

文章编号: 1000-5471(2008)05-0091-04

李坏死环斑病毒检测方法的比较研究^①

郭俊, 陈精兰, 李凡, 黄扬, 尹朝先, 陈海如

云南农业大学 农业生物多样性与病害控制教育部重点实验室, 昆明 650201

摘要: 针对感染李坏死环斑病毒(*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) 植株病毒的特异性检测, 将 DAS-ELISA、RT-PCR 方法综合改进、优化, 建立了免疫捕获反转录 PCR(IC-RT-PCR) 检测 PNRSV 的方法. 该方法采用 PNRSV 抗体特异性免疫捕获病毒, 并根据 GenBank 中 PNRSV 序列设计的特异性引物对 PN5/PN3 进行 PCR 扩增, 得到约 760 bp 大小的特异性基因片段. 扩增产物经克隆测序后, 结果表明: 产物序列与 PNRSV 的外壳蛋白编码基因存在 94%~98% 的同源性. 检测广泛性以及灵敏度比较研究显示, IC-RT-PCR 方法能从含量很低的受病样品中检出 PNRSV, 检测灵敏度与 RT-PCR 相近, 但所检测样品的范围更广, 适用于从植物各部位检测低含量的病毒. IC-RT-PCR 检测灵敏度比 DAS-ELISA 方法高出 1 000 倍.

关键词: 月季; 李坏死环斑病毒; 检测; RT-PCR; IC-RT-PCR

中图分类号: S685.12

文献标识码: A

李坏死环斑病毒(*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) 寄主范围广泛, 能自然和人工侵染双子叶植物中的 21 个科^[1], 在全世界范围内都有分布. 我国植物检疫部门将此病毒列为我国二类危险性检疫病毒. 据国外报道, 能危害多种核果类果树以及蛇麻草等^[2], 除此之外, PNRSV 还能侵染多种花卉、蔬菜, PNRSV 是引起欧洲很多国家月季花叶病的主要病毒^[3], 并造成月季观赏价值和经济价值的巨大损失. 在我国, 已报道的 PNRSV 侵染的自然寄主大多为甜樱桃、歇马杏、桃树、杏仁树、月季^[4-8]等, 病毒侵染植株后, 导致其产量和品质降低. PNRSV 所侵染的寄主具有一定的特殊性, 大多为木本植物果树及其苗木等. 传播方式上, 该病毒可以通过机械接种和种子传播, 也可通过苗木、组培苗等无性繁殖材料的调运而进行远距离传播, 另外还可以通过花粉迅速传播^[9]. 由于病毒在植株体内常常分布不均, 含量低且浓度随着生长季节的变化而发生巨大的改变, 常常给病毒的检测带来了很大难度^[10]. 因此, 建立一种高效、快速、精确、灵敏的 PNRSV 检测方法十分必要, 特别是对检疫部门至关重要. 本研究将分子生物学技术结合血清学方法, 建立了免疫捕获反转录 PCR(IC-RT-PCR) 技术检测感染蔷薇属植物的 PNRSV 的方法, 以期这些植物的健康良性生产, 加强对 PNRSV 的检验检疫提供技术保障, 同时也为其他木本植物病毒检测开辟一条新思路.

1 材料与方法

1.1 植物材料、试剂和引物

云南农业大学实验室保存的月季中的李坏死环斑病毒.

PNRSV 抗血清购自 Agida 公司, 反转录酶 AMV 购自 TaKaRa 公司, RNA 提取试剂 TRIZOL^(r) Reagents 购自 BBI 公司, 凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司, Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自 Sangon 公司, 其它药品为国产分析纯.

① 收稿日期: 2008-02-29

基金项目: 云南省自然科学基金重点资助项目(2004C0007Z).

作者简介: 郭俊(1980-), 女, 云南昆明人, 硕士研究生, 主要从事花卉病害研究.

通讯作者: 李凡, 博士, 教授.

根据 GenBank 数据库中已报道的 PNRSV 基因序列, 利用 DNAMAN 比较多个分离物之间的保存序列, 设计特异引物对 PN5/PN3, 由北京三博远志公司合成. 引物序列如下:

PN5: 5'- TTCCGAACATCTCTTTTCATTTG - 3'

PN3: 5'- ACTATCGGTGGTGC GAACTT - 3'

1.2 免疫捕获反转录 PCR(IC-RT-PCR)

在 0.5 mL 的 PCR 管中加入 100 μ L 碳酸缓冲液稀释好的 PNRSV 一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜后 PBST 洗 1 次; 取 100 mg 的月季感病组织, 加 1 mL 研磨缓冲液研磨, 6 000 r/min 离心 5 min, 取上清 100 μ L 加入 PNRSV 一抗包被的 PCR 管, 37 $^{\circ}$ C 温育 3 h. 倒尽包被液, PBST 洗 3 次.

