

GICA- RT- PCR 检测菜豆荚斑驳病毒的新方法

张晓雷¹, 檀根甲¹, 魏梅生², 张永江², 李桂芬²

(¹安徽农业大学植物保护学院, 安徽 合肥 230063; ²中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所, 北京 100029)

摘要:菜豆荚斑驳病毒 (Bean pod mottle virus, BPMV) 是我国进境植物检疫性有害生物。为解决普通 RT- PCR 不能直接检测大豆病种子中该病毒的问题, 将简便快速的胶体金免疫层析技术 (GICA) 和高灵敏度的普通 RT- PCR 检测技术有机地结合起来, 建立了 GICA- RT- PCR 检测新方法。即先用 GICA 捕获病毒, 将捕获的病毒直接进行 RT- PCR 扩增, 简化了检测的步骤, 提高了检测的灵敏度。结果表明: 用该方法检测提纯病毒灵敏度达到 $0.01\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、检测大豆病叶和病大豆种皮, 灵敏度达到 10^{-4} , 分别比 GICA 检测提高了 20 倍、10 倍和 100 倍。GICA- RT- PCR 可进一步确认 GICA 的结果。

关键词:胶体金免疫层析; 试纸条; 菜豆荚斑驳病毒; GICA- RT- PCR

中图分类号:S435.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2008)06-1019-05

A New Method for Detecting Bean Pod Mottle Virus by GICA- RT- PCR

ZHANG Xiao-lei¹, TAN Gen-jia¹, WEI Mei-sheng², ZHANG Yong-jiang², LI Gui-fen²

(¹Plant Protection School, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui; ²Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China)

Abstract: Bean pod mottle virus (BPMV) is a quarantine pest for China. A high sensitive and rapid gold immunochromatography assay-RT-PCR (GICA-RT-PCR) method has been developed for the detection of BPMV- infected soybean seed. This method takes the advantage of gold immunochromatography assay (GICA) which captures the virus first on test line, then the immunocaptured virus will be used for direct RT-PCR to amplify the target nucleic acid, eliminating the need for traditional total RNA extraction methods and reducing the number of steps involved. The sensitivity of the GICA-RT-PCR for purified virus is $0.01\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. BPMV- infected soybean leaves and soybean seed coat diluted to 10^{-4} can be detected by GICA-RT-PCR. GICA-RT-PCR is 20 times, 10 times and 100 times more sensitive than GICA for detecting purified BPMV, BPMV- infected soybean leaves and soybean seed coat, respectively. GICA-RT-PCR is a simple and sensitive tool for confirmation of GICA results.

Key words: GICA; Immunostrip; BPMV; GICA- RT- PCR

菜豆荚斑驳病毒 (Bean pod mottle virus, BPMV) 属豇豆花叶病毒科 (*Comoviridae*) 豇豆花叶病毒属 (*Comovirus*) 成员, 是我国进境植物检疫性有害生物^[1]。该病毒主要危害大豆、菜豆和豇豆等植物, 可造成产量损失和品质下降。其田间传播主要由各种叶甲来完成, 远距离则主要由病种子传播。BPMV 主要分布于美国^[2]、加拿大^[3]、巴西^[4]、秘鲁^[5]、厄瓜多尔^[6]、伊朗^[7]等国家。虽然我国目前尚无该病毒发生的报道, 但我国每年都从国外进口大量榨油用的大豆种子, 使该病毒进入的风险日益

增加, 近年来我国多个出入境检验检疫局陆续从进口的大豆中截获到该病毒^[8-10], 证实了这种风险的存在。

口岸局对进口大豆种子的检测主要采用双抗体夹心 ELISA^[8,11], 免疫捕获巢式 RT-PCR^[9], 半巢式 RT-PCR^[10]等方法, 而普通 RT-PCR 不能直接用于对大豆病种子的检测^[9,11]。口岸检疫急需快速灵敏的检测方法。胶体金免疫层析 (Gold immunochromatography assay, GICA) 试纸条 (或简称试纸条, Immuno-strip) 具有使用方便, 操作简单、检测快速的特

