

# 进境大豆种子中烟草环斑病毒的快速检测

闻伟刚,崔俊霞,盛 蕾

(宁波出入境检验检疫局,宁波 315012)

**摘要** 烟草环斑病毒(Tobacco ringspot virus,TRSV)是进境大豆种子必须检疫的项目,属于我国禁止入境的二类检疫性有害生物,本文建立了大豆种子中 TRSV 的快速检测方法。采用 Trizol 试剂直接提取大豆种子总 RNA,通过 RT-PCR 扩增得到 359 bp 特异性产物。该产物经半巢式 PCR 进一步验证得到 206 bp 特异性片段,经测序及同源性比较表明,片段序列与 GenBank 中登录的 TRSV 外壳蛋白基因部分序列存在 92%~96% 的同源性,而未见与其它基因序列存在同源性。同时,大豆种子样品经 DAS-ELISA 复核检测结果显示 TRSV 阳性反应。因此,判定该批进境大豆种子携带 TRSV。

**关键词** 大豆;烟草环斑病毒;快速检测;RT-PCR;半巢式 PCR

**中图分类号** S41-31 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)05-0748-04

## RAPID DETECTION OF TOBACCO RINGSPOT VIRUS IN IMPORTED SOYBEAN SEEDS

WEN Wei-gang,CUI Jun-xia,SHENG Lei

(Ningbo Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau,Ninbo 315012)

**Abstract** Tobacco ringspot virus(TRSV) is the second level quarantine pest which should be tested in imported soybean. In this paper,a rapid detection method was established which used Trizol for extracting total RNA of soybean seeds directly and adopted RT-PCR for amplification,a 359 bp special band was obtained. Through further verification of semi-nested PCR and sequence homologous comparison,a 206 bp special product was obtained and had 92%~96% identities with TRSV sequence of coat protein genes published in GeneBank. The homology to other genetic sequences of plant viruses were not found. Meanwhile,the soybean seeds sample showed TRSV positive reaction when checked by DAS-ELISA. Thus,the soybean seeds sample was determined to contain TRSV.

**Key words** Soybean;Tobacco ringspot virus;Rapid detection ;RT-PCR;Semi-nested PCR

烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot nepovirus*)是我国进境大豆必须检疫的一种植物病毒,属于对外公布的二类植物检疫性有害生物<sup>[1]</sup>。目前,该病毒在世界五大洲近 40 个国家均有分布,包括美国、巴西及加拿大等转基因大豆主要生产国,在中国尚无发

生和危害的官方报道。烟草环斑病毒的寄主范围十分广泛,能够侵染包括豆类、瓜类、薯类、花卉和果树等在内的 54 科 300 余种植物并引起重大经济损失。该病毒侵染大豆主要引起芽枯,产量损失很大,可减少 25%~100%,

收稿日期:2007-04-27

基金项目:宁波出入境检验检疫局科技项目(甬 K34-2006)

作者简介:闻伟刚(1975-),男,博士研究生,主要从事疫病分子生物学检测工作。

带毒种子是该病毒进行远距离传播扩散的主要途径<sup>[2]</sup>。

用于检测烟草环斑病毒的方法一般采用生物学、血清学和电镜技术,其中以 ELISA 技术应用最为广泛<sup>[3]</sup>。随着对快速检疫的要求以及分子生物学技术的不断发展,基于核酸水平的高灵敏度 RT-PCR 方法已越来越广泛地应用于植物病毒的快速检测<sup>[4~7]</sup>。本实验室采用建立的植物病毒分子检测方法对一批从美国进境的转基因大豆进行检疫时,从中截获烟草环斑病毒阳性。本文在此基础上对大豆种子中烟草环斑病毒的分子检测方法进行归纳总结,以期口岸出入境检疫部门或相关研究机构提供一种成熟的方法,提高烟草环斑病毒的疫情检出率,严防该危险性病毒传入我国。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

在 5 kg 美国转基因大豆中选取颜色发青、种脐周围带色斑、瘪粒及畸形等一些外观异常的种子颗粒 10 g 左右作为检测材料。

烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot nepvirus*)阳性样品购自美国 Agdia 公司,阴性样品为健康大豆种子。

PCR 引物由上海英骏生物技术公司合成。核酸提取试剂 Trizol、Taq 聚合酶、dNTP 等购自上海生物工程公司。One-Step RNA PCR Kit 与 DL-2000 Marker 购自大连 TaKaRa 公司。TRSV 双抗体夹心酶联免疫(DAS-ELISA)检测试剂盒购自美国 Agdia 公司。

