

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.04.007

邢飞, 王红清, 李世访, 等. 苹果坏死花叶病毒 CP 基因原核表达及其抗血清制备 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(4): 63-69.

苹果坏死花叶病毒 CP 基因原核表达 及其抗血清制备

邢飞¹, 王红清², 李世访¹

1. 中国农业科学院 植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 中国农业大学 园艺学院, 北京 100193

摘要: 苹果坏死花叶病毒(ApNMV)是近年新发现的病原物, 并且是与我国苹果花叶病症状高度相关的重要病毒, 进行 ApNMV 外壳蛋白(coat protein, CP)基因原核表达、制备多克隆抗血清, 以建立快速、灵敏、准确的 ApNMV 常规检测方法尤为必要。通过设计特异性引物, 以 RT-PCR 方法成功获得 ApNMV CP 基因序列, 插入到原核表达载体 pET-28a(+)中构建重组质粒, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 利用 IPTG 进行重组蛋白(含 His-tag)诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 分析结果表明, CP 基因在大肠杆菌中获得了高效表达, 用 Ni Sepharose 6 Fast Flow 进行蛋白纯化, 回收共得到重组蛋白 2.4 mg。在屏障环境下免疫 2 只 SPF 级新西兰兔, 制备出多克隆抗血清, 稀释 400 倍后仍能与 ApNMV 阳性苹果叶片样品发生免疫反应。由此证明, 本研究建立的 ApNMV 间接 ELISA 检测方法具有较好的灵敏性, 检测效率高, 能够用于田间大量样品 ApNMV 的诊断。

关 键 词: 苹果坏死花叶病毒; 外壳蛋白基因; 原核表达;

抗血清; 酶联免疫吸附分析方法

中图分类号: S436.611.1

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1673-9868(2024)04-0063-07



Prokaryotic Expression and Preparation of Antiserum of Coat Protein Gene of Apple Necrotic Mosaic Virus

XING Fei¹, WANG Hongqing², LI Shifang¹

1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences / State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Beijing 100193, China;

2. College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100193, China

收稿日期: 2023-07-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31872922).

作者简介: 邢飞, 博士, 主要从事果树病毒研究.

通信作者: 李世访, 研究员.

Abstract: In recent years, apple necrotic mosaic virus (ApNMV), a novel ilarvirus, was identified as the main causal agent of apple mosaic disease in China. The objective of this study is to conduct prokaryotic expression and preparation of antiserum of coat protein gene of apple necrotic mosaic virus to establish a rapid, sensitive and accurate diagnostic method for ApNMV. In the present study, ApNMV coat protein (CP) gene sequence was successfully cloned by RT-PCR using specific primers and inserted into prokaryotic expression vector pET-28a(+) to construct recombinant plasmid. And then the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strains. The target recombinant protein with His-tag was induced by IPTG. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that CP gene was highly expressed in *E. coli*. The expected fusion protein with His-tag was purified using Ni Sepharose 6 Fast Flow. Total 2.4 mg recombinant protein was obtained, and used to immunize two specific pathogen-free New Zealand rabbits to produce polyclonal antibody under the barrier environment. After 400 times dilution of the anti-serum, the immune reaction could be still efficient to detect ApNMV in apple leaf samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Taken together, a fast, simple, sensitive and specific indirect ELISA method was established for the detection of ApNMV.

Key words: apple necrotic mosaic virus (ApNMV); coat protein gene; prokaryotic expression; antiserum; ELISA

苹果是世界上重要的经济作物，我国是苹果的重要生产国，栽培面积和产量均位居全球首位。苹果花叶病是我国苹果生产栽培中最常见的病毒性病害，能够引起花叶、斑驳、坏死等症状^[1]。感病叶片栅栏组织细胞排列松散，细胞器畸变，液泡非正常增生，叶绿体变成不规则的球形，膜结构遭到破坏，严重影响光合能力，最终导致果实产量和品质下降，对苹果产业健康发展危害较大^[2]。