上述 PCR 管中加入 3'引物 1 μ L(20 μ M), DEPC 处理水 11.5 μ L, 70 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后, 于冰上放置 2 min. 加 5 \times RT-PCR Buffer 4 μ L, dNTPs 2 μ L, RNase Inhibitor 0.5 μ L, AMV Reverse Transcriptase 1 μ L, 室温放置 10 min, 42 $^{\circ}$ C 温育 60 min 后置冰上 2 min. PCR 反应按上海生工 Taq DNA polymerase 操作说明书进行. PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min.

1.3 RT-PCR

按 Trizol 试剂说明书提取 RNA. 取 DEPC 水处理的 PCR 管中加入 3'引物 1 μ L(20 μ M), DEPC 水 9.5 μ L, RNA 2 μ L(约 200 ng), 70 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 放置冰上 2 min. 加 5 \times RT-PCR Buffer 4 μ L, dNTPs 2 μ L, RNase Inhibitor 0.5 μ L, AMV Reverse Transcriptase 1 μ L, 室温放置 10 min, 42 $^{\circ}$ C 温育 60 min 后置冰上 5 min. PCR 反应程序同 1.2.

1.4 病毒的 DAS-ELISA 检测

按 Agida 公司 PNRSV 抗血清说明书操作步骤进行.

1.5 PCR 产物克隆及序列测定

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶分析后, 分别割取预期的扩增条带, 经 QIAGEN 公司的 QIAquick Gel Extraction 试剂盒纯化. 纯化后的 DNA 片段采用 Sangon 公司的 pUCm-T Vector System 试剂盒进行连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 菌株. 在含氨苄青霉素的麦康凯平板上挑取白色菌落. 抽提质粒 DNA, PCR 及酶切筛选出重组子, 送上海生工公司进行序列测定, 所得 DNA 序列输入 GenBank 和 DNAMAN 进行同源性比对.

1.6 不同检测方法的检测灵敏度比较

取 100 mg 月季当年生感病叶片组织, 加 1 mL 研磨缓冲液研磨, 6 000 r/min 离心 5 min, 取上清备用. 取 10 μ L 经检测含有 PNRSV 的样品原液加入 90 μ L 的月季研磨液中, 混匀后得到 10⁻¹ 稀释度含病毒样品, 再从中取 10 μ L 加入 90 μ L 的月季研磨液中, 得到 10⁻² 稀释度的含病毒样品, 以此方法, 分别得到 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 稀释度的含病毒样品, 分别采用 DAS-ELISA、RT-PCR 和 IC-RT-PCR 等方法进行检测灵敏度的比较分析.

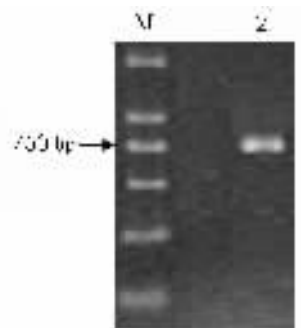
2 结果与分析

2.1 免疫捕获反转录 PCR 体系的建立

选择染病月季组织, 利用 PNRSV 抗血清捕获后, 用特异性引物对 PN5/PN3 进行反转录 PCR 检测, 扩增的产物呈明亮的单一电泳条带(图 1). 基因片段测序结果显示, PNRSV 扩增片段为 761 bp, 其中包括完整的 PNRSV cp 基因(26-706), 由 681 个碱基组成, 编码 226 个氨基酸, 与 GenBank 中已报道的其他分离物核苷酸序列同源性为 96%~99%, 其中与中国、美国、波兰、印度等分离物同源性最高, 为 99%, 与斯洛伐克分离物同源性最低, 为 96%.

