

马铃薯病毒病分子检测技术研究进展

袁青¹，殷幼平²，王中康²

(1. 西南农业大学植保学院, 重庆 400716; 2. 重庆大学基因工程研究中心, 重庆 400044)

摘要：快速、准确地定性或定量检测马铃薯植株中病毒、类病毒的种类和数量是有效地控制马铃薯病毒病害的需要, 也是马铃薯种薯品质的重要保证。本文就马铃薯病毒检测和病害早期诊断的分子检测新技术的基本原理和研究进展作了较为详尽的介绍与评价。

关键词：马铃薯；病毒；检测；RT-PCR

中图分类号：S532

文献标识码：A

文章编号：1001-0092 (2003) 01-033-04

在马铃薯生产中, 普遍存在的病毒和类病毒虽然有十几种, 但在我国广大马铃薯产区危害马铃薯的五种主要病毒分别为马铃薯X病毒(PVX); 马铃薯A病毒和Y病毒(PVA, PVY); 马铃薯S病毒(PVS), 马铃薯卷叶病毒(PLRV); 以及马铃薯纺锤状块茎类病毒(PSTVd)。因马铃薯栽培品种的抗性差异, 在不同地区几种马铃薯病毒病往往混合发生, 传统的常规生物学鉴定方法固然可靠, 但检测周期较长, 费时费事; 而以病毒包被蛋白抗原及其用免疫动物制备的多克隆或单克隆抗体反应为基础的血清学检测法, 虽然提高了马铃薯病毒病

收稿日期：2002-10-25

作者简介：袁青（1978—），女，硕士，西南农业大学植保学院，从事马铃薯病毒病分子检测研究。

检测的灵敏度和特异性, 但对于某些含量极少的韧皮部病毒仍显得不够灵敏, 也存在操作步骤烦琐等不足; 近年来迅速发展的以病毒核酸为对象的分子检测技术, 以其快速、特异和灵敏性高的优点, 在包括马铃薯等植物种苗病毒病的鉴定中起着愈来愈大的作用, 为脱毒种苗和病毒的同期检测提供了新的诊断工具。

1 常规的检测方法

马铃薯病毒的检测, 最开始是通过观察植物症状判断所带病毒种类, 这样往往不准确。后来采用指示植物法, 但指示植物法历时长, 并且要求严格的环境条件^[1]。免疫学检测法的发展则显著提高了马铃薯病毒检测的精确度, 其中包括IG指示试纸法、免疫吸附电子显微术(ISEM)、ELISA法等^[2]。

[21] Pedros A R, MacLeod M R, Ross H A, et al. Manipulations of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in potato tubers: an increase in activity leads to an increase in tuber number and a change in tuber size distribution [J]. Planta, 1999, 209: 153—160.

[22] Tjaden J, Mohlmann T, Kampfenkel K, et al. Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato tuber morphology, yield and composition of starch [J]. Plant J, 1998, 16: 531—540.

[23] Claassens M M J, and Vreugdenhil D. Is dormancy breaking of potato tubers the reverse of tuber initiation? [J] Potato Res, 2000, 43: 347—369.

[24] Lerberth R, Ritte G, Willmitzer L, et al. Inhibition of a starch-

granule bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16: 531—540.

[25] Duwenig E, Steup M, Willmitzer L, et al. Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism [J]. Plant J, 1997, 12: 323—333.

[26] Farre E M, Bachmann A, Willmitzer L, et al. Acceleration of potato tuber sprouting by expression of a bacterial pyrophosphatase [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19: 268—272.

[27] Hajirezaei M, and Sonnewald U. Inhibition of potato tuber sprouting: Low levels of cytosolic pyrophosphate lead to non-sprouting tubers harvested from transgenic potato plants [J]. Potato Res, 1999, 42: 353—372.

