

利用 ELISA 与 qRT-PCR 技术检测番木瓜 PRSV 病毒的方法研究

谢秀菊¹, 夏启玉^{1*}, 霍姗姗¹, 杜晓希¹, 麦贤俊², 张雨良¹, 郭安平¹, 李 峰³, 孔祥义^{2**}, 赵 辉^{1**}

1. 中国热带农业科学院三亚研究院/中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室, 海南三亚 572024; 2. 三亚市热带农业科学院, 海南三亚 572022; 3. 山东舜丰生物科技有限公司, 山东济南 250300

摘 要: 番木瓜环斑病毒 (*Papaya ringspot virus*, PRSV) 是番木瓜生产上最严重的病害之一, 其发病率高, 传播快, 危害重。为及时发现感染 PRSV 的番木瓜植株, 本研究建立了分别利用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 技术和荧光定量逆转录 PCR (qRT-PCR) 技术检测番木瓜植株感染 PRSV 的方法, 利用这 2 种方法检测多株转基因番木瓜与非转基因番木瓜的 PRSV 含量, 并对结果进行比较分析。结果表明: 利用 PRSV 多肽抗原作为标准品制备的抗体建立的标准曲线拟合度较好, 可用于 ELISA 法检测 PRSV; qRT-PCR 法中选择的内参基因 *Cpa03g018830* 在番木瓜的不同生长阶段均稳定表达, 可作为 PRSV 含量测定的内参基因; ELISA 法和 qRT-PCR 法对多株转基因和非转基因番木瓜植株中 PRSV 含量的检测结果基本一致, 表明这 2 种方法均可用于番木瓜植株中 PRSV 含量的检测。利用这 2 种检测手段, 可及时发现并铲除感染了 PRSV 的番木瓜植株, 有效预防与控制 PRSV 传播。

关键词: 番木瓜环斑病毒; 酶联免疫吸附; 荧光定量逆转录 PCR

中图分类号: S436.67 文献标志码: A

Detection of Papaya PRSV Virus Using ELISA and qRT-PCR Techniques

XIE Xiuju¹, XIA Qiyu^{1*}, HUO Shanshan¹, DU Xiaoxi¹, MAI Xianjun², ZHANG Yuliang¹, GUO Anping¹, LI Feng³, KONG Xiangyi^{2**}, ZHAO Hui^{1**}

1. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-Season Reproduction Regions, Sanya, Hainan 572024, China; 2. Sanya Academy of Tropical Agriculture, Sanya, Hainan 572022, China; 3. Bellagen Biotechnology Co., Ltd., Jinan, Shandong 250300, China

Abstract: *Papaya ringspot virus* (PRSV) is one of the most serious diseases in papaya production, with high incidence rate, rapid transmission and serious harm. To detect papaya plants infected with PRSV in a timely manner, this study established methods for detecting papaya plants infected with PRSV using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and fluorescence quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). The two methods were used to detect the PRSV content of multiple transgenic and non transgenic papaya plants, and the results were compared. The results showed that the standard curve established using PRSV peptide antigen as the standard and antibodies prepared from it had good fitting, and could be used for ELISA detection of PRSV; The reference gene *Cpa03g018830* selected in qRT-PCR method was stably expressed at different growth stages of papaya and could be used as a reference gene for PRSV con-

收稿日期 2024-05-10; 修回日期 2024-07-10

基金项目 三亚市科技创新专项 (No. 2022KJCX21); 海南省院士创新平台项目。

作者简介 谢秀菊 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬遗传转化育种; *同等贡献作者: 夏启玉 (1983—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 作物遗传育种。**通信作者 (Corresponding author): 赵 辉 (ZHAO Hui), E-mail: zhaohui@itbb.org.cn; 孔祥义 (KONG Xiangyi): E-mail: kongxiangyi20@163.com。

tent determination; The detection results of PRSV content in multiple transgenic and non transgenic papaya plants using ELISA and qRT-PCR methods were basically consistent, indicating that both methods can be used for the detection of PRSV content in papaya plants. By using the two detection methods, papaya plants infected with PRSV can be detected and eradicated in a timely manner, effectively preventing and controlling the spread of PRSV.

