

分子生物学技术在马铃薯病毒检测中的应用

吴兴泉，陈士华，吴祖建，林奇英，谢联辉

(福建农林大学植物病毒研究所，福州，350002)

摘 要：直接应用于马铃薯病毒检测的分子生物学技术主要有：RT-PCR 检测技术、指示分子-NASBA 检测技术、核酸杂交检测技术三大类，以 RT-PCR 技术应用最为广泛。另外病毒外壳蛋白基因的克隆与表达、DNA 介导的抗体制备及病毒单链抗体片段筛选等技术在马铃薯病毒免疫学检测技术中也有成功的应用，并解决了传统免疫学方法难以解决的抗原制备问题，使后者更具应用前景。

关键词：分子生物学技术；马铃薯；病毒检测

中图分类号：S532

文献标识码：A

文章编号：1672-3635 (2003) 03-175-05

马铃薯病毒病是马铃薯上非常重要的一类病害，分布于世界各马铃薯种植区。可导致马铃薯退化，降低产量，严重时减产可达 80% 以上。是当前马铃薯生产中的主要限制因子。在我国由北向南马铃薯带毒率逐渐增高，造成我国中部和南部地区不能自行留种，必须从北部发病轻的地区调种，造成巨大的经济损失。可侵染马铃薯的病毒种类繁多，以马铃薯命名的病毒就多达 16 种^[1]。其中最重要的有马铃薯卷叶病毒 (Potato Leafroll Virus, PLRV)、马铃薯 Y 病毒 (Potato Virus Y, PVY)、马铃薯 X 病毒 (Potato Virus X, PVX)、马铃薯 A 病毒 (Potato Virus A, PVA)、马铃薯 S 病毒 (Potato Virus S, PVS)、马铃薯 M 病毒 (Potato Virus M, PVM) 等。在田间，很多马铃薯病毒病表现的症状相似，而对于同一种病毒病在不同条件下的症状又会出现很大变异，给这类病害的田间诊断带来很大困难。建立快速、准确的金薯病毒检测技术是保证种薯安全调运和种薯成功脱毒的关键，具有重要的现实意义。随着分子生物学技术的发展，很多试验技术日趋成熟，为马铃薯病毒的快速、准确检测提供了有用的工具。下面对近年来分

子生物学技术在马铃薯病毒检测技术中的应用情况做一评述。

1 马铃薯病毒分子检测技术

直接应用于马铃薯病毒检测的分子生物学技术有反转录一聚合酶链式反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 技术、核酸杂交 (Nucleic acid hybridization) 技术、指示分子一核酸序列扩增 (Molecular Beacon-Nucleic acid sequence based amplification, NASBA) 技术等。

病毒 RNA 的成功提取是运用这些技术的前提。目前病毒 RNA 提取方法主要有两类：一是先提纯病毒，再从提纯病毒中提取病毒 RNA；二是直接提取带毒寄主植物总 RNA 作为病毒 RNA。随着研究的深入，病毒 RNA 提取技术也在不断改进^[2,3]。有研究发现植物组织中的酚类物质对 RT-PCR 有抑制作用，所以在提取植物 RNA 时，很多步骤都用来去除酚类物质。Singh 等^[4]最新研究证实在 RNA 提取缓冲液中加亚硫酸钠可改进核酸提取质量，而且在提取液中不需使用蛋白酶 K，从而降低了费用。

1.1 RT-PCR 检测技术

RT-PCR 检测技术在马铃薯病毒分子检测技术中应用最广。RT-PCR 检测技术具有简单、快速、灵敏、特异性强、重复性好等优点，仅用微量感病

收稿日期：2003-04-17

作者简介：吴兴泉 (1970-)，男，博士，副教授，现工作单位
郑州工程学院生物工程系，主要从事植物病毒与分子生物学研究。

组织汁液即可灵敏地检测到病毒的存在。此类技术不仅可以在基因水平上为植物病毒的检测提供更灵敏的手段, 而且可与核酸序列分析结合, 检测基因序列的分子变异, 分析病毒株系间的序列同源性, 比较亲缘关系, 为病毒的鉴定提供可靠依据。目前该项技术已分别应用于 PVY^[5]、PVA^[2,6]、PLRV^[3]、PVS、PVX^[7]等的病毒的检测中。

合理的引物设计是成功应用该项技术的关键。如对某种病毒进行检测, 所选病毒基因组中的靶序列应为该种病毒的特异保守序列, 对于株系间分子变异大的病毒尤应注意。如对同种病毒的不同株系进行检测, 则应选择该株系的特异序列区进行引物设计^[8]。

