植物保护学报 Journal of Plant Protection，2023，50（2）：343-349 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2023.2021138

# 玉米黄花叶病毒运动蛋白的原核表达纯化与抗血清制备

马秋萌　刘玉姿　吴　迪　李洪蕊　王　颖　韩成贵*

（中国农业大学植物病理学系，农业农村部作物有害生物监测与绿色防控重点实验室，北京 100193）

**摘要**：为实现对玉米黄花叶病毒（maize yellow mosaic virus，MaYMV）的血清学检测，丰富该病毒的检测方法，将编码MaYMV运动蛋白（movement protein，MP）的基因连接到原核表达载体pDB-His-MBP上，将构建成功的原核表达质粒转化到大肠杆菌*Escherichia coli*中诱导表达融合蛋白，将纯化后的融合蛋白对新西兰大白兔*Oryctolagus cuniculus*进行免疫并制备MaYMV MP多克隆抗血清，并采用Western blot对抗血清的效价、灵敏度和特异性进行检测。结果显示，利用成功构建的原核表达载体经诱导表达获得分子量大小约为62 kD的融合蛋白，纯化后对新西兰大白兔进行免疫获得MaYMV MP抗血清，该抗血清的效价为1∶128 000，灵敏度为1∶32，且该抗血清能够特异性地检测到本氏烟*Nicotiana benthamiana*中瞬时表达的MaYMV MP，而不与马铃薯卷叶病毒属*Polerovirus*及黄症病毒属*Luteovirus*的其他病毒发生血清学交叉反应，证明该抗血清具有良好的特异性。表明本研究制备的MaYMV MP抗血清能特异性地检测到MaYMV MP，可用于对田间样品的MaYMV血清学检测。

**关键词**：玉米黄花叶病毒；血清制备；原核表达；瞬时表达；运动蛋白

## Prokaryotic expression and purification of maize yellow mosaic virus movement protein and antiserum preparation

Ma Qiumeng　Liu Yuzi　Wu Di　Li Hongrui　Wang Ying　Han Chenggui*

（Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Pest Monitoring and Green Management, Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193, China）

**Abstract:** In order to achieve serological test of maize yellow mosaic virus (MaYMV) and provide more detection methods for the virus, the movement protein (MP) gene of MaYMV was cloned and ligated into the prokaryotic expression vector pDB-His-MBP. The ligated plasmid was transformed into *Escherichia coli* to express fusion protein. The fusion protein (62 kD) was purified and used to immunize *Oryctolagus cuniculus* to prepare MaYMV MP polyclonal antiserum, and the titer, sensitivity and specificity of the antiserum were determined by Western blot. The results showed that the titer of the antiserum was 1∶128 000 and its sensitivity was 1∶32. The antiserum could react specifically with the MaYMV MP transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* and did not have cross-reactions with MPs of other members in the genera *Polerovirus* and *Luteovirus*. This antiserum developed in this study will be useful in detection of MaYMV MP in the transient expression system and in detection of MaYMV in field samples.

**Key words:** maize yellow mosaic virus (MaYMV); antiserum preparation; prokaryotic expression; transient expression; movement protein (MP)

---

基金项目：国家现代农业（糖料）产业技术体系（CARS-170304），国家自然科学基金（31972240）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：hanchenggui@cau.edu.cn

收稿日期：2021-07-08

玉米是世界上重要的粮食作物和饲料作物，生产中受到诸多病虫害的严重威胁。玉米黄花叶病毒（maize yellow mosaic virus，MaYMV）于2014年在中国云南省田间玉米植株中被首次发现，该病毒是马铃薯卷叶病毒属*Polerovirus*的1个新成员（Chen et al.，2016）。MaYMV主要由蚜虫近距离传播，可以导致多种禾谷类作物出现黄化和矮化等症状（Chavez et al.，2012；陈建生等，2019；Mlotshwa et al.，2021），目前已在中国、巴西和厄瓜多尔等国家广泛分布，给世界各地的玉米生产带来严重威胁（Read et al.，2019；Yahaya et al.，2019；Welgemoed et al.，2020）。MaYMV寄主范围十分广泛，可以侵染玉米和高粱等多种禾本科作物，2016—2018年在尼日利亚和中国的感病甘蔗上也检测到了MaYMV，说明该病毒可以侵染甘蔗（Sun et al.，2019）；而且MaYMV经常与引致甘蔗花叶病的相关病毒同时侵染甘蔗和玉米，由于多种病毒频繁混合侵染，仅根据症状来区分MaYMV与引致甘蔗花叶病的相关病毒具有一定困难（Sun et al.，2019；2021）。因此，对MaYMV的准确鉴定与精准防治十分重要。

