

# 基于抗原表位烟草环斑病毒单克隆抗体的制备

秦绍钊<sup>1,2</sup> 何月秋<sup>1</sup> 李旻<sup>2</sup> 雷屈文<sup>1,2</sup> 王光勇<sup>3</sup> 丁元明<sup>2</sup>

1. 云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201; 2. 云南出入境检验检疫局技术中心, 昆明 650228;  
3. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650224

**摘要** 基于多种生物信息学软件综合预测烟草环斑病毒(TRSV)外壳蛋白抗原表位所在的结构域,明确了该外壳蛋白抗原表位可能位于C端319~328、384~388、420~430、480~487、495~511位氨基酸残基附近。通过RT-PCR扩增出了目的片段,构建了TRSV外壳蛋白原核表达载体,表达的TRSV外壳蛋白外源融合蛋白具免疫活性。采用杂交瘤细胞技术,利用外源融合蛋白制备了单克隆抗体,制备的抗血清可与TRSV外壳蛋白基因原核表达产物发生免疫反应。检验结果表明,制备的抗血清具较好的特异性,可应用于TRSV的检验检疫。

**关键词** 烟草环斑病毒; 抗原表位; 原核表达; 融合蛋白; 单克隆抗体

**中图分类号** S 41; S 432.4<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0598-06

烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot virus*, TRSV)隶属豇豆花叶病毒科(Comoviridae),是线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)的代表种。该病毒粒子是球状、等轴、直径约28 nm的二十面体,壳粒由60个外壳蛋白亚基组成。TRSV的自然寄主范围广,可侵染54科246种植物<sup>[1]</sup>。TRSV传播途径多样,可通过种子传播、嫁接、机械接种、媒介传播。TRSV分布于世界50多个国家,我国已从荷兰进口的萝卜种子、美国进口的大豆和塞尔维亚进口的葵花种子等进口货物中截获了烟草花叶病毒,并将其列入中国进境检疫性有害生物名录<sup>[2-3]</sup>。为防止其通过进出口贸易传入我国,需要加大检验检疫力度。

近年来,国内关于烟草环斑病毒的研究报道较多,但主要集中在生物学的研究和检测方法的建立。早期的研究工作多在病毒的复制与转录、病毒粒子细胞间传播过程和电化学酶联免疫分析等方面<sup>[3-6]</sup>。分子检测的研究主要体现在建立各种不同的方法。杨翠云等<sup>[7-8]</sup>建立了RT-PCR和IC-RT-PCR检测方法。易汪雪等<sup>[9]</sup>建立了单管实时荧光RT-PCR方法。常规的RT-PCR方法检测也有相关的报道<sup>[10-12]</sup>。以上检测方法虽能提高检验检疫工作效率,但是在检测过程中因检测样品较多,需要使用大量的抗血清,其中大部分是价格昂贵的进口血清,加之进口血清到货时间周期长,故不便于检测工作的

顺利开展。国内有关TRSV抗血清制备的报道中,制备的血清为多克隆抗体<sup>[13]</sup>或只是原核表达载体的构建<sup>[14]</sup>,尚未见TRSV单克隆抗体制备的研究与报道。由于多抗血清的特异性和效价都存在一定的局限,所以无法保障检测结果的准确性。

笔者根据综合预测结果,有针对性地扩增烟草环斑病毒壳蛋白抗原表位基因所在结构域,获取了其外壳蛋白的外源融合蛋白,并通过杂交瘤细胞技术制备特异性强、灵敏度高的TRSV单克隆抗体,旨在为准确、快速检疫烟草花叶病毒提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

烟草环斑病毒(TRSV)从来自云南的文殊兰上分离得到; *E. coli* DH5 $\alpha$ 、TOP10菌种; BALB/c小鼠, SP2/0骨髓瘤细胞等供试细胞均由云南出入境检验检疫局技术中心提供。

