

RT-PCR 法特异性快速检测 黄瓜绿斑驳花叶病毒

张卫东¹ 权永兵^{1,2} 廖力¹ 王建国^{2*} 徐淼锋¹ 迟远丽¹

(1. 珠海出入境检验检疫局技术中心, 广东 珠海 519015; 2. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 根据黄瓜绿斑驳花叶病毒运动蛋白基因序列, 设计并合成了特异性 PCR 检测引物, 建立该病毒的快速检测方法。该方法可以从带毒叶片中扩增到约 591 bp 的片段, 而 TMV 属其他 9 种病毒均无特异性扩增。本方法也适用于带毒种子的检测, 具有准确、灵敏及时效性强等特点, 为进出境植物检疫和农业安全生产提供可靠的技术支持。

关键词: 黄瓜绿斑驳花叶病毒; 运动蛋白基因; 特异性检测

中图分类号: S432.4⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)01-0043-04

Rapid Detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* by RT-PCR

ZHANG Wei-dong¹, QUAN Yong-bing^{1,2}, LIAO Li¹,
WANG Jian-guo^{2*}, XU Miao-feng¹, CHI Yuan-li¹

(1. Inspection Technical Center, Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai, 519015, China; 2. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, 330045, China)

Abstract: In this study specific primers were designed based on the sequence of movement protein gene, a rapid and effective method for cucumber green mottle mosaic virus detection was established. The established detection system amplified band with expected size of 591 bp in infected leaves, but the other 9 viruses of *Tobamovirus* were not. The method, which can also detect CGMMV in seeds, is rapid, accurate and sensitive, providing a reliable technical support for entry-exit inspection and quarantine and safety of agricultural production.

Key words: CGMMV, movement protein, specific detection

黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)为大小约 300 nm × 18 nm 的直杆状 RNA 病毒,烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)成员,典型的种传病毒,主要侵染南瓜、西瓜、甜瓜、小西葫芦等葫芦科植物^[1]。该病毒分布于英国、德国、以色列、巴西、日本等欧亚和南美国家和地区,引起花叶、斑驳和果实腐烂等症^[2-4]。在日本引起“konjak disease”(魔芋病),韩国引起“blood flesh”(西瓜血瓢病),造成严重危害^[5]。我国台湾、山东、辽宁、广西、广东等地区均有发生,给当地的葫芦科农作物造成不同程度减产^[6]。农业部 2007 年 862 号公告公布的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》将其列为重要的对外检疫性有害生物^[7]。

收稿日期: 2010-09-09 修回日期: 2010-10-28

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局课题(2008IK264)资助

作者简介: 张卫东(1979—),男,硕士,主要从事植物检疫性有害生物分子鉴定研究; E-mail: zwdjlq@126.com; * 通讯作者: 王建国,教授,博士, E-mail: ppdjxau@gmail.com。

近年来检疫部门多次从进境种子中截获到该病毒,采用的主要检测方法包括枯斑和指示植物检测法、血清学检测法、酶标免疫吸附法(ELISA)以及免疫电镜检测法^[8]。这些方法存在检测灵敏度低、周期长的局限性,满足不了检验检疫大通关的需求,因此国内外学者对分子水平的检测方法进行了探索,Varveri等^[9]利用IC-RT-PCR方法检测了希腊的CGMMV,赵世恒、Shim、Yoon和Slavokhotova等^[10-13]分别用基于CP基因的RT-PCR方法,对日本、韩国、俄罗斯等地CGMMV病毒的检测进行了有益的探索研究。目前尚未有利用运动蛋白(Movement protein, MP)基因序列进行分子鉴定的研究报道。本试验在克隆鉴定3个CGMMV不同分离物MP基因的基础上,针对MP基因保守序列设计特异性引物,建立RT-PCR快速检测CGMMV的方法。

