

黄瓜绿斑驳花叶病毒 MP 基因的原核表达及抗血清制备

任春梅, 程兆榜, 杨柳, 李硕, 王海涛, 陆芳, 季英华*

江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014

摘要: 黄瓜绿斑驳花叶病毒 (Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV) 是危害瓜类作物的重要植物病毒之一, 其运动蛋白 (movement protein, MP) 在病毒传播和致病过程中起关键作用。本研究通过 RT-PCR 克隆 CGMMV 的 MP 基因, 构建原核表达载体 pET-32a-MP, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功诱导表达分子量约 48 kDa 的重组 MP 融合蛋白。利用镍柱亲和层析纯化获得高纯度蛋白 (纯度 $\geq 80\%$), 以此免疫新西南大白兔制备多克隆抗体。Western blot 和 ELISA 分析表明, 抗血清效价达 409 600, 且能特异性识别 CGMMV 侵染叶片中的 MP 蛋白, 与烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV)、西瓜花叶病毒 (Watermelon mosaic virus, WMV) 等其他病毒无交叉反应。本研究实现了 CGMMV MP 蛋白的原核高效表达与特异性抗体制备, 为病毒快速检测、免疫组织化学及蛋白功能研究提供重要工具, 对保障瓜类作物安全生产具有重要意义。

关键词: 黄瓜绿斑驳花叶病毒; 运动蛋白; 原核表达; 抗血清

中图分类号: S642.2 文献标志码: A

Prokaryotic Expression and Antiserum Preparation of the Movement Protein Gene of Cucumber Green Mosaic Virus

REN Chunmei, CHENG Zhaobang, YANG Liu, LI Shuo, WANG Haitao, LU Fang, JI Yinghua*

Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China

Abstract: Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) is one of the important plant viruses that harm melon crops, and its movement protein (MP) plays a key role in virus transmission and pathogenicity. This study cloned the MP gene of CGMMV through RT-PCR, constructed the prokaryotic expression vector pET-32a-MP, and successfully induced the expression of a recombinant MP fusion protein with a molecular weight of approximately 48 kDa in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Purification of high purity protein (purity degree $\geq 80\%$) using nickel column affinity chromatography was used to prepare polyclonal antibodies against the New Southwest White Rabbit. Western blot and ELISA analysis showed that the titer of the anti serum reached 409 600, and it could specifically recognize the MP protein in CGMMV infected leaves, without cross reactivity with other viruses such as Tobacco mosaic virus (TMV) and Watermelon mosaic virus (WMV). The study would provide important tools for rapid virus detection, immunohistochemistry, and protein function research, which is of great significance for ensuring the safe production of melon crops.

Keywords: Cucumber green mottled mosaic virus; sports protein; prokaryotic expression; antiserum

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.09.016

黄瓜绿斑驳花叶病毒 (Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV) 隶属于帚状病毒科 (Virgaviridae) 烟草花叶病毒属 (Tobamovirus)^[1], 是一

种主要危害瓜类作物的重要植物病毒, 其典型症状表现为叶片斑驳、褪绿及果实畸形等, 影响瓜类作物的产量和品质, 对瓜类作物的产业安全构成严重

收稿日期 2025-03-18; 接受日期 2025-05-14

基金项目 现代农业产业技术体系; 国家西甜瓜产业技术体系 (No. CARS-25-2025-G20)。

作者简介 任春梅 (1981—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 植物病毒研究。*通信作者 (Corresponding author): 季英华 (JI Yinghua), E-mail: 2547661128@qq.com。

威胁^[2-3]。目前,全球范围内已有超过 20 个国家报道过 CGMMV 发生^[4],我国自 2005 年在辽宁省盖州市首次发现西瓜植株感染该病毒以来^[5],已在广西^[6]、广东^[7]、湖南^[8]、云南^[9]、海南^[10]、山东^[11]、甘肃及上海^[12]等地形成区域性流行。本实验室自 2012 年在江苏地区开展 CGMMV 的调查结果也显示,CGMMV 已在江苏成功定殖并形成稳定的种群分布,其中设施栽培西瓜上危害最为严重,常连片发生,重病田损失率达 50%以上,严重影响了江苏省西甜瓜的安全生产^[13-14]。

CGMMV 病毒粒子为直棒状,无膜^[15],是一种正义线性单链 RNA 病毒,基因组全长约为 6400 bp,分别编码 129 kDa 复制酶、186 kDa 复制酶、29 kDa 运动蛋白(movement protein, MP)和 17.4 kDa 外壳蛋白(coat protein, CP)^[16]。其中 MP 蛋白除在病毒致病过程中起作用外,主要参与病毒粒子在细胞间的移动^[17]。有研究表明同属的烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)胞间运动是以 MP 与病毒核糖核蛋白形成复合体的形式运输的^[18],并且在长距离运输中有多个寄主因子参与^[19],至于 CGMMV 的 MP 是否有相似的功能尚不明确,因此本研究借助原核表达技术在体外表达高质量 MP 蛋白并制备特异性抗血清,以应用于该蛋白的功能研究。

原核表达系统已广泛应用于植物病毒的蛋白表达中,运动蛋白的原核表达研究多聚焦于可溶性表达优化及高纯度抗原制备,如马秋萌等^[20]、刘玉姿等^[21]、胡汝检等^[22]、尚卫娜等^[23]分别对玉米黄叶病毒、甘蔗黄叶病毒、大麦黄矮病毒 PAV 青海分离物、番茄斑萎病毒的 MP 蛋白进行了原核表达,制备了高效价特异性抗血清,研究发现融合标签的选择及纯化策略对蛋白活性和抗体特异性至关重要。针对 CGMMV 外壳蛋白的原核表达及抗血清制备已有相关报道^[24],而 CGMMV 运动蛋白的原核表达尚无研究,因此本研究将 CGMMV-MP 基因与 pET-32a 载体结合,通过优化诱导条件显著提高融合蛋白表达量;同时,采用镍柱亲和层析结合尿素复性技术,高效纯化包涵体形式的重组蛋白,制备高效价且高特异性的多克隆抗体,为 CGMMV 的免疫检测及后续功能研究提供关键技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料

