

丹参病毒病病原鉴定研究

甄杰¹, 吴志明², 谢晓亮^{2*}, 朱水芳³, 温春秀², 高必达^{1*}

(1. 湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2. 河北省农业科学院 药用植物研究中心, 河北 石家庄 050051;
3. 国家质检总局植物检疫所, 北京 100029)

摘要: 目的 鉴定我国中草药丹参病毒病的病原及其种类。方法 从自然感染引起花叶、矮化、褪绿和斑驳的丹参植株上分离病毒病原, 进行生物学接种、电镜观察、双抗体夹心酶联免疫吸附测定、逆转录聚合酶链式反应及基因克隆和序列分析。结果 通过指示植物症状、电镜下病毒粒体形状和血清学反应发现病毒分离物与黄瓜花叶病毒有较近的亲缘关系, 初步将该病毒分离物鉴定为黄瓜花叶病毒。通过逆转录聚合酶链式反应及基因克隆和序列分析, 证明该病毒分离物为一个黄瓜花叶病毒新株系。结论 感染丹参的病毒病原为黄瓜花叶病毒, 这是首次在我国中草药丹参上发现黄瓜花叶病毒。

关键词: 丹参; 黄瓜花叶病毒; 电镜观察; 双抗体夹心酶联免疫吸附测定; 逆转录聚合酶链式反应; 基因克隆; 序列分析
中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)12-1136-04

Identification of pathogen from Danshen virus diseases in China

DING Yuan-jie¹, WU Zhi-ming², XIE Xiao-liang², ZHU Shui-fang³, WEN Chun-xiu², GAO Bi-dai¹

(1. College of Plant Protection, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; 2. Herbal Medicine Research Center, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Science, Shijiazhuang 050051, China;
3. Institute of Animal and Plant Quarantine, AQSIQ, Beijing 100029, China)

Abstract Object To identify the virus disease pathogens and its species from Danshen (*Salvia miltorrhiza* Bge.) which is an important kind of Chinese traditional and herbal drugs in China. **Methods** The virus pathogens were isolated from naturally infected Danshen with symptoms of mosaic, stunting, chlorosis and mottle, and the isolates were identified by biological inoculation, electron microscope observation, double-antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA), reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) detection and gene cloning and sequence analysis. **Results** By the indicative plant symptoms, virus particles size in electron microscope and serological reactions, the virus isolate was found to be very similar to cucumber mosaic *cucumovirus* (CMV) and it was identified as CMV primarily. RT-PCR detection, gene cloning and sequence analysis demonstrated that the isolate was a new CMV isolate. **Conclusion** The virus disease pathogen infecting Danshen was CMV, this is the first reporting of a new CMV isolate from Danshen in China.

Key words Danshen (*Salvia miltorrhiza* Bge.); cucumber mosaic *cucumovirus* (CMV); electron microscope observation; DAS-ELISA; RT-PCR; gene cloning; sequence analysis

丹参 *Salvia miltorrhiza* Bge. 为唇形科鼠尾草属多年生草本植物, 以根入药, 别名有红根、大红袍、血参根等, 是我国一种常用大宗中草药, 也是国际上开发的热门药材, 主要用于治疗心血管系统疾病。近年来在河北安国、山东等地发现, 丹参上有一种病害引起丹参退化, 该病田间发病率高, 有些田块高达 60%~80%, 表现为花叶、斑驳、卷叶、黄花、矮化等典型症状, 感病植株的根系细小, 药用成分含量降

低, 严重影响了丹参的产量和质量。为此对本病进行了初步研究, 在发病组织中没有发现真菌及细菌病原, 判断为病毒病原的可能性较大。我们根据世界上已经报道的侵染唇形科植物的病毒种类, 采用指示植物、DAS-ELISA 电镜观察及 RT-PCR 分子检测等进行了系统研究, 发现了黄瓜花叶病毒和此病害相关, 并且可能为一新株系。

1 材料与方

* 收稿日期: 2003-04-18

基金项目: 河北省科技攻关项目资助(03220111)

* 通讯作者 Tel (0311) 765129 E-mail wuzhiming71@hotmail.com

1.1 材料: 丹参退化病株经国家质检总局动植物检疫所朱水芳博士鉴定, 采自河北省农林科学院药用植物研究中心实验基地, 现保存在 -70°C 冰箱。主要实验仪器 Labsystems Dragon Welscan MK 3酶联检测仪, 日立 H-7500透射电镜, Gradient cyler PCR仪, 安莱中国凝胶成像系统, DU 640核酸蛋白分析仪。

