

# 落葵皱缩花叶病毒 CP 基因的原核表达及多克隆抗血清的制备

李小琴<sup>1</sup>, 张鹏远<sup>1,2</sup>, 任龙辉<sup>1,3</sup>, 代瑾然<sup>1</sup>, 王建光<sup>1,\*</sup>, 陈穗云<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>云南大学生命科学学院, 昆明 650091; <sup>2</sup>西南林业大学生命科学学院, 昆明 650224; <sup>3</sup>云南香料烟有限责任公司, 云南保山 678000)

**摘要:** 以感病紫茉莉叶片为材料, 采用 RT-PCR 方法克隆落葵皱缩花叶病毒 (*Basella rugose mosaic virus*, BaRMV) 的外壳蛋白 (coat protein, CP) 基因, 并构建 pET30a-BaRMV-*cp* 原核表达载体。将原核表达载体转化大肠杆菌 [Rosetta(DE3)PlysS], 成功诱导表达得到大小约为 40.0 kD 的与预期大小相符的融合蛋白 (His-CP)。SDS-PAGE 电泳完毕后用 0.25 mol · L<sup>-1</sup> 的 KCl 溶液染色, 将目的蛋白切胶纯化后免疫新西兰大白兔, 制备抗血清。间接酶联免疫吸附法 (ID-ELISA) 检测该抗体的效价为 1 : 16 000, Western-blotting 分析表明该抗体具有很强的特异性。对野外感病紫茉莉和实验室内接种发病本氏烟检测结果也表明, 所制备的抗体具有良好的特异性, 可用于大规模样品检测。

**关键词:** 落葵皱缩花叶病毒; 紫茉莉; *cp* 基因; 多克隆抗血清; ID-ELISA; 蛋白质印迹法

**中图分类号:** S 681.9

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 10-2001-07

## Prokaryotic Expression of *Basella rugose mosaic virus* CP Gene and Preparation of Its Polyclonal Antiserum

LI Xiaoqin<sup>1</sup>, ZHANG Pengyuan<sup>1,2</sup>, REN Longhui<sup>1,3</sup>, DAI Jinran<sup>1</sup>, WANG Jianguang<sup>1,\*</sup>, and CHEN Suiyun<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China; <sup>2</sup>School of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; <sup>3</sup>Yunnan Oriental Tobacco Co., Ltd., Baoshan, Yunnan 678000, China)

**Abstract:** The full length *cp* gene of *Basella rugose mosaic virus* (BaRMV) was obtained by RT-PCR in the infected *Mirabilis jalapa* L. leaves and the prokaryotic expression vector of BaRMV *cp* gene was successfully constructed also. The pET30a-BaRMV-*cp* vector was transferred into Rosetta(DE3)PlysS. SDS-PAGE results indicated that the His-CP fusion protein was about 40.0 kD in size, which was in accord with the prediction. Target proteins were isolated by cutting the gel slices that contained the 40.0 kD bands which were stained by 0.25 mol · L<sup>-1</sup> KCl. Purified fusion protein was used to immunize New Zealand white rabbits to produce the antiserum. The polyclonal antiserum was detected with indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ID-ELISA), the titer of the antiserum was 1 : 16 000, Western-blotting analysis showed that the antiserum has very strong specificity. Detected the field susceptible *M. jalapa* L.

**收稿日期:** 2017 - 07 - 04; **修回日期:** 2017 - 10 - 13

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31101416, 31660038)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jgwangyn@yeah.net; chensuiyun@ynu.edu.cn)

and the laboratory inoculated and infectious *Nicotiana benthamiana* L. by the antiserum, the test result also showed that the prepared antiserum has good specificity and can be used for large-scale sample testing.

