西北农业学报 2006, 15(2): 54~58
*Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*

# 3 种梨树病毒 cDNA 探针检测

马兵钢, 牛建新*, 张虎平
(石河子大学农学院园艺系, 新疆兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆石河子 832003)

摘 要: 利用 Biotin-16-dUTP 标记的cDNA 探针分子杂交检测分析了新疆梨树上的3 种主要病毒(梨环纹花叶病毒、梨脉黄病毒、苹果茎沟病毒)并优化了杂交反应体系。结果表明, 这 3 种病毒探针的检测灵敏度分别为 5、10 和 10 pg。用文中的方法提取的 RNA 均能在 $10^{-3}$ 稀释后显色。该方法与 RT-PCR 方法对样品带毒状况的检测结果一致。

关键词: 梨脉黄病毒; 梨环纹花叶病毒; 苹果茎沟病毒; cDNA 探针
中图分类号: S436.612.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2006)02-0054-05

# Detection of Three Pear Viruses by cDNA Probe

MA Bing-gang, NIU Jian-xin* and ZHANG Hu-ping
(Department of Horticulture, College of Agriculture, Shihezi University, Key Laboratory of Oasis Ecology Agriculture of Xinjiang Bingtuan, Shihezi Xinjiang 832003, China)

**Abstract**: This paper used cDNA probe molecular hybridization assay to detect three economically important viruses on Xinjiang's commercial pear cultivars: Pear vein yellows virus (*Foveavirus*), Pear ring pattern mosaic virus (*Trichovirus*), Apple stem grooving virus (*Capilloviru*), and to optimize hybridization reaction system. The results indicated cDNA probe coloration sensitivity of these three symptomless viruses are 5 pg, 10 pg and 10 pg differently. Total RNA isolated by this assay can coloration after diluted in $10^{-3}$ times. We gained identically detection results with RT-PCR assays to several samples.

**Key words**: PRPMV; PVYV; ASGV; cDNA probe

检测和鉴定果树病毒的传统方法是指示植物法。经过几十年筛选, 国际上已经确认了成套标准指示植物。该法对鉴定目前已知的果树病毒, 可靠性很高, 但需时较长且要大量人力物力。血清学方法较指示植物法检测果树病毒的灵敏性和检测速度大为提高, 特异性增强。目前已经成为常规的果树病毒检测和鉴定方法。应用 ELISA 方法的报道很多, 如 Kalashyan 等[1] 对马铃薯 Y 病毒和李痘病毒进行了鉴定, Jelkmann 等[2] 对苹果茎痘病毒的鉴定。分子生物学技术与指示植物法和血清学方法相比检测果树病毒有其独特的优势, 该技术检测病毒的灵敏性比上述方法高出几个数量级, 可以检测到用上述方法检测不到的病毒, 而且特异性更强、速度更快。如 Wetzel 等[3] 利用 IC-PCR 技术检测了李茎痘病毒。并有许多类似的报道[4~7], 从分子水平上研究果树病毒, 发掘果树病毒基因组中潜在的遗传信息, 用于果树病毒分类、亲缘关系分析等基础理论研究, 根据病毒基因组序列分析制定出了基因工程培育抗病毒果树新品种的战略, 为果树病毒的防治开辟了新的途径[5,8~10]。

我国对果树病毒病的研究起步较晚。20 世纪 80 年代初才开始对我国三大苹果主产区(渤海湾产区、黄河故道产区、西北高原产区)的主栽品种

* 收稿日期: 2005-08-01 修回日期: 2005-11-03
基金项目: 国家科技攻关计划引导项目(2003BA546C); 国家自然科学基金项目(30360066)。
作者简介: 马兵钢(1972-), 博士, 副教授, 主要从事果树与生物技术研究。
* 通讯作者: 教授, 博士生导师, 主要从事果树生物技术与育种研究。Email: nix105@163.com.