克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司; 原核表达试剂盒 pBAD/TOPO<sup>®</sup> ThioFusion<sup>™</sup> Expression Kit 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 生物信息学软件分析

首先,利用软件 Clustal X(1.83)、MEGA 5.0 和 BioEdit 7.0 对 TRSV 所有分离物核苷酸序列和氨基酸序列进行多序列比对(multiple sequence

收稿日期: 2012-04-16

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2010 IK259)

秦绍钊, 博士研究生. 研究方向: 植物病毒学. E-mail: sz\_qin@163.com

通讯作者: 丁元明, 硕士, 研究员. 研究方向: 植物病毒病害及检验检疫. E-mail: dingdym2008@yahoo.com.cn

alignment)分析各自的保守区域。其次,通过蛋白质结构预测结果最可靠的同源模型化的方法,分析 TRSV 外壳蛋白有 3 个主要结构域,显示外壳蛋白模拟结构中暴露在表面的位点。第三,采用不同的计算方法和软件分析 TRSV 外壳蛋白的抗原表位、氨基酸弹性、表面可及性分析、抗原指数、 $\beta$  片层和卷曲结构、 $\alpha$  螺旋和  $\beta$  转角。第四,根据以上 3 个方面的研究结果,确定 TRSV 外壳蛋白抗原表位在不同结构域中所在的区域。

### 1.3 RNA 提取和引物设计

采用 Invitrogen 公司的 Trizol 方法提取病毒总 RNA。溶解在 30  $\mu$ L DEPC 处理的水中,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存。根据 GenBank 中已报道的 TRSV-CP 基因序列(登录号: AF461163, AF461164, AY363727, AY787756, L09205, NC005096)保守区,结合抗原表位预测的结果,设计了特异性引物。引物由上海生工生物技术有限公司合成。F-primer TRSV-CP1: 5'-ATGGGGCCCGTCATTGATCGT-3'(1~21); R-primer TRSV-CP1: 5'-GAACAAAGTG-GCGGAGCGACC-3'(1 044~1 024)。

### 1.4 RT-PCR 目的片段的扩增

cDNA 第一链的合成,反应体系为 20  $\mu$ L,在 0.5 mL PCR 反应管中,先加入总 RNA 5  $\mu$ L, Random primer(10 pmol/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, AMV (10 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 5 $\times$ Buffer 5  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, DEPC 处理水 5  $\mu$ L。反应条件: 25  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  90 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  5 min。

PCR 反应体系为 20  $\mu$ L: ddH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ L; dNTP (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L; 10 $\times$  LA $Taq$  Buffer 5  $\mu$ L; Up primer(10 pmol/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L; Down primer (10 pmol/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L; cDNA 3  $\mu$ L; LA $Taq$  polymerase (1 U/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L。

PCR 反应条件: 预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 变性 94  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 退火 58  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  90 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 16  $^{\circ}\text{C}$  保存。

取 PCR 产物 5  $\mu$ L, Marker 为 DL 2 000, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,观察所扩增片段的大小。采用 TaKaRa 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒纯化 DNA。

### 1.5 原核表达载体的构建

将 PCR 产物回收纯化后,按载体操作手册进行连接,连接反应体系组成: PCR 回收纯化产物 4.5  $\mu$ L(50~250 ng); 10 $\times$  Ligase Buffer 1  $\mu$ L; 载体

DNA 0.5  $\mu$ L; T4 DNA Ligase 1  $\mu$ L; 加 dd H<sub>2</sub>O 至终体积;置于 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。

用 *Nco* I 和 *Eco* RV 进行双酶切鉴定。酶切体系(100  $\mu$ L): 10 $\times$  Buffer 20  $\mu$ L; *Nco* I 2  $\mu$ L; *Eco* RV 2  $\mu$ L; pBAD/TOP-CP 10  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 66  $\mu$ L; 混匀后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜。酶切产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析。将经酶切鉴定为阳性的克隆进行序列测定。将鉴定正确的重组子(命名为 pBAD/TOP-TRSV-CP)送上海生工生物技术公司进行序列测定。

