

中华蜜蜂囊状幼虫病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 基因的原核表达及多克隆抗体制备^{*}

张 洁, 张淑钦, 党晓群, 周泽扬

(重庆师范大学 农业农村部长江上游传粉昆虫资源保护与利用重点实验室(部省共建)

媒介生物控制和利用重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要:为研究对中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)健康构成严重威胁的中华蜜蜂囊状幼虫病毒(Chinese sacbrood virus, CSBV)RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)基因 *RdRp* 的原核表达及制备对应的多克隆抗体,通过 PCR 扩增 CSBV 的 *RdRp* 全长序列,将它克隆到 pET-28a 原核表达载体,再将含有目的基因的载体转入到大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosetta(DE3)菌株中,经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导表达出大量目的蛋白,通过免疫小鼠(*Mus musculus*)制备对应的多克隆抗体,采用蛋白印迹法(Western blot)分析多克隆抗体的特异性。结果显示:成功构建了重组表达质粒 pET28a-*RdRp*,在大肠杆菌 Rosetta(DE3)菌株中成功表达出大量 RdRp 重组蛋白;Western blot 分析结果表明制备的多克隆抗体能特异性地识别感染了 CSBV 的中华蜜蜂幼虫体内的 RdRp。上述研究结果为今后研究 RdRp 的精确定位和揭示 CSBV 入侵宿主具体过程奠定了基础。

关键词:中华蜜蜂囊状幼虫病毒;RNA 依赖性 RNA 聚合酶;原核表达;多克隆抗体

中图分类号:Q78

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2024)06-0036-07

蜜蜂(*Apis*)作为一类重要的经济昆虫,为世界上分布广泛的开花植物提供着关键的授粉服务。在过去的几十年里,世界上许多地方均报道了蜜蜂种群损失增加的消息。病毒作为威胁蜜蜂健康的主要因素之一,引起了研究人员和从业人员的密切关注。

蜜蜂囊状幼虫病毒(sacbrood virus, SBV)是第 1 个被确定为感染蜜蜂的病毒^[1],它是全球蜜蜂病毒中常见的一种病毒,蜜蜂囊状幼虫病即由该病毒感染蜜蜂而引起^[2]。目前,SBV 已得到了世界各地研究者的广泛重视^[3]。SBV 是东方蜜蜂(*Apis cerana*)面临的巨大威胁:它能感染后者的幼虫和成虫,并且具有很高的流行能力。中国是世界第一养蜂大国,作为东方蜜蜂亚种之一的中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*,后简称中蜂)是中国重要的经济昆虫^[4]。1972 年,研究人员在中国广东省首次发现感染东方蜜蜂的 SBV,并将它命名为中蜂囊状幼虫病毒(Chinese sacbrood virus, CSBV)^[5]。CSBV 的基因组长度约为 8 800 bp,包括 1 个编码大的假定多蛋白的开放阅读框,它的结构蛋白按 VP2、VP4、VP3 和 VP1 的顺序位于多蛋白的 N 末端部分,非结构蛋白被鉴定为解旋酶、蛋白酶和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp),它们位于多蛋白的 C 末端部分^[6]。CSBV 是正义单链 RNA 病毒,而单链 RNA 病毒是感染蜜蜂的最大病原体群^[7]。该病毒主要感染 2 日龄的中蜂幼虫并使后者不能进入蛹期而在蜂蛹封盖前后不久便会死亡;CSBV 也会感染成年蜜蜂,虽不导致后者出现明显症状但是会缩短后者寿命;因此,CSBV 可对养蜂业造成毁灭性打击并带来巨大经济损失^[8]。

RdRp 在 RNA 病毒感染宿主过程中起到关键作用,并扮演着双重酶的角色,即 RNA 病毒进入宿主细胞后在细胞核内的复制和转录过程都由 RdRp 催化^[9]。开发针对 RdRp 的抗病毒药物是一个很有前景的研究靶点^[10]。然而在关于 CSBV 的已有研究中涉及 RdRp 的报道甚少,而对 CSBV 中 RdRp 的多克隆抗体制备的研究更为罕见。因此,本研究通过 PCR 扩增了 CSBV 的 RdRp 编码基因即 *RdRp* 的全长序列,并在构建 *RdRp* 表达载体基础上制备了该酶的多克隆抗体,以便为今后进一步研究 RdRp 的精确定位奠定基础,并为揭示 CSBV 入

* 收稿日期:2024-02-26 修回日期:2024-04-01 网络出版时间:2024-12-27T14:03

资助项目:国家自然科学基金面上项目(No. 32372944)