**Keywords:** *Basella rugose mosaic virus* (BaRMV); *Mirabilis jalapa*; coat protein gene; polyclonal antiserum; ID-ELISA; Western blotting

落葵皱缩花叶病毒 (*Basella rugose mosaic virus*, BaRMV) 属于马铃薯 Y 病毒科 (Family *Potyviridae*) 马铃薯 Y 病毒属 (Genus *Potyvirus*) 成员 (King et al., 2012)。该病毒为单链正义 RNA 病毒, 基因组大小为 9 804 bp (NC\_009741.1), 病毒粒子为弯曲线状 (Huang & Chang, 2006)。BaRMV 是 2006 年在中国台湾省种植的落葵属 (*Basella* L.) 植物上发现并命名的 (Huang et al., 2006), 随后在白鹤芋 (Ha et al., 2008)、蝴蝶兰 (Zheng et al., 2008) 和紫茉莉 (Wang et al., 2012) 等自然寄主上也相继发现了该病毒。实验室接种试验表明, 该病毒还能侵染苋色藜、昆诺藜、本氏烟、克利夫兰烟等植物, 寄主植物广泛。不同的寄主在被 BaRMV 侵染后表现出不同的症状, 主要有花叶、皱缩和斑驳等症状, 特别是幼叶被侵染后症状表现的尤为明显, 幼叶生长畸形, 严重影响植株的生长。

紫茉莉 (*Mirabilis jalapa* L.) 原产于美洲, 18 世纪作为观赏植物引进中国 (徐海根和强盛, 2004)。其生长迅速, 繁殖能力和抗逆性强, 还具有化感作用和化学防御性, 抑制周边植物的生长, 在进入中国后迅速扩张, 很快在全国各地都实现了分布, 其主要生长在田间和庭院, 严重影响农业生产, 是中国的一种重要的外来入侵植物 (马金双, 2014)。紫茉莉作为 BaRMV (Wang et al., 2012) 的自然寄主, 在该病毒的扩散传播中起到重要的作用, 因此如何进行该病毒的大量检测, 监测该病毒的传播, 在农业生产上具有非常重要的意义。

本试验中根据前期报道的 BaRMV-MJ 分离物 3'端基因组序列 (GenBank No. JN250997) (Wang et al., 2012) 设计特异引物扩增获得 BaRMV 完整的 *cp* 基因序列并制备该病毒外壳蛋白多克隆抗血清, 以期为 BaRMV 快速检测和调查监测提供便利。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

感病紫茉莉叶片于 2015 年采自云南省昆明市, BaRMV 接种本氏烟样品由本实验室接种并保存; 大肠杆菌 (DH5 $\alpha$ ) 菌株、原核表达用菌株 Rosetta(DE3)PlysS 和原核表达载体 pET-30a 均由本实验室保存。克隆载体、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司; PCR 相关扩增酶均购自北京全式金公司; IPTG、羊抗兔 IgG 二抗等均购自 Sigma 公司; 质粒抽提试剂盒、胶纯化回收试剂盒和间接 ELISA 检测试剂等购自北京天根生物公司; 引物由广州英骏公司合成, 序列测定由昆明铂尚生物公司完成。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 紫茉莉叶片总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

紫茉莉叶片总 RNA 用 Trizol 法提取 (具体方法参照试剂使用说明)。以 M4T[5'-GTTTTCCCA GTCACGAC(T)15-3'] 为引物进行反转录合成 cDNA。轻微混匀后保存于 -80 °C。

### 1.2.2 pET30a-BaRMV-*cp* 原核表达载体的构建

根据已报道的 BaRMV 紫茉莉分离物 (MJ) 序列 (GenBank 登录号 No. JN250997) 设计引物, 在上、下游引物 5'端分别引入 *EcoR* I 和 *Hind*III 酶切位点, 并加入保护碱基 GGA 和 CCG, BaRMVCP-F: 5'-GGAGAATTCATGTCAAGTAGTGCAGCAGCAAG-3'; BaRMVCP-R: 5'-CCGAAGC TTGCCCTGATTAACGCCCATCA-3' (下划线部分为酶切位点)。