1.2 试剂: CMV DAS-ELISA检测试剂盒购于 Agdia 公司, PCR引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成, P1互补引物: $5'\text{tagcagaactgccaactcgcgt } 3'$, P2同源引物: $5'\text{tcgcgattcaaatcgagtt } 3'$, RNA提取试剂盒购于上海生工生物工程技术服务有限公司, pfuDNA聚合酶购于北京鼎国生物技术有限公司, M-MLV 逆转录酶, DNA片断回收试剂盒采用 Promega公司产品, pMD 18-T Vector 购于宝生物工程(大连)有限公司, 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 由国家动植物检疫实验所保存。

1.3 方法

1.3.1 生物学接种: 按常规汁液摩擦接种法, 将丹参带病毒的叶片汁液接种到白肋烟、三生烟、心叶烟、苋色藜 4种指示植物上, 3次重复, 然后罩上防虫网培养, 30 d后观察病毒症状反应。

1.3.2 电镜观察检测: 黄瓜花叶病毒的提纯采用裴美云等的方法, 稍作修改^[1]。复染采用 2%醋酸铀, 然后进行电镜观察, 拍照。

1.3.3 DAS-ELISA检测 CMV DAS-ELISA检测过程按照其说明书进行, 酶联仪上信号检测选用临界值进行, 滤光片选用 405 nm

1.3.4 RT-PCR检测: 具体方法见文献^[2]。

RNA的提取: 按照 RNA提取试剂盒提供的方法, 从具典型症状的病叶中提取总 RNA

cDNA第一链的合成: 在 Eppendorf管中加入 $1\mu\text{L}$ 模板 RNA, $1\mu\text{L}$ 引物 primel ($20\mu\text{mol}$), 无菌重蒸水 $9\mu\text{L}$, 置于 90°C 水浴 3 min, 放冰上 5 min, 加入 $1\mu\text{L}$ Rnasin (20U), $2\mu\text{L}$ DTT (0.1mol), $4\mu\text{L}$ $5\times$ first strand buffer (0.25mol/L Tris $^{\circ}$ Cl pH 8.2, 25mmol/L MgCl_2 , 0.25mol/L KCl, 0.25mg BSA) $1\mu\text{L}$ dNTP (10mmol/L), $1\mu\text{L}$ M-MLV 逆转录酶 ($200\text{U}\mu\text{L}$), 42°C 水浴 60 min

PCR扩增: 将下列组份依次加入 0.5mL Eppendorf管中, 无菌重蒸水 ($40\mu\text{L}$), $10\times$ PCR buffer ($5\mu\text{L}$), cDNA模板 ($1\mu\text{L}$), 引物 prime 1 ($1\mu\text{L}$), 引物 prime 2 ($1\mu\text{L}$), dNTP (10mmol/L), $1\mu\text{L}$ (3U) pfuDNA聚合酶, 在 PCR仪上按以下条件扩增: 94°C

变性 3 min后, 94°C 40 s, 56°C 60 s, 72°C 60 s, 共进行 35个循环, 循环结束后 72°C 保温 10 min

电泳分析: 灌制 1.2% 琼脂糖凝胶, 取 $8\mu\text{L}$ PCR产物加 $1\mu\text{L}$ 凝胶加样缓冲液 ($6\times$ loading-buffer)混匀后点样, 以 $3\sim 5\text{V/cm}$ 的电压在 TAE (0.04mol/L Tris-乙酸 0.001mol/L EDTA)电泳, 直至溴酚兰迁移至 $2/3$ 处时结束电泳, 溴乙锭 ($0.5\mu\text{g}\mu\text{L}$)染色 20 min, 在凝胶成像系统成像

克隆及测序: 将 PCR条带切胶, 用 DNA片断回收试剂盒回收目的片断, 克隆至 pMD18-T Vector上, 转化大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 感受态, 转移 $100\mu\text{L}$ 菌液涂布于 LB固体培养基, 37°C 过夜, 挑取白色菌落于 LB液体培养基, 37°C 振荡培养至 OD值到 $0.4\sim 0.6$, 从此菌液中用碱裂解法提取质粒, 并命名为 pMDCMV, 将此质粒于上海基康生物有限公司完成序列测定

