

实验方法与技术

Experimental Method & Technology

应用 RT-PCR 和 dot-ELISA 方法检测单头灰飞虱体内水稻条纹病毒

张水英¹, 蒋春和², 兰平秀^{1,3}, 张雪峰^{4*}, 李凡^{1*}

(1. 云南农业大学农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 昆明 650201; 2. 云南农业大学教务处, 昆明 650201; 3. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201; 4. 红河学院, 蒙自 661199)

摘要 本文比较了 RT-PCR 和 dot-ELISA 两种方法对单头灰飞虱携带水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV)的检出率、检测灵敏度和检测成本。结果表明,两种方法均能检测到单头灰飞虱体内的 RSV,RT-PCR 检测单头灰飞虱体内 RSV 的阳性检出率比 dot-ELISA 方法低 11.79%~15.77%,但 RT-PCR 的检测灵敏度比 dot-ELISA 高 10 倍,RT-PCR 技术的检测成本比 dot-ELISA 的高。结果暗示,对于单头介体昆虫中的病毒检测,RT-PCR 技术的检出率不一定比 dot-ELISA 的高。综合考虑后,如对室外大批量灰飞虱进行带毒率检测时可采用 dot-ELISA 方法,如需准确分析单头灰飞虱体内 RSV 时可采用 RT-PCR 方法。

关键词 水稻条纹病毒; 灰飞虱; RT-PCR; dot-ELISA; 检测

中图分类号: Q 93-331, S435.111.42 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.02.021

Detection of *Rice stripe virus* in individual small brown planthoppers by RT-PCR and dot-ELISAZhang Shuiying¹, Jiang Chunhe², Lan Pingxiu^{1,3}, Zhang Xuefeng⁴, Li Fan¹

(1. Key Laboratory of Agricultural Biodiversity and Pest Management of Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Office of Teaching Affairs, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 4. Honghe University, Yunnan 661199, China)

Abstract The detection rates, sensitivities and cost of RT-PCR and dot-ELISA methods were compared for the detection of *Rice stripe virus* (RSV) in individual small brown planthoppers (SBPH). The results indicated that RSV could be detected in single SBPH successfully by both methods. The RSV-positive detection rates in single SBPHs by RT-PCR were 11.79%—15.77% lower than that by dot-ELISA; however, the sensitivity of RT-PCR was 10 times higher than that of dot-ELISA. The cost of RT-PCR was also higher. The results suggested that the detection rate of RSV in individual insect vectors by RT-PCR might be lower than that by dot-ELISA. Therefore, dot-ELISA is recommended for the detection of RSV in individual SBPHs when large-scale field samples need to be tested, while RT-PCR is used for accurate analysis of the virus in single SBPHs.

Key words *Rice stripe virus*; small brown planthopper; RT-PCR; dot-ELISA; detection

水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV)引起水稻条纹叶枯病,自然界中可以由灰飞虱(*Laodelphax striatellus*)、白脊飞虱(*Unkanodes sapporona*)、白带飞虱(*U. albifascia*)和白条飞虱(*Ter-*

thron albiovittatum)传播,但主要依靠灰飞虱以持久方式经卵传给后代^[1]。水稻是 RSV 最主要的寄主,受侵染的水稻最典型的外部症状为出现褪绿的条纹斑点或斑块,一般最早出现在嫩叶,根据具体表现症

收稿日期: 2015-01-30

修订日期: 2015-03-31

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金重大专项(ZD2012005);云南省高校科技创新团队支持计划(云教科[2014]22号)

* 通信作者 E-mail: zxf197927@163.com; fanlikm@126.com

状可以分为卷叶型和展叶型两类。水稻条纹叶枯病最早于 1897 年在日本关东地区发生,随后在俄罗斯、朝鲜、韩国、前苏联和乌克兰相继发生^[2]。我国自 1963 年首次在江苏南部地区发生后,该病迅速扩散到 18 个省(市、自治区)的广大稻区,并在江苏、安徽、河南、山东、云南、北京、上海、台湾等地暴发流行,病情严重的稻区甚至颗粒无收。自 2006 年以来,通过选育抗病品种、加强病害的预测预报、合理用药等综合治理措施,该病害发生面积已大幅下降^[3],但是全国各地仍时有发生,因此对该病进行早期预测预报及有效防控仍很有必要。