在田间, 马铃薯病毒常常复合侵染, 为实现对同一样品多种病毒检测的同时检测, 先后建立了 duplex-RT-PCR^[9]、M-RT-PCR^[7,10]、CF-RT-PCR^[11]等技术。m-RT-PCR 技术与常规方法的主要区别在于: (1) 以 oligo (dT) 或随机引物作为公共引物进行反转录^[7]。(2) PCR 反应体系中使用多对病毒特异性引物, 同时扩增多种病毒各自不同的特定基因片段, 且各扩增片段间大小各不相同; (3) 凝胶电泳检测时根据电泳条带的多少和大小即可判断病毒的种类, 实现对多种病毒的同时检测。CF-RT-PCR 技术中使用的各病毒特异性引物分别采用不同的荧光染料标记, 不同病毒的 PCR 产物释放的荧光颜色不同, 根据荧光颜色来判断样品中病毒的种类和多少。

免疫捕捉-RT-PCR (IC-RT-PCR) 检测技术是免疫学技术与 RT-PCR 技术相结合建立起来的检测技术^[12]。该技术不需进行病毒 RNA 的抽提, 操作更容易, 并且在不破坏病毒粒体的情况下, 既可实现病毒的检测。该方法中的病毒特异性抗体可用依赖于 dsRNA 的单克隆抗体替代, 为不具备病毒特异性抗体或采用免疫学技术很难检测的病毒提供了一个可行的检测方法。其灵敏度与典型的 RT-PCR 检测技术相同。

1.2 指示分子 NASBA 技术

NASBA 技术是以 RNA 转录为基础的等温扩增方法 (图 1), 适用于 RNA 分子的扩增, 一般可通过分子杂交判断扩增结果。此方法在有双链 DNA 存在的条件下也可实现对单链 RNA 的特异扩增, 具有高度的特异性, 目前已成为医学上检测

RNA 病毒的首选方法。

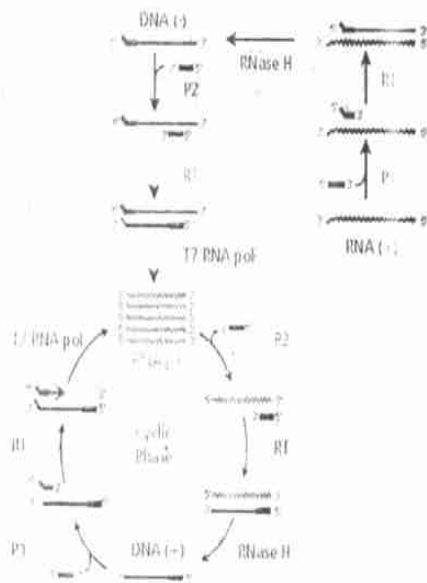


图 1 NASBA 法扩增 RNA 的基本原理

指示分子是一条寡聚核苷酸链, 具有茎环结构, 其环部包含被检样品靶核苷酸序列的互补序列; 茎部为双链结构, 一条臂的末端用的荧光染料报告子 (Reporter) 标记, 另一臂的末端连接无荧光的淬灭子 (Quencher)。在未杂交状态下, 报告子与淬灭子结合, 报告子中的能量转移到淬灭子上以热能的形式释放出来, 因此不发荧光; 当指示分子与靶核苷酸杂交后发生构象变化, 报告子与淬灭子分离而释放荧光。所以通过荧光的有无即可判断检测结果 (图 2)。Gionata 等^[13]设计合成了与 PLRV 特定 RNA 序列互补的指示分子, 并应用于 PLRV RNA 的 NASBA 扩增反应中, 结果发现在阳性反应中, 随着时间的延长荧光强度呈指数曲线形式增加, 而在阴性反应中荧光强度无变化。另外样品中病毒 RNA 含量高时, 反应过程中荧光强度增加的速度快, 反之则慢。因此利用此技术不但可实现病毒的检测, 而且可对样品中病毒浓度进行分析。此技术检测灵敏度与 Northern blots 相同近年来该技术已被广泛用于马铃薯病毒检测中, 并得到不断改进。目前利用该技术可以对多种不同病毒和同种病毒的多个不同株系进行同时检测^[14~15]。Leone 利用免疫捕捉技术对 PLRV 进行纯化后, 利用此项技术也实现了对 PLRV 的特异性检测, 并证明其灵敏度与常规指示分子-NASBA 技术相同^[16]。