1 材料和方法

1.1 供试病毒样品

供试病毒样品见表1,其中黄瓜、西葫芦带毒种子由广东省植物保护总站惠赠,带毒南瓜种子由检验检疫口岸截获。

表1 供试病毒样品
Tab.1 Viruses for detection of RT-PCR

中文名 Chinese name	学名 Scientific name	来源 Source
番茄花叶病毒	<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	英国安德珍 Adgen
齿舌兰环斑病毒	<i>Odontoglossum ringspot virus</i> (ORSV)	
番木瓜环斑病毒	<i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV)	
Kyuri 绿斑驳花叶病毒	<i>Kuyri green mottle mosaic virus</i> (KGMMV)	
小西葫芦绿斑驳花叶病毒	<i>Zucchini green mottle mosaic virus</i> (ZGMMV)	
烟草花叶病毒	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	
西瓜花叶病毒2号	<i>Watermelon mosaic virus</i> (WMV-2)	
辣椒轻斑驳病毒	<i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMV)	
车前草花叶病毒	<i>Ribgrass mosaic virus</i> (RMV)	
土传小麦花叶病毒	<i>Wheat soil-borne mosaic virus</i> (WSBMV)	美国阿格迪 Agdia
黄瓜绿斑驳花叶病毒	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (CGMMV-GZ)	辽宁盖州
	(CGMMV-GX)	广西
	(CGMMV-AD)	英国安德珍
	(CGMMV-AG)	美国阿格迪
带毒种子	黄瓜种子 1Cucumber seeds 1	CGMMV-Cu1
Seeds carrying the virus	黄瓜种子 2Cucumber seeds 2	CGMMV-Cu2
	西葫芦种子 Pumpkin seeds	CGMMV-Pu
	南瓜种子 Squash seeds	CGMMV-Sq
		中国台湾

1.2 仪器和试剂

主要试剂及酶类: RNA提取试剂盒(TAKARA Code: D9108A)、dNTP、反转录酶及Taq酶均购自大连宝生物公司。

仪器: 梯度PCR仪(C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD, USA); 电泳仪(PowerPac™ basic, BIO-RAD, USA); 凝胶成像分析系统(Gel Dox XR, BIO-RAD, USA)。

1.3 RT-PCR检测方法

1.3.1 特异性引物设计 依据本实验室克隆得到的CGMMV的MP基因完整序列,参照GenBank发表的序列,利用DNAStar软件包PrimerSelect设计引物。上游引物: 5'-CACCTTTATGTCACATTGTTG-3';

下游引物: 5'-GTGATCGGATTGTAAGCCATC-3', 预期扩增片段大小为 591 pb。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3.2 样品总 RNA 提取 取冷冻样品 0.1 g, 置于预冷的研钵中, 加入液氮, 迅速研磨至粉末状, 利用 RNA 提取试剂盒从样品中提取总 RNA, 溶解于 60 μ L DEPC 处理的 ddH₂O 中, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.3 RT-PCR 检测方法 (1) 反转录合成第一条模板链 cDNA。以总 RNA 为模板, MMV-R 为引物反转录合成 cDNA, 0.2 mL PCR 管中加入: Total RNA 2.5 μ L, 5 倍缓冲液 2 μ L, dNTP 1 μ L, 引物 MMV-R (10 μ mol/L) 2 μ L, 反转录酶 0.5 μ L 补 ddH₂O 至总体积 10 μ L。反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s, 16 $^{\circ}$ C 30 s, 反应结束后将模板于 -4 $^{\circ}$ C 保存备用。

(2) 反应体系及条件的优化。对引物浓度和酶的浓度以及退火温度等进行优化后, 最终确定 PCR 反应体系为: 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, MMV-F 1 μ L, MMV-R 1 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 2.5 U, cDNA 模板 3 μ L, 加 ddH₂O 补足 25 μ L。反应条件为: 预变性 95 $^{\circ}$ C 4 min; 变性 95 $^{\circ}$ C 1 min, 退火 55 $^{\circ}$ C 50 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。

(3) MP 基因片段扩增。按照优化后的反应体系和条件, 以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增产物于 -4 $^{\circ}$ C 保存备用。

(4) PCR 产物检测。取 10 μ L 产物于 $\rho = 1.5\%$ 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并在凝胶成像分析系统上进行分析, 记录结果。

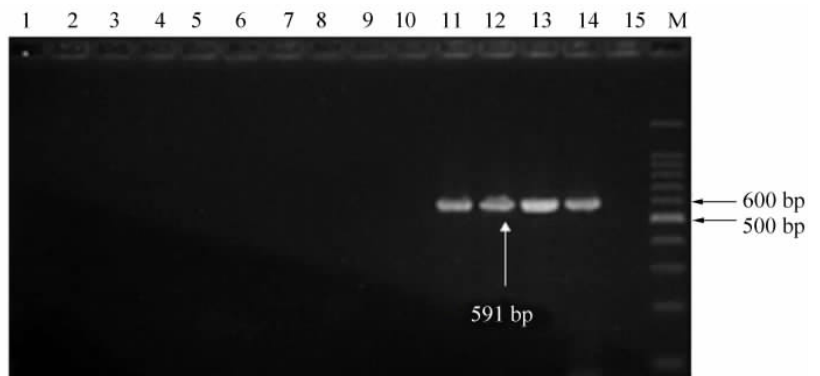
2 结果和分析

2.1 CGMMV 特异性检测

用表 1 中所列的 TMV 属 9 种病毒、WSBMV 和 CGMMV 的 4 个不同株系, 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1 所示: 第 11 - 14 泳道分别为 CGMMV 的辽宁盖州、广西、Adgen 和 Agdia 4 个不同的株系, 均能扩增到 591 bp 的目标片段; 第 1 - 10 泳道为 TMV 病毒属其他 9 种病毒以及一个属外病毒 WSBMV, 均没有扩增出特异性条带, 表明这对引物具有很强的特异性, 能用于黄瓜绿斑驳花叶病毒的特异性检测。

