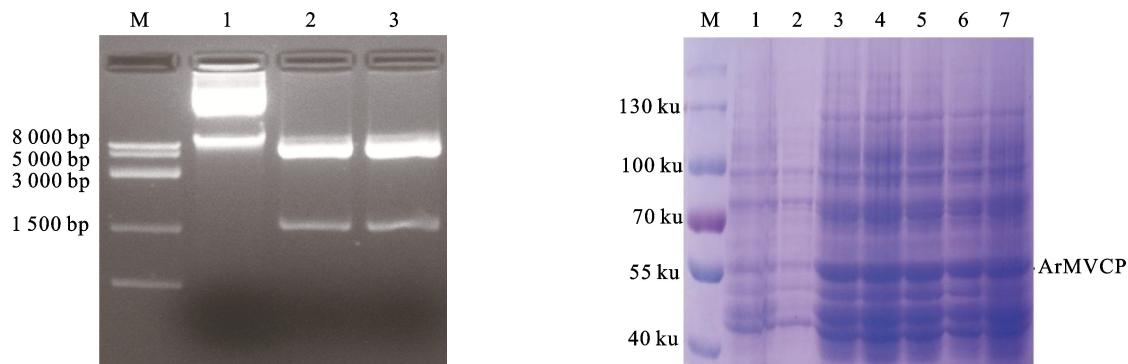


图 2 ArMV CP 蛋白的二级结构、亲水性、柔韧性和抗原性预测

Fig. 2 Prediction of secondary structure, hydrophilicity, flexibility and antigenicity of ArMV CP



M. DNA marker; 1. 未经酶切的 pET-28a 重组质粒; 2~3. pET-28a 重组质粒的双酶切结果

M. DNA marker; 1. Negative control of recombinant plasmid pET-28a without enzyme digestion; 2~3. Double enzyme digestion of recombinant plasmid pET-28a

图 3 双酶切鉴定 pET-28a 重组质粒

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET-28a by double enzyme digestion

2.5 Western blot 免疫印迹

提取百合叶片总蛋白,经 Western blot 检测,发现抗体与感染 ArMV 的样品在预期大小的位置处发生特异性反应,而与健康百合样品以及分别感染 LSV、CMV、LMoV、PlAMV 的样品无交叉反应,表明抗体能够特异性结合 ArMV CP 蛋白,具有很好的特异性(图 5)。

M. 蛋白质分子质量标准; 1. pET-28a 空载体对照; 2. 未诱导对照; 3~7. 分别诱导 3、4、5、6、7 h 的蛋白表达

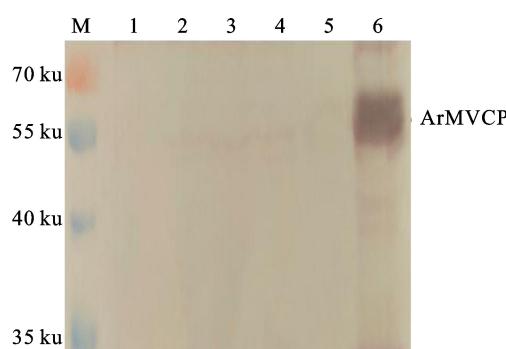
M. Protein marker; 1. Negative control of pET-28a with-outcp gene inserted; 2. Negative control of pET-28a not induced by IPTG; 3~7. Expression of ArMV CP induced at 3, 4, 5, 6 and 7 h, respectively

图 4 ArMV CP 蛋白的原核表达

Fig. 4 Prokaryotic expression of recombinant ArMV CP

3 讨论

贸易全球化推动了中国经济的发展,但是也为国内生物安全带来挑战,近些年来,海关不断从进境的百合、水仙、郁金香等花卉植物上检测到 ArMV^[15-16]。目前,该病毒的防治主要依赖于快速灵敏的血清学检测技术,相较于核酸检测技术,



M. 蛋白质分子质量标准;1. 健康百合样品;2~5. 分别感染 LSV、CMV、LMoV 和 PIAMV 的百合样品;6. 感染 ArMV 的百合样品

M. Protein marker;1. Negative control of healthy lily;2~5. Total protein of lily samples infected with LSV, CMV, LM**O**V and PIAMV, respectively;6. Total protein of lily samples infected with ArMV