多功能食品加工机(SQ2119 型)购自上海帅佳科技有限公司。PCR 仪(2700 型)购自美国 ABI 公司。

### 1.2 样品制备

10 g 种子样品在食品加工机中充分加工成细

粉,当中取 2 g 粉末于研钵中,加入 8 mL 样品提取液,充分研磨匀浆后转入 50 mL 管中,2000 r min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清为样品提取液用于检测。设 3 个重复,剩余粉末作为留样保存以备复核。

### 1.3 RT-PCR 检测

1.3.1 总 RNA 提取 取 100 μL 体积的样品提取上清液,采用 Trizol 试剂方法快速提取<sup>[8]</sup>。

1.3.2 RT-PCR 扩增 反应体系参照 One-Step RNA PCR Kit 试剂盒说明书执行。引物序列<sup>[8]</sup>和扩增产物大小见表 1。

反应条件如下:50℃ cDNA 合成 30 min,94℃预变性 2 min,94℃变性 30 s,58℃复性 30 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃延伸 8 min。

### 1.4 RT-PCR 结果验证

1.4.1 半巢式 PCR 扩增 半巢式 PCR 反应体系:DNA 模板 1 μL,10 × PCR buffer(Mg<sup>2+</sup> plus)2.5 μL,dNTP(10 mmol L<sup>-1</sup>)1 μL,Taq 酶(5 U μL<sup>-1</sup>)0.2 μL,引物(20 μmol L<sup>-1</sup>)各 0.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 19.3 μL,总体积为 25 μL。DNA 模板为第一轮 RT-PCR 反应产物。

半巢式 PCR 反应条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,58℃复性 30 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃延伸 5 min。

1.4.2 扩增产物电泳分析 取 15 μL 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在 GelDoc-2000 (Bio-Rad)凝胶成像系统上观察并记录结果。

1.4.3 产物测序分析 半巢式 PCR 扩增产物由上海基康生物技术有限公司测序。序列分析采用 BioEdit 软件,同源性比较在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中通过 Blast 程序进行。

### 1.5 DAS-ELISA 检测

取 100 μL 体积的样品提取上清液用于 DAS-ELISA 检测,测试方法参照试剂盒说明书,阴性对照与阳性对照均为试剂盒中含有。当样品 OD<sub>405</sub>≥2 × 阴性 OD<sub>405</sub>时,样品被判定为阳性,即携带 TRSV 病毒。

表 1 TRSV 检测引物

Table 1 The primers for identification of TRSV

名 称 Items	引物序列 Primers' sequence	组 合 Combination	扩增产物(bp) Amplification products
TRSV	TR1:5' - GACATTCGGCAAGCCATTATG - 3'	TR1/TR2	3359
	TR2:5' - GTCACCTGATTGTGGACGCA - 3'		
	TR3:5' - CGCATAGACCTACCAGCACTTG - 3'	TR2/TR	206

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增结果

以样品总 RNA 为模板,采用 TRSV 专化性引物通过 RT-PCR 扩增得到一条约 359bp 的特异性条带,与阳性对照结果一致,符合预期片段大小(图 1)。阴性对照与空白对照均没有条带产生,表明扩增结果准确可靠,未出现假阳性或污染情况。

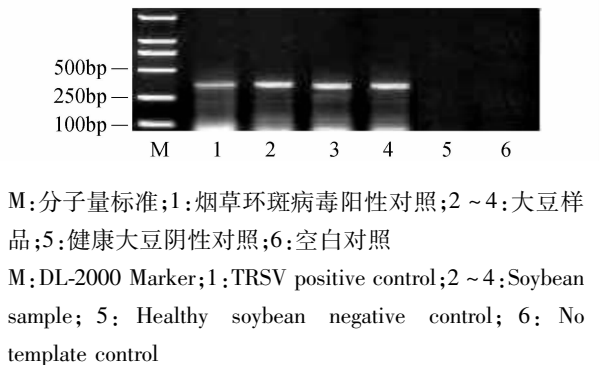


图 1 RT-PCR 扩增结果  
Fig. 1 Results of RT-PCR amplification

2.2 半巢式 PCR 扩增结果

以 RT-PCR 扩增产物为模板,通过半巢式 PC

R 能够扩增得到一条分子量为 206bp 的特异性条带(图 2),与阳性对照结果一致,符合预期片段大小。阴性对照与空白对照均没有条带产生,结果准确可靠。另外,从图中可以看出,半巢式 PCR 扩增产物的纯度与特异性均要比第一轮 RT-PCR 扩增产物好。

