

植物病毒检测方法研究进展*

金羽, 文景芝

(东北农业大学植物病理系, 哈尔滨 150030)

摘要: 主要介绍了通过生物学、血清学、电子显微镜以及分子生物学方法检测植物病毒的原理及特点, 并重点介绍了近几年发展起来的免疫胶体金技术和实时荧光定量 PCR 技术。

关键词: 植物病毒; 检测; 研究进展

中图分类号: S 432.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2005)03-0037-04

Advances on Methods for the Detection of Plant Virus

JIN Yu, WEN Jing-zhi

(Department of Plant Pathology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: The paper mainly introduced the theories and characteristics on the methods to detect plant virus by applying biological, serological, electron microscopical and molecular techniques, and emphasised on the Immunogold-label assay and real-time fluorescent quantitative PCR techniques developed in recent years.

Key words: plant virus; detection; advances

植物病毒学历经近百年的发展, 病毒的检测手段和方法也在朝着快速、灵敏、准确的方向不断发展和改进, 常用的植物病毒的检测方法有生物学方法、血清学方法、电子显微镜检测法和分子生物学方法等。

1 生物学检测法

不同的病毒往往都有一套鉴别寄主或特定的指示植物。鉴别寄主是指接种某种病毒后能够在叶片等组织产生典型症状的寄主, 指示植物指接种某种病毒后能产生独特症状的一种寄主。根据实验寄主上表现出来的局部或系统症状, 可以初步确定病毒的种类和归属。生物学测定通常在隔离温室或网室进行, 该方法简单、易行, 不需要昂贵的设备。1929年美国病毒学家霍姆斯(Holmes)用感病的植物叶片与少许金刚砂相混, 研磨成粗汁液, 磨擦供试植物的叶片, 经清水清洗后, 置于温室内待测, 2~3d后叶片上出现局部圆形的枯斑, 在一定的范围内, 枯斑数与侵染性病毒的浓度成正比。枯斑法能测出一些病毒的相对侵染力, 对于病毒的定性有着重要的意义。时至今日, 很多实验室和生产检测单位仍然利用此方法检测一些病毒。吴凌娟等^[1]用千日红、指尖椒、

灰条藜、苋色藜鉴定马铃薯 X 病毒, 并确定千日红是很好的鉴定指示植物。

2 血清学检测法

血清学方法于 20 世纪六七十年代发展起来, 原理是利用抗原抗体的体外特异性结合检测植物病毒。血清学测定的方法有酶联免疫吸附法、快速免疫滤纸法及近几年发展起来的免疫胶体金技术等。

2.1 酶联免疫吸附测定 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

1977年 Clark 和 Adams 等首次将 ELISA 应用于植物病毒检测, 其原理是把抗原抗体的免疫反应与酶的高效催化作用相结合, 通过化学方法将酶与抗体结合, 形成酶标抗体。在遇到相应底物时, 酶催化无色底物产生化学反应, 生成有色化合物, 其强度与病毒浓度成正比, 用此方法也可测定出病毒的浓度, 既保持了酶催化反应的敏感性, 又保持了抗原抗体反应的特异性, 因而极大的提高了灵敏度。ELISA 方法的最低检测限为 0.1~10 ng/mL, 具有特异性强、仪器简单、自动化程度高等优点, 国内外多家公司有商品化试剂盒出售。由此, ELISA 被广泛应用于植物病毒的检测、病毒病的普查、口岸和产

* 收稿日期: 2005-03-03

第一作者简介: 金羽(1979-), 女, 黑龙江省铁力县人, 在读硕士, 从事植物病毒的检测与鉴定研究。

地检疫。随着科学的不断发展,在 ELISA 方法基础上加以改进又发展了许多新的检测方法,1982 年 Hawkes 等建立了 DIBA(dot immunobinding assay, 斑点免疫吸附)。DIBA 用硝酸纤维素膜代替酶标板,使检测更为简便、快速、经济^[2]。另外,还有直接组织斑免疫测定(IDDTB)、A 蛋白酶联吸附(SPA—ELISA)、伏安酶联免疫分析^[3]等。

