果 树 学 报 2019,36(9):1121-1129
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20190004

四川省猕猴桃病毒A外壳蛋白基因的序列分析、原核表达及抗血清制备

吕 蕊[1],彭期定[1],杨 婷[1],林宏辉[1],董家红[2],席德慧[1*]

([1]四川大学生命科学学院•生物资源与生态环境教育部重点实验室,成都 610065;[2]云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所•云南省农业生物技术重点实验室•农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室,昆明 650205)

摘 要:【目的】研究猕猴桃病毒A(*Actinidia virus* A,AcVA)的发生及其多样性,为我国猕猴桃产业中AcVA病毒的快速检测、科学防控以及猕猴桃品种选育提供科学依据。**【方法】**通过巢式PCR从四川省猕猴桃感病叶片中扩增AcVA *CP*基因序列,进行序列分析和同源性比对;构建AcVA *CP*基因的原核表达载体,诱导目的蛋白表达后制备抗血清,用Western blot检测效价。**【结果】**克隆到3个AcVA四川分离株的完整*CP*基因序列,成功构建了pET28a-AcVA-DJY4-*CP*重组质粒,原核表达目的蛋白并制备出特异性抗血清,效价达到1∶5 000。**【结论】**首次获得了3个AcVA四川分离株,丰富了AcVA的序列多样性,并探索了原核表达的最佳条件,制备了高效价抗血清,为今后AcVA病毒的快速检测和防控提供了技术支撑。

关键词:猕猴桃病毒A;外壳蛋白;序列分析;原核表达;抗血清制备

中图分类号:S663.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2019)09-1121-09

Sequence analysis, prokaryotic expression and antiserum preparation of coat protein gene of *Actinidia virus* A in Sichuan province

LÜ Rui[1], PENG Qiding[1], YANG Ting[1], LIN Honghui[1], DONG Jiahong[2], XI Dehui[1*]

([1] *Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education/College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan, China*; [2] *Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences/Yunnan Provincial Key Lab of Agricultural Biotechnology/Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Kunming 650205, Yunnan, China*)

Abstract:【Objective】The purpose of the research was to study the occurrence and molecular diversity of *Actinidia virus* A (AcVA), so as to provide scientific basis for the rapid detection, scientific prevention and control of AcVA and the variety breeding of kiwifruit in China.【Methods】Total RNA was extracted from kiwifruit leaves by CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide). Nested-PCR was used to amplify AcVA *CP* gene sequence. The first round PCR amplification was performed by using primers AcVA-1F (5'-ATGAATCGTTCGAGCA TAGGT-3') and AcVA-1R (5'-TGCGAACATG-GTCCCACACTTA-3'), and the pair of primers was designed according to the full length of AcVA sequence, and the amplified fragment was 888 bp that included the complete *CP* gene sequence. The reaction was conducted under conditions of initial 5 min denaturation at 94 ℃, 34 cycles of 94 ℃ for 60 s, 54 ℃ for 60 s, 72 ℃ for 60 s and extension for 10 min at 72 ℃. Then, 1 μL PCR product was used as template for the second round of PCR amplification with the primers AcVA-2F (5'-ATG-GCAAAGAATATCTCAAG-3') and AcVA-2R (5'-CTATATTTCAACAGCCTGC-3'). PCR was performed using the following parameters: one cycle at 94 ℃ for 5 min, 34 cycles at 94 ℃ for 30 s, 54 ℃ for 30 s, and 72 ℃ for 40 s, and extension for 10 min at 72 ℃. The BLAST algorithm was used to

收稿日期:2019-01-19 接受日期:2019-05-16

基金项目:国家自然科学基金(31772131);四川省应用基础研究项目(2019YJ0135)

作者简介:吕蕊,女,在读硕士研究生,研究方向为野生动植物保护。Tel:15198029265, E-mail:lvrui518@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:028-85415389, E-mail:xidh@scu.edu.cn