2.2 月季样品不同部位的检测比较

取患病的月季植株花、当年生叶片、表皮、根等组织, 分别以 RT-PCR 以及 IC-RT-PCR 进行



M. DNA 标准分子量;

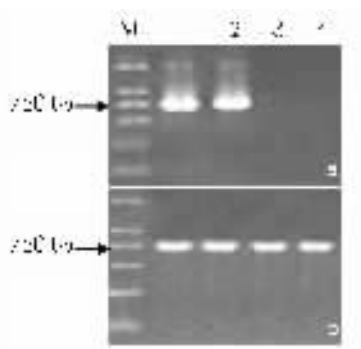
1. 健康月季; 2. 月季病样

图 1 利用 IC-RT-PCR 从染病组织中检测 PNRSV

PNRSV 检测. 电泳结果表明: RT-PCR 不能从月季植株的表皮以及根上扩增到特异性条带, 能从叶片、花上扩增到一条约 760 bp 左右的特异性条带, 产物片段大小与引物设计相符, 但扩增的产物有部分脱尾现象. 应用 IC-RT-PCR, 均能从感病植株的花、叶片、表皮、根上扩增到一条约 760 bp 左右的特异性明亮条带(图 2).

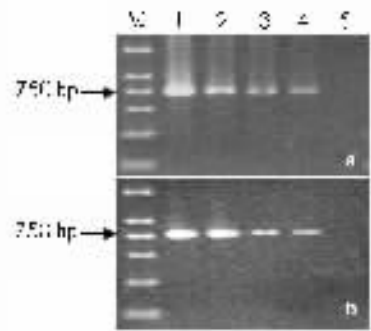
2.3 病毒不同检测方法比较

不同稀释度的病毒样品经 DAS-ELISA 反应, 得到稀释 101 倍的含病毒样品与 PNRSV 抗血清呈阳性反应; 稀释 102, 103, 104 和 105 倍的含病毒样品与 PNRSV 抗血清呈阴性反应. 分别进行 RT-PCR、IC-RT-PCR 检测, 结果显示: RT-PCR、IC-RT-PCR 都能从稀释 101, 102, 103, 104 倍的含病毒样品中扩增到与引物设计相符的目的条带, 但不能从稀释 105 倍的含病毒样品中扩增到目的条带(图 3).



M. DNA 标准分子量; 1. 月季花;
2. 月季叶片; 3. 月季表皮; 4. 月季根
a. RT-PCR 检测结果;
b. IC-RT-PCR 检测结果

图 2 感染 PNRSV 植株不同部位 RT-PCR
与 IC-RT-PCR 检测结果



M. DNA 标准分子量;
1-5 为稀释 101~105 倍的含病毒样品
a. RT-PCR 灵敏度检测结果;
b. IC-RT-PCR 灵敏度检测结果

图 3 利用 RT-PCR 与 IC-RT-PCR
对染病月季组织的检测灵敏度比较

3 讨 论

PNRSV 侵染的寄主大多为木本植物如核果类果树以及蔷薇属植物, 这些植株中的茎干、表皮、根等组织携带病毒极其微量, 同时叶片中含有丰富的多糖、多酚. 目前, 国内检测 PNRSV 的方法主要有生物学指示植物法、RT-PCR^[11-12]等; 国外有利用酶联免疫(ELISA)法、多重 RT-PCR 等技术检测^[13-15], 生物学指示法研究成本相对较低, 但周期长, 同时易受季节及气候限制. ELISA 技术操作方便但检测灵敏度相对较低. RT-PCR 方法提高了检测灵敏度, 但是从木本植物组织中提取的 RNA 含有杂质较多, 如蔷薇属植物组织中酚类物质、糖分含量较多. 提取 RNA 过程中, 酚类物质、糖类随着 RNA 一起沉淀, RNA 质量降低, 影响 RT-PCR 扩增的灵敏度, 导致不能很好地从这些组织中检出病毒. 传统的病毒检测方法对于木本植物病毒的检测往往灵敏度偏低, 常常造成病毒的漏检、假阴性等情况. 本研究针对木本植物病毒检测难点建立的 IC-RT-PCR 方法, 对于从这些组织中检测 PNRSV, 操作比较简单, 无过多繁琐的步骤, 结果高效、特异. 实验中, 由于血清特异性捕获病毒后再进行反转录 PCR, 因而特异性高, 扩增的片段容易回收, 为后续的分子生物学分析等提供方便. 同时灵敏度增强, 在检测病毒方面, 能有效防止漏检情况. 因此, 所创建的 IC-RT-PCR 是一种从蔷薇科等木本植物中检测 PNRSV 高效、精确、灵敏、特异的方法.

