

368 367-372 (11)
番木瓜环斑病毒 PCR 检测技术研究

S432-41

肖火根¹, 胡晋生², 范怀忠¹

S436-68

¹(华南农业大学植物病毒研究室, 广州 510642)²(Department of Plant Pathology, University of Hawai'i, HI96822, USA)

摘要: 建立了检测番木瓜环斑病毒(PRV)的免疫捕捉-PCR(IC-PCR)法、ELISA-PCR法和巢式-PCR法,它们分别能从 10^{-4} 、 10^{-7} 和 10^{-14} 稀释度的番木瓜叶粗汁液(所含鲜叶组织的量分别0.5 μg、0.5 ng和 5×10^{-6} ng)中检测出PRV。

关键词: 番木瓜环斑病毒; 免疫捕捉-PCR法; ELISA-PCR法; 巢式-PCR法

检测技术

中图分类号: S432.41 **文献标识码:** B **文章编号:** 1003-5125(2000)04-0367-06

多聚酶链式反应(PCR)技术已广泛应用于检测植物病毒^[1]。对于RNA病毒,则用反转录-PCR(RT-PCR)法^[2]。已报道RT-PCR法比ELISA法更灵敏^[3]。PCR技术在常规诊断中所存在的问题是纯化核酸。大多数核酸抽提程序不能除去植物的多糖或多酚化合物,而这些物质对PCR扩增反应有抑制作用^[1,4]。Jenson发展了免疫捕捉-PCR(Immunocapture-PCR, IC-PCR)技术,可以减轻PCR抑制物在检测甲型肝炎病毒的抑制效果^[5]。后来IC-PCR法也应用来检测植物病毒^[6]。对于那些很难制备抗血清的病毒,又发展和应用了直接结合-PCR(Direct Binding-PCR, DB-PCR)技术^[7]。但如应用巢式引物进行第二次PCR(即巢式-PCR法),则可大大提高检测灵敏度^[8]。另外,还有用ELISA-PCR法来定量测定mRNA的表达^[9]。

我们已报道了检测番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus, PRV)^[10]的RT-PCR、IC-PCR和DB-PCR方法^[11]。RT-PCR法能从稀释度为 10^{-5} 的RNA抽提物(相当于0.05 μg的番木瓜叶组织)中扩增出目的产物,IC-PCR和DB-PCR法分别能从 10^{-4} 和 10^{-3} 稀释度的粗汁液(分别相当于0.5 μg和5 μg的番木瓜叶组织)中检测出PRV。本文继续报道用免疫捕捉-PCR、巢式-PCR和ELISA-PCR法检测PRV的研究结果。

1 材料和方法

1.1 植物材料

感染了PRV的番木瓜病叶采自温室。

1.2 RT-PCR引物的设计

根据PRV_{HA}株系核苷酸序列^[12],设计了上游引物PRV100(5'-CATCCCATGGCCGAATTACTAGTGTA-CCAT-3',相对于核苷酸序列,9174-9193)和下游引物PRV101(5'-CTCTCCATGGAGAACTCAACAAACA-CAAG-3',与核苷酸序列10130-10149互补)。在两个引物的5'端加了一个Nco I限制性酶切位点,以便进行

收稿日期:1999-09-13,修回日期,2000-02-21

作者简介:肖火根(1964年-),男,江西,教授,博士,研究方向为植物病毒学。

克隆之用。根据同样的核苷酸序列,同时设计了另一对巢式-PCR引物 PRV200(5'-ATAGAGATGTCAAT-GTGGG-3',相对应于核苷酸序列 9 411-9 430)和 PRV201(5'-TGTACCTCTCAGTAGCATT-3',相对应于核苷酸序列 9 721-9 740)。

1.3 免疫捕捉 PCR(Immunocapture-PCR, IC-PCR)法

IC-PCR法按照肖火根等(1999)^[11]的方法进行。取约0.1g番木瓜病叶组织,置于1mL研磨缓冲液(50mmol/L柠檬酸钠,pH8.3,20mmol/L NaDIECA,2%PVP-40K)。研磨后10000r/min离心10min,上清液即为检测用的病叶粗汁液,对照为同法制备的健康叶粗汁液。在0.5mL PCR管中加入50 μ L PRV抗血清(1 μ g/mL)(用ELISA包被缓冲液稀释),在37 $^{\circ}$ C下孵育1h,倒尽包被液,用PBST洗3次,加入50 μ L 1:10⁶稀释度的番木瓜叶粗汁液(用PBST进行稀释),在37 $^{\circ}$ C下孵育1h。用PBST洗4次,然后直接在管中进行RT-PCR反应。

