

特异扩增 BBTV 基因组 III、IV、I 编码区部分序列 及其在检测中的应用*

孙德俊 毛国杰 孙 卉 腊 平 蔡文启**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 BBTV-DNA-III、IV 和 I, PCR 检测, 克隆

中图分类号 Q432.4 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2001)01-0109-04

香蕉束顶病(BBTD)是香蕉植株的一种毁灭性病害,正在世界(包括中国)的许多香蕉种植区蔓延^[1~7]。其病原物为香蕉束顶病毒(Banana Bunchy Top Virus, BBTV),被列为我国第三类检疫对象。目前生产上主要采用培育脱毒组培苗来防治 BBTD 的发生,因此建立一种能快速、灵敏、特异地检测 BBTV 的方法就显得很重要。国内现在大多采用 ELISA 方法,但其灵敏度不够高,且需要制备特异性强的抗血清,否则较易出现假阳性。参照漳州分离物 BBTV 基因组 III、IV、I 编码区的 DNA 序列,分别设计一对引物,建立了一种通过 PCR 特异地扩增编码 BBTV 外壳蛋白、复制起始蛋白和运动蛋白部分序列的 BBTV 检测方法。该方法也适用于我国其它地区香蕉植株或香蕉组培苗中 BBTV 的检测。

1 材料和方法

1.1 植物材料

具典型香蕉束顶病症状的香蕉植株采自漳州地区,无 BBTV 感染的香蕉组织取自无 BBTV 的香蕉组培苗。

1.2 植物组织总 DNA 的提取

1.2.1 CTAB 法 按文献[8]方法进行。

1.2.2 碱法:取 10~20mg 植物组织,加入 100 μ L 0.5mol/L 的 NaOH,充分研磨后,8000r/min 离心 5min,上清液稀释 10 倍后备用。

1.3 工具酶、试剂和序列测定

Taq DNA 聚合酶和 DNA Gel Extraction Kit 购自 Sangon 公司,dNTPs 购自 USB 公司,pGEM-T 载体购自 Promega 公司。序列由 BioAsia 上海博亚生物技术有限公司测定。其它试剂均为国产试剂。

1.4 引物设计及 PCR 扩增

1.4.1 根据已克隆的漳州分离物 BBTV-DNA-III 外壳蛋白编码区的 DNA 序列设计一对引物 Primer31: 5' ATCAAGAAGAGGCGGGTTG 3',和 Primer32: 5' TCAAACATGATATGTAATTC 3',以便克隆出 BBTV-DNA-III 的外壳蛋白部分编码区序列。PCR 扩增条件为 (1)94 $^{\circ}$ C 4min (2)94 $^{\circ}$ C 50s,58 $^{\circ}$ C 50s,72 $^{\circ}$ C 50s,总共 35 个循环 (3)72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.4.2 根据已克隆的漳州分离物 BBTV-DNA-IV 运动蛋白的编码区的 DNA 序列设计一对引物:

* 中国科学院“九五”院重大项目(KY951-A1-302-12-10)

作者简介 孙德俊(1966-)男,博士生,主要从事基因工程和植物病毒分子生物学研究。

**通讯作者

收稿日期 2000-05-30,修回日期 2000-08-01

Primer41 5′ CAACAGAGCGGGTGAAAC 3′和 Primer42 5′ GTTTCCTCGTCTTCCTTG 3′以便克隆出 BBTV-DNA-Ⅳ运动蛋白的部分编码区序列。PCR 扩增条件为 (1)94℃ 4min (2)94℃ 30s ,65℃ 30s ,72℃ 30s ,总共 35 个循环 (3)72℃ 延伸 10min。

1.4.3 根据已克隆的漳州分离物 BBTV-DNA-I 编码 33 kDa 的 DNA 序列 ,设计了一对引物 Primer11 : 5′ CTCATGGCGCGATATGTGGT 3′和 Primer12 5′ AAGGAAGTTAGCCATTA 3′ ,以便克隆出 BBTV-DNA-I 复制起始蛋白部分编码区序列。PCR 扩增条件为 (1)94℃ 4min (2)94℃ 1min ,68℃ 1min ,72℃ 1min ,总共 35 个循环 (3)72℃ 延伸 10min。

1.5 克隆和测序

用 DNA Gel Extraction Kit 回收特异的 PCR 产物 ,与 pGEM-T 载体连接后转化 *E. coli* JM109 ,经 PCR 扩增和酶切检测 ,挑选出阳性克隆并测序。

