

# 黄瓜绿斑驳花叶病毒核酸试纸条检测技术的建立

霍亚云<sup>1,2</sup>, 张永江<sup>2</sup>, 李为民<sup>1</sup>, 朱罗罗<sup>3</sup>, 胡林<sup>3</sup>, 尤其敏<sup>3</sup>

(1. 中国农业科学院 生物技术研究所, 北京 100081; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176;

3. 杭州优思达生物技术有限公司, 浙江 杭州 310012)

**摘要:**以黄瓜绿斑驳花叶病毒(cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)阳性样品为研究对象, 根据其外壳蛋白基因设计 3 条引物和 2 条探针, 探针 5' 端分别用生物素和荧光进行标记; 利用这套引物和探针在 59 °C 进行 RT-PCR 恒温扩增 90 min, 扩增产物用核酸试纸条进行检测。用其它 5 种同样侵染葫芦科作物的植物病毒作为对照进行试验, 以期确定试纸条检测方法的特异性。将梯度稀释后的总 RNA 作为模板进行检测, 以确定该方法的灵敏度。结果表明: 该试验建立的核酸试纸条检测方法对 CGMMV 具有特异性, 能够有效区分 CGMMV 及同样侵染葫芦科作物的黄瓜花叶病毒(CMV)、辣椒轻斑驳病毒(PMMoV)、烟草花叶病毒(TMV)、番茄花叶病毒(ToMV)和小西葫芦黄花叶病毒(ZYMV); 同时该方法也具有较高的灵敏度, 可检测低至 24.300 ng · μL<sup>-1</sup> 的总 RNA。因此该试验建立的核酸试纸条法可用于 CGMMV 的快速检测。

**关键词:** 黄瓜绿斑驳花叶病毒; 核酸试纸条; 检测

**中图分类号:** S 431.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2017)10-0100-04

黄瓜绿斑驳花叶病毒(cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)是我国进境植物检疫性有害生物, 为芜菁花叶病毒科(Tymoviridae)烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)植物病毒。该病毒可侵染黄瓜、甜瓜等多种葫芦科作物, 造成作物品质下降和产量降低。近年来随着进口瓜类种子传入我国, 使得多地区葫芦科作物损失惨重<sup>[1]</sup>。目前对该病毒的检测方法主要有酶联免疫吸附法(ELISA)和 RT-PCR 法<sup>[2]</sup>, 这些检测方法过程繁琐, 需要 PCR 仪等精密仪器, 基层单位较难满足这些检测方法开展的条件。

试纸条是根据抗原和抗体或者目标 DNA 分子与探针特异性结合的原理制成<sup>[3]</sup>, 用于检测 PCR 扩增产物中是否含有目标核酸片段。试纸条检测技术能在较短时间内实现检测结果的可视化, 目前已经

成功的在食品和医学等多领域的临床实践中使用, 效果十分良好。核酸试纸条检测技术是一种利用多条引物恒温扩增目标核酸片段后对扩增产物进行检测的方法<sup>[4]</sup>, 目前已经运用于检测志贺氏菌<sup>[5]</sup>和结核分枝杆菌<sup>[6]</sup>等生物医学和食品卫生领域。

现以黄瓜绿斑驳花叶病毒为研究对象, 结合恒温扩增技术, 利用内含核酸试纸条的全封闭式靶核酸快速检测装置<sup>[7]</sup>, 建立了核酸试纸条检测法。该方法不需要 PCR 仪等精密仪器, 操作过程简单, 不需要特殊培训的工作人员, 适用于设备简单的基层检疫部门。该方法的建立对于及时发现黄瓜绿斑驳花叶病毒、保护农业生产具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试黄瓜绿斑驳花叶病毒(cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)、辣椒轻斑驳病毒(pepper mild mottle virus, PMMoV)、烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、番茄花叶病毒(tomato mosaic virus, ToMV)和小西葫芦黄花叶病毒(zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), 均由中国检验检疫科学研究院保存。

**第一作者简介:** 霍亚云(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: huoyayuns@163.com

**责任作者:** 张永江(1977-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事植物检疫等研究工作。E-mail: zhangyjpvi@yeah.net

**基金项目:** 国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2015BAD08B01); 国家“十三五”重点研发计划资助项目(2016YFF0203203)。

**收稿日期:** 2016-12-15

引物和探针:利用 GenBank 中 CGMMV 外壳蛋白基因序列设计 3 条特异性引物和 2 条特异性探针,引物和探针由上海辉睿生物科技有限公司合成,使用时用  $1\times\text{TE}$  缓冲液溶解到所需浓度。引物和探针序列如表 1 所示。

