

洋葱黄矮病毒 RT-PCR 和 ELISA 检测方法的建立

Establishment of RT-PCR and ELISA detection methods for *Onion yellow dwarf virus*郭 炎^{1,2} 李小宇² 苏 颖² 张春雨² 周雪平^{3*} 王永志^{2,3*}

(1. 吉林师范大学, 四平 136000; 2. 吉林省农业科学院, 公主岭 136100; 3. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

Guo Yan^{1,2} Li Xiaoyu² Su Ying² Zhang Chunyu² Zhou Xueping^{3*} Wang Yongzhi^{2,3*}

(1. Jilin Normal University, Siping 136000, Jilin Province, China; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, Jilin Province, China; 3. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

分蘖洋葱 *Allium cepa* var. *aggregatum* 俗称毛葱、鬼子葱, 是北方地区特色经济作物, 保健功效显著, 其种植面积逐年增加。洋葱黄矮病毒 (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV) 能够侵染分蘖洋葱, 造成其产量和品质下降。OYDV 侵染分蘖洋葱后, 植株矮化, 叶片变形褪绿、叶尖枯萎, 后期整个叶片表现发黄、起皱及萎缩等症状。为能在发病早期及时快速地检测出 OYDV, 本研究利用特异性引物和已制备的单克隆抗体, 通过优化参数确定最佳检测条件, 建立 OYDV 的 RT-PCR 和 ELISA 检测方法, 以期分为蘖洋葱生产中农药减施提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品及抗体: 分蘖洋葱病株采集自吉林省, 以 RT-PCR、ELISA 和 Western-blot 检测仅含 OYDV; 特异性识别 OYDV 的单克隆抗体 4G12 由本实验室制备并保存, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的 4G12-HRP 抗体, 委托南京钟鼎生物科技有限公司完成。

试剂及仪器: Primix TaqTM、1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒, 日本 TaKaRa 公司; 其余试剂均为国产分析纯。Bio Tek 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; DYY-11 型电泳仪, 北京六一仪器厂。

1.2 方法

引物设计与合成: 根据 GenBank 中 OYDV 基因序列设计 4 条特异性引物, 即 OYDV8077-s: 5'-TAT-TTCAACCATTGCTAG-3'; OYDV8253-a: 5'-GG-AGGTGGTATGTCCAAGTGT-3'; OYDV7966-s: 5'-AACTTAAAGGTAGTTGGCT-3'; OYDV8252-a: 5'-GAGGTGGTATGTCCAAGTGT-3'; 均由吉林省库美生物科技有限公司合成。配对为 OYDV8077-s/

OYDV8285-a、OYDV8077-s/OYDV8253-a、OYDV-7966-s/OYDV8285-a、OYDV7966-s/OYDV8253-a, 扩增长度分别为 209、177、320、288 bp。

RT-PCR 方法的建立: 采用 TRIzol 法分别提取 2 株 OYDV 感病植株叶片的总 RNA, 并将其命名为 1 号和 2 号样品。用 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂合成 cDNA 第一条链, 以其为模板分别用上述 4 对引物进行 PCR 扩增。30 μ L PCR 反应体系: Primix TaqTM 10 μ L、10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L、模板 DNA 1 μ L、ddH₂O 17 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s; 退火温度待优化; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。根据目的条带信号强度选出最佳引物; 最佳引物设置 5 个退火温度, 即以 40、45、50、55、60 $^{\circ}$ C 分别进行 PCR 扩增, 反应体系及程序同上, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

ELISA 方法的建立: 根据直接 ELISA 检测方法对 OYDV 感病植株的叶片进行检测, 以样品 OD_{450 nm} (P 值)/阴性对照 OD_{450 nm} (N 值) 对该方法影响因素进行优化。在 37 $^{\circ}$ C 下设置样品包被时间分别为 15、30、60、90、120 min, 综合考虑检测时间及效率来确定最佳包被时间; 检测样品按最佳包被时间孵育, 37 $^{\circ}$ C 下设置 4G12-HRP 抗体浓度分别为 6.60、3.30、1.65、0.83、0.42、0.21、0.10、0.05 μ g/mL, 根据 P/N 值确定最佳工作浓度; 按优化后的最佳条件, 在室温以及 37 $^{\circ}$ C 下设置抗体孵育时间分别为 15、30、60、90、120 min。根据以上试验结果确定 OYDV 的 ELISA 检测方法。

田间样品的检测: 对吉林省公主岭市分蘖洋葱田中随机采集的 50 份叶片样品分别使用本研究建立的 RT-PCR 和 ELISA 方法进行检测。ELISA 试验

中以 P/N 值 ≥ 1.5 为阳性来判定检测结果。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测方法的建立

最佳引物筛选结果表明, 1、2 号样品中 OYDV7966-s/OYDV8253-a 引物组合扩增目的条带信号最强(图 1-a), 选为最佳引物。OYDV7966-s/OYDV8253-a 引物组合在 40、45、50、55、60℃ 退火温度下无明显差异(图 1-b), 由于温度低易导致非特异性结合, 所以最佳退火温度确定为 60℃。