2 结果和讨论

2.1 PCR 扩增及序列分析

采用 CTAB 法 ,分别从感染和无 BBTV 感染的香蕉植株组织提取总 DNA ,并以此为模板 ,根据上述 PCR 扩增条件进行扩增。同时分别以含有外壳蛋白编码区全序列的质粒 pSKCP、含有运动蛋白编码区全序列的质粒 p400 及含有复制起始蛋白编码区全序列的质粒 pBV1 的 PCR 扩增做为阳性对照。引物 P31 和 P32 的 PCR 扩增结果见图 1a。引物 P41 和 P42 的 PCR 扩增结果见图 1b。引物 P11 和 P12 的 PCR 扩增结果见图 1c。从图示中可以看出 :以无 BBTV 感染的香蕉植株组织总 DNA 为模板未见有特异的扩增产物 ,只有以 BBTV 感染的香蕉植株组织的总 DNA 为模板时才有特异的扩增产物。

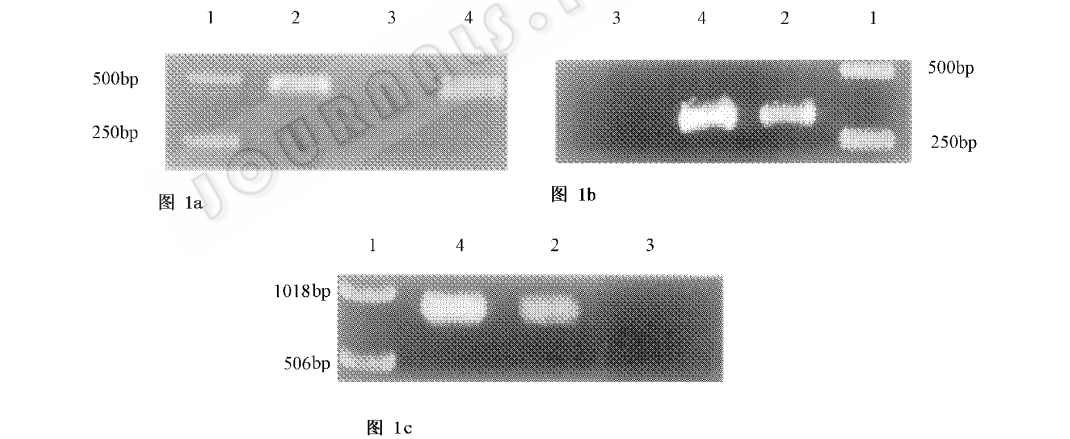


图 1a 引物 P31 和 P32 的 PCR 扩增结果 图 1b 引物 P41 和 P42 的 PCR 扩增结果
图 1c 引物 P11 和 P12 的 PCR 扩增结果

1. Marker ; 2. BBTV 感染的香蕉植株组织总 DNA 为模板的 PCR 结果 ; 3. 无 BBTV 感染的香蕉植株组织总 DNA 为模板的 PCR 结果 ; 4. 阳性质粒 (1a pSKCP ; 1b p400 ; 1c pBV1) 的 PCR 结果。
用引物 P31 和 P32 ,PCR 扩增出约 489bp 的特异的 DNA 片段 ,克隆后测序 ,其序列如图 2 所示。其序列与漳州分离物 BBTV-DNA-Ⅲ 的外壳蛋白编码区序列 (将另文发表) 第 25bp 到 513bp 之间序列完全一致。用引物 P41 和 P42 ,PCR 扩增出约 323bp 的特异的 DNA 片段 ,克隆后测序 ,其序列如图 3 所示。其序列与漳州分离物 BBTV-DNA-Ⅳ 编码 15.5kD 蛋白质的序列 (将另文发表) 第 11bp 到 333bp 之间序列完全一致。用引物 P11 和 P12 ,PCR 扩增出约 810bp 的特异的 DNA 片段 ,克隆后测序 ,其序列如图 4 所示。其序列与漳州分离物 BBTV-DNA-I 编码 33kD 蛋白质其核苷酸序列 [2] 第 103bp 到 912bp 之间序