CGMMV 毒源采集于海南省万宁市长丰镇一

生产田中具有典型 CGMMV 侵染症状的西瓜病叶,经分子检测和致病性回接为 CGMMV 阳性,将该分离物命名为 CGMMV-HaiN12,病叶干燥保存于-70 °C 冰箱中备用。新西兰大白兔由江苏省农业科学院兽医研究所提供。

总 RNA 提取试剂盒及 M-MLV 反转录酶购自美国 Fermentas 公司;大肠杆菌表达系统包含 Trans10 感受态细胞及 BL21 (DE3) 蛋白表达菌株,均购自北京全氏金生物技术有限公司;克隆载体 pET-32a(+)由本实验室保存;pMD-19T 载体及配套酶体系(T4 DNA Ligase、限制性内切酶等)购自日本 TaKaRa 公司;表达载体 pET-32a(+)由本实验室保存;pMD-19T 载体、T4 DNA 连接酶、DNA 限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司;碱性磷酸酶标记的抗兔 IgG 二抗、弗氏完全及不完全佐剂均购自 Sigma 公司;硝酸纤维素膜(PVDF, 0.45 μm 孔径)购自 Pall 公司;His-tag 亲和层析介质 Ni-NTA Agarose 购自 QIGEN 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 CGMMV-MP 基因的克隆及序列分析 根据 CGMMV-HaiN12 (GenBank 登录号为 KC852074) 的全基因序列设计 MP 基因引物,上游引物:5'-CGggatccATGTCTCTAAGTAAGGTGTCAG-3' (下划线处为 BamH I 酶切位点);下游引物:5'-GCgtcgacCTAGGTGTGATCGGATTGT-3' (下划线处为 Sal I 酶切位点),由 Invitrogen 公司合成。采用总 RNA 提取试剂盒提取叶片总 RNA,利用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 合成 cDNA,具体方法步骤按说明书进行。

以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系如下:LA Taq (5 U/μL) 0.5 μL, 10×LA PCR Buffer II (Mg²⁺ Free) 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μL, 高纯 dNTPs(均为 2.5 mmol/L) 8 μL, cDNA 模板 1 μL, 上下游引物 (20 μmol/L) 各 1 μL, 0.1% DEPC 水 29.5 μL。PCR 反应参考王峰等^[10]关于 CGMMV 3 条片段扩增程序进行。PCR 产物经试剂盒回收和纯化后连接至 pMD-19T 载体,蓝白斑筛选阳性克隆后送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。测定序列提交 NCBI 网站,应用 BLASTn 进行序列同源性比对,并基于比对结果构建系统发育树并计算同源性指数。

1.2.2 CGMMV-MP 基因原核表达载体的构建 对

pMD-19T-*MP* 克隆载体及 pET-32a(+)表达载体分别进行 *Bam*H I 与 *Sal* I 核酸限制性酶双酶切, 通过琼脂糖凝胶电泳分离回收 *MP* 基因片段和表达载体, 经 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜后将其转化大肠杆菌 Trans 10, 然后在含有氨苄青霉素的平板上挑取重组克隆, PCR 分析插入基因的完整性, 酶切验证重组质粒构型的正确性, 并对阳性克隆进行 DNA 测序分析比对序列一致性, 验证成功的重组表达载体命名为 pET-32a-*MP*, -80 °C 超低温冻存备用。

1.2.3 CGMMV-*MP* 基因的诱导表达 将验证正确的重组表达载体 pET-32a-*MP* 及空载体 pET-32a(+)分别导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 通过抗生素抗性筛选获得阳性克隆。选取单个菌落接种于 3 mL 含 100 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 在 37 °C 恒温摇床中以 180 r/min 转速培养过夜, 再按 1:100 体积比稀释至新鲜 LB 培养基中, 继续培养至菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.8~1.0, 添加 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 将培养体系转移至 28 °C 恒温摇床中继续振荡培养 3 h。同时设置未添加 IPTG 诱导的 pET-32a-*MP* 为阴性对照, 用于验证基础水平表达。于 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 用预冷的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 8.0) 重悬菌体至原始体积的 1/10。超声破碎处理 (400 W, 超声 2 s, 间隔 5 s, 循环 60 次), 期间保持样本温度不超过 4 °C。再以 12 000 r/min 高速离心 10 min, 分离得到上清液 (可溶性蛋白组分) 和沉淀 (包涵体)。分别向上清液和沉淀中加入 2×SDS 蛋白上样缓冲液, 充分混匀后煮沸 5 min 变性。通过 SDS-PAGE 分析目标蛋白在可溶性和包涵体中的表达情况。

1.2.4 表达蛋白的可溶性分析及纯化 含有重组质粒 pET-32a-*MP* 的 BL21 (DE3) 菌株接种于含氨苄青霉素 (终浓度 100 μg/mL) 的培养基中。在 37 °C、180 r/min 条件下震荡培养, 待菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.8~1.0 区间时, 加入 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L) 诱导表达 4 h, 于 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min 收集菌体细胞。再采用超声波破碎仪 (功率 50 W, 脉冲 3 s×5 s, 冰浴环境) 进行细胞裂解处理, 裂解完成后进行差速离心分别收集上清液 (可溶性蛋白) 和沉淀 (包涵体), 分别取上清液和沉淀溶解液进行 SDS-PAGE 分析。上清液加至预先平衡的 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱, 4 °C 条件下振荡

吸附 1 h, 依次用 20 mmol/L 咪唑和 100 mmol/L 咪唑洗脱^[25], 采用 SDS-PAGE 分析蛋白洗脱情况。洗脱液在 4 °C PBS 缓冲液 (pH 8.0) 中透析 24 h 以去除残留小分子杂质。透析产物通过冷冻干燥浓缩至适当浓度, 经 SDS-PAGE 电泳分析纯度。