### 1.6 外源蛋白的表达、纯化及鉴定

将上述测序后正确的菌落在平板 LB(Amp, 100  $\mu$ g/mL)上划线,将单菌落接种于 3 mL 液体 LB(Amp, 100  $\mu$ g/mL)中, 37  $^{\circ}\text{C}$  下 120 r/min 振荡培养至  $D_{600}=1\sim 2$ 。将 30  $\mu$ L 菌液分别加入已准备的含有 3 mL 液体 LB(Amp, 100  $\mu$ g/mL)的 5 个冻存管中, 37  $^{\circ}\text{C}$  下 120 r/min 振荡培养至  $D_{600}=1\sim 2$ 。上述 3 mL 的正处于对数生长期中期的培养物,以不同终质量分数为 0.2%、0.02%、0.002%、0.0002% 的阿拉伯糖溶液进行诱导, 37  $^{\circ}\text{C}$  下 120 r/min 振荡培养 4 h。

按 Invitrogen 公司的 ProBond<sup>TM</sup> Purification System 说明书中纯化多聚组胺酸融合蛋白的步骤以 Ni<sup>2+</sup>-NTA 方法从表达培养菌液中纯化重组蛋白,表达产物的 SDS-PAGE 凝胶电泳参照朱常香等<sup>[13]</sup>的方法进行。

### 1.7 表达产物 Western blot 的鉴定

采用 Invitrogen 公司的 ProBond<sup>TM</sup> 多聚组胺酸融合蛋白纯化试剂盒的抗 V5 的抗体(结合辣根过氧化物酶标记,即 Anti-V5-HRP)作为与靶蛋白结合的特异抗体进行 Western blot 分析。

### 1.8 间接 ELISA 方法的建立

第 3 次免疫 7 d 后,每只小鼠断尾采血 100  $\mu$ L,在选择抗原的最佳包被浓度、最佳包被条件和抗体最佳工作浓度、最佳反应时间等条件的基础上,建立间接 ELISA 方法。用该方法检测小鼠免疫后的抗体水平以及筛选阳性细胞孔。

1)包被。用包被液分别按 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 稀释抗原为最佳包被浓度,然后分别加到酶标板中,每孔加 100  $\mu$ L,在最佳包被条件下进行包被。

2)洗板。弃去包被液拍干后,每孔加洗涤液 200  $\mu$ L, 4 min 后弃洗涤液。如此重复 3 次。

3)封闭。每孔加封闭液 200  $\mu$ L, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h,

弃封闭液。洗涤同上。

4) 加一抗。将抗体稀释到最佳浓度, 加到酶标板中, 每孔加 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱分别孵育 30、60、90、120 min, 筛选最佳反应时间。

5) 洗板。同上。

6) 加酶标二抗。将抗体按 1 : 5 000 稀释到最佳浓度, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱分别孵育 30、60、90、120 min, 筛选最佳反应时间。

7) 洗板。同上。

8) 显色。加底物液, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  避光放置 10 min。

9) 终止。加终止液终止显色反应, 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 用酶标仪测定  $D_{450}$  值。

10) 结果判定。以  $P/N \geq 2.1$  且  $P/N$  值最大时所对应的反应时间为最佳反应时间。

### 1.9 单克隆抗体的制备

病毒提纯参照明艳林等<sup>[15]</sup>的方法进行。通过 4 次免疫 5 只 6 周龄的 BALB/c 小鼠, 采用杂交瘤细胞技术制备单克隆抗体<sup>[16]</sup>。

### 1.10 单克隆抗体的纯化和鉴定

单克隆抗体的纯化采用辛酸-饱和和硫酸铵法进行<sup>[16-18]</sup>。采用间接 ELISA 方法检测 TRSV 单克隆抗体与 LoMV、ArMV、LSV、SLRSV 的交叉反应性。用 Biotech 公司的免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒鉴定单抗的抗体亚类。

