

# 菜豆荚斑驳病毒的 RT-PCR 检测<sup>\*</sup>

魏梅生<sup>1</sup> 相 宁<sup>1</sup> 张春泉<sup>2</sup> Said A. Ghabrial<sup>2</sup>

(1. 中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所, 北京 100029; 2. University of Kentucky)

**摘要** 菜豆荚斑驳病毒是对大豆经济具有重要影响的病毒。根据已报道的菜豆荚斑驳病毒外壳蛋白基因序列, 设计出一对特异性引物, 采用 RT-PCR 法, 可有效地扩增出 BPMV 不同亚组的 4 个分离物, 得到 650 bp 大小的 PCR 产物。这种方法能成功地检测出大豆病叶中的 BPMV, 结果和酶联检测是一致的, 而对大豆种皮中 BPMV 的检测效果不佳, 建议采用酶联的方法进行检测。

**关键词** 菜豆荚斑驳病毒; 聚合酶链式反应; 酶联免疫吸附测定

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2005)04-0317-03

菜豆荚斑驳病毒( *Bean pod mottle virus*, BPMV) 为豇豆花叶病毒科( *Comoviridae* ) 豇豆花叶病毒属( *Comovirus* ) 成员。其基因组为二分基因组, 由正义的单链 RNA1 和 RNA2 组成。二者分别包裹在直径为 28nm 的球状病毒粒体中。

1948 年 Zaumeyer 和 Thomas 在菜豆上首次报道了 BPMV。其自然寄主有大豆、豇豆、菜豆、*Desmodium paniculatum*。实验寄主有 20 属 25 种植物, 包括胡枝子属, 绦车轴草、*Stizolobium deeringianum* Bort. 等<sup>[2]</sup>。

BPMV 主要危害大豆的叶片和种子, 造成大豆产量下降和品质降低。BPMV 早期侵染大豆, 植株上部的幼叶出现黄绿色斑驳, 重型株系可引起叶片皱缩和畸形, 高温时症状消失。一般结荚期不易观察到症状。BPMV 还可引起一些大豆品种的顶端坏死。受 BPMV 侵害后, 大豆茎秆的成熟延缓, 形成“绿茎”症状, 叶片脱落后, 叶柄仍留在枝上。某些品种大豆的豆荚呈现斑驳症状。受侵大豆种子种皮可能会出现斑驳症状, 这种斑驳起源于种脐, 看似是从种脐部分流出来的, 故称作“种脐渗色”( *Bleeding-hilum* )。大豆种皮的斑驳, 严重影响大豆的品质, 降低了大豆的商用价值。

受 BPMV 侵染的大豆, 产量损失在 3% - 52.4%。BPMV 和大豆花叶病毒有着协同作用, 二者复合侵染大豆后, 产量损失可达 66%。BPMV 侵染的大豆植株, 也易受到拟茎点霉属( *Phomopsis* )

真菌的危害。拟茎点霉属真菌侵染大豆后, 大豆种子的品质会进一步降低。

BPMV 近距离田间扩散可由菜豆萤叶甲( *Cerotoma trifurcata* ) 等甲虫来完成, 这种传播途径进一步加剧了 BPMV 的危害。自然状况下 BPMV 有亚组的分化<sup>[1]</sup>, 其致病性存在差异。在美国, BPMV 已对大豆产业构成严重的威胁<sup>[3]</sup>。目前尚无抗 BPMV 的商用大豆品种可供利用。

BPMV 分布于美国<sup>[2]</sup> ( 阿肯色州, 北卡罗来纳州, 弗吉尼亚州, 肯塔基州, 密西西比州, 路易斯安那州, 衣阿华州, 伊利诺斯州, 印第安纳州, 堪萨斯州, 内布拉斯加州, 俄亥俄州, 南达科他州, 威斯康星州 )、加拿大<sup>[3]</sup>、巴西<sup>[4]</sup>、秘鲁<sup>[5]</sup>、厄瓜多尔<sup>[6]</sup> 等国。我国尚无该病毒危害的报道, 国内也未开展相应的研究。为保护我国大豆产业的安全, 需建立一套准确快速的检测方法。RT-PCR 技术具有快速、灵敏、特异性强的优点, 广泛应用于植物病毒的检测上。本文将报道 RT-PCR 检测方法的建立, 为 BPMV 的鉴定、检疫检测提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒原