2017 年，日本研究者利用高通量测序(Next Generation Sequencing, NGS)技术从表现花叶和坏死症状的苹果叶片中鉴定出一种新的病毒，命名为苹果坏死花叶病毒(apple necrotic mosaic virus, ApNMV)^[3]。ApNMV 属于雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)等轴不稳环斑病毒属(*Ilarvirus*)，基因组结构为三分体，包括 RNA1, RNA2 和 RNA3。RNA1 和 RNA2 均为单顺反子，分别编码与病毒复制相关的蛋白 MET/HEL 和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 POL，前者蛋白的 C 端与后者蛋白的 N 端在这两个蛋白互作中起主要作用^[3-5]。RNA3 为双顺反子，分别编码一个 5' 端的运动蛋白(movement protein, MP)和一个 3' 端的外壳蛋白(coat protein, CP)，CP 中含有 α -螺旋、 β -折叠、锌指结构域和 RNA 结合区域，在病毒的复制、蛋白翻译及与寄主的互作中发挥重要功能^[2-4]。已有的研究表明，ApNMV 在我国苹果花叶病样品中的检出率高达 92%，且在我国苹果种植区普遍发生，是引起我国苹果花叶病的重要病原^[2-4, 6-8]。韩国^[9]、印度^[10]也在少量苹果花叶病样品中检测出 ApNMV。除苹果外，沙果(*Malus* spp.)^[6]、海红果(*Malus micromalus* Makino)^[7]和山楂(*Crataegus* spp.)^[11]也被鉴定出是 ApNMV 的自然寄主。这些结果说明了 ApNMV 可能具有较宽的自然寄主范围，值得引起重视，而新检测技术的开发也有助于新寄主的发现。

目前，NGS 测序技术和逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)是检测 ApNMV 的主要技术手段^[3-4, 9, 11]。尽管 RT-PCR 技术具有检测灵敏、快速等优势，但受到试验条件、检测设备和成本的限制。NGS 虽然具有检测灵敏度强、检测范围广、效率高的特点，但检测过程耗时费力，成本较高，难应用于口岸或田间 ApNMV 的快速检测和鉴定，且不适于对大量样品的检测。血清学方法尤其是酶联免疫吸附分析方法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)因其能够对大量样品进行快速、灵敏、准确的检测，以及试验成本低、方法简单等优点，成为

植物病毒鉴定、分类以及检测的重要工具。近年来, 果树病毒的原核表达及抗血清制备已得到广泛应用^[12-14]。但是, 目前国内外尚无 ApNMV 血清制备及有效检测的相关报道。因此, 本研究利用分子生物学手段在大肠杆菌中高效表达 ApNMV 的 CP, 制备多克隆抗血清, 建立 ApNMV 血清学常规检测体系, 对于生产中该病害的诊断和防控具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

ApNMV 带毒和健康的苹果叶片样品由本实验室保存。

原核表达载体 pET-28a(+)由本实验室保存, 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒和大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自天根生化科技有限公司(天根, 北京), 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自宝日医生物技术有限公司(TaKaRa, 北京), 反转录试剂 dNTP Mix, M-MLV reverse transcriptase, RNase inhibitor 购自于普洛麦格生物技术有限公司(Promega, 北京), 高保真酶 Phusion high-fidelity DNA polymerase 购自美国赛默飞世尔科技公司, 2 \times Taq Mix 购自北京冰达生物科技有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自美国 Axygen 公司, 大肠杆菌原核表达菌株 BL21(DE3)购自北京博迈德生物技术有限公司, 羊抗兔酶标二抗购自北京博尔迈生物技术有限公司, 化学发光显色液和 PVDF 膜购自 Millipore 公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 植物总 RNA 提取及 RT-PCR