MaYMV是正单链RNA病毒，全长为5 642 bp，包含7个开放阅读框（open reading frame，ORF）ORF0~ORF5、ORF3a和3个非编码区（untranslated region，UTR）5′ UTR、3′ UTR及intergenic UTR。MaYMV的运动蛋白（movement protein，MP）由相对保守的ORF4编码，能够促进病毒在宿主细胞之间的移动（Crawford & Zambryski，2001；Chen et al.，2016；李畅等，2017）。目前，对MaYMV MP的研究报道很少，有研究人员对同属的马铃薯卷叶病毒（potato leaf roll virus，PLRV）和黄症病毒科*Luteoviridae*的大麦黄矮病毒（barley yellow dwarf virus，BYDV）的MP进行了详细研究，发现PLRV MP与其致病性和症状表现密切相关，而且能够调节植物细胞之间胞间连丝的直径，使病毒能够顺利在细胞之间移动；BYDV MP在植物体内和体外发生强烈的自身互作形成二聚体，在本氏烟*Nicotiana benthamiana*和普通烟*Nicotiana tabacum*叶片中瞬时表达BYDV MP会引发植物对病原物的抗性反应，使叶片发生细胞程序性死亡（programmed cell death，PCD），并且BYDV MP的N端可能是引发PCD的关键区域（Fusaro et al.，2017；Ju et al.，2017；DeBlasio et al.，2018）。

目前，已有利用反转录PCR（reverse transcription PCR，RT-PCR）和反转录环介导等温扩增（reverse transcription loop-mediated isothermal amplification，RT-LAMP）技术检测MaYMV的报道（陈建生等，2019；Sun et al.，2021），但是还没有通过原核表达方法获得MaYMV MP抗血清及利用血清学反应检测MaYMV的正式报道（王建光等，2019；张静雅和何衍彪，2019；薛超，2020）。因此，本研究通过构建含有MaYMV *MP*基因序列的原核表达载体，表达大量的纯化蛋白，制备高效价、高灵敏度、高特异性的MaYMV MP多克隆抗血清，并进一步验证MaYMV的血清学关系，以期用于MaYMV MP的检测，促进田间玉米病毒病害的检测与防治，同时为研究马铃薯卷叶病毒属各病毒之间的血清学关系提供材料，为深入研究MaYMV MP功能及MaYMV与寄主互作提供必要的材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株及植物：大肠杆菌*Escherichia coli*感受态细胞DH5$\alpha$来源于北京全式金生物技术有限公司，感受态细胞Rosetta由中国农业大学分子植物病毒学实验室保存。根癌农杆菌*Agrobacterium tumefaciens*感受态细胞GV3101和本氏烟由英国剑桥大学的David Baulcombe教授馈赠，本氏烟在温度（24±1）℃、相对湿度40%、光周期16 L∶8 D条件下培养3~4周供试。

供试载体及病毒：原核表达载体pDB-His-MBP来源于DNASU质粒库；双元表达载体pMDC32由中国农业大学分子植物病毒学实验室保存并提供。MaYMV *MP*基因克隆pMDC32-MP$^{\text{MaYMV}}$-3Flag、芸薹黄化病毒（brassica yellow virus，BrYV）*MP*基因克隆pMDC32-3Flag-MP$^{\text{BrYV}}$、PLRV *MP*基因克隆pMDC32-3Flag-MP$^{\text{PLRV}}$由本实验室左登攀博士提供；BYDV *MP*基因克隆pMDC32-3Flag-MP$^{\text{BYDV-PAV}}$由本实验室胡汝检硕士提供；丝瓜蚜传黄化病毒（suakwa aphid-borne yellow virus，SABYV）*MP*基因克隆pMDC32-MP$^{\text{SABYV}}$-3Flag由本实验室张绍康硕士提供；甜菜叶黄化病毒（beet leaf yellowing virus，BLYV）*MP*基因克隆pMDC32-MP$^{\text{BLYV}}$-3Flag由本实验室刘玉姿博士提供；甘蔗黄叶病毒（sugarcane yellow leaf virus，ScYLV）*MP*基因克隆pMDC32-MP$^{\text{ScYLV}}$-3Flag由本实验室赵航海硕士提供。

供试培养基：LB（Luria-Bertani）固体培养基成分为酵母浸膏25 g、胰蛋白胨50 g、NaCl 50 g、琼脂粉82.5 g，调节pH为7，定容至5 L，121 ℃高压灭菌

20 min，室温保存；LB固体培养基不添加琼脂即得到LB液体培养基。

试剂及仪器：Primer Star Max HS DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、Solution I，日本TaKaRa公司；限制性内切酶*Nde* I和*Xho* I，美国NEB公司；同源重组酶试剂盒，北京全式金生物技术有限公司；2×*Taq* DNA聚合酶Mix，北京擎科生物有限公司；蛋白质预染Marker，美国赛默飞世尔科技公司；5-溴-4-氯-3-吲哚二钠盐（5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate，BCIP）、氯化硝基四氮唑蓝（nitro blue tetrazolium，NBT）、异丙基-$\beta$-D-硫代半乳糖苷（isopropyl $\beta$-D-1-thiogalactopyranoside，IPTG）、苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF）、2-吗啉乙磺酸（2-morpholinoethanesulfonic acid，MES）、乙酰丁香酮（acetosyringone，AS）、生物素标记山羊抗兔免疫球蛋白Anti-rabbit IgG，日本Sigma公司；DNA凝胶回收试剂盒，美国Omega公司；质粒小量提取试剂盒，美国Axygen公司；硝酸纤维膜，美国GE公司；镍亲和His融合标签蛋白纯化树脂Ni-NTA His Binding Resin，北京Novagen公司；Flag标签抗血清，北京柏奥易杰科技有限公司；其余试剂均为国产分析纯。22331 Hamburg PCR仪、5424 R离心机，德国Eppendorf公司；ZHWY-103D恒温培养振荡器，上海智城分析仪器制造有限公司；GRP-9080型隔水式恒温培养箱，上海森信实验仪器有限公司；Bluepard隔水式恒温培养箱，上海一恒科技有限公司；Universal Hood II凝胶成像仪，美国Bio-Rad公司；JY600C电泳仪，北京君意科技有限公司。