ELISA 是本世纪 70 年代发展起来的一项免疫酶法与固相吸附相结合的免疫技术, 自 Casper (1977) 应用 ELISA 方法鉴定了 PLRV 病毒后, 这一技术在马铃薯病毒检测中得到了应用。其依据是产生一个抗体-酶结合体, 而这两种分子仍各自保留其本身的特性, 抗体附于抗原上, 而酶则进行检测放大和反应结果。ELISA 又分为双抗夹心法 (DAS-ELISA) 和斑点免疫检测法 (Dot-ELISA 或 DIA), 双抗夹心法 (DAS-ELISA) 在微量滴定板上进行反应, 它包括常规 DAS-ELISA 和快速 DAS-ELISA。刘卫平等采用快速法检测了马铃薯 PVX、PVY 病毒^[3], 白艳菊等应用快速 DAS-ELISA 同时检测 PVX、PVY、PVS、PVM、PLRV 5 种马铃薯病毒^[4], 快速法比常规法操作简便, 节省时间、材料, 重复性好, 结果可靠。斑点免疫检测法 (Dot-ELISA 或 DIA) 是以纤维素膜 (NCM) 为固相载体, 应用双抗体夹心法检测马铃薯病毒, 其灵敏度高于 DAS-ELISA。张国柱 (1991) 用 Dot-ELISA 对马铃薯主要病毒 PVX、PVY、PLRV 进行了检测^[5], 孟清等 (1993) 用这种方法检测了马铃薯 PVX、PVY 和 PVS 病毒^[6]。结果都表明, Dot-ELISA 比 DAS-ELISA 灵敏度高, 而且经济简便, 快速直观, 是一种比较理想的检测方法。而近年来发展的分子检测方法, 如核酸斑点杂交技术和 RT-PCR, 使马铃薯病毒检测的灵敏度和准确性又提高了一大步。

2 核酸斑点杂交技术 (NASH)

核酸斑点杂交技术 (Nucleic Acid Spot Hybridization, NASH) 是依据探针与病毒或类病毒核酸相杂交的原理进行检测的, 探针带有放射性或非放射性标记。杂交在固体或液体支持物上进行, 比如硝化纤维素膜或尼龙膜, 马铃薯病毒和类病毒的检测, 一般使用固体支持物硝化纤维素膜。典型的 NASH 包括以下几个步骤: 样品的制备和膜的准备; 样品固定和预杂交; 洗去剩余的探针; 放射自显影。马铃薯病毒和类病毒属于正意单链 RNA, 在制备单链 cDNA 时, 用依赖 RNA 的 DNA 聚合酶将 RNA 反转录为 cDNA, cDNA 插入细菌质粒, 克隆后可以得到大量的病毒或类病毒 cDNA 探针。最初, 分子探针使用放射性标记, 后来在马铃薯 PSTVd 和病毒检测中应用非放射性标记, 使用非

放射性标记 (生物素或非生物素) 探针检测的灵敏度相当于放射性探针标记。试验表明, DIG (地高辛配基) 标记的 DNA 探针与 P³² 标记的探针具有同样的灵敏度, 但碘化生物素和过氧化物标记的探针在检测 PVS、PVX、PVY 时灵敏度不高^[7]。DIG 探针检测目的基因是依据抗 DIG 碱性磷酸酶结合地高辛, 水解特定的酶物质, 产生有颜色或化学发光物质^[4]。

2.1 马铃薯类病毒的核酸检测

核酸斑点杂交技术 (NASH) 最初由 Owens 和 Diener (1981) 设计用于检测 PSTVd 的。类病毒不具有外壳蛋白, 不能用免疫学方法检测, 用指示植物检测, 需要占用大面积温床, 费力费时, 而且灵敏度也不高。80 年代初期, Pfannenstiel (1980) 和 Morris (1978) 建立了检测类病毒的聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 并用于筛选马铃薯核心种薯, 但存在灵敏度较低的缺点。此后, Schumacher (1986) 和 Singh (1987) 利用类病毒核酸在高温条件下变性、迁移率变慢这一特点, 建立了双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 提高了鉴定类病毒的准确性。崔荣昌等 (1992) 用双向电泳法检测了 PSTVd^[8]。但这些方法的灵敏度和精确性都远不及酸斑点杂交检测技术。NASH 是目前国际上较先进的一种检测方法, 它已被一些国家列为检测 PSTVd 的标准检测方法。李学湛等应用 NASH 检测了马铃薯类病毒 (PSTVd)^[9], 结果表明, NASH 法具有省时、灵敏度高、简单方便、样品可以在杂交膜上长期保存等优点。

