

李丽丽,付耕云,杨洪一. 苹果茎痘病毒的 IC-RT-PCR 检测[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):63-65.

# 苹果茎痘病毒的 IC-RT-PCR 检测

李丽丽<sup>1</sup>, 付耕云<sup>2</sup>, 杨洪一<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省林业科学研究所,黑龙江哈尔滨 150081; 2. 东北林业大学生命科学学院,黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:**利用 CTAB 缓冲液提取苹果叶片粗提液,以苹果茎痘病毒(ASPV)的抗血清包被薄壁管,捕获感病叶片粗提液中的 ASPV 病毒粒子;最终进行 RT-PCR 反应扩增 ASPV 特异片段,建立了利用免疫捕获 RT-PCR(IC-RT-PCR)技术检测 ASPV 的技术体系。结果显示,IC-RT-PCR 可有效检测 ASPV,且对栽培苹果、海棠、杏、毛樱桃样品的检测皆有效。IC-RT-PCR 无需提取 RNA,只需叶片粗提液,步骤简单;IC-RT-PCR 技术受叶片中杂质影响较小,可有效检测不同植物样品中的 ASPV,具有重要应用价值。

**关键词:**苹果茎痘病毒;IC-RT-PCR;粗提液

**中图分类号:** S436.611 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0063-02

苹果茎痘病毒(apple stem pitting virus, ASPV)是一种严重危害果树生产的潜隐性病毒,主要感染苹果和梨,从而导致苹果和梨产量降低、品质变差<sup>[1]</sup>。ASPV 最早于 1954 年在美国森林苹果(*Malus sylvestris*)上被发现<sup>[1]</sup>,目前在世界各地广泛分布。ASPV 在一些敏感的砧木和栽培品种上症状较明显,主要表现为叶片反卷、木质部茎痘斑、果实凹陷、叶偏上性生长等<sup>[2]</sup>。为了进一步控制病毒危害,迫切需要灵敏、快速的病毒检测技术,因此本研究探索了用于检测 ASPV 的 IC-RT-PCR 技术。生物学方法是最传统的植物病毒检测方法,主要是将病毒转移到木本或草本指示植物上,通过病毒在敏感的指示植物上显示一些典型症状来确定病毒的存在。刘福昌等利用生物学方法对我国苹果、梨受 ASPV 感染情况进行了大规模的病毒筛查,结果显示该方法可有效鉴定 ASPV,其缺点是周期长、易受季节和环境等因素影响<sup>[3]</sup>。基于基因组学的发展,国内外研究人员已获得 ASPV 的基因组序列<sup>[4]</sup>,以此为基础,并进一步开始探索利用 PCR 技术进行病毒检测。早在 1998 年 Nemchinov 等即开始探索利用 RT-PCR 技术检测 ASPV 并取得了成功<sup>[5]</sup>。我国从 20 世纪末开始了苹果病毒的 RT-PCR 检测研究,侯义龙等首先探索建立了 ASPV 的 RT-PCR 检测体系,并对一些田间样本进行了小规模检测<sup>[4,6]</sup>。RT-PCR 技术的缺点在于其稳定性较差,提取高质量苹果、梨核酸较难,而核酸中的杂质影响 DNA 聚合酶的稳定性,因而有较多 PCR 检测结果不稳定的报道<sup>[7]</sup>。为了提高 PCR 反应的稳定性,一些基于 PCR 技术的新技术被开发并不断完善。免疫捕获 RT-PCR(immunocapture RT-PCR, IC-RT-PCR)是近年来新发展起来的一种联合血清学和分子生物学方法的检测技术。IC-RT-PCR 首先利用抗血清捕获病毒粒子,再进行 RT-PCR 反应,解决了因病毒含量和

核酸纯度低影响扩增的问题。基于 IC-RT-PCR 的优势,本研究探索利用 IC-RT-PCR 技术检测 ASPV,从而希望获得一种可有效检测 ASPV 的技术体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