Keywords: PRSV; ELISA; qRT-PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.12.005

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 是全球热带地区的重要出口水果和消费品之一^[1-2]。番木瓜环斑病毒 (*Papaya ringspot virus*, PRSV) 是一种世界性的番木瓜病害, 其发病率高, 传播快, 危害重, 是番木瓜生产上最严重的病害之一。PRSV 属于马铃薯 Y 病毒科 (Potyviridae) Y 病毒属 (*Potyvirus*)^[3], 按寄主范围的不同可划分为 P 和 W 两个株系, PRSV-P 发生在大多数栽培番木瓜的热带、亚热带国家。PRSV-P 感染的典型特征是在受感染的番木瓜果实上产生环斑症状^[4]。除环斑外, PRSV 还会产生一系列其他症状。如叶片出现花叶、萎黄和卷曲; 叶柄和树干上部呈现水浸油性条纹; 幼叶变形, 有时会产生类似于螨虫损伤的皱缩症状。受 PRSV 感染的番木瓜植株表现出发育迟缓和花脱落等生理现象, 导致产量严重下降。PRSV 是通过蚜虫进行传播, 在树间传播速度极快, 发病的植株需及早铲除。因此, 为了及时发现番木瓜植株是否受到 PRSV 感染, 亟需一种简单、快速、灵敏的检测 PRSV 的方法。

酶联免疫吸附法 (ELISA) 是一种结合抗原抗体免疫反应和酶的催化反应的方法, 具有快速检测出植物 RNA 病毒的优点。自 CLARK 等^[5]对 ELISA 检测病毒的理论方法进行了研究和报道后, ELISA 技术被广泛地应用于植物病毒检测。在之前的研究中, PRSV 血清学检测多以粗提病毒粒子为抗原, 存在抗体制备效价低、制备繁琐等缺点^[6-8], 限制了 PRSV 病毒抗血清的应用。近些年来, 研究者利用分子生物学方法在大肠杆菌中高效表达病毒的外壳蛋白, 用纯化的蛋白免疫大白兔, 制备专化性抗血清, 为利用 ELISA 技术建立病毒检测体系研究奠定了基础^[9]。CHEN 等^[10]开发了一批 H7 亚型特异性单克隆抗体 (mAb), 并建立了双抗体夹心酶联免疫吸附 (DAS-ELISA) 法测定 H7 蛋白的含量和检测除 H7HA 亚型以外的甲型流感病毒, 显示出极好的灵敏度和高特异性。MARTINEZ VIEDMA 等^[11]使用虫媒病毒特异性肽对收集的 339 个样本进行血清学分析, 发现基

于多肽的多重 ELISA 在感染病毒后 2 周就可以高效识别寨卡病毒 (ZIKV) 抗体。

荧光定量逆转录 PCR (qRT-PCR) 因其快速、灵敏度高和特异性强等优点, 广泛地应用于动物病毒和植物病毒检测^[12-13]。即使在中等质量的 DNA 情况下, 如从石蜡或福尔马林固定组织中提取的 DNA, 荧光定量 PCR 也可以有效地用于病毒检测^[14-15]。qRT-PCR 常用的 2 种方法有 TaqMan 探针法和 SYBR Green I 染料法, 其中 SYBR Green I 染料法因其引物设计简单、检测成本低而被广泛使用^[16]。许多研究表明, qRT-PCR 在量化病毒 DNA 方面是准确有效的, HARJU 等^[17]开发了 qRT-PCR (TaqMan) 测定法, 用于甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV) 的特异性检测, 发现 TaqMan 的灵敏度是常规 RT-PCR 测定的 10 000 倍。CHENG 等^[18]开发了基于 SYBR Green I 的实时 PCR 检测方法, 用于正痘病毒的检测和定量, 该方法具有很高的重现性和可靠性, 检测速度更快且具有更高的灵敏度。COERTSE 等^[19]研究发现, 与 TaqMan 探针法相比, SYBR Green I 检测的灵敏度大于 95%, 表明染料法在病毒检测中同样具有较高的灵敏度。