## 1.2　方法

### 1.2.1　原核表达载体的构建

采用同源重组的方法构建MaYMV MP的原核表达载体。根据MaYMV *MP*基因序列和pDB-His-MBP原核表达载体序列设计引物MaYMV MP-F（5′-<u>ACCTTTACTTCCAGGGCCATATG</u>ATGGACGCAGAGCTAGGAAC-3′）和MaYMV MP-R（5′-<u>TGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAG</u>CTACCTATTTCGGGTTTTGAACAT-3′），下划线所示为pDB-His-MBP原核表达载体的同源臂。以pMDC32-MP$^{MaYMV}$-3Flag为模板、MaYMV MP-F和MaYMV MP-R为引物进行PCR反应。50 μL反应体系：Primer Star Max HS DNA Polymerase 25 μL、模板1 μL、10 μmol/L引物MaYMV MP-F/MaYMV MP-R各1 μL、ddH$_2$O 22 μL。扩增程序：98 ℃预变性20 s；98 ℃变性10 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸15 s，共30个循环；72 ℃再延伸10 min；PCR产物于4 ℃保存。PCR扩增完成后，通过1%琼脂糖凝胶电泳观察电泳结果，根据Marker指示，在紫外灯下切胶回收大小为600 bp左右的目的条带。用*Nde* I和*Xho* I两种限制性核酸内切酶在37 ℃烘箱内酶切pDB-His-MBP原核表达载体，将同源重组酶处理回收的目的片段并与经过酶切处理的载体在50 ℃下反应20 min。10 μL反应体系包括同源重组酶5 μL、载体1 μL和PCR产物4 μL。将所得同源重组产物pDB-His-MBP-MP$^{MaYMV}$加入大肠杆菌感受态细胞DH5$\alpha$进行热激转化，在含有终浓度为50 μg/mL的卡那霉素的LB固体平板上于37 ℃烘箱内培养12 h，挑取单克隆大肠杆菌菌落并进行PCR检测。根据PCR检测结果筛选阳性克隆，挑取阳性菌落接种于含有终浓度为50 μg/mL的卡那霉素的LB液体培养基中于37 ℃摇培12 h，利用质粒小量提取试剂盒参照说明书进行质粒DNA的小量提取，质粒送至北京擎科生物技术公司进行DNA测序。

### 1.2.2　融合蛋白的原核表达和纯化

将1.2.1成功构建的原核表达载体pDB-His-MBP-MP$^{MaYMV}$转入大肠杆菌表达感受态细胞Rosetta中，大肠杆菌在含有终浓度为50 μg/mL的卡那霉素和34 μg/mL的氯霉素的LB固体平板上于37 ℃烘箱内培养12 h。挑取阳性单克隆菌落接种于10 mL含有终浓度为50 μg/mL的卡那霉素和34 μg/mL的氯霉素的LB液体培养基中，37 ℃摇培12 h获得大肠杆菌菌液。取10 mL大肠杆菌菌液接种于1 L含有终浓度为50 μg/mL的卡那霉素和34 μg/mL的氯霉素的LB液体培养基中，37 ℃下振荡培养3~4 h，测定菌液OD$_{600\ nm}$值在0.6~0.8时，收集备用，一部分留作未诱导液，一部分用于诱导表达融合蛋白。向用于诱导表达的1 L菌液中加入2 mL IPTG，16 ℃下以180 r/min摇培18~20 h，诱导大肠杆菌表达大量的融合蛋白。将大肠杆菌诱导表达液分装到500 mL离心瓶中，以8 000 r/min离心5 min收集大肠杆菌菌体，再用100 mL高盐缓冲液（500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl，pH 8）悬浮大肠杆菌菌体。将悬浮菌液转移至100 mL烧杯中，并加入1 mL PMSF，在冰浴条件下超声破碎3次，于4 ℃下以12 000 r/min离心40 min，将沉淀于4 ℃冰箱中保存备用，并收集上清液备用。在4 ℃下，先用高盐缓冲液清洗镍亲和His融合标签蛋白纯化树脂层析柱2次后，再将收集的上清液过层析柱，收集穿出液备用。再次用15 mL高盐缓冲液清洗层析柱从而洗脱杂蛋白，并收集洗杂液备用。依次用20、40、60、80、100、200和