苹果植株购自浙江,海棠和杏样品取自吉林九台。35 株毛樱桃样品取自黑龙江省哈尔滨市,其中 20 株取自东北林业大学校园,其他为哈尔滨街边绿化苗木。

### 1.2 引物

引物 ASPV1、ASPV2 序列分别为:5'-GAGCTCATAGGT-GCGTTCATCAT-3'、5'-CTCGAGTCACTTCCTGATGGATA-AA-3',由 TaKaRa 公司合成。

### 1.3 总 RNA 提取

取新鲜的植物叶片约 0.05 g,在液氮中迅速研磨,转入至 1.5 mL 离心管中,再向离心管中加入 490  $\mu$ L CTAB 缓冲液和 10  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇,至振荡器上混匀,65  $^{\circ}$ C 恒温水浴 10 min,其间上下颠倒离心管使混合溶液混匀;加入与混合液等体积的三氯甲烷/异戊醇(体积比为 24:1),颠倒至均匀,12 000 r/min 离心 5 min;弃沉淀,抽取上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中,再次加入与上清液等体积的三氯甲烷/异戊醇(24:1),混匀,12 000 r/min 离心 5 min;弃沉淀,抽取上清至已加入 2 倍体积的无水乙醇的 1.5 mL 离心管中,混匀,12 000 r/min 离心 5 min;弃上清,加入 300  $\mu$ L TE 溶解沉淀,12 000 r/min 离心 5 min;弃沉淀,吸上清液至新的 1.5 mL 离心管中,加入 1/10 体积的醋酸钠(NaAc, pH 值=5.2)、3 倍体积的无水乙醇,混匀,12 000 r/min 离心 5 min;弃上清,加入 50  $\mu$ L 去离子水溶解,低温保存。

### 1.4 RT-PCR

RT-PCR 反应体系参见文献[4]。

### 1.5 IC-RT-PCR

IC-RT-PCR 是多抗血清吸附法和 RT-PCR 法的结合,具体步骤如下:(1)在 0.5 mL PCR 管中加入 200  $\mu$ L 的碳酸盐缓冲溶液(pH 值=9.6)稀释的抗血清(稀释 100 倍),37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h,弃包被液。(2)加入 200  $\mu$ L PBST 洗管,弃洗

收稿日期:2013-12-19

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(编号:DL13EA06-3)。

作者简介:李丽丽(1978—),女,辽宁阜新人,博士,助理研究员,主要从事经济林研究。

通信作者:杨洪一,男,博士,副教授,主要从事微生物学研究。

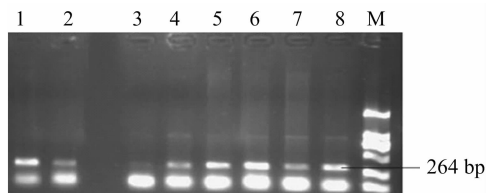
E-mail: yhyil@sohu.com。

液,重复 2 次。(3)加入 200  $\mu\text{L}$  感病植物叶片汁液的上清液 [0.2 g 感病鲜叶 + 2 mL 0.02 mol/L PBS 缓冲液 (pH 值 = 7.2), 6 000 r/min 离心 2 min], 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。(4)弃抗原液,加入 200  $\mu\text{L}$  PBST 洗涤 3 次,每次洗涤 3 min,去离子水洗涤 1 次,短暂离心,用移液器吸去离心管底部的余液。(5)直接在吸附了植物病毒的 PCR 管中进行反转录,体系 20  $\mu\text{L}$  (Buffer 5  $\mu\text{L}$ 、反转录酶 5 U、RNasin 40 U、20  $\mu\text{mol/L}$  随机引物 1  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs 2  $\mu\text{L}$ ), 42  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h,之后进行 PCR 反应。

## 2 结果与分析

### 2.1 RT-PCR 及克隆测序

以苹果叶片为试材,采用改进的 CTAB 法提取苹果总 RNA,以其为模板,应用 ASPV 特异性引物对 ASPV1/ASPV2,通过 RT-PCR 反应扩增 ASPV 的特异性片段。经过优化反应体系,扩增出预期大小为 264 bp 的特异性条带(图 1)。



