

植物类病毒检测技术概述

李桂芬, 李明福, 张永江

(中国检验检疫科学研究院 动植物检疫研究所, 北京 100024)

摘要: 类病毒是一类无外壳蛋白、能在受侵染寄主植物中自我复制的环状单链 RNA 小分子。文中概述了目前检测类病毒的几种方法。

关键词: 类病毒; 生物学; 电泳; 分子生物学

中图分类号: Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)03-0019-03

类病毒是一类无外壳蛋白、能在受侵染寄主植物中自我复制的环状单链 RNA 小分子, 由 246 ~ 399 个核苷酸组成^[1]。到目前为止, 类病毒只在高等植物中发现, 能侵染柑橘、苹果、葡萄、菊花、啤酒花等多种植物, 并造成严重损失。不同类病毒的寄主范围不同, 如对马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)敏感的寄主植物就数以百计, 除茄科外, 还有桔梗科、石竹科、菊科等, 在美国有的地区马铃薯的感染率达 100%, 减产达 68.5%。我国北方地区的马铃薯也出现了这种病毒病害, 感染品种的发病率在 80% 以上, 减产 60% ~ 70%。类病毒病与病毒病在症状上没有明显的区别, 病毒病的大多数典型症状也可以由类病毒引起, 包括矮化、叶脉变色、叶扭曲、叶局部褪绿或枯斑、斑驳和整个植株死亡。类病毒感染后潜伏期较长, 并持续感染^[2]。类病毒的侵染力强, 可以通过摩擦接种传播。多数类病毒靠无性

繁殖(如嫁接、块茎繁殖)传播, 有些可经种子或花粉传播。一旦苗木、块茎被类病毒污染, 就增加了类病毒蔓延的机率, 给防治带来很大的困难。因此, 及早发现病株以控制类病毒病害的蔓延尤其重要。而要达到此目的, 建立灵敏、快速、准确检测类病毒的方法至关重要。以下将目前所采用的类病毒的检测方法做简单叙述。

1 生物学检测

根据类病毒在指示植物上的特有症状来判断待检类病毒的种类的生物学方法是一种敏感和方便的方法。通常采用汁液摩擦接种的方法接种指示植物。也可采用嫁接法使指示植物感病。而用类病毒核酸提取物接种指示植物可以提高症状出现比率和加快症状的出现速度以及提高类病毒的侵染能力。自 1964 年 Raymer 等人^[3]发现番茄可作为马铃薯

收稿日期: 2006-11-21

作者简介: 李桂芬(1967-), 女, 北京通州人, 副研究员, 主要从事植物病毒检疫研究工作。

- [17] 霍仕平, 晏庆久, 许明陆, 等. 玉米主要株型数量性状的基因效应分析[J]. 玉米科学, 2001, 9(1): 12-15.
- [18] 李玉玲, 张长江, 杨铁柱, 等. 玉米株型性状的基因效应研究[J]. 河南农业大学学报, 1996, 30(1): 41-44.
- [19] 邢吉敏, 蔡春泉, 王维真, 等. 国外种质×国内种质玉米单交种产量构成性状的遗传分析[J]. 玉米科学, 2005, 13(1): 55-59.
- [20] 王秀全, 陈光明, 刘昌明, 等. 玉米株型育种亲本选配的遗传规律研究[J]. 西南农业学报, 2000, 13(1): 50-54.
- [21] 王克胜, 孔繁玲, 杜曼·依马买地. 玉米株型性状的遗传表达和自交系与杂交种株型的聚类分析[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(3): 19-27.
- [22] 许明陆, 潘光堂, 霍仕平, 等. 两种方法对玉米几个株型性状遗传效应的比较分析[J]. 杂粮作物, 2002, 22(3): 125-128.
- [23] 王雅萍. 玉米自交系株型和产量性状的关系及其利用研究[J]. 玉米科学, 2004, 12(3): 47-49.
- [24] 蔡一林, 王久光, 孙海燕, 等. 玉米几个株型性状的遗传模型及其与穗粒性状的典型相关[J]. 作物学报, 2002, 28(6): 829-834.
- [25] 吴建宇, 陈彦惠, 席章营, 等. 玉米雄穗性状主基因-多基因遗传的初步研究[J]. 河南农业大学学报, 2000, 34(2): 107-108.
- [26] 温海霞, 蔡一林, 王久光, 等. 9 个玉米自交系主要株型性状的配合力分析[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(3): 223-225.

