

应用 IC-RT-PCR 方法检测水仙中百合斑驳病毒

贾丽霞¹, 李志勇², 马继芳²

(1. 河北工程大学, 河北 邯郸 056038 2. 河北省农林科学院 谷子研究所, 河北 石家庄 050031)

摘要:水仙病毒严重影响水仙的品质与规模化生产,而快速检测水仙病毒可以有效防控其危害与扩散。根据已报道的百合斑驳病毒外壳蛋白基因序列设计 PCR 引物,利用免疫捕获 PCR 检测了水仙样品中百合斑驳病毒。PCR 扩增产物回收后克隆到 PMD19-T 载体中测序。把克隆得到的百合斑驳病毒外壳蛋白基因部分序列提交到 Genbank 中。结果表明:基因登录号为 JF714974 克隆的百合斑驳病毒外壳蛋白基因部分序列与国内外百合斑驳病毒同源性为 90.4%~99.5%。建立了水仙中百合斑驳病毒的 IC-RT-PCR 的检测方法,简化了试验步骤,适合于水仙中百合斑驳病毒的快速检测。

关键词:水仙病毒病;免疫捕获 PCR;百合斑驳病毒;序列分析
中图分类号:S 432.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2011)14—0123—03

水仙为我国传统的名花之一,由于其利用鳞茎进行无性繁殖,病毒易于积累与传播,进而病毒病日趋严重,水仙病毒病的发生严重影响其观赏价值及种植。已报道有 20 多种病毒可以侵染水仙,国内先后报道有水仙普通潜隐病毒(NCLV)、水仙退化病毒(NDV)、水仙斑驳相关病毒(NMaV)、水仙白条相关病毒(NWSaV)、水仙花叶病毒(NMV)、虎眼万年青花叶病毒(OrMV)、南芥菜花叶病毒(ArMV)、百合斑驳病毒(LMoV)等^[1-5]。百合斑驳病毒为马铃薯 Y 病毒属的病毒,通过蚜虫或机械摩擦传毒,造成百合鳞茎退化^[6]。刘博等利用 RT-PCR 首次在喇叭水仙(*Narcissus pseudonarcissus*)上检测到百合斑驳病毒,并通过测序进一步确定该病毒^[7]。近年来,随着邯郸水仙新品种不断引进与种植,水仙病毒病对邯郸水仙的种植业危害越发严重。水仙病毒检测的常用方法为酶联免疫、RT-PCR、电镜观测等方法。而未见免疫捕获 PCR 法。鉴此,建立了免疫捕获 PCR 快速检测体系,从中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)上检测到百合斑驳病毒,由于该病毒报道较少,应加强检测与防控。该检测方法的建立为水仙引种和脱毒种苗的生产提供技术支持。

第一作者简介:贾丽霞(1976-),女,河北行唐人,硕士,讲师,现主要从事园林植物教学与研究工作。E-mail: jialixiale@163.com。
基金项目:国家“863”计划资助项目(2008AA100905-21);河北邯郸市科技局基金资助项目(0923130070-3)。
收稿日期:2011-04-11

1 材料与方法

1.1 试验材料

TaKaRa One Step RNA PCR Kit(DRR024A)、Taq 酶、Pmd19-T 载体(大连宝生物公司)、LMoV 多克隆抗体(Agdia 公司),引物的合成与测序由大连宝生物公司完成,感病水仙采集于邯郸市商贸城花卉市场。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计合成 根据百合斑驳病毒 CP 基因的保守序列,通过在线 Primer 3.0 软件设计合成 1 对引物,引物序列如下:

LoMV-CP1: 5' ATGGCTCTCGCAATGAACGG 3';
LoMV-CP2: 5' CTGTATGCCTCTCC GTGTCC3'。

1.2.2 IC-RT-PCR 扩增外壳蛋白基因 百合斑驳病毒多克隆抗体经包被缓冲液(Na_2CO_3 1.59 g、 NaHCO_3 2.93 g、 Na_2SO_4 0.2 g 溶于蒸馏水,调 pH 至 9.6)稀释 200 倍后,取 50 μL 稀释抗体 4℃ 孵育过夜,倒掉包被液,用 PBST 洗 3 次后,加入 50 μL 水仙病叶研磨液,37℃ 孵育 2 h,用 PBST 洗 3 次,ddH₂O 洗 1 次,洗毕离心后吸去残余液后即可进行后续反转录,在 PCR 管中加入下列试剂,10× RNA PCR Buffer 5 μL , MgCl_2 10 μL (25 mmol/L), dNTP mixture 5 μL (10 mmol/L), Rnase Inhibitor 1 μL (40 U/ μL), AMV RTase XL 1 μL (5 U/ μL), AMV Optimized Taq 1 μL (5 U/ μL), 上游特异性引物 LoMV-CP1 (20 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 下游特异性引物 LoMV-CP2 (20 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Rnase Free H₂O 25 μL 。利用一步法扩增: RT 反应如下 50℃ 30 min; 然后 94℃ 变性 2 min; PCR 扩增如下 94℃ 变性 30 s 56℃ 退火 30 s 72℃ 延伸 1 min 35 个循环后,再充分延伸 10 min。