500 mmol/L咪唑浓度洗脱结合在层析柱上的融合蛋白，并收集以上各浓度的咪唑蛋白洗脱液备用。洗脱完成后用超纯水冲洗填料，加入适量20%乙醇在4 ℃下保存。取少量上述离心所得沉淀，以及未诱导、上清液、穿出液、洗杂液和不同浓度咪唑蛋白洗脱液各100 μL，分别加入100 μL十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate, SDS）蛋白上样缓冲液，100 ℃加热10 min，12 000 r/min离心10 min，取上清液进行SDS-聚丙烯酰胺（polyacrylamide gel electrophoresis，PAGE）电泳检测。将提取的蛋白样品按照一定的次序加入凝胶中，每孔上样量为10 μL。80 V电泳30 min，当蛋白样品完全进入分离胶后，120 V继续电泳，直到溴酚蓝跑至分离胶底端，结束电泳。根据SDS-PAGE电泳检测结果，将能够洗脱下目的融合蛋白的对应浓度（80、100和200 mmol/L）的咪唑蛋白洗脱液合并于30 kD浓缩管中，通过超滤管以6 000 r/min离心浓缩至1.0~1.5 mL，用高盐缓冲液稀释3次，确保融合蛋白的终浓度不小于2 mg/mL，并于−80 ℃保存备用。

**1.2.3　多克隆抗血清的制备**

将1.2.2所得纯化的融合蛋白作为抗原送至北京华大蛋白质研发中心有限公司对健康的新西兰大白兔*Oryctolagus cuniculus*进行免疫，制备多克隆抗血清。各取1只体重为2 kg左右的新西兰大白兔，初次免疫400 μg抗原，之后分3次进行加强免疫，间隔时间分别为14、12和10 d，每次加强免疫量为200 μg。在免疫过程中，将抗原先用生理盐水稀释到200~500 μL，再加入等体积弗氏佐剂，初次免疫用弗氏完全佐剂，加强免疫用弗氏不完全佐剂；将溶液和佐剂混匀至油包水状态，之后在新西兰大白兔背部皮下打8~10个点进行注射免疫。在整个免疫过程完成后7 d，自新西兰大白兔的颈动脉取血，以5 000 r/min离心10 min，经过2次相同条件的离心后收集得到抗血清30 mL，即为MaYMV MP多克隆抗体Anti-$MP^{MaYMV}$。经北京华大蛋白质研发中心有限公司测定免疫效价为102 400，符合要求。

**1.2.4　农杆菌浸润接种本氏烟后瞬时表达蛋白提取**

采用农杆菌浸润接种本氏烟获得瞬时表达MaYMV MP的样品，用于对抗血清的效价、灵敏度以及特异性检测。取100 μL根癌农杆菌GV3101感受态细胞置于冰上，加入MaYMV *MP*基因克隆pMDC32-$MP^{MaYMV}$-3Flag质粒5 μL进行感受态细胞的冻融转化，筛选阳性克隆根癌农杆菌菌落，接种于10 mL含有终浓度为25 μg/mL的利福平和50 μg/mL的卡那霉素的LB液体培养基中，于28 ℃下以220 r/min摇培16 h。将获得的菌液以4 000 r/min离心10 min，弃上清液，收集菌体，加入2 mL农杆菌悬浮缓冲液（MES 1 mL、AS 50 μL、2 mol/L $MgCl_2$ 250 μL，定容至50 mL），用移液枪充分悬浮菌体，获得原菌液。取100 μL原菌液稀释至2 mL，用紫外分光光度计测定稀释液在600 nm波长下的吸光度值，换算原菌液$OD_{600\ nm}$值（$OD_{600\ nm}$测定值×20）。用根癌农杆菌原菌液稀释得到$OD_{600\ nm}$约为0.5的4 mL注射液，于室温静置3 h，用注射器的针头在适龄本氏烟的倒数第3、4、5叶片中间分别刺2个孔便于注射。用不带针头的注射器从叶背针孔处进行注射，直至注射液几乎浸润整片叶片，标记注射液浸润叶片范围。将注释后的本氏烟置于生长室继续培养，2 d后采样。取0.1 g标记范围内的不含粗壮维管组织的本氏烟叶片，置于装有0.5 mm钢珠的2 mL离心管中，液氮速冻后研磨成末。加入300 μL SDS蛋白上样缓冲液，充分混匀10 min，100 ℃下加热10 min，以12 000 r/min离心10 min，取上清液即为接种MaYMV *MP*基因克隆pMDC32-$MP^{MaYMV}$-3Flag的本氏烟叶片总蛋白样品，置于−80 ℃保存备用。采用相同方法制备接种空载体pMDC32的本氏烟叶片总蛋白样品，相同条件下保存备用。

