

## 三种百合线状病毒的外壳蛋白抗血清制备\*

沈嘉乐<sup>1</sup>, 2 郑红英<sup>2</sup> 陈炯<sup>2</sup> 黎昊雁<sup>3</sup> 郭方其<sup>4</sup> 陈剑平<sup>2</sup>\*\*

(1 浙江大学生命科学院 杭州 310029; 2 浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所 杭州 310021; 3 浙江省出入境检验检疫局技术中心微生物室 杭州 310012; 4 浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所 杭州 310021)

摘要: 设计3对表达引物分别扩增侵染了百合无症状病毒, 百合斑驳病毒和百合X病毒的外壳蛋白基因, 并在肠杆菌中原核表达。目的蛋白切胶后免疫小鼠制备多克隆抗体。Western blot检测表明3种病毒抗血清均与目的蛋白起特异性反应, 但与阴性对照无反应。3种病毒间无交叉血清学反应。对田间栽种的百合样品ELISA检测表明, 百合无症状病毒和百合斑驳病毒LMOV和LSV均有发生, 但没有检测到百合X病毒LVX。

关键词: 百合无症状病毒; 百合斑驳病毒; 百合X病毒; 原核表达; 血清学

中图分类号: s432.41 文献标识码: A 文章编号:

The Preparation of Antisera to the Coat Proteins of three filamentous viruses infecting lily plants

SHENG Jia-Le<sup>1,2</sup>, ZHENG Hong-Ying<sup>2</sup>, CHEN Jiong<sup>2</sup>, LI Hao-yan<sup>3</sup>, GUO Fangqi<sup>4</sup>, CHEN Jian-ping<sup>1</sup>\*\*

(1. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, P.R.China; 2. Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, P.R.China; 3. Technical Center, Microorganism Examination Lab, Zhejiang Entry and Exit Inspection Quarantine Bureau, Hangzhou 310021, P.R.China; 4. Institute of Crop Science and Utilization of Atomic Energy, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, P.R.China)

Abstract: The specific primers were designed to amplify the coat protein genes of Lily symptomless virus (LSV, genus Carlavirus), Lily mottle virus (LMOV, genus Potyvirus) and Lily virus X (LVX, genus Potexvirus) respectively. The plasmids containing CP genes were constructed and prokaryotic expressed in E.coli. The antisera specific to the CPs were subsequently prepared. ELISA results showed that LSV and LMOV were detected from lily plants in Zhejiang province, China. LVX was not detected.

Key words: Lily symptomless virus; Lily mottle virus; Lily virus X; Prokaryotic expression; ELISA

百合 (*Lilium* spp.) 为百合科百合属多年生宿根植物, 又名野百合、药百合。百合除传统药用、食用和提取精外, 同时也是名贵的高档观赏花卉。由于长期的营养繁殖, 病毒在球茎中积累, 严重影响品质, 种质退化, 使百合经济价值遭受很大损失。在国内外目前报道的10余种百合病毒中。百合斑驳病毒 (Lily mottle virus, LMOV) 和百合无症状病毒 (Lily symptomless virus, LSV) 是其中分布和发生最为普遍的线状植物病毒, 也是我国公布的三类禁止入境检疫有害生物。LMOV为马铃薯Y病毒属 (Potyvirus) 成员, 可引起病叶出现叶面斑驳、叶片分叉扭曲、花变形、蕾不开或产生坏死斑等[1]。LSV为香石竹潜隐病毒属 (Carlavirus) 成员, 单独侵染时一般不会造成明显症状, 但会造成百合采后下部叶片提前黄化, 影响瓶插寿命; 与黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) 或LMOV复合侵染时, 可造成脉明、花叶、畸形、坏死斑等症状, 严重影响百合的观赏价值和产量[2,3,4,5]。百合X病毒 (Lily virus X, LVX) 为马铃薯X病毒属 (Potexvirus) 成员, 单独侵染百合无病, 与其它病毒复合侵染时可造成黄条纹、叶畸形、矮化, 有的早熟而死[6]。目前, 百合上的病毒病已引起人们的广泛关注, 国内的研究主要着重于对百合病毒病原的检测方法的探讨[7,8,9,10], 本文通过原表达LSV、LMOV和LVX的外壳蛋白 (Coat protein, CP) 基因, 制备了相应的抗血清, 并应用该抗血清对部分引种进口百合样品进行了ELISA检测, 为进一步开展病害的检测和防治工作奠定了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 植物材料: 进口百合样品分别由浙江杭州虹越花卉有限公司和浙江省金华市农科院提供。