以 cDNA 为模板, 采用北京全式金公司提供的 EasyTaq<sup>®</sup> DNA 聚合酶扩增体系方法进行 PCR 扩增。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 利用胶纯化回收试剂盒进行样品的纯化和回收。将回收片段与 pMD19T-Simple 克隆载体连接转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 通过蓝白斑筛选及菌液 PCR 扩增验证后, 提取 pMD19T-*cp* 阳性单克隆质粒进行 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切。回收目的片段 *cp* 基因并与同样经 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切的表达载体 pET30a 进行连接, 转化表达菌 Rosetta(DE3)PlysS, 经菌液 PCR 和双酶切验证并测序, 获得 pET30a-BaRMV-*cp* 阳性克隆。

### 1.2.3 pET30a-BaRMV-*cp* 基因原核表达、BaRMV CP 蛋白提取及抗血清制备

挑取 pET30a-BaRMV-*cp* 阳性克隆进行原核表达条件的优化。首先在设定温度为 37 °C, 转速为 220 r·min<sup>-1</sup> 的摇床中过夜培养获得一级菌, 然后按 1:100 接菌至 500 mL 2 $\times$  YT 培养基中继续培养二级菌培养至 OD<sub>600</sub> 约 0.6, 最后分别在不同诱导表达温度 (25、28、30、和 37 °C)、不同时间 (0、2、4 和 6 h) 和不同诱导 IPTG 浓度 (0.2、0.4、0.6 和 0.8 mmol·L<sup>-1</sup>) 进行试验, 获得最佳诱导条件。pET30a-BaRMV-*cp* 原核表达总蛋白通过 SDS-PAGE 电泳进行分离, 利用 KCl 染色后切胶纯化方法简单快速获得免疫注射用蛋白 (高慎阳 等, 2010)。根据 Hu 等 (2002) 的方法采用两次注射抗原加强免疫的方法, 分别对两只新西兰大白兔 (A、B) 进行免疫, C 兔免疫等量缓冲液作为对照, 最后得到 BaRMV *cp* 基因的多克隆抗血清。

利用 Western-blotting 对抗血清的特异性进行检测。Western-blotting 具体操作步骤如下: ①转膜: SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白后, 将凝胶中的蛋白进行转膜试验, 转移至 PVDF 膜。②封闭: 小心取出 PVDF 膜, 用 Buffer B 洗膜 3 次后放入 Buffer C 中室温条件下浸泡 1 h, 进行封闭。③孵育一抗: 用 Buffer D 配置一抗, 同时将一抗按 1:2 000 ~ 1:4 000 的效价进行稀释成一抗孵育液备用; 用 Buffer B 洗膜 3 次后放入孵育液中, 室温振荡孵育 1 h 后 4 °C 过夜孵育。④孵育二抗: 用 Buffer E 将 HRP-conjugated 2nd antibody 按 1:25 000 的效价稀释成二抗孵育液备用; 用 Buffer B 洗膜 3 次后放入孵育液中, 室温振荡孵育 1 h。⑤压片显影: 用 Buffer A 洗膜 3 次后放入检测反应液中轻摇 1 min 取出, 吸去膜上的多余检测反应液, 用保鲜膜将膜包好后于 X 光片夹中曝光 0.5 ~ 10 min, 取出 X 光片, 显影 5 ~ 10 min, 定影 5 min, 清水冲洗后风干, 扫描拍摄。