2.2 马铃薯病毒检测

现在, NASH 应用已扩大到病毒检测。Maule (1983) 和 Baulcombe (1984) 报道了他们应用 NASH 检测病毒。后来相继有报道用 NASH 方法检测马铃薯 PVX、PVS、PLRV, 但休眠种薯中的病毒, 检测灵敏度还不高, 尤其对于 PVY 和 PLRV。与血清学相比, 杂交分析的一个主要优点在于它有可能使用全部或部分病毒基因组制备预定特异性的探针, 而血清学方法是基于检测病毒外壳蛋白抗原决定基因, 它的顺反子只代表了基因组的一小部分。Querci 等 (1993) 将特异性检测血清型 PVX-A (Andean) 或 PVX-O (普通系) 的两个核酸探针连接在一起形成一个新探针, 它能够用这两种血清型中任何一种检测 PVX 的分离株系。在病

毒检测中，影响到检测结果的有以下几个方面的因素，首先是提取的病毒 RNA 的质量，其次是探针的大小^[10]。研究表明，从 PVYN 基因 3 端克隆的 0.5、1.2、2.5 和 3.25 kb 的探针，其中 3.25 kb 大小的探针的灵敏度足以检测到 5 pg RNA，对于更小的探针如 0.25 kb，则需要 1000 pg 或者更多的 RNA，因此使用较大的探针可以提高灵敏度。另外，Welnicki (1994) 用多重探针在西红柿、烟草和马铃薯叶片上同时检测了马铃薯病毒 (PLRV 和 PVY) 和 PSTVd，试验中的分子探针用三种病原菌的 cDNA 片段克隆制成，探针用非放射性地高辛标记，同时检测三种病原菌，但对于休眠种薯还有一定的局限性。对于同步检测多种病毒或类病毒，RT-PCR 灵敏度较高。

3 聚合酶链式反应 (PCR)

3.1 RT-PCR

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction PCR) 是一种以指数形式扩增特定 DNA 序列的检测方法。在检测病毒 RNA 时，通过反转录合成 cDNA，然后对 cDNA 进行扩增。RT-PCR (反转录 PCR) 方法可以用于检测各种植物感染的类病毒、病毒、植原体、细菌、真菌、线虫等。在马铃薯病毒检测中，ELISA 相对 PCR 来说既耗时，又不能检测休眠种薯所带的病毒，其灵敏度也大大低于 PCR。对于某些病毒的检测，如 PLRV，由于 PLRV 局限于寄主的韧皮部中且浓度极低，应用 ELISA 不足以用来对其进行可靠的病毒诊断、病毒流行或病毒与寄主和蚜虫相互关系的研究。近年来随着现代分子生物学技术的发展，聚合酶链式反应已在植物病毒的检测上得到了迅速的推广应用，采用 PCR 法可检测出植物组织中含量极低的病毒 RNA，灵敏度高，特异性强，随着目前面市的自动 PCR 仪的推广，在不久的将来 PCR 将成为植物有害生物定量检测的首选技术。

3.2 RT-PCR 的影响因素

典型的 RT-PCR 方法包括引物的设计与合成、反向转录合成 cDNA、PCR 反应混合液的配制、靶核酸扩增、DNA 条带检测。RT-PCR 除了受提取的核酸质量影响外，还受到提取物中多酚和多糖的抑制^[12]。研究表明，稀释核酸的浓度、改变核酸抽提方案 (用异丙醇沉淀 RNA) 在 RT 阶段加入