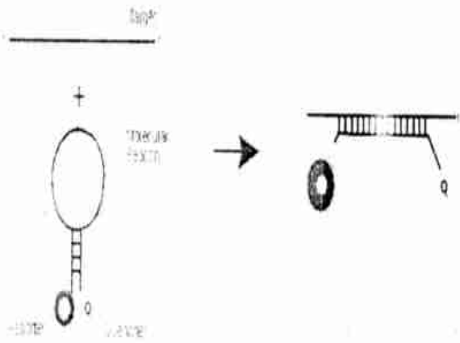


图 2 指示分子检测核酸的原理

1.3 核酸杂交检测技术

根据互补的核酸单链可以相互结合的原理，将一段病毒核酸单链以某种方式加以标记，制成探针，再与互补的待测样品核酸杂交，带有探针的杂交核酸能指示病原的存在。目前有核酸斑点杂交技术（Nucleic acid spot hybridization, NASH）和 PCR 微量板杂交检测技术两种。NASH 检测技术通常采用地高辛（DIG）标记的病毒特异性探针直接对待测样品 RNA 进行检测。研究表明 NASH 检测技术比 ELISA 法更灵敏，更可靠，适于检测大量样品。对病毒或类病毒的侵染诊断更为有用，但其灵敏度和特异性较 RT-PCR 差^[17,18]。PCR 微量板杂交检测技术是 RT-PCR 技术与核酸杂交技术相结合建立起的一种病毒检测手段。其基本原理是通过 RT-PCR 扩增病毒特定基因片段，再利用地高辛标记的 cDNA 探针杂交对 RT-PCR 产物进行检测，利用带有探针的杂交核酸指示病毒的存在。有研究表明 RT-PCR 产物稀释 100~125 倍后进行杂交反应，检测效果最好。该技术的灵敏度较高，是 ELISA 的 10⁴ 倍，特异性也比普通 PCR 强。近期研究发现核酸杂交检测技术中所用探针越大，灵敏度越高^[19~20]。

2 分子生物学技术在病毒免疫学检测技术中的应用

目前免疫学技术在马铃薯病毒检测中应用最广泛。快速制备大量的高纯度的抗血清是该项技术成功应用的关键。传统生物学中以提纯病毒粒体为抗原制备抗血清，此方法存在很多弊端，如一些病毒在寄主体内含量较低，难以提纯获得足够的抗原；

还有一些病毒分离提纯困难不易得到纯化的病毒粒子，以此为抗原制备的抗血清含有寄主蛋白抗体，检测时会产生假阳性反应，很难准确判断反应结果。近年来，随着分子生物学技术的发展，新技术不断产生并应用于病毒特异性抗血清的制备中，给马铃薯病毒免疫学检测技术的发展带来新的曙光。

有研究表明通过基因工程技术克隆病毒外壳蛋白基因，并使其在原核细胞中表达，以表达产物作为抗原可制备得到高特异性抗血清。此方法克服了以提纯病毒为抗原制备抗血清时的种种弊端，所构建的工程菌株可在冰箱中长期保存，根据需要可随时诱导基因表达产生足够的抗原用于抗血清的制备^[21]。

Wolff 等报道将提纯的 DNA 质粒注射到小鼠体内可导致报告基因的大量表达^[22]。进一步研究发现含编码病毒蛋白基因的 DNA 质粒可诱导动物产生免疫反应并可用于制备该蛋白的特异性抗血清^[23]。目前已知外源 DNA 可诱导小鼠、家兔等多种动物产生免疫反应，可用于诱导免疫反应的 DNA 有多种类型：如裸 DNA、DNA-脂复合物、DNA 包被的金粒子等；免疫动物时可采用肌肉注射、静脉注射、皮下注射、烟雾处理等多种形式。Hinrichs^[24]等利用此技术制备了 PVY P1 和 TMV CP 的抗血清。结果表明含 PVY P1 基因的质粒可诱导动物产生 P1 蛋白的特异性抗血清，但抗体浓度较低，而 TMV CP 基因却可快速诱导动物产生高抗体浓度的抗血清，原因可能是 TMV CP 基因中包含特效免疫序列（Immunostimulatory DNA sequences, ISS）^[25]。有报道认为在利用 DNA 介导的抗血清制备技术时将 DNA 与高效表达载体连接或在 DNA 序列中引入 ISS 可增强免疫反应，提高抗血清效价；改肌肉注射为静脉注射或皮下注射也可增强免疫反应^[26]。该技术具有以下优点：（1）不需提纯蛋白质，节省时间和人力；（2）避免了蛋白质提纯时的改变和抗原决定簇的丢失；（3）可减少对动物产生的伤害^[27]。但目前该项技术还需进一步研究完善。