1.1.2 酶及试剂: QIAquick Gel Extraction试剂盒购自QIAGEN公司, SDS-PAGE 低分子量蛋白标准购自中国科学院上海生物化学研究所, Ex Taq DNA聚合酶、Nde I和Bam HI购自Takara公司, T4 DNA连接酶购自New England Biolabs公司, pSBET原核表达载体由德国麻浦作物研究所Hans-Henning Steinbiss教授赠送, 羊抗鼠IgG (碱性磷酸酶共价结合)、5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸(BCIP)和氮蓝四唑(NBT)购自Sigma公司, 其余药品试剂均为进口分析纯。插入有LSV、LMOV和LVX基因组3'-端序列(包括全长CP基因)的质粒pGEM-LSV-3t、pGEM-LMOV-3t和pGEM-LVX-3t由本实验室保存。

#### 1.2 原核表达载体的构建和外源基因的诱导表达

根据已发表的LSV、LMOV和LVX序列[11,12]分别设计表达引物对LSV-CPe(+): 5'- CCA TAT GCA ATC AAG ACC ACA ACA A -3'和LSV-CPe(-): 5'- GGG ATC CTC ATC CAT TAT TTG CGT ATC GA -3'; LMOV-CPe(+): 5'- CCA TAT GAA TG, GAC ACT CAA TGC TGG AG -3'和LMOV-CPe(-): 5'- GGG ATC CTT ACA TAG AAA TTC CAA GTA AGG -3'; LVX-CPe(+): 5'- CCA TAT GAC GAC CTT TGT TCC TGA CG -3'和LVX-CPe(-): 5'- GGG ATC CCT AGG GTG GGG ACA GTA G -3', (+)为扩增上游引物, 5'-端均分别引入Nde I识别位点序列, (-)为扩增下游引物, 5'-端均分别引入Bam HI识别位点序列。分别以质粒pGEM-LSV-3t、pGEM-LMOV-3t和pGEM-LVX-3t为模板, PCR扩增相应病毒的全长CP基因, 预期大小的扩增产物经1% (w/v)琼脂糖凝胶电泳分离后用QIAquick Gel Extraction试剂盒回收, 方法参照厂家说明纯化产物用Nde I和Bam HI双酶切后插入到同样双酶切的原核表达载体pSBET中, 在大肠杆菌BL21(DE3)plysS菌株中用IPTG诱导表达目的基因, SDS-PAGE分离后用考马斯亮蓝R-250染色检测蛋白表达情况。

#### 1.3 抗血清的制备和Western blot分析

能正确表达外源基因的大肠杆菌经裂解后用12% SDS-PAGE和5%-20%的梯度胶二次分离, 0.25 mol/L KCl染色后切下目的蛋白条带免疫小鼠制备抗血清。Western blot检测抗血清特异性, 一抗为原核表达制备的抗血清二抗为羊抗小鼠IgG (碱性磷酸酶共价结合), BCIP/NBT显色, 方法参照文献[13]描述。

#### 1.4 田间样品的间接ELISA法检测

用间接ELISA法检测从荷兰引种入浙江省的进口百合样品, 共72株, 检测田间栽种的浙江本地食用百合样品30株, 方法参照文献[14]。

■热门文章

■最新更新

## 2 结果

### 2.1 3种百合线状病毒外壳蛋白基因的原核表达

LSV、LMoV和LVX外壳蛋白基因特异性扩增产物经Bam HI和Nde I双酶切后，分别插入到同样酶切的pSBET载体中，构建成原核表达质粒pSB-LSV-CP、pSB-LMoV-CP和pSB-LVX-CP，转化大肠杆菌BL21(DE3)pLysS菌株，经IPTG诱导，SDS-PAGE检测发现分别在32kDa、31kDa和22kDa处出现特异性表达条带，大小与序列分析推断的结果（分别为32.0kDa、30.6kDa和21.6kDa）相似（图1）。将这些片段切胶纯化后分别免疫小鼠，制备抗血清。