灰飞虱的带毒率与水稻条纹叶枯病的发生关系密切,快速、准确地检测灰飞虱体内的 RSV 对水稻条纹叶枯病的预测预报和防治具有重要意义。要准确探明田间灰飞虱的带毒率,需要对大量单头灰飞虱携带 RSV 情况进行检测。RSV 的检测方法有许多,包括 ELISA、DIBA、Western Blot、RT-PCR、Northern 杂交等^[4-6],其中 RT-PCR 具有灵敏度高、特异性强、准确性好等特点。dot-ELISA 除具有灵敏度高、特异性强等特点外,还具有成本低的优势,适于大批量样品检测,且不需要特殊仪器设备,操作简便,结果判定简单易行,因此被广泛应用于灰飞虱体内 RNA 病毒的检测^[7-9]。虽然目前利用 RT-PCR 和 dot-ELISA 检测灰飞虱体内水稻病毒的报道有不少,但尚未见比较这两种方法检测单头灰飞虱体内 RSV 的相关报道。本文比较了两种方法对单头灰飞虱体内 RSV 的检出率、检测灵敏度和检测成本等,以期对单头灰飞虱体内 RSV 以及其他虫传病毒的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

可能携带水稻条纹病毒的灰飞虱高龄若虫和成虫,在温室用‘武育梗 3 号’饲养。

1.2 试验试剂

0.01 mol/L PBS 缓冲液,百泰克公司的 TRI-pure 总 RNA 提取试剂,TaKaRa 公司的 Reverse Transcriptase M-MLV RNase H⁻ 反转录试剂盒,Tiagen 公司的 Taq DNA Polymerase 试剂盒,美国 KPL 公司的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 二抗,Sigma 公司的 TMB 显色液,美国 PALL 公司的硝酸纤维素滤膜。RSV 单克隆抗体由浙江大学周雪平教授惠赠。

1.3 试验方法

1.3.1 样品准备

在比较两种方法的检出率时,设置了两个处理,处理 1:同一头灰飞虱,用 PBS 研磨后将上清液分成两部分,一部分直接用于 dot-ELISA 检测,另一部分提 RNA 后进行 RT-PCR 检测,该处理设置 3 组重复,分别检测灰飞虱 20、30、20 头。处理 2:不同的单头灰飞虱分别进行 RT-PCR 和 dot-ELISA 检测,均各自设置 2 组重复,分别检测灰飞虱 34、72 头。

1.3.2 单头灰飞虱体内 RSV 的 RT-PCR 检测

根据已报道的 RSV RNA4 序列,设计特异性 RSV 检测引物(RNA4dF1: 5'-ACACAAAGTC-CAGGGCATT-3', RNA4dR1: 5'-CACACAA-GAAGGTCAACCCAAAC-3')。利用 TRIpure 试剂提取单头灰飞虱上清液中的总 RNA,取 1 μ L 总 RNA 用 ddH₂O 按 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 倍进行系列稀释,然后分别按照 Reverse Transcriptase M-MLV RNase H⁻ 反转录试剂盒和 Taq DNA Polymerase 试剂盒说明书进行 RT-PCR 扩增。

1.3.3 单头灰飞虱体内 RSV 的 dot-ELISA 检测

dot-ELISA 采用 Xie 等^[10]的方法,略有改动。取 1 μ L 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液研磨单头灰飞虱后的上清液,用 0.01 mol/L PBS 进行 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 系列稀释;取 2 μ L 稀释液点到 NC 膜上,室温干燥;用 5% 脱脂奶粉室温封闭 60 min,用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 缓冲液按 1:8 000 稀释 RSV 单克隆抗体,将抗体与 NC 膜在室温孵育 60 min;洗膜后与用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 缓冲液按 1:10 000 的比例稀释辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 二抗室温孵育 60 min;洗膜后用 TMB 底物显色液显色,待 NC 膜上的阳性样品呈现明显蓝色而阴性对照未显色时弃显色液终止反应,记录结果并照相保存。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 和 dot-ELISA 方法对单头灰飞虱体内 RSV 的检出率