生化试剂: $10\times\text{Thermopol buffer}$ 、 $\text{Bst } 1.0$  ( $8\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) DNA 聚合酶、 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgSO}_4$  购自纽英伦生物技术有限公司, $1\times\text{TE}$  缓冲液、 $\text{dNTP Mix}$  为生工生物工程有限公司产品、 $\text{AMV}$  反转录酶为 Promega 公司产品。

供试仪器:金属浴购自 Ginkgo Science 公司,一次性核酸检测装置购自杭州优思达生物技术有限公司。

表 1 CGMMV 扩增引物和探针序列

Table 1 Primers and probes sequences for detection of CGMMV

名称 Name	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
CGMMV-BF	5'-CCTCAACGGTCTGTGTG-3'
CGMMV-MBF	5'-Biotin-GGCCTATCTTCGTTTCGCT-3'
CGMMV-DF	5'-FAM-CTTAGCTCCACGGATACGC-3'
CGMMV-CPR	5'-AACCTCAATGACCCATATAGCGCCATCTTUGTTTGCT-3'
CGMMV-BR	5'-GTGGGATTGCTAGGATCTA-3'

## 1.2 试验方法

1.2.1 核酸提取 使用 RNA 试剂盒提取病毒材料总 RNA(天根生化科技有限公司)。利用 RT-PCR 和凝胶电泳验证所用病毒是否正确。

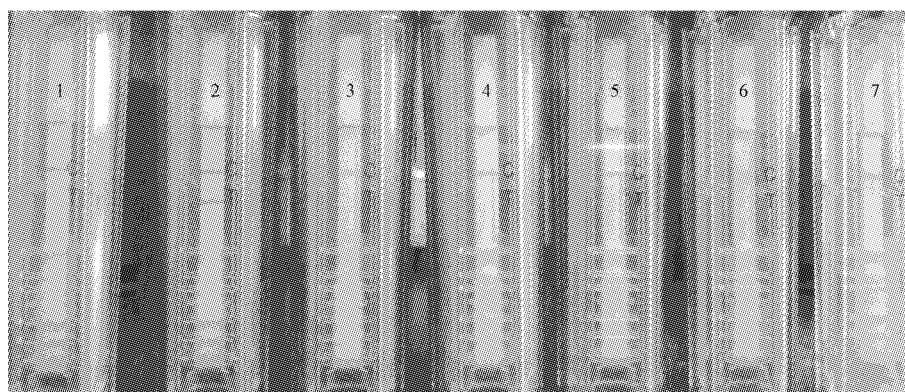
1.2.2 恒温扩增反应  $20\mu\text{L}$  的反应体系中包含: $1.5\mu\text{L}$  交叉引物 PSPL-CPR ( $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $0.9\mu\text{L}$  正向检测探针 CGMMV-MBF( $5'$ 端生物素标记, $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $0.9\mu\text{L}$  正向检测探针 PSPL-DF ( $5'$ 端 FAM 标记  $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、各  $0.3\mu\text{L}$  的 2 条置换引物 CGMMV-BF( $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和 CGMMV-BR ( $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $0.8\mu\text{L}$   $\text{dNTP}$  ( $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $0.4\mu\text{L}$   $\text{MgSO}_4$  ( $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $1\mu\text{L}$   $\text{Bst DNA}$  聚合酶( $8\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )、 $1\mu\text{L}$   $\text{AMV}$  反转录酶( $10\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )、以及  $1\mu\text{L}$  的 RNA,余量为无菌水。恒温扩增程序: $59^\circ\text{C}$ ,恒温扩增  $90\text{ min}$ 。

1.2.3 扩增产物检测 恒温扩增产物在未打开 PCR 管情况下放入一次性核酸检测装置,静置  $3\sim 5\text{ min}$  观察检测结果。试纸条有 2 条线则说明检测结果为阳性,试纸条上只有质控线(C)而无检测线(T),则说明检测结果为阴性。

## 2 结果与分析

### 2.1 核酸试纸条检测法特异性试验

该试验建立的黄瓜绿斑驳花叶病毒核酸试纸条检测法具有较好的特异性,结果表明该检测方法在检测 CGMMV 时结果呈阳性,5 种对照病毒 CMV、PMMoV、TMV、ToMV 和 ZYMV 的检测结果均为阴性。检测结果如图 1 所示。



注:1.空白对照;2.黄瓜绿斑驳花叶病毒;3.黄瓜花叶病毒;4.辣椒轻斑驳病毒;5.烟草花叶病毒;6.番茄花叶病毒;7.小西葫芦黄花叶病毒。

Note:1. Blank control;2. Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV);3. Cucumber Mosaic virus (CMV);4. Pepper mild mottle virus (PMMoV);5. Tobacco Mosaic virus (TMV);6. Tomato Mosaic virus (ToMV);7. Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV).