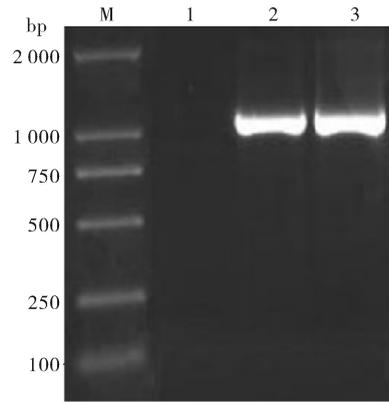
## 2 结果与分析

### 2.1 TRSV-CP 抗原表位预测结果

利用软件综合分析, 预测 TRSV 外壳蛋白抗原表位区可能位于 C 端 319~328、384~388、420~430、480~487、495~511 位氨基酸残基附近。

### 2.2 TRSV-CP 基因的扩增与克隆

用设计的 CP 基因特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 显示扩增片段大小约 1 044 bp, 与预期结果相符(图 1)。PCR 扩增产物经回收、连接、转化克隆到 pMD-18T 载体上进行双酶切, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 将经酶切鉴定为阳性的克隆进行序列测定。将鉴定正确的重组子(命名为 pMD-18T-TRSV-CP) 送上海生工生物技术公司测序。测序结果表明, 本试验所扩增的序列与 GenBank 中已报道的 TRSV-CP 基因序列同源性达到 94%~99%。确认所挑选的菌落为含有插入目的片段的重组子。



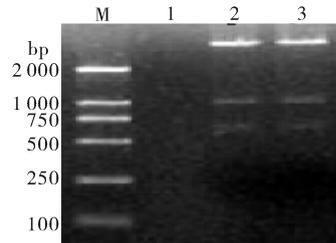
M. 分子质量标准; 2, 3. 目的基因 PCR 扩增产物; 1. 阴性对照( $\text{H}_2\text{O}$ )。M. Marker; 2, 3. PCR products amplified; 1. Negative control( $\text{H}_2\text{O}$ )。

图 1 TRSV CP 基因的 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretic profile of TRSV CP RT-PCR product

### 2.3 表达载体的酶切与测序

用质粒提取试剂盒提取 pBAD-TRSV-CP 重组表达质粒, 用 *Nco* I 和 *Eco*RV 对表达重组质粒进行双酶切, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, CP 基因正向插入的质粒产生约 3.6、1.1、0.6 kb 的 3 条片段, 均与预期的目的条带大小基本一致(图 2)。将鉴定正确的重组子(命名为 pBAD-TRSV-CP) 送上海生工生物技术公司进行测定, 测序结果与预期的一致。



M. 分子质量标准; 1. 阴性对照( $\text{H}_2\text{O}$ ); 2, 3. CP 基因正向插入。M. Marker; 1. Negative control( $\text{H}_2\text{O}$ ); 2, 3. Insert CP gene recombination plasmid.

图 2 重组质粒 pBAD-TRSV-CP 的酶切鉴定

Fig. 2 The identification of the recombination plasmid pBAD-TRSV-CP

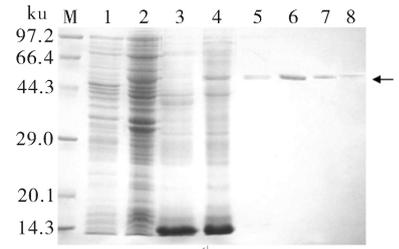
### 2.4 表达产物的纯化与鉴定

SDS-PAGE 分析结果表明, 经阿拉伯糖诱导表达, 可产生约 54.7 ku 的特异蛋白条带, 且以终质量分数为 0.02% 的阿拉伯糖诱导表达 4.5 h 后的表达量最高(图 3)。经诱导的阳性对照菌和未经诱导菌株的菌液中未见相应的条带, 据此可初步确定重组