第一链的cDNA合成是在20 μ L反应体积中进行,其中含有5mmol/L MgCl₂,50mmol/L KCl,10mmol/L Tris-HCl(pH8.0),1mmol/L dNTPs,1U/ μ L RNasin(Promega),2.5U/ μ L MMLV(Mooney Murine Leukaemia Virus)(Promega),15pmoles Primer101。反转录反应条件是:42 $^{\circ}$ C 30min,99 $^{\circ}$ C 5min,4 $^{\circ}$ C 5min。然后加入80 μ L PCR反应缓冲液(10mmol/L Tris-HCl,pH9.0,50mmol/L KCl,0.1% Triton X-100,2mmol/L MgCl₂,15pmoles Primer 100和2.5个单位 Tag DNA聚合酶)。反应总体积为100 μ L,加50 μ L矿物油覆盖,在Perkin-Elmer CetusGeneAmp TM PCR E480上扩增。其扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 4min,94 $^{\circ}$ C 1min,58 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,35个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。RT-PCR扩增后,进行1.2%琼脂糖凝胶电泳,检查扩增结果。

1.4 巢式 PCR(Nested PCR)法

第一次PCR扩增(IC-PCR)是用外部引物(PRV100和PRV101)进行的,25个循环;然后用内部引物(PRV200和PRV201)再进行一次PCR扩增。取1 μ L第一次PCR扩增产物,加入到新配制的50 μ L PCR反应混合物,退火温度为60 $^{\circ}$ C,30个循环。然后进行1.2%琼脂糖凝胶电泳,检查扩增结果。

1.5 ELISA-PCR法

在酶标反应板中加入50 μ L(100 μ g/mL,用0.1 \times PBS稀释)链亲和素溶液(streptavidin),在4 $^{\circ}$ C下过夜。用水冲洗反应板2次后,再用100 μ L A缓冲液(在1 \times PBS中加入0.1mol/L Tris-HCl,pH7.5和0.05% Tween-20)洗1次,然后加入封闭缓冲液[在A缓冲液中加入牛血清白蛋白(2.5mg/mL)和salmon sperm DNA(100 μ g/ μ L),室温下放置1h。再用A缓冲液洗2次。不同样品的PCR产物用0.75pmol生物素化引物(PRVB,5'-XATAGAGATGTCAATGTTGGG-3',X-biotin)在50 μ L的1 \times 杂交缓冲液(6 \times 标准柠檬酸盐)中捕捉,在99 $^{\circ}$ C下加热5min,然后在冰上冷却。样品分别加入到包被好的反应板中,并在常温下在摇床上孵育1h。用A缓冲液洗板3次,加入0.2pmol的在3'端标记了地高辛的巢式引物(PRVD,5'-AAGAGAAATGC-TACTGAGAGL-3',L-digoxigenin)。这一步骤是在50 μ L的1 \times 杂交液中进行,在37 $^{\circ}$ C下反应1h。用A缓冲液洗板3次,加入50 μ L碱性磷酸酯酶标记的地高辛Fab抗体(Boehringer Mannheim)(工作浓度为1:3000),37 $^{\circ}$ C下孵育45min。用A缓冲液洗板3次,加入50 μ L p-硝基酚磷酸(1mg/mL,用10mmol/L二乙胺,pH9.8,配制)。在室温下孵育后,用BioRad 450酶标仪测定405nm的OD值。

1.6 DAS-ELISA法

样品的制备同IC-PCR法。双抗体夹心ELISA(DAS-ELISA)法按Clark & Adams(1977)^[12]方法进行。用BioRad 450酶标仪测定在405nm的读数。

2 结果

2.1 IC-PCR、巢式-PCR、ELISA-PCR和ELISA法检测PRV的灵敏度的比较

对IC-PCR、巢式-PCR、ELISA-PCR和ELISA法检测PRV的灵敏度进行了比较。番木瓜叶粗汁液经10倍的梯度稀释后,分别用IC-PCR、巢式-PCR、ELISA-PCR和ELISA法进行检测。

