

## 水稻矮缩病毒昆明分离物抗血清制备及免疫捕捉 PCR 检测\*

彭潞波<sup>1</sup>, 李婷婷<sup>1</sup>, 魏春红<sup>2</sup>, 方琦<sup>1</sup>, 董家红<sup>1</sup>, 张丽珍<sup>1</sup>,  
苏晓霞<sup>1</sup>, 丁铭<sup>1</sup>, 张仲凯<sup>1\*\*</sup>, 李毅<sup>2</sup>

(1. 云南省农业科学院生物技术及种质资源研究所, 云南昆明 650223; 2. 北京大学生命科学学院, 北京 100871)

### Antiserum Preparation against Rice Dwarf Virus Kunming Isolate and Detection by Immunocapture PCR Tests

PENG Lu-bo<sup>1</sup>, LI Ting-ting<sup>1</sup>, WEI Chun-hong<sup>2</sup>, FANG Qi<sup>1</sup>, DONG Jia-hong<sup>1</sup>,  
ZHANG Li-zhen<sup>1</sup>, SU Xiao-xia<sup>1</sup>, DING Ming<sup>1</sup>, ZHANG Zhong-kai<sup>1\*\*</sup>, LI Yi<sup>2</sup>

(1. The Biotechnology and Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China; 2. College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract:** By Using the modified method to extract *Rice dwarf virus* virions from infected rice leaves, a concentration 3.854mg/mL of purified virus virions reached, and the Rabbits was immunized with purified virions, yielding high titer antiserum; 1:20480 by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA) test. The antiserum successfully detected three rice samples from Kunming, Yuxi and Luliang by I-ELISA. Immunocapture polymerase chain reaction (IC-PCR), respectively was the utilized to show that serologic and molecular methods were successfully used for detection of *Rice dwarf virus*.

**Key word:** *Rice dwarf virus*(RDV); Antiserum; I-ELISA; IC-PCR

关键词: 水稻矮缩病毒; 抗血清; 间接 ELISA; 免疫捕捉 PCR

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0408-03

由水稻矮缩病毒 (*Rice dwarf virus*, RDV) 引起的水稻矮缩病害, 最早由日本报道, 随后在东南亚等国以及我国的福建、云南等南方稻区普遍发生, 云南主要发生于中部及南部地区<sup>[1]</sup>。水稻在苗期至分蘖期感病后, 植株矮缩, 分蘖增多, 叶片浓绿, 僵直, 出现白斑, 生长后期病稻不能抽穗结实, 在暴发流行年份可以引起水稻的严重减产。

RDV 在分类上属于呼肠孤病毒科 (*Reoviridae*) 植物呼肠孤病毒属 (*Phytoreovirus*) 成员, 病毒粒子为正十二面体球形结构, 直径约为 69.3nm, 无刺突, 无脂蛋白外膜包被, 具有双层的蛋白衣壳<sup>[2]</sup>。病毒基因组由 12 条双链 RNA 片段组成, 其中 S8 编码病毒外层外壳蛋白<sup>[3]</sup>, S6 编码蛋白与细胞间运动相关<sup>[4]</sup>, RDV 侵染寄主还可引起 RNA 沉默<sup>[5]</sup>。

为便于对水稻感病植株的快速检测, 本研究对水稻矮缩病毒的分离提纯方法进行了改进, 并用提纯的病毒制品制备了高效价抗血清。应用制备的抗血清对 RDV 云南 3 个不同地区的分离物进行间接酶联免疫吸附测定 (I-ELISA), 以及免疫捕捉多聚酶链式反应 (IC-PCR) 测定, 建立了快速检测 RDV 的血清学和分子检测方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

提纯用病毒材料采自云南省昆明市市郊感病稻田, 其他毒源材料分别采自云南玉溪和陆良, 水稻病株具有明显矮化症状, 局部有细小褪绿斑点; 免疫用兔子购自昆明制药厂实验动物处。

收稿日期: 2005-12-26, 修回日期: 2006-02-16

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (G2000016201)

