

香蕉束顶病毒 PCR 检测技术研究^{*}

肖火根¹ 胡晋生²

(1 华南农业大学植物病毒研究室, 广州, 510642; 2 美国夏威夷大学植物病理系)

摘要 建立了聚合酶链式反应(PCR)扩增技术检测香蕉组织和单头蚜虫内的香蕉束顶病毒(BBTV), 并报道了 BBTV 免疫捕捉 PCR(IC-PCR)和直接结合 PCR(DB-PCR)检测方法. IC-PCR 和 DB-PCR 分别能从 4^μg 和 0.4 mg 香蕉叶组织中检测到 BBTV.

关键词 香蕉束顶病毒; 免疫捕捉 PCR; 直接结合 PCR

中图分类号 S 432.41

香蕉束顶病是世界香蕉生产上的一种危害十分严重的病害(Dale, 1987). 在我国, 此病在 50 年代开始发生, 现在南方各省香蕉产区发生流行. 一般发病率为 20%~30%, 重者达 70%~80%, 以致蕉园毁灭. 香蕉束顶病主要是通过吸芽和组培苗带毒, 以及香蕉交脉蚜(*Pentalonia nigroneryosa*)来传播.

香蕉束顶病病原病毒(Banana bunchy top virus, BBTV)是单链环状 DNA 病毒. 虽然从 1920 年就开始展开对此病毒的研究, 但由于香蕉植株体内病毒浓度极低, 到 1988 年才得以提纯到病毒, 病毒粒体球状, *d* 为 18~20 nm(Wu et al, 1990a). BBTV 基因组至少含有 6 个 DNA 组份(Burns et al, 1995).

当前, 防治 BBTV 的方法是种植无毒香蕉苗和及时铲除田间病株. 该方法的成功与否完全有赖于建立灵敏、快速和可靠的病毒检测方法. 这些检测方法对于 BBTV 的流行研究也是必需的. 目前, 检测 BBTV 的方法有 BBTV 特异性多抗和单抗(Thomas et al, 1991; Wu et al, 1990b; 孙茂林等, 1992; 张海保等, 1995)、聚合酶链式反应(PCR)(Xie et al, 1995)、放射性 DNA 探针(Harding et al, 1991)和非放射性 DNA 探针(Xie et al, 1995). 本文则报道 BBTV 的免疫捕捉 PCR(Immunocapture-PCR, IC-PCR)和直接结合 PCR(Direct-binding PCR, DB-PCR)检测技术的建立.

1 材料与方法

1.1 引物设计

根据已报道的 BBTV DNA 组份 III 的核苷酸序列(Burns et al, 1995), 设计了扩增外壳蛋白基因的两端引物 CPL(5' - CATCGACCATGGCTAGGTATCCGAAGG - 3')和 CPR(5' - CTCTC-CATGGCGTGTGTATGTTATTTGG - 3').

1.2 总核酸的提取

用 CTAB 方法(Doyle et al, 1990)提取香蕉叶和香蕉交脉蚜的总核酸. 对于植物材料, 大

约 80 mg 的叶主脉组织用 0.3 mL CTAB 缓冲液(Xie et al. 1995)在研钵中研磨. 对于蚜虫材料, 单个蚜虫用 50 μ L CTAB 缓冲液用玻璃棒在 1.5 mL 离心管中研磨. 研磨液在 60 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 1 h, 然后用等体积的饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提. 离心后的上清液用氯仿/异戊醇(24:1)再抽提 1 次. 总 DNA 用乙醇回收, 并溶解在 100 μ L TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0)中.

1.3 PCR 扩增反应

在 0.5 mL PCR 反应管中, 加入反应缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH9.0, 50 mmol/L KCl, ϕ 为 0.1% Triton X-100), 2 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dATP、dGTP、dCTP、dTTP, 0.3 μ mol/L CPL 和 CPR 引物和 2.5 u Taq DNA 聚合酶(Promega). 每个 PCR 反应用 1 μ L 的 DNA 样品, 反应总体积为 50 μ L, 加 50 μ L 矿物油覆盖. 在 Perkin-Elmer CetusGeneAmpTM PCR E480 上扩增. 其扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C, 4 min; $\rightarrow$ 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 58 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 35 个循环 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 10 min. PCR 扩增后, 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 检查扩增结果.

1.4 免疫捕捉 PCR(Immunocapture-PCR, IC-PCR)

参照 Rowhani 等(1995)报道的方法进行. 取大约 80 mg 的香蕉叶脉组织, 置于 1 mL 研磨缓冲液(ELISA 洗液缓冲液+10 g/L NaDIECA). 研磨后用 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为检测用的病叶粗汁液, 对照为同法制备的健康叶粗汁液. 在 0.5 mL PCR 管中加入 50 μ L BBTV 单抗(1 mg/L)(用 ELISA 包被缓冲液稀释), 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h, 倒尽包被液, 用 PBST 洗 3 次. 然后, 加入 50 μ L $1:10^4$ 稀释度的香蕉叶粗汁液(用 PBST 进行稀释), 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h. 用 PBST 洗 4 次, 然后直接在管中进行 PCR 反应(方法同 1.3).