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

search the NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) databases for homologous sequences and ascertain the identity of target gene. DNAMAN was used to analyze the AcVA *CP* gene sequence, and MegAlign was used to analyze the sequence identity. The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining (NJ) method in MEGA 6.0. The restriction enzymes *Bam* HⅠ and *Sal* Ⅰ were added to the corresponding end of the AcVA *CP* gene sequence, respectively. The PCR purified products and pET28a vector were digested by *Bam* HⅠ and *Sal* Ⅰ, after that they were ligated with T4 DNA ligase (TaKaRa) and transferred into *E. coli* (*Escherichia coli*) strains DH5á (TaKaRa), and finally plated onto LB (Luria-Bertani) agar containing Kana (Kanamycin). The expression strain BL21 containing the recombinant plasmid was cultured at 37 ℃ overnight, and transferred to a new medium at a 10% inoculum on the second day, until OD_{600} reached 0.4-0.6, IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactoside) was added to a final concentration of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mM, and incubated at 16 ℃ overnight. The expressed protein was purified and then anti-AcVA-*CP* antibody was obtained from a rabbit. The optimal titer of the antiserum was tested by Western blot.【Results】The complete *CP* gene sequences of AcVA Sichuan isolates were cloned by nested-PCR and named as AcVA-DJY4, AcVA-HYZ1 and AcVA-WBS12, respectively. In the study the frequency of AcVA in Sichuan province was also counted. The full length of the *CP* gene sequence was 597 bp, encoding 198 amino acids. Based on the comparison of the nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of *CP* gene of the AcVA isolates, the nucleotide identity between the AcVA isolates from Sichuan province ranged from 86.9% to 88.3%, and the identity of the encoded amino acids ranged from 96.0 to 96.5%. The *CP* genes of three AcVA Sichuan isolates shared 87.9%-90.8% nucleotide identity and 94.9%-97.5% amino acid identity with the *Actinidia virus* A isolate TP7-93A (AcVA-TP7-93A) from New Zealand and the *Actinidia virus* A isolate Haenam (AcVA-Haenam) from South Korea. Phylogenetic analysis based on nucleotide sequence of AcVA *CP* gene showed that AcVA-HYZ1 was clustered with AcVA-Haenam (Group I), and AcVA-WBS12 was clustered with AcVA-TP7-93A (Group II), but AcVA-DJY4 was an independent branch. Phylogenetic analysis based on amino acid sequence of AcVA *CP* gene showed that AcVA-WBS12 was a single branch, AcVA-DJY4 and AcVA-HYZ1 were clustered into one group (Group I), and the AcVA-Haenam reported in South Korea and the AcVA-TP7-93A reported in New Zealand were clustered into another group (Group II). The results of the phylogenetic analyses indicated that there were significant differences among the AcVA isolates. The prokaryotic expression plasmid pET28a-AcVA-DJY4-*CP* was successfully constructed. The target fusion protein (27 kDa) was highly expressed in *E. coli* induced by 0.6 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG at 16 ℃. The expressed protein was purified and retrieved and then used to immune rabbits and the corresponding specific antiserum was prepared. Western blot analysis confirmed that the antiserum reacted strongly and specifically with the *CP* of AcVA-DJY4, with the optimal titer of the antiserum being up to 1:5 000.【Conclusion】Three AcVA Sichuan isolates were obtained for the first time, enriching the sequence diversity of the AcVA *CP* gene sequences. In the study, the optimal conditions were explored for prokaryotic expression and specific antisera was prepared for detection of AcVA-DJY4-*CP*. Western blot analysis showed that the antiserum could be used for the detection of AcVA in the kiwifruit producing districts. These results can also provide a technical support for the rapid detection, scientific prevention and control of virus disease in kiwifruit plant and the breeding of kiwifruit varieties.

Key words: *Actinidia virus* A; Coat protein; Sequence analysis; Prokaryotic expression; Preparation of antiserum

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

猕猴桃（*Actinidia*）原产于中国，是一种珍贵的果树资源，其果实享有“果中之王”美誉。猕猴桃隶属于猕猴桃科（Actinidiaceae）猕猴桃属（*Actinidia* Lindl.），相关资料显示该属共有55种，共约76个分类单元[1]。

过去的二十年来，中国猕猴桃的商业化生产稳步增长，中国作为最大的猕猴桃生产国，生产总量占世界总产量的25%以上[2]。近年来，国内外学者对猕猴桃病害进行了大量的研究报道，主要为由细菌性和真菌性引起的病害，其中由细菌性引发的猕猴桃溃疡病成为限制该产业发展最重要的因素之一。

病毒病潜伏期较长，国内外对于猕猴桃病毒病害展开的研究相比于细菌和真菌的起步晚。2003年在新西兰首次报道了由苹果茎沟病毒（*Apple stem grooving virus*，ASGV）侵染引起的猕猴桃病毒病害[3]。此后十年间，新西兰与意大利等国开展了猕猴桃病毒的鉴定，陆续报道了13种侵染猕猴桃的病毒[4]。2012年，新西兰的Blouin等[5]首次报道了侵染猕猴桃的猕猴桃病毒A（*Actinidia virus* A，AcVA）和猕猴桃病毒B（*Actinidia virus* B，AcVB）。2018年，Blouin等[6]报道了在意大利生长的中华猕猴桃（*Actinidia chinensis*）表现为叶片褪绿和坏死环斑的症状，利用二代测序技术鉴定出该病毒为长线形病毒科（Closteroviridae）的一个新成员，命名为猕猴桃病毒1（*Actinidia virus* 1，AcV-1）。此外，Veerakone等[7]于2018年报道了在新西兰鉴定出侵染中华猕猴桃（*Actinidia chinensis*）的猕猴桃种传潜伏病毒（*Actinidia seed-borne latent virus*，ASbLV），症状表现为叶脉褪绿和斑驳。

在国内，猕猴桃的病毒性病害早在1990年已有报道[8]，苗期叶片表现为花叶、畸形，成株期叶片黄化、叶片瘦小畸形，但是对于该病毒种类及其相关信息并未明确。2013—2014年间，郑亚洲等[9]展开了我国猕猴桃病毒病侵染状况的调查，从多个省收集151份表现为褪绿斑驳、褪绿环纹和花叶等疑似病毒病症状的猕猴桃样品，也鉴定出了AcVA和AcVB。2017年，王然等[10]对国内外所报道的15种猕猴桃病毒的基本特性及侵染症状进行归纳总结，其中从我国栽培的猕猴桃中鉴定出5种猕猴桃病毒，分别是AcVA[9, 11]、AcVB[9, 11]、猕猴桃属柑橘叶斑驳病毒（*Citrus leaf blotch virus*，CLBV）[12]、正番茄斑萎病毒属（*Orthotospovirus*）的番茄坏死斑相关病毒（*Tomato necrotic spot associated virus*，TNSaV）[13]和猕猴桃属褪绿环斑相关病毒（*Actinidia chlorotic ringspots-associated virus*，AcCRaV）[14]。

AcVA是β-线形病毒科（Betaflexiviridae）、葡萄病毒属（*Vitivirus*）的成员[15]。该属病毒有长约725~785 nm和宽12 nm的长线状粒体，为正义单链RNA植物病毒。基因组全长大小约为7500个核苷酸，包括5个开放阅读框[5]。目前在新西兰、意大利报道了AcVA和AcVB复合侵染猕猴桃，主要表现为褪绿斑驳、花叶、脉黄等主要典型症状。2017年8月，韩国也首次报道[16]出AcVA和AcVB复合侵染猕猴桃，表现为叶片上出现褪绿斑。