列完全一致。结果表明用本文所述的 PCR 方法检测 BBTV 的特异性极强。

碱法提取 DNA 的 PCR 扩增结果与 CTAB 法提取 DNA 的 PCR 扩增结果相同。对 CTAB 法及碱法提取的 DNA 进行 10 ,100 ,1000 ,10000 倍稀释时 ,三对引物都能扩增出各自特异的条带 ,但随着模板 DNA 的稀释倍数增大 ,PCR 产量依次变少 ,往往造成电泳时成带虚弱 ,易造成假阴性。因此建议 PCR 扩增时 ,取模板 DNA 1 μ L 或稀释 10 倍后取 1 μ L 作模板。此外 ,提取 DNA 时选用香蕉植株材料的生理状况和感病程度也影响提取的 DNA 中 BBTV-DNA 的含量 ,所以进行 PCR 扩增时模板 DNA 的量可酌情做适当的调整。

```
1 ATCAAGAAGA GGC GG GTTG CAGGAGGAAG TATGGAAGCA AGGCGGCAAC AAGCCACGAC
61 TACTCGTCGT TAGGATCAAT ATTGGTTCCT GAAAATACCG TCAAGGTATT TAGGATTGAG
121 CCTACTGATA AAACATTACC CAGATATTTT ATCTGGAAAA TGTTTATGCT GTTGGTGTGC
181 AAGGTGAAGC TCGGAAGAAT ACTTCACTGG GCTATGATTA AAAGTTCATG GGAAATCAAC
241 CAGCCGACTA CATGTCTGGA AGCACCAGGT TTATTTATAA AACCTGAACA TAGCCATCTG
301 GTTAAACTGG TATGTAGTGG GGAAGTAGAA GCAGGAGTCG CAACAGGGAC ATCAGATGTT
361 GAATGTCTTC TTAGGAAGAC AACTGTGTTG AGGAAGAATG TAACAGAGGT GGATTACTTG
421 TATTTGGCAT TTTATAGTAG TGCTGGAGTT AGTATTAAC TACCAGAACAG AATTACATAT
481 CA GTTTGA (阴影部分为引物序列)
```

图 2 引物 P31 和 P32 扩增出特异 DNA 片段的序列

```
1 CAACAGAGCG GGTGAACTA TTCTTCGAAT GGTTTCTGTT TATTGGAGCA ATATTCATTG
61 CGATAACAAT ATTATATATA TTGTTGGCAT TGCTCTTTGA GGTTCCCAAG TATATTAAGG
121 AGGTTGTGAA GTATCTCGTA GAATACATGA CCAGACGACG TGTATGGATG CAGAAAACGC
181 AGTTGACGGA GGCAACCGGA GATGCAGAGC TCGTCAGAGG TATTGTGGAA GAGAGACGCG
241 ATCAACAAGC GGCTATCATA CCACAGGCAA GTCATGTAA CCCTTCTCAA GCAAGAAGGG
301 ATGACCAAGG AAGACGAGGA AAC (阴影部分为引物序列)
```

图 3 引物 P41 和 P42 扩增出特异 DNA 片段的序列

```
1 ATGGCGCGAT ATGTGGTATG CTGGATGTTT ACCATCAACA ATCCC GCCTT C GCTACCAGTG
61 ATGCGGGATG AGATTAATAA TATGGTATAT CAAGTGGAGA GGGGACAGGA GGGTACTCGT
121 CATGTGCAAG GATACGTCGA GATGAAGAGA CGAAGCTCTC TGAAGCATAT GAGAGGCTTC
181 TTCCAGGCG CACACCTTGA GAAACGAAAAG GGGAGCCAAG AAGGAGCACG GGCTTACTGT
241 ATGAAGGAAG ATACAAGAAT CGAAGGTCCC TTCGAGTTTG GTGCATTAA ATTGTCATGT
301 AATGATAATT TATTTGATGT CATAAGGAT ATGCGTGAAG CTCATAACG GCCTCTGGAA
361 TATTTATATG ATTGTCCGAA TACCTTCGAC AGAAGTAAGG ATACATTATA CAGAGTGCAA
421 GCAGAGCTGA ATAAAACGAA GGCATGAAT AGCTGGAAGA CATCCTTCAA TGCATGGACA
481 TCTGAAGTAG AAAATATTAT GGCGGAGCCA TGTTATCGAA GCATTATTTG GGTCTATGGC
541 CCAATGAAG GTGAAGGAAA GCCAACCTAT GCAAAATATT TAATGAAGCC TAAGAATGCG
601 TTTTATTCGC CAGGAGGAAA ATCATTGGAT ATATGTAGAT TGTATAATTA TGAGGATATA
661 GTTATATTTG ATATTTCCAG ATGCAAGGAG GAATATTTAA ACTATGGTTT ATTAGAAGAA
721 TTTAAAAATG GAATTATCCA AAGCGGAAA TATGAACCCG TTTTGAAAAT TGTAGAATAT
781 GTGGAAGTCA GGCTAATGGC TAACCTCCTT (阴影部分为引物序列)
```