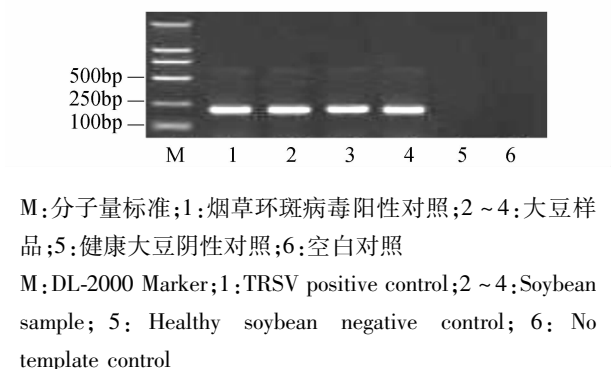


图 2 半巢式 PCR 扩增结果  
Fig. 2 Results of semi-nested PCR amplification

2.3 半巢式 PCR 产物的序列分析

半巢式 PCR 产物经测序和同源性比较后发现,产物核苷酸序列与 TRSV 外壳蛋白基因序列分别存在 92% ~ 96% 的同源性(图 3),而未见与其它基因序列存在同源性。

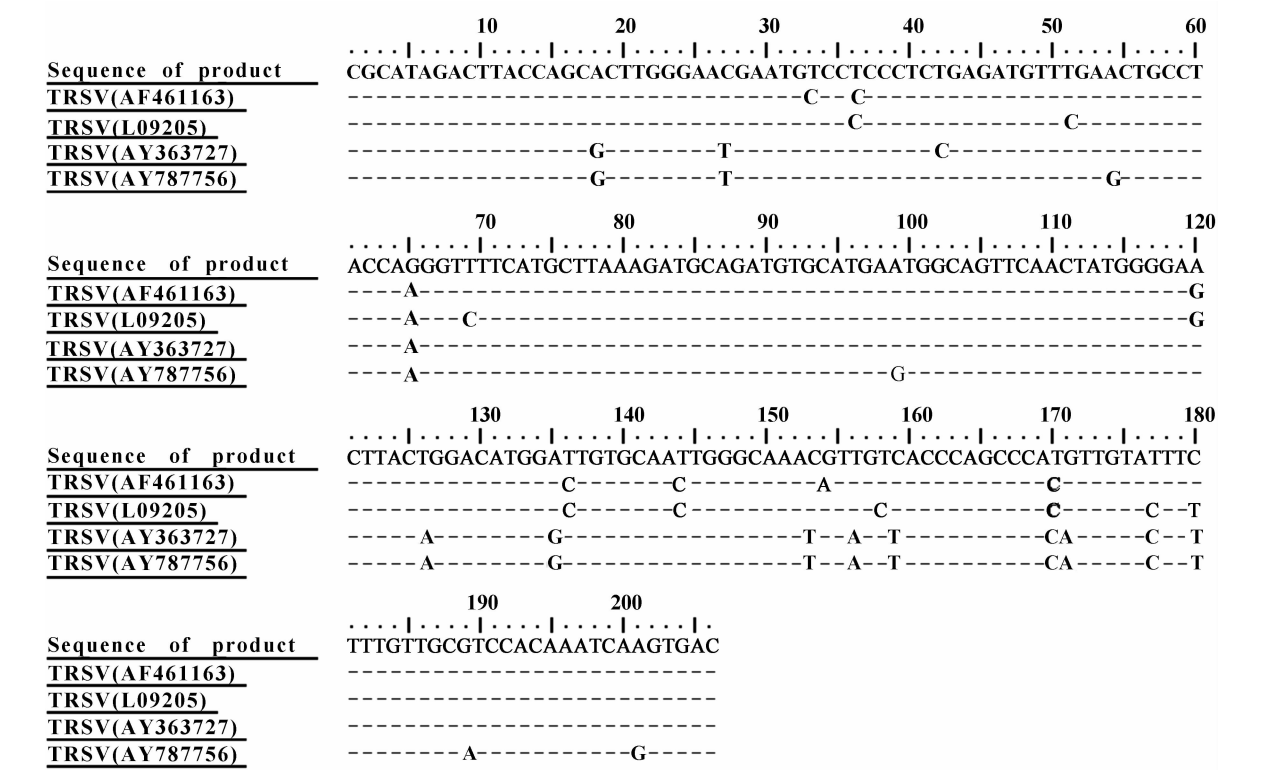


图 3 半巢式 RT-PCR 产物与 TRSV 外壳蛋白基因部分序列的比较  
Fig. 3 Sequence alignments of semi-nested RT-PCR products with coding genes of TRSV coat protein  
Note: “-”: Identical nucleotide bases