收稿日期: 2008-08-06
基金项目: 国家质量监督检验检疫总局资助项目 (2006IK216)。
作者简介: 张晓雷, 男, (1983-), 硕士研究生, 从事检疫性植物病毒检测研究。E-mail: zhangxiaolei198319@yahoo.cn。
通讯作者: 魏梅生, 副研究员。E-mail: wmsh02@yahoo.com.cn。

点,在 10 min 内就可以观察到检测结果,特别适合口岸现场检疫及田间病害调查时的快速检测,其不足之处是检测的灵敏度相对较低。

试验将简便快速的胶体金免疫层析技术和高灵敏度的普通 RT-PCR 检测技术有机地结合。先用胶体金免疫层析试纸条捕获病大豆种皮中的病毒,避开了大豆种皮中的钝化物质对检测效果的影响,然后进行 RT-PCR 扩增,放大目标核酸的信号,建立 GICA-RT-PCR 检测新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料 毒原为 BPMV- G7 分离物,接种在大豆 Essex 品种上保存。

1.1.2 主要试剂 BPMV 的兔多克隆抗体是经硫酸铵沉淀和 DE52 柱层析后所获得的 IgG,为实验室自制。在 BioDot XYZ 3050 三维喷点平台上,用浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 IgG,在硝酸纤维膜上喷成检测 T 线。

羊抗兔抗体购自军事医学科学院。在 BioDot XYZ 3050 三维喷点平台上,用浓度为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 IgG,在硝酸纤维膜上喷成对照 C 线。

引物设计参照文献[12],由北京赛百盛公司合成。BPMVf:5'-ATA GTT CCA TTA GAG GGC GTG-3';BPMVr:5'-AGT GGA CCA TGT GAG AAA C-3'。预期扩增的片段大小为 653bp。

1.2 方法

1.2.1 BPMV 的提纯 采收接种 21 d 后的大豆病叶作提纯材料,病毒的粗提纯采用差速离心的方法,用 Triton X-100 作为澄清剂,用 PEG 来沉淀病毒。病毒的精提纯在 10%~40% 的蔗糖梯度液中超速离心完成。提纯的病毒在 HITACHI 320 紫外分光光度计上,测 OD_{260} 来确定浓度。

1.2.2 胶体金免疫层析试纸条的制备参照文献[13]。

1.2.3 胶体金免疫层析试纸条的检测(GICA) 提纯病毒:提纯病毒用酶联检测的酶标缓冲液稀释,依次稀释为 100,50,20,10,1,0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度。

大豆病叶:大豆病叶用酶联检测的样品抽提缓冲液稀释(W/V),依次稀释为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 。

大豆病种子:病种子在蒸馏水中 30℃ 浸泡 1 h,用镊子将种皮和种胚剥离开,对种皮进行检测。用

酶联检测的样品抽提缓冲液,将浸泡后充分吸水的种皮,稀释成 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 。

从 4℃ 冰箱中取出密封干燥保存的试纸条,恢复至室温。将有胶体金复合物端插入 200 μL 的上述待测样品中,样品液面不要超过胶体金免疫层析试纸条上的 MAX 线,10~15 min 左右取出判断结果。

1.2.4 胶体金免疫层析试纸条的 T 线和 C 线的 RT-PCR 检测(GICA-RT-PCR) 取 GICA 检测完的提纯病毒,大豆病叶和大豆病种子的试纸条,用消毒过的剪刀将试纸条 T 线以下剪掉,PBST 冲洗保留试纸条的 T 线和 C 线周围的区域。用消毒过的刀片分别刮下 T 线,C 线及其周围的区域,各自放到事先配置好的 10 μL 反转录溶液(含 5.5 μL DEPC 水、2 μL 5 × Buffer 缓冲液、0.5 μL 下游引物、1 μL dNTP、0.5 μL M-MLV、0.5 μL RNasin)的管中,进行 cDNA 第一链的合成。42℃ 水浴 60 min 后,分别取 3 μL 合成好的 cDNA,于 25 μL 体系中用设计的引物进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系:取 1 μL 的反转录产物,加 10 × PCR buffer(含有 Mg^{2+}) 2.5 μL 、DEPC 水 19 μL 、BPMVf 0.5 μL 、BPMVr 0.5 μL 、dNTP 1 μL 、Taq 酶 0.5 μL ,总体系为 25 μL 混匀后进行 PCR。