1.2.5 表达蛋白的抗血清制备及效价测定 通过 Bradford 法蛋白浓度定量试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司) 测定纯化蛋白的浓度; 参考季英华等^[26]的方法皮下和肌肉混合多点注射雄性大耳白兔, 共免疫 6 次, 每周免疫 1 次, 每次免疫蛋白量为 0.5 mg。选取健康成年兔耳缘静脉采集 2 mL 基础血清, 经 4 °C 静置 12 h 后, 离心获取阴性对照血清, -20 °C 冻存备用。初级免疫阶段 (前 3 次) 采用多点皮下及肌肉联合注射: 首次免疫将纯化蛋白与等体积的氟氏完全佐剂充分乳化后注射, 第 2、3 次将蛋白与等体积的氟氏不完全佐剂充分乳化后注射; 强化免疫阶段 (后 3 次) 采用静脉注射: 连续 3 周静脉注射无佐剂抗原。末次免疫 14 d 后心脏采血。血样 4 °C 放置过夜, 于 8000 r/min 离心 10 min 所得上清即为抗血清。参考商海丽等^[27]的方法采用间接 ELISA 法测定抗体效价, 以免疫前健康兔血清作为阴性对照, 用 0.01 mol/L PBST 连续倍比稀释 (100×2¹~100×2¹⁵) 多克隆抗体和阴性血清, 每个梯度设置 3 个重复, 通过酶标仪检测抗血清效价。

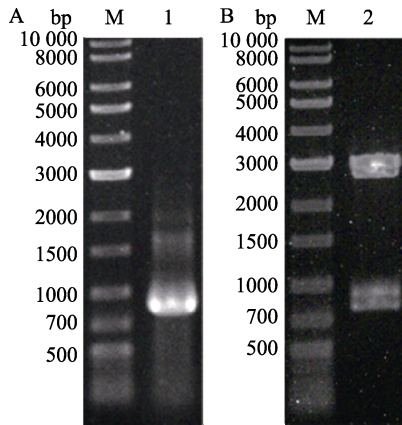
1.2.6 多克隆抗体的特异性分析 参考熊如意等^[28]的 Western blot 印记法检测多抗的特异性, 分别准备感染 CGMMV、烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV)、西瓜花叶病毒 (Watermelon mosaic virus, WMV)、黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) 的叶片和健康叶片, 参考马秋萌等^[20]的方法提取植物总蛋白, 加入 100 μL 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 蛋白上样缓冲液, 在 100 °C 的水浴锅中加热 10 min, 于 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测。然后转印至 PVDF 膜上, 以多克隆抗体 Anti-*MP* 为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 用 BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒进行显色, 显现清晰条带后加去离子水终止反应并拍照。

2 结果与分析

2.1 CGMMV-*MP* 基因的克隆

提取 CGMMV-HaiN12 的 RNA, 经反转录试

剂盒合成 cDNA，以此为模板，用设计的 MP 基因引物 PCR 扩增后，在 800 bp 左右获得了与预期大小相近的片段，其电泳检测结果见图 1A。将回收纯化的 MP 基因连接到 pMD19-T Vector 上，转化 Trans10 化学感受态细胞，经蓝白斑筛选，提取质粒，并用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定，在 800 bp 附近切出一条条带（图 1B），与 MP 基因大小相近。



M: 1 kb ladder plus; 1: CGMMV-MP 基因扩增产物; 2: pMD 19-MP 经 *EcoR* I /*Hind* III 双酶切。

M: 1 kb ladder plus; 1: The amplification product of CGMMV-MP gene; 2: Enzyme digestion of PMD 19-MP with *EcoR* I /*Hind* III enzymes.

图 1 CGMMV-MP 基因克隆电泳检测图

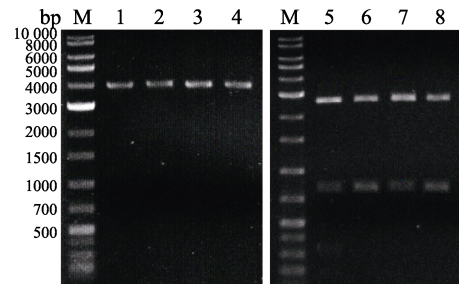
Fig. 1 Electrophoresis detection map of CGMMV-MP gene clone

2.2 CGMMV-MP 基因原核表达载体的构建

将重组原核表达质粒 pET-32a-MP 进行电泳检测，质粒大小和预期大小相符（图 2）。将质粒用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定，在 800 bp 左右

切出目的条带（图 2），说明 MP 基因已克隆到原核表达载体 pET-32a 上。

将双酶切鉴定正确的重组原核表达质粒送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序，测序结果经 BioEdit v 7.0.9 比对拼接，显示所测定核酸序列与 CGMMV-HaiN12 的 MP 基因核苷酸序列一致性达 100%，所克隆的 MP 基因阅读框架均正确（图 3），说明构建的 pET-32a-MP 原核表达质粒正确。



M: 1 kb ladder plus; 1~4: 重组原核表达质粒 pET-32a-MP; 5~8: 重组原核表达质粒 pET-32a-MP 酶切。

M: 1 kb ladder plus; 1-4: Recombinant prokaryotic expression plasmid pET-32a-MP; 5-8: Enzyme digestion of recombinant prokaryotic expression plasmid pET-32a-MP.

图 2 重组原核表达质粒的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant prokaryotic expression vectors

2.3 CGMMV-MP 融合蛋白的诱导表达

将重组原核表达质粒 pET-32a-MP 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中，挑取单菌落于 LB 液体培养基中培养，并用终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，与未诱导和空载体 2 个对照相比，在约