利用间接酶联免疫 (ID-ELISA) 法对得到的抗血清进行效价评估 (徐宜为, 1997), 并利用 ID-ELISA 对样品植株进行检测。ID-ELISA 具体操作如下: ①抗原包被: 酶标板每孔加入 100  $\mu$ L 包被抗原 (蛋白质浓度为 10  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>), 4 °C 过夜, 洗板。②封闭: 加封闭液, 每孔 200  $\mu$ L, 37 °C 封闭 1 h, 洗板。③加样: 对照孔加入阴性血清, 其余各列孔加入待检血清, 从 1:100 倍比稀释后梯度加入, 每孔 100  $\mu$ L, 37 °C 孵育 1 h, 洗板。④加二抗: 每孔加入 10  $\mu$ L AP 标记的羊抗兔抗体 (1:800 稀释), 37 °C 反应 2 h, 洗板。⑤显色: 每孔加入新鲜配制的 TMB 显色液, 加 150  $\mu$ L 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 37 °C 反应 20 min。⑥终止反应: 每孔加入 50  $\mu$ L 终止液 (2 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 以终止反应。⑦结果分析: 可直接观察反应颜色 (蓝色) 来判断, 或者测定各孔 OD<sub>450 nm</sub> 值来进行判断。

## 2 结果与分析

### 2.1 原核表达载体 pET30a-*cp* 的构建与鉴定

以 BaRMVCP-F 和 BaRMVCP-R 特异引扩增获得与预期大小一致的完整的 BaRMV-*cp* 基因(843 bp), 切胶回收后连接至 pMD19T-Simple 克隆载体, 转化 DH5 $\alpha$  培养, pMD19T-*cp* 阳性克隆质粒经双酶切(图 1, a) 后获得目的片段 *cp* 基因, 将目的片段连接至同样经 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切的 pET30a 表达载体, 转化 Rosetta(DE3)PlysS 培养, 提取 pET30a-BaRMV-*cp* 阳性克隆质粒通过双酶切(图 1, b) 和测序(图 2), 结果表明构建的 pET30a-BaRMV-*cp* 重组原核表达载体正确, 可用于后续的诱导表达。

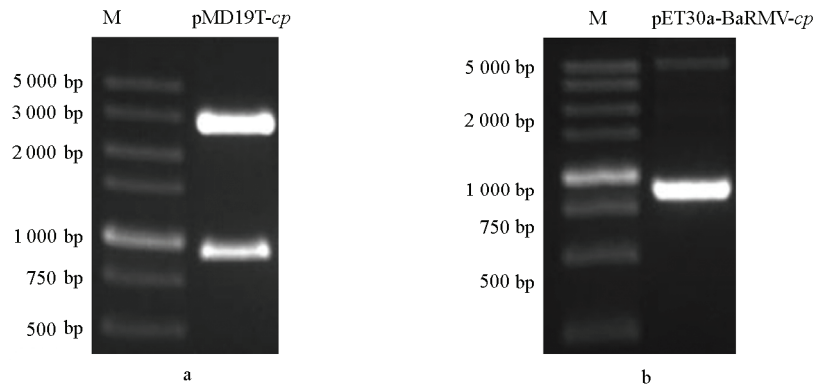


图 1 pMD19T-*cp* 克隆质粒 (a) 和 pET30a-BaRMV-*cp* 表达质粒 (b) 的 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切鉴定

Fig. 1 Both pMD19T-*cp* vector (a) and pET30a-BaRMV-*cp* vector (b) were digested with *EcoR* I / *Hind*III  
 M: Marker DL5000.

