

从荷兰进口植物中检出南芥菜花叶病毒

Detection of *Arabis mosaic virus* in plants imported from the Netherlands

马新颖^{1,2} 汪琳^{2*} 任鲁风³ 高文娜² 周琦²

(1. 浙江林学院, 临安 311300; 2. 北京出入境检验检疫局, 北京 100026;
3. 本元正阳基因技术有限公司, 北京 100176)

MA Xin-ying^{1,2} WANG Lin^{2*} REN Lu-feng³ GAO Wen-na² ZHOU Qi²

(1. Zhejiang Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China; 2. Beijing Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China; 3. Ben Yuan Zheng Yang Gene Technology Joint-stock Company, Beijing 100176, China)

南芥菜花叶病毒 *Arabis mosaic virus* (ArMV) 是豇豆花叶病毒科 Comoviridae 线虫传多面体病毒属 *Nepovirus* 成员, 主要分布在荷兰、比利时等欧洲国家和美国、加拿大、澳大利亚、新西兰、南非、日本, 我国尚未有报道。该病毒通常采用血清学和鉴别寄主方法进行检测, 但该方法较易出现假阳性, 存在检测时间长, 准确性和灵敏度较低等问题。近几年发展起来的基因芯片技术已经广泛用于人类病毒如乙肝病毒、人类免疫缺陷病毒、严重急性呼吸系统综合征病毒^[1~3]等医学诊断和动物病毒如口蹄疫、禽流感^[4]的检测和检疫, 而应用基因芯片检测植物病毒实例的报道很少, 目前仅用于百合病毒的检测^[5], 在南芥菜花叶病毒的检测中还没有尝试。为了提高该病毒检测的准确性, 作者进行了基因芯片检测技术的研究, 建立了一套快速准确、高通量的植物病毒检测系统。应用该芯片对进口的植物进行筛查, 从荷兰进口的郁金香和唐菖蒲种球中检测出南芥菜花叶病毒。

1 材料与方法

1.1 样本

从荷兰进口的郁金香和唐菖蒲种球。

1.2 引物序列

ArMV_{cp}-d-f: CACGAGGAGTCTGCTACGATATT-TCCTCTACTACTAGCACTGTAGCCCTTG; ArMV_{cp}-d-r: CACGAGGAGTCTGCTACGTGATGTAACACCACCA-

GAAGTCTTTC; 18S-f: CACGAGGAGTCTGCTACAT-GATAACTCGACGGATCGC; 18S-r: CACGAGGAGTCTGCTACCTTGGATGTGGTAGCCGTTT; 标记引物: C-ACGAGGAGTCTGCTAC。

1.3 血清学反应

参照供应商 (Agdia 公司) 推荐的双抗体夹心酶联免疫技术操作程序操作。

1.4 植物总 RNA 的提取及 RT-PCR 反应

参照供应商 (Invitrogen 公司) 推荐的方法, 提取郁金香和唐菖蒲种球的总 RNA。以总 RNA 为模板, 用随机引物反转录合成 cDNA。以合成的 cDNA 为目标, 分别进行南芥菜花叶病毒和 18S rRNA 的扩增。PCR 扩增体系为 25 μ L, 条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 5 个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 标记扩增

以前一次的 PCR 产物作为标记扩增的模板, 进行 PCR 反应, 体系为 10 μ L。10 $\times$ PCR Buffer 1 μ L, dNTP (1 mmol/L, 其中 Cy3-dCTP 0.35 μ mol/L) 0.2 μ L, 标记引物 (50 μ mol/L) 0.4 μ L, TaqDNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.1 μ L, 标记对照 (2 ng/ μ L) 0.3 μ L, 18S rRNA 反应模板 0.2 μ L, 病毒反应模板 0.2 μ L, 去离子水 7.6 μ L。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延

基金项目: 国家“十五”食品安全重大专项资助项目和国家“863”计划资助项目 (2003AA2Z2009)

作者简介: 马新颖, 女, 1971 年生, 助理研究员, 研究方向为植物病毒学, email: maxy015@163.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: wanglin@bjciq.gov.cn

收稿日期: 2006-09-11

伸 10 min;4℃ 保存。

1.6 杂交及洗涤

取 9 μ L 标记反应产物、5 μ L 3 $\times$ Southern 杂交封闭缓冲液和 1 μ L 杂交对照 (500 n mol/L) 混合,95℃ 变性 5 min,迅速冰浴 5 min。芯片杂交盒中加入 200 μ L 去离子水,将芯片正面朝上放进杂交盒中,对准方向放入盖片,通过加样孔将杂交液一次性注入,使其充满盖片和芯片之间空隙,封闭杂交盒,置于 65℃ 恒温环境 30 min。