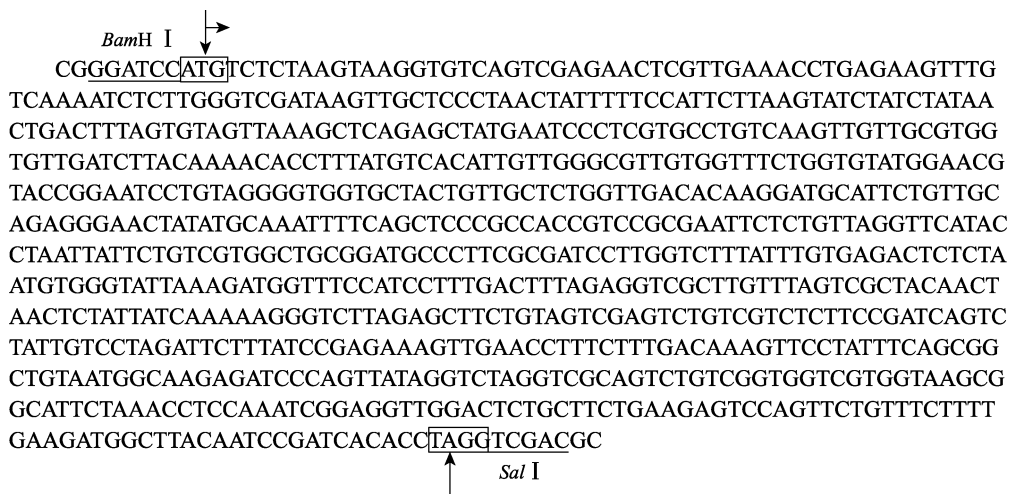
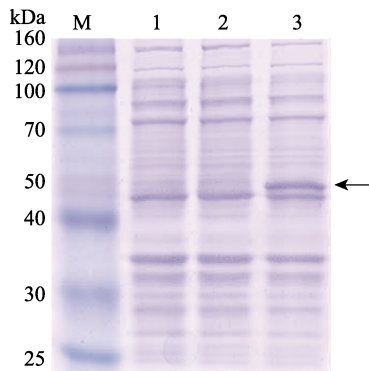


图 3 重组原核表达质粒的序列

Fig. 3 Sequence of recombinant prokaryotic expression plasmid

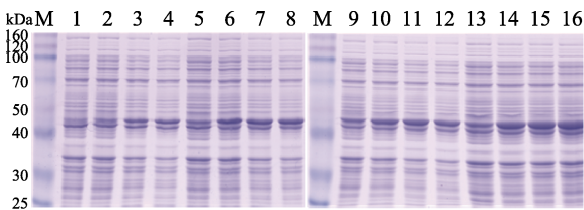
48 kDa 附近出现特异性条带 (图 4), 但是表达量较低。按 CGMMV 的 MP 基因的阅读框架, MP 蛋白分子量大小约为 29 kDa, 加上融合蛋白表达的 1 个 Trx Tag、1 个 His Tag 和 1 个 S Tag 的约 19 kDa 的标签, 共约 48 kDa, 这与预期融合蛋白分子量相当, 表明 MP 基因已经在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功融合表达。经过原核表达条件的优化, 当 OD₆₀₀ 为 1.5, IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 时, MP 融合蛋白的表达量最高 (图 5)。



M: Blus plus™ III protein marker; 1: 经 IPTG 诱导的转化有 pET-32a 载体的 BL21 (DE3) 菌裂解物; 2: 未诱导的转化有 pET-32a-MP 的 BL21 (DE3) 菌裂解物; 3: 经 IPTG 诱导的转化有 pET-32a-MP 的 BL21 (DE3) 菌裂解物; 箭头指示 MP 融合蛋白 (大约 48 kDa) 的位置。
M: Blus plus™ III protein marker; 1: Transformation of BL21 (DE3) bacterial lysate with pET-32a vector induced by IPTG; 2: Untreated transformation of BL21 (DE3) bacterial lysate containing pET-32a-MP; 3: Transformation of BL21 (DE3) bacterial lysate with pET-32a-MP induced by IPTG; The arrow indicates the location of the MP fusion protein (approximately 48 kDa).

图 4 CGMMV-MP 基因的原核表达

Fig. 4 Prokaryotic expression of CGMMV-MP gene



M: Blus plus™ III protein marker; Lane 1-4: OD₆₀₀=0.4, IPTG=0, 0.1, 0.5, 1.0 mmol/L; Lane 5-8: OD₆₀₀=0.7, IPTG=0, 0.1, 0.5, 1.0 mmol/L; Lane 9-12: OD₆₀₀=1.0, IPTG=0, 0.1, 0.5, 1.0 mmol/L; Lane 13-16: OD₆₀₀=1.5, IPTG=0, 0.1, 0.5, 1.0 mmol/L.

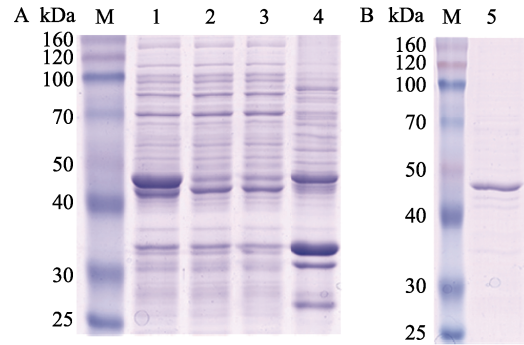
图 5 CGMMV-MP 原核表达条件优化

Fig. 5 Optimal prokaryotic expression conditions

2.4 CGMMV-MP 融合蛋白的纯化

MP 融合蛋白基本上以包涵体的形式存在 (图 6A)。MP 融合蛋白聚集成的包涵体经超声破碎、反复洗涤, 与可溶性蛋白和膜结合蛋白等细菌蛋白分离后, 溶于 8.0 mol/L 尿素, 再经镍柱亲和层

析, 在 250 mmol/L 洗脱缓冲液中洗脱 2 次后, MP 融合蛋白纯度达到 80% 以上 (图 6B), 可直接用作抗原。应用北京百泰克生物技术有限公司的 Bradford 法蛋白定量试剂盒测定提纯的 MP 融合蛋白的浓度, MP 融合蛋白浓度为 0.5 mg/mL。



A: MP 融合蛋白定位。B: MP 融合蛋白纯化。M: Blus plus™ III protein marker; 1: 超声波破碎后的全菌液; 2: 5000 r/min 离心 10 min 后的上清液; 3: 15 000 r/min 离心 30 min 后的上清液; 4: 15 000 r/min 离心 30 min 后的沉淀。5: 经镍柱亲和层析, 于 250 mmol/L 缓冲液洗脱下纯化的 MP 融合蛋白。

A: Localization of MP fusion protein. B: Purification of MP fusion protein. M: Blus plus™ III protein marker; 1: Whole bacterial solution after ultrasonic disruption; 2: The supernatant after centrifugation at 5000 r/min for 10 min; 3: The supernatant after centrifugation at 15 000 r/min for 30 min; 4: Precipitation after centrifugation at 15 000 r/min for 30 min; 5: MP fusion protein purified by nickel column affinity chromatography with 250 mmol/L buffer elution.