### 图1 百合无症病毒、百合斑驳病毒和百合X病毒外壳蛋白基因的原核表达产物SDS-PAGE分析

M: 蛋白质分子量标准，大小(kDa)在图左标示；1: pSB-LSV-CP转化的BL21 pLysS菌经IPTG诱导后的裂解物；2: pSB-LMoV-CP转化的BL21 pLysS菌经IPTG诱导后的裂解物；3: pSB-LVX-CP转化的BL21 pLysS菌经IPTG诱导后的裂解物；4: pSBET空载体转化的BL21(DE3) pLysS菌经IPTG诱导后的裂解物，阴性对照。

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the lysates of pSB-LSV-CP, pSB-LMoV-CP and pSB-LVX-CP transformed BL21(DE3) pLys S induced by IPTG. M: Molecular weight markers for protein. Positions of protein size markers (kDa) are shown on the left.; 1: pSB-LSV-CP transformed BL21(DE3) pLys S induced by IPTG; 2: pSB-LMoV-CP transformed BL21(DE3) pLys S induced by IPTG; 3: pSB-LVX-CP transformed BL21(DE3) pLys S induced by IPTG; 4: pSBET vector transformed BL21 (DE3) pLys S induced by IPTG was used as the negative control.

### 2.2 抗血清的Western blot检测

抗血清特异性的Western blot检测表明各抗血清分别与自身相关表达产物有强的特异性免疫反应，而与阴性对照无反应（图2），3种抗血清间无交叉反应。

图2 百合斑驳病毒(a)、百合X病毒(b)和百合无症病毒(c)外壳蛋白抗血清的Western blot分析. M: 蛋白质分子标准，大小(kDa)在图左标示；1, 3和5: 转化有pSBET载体的BL21(DE3)pLysS菌裂解物，阴性对照；2: 转化有pSB-LMoV-CP的BL21(DE3)pLysS菌裂解物；4: 转化有pSB-LVX-CP的BL21(DE3)pLysS菌裂解物；6: 转化有pSB-LSV-CP的BL21(DE3)pLysS菌裂解物。

Fig. 2 Western blot analysis on the antiserums raised to the coat proteins of Lily mottle virus(a), Lily virus X(b) and L symptomless virus(c) respectively.M: molecular weight marker of proteins. Positions of protein size markers (kDa) are shown on the left. 1,3 and 5: Lysis of BL21(DE3)pLysS transformed with pSBET as the negative control; 2: Lysis of BL21(DE3)pLysS transformed with pSB-LMoV-CP; 4: Lysis of BL21(DE3)pLysS transformed with pSB-LVX-CP; 6: Lysis of BL21(DE3)pLysS transformed with pSB-LSV-CP.

### 2.3 田间百合样品的ELISA检测

用制备的LSV、LMoV、LVX抗血清检测从荷兰引种入浙江省的72个进口百合样品，其中LMoV抗血清检测9个样品呈阳性，63个样品呈阴性，阳性检出率为12.5%；LSV抗血清检测6个样品呈阳性，66个样品呈阴性，阳性检出率为8.3%，且这6个样品均同时被LMoV侵染。检测田间栽种的浙江本地食用百合样品30株，其中LMoV抗血清检测26个样品呈阳性，4个样品呈阴性，阳性检出率为86.7%；LSV抗血清检测13个样品呈阳性，17个样品呈阴性，阳性检出率为43.3%，并且这13个阳性样品均同时感染LMoV。所有样品用LVX抗血清检测均为阴性。

## 3 讨论

百合作为一种高经济价值作物在产业结构调整 and 效益农业发展中深受重视，随着我国百合引种数量和种植面积的迅速扩大，及不规范的种球自繁，病毒病害的发生流行也日趋严重。为害百合最重的病毒主要为LSV、CMV、LMoV，这3种病毒往往表现为其中2种或3种共同侵染百合。据Bellardi(2002)报道，在其检测的百合鳞茎中，LSV的带毒率为100%。LSV+CMV的带毒率为42%~54%[15]。近年来我们对浙江省萧山、金华、海宁、绍兴等地区几个百合种植区的线状病毒的分子鉴定研究表明，部分引进品种如元帅、爱玛、西伯利亚等上存线状病毒的侵染，并且多数为混合侵染。由于这些线状病毒的粒子形态和寄主范围等特征上很相似，采用常规方法分离病毒提纯病毒比较困难，很难获得单一的纯病毒粒子用来制备特异性抗血清，通过原核表达的方法，可以在相当程度上避免因病毒不纯和寄主植物蛋白干扰等因素导致的抗血清非特异性反应的一些问题。检测表明，LMoV和LSV在浙江栽种的本地食用百合样品上感染率远高于进口百合样品，这可能是由于进口百合品种一般在出口国为脱毒组培大规模繁殖，引入国内时也经过病毒检测，因此相关病毒的检出率很低。而那些检出病毒的进口百合样品也不排除在国内培育时受病毒侵染的可能性。显然，国内食用百合品种需切实加强脱毒组培研究以提高品质。LVX目前在国内百合上还没有报道发生，引进品种时应加强对该病毒的检疫。