杂交完毕后,弃去盖片,芯片探针面向下在少量 65℃ 预热的杂交洗液 I (0.3 $\times$ SSC,0.2% SDS) 中漂去残余杂交液,然后将芯片放在铜染色架上,在预热的杂交洗液 I 中用磁力搅拌器中速度搅拌清洗 5 min,再在预热的杂交洗液 II (0.06 $\times$ SSC) 中搅拌清洗 5 min,然后将芯片置于 50 mL 离心管中 2 000 r/min 离心 1 min,置于暗盒室温保存。

1.7 扫描及数据分析

将芯片置于芯片扫描仪中进行扫描,Cy3 标记

用 532 nm 激光管扫描。采用 GenePix Pro4.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 血清学反应检测

检测了八批次郁金香和唐菖蒲种球样品,一批次的郁金香种球和两批次的唐菖蒲种球的检测结果为阳性,表明郁金香和唐菖蒲种球携带有 ArMV,且种球带毒率较高。

2.2 RT-PCR 检测

以血清学检测结果为阳性的郁金香和唐菖蒲的总 RNA 为模板,经 RT-PCR 扩增后,在琼脂糖凝胶电泳中均可扩增出约 200 bp 的片段,与预期片段大小一致。说明扩增的条带是 ArMV 基因组特异扩增得来的(图 1)。同时将扩增条带进行序列测定,将所测的序列在 GenBank 中进行 Blast 检索,结果表明所测序列与 ArMV 的序列同源性最高,为 ArMV *cp* 基因的部分序列,表明从进境郁金香和唐菖蒲中检测到了 ArMV。

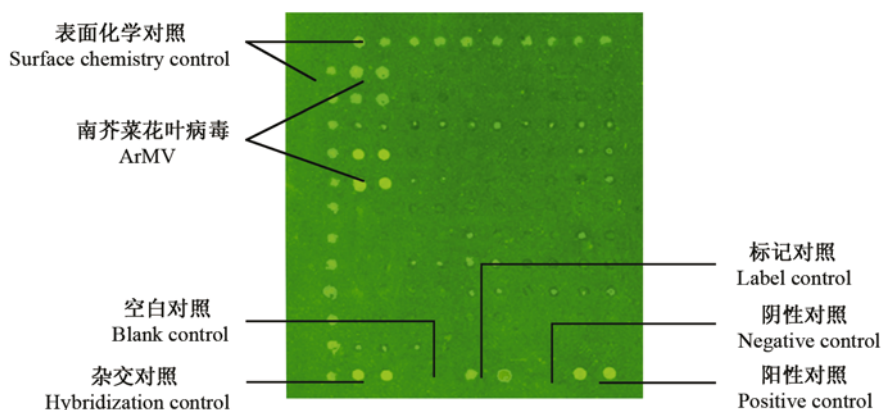


图 1 芯片检测结果

Fig. 1 Detecting result of gene chip

2.3 基因芯片检测

结果显示,郁金香和唐菖蒲在 ArMV 探针位置都有较强的荧光信号,与 RT-PCR 检测结果一致,与空白对照、阴性对照和其它病毒的探针无杂交信号(图 1),说明检测的植物样品中确实存在 ArMV,并且芯片的特异性较好,确保了芯片杂交结果的可靠性,证明基因芯片可用于 ArMV 的日常检测。从杂交结果也可看到南芥菜花叶病毒不同探针杂交信号的强弱程度不同,出现这一现象可能的原因一方面是由于探针与病毒序列的同源性不同而导致的,另一方面是由于探针在 PCR 产物上的位置不同使得二者形成的复合物空间位阻的不同而导致的。

参考文献 (References)

- 1 孙朝晖,郑文岭,张宝,等. DNA 芯片技术检测乙型肝炎病毒及丁型肝炎病毒的初步研究. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(9): 563-564
- 2 吴守丽,严延生,蒋岩. HIV 耐药性检测方法及其临床应用. 中国艾滋病性病, 2004, 10(4): 312-315
- 3 周琦,赖平安,汪琳,等. 基因芯片技术快速检测 SARS 病毒. 检验检疫科学, 2003, 13(5): 33-36
- 4 杨素,花群义,徐自忠,等. 口蹄疫等 5 种动物病毒基因芯片检测技术的研究. 微生物学报, 2004, 44(4): 479-482
- 5 王进忠,贾慧,文思远,等. 百合病毒的 DNA 芯片检测技术研究. 中国病毒学, 2005, 20(4): 429-433