进行病毒种类鉴定。我国报道的梨病毒有 6 种分别为: 梨脉黄病毒、梨环纹花叶病毒、苹果茎沟病楹梓矮化病毒、苹果锈果类病毒和梨锈皮类病毒, 其中前 3 种的带毒株率分别为 61.8%、44.3%、32.8%[11]。本研究利用非放射性标记 cDNA 探针杂交检测新疆库尔勒香梨上 3 种潜隐病毒, 并研制了相关检测试剂盒, 为香梨无病毒规范化生产奠定基础。

# 1　材料和方法

## 1.1　供试材料

梨树材料　用于核酸提取的组织分别为库尔勒香梨当年或 1 a 生枝条的周皮及催芽茎尖、叶片。采集地点库尔勒 28 团、29 团、沙依东园艺场。

无病毒对照　以杜梨实生苗为对照。

## 1.2　主要试剂

1.2.1　引物　以下引物分别根据 Genbank 中相关序列设计: PRPMV 根据 D14996[12]; PVYV 根据 D21828[13]; ASGV 根据 AB004063[14]。在上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

引物序列及相应的 RT-PCR 产物见表 1。

1.2.2　试剂及主要仪器　4 种碱基混合物 (dNTPs)、Ex Taq DNA 聚合酶、核酸标准分子量 Wide Range DNA Ladder Marker 购自大连宝生物公司。其余试剂为国产分析纯。PCR 仪为 BIO-RAD MyCycler 型 DNA 自动扩增仪。

表 1　引物序列及相应的 RT-PCR 产物

**Table 1　Primer sequences and their RT-PCR products**

| 引物 Primer | 序列 5′-3′ Sequences 5′-3′ | 产物 Products |
|---|---|---|
| PRPMV | | |
| Sense | TGGAACAGACACTGGATGCC | 623 bp |
| Antisense | ACACTCCAATTAAATACCATGACTCT | |
| PVYV | | |
| Sense | TGGAACCTCATGCTGCAAACTC | 355 bp |
| Antisense | CTTTACTAAAAAGCATAAATACTTGTTGGT | |
| ASGV | | |
| Sense | TAGGCAGAACTCTTTGAACGAATGT | 256 bp |
| Antisense | TTGTCCTTCAGTACGAAAAAGCCTT | |

## 1.3　方 法

1.3.1　梨树组织中总核酸的提取　从贮藏于 4 ℃的 1~2 a 枝上取大约 0.1 g 带芽的周皮, 置于研钵中, 加入 1 mL 研磨缓冲液 (6 mol/L 盐酸胍, 0.2 mol/L NaAc, pH5.2, 25 mmol/L EDTA, 1 mol/L KAc, 2.5%PVP-40) 充分研磨; 将 500 μL 匀浆转入 2 L EP 管中, 加入 100 μL SDS (10%); 70 ℃温浴 5 min, 间歇摇动几次, 然后冰浴 5 min; 13 000 g 离心 10 min, 取上清 300 μL 转入一个新管中; 加入 300 μL NaI 溶液 (6 mol/L, 用 0.15 mol/L $Na_2SO_3$ 稳定), 150 μL 乙醇 (99.6%), 25 μL 硅土悬液 (1 g/mL silica particles; Sigma S5631, pH2), 室温放置 10 min, 间歇摇动几次; 6 000 g 离心 1 min, 弃去悬液, 沉淀重悬于 500 μL 洗涤缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.05 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 50%乙醇), 重复洗涤一次, 然后重悬于 150 μL TE (10 mol/L Tris-HCl pH7.5, 0.1 mol/L EDTA), 70 ℃温浴 4 min 解脱核酸; 13 000 g 离心 5 min, 上清液转入一个新的离心管中于 -20 ℃贮存。