作者简介: 彭潞波 (1975-), 女, 云南昆明籍, 助理研究员, 从事植物病毒学研究。

\*\* 通讯作者: 张仲凯 (1966-), 男 (彝族), 云南昌宁籍, 研究员, 从事植物病毒学研究。

Corresponding author. Tel:0871-5183204, E-mail: zhongkai99@sina.com



采集到的水稻病株经电镜及 RDV 运动蛋白多抗血清 I-ELISA 检测含有 RDV, RDV 运动蛋白多抗血清由北京大学李毅教授惠赠。

### 1.2 RDV 的分离提纯

将经鉴定含 RDV 的水稻病株叶片剪碎, 加入 3 倍体积的 0.1 mol/L PBS (pH6.4) 匀浆, 过滤, 应用  $\text{CHCl}_3$  和  $\text{CCl}_4$  澄清、PEG 沉淀, 及差速离心分离纯化, 纯化过程中应用电镜监测沉淀物中的 RDV 相对含量。制备的样品在 BECKMAN DU-640 型紫外分光光度计上测 200nm~300nm 的吸收光值, 并进行电镜观察。

### 1.3 RDV 兔多抗血清制备及其效价检测

用提纯的病毒对家兔进行常规免疫, 采血, 测定效价。间接 ELISA 法参考肖火根等的方法<sup>[6]</sup>测定抗血清效价, 在 ELX 808 型酶标仪 (BIO TEK) 上读取吸光度值 (OD 值)。并用此 RDV 兔多抗血清对 RDV 云南三个不同地区分离物进行 I-ELISA 检测。

### 1.4 水稻矮缩病毒样品的免疫捕捉 PCR (IC-PCR) 检测

根据已报道的水稻矮缩病毒基因组 S8 片段的引物序列<sup>[7]</sup>合成引物, P1: 5'-CAAAG ATCTCCACC TGCCACTATG-3'; P2: 5'-GCGCTCGAGATTCAG GACCG-3'。在 PCR 管中加入稀释为 1:5 000 的 RDV 兔多抗血清, 4℃ 下包被过夜, PBST 洗涤 3 次。采自云南昆明、玉溪、陆良三个稻区的水稻病样分别用 PBST 缓冲液研磨, 1000×g 离心 1min, 取 100μL 上清加入 PCR 管中, 温育 3h; PBST 缓冲液洗涤 3 次, H<sub>2</sub>O 洗涤 1 次, 短暂离心, 吸去残液。应用 Promega 公司 cDNA 试剂盒合成 cDNA 第一链, 取 5μL 反转录产物进行 PCR 反应。PCR 反应体系 50μL, cDNA 5μL, 20mmol/LP1、P2 引物各 1μL, 10×PCR buffer (TaKaRa) 5μL, 10mmol/L dNTP1μL, Taq 酶 1μL (TaKaRa), 超纯水 36μL。反应条件: 94℃ 预变性 2min, 然后 94℃ 30s, 54℃ 1min, 72℃ 1min, 35 个循环。

## 2 结果与讨论

### 2.1 RDV 昆明分离株的分离纯化

病叶研碎后负染电镜观察, 含有 RDV 粒体及较多的寄主杂质; 纯化后的 RDV 为半透明乳白色悬液, 在电镜下观察到直径为 70nm、无刺突的球形病毒, 含量很高, 未见寄主杂质, 见图 1。紫外分光光度计测得提纯病毒的浓度为 3.854mg/mL, 推算提纯病毒的产量为 115ng/g 病叶。

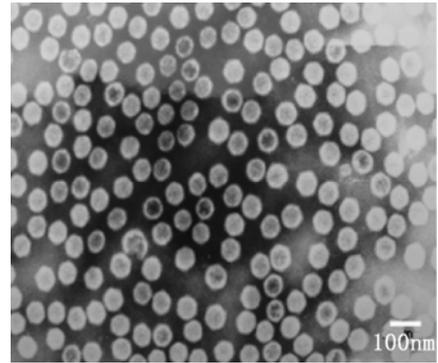


图1 提纯的 RDV 粒子  
Fig.1 Purified RDV virions

### 2.2 RDV 昆明分离株兔多抗血清的制备及其效价测定

经间接 ELISA 法测定, 制备的 RDV 兔多抗血清最大稀释到 1:20 480 时, 仍有明显的阳性反应, 其效价为 1:20 480。以往 RDV 的分离提纯采用差速离心、蔗糖密度梯度并结合 PEG 沉淀的方法<sup>[8]</sup>, 但往往蔗糖梯度成带取带难, 不易获得理想的病毒制品。本实验用差速离心结合二次 PEG 法, 避免了制备和使用蔗糖密度梯度的繁琐以及抽取病毒带来的不方便, 缩短病毒纯化时间, 提高提纯病毒产率和纯度, 从而制备得到高效价的多抗血清, 远高于报道的 RDV 兔多抗血清效价 1:2 000~1:8 000<sup>[1]</sup>。