以往的研究中, 病毒抗体的制备步骤繁琐, 而本研究采用多肽抗原制备 PRSV 的多克隆抗体, 建立了简单易行的 ELISA 检测番木瓜植株中 PRSV 病毒含量的方法; 并以番木瓜单拷贝基因为内参基因, 首次建立了 qRT-PCR 检测番木瓜植株 PRSV 病毒含量的方法, 并对 2 种检测方法得到的番木瓜植株中 PRSV 的含量进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 转基因番木瓜与非转基因番木瓜均来自中国热带农业科学院三亚研究院。转基因番木瓜共 18 株, 包括 1 株转入海南 PRSV 的 CP 基因的 T₀ 代番木瓜、6 株转入海南 PRSV 的辅助成分-蛋白酶基因 (HC-Pro) 发夹结构的 T₀ 代

番木瓜苗、8 株转入海南 PRSV 的复制酶基因 (*Nib*) 发夹结构的 T₀ 代番木瓜苗、3 株转入海南 PRSV 的 CP 基因全长的 T₁ 代番木瓜; 非转基因番木瓜共 6 株; 非转基因且无 PRSV 症状的番木瓜组培脱毒苗 1 株。

1.1.2 试剂耗材 植物 RNA 提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; 2×Q3 SYBR qPCR Master Mix 购自吐露港生物科技有限公司; PCR 平盖八排管购自甄选 (Labselect) 公司; 脱脂奶粉购自国赛生物技术有限公司, 96 孔酶联板购自康宁公司; TMB 双组分显色试剂盒和 Goat Anti-Rabbit IgG/HRP 购自北京索莱宝科技有限公司。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 ELISA 法测定番木瓜植株的 PRSV 含量

(1) PRSV 的多克隆抗体制备。制备多克隆抗体的抗原肽的氨基酸序列为: DQVPPPTKSVHHEGC, 使用的载体为血蓝蛋白载体 KLH, 由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成抗原及抗体。

(2) 标准曲线绘制。以合成的抗原 PRSV-1 (93.4% pure) 为标准品进行梯度稀释, 绘制吸光度与浓度的标准曲线。首先将标准品配制成 1000 ng/mL 的母液, 准备 13 只 1.5 mL 的离心管, 编号为 S₁~S₁₂、CK (对照), 分别加入 400 μL coating buffer 稀释液; 吸取 400 μL 母液至 S₁ 管, 进行 2 倍稀释, 吹打 10 次, 混匀, 涡旋振荡 5 s, 从 S₁ 管中吸取 400 μL 液体至 S₂ 管, 吹打混匀, 继续以上步骤, 进行 2 倍梯度稀释直至稀释到 S₁₂。将配置好的梯度稀释液进行间接法 ELISA 实验, 加入显色液 30 min 后测定吸光度, 绘制标准曲线。

(3) 番木瓜植株的 PRSV 含量测定。在常年发病 (PRSV) 的番木瓜果园中选择不同生长阶段的番木瓜植株样品共 24 株, 包括 18 株转基因番木瓜 (编号为: CP-1-3、H-1-6、H-1-10、H-1-22、H-2-15、H-3-4、Hc-n-35、N-1-8、N-2-21、N-2-31、N-n-17、N-n-20、N-n-23、N-n-24、N-n-26、YK-1-9、YK-2-11、YK-2-13) 和 6 株非转基因番木瓜 (编号为: F-5、F-16、F-25、F-28、F-30、F-50)。每株均在生长期为 11、13、14、18、19、21 个月时采集叶片 (编号为: 11M、13M、14M、18M、19M、21M), 每个样品取 0.3 g, 其中, 取 0.15 g 用于 ELISA 实验, 剩余样品放 -80 °C 保存。另取