第一作者简介:张洁,女,研究方向为资源昆虫与病原微生物,E-mail:779139342@qq.com;通信作者:党晓群,女,副教授,博士,E-mail:dangxiaqun@126.com

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/50.1165.n.20241227.0844.002

侵宿主过程的研究提供新思路。

1 研究方法

1.1 材料与试剂

本研究所用的主要材料和试剂有:中蜂 cDNA、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株、大肠杆菌 Rosetta (DE3) 菌株、pET28a 原核表达载体 (pET28a 质粒)、Trizol Reagent 总 RNA 提取试剂、经焦碳酸二乙酯处理的无核酸酶水 (DEPC 水)、琼脂糖、琼脂粉、酵母提取物、蛋白胨、尿素、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG、双色预染蛋白 Marker、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、2 000 bp DNA Marker、Premix TaqTM DNA 聚合酶 (Premix r-Taq 酶)、pMD19-T 载体、*Bam*H I 内切酶、*Sal*I 内切酶、Solution I 连接酶、氯化钠、三氯甲烷、甲醇、无水乙醇、液氮、Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒、Plasmid Mini Kit 质粒抽提试剂盒、EvoScript Universal cDNA Master 反转录试剂盒、蛋白印迹法 (Western blot) Marker、聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜、增强型化学发光试剂 (ECL) 显色液。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中登录到的中蜂 *RdRp* 序列,通过 Primer 软件设计特异性引物 *Ac-RdRp*-F: 5'-CGGGATCCATGAAGCGAAAATCCGAGTTGAGAA-3' 和 *Ac-RdRp*-R: 5'-GCGTCGACATAACTAATTTTCGGGATAAAATAAATC-3',并由生工生物工程公司合成这 2 种引物。

1.3 中蜂总 RNA 的提取和 *RdRp* 的 PCR 扩增

取 1 只感染了 CSBV 的中蜂幼虫,先后用双蒸水 (ddH₂O)、乙醇溶液 ($\varphi_{乙醇}=75\%$) 以及 DEPC 水各清洗 5 s,使用灭菌滤纸吸去多余水分,置于预冷研钵中研磨至光滑粉状,再将粉末放入规格为 1.5 mL 的 RNase-free 离心管中,采用 Trizol 法提取其中的 RNA。按 TaKaRa 公司反转录试剂盒的操作说明将中蜂总 RNA 进行反转录得 cDNA。以该 cDNA 为模板,以及上述特异性引物扩增 CSBV 的 *RdRp*,反应体系为:2 种引物各 0.2 μ L、Premix r-Taq 酶 12 μ L、ddH₂O 8.6 μ L、cDNA 模板 4 μ L,共计 25 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,39 个循环的 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。

1.4 *RdRp* 表达载体的构建

经上述步骤得到的 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳 ($w_{琼脂糖}=1\%$) 在 200 V、200 mA 条件下分离,在凝胶成像系统紫外光下切胶,按 TaKaRa 公司胶回收试剂盒的步骤回收目的片段,按 Solution I 连接酶 5 μ L、回收目的片段 4 μ L、pMD19-T 载体 1 μ L 的体系于 16 $^{\circ}$ C 金属浴中连接 12 h。融解 1 管大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,与上述连接产物作用。选取经质粒 PCR 与双酶切验证成功的菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司进行核苷酸测序。

比对序列后确认无氨基酸层面的突变后再将上述菌液提取重组质粒,同时提取 pET28a 质粒,用 *Bam*H I 内切酶和 *Sal*I 内切酶进行双酶切,体系为:pET28a 质粒 5 μ L、QuickCut Buffer 1 μ L、*Bam*H I 内切酶和 *Sal*I 内切酶各 0.5 μ L、ddH₂O 3 μ L。酶切产物用中孔径琼脂糖核酸凝胶电泳 ($w_{琼脂糖}=1\%$) 分离后切胶回收,将胶回收的 *RdRp* 片段与 pET28a 质粒连接,连接体系为:pMD19-T-*RdRp* 质粒 4 μ L、pET28a 质粒 1 μ L、Solution I 连接酶 5 μ L。将连接产物转入大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,菌液均匀涂布于含有 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 卡那霉素的 LB 固态培养基平板上,随机挑取菌落于 1 mL 含 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 卡那霉素的 LB 液体培养液中,选取经质粒 PCR 与双酶切验证成功的菌液。