**1.2.5　抗血清的效价检测**

利用Western blot检测抗血清的效价。分别取1.2.4制备的瞬时表达空载体pMDC32（阴性对照）和MaYMV *MP*基因克隆pMDC32-$MP^{MaYMV}$-3Flag的本氏烟叶片总蛋白样品20 μL，采用1.2.2方法对其进行SDS-PAGE检测，将凝胶中的蛋白样品通过电转化法转移至硝酸纤维膜上。称取0.5 g奶粉溶解于10 mL 1×TBST缓冲液（含pH 7.5~8.0的0.02 mol/L Tris、0.15 mol/L NaCl和0.05%吐温20）中，将携带蛋白样品的硝酸纤维膜浸入其中，37 ℃封闭1 h。分别以1∶1 000、1∶2 000、1∶4 000、1∶8 000、1∶10 000、1∶16 000、1∶32 000、1∶64 000、1∶128 000的比例向封闭液中加入MaYMV MP多克隆抗体Anti-$MP^{MaYMV}$，于37 ℃孵育1 h，用1×TBST缓冲液（含pH 7.5~8.0的0.02 mol/L Tris、0.15 mol/L NaCl和0.05%吐温20）洗膜3次，每次10 min。然后以1∶10 000的比例加入二抗Anti-rabbit IgG，于37 ℃孵育1 h，用1×TBST缓冲液（含pH 7.5~8.0的0.02 mol/L Tris、0.15 mol/L NaCl和0.05%吐温20）洗膜3次，每次10 min。准备10 mL显色缓冲液，分别加入BCIP 66 μL和NBT 66 μL，混匀后使硝酸纤维膜浸润其中，避光显色3~5 min即可观察到目标条带，其所对应的最大稀释倍数即为抗血清的效价。

1.2.6 抗血清的灵敏度检测

利用Western blot检测抗血清的灵敏度。以接种空载体pMDC32的本氏烟叶片总蛋白样品为阴性对照，将MaYMV MP多克隆抗体Anti-MP$^{MaYMV}$分别稀释2 000倍和6 000倍，获得1∶2 000和1∶6 000的抗血清，将1.2.4所得瞬时表达MaYMV *MP*的本氏烟叶片总蛋白用SDS蛋白上样缓冲液稀释4、8、16、32、64、128、256、512倍，再分别用1∶2 000和1∶6 000的抗血清进行Western blot检测，方法同1.2.5。

1.2.7 抗血清的特异性检测

利用Western blot检测抗血清的特异性。以接种空载体pMDC32的本氏烟叶片总蛋白样品为阴性对照，并采用1.2.4方法依次提取瞬时表达MaYMV *MP* 基因克隆 pMDC32-MP$^{MaYMV}$-3Flag、BrYV *MP*基因克隆pMDC32-3Flag-MP$^{BrYV}$、PLRV *MP*基因克隆pMDC32-3Flag-MP$^{PLRV}$、BYDV *MP*基因克隆pMDC32-3Flag-MP$^{BYDV-PAV}$、SABYV *MP*基因克隆pMDC32-MP$^{SABYV}$-3Flag、BLYV *MP*基因克隆pMDC32-MP$^{BLYV}$-3Flag和ScYLV *MP*基因克隆pMDC32-MP$^{ScYLV}$-3Flag的本氏烟叶片总蛋白，先用Flag标签抗血清验证各瞬时表达蛋白的存在，再将MaYMV MP多克隆抗体Anti-MP$^{MaYMV}$稀释1 000倍后对以上各蛋白进行Western blot检测，方法同1.2.5。

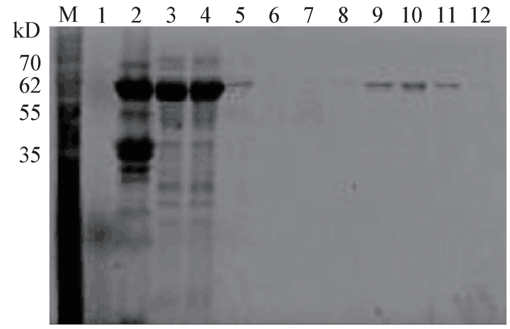
## 2 结果与分析

### 2.1 构建获得MaYMV原核表达载体

根据琼脂糖凝胶电泳结果，利用引物MaYMV MP-F/MaYMV MP-R扩增得到600 bp左右的特异性条带，符合MaYMV MP的实际大小579 bp。对筛选到的含有pDB-His-MBP-MP$^{MaYMV}$的阳性克隆进行测序，所得序列经DNAMAN比对发现与MaYMV MP序列的一致性为100%，表明已成功构建了pDB-His-MBP-MP$^{MaYMV}$原核表达载体。

### 2.2 原核表达获得纯化的融合蛋白

各蛋白样品的SDS-PAGE检测结果显示，80、100和200 mmo/L的咪唑蛋白洗脱液可以将融合蛋白成功洗脱，蛋白分子量大小为62 kD（图1）。浓缩后的蛋白样品浓度为3.5 mg/mL，满足浓度需求。



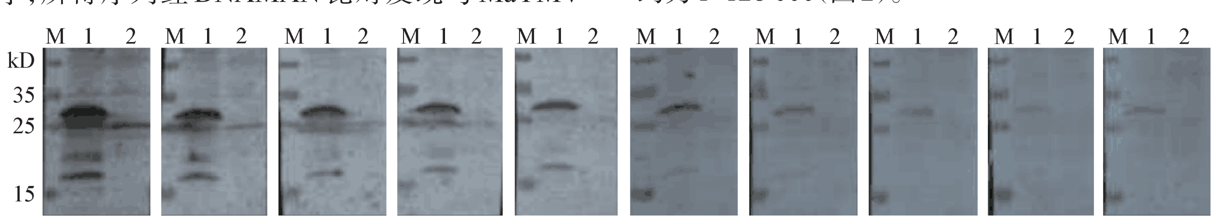

M：蛋白质分子量标记；1：未诱导；2~5：IPTG诱导大肠杆菌的上清液、沉淀、穿出液、洗杂液；6~12：浓度分别为20、40、60、80、100、200和500 mmol/L咪唑蛋白的洗脱液。M: Protein molecular weight marker; 1: non-induced bacterial lysate; 2−5: soluble extract, insoluble fraction, flow-through fraction and washes fraction from IPTG-induced lysate; 6−12: eluted MaYMV MP fusion protein with elution buffer containing imidazole concentrations of 20, 40, 60, 80, 100, 200 and 500 mmol/L, respectively.