图 5 Western blot 鉴定 ArMV CP 多克隆抗体

Fig. 5 Western blot analysis of ArMV

CP using rabbit polyclonal antibody

前者的优点在于避免病毒 RNA 提取的困难,操作简便,并且适用于大规模的田间检测。病毒 CP 蛋白在原核表达中具有较好的免疫原性,因此通常被作为抗体制备的抗原,同时借助原核表达也避开直接纯化病毒所面临的难题^[17~18]。然而,国内学者选取部分 ArMV CP 基因进行原核表达,没有注意到 CP 结构和功能的完整性。于翠等^[15]使用商业化的多克隆抗体建立 DAS-ELISA 技术体系,从水仙种球上检测到 ArMV。一方面,商业化抗体相较于本研究所制备的抗体,对于检测百合上 ArMV 的特异性可能有所降低;另一方面,ELISA 检测的结果存在非特异性的可能,无法应用于病毒蛋白表达分析,不能满足 ArMV 致病机理研究的需要。本研究在此基础上,克隆 CP 全长基因,表达具备完整结构与功能的 CP 融合蛋白。序列分析结果表明 ArMV 不同分离物的 CP 序列相似性高,抗原表位保守,因此以纯化 ArMV CP 蛋白为抗原制备多克隆抗体,可用于检测感染不同宿主的 ArMV。此外,本研究制备的抗体效价高,建立的 Western blot 方法能够用于分析病毒蛋白的表达量,可用于病毒蛋白功能的分析及致病机理的研究。

为了提高目的蛋白表达量,获得优异的抗体,对重组蛋白诱导表达条件进行初步摸索。本研究设置蛋白诱导表达的时间梯度,探究诱导时间和蛋白表达量的关系。SDS-PAGE 结果表明,增加

诱导时间,ArMV CP 蛋白表达量没有发生明显变化(图 4)。这个结论与王玉等^[19]的研究并不一致,可能与两者所用诱导剂的浓度差异有关。本研究用于诱导蛋白表达的 IPTG 为 1.0 mmol/L,相比 0.2 mmol/L 浓度明显偏高,这可能会抑制菌体的生长^[20],从而使目的蛋白的表达量在 3 h 达到峰值。

然而在优化诱导时间后,发现本研究获得的 ArMV CP 蛋白表达量并不高,推测其原因可能与表达载体及密码子偏性有关。谷红等^[21]构建不同的原核表达载体,发现 PRRSV dORF5(去掉 N 端疏水序列)在 pGEX-4T-2 表达载体中能够大量表达,而在 pET-28a 和 pET-5a 中不表达。即表达载体影响蛋白的高效表达,CP 蛋白表达量低可能受到载体的影响。卢海强等^[22]根据毕赤酵母的密码子偏好性,优化嗜热甘露聚糖酶 ManBK 的基因序列,并以此构建 pPIC9K 表达载体,得到高浓度的嗜热甘露聚糖酶。密码子偏性是普遍存在的现象,ArMV 和大肠杆菌的密码子偏性不同,这可能是制约 CP 蛋白表达的原因。

蛋白纯化和抗体特异性检验也可以进行优化,从而提高抗体制备的效率。Ni-NTA 柱亲和层析纯化时,最初获得的纯化蛋白浓度较低,后来在蛋白上样之后增加孵育过程,即在 4 ℃下孵育 4~10 h,使目的蛋白与柱子的结合更加充分,显著提高纯化蛋白含量。Western blot 鉴定抗体特异性的过程中封闭是非常重要的环节之一,只有背景干净的显色结果才具有说服力。尤其是对于化学显色检测系统,因检测灵敏度极高,对背景信号的要求非常严格。本研究最初选择脱脂奶粉和 BSA 作为封闭剂,但是显色结果中均出现较高的背景,这可能是因为脱脂奶粉和 BSA 自身具有的一定的碱性磷酸酶活性造成的结果^[23]。为消除内源性的碱性磷酸酶活性,选择酪蛋白作为封闭剂,成功降低显色背景,验证多克隆抗体的特异性^[24]。

ArMV 是世界上一种重要的植物病害,本研究构建 ArMV CP 基因原核表达载体,制备 ArMV CP 蛋白的多克隆抗体,可以为 ArMV 的血清学检测和致病机理的研究提供一定参考。

参考文献 Reference:

- [1] KING A M, LEFKOWITZ E, ADAMS M J, et al. Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee

- on Taxonomy of Viruses[M]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2011.
- [2] GAO F, LIN W, SHEN J, et al. Genetic diversity and molecular evolution of *Arabis mosaic virus* based on the CP gene sequence[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(4): 1047-1051.
- [3] WETZEL T, CHISHOLM J, BASSLER A, et al. Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1-encoded polyprotein from *Arabis mosaic virus* (subgroup A nepovirus)[J]. *Virology*, 2008, 375(1): 159-169.
- [4] VIGNE E, MARMONIER A, FUCHS M. Multiple interspecies recombination events within RNA2 of *Grapevine fanleaf virus* and *Arabis mosaic virus*[J]. *Archives of Virology*, 2008, 153(9): 1771-1776.
- [5] 赵晓丽, 周琦, 孙宁, 等. 体外转录法制备南芥菜花叶病毒 RNA 标准品[J]. 植物检疫, 2014, 28(1): 37-40.
- ZHAO X L, ZHOU Q, SUN N, et al. Preparation of *Arabis mosaic virus* RNA standards by in vitro transcription[J]. *Plant Quarantine*, 2014, 28(1): 37-40.
- [6] 全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271). 南芥菜花叶病毒检疫鉴定方法:GB/T 28073-2011[S]. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2011: 1-9.
- National Technical Committee on Plant Quarantine of Standardization Administration (SAC/TC 271). Detection and Identification of *Arabis mosaic virus*: GB/T 28073-2011[S]. Beijing: General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China; Standardization Administration of China, 2011: 1-9.
- [7] ZHENG Y, ZHANG W, LU X, et al. Specific and rapid detection of Lily symptomless virus and *Arabis mosaic virus* in lily by dual IC-RT-PCR[J]. *Journal of Phytopathology*, 2013, 161: 823-827.
- ZHANG Y B, WANG Y J, XIE Z K, et al. Rapid detection of lily mottle virus and *Arabis mosaic virus* infecting lily (*Lilium* spp.) using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2020, 36(2): 170-178.
- [9] ASJES C J, SEGERS L C. Incidence and control of necrotic leaf mosaic caused by *Arabis mosaic virus* in *Lilium tigrinum* splendens in the Netherlands[J]. *Journal of Phytopathology*, 1983, 106(2): 115-126.
- [10] BOONHAM N, KREUZE J, WINTER S, et al. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing[J]. *Virus Research*, 2014, 186: 20-31.
- [11] 薛杨. 葡萄几种病毒多重 PCR 检测和 ArMV 外壳蛋白的表达及抗血清制备[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- XUE Y. Mutiple RT-PCR detection of quarantine viruses in grape and expression of the coat protein gene of *Arabis* mosaic *nepovirus* and preparation of virus-specific antiserum[D]. Yangling Shaanxi: Northwest A&F University, 2006.
- [12] 陈先锋, 张吉红, 崔俊霞, 等. 南芥菜花叶病毒的 RT-LAMP 检测试剂盒的研制[J]. 植物保护学报, 2013, 40(2): 189-190.
- CHEN X F, ZHANG J H, CUI J X, et al. Detection of *Arabis mosaic virus* by RT-LAMP[J]. *Plant Protection*, 2013, 40(2): 189-190.
- [13] 林武镇. 伴生豇豆病毒科病毒和南芥菜花叶病毒 RT-PCR 检测方法研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
- LIN W ZH. Detection of secoviridae and *Arabis mosaic virus* by RT-PCR[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014.
- [14] ZHANG Y, WANG Y, XIE Z, et al. Simultaneous detection of three lily viruses using Triplex IC-RT-PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2017, 249: 69-75.
- [15] 于翠, 杨翠云, 杨艳, 等. 从进境水仙上检测出南芥菜花叶病毒[J]. 植物检疫, 2005(6): 41-43.
- YU C, YANG C Y, YANG Y, et al. *Arabis mosaic virus* was detected from imported narcissus[J]. *Plant Quarantine*, 2005(6): 41-43.
- [16] 刘毅, 丁元明, 陈丽梅, 等. 进境百合种球南芥菜花叶病毒的检测及分子鉴定[J]. 植物检疫, 2009, 23(1): 7-9.
- LIU Y, DING Y M, CHEN L M, et al. Detection and molecular identification of *Arabis mosaic virus* from imported lily hybrids[J]. *Plant Quarantine*, 2009, 23(1): 7-9.
- [17] PENG D W, ZHENG G H, ZHENG Z Z, et al. High variability in the N terminus of coat protein among potyviruses and its advantage in producing a specific antibody[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2018, 152: 385-393.
- [18] LIU Z, SUNZHU Y J, ZHOU X P, et al. Monoclonal antibody-based serological detection of *Citrus yellow vein clearing virus* in citrus groves[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(4): 884-891.
- [19] 王玉, 黄显德, 魏代福, 等. 马铃薯 Y 病毒衣壳蛋白的原核表达及抗血清制备[J]. 山东农业科学, 2018, 50(1): 111-114.
- WANG Y, HUANG X D, WEI D F, et al. Prokaryotic expression of potato virus Y coat protein and preparation of antiserum [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2018, 50(1): 111-114.
- [20] 林陈水. 色氨酸酶基因工程菌的构建与表达[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- LIN CH SH. Construction and expression of tryptophanase genetic engineered strain[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2002.
- [21] 谷红, 杨汉春, 郭鑫, 等. PRRSV BJ-4 株 ORF5 基因的原核表达与重组蛋白的纯化[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1): 64-69.
- GU H, YANG H CH, GUO X, et al. Prokaryotic expression of ORF5 gene of PRRS virus BJ-4 and purification of