表达质粒 pBAD/TOP-TRSV-CP 中外壳蛋白基因得到表达。

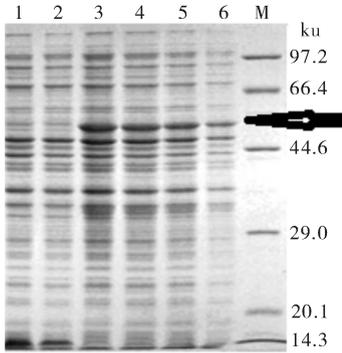
诱导培养后收获的菌体经高压破碎仪破碎，离心取上清液为粗提物，经 SDS-PAGE 分析，沉淀中无目的蛋白，说明已经完全获得了目的蛋白。粗提的重组蛋白质经 Ni<sup>2+</sup>-NTA 纯化和 SDS-PAGE 电泳分析，结果只有 1 条分子质量为 54.7 ku 的蛋白质条带(图 4)。图 4 中的泳道 3 与 4 作为菌液纯化前后的对比，证实重组核蛋白得到了很好纯化。

将 pBAD-TRSV-CP 重组载体表达的重组 CP 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后，转移至硝酸纤维素滤膜上，加入 His 标签标记的鼠抗抗体完成免疫学反应，显色后出现与重组融合蛋白分子质量相应大小的条带(图 5)，说明所表达的 TRSV-CP 蛋白具有良好的免疫学活性。



M. 蛋白分子质量标准；1. 阴性表达对照(未诱导菌株)；2. 终质量分数为 0.02% 的阿拉伯糖诱导表达结果；3. 纯化后菌液；4. 纯化前菌液；5~8. 蛋白纯化结果。M. Protein marker；1. Negative control (non-induced)；2. pBAD-TRSV-CP induced expression by at 0.2% L-arabinose；3. Purified liquid of TRSV-CP；4. Non-purified liquid of TRSV-CP；5-8. Purified TRSV-CP protein.

图 4 纯化后 TRSV-CP 蛋白的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified protein from pBAD-TRSV-CP induced expression in TOP10



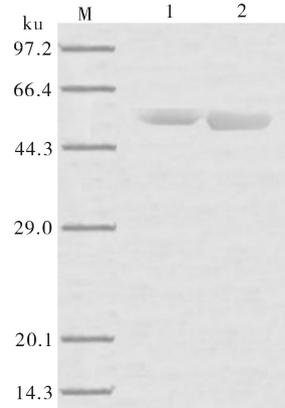
M. 蛋白分子质量标准；1. 阳性对照；2. 阴性对照(未诱导菌株)；3~6. 终质量分数分别为 0.2%、0.02%、0.002%、0.0002% 的阿拉伯糖在 TOP10 中的诱导表达。M. Protein marker；1. Positive control；2. Negative control (non-induced)；3-6. pBAD-TRSV-CP induced expression in TOP10 by L-arabinose at 0.2%，0.02%，0.002%，0.0002% respectively.

图 3 重组质粒 pBAD-TRSV-CP 在 TOP10 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the pBAD-TRSV-CP expression product in *E. coli* TOP10

### 2.5 间接 ELISA 方法的建立

根据小鼠血清的方阵滴定试验结果，确定纯化 TRSV 的最佳包被质量浓度为 5 μg/mL，按照 P/N≥2.1 的判断标准，免疫小鼠的抗体效价达到了 1:5120 以上，可用于细胞融合。通过优化间接 ELISA 方法的各种孵育条件，最终确定抗原的最佳包被条件为 37 °C 孵育 1 h，放置 4 °C 过夜；一抗的最佳反应时间为 37 °C 孵育 90 min；酶标抗体的最