四川省是猕猴桃的主要种植大省，猕猴桃的细菌性及病毒性病害将会不同程度的影响猕猴桃产业的可持续发展，病毒性病害的潜在性威胁仍未知，目前关于四川省猕猴桃的病毒性病害的研究还未见报道。笔者在田间调查的基础上，建立了巢式PCR快速检测的方法，首次克隆了3个来自四川省的AcVA分离株的外壳蛋白（coat protein，*CP*）基因序列，进行了序列比对及同源性分析，为今后深入研究AcVA的分子多样性提供依据。同时，构建了pET28a-AcVA-DJY4-*CP*重组表达载体，导入表达菌株BL21诱导目的蛋白表达，制备了特异性检测AcVA *CP*的抗血清，并用该抗血清检测了被AcVA侵染的猕猴桃样品。本研究对今后关于猕猴桃病毒病的田间快速检测、科学防控以及猕猴桃的品种选育有重要意义。

1　材料和方法

1.1　材料

2017和2018年的5—8月，于四川省蒲江市、都江堰市、邛崃市、彭州市等地采集疑似病毒侵染的中华猕猴桃（*Actinidia chinensis*）叶片样品，染色体倍性为2n=2x=58，均为二倍体，品种为‘红阳’和‘金果’，叶片表现为脉间失绿的症状（图1）。材料采集

图1　表现为脉间失绿症状的猕猴桃叶片

Fig. 1　Symptom of veinal chlorosis on kiwifruit leaves

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

后编号并立即投入液氮中速冻，于−80 ℃低温保存。

1.2 菌株及试剂

pET28a载体由本实验室保存，pMD19-T克隆载体、大肠杆菌DH5α、T4 DNA连接酶和异丙基硫代半乳糖苷（Isopropyl β-D-Thiogalactoside，IPTG）均购于宝生物工程（大连）有限公司。由成都擎科生物科技有限责任公司完成引物合成及相关测序工作。

1.3 方法

1.3.1 总RNA的提取及目的片段的克隆 采用CTAB法提取猕猴桃叶片总RNA，取感病的猕猴桃叶片0.1 g加液氮充分研磨，加入65 ℃预热的CTAB提取液，震荡混匀后在65 ℃水浴加热0.5~1 h，离心后取上清，加入预冷的氯仿-异戊醇充分混匀，静置3~5 min后离心，再加入1/10体积的3 mol·L^{-1}的醋酸钠和600 μL异丙醇置于−20 ℃沉淀1.5~2 h，用75%和100%乙醇洗涤沉淀两次，于超净台风干后溶于30 μL DEPC水。以提取的总RNA为模板，用随机引物进行反转得到cDNA。

采用巢式PCR的方法进行扩增。第一步扩增所用的上游引物AcVA-1F: 5’-ATGAATCGTTCGAGCATAGGT-3’，下游引物AcVA-1R: 5’-TGCGAACATGGTCCC ACACTTA-3’，参照NCBI上已知的AcVA全长序列进行引物合成，扩增片段为888 bp，扩增序列为ORF3和ORF5的部分序列以及完整的*CP*基因序列。PCR反应总体系为50 μL，PCR扩增条件：94 ℃预变性5 min；94 ℃ 60 s，54 ℃ 60 s，72 ℃ 60 s，34个循环后，72 ℃ 10 min。第二步巢式扩增所用的上游引物AcVA-2F：5’-ATGGCAAAG AATATCTCAAG-3’，AcVA-2R：5’-CTATATTTCAACAGCCTGC-3’，参照郑亚洲[17]报道的引物合成。扩增片段为597 bp，扩增序列为完整*CP*基因。PCR反应总体系为50 μL，PCR扩增条件：94 ℃预变性5 min；94 ℃ 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 40 s，34个循环后，72 ℃ 10 min。用1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。将扩增的目的条带回收后与pMD19-T载体连接，转化至DH5α中。挑取阳性克隆进行测序。

1.3.2 序列比对与分析 猕猴桃AcVA *CP*基因的核苷酸序列以及推导编码的氨基酸序列采用生物学软件DNAMAN 6.0进行分析，用MegAlign程序完成核苷酸序列及推导编码的氨基酸序列的一致性分析，系统发育树的构建用MEGA 6.0软件中的邻接法（Neighbor-Joining，NJ）进行，Bootstrap重复1 000次。

1.3.3 重组载体的构建 分别在上、下游引物（AcVA-2F/2R）引入酶切位点*Bam* HⅠ、*Sal* Ⅰ，引物序列为AcVA-3F：5’-<u>*CGGGATCC*</u>ATGGCAAAGAATATCTCAAG-3’（划线部分为*Bam* HⅠ酶切位点），AcVA-3R：5’-<u>*GCGTCGAC*</u>CTATATTTCAACAGCCTGC-3’（划线部分为*Sal* Ⅰ酶切位点）。将PCR扩增产物和原核表达载体pET28a用*Bam* HⅠ和*Sal* Ⅰ双酶切后，经T4 DNA连接酶16 ℃过夜连接，将连接产物转化至DH5α，涂布在含100 mg·L^{-1} Kana的LB固体培养基过夜培养，经菌落PCR鉴定结果为阳性后进行测序。将构建好的重组质粒转化到表达菌株BL21。PCR检测为阳性的菌落扩大培养后提质粒，进行酶切检测。

1.3.4 融合蛋白的诱导表达与纯化 参照实验室之前的方法[18]对蛋白进行诱导表达。筛选含有重组质粒的表达菌株，用不同终浓度（0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol·L^{-1}）的IPTG于16 ℃诱导蛋白表达，诱导时间为12 h。蛋白经SDS-PAGE胶检测后进行纯化、回收。