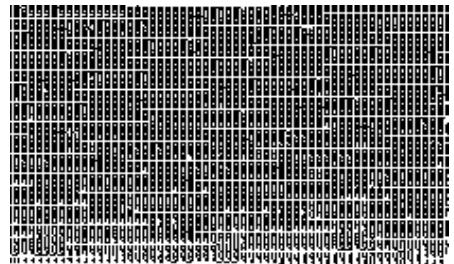
1.5 直接结合 PCR(Direct-binding PCR, DB-PCR)

除了香蕉叶粗汁液是加在没有包被 BBTV 单抗的 0.5 mL 反应管中外, 其它步骤同 IC-PCR

2 结果

2.1 PCR、IC-PCR 和 DB-PCR 检测灵敏度的比较

利用同一感病香蕉叶脉组织提取总 DNA 和制备粗汁液, 分别进行 3 种检测方法(PCR, IC-PCR 和 DB-PCR)的灵敏度比较. 总 DNA 和病叶粗汁液分别进行一系列 10 倍释稀, 3 次重复. 试验结果表明, 当用 PCR 检测总 DNA 时, PCR 产物(589 bp)可以从稀释到 10^{-4} (相当于 80 ng 的叶组织)的总 DNA 扩增出来(图 1). 当用 IC-PCR 和 DB-PCR 检测病粗汁液时, 589 bp DNA 片段分别可从稀释 10^{-3} (相当于 4 μ g 的叶组织)和 10^{-1} 相当于 400 μ g 的叶组织的粗汁液中扩增出来(图 2). 这表明上述 3 种方法都可用于检测 BBTV, 而且 PCR 法比 IC-PCR 和 DB-PCR 法分别灵敏 50 倍和 5 000 倍, IC-PCR 又比 DB-PCR 灵敏 100 倍.

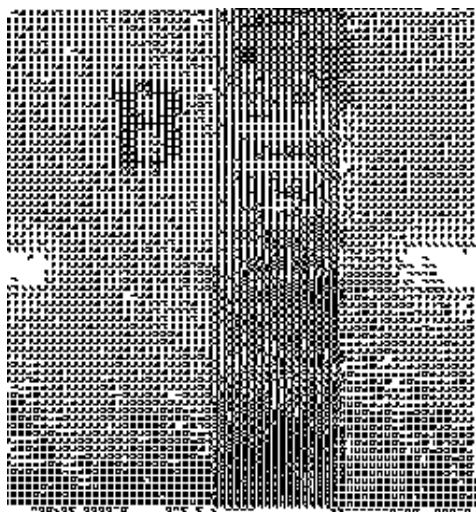


M: DNA 分子量标准(从上到下依次为 1 353、1 078、872、603、310、281、271、234 bp); 1~7: 稀释度分别为 $10^0 \sim 10^6$ (分别相当于 800、80、8 μ g, 800、80.8、0.8 ng 蕉叶组织)感染 BBTV 蕉叶总 DNA 的扩增产物; 8: 阴性对照(从健康叶片抽提的 DNA)

图 1 香蕉组织 BBTV PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

2.2 用 PCR 检测单头蚜虫

PCR 方法也用来从单头香蕉蚜虫中检测 BBTV. 用 CTAB 法从单头蚜虫中提取总 DNA. 大小为 589 bp 的 DNA 产物可从带毒蚜虫中提取的总 DNA 中扩增出来, 而且可从稀释 10 倍的 DNA 样品中扩增出来, 但不能从无毒蚜虫的 DNA 中扩增出来(图 3).



M: DNA 分子量标准(从上到下依次为 1 353.1 078.872.603.310.281.271.234 bp); 1~6: 分别为叶片粗汁液稀释度 $10^0 \sim 10^6$ 的扩增产物; 7: 阴性对照(健康叶片粗汁液); 8: 阴性对照(水)

图 2 IC-PCR(A) 和 DB-PCR(B) 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析



M: DNA 分子量标准(从上到下依次为 1 353.1 078.872.603.310.281.271.234 bp); 1~4: 稀释度分别为 $10^0 \sim 10^3$ 带毒蚜虫总 DNA 的扩增产物; 5: 阴性对照(从无毒蚜虫抽提的 DNA); 6: 阴性对照(水)

图 3 介体蚜虫 BBTV PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

3 讨论

PCR 扩增技术是植物病毒的最有效和灵敏的检测方法, 并已经得到广泛的应用(Hadidi et al, 1995). 标准 PCR 技术在常规诊断中的主要限制因素是高质量的核酸模板的制备. 大多数核酸提取方法都不能完全除掉来自植物组织的多糖和多酚类化合物, 而这些物质对随后的 PCR 或反转录 PCR 扩增反应有直接的抑制作用(Demeke et al, 1992; Henson et al, 1993). 免疫捕捉 PCR(ICP-CR)技术则可解决这个问题(Wetzel et al, 1992). 而对于检测不能制备出抗血清的病毒, 则发展建立了直接结合 PCR(DB-PCR)(Rowhani et al, 1995).