1.3.5 同源性分析: 将所测序列输入 GenBank, 在网上进行 BLAST, 分析丹参分离物的序列与已经报道的序列的相似性。

2 结果与分析

2.1 生物学鉴定: 我们在河北、山东等地对丹参进行了实地系统调查, 观测到田间典型病毒症状的病叶及丹参植株, 表现了典型的花叶、植株矮化及叶片褪绿黄化畸形等症。在供试的集中植物摩擦接种后, 在白肋烟 (*Nicotiana tabacum*-white burley.)表现系统花叶、褪绿斑、三生烟 (*N. tabacum*-Samsun)植株表现局部枯斑、卷叶、矮化系统症状, 这与国际上黄瓜花叶病毒敏感植物的报道较一致。在心叶烟 (*N. glutinosa*)上未表现症状。苋色藜 (*Chenopodium. amaranticola*)症状不明显。

2.2 电镜观察: 电镜放大倍数为 30 000倍, V表示视野中的病毒粒子 (紧靠于 V字左边), 观测到的粒子经测量比较, 其直径约为 $29\sim 30\text{nm}$ (图 1), 与 CMV病毒球形粒子相近, 电镜视野中未见线状及杆状病毒。

2.3 DAS-ELISA检测: 利用 CMV抗血清进行了 DAS-ELISA检测 (表 1), 在检测的 15个丹参样品中, 10个为样品阳性。1~3表示酶联板列数, A~H表示酶联板的行数, 共 24个孔。B1, B2, B3孔表示空白对照, 实验过程中不加入二抗 (Alk Phos Enzyme Conjugate)抗体; C1, C2, C3孔表示阴性对照, 实验过程中抗原采用健康烟草叶片研磨液, H1, H2, H3表示阳性对照, 实验过程中抗原采用试剂盒阳性研磨液; 其余 15个孔, 实验过程中抗原采用田

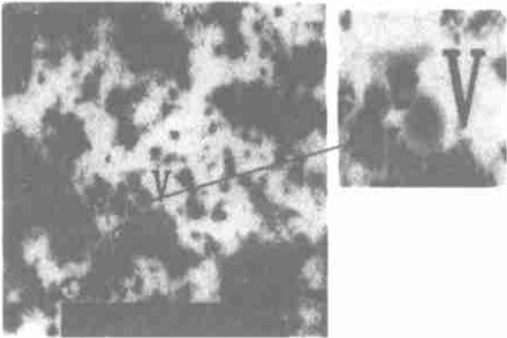


图 1 提纯病毒粒子形态电镜观察 (1: 30 000)

Fig. 1 Electron micrograph of purified virus particles (1: 30 000)

表 1 CMV DAS-ELISA 检测结果

Table 1 Results of CMV DAS-ELISA detection

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	+	-	-	-	+	+	-	+
2	+	-	-	+	+	-	+	+
3	-	-	-	+	+	+	-	+

间采集的丹参叶片,其他各个步骤相同。数据处理过程中,临界值方程等于 2^{-N} (N 表示阴性对照数据,大于 2^{-N} 的数据用“+”表示阳性结果,小于 2^{-N} 的数据用“-”表示阴性结果)。

2.4 RT-PCR检测: 根据 CMV 的外壳蛋白基因 (CP)的序列,由 prime 1和 prime 2扩增出 409 bp 的 CMV 衣壳蛋白部分片段 (图 2),与预期扩增大小一致。第 2泳道产物由提纯病毒合算进行 RT-PCR 得到,第 3泳道产物扩增 LB 平板上的白色菌落得到,第 4泳道产物则由扩增 pMDCMV 得到。

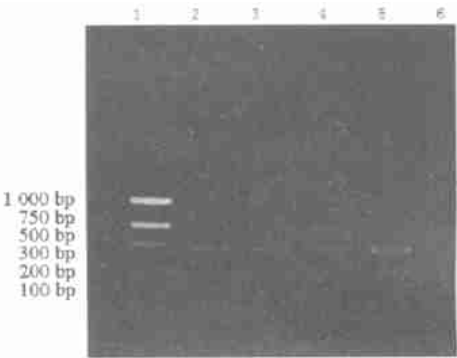
2.5 PCR产物序列分析: 将克隆载体 pMDCMV 进行序列分析,结果表明,所克隆的 DNA 片段的长度为 409 bp (图 2)。下划线所标示的序列依次为 prime 2的同源和 prime 1的互补序列。CMV 衣壳