叶片总 RNA 提取使用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(天根), 具体操作方法按说明书进行。反转录合成 cDNA, 体系为: dNTP Mix(10 mmol)1 μ L, 5 \times M-MLV buffer 4 μ L, M-MLV reverse transcriptase (200 U \cdot μ L $^{-1}$, PROMEGA)0.5 μ L, RNase inhibitor(40 U \cdot μ L, PROMEGA)0.5 μ L, 随机六聚引物(10 μ M)0.5 μ L, Oligo(dT)18 引物(10 μ M)0.5 μ L, 用灭菌 ddH₂O 补足至 20 μ L。混匀后, 37 °C 温育 1 h。之后, 进行 PCR 扩增目的基因, 体系为: cDNA 1 μ L, dNTP Mix(10 mmol)0.4 μ L, 5 \times Phusion HF buffer 4 μ L, 上游引物 ApnCP-F(CGC GGA TCC ATG GTG TGC AAT CGC TGT CA 下划线序列为 *Bam*H I 酶切位点)0.8 μ L, 下游引物 ApnCP-R(CCG AAG CTT GAC ATC CAA AAG GTC TTC ATC G 下划线序列为 *Hind* III 酶切位点)0.8 μ L, Phusion DNA polymerase(2 U \cdot μ L $^{-1}$, Thermo Scientific)0.25 μ L, 用灭菌 ddH₂O 补足体系至 20 μ L。PCR 反应循环参数: 98 °C 预变性 30 s, 98 °C 变性 10 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 32 次; 72 °C 再延伸 10 min, 4 °C 保存, 预期目的片段大小为 675 bp。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、成像分析后, 使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收目的片段。ApNMV 的检测参考 Xing 等^[4]方法。

1.2.2 原核表达重组质粒构建

分别将回收产物和原核表达载体 pET-28a(+)用 *Bam*H I, *Hind* III 进行双酶切。体系为: 回收产物或 pET-28a(+)质粒 30 μ L, *Bam*H I, *Hind* III 各 2.5 μ L, 10 \times K buffer 5 μ L, 用灭菌 ddH₂O 补足体系至 50 μ L; 混匀后, 37 °C 温育 15 h, 加 5 μ L 10 \times loading buffer 终止酶切反应, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳、成像后, 切下目的条带, 使用凝胶回收试剂盒纯化回收。分别取 4 μ L 双酶切后的目的基因回收产物和 pET-28a(+)回收产物、1 μ L 10 \times T4 DNA buffer 和 1 μ L T4 DNA Ligase(TaKaRa)进行 4 °C 过夜连接反应。将连接液转化入 50 μ L DH5 α 感受态细胞, 涂板(卡那抗性), 37 °C 过夜培养后, 筛选阳性克隆, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.3 CP 基因诱导表达及蛋白纯化

将基因序列、读框均正确的重组质粒及 pET-28a(+)分别转化大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3), 37 °C

过夜培养,挑取单菌落,过夜培养,保存甘油菌并将过夜菌液按 1:20 比例接种到新鲜卡那抗性 LB 培养基,小量表达。小量表达成功后大量表达,接种 100 μ L 甘油菌到 50 mL 卡那抗性 LB 培养基中过夜培养,再按 1:20 比例转接种到 1 000 mL 培养基中,37 °C,160 r/min,振荡培养;当 OD₆₀₀ 达到 0.6 左右时,向培养的菌液中加入 0.5 mmol IPTG,诱导蛋白表达,37 °C,160 r/min,振荡培养 2 h;4 °C,8 000 r/min,20 min 离心回收菌体。纯化蛋白用 Ni Sepharose 6 Fast Flow,最后回收的蛋白集中在 250 mmol 咪唑/8M Urea PBS 中,用于后续多抗免疫。

1.2.4 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blot 检测分析

小量表达时,离心收集菌体,加入 1/10 体积样品缓冲液,震荡悬浮,100 °C 煮沸 5 min,用 12% 的胶进行 SDS-PAGE 分析,浓缩胶电压为 8 V/cm,分离胶为 15 V/cm。考马斯亮蓝 R-250 染色 1 h 后,室温摇床上脱色 3 h。表达产物的 Western blot 分析参考 Towbin 等^[15]的方法,以保存的 His-tag 抗体为一抗,羊抗兔抗体(博尔迈,北京)为酶标二抗,最后用 TMB 显色。大量表达检测则使用经过纯化后的蛋白为上样样品,其余同小量表达 SDS-PAGE 及 Western blot 分析。