PBS-Tween 20 可以消除抑制物质的影响^[13]。也有实验表明，在提取缓冲液中加入柠檬酸可以去除大部分多酚，包括马铃薯病毒提取液中的氯原酸^[14]。另外一个影响 PVY 检测灵敏度的因素是扩增片段的大小，从 PVY⁰ 的 3 端编码序列，可以得到 1040、690、412、217 bp 的扩增产物，从 PVY⁰ 的 3 端编码序列，则可以得到 1016、704、388、249 bp 的扩增产物，这表明设计的引物不同其检测灵敏度也有所不同^[15]。1016 bp 和 1040 bp 的引物可以检测到 1~10 pg PVY⁰ RNA，用扩增片段为 217 和 249 bp 的引物则可以检测到 1 fg RNA，在灵敏度上增加了 103 倍。这说明扩增片段较小，灵敏度会较高^[11]。

3.3 检测蚜虫体内的 PVY 和 PLRV 病毒

两种最普遍病毒 (PLRV 和 PVY) 都是通过蚜虫传播的。蚜虫从感染 PLRV 的植物上获毒后 (几分钟到几个小时)，便可终生带毒。Smith (1993) 和 Hadid (1993) 用 NASH 和 RT-PCR 方法检测了 5~10 头蚜虫携带的 PLRV^[16]。实验表明，用 RT-PCR 方法，在带有马铃薯 PLRV 病毒的植物上取食 5 min 的蚜虫，有 13% 能检测出带有 PLRV 病毒；长期取食带 PLRV 植物的蚜虫，有 90% 能检测出 PLRV 病毒。Singh 用 RT-PCR 方法检测出和与 29 只不带毒的蚜虫混在一起的单只带毒蚜虫，并可以从采集到的新鲜蚜虫、冰冻 (-70°C) 存储的蚜虫或室温存储在 70% 酒精中长达 6 年的蚜虫体内检出病毒。这些蚜虫包括 *M. persicae* (桃蚜)，鼠李蚜 (*Aphis nasturtii*) 和马铃薯 (*Macrosiphum euphorbiae*) 蚜虫。与 PLRV 相比，蚜虫对于 PVY 是非持久传毒的，通过 RT-PCR 方法表明，在控制条件下，40% 的桃蚜和 15% 的鼠李蚜带 PVY 后，可以检测出来。在采集到的新鲜蚜虫或在 70% 酒精中储存 45 天的蚜虫里也可以检测到 PVY 病毒^[17]。

3.4 RT-PCR 的发展方向

利用 RT-PCR 检测马铃薯病毒、类病毒研究进展很快。近年来，由一次只能检测一种病毒的单一 RT-PCR 发展到可以同步检测两种至多种病毒的单重、双重，甚至多重 RT-PCR，而且在试验条件的优化方面也做了很大的改进。我国李浩戈等用 RT-PCR 检测了马铃薯 Y 病毒^[18]；吴志明等用 RT-PCR 检测法快速检测了马铃薯卷叶病