模板中 In templet	ATGTCAAGTAGTGCAGCAGCAAGCTCAAGTCCGCGAGACACAGGTGCAGGGACAGCAAAGTCAACCAGCGAGCATAAATGC	80
表达载体中 In vector	-----t-----c-----	80
模板中 In templet	TGGACAGAACCCACAGGTACAACGGAAAAACGCAAGGTGATGTGATTCAACATGATGCAAGCCAGGCTCAGGACATTGGTA	160
表达载体中 In vector	-----a-----t-----	160
模板中 In templet	GAGTAAGTTACTCAGTCCCAAGGCTCAAATCAATCTCAAAGATGCGCTTACCCAAGGTTAAGGGGAAAGTCATTCTCGCT	240
表达载体中 In vector	-----	240
模板中 In templet	CTAGACCATATACTTGATTATAAGCCAGACCAGCTCGATTGTCAAACACAAGGGCAACTCATGAACAGCTCGCAACTTG	320
表达载体中 In vector	-----	320
模板中 In templet	GTACGAAGCAATCATGAATGAGTATGAAGTCTCTGAGAGCCAAATGGGAATCCTCATGAATGGCCTGATGACATGGTGCA	400
表达载体中 In vector	-----	400
模板中 In templet	TCGAAAAATGGAACATCACCTAATTTAAATGGAGAATGGGTCATGATGGATGGTGATGAGCAAGTGCATATCCTTTGAAG	480
表达载体中 In vector	-----a-----	480
模板中 In templet	CCAGTTATTGAGAATGCGAAACCTTCGTTTCGTCAAATCATGCATCACTTCTCAGATGCAGCAGAAGCGTATATTGAGAT	560
表达载体中 In vector	-----	560
模板中 In templet	GCGCAATAAAGAGAAACCGTACATGCCTCGGTATGGTTTGATAAGAAATTTGAGAGACATGTCGCTAGCCCGGTATGCAT	640
表达载体中 In vector	-----	640
模板中 In templet	TTGACTTTTATGAAATCAATTCACGAACACCGGCTCGTGCCAAAGAAGCAATTATGCAAATGAAAGCGGCAGCTCTTACT	720
表达载体中 In vector	-----t-----	720
模板中 In templet	AACGTTTCTAATAAACTATTTGGTTGGATGGAACGTAGCCACTACAACGGAAGACTGAGAGGCACACGGCATCTGA	800
表达载体中 In vector	-----	800
模板中 In templet	TGTTAATGCCCGCATGCATCACTTGATGGGCGTTAATCAGGGC	843
表达载体中 In vector	-----	843

图 2 连接到 pET30a 表达载体中 *cp* 基因序列与模板中 *cp* 基因序列比较

Fig. 2 Comparison of *cp* gene sequence in templet with *cp* gene sequence in pET30a expression vector

## 2.2 pET30a-BaRMV-*cp* 基因的诱导表达及检测

经 ExPASy 预测 pET30a-BaRMV-*cp* 表达质粒的原核表达蛋白的大小, 该表达的融合蛋白大小约为 40.0 kD。对 pET30a-BaRMV-*cp* 融合蛋白在不同温度、不同 IPTG 浓度、不同诱导时间下进行诱导, 试验初步确定 pET30a-BaRMV-*cp* 融合蛋白原核表达的最优诱导条件是: 28 °C、IPTG 终浓度为 0.8 mmol · L<sup>-1</sup> 和 6 h (试验结果未显示)。

在最优条件下进行 pET30a-BaRMV-*cp* 融合蛋白的诱导, 经 12% SDS-PAGE 分离, 检测表明, 单独的 Rosetta(DE3)PlysS 表达菌、经 IPTG 诱导转化的 pET30a 空载体表达菌和未经 IPTG 诱导的 pET30a-BaRMV-*cp* 表达菌, 均无特异性的表达条带, 而经 IPTG 诱导的 pET30a-BaRMV-*cp* 表达菌有一条与预期大小一致的融合蛋白条带 (His-CP), 说明该原核表达载体构建正确, 并能表达出正确的融合蛋白 (图 3)。

## 2.3 融合蛋白抗血清制备及其 Western-blotting 法检测和 ID-ELISA 法效价测定

对原核表达 pET30a-BaRMV-*cp* 融合蛋白利用 KCl 染色切胶纯化方法简单快速获得免疫注射用蛋白 (高慎阳 等, 2010)。将获得的蛋白分别免疫 2 只新西兰大白兔 (A, B) 后制备得到 BaRMV CP 多克隆抗血清。经间接酶联免疫 (ID-ELISA) 方法分别测定抗血清的效价, 免疫 B 家兔的血清效价为 1 : 16 000, 该多克隆抗血清可用于后续试验。将所制备的多克隆抗血清按 1 : 16 000 稀释, 对诱导培养的融合蛋白进行 Western-blotting 检测, 结果在目的蛋白的位置有明显的杂交带 (图 4), 同时, 感病植株叶片的 Western-blotting 检测也有明显的特异性杂交条带 (图 5), 说明制备的多克隆抗血清能够与目的蛋白发生抗原—抗体特异性的识别反应。