1.2.5 抗血清的制备及效价评定

先在试验兔耳静脉取血 2 mL 制备少量正常血清,作为阴性对照。之后,向经过纯化的蛋白产物中加入等体积的福氏完全佐剂(首次)或不完全佐剂(后续)进行乳化,使用 2 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级新西兰兔在屏障环境下进行皮内多点注射免疫。每周五进行免疫,第一次免疫后休息一周,共免疫 6 次。完成免疫后,采血 2 mL 进行 ELISA 效价检测,如效价不够需追加免疫,如效价达标,则进行全采血及 ELISA 检测。制备的抗血清经过滤加入 0.09% 的叠氮化钠,4 °C 保存,备用。另外,将所得抗血清进行 5 倍间隔梯度稀释,以表达的目的融合蛋白为抗原包被,利用间接 ELISA 检测方法测定血清的效价。

1.2.6 间接 ELISA 检测苹果叶片样品

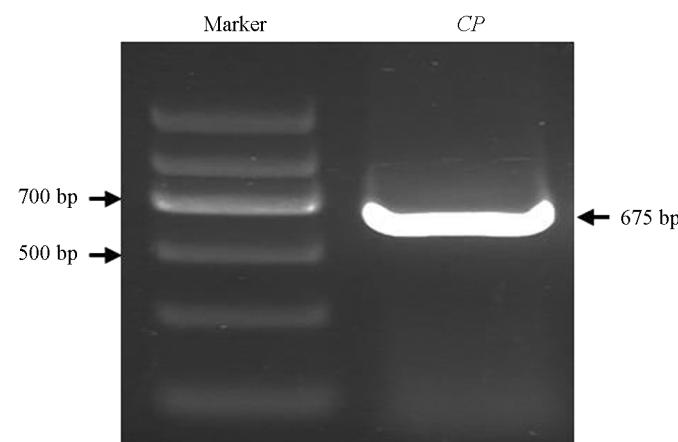
参考施曼玲^[16]、郑世玲^[17]的方法,以制备的稀释 400 倍后的 ApNMV 抗血清为一抗,购买的羊抗兔抗体(博尔迈,北京)为酶标二抗,间接 ELISA(ID-ELISA)法检测田间苹果叶片样品。以不加抗原为空白对照进行校零,测定样品在波长为 450 nm 处的吸光值(OD 值),根据临界值=待测样品 OD 值/阴性对照 OD 值进行结果的判断。本研究中,阴性对照 OD_{450 nm} 数据为 3 个健康苹果样品的均值,待测样品 OD_{450 nm} 测定均做 3 个重复;P/N 值为待测样品与对照样品 OD_{450 nm} 比值,若 P/N 值 >2,则认为样品带毒,否则不带毒。

2 结果与分析

2.1 CP 基因克隆及重组质粒构建

提取苹果花叶病叶片样品总 RNA,经反转录后,用特异性引物 ApnCP-F/R 进行 RT-PCR 扩增,产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,两个泳道中均有明亮、单一且符合预期目的基因大小(675 bp)的特异性条带(图 1)。

切胶纯化目的条带, *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后,连入经相同限制性内切酶处理后的原核表达载体 pET-28a(+),连接后得到重组质粒。经过测序验证,表明 CP