### 2.3 RDV 兔多抗血清对 3 个分离物的 I-ELISA 检测

应用制备的 RDV 抗血清 (1:5 000) 与 RDV 云南昆明、玉溪、陆良 3 个分离物进行间接 ELISA 检测, 结果均呈阳性反应。

### 2.4 RDV 的 IC-PCR 检测

用此抗血清对 RDV 云南玉溪及陆良分离物进行 IC-PCR 扩增, 得到大小约为 1.35kb 的目的片段, 与报道的 RDV S8 大小相符, 见图 2。表明 IC-PCR 方法利用免疫反应原理<sup>[9]</sup>可以捕捉到病株汁液中微量的病毒进行 PCR, 可以检测到样品中的 RDV。

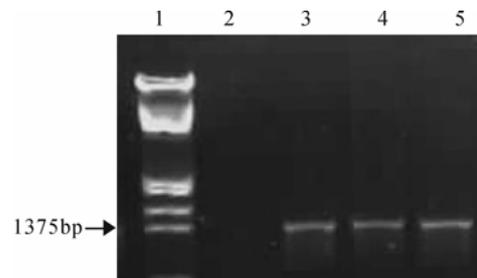


图2 RDV 云南三个分离物的 IC-PCR  
Fig.2 IC-PCR test of three isolates of RDV in Yunnan  
1, DNA Marker; 2, Health rice plant; 3, RDV Kunming isolate; 4, RDV Yuxi isolate; 5, RDV Luliang isolate.

IC-PCR 避免了常规 RT-PCR 中 RNA 样品制备的损失和破坏,提高了 RNA 浓度,从而提高了检测的灵敏度。

## References

- [1] Zhang Z K, Li Y (张仲凯, 李毅). Plant Viruses in Yunnan (云南植物病毒) [M]. Beijing: Science Press, 2001: 120-121.
- [2] Li Y, Chen Z L (李毅, 陈章良). Molecular Biology of Rice Viruses (水稻病毒的分子生物学) [M]. Beijing: Science Press, 2001: 1-16.
- [3] Omura T, Ishikawa K, Hirano H, *et al.* The outer capsid protein of rice dwarf virus encoded by genome segment S8 [J]. J Gen Virol, 1989, 70: 2759-2764.
- [4] Li Y, Bao Y M, Wei C H, *et al.* Rice dwarf phytoevirus segment S6-encoded nonstructural protein has a cell-to-cell movement function [J]. J Virol, 2004, 78: 5382-5389.
- [5] Cao X S, Zhou P, Li Y, *et al.* Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA Virus [J]. J Virol, 2005, 79: 13018-13027.
- [6] Xiao H G, Fan H Z (肖火根, 范怀忠). Studies on the detection of papaya ringspot virus in infected tissue of plant by ELISA [J]. Virologica Sinica (中国病毒学), 1994, 9 (3): 249-255.
- [7] Li W, Li Y, Zhang X, (李玮, 李毅, 张旭) *et al.* Molecular cloning and sequencing of the eighth largest segment of rice dwarf virus and its expression in *E.coli* [J]. Chin J Virol (病毒学报). 1995, 11 (1): 55-62.
- [8] Gao X, Ouyang X, Chen Z-L, (高谦, 欧阳新, 陈章良) *et al.* Partial cDNA cloning and nucleotide sequence of rice dwarf virus genome [J]. J Integrat Plant Biol (植物学报), 1990. 32: 13-18.
- [9] Chen Z N, Lu Z G, Lu J (陈枝楠, 卢泽高, 卢俭). A brief skech of the progress application of PCR [J]. Acta Phytopathol Sinica (植物病理学报), 1997. 27 (3): 198-200.

## ( 上接第 411 页 )

复叙述图表中数据,行文要求组织严密、符合逻辑,突出重点,以便读者容易理解全文。

**Figures:** 图题置图下方,以 FIG.X 表示, X 代表图序号,如有分图应以大写 A、B、C、D——标示并置图左上角,图注应置图题下方,分图内容应在图注中加以说明。

**Tables:** 表格请用三线表,表题置表格上方,如对表内内容有附加说明,应在说明处右上方标注小写字母,在表格下方对标注处给以解释。

**Discussion:** 讨论主要是针对实验的客观结果发表作者的主观判断,内容包括:(1)主要的原理和概念;(2)实验条件的优缺点;(3)本人结果与他人结果的异同,突出新发现、新发明;(4)解释因果关系,说明偶然性与必然性;(5)尚未定论之处,相反的理论;(6)急需研究的方向和存在的主要问题,“讨论”的内容也以精简为原则,要清楚阐明主要论点,已经谈过的不宜在这一节里予以重复。在结论的问题中避免以假设来“证明”假设,以未知来说明未知,并依次循环推论。