PCR 反应条件:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,61℃ 复性 30 s、72℃ 延伸 2 min,30 个循环;72℃ 延伸 5 min 后保存于 4℃ 环境下。

取 10 μL PCR 产物于 1.0% 琼脂凝胶上 135 V 电泳 20 min,EB 染色,在凝胶成像仪上观察并记录结果。

2 结果与分析

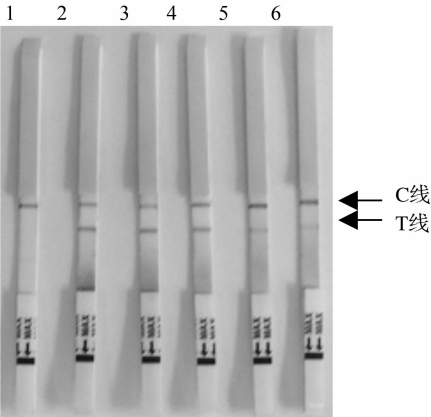
2.1 提纯病毒的检测

GICA 检测的结果是,病毒浓度在 100~1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,T 线显色明显,为强阳性。而浓度为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,T 线显色较模糊,为弱阳性(图 1)。缓冲液仅 C 线显色。

GICA-RT-PCR 检测提纯病毒,将 T 线上捕获的提纯病毒进行 RT-PCR 检测,病毒浓度从 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ~0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均扩增出清晰明亮的条带(图 2)。

2.2 大豆病叶的检测

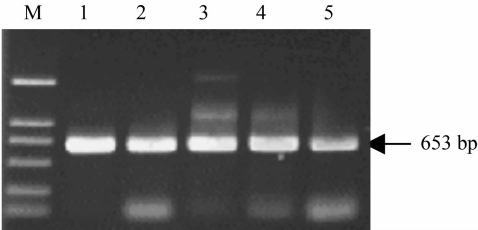
GICA 检测大豆叶片病汁液的结果显示,当病汁液在 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 的稀释度时,T 线显色明显,为



1:缓冲液;2~6:提纯的病毒($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1:Buffer;2-6:Purified BPMV ($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

图1 GICA 检测提纯病毒

Fig. 1 Detection of the purified BPMV by GICA



1~5:提纯的病毒($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.01\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);M: DNA Marker (TaKaRa DL2000)
1-5:Purified BPMV($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.01\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);M: DNA Marker (TaKaRa DL2000)

图2 GICA-RT-PCR 检测提纯病毒

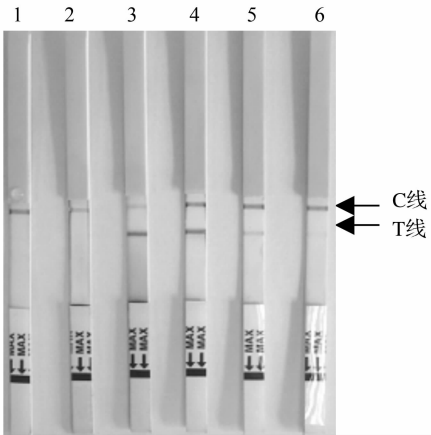
Fig. 2 Detection of the purified BPMV by GICA-RT-PCR
强阳性,当稀释度为 10^{-4} 时显色较淡,为弱阳性(图3)。样品抽提缓冲液和健康叶片仅C线显色。

GICA-RT-PCR 检测大豆病叶,将显色的T线进行RT-PCR 的结果是,病汁液在 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 稀释度时都能扩增出预期的片段(图4)。

将健康大豆叶和样品抽提缓冲液对照相应位置上未显色的T线进行RT-PCR,则没有扩增出相应的目标片段。

GICA-RT-PCR 检测大豆病叶,将显色的C线进行RT-PCR 的结果是,在 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 稀释度时都能扩增出预期的片段(图5)