1.5 *RdRp* 重组蛋白的表达

从上述验证成功的菌液提取重组质粒 pET28a-*RdRp* 并将它导入 100 μ L 大肠杆菌 Rosetta(DE3) 菌株中,选取经质粒 PCR 与质粒双酶切验证成功的菌液,将 5 mL 菌液和 pET28a 空载菌各 2 管以 37 $^{\circ}$ C、180 r $\cdot$ min⁻¹ 振荡培养至光波长为 450 nm 处的吸光度值为 0.6,2 种菌各取 1 支作为未诱导组(对照组),剩下各 1 管中均加入 IPTG 终浓度为 0.1 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的诱导剂作为诱导组(处理组)。在室温下以 12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 5 min,分别收集诱导和未诱导的菌体,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬并利用超声破碎仪破碎菌体,再以 4 $^{\circ}$ C、12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 1 h,取上清液和沉淀进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测。

将含有阳性重组表达质粒 pET28a-*RdRp* 的大肠杆菌 Rosetta(DE3) 菌株接种到 2 L 含 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 卡那霉素的 LB 液体培养基中,收集菌体;用含 8 mol $\cdot$ L⁻¹ 尿素的 Binding Buffer 缓冲液破碎菌体,离心,收集上清,

过膜于灭菌的瓶子中以 4℃ 保存。用 5 个 His 镍柱体积的 ddH₂O 清洗 His 镍柱,再用 10~15 个 His 镍柱体积的过膜 Binding Buffer 平衡 His 镍柱,将蛋白溶液在 His 镍柱中循环 30 min,再用 10~15 个 His 镍柱体积的过膜 Binding Buffer 平衡柱内蛋白,最后用 200 mmol·L⁻¹ Elution Buffer 洗脱蛋白,在灭菌的规格为 1.5 mL 的 EP 管中收集洗脱液,每次 3~4 滴,并测定洗脱液中的蛋白质质量浓度,用 SDS-PAGE 检测纯化的重组蛋白。

1.6 RdRp 多克隆抗体的制备及 Western blot 分析

用 SDS-PAGE 分离前文 1.5 节中提及的上清液,每次每块分离胶的一个孔上样 15 μL,分离后用新配制的考马斯亮蓝溶液快速染色 3~5 s,在照胶仪器上观察目的条带、拍照保存并快速切下目的条带,将目的条带置于干净平板中,并在平板中装入 ddH₂O,于摇床上脱色 3~5 d。取干净灭菌的研钵,用液氮预冷,将胶条在灭菌滤纸上吸干水分,放入研钵中加液氮研磨至粉末呈滑石粉般光滑,加入等量弗氏完全佐剂后于涡旋振荡器上漩涡 1~2 h,乳化后作为抗原免疫昆明雌性小鼠(*Mus musculus*),过膜 PBS 作为阴性对照,给每只小鼠皮下注射 20 μL 乳化液,并于 10 d 后进行第 2 次免疫,之后每隔 7 d 进行 1 次加强免疫,第 2、3、4 次免疫时加弗氏不完全佐剂乳化,最后 1 次免疫后隔 10 d 摘除小鼠眼球取血,用规格为 1.5 mL 的 EP 管收集眼球血,每次 2~3 滴,立即在 37℃ 培养箱放置 0.5 h 后,再于 4℃ 下冷藏并在 12~24 h 以内于超净工作台内将澄清血清转移到新的 PCR 管中,写上标签于 -20℃ 下保存。

将前文 1.5 节中提及的上清液用 PBS 稀释为原来的 10 倍,用稀释比为 1:1 000 的 RdRp 多克隆抗体血清作为一抗、用稀释比为 1:10 000 的经 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗与蛋白溶液进行 Western blot 分析,检测多克隆抗体的特异性。

1.7 感染 CSBV 的中蜂幼虫总蛋白的提取及蛋白表达分析

为了检测 RdRp 在中蜂幼虫总蛋白表达水平,使用玻璃珠破碎法提取中蜂幼虫总蛋白,取 1 只感染 CSBV 时间达 96 h 的中蜂幼虫于规格为 1.5 mL 的 EP 管中,加入 200~300 μL RIRP、2 μL PMSF 和 15 颗玻璃珠进行破碎,离心后吸取上清液,上清液中含有该幼虫的总蛋白,以总蛋白作为抗原,用稀释比为 1:80 的 RdRp 多克隆抗体血清作为一抗、用稀释比为 1:1 000 的经 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗进行 Western blot 分析,检测 RdRp 在已感染 CSBV 的中蜂幼虫体内表达情况。

2 结果与分析

2.1 中蜂 RdRp 原核表达克隆

2.1.1 PCR 扩增与重组质粒构建

PCR 扩增得到了长度约为 1 050 bp 的条带(图 1a),与理论长度一致。将该 PCR 扩增产物与 pMD19-T 载体连接,经质粒 PCR(图 1b)以及质粒双酶切(图 1c)双重验证得到与预期大小一致的目的条带。测序结果说明 RdRp 成功插入质粒且未有氨基酸突变。