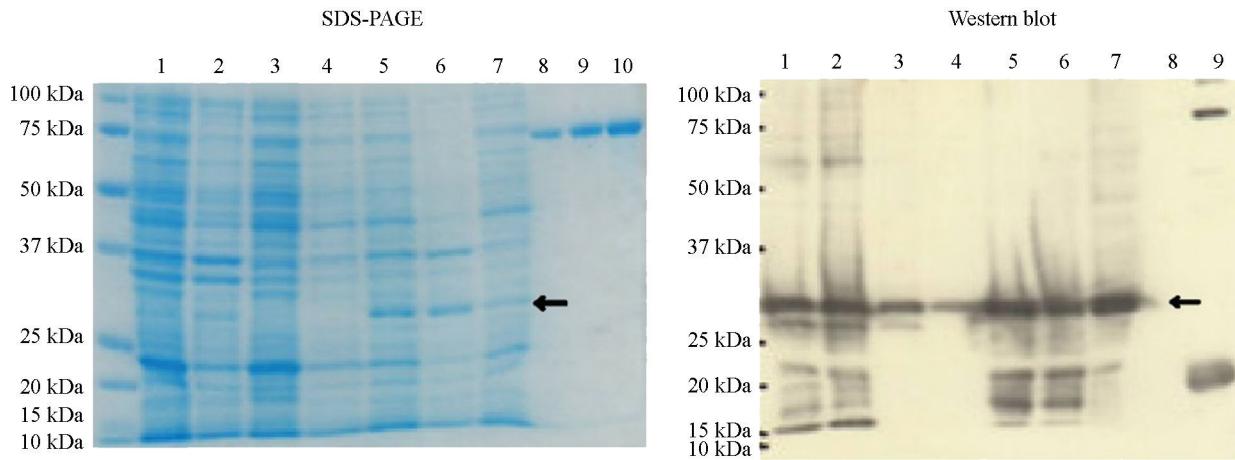
Marker: DNA marker II; CP: ApNMV CP, 目的条带大小为 675 bp.

图 1 RT-PCR 扩增苹果中 ApNMV CP 基因

基因以正确的序列和读码框连接到表达载体中。在 NCBI 分别进行 Blastn 和 Blastx 比对, 发现获得的 ApNMV CP 序列在核苷酸水平和蛋白水平与已登陆的序列相似性均为 96%~100%, 其中, 所得序列与 ApNMV 分离物 AM75 RNA3(登录号: KY808387)编码的 CP 序列完全一致。表明 CP 序列较为保守, 适合用于蛋白表达制备抗血清用以检测 ApNMV。

2.2 CP 基因诱导表达检测

37 °C 过夜培养大肠杆菌表达菌株后, 经煮沸裂解细胞, 释放表达蛋白, 对小量表达样品进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测分析。结果显示, 裂解溶液、沉淀部分和上清部分均能在分子量约 25 kDa 处检测到与重组蛋白预期大小一致的目的条带; SDS-PAGE 分析显示, 未经 IPTG 诱导的泳道中则无明显的符合预期大小的条带, 但 Western blot 能够杂交出微弱条带; 经 IPTG 诱导表达后, 重组蛋白表达量显著增加(图 2)。由此表明, CP 基因被成功诱导表达。



SDS-PAGE: 1. 37 °C 过夜培养裂解液; 2. 37 °C 过夜培养沉淀部分; 3. 37 °C 过夜培养上清部分; 4. 未经 IPTG 诱导; 5. 经 IPTG 诱导全部裂解液; 6. 经 IPTG 诱导沉淀部分; 7. 经 IPTG 诱导上清部分; 8. BSA 0.5 μg; 9. BSA 1.0 μg; 10. BSA 2.0 μg。

Western blot: 1. 37 °C 过夜培养裂解液; 2. 37 °C 过夜培养沉淀部分; 3. 37 °C 过夜培养上清部分; 4. 未经 IPTG 诱导; 5. 经 IPTG 诱导全部裂解液; 6. 经 IPTG 诱导沉淀部分; 7. 经 IPTG 诱导上清部分; 8. 阴性对照; 9. 阳性对照; 抗 His 抗体检测。

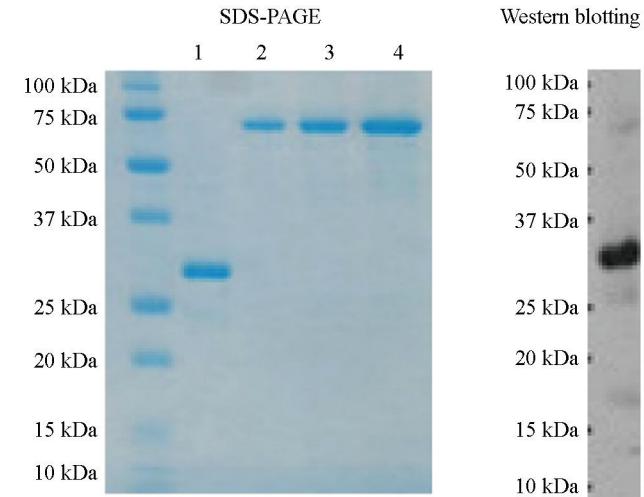
图 2 重组蛋白小量表达 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