将健康大豆叶和缓冲液对照所显色的C线进行RT-PCR,则不能扩增出相应的目标片段。

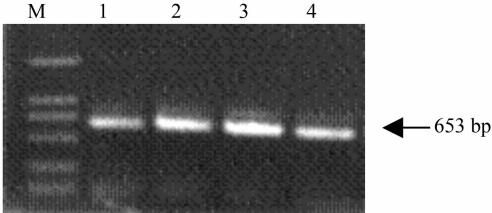


1:样品抽提缓冲液;2:健康的大豆叶片(10^{-1});3~6:系列稀释的大豆病叶(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})

1:Buffer;2:Healthy soybean leaves sap(10^{-1});3-6:BPMV infected soybean leaves sap dilution(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})

图3 GICA 检测大豆病叶

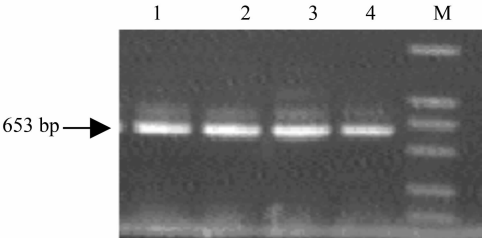
Fig. 3 Detection of BPMV infected soybean leaves sap by GICA



1~4:系列稀释的大豆病叶(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});M: DNA Marker (TaKaRa DL2000)
1-4:BPMV infected soybean leaves sap dilution(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});M: DNA Marker (TaKaRa DL2000)

图4 GICA-RT-PCR 检测大豆病叶(T线)

Fig. 4 Detection of BPMV infected soybean leaves sap by GICA-RT-PCR(T line)



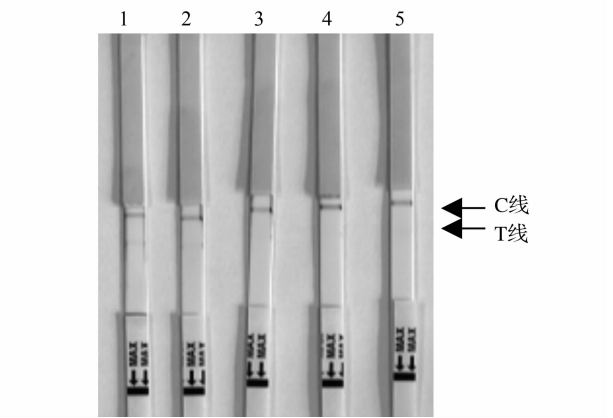
1~4:系列稀释的大豆病叶(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});M: DNA Marker (TaKaRa DL2000)
1-4:BPMV infected soybean leaves sap dilution(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});M: DNA Marker (TaKaRa DL2000)

图5 GICA-RT-PCR 检测大豆病叶(C线)

Fig. 5 Detection of BPMV infected soybean leaves sap by GICA-RT-PCR(C line)

2.3 病大豆种皮的检测

GICA 检测病大豆种皮,在稀释度为 10^{-1} 和 10^{-2} 的时候 T 线显色较弱,为弱阳性(图 6)。样品抽提缓冲液仅 C 线显色。

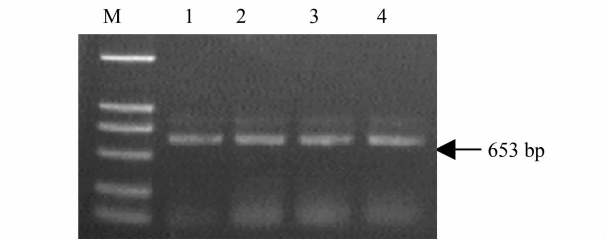


1~4:系列稀释的病大豆种皮(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});5:样品抽提缓冲液
1-4:BPMV infected soybean seed coat dilution(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});5:Buffer

图 6 GICA 检测病大豆种皮

Fig. 6 Detection of BPMV infected soybean seed coat by GICA

GICA-RT-PCR 检测病大豆种皮,将微弱显色的 T 线进行 RT-PCR 的结果显示,从稀释度 10^{-1} ~ 10^{-4} ,用此方法都能检测到目标片段(图 7)。