1.3.5 抗血清的制备 参照实验室之前的方法[19]进行抗血清的制备。

1.3.6 抗血清效价检测及田间样品的Western blot检测 将抗血清按1∶500的浓度稀释后作为一抗，将实验室保存的羊抗兔作为二抗，用纯化的目的蛋白检测抗血清特异性。将抗血清以1∶500、1∶1 000、1∶2 000、1∶3 000、1∶5 000的浓度稀释，进行抗血清效价的测定。将所得抗血清用Western blot方法对田间猕猴桃样品进行检测。

2 结果与分析

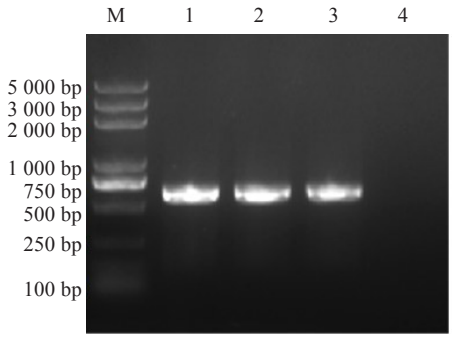
2.1 AcVA *CP*基因的扩增

经巢式PCR从四川省感病的猕猴桃样品中扩增出600 bp左右的DNA片段，其大小与预期相符（图2）。经序列比对，本研究获得了3个来自四川省都江堰和邛崃的AcVA分离株，标记为AcVA-DJY4、AcVA-HYZ1和AcVA-WBS12。

2.2 AcVA的发生频率统计

利用巢式PCR方法对79份疑似病毒侵染的猕猴桃样品进行检测，经统计发现26份脉间失绿症状

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



M. DNA 分子质量标准；1. AcVA 分离株 AcVA-DJY4；2. AcVA 分离株 AcVA-HYZ1；3. AcVA 分离株 AcVA-WBS12；4. 空白对照。

M. DNA marker; 1. AcVA- DJY4; 2. AcVA- HYZ1; 3. AcVA-WBS12; 4. Blank control.

图 2　AcVA 四川分离株 *CP* 基因的巢式 PCR 扩增

Fig. 2 Nested-PCR amplification of *CP* gene sequences of AcVA Sichuan isolates

的样品检测为 AcVA 阳性，总检出率为 32.9%（表 1）。由检测结果可知，在彭州采集的猕猴桃叶片样品中未检测到 AcVA 的发生；在蒲江的红阳样品中检测到 2 个 AcVA 阳性样品，检出率为 25%；从来自都江堰和邛崃的红阳和金果样品中均检测到 AcVA，其检出率分别是为 36%和 50%，且红阳猕猴桃样品的 AcVA 检出率较高。

2.3　AcVA 分离株 *CP* 序列分析及同源性比较

从四川省猕猴桃样品中获得的 3 个 AcVA 分离株的 *CP* 基因序列全长均为 597 bp，编码 198 个氨基酸。经序列比对可知，它们的核苷酸序列一致性为 86.9%~88.3%，其推导编码的氨基酸序列一致性为 96.0%~96.5%，表明来自四川省的 3 个 AcVA 分离株之间存在较大的分子变异。经比较分析发现这 3 个 AcVA 四川分离株 *CP* 基因序列与 GenBank 中新西兰报道的分离株 AcVA-TP7-93A（JN427014）和韩国报道的分离株 AcVA-Haenam（KY613999）的核苷酸序列一致性为 87.9%~90.8%，其编码的氨基酸序列一致性为 94.9%~97.5%，表明 AcVA 分离株的 *CP* 基因存在着较大的地理差异性。

表 1　猕猴桃叶片样品的 AcVA 巢式 PCR 检测结果

Table 1 Nested-PCR results for the detection of AcVA in kiwifruit leaves

样品采集地 Collection sites	样品数 Number of detected samples		样品总数 Total of detected samples	阳性样品数 Number of positive samples		阳性样品总数 Total number of positive samples	发生频率 Frequency/%
	红阳 Hongyang	金果 Jinguo		红阳 Hongyang	金果 Jinguo		
彭州 Pengzhou	8	8	16	0	0	0	0
蒲江 Pujiang	8	0	8	2	0	2	25
都江堰 Dujiangyan	16	9	25	7	2	9	36
邛崃 Qionglai	16	14	30	12	3	15	50
总计 Total	48	31	79	21	5	26	32.9

在基于 AcVA *CP* 基因核苷酸序列的系统进化树中，AcVA-DJY4 单独作为一个分支，AcVA-HYZ1 与韩国报道的分离株 AcVA-Haenam 聚类为一组（组Ⅰ），AcVA-WBS12 与新西兰报道的分离株 AcVA-TP7-93A 聚类为另一组（组Ⅱ）（图 3-A）。在基于 AcVA *CP* 基因氨基酸序列的系统进化树中，AcVA-WBS12 单独作为一个分支，AcVA-DJY4 和 AcVA-HYZ1 聚类为一组（组Ⅰ），韩国报道的分离株 AcVA-Haenam 与新西兰报道的分离株 AcVA-TP7-93A 聚类为另一组（组Ⅱ）（图 3-B）。基于系统进化树的分析结果进一步表明来自四川省的 3 个 AcVA 分离株之间存在差异，且来源于不同地区的分离株之间也存在较大的差异。

2.4　重组载体的鉴定

用引入酶切位点的引物扩增出 AcVA-DJY4-*CP* 基因片段（图 4-A）。将重组质粒用 *Bam*H Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切，分别得到 5 000 bp 和 600 bp 左右的条带（图 4-B）。同时序列测定结果正确，表明已成功构建了含有 AcVA-DJY4-*CP* 基因的原核表达载体，标记为 pET28a-AcVA-DJY4-*CP*（图 4-C）。