图 6 MP 融合蛋白的纯化

Fig. 6 Purification of MP fusion protein

2.5 抗血清 anti-MP 的效价测定

固定抗原浓度, 抗血清 Anti-MP 从 100 倍开始稀释, 二倍比稀释, 采用间接 ELISA 法检测 Anti-MP 效价, 每个抗体稀释倍数重复 3 次, 同时倍比稀释免疫前的兔血清作为阴性对照 (CK)。根据 ELISA 测定评价标准, 在抗血清 Anti-MP 稀释倍数为 409 600 时, OD₄₀₅Anti-MP/OD₄₀₅CK=2.35, 鉴定为阳性; 而当稀释倍数为 819 200 时, OD₄₀₅Anti-MP/OD₄₀₅CK=1.81, 鉴定为阴性 (图 7), 因此抗血清 Anti-MP 的效价为 409 600, 表明用纯化的 CGMMV-MP 融合蛋白制备的抗血清具有很高的效价。

2.6 Western blot 分析

用 Anti-MP 对 MP 原核表达产物进行 Western blot 分析 (图 8), Anti-MP 能与 pET-32a 空载体诱导菌体蛋白在 19 kDa 附近发生特异性反应, 与 pET-32a-MP 诱导菌体总蛋白在 48 kDa 附近处发生特异性反应, 能与纯化的 MP 融合蛋白也发生

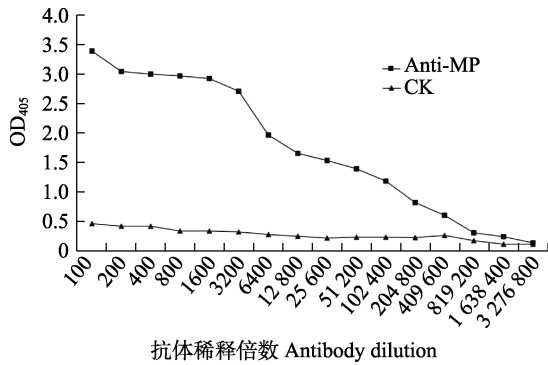
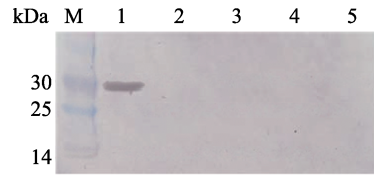


图 7 抗血清效价测定

Fig. 7 ELISA titers of the antiserum

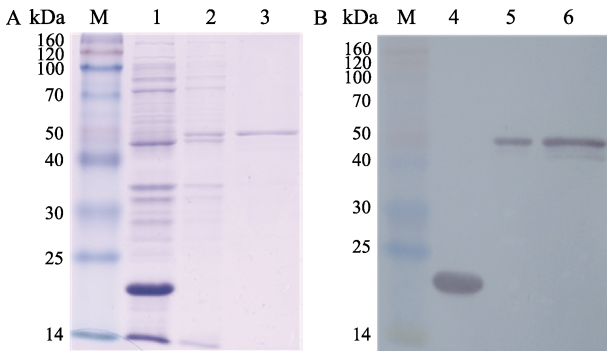


M: Blus plus™ III protein marker; 1: CGMMV 感病叶片; 2: 健康叶片; 3: TMV 感病叶片; 4: WMV 感病叶片; 5: CMV 感病叶片。

M: Blus plus™ III protein marker; 1: CGMMV infected leaves; 2: Healthy leaves; 3: TMV infected leaves; 4: WMV infected leaves; 5: CMV infected leaves.

图 9 被感染烟草中 CGMMV-MP 的检测

Fig. 9 Detection of CGMMV-MP in CGMMV-infected tobacco



A: 考马斯亮蓝染色; B: 转移到硝酸纤维素膜, 用 Anti-MP 作免疫印迹。M: Blus plus™ III protein marker; 1 和 4: pET-32a 转化 BL21 (DE3), 0.5 mmol/L IPTG 诱导; 2 和 5: pET-32a-MP 转化 BL21 (DE3), 0.5 mol/L IPTG 诱导; 3 和 6: 纯化的 MP 融合蛋白。

A: Coomassie Brilliant Blue staining; B: Transfer to nitrocellulose membrane and perform immunoblotting using Anti MP. M: Blus plus™ III protein marker; 1 and 4: pET-32a was transformed into BL21 (DE3) and induced with 0.5 mmol/L IPTG; 2 and 5: pET-32a-MP transformation into BL21 (DE3), induction with 0.5 mol/L IPTG; 3 and 6: Purified MP fusion protein.

图 8 Anti-MP 的 Western blot 检测

Fig. 8 Western blot analysis of Anti-MP

反应。说明 Anti-MP 可以特异地和 MP 融合蛋白及表达的标签相结合。

再通过 Anti-MP 对 CGMMV 侵染寄主叶片的总蛋白进行 Western blot 检测 (图 9), 结果发现该抗体在预期大小位置发生抗体反应, 检测到 MP 蛋白。而与健康对照叶片、TMV、WMV 和 CMV 侵染叶片无交叉反应, 说明 Anti-MP 只能结合 CGMMV 的 MP 蛋白, 具有较好的特异性。

3 讨论

黄瓜绿斑驳花叶病毒作为一种可种传的外来入侵有害生物, 近年来已在我国多个省份的葫芦科作物种植区引发严重疫情, 造成了巨大的经济损失。鉴于该病毒可通过宿主种子进行有效传