## 参考文献

- [1] Derks AFLM, Lemmers MEC, van Gemen BA. Lily mottle virus in lilies: characterization, strains and its differentiation from tulip breaking virus in tulips[J] Acta Hort (ISHS) 1994,377: 281-288.
- [2] 刘文洪, 洪健, 陈集双, 王冲, 叶美琴. 百合斑驳病毒浙江分离物的基因组3'端序列分析[J], 微生物学报, 2004,44(3): 386 - 389.
- [3] 刘文洪, 洪健, 陈集双, 叶美琴. 百合病毒病原的检测诊断[J], 电子显微学报, 2004,23(3): 225-228
- [4] 沈淑琳. 百合病毒病及其检验. 植物检疫, 1996, 10(4):223-226.
- [5] 杨佐琦, 林俊义, Zettler FW, 等. 百合潜在性病毒病害之鉴定及诊断[J]. 植物保护学会会刊, 1993,35(2):95-103.
- [6] Kimura S, Goto M, Saito N. Detection of lily virus X (LVX) from several lily cultivarities grown in Japan[J]. Resear Bulletin of Plant Protection Service (Japan), 1990, 26:79-81.
- [7] 王进忠, 贾慧, 文思远, 等. 百合病毒的DNA芯片检测技术研究[J].中国病毒学, 2005, 20(4):429-433.
- [8] 贾慧, 王进忠, 陈忠斌, 等. 百合病毒检测技术研究进展[J], 北京农学院学报, 2004,19(4):73-76.
- [9] 丁元明, 王继华, 刘忠善, 等.应用特异引物和简并引物检测百合斑驳病毒[J], 植物检疫, 2004, 18(3):134-136.
- [10] 王继华, 瞿素萍, 孔宝华, 等. 百合无症病毒的RT-PCR和IC-RT-PCR检测[J], 云南农业大学学报, 2004 19(2):148-150.
- [11] Zheng HY, Chen J, Zhao MF, et al. Occurrence and sequences of Lily mottle virus and Lily symptomless virus in plants grown from imported bulbs in Zhejiang province, China[J]. Archives of Virology, 2003,148(12): 2419 - 2428.
- [12] Chen J, Shi YH, Adams MJ, et al.. The complete sequence of the genomic RNA of an isolate of Lily virus X (genus Potexvirus) [J]. Archives of Virology, 2005, 150(4): 825 - 832.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M], 2nd ed.1989, Cold Spring Harbor

Laboratory, New York.

[14] 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998,p.414-417.

[15] Bellardi-MG, Nanni-G, Bertaccini A. et al. Old and new viruses of lily in Italy[J]. Acta Horticulturae. 2002, 568:215-220.

编辑: 作者: 来源: 加入日期: 2006-1-6 10:15:

[发送给好友](#)

■[相关链接](#)

- [对稻曲病菌T-DNA插入突变体若干生物学性状的分析](#)
- [中国番茄黄化曲叶病毒DNA \$\beta\$ 缺失突变体与异源病毒的互作研究](#)
- [常见杀菌剂的药害及其控制](#)
- [弱筋小麦不同栽培条件与赤霉病的发生](#)
- [西瓜炭疽病菌Colletotrichum orbiculare的分子检测\\*](#)
- [烯啶醇对辣椒和番茄的影响](#)
- [农杆菌介导的黄瓜炭疽菌遗传转化](#)
- [三种百合线状病毒的外壳蛋白抗血清制备\\*](#)

江苏省植物  
病理学会

Copyright ? 2003, 江苏省植物病理学会. All rights reserved.

南京 钟灵街50号

联系电话: 025-4390383

电子邮件: xhzjx@ipp.jaas.ac.cn