- recombinant protein[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2004, 35(1): 64-69.
- [22] 卢海强, 谷新晰, 袁巧梅, 等. 嗜热甘露聚糖酶 ManBK 的密码子优化表达及在魔芋寡糖制备聚糖降解中的应用[J/OL]. 食品科学, 1-10 [2020-07-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20191025.1208.004.html>.
- LU H Q, GU X X, YUAN Q M, et al. Heterologous expression of codon optimized mannanase ManBK and its application in degradation of Konjac [J/OL]. Food Science, 1-10 [2020-07-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20191025.1208.004.html>.
- [23] 格林 M R, 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 贺福初, 陈薇, 杨晓明译. 第 4 版. 北京: 科学出版社, 2017: 1344-1345.
- GREEN M R, SAMBROOK J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. HE F CH, CHEN W, YANG X M Trans. 4th ed. Beijing: Science Press, 2017: 1344-1345.
- [24] GILLESPIE P G, HUDSPETH A J. Chemiluminescence detection of proteins from single cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(6): 2563-2567.

Preparation of Polyclonal Antibody against *Arabis mosaic virus* by Cloning and Prokaryotic Expression of Coat Proteins

SU Xuesi^{1,2,3}, ZHANG Yubao^{1,3}, WANG Yajun^{1,3},
GUO Zhihong^{1,3}, QIU Yang^{1,3} and TANG Guoliang^{1,2,3}

(1. Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou

730000, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Gansu Gaolan Field Scientific Observation and Research Station for Agricultural Ecosystem, Lanzhou 730000, China)

Abstract In order to improve serological detection of *Arabis mosaic virus* (ArMV), and to facilitate further study of its pathogenic mechanism, the coat protein (CP) was expressed by prokaryote cells, and the polyclonal antibody was prepared. In this study, the genomic RNA of ArMV infecting oriental hybrid lily (*Lilium oriental* cv. ‘Conca D’or’) was used as a template to amplify the full-length CP gene. The CP gene of 1 515 bp was constructed into the prokaryotic expression vector pET-28a (+) to express the fusion CP protein. Further CP protein was purified by using a Ni-NTA Gravity Column and this antigen was used to prepare rabbit anti-polyclonal antibodies to ArMV. A Western blot assay was then developed to identify the specificity of these polyclonal antibodies. BLAST results showed that the similarity of nucleotide and amino acid sequences was up to 93.6% and 98.2%, respectively, between the cloned ArMV CP sequence (GenBank Accession: MT323117) and the known ArMV CP sequence (GenBank Accession: MH316599). SDS-PAGE indicated that CP protein was highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3), and had a protein relative molecular mass of 56 ku. Western blot results demonstrated that the prepared polyclonal antibody successfully bound CP protein and had high specificity in detecting ArMV.

Key words Lily; *Arabis mosaic virus*; Coat protein; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody

Received 2020-05-07

Returned 2021-01-28

Foundation item The Longyuan Youth Innovation and Entrepreneurship Talent (Team) Project (No. 2020-339); Lanzhou Talent Innovation and Entrepreneurship Project (No. 2019-HLJC-9); Lanzhou Chengguan District Science and Technology Project (No. 2019-6-2).

First author SU Xuesi, male, master student. Research area: plant virology. E-mail: suxuesi18@mails.ucas.ac.cn

Corresponding author ZHANG Yubao, male, Ph. D, senior engineer, master supervisor. Research area: phytopathology. E-mail: zyubao@lzb.ac.cn

(责任编辑:郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)