TGCGCATTCAAATTCGAGTT AATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCCGTAAGTTCTGCCT
CCTCGGACTTGTCGCTCGCCGCCATCTCTGCTATGTTTGGCGACGGAGCCTACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGC
ATCCGGAGTCCAAGCCAACAATAAACTGTTGTGTGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGATATAGGCGACATGCGTAAGTAC
GCCGTACTCGTGTA TTCAAAAGACGATGCACTCGAGACGGATGAGCTAGTACTTCATGTCGACATCGAGCACCAACGCA
TTCCACATCTGGGGTGCTCCAGTTTG* ATCCGTGTTTCCCAGAACCCTCCCTCCAGTCTTGAGGCGGGA ACGTGAG
TTGGCAGTTCTGCTA

图 3 黄瓜花叶病毒丹参株系的部分外壳蛋白基因序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of partial coat protein gene of CMV-Danshen

丹参在引种栽培中常发生叶枯病 (*Septoria* sp.), 白绢病 (齐整小核菌, *Sclerotium rolfii*), 菌核病 (唐菖蒲核盘菌, *Sclerotinia gladioli*), 根腐病 (木贼镰孢, *Fusarium equiseti*), 紫纹羽病 (紫卷提子菌, *Helicobasidium mompa*) 根结线虫病 (南方根结线虫, *Meloidogyne hapla*) 菟丝子病 (中国菟丝子,



1-标准分子量 (Marker),由上至下依次是 1 000, 750, 500, 300, 200, 100 bp 2- 5-CMV 外壳蛋白基因部分片段 RT-PCR产物 6空白对照

1-Ladder DNA Marker, size from upper to down are 1 000, 750, 500, 300, 200, 100 bp 2- 5-CMV coat protein gene partial fragment RT-PCR products 6-blank control

图 2 CMV CP基因部分片段的 RT-PCR产物

Fig. 2 RT-PCR products of CMV CP gene partial fragment

蛋白基因的完整编码区位于 RNA 3上,全长 657 bp,编码一条 218个氨基酸的蛋白多肽链,在 CMV 的系统侵染中有重要作用,但与病毒基因组 RNA 的复制无关^[3]。所克隆的 409 bp的核苷酸中,前 345 bp的核苷酸序列 (从第一个核苷酸到用* 标示的第 344个核苷酸止)为编码衣壳蛋白的 C端的 114个氨基酸的序列;后 64 bp核苷酸序列为非编码区。在 GenBank 中用 BLAST 进行同源性比较分析,与登录号为 AF127977 基因序列 (Cucumber mosaic virus strain K 3a protein and coat protein genes, complete cds,黄瓜花叶病毒 K 株系)的同源性最为接近,达到 98%,说明我们分离的丹参病毒分离物确实为 CMV 的一个株系,记为 CMV-Dan 见图 3

3 讨论
Cuscuta chinensis)等真菌为主的病害。但是国内外至今未见丹参病毒病原病害的报道,已经报道的唇形科病毒病害有串红上的 CMV^[4],湿地鼠尾草上的 CMV^[5]等。我们从田间采集具有典型症状的丹参病叶及植株,进行了病毒检测,首次检测到了 CMV 的存在,为栽培丹参提纯复壮、种苗的无毒化生产,以

及监测田间 CMV 的发病情况打下基础。

CMV 为雀麦花叶病毒科 (Bromoviridae) 黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*) 的典型成员, 为单链正义 RNA 病毒^[6], 其基因组由 3 个正链的 RNA 分子组成, 按相对分子质量由大到小的顺序分别命名为 RNA1, RNA2, RNA3。它具有很广的寄主范围, 可以侵染 1 000 多种双子叶和单子叶植物^[7], CMV 的分布是世界性的, 能通过蚜虫以非持久性的方式, 机械接种或带毒种子进行传播, 是农作物以及重要经济作物上危害最大的病毒之一。在实践中 CMV 的检测主要是应用酶联检测, 已经能检测到亚组, 接种鉴定, 电镜检测, 核酸杂交, RT-PCR 检测都有报道^[8,9]。依照血清学数据、衣壳蛋白的多肽图谱、核酸杂交以及核苷酸序列的相似性将 CMV 分成了亚组 I 和亚组 II, 我们依照 MARILYN^[10] 提供的方法进一步分析后, 将其命名为黄瓜花叶病毒丹参分离物, 并归入 IB 亚组。因只对此分离物的外壳蛋白基因进行了部分克隆, 所以若要进行更进一步的确认, 还需重新设计引物, 进行全序列的克隆分析。