M—DL 2000 Marker; 1—8—8个苹果样品

图1 利用RT-PCR技术检测ASPV

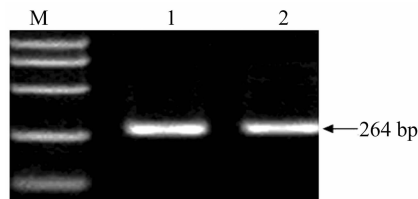
利用 DNA 凝胶回收试剂盒对特异片段进行回收、克隆、测序,获得了 264 bp 的 ASPV 特异序列。将获得的测序结果利用网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的 BLAST 工具在 GenBank 中进行检索。结果表明,该序列与 GenBank 中 ASPV 其他分离物的同源性为 79% ~ 93%,同源性最低的为收录号为 HQ339957 的法国分离物 SB12452 和收录号为 AF057035 的美国分离物 ALV 等;与收录号为 FJ619184 的中国分离物 1615 的同源性最高,达到 93%。

### 2.2 IC-RT-PCR 结果

以苹果叶片为试材,以 CTAB 缓冲液提取叶片粗提液,探索建立 ASPV 的 IC-RT-PCR 检测技术体系。以 ASPV 的抗血清包被薄壁管,捕获感病叶片粗提液中的 ASPV 病毒粒子,利用 ASPV 特异性引物,先采用 RT-PCR 法进行病毒 RNA 的反转录,再进行 PCR 扩增,最终扩增出 ASPV 的特异片段,该方法可有效检测 ASPV,且对栽培苹果、海棠、杏、樱桃样品的检测皆有效(图 2)。利用 IC-RT-PCR 检测技术体系,共对 8 个栽培苹果样品、1 个杏样品、1 个海棠样品、35 个毛樱桃样品进行了病毒检测,结果显示,苹果、杏、海棠样品皆受 ASPV 感染,19 个毛樱桃样品受 ASPV 感染。

## 3 讨论

当前植物病毒检测方法主要为血清学方法及 RT-PCR 为主的分子生物学方法。由于血清学检测方法灵敏度不高,因此不适合检测病毒含量低的植物;而 RT-PCR 虽然灵敏度较高,但极易出现假阳性。IC-RT-PCR 具有上述 2 种方法的优点,利用抗血清特异性结合病毒粒子,再通过 PCR 扩增提高灵敏度。许多植物叶片中多酚及多糖类物质较多,提取高质量 RNA 较困难;提取产物中容易残留杂质,这些杂质很



M—DL 2000 marker; 1—2—2个苹果样品

图2 利用IC-RT-PCR技术检测ASPV

难除去,抑制了后续的 RT-PCR 反应<sup>[7]</sup>。IC-RT-PCR 无需提取 RNA,仅需病毒叶片的粗提液,极大地简化了操作步骤,也使得 PCR 反应可以不受多酚和多糖影响,从而使检测结果相对准确。

尽管 IC-PCR 需要抗血清与免疫捕获步骤,但对苹果、草莓、樱桃等难以分离优质核酸树种的病毒检测有独特的优势。IC-PCR 技术已被用于检测苹果褪绿叶斑病毒 (apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、草莓潜隐型环斑病毒 (strawberry latent ringspot virus, SLRSV)、葡萄卷叶伴随病毒 1 (grapevine leafroll-associated virus 1, GLRaV-1)、草莓轻型黄边病毒 (strawberry mild yellow edge virus, SMYEV) 等病毒<sup>[8]</sup>。在检测 SMYEV 的研究中,常规 PCR 无扩增产物,而 IC-RT-PCR 对不同的引物都可以很好地扩增<sup>[9]</sup>。