1.3.2　梨树病毒的 cDNA 探针检测体系　非放射性标记 cDNA 探针的制备: 以新疆兵团绿洲生态农业重点实验室保存的含有目的 DNA 片段的质粒为模板, 通过 PCR 方法合成生物素标记的 DNA 探针。所用 dNTP 底物中, Biotin-16-dUTP 与普通 dNTP 的比例为 1∶12。50 μL 标记扩增体系包含: 10×Ex Taq 酶缓冲液 5 μL、质粒 DNA 2 μL、上游引物 3 μL、下游引物 3 μL、dNTPs 3.575 μL、Ex Taq 0.5 μL、dd $H_2O$ 32.925 μL。其中 3.575 μL dNTPs 包括 10 mmol/L dATP 0.5 μL、10 mmol/L dCTP 0.5 μL、10 mmol/L dGTP 0.5 μL、10 mmol/L dTTP 0.325 μL、1 mmol/L Bio-16-dUTP 1.75 μL。PCR 扩增条件: 94 ℃预变性 3 min, 然后 94 ℃变性 30 s; 62 ℃退火 30 s; 72 ℃延伸 1 min, 共 34 个循环, 最后 72 ℃延伸 7 min。PCR 扩增产物通过凝胶电泳并用 UNIQ-10 Gel Extraction Kit (Sangon) 回收进行纯化。或者用 1/10 体积 4 mol/L LiCl 和 3 倍体积无水乙醇, -20 ℃沉淀 2 h, 然后 70%乙醇洗涤, 溶于 50 μL TE (pH8.0)。

探针显色灵敏度的检测　将 cDNA 探针用紫外法测定含量, 将探针经一系列稀释, 在硝酸纤维素膜上各点 1 μL, 进行显色反应。

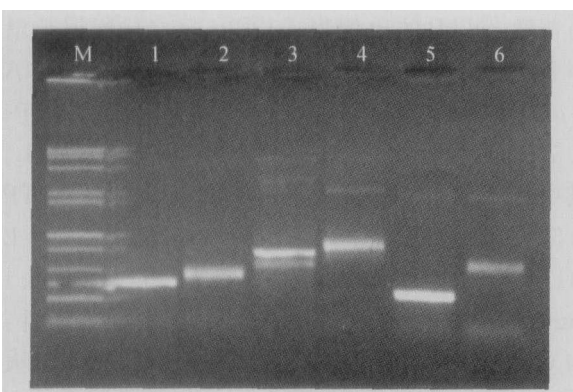
RNA 点杂交方法的改进　点杂交常规方法耗时长,严重限制了其在实际检测工作中的应用,为此对方法进行了改进。研究发现常规法中很多步骤所用时间可以缩短,改进方法的具体步骤与常规法相同,不同之处在于采用尼龙膜或硝酸纤维素膜为固相载体,不需乙醇处理即可直接点样;预杂交时间 20 min;杂交 1.5 h;洗膜时用 0.1× wash solution 42℃下洗膜每次只需 5 min;用 bufferII 封闭 20 min;显色前用 buffer I 洗涤每次 l0 min;显色只需 1 h 即可。

病毒样品的检测　依据香梨病毒核酸斑点杂交技术,设计并组装了梨主要病毒核酸斑点杂交检测试剂盒。利用所建立的库尔勒香梨病毒检测试剂盒对 10 份样品进行检测。具体方法按试剂盒各操作步骤进行。

## 2　结果与分析

### 2.1　梨树组织中总核酸的提取

从梨组织提取总核酸,影响纯度的主要因素是杂蛋白、多糖和酚类等污染物,这些物质的存在严重影响 cDNA 探针的合成,纯度低的总 RNA 模板得不到扩增产物。本试验所采用的方法提取的总核酸基本无杂蛋白、多糖和酚类等污染物的干扰。从操作的可行性及消耗时间等方面考虑,用笔者的方法可作为适宜于病毒快速检测时梨组织的总核酸提取方法。




1. PVYV 对照 PCR 产物 Amplification product as a control of PVYV; 2. PVYV 标记探针 PCR 产物 Labeled PCR product of PVYV; 3. PRPMV 对照 PCR 产物 Amplification product as a control of PRPMV; 4. PRPMV 标记探针 PCR 产物 Labeled PCR product of PRPMV; 5. ASGV 对照 PCR 产物 Amplification product as a control of ASGV; 6. ASGV 标记探针 PCR 产物 Labeled PCR product of ASGV