**图1 MaYMV MP融合蛋白的SDS-PAGE分析**

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the MaYMV MP fusion protein

### 2.3 MaYMV MP抗血清的效价

Western blot检测结果显示，将MaYMV MP抗血清稀释到1∶128 000时仍然可以检测到相应蛋白条带，因此MaYMV MP抗血清Anti-MP$^{MaYMV}$的效价约为1∶128 000（图2）。




M：蛋白质分子量标记；1：在野生型本氏烟中瞬时表达的MaYMV MP蛋白；2：阴性对照。M: Protein molecular weight marker; 1: MaYMV MP proteins transiently expressed in *N. benthamiana*; 2: negative control.

**图2 MaYMV MP抗血清效价的Western blot检测**

Fig. 2 Titer of the MaYMV MP antiserum determined by Western blot

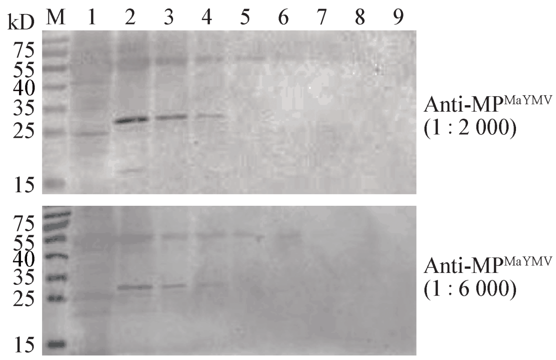
### 2.4 MaYMV MP抗血清的灵敏度

Western blot检测结果显示，将MaYMV MP抗血清Anti-MP$^{MaYMV}$稀释2 000倍时，能够检测到稀释32倍的MP$^{MaYMV}$；稀释6 000倍时，也能够检测到稀释32倍的MP$^{MaYMV}$（图3）。因此，1∶2 000和1∶6 000的MaYMV MP抗血清的灵敏度均为1∶32。

### 2.5 MaYMV MP抗血清的特异性

Western blot检测结果显示，MaYMV MP在本

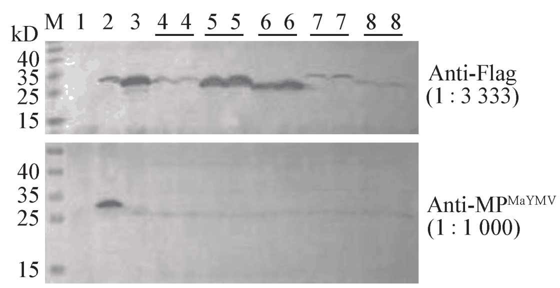
氏烟叶片中均能正常表达，MaYMV MP抗血清Anti-MP$^{MaYMV}$的稀释倍数为1 000时，能够特异性地检测到本氏烟中的MP$^{MaYMV}$，而与同属的BLYV、BrYV、PLRV、ScYLV、SABYV以及黄症病毒属的BYDV-PAV的MP均未产生血清学交叉反应（图4），表明制备的抗血清特异性良好，可用于区分MaYMV与同属的其他病毒。




M：蛋白质分子量标记；1：阴性对照；2~9：在野生型本氏烟中瞬时表达稀释浓度分别为1∶4、1∶8、1∶16、1∶32、1∶64、1∶128、1∶256、1∶512的MaYMV MP蛋白。M: Protein molecular weight marker; 1:negative control; 2−9: MaYMV MP proteins transiently expressed in *N. benthamiana* was determined by dilution of 1∶4, 1∶8, 1∶16, 1∶32, 1∶64, 1∶128, 1∶256, 1∶512.

**图3 MaYMV MP抗血清灵敏度的Western blot检测**

Fig. 3 Sensitivity of the MaYMV MP antiserum determined by Western blot




M：蛋白质分子量标记；1：阴性对照；2~8：分别为MP$^{MaYMV}$-3Flag、MP$^{BLYV}$-3Flag、3Flag-MP$^{BrYV}$、3Flag-MP$^{PLRV}$、MP$^{ScYLV}$-3Flag、MP$^{SABYV}$-3Flag和3Flag-MP$^{BYDV}$-PAV融合蛋白。M: Protein molecular weight marker; 1: negative control; 2−8: MP$^{MaYMV}$-3Flag, MP$^{BLYV}$-3Flag, 3Flag-MP$^{BrYV}$, 3Flag-MP$^{PLRV}$, MP$^{ScYLV}$-3Flag, MP$^{SABYV}$-3Flag and 3Flag-MP$^{BYDV-PAV}$ fusion proteins, respectively.