4 个 BPMV 分离物由美国肯塔基大学植病系 S. A. Ghabrial 教授提供, 它们分别是分离物 Han

\* 收稿日期: 2005-03-15

项目来源: 本研究得到国家质量监督检验检疫总局的经费支持( 2002 IK015-01 ), 特此致谢。

作者简介: 魏梅生( 1965- ), 男, 副研究员, 从事植物病毒病害的检疫检测研究。E-mail: wmsh02@yahoo.com.cn

(Kentucky)、Hop(Kentucky)、G7(Kentucky)、CB1(Illinois)。毒原接种在大豆“Essex”品种上。

## 1.2 酶联免疫吸附测定

采用双抗体夹心法检测大豆的病叶和种子。IgG 为抗 BPMV - Han 分离物的免抗体, 标记所用的酶为碱性磷酸酯酶。

大豆病叶按 1: 10(W/V) 稀释。病种子在蒸馏水中 30℃ 浸泡 1h, 用镊子将种皮和种胚剥离开进行检测。

## 1.3 大豆叶片总 RNA 的提取

取 0.2g 新鲜大豆病叶, 在液氮中研磨成粉末, 加入热的(80℃)抽提缓冲液(0.2M Tris - HCl pH 8.0, 0.2M LiCl, 2% SDS, 0.02M EDTA); 水饱和酚(1: 1), 继续研磨, 并振荡 5min。室温下 12000rpm 离心 5min。收集上清液, 加入等体积 4M LiCl, 置 - 80℃ 冷冻 1h。取出离心管, 室温下溶解后, 在 4℃ 条件下, 12000rpm 离心 10min。将沉淀溶于 500μl 的 DEPC 水中。在 4℃ 条件下, 12000rpm 离心 10min。将上清液移至一新的离心管中, 加入 1/10 体积的 3M 醋酸钠和等体积的异丙醇, - 20℃ 过夜。在 4℃ 条件下, 12000rpm 离心 15min。沉淀用 70% 的乙醇洗涤, 即在室温条件下, 12000rpm 离心 10min。将沉淀真空离心干燥。得到的总 RNA 溶于 20μl 的 DEPC 水中。 - 20℃ 条件下保存。

## 1.4 提纯病毒 RNA 的抽提

在 100μl(浓度 1mg/ml) 的提纯病毒中加入 33.33μl 的 4X 的裂解缓冲液(4% 的 SDS 4ml, 4X 的 TAE 电泳缓冲液), 1.5μl 的皂土(浓度 10mg/ml), 1.5μl 的 β - 巯基乙醇。振动混匀, 放在 65℃ 孵育 5min(孵育过程中混匀数次), 再次振动混匀。加等体积水饱和酚, 轻轻混匀后, 振动 20Sec, 室温下放置 5min, 再次振动混匀。室温下 10,000rpm 离心 3min, 取水相。用酚再抽提一次。加等体积的氯仿: 异戊醇(24: 1)振动混匀, 室温下 10,000rpm 离心 3min, 取上清。加入 1/10 体积的 3M 醋酸钠和 95% 的乙醇, 置 - 20℃ 条件下至少 2h。4℃, 14000rpm 离心 20min, 沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2 次, 即在室温下 14000rpm 离心 20min。将沉淀真空离心干燥。得到的病毒 RNA 溶于 20μl 的 DEPC 水中。 - 20℃ 条件下保存。

## 1.5 引物设计

根据已报道的 BPMV 外壳蛋白基因序列, 选择保守的区域(2070 ~ 2722), 用 Vector NTI 7 软件设

计一对引物, 引物序列为: 正向引物(5' - ATA GTT CCA TTA GAG GGC GTG - 3'); 反向引物(5' - AGT GGA CCA TGT GAG AAA C - 3')。

## 1.6 反转录

取 11μl 大豆病叶的总 RNA, 1μl 的 10pM 反向引物, 混匀。70℃ 维持 10min。加入 4μl 的 5X Superscript II 第一链缓冲液, 2μl 的 0.1M DTT, 1μl 的 10mM dNTP, 1μl 的 Superscript II 反转录酶(200U/μl, Invitrogen)。37℃ 孵育 1h 将 RNA 反转录成 cDNA。

## 1.7 PCR 程序

取 5μl 的 10X PCR 缓冲液(不含 MgCl<sub>2</sub>), 1.5μl 的 50mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5μl 的 10mM dNTP, 1μl 的 10pM 反向引物, 1μl 的 10pM 正向引物, 1μl 反转录好的 cDNA 模板, 0.3μl 的 Taq DNA 聚合酶(5U/μl, Invitrogen), 38.7μl 的 MilliQ 水, PCR 反应总体积为 50μl。采用 94℃ 孵育 2min, 然后 94℃, 30Sec; 61℃, 30Sec; 72℃, 2min; 循环 35 次, 72℃ 延伸 5min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖上, 80V 电压下电泳 30min。1Kb Plus DNA Ladder(Invitrogen)作为标准分子量的参照。胶用溴化乙锭染色。凝胶成像仪下拍照。

# 2 结果

## 2.1 酶联检测

用 BPMV - Han 分离物制备的抗体, 采用双抗体夹心酶联法, 可有效地检测上述 4 个 BPMV 分离物, 病叶最大稀释倍数为 1/1000。

对大豆种子的检测, 以种皮的检测效果最好, 整个种子次之, 种胚则很难检测到病毒。

## 2.2 大豆病叶和提纯病毒 RNA 的抽提

从 BPMV 感染的大豆病叶中抽提的总 RNA, 经电泳检查, 发现浓度较高。用提纯病毒抽提 RNA, 得到 2 条带。从病叶和提纯病毒中抽提的 RNA 都可用于反转录合成 cDNA。