图 4 引物 P11 和 P12 扩增出特异 DNA 片段的序列

虽然上述 PCR 扩增所用的模板是漳州地区感染 BBTV 的香蕉植株组织提取的 DNA ,但是我们建立的 PCR 检测方法具有比较广泛的使用范围。将已克隆的漳州分离物 BBTV-DNA-Ⅰ、BBTV-DNA-Ⅲ及 BBTV-DNA-Ⅳ的编码区序列和 Genbank 中的其它分离物的 BBTV-DNA-Ⅰ和 BBTV-DNA-Ⅲ及 BBTV-DNA-Ⅳ的编码区序列用 Dnastar 进行比较 ,结果表明 :设计的 P31 ,P32 引物同样适用于亚洲亚组的中国(广东和台湾)、菲律宾、越南的 BBTV 分离物以及南太平洋亚组的澳大利亚、斐济、布隆迪的 BBTV 分离物。引物 P41 ,P42 也适用于亚洲亚组中国广东、菲律宾分离物和南太平洋亚组的澳大利亚、

BBTV 分离物。引物 P11, P12 也能适用于亚洲亚组中国(广东和台湾)的 BBTV 分离物和南太平洋亚组的澳大利亚 BBTV 分离物。

2.2 PCR 检测方法与其它方法的比较

以核酸杂交为基础的植物病毒检测需要标记探针,而标记的探针一般不宜长期使用,这种方法操作复杂,费时费力不适用于大批量的田间检测。同位素标记探针虽然灵敏度高,但是对人体造成的危害及对环境造成的污染不容忽视。如采用非同位素标记,其灵敏度又不及同位素标记。ELISA 检测方法需要制备特异性强的抗血清,然而 BBTV 尚无繁殖寄主,从感病香蕉组织中提取又因香蕉组织易氧化及病毒含量低等问题使纯化的 BBTV 往往混杂寄主成分,且得到的病毒数量较少,因此不易制备特异性强的抗血清,特异性不够强的抗血清将导致检测时易出现假阳性。此外,ELISA 检测方法的灵敏度只能达到 ng 级水平。而选用 PCR 扩增检测方法时,合成的引物可长期使用,灵敏度能达到 pg 级水平,而且特异性强,所用的植物材料极少,取材量少也更适合于检测脱毒组培苗。

致谢 漳州市农科所宋春华副研究员提供植物材料。

参 考 文 献

- [1] Harding R M, Burns T M, Dale J L. *Journal of General Virology*, 1991, **72**: 225~230.
- [2] Harding R M, Burns T M, Harfner G J. *Journal of General Virus*, 1993, **74**: 323~328.
- [3] Xie W S, Hu J S. *Phytopathology*, 1995, **85**: 339~347.
- [4] Khalid S, Soomro M H, Stover R H. *Plant Dis*, 1993, **77**: 101.
- [5] 徐绍华, 蔡文启, 莽克强. *微生物学报*, 1993, **33**(1): 158~161.
- [6] 肖火根, Hu John, 李华平. *病毒学报*, 1999, **15**: 55~63.
- [7] 腊平, 蔡文启, 方荣祥. *病毒学报*, 2000, **16**: 158~161.
- [8] Murray M G, Thompson W F. *Nucleic Acid Res*, 1980, **8**: 4321~4325.

SPECIFIC AMPLIFICATION OF THE CODING SEQUENCES OF BBTV III, IV, I AND THEIR APPLICATION IN BBTV DETECTION

Sun Dejun Mao Guojie Sun Hui La Ping Cai Wenqi

(Institute of Microbiology, The Academy of Chinese Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Banana bunchy top virus disease (BBTD) is a disastrous disease in bananas, and it is spreading in the world (including China) by the banana bunchy top virus (BBTV). At present, virus-free plantlets are used to prevent BBTD in banana production, therefore, it is very important to establish a method to detect BBTV quickly, sensitively and specifically. ELISA is now popularly used to detect BBTV. The sensitivity of this method is not high enough, and needs specific anti-serum, otherwise, pseudo-positive results often occur. According to DNA coding sequences of component III, IV and I of BBTV isolates from Zhangzhou, China, three pairs of primers are designed to establish a PCR method to specifically amplify parts of coding sequences of the BBTV coat protein, movement protein and replicase-association. This method is also applicable to detect BBTV of bananas or cultured banana seedlings in other regions.

Key words: BBTV-DNA-III, IV and I, PCR, Detection