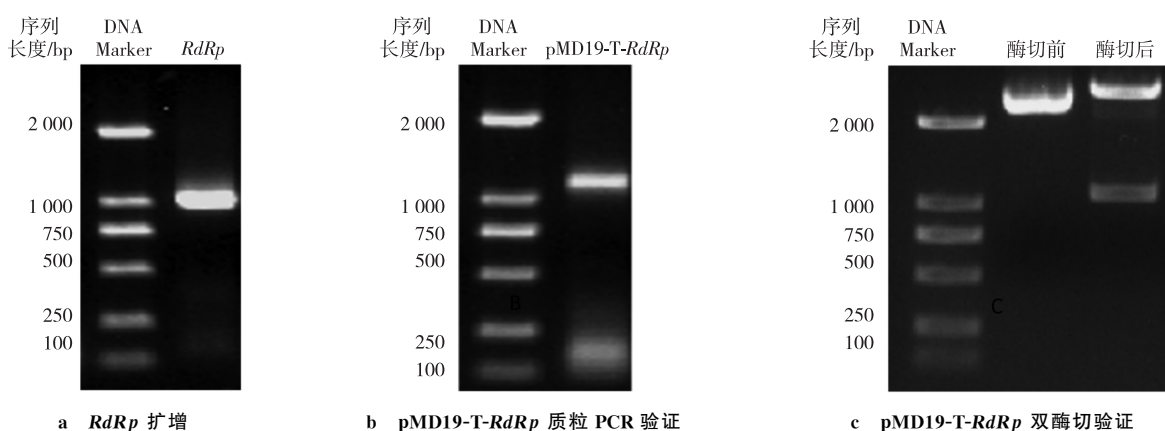


图 1 RdRp 的 PCR 扩增及重组质粒构建

Fig. 1 PCR amplification of RdRp and construction of recombinant plasmid

2.1.2 重组表达质粒 pET28a-RdRp 的构建

分别提取 pMD19-T-RdRp、pET28a 质粒,进行双酶切后再切胶回收(图 2a),连接并导入大肠杆菌 DH5α 感

受态细胞构建重组表达质粒 pET28a-RdRp (图 2b), 对该重组表达质粒进行质粒 PCR (图 2c) 和双酶切 (图 2d) 双重验证, 得到与预期大小一致的目的条带, 结果表明重组表达质粒 pET28a-RdRp 构建成功。

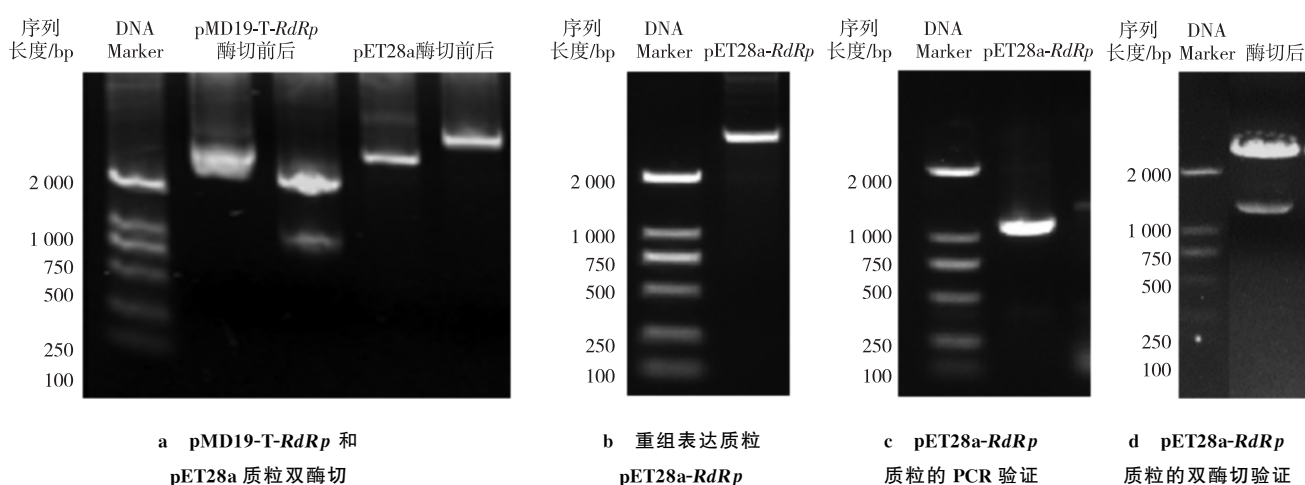
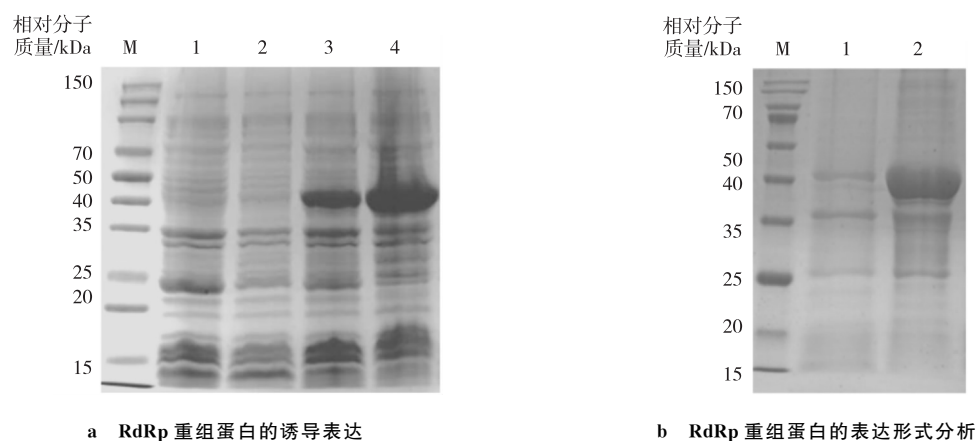