## 2.4 不同 BaRMV 感病样品的 ID-ELISA 检测

将制备的抗血清稀释 500 ~ 16 000 倍后, ID-ELISA 检测最佳抗血清工作浓度。检测结果表明将抗血清稀释到 1 000 ~ 8 000 倍之间具有较好的检测效果 (试验结果未显示)。

为了进一步验证该抗血清的检测效果, 将抗血清稀释到 1 000 倍对 5 个感病紫茉莉样品和 16 个 BaRMV 接种本氏烟样品进行了检测, 结果表明: 除阴性对照和空白对照外, 其他所有检测样品均呈现出蓝色, 说明感病紫茉莉样品和 BaRMV 接种本氏烟样品检测结果均为阳性, 初步判断均被 BaRMV 所侵染 (图 6)。

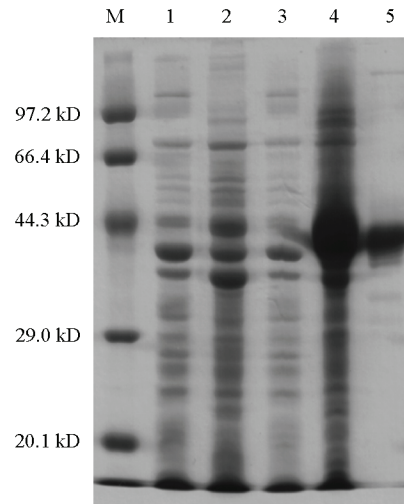
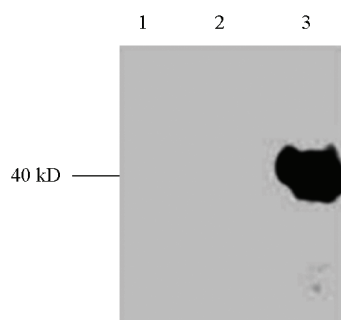


图 3 重组 pET30a-BaRMV-*cp* 的原核表达分析

1: Rosetta(DE3)PlysS 菌; 2: 诱导 pET30a 菌; 3: 未诱导 pET30a-BaRMV-*cp* 菌; 4: 诱导 pET30a-BaRMV-*cp* 菌; 5: KCl 染色切胶回收融合蛋白; M: Marker。

Fig. 3 Analysis of prokaryotic expression products of pET30a-BaRMV-*cp*

1: Rosetta(DE3)PlysS; 2: Protein from induced pET30a by IPTG; 3: Protein from uninduced pET30a-BaRMV-*cp*; 4: Protein from induced pET30a-BaRMV-*cp*; 5: KCl staining of gel extraction protein; M: Marker.

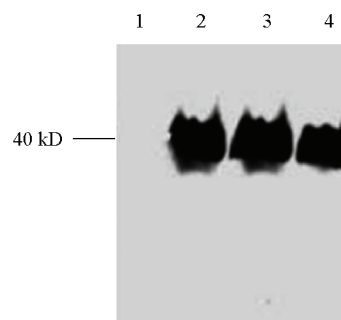


**图 4 pET30-BaRMV-*cp* 融合蛋白多克隆抗血清 Western-blotting 分析**

1: 诱导 Rosetta(DE3)PlysS 菌; 2: 诱导 pET-30a 空载体菌;  
3: pET30-BaRMV-*cp* 未纯化蛋白。

**Fig. 4 Analysis of the pET30-BaRMV-*cp* fusion protein antiserum by Western-blotting**

1: Rosetta(DE3)PlysS; 2: Western-blotting analysis of pET-30a induced; 3: Unpurified pET30-BaRMV-*cp* protein.