2.2 带毒种子的检测

琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, 利用这对引物可以从感染 CGMMV 的黄瓜、南瓜和西葫芦种子中检测到该病毒, 扩增出 591 bp 的序列, 与预期结果一致, 而阴性对照无扩增产物(图 2), 充分说明该方法可以用于带毒种子的检测, 检测结果准确, 且节省时间和成本, 能满足检验检疫时效性和准确性的要求。



M: 100 bp DNA marker; 1 - 10: 分别为番茄花叶病毒, 齿舌兰环斑病毒, 番木瓜环斑病毒, Kyuri 绿斑驳花叶病毒, 小西葫芦绿斑驳花叶病毒, 烟草花叶病毒, 西瓜花叶病毒 2 号, 辣椒轻斑驳病毒, 车前草花叶病毒, 土传小麦花叶病毒; 11 - 14: 分别为黄瓜绿斑驳花叶病毒盖州、广西、Adgen、Agdia 分离物; 15: 阴性对照。

Lane M: 100 bp DNA ladder marker; Lane 1 - 10: ToMV, ORSV, PRSV, KGMMV, ZGMMV, TMV, WMV - 2, PMMV, RMV, WSBMV; Lane 11 - 14: CGMMV - GZ, CGMMV - GX, CGMMV - AD, CGMMV - AG; 15: Negative control.

图 1 特异性引物扩增检测结果

Fig. 1 RT-PCR results for primer specific detection

3 讨论

国内外已有不同的针对黄瓜绿斑驳花叶病毒检测方法的报道。Lee^[14] 研究了可以检测包括 CGMMV 在内的四种病毒的“cucurbit-virus chip”, 建立了基于 CP 基因的芯片技术(cDNA chip technology) 检测植物病毒的方法, 这是在植物病毒检测领域的首次报道; 邓丛良等^[15] 将纳米磁珠(Magnetic Nano

Particles , MNP) 和 RT - PCR 结合 ,省去了病毒 RNA 抽提过程和病毒抗体的使用 ,直接进行 MNP - RT - PCR 检测 ,缩短了检测时间 ,但该方法的灵敏度比常规 RT - PCR 低 10 倍而且成本更高; Chen 等^[16] 基于 CGMMV 基因组 3' 端非编码区设计特异性引物和探针 ,建立了实时荧光 PCR 特异性检测 CGMMV 的技术 ,提高了检测灵敏度。目前这些方法基本都是针对 CP 基因序列设计引物进行检测 ,而且每个方法的检测对象均是单一的 CGMMV 株系 ,测试样品为感病叶片或带毒种子等单一的植物材料 ,因此都有一定的局限性 ,没有适用于多种不同材料的检测方法。同时 ,这些方法中设计的引物 ,都没有针对 TMV 属其他 CGMMV 的近缘种病毒进行特异性试验。

本试验在总结前人工作的基础上补充不足 ,对 RT - PCR 方法进行改进 ,建立了准确灵敏、时效性高和成本低廉的黄瓜绿斑驳花叶病毒检测方法:

1. 设计引物 扩增出 CGMMV 三个分离物的 MP 基因全序列(分别为 CGMMV - GZ、CGMMV - AD 和 CGMMV - AG) 3 段 MP 基因序列大小均为 795 bp。将这些序列和 GenBank 中的 TMV 属病毒序列进行比对 结果显示 MP 基因在 CGMMV 种内具有很高的保守性 而与 TMV 属的其他种病毒差异很大。因此试验针对 MP 基因设计筛选了引物 特异性更强 检测结果更准确。