处理 1 中,RT-PCR 的 RSV 平均阳性检出率为 55.56%,dot-ELISA 的 RSV 平均阳性检出率为 67.35%,RT-PCR 的 RSV 平均阳性检出率比 dot-ELISA 方法低 11.79%。处理 2 中,RT-PCR 和 dot-ELISA 的 RSV 平均阳性检出率分别为 27.82% 和 43.59%,前者阳性检出率比后者低 15.77%。无

论是同一头灰飞虱同时进行 RT-PCR 检测和 dot-ELISA 检测,还是不同的单头灰飞虱分别进行 dot-ELISA 和 RT-PCR 检测,RT-PCR 的 RSV 阳性检出率都比 dot-ELISA 的低(表 1)。

表 1 RT-PCR 和 dot-ELISA 对单头灰飞虱体内 RSV 的检出率¹⁾
Table 1 Detection rate of RSV in individual SBPHs by RT-PCR and dot-ELISA

处理 Treatment	样品数/头 Sample	RT-PCR			dot-ELISA		
		检出数/头 Number detected	检出率/% Detection rate	平均检出率/% Average detection rate	检出数/头 Number detected	检出率/% Detection rate	平均检出率/% Average detection rate
处理 1 Treatment 1	20	11	55.00	55.56	19	95.00	67.35
	30	20	66.67		16	55.33	
	20	9	45.00		12	51.72	
处理 2 Treatment 2	34	9	26.47	27.82	—	—	—
	72	21	29.17		—	—	
	34	—	—	—	15	44.12	43.59
	72	—	—		31	43.06	

1) 处理 1:随机采集的同一头灰飞虱既进行 RT-PCR 检测又进行 dot-ELISA 检测;处理 2:随机采集的不同的单头灰飞虱,一半进行 RT-PCR 检测,另一半进行 dot-ELISA 检测。
Treatment 1: RSV detection was conducted by both RT-PCR and dot-ELISA for the same individual SBPH; Treatment 2: RSV detection was conducted by RT-PCR or dot-ELISA for different individual SBPHs.

2.2 RT-PCR 和 dot-ELISA 对单头灰飞虱体内 RSV 的检测灵敏度

取一头灰飞虱用 PBS 缓冲液充分研磨后得到上清液,一部分上清液用 PBS 按 10×梯度进行稀释后用于 dot-ELISA 检测,稀释倍数为 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵和 10⁻⁶,随着稀释倍数增大,阳性显色逐渐减弱,稀释至 10⁻²后便不再显色(图 1),即 dot-ELISA 方法可以检测到 RSV 的最大稀释倍数为原液的 100 倍。另一部分上清液提 RNA 后用 ddH₂O 按 10×梯度进行稀释后用于 RT-PCR 检测,稀释倍数为 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵和 10⁻⁶,随着稀释倍数增大,目标条带逐渐减弱,稀释至 10⁻³后便检测不到目标条带(图 2),即 RT-PCR 方法可以检测到 RSV 的最大稀释倍数为原 RNA 浓度的 1 000 倍。

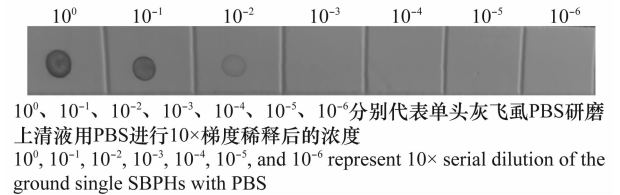


图 1 Dot-ELISA 对单头灰飞虱体内 RSV 的检测灵敏度
Fig. 1 Detection sensitivity for RSV in individual SBPHs by dot-ELISA