纺锤块茎类病毒的指示植物以来,马铃薯类病毒的研究工作有了快速的进展。张少瑜^[4]等利用桃实生苗 GF-305 对桃潜隐花叶类病毒进行鉴定。但指示植物法需要的时间长,不同类病毒在指示植物上的症状表现有干扰作用,如柑橘裂皮类病毒(CEVd)和 PSTVd 的寄主范围几乎一样,并且它在寄主上引起的症状很难区分。

2 电泳方法

自 Morris 等人^[3]首次把聚丙烯酰胺凝胶电泳法用于马铃薯纺锤块茎类病毒鉴定以来,聚丙烯酰胺凝胶电泳技术已成为广大学者研究类病毒所普遍采用的方法。随着人们对类病毒结构的深入研究,这项技术逐渐完善起来。目前,较通用的方法为往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(return-PAGE),它是基于类病毒环状分子的特性而设计的,类病毒分子变性后,其电泳迁移率明显慢于相同分子量的其他线性 RNA 分子。在第 1 向常规电泳中,所有核酸分子按分子量大小在凝胶中分离开来,而寄主中的小分子核酸如 tRNA 已经跑到胶外。在第 2 向变性电泳中,类病毒环状分子与线状核酸分子分开,通过银染可以获得能检测出 pg 水平的类病毒样品。目前,双向往复聚丙烯酰胺凝胶电泳法是检测类病毒的主要方法。往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳还可以用在类病毒分离物的鉴定上。Singh R P^[5]用此方法分离了 PSTVd 的 m 和 s 分离物。

3 分子生物学方法

3.1 RT-PCR 方法

PCR 是 Mullis 等在 1985 年发明的一种特异性 DNA 体外扩增技术。类病毒应用此方法检测时,需要将 RNA 反转录成 cDNA 再进行 PCR 反应,此方法称为 RT-PCR,RT-PCR 的产物经琼脂糖凝胶电泳看其是否有特异性扩增带及扩增带的碱基对的数目,以此来判断待检测的样品是否为阳性。RT-PCR 电泳检测方法在植物类病毒的检测中显示出快速、灵敏、特异性强的优点。胡勤学^[6]参考国外柑橘裂皮病类病毒分离物的序列设计并合成引物,首次利用 RT-PCR 扩增出我国柑橘裂皮病类病毒分离物的特异的 DNA 片断,建立的 RT-PCR 方法可检测出约 0.1 ng 感病柑桔总核酸中的柑橘裂皮类病毒。叶明^[7]利用一步法 RT-PCR 检测马铃薯纺锤块茎类病毒并与传统 RT-PCR 进行了比较,结果显示,一步法 RT-PCR 在检测灵敏度方面与传统

RT-PCR 无明显差别。与传统的 RT-PCR 相比,该方法还具有耗时短、价格低的特点。RT-PCR 电泳方法目前已经是一种非常成熟、经常应用的方法,但此方法如操作不当,则会导致交叉污染而出现假阳性问题。其次,由于植物抽提物对酶的抑制作用而会出现假阴性的结果,在实际操作中应引起注意,且需要用其他方法来复合检测结果。

3.2 核酸杂交技术

核酸杂交方法是一种分子生物学的标准技术,用于检测 DNA 或 RNA 分子的特定序列(靶序列)。核酸斑点杂交技术是待检测的 DNA 或 RNA 先转移并固定到硝酸纤维素或尼龙膜上,DNA 或 RNA 探针用放射或非放射性物质标记,在膜上杂交时,探针通过氢键与其互补的靶序列结合,洗去未结合的游离探针后,经放射自显影或显色反应检测特异结合的探针。cRNA 探针和 cDNA 探针及合成的寡核苷酸探针已被应用于类病毒的检测。李世访^[8]1995 年对采用往返聚丙烯酰胺凝胶电泳和地高辛标记的 DNA 和 RNA 探针方法鉴定啤酒花矮化类病毒(*Hop stunt viroid*)、柑橘裂皮类病毒(*Citrus Exocortis viroid*)和苹果锈果类病毒(*Apple Scar Skin viroid*)做了比较,结果显示:cRNA 探针是 3 种方法中最敏感的,分别是 cDNA 探针方法和往返电泳方法的 25~125 倍和 100~625 倍。白艳菊^[9]等用荧光素标记的 PSTVd-cDNA 探针对大田马铃薯试管苗进行检测,结果清晰、重复性好。核酸斑点杂交方法检测类病毒具有快速、准确、特异性好、灵敏度高(据报道,其灵敏度为 0.33 pg)的特点,适合大批量样品检测和异地取样。除核酸斑点杂交方法外,组织印记杂交方法已被应用到马铃薯上的马铃薯纺锤块茎类病毒、苹果上的苹果锈果类病毒的检测。这种方法简单、快速,减少了核酸抽提的步骤,但这种方法要求必须是新鲜的植物组织。