2.5　目的蛋白的诱导表达与纯化

重组菌用不同终浓度（0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol·L^{-1}）的 IPTG 诱导后，当 IPTG 终浓度为 0.2 和 0.4 mmol·L^{-1}时未见蛋白表达（结果未显示）。当 IPTG 终浓度为 0.6 mmol·L^{-1}时成功表达了目的蛋白，其分子量在 27 kDa 左右，与预期大小相符，且与 IPTG 终浓度为 0.8 和 1.0 mmol·L^{-1}时的表达量相差不大（图 5）。

2.6　Western blot 检测及效价测定

将免疫获得的抗血清以 1:500 的浓度稀释，分别

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

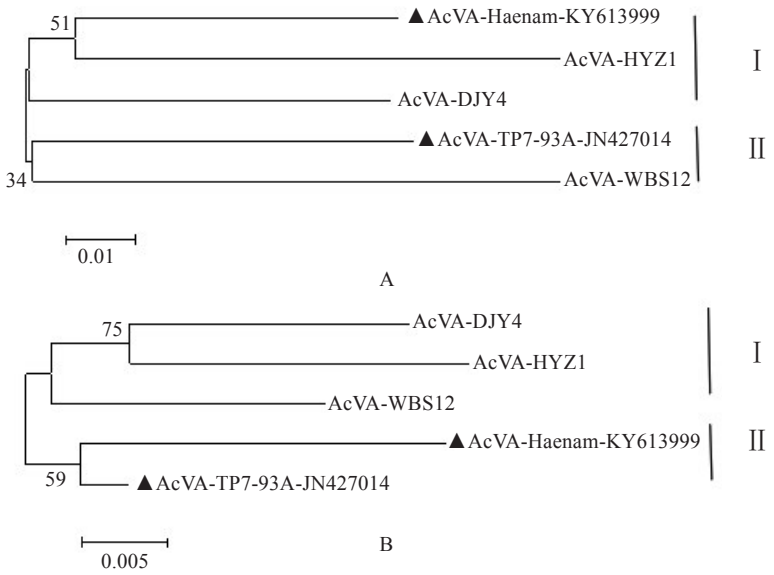
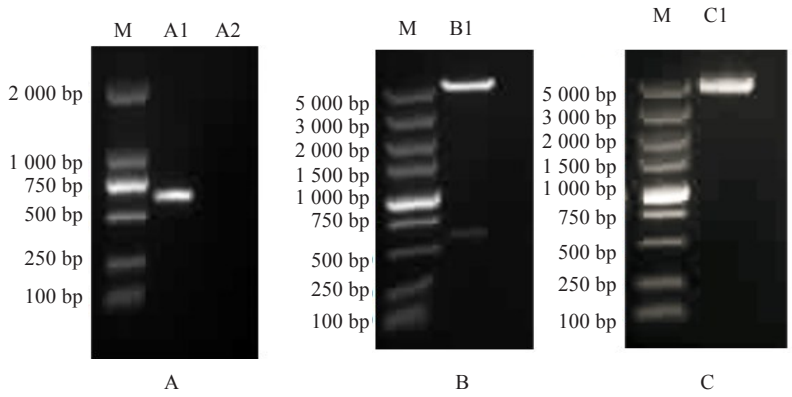


图 3 AcVA 分离株 *CP* 基因的核苷酸(A)及其推导氨基酸(B)序列的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *CP* gene based on nucleotide (A) and deduced amino acid (B) sequence of AcVA isolates

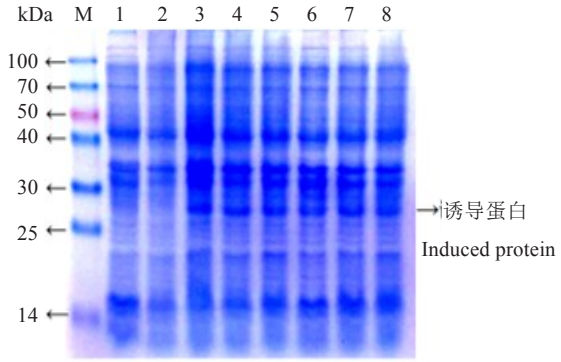


A. AcVA-DJY4-*CP* 基因序列的扩增;M. DNA 分子质量标准;A1. AcVA-DJY4-*CP*;A2. 空白对照;B. 重组质粒的双酶切验证;M. DNA 分子质量标准;B1. 重组质粒的双酶切验证;C. 重组质粒的检测;M. DNA 分子质量标准;C1. 重组质粒。

A. Amplification of AcVA-DJY4-*CP* gene sequence. M. DNA marker; A1. Amplified products of AcVA-DJY4-*CP*; A2. Blank control; B. Verification of recombinant plasmid by restriction enzymes. M. DNA marker; B1. Verification of recombinant plasmid pET28a-AcVA-DJY4-*CP* by restriction enzymes *Bam*H Ⅰ and *Sal* I; C. Detection of recombinant plasmid. M. DNA marker; C1. Recombinant plasmid pET28a-AcVA-DJY4-*CP*.