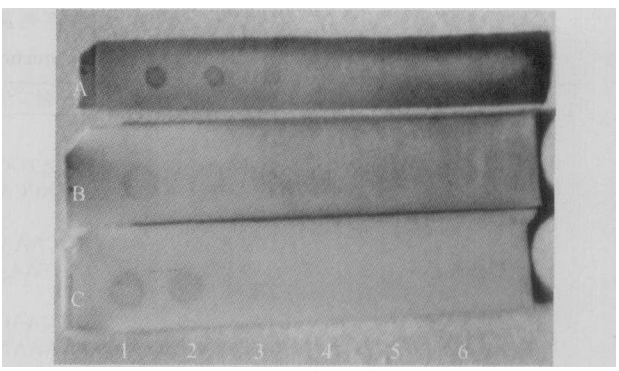
图 1　用 PCR 标记探针的电泳分析

**Fig. 1　Agarose gel analysis of Biotin labeled cDNA probe by PCR amplification**

### 2.2　梨树病毒的 cDNA 探针检测体系

2.2.1　非放射性标记 cDNA 探针的鉴定　PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖电泳后,体系中加入 Biotin-16-dUTP 的扩增产物均较相应的未标记扩增产物稍大,这是由于扩增片段中掺入了 Biotin-16-dUTP,因此分子量较大,泳动较慢,亦表明 PCR Biotin 探针标记成功(图 1)。

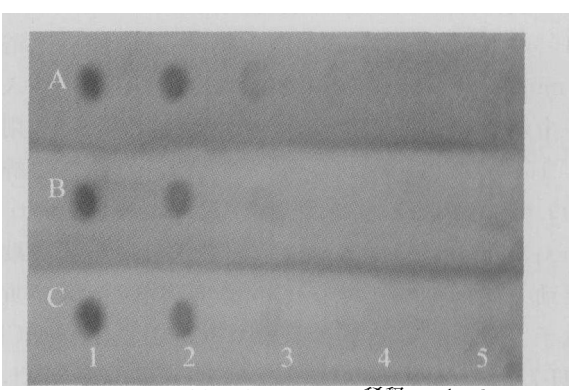
2.2.2　探针显色灵敏度的检测　将探针按 50 pg/μL、10 pg/μL、5 pg/μL、1 pg/μL、0.5 pg/μL、0 pg/μL 系列稀释,进行显色反应。结果表明:显色深浅与探针浓度成正相关,当 PRPMV 稀释至 5 pg 仍能显色,即 PRPMV 探针显色灵敏度为 5 pg;ASGV 探针显色灵敏度为 10 pg;PVYV 探针显色灵敏度为 10 pg(图 2)。




A. PRPMV, B. ASGV, C. PVYV;
1. 探针浓度 50 pg/μL Probe concentration at 50 pg/μL;
2. 探针浓度 10 pg/μL Probe concentration at 10 pg/μL;
3. 探针浓度 5 pg/μL Probe concentration at 5 pg/μL;
4. 探针浓度 1 pg/μL Probe concentration at 1 pg/μL;
5. 探针浓度 0.5 pg/μL Probe concentration at 0.5 pg/μL;
6. 阴性对照 Negative control

图 2　探针显色灵敏度检测

**Fig. 2　Detection of coloured sensitivity of cDNA probes**




A. PRPMV, B. ASGV, C. PVYV; 1. 稀释 $10^{-1}$ Dilution at $10^{-1}$; 2. 稀释 $10^{-2}$ Dilution at $10^{-2}$; 3. 稀释 $10^{-3}$ Dilution at $10^{-3}$; 4. 稀释 $10^{-4}$ Dilution at $10^{-4}$; 5. 阴性对照 Negative control