2.2 快速免疫滤纸测定法(Rapid immuno—filter paper assay, RIPA)

此方法原理是用特异性抗体球蛋白 IgG 孵育红白两种乳胶颗粒制备成致敏乳胶,同时用封闭剂封闭致敏乳胶上未被占据的位点,将上述乳胶粒子以红下白上的相对部位分别固定在同一滤纸条上,测定时,当滤纸条侵入待测样品液中时,如果样品中含有待测病毒粒子,由于毛细管作用,它将与一部分红色致敏乳胶结合,结合产物会同其他尚未结合的红色致敏乳胶及病毒粒子一起向上迁移,当迁移到固定有白色致敏乳胶部位时它们就会被吸附起来,该部位显示红色。反之,如果没有待测病毒粒子,则不会产生吸附现象,该部位不显现红色^[4]。在兰花病毒检测中,采用致敏抗体(A 蛋白)代替常规抗血清所形成的微量凝集法,其灵敏度有很大的提高^[5,6]。

2.3 免疫胶体金技术(Immunogold—label assay)

金是惰性金属,有良好的电荷分布,柠檬酸钠—鞣酸能将氯金酸金离子还原为胶体金,利用胶体金在碱性环境中带有负电的性质,能以静电、非共价键方式吸附抗体 IgG 或 A 蛋白分子,形成稳定的 IgG 或 A 蛋白胶体金复合物。而且免疫胶体金对组织细胞的非特异性吸附作用小,具有较高的特异性。免疫胶体金制备不需经过化学反应交联,生物大分子与金颗粒吸附形成复合物,生物活性保持不变。通过抗原抗体特异性结合,IgG 或 A 蛋白胶体金复合物就可以结合在抗原上,从而得到明显的鉴别性和可见度^[7]。自 1983 年胶体金标记的抗体首次被成功的应用于植物病毒检测以来,该技术不断改进,1992 年傅仓生等^[8]应用胶体金免疫电镜技术检测烟草花叶病毒电镜下观察到大量金颗粒密集地、有规律地附着于病毒粒子上,魏梅生等^[9]应用该技术成功地进行了烟草环斑病毒的检测。

3 电子显微镜检测法

电子显微镜的诞生加快了人类认识微观世界的脚步,电镜技术在近 70 年发展历程中,已广泛应用于生物学、组织学、细胞学、病毒学等各个领域。对植物病毒的研究,由于电镜的出现,得到重大的发

展。电子显微镜技术可以说是最直接、最准确的检测病毒的手段,它可以直接看到病毒的形态结构、存在与否,所以在进入了分子水平的今天它仍然有着无法替代的作用。

植物病毒电镜诊断最常用的是负染色和超薄切片法,结合免疫电镜技术则可以更进一步判断血清学关系、研究病毒在细胞内的复制和装配等。

3.1 电镜负染检测法(electron microscopy negative stain)

1959 年 Brenner 和 Horne 将电镜负染技术首次成功应用于病毒结构研究,当时发现一些重金属离子能绕核蛋白体四周沉淀下来,形成一个黑暗的背景,在核蛋白体内部不能沉积而形成清晰的亮区,其图像如同一张照相的底片,因此人们习惯地称为负染色。负染色法快速简便,可以直接观察病毒的形态、大小、表面结构、有无包膜等。常用的染色剂为磷钨酸、醋酸铀、甲酸铀、钼酸铵等,但某一种染色剂并非对各种病毒都合适。2% 磷钨酸水溶液(pH6.7~7.0)适用于大多数病毒,负染色法既可以做纯化的样品,也可以做粗汁液样品,后者在诊断中有广泛的用途^[10]。

3.2 电镜超薄切片法(electron microscopy ultra—thin section)