图 4 AcVA-DJY4-*CP* 基因序列的扩增及重组质粒的双酶切验证

Fig. 4 Amplification of AcVA-DJY4-*CP* gene sequence and verification of recombinant plasmid by restriction enzymes



M. 蛋白质分子质量标准;1. 未被诱导的 BL21;2. 未被诱导的 pET28a 空载体;3~8. IPTG 的终浓度为 0.6 mmol·L^{-1} (3,4)、0.8 mmol·L^{-1} (5,6)、1.0 mmol·L^{-1} (7,8)。

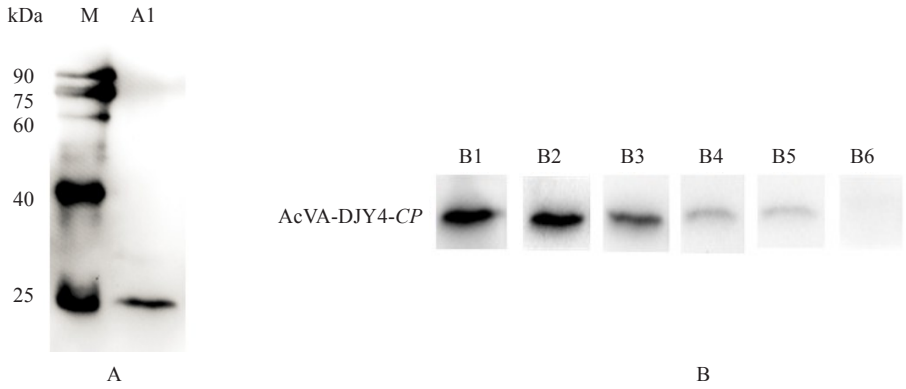
M. Protein molecular weight marker; 1. Uninduced BL21; 2. Uninduced pET28a; 3-8. Induced by IPTG 0.6 (3,4), 0.8 (5,6) and 1.0 (7,8) mmol·L^{-1}.

图 5 重组菌在不同浓度 IPTG 诱导下的蛋白表达

Fig. 5 Analysis of protein expression induced by different concentrations of IPTG in AcVA-DJY4-*CP* recombinant bacteria

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

与空载体蛋白、BL21菌株蛋白和纯化目的蛋白进行Western blot检测，结果表明抗血清与纯化的目的蛋白有特异性免疫反应，条带单一（图6-A）。而与空载体蛋白、BL21菌株蛋白无特异性反应。将抗血清按1:500、1:1 000、1:2 000、1:3 000、1:5 000的浓度稀释后与纯化的目的蛋白进行Western blot检测抗血清效价，由Western blot结果可知，抗血清的效价达到了1:5 000（图6-B）。



A. 抗血清的特异性检测；M. 蛋白质分子质量标准；A1. 纯化的 AcVA-DJY4-*CP* 蛋白；B. 抗血清的效价检测；B1~B5. 将制备的抗血清稀释成不同的倍数，1∶500、1∶1 000、1∶2 000、1∶3 000、1∶5 000；B6. 阴性对照。

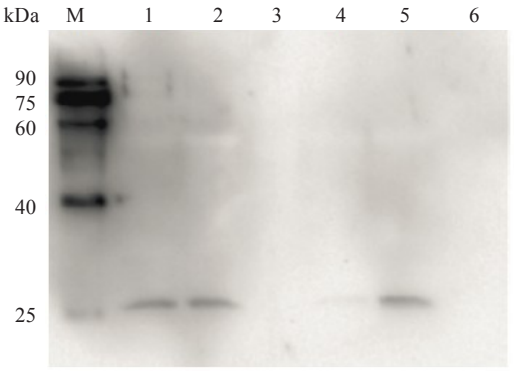
A. Detection of specificity of AcVA-DJY4-*CP* antiserum by Western blot; M. Protein marker; A1. Purified protein; B. Detection of titler of AcVA-DJY4-*CP* antiserum by Western blot. B1-B5. AcVA-DJY4-*CP* antiserum was diluted into different multiples: 1∶500，1∶1 000，1∶2 000，1∶3 000，1∶5 000，respectively; B6. Negative control.

图6　抗血清特异性以及效价检测

Fig. 6　Detection of specificity and titler of AcVA-DJY4-*CP* antiserum by Western blot

2.7　田间猕猴桃样品的血清学检测

为了验证所制得抗血清检测田间样品的可行性，进一步提取了2017和2018年5月、8月于不同地点采集的不同症状表现的猕猴桃病毒叶片样品的总蛋白，将所制得的抗血清按照1:5 000稀释后作为二抗，用Western blot验证该抗血清检测田间样品的效果。结果表明，症状为脉间失绿的猕猴桃叶片经抗血清检测在27 kDa左右出现蛋白条带，条带清晰、单一，特异性较高；对于血清学检测未出现目的条带的其他疑似病毒侵染的猕猴桃叶片样品，经巢式PCR分子检测方法也未检测到AcVA病毒（图7）。以上实验结果进一步证实了本研究中的巢式PCR检测AcVA的可行性，同时抗血清检测结果表明所制备的抗血清可以用于田间猕猴桃样品中AcVA的检测。



M. 蛋白质分子质量标准；1、2、5. 分别来自都江堰、蒲江和邛崃的被 AcVA 侵染的猕猴桃叶片样品；3、4、6. 分别来自蒲江、彭州和邛崃的被病毒侵染的其他症状表现的猕猴桃叶片样品。

M. Protein marker; 1，2，5. AcVA-infected kiwifruit leaves collected from Dujiangyan，Pujiang and Qionglai，respectively; 3，4，6. Kiwifruit leaves with other symptoms collected from Pujiang，Pengzhou and Qionglai，respectively.