**图4 MaYMV MP抗血清特异性的Western blot检**

Fig. 4 Specificity of the MaYMV MP antiserum determined by Western blot

## 3 讨论

植物病毒病是危害植物的重要病害，不能彻底根治，因此检测并及时掌握田间作物病毒病的发生状态，对于预防该类病害的发生尤为重要。目前，病毒病的检测方法主要有症状观察、分子生物学检测、血清学检测以及电镜观察等方法（庄新建等，2020）。血清学检测操作简便，成本低廉，是最常见、应用最广泛的植物病毒病检测方法之一。利用提纯的植物病毒粒子作为抗原制备抗血清是早期常用的方法，但是病毒粒子浓度低，较难提纯。随着生物学技术的发展，基因克隆技术日渐完善，以植物病毒的某个蛋白作为抗原制备抗血清得以实现（徐品三等，2017；胡汝检等，2020；苏学思等，2021）。

本研究制备的MaYMV MP抗血清Anti-MP$^{MaYMV}$具有良好的效价和灵敏度，并且在瞬时表达体系中能够特异性地与MaYMV MP发生血清学反应，利用NCBI数据库比对了MaYMV与同属于马铃薯卷叶病毒属的BLYV、BrYV、PLRV、ScYLV、SABYV以及黄症病毒属的BYDV-PAV的氨基酸序列一致性，发现MP氨基酸序列的一致性除PLRV外均低于50%（MP$^{MaYMV}$与MP$^{PLRV}$氨基酸序列同源性为62.82%），而本试验结果也验证了MaYMV MP抗血清不能与BLYV、BrYV、PLRV、ScYLV、SABYV和BYDV-PAV发生血清学交叉反应，具有良好的特异性。MaYMV作为马铃薯卷叶病毒属的新成员，寄主范围十分广泛，近年发现其可以侵染甘蔗，本实验室制备的ScYLV MP多克隆抗血清与MaYMV MP不能发生血清学反应（刘玉姿等，2020）。对MaYMV河北分离物进行了RT-PCR和序列分析鉴定，克隆获得了含有复制酶、间隔区、外壳蛋白和MP的MaYMV cDNA克隆，与云南分离物的一致性达99%以上（李畅等，2017）。因此，本研究通过制备得到MaYMV MP多克隆抗血清，根据MaYMV抗血清的特异性检测结果，进一步验证了ScYLV与MaYMV的血清学关系，证明该MaYMV MP抗血清可以用来区别侵染禾本科作物的ScYLV与MaYMV，实现了对MaYMV的血清学检测。本研究制备MaYMV抗血清的一个主要目的是实现对田间玉米黄花叶病毒病的血清学检测，因此未来还需要使用该抗血清进行田间玉米黄花叶病毒病的检测验证，并以此对田间玉米黄花叶病毒病的发生率及严重程度展开系统调查。

## 参 考 文 献（References）

Chavez JD, Cilia M, Weisbrod CR, Ju HJ, Eng JK, Gray SM, Bruce JE. 2012. Cross-linking measurements of the potato leafroll virus reveal protein interaction topologies required for virion stability, aphid transmission, and virus-plant interactions. Journal of Proteome Research, 11(5): 2968−2981

Chen JS, Sun SR, Huang XC, Huang MT, Fu HY, Gao SJ. 2019. Molecular detection and genome sequence analysis of maize yellow mosaic virus infecting sugarcane.//Academic Annual Conference of China Society of Plant Protection in 2019. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 255 (in Chinese) [陈建生, 孙生仁, 黄小聪, 黄美婷, 傅华英, 高三基. 2019. 侵染甘蔗的玉米黄花叶病毒分子检测及基因组序列分析.//中国植物病理学会2019年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, pp. 255]

Chen S, Jiang GZ, Wu JX, Liu Y, Qian YJ, Zhou XP. 2016. Characterization of a novel *Polerovirus* infecting maize in China. Viruses, 8(5): e120

Crawford KM, Zambryski PC. 2001. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. Plant Physiology, 125(4): 1802−1812

DeBlasio SL, Xu Y, Johnson RS, Rebelo AR, MacCoss MJ, Gray SM, Heck M. 2018. The interaction dynamics of two potato leafroll virus movement proteins affects their localization to the outer membranes of mitochondria and plastids. Viruses, 10(11): e585

Fusaro AF, Barton DA, Nakasugi K, Jackson C, Kalischuk ML, Kawchuk LM, Vaslin MFS, Correa RL, Waterhouse PM. 2017. The *Luteovirus* P4 movement protein is a suppressor of systemic RNA silencing. Viruses, 9(10): e294

Hu RJ, Zhao TY, Zuo DP, Wang Y, Zhang ZY, Han CG. 2020. Antiserum preparation of the movement protein of barley yellow dwarf virus PAV Qinghai isolate and its serological relationship with other BYDVs. Acta Phytopathologica Sinica, 50(2): 141−146 (in Chinese) [胡汝检, 赵添羽, 左登攀, 王颖, 张宗英, 韩成贵. 2020. 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. 植物病理学报, 50(2): 141−146]