播的特性及其对产业构成的实质性威胁, 我国于 2007 年正式将其列为国家农业植物检疫对象。根据当年农业部颁布的第 862 号公告要求, 相关部门已建立起针对带毒葫芦科作物种子、种苗的强制性检疫管控体系, 明确禁止或严格管控相关农业繁殖材料的跨区域调运与流通, 以遏制病原体的扩散蔓延^[29]。近些年, CGMMV 仍在我国蔓延危害, 根据笔者近年来在江苏省对 CGMMV 的调查发现, 全省病害发生面积最高达 35.8 hm², 主要危害西瓜, 由种子调运传入, 病害突发连片发生, 病害的发生强度上设施作物大于露地作物, 究其原因可能与设施农业农事操作频繁, 病毒易于传播侵染, 一旦定殖难根治等相关。

本研究利用 RT-PCR 方法扩增和克隆了 CGMMV-HaiN12 的 MP 基因, 成功构建了原核表达质粒 pET-32a-MP, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功表达了 CGMMV-HaiN12 的 MP 蛋白。SDS-PAGE 及 Western blot 分析表明, 所得 MP 融合蛋白主要呈现包涵体形态特征。这是因为采用高温诱导策略 (通常为 42 °C) 时, 菌体增殖速率显著提升 (约提高 3~5 倍), 导致 mRNA 翻译效率呈指数级增长。这种快速的蛋白合成过程使得细胞内的折叠辅助机制处于超负荷状态, 进而造成新生肽链的错误折叠与聚集从而形成包涵体^[30]。此外, IPTG 的浓度直接影响大肠杆菌生长速率和蛋白表达效率^[31]。本研究通过系统优化确定 1.0 mmol/L IPTG、OD₆₀₀ 为 1.5 时蛋白表达量最多, 所得融合蛋白表达量显著高于张正坤等^[32]采用 0.4 mmol/L IPTG 诱导 TMV-MP 表达蛋白的表达量。然后通过复性获得了可溶性蛋白, 不仅恢复了外源蛋白的完整高级空间结构, 而且通过去除宿主菌自身蛋白而实现了纯化^[33]。

进一步以纯化的 MP 融合蛋白为抗原免疫家兔, 制备了 MP 蛋白高效价的抗血清 Anti-MP, 效价为 1 : 409 600, 这一效价显著高于已报道的 GGMMV-CP 抗血清(效价为 1 : 1024)^[24]、TMV-MP 多克隆抗体(效价为 1 : 51 200)^[33]和玉米黄花叶病毒 MP 抗血清(效价为 1 : 102 400)^[20]。Western blot 分析显示其与 TMV、WMV 等近缘病毒无交叉反应, 能特异性识别 CGMMV 侵染叶片中的 MP 蛋白, 验证了该原核表达蛋白的体外活性, 这一高特异性可能源于纯化过程中对宿主杂蛋白的严格去除(纯度 ≥ 80%)及抗原表位的完整保留, 为开发高灵敏度的 CGMMV 免疫检测试剂盒奠定基础。

目前的研究表明 CMV 的 2b 蛋白^[34]和 PVX 的 MP 蛋白^[35]为基因沉默抑制子; TMV 的 MP 蛋白不仅可诱导基因沉默, 主要在病毒粒子胞间移动和长距离运输中发挥重要作用^[36-37]。CGMMV 的 MP 蛋白无论在氨基酸序列保守性和功能域特征均与 TMV 的 MP 蛋白、CMV 的 2b 蛋白具有相似性, 但其是否具有类似转录后基因沉默抑制功能仍需进一步验证。郑海刚等^[38]证明了 CGMMV 的 MP 蛋白具备干扰宿主转录后基因沉默的潜能。本研究成功实现 CGMMV-MP 的原核高效表达及抗体制备, 为解析 MP 蛋白的细胞间运输机制及开发基于抗体的快速检测技术提供了重要工具。未来可进一步利用该抗体探索 MP 在病毒侵染早期的动态分布, 或通过免疫共沉淀筛选其互作宿主因子。

参考文献

- [1] FRANCKI R I, HU J, PALUKAITIS P. Taxonomy of cucurbit infecting tobamoviruses as determined by serological and molecular hybridization analyses[J]. *Intervirology*, 1986, 26(3): 156-163.
- [2] 陈红运, 林石明, 陈青, 赵文军, 廖富荣, 陈洪俊, 朱水芳. 黄瓜绿斑驳花叶病毒辽宁分离物全基因组序列测定[J]. *病毒学报*, 2009, 25(1): 68-72.
CHEN H Y, LIN S M, CHEN Q, ZHAO W J, LIAO F R, CHEN H J, ZHU S F. Complete genomic sequence of a watermelon isolate of Cucumber green mottle mosaic virus in Liaoning province[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2009, 25(1): 68-72. (in Chinese)
- [3] 吴元华, 李立梅, 赵秀香, 王文航, 王林, 蔡明. 黄瓜绿斑驳花叶病毒在我国定殖和扩散的风险性分析[J]. *植物保护*, 2010, 36(1): 33-36.
WU Y H, LI L M, ZHAO X X, WANG W H, WANG L, CAI M. Pest risk analysis of invasion and spreading of Cucumber green mottle mosaic virus in China[J]. *Plant Protection*, 2010, 36(1): 33-36. (in Chinese)
- [4] DOMBROVSKY A, TRAN-NGUYEN L T T, JONES R A C. Cucumber green mottle mosaic virus: rapidly increasing global distribution, etiology, epidemiology, and management[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2017, 55: 231-256.
- [5] 陈红运, 赵文军, 程毅, 李明福, 朱水芳. 辽中地区西瓜花叶病病原的分子鉴定[J]. *植物病理学报*, 2006, 36(4): 306-309.
CHEN H Y, ZHAO W J, CHENG Y, LI M F, ZHU S F. Molecular identification of the virus causing watermelon mosaic disease in Mid-Liaoning[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2006, 36(4): 306-309. (in Chinese)
- [6] 秦碧霞, 蔡健和, 刘志明, 陈永惠, 朱桂宁, 黄福新. 侵染观赏南瓜的黄瓜绿斑驳花叶病毒的初步鉴定[J]. *植物检疫*, 2005, 19(4): 198-200.
QIN B X, CAI J H, LIU Z M, CHEN Y H, ZHU G N, HUANG F X. Preliminary identification of a Cucumber green mottle mosaic virus infecting pumpkin[J]. *Plant Quarantine*, 2005, 19(4): 198-200. (in Chinese)
- [7] 张卫东, 权永兵, 廖力, 徐森锋, 迟远丽, 陈其文. 黄瓜绿斑驳花叶病毒广东分离物的分子鉴定[J]. *广东农业科学*, 2011, 38(20): 73-76.
ZHANG W D, QUAN Y B, LIAO L, XU M F, CHI Y L, CHEN Q W. Molecular identification of three isolates of Cucumber green mottle mosaic virus in Guangdong[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 38(20): 73-76. (in Chinese)
- [8] 赵慧茹, 林振亚, 朱俊子, 张亚东, 高必达. 湖南首次检测到黄瓜绿斑驳花叶病毒[J]. *植物病理学报*, 2013, 43(2): 219-221.
ZHAO H R, LIN Z Y, ZHU J Z, ZHANG Y D, GAO B D. First report of Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) in Hunan province[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2013, 43(2): 219-221. (in Chinese)
- [9] 吴鑫, 丁元明, 何月秋, 李旻, 李克海, 王绍君, 周剑. 黄瓜绿斑驳花叶病毒的分子检测及云南分离物的序列分析[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2010, 31(3): 75-80.
WU X, DING Y M, HE Y Q, LI M, LI K H, WANG S J, ZHOU J. Molecular detection of Cucumber green mottle mosaic virus and sequence analyses of Yunnan isolates[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2010, 31(3): 75-80. (in Chinese)
- [10] 王峰, 任春梅, 季英华, 缪倩, 姚恋秋, 周益军, 徐冬青, 程兆榜. 黄瓜绿斑驳花叶病毒海南分离物基因组测定与毒源分析[J]. *植物保护*, 2014, 40(6): 75-81.