2.3 重组蛋白大量表达及纯化

小量蛋白表达分析证明了目的蛋白被成功表达, 进一步扩大培养, 诱导蛋白大量表达后, 对大肠杆菌裂解后的沉淀部分用 Ni Sepharose 6 Fast Flow 进行蛋白纯化, 经过回收的蛋白集中在 250 mmol 碳酸/8M Urea PBS 中, 浓度 1.2 mg/mL, 体积 2 mL, 共纯化得到重组蛋白 2.4 mg。另外, 将得到的纯化蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测分析, 在分子量约 25 kDa 附近有主要目的蛋白条带出现, 说明试验纯化出符合要求的目的蛋白(图 3)。

2.4 抗血清的制备和效价评定

将纯化的目的蛋白免疫 2 只 SPF 级新西兰兔, 最后获得了 ApNMV 的特异性抗血清。以表达的目的融合蛋白为抗原包被, 利用间接 ELISA 检测方法测定抗血清的效价。结果表



SDS-PAGE: 1. 纯化蛋白 1 μg; 2. BSA 0.5 μg; 3. BSA 1.0 μg; 4. BSA 2.0 μg。

Western blot: 纯化蛋白 0.5 μg, 抗 His 抗体检测。

图 3 重组蛋白大量表达 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

明, 2 只兔子的采血血清稀释 62 500 倍后仍能表现明显的阳性反应, 同时与免疫前血清、空白对照没有明显的血清学反应(图 4)。

2.5 间接 ELISA 法检测苹果叶片样品

利用实验室制备的 ApNMV 抗血清, 通过间接 ELISA 法对来自田间的苹果叶片进行检测。样品的检测结果显示, 样品 1~6 的 P/N 值均大于 2, 判断为 ApNMV 阳性; 7~9 样品 P/N 值均小于 2, 判断为 ApNMV 阴性(表 1)。该 ELISA 检测结果与前期 RT-PCR 检测结果一致, 表明制备的 ApNMV 抗血清能够应用于苹果叶片 ApNMV 的检测。

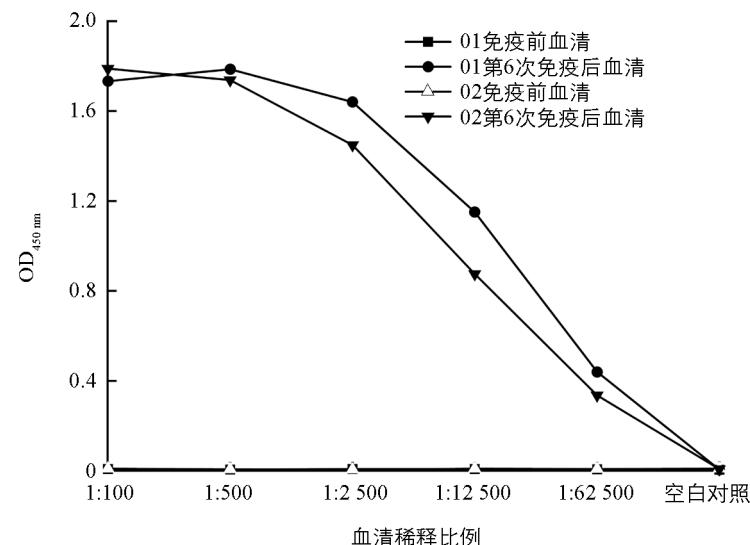


图 4 多克隆抗血清效价检测

表 1 样品间接 ELISA 测定 ApNMV

指标	1	2	3	4	5	6	7	8	9	对照
OD _{450 nm}	0.192	0.087	0.123	0.116	0.195	0.076	0.015	0.008	0.009	0.017
P/N 值	11.01	5.01	7.03	6.67	11.18	4.35	0.83	0.47	0.51	1
RT-PCR	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