3.3 PCR 微量板杂交法

此方法是由 Inouye 和 Hondo^[10]首先改进的一种新的杂交方法,是 RT-PCR 技术与核酸杂交技术相结合建立起来的一种检测手段,该方法利用类病毒特定基因片段的 RT-PCR 产物与利用地高辛(Dig)标记的 cDNA 或 cRNA 探针杂交,此杂交产物再与酶标记的抗 Dig 抗体结合,然后通过加入酶的底物生成有色物质再通过酶联仪读数来判断反应结果,可检测出极微量的病原物,如 10fg 病毒 RNA,灵敏度为 ELISA 的 10^4 倍,特异性比 RT-PCR 强,很适宜进出境植物苗木、种子的检疫。Sai-

to-N^[1] 用此方法检测柑橘裂皮类病毒, 结果显示, 此方法是一种快速和灵敏度高的检测柑橘裂皮类病毒的方法。

3.4 RT-PCR-ELISA 方法检测类病毒

该方法是 RT-PCR 与 ELISA 的联合应用, 通过 ELISA 的方法对 PCR 产物进行检测。在 PCR 扩增过程中掺入标记有地高辛的核苷酸, 得到标记了地高辛的 PCR 产物。在进行 ELISA 检测时, 将 PCR 产物变性后与标记有生物素的探针杂交, 探针上生物素能被包被在酶联板上的链亲和素捕获(固定 PCR 产物), 用缓冲液冲洗后, 加入酶标抗地高辛抗体, 冲洗后形成复合物: 链亲和素-生物素-核酸探针-PCR 产物-地高辛-抗地高辛抗体-酶, 加入底物显色观察。该方法通过 ELISA 将信号进一步放大, 并有探针的特异性结合, 较普通 PCR 方法的特异性和敏感性大大提高, 适合微量抗原的检测。Shamloul-AM^[12] 用此方法检测 PSTV 和温带果树类病毒, 结果显示, RT-PCR-ELISA 方法对 PCR 扩增产物的检测灵敏度至少是 RT-PCR 电泳方法的 100 倍。

以上叙述的是目前检测植物类病毒的几种方法, 每种方法都有其各自的特点。实际应用中应根据不同情况采取不同的方法。生物学检测操作比较简单, 但耗时长, 有的类病毒不适合应用, 有一定的局限性; 电泳方法对试验条件和技术要求较低, 可操作性强, 且可区分类病毒的不同分离物, 是目前普遍采用的方法; RT-PCR 电泳方法特异性强、灵敏度高、快速, 也是普遍应用的方法, 但由于种种原因也会出现假阳性和假阴性问题, 在具体操作中应引起足够的重视; 核酸斑点杂交技术特异性强、灵敏度高, 同时检测的样品量大, 也是一种比较好的方法; PCR 微量板杂交技术、RT-PCR-ELISA 方法的特异性好, 其灵敏度高于 RT-PCR 电泳方法, 但其操作步骤较复杂, 要求实验室有较好的条件。各个实验室可根据试验目的、检测目标等不同情况选择应用。随着生物科技的发展, 还会有一些更好的检测技术应用于类病毒的检测。

参考文献:

[1] 李世访, 郑银英, 成卓敏. 利用酵母的 *Pac I* 基因获得

抗类病毒转基因植物[J]. 植物保护, 2001, 27(3): 35-37.

- [2] 郑洪. 类病毒研究进展[J]. 中学生物教学, 2001(3): 47-47.
- [3] 李学湛, 吕典秋, 何云霞, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法检测马铃薯类病毒技术的改进[J]. 中国马铃薯, 2001, 15(4): 213-214.
- [4] 张少瑜, 张尊平, 洪霓, 等. 桃潜隐花叶类病毒的鉴定[J]. 中国果树, 2000(1): 30-31.
- [5] R P Singh, A Boucher. Electrophoretic separation of a severe from mild strains of potato spindle tuber viroid [J]. *Phytopathology*, 1987, 77(11): 1588-1591.
- [6] 胡勤学, 林木兰, 张春立, 等. 利用 RT-PCR 扩增和分析柑桔裂皮病类病毒[J]. 植物学报, 1997, 39(7): 613-617.
- [7] 叶明, 李德森, 杜荣蹇. 利用一步法 RT-PCR 检测马铃薯纺锤块茎类病毒[J]. 云南大学学报, 1999, 21(3): 190-191.
- [8] li Shi-Fang, Seiko ONODERA, Teruo SANO, *et al.* Gene diagnosis of viroids: comparison of return-PAGE and hybridization using DIG-labeled DNA and RNA probes for practical diagnosis of hop stunt, citrus exocortis and apple scar skin viroids in their natural host plants[J]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1995, 61(4): 381-390.
- [9] 白艳菊, 李学湛, 吕典秋, 等. 用 NASH 方法检测马铃薯纺锤块茎类病毒[J]. 杂粮作物, 2001, 21(3): 42-43.
- [10] Inoaye S, Hondo R. Microplate hybridization of amplified vrial DNA segment [J]. *Clin Microbiol*, 1990, 28: 1469-1472.
- [11] Saito N, Ohara T, Sugimoto, *et al.* Detection of citrus exocortis viroid by PCR microplate hybridization[J]. *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan*, 1995, 16(31): 47-55.
- [12] Shamloul A M, Hadidi A. Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit tree viroids by reverse transcription polymerase chain reaction probe capture hybridization [J]. *Journal of Virological Methods*, 1999, 80(2): 145-155.