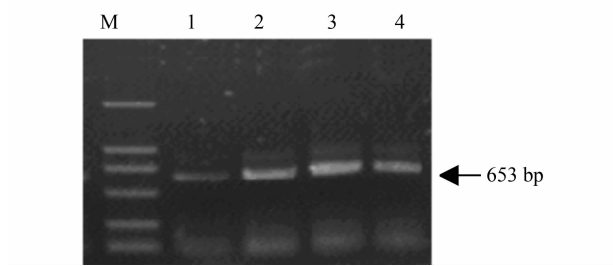
1~4:系列稀释的病大豆种皮(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});M:DNA Marker(TaKaRa DL2000)
1-4:BPMV infected soybean seed coat dilution(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});M:DNA Marker(TaKaRa DL2000)

图 7 GICA-RT-PCR 检测病大豆种皮(T 线)

Fig. 7 Detection of BPMV infected soybean seed coat by GICA-RT-PCR(T line)

将健康大豆种皮和样品抽提缓冲液对照相应位置上未显色的 T 线进行 RT-PCR,则没有扩增出相应的目标片段。

GICA-RT-PCR 检测病大豆种皮,将显色的 C 线进行 RT-PCR 的结果显示,从稀释度 10^{-1} ~ 10^{-4} ,用此方法都能检测到目标片段(图 8)。



1~4:系列稀释的病大豆种皮(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});M:DNA Marker(TaKaRa DL2000)
1-4:BPMV infected soybean seed coat dilution(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});M:DNA Marker(TaKaRa DL2000)

图 8 GICA-RT-PCR 检测病大豆种皮(C 线)

Fig. 8 Detection of BPMV infected soybean seed coat by GICA-RT-PCR(C line)

将健康大豆种皮和缓冲液对照所显色的 C 线进行 RT-PCR,则不能扩增出相应的目标片段。

3 讨论

用 GICA 和 GICA-RT-PCR 两种方法分别对提纯病毒、大豆病叶和病大豆种皮进行检测,结果表明,用 GICA-RT-PCR 检测提纯病毒比 GICA 灵敏度提高 20 倍;检测大豆病叶提高 10 倍;检测病大豆种皮可提高 100 倍。

直接用提纯的病毒作模板进行 RT-PCR,可以扩增到 653bp 的目标核酸片段;而直接用病叶和病大豆种皮作模板进行 RT-PCR 则扩增不出目标片段,这可能是由于病材料中病毒的含量太低或存在某些钝化物质,不能提供足够的高质量 RNA 模板所致。而用 GICA-RT-PCR 可以直接扩增出目标片段,缘于 GICA 对病毒的特异性免疫捕获作用,富集了目标病毒,并能提供高质量的 RNA 模板,从而使 RT-PCR 对目标核酸进一步放大,提高了检测的灵敏度。

胶体金试纸条 T 线上喷有抗 BPMV 的特异性抗体,采用的是双抗体夹心法的原理,用 GICA 检测 BPMV 病材料时,则样品中的病毒与抗体-胶体金

结合后,形成复合物,层析时该复合物被 T 线上的病毒特异性抗体所捕获,而使 T 线显色,简言之,显色的 T 线,表明捕获到病毒,故显色的 T 线,可以用 RT-PCR 扩增出目标片段。

胶体金试纸条的 C 线上喷有羊抗兔抗体,采用的是间接法原理,用 GICA 检测 BPMV 病材料时,则病毒与抗体-胶体金形成复合物,层析时该复合物先被 T 线上病毒特异性抗体所捕获,多余的复合物则被随后的 C 线所捕获,所以显色的 C 线用 RT-PCR 也能扩增出目标片段。但用 GICA 检测健康的大豆材料或缓冲液时,C 线所捕获的只是抗体-胶体金结合物,并没有捕获到病毒,故这种显色的 C 线,不可能用 RT-PCR 扩增出病毒核酸的目标片段。