本研究中所建立的 3 种检测方法都能灵敏和专化地检测感病香蕉样品的 BBTV. PCR 是最灵敏的方法, 它能检测出仅相当于 80 ng 香蕉组织的 BBTV, 也能检测单头带毒蚜虫的 BBTV. 这和 Xie 等(1995)的研究结果一致. 当用 IC-PCR 和 DB-PCR 检测香蕉病粗汁液时, 它们分别可从稀释 10^{-3} (相当于 4 μg 的叶组织)和 10^{-1} (相当于 400 μg 的叶组织)的粗汁液中扩增出来. Xie 等(1995)报道用 ELISA 检测 BBTV 的灵敏度为 1:250(相当于 0.4 mg 叶组织). 因此, 本研究所建立的 IC-PCR 法的灵敏度比 ELISA 高 100 倍, DB-PCR 的与 ELISA 相当.

本研究中所建立的 3 种检测方法有不同的特点, 在实际应用中应根据不同的要求和条件, 采用相应的检测方法. 虽然 IC-PCR 的灵敏度比 PCR 稍低, 但由于它省去了总 DNA 提取步

骤, 既省时又简单方便, 还免去接触苯酚和氯仿等有毒物质, 因此, 可用于大量样品, 如香蕉种苗 BBTV 的常规检测. 而田间病害的常规诊断则可用灵敏度稍低但更简单的 DB-PCR 方法.

参 考 文 献

- 孙茂林, 和春育, 庄俊英. 1992. 香蕉束顶病毒单克隆抗体的制备及其应用. 西南农业学报, 5(3): 75~79
- 张海保, 朱西儒, 刘卫, 等. 1995. 应用单克隆抗体检测香蕉束顶病. 植物保护学报, 22(1): 75~79
- Burns T M, Harding R M, Dale J L. 1995. The genome organization of banana bunchy top virus: an analysis of six ss-DNA components. J Gen Virology, 76: 1471~1482
- Dale J L. 1987. Banana bunchy top: An economically important tropical plant virus disease. Adv Virus Res. 33: 301~325
- Demeke T, Adams R P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. Biotechniques. 12: 332~334
- Doyle J J, Doyle J L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13~15
- Hadidi A, Levy L, Podleckis E V. 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In: Singh R P, Singh U S, eds. Molecular Methods in Plant Pathology. London: Lewis Publishers, 523
- Harding R M, Burns T M, Dale J L. 1991. Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single stranded DNA. J Gen Virol. 72: 225~230
- Henson J M, French R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Ann Rev Plant Pathol. 31: 81~109
- Rowhani A, Maningas M A, Lile L S et al. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. Phytopathology, 85: 347~352
- Thomas J E, Dietzen R G. 1991. Purification, characterization and serological detection of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Australia. J Gen Virol. 72: 217~224
- Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, et al. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. J Virol Methods. 39: 27~37
- Wu R Y, Su H J. 1990a. Purification, characterization of banana bunchy top virus. J Phytopathol. 128: 153~160
- Wu R Y, Su H J. 1990b. Production of monoclonal antibodies against banana bunchy top virus and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. J Phytopathol. 128: 203~208
- Xie W S, Hu J S. 1995. Molecular cloning, sequence analysis and detection of banana bunchy top virus in Hawaii. Phytopathology, 85: 339~347

Detection of Banana Bunchy Top Virus by Polymerase Chain Reaction Assays

Xiao Huogen¹ Hu J S²

(1 Lab. of Plant Virology, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642; 2 Dept. of Plant Pathology, Univ. of Hawaii)

Abstract A polymerase chain reaction (PCR) assay was developed for the detection of banana bunchy top virus in banana samples and single aphid. Sensitive, rapid, and reliable immunocapture PCR (IC-PCR) and direct-binding PCR (DB-PCR) assays were reported for the first time to detect BBTV. It was detected from dilutions equivalent to $4 \mu\text{g}$ and 0.4 ng of banana materials by IC-PCR and DB-PCR, respectively.

Key words banana bunchy top virus; immunocapture PCR; direct-binding PCR

【责任编辑 张 砾】