ASPV 在我国危害较严重,植株带毒率普遍较高。刘福昌等报道我国的渤海湾、黄河故道和西北高原苹果主产区主栽苹果品种和营养系矮生砧木普遍受 ASPV、ACLSV、ASGV 的侵染,其中 ASPV 带毒率普遍高于 50%,金冠、元帅苹果品种的带毒率则高于 80%<sup>[3]</sup>。王国平等研究结果表明,我国北方梨产区主栽品种上 ASPV 的平均带毒率为 61.8%<sup>[10]</sup>。近年来,利用分子生物学技术检测 ASPV 的带毒率差异较大 (26.3% ~ 86.5%)<sup>[6,11-12]</sup>,但多数带毒率较高。本研究中的带毒率也较高,可能与 IC-RT-PCR 检测灵敏度较高有关,也可能本研究中选取的试材较特殊且总体样本量较小。关于 ASPV 感染杏的相关报道较少,已有报道中 ASPV 主要侵染苹果和梨,ASPV 自然寄主是森林苹果、三叶海棠 (*Malus sieboldii*)、梨属 (*Pyrus*) 植物及花楸属 (*Sorbus*) 植物,近年来也有侵染毛樱桃和榲桲的报道<sup>[13-14]</sup>,因而下一步有必要对大量杏样本进行大规模筛查。此外,本研究也发现了大量 ASPV 与 ASGV、ACLSV 混合感染的情况,说明当前苹果 3 种潜隐病毒的危害较严重。综合分析来看,尽管我国自 20 世纪 90 年代初就开始了脱毒研究,但当前 ASPV 感染率未见明显降低,说明控制该病毒的传播和扩散仍较重要,有必要进一步加强病毒检测研究,严格无病毒苗木繁育管理。

## 4 结论

本研究建立了利用 IC-RT-PCR 技术检测 ASPV 的技术体系,对栽培苹果、海棠、杏、毛樱桃样品皆可有效检测。IC-RT-PCR 无需提取 RNA,只需病毒叶片的粗提液,步骤简单,适用于果树病毒检测。

### 参考文献:

- [1] Jelkmann W. Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein

王亚男,黄培华,樊宝良.一种高通量快速鉴定重组子方法的建立[J].江苏农业科学,2014,42(5):65-66.

# 一种高通量快速鉴定重组子方法的建立

王亚男<sup>1</sup>,黄培华<sup>3</sup>,樊宝良<sup>1,2</sup>

(1.河北农业大学动物科技学院,河北保定 071000; 2.河北工程大学农学院,河北邯郸 056038;

3.河北工程大学教育技术中心,河北邯郸 056038)

**摘要:**利用添加了 RNaseA 的 1X cracking buffer 直接裂解细菌增强观测效果,排除 RNA 干扰,通过琼脂糖凝胶电泳与空载体质粒进行比较,建立一种高通量快速鉴定重组子方法。该方法方便易行,大大提高了工作效率。

**关键词:**cracking buffer;直接裂解;RNaseA;重组子鉴定;克隆鉴定;优化方法

**中图分类号:** Q784 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0065-02

在分子生物学研究中,筛选阳性重组质粒 DNA 是非常重要的步骤之一,由于受连接效率、转化效率等多种因素的制约,筛选阳性重组子成为一项十分繁琐复杂的工作。蓝白斑筛选(Lac Z 的 a 互补)通过颜色反应区分阴阳性克隆,出现假阳性概率较高;PCR 法鉴定重组克隆<sup>[1]</sup>需事先设计相应引物,限制性内切酶酶切鉴定法<sup>[2]</sup>需提取质粒 DNA,反应所需材料成本较高,需要时间长。近几年人们建立了一些快速鉴定重组质粒的方法,但有的需要使用苯酚/氯仿/异戊醇(体积比 25:24:1)<sup>[3]</sup>等毒性较高的材料,有的裂解缓冲液成分复杂<sup>[4-5]</sup>,有的需要昂贵的试剂盒<sup>[6]</sup>,而利用 1% SDS 一步裂解法<sup>[7]</sup>获取质粒 DNA 的方法则需要较长的摇菌或培养转化平板的时间。笔者在科研实践中不断地总结了很多筛选方