图 2 RdRp 重组表达载体的构建与鉴定

Fig. 2 Construction and identification of recombinant expression vector of RdRp

2.2 RdRp 重组蛋白的诱导表达及表达形式

将验证正确的 pET-28a-RdRp 质粒转入大肠杆菌 Rosetta(DE3) 表达感受态细胞中进行体外蛋白原核表达, 利用 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导表达; 产物经 SDS-PAGE 检测, 结果显示在 IPTG 诱导下获得了相对分子质量约为 40 kDa 的目的蛋白带, 说明 RdRp 重组蛋白诱导表达成功 (图 3a)。同时, 为了检测 RdRp 的表达形式, 再次对上述大肠杆菌表达感受态细胞进行 IPTG 诱导后收集菌体; 加入 PBS 超声破碎, 收集上清液和沉淀并对两者进行 SDS-PAGE, 最后在沉淀中检测到预估大小的目的条带 (图 3b), 说明 RdRp 重组蛋白主要在沉淀中以包涵体形式在大肠杆菌中表达。



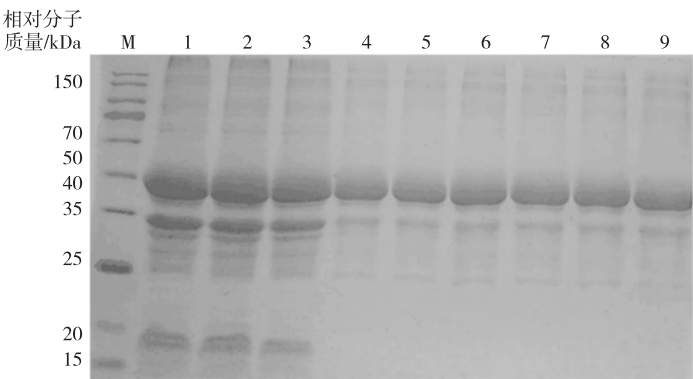
注: M 为双色预染蛋白 Marker, 图 a 中泳道 1~4 分别对应 pET28a 空载未诱导组、pET28a 空载诱导组、pET28a-RdRp 未诱导组和 pET28a-RdRp 诱导组; 图 b 中泳道 1、2 分别为转入 pET28a-RdRp 质粒的大肠杆菌 Rosetta(DE3) 表达感受态细胞在 IPTG 诱导后经超声破碎得到的上清液与沉淀。

图 3 RdRp 重组蛋白的诱导表达以及表达形式的分析

Fig. 3 Induced expression of RdRp recombinant protein and analysis of expression forms

2.3 RdRp 重组蛋白的纯化

由于 RdRp 重组蛋白的表达形式为包涵体, 因此采用含 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素的 Binding Buffer 溶解大肠杆菌 Rosetta(DE3) 菌体后再用镍柱亲和层析法纯化该蛋白, 将纯化后的上柱原液、流穿液、洗涤液和洗脱液进行 SDS-PAGE 检测 (图 4), 结果显示纯化后的洗脱液中存在少量的杂蛋白的同时也富集到大量的目的蛋白。因此, 将纯化后的 RdRp 重组蛋白用于后续的小鼠免疫来制备 RdRp 多克隆抗体血清。