2.3 RT-PCR 和 dot-ELISA 对单头灰飞虱体内 RSV 的检测成本比较

对单头灰飞虱进行 RT-PCR 检测时,如果选用

较为便宜的 TRIpure 总 RNA 提取试剂、TaKaRa Reverse Transcriptase M-MLV 反转录试剂盒和天根 Taq DNA Polymerase 试剂盒等,折算后检测 1 个样品的主要试剂、耗材成本约为 20~30 元;对单头灰飞虱进行 dot-ELISA 检测时,需用到硝酸纤维素滤膜、RSV 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 二抗和 TMB 显色液,折算后检测 1 个样品的试、耗材成本约为 8~10 元,约是 RT-PCR 检测成本的 1/3。由此可见 RT-PCR 检测成本比 dot-ELISA 高许多。

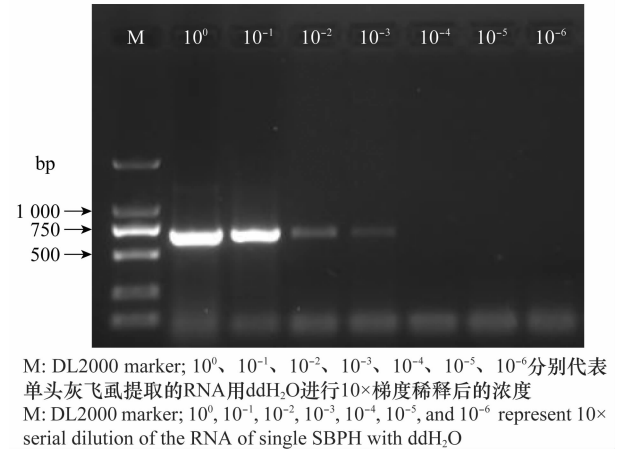


图 2 RT-PCR 对单头灰飞虱体内 RSV 的检测灵敏度
Fig. 2 Detection sensitivity for RSV in individual SBPHs by RT-PCR

3 讨论

刘珊珊等^[11]、马占鸿等^[12]的研究结果表明 RT-

PCR 检测灵敏度比 dot-ELISA 的高,因此我们起初也一直认为 RT-PCR 的检出率应该比 dot-ELISA 的高,但是经过多次试验,结果都是 RT-PCR 的阳性检出率比 dot-ELISA 的低,且存在 RT-PCR 检测为阳性的样品 dot-ELISA 检测却为阴性、dot-ELISA 检测为阳性的样品 RT-PCR 检测为阴性的现象。针对 RT-PCR 和 dot-ELISA 阳性检出率不一致的现象,我们分别用 TRIpure、RNAiso 和 Trizol 3 种 RNA 提取试剂分别对单头灰飞虱的 RNA 进行提取,发现 3 种试剂的提取效果差异不大,结果依然是 RT-PCR 的阳性检出率比 dot-ELISA 的低,说明 RNA 的提取试剂不是造成 RT-PCR 检出率比 dot-ELISA 低的主要原因。另外对两种方法检测结果出现双向差异的这些样品进行 10、50、100、200 倍稀释后再检测,发现结果仍然是 RT-PCR 的阳性检出率比 dot-ELISA 的低。于是我们用 IC-RT-PCR 对这些样品进行验证,结果显示 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 的检测结果基本一致,且 IC-RT-PCR 阳性检出率比 RT-PCR 提高 8% 左右,依然存在部分阳性结果与 dot-ELISA 不吻合的现象。

饶黎霞等^[13]的研究结果也表明,分别用 RT-PCR 和 dot-ELISA 检测水稻上的南方水稻矮缩病毒、水稻矮缩病毒和水稻齿叶矮缩病毒时,从检出率看,两种方法的吻合率并不完全一致,并因病毒而异。另外嵇朝球等^[14]、杨杰等^[15]认为 dot-ELISA 是在蛋白质水平上检测有无病毒的外壳蛋白,这种检测法受到基因表达和环境条件等因素的影响,检测结果假阳性较高,导致 dot-ELISA 的检出率要高许多。另外在开展 RT-PCR 检测前需要对单头灰飞虱进行 RNA 提取,因虫体很小,很容易在提取过程中发生 RNA 的降解及丢失,导致 RT-PCR 的检出率要低一些,这些可能都是导致在对大批量单头灰飞虱进行检测时很难做到两种方法的检测结果完全吻合的原因。