定。结果表明(见图1和表1), IC-PCR和ELISA法都能从 10^{-4} 稀释度的粗汁液(相当于

表1 IC-PCR、巢式-PCR、ELISA-PCR和ELISA法检测PRV灵敏度的比较

Table 1 Sensitivity of IC-PCR, Nested-PCR, ELISA-PCR, and ELISA for the detection of PRV

检测方法 Assay	灵敏度 Sensitivity	相当于能检测到的组织(ng) A equivalent to ng of tissue
IC-PCR	10^{-4}	500
ELISA-PCR	10^{-7}	0.5
Nested-PCR	10^{-14}	5×10^{-8}
ELISA	10^{-4}	500

$0.5 \mu\text{g}$ 的番木瓜叶组织)中检测出PRV, ELISA-PCR法则能从 10^{-7} 稀释度的粗汁液(相当于 0.5 ng 的番木瓜叶组织)中检测出PRV, 而巢式-PCR法则能从 10^{-14} 稀释度的粗汁液(相当于 $5 \times 10^{-8} \text{ ng}$ 的番木瓜叶组织)中检测出PRV。这表明ELISA-PCR法的灵敏度比IC-PCR和ELISA法的高出 10^3 倍, 而巢式-PCR法的灵敏度又比ELISA-PCR法的高出 10^7 倍。

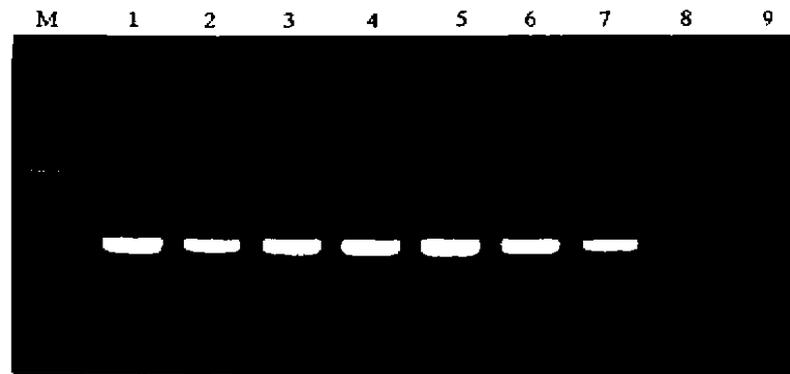


图1 巢式-PCR法扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

M: DNA分子量标准; 1-8: 分别为叶片粗汁液稀释度 10^{-2} - 10^{-14} 的Nested-PCR扩增产物; 9: 阴性对照(水)

Fig. 1 Agarose gel electrophoretic analysis of nested-PCR for the detection of PRV

Lane M: DNA marker; lane 1-8: nested-PCR using 10^{-2} (lane 1) to 10^{-14} (lane 8) dilutions of leaf extract; lane 9: water control

2.2 用ELISA、IC-PCR、ELISA-PCR和巢式-PCR法监测PRV在番木瓜植株上的侵染动态

为了证实ELISA-PCR和巢式-PCR的高灵敏度和测试它们在PRV常规检测中的作用, 我们对ELISA、IC-PCR、ELISA-PCR和巢式-PCR法监测PRV在番木瓜植株上的增殖动态进行了研究和比较。在番木瓜苗上接种PRV后第3、6、8、10、12和15 d分别采样, 然后用ELISA、IC-PCR、ELISA-PCR和Nested-PCR法进行测定。试验重复3次。

试验3次的结果都很相似(表2)。番木瓜苗在接种PRV后11 d表现症状; ELISA、IC-PCR和ELISA-PCR法可以在接种后第8天检测到PRV, 比症状表现提前3 d, 并且ELISA-PCR法可以在ELISA和IC-PCR法不能检测到病毒的叶片上检测出PRV, 如在接种后15 d, ELISA-PCR法可以在L4、L5、L6、L7和L8叶片中检测出PRV, 而ELISA和IC-PCR法只能从L7和L8叶片中检测到PRV。但是, 巢式PCR则能在接种后第3天就在接种叶上检测出

PRV。这表明 IC-PCR 和 ELISA 法都能从未显症的染病番木瓜植株上检测到 PRV, 但 ELISA-PCR 法的灵敏度又高于 IC-PCR 和 ELISA 法, 而巢式 PCR 法的检测灵敏度则又高于 ELISA-PCR 法。

表 2 用 ELISA、IC-PCR、ELISA-PCR 和巢式-PCR 法监测 PRV 在番木瓜植株上的侵染动态

Table 2 Monitoring of PRV infection on papaya plants by ELISA, IC-PCR, ELISA-PCR and Nested PCR