## 2.3 RT - PCR 产物

用 BPMV 分离物 Han、Hop、CB1、G7 感染的大豆叶片总 RNA 作为模板经反转录, 合成 cDNA, 以 cDNA 为新的模板通过 PCR 扩增后, 产物在 1% 琼脂糖上电泳, 所有的分离物均出现一条 650bp 左右大小的片段, 用提纯病毒所作 RT - PCR, 以及克隆的 G7R2 质粒(BPMV RNA2)作阳性对照进行 PCR, 均扩增出相应大小的片段, 而健康大豆阴性对

照未出现相应的谱带。

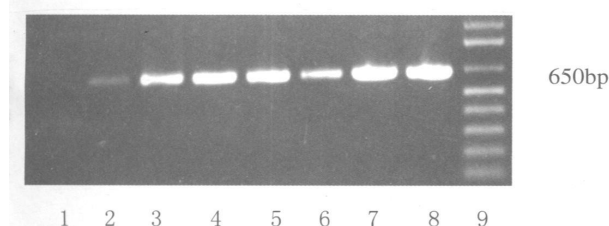


图 1 RT-PCR 产物

Fig. 1 RT-PCR product

1、健康对照; 2、Han 病叶; 3、Hop 病叶; 4、CB1 病叶; 5、G7 病叶; 6、Han 提纯病毒; 7、G7 提纯病毒; 8、G7R2 质粒; 9、1Kb Plus DNA Ladder

1、Healthy control; 2、Han; 3、Hop; 4、CB1; 5、G7; 6、Han; 7、G7; 8、G7R2; 9、1Kb Plus DNA Ladder

### 3 讨论

酶联检测具有快速大批量的优点, 不仅可检测出大豆病叶中的 BPMV, 还可有效地检测出大豆种皮中的 BPMV。

本实验建立起来的 RT-PCR 方法, 能有效地检测出 BPMV 不同亚组的分离物。G7 分离物属 BPMV 亚组 I, Han 属亚组 II, Hop 和 CB1 是 I 亚组和 II 亚组的重组体。用 PCR 方法都扩增出 650bp 大小的片段, 这和预计的 PCR 产物 653bp 大

小相符。RT-PCR 检测大豆病叶的结果和血清学酶联检测的结果是一致的, 这种一致性是由 BPMV 的外壳蛋白序列的高度保守性所决定的。

本实验建立起来的 RT-PCR 方法可有效地检测出大豆病叶中的 BPMV, 而对大豆种皮中 BPMV 的检测, 由于钝化物质对核酸抽提的干扰, 效果不佳, 尚需进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 Gu H., Clark A. J., de Sa P. B., et al. Diversity among isolates of Bean pod mottle virus [J]. *Phytopathology*, 2002, 92: 446-452.
- 2 Giesler L. J., Ghabrial S. A., Hunt T. E., et al. Bean pod mottle virus a threat to U. S. soybean production [J]. *Plant Disease*, 2002, 86: 1280-1289.
- 3 Michelutti R; Tu JC; Hunt DWA, et al. Anderson First report of bean pod mottle virus in soybean in Canada [J]. *Plant - Disease*, 2002, 86(3): 330.
- 4 Anjos JRN; Brioso PST; Charchar MJA. Partial characterization of bean pod mottle virus in soybeans in Brazil [J]. *Fitopatologia - Brasileira* 1999, 24(1): 85-87.
- 5 Fribourg CE; Perez W. Bean pod mottle virus (BPMV) affecting *Glycine max* (L.) Merr. in the Peruvian jungle [J]. *Fitopatologia* 1994, 29(3): 207-210.
- 6 Zettler FW; Stansly PA; Elliott M S; et al. Report of bean pod mottle virus in South America [J]. *Plant - Disease* 1989, 73(6): 518.

### DETECTION OF BEAN POD MOTTLE VIRUS BY RT-PCR

Wei Meisheng<sup>1</sup> Xiang Ning<sup>1</sup> Zhang Chunquan<sup>2</sup> Said A. Ghabrial<sup>2</sup>

(1. Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029; 2. University of Kentucky)

**Abstract** Bean pod mottle virus is an economically important virus that infect soybean. A pair of specific primers was designed based on the conserved region of the coat protein gene of bean pod mottle virus. Total RNA was extracted from infected soybean leaves and was reverse transcribed to cDNA. The cDNA was subjected to PCR using the forward and reverse primers. PCR products of 650 bp were generated from all isolates tested. The RT-PCR method could be used to detect BPMV-infected soybean leaves with satisfied results that were confirmed by DAS-ELISA assay. We recommended ELISA assay to detect BPMV-infected soybean seed rather than RT-PCR.

**Key words** Bean pod mottle virus; PCR; ELISA