超薄切片是观察病毒在寄主细胞内分布以及细胞病变的主要方法。观察各种病毒引起的寄主细胞病变和内含体特征,有助于鉴别病毒种类甚至株系,并了解病毒侵染和增殖的动态过程,直观病毒生物大分子的亚基单位,已经从细胞水平发展到分子水平。尤其对一些未知病毒、难于提纯的病毒材料、负染技术不能解决的检测材料都可用此方法,通过对组织细胞的直接观察而得到解决,因此在病毒学检测和脱毒快繁的实际生产中均有着特殊的重要性和不可取代的作用。超薄切片整个过程比较繁琐和冗长,现已发展了微波辐射固定等快速固定和包埋方法,可在较短时间内制备好样品包埋块供切片观察。

3.3 免疫电镜检测法(immuno electron microscopy, IEM)

免疫电镜技术是将免疫学原理与电镜负染技术相结合,利用抗原抗体的吸附性使病毒能较集中地沉积在有效视野内,从而便于电镜下的观察,大大提高了检测几率。Derrick(1973)建立了免疫吸附电镜术(ISEM)^[11],此后 Milne、Shukla、Katz 等在应用中进一步发展完善,形成了一系列方法^[12~14]。目前常用的有:诱捕法,即用抗体预先包被的载网来捕获样

品溶液中的病毒粒体, 再作负染, 可以大大增加电镜视野中病毒粒子的数量, 提高诊断的灵敏度。ISEM 法最少可检出几个微升样品中 $0.1 \sim 1 \text{ mg/mL}$ 的病毒。蛋白 A—吸附法是先利用蛋白 A 包被载网, 再结合抗体来捕获病毒, 可以进一步增加灵敏度。修饰法则是将吸附于载网的病毒粒子与其抗体进行反应, 利用电镜下可见的特异性免疫反应所产生的抗体“外套”, 来判断血清学关系, 尤其适用于病毒种或株系的诊断、复合感染病毒的检测等。为了进一步增加修饰法的直观性, Lin(1984)、Louro(1984)等建立了悬浮样品的金标记免疫修饰法^{15,16}, 先用一抗病毒进行免疫修饰, 再用胶体金标记二抗或蛋白 A 处理, 形成病毒—抗体—金颗粒免疫复合物, 在病毒表面的抗体“外套”上结合了直径 $5 \sim 10 \text{ nm}$ 的金颗粒, 电镜下可见性好, 比单纯免疫修饰法更易判断。

4 分子生物学检测方法

分子生物学检测法是通过检测病毒核酸来证实病毒的存在。此方法灵敏度高, 特异性强, 有着更快的检测速度, 操作也比较简便。目前, 在植物病毒检测与鉴定方面应用的分子生物学技术主要包括核酸分子杂交技术、dsRNA 电泳技术、多聚酶链式反应技术等。

4.1 核酸分子杂交技术(Nucleic acid hybridization)

核酸分子杂交技术是 20 世纪 70 年代发展起来的一种新的分子生物学技术, 它是基于 DNA 分子碱基互补配对的原理, 用特异性的核酸探针与待测样品的 DNA 或 RNA 形成杂交分子的过程。根据使用的方法, 待测样品核酸可以是提纯的(膜上印迹杂交或液相杂交), 也可以在细胞内杂交(细胞原位杂交)。核酸探针是指能与特定核苷酸序列发生特异互补杂交, 而后又能被特殊方法检测的已知核苷酸链, 所以探针必须标记, 以便示踪和检测。核酸探针的标记有同位素标记和非同位素标记两大类。同位素标记方法简单, 灵敏度高, 但存在环境污染以及放射性废物处理等问题。非同位素标记不存在以上问题, 且由于信号放大以及模板扩增两方面的发展, 检测灵敏度亦在不断提高, 常用的非同位素标记物有生物素、地高辛精和荧光素。孟清等¹⁷应用 Digoxigenin 标记的 cDNA 探针检测香蕉束顶病毒的灵敏度为 10 pg 。