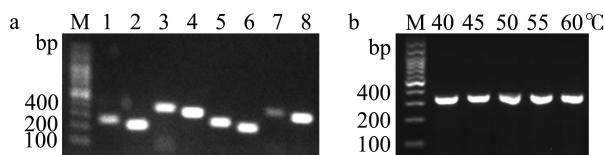


图 1 不同引物组合(a)和最佳引物在不同退火温度(b)下检测 OYDV 的 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of PCR products of OYDV detected by using different primer combinations (a) and at different annealing temperatures with the best primer combination (b)

M: DNA maker. a 图: 1~4 和 5~8 分别为 1 号和 2 号样品, 所用引物依次为 OYDV8077-s/OYDV8285-a、OYDV8077-s/OYDV8253-a、OYDV7966-s/OYDV8285-a、OYDV7966-s/OYDV8253-a; b 图: 引物为 OYDV7966-s/OYDV8253-a。In Fig. a: 1~4 and 5~8 are samples no. 1 and no. 2, using the primers OYDV8077-s/OYDV8285-a, OYDV8077-s/OYDV8253-a, OYDV7966-s/OYDV8285-a, OYDV7966-s/OYDV8253-a, respectively. In Fig. b: the primers are OYDV7966-s/OYDV8253-a.

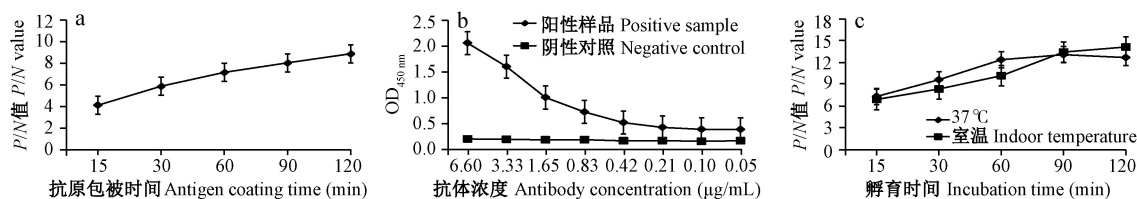


图 2 抗原包被时间(a)、抗体浓度(b)、不同温度下抗体孵育时间(c)对 ELISA 检测结果的影响

Fig. 2 Influences of antigen coating time (a), different antibody concentrations (b), antibody incubation time at different temperatures (c) on the ELISA detection results

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。Data are mean $\pm$ SD.

2.3 所建检测体系的应用

利用建立的 RT-PCR 和 ELISA 体系检测 50 份分蘖洋葱叶片, 二者检测结果中阳性样品均为 39 份; 但其中 RT-PCR 检测为阴性而 ELISA 检测为阳性的样品有 3 份; RT-PCR 检测为阳性而 ELISA 检测为阴性的样品有 3 份。2 种检测方法一致率为 88.0%。

3 讨论

在利用所建方法对田间分蘖洋葱植株进行检测时, 发现 RT-PCR 与 ELISA 的检测结果不符, 推测检测样品病毒含量低, ELISA 检测结果中可能存在部分假阴性; 本研究选用的 4G12-HRP 抗体为衣壳蛋白的单克隆抗体, 对检测 OYDV 等马铃薯 Y 病毒属病毒具有广谱性(尤晴等, 2016), 且洋葱病毒病多为复合侵染(Gao et al., 2004), 故推测洋葱样品中含有其它马铃薯 Y 病毒属病毒可能被检测抗体 4G12-HRP 识别, 但是不能被 OYDV 特异性引物通过 RT-

2.2 ELISA 检测方法的建立

当检测样品孵育时间为 120 min 时 P/N 值最高(图 2-a), 以此条件进行 4G12-HRP 抗体工作浓度优化。当抗体浓度为 3.3 $\mu\text{g/mL}$ 时, $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 出现较大幅度下降(图 2-b), 选定该浓度为抗体最佳工作浓度。抗体在 37℃ 下孵育 90 min 时 P/N 值最高, 与室温下孵育 90 min 时 P/N 值相当, 但相较于孵育 60、120 min 时变化趋势不明显(图 2-c), 为有利于实际操作, 选择 37℃ 下抗体孵育 60 min 为最佳抗体孵育时间。

PCR 方法检测出, 这有待进一步研究分析。本研究建立的 ELISA 体系在室温和 37℃ 条件下都具有良好的检测效果, 根据实际检测条件可调整抗体孵育时间, 在基层病毒检测条件参差不齐的情况下, ELISA 检测方法具有更好的适应性。

参考文献 (References)

- Gao Z, Johansen E, Eysers S, Thomas CL, Noel Ellis TH, Maule AJ. 2004. The *Potyvirus* recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant Journal*, 40(3): 376–385
- You Q, Li XY, Zhang CY, Zhang LL, Song JR, Wang YZ, Li QY. 2016. Identification of universal monoclonal antibodies against three viruses of *Potyvirus*. *Plant Protection*, 42(6): 76–79 (in Chinese) [尤晴, 李小宇, 张春雨, 张淋淋, 宋景荣, 王永志, 李启云. 2016. 马铃薯 Y 病毒属三种病毒通用型单克隆抗体的鉴定. *植物保护*, 42(6): 76–79]

(责任编辑: 李美娟)