在使用成本及实用性方面,RT-PCR 方法所使用的仪器和试剂成本较高,需要专业人员进行操作,不利于大批量的样品检测。dot-ELISA 方法的成本相对较低,灵敏度高、特异性强,不需要特殊仪器设备,适用于大批量的单头灰飞虱样品检测,但可能存在假阳性现象。总的来说在进行田间大批量灰飞虱

带毒率的检测时,dot-ELISA 方法是一个不错的选择,而需要准确分析单头灰飞虱体内 RSV 时,选择 RT-PCR 方法较好,各单位可根据自己的条件及具体情况来选择检测技术^[16]。

参考文献

- [1] 白雪亮,王金菊,周维,等. 水稻条纹叶枯病的研究进展[J]. 生物学通报, 2007, 42(8): 4-6.
- [2] 任春梅,程兆榜,季英华,等. 灰飞虱来源的水稻条纹病毒病害特异性蛋白基因遗传多样性[J]. 华北农学报, 2010, 25(6): 132-138.
- [3] 郑璐平. 水稻条纹病毒基因 NS2 致病作用机理分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [4] 周益军,刘海建,王贵珍,等. 灰飞虱携带的水稻条纹病毒免疫检测[J]. 江苏农业科学, 2004(1): 50-52.
- [5] 孙祥良,王华第,朱金良,等. 灰飞虱携带水稻条纹叶枯病毒检测研究[J]. 中国植保导刊, 2007, 27: 7-9.
- [6] Cai Lijun, Ma Xizhi, Kang Lin, et al. Detecting *Rice stripe virus* (RSV) in the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*) with high specificity by RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2003, 112: 115-120.
- [7] 王朝辉,周益军,范永坚,等. 从单头灰飞虱中检测水稻黑条矮缩病毒简单快速的方法[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2002, 20(4): 340-343.
- [8] 曲志才,沈大棣. 单头灰飞虱体内水稻条纹叶枯病毒的快速检测[J]. 植物学通报, 2008, 25(4): 459-464.
- [9] 张开玉,熊如意,周益军. 灰飞虱体内水稻条纹病毒的检测[J]. 植物保护学报, 2008, 35(5): 410-414.
- [10] Xie Yan, Jiao Xiaoyang, Zhou Xueping et al. Highly sensitive serological methods for detecting tomato yellow leaf curl virus in tomato plants and whiteflies [J]. Virology Journal, 2013, 10: 142.
- [11] 刘珊珊,周倩,高必达,等. Dot-ELISA 和 RT-PCR 检测南方水稻黑条矮缩病毒灵敏度的比较[J]. 湖南农业科学, 2014(1): 51-54.
- [12] 马占鸿,常胜军,周广和. 应用 dot-ELISA 和 RT-PCR 法检测玉米花粉中玉米矮花叶病毒的研究[J]. 植物病理学报, 1999, 29(3): 247-249.
- [13] 饶黎霞,王震成,吴建祥,等. 2011-2012 年三种水稻矮缩病在我国分布及发生调查[J]. 植物保护, 2014, 40(3): 151-156.
- [14] 嵇朝球,钟环,钟佩英,等. 水稻条纹叶枯病病毒 RT-PCR 快速检测研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2005, 23(2): 188-191.
- [15] 杨杰,王军,陈志德,等. 利用 RT-PCR 快速检测水稻条纹叶枯病病毒[J]. 金陵科技学院学报, 2008, 24(1): 40-44.
- [16] 李海明,沈建国,吴祖建,等. 3 种方法检测黄瓜绿斑驳花叶病毒的灵敏度对比分析[J]. 中国农学通报, 2010, 26(17): 269-272.

(责任编辑: 杨明丽)