图7　田间猕猴桃样本的 Western blot 检测

Fig. 7　Western blot detection of kiwifruit field samples

3　讨　论

植物病毒性病害的潜伏期长，可以引起树势衰退，使植株抗病能力减弱，降低果实品质和产量。病毒在自然界容易发生变异，不同的病毒株系其致病力不同，四川省是猕猴桃种植大省，至今未见关于四川省AcVA侵染猕猴桃的报道，该病毒对猕猴桃产业的威胁仍是未知，其潜在风险无法评估，需引起人们的广泛重视。

前人研究报道AcVA常与AcVB复合侵染[5,16-17]。但在本研究中采集的猕猴桃样品并未检测到AcVB，而且样品的叶片症状表现为脉间失绿，与

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

之前研究报道的两种病毒复合侵染后表现为叶脉黄化、叶片出现褪绿环斑的症状是不同的。

考虑到猕猴桃样品中病毒粒子的含量少，其叶片中多糖、多酚类物质多，导致所提取的总核酸浓度较低[20]。常规PCR检测的方法灵敏度较低，故本研究中采用巢式PCR的方法对AcVA分离株*CP*基因序列进行扩增，建立了巢式PCR快速检测方法，提高猕猴桃样品的病毒检测效率，可以实现AcVA在潜伏期病毒含量低时的特异性检测，为AcVA侵染猕猴桃的早期诊断提供了新方法。此外，本研究还统计了AcVA在四川地区的发生频率，发现AcVA在邛崃的检出率较高，达到50%。

本研究将获得的3个四川分离株AcVA-DJY4、AcVA-HYZ1和AcVA-WBS12之间的核苷酸及其编码氨基酸一致性进行分析，以及将四川省的3个分离株与已知的来自新西兰的分离株AcVA-TP7-93A和来自韩国的分离株AcVA-Haenam同源性比较分析说明不同来源的AcVA分离株*CP*基因的变异性较大。目前关于AcVA的研究报道较少，AcVA分离株的序列比对受到一定的限制。本研究获得的来自四川省的3个分离株丰富了AcVA的序列库，也为今后不同来源的AcVA分离株的遗传进化及序列多样性分析提供了依据。

在原核表达过程中，重组菌在IPTG诱导后表达产物所得量的高低以及其存在形式是蛋白成功表达的重要因素[21]。在本研究设置的浓度梯度中，当IPTG终浓度为0.6 mmol·L^{-1}时可见蛋白表达，而与其他较高诱导浓度下的表达量相差不大。考虑到IPTG对细菌产生毒性以及节省经济成本的因素，确定IPTG终浓度0.6 mmol·L^{-1}，诱导温度16 ℃，诱导时间12 h，作为pET28a-AcVA-DJY4-*CP*重组质粒在大肠杆菌BL21中得以表达的诱导条件。

经Western blot对抗血清效价的检测结果可知，该抗血清可特异性检测AcVA-DJY4分离株的*CP*蛋白，效价高达1:5 000，抗血清效果较好，表明已经成功制备了检测AcVA-DJY4 *CP*蛋白的特异性抗血清。本研究还提取了来自不同地点、不同症状的田间猕猴桃叶片样品的总蛋白，用该抗血清可以特异性检测到样品中的AcVA *CP*蛋白条带，也进一步证实了本研究中的巢式PCR方法的可行性。将为今后田间猕猴桃病毒病的快速检测、科学防控以及猕猴桃品种选育提供了技术支撑。此外，目前对于AcVA的传播媒介和传播途径并不是很明确，为了更好的防控AcVA，降低其对猕猴桃产业的危害，需要对该病毒的传播途径及宿主范围进行深入的研究。

4 结 论

本研究建立了AcVA *CP*基因序列的巢式PCR检测方法，并首次获得了3个来自四川省的AcVA分离株AcVA-DJY4、AcVA-HYZ1和AcVA-WBS12，确定了诱导pET28a-AcVA-DJY4-*CP*融合蛋白表达的最佳条件，并制备出特异性检测AcVA-DJY4 *CP*蛋白的高效价抗血清，对今后AcVA的序列多样性分析以及田间AcVA的快速检测及防控有重要意义。

参考文献 References:

[1] LI X，LI J，SOEJARTO D D. Advances in the study of the systematics of *Actinidia* Lindley[J]. Frontiers of Biology in China，2009，4(1): 55-61.

[2] GARCIA C V，QUEK S Y，STEVENSON R J，WINZ R A. Kiwifruit flavour: a review[J]. Trends in Food Science & Technology，2012，24(2): 82-91.

[3] CLOVER G R G，PEARSON M N，ELLIOTT D R，TANG Z，SMALES T E，ALEXANDER B J R. Characterization of a strain of *Apple stem grooving virus* in *Actinidia chinensis* from China[J]. Plant Pathology，2003，52(3): 371-378.

[4] BLOUIN A G，PEARSON M N，CHAVAN R R，WOO E N Y，LEBAS B S M,VEERAKONE S，RATTI C，BICCHERI R，MACDIARMID R M，COHEN D. Viruses of Kiwifruit (*Actinidia* Specises) [J]. Journal of Plant Pathology，2013，95(2): 221-235.

[5] BLOUIN A G，CHAVAN R R，PEARSON M N，MACDIARMID R M，COHEN D. Detection and characterisation of two novel vitiviruses infecting *Actinidia*[J]. Archives of Virology，2012，157(4): 713-722.

[6] BLOUIN A G，BICCHERI R，KHALIFA M E，PEARSON M N，POGGI POLLINI C，HAMIAUX C，COHEN D，RATTI C. Characterization of *Actinidia virus* 1，a new member of the family Closteroviridae encoding a thaumatin- like protein[J]. Archives of Virology，2018，163(1): 229-234.

[7] VEERAKONE S，LIEFTING L W，TANG J，WARD L I. The complete nucleotide sequence and genome organisation of a novel member of the family Betafexiviridae from *Actinidia chinensis* [J]. Archives of Virology，2018，163(5): 1367-1370.