法,从传统的碱裂解质粒 DNA 的原理出发,逐步建立了一种更为简捷快速且成本低廉的重组子鉴定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 大肠埃希菌 JM109 和 T-simple 载体以及转化平板由笔者所在实验室保存提供。克隆片段为 560 bp 的猪 2 型圆环病毒核衣壳蛋白基因部分片段,由笔者所在实验室扩增得到。

1.1.2 试剂 1X cracking buffer(1.0 mol/L NaOH,0.5 mol/L EDTA,1% SDS)为自行配置,RNaseA(10 mg/mL),氨苄青霉素(100 mg/mL)。Tris 碱、EDTA 和冰乙酸等试剂购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.1.3 培养基 LB 液体培养基:10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母提取物,10 g NaCl,1 000 mL 蒸馏水,高压灭菌。LB 固体培养基:15 g 琼脂糖,1 000 mL LB 液体培养基,高压灭菌(配制培养基所用制剂购自上海生工生物工程技术服务有限公司)。

收稿日期:2013-09-18

基金项目:国家转基因重大专项(编号:2013ZX08006-005)。

作者简介:王亚男(1987—),女,河北承德人,硕士研究生,主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究。E-mail:sxdc1987@sina.cn。

通信作者:樊宝良。E-mail:fanbl119@sina.vip.com。

yellow disease and their relationship with potex- and carlavirus [J]. Journal of General Virology,1994,75(7):1535-1542.

[2] Kundu J K. The application of RT-PCR assay for the detection of apple stem pitting virus and apple stem grooving virus in four apple cultivars[J]. Plant Protection Science,2002,38(1):13-17.

[3] 刘福昌,王焕玉. 苹果潜隐病毒(Latent virus)研究 II. 苹果品种和矮生砧木潜隐病毒鉴定[J]. 植物病理学报,1989,19(4):193-197.

[4] 侯义龙. 果树主要病毒 RT-PCR 检测体系的建立、优化及病毒特异 DNA 片段克隆测序研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2000:5-60.

[5] Nemchinov L, Hadidi A, Faggioli F. PCR-detection of apple stem pitting virus from pome fruit hosts and sequence variability among viral isolates [C]//17th International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops. Bethesda: International Society Horticultural Science Louvain,1997:67-74.

[6] 张开春,侯义龙,胡文玉,等. 采用 RT-PCR 技术检测苹果病毒[J]. 果树学报,2001,18(6):370-371.

[7] Hull R. 马修斯植物病毒学[M]. 范在丰,李怀方,韩成贵,等译. 北京:科学出版社,2000:5-60.

[8] 杨洪一. 草莓病毒分子检测及其部分基因组序列分析[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2005.

[9] Kaden-Kreuziger D, Lamprecht S, Martin R R, et al. Immunocapture polymerase chain reaction assay and ELISA for the detection of strawberry mild yellow edge associated potexvirus [J]. Acta Hort, 1998(385):33-40.

[10] 王国平,洪霓,张尊平,等. 我国北方梨产区主栽品种病毒种类的鉴定研究[J]. 中国果树,1994(2):1-4.

[11] 侯雨萱,洪霓,邓晓云,等. 砂梨上苹果茎痘病毒的调查分析及 RT-PCR 与 TC-RT-PCR 检测研究[J]. 果树学报,2005,22(4):343-346.

[12] 牛建新,朱军,马兵钢,等. 库尔勒香梨的苹果茎痘病毒 cDNA 探针检测技术研究[J]. 中国农业科学,2004,37(1):99-105.

[13] Dhir S, Tomar M, Thakur P D, et al. Molecular evidence for apple stem pitting virus infection in India[J]. Plant Pathology,2010,59(2):393.

[14] Mathioudakis M M, Maliogka V I, Dovas C I, et al. First record of the apple stem pitting virus (ASPV) in quince in Greece[J]. Journal of Plant Pathology,2006,88(2):225.