M. 蛋白分子质量标准；1,2. 诱导表达产物的免疫印迹分析。M. Protein marker；1,2. Analysis of the expressed product by Western blot.

图 5 诱导表达产物的 Western blot 分析

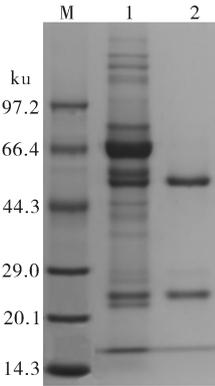
Fig. 5 Analysis of the expressed product by Western blot  
佳孵育时间为 60 min。

### 2.6 单克隆抗体的纯化与鉴定

由于胎生牛血清中支原体的污染，试验最终只获得 1 株杂交瘤细胞株(6D2)，其单抗亚型测定结果为 IgG2a，轻链的亚型均为 k 链。纯化的 McAb 经 SDS-PAGE 电泳分析表明，得到的 McAb 均有 2 条明显的电泳条带(图 6)，大小分别在 53 ku 和 22 ku 左右，与 BALB/c 小鼠 IgG 的重链和轻链理论值一致。Western blot 杂交结果显示，6D2 细胞株分泌的单克隆抗体均能识别 TRSV 中的 CP 蛋白。

阳性杂交瘤细胞株 6D2 细胞上清分别与用不

同病毒建立的间接 ELISA 进行反应,细胞上清与 TRSV 的病毒粗提液的 ELISA 反应时呈阳性,而其他病毒 LoMV、ArMV、LSV、SLRSV 的粗提液建立的 ELISA 反应时均为阴性,健康植株叶片提取液为阴性对照材料,结果表明单抗具有良好的特异性。



M. 蛋白分子质量标准; 1. 未纯化的单克隆抗体; 2. 纯化的单克隆抗体。M. Protein marker; 1. Non-purified McAb; 2. Purified McAb 6D2.

图 6 SDS-PAGE 鉴定纯化的 6D2 腹水单抗

Fig. 6 SDS-PAGE of purified McAb 6D2

### 3 讨论

烟草环斑病毒是中国检疫性有害生物,无论是检疫工作还是常规检验都需要大量抗血清完成初期的 ELISA 鉴定。目前,国内制备的抗血清都是多抗血清,不仅特异性差、效价低,而且劳动强度大。本试验采用生物信息学的方法,综合预测了 TRSV 外壳蛋白主要分布于  $\beta$  转角结构和无规则卷曲区域、亲水性和表面可及性参数较高区域,分别位于 C 端 319~328、384~388、420~430、480~487、495~511 位氨基酸残基附近的抗原表位。TRSV 外壳蛋白抗原表位的分析结果,可为制备具有强免疫性免疫原和获得特异性强且灵敏度高的抗血清提供理论依据,研究成果的应用将有望改变我国一直进口高价血清的被动局面。

单克隆抗体制备周期长、环节多,影响因素也较多。霉菌和支原体的污染问题非常严重,直接影响了抗体的制备。本试验在后期培养过程中,由于胎牛血清含有支原体导致丢失了 3 株阳性杂交瘤细胞株,在今后的试验中应随时观察,防止此类事情再次发生。另外,本试验所获得的 TRSV 单克隆抗体尚未对各抗原表位的免疫效果进行分析,但可在下一步的试验中进行更深入研究,并且与完整的 CP 进行比较,以便更精确地判断抗原表位所处的区域。

本试验所制备的 TRSV 单克隆抗体和建立的检测方法,可为烟草环斑病毒病的快速诊断和检疫工作中的准确检测提供新途径,并能为经济作物的抗病育种、脱毒种球种苗生产等提供技术支持,同时,还能为研究烟草环斑病毒病侵染寄主的分子机制提供科学依据。