[8] 牟惠芳，刘开启，刘晖，孙芙蓉 . 猕猴桃病害种类调查初报[J]. 山东农业大学学报，1990，21(3): 83-85.
MU Huifang，LIU Kaiqi，LIU Hui，SUN Furong. A preliminary report on investigation of disease types infecting *Actinidia*[J].

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Journal of Shandong Agriculture University，1990，21(3): 83-85.

[9] 郑亚洲，王国平，周菊芳，朱晨熹，王利平，徐文兴，洪霓 . 猕猴桃病毒 A 和 B 的 RT-PCR 检测及分子变异初步研究[J]. 园艺学报，2015，42(4): 665-671.
ZHENG Yazhou，WANG Guoping，ZHOU Jufang，ZHU Chenxi，WANG Liping，XU Wenxing，HONG Ni. The detection of *Actinidia virus* A and *Actinidia virus* B by RT-PCR and their molecular variation analysis[J]. Acta Horticulturae Sinica，2015，42(4): 665-671.

[10] 王然，周丹，罗静，方金豹 . 猕猴桃病毒病研究进展[J]. 果树学报，2017，34(8): 1043-1050.
WANG Ran，ZHOU Dan，LUO Jing，FANG Jinbao. Progress report on viruses of kiwifruit[J]. Journal of Fruit Science，2017，34(8): 1043-1050.

[11] ZHENG Y Z，Z J F，YANG Z K，WANG G P，HONG N. First report of *Actinidia virus* A and *Actinidia virus* B on kiwifruit in China[J]. Plant Disease，2014，98(11): 1590.

[12] 朱晨熹，王国平，郑亚洲，杨作坤，王利平，徐文兴，洪霓 . 来源于猕猴桃的柑橘叶斑驳病毒的 RT-PCR 检测及外壳蛋白基因序列分析[J]. 植物病理学报，2016，46(1): 11-16.
ZHU Chenxi，WANG Guoping，ZHENG Yazhou，YANG Zuokun，WANG Liping，XU Wenxing，HONG Ni. RT-PCR detection and sequence analysis of coat protein gene of *Citrus leaf blotch virus* infecting kiwifruit trees[J]. Acta Phytopathologica Sinica，2016，46(1): 11-16.

[13] WANG Y X，HONG N，WANG G P，YANG Z K，WANG L P，LI L. First report of the Tospovirus *tomato necrotic spot associated virus* infecting kiwifruit (*Actinidia* sp.) in China[J]. Plant Disease，2016，100(12): 2539.

[14] ZHENG Y Z，NAVARRO B，WANG G P，WANG Y X，YANG Z K，XU W X，ZHU C X，WANG L P，SERIO F D，HONG N. *Actinidia chlorotic ringspot-associated virus*: a novel emaravirus infecting kiwifruit plants[J]. Molecular Plant Pathology，2017，18(4): 569-581.

[15] ADAMS M J，LEFKOWITZ E J，KING A M，HARRACH B，HARRISON R L，KNOWLES N J，KROPINSKI A M，KRUPOVIC M，KUHN J H，MUSHEGIAN A R，NIBERT M，SABANADZOVIC S，SANFACON H，SIDDELL S G，SIMMONDS P，VARSANI A，ZERBINI F M，GORBALENYA A E，DAVISON A J. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016)[J]. Archives of Virology，2016，161(10): 2921-2949.

[16] CHO S Y，KIM H，Yi S I. First report of *Actinidia virus* A and B infecting *Actinidia chinensis* in South Korea[J]. Plant Disease，2017，101(8): 1560.

[17] 郑亚洲 . 猕猴桃病毒种类鉴定及分子特性研究[D]. 湖北: 华中农业大学，2015.
ZHENG Yazhou. Identification and molecular characterization of viruses infecting Kiwifruit[D]. Hubei: Huazhong Agricultural University，2015.

[18] ZHU，XU M Y，WANG S D，JIA S D，ZHANG P，LIN H H，XI D H. Prokaryotic expression of pathogenesis related protein 1 gene from *Nicotiana benthamiana*: antifungal activity and preparation of its polyclonal antibody[J]. Biotechnology Letters，2012，34(5): 919-924.

[19] 张静，朱峰，陈应娟，邓星光，刘健，林宏辉，席德慧 . 芜菁皱缩病毒 P38 蛋白的原核表达及抗血清的制备[J]. 四川大学学报（自然科学版），2015，52(2): 441-445.
ZHANG Jing，ZHU Feng，CHEN Yingjuan，DENG Xingguang，LIU Jian，LIN Honghui，XI Dehui. Prokaryotic expression of P38 from *Turnip Crinkle Virus* and preparation of it polyclonal antibody[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)，2015，52(2): 441-445.

[20] 张鸿凯，杨曼，石登红，韩振诚，李正文，罗翔 . 不同 DNA 提取方法在猕猴桃属植物中的应用[J]. 贵阳学院学报（自然科学版），2018，13(1): 101-104.
ZHANG Hongkai，YANG Man，SHI Denghong，HAN Zhencheng，LI Zhengwen，LUO Xiang. Application of different DNA extraction methods in *Actinidia*[J]. Journal of Guiyang University (Natural Sciences Edition)，2018，13(1): 101-104.

[21] 吴育鹏，王健华，冯团诚，张雨良，王小明，刘志昕 . 辣椒脉斑驳病毒 *CP* 基因的原核表达及其抗血清的制备[J]. 园艺学报，2010，37(10): 1598-1604.
WU Yupeng，WANG Jianhua，FENG Tuancheng，ZHANG Yuliang，WANG Xiaoming，LIU Zhixin. Expression of *Chilli veinal mottle virus* coat protein and preparation of a virus-specific antiserum[J]. Acta Horticulturae Sinica，2010，37(10): 1598-1604.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net