使用抗菌素展示库（phage display library）技术可筛选得到几乎任何抗原的抗体片段^[28]。Harper 等^[29]利用此技术筛选得到了 PLRV 的单链 Fv 抗体片段（single chain Fv antibody fragment, scFv）。核苷酸序列分析表明此 scFv 片段属于人类

V (H) ³ 基因组。将此基因克隆并诱导表达, 所产生的 scFv-碱性磷酸酶融合蛋白可直接用于 PLRV 的检测。目前类似的研究很多, 但筛选得到的抗体片段仅具有中等亲和力。有证据表明通过增加抗菌素库的差异性可直接筛选得到具有高亲和力的抗体片段^[30]。Vaughan^[31]发现再筛选过程中通过调控抗原包被条件或使溶液中形成抗菌素-抗原复合物也可筛选得到具高亲和力的抗体片段。依据上述研究结果 Boonham^[32]等改进筛选技术得到了具有高亲和力且具株系特异性的 PVYO 抗体片段。目前此项技术已逐渐成为免疫学研究中的热点。

3 讨论与展望

马铃薯病毒检测技术经历了传统生物学检测技术、免疫学检测技术和分子生物学检测技术三个阶段。传统生物学检测技术准确、直观、易于操作, 但耗时长, 已不能适应生产需要。免疫学检测技术快速、灵敏, 适用于大量样品的检测, 但传统免疫学技术中在抗血清的制备上还有很多不足。随着分子生物学技术的不断发展, 一些技术应用到马铃薯病毒检测中将是必然趋势。随着 RT-PCR 技术及相应仪器的普及, RT-PCR 技术在马铃薯病毒检查中的应用也越来越多, 是目前应用最广泛、也将是最有前途的一项分子检测技术。

分子生物学技术与免疫学技术的结合推动了两种技术的共同发展, 这种结合也将是未来发展的方向。免疫捕捉技术在 RT-PCR 检测技术和指示分子-NASBA 检测技术中的应用, 使得在不需提纯病毒 RNA 的情况下, 既可完成对病毒的检测。利用病毒外壳蛋白基因的克隆与表达大量生产高纯度抗原, 解决了传统免疫学技术中的难以解决的抗原制备问题。DNA 介导的抗血清制备技术无须蛋白提纯既可实现抗体的制备, 而单链抗体制备技术无须免疫动物, 直接通过单链抗体片段的筛选及抗体基因克隆及表达既可完成抗血清的制备。这些分子生物学技术在抗体制备中的应用为免疫学技术的发展扫清了障碍。

分子生物学技术在马铃薯病毒检测实践中的应用, 已使得马铃薯病毒的鉴定技术发生了革命性的变化, 也体现了植物病理学向分子水平发展的客观必然。尽管在检测过程中还存在着诸如检测费用高, 对操作手段和实验仪器要求高, 不易推广等缺

陷, 但随着人们认识事物的深入、知识积累的增多, 这些问题都将逐步得到解决。

参 考 文 献

- [1] 谢联辉, 林奇英, 吴祖建. 植物病毒名称及其归属 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999, 137—142.
- [2] Cerovska N, Petrzik K, Moravec T, et al. Potato virus A detection by reverse transcription—polymerase chain reaction [J]. Acta Virol, 1998, 42 (2): 83—5.
- [3] Singh R P. A solvent—free, rapid and simple virus RNA—release method for potato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction [J]. J Virol Methods, 1999, 83 (1—2): 27—33.
- [4] Singh R P, Nie X, Singh M, et al. Duplessis P. Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT—PCR [J]. J Virol Methods, 2002, 99 (1—2): 123—31.
- [5] Weilguny H et al. Separation of Slovenian isolates of PVY (NTN) from the North American isolates of PVY (N) by a 3—primer PCR [J]. J Virol Methods, 1998, 71 (1): 57—68.
- [6] Singh R P, Singh M. Specific detection of potato virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction [J]. Plant Dis, 1998, 82: 230—234.
- [7] Nie X Z, Singh R P. Detection of multiple potato viruses using an oligo (dT) as a common cDNA primer [J]. J Virol Methods, 2000, 86 (2): 179—85.
- [8] Singh R P. Reverse—transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids [J]. J Virol Methods, 1998, 74: 125—138.
- [9] Singh R P, Kurz J, Boiteau G. Detection of styletborne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction [J]. J Virol Methods, 1996, 59 (2): 189—96.
- [10] Nie X Z, Singh R P. A novel usage of random primers for multiplex RT—PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers [J]. J Virol Methods, 2001, 91 (1): 37—49.
- [11] Walsh K, North J, Barker I, et al. Detection of different strains of potato virus Y and their mixed infections using competitive fluorescent RT—PCR [J]. J Virol Methods, 2001, Feb; 91 (2): 167—73.
- [12] Nolasco G, Blas D C, Torres V, et al. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens [J]. J Virol Methods, 1993, 45 (2): 201—18.
- [13] Leone G, Harm V S, Bob V G, et al. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real—time detection of RNA [J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26 (9): 234—239.
- [14] Klerks M M, Leone G O, Verbeek M, et al. Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of potato

leafroll virus and potato virus Y in potato tubers [J]. J Virol Methods, 2001, 93 (1-2): 115-25.