10 μ L PCR 产物 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 经 EB 染色后回收目的条带, 回收产物与 Pmd19-T 载体连接过夜后热激转入大肠杆菌 JM109 中, 经 PCR 鉴定为阳性克隆后邮寄到大连宝生物公司进行测序。

1.2.3 序列分析 通过 DNAMAN 5.0 软件分析百合斑驳病毒邯郸分离物外壳蛋白基因与已报道的百合斑驳病毒核苷酸的相似性, 并利用 DNAMAN 5.0 软件以邻接法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 IC-RT-PCR 扩增结果

1.2% 琼脂糖凝胶电泳后检查 PCR 扩增产物, 叶片症状表现为斑驳的 (图 1) 水仙分离物用百合斑驳病毒特异引物可以扩增出约 450 bp 预期目的条带 (图 2), 未发现非特异性扩增, 而健康的水仙用该引物扩增不出任何条带, 表明该引物特异性好, IC-RT-PCR 检测体系可以用来检测水仙中百合斑驳病毒。

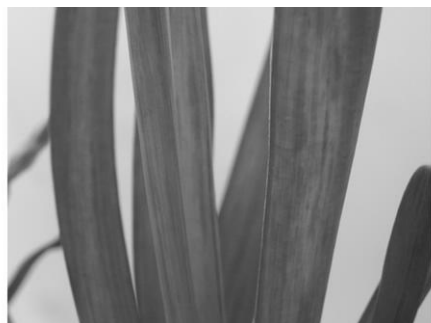


图 1 LMov 侵染水仙后症状

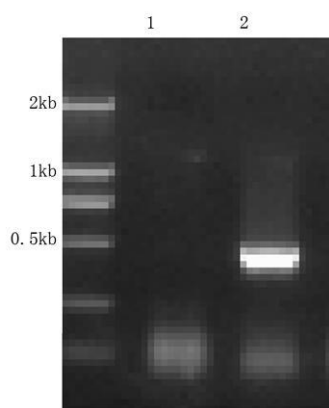


图 2 IC-RT-PCR 检测 LMov
注: 1. 健康对照 2. 邯郸病样。

2.2 CP 基因序列分析

利用 NCBI 中在线 BLASTN 软件分析邯郸分离物与 GenBank 中已知百合斑驳病毒进行同源性分析, 为 99.5% (AJ748256), 与百合斑驳病毒新西兰、俄罗斯、韩国、日本和中国分离物外壳蛋白基因同源性为 99.3% (FJ618539、EU348827、GQ150684、AB053256、

EU167936), 与其它百合斑驳病毒同源性在 90.4% ~ 96.7%。因此, 推测该序列为百合斑驳病毒外壳蛋白基因。将该序列提交到 GenBank, 获得的基因登陆号为 (JF714974)。

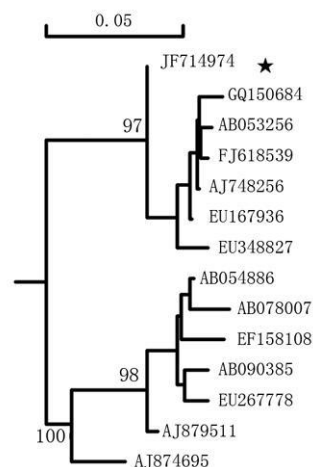


图 3 百合斑驳病毒主要分离物
外壳蛋白基因序列进化树

注: JF714974 为百合斑驳病毒邯郸分离物; GQ150684 和 EU267778 为百合斑驳病毒韩国分离物; AB054886 和 AB053256 为百合斑驳病毒日本分离物; EU167936、AJ748256、EF158108 和 AJ874695 为百合斑驳病毒中国分离物; AJ879511 为百合斑驳病毒印度分离物; FJ618539 为百合斑驳病毒新西兰分离物; EU348827 为百合斑驳病毒俄罗斯分离物; AB090385 和 AB078007 为郁金香带状碎色病毒日本分离物。

用 DNAMAN 5.0 软件对百合斑驳病毒邯郸分离物和各百合斑驳病毒分离物进行外壳蛋白基因核苷酸序列同源性分析, 从图 3 可看出, 百合斑驳病毒各分离物根据外壳蛋白基因可以聚为 2 类, 各个分离物同源性高低与病毒地理来源无关, 如中国的 5 个分离物分别聚在 2 个不同的分支内。邯郸分离物与来自新西兰、俄罗斯、韩国、日本和中国的 6 个分离物同源性最近 (AJ748256、FJ618539、EU348827、GQ150684、AB053256、EU167936)。