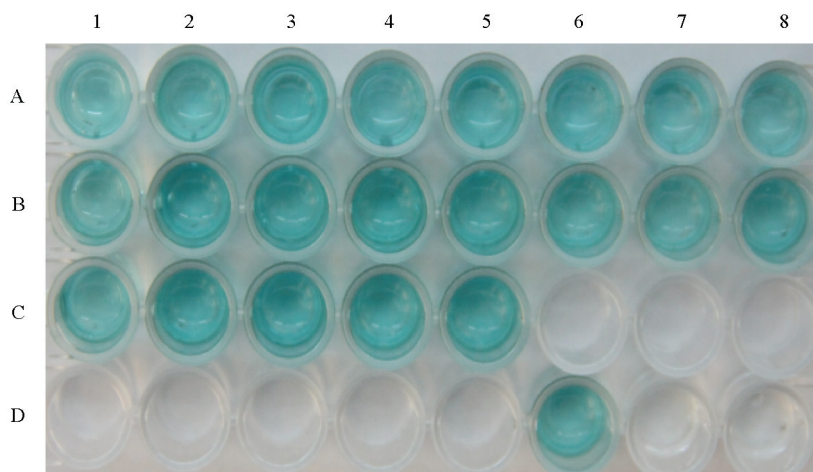


**图 5 多克隆抗血清检测感病样品的 Western-blotting 分析**

1: 健康本氏烟; 2: 感病紫茉莉; 3: 受侵染本氏烟;  
4: pET30-BaRMV-*cp* 未纯化蛋白。

**Fig. 5 The detection of infected leaves**

1: Healthy *Nicotiana benthamiana* L.; 2: Infected *Mirabilis jalapa* L.; 3: Infected *Nicotiana benthamiana* L.; 4: Unpurified pET30-BaRMV-*cp* protein.



**图 6 感病样品 ID-ELISA 检测**

D-6: 阳性对照; D-7: 阴性对照; D-8: 空白对照; C-1 ~ C-5: 紫茉莉样品; A-1 ~ A-8 和 B-1 ~ B-8: 本氏烟样品。

**Fig. 6 The detection of infected plant leaves sample by ID-ELISA**

D-6: Positive control; D-7: Negative control; D-8: Blank control; C-1 - C-5: *Mirabilis jalapa* L. samples;  
A-1 - A-8 and B-1 - B-8: *Nicotiana benthamiana* samples.

### 3 讨论

2012 年本课题组首次发现了紫茉莉也能被 BaRMV 所侵染, 经 BaRMV 3'端基因组序列分析表明, 该分离物 (BaRMV-MJ) 与 2 个落葵分离物和 1 个白鹤芋分离物的 *cp* 基因核苷酸序列同源性为 74.6% ~ 76.8%。根据当前马铃薯 Y 病毒属的分类标准, 该病毒应是 BaRMV 的一个分离物。为了进一步明确 BaRMV 的分布, 试验构建了一种有效快捷的 BaRMV CP 多克隆抗血清的制备方法。在 pET30a-BaRMV-*cp* 融合蛋白的原核表达过程中发现, pET30a-BaRMV-*cp* 融合蛋白对温度、IPTG 等诱导条件的敏感度小。本试验经对该融合蛋白体外表达诱导条件的优化, 最终确定了在

Rosetta(DE3)PlysS 中, 28 °C、0.8 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG、6 h, 为该融合蛋白的最优表达条件。并且在该条件下融合蛋白的表达量非常大, 因此, 本试验采用 KCl 染色切胶纯化的方法来获得免疫动物的融合蛋白。同时, 对 pET30a-BaRMV-*cp* 融合蛋白制备的多克隆抗血清的 ID-ELISA 效价测定和 Western-blotting 检测结果也表明, 直接利用 KCl 染色法制备 BaRMV *cp* 多克隆抗血清是一种非常高效、快速、便捷、性价比高的制备该多克隆抗血清的方法。