[15] Szemes M, Klerks M M, et al. Development of a multiplex AmpliDet RNA assay for simultaneous detection of potato virus Y isolates [J]. J Virol Methods, 2002, 100 (1-2): 83-96.

[16] Leone G, van H B, Schijndel B, et al. Direct detection of potato leafroll virus in potato tubers by immunocapture and the isothermal nucleic acid amplification method NASBA [J]. Journal of Virological Methods, 1997, 66: 19-27.

[17] Welnicki M, Zekanowski C, Zagorski W. Digoxigeninlabelled molecular probe for the simultaneous detection of three potato pathogens: potato spindle tuber viroid (PSTVd), potato virus Y (PVY), and potato leafroll virus (PLRV) [J]. Acta Biochim Pol, 1994, 41 (4): 473-475.

[18] Singh M, Singh R P, Moore L. Evaluation of NASH and RT-PCR for the detection of PVY and its comparison with ELISA in plants [J]. Amer J of Potato Res, 1976, 76 (2): 61-66.

[19] Dhar A K, Singh R P. Improvement in the sensitivity of PVY^N detection by increasing the cDNA probe size [J]. J Virol Methods, 1994, 50 (1-3): 197-210.

[20] 王明霞. 应用 PCR 微量板杂交法检测植物病毒和类病毒 [J]. 植物保护, 1996, 22 (1): 34-35.

[21] 王振东, 张敏等. 马铃薯 Y 病毒普通系外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达 [J]. 中国病毒学, 1999, 14 (2): 157-162.

[22] Wolff J A, Maline R W, Williams et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo [J]. Science, 1990, 247: 1465-1468.

[23] Tang D C, Vit M, Johnston S A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response [J]. Nature, 1992, 356: 152-154.

[24] Hinrichs J, Berger S, Shaw J G. Induction of antibodies to plant viral proteins by DNA-based immunization [J]. J Virol Methods, 1997, 66 (2): 195-202.

[25] Sato Y, Roman M, Tighe H, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization [J]. Science, 1996, 273: 352-354.

[26] Raz E, Tighe H, Sato Y, et al. Preferential induction of an immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 5141-5145.

[27] Hasset D E, Whitton J L. DNA immunization [J]. Trends Microbiol, 1996, 4: 307-312.

[28] Nissim A, Hoogenboom H R, Tomlinson I M, et al. Antibody fragments from a single phage display library as immunochemical reagents [J]. EMBO J, 1994, 14: 692-698.

[29] Harper K, Kerschbaumer R J, Seigler A, et al. A scFv-alkaline phosphatase fusion protein which detects potato leafroll luteovirus in plant extracts by ELISA [J]. J Virol Methods, 1997, 63: 237-242.

[30] Griffiths A D, Williams S C, Hartley O, et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires [J]. EMBL J, 1994, 13: 3245-3260.

[31] Vaughan T J, Williams A J, et al. Human Antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library [J]. Nat Biotechnol, 1996, 14: 309-314.

[32] Boonham N, Barker I. Strain specific recombinant antibodies to potato virus Y potyvirus [J]. Journal of Virological Methods, 1998, 74: 193-199.

浙江省台州市路桥锦绣筛网厂

全国马铃薯育种单位防虫网专用生产厂家

经营项目：尼龙筛网、网罩、遮阳网（防虫网）、尼龙种子袋、塑料标签等。

价目：	尼龙筛网	40目	1.60元/m	60目	1.90元/m
	尼龙种子袋	35×24 cm	0.45元/条	45×30 cm	0.65元/条
	塑料遮阳网	遮阳率（70%）	0.85元/m		
	塑料标签	4.5×3.0	160元/万张	（以上产品优惠 10%）	

通信地址：浙江省台州市新桥镇凤阳章路9号
汇款户名：浙江省台州市路桥锦绣筛网厂
开户银行：台州市农行路桥区支行新桥分理处
银行帐号：331021089874021848

邮编：318055
厂长：章万富 手机：013701030208（北京网）
业务科手机：013968615918（台州网）
电话/传真：0576-2642298、2615837、2615705