图 3　杂交显色敏感性

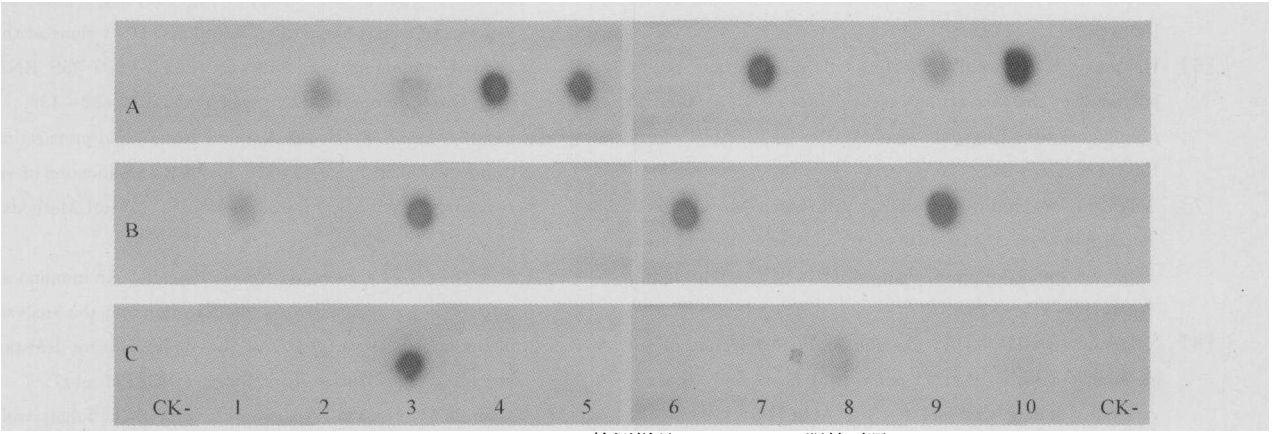
**Fig. 3　Detection of colored sensitivity of blot hybridization**

2.2.3　RNA 点杂交的显色敏感性　将 RNA 样

品经过 $10^{-1}$、$10^{2}$、$10^{3}$、$10^{4}$稀释后, 3 种病毒均能在 $10^{3}$稀释后显色(图 3)。

**2.3　病毒样品的检测**

用库尔勒香梨病毒的核酸点杂交检测试剂盒检测结果表明, 10 份香梨样品中有 7 份带有 PVYV, 占测试样品的 70%, 有 4 份样品带有 PRPMV, 占测试样品的 40%, 有 2 份样品带有 ASGV, 占测试样品的 20%。复合感染 PVYV、PRPMV 的 2 份, 占测试样品的 20%, 复合感染 ASGV、PRPMV 的 1 份, 占测试样品的 10%, 复合感染 ASGV、PVYV 的 1 份, 占测试样品的 10%, 复合感染 ASGV、PVYV、PRPMV 的 1 份, 占测试样品的 10%。所有样品均带有至少 1 种病毒(图 4)。检测样本的带毒状况与用 RT-PCR 分析的结果一致。




A. PVYV, B. PRPMV, C. ASGV; 1～10 检测样品 Samples; CK- 阴性对照 Negative control

图 4　样品检测结果

**Fig. 4　Bolting hybridization detection result of PRPMV, ASGV and PVYV in Korla pear**

## 3　讨 论

**3.1　梨树组织中总核酸的提取**

利用传统方法从植物中提取核酸费力耗时, 不适合大量样品的检测。Levy 等[15] 报道了一种简单的用于检测植物病毒的核酸提取方法。本实验采用硅土吸附法, 用 1～2 a 生枝的皮层为研磨组织, 可以保证测试材料的周年供应。用 ELSIA 或指示植物法则不能做到任意时间操作[16]。实验中使用叶片为试材进行 RT-PCR, 产生的谱带较使用皮层弱, 这可能是因为在叶片中病毒的浓度较低或者叶片中抑制反转录酶、Taq 酶的多糖、酚类等复合物浓度高于皮层组织[17]。使用 6 mol/L 盐酸胍代替常规法中的 4 mol/L 硫氰酸胍, 避免了提纯过程中形成氢氰酸的危险。实验省去 BME 并不影响结果, 这样不仅避免了 BME 本身的毒害, 而且增加了规范化检测过程的效率及可操作性。本研究方法省力、快速、简单, 适合大量样品的核酸提取, 取得了理想的效果。