注:M 为双色预染蛋白 Marker,泳道 1~3 分别为上柱原液、流穿液、洗涤液,泳道 4~9 均为洗脱液。

图 4 SDS-PAGE 检测重组蛋白 RdRp 的纯化效果

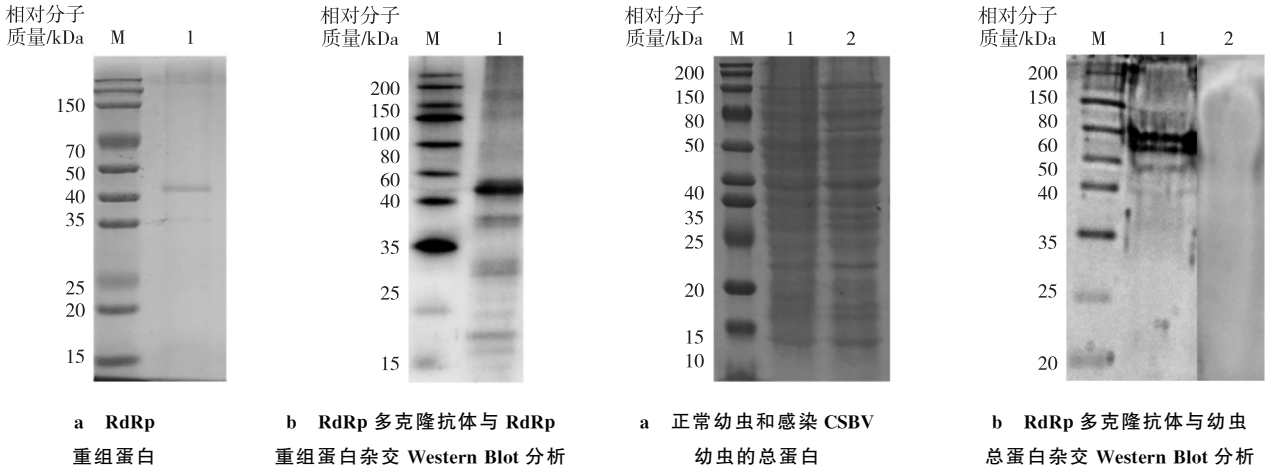
Fig. 4 Purification effect of RdRp recombinant protein detected by SDS-PAGE

2.4 RdRp 多克隆抗体备清的制备及验证

以制备的稀释比为 1 : 1 000 的 RdRp 多克隆抗体血清与 RdRp 重组蛋白溶液(图 5a)进行 Wertern blot 分析,结果表明制备的 RdRp 多克隆抗体可以和 RdRp 重组蛋白发生反应(图 5b),说明它可以特异性地识别 RdRp 重组蛋白。

2.5 感染 CSBV 的中蜂幼虫 RdRp 蛋白表达分析

为了检测制备的 RdRp 多克隆抗体是否能与 CSBV 的 RdRp 发生反应,从感染 CSBV 时间达 96 h 的中蜂幼虫(感染 CSBV 幼虫)和与之对照的未感染 CSBV 时间达 96 h 的幼虫(正常幼虫)中提取总蛋白进行 SDS-PAGE 检测(图 6a),再用稀释比为 1 : 80 的 RdRp 多克隆抗体血清与上述 2 种中蜂幼虫的总蛋白进行 Wertern blot 分析,结果如图 6b 所示;RdRp 多克隆抗体与正常幼虫总蛋白的杂交反应中没有出现杂交条带,但在与感染幼虫总蛋白的杂交反应中识别到 1 条相对分子质量大约为 60 kDa 的蛋白,这比预测的 RdRp 相对分子质量即 41 kDa 更大,暗示所制备的 RdRp 多克隆抗体可以特异性地与 CSBV 的 RdRp 杂交。



a RdRp 重组蛋白
b RdRp 多克隆抗体与 RdRp 重组蛋白杂交 Western Blot 分析

注:图 a 中 M 为双色预染蛋白 Marker,泳道 1 为 RdRp 重组蛋白;图 b 中 M 为 Western blot Marker,泳道 1 为 RdRp 多克隆抗体与 RdRp 重组蛋白杂交结果。

图 5 RdRp 重组蛋白多克隆抗体的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blot analysis of RdRp recombinant polyclonal antibody

注:图 a 中 M 为双色预染蛋白 Marker,泳道 1、2 分别为感染 CSBV 幼虫和正常幼虫的总蛋白;图 b 中 M 为 Western blot Marker,泳道 1、2 分别为 RdRp 多克隆抗体与感染 CSBV 幼虫及正常幼虫的总蛋白杂交结果。

图 6 中蜂幼虫总蛋白 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig. 6 SDS-PAGE and Western blot analysis of total protein of *A. cerana cerana* larvae