参考文献:

- [1] Mink G I. *Prunus necrotic ringspot virus* [C]// Kumer J, Chaube H S, Singh U S, et al. Plant Diseases of International Importance. New York: Prentice Hall, 1992: 335 - 356.
- [2] Ulubas C, Ertunc F. RT-PCR Detection and Molecular Characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* Isolates Occurring in Turkey [J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152: 498 - 502.
- [3] Moury B, Cardin L, Onesto J P, et al. Survey of *Prunus necrotic ringspot virus* in Rose and its Variability in Rose and *Prunus* spp [J]. Phytopathology, 2001, 91: 84 - 91.
- [4] 侯义龙, 张开春, 杨俊玲. 应用 RT-PCR 方法检测桃和樱桃及其组培苗上的 PNRSV 和 PDV [J]. 果树学报, 2005,

22(3): 292 – 293.

- [5] 侯义龙, 赵洋, 于亚军, 等. 应用 RT-PCR 检测歇马杏李属坏死环斑病毒 [J]. 江苏农业科学, 2006, 5: 93.
- [6] 马万里, Mekuria G T, Wirthensohn M, 等. 用 RT-PCR 技术检测澳大利亚杏仁树李坏死环斑病毒 [J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版), 2005, 34(2): 197 – 199.
- [7] 戴志新, 牛建新, 潘立忠, 等. 桃树李坏死环斑病毒的 RT-PCR 检测方法研究 [J]. 西北农业学报, 2006, 15(5): 163 – 165.
- [8] 王继华, 王丽花, 杨秀梅, 等. 侵染月季的李坏死环斑病毒的检测及 CP 基因序列分析 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 99 – 101.
- [9] 周灼标, 郑雷青, 管维, 等. 用二重 PCR 方法检测李痘病毒和李坏死环斑病毒 [J]. 植物保护, 2006, 32(4): 107 – 109.
- [10] Moury B, Cardin L, Onesto J P, et al. Enzyme-linked Immunosorbent Assay Testing of Shoots Grown in Vitro and the Use of Immunocapture-reverse Transcription-polymerase Chain Reaction Rmprove the Detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in Rose [J]. Phytopathology, 2000, 90: 522 – 528.
- [11] 李春敏. 利用指示植物检测核果坏死环斑病毒 [J]. 河北果树, 2003, 4: 14 – 15.
- [12] 阮小凤, Jelkmann W, 马锋旺. 改良 RNA 提取法及樱桃 PDV 和 PNRSV 的 RT-PCR 检测 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(8): 7 – 12.
- [13] Verma N, Hallan V, Ram R, et al. Detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in Begonia by RT-PCR [J]. Plant Pathology, 2002, 51(6): 800.
- [14] Saade M, Aparicio F, Sanchez-Navarro J A, et al. Simultaneous Detection of the Three Ilarviruses Affecting Stone Fruit Trees by Nonisotopic Molecular Hybridization and Multiplex Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction [J]. Phytopathology, 2000, 90: 1330 – 1336.
- [15] Mekuria G, Ramesh S A, Alberts E, et al. Comparison of ELISA and RT-PCR for the Detection of *Prunus necrotic ringspot virus* and Prune Dwarf Virus in Almond (*Prunus dulcis*) [J]. Journal of Virological Methods, 2003, 114: 65 – 69.

Comparative Studies on Detection Methods of *Prunus necrotic ringspot virus*

GUO Jun, CHEN Jing-lan, LI Fan,
HUANG Yang, YIN Chao-xian, CHEN Hai-ru

*Key Laboratory for Agricultural Biodiversity for Pest Management of Ministry of Education,
Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China*

Abstract: For the purpose of detection PNRSV in rose, IC-RT-PCR (immunocapture-reverse transcriptase-polymerase chain reaction) was established based on optimized double-antibody sandwich (DAS)-ELISA and RT-PCR to detect *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) from infected rose plants. Capture antiserum of PNRSV for virus immunocapture was conducted and a 760 bp fragment was amplified from diseased tissues with specific primers, designed on the basis of the coat protein gene of PNRSV. The fragment was cloned and sequenced. Sequence analysis result showed it shared 94%~98% nucleotide identity with the coat protein gene of PNRSV. The detection sensitivity of IC-RT-PCR is identical to that of RT-PCR. While IC-RT-PCR could detect PNRSV-infected samples more widely, especially from plant samples with low virus concentration in different tissues. And the detection sensitivity of IC-RT-PCR is 1000 times higher than that of DAS-ELISA.

Key words: rose; *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV); detection; RT-PCR; IC-RT-PCR