**3.2　梨树病毒的 cDNA 探针检测体系**

核酸探针的制备是杂交成功的关键, 以往多采用同位素标记的探针, 虽然特异性、敏感性较好, 但受同位素防护、高成本及购置放射自显影设备等限制, 而且因同位素衰变而影响检测结果的可靠性, 从而使这项技术广泛应用受到限制。自 Langer 等成功地合成了 Biotin-11-dUTP, 并将其掺入到 cDNA 分子中进行杂交检测。Leary 等[18] 发展了一项迅速、灵敏的斑点杂交技术, 极大简化了核酸杂交过程。生物素标记的 cDNA 探针十分稳定, 在 -20 ℃至少可贮存 1 a, 且不需要同位素实验用的仪器设备, 为应用带来方便。本文建立了香梨主要病毒的常规核酸斑点杂交(NASH)检测技术, 并对其进行了改进, 由常规方法中的 22 h 缩短为 5 h, 极大地减少了检测时间。利用核酸斑点杂交检测技术可直接将标本点在固相载体上杂交, 一次可检测大量标本, 在果树病毒检测方面有巨大应用潜力。

参考文献:

[1]　Kalashyan YA, Bilkey ND, Verderevskaya TD, *et al*. Plum pox potyvirus on sour cherry in Moldova[J]. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 1994, 24, 645～650.

[2]　Jelkmann W, Keim-Konrad R. An immuno capture polymerase chain reaction and plate trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus[J]. J Phytopathol, 1997, 145, 499～504.

[3]　Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, *et al*. A highly sen-

sitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection[J]. J Virol Methods, 1992, 39, 27~37.

[4] Marinho V L A, Kummert J, Rufflard G, *et al*. Detection of apple stem grooving virus in dormant apple trees by using crude extracts as templates for one step RT-PCR[J]. Plant Disease, 1998, (82): 785~790.

[5] Crossley S J, Jacobi V, Adams A N. IC-PCR amplification of apple stem grooving virus isolates and comparison of polymerase and coat protein gene sequences[J]. Acta Hort, 1998, 472, 113~118.

[6] Hammond R, Howell W E, Mink G I, *et al*. Strain-specific polymerase chain reaction assays for discrimination of prunus necrotic ringspot virus isolates[J]. Acta Hort, 1998, 472: 235~242.

[7] Jelkmann W, Keim-Konrad R, Vitushkina M. Complete nucleotide sequences of little cherry closterovirus and virus detection by polymerase chain reaction[J]. Acta Hort, 1998, 472: 315~320.

[8] Nemchinov L, Hadidi A, Faggioli F. PCR-detection of apple stem pitting virus from pome fruit hosts and sequence variability among viral isolates[J]. Acta Hort, 1998, 472: 67~74.

[9] Rott M E, Jelkmann W. Complete nucleotide sequence of cherry necrotic mottle virus[J]. Phytopathology, 2000, (90): 67~72.

[10] Rott M. E, Jelkmann W. Complete nucleotide sequence of cherry necrotic rusty ottle virus[J]. Acta Hort, 2000, 550, 207~212.

[11] 王国平, 洪 霓. 我国落叶果树的病毒病及其研究现状[J]. 中国果树, 1997(3): 43~45.

[12] Sato K, Yoshikawa N, Takahashi T. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of apple chlorotic leaf spot virus[J], J Gen Virol, 1993, 74, 1927~31.

[13] Jelkmann W. Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex and carlaviruses[J]. J Gen Virol. 1994, 75, 1535~1542.

[14] Terauchi H, Magome H, Yoshikawa N, *et al*. Nucleotide sequence of the genome of apple stem grooving capillovirus isolate and construction of an infectious cDNA clone of the genome containing a cauliflower mosaic virus 35S RNA [J]. Ann Phytopathol Soc Japan, 1997, 63, 432~436.

[15] Levy L, Lee I M, Hadidi A. Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid, and MLO nucleic acids[J]. J Virol Methods, 1994, 49, 295~304.

[16] Candresse T, Lanneau M, Revers F, *et al*. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leafspot virus[J]. Acta Horticulturae, 1995, 386: 136~147.

[17] Schmitz M, Noga G. Ausgewahlte pflanzliche Inhaltsstoffe und ihr antioxidatives Potential in hydropHilen und lipopHilen Extracten von pHaseolus vulgaris, Malus domestica und Vitis vinifera Blattern[J]. Gartenbauwissenschaft, 2000, 65: 65~73.

[18] Leary J J Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin labeled DNA probes hybridzed to DNA or RNA immlbiliezd on nitroccllulose: Bio blots[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80(13): 4045~4049.