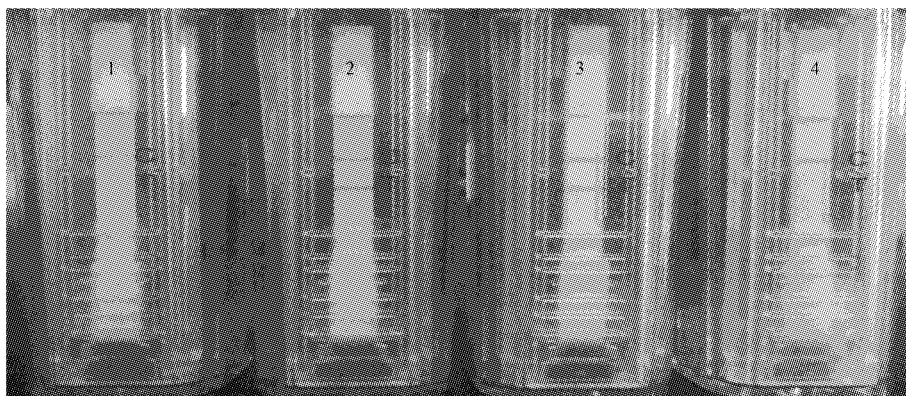
图 1 黄瓜绿斑驳花叶病毒试纸条检测法特异性结果

Fig. 1 Specificity of detecting cucumber green mottle mosaic virus by nucleic acid strip

### 2.2 核酸试纸条检测法灵敏度试验

用无菌水将黄瓜绿斑驳花叶病毒的总 RNA 提取液进行 10 倍梯度稀释,分别得总浓度为  $243.000$ 、 $24.300$ 、 $2.430\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  的 RNA 提取液。以各稀

释液为模板(用  $1\mu\text{L}$  无菌水作为空白对照)进行扩增后检测,由图 2 可知,RNA 浓度为  $24.300\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  以上的溶液检测结果为阳性。



注:1. 空白对照;2.  $243.000 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ;3.  $24.300 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ;4.  $2.430 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。  
Note:1. Blank control;2.  $243.000 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ;3.  $24.300 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ;4.  $2.430 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

图2 核酸试纸条法检测黄瓜绿斑驳花叶病毒灵敏度结果

Fig. 2 The sensitivity of detection cucumber green mottle mosaic virus by nucleic acid strip

### 3 讨论

试验结果显示黄瓜绿斑驳花叶病毒检测结果为阳性,而5种常见对照植物病毒检测结果为阴性,说明设计的3条引物和2条探针具有良好的序列特异性,可以用于CGMMV核酸试纸条检测方法的建立。浓度为 $24.300 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以上的RNA溶液检测结果为阳性,表明该试验所建立的核酸试纸条法具有较高的灵敏度,对于黄瓜绿斑驳花叶病毒的早期防治具有重要意义。该研究建立的核酸试纸条检测方法所需设备简单,利用金属浴和核酸检测装置即可完成黄瓜绿斑驳花叶病毒检测;同时使用含有核酸试纸条的一次性密封核酸检测装置能避免交叉污染,有效防止检测过程中假阳性现象的出现;而且按照体系配方加样后放入 $59^\circ\text{C}$ 恒温装置中使目标片段进行扩增,扩增产物放入一次性核酸检测装置中进行结果判读,经过以上2步就可以实现检测结果的可视化,不需要经过专业培训的技术人员;这些特点对于基层检验检疫部门具有重要应用价值。总之,

该方法具有良好的特异性,较高的灵敏度且操作简便性,适用于基层口岸的检疫工作。

### 参考文献

- [1] 曹冬梅,李鑫,孙晓非,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒荧光纳米颗粒试纸条的研制[J]. 江苏农业科学,2015(9):152-154.
- [2] 罗梅,王琳,宾淑英,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒检测技术的研究进展[J]. 华中农业大学学报,2010,29(3):392-396.
- [3] BAHADR E B, SEZGINTÜRK M K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels[J]. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2016, 82:286-306.
- [4] XU G, HU L, ZHONG H, et al. Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification[J]. Scientific Reports, 2012, 2(2):57.
- [5] 祁军,张霞,蒋刚强,等. 交叉引物等温扩增技术检测志贺氏菌[J]. 食品研究与开发,2013(11):67-70.
- [6] FANG R, LI X, HU L, et al. Cross-priming amplification for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(3):845-847.
- [7] 尤其敏. 一种核酸薄膜层析快速检测方法及其试纸条及其用途:2006100034291[P]. 2006-02-08.