接种后的天数 Days after inoculation	植株的叶位 Leaves on the plant	症状 Symptoms	ELISA	IC-PCR	ELISA-PCR	Nested-PCR
3	L6	-	-	-	-	-
	L5*	-	-	-	-	+
6	L7	-	-	-	-	-
	L5*	-	-	-	-	+
8	L8	-	+	+	+	+
	L7	-	-	-	-	+
	L5*	-	-	-	-	+
10	L8	-	+	+	+	n***
	L7	-	n	n	n	n
	L6	-	-	n	n	n
	L5*	-	-	-	-	n
12	L8	+	+	+	+	n
	L7	-	+	n	n	n
	L6	-	-	n	n	n
	L5*	-	+	+	+	n
15	L8	+	+	+	+	n
	L7	+	+	+	+	n
	L6	-	-	-	+	n
	L5*	-	-	-	+	n
	L4	-	-	-	+	n
	L3	-	-	-	-	n
	L2	-	-	-	-	n
L1	-	-	-	-	n	

注: * L5 接种叶; * 在接种后 11 天症状出现在植株的第 8 叶; * * * n 表示没有测定。

Notes: * L5 was the inoculated leaf; * * The symptoms on L8 leaf appeared at 11 days after inoculation;

* * * n indicated not tested.

3 讨论

本研究表明, 在 IC-PCR 法的基础上用巢式引物再进行一次 PCR, 即巢式 PCR 法, 可以极大地提高检测灵敏度。在对不同稀释度的感染 PRV 的病叶粗汁液进行检测时, 巢式 PCR 法的灵敏度比 IC-PCR 法的高 10^{10} 倍。在监测 PRV 在番木瓜植株上的侵染动态时, IC-PCR 法可以在接种后第 8 天检测到 PRV, 而巢式 PCR 法在接种后第 3 天就能在接种叶上检测到 PRV。当然, 此时接种叶上的 PRV 不一定是新生的 PRV。病毒何时复制和运转尚待进一步研究。

由于 PCR 方法的灵敏度也依赖于扩增产物最后检测技术的灵敏度。PCR 扩增的 DNA 通常是由用溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶电泳分析, 或用专化性探针。如 ^{32}P 标记探针^[14] 或地高辛标记探针^[15] 的 Southern 或斑点杂交方法, 或用 ELISA^[9]。本试验结果表明, ELISA-PCR

法的灵敏度比 IC-PCR 法的高 1 000 倍。在监测 PRV 在番木瓜植株上的侵染动态时, ELISA-PCR 法也表现出比 IC-PCR 法和 ELISA 法更高的灵敏度。ELISA 法可以用于测定病毒外壳蛋白的表达量, ELISA-PCR 法则可以用于定量测定病毒 RNA 增殖水平, 还可以用于转基因植物中该基因的转录水平的测定。

对于大量样品的常规检测, ELISA 法是最方便和实用的方法。但 IC-PCR、ELISA-PCR 和巢式 PCR 法在 PRV 的流行、弱株系的应用、分子生物学和基因工程抗病性研究方面有特殊的作用。交互保护作用和外壳蛋白基因的转基因番木瓜品系已成功用来防治番木瓜环斑病^[16]。对于这些防治方法, 很难用 ELISA 法来监测弱株系保护的番木瓜植株和外壳蛋白转基因番木瓜植株的病毒感染情况, 但 IC-PCR、ELISA-PCR 和巢式 PCR 法则可靠和灵敏的检测方法。