2.4 DAS-ELISA 检测

结果显示,TRSV 阴性对照的 OD<sub>405</sub> 值为 0.142,因此,判定样品 TRSV 阳性的临界 OD<sub>405</sub> 值为 0.284。从表 2 可以看到,三个受检样品重复的 OD<sub>405</sub> 值均大于临界 OD<sub>405</sub> 值,根据检测依据被判定为 DAS-ELISA 阳性。健康大豆的 OD<sub>405</sub> 值低于临界 OD<sub>405</sub> 值,被判定为 DAS-ELISA 阴性。

表 2 DAS-ELISA 检测结果  
Table 2 Results of DAS-ELISA

样品 Samples	OD <sub>405</sub>	结果 Results
阳性对照 Positive control	1.178	+
样品重复 1 Replicate 1	1.612	+
样品重复 2 Replicate 2	1.659	+
样品重复 3 Replicate 3	1.603	+
健康大豆 Healthy soybean	0.157	-
阴性对照 Negative control	0.142	

“+”:Positive,“-”:Negative

3 讨论

首先用 RT-PCR 技术对 TRSV 进行了初步检测,然后采用半巢式 PCR 及测序进行验证,主要是基于以下几点考虑:1)建立一种灵敏度更高的病毒检测方法,以确保在种子及鳞球、块茎、苗木等材料病毒含量低或作混合样检测时,第一轮 RT-PCR 无法达到其检测灵敏度,从而可使用半巢式 PCR 方法对其进行检测,防止漏检;2)通过第二轮半巢式 PCR 扩增,可以确证第一轮 RT-PCR 扩增结果的特异性,同时其扩增结果的稳定性也大大高于第一轮 RT-PCR 扩增<sup>[9]</sup>;3)病毒分子检测对扩增产物进行测序验证非常必要。目前,PCR 扩增产物可以直接进行测序,方便快捷,而无需克隆到载体上后进行测序。但是,第一轮 RT-PCR 产物往往会因杂质含量高或特异性产物含量低等原因,影响测序结果的准确性,有时甚至无法测序。通过半巢式 PCR 方法,可以大大提高特异性产物的含量,降低杂质含量,从而提高测序的准确性,以适应快速检验检疫的要求。

我国每年从国外进口数千万吨的种子,当中携

带的种传病毒含量通常较低。目前,常规的检测方法是采用种子发芽长成植株后取叶片或茎秆进行病毒分离、生物学测定及 ELISA 等,这往往需要几周的时间才能完成整个项目的检测,不能满足口岸快速检疫通关的需求。并且,许多携带病毒的种子在长成植株后,其叶片或茎秆却有可能检测不到病毒的存在。因此,本文建立的直接针对大豆种子进行病毒检测的方法,能够极大地提高 TRSV 检出率,对于其它种传病毒的检测也具有借鉴意义。另外,该方法能够满足口岸快速检疫通关的需求,具有较强的实用性,值得推广应用。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国动植物检疫局. 中国进出境植物检疫手册 [M]. 北京:文物出版社,1996.

[2] Demski J W, Kuhn C W. Tobacco ringspot virus. In: Compendium of soybean disease [M]. American Phytopathological Society, 1989, 3<sup>rd</sup> edition, 57-59.

[3] 袁小环,李青. 血清学方法和分子生物学方法检测植物病毒研究进展[J]. 热带农业科学, 2001, 6: 63-68.

[4] Wetzel T, Jardak R, Meunier L, et al. Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers[J]. Journal Virological Methods, 2002, 101(1-2): 63-69.

[5] Bertolini E, Olmos A, Carmen M M, et al. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees [J]. Journal Virological Methods, 2001, 96(1): 33-41.

[6] Nassuth A, Pollari E, Helmechy K, et al. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts[J]. Journal Virological Methods, 2000, 90(1): 37-49.

[7] 闻伟刚,赵秀玲,翁志平,等. 一步 RT-PCR 检测南芥菜花叶病毒方法的建立[J]. 植物检疫, 2003, 17(6): 330-332.

[8] 闻伟刚,崔俊霞,盛蕾. 烟草环斑病毒和番茄环斑病毒的半巢式 RT-PCR 检测[J]. 植物保护学报, 2007, 34(1): 61-66.

[9] Mayer C L, Palmer C J. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(6): 2081-2085.