Ju J, Kim K, Lee KJ, Lee WH, Ju HJ. 2017. Localization of barley yellow dwarf virus movement protein modulating programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. Plant Pathology Journal, 33(1): 53−65

Li C, Sun Q, Li YY, Wang Y, Zhang ZY, Li DW, Yu JL, Han CG. 2017. Preliminary identification of maize yellow mosaic virus isolated from Hebei Province.//Academic Annual Conference of China Society of Plant Protection in 2017. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 238 (in Chinese) [李畅, 孙倩, 李源源, 王颖, 张宗英, 李大伟, 于嘉林, 韩成贵. 2017. 玉米黄花叶病毒河北分离物的初步鉴定.//中国植物病理学会2017年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, pp. 238]

Liu YZ, Zhang SK, Tian C, Zhang XY, Zuo DP, Wang Y, Zhang ZY, Han CG. 2020. Prokaryotic expression and antiserum preparation of the movement protein of sugarcane yellow leaf virus. Acta Phytopathologica Sinica, 50(6): 694−701 (in Chinese) [刘玉姿, 张绍康, 田畅, 张晓艳, 左登攀, 王颖, 张宗英, 韩成贵. 2020. 甘蔗黄叶病毒运动蛋白的原核表达和抗血清制备. 植物病理学报, 50(6): 694−701]

Mlotshwa S, Khatri N, Todd J, Tran HH, Stewart LR. 2021. First report of cDNA clone-launched infection of maize plants with the polerovirus maize yellow mosaic virus (MaYMV). Virus Research, 295: 198297

Read DA, Featherstone J, Rees DJG, Thompson GD, Roberts R, Flett BC, Mashingaidze K, Berger DK, Welgemoed T, Pietersen G, et al. 2019. First report of maize yellow mosaic virus (MaYMV) on maize (*Zea mays*) in Tanzania. Journal of Plant Pathology, 101(1): 203

Su XS, Zhang YB, Wang RY, Wang YJ, Tang GL, Jin WJ. 2021. Prokaryotic expression of Plantago asiatica mosaic virus capsid protein and preparation of its polyclonal antibody. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 33(1): 104−111 (in Chinese) [苏学思, 张玉宝, 王若愚, 王亚军, 唐国亮, 金卫杰. 2021. 车前草花叶病毒衣壳蛋白的原核表达和多克隆抗体制备. 浙江农业学报, 33(1): 104−111]

Sun SR, Chen JS, He EQ, Huang MT, Fu HY, Lu JJ, Gao SJ. 2021. Genetic variability and molecular evolution of maize yellow mosaic virus populations from different geographic origins. Plant Disease, 105(4): 896−903

Sun SR, Chen JS, Yang J, Huang XC, Huang MT, Gao SJ. 2019. First report of maize yellow mosaic virus infecting sugarcane in China. Plant Disease, 103(9): 2482

Wang JG, Hu WL, Chen SY, Li XQ, Zhang B. 2019. RT-LAMP kit for detection of maize yellow mosaic virus and its application: CN109971889A. 2019-07-05 (in Chinese) [王建光, 胡文丽, 陈穗云, 李小琴, 章彬. 2019. 玉米黄花叶病毒的RT-LAMP检测试剂盒及其应用: CN109971889A. 2019-07-05]

Welgemoed T, Pierneef R, Read DA, Schulze SE, Pietersen G, Berger DK. 2020. Next generation sequencing reveals past and current widespread occurrence of maize yellow mosaic virus in South Africa. European Journal of Plant Pathology, 158(1): 237−249

Xu PS, Song J, Zhang ZY. 2017. Prokaryotic expression of coat protein gene of lily mottle virus and preparation, application of its antiserum. Journal of Plant Protection, 44(4): 630−635 (in Chinese) [徐品三, 宋炯, 张郑瑶. 2017. 百合斑驳病毒外壳蛋白基因原核表达、抗血清制备及其应用. 植物保护学报, 44(4): 630−635]

Xue C. 2020. Research progress of plant virus detection technology. Agriculture and Technology, 40(16): 48−50 (in Chinese) [薛超. 2020. 植物病毒检测技术研究进展分析. 农业与技术, 40(16): 48−50]

Yahaya A, Dangora DB, Alabi OJ, Zongoma AM, Kumar PL. 2019. Detection and diversity of maize yellow mosaic virus infecting maize in Nigeria. Virus Disease, 30(4): 538−544

Zhang JY, He YB. 2019. Research progress of plant virus disease detection and management technology. Anhui Agricultural Science Bulletin, 25(12): 79−81, 83 (in Chinese) [张静雅, 何衍彪. 2019. 植物病毒病检测及防治技术研究进展. 安徽农学通报, 25(12): 79−81, 83]

Zhuang XJ, Xu HM, Gan HF, He Z, Liu F, Zhang K. 2020. Research progress in detection and identification methods of common wheat virus diseases in China. China Plant Protection, 40(10): 23−33 (in Chinese) [庄新建, 徐红梅, 甘海峰, 贺振, 刘芳, 张坤. 2020. 我国常见小麦病毒病检测与鉴定方法的研究进展. 中国植保导刊, 40(10): 23−33]

（责任编辑：李美娟）