3 讨论

CSBV 为传染性软腐病病毒科(Iflaviridae)传染性软腐病病毒属(*Iflavirus*)的二十面体小 RNA 病毒,该病

毒使用 RdRp 进行基因组复制^[11]。RdRp 作为 RNA 病毒的 RNA 聚合酶,在 RNA 病毒的复制周期中发挥着重要的作用;由于 RdRp 是 RNA 病毒生命周期中必不可少的酶,它的氨基酸序列在 RNA 病毒物种中较为保守,所以该酶是抗 RNA 病毒发现策略的理想靶标。近些年来,许多关于抗 RNA 病毒药物的研究都围绕着 RdRp 来开展^[12]。如 Li 等人^[13]在研究肠道病毒 D68 时发现一种 RdRp 抑制剂,该抑制剂的 NADPH 通过占据 EV-D68RdRp 的 RNA 模板结合通道来抑制 RdRp 的活性。一项有关治疗呼吸道合胞病毒(RSV)的研究指出,可通过破坏 RSV 编码的 RdRp 活性来抑制 RSV 的复制^[14]。由于病毒进入宿主细胞后在细胞核内的复制和转录过程都由 RdRp 催化,但 CSBV 的入侵机制目前尚未有详细阐述,而 CSBV 作为小 RNA 病毒的代表之一无疑是最好的研究材料;因此,本研究相当于对 CSBV 中的 RdRp 侵染宿主的相关研究进行了初步探索。

通过对 CSBV 基因组序列信息的深入分析,本研究选取了非结构蛋白 RdRp,用 pET28a 质粒构建原核表达载体,经过 IPTG 诱导后成功表达出了相对分子质量为 40 kDa 的 RdRp 重组蛋白,并用该重组蛋白免疫小鼠制得了 RdRp 多克隆抗体,Western blot 分析结果显示制备的 RdRp 多克隆抗体能特异性地识别 RdRp。值得一提的是,Western blot 分析时在感染 CSBV 的中蜂幼虫总蛋白中识别到的蛋白相对分子质量大约为 60 kDa,比预测的 RdRp 相对分子质量 41 kDa 偏大,其中可能原因是翻译后修饰,例如磷酸化和糖基化或选择性剪切变异体,从而导致许多蛋白实际检测的条带相对分子质量略高于预期值,然而更为具体的原因目前尚不清楚。本研究结果为后期 RdRp 的精确定位研究奠定了基础,也为深入研究 CSBV 入侵宿主机制提供了坚实的铺垫。

参考文献:

- [1] WEI R K, CAO L F, FENG Y, et al. Sacbrood virus: a growing threat to honeybees and wild pollinators[J]. Viruses, 2022, 14 (9): 1871.
- [2] 蔡梦宇, 郑飞扬. 中蜂囊状幼虫病的研究进展[J]. 科技经济市场, 2015(4): 115.
CAI M Y, ZHENG F Y. Research progress of Chinese sacbrood bee disease[J]. Keji Jingji Shichang, 2015(4): 115.
- [3] 李小青, 党晓群. 中华蜜蜂囊状幼虫病检测方法研究进展[J]. 中国蜂业, 2021, 72(4): 53-58.
LI X Q, DANG X Q. The advances of detection methods of Chinese sacbrood virus in *Apis cerana cerana* [J]. Apiculture of China, 2019, 72(4): 53-58.
- [4] 安建东, 陈文锋. 全球农作物蜜蜂授粉概况[J]. 中国农学通报, 2011, 27(1): 374-382.
AN J D, CHEN W F. Review of crop pollination by honey bees world-wide[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27 (1): 374-382.
- [5] 费东亮, 胡影, 岳金金, 等. 中蜂囊状幼虫病毒基因分型及其代表毒株生物学特性比较[C]//金宁一. 中国畜牧兽医学动物传染病学分会第九次全国会员代表大会暨第十七次全国学术研讨会论文集. 贵阳: 中国畜牧兽医学动物传染病学分会, 2017: 234.
FEI D L, HU Y, YUE J J, et al. Genotyping and comparison of biological characteristics of representative strains of Chinese sacbrood bee virus[C]//JIN N Y. Proceedings of the 9th National Congress and 17th National Symposium of the Zoonotic Infectious Diseases Branch of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine. Guiyang: Zoonotic Infectious Diseases Branch of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, 2017: 234.
- [6] 张景强, 冯建勋, 梁玉尧, 等. 中蜂囊状幼虫病毒病毒的三维结构[J]. 中国科学(C 辑), 2001, 31(4): 367-370.
ZHANG J Q, FENG J X, LIANG Y Y, et al. The three-dimensional structure of Chinese sacbrood bee virus[J]. Science in China (Series C), 2001, 31(4): 367-370.
- [7] 王莹莹, 马跃宇, 费东亮, 等. 中蜂囊状幼虫病毒非编码区对蛋白翻译的影响[J]. 病毒学报, 2022, 38(6): 1429-1437.
WANG Y Y, MA Y Y, FEI D L, et al. Effect of the untranslated regions of the Chinese sacbrood virus on translational regulation [J]. Chinese Journal of Virology, 2022, 38(6): 1429-1437.
- [8] 郭力争, 郭佩君, 郭智君. 中华蜜蜂囊状幼虫病的探讨[J]. 中国蜂业, 2016, 67(7): 38-39.
GUO L Z, GUO P J, GUO Z J. Discussion of Chinese sacbrood bee disease[J]. Apiculture of China, 2016, 67(7): 38-39.
- [9] 史红霞, 党晓群, 朱祥龙, 等. 中蜂囊状幼虫病毒 RdRp 基因 dsRNA 干扰的研究[J]. 病毒学报, 2019, 35(1): 103-111.
SHI H X, DANG X Q, ZHU X L, et al. RNA interference against infection by Chinese sacbrood virus[J]. Chinese Journal of Virology, 2019, 35(1): 103-111.
- [10] 张雪琦, 孙丽萍, 赵冬香, 等. 中华蜜蜂囊状幼虫病发病及防治研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(4): 806-813.
ZHANG X Q, SUN L P, ZHAO D X, et al. Progress in research on pathogenic factors of the Chinese sacbrood virus and the potential of Chinese herbal medicine to control this disease[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2020, 57(4): 806-813.