### 参 考 文 献

- [1] 魏梅生,李桂芬,陈燕芳,等. 烟草环斑病毒无侵染性组分的分离[J]. 植物检疫,2000,14(4):193-195.
- [2] 文朝慧,刘箭,王军平,等. 从荷兰进境的萝卜种子中截获烟草环斑病毒[J]. 植物检疫,2009,23(6):34.
- [3] 黄江华,陈秀菊,彭仁,等. 烟草环斑病毒研究进展[J]. 现代农业科学,2008,215(1):24-27.
- [4] 魏梅生. 斑点免疫金和免疫金/银染色法测烟草环斑病毒[J]. 植物检疫,2000,141(1):1-2.
- [5] 李学湛. 烟草环斑病毒粒体细胞间传播过程的电镜观察[J]. 植物病理学报,1990,20(2):127-129.
- [6] 封立平,陈长法,孙伟,等. 电化学酶联免疫分析法检测烟草花叶病毒和烟草环斑病毒[J]. 检验检疫科学,2003,13(2):3-5.
- [7] 杨翠云,于翠,张舒亚,等. 利用实时荧光 RT-PCR 方法检测番茄环斑病毒和烟草环斑病毒[J]. 植物检疫,2006,20(1):31-34.
- [8] 杨翠云,曹洁,于翠,等. 烟草环斑病毒 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测方法的研究[J]. 上海农业学报,2007,23(1):83-87.
- [9] 易汪雪,陈舜胜,杨翠云,等. 单管实时荧光 RT-PCR 方法同时检测大豆种子中的菜豆荚斑驳病毒和烟草环斑病毒[J]. 植物病理学报,2011,41(1):85-92.
- [10] 孙宝华,蔡红,陈海如,等. RT-PCR 方法检测烟草环斑病毒的研究[J]. 云南农业大学学报,2001,16(1):13-15.
- [11] 相宁,孙彤,刘宏迪,等. 烟草环斑病毒 PCR 产物的克隆和部分序列分析[J]. 植物检疫,1998,12(5):260-263.
- [12] 陈燕芳,陈京,宋淑敏,等. 烟草环斑病毒的检疫检测方法[J]. 植物检疫,1999,13(4):215-217.
- [13] 朱常香,宋云枝. 烟草环斑病毒外壳蛋白基因的原核表达及抗血清的制备[J]. 中国病毒学,2005,20(4):434-437.
- [14] 乔艳艳,杨翠云. 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.
- [15] 明艳林,李梅. RT-PCR 检测齿兰环斑病毒技术的建立[J]. 福建农林大学学报,2003,32(3):345-347.
- [16] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1992:27-125.
- [17] SAMBROOK J, FRISTSCH E, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- [18] CHANG H J, SHEU S Y, LO S J. Expression of foreign antigens on the surface of *Escherichia coli* by fusion to the outer membrane protein [J]. J Biomed Sci, 1999, 6(1): 64-70.

## Monoclonal antibody preparation of *Tobacco ringspot virus* based on antigenic epitopes

QIN Shao-zhao<sup>1,2</sup> HE Yue-qiu<sup>1</sup> LI Min<sup>2</sup> LEI Qu-wen<sup>1,2</sup>  
WANG Guang-yong<sup>3</sup> DING Yuan-ming<sup>2</sup>

1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Technical Center, Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Kunming 650228, China;
3. College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China

**Abstract** By using bioinformatics software, the domain of antigenic epitopes on *Tobacco ringspot virus* (TRSV) coat protein was analyzed and predicted, and the epitopes were found to be located near 319-328, 384-388, 420-430, 480-487, 495-511 amino acid residues at C-terminal. After the targeted fragment was amplified by RT-PCR based on the specific primers, the expression vector was constructed and the monoclonal antibody was prepared with the fusion protein and hybridoma. The antiserum prepared with the fusion protein reacted specifically with the expressed product of TRSV coat protein in *E. coli*. The antiserum had high specificity and may be applied to quarantine and inspection.

**Key words** *Tobacco ringspot virus* (TRSV); antigenic epitope; prokaryotic expression; fusion protein; monoclonal antibody (McAb)

(责任编辑:陈红叶)