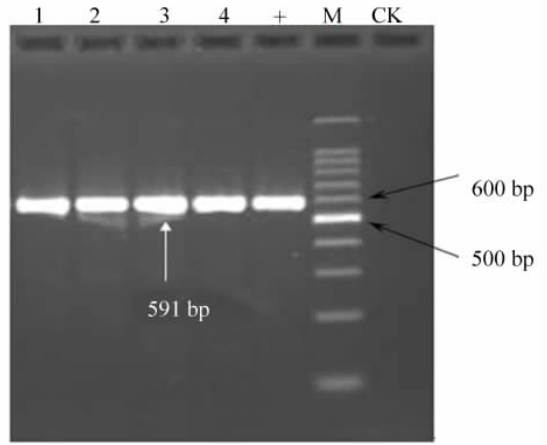
2. 获得 TMV 属 CGMMV 的近缘种病毒 9 种 ,以及一个真菌传杆状病毒属(*Furovirus*) 的土传小麦花叶病毒(WSBMV) 。将这些病毒样品和 4 个 CGMMV 的不同株系按照优化后的 RT - PCR 体系和条件进行序列扩增 结果表明该方法能检出 CGMMV 的 4 个不同株系 ,而其他 10 种测试病毒都没有特异性扩增 ,充分证明该方法具有很高的特异性和准确性。

3. 将该方法用于四种带毒种子(两种黄瓜 ,一种南瓜和一种西葫芦) 的检测 ,也能扩增出 591 bp 的目的片段 ,证明该方法可以直接用于种子中 CGMMV 的检测 ,省去了种植培养再进行检测的程序 ,大大缩短了检测时间 符合检验检疫时效性要求。

目前在检疫工作中 ,病毒检测常用的是 ELISA 和生物学方法 ,本试验基于 RT - PCR 技术 ,建立针对 CGMMV 的 MP 基因进行检测的方法 ,具有更强的特异性和灵敏性 ,并且节省时间和成本 检测结果准确可靠 符合检验检疫时效性和准确性要求 ,在植物病毒检测中具有很高的实用价值 ,对其他有害生物分子检测技术的研究具有借鉴意义。

参考文献:

[1]Aniworth G C. Mosaic disease of cucumber[J]. Ann Appl Biol ,1935 ,22: 55 - 67.
 [2]Kim S M , Lee J M , Yim K O , et al. Nucleotide sequences of two Korean isolates of *Cucumber green mottle mosaic virus* [J]. Mol Cells ,2003 ,16(3) : 407 - 412.
 [3]Suehiro N. A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT - PCR[J]. Journal of Virological Methods ,2005 ,125: 67 - 73.
 [4]Hollings M , Komuro Y , Tochihara H. *Cucumber green mottle mosaic virus* CMI/AAB descriptions of plant viruses [J]. Association of Applied Biologists ,1975: 154.
 [5]Choi G , Choi G S. Occurrence of two tobamovirus diseases in cucurbits and control measures in Korea [J]. Plant Pathology Journal 2001 ,17(5) : 243 - 248.
 [6]陈京 ,李明福. 新入侵的有害生物: 黄瓜绿斑驳花叶病毒 [J]. 植物检疫 ,2007 ,21(2) : 94 - 96.



M: 100 bp DNA marker; 1 - 4: 分别为黄瓜 - 1 ,黄瓜 - 2 ,南瓜 ,西葫芦; + : 阳性对照; CK: 阴性对照。
 Lane M , 100 bp DNA ladder marker; Lane 1 - 4: CGMMV - Cu1 , CGMMV - Cu2 , CGMMV - Sq , CGMMV - Pu; + : Positive control; CK: Negative control.

图 2 带毒种子中 CGMMV 病毒 RT - PCR 检测结果
 Fig. 2 RT - PCR results for detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in infected seeds