致谢: 中国农业大学生物学院农业生物技术重点实验室牛胜乌博士、植物保护学院蔡祝南教授在电镜观察时给予指导。

RP-HPLC法测定寻骨风中马兜铃酸 A 的含量

刘超, 陈蕴, 赵小磊, 龚立雄, 王林*

(河南省中药研究所, 河南 郑州 450004)

寻骨风为马兜铃科植物绵毛马兜铃 *Aristolochia mollissima* Hance 的全草。寻骨风药材收载于河南省药材标准^[1], 马兜铃酸 A 为其有效活性成分^[2], 具有抗癌、抗感染、抗早孕及增强吞噬细胞的活性等药理作用, 其对肝、肾的毒性剂量为有效剂量的 1 000 倍^[3-5]。近年来马兜铃酸引起的肾损害“马兜铃酸肾病”(AAN) 已日益受到临床重视并对用药情况进行了调查^[6]。目前马兜铃酸 A 的测定方法多为 HPLC 法, 涉及的药材有青木香、马兜铃及关木通^[7-11]等, 但有关寻骨风中马兜铃酸 A 的定量分析未见报道, 所以, 本实验对药材的马兜铃酸 A 含量进行测定研究。

References

- [1] Tian B. *Plant Virus Research Methods* (植物病毒研究方法) [M]. Beijing: Science Press, 1987.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989.
- [3] Suzuki M, Kuwata S, Kataoda J, et al. Functional analysis of deletion mutants of *Cucurbit mosaic virus* RNA3 using an *in vitro* transcription system [J]. *Virology*, 1991, 183: 106-113.
- [4] Holcomb G E, Valverde R A. Natural infection of *Salvia uliginosa* with *Cucumber Mosaic Cucumovirus* [J]. *Hort Science*, 1998, 33(7): 1215-1216.
- [5] Wang X F, Pei M Y, Ma D F. Identification of Cuanhong mosaic virus [J]. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 1985, 15: 36-37.
- [6] Van Rengenmortel. *Virus Taxonomy* (7th ICTV Report) [M]. London: Academic Press, 2000.
- [7] Palukaitis P, Roossink M J, Dietzgen R G, et al. Cucumber mosaic virus [J]. *Adv Virus Res*, 1992, 41: 281-348.
- [8] Hsu H T, Barzuna L, Hsu Y H. Identification and sub grouping of *Cucumber mosaic virus* with mouse monoclonal antibodies [J]. *Virology*, 2000, 90: 615-620.
- [9] Chaumpluk P Y, Sasaki N, Nakajima H, et al. Six new subgroup I members of Japanese *Cucumber mosaic virus* as determined by nucleotide sequence analysis of RNA 3' cDNAs [J]. *Ann Phytopathol Soc Jpn*, 1996, 62: 40-44.
- [10] Roossink M J, Zhang L, Hellwald K H. Rearrangement in the 5' nontranslated region: phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA3 indicate radial evolution of three subgroups [J]. *J Virol*, 1999, 8: 6752-6758.

1 仪器、试药及样品

Waters 液相色谱仪, 481 紫外检测器, 510 泵 (美国), Echrom 98 色谱工作站 (大连依利特); 色谱纯甲醇 (上海陆忠); 水为乐百氏纯净水 (广东乐百氏, 规格 550 mL, 批号: 20020406); 马兜铃酸 A 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 746-9002); 其他试剂均为分析纯。寻骨风药材购自郑州市及禹州市。由本所药材研究室安维教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×200 mm, 5 μm) (大连化学物理研究所); 流动相为甲醇-水-醋酸 (65: 35: 1); 流速 1.0 mL/min; 柱温 25

* 收稿日期: 2003-03-18

作者简介: 刘超 (1962-), 河南郑州人, 工程师, 1988 年毕业于河南中医学院, 研究方向为中药新药研制及质量标准研究。

Tel: (0371) 6323448 Fax: (0371) 6323880 E-mail: lc621023@ sina.com