本试验建立了 BaRMV 快速高效的 ID-ELISA 检测体系, 为 BaRMV 病毒的检测提供了一种经济、实用的方法。

## References

- Gao Shenyang, Zha Enhui, Wang Shen, Zhou Tiezhong, Li Hui. 2010. A 'Cost-Effective' method for purification of prokaryotic expression proteins in gel slices. Chinese Agricultural Science Bulletin, 26 (22): 24 - 26. (in Chinese)
- 高慎阳, 查恩辉, 王 坤, 周铁忠, 李 慧. 2010. 一种“高性价比”切胶纯化原核表达蛋白的方法. 中国农学通报, 26 (22): 24 - 26.
- Ha C, Revill P, Harding R M. 2008. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. Archives of Virology, 153 (1): 45 - 60.
- Hu Y X, Guo J Y, Shen L. 2002. Get effective polyclonal antisera in one month. Cell Research, 12 (2): 157 - 160.
- Huang C H, Chang Y C. 2006. *Basella rugose mosaic virus*, a new potyvirus infecting *Basella rubra*. Plant Pathology, 55: 819.
- King A M Q, Adams M J, Lefkowitz E J. 2012. Classification and nomenclature of viruses//Virus taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press.
- Ma Jinshuang. 2014. The investigation report of invasive alien plants. Beijing: Higher Education Press. (in Chinese)
- 马金双. 2014. 中国外来入侵植物调研报告. 北京: 高等教育出版社.
- Wang J G, Peng J J, Chen H R. 2012. First report of *Basella rugose mosaic virus* infecting four o'clock (*Mirabilis jalapa*) in China. Plant Disease, 96 (2): 294.
- Xu Haigen, Qiang Sheng. 2004. Catalogue of alien invasive species in China (Selected). Beijing: Environmental Science Press. (in Chinese)
- 徐海根, 强 胜. 2004. 中国外来入侵物种编目(精). 北京: 环境科学出版社.
- Xu Yiwei. 1997. Immunoassay technology. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 徐宜为. 1997. 免疫检测技术. 北京: 科学出版社.
- Zheng Y X, Chen C C, Chen Y K. 2008. Identification and characterization of a potyvirus causing chlorotic spots on *Phalaenopsis* orchids. European Journal of Plant Pathology, 121 (1): 87 - 95.

征 订

## 欢迎订阅 2018 年 Journal of Integrative Agriculture (JIA)

《农业科学学报》(Journal of Integrative Agriculture, JIA) 由农业部主管、中国农业科学院与中国农学会共同主办, 是综合性英文学术期刊, 月刊。JIA 前身为 2002 年创刊的《中国农业科学》英文版 (Agricultural Sciences in China, ASC), 2012 年更名为 JIA。JIA 2006 年起与 Elsevier 合作, 全文数据在 ScienceDirect 平台面向世界发行; 2009 年被 SCI 收录, 最新影响因子为 1.042, 位于 JCR 农业综合类 Q2 区前列位次。JIA 是中国科技核心期刊; 连续 5 年获得“中国最具国际影响力学术期刊”称号; 2016 年入选中国科协“中国科技期刊国际影响力提升计划”及“中国科技期刊登峰行动计划”项目, 是我国农业领域领军学术期刊, 并具有较高国际影响力。

JIA 大 16 开, 每月 20 日出版, 国内外公开发售。每期 180 页, 国内订价 80.00 元, 全年 960.00 元。国内统一连续出版物号: CN 10-1039/S, 国际标准连续出版物号: ISSN 2095-3119, 邮发代号: 2-851, 国外代号: 1591M。

全国各地邮局均可订阅, 也可直接向编辑部订购。

邮编: 100081; 地址: 北京中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部; 电话: 010-82109808; 传真: 010-82106247; 网址: www.ChinaAgriSci.com; E-mail: zgnykx@caas.cn; 联系人: 林鉴非。