3 结论与讨论

近年来, 国内用来检测植物病毒主要方法为血清学方法、RT-PCR、电镜观测等方法^[7]。血清学方法由于检测灵敏度不高, 不适合病毒含量低的组培苗检测。而 RT-PCR 虽然检测灵敏度比血清学方法高, 但容易出现假阳性。而免疫捕获 PCR 具有该 2 种方法的优点, 利用抗体特异结合病毒, 并通过 PCR 扩增提高灵敏度。水仙、百合、郁金香等球茎类花卉种球富含多酚和多糖, 提取的 RNA 中残留多酚和多糖抑制了后续的 RT-PCR 反应^[8], 而免疫捕获 PCR 因为不用提取 RNA, 并且简化了操作步骤, 可以不受多酚和多糖影

响, 非常适合于水仙、百合、郁金香种球的百合斑驳病毒批量检测。IC-RT-PCR 唯一不足是不适合于不易制备血清的病毒的检测^[9]。

由于 PCR 扩增具有假阳性, 仅仅通过电泳后检测还不可以最终进行病毒鉴定。而通过测序可以准确确定病毒分离物^[10]。该研究所克隆的百合斑驳病毒与与国内外百合斑驳病毒同源性的 90.4%~99.5%。根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 规定, 马铃薯 Y 病毒属不同成员外壳蛋白同源性低于 85%, 而邯郸分离物外壳蛋白基因与百合斑驳病毒的同源性远高于 85%, 因而此分离物为百合斑驳病毒。百合斑驳病毒主要通过鳞茎无性繁殖、汁液摩擦及蚜虫传播, 远距离传播的途径是国内外引种, 而该病毒国内外报道较少, 因此病毒的准确快速诊断可以防止该病毒进一步传播危害, 并可用于检测脱毒苗的脱毒效果。

参考文献

[1] Chen J, Chen J P, Langeveld, et al. Molecular characterization of carla and potyviruses from Narcissus in China[J]. Phytopathology, 2003, 151: 26-29.

[2] 梁艳, 宋荣浩, 杨翠云, 等. 上海崇明水仙病毒病原种类鉴定[J]. 植物病理学报, 2008, 38(5): 456-461.

[3] 郑红英, 鲁宇文, 沈嘉乐, 等. 侵染水仙的虎眼万年青花叶病毒外壳蛋白的原核表达、抗血清制备及应用[J]. 浙江农业学报, 2009, 21(3): 198-201.

[4] 于翠, 杨翠云, 杨艳, 等. 从进境水仙上检测出南芥菜花叶病毒[J]. 植物检疫, 2005, 19(6): 359-361.

[5] 刘博, 明军, 刘春, 等. 喇叭水仙中百合斑驳病毒的 RT-PCR 检测及序列分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(12): 1843-1848.

[6] 王仙芝, 张延龙, 牛立新, 等. 秦巴山区六种野生百合感染 3 种病毒病鉴定及其田间抗病性初步评价[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3618-3625.

[7] 尚海丽, 周雪平, 吴建祥. 免疫斑点法和免疫捕获 RT-PCR 检测黄瓜绿斑驳花叶病毒[J]. 浙江大学学报, 2010, 36(5): 485-490.

[8] 杜运鹏, 李双, 何恒斌, 等. 百合鳞片总 RNA 提取方法的比较[J]. 分子植物育种, 2010, 8(4): 832-836.

[9] 施曼玲, 周雪平. 浙江宁波雪里蕻花叶病原鉴定及雪里蕻品种的抗病性测定[J]. 植物病理学报, 2006, 36(5): 413-419.

[10] Wang X, Liu F, Zhou G, et al. Detection and molecular characterization of pepper mild mottle virus in China[J]. J. Phytopathology, 2006, 154: 755-757.

Detection of Lily Mottle Virus in Narcissus by the Method of IC-RT-PCR

JIA Li-xia¹, LI Zhi-yong², MA Ji-fang²

(1. Hebei University of Engineering Handan, Hebei 056021; 2. Millet institute of Agricultural Academy of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050031)

Abstract: The virus on narcissus affect the quality and growth of narcissus at large scale. The quick detection and identification of narcissus virus is important for control of the disease. According to reported lily mottle virus(LMoV) coat protein sequence, a pairs of primer was desingned and IC-RT-PCR was carried out. The sample collected from Handan were detected with the primer. IC-RT-PCR products were purified and ligated into PMD19-T vector. The partial coat protein gene sequence was submitted to Genbank. The results showed that the accession number was JF714974. The gene alignment analysis showed handan isolate shared 90.4%~99.5% homology with coat protein gene of other lily mottle virus isolate. The study constructed the platform of detection of lily mottle virus by IC-RT-PCR which simplified procedure and it was convenient for quickly detection of LMoV in narcissus.

Key words: narcissus virus disease; IC-RT-PCR ; lily mottle virus; sequence analysis