参 考 文 献

- [1] Henson J M, French R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis [J]. *Ann Rev Plant Pathol*, 1993, 31:81-109
- [2] Langeveld S A, Dore J M, Memelink J, *et al.* Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72:1531-1541
- [3] Borja M J, Ponz F. An appraisal of different methods for the detection of the walnut strain of cherry leafroll virus [J]. *J Virol Methods*, 1992, 36:73-83
- [4] Demeke T, Adams R P. The effects of plant polysaccharides and huffer additives on PCR [J]. *Biotechniques*, 1992, 12:332-334
- [5] Jensen R W, Siegl G, Lemon S M. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain method [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:2867-2871
- [6] Wetzel T, Candresse T, Macquire G, *et al.* A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection [J]. *J Virol Methods*, 1992, 39:27-37
- [7] Rowhani A, Maningas L S, Lile S D, *et al.* Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions [J]. *Phytopathology*, 1995, 85:347-352
- [8] Lee I M, Gundersen D E, Hammond R W, *et al.* Use of mycoplasma-like organism (MLO) group specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed MLO infections in single host plant [J]. *Phytopathology*, 1994, 84:559-566
- [9] Alard P, Lantz O, Sebah M, *et al.* A versatile ELISA-PCR assay for mRNA quantitation from a few cells [J]. *Bio Techniques*, 1993, 15(4):730-737
- [10] Purcifull D E, Edwardson J R, Hiebert E, *et al.* Papaya ringspot virus [R]. CMI/AAB. *Descriptions of Plant Viruses* No.292
- [11] 肖火根, 胡晋生, 李华平, 等. 番木瓜环斑病毒 RT-PCR、IC-PCR 和 DB-PCR 检测技术研究[C]. 中国植物病理学会第四届青年学术研讨会论文集, 1999, 28-35, 西南科技出版社
- [12] Yeh S D, Jan F J, Chiang C H, *et al.* Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73:2531-2541
- [13] Clark M F, Adams A N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses [J]. *J Gen Virol*, 1977, 34:475-483
- [14] Jones J D, Buck K W, Plumh R T. The detection of beet western yellows virus and beet mild yellowing virus in crop plants using the polymerase chain reaction [J]. *J Virol Methods*, 1991, 35:287-296
- [15] Hataya T, Inoue A K, Shikata E. A PCR-microplate hybridization method for plant virus detection [J]. *J Virol Methods*, 1994, 46:223-236

- [16] . Tennant P F, Gonsales C, Ling K S, *et al.* Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically crossprotected papaya [J]. *Phytopathology*, 1994, 84:1359 - 1366

Detection of Papaya Ringspot Virus by Immuno-capture PCR, Nested-PCR and ELISA-PCR Assays

XIAO Huo-gen¹, HU Jin-Sheng², FAN Huai-zhong¹

¹(*Lab of Plant Virology, South China Agric Univ, Guangzhou 510642, China*)

²(*Dept of Plant Pathology, Univ of Hawaii, HI 96822, U. S. A.*)

Abstract: Sensitive, rapid, and reliable immuno-capture PCR (IC-PCR), ELISA-PCR and Nested-PCR assays were developed for the first time to detect PRV. It was detected from dilutions of 10^{-4} , 10^{-7} and 10^{-14} (equivalent to 0.5 ug, 0.5 ng and 5×10^{-8} ng of papaya leaf tissues) by IC-PCR, ELISA-PCR and Nested-PCR, respectively.

Key words: Papaya ringspot virus; Reverse transcription-PCR; Immunocapture-PCR; Nested-PCR; ELISA-PCR

《长江流域资源与环境》2001年征订启事

《长江流域资源与环境》杂志是中国科学院资源环境科学与技术局和中国科学院武汉文献情报中心联合主办的综合性学术刊物,是全国中文核心期刊和中国科技论文统计源期刊,并被《中国科学引文索引》作为源期刊收录。国内统一刊号:CN42-1320/X,国际标准刊号:ISSN1004-8227。

本刊是全国唯一一份专门研究长江流域各种资源的开发利用保护与生态环境的综合性学术刊物,它面向国内外,围绕长江流域资源与生态环境重大问题,报道流域资源与生态环境科学研究成果,交流资源综合开发与生态环境保护工作经验,介绍国内外江河流域开发整治和环境保护的最新成就。

本刊主要栏目有:资源环境与社会经济可持续发展、自然资源、农业发展、生态环境、自然灾害、动态信息等。

本刊对从事资源与环境研究,以及广大农业、林业、气象、能源、水利、土地管理、旅游、经济、人口、生物、地理等学科部门的科技人员、决策与管理人、高等院校师生都很有参考价值。

本刊从2001年起改为双月刊,16开本,每期96页,每逢单月出版,每期定价8.00元,全年订费48元。各地邮局均可订阅,邮发代号:38-311。如漏订,也可通过邮局或银行汇款,直接到编辑部办理订购手续。

邮局汇款请寄:中国科学院武汉文献情报中心内《长江流域资源与环境》编辑部

银行汇款请寄:中国科学院武汉文献情报中心 85493892261014638 建行小洪山分理处 854938。编辑部地址:湖北武汉武昌小洪山西区25号 邮政编码:430071 电话:027-87869181