3 讨论

ApNMV 是一种新的植物病毒, 是导致我国苹果花叶病的重要病原物^[2-4, 6, 8]。考虑到苹果栽培在我国农业生产中的重要地位, 加强对该病毒的检测并进一步提出合理科学的防控措施尤为必要。血清学检测是病毒检测的重要手段, 尤适用于大量样品的检测, 被广泛用于田间病毒病的发生分布调查。病毒特异性抗血清的制备是进行血清学检测的基础, 血清通过与相应抗原的特异结合发生免疫反应, 选择合适的血清反应方法不仅可以检测到寄主植物中病毒存在与否, 同样能够进行病毒含量多少的测定^[18]。

等轴不稳环斑病毒属病毒的 CP 由源于 RNA3 的亚基因组 RNA4 编码, 3' 端能够形成复杂的二级结构, 参与病毒的复制, 激活病毒的侵染过程, 具有较强的保守性^[19-21]。为此, 本研究利用较强保守性的外壳蛋白为表达目的蛋白, 制备出多克隆抗血清, 以此避免检测过程中假阴性结果的出现。同时, 由于构建的重组质粒表达产物中不含有植物蛋白成分, 在用血清学方法检测相应病毒病原时不易出现假阳性^[22]。

研究表明, 插入目的基因、载体及菌株类型与培养条件等因素可能会影响外源基因的表达^[23]。本研究选用了高效表达载体 pET-28a(+)作为构建 ApNMV CP 基因原核表达的骨架载体, 该载体采用 T7 lacI 原核启动子, 能够极大提高翻译效率。该载体携带 6×His 标签, 一方面有助于利用 His 抗体杂交目的融合蛋白, 借助蛋白分子量标准, 判断目的基因表达情况; 另一方面, 所表达出的融合蛋白能够利用 Ni 柱进行快速纯化。此外, 6×His 标签蛋白分子量小, 免疫原性低, 有助于与目的蛋白连接时减少对其空间构象及活性的影响。构建成功的重组载体导入到大肠杆菌表达菌株中进行融合蛋白的诱导表达, 本研究首先使用小量表达, 以证明构建的载体能够成功表达出目的蛋白; 再扩大培养菌株, 大量表达以纯化出足够量的目的蛋白, 以此免疫兔子获得较高浓度针对 ApNMV CP 的特异性抗体。进行抗血清效价评定时, 先利用纯化出的融合蛋白作为抗原, 测试显示制备的抗血清效价较高。进一步以此抗血清为基础, 利用间接 ELISA 方法对田间采集的苹果叶片样品进行 ApNMV 检测, 检测结果与 RT-PCR 结果相一致, 表明制备出的抗血清灵敏度高。考虑到苹果花叶病毒(apple mosaic virus, ApMV)、李属坏死环斑病毒(prunus necrotic ring-spot virus, PNRSV)与 ApNMV 较近的遗传进化关系^[4, 8], 本研究试图利用 ApMV, PNRSV 阳性苹果叶片样品评估制备的抗血清的特异性。但多年来, 本实验室未从苹果中检测到这两种病毒, 因而利用感染了 PNRSV 的桃叶片作为待测样品, 结果显示本研究制备的 ApNMV 抗血清与桃中 PNRSV 未见明显的免疫

反应, 说明该抗血清具有较好的特异性。

4 结论

本研究成功进行了 ApNMV CP 基因的原核表达, 制备出抗血清, 并首次建立了一种简便、快速、灵敏度高、特异性良好的间接 ELISA 检测方法, 为 ApNMV 田间调查提供了可行的检测手段, 为病害诊断与防控提供了技术基础。

参考文献:

- [1] 魏宁生. 苹果花叶病试验初报 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 1959(3): 41-74, 125-134.
- [2] SHI W S, YAO R D, SUNWU R Z, et al. Incidence and Molecular Identification of Apple Necrotic Mosaic Virus (ApNMV) in Southwest China [J]. Plants, 2020, 9(4): 415.
- [3] NODA H, YAMAGISHI N, YAEGASHI H, et al. Apple Necrotic Mosaic Virus, a Novel Ilarvirus from Mosaic-Dis-eased Apple Trees in Japan and China [J]. Journal of General Plant Pathology, 2017, 83(2): 83-90.
- [4] XING F, ROBE B L, ZHANG Z X, et al. Genomic Analysis, Sequence Diversity, and Occurrence of Apple Necrotic Mosaic Virus, a Novel Ilarvirus Associated with Mosaic Disease of Apple Trees in China [J]. Plant Disease, 2018, 102(9): 1841-1847.
- [5] ZHANG Z L, ZHANG F J, ZHENG P F, et al. Determination of Protein Interactions among Replication Components of Apple Necrotic Mosaic Virus [J]. Viruses, 2020, 12(4): 474.
- [6] HU G J, DONG Y F, ZHANG Z P, et al. Molecular Characterization of Apple Necrotic Mosaic Virus Identified in Crabapple (*Malus* spp.) Tree of China [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(3): 698-701.
- [7] 李正男, 张磊, 耿帅鑫, 等. 内蒙古呼和浩特地区苹果坏死花叶病毒的检测与遗传多样性研究 [J]. 中国果树, 2020(3): 39-42, 143.
- [8] 邢飞, 王红清, 李世访. 中国苹果花叶病病原研究现状分析 [J]. 果树学报, 2020, 37(12): 1953-1963.
- [9] CHO I S, KWON S J, YOON J Y, et al. First Report of Apple Necrotic Mosaic Virus Infecting Apple Trees in Korea [J]. Journal of Plant Pathology, 2017, 99(3): 815.
- [10] NABI S U, BARANWAL V K, YADAV M K, et al. Association of Apple Necrotic Mosaic Virus (ApNMV) with Mosaic Disease in Commercially Grown Cultivars of Apple (*Malus domestica* Borkh) in India [J]. 3 Biotech, 2020, 10(3): 122.
- [11] XING F, HOU W Y, MASSART S, et al. RNA-Seq Reveals Hawthorn Tree as a New Natural Host for Apple Necrotic Mosaic Virus, Possibly Associated with Hawthorn Mosaic Disease [J]. Plant Disease, 2020, 104(10): 2713-2719.
- [12] 怀晓, 周颖, 张瑞, 等. 苹果茎沟病毒外壳蛋白基因的克隆、原核表达及抗血清制备 [J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 436-440.
- [13] 任芳, 董雅凤, 张尊平, 等. 葡萄 A 病毒外壳蛋白原核表达及抗血清制备 [J]. 植物病理学报, 2014, 44(3): 327-331.
- [14] 任芳, 董雅凤, 张尊平, 等. 葡萄病毒 B 外壳蛋白原核表达及抗血清制备 [J]. 园艺学报, 2016, 43(11): 2233-2242.
- [15] TOWBIN H, STAEHELIN T, GORDON J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(9): 4350-4354.
- [16] 施曼玲. 芫菁花叶病毒单克隆抗体制备及病毒基因组变异研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [17] 郑世玲. 中国小麦花叶病毒侵染性克隆构建及运动蛋白的功能分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [18] 刘大群, 董金皋. 植物病理学导论 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [19] BOL J F. Alfalfa Mosaic Virus and Ilarviruses: Involvement of Coat Protein in Multiple Steps of the Replication Cycle [J]. The Journal of General Virology, 1999, 80(Pt 5): 1089-1102.
- [20] BOL J F. Replication of Alfamо- and Ilarviruses: Role of the Coat Protein [J]. Annual Review of Phytopathology, 2005, 43: 39-62.
- [21] OLSTHOORN R C, MERTENS S, BREDERODE F T, et al. A Conformational Switch at the 3' End of a Plant Virus RNA Regulates Viral Replication [J]. The EMBO Journal, 1999, 18(17): 4856-4864.
- [22] 韩成贵, 李大伟, 于嘉林, 等. 小麦黄色花叶病毒外壳蛋白基因 *E. coli* 表达产物特异性抗血清的制备及其应用 [J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(4): 373-376.
- [23] 乔艳艳, 杨翠云, 于翠, 等. 烟草环斑病毒外壳蛋白基因片段原核表达载体的构建及表达 [J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(3): 345-349.