## Development of Nucleic Acid Test Strip for Detection of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus

HUO Yayun<sup>1,2</sup>, ZHANG Yongjiang<sup>2</sup>, LI Weimin<sup>1</sup>, ZHU Luoluo<sup>3</sup>, HU Lin<sup>3</sup>, YOU Qimin<sup>3</sup>

(1. Institute of Biotechnology Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176; 3. Ustar Biotechnologies (Hangzhou) Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310012)

**Abstract:** Positive sample of CGMMV was used as research object. Three primers and two probes were designed according to the coat protein of CGMMV and probes were labeled with Biotin and FAM at 5' terminus separately. The nucleic acid strip was used to show the detection result after isothermal RT-PCR at the

# 宁夏枸杞内生真菌的分离及多样性分析

徐全智, 孙牧笛, 李 帆, 高 媛, 顾沛雯

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

**摘 要:**以枸杞为试材,采用组织分离法从不同品种、不同部位的枸杞组织中进行内生真菌的分离,根据培养性状、菌落、孢子等的形态特征和 rDNA-ITS 序列分析对分离菌株进行鉴定;根据枸杞内生真菌的相对频率、物种多样性指数、丰富度指数和相似性系数分析其组成特点。结果表明:21 份枸杞样品中共分离得到 363 株内生真菌,这些菌株分属于链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)、双极霉属(*Bipolaris*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)、枝孢属(*Cladosporium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、青霉菌属(*Penicillium*)、光黑壳属(*Preussia*)、裂壳菌属(*Schizothecium*)、粪壳菌属(*Sordaria*)、戴氏霉属(*Taifanglania*)、梭孢壳属(*Thielavia*)、火丝菌属(*Tricharina*)和炭角菌属(*Xylaria*)14 个属,其中链格孢属(*Alternaria*)、梭孢壳属(*Thielavia*)和曲霉属(*Aspergillus*)为优势属,分别占分离菌数的 46%、14%和 13%。枸杞植株各器官都有内生真菌分布,其中,茎部内生真菌多样性指数最大,为 0.86,且果与茎部的相似性系数最大。不同枸杞品种间内生真菌分布存在差异,“宁杞 1 号”“宁杞 2 号”内生真菌多样性指数和丰富度指数远远高于黄果枸杞和黑果枸杞。内生真菌群落组成的相似性结果表明,部分内生真菌具有一定的宿主和组织偏好性。枸杞体内含有丰富的内生真菌资源,其内生真菌具有很高的宿主特异性,而且其分布受生境影响。

**关键词:**枸杞;内生真菌;多样性;rDNA-ITS

**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)10-0103-07

1993 年,STIERLE 等<sup>[1]</sup>首次报道了从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)的树皮中分离出一株内生真菌(*Taxomyces andreanae*)能产生紫杉醇(taxol),使人们对植物内生真菌有了更深刻的了解,掀起了从

植物内生真菌中寻找新物质的热潮。短短十几年来,一批新的抗肿瘤、抗菌、抗虫等生物活性物质先后从内生真菌中分离出来。药用植物内生真菌成为医药、环境和农业等领域的天然资源菌,具有广阔的理论研究价值和开发应用前景。

植物内生真菌在植物组织中普遍存在,具有丰富的物种多样性,其多样性受多种因素的影响。不同的区域或位点、气候条件、植被等均可影响内生真菌类群的多样性。内生真菌与宿主植物在长期的生态系统演化过程中形成了互惠共生关系,可促进植物生长、增强抗病能力、提高抗逆性等,因此内生真菌在植物演替过程中具有重要的生态学意义<sup>[2]</sup>。

**第一作者简介:**徐全智(1991-),男,山东德州人,硕士研究生,研究方向为生物防治与菌物资源利用。E-mail:981472068@qq.com.

**责任作者:**顾沛雯(1969-),女,宁夏银川人,博士,教授,现主要从事植物病理学等研究工作。E-mail:gupeiwen2013@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31460484)。

**收稿日期:**2017-02-09

temperature of 59 °C for 90 minutes. The other five viruses that also infect cucurbitaceae crops were used to assay the specificity of this method. Diluted nucleic acid solution with certain concentration was used as template to confirm the sensitivity of this method. The results showed that nucleic acid strip was a special method to distinguish CGMMV from the other five plant virus which also infect cucurbitaceae crops, CMV, PMMoV, TMV, ToMV and ZYMV. And the sensibility of this method was 24.300 ng · μL<sup>-1</sup> of total RNA. Thus, nucleic acid strip was a rapid, special and sensitive detection method for CGMMV and can be used in routine testing.

**Keywords:** cucumber green mottle mosaic virus; nucleic acid test strip; detection