毒^[19], 他们都是采用的单一 RT-PCR 法, 随着 RT-PCR 技术的发展, 后来又发展了双重、多重 PCR, 这样就可以同时检测多种马铃薯病毒和类病毒, 从而节约了时间、资金, 并提高了检测速度和灵敏度。Nie 用寡核苷酸 (dt) 作为公共引物, 同步检测了多种马铃薯病毒^[21]; 在实验条件的优化方面, 由经典的双酶两步 RT-PCR (不连续), 即在试验中, 反转录 (RT) 和 PCR 反应分为两步完成, 先反转录合成 cDNA, 再用部分单链 cDNA 作模板进行 PCR 扩增, 向单酶一步 RT-PCR (连续) 发展。一步 RT-PCR 将彼此分离的 RT 和 PCR 两个步骤合二为一, 整个反应过程在一个 PCR 管中进行。但需要对检测样品进行适当的处理以去除不同样品中可能带有的抑制物。Mallet 等 (1995) 就采用 AMV-RT 和 Taq DNA 聚合酶将一步 RT-PCR 和两步 RT-PCR 作了比较, 一步 RT-PCR 排除了在将 cDNA 转至 PCR 反应混合体系过程中可能出现的交叉污染和体积变化。简化的一步法还避免了逆转录酶反应结束阶段的变性过程中可能出现的 cDNA 蒸发。现在, 马铃薯病毒、类病毒 RT-PCR 检测正在朝这方面发展, 从而为高通量、多靶标马铃薯病毒检测试剂盒的研制奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 刘永全. 马铃薯病毒检测及其抗病毒基因工程研究进展 [J]. 生物学通讯, 2001, 1: 12—14.
- [2] 周艳玲, 刘学敏, 孟玉芹. 马铃薯 Y 病毒的检测技术 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14 (2): 89—93.
- [3] 刘卫平. 快速 ELISA 法鉴定马铃薯病毒 [J]. 马铃薯杂志, 1997, 11 (1): 11—13.
- [4] 白艳菊, 李学湛等. 应用 DAS-ELISA 法同时检测多种马铃薯病毒 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14 (3): 143—145.
- [5] 张国柱. 马铃薯病毒检测技术中 NCM-ELISA 的应用 [J]. 山西农业大学, 1991, 4: 25—27.
- [6] 孟清, 张鹤龄, 宋伯符. 应用 Dot-ELISA 检测 PVX、PVY 和 PVS [J]. 中国病毒学, 1993, 4: 366—370.
- [7] Audy P, Parent J, and Asselin A. A note on four nonradioactive labelling systems for dot hybridization detection of potato viruses. Phytoprotection, 1991, 72: 81—86.
- [8] 崔荣昌, 李芝芳, 李晓龙等. 马铃薯块茎类病毒的检测和防治 [J]. 植物保护学报, 1992, 3: 263—269.
- [9] 李学湛, 吕典秋等. 应用 NASH 方法检测马铃薯类病毒 (PSTVd) [J]. 中国马铃薯, 2001, 2: 87—89.
- [10] Dhar A K and Singh R P. Improvement in the sensitivity of PVYN detection by increasing the cDNA probe size. J Virol Methods, 1994, 50: 197—210.
- [11] Rudra P Singh. Development of the molecular methods for potato virus and viroid detection and prevention. Genome Vol, 1999, 42: 592—603.
- [12] De Boer S H, Ward L J, Li X, and Chittaranjan S. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTO. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 2567—2568.
- [13] Barbara D J, Morton A, Spence N J, and Miller A. Rapid differentiation of closely related isolates of two plant viruses by polymerase chain reaction fragment length polymorphism analysis. J Virol Methods, 1995, 55: 121—131.
- [14] Singh R P. Potato virus Y detection: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. Can J Plant Pathol, 1997, 19: 149—155.
- [15] Singh M and Singh R P. Potato virus Y detection: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. Can J Plant Pathol, 1997, 19: 149—155.
- [16] Singh R P, Kurz J, Boiteau G, and Berbard G. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. J Virol Methods, 1995, 55: 133—143.
- [17] Singh R P, Kurz J, and Bioteau G. Detection of stemborne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. J Virol Methods, 1996, 59: 189—196.
- [18] 李浩戈, 吴远华, 赵秀香. 马铃薯 Y 病毒的 RT-PCR 检测 [J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 3: 244—246.
- [19] 吴志明, 朱水芳, 张成良等. 应用 RT-PCR 法快速检测马铃薯卷叶病毒 [J]. 河北农业大学学报, 2000, 4: 77—79.
- [20] Singh R P, Nie X, and Singh M. Duplex RT-PCR: reagent concentrations at reverse transcription stage affect the PCR performance. Journal of Virological methods, 2000, 86: 121—129.
- [21] Nie X and Singh R P. Detection of multiple potato viruses using an oligo (dt) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. J Virol Method, 2000, 86 (2): 79—85.
- [22] Mallet G Oriol, C Mary, et al. Continuous RT-PCR using AMV-RT and Taq DNA polymerase characterization and comparison to uncoupled procedures. Biotechniques, 1995, Vol18, No4.