- WANG F, REN C M, JI Y H, MIAO Q, YAO L Q, ZHOU Y J, XU D Q, CHENG Z B. Genomic sequencing and infection source analysis of Cucumber green mottle mosaic virus isolated from Hainan, China[J]. *Plant Protection*, 2014, 40(6): 75-81. (in Chinese)
- [11] 田永蕾, 刘冬梅, 张永江, 李明福, 马占鸿. 黄瓜绿斑驳花叶病毒北京和山东分离物的生物学测定及其基因组比较[J]. *植物检疫*, 2009, 23(6): 1-6.
- TIAN Y L, LIU D M, ZHANG Y J, LI M F, MA Z H. Bioassay and genomic studies on the two isolates of Cucumber green mottle mosaic virus from Beijing and Shandong[J]. *Plant Quarantine*, 2009, 23(6): 1-6. (in Chinese)
- [12] LIU Y, WANG Y N, WANG X F, ZHOU G H. Molecular characterization and distribution of Cucumber green mottle mosaic virus in China[J]. *Journal of Phytopathology*, 2009, 157(7/8): 393-399.
- [13] 程兆榜, 任春梅, 缪倩, 王锋, 张重阳, 周益军, 范永坚. 江苏黄瓜绿斑驳花叶病毒的发生和防治[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(2): 114-117.
- CHENG Z B, REN C M, MIAO Q, WANG F, ZHANG C Y, ZHOU Y J, FAN Y J. The occurrence and control of Cucumber green mottled mosaic virus in Jiangsu province[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(2): 114-117. (in Chinese)
- [14] 程兆榜, 任春梅, 缪倩, 王锋, 张重阳, 周益军. 江苏黄瓜绿斑驳花叶病毒的鉴定[J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(1): 65-70.
- CHENG Z B, REN C M, MIAO Q, WANG F, ZHANG C Y, ZHOU Y J. Identification of Cucumber green mottle mosaic virus in Jiangsu[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(1): 65-70. (in Chinese)
- [15] HOLLINGS M, KOMURO Y, TOCHIHARA H. Cucumber green mottle mosaic virus. CMI/AAB descriptions of plant viruses[C]. Guildford: Commonwealth Mycological Institute, 1975.
- [16] KIM S M, LEE J M, YIM K O, OH M H, PARK J W, KIM K H. Nucleotide sequences of two Korean isolates of Cucumber green mottle mosaic virus[J]. *Molecular Cells*, 2003, 16(3): 407-412.
- [17] KIM S M, NAM S H, LEE J M, YIM K O, KIM K H. Destruction of Cucumber green mottle mosaic virus by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR[J]. *Molecules and Cells*, 2003, 16(3): 338-342.
- [18] HEINLEIN M, PADGETT H S. Changing patterns of localization of the Tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection[J]. *Plant Cell*, 1998, 10(7): 1107-1120.
- [19] KOTLIZKY G, KATZ A, VANDER L J, BOYKO J, LAPIDOT M. A dysfunctional movement protein of Tobacco mosaic virus interferes with targeting of wild type movement protein to microtubules[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(7): 895-904.
- [20] 马秋萌, 刘玉姿, 王颖, 韩成贵, 李洪蕊, 吴迪. 玉米黄斑花叶病毒运动蛋白的原核表达纯化与抗血清制备[J]. *植物保护学报*, 2023, 50(2): 343-349.
- MA Q M, LIU Y Z, WANG Y, HAN C G, LI H R, WU D. Prokaryotic expression and purification of Maize yellow mosaic virus movement protein and antiserum preparation[J]. *Journal of Plant Protection*, 2023, 50(2): 343-349. (in Chinese)
- [21] 刘玉姿, 张绍康, 田畅, 张晓艳, 左登攀, 王颖, 张宗英, 韩成贵. 甘蔗黄叶病毒运动蛋白的原核表达和抗血清制备[J]. *植物病理学报*, 2020, 50(6): 694-701.
- LIU Y Z, ZHANG S K, TIAN C, ZHANG X Y, ZUO D P, WANG Y, ZHANG Z Y, HAN C G. Prokaryotic expression and antiserum preparation of the movement protein of Sugarcane yellow leaf virus[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2020, 50(6): 694-701. (in Chinese)
- [22] 胡汝检, 赵添羽, 左登攀, 王颖, 张宗英, 韩成贵. 大麦黄矮病毒 PAV 青海分离物运动蛋白抗血清制备及其与同属 BYDVs 的血清学关系[J]. *植物病理学报*, 2020, 50(2): 141-146.
- HU R J, ZHAO T Y, ZUO D P, WANG Y, ZHANG Z Y, HAN C G. Antiserum preparation of the movement protein of Barley yellow dwarf virus PAV Qinghai isolate and its serological relationship with other BYDVs[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2020, 50(2): 141-146. (in Chinese)
- [23] 尚卫娜, 郑宽瑜, 董家红, 张仲凯, 洪健, 周雪平. 番茄斑萎病毒运动蛋白 NSm 的原核表达及抗体制备[J]. *植物病理学报*, 2015, 45(6): 592-597.
- SHANG W N, ZHENG K Y, DONG J H, ZHANG Z K, HONG J, ZHOU X P. Expression and antiserum preparation of the NSm of Tomato spotted wilt virus[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2015, 45(6): 592-597. (in Chinese)
- [24] 刘锦, 李亦晴, 黄显德, 房乐, 李向东, 田延平. 黄瓜绿斑驳花叶病毒外壳蛋白基因原核表达及抗血清制备[J]. *山东农业科学*, 2017, 49(5): 10-13.
- LIU J, LI Y Q, HUANG X D, FANG L, LI X D, TIAN Y P. Prokaryotic expression and antiserum preparation of Cucumber green mottle mosaic virus coat protein gene[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2017, 49(5): 10-13. (in Chinese)
- [25] 郝英辰, 龙月, 郭豪, 李宁, 张松杰, 赵棋, 张松涛. 烟草 NtGCN2 的原核表达、纯化及多克隆抗体制备[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(1): 170-179.
- HAO Y C, LONG Y, GUO H, LI N, ZHANG S J, ZHAO Q,