4.2 双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)电泳技术

大约 90% 的植物病毒基因组为单链 RNA, 当病

毒侵染植物后利用寄主成分进行复制时, 首先产生与基因组 RNA 互补的链, 配对成双链模板, 再以互补链为模板转录出子代基因组 RNA, 互补链的长度与基因组 RNA 相同。这种双链 RNA 结构称为复制型分子(RF), 可在植物组织中积累起来。有些病毒基因组为 dsRNA, 因而复制后会产生大量的子代 dsRNA 基因组。而正常的植物中往往不产生, 而且 dsRNA 对酶具有一定的抗性, 因而较易操作。因此通过对植物组织中 dsRNA 的分析, 可用于植物病毒的检测和诊断等研究^{18,19}。1979 年, Morris 和 Dodds 成功的将 dsRNA 技术用于植物和真菌病毒的研究²⁰。

dsRNA 经提纯、电泳、染色后, 在凝胶上所显示的谱带可以反映每种病毒组群的特异性, 并且有些单个病毒的 dsRNA 在电泳图谱上也显示一定的特征。因此, 利用病毒 dsRNA 的电泳图谱可以检测出病毒的类型和种类。此法已用于一些病毒组(如黄化病毒组、马铃薯 Y 病毒组、番石竹潜病毒组、烟草坏死病毒组、黄瓜花叶病毒组、绒毛烟斑驳病毒组)的分类研究。李东栋等(2000)确立葡萄卷叶病毒(GLRV)的 dsRNA 提取方法和检测标准, 为今后葡萄病毒病的诊断检测奠定了良好的基础。

4.3 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术

1983 年美国 PE—Cetus 公司的 Mullis 等人发明了聚合酶链式反应, 并推出了第一台 PCR 仪, 它是一种体外模拟自然 DNA 复制过程的核酸扩增技术, 即通过引物延伸核酸的某个区域而进行的重复双向 DNA 体外合成²¹。能把痕量的遗传物质迅速而简便的扩增百万倍, 使原来无法进行分析和检测的各种项目得以完成。基本原理是: 以待扩增的 DNA 样品为模板, 两条分别与待扩增 DNA 正链相同和互补的 DNA 片断为引物, 在 TaqDNA 聚合酶的催化下, 反复进行变性、退火、延伸循环, 就可以使 DNA 无限扩增。当上述三个过程中一个循环过程完成后, DNA 的总量则可增加一倍, 每次循环所得产物都是下一个循环的模板。理论上, 循环 n 次, 就增加为 2^n 倍。一般经过大约 30 次循环, DNA 的量可扩增 100 万以上。对于 DNA 病毒可以直接进行扩增, 而对于 RNA 病毒, 则需先将 mRNA 反转录成 cDNA, 再做 PCR 扩增, 此方法称 RT—PCR(Reverse transcription—PCR)。RT—PCR 是一种检测 RNA 病毒的行之有效的办法。应用 RT—PCR 技术从百合叶片组织中检测百合无症病毒(LSV), 结果表明 RT

—PCR 是 DAS—ELISA 敏感度的 1 000 倍^[22]。

4.4 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR) 技术

实时荧光定量 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出, 它是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

实时荧光定量 PCR 所用荧光探针主要有三种: TaqMan 荧光探针、杂交探针和分子信标探针三种, 其中 TaqMan 荧光探针使用最为广泛。TaqMan 荧光探针的工作原理是使用具有 5' 外切核酸酶活性的 DNA 聚合酶^[23], 水解同底物 DNA 杂交的探针。反转录后, 在复性阶段, 两个特异性的引物同模板 DNA 的末端杂交, 同时探针同模板中互补序列杂交。TaqMan 探针的 5' 端带有荧光染料报道(reporter), 它发出的荧光信号可被 3' 端的淬灭子吸收, 以热量的形式释放掉。如果在 PCR 过程中, 底物序列不能同探针互补, 则探针仍然是游离的, 由于使用的是酶, 是双链特异性, 因此没杂交的探针仍然保持完整, 荧光信号也就不能被检测到。相反如果正确的底物被扩增出来后, 探针就会在复性阶段与其杂交, 当聚合酶延伸到探针时, 它就会将探针的 5' 端给替换下来, 并将报道子切割下来, 这就使得报道子和淬灭子分开, 从而使荧光信号释放出来, 可通过检测系统观察到信号的变化。