研究建立的 GICA-RT-PCR 检测方法,将免疫捕获和核酸扩增技术结合起来,两种技术互为补充,提高了检测的特异性和灵敏度;两种技术相互验证,增强了对检疫性有害生物的复核能力。其方法简化了普通 RT-PCR 的步骤,检测的样品不需要经过总 RNA 提取等步骤,可直接进行 RT-PCR 扩增,解决了长期以来大豆种皮中病毒用普通 RT-PCR 方法检测不出来的问题,该方法值得在口岸推广应用。

参考文献

[1] 魏梅生,杨翠云. 菜豆荚斑驳病毒- 危害大豆等豆科植物的重要病毒[J]. 植物检疫,2006,20(4):26-28. (Wei M S, Yang C Y. Bean pod mottle virus -an important virus on soybean and leguminous plants[J]. Plant Quarantine,2006,20(4):26-28.)

[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 J C, Hunt D W A, et al. First report of Bean pod mottle virus in soybean in Canada [J]. Plant Disease, 2002, 86(3):330.

[4] Anjos J R N, Briosio P S T, Charchar M J A. Partial characterization of bean pod mottle virus in soybeans in Brazil [J]. Fitopatologia Brasileira, 1999, 24(1):85-87.

[5] Fribourg C E, 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 F W, Stansly P A, Elliott M S, et al. Report of bean pod mottle virus in Southern American [J]. Plant Disease, 1989, 73(6):518.

[7] Shahraeen N, Ghotbi T, Salati M. First report of Bean pod mottle virus in soybean in Iran [J]. Plant Disease, 2005, 89(7):775.

[8] 李彬, 吴新华, 栗寒, 等. 进境美国大豆幼苗中菜豆荚斑驳病毒的检测与鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(2):139-141. (Li B, Wu X H, Su H, et al. Identification of Bean pod mottle virus (BPMV) on the soybean seedling from America [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2007, 30(2):139-141.)

[9] 于翠, 杨翠云, 宋绍祎, 等. 进口大豆上菜豆荚斑驳病毒的免疫捕获巢式 RT-PCR 检测[J]. 植物检疫, 2006, 20(4):201-203. (Yu C, Yang C Y, Song S W, et al. Detection of Bean pod mottle virus by immuno-capture nested RT-PCR from the imported soybean [J]. Plant Quarantine, 2006, 20(4):201-203.)

[10] 闻伟刚, 崔俊霞, 赵秀玲, 等. 半巢式 RT-PCR 检测进口大豆中菜豆荚斑驳病毒的研究[J]. 植物病理学报, 2006, 34(4):296-300. (Wen W G, Cui J X, Zhao X L, et al. Detection of Bean pod mottle virus by semi-nested RT-PCR in imported soybean [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(4):296-300.)

[11] 魏梅生, 相宁, 张春泉, 等. 菜豆荚斑驳病毒的 RT-PCR 检测[J]. 大豆科学, 2005, 24(4):317-319. (Wei M S, Xiang N, Zhang C Q, et al. Detection of Bean pod mottle virus by RT-PCR [J]. Soybean Science, 2005, 24(4):317-319.)

[12] 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.

[13] 魏梅生, 刘洪义, 李桂芬, 等. 马铃薯 X 病毒和马铃薯 Y 病毒胶体金免疫层析试制条的研制[J]. 植物保护, 2006, 32(6):139-141. (Wei M S, Liu H Y, Li G F, et al. Gold immunochromatography assay for rapid detection of Potato virus X and Potato virus Y [J]. Plant Protection, 2006, 32(6):139-141.)

参考文献著录格式

3. 期刊中的析出文献

著录格式:

[序号] 主要责任者. 文献题名[J]. 刊名, 年, 卷(期):起止页码.

例:

[1] 何龄修. 读顾城《南明史》[J]. 中国史研究, 1998(3):167-173.

[2] 金显贺, 王昌长, 王忠东, 等. 一种用于在线检测局部放电的数字滤波技术[J]. 清华大学学报(自然科学版), 1993, 33(4):62-67.