- [11] 张勤奋,杨艺峰,梁玉尧,等. 中蜂囊状幼虫病病毒(CSBV)核酸的结构研究[J]. 电子显微学报,2002,21(3):331-334.
ZHANG Q F, YANG Y F, LIANG Y Y, et al. Study on structure of the Chinese sacbrood virus' nucleic acid[J]. Journal of Electron Microscopy Society, 2002, 21(3): 331-334
- [12] MACHITANI M, YASUKAWA M, NAKASHIMA J, et al. RNA-dependent RNA polymerase, RdRP, a promising therapeutic target for cancer and potentially COVID-19[J]. Cancer Science, 2020, 111(11): 3976-3984.
- [13] LI L, WANG M L, CHEN Y P, et al. Structure of the enterovirus D68 RNA-dependent RNA polymerase in complex with NADPH implicates an inhibitor binding site in the RNA template tunnel[J]. Journal of Structural Biology, 2020, 211(1): 107510.
- [14] BALAKRISHNAN A, PRICE E, LUU C, et al. Biochemical characterization of respiratory syncytial virus RNA-dependent RNA polymerase complex[J]. ACS Infectious Diseases, 2020, 6(10): 2800-2811.

Molecular Biology and Bioinformatics

Prokaryotic Expression of RNA-Dependent RNA Polymerase Gene of Chinese Sacbrood Virus and Preparation for Its Polyclonal Antibody

ZHANG Jie, ZHANG Shuqin, DANG Xiaoqun, ZHOU Zeyang

(Chongqing Key Laboratory of Vector Control and Utilization, Key Laboratory of Conservation and Utilization of Pollinator Insect of the Upper Reaches of the Yangtze River (Co-Construction by Ministry and Province),
Chongqing Normal University, Chongqing, 401331, China)

Abstract: To investigate the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene of Chinese sacbrood virus (CSBV), a serious threat to the health of *Apis cerana cerana*, its expression in prokaryotic cells and the preparation of corresponding polyclonal antibodies, the full-length sequence of RdRp gene was amplified by PCR, cloned into the pET-28a prokaryotic expression vector, and then introduced into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) cells. The target protein was induced to express in large quantities by IPTG- β -D-thiogalactoside, and polyclonal antibodies were prepared by immunizing mice (*Mus musculus*). The specificity of the polyclonal antibody was analyzed by Western blot. The results showed that the recombinant expression plasmid pET28a-RdRp was successfully constructed, and large amounts of RdRp recombinant protein were expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) cells. The Western blot analysis results showed that the polyclonal antibody prepared could specifically recognize RdRp in the larvae of *Apis cerana cerana* infected with CSBV. The above research results lay a foundation for further studying the precise location of RdRp and revealing the specific process of CSBV invading host cells.

Keywords: Chinese sacbrood virus; RNA-dependent RNA polymerase; prokaryotic expression; polyclonal antibody

(责任编辑 方 兴)