实时荧光定量 PCR 技术不仅实现了对 DNA 模板的定量, 而且具有灵敏度高、特异性和可靠性更强、能实现多重反应、自动化程度高, 具实时性和准确性等特点。采用完全封闭管检测, 不需要 PCR 后处理, 避免了交叉污染。朱建裕等^[24]用实时荧光 RT—PCR 一步法检测番茄环斑病毒证明实时荧光 PCR 检测比 PCR 电泳检测灵敏度高出 10~100 倍。

参考文献:

- [1] 吴凌娟, 张雅奎, 董传民, 等. 用指示植物分离鉴定马铃薯轻花叶病毒(PVX)的技术[J]. 中国马铃薯, 2003, 17(2): 82-83
- [2] 周雪平, 濮祖芹. 应用斑点法检测植物病毒的研究[J]. 病毒学杂志, 1990, (3): 317-32
- [3] 焦奎, 张书圣. 伏安酶联免疫分析法及其在植物血清学检测技术中的应用[J]. 化学通报, 2000, (10): 50-55
- [4] 张建军, 莫晓凤. 一种快速简便的植物病毒检测方法[J]. 植物检疫, 1998, 12(4): 222-223
- [5] 张建军, 谢为龙. 兰花病毒病研究进展[J]. 植物检疫, 1999, 13(2): 109-111
- [6] Abdul Samad N, Ari Z. The use of antibody-sensitized latex to detect Cymbidium mosaic virus in orchids[J]. Pertemika Journal of Tropical Agriculture Science, 1993, 16(2): 157-160
- [7] 徐平东. 免疫胶体金技术及其在植物病毒研究中的应用[J]. 植物检疫, 1993, 7(4): 327-328
- [8] 傅仓生, 秦臻. 胶体金免疫电镜技术用于烟草花叶病毒的检测[J]. 植物病理学报, 1994, 24(4): 353-355
- [9] 魏梅生. 斑点免疫金和免疫金/银染色法检测烟草环斑病毒[J]. 植物检疫, 2000, 14(1): 1-2
- [10] 洪健, 陈集双, 周雪平, 等. 植物病毒的电镜诊断[J]. 电子显微学报, 1999, 18(3): 274-289
- [11] Derrick K S. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy[J]. Virology, 1973, 56: 652
- [12] Milne R G. Electron microscopy for the identification of plant viruses in vitro preparations[J]. Methods in Virology, 1984, (4): 87-120
- [13] Katz D, Kohn A. Immunosorbent electron microscopy for detection of viruses[J]. Advances in Virus Research, 1984, 29: 169-194
- [14] Shukla D D, Gough K V. The use of protein A from Staphylococcus aureus in immune electron microscopy for detecting plant virus particles[J]. Gen. Virol., 1979, 45: 533-536
- [15] Lin N S. Gold-IgG complexes improve the detection and identification of viruses in leaf dip preparations[J]. Virol. Methods, 1984, (8): 181-190
- [16] Louro D, Leseman D E. Use of protein A-gold complex for specific labeling of antibodies bound to plant viruses. I. Viral antigens in suspensions[J]. Virol. Methods, 1984, (9): 107-122
- [17] 孟清, 曹先维, 张彤. 应用 Digoxigenin 标记的 cDNA 探针检测香蕉束顶病毒[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1999, 30(3): 367-371
- [18] 田文会, 王江柱. 双链检测技术在鉴定病毒中的应用[J]. 河北农业大学学报, 1995, 18(4): 112-117
- [19] 周雪平, 李德葆. 双链检测技术在植物病毒研究中的应用[J]. 生物技术, 1995, 5(1): 1-4
- [20] Morris T J, Dodds J A. Isolation and analysis of double stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue[J]. Phytopathology, 1979, 67: 854-858
- [21] 黄培堂. PCR 技术试验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [22] 王继华, 瞿素萍, 孔宝华, 等. 百合无症病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(2): 148-150
- [23] Deborah S G. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer Applied biosystems division 7700 sequence detector[J]. Journal of Biomolecular Techniques, 1999, 10(1): 11-16
- [24] 朱建裕, 朱水芳, 廖晓兰, 等. 实时荧光 RT-PCR 一步法检测番茄环斑病毒[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 338-341