- [3] Penafiel S R. Determination of plant species for fuel breaks [J]. *Sylvatrop*, 1984, 12(9): 21–23.
- [4] Dickinson K J M, Kirkpatrick J B. The flammability and energy content of some important plant species and fuel components in the forests of southern Tasmania [J]. *J Biogeography*, 1985, 2(12): 121–134.
- [5] Wilgen B W. The role of vegetation structure and fuel chemistry in excluding fire from forest patches in the fire prone fynbos shrub lands of South Africa [J]. *Journal of Ecology Oxford*, 1990, 78(1): 210–222.
- [6] 陈存及, 何宗明, 陈东华, 等. 37 种针阔树种抗火性能及其综合评价的研究 [J]. *林业科学*, 1995, 31(2): 42–51.
- [7] 薄颖生, 韩恩贤, 韩刚, 等. 陕西省生物防火林带树种选择研究 [J]. *西北林学院学报*, 1997, 12(4): 24–30.
- [8] 王得祥, 张景群, 吴宽让, 等. 可燃性气体逸出指标应用于树种燃烧性评价的研究 [J]. *西南林学院学报*, 1999, 19(3): 176–181.
- [9] 舒立福, 田晓瑞, 李红, 等. 我国亚热带若干树种的抗火性研究 [J]. *火灾科学*, 2000, 9(2): 2–6.
- [10] 肖金香, 谢科峰, 彭家武, 等. 庐山主要树种燃烧性研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2000, 22(5): 138–142.
- [11] 张景群, 徐钊, 康永祥, 等. 陕西栎属 7 种枯叶燃烧性分析 [J]. *西北林学院学报*, 2000, 15(1): 40–42.
- [12] 田晓瑞, 舒立福, 乔启宇, 等. 南方林区防火树种的筛选研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2001, 23(5): 43–47.
- [13] 单延龙, 李华, 其其格. 黑龙江大兴安岭主要树种燃烧性及理化性质的实验分析 [J]. *火灾科学*, 2003, 12(2): 74–78.
- [14] 鞠琳, 胡海清, 孙龙, 等. 东北三大硬阔的阻火性能 [J]. *东北林业大学学报*, 2008, 36(1): 28–30.
- [15] 胡海清, 鞠琳. 小兴安岭 8 个阔叶树种的燃烧性能 [J]. *林业科学*, 2008, 44(5): 90–95.
- [16] 李世友, 罗文彪, 舒清志, 等. 昆明地区 25 种木本植物的燃烧性及防火树种筛选 [J]. *浙江林学院学报*, 2009, 26(3): 351–357.
- [17] 李世友, 杨清, 张凯, 等. 从预防树冠火角度确定云南松的最低修枝高度 [J]. *江西农业大学学报*, 2009, 31(1): 1097–1103.
- [18] 顾凤岐, 王世江. 大兴安岭主要树种的燃烧性和火性状的 Fuzzy 的综合排序 [J]. *森林防火*, 1995, 12(2): 17–20.
- [19] 张景群, 康永祥, 徐钊. 秦岭松科常绿种叶燃烧性排序 [J]. *东北林业大学学报*, 2001, 29(4): 16–17.
- [20] 乐新贵, 刘细燕, 杨帆, 等. 层次分析法在防火林带树种选择上的应用 [J]. *江西林业科技*, 2002(2): 12–14.
- [21] 李立伟. 树种防火性能的灰色综合评判 [J]. *防护林科技*, 2006, 23(4): 17–18.
- [22] 王益和. 灰色关联分析在树种抗火性能评价中的应用 [J]. *防护林科技*, 2007, 24(5): 21–22.
- [23] 邓聚龙. 灰理论基础 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2002: 30–35.
- [24] 李世友, 王少名, 年有春, 等. 落叶灌木南烛在防火戒严期的燃烧性动态 [J]. *江西农业大学学报*, 2008, 30(5): 845–849.
- [25] 胡海清. 林火生态与管理 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 79–80.

(上接第 46 页)

- [7] 中华人民共和国农业部公告. 中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录 [S]. 北京, 2007.
- [8] 文朝慧, 刘雅莉, 刘箐, 等. 从进境黄瓜种子中截获黄瓜绿斑驳花叶病毒 [J]. *植物检疫*, 2010, 23(5): 82.
- [9] Varveri C, Vassilakos N, Bem F. Characterization and detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Greece [J]. *Phytoparasitica*, 2002, 30(5): 493–501.
- [10] 赵世恒, 李明福, 张永江, 等. 引进种质西瓜中黄瓜绿斑驳花叶病毒的检测 [J]. *北京农学院学报*, 2007, 22(2): 32–34.
- [11] Shim C K, Han K S, Lee J H, et al. Isolation and characterization of watermelon isolate of *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV-HY1) from watermelon plants with severe mottle mosaic symptoms [J]. *Plant Pathology*, 2005, 2(2): 167–171.
- [12] Yoon J Y, Choi G S, Choi S K, et al. molecular and biological diversities of *Cucumber green mottle mosaic virus* from cucurbitaceous crops in Korea [J]. *Phytopathology*, 2008, 156: 408–412.
- [13] Slavokhotova A A, Andreeva E N, Shijan A N, et al. Specifics of the coat protein gene in russian strains of the *Cucumber green mottle mosaic virus* [J]. *Russian Journal of Genetics*, 2007, 43(11): 1221–1226.
- [14] Lee G P, Min B E, Kim C S, et al. Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting tobamoviruses [J]. *Virological Methods*, 2003, 110: 19–24.
- [15] 邓丛良, 江明, 汪万春, 等. 应用 MNP-RT-PCR 方法检测黄瓜绿斑驳花叶病毒 [J]. *植物病理学报*, 2008, 38(4): 436–440.
- [16] Chen H Y, Zhao W J, Gu Q S, et al. Real time TaqMan RT-PCR assay for the detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* [J]. *Virological methods*, 2008, 149: 326–329.