- ZHANG S T. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of tobacco (*Nicotiana tabacum*) NtGCN2[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(1): 170-179. (in Chinese)
- [26] 季英华, 周晓伟, 蔡振东, 程兆榜, 周益军. 番茄黄化曲叶病毒 V2 基因原核表达及多克隆抗体制备[J]. 植物病理学报, 2013, 43(2): 143-148.
- JI Y H, ZHOU X W, CAI Z D, CHENG Z B, ZHOU Y J. Prokaryotic expression of V2 gene of Tomato yellow leaf curl virus and preparation of its polyclonal antibody[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2013, 43(2): 143-148. (in Chinese)
- [27] 尚海丽, 周雪平, 吴建祥. 免疫斑点法和免疫捕获 RT-PCR 检测黄瓜绿斑驳花叶病毒[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2010, 36(5): 485-490.
- SHANG H L, ZHOU X P, WU J X. Polyclonal antibody-based dot-ELISA and immunocapture-RT-PCR for Cucumber green mottle mosaic virus detection[J]. Journal of Zhejiang University (Agricultural & Life Science), 2010, 36(5): 485-490. (in Chinese)
- [28] 熊如意, 吴建祥, 周益军, 周雪平. 水稻条纹病毒 NS2 基因原核表达产物多克隆抗体制备及受侵染水稻和灰飞虱体内 NS2 检测[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 95-99.
- XIONG R Y, WU J X, ZHOU Y J, ZHOU X P. Polyclonal antibody preparation against prokaryotic expression products of Rice stripe virus NS2 gene and detection of NS2 in infected rice and planthoppers[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(1): 95-99. (in Chinese)
- [29] YIN X Y, LI X, YANG L L, ZHENG Q Y, PIAO Y Z, CAO J J. Detection of Cucumber green mottle mosaic virus in low-concentration virus-infected seeds by improved one-step pre-amplification RT-qPCR[J]. Plant Methods, 2022, 18(1): 70.
- [30] VENTURA S. Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility[J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4(1): 1-8.
- [31] 陈德鑫, 李雯雯, 李思斌, 李宁, 郭豪, 龙月, 杨永霞, 贾红昉, 张洪映, 崔红, 张松涛. 烟草 Ntelf2 α 的原核表达、纯化及多克隆抗体制备和应用[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(1): 50-57.
- CHEN D X, LI W W, LI S B, LI N, GUO H, LONG Y, YANG Y X, JIA H F, ZHANG H Y, CUI H, ZHANG S T. Prokaryotic expression, purification of Ntelf2 α and preparation and application of polyclonal antibody in *Nicotiana tabacum*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(1): 50-57. (in Chinese)
- [32] 张正坤, 吴祖建, 沈建国, 谢联辉, 林奇英. 烟草花叶病毒运动蛋白的表达及特异性抗体制备[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2008, 37(3): 265-268.
- ZHANG Z K, WU Z J, SHEN J G, XIE L H, LIN Q Y. Expression and antibody preparation of Tobacco mosaic virus movement protein[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2008, 37(3): 265-268. (in Chinese)
- [33] 陈浩, 陈于红, 朱德煦, 刘建宁. 重组蛋白质纯化技术[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(5): 87-92.
- CHEN H, CHEN Y H, ZHU D X, LIU J N. Recombinant protein purification technology[J]. China Bioengineering, 2002, 22(5): 87-92. (in Chinese)
- [34] BRIGNETI G, VOINNET O, LI W X, JI L H, DING S W, BAULCOMBE D C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(22): 6739-6746.
- [35] VOINNET O, LEDERER C, BAULCOMBE D C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*[J]. Cell, 2000, 103: 157-167.
- [36] BENITEZ-ALFONSO Y, FAULKNER C, RITZENTHALER C, MAULE A J. Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2010, 23: 1403-1412.
- [37] BENDAHMANE M, SZECSI J, CHEN L, BERG R H, BEACHY R N. Characterization of mutant Tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement[J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2002, 99: 3645-3650.
- [38] 郑海刚, 陈启建. 诱导提取的 dsRNA 粗提液对黄瓜绿斑驳花叶病毒的抑制作用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(4): 346-350.
- ZHENG H G, CHEN Q J. Inhibition of crude extracts of extracted dsRNA by induction on the Cucumber green mottle mosaic virus[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2011, 40(4): 346-350. (in Chinese)