**References:** (参考文献录入格式,中文期刊需全部改为英文格式)

**期刊:** 作者. 题名[J]. 刊名, 年, 卷: 起—止页.

**图书:** 作者. 书名[M]. 版次(初版不写), 出版地: 出版者, 年. 起—止页.

**论文集:** 作者. 题名[A]. 论文集名[C]. 出版地: 出版者, 出版年. 页次.

**专利文献:** 专利所有者. 专利题名[P]. 专利国别: 专利号, 出版日期.

**学位论文:** 作者. 题名[D]. 地点: 学位授予单位, 出版年.

**数据库:** 责任者. 联机上数据库[DB/OL]. 网址/引用日期.

(文献作者录入格式: 姓氏列前(首字母大写), 名缩写以大写字母列后, 中间无任何标点(如 Allan G M, 请注意原引文献姓和名的顺序), 多个作者之间用 ‘,’ 隔开, 限列 3 名, 第 4 名之后的作者用 ‘*et al*’ 表示, 但 ‘*et al*’ 前应有 3 位作者。

## 《中国病毒学》英文版稿约

《中国病毒学》英文版 (*Virologica Sinica*) 是由中国科学院主管、中国科学院武汉病毒研究所和中国微生物学会共同主办、国内外公开发行的高级学术性双月刊。国际刊号仍为: ISSN 1003-5125, 国内刊号变更为 CN42-1760/Q。原《中国病毒学》中文版 (ISSN 1003-5125, CN 42-1295/Q) 为中国科学引文数据库和中国科技信息所《中国科技论文统计与分析》的统计源期刊, 同时加入了《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”、“中国科技信息网”, 被著名文摘 CA (化学文摘)、BA (生物学文摘) 等国内外 20 余种文摘刊物和数据库收录。主要刊载病毒学及各分支学科具有较高学术水平的原始研究论文, 以及病毒学研究的新技术、新方法, 酌登综合评论和研究简报。本刊热忱欢迎作者惠赐英文文稿。

### 1 来稿要求和注意事项

1.1 本刊今年 6 月开始接收英文稿件, 作者请登陆本刊网站: <http://www.virol.cn>。按照投稿指南撰写文稿、通过网站传递电子文稿, 国内作者需同时提供中文文题、作者、单位、摘要等信息以便审查。为避免提交失误, 请另将文稿的印刷稿和作者单位介绍信通过邮局寄送编辑部。

1.2 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”、“中国科技信息网”。作者如不同意将文章编入光盘版和网上数据库, 请在投稿时声明, 否则视为同意。

1.3 本刊将通过电子邮件将评审和修改意见通知作者。作者应在 2 周内将修改后的电子稿件返回, 逾期寄回的作新收稿处理。本刊将按稿件的收稿日期排队逐期发表。

1.4 文稿经终审通过后, 编辑部将及时在网站上公布, 请作者留意。不拟采用的稿件编辑部将通知作者, 稿件概不退还, 请自留底稿。

### 2 英文版文章撰写格式

**Title:** 题名一般不要超过 25 个字, 凡获基金资助课题应在题名右上角标注“\*”。

**Authors:** 中文作者要用汉语拼音(姓氏字母全部大写置后, 双名的前名首字母大写、后名全部小写, 两名中间加“-”符隔开, 姓名均不缩写。如: Da-ming WANG), 国外作者遵从所在国习俗。不同工作单位的作者应在作者右上角标注序号以示区别, 通讯(责任)作者右上角同时标注“\*\*”。如第一作者为在读学生, 应将导师注明为通讯作者。

(文章首页地脚处)

**Received (收稿日期):** Month Day, Year. **Accepted (修回日期):** Month Day, Year. (由本刊填写)

\* **Foundation item (基金项目):** 基金名称(编号)

\*\* **Corresponding author (通讯作者). Tel:**     , **E-mail:**

**Introduction:** 介绍本研究领域的历史背景, 前人所获得的主要成果, 本研究的目的意义。

**Materials and Methods:** 材料和方法部分主要介绍: 研究对象来源、主要试剂厂家、主要实验步骤和检测方法和技术, 要求简明准确、材料完整及可信, 常规方法应尽量简述。

**Result:** 介绍实验的主要结果, 对结果应是随机客观地加以分析, 不应有意无意地加以挑选。文中不要重

( 下转第 410 页 )