1 株非转基因且无 PRSV 症状的番木瓜组培脱毒苗的叶片作为阴性对照, 以稀释 100 倍的抗原作为阳性对照。所有样品进行间接 ELISA 实验, 测定吸光度。若样品 OD 值/阴性对照 OD 值 ≥ 2.0, 则将该植株判定为 PRSV 阳性; 若样品 OD 值/阴性对照 OD 值 < 2.0, 则将该植株判定为 PRSV 阴性^[20]。将判定为阳性的样品代入标准曲线中, 计算出 PRSV 含量, 并将不同时期样本 PRSV 含量的数据绘制成热图。

1.2.2 qRT-PCR 法测定番木瓜植株的 PRSV 的含量

(1) RNA 提取和反转录。取 1.2.1 (3) 中的 24 株番木瓜剩余的叶片提取 RNA。另采集 1 株番木瓜组培脱毒苗的叶片 0.15 g, 提取 RNA。以获得的 RNA 为模板, 使用反转录试剂盒进行反转录得到 cDNA 模板, -80 °C 保存待用。

(2) 引物设计及验证。通过 DNAMAN 软件对比 39 株来源于海南不同地区不同 PRSV 株系的 *Nib* 序列^[21], 选取其保守序列, 使用生工生物工程(上海)股份有限公司官网引物设计工具进行 qRT-PCR 引物设计 (*Nib*-F: 5'-AGTGGTCAGCCT-TCGACAGT-3', *Nib*-R: 5'-CCTTCGTGTCGTAA-CCAGCC-3')。以番木瓜 *Cpa03g018830* 基因为内参基因 (830-F: 5'-TTCGAACGAGTCTGCA-GTGG-3', 830-R: 5'-ACCACCTGAACCCAGGC-TAA-3'), 并对其表达量进行稳定性检测。随机选择 3 份感染 PRSV 的番木瓜的 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 实验, 验证内参基因 *Cpa03g018830* 和目的基因 *Nib* 引物的有效性。反应体系为: 2×Q3 SYBR qPCR Master Mix 10 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, cDNA 模板 1 μL, 加无菌水至 20 μL。扩增程序为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 10 s, 58 °C 30 s, 40 个循环; 融解曲线为 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。反应结束后, 通过扩增曲线及熔解曲线判定引物是否有效。

(3) 内参基因表达的稳定性检测。采用荧光定量 PCR 对不同生长阶段番木瓜叶片 *Cpa03g-018830* 基因的表达量进行稳定性测定, 以 CT 值的波动情况评价其是否能应用于本研究的内参基因。荧光定量 PCR 反应体系和程序同 1.2.2 (2)。

(4) 番木瓜植株的 PRSV 含量测定。以番木瓜组培脱毒苗为参照, 使用 qRT-PCR 测定 24 个转基因番木瓜和非转基因番木瓜的不同生长阶段样品中的 PRSV 含量。以 *Cpa03g018830* 为内参基因, 以 PRSV 的 *Nib* 基因为目的基因, 进行 qRT-PCR 扩增, 每个样品 3 次重复, 反应体系及扩增

程序同 1.2.2 (2)。得出每个样品的 CT 值后, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行相对定量分析, 计算每个样品 PRSV 的相对含量, 并将不同时期样品的数据绘制成热图。并与 ELISA 法测定的 PRSV 含量进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 ELISA 法测定 PRSV 的含量

2.1.1 标准曲线的绘制 依据 ELISA 实验的标准品的吸光度与浓度的结果 (表 1) 绘制出标准曲线 (图 1), 标准曲线公式为 $y=30.211x^4-100.99x^3+109.26x^2+17.56x-12.125$ ($R^2=0.9998$)。此公式 R^2 值大于 0.99, 表明线性公式拟合较好, 可用于后续实验样品的 PRSV 含量计算。

表 1 PRSV 标准品的吸光值		
Tab. 1 Absorbance value of PRSV standard		
样本 Sample	OD 值 OD value	标准品浓度 Standard concentration/(ng·mL ⁻¹)
S ₁	2.7623	500.000
S ₂	2.3603	250.000
S ₃	1.9600	125.000
S ₄	1.3356	62.500
S ₅	0.7010	31.200
S ₆	0.5906	15.600
S ₇	0.4633	7.800
S ₈	0.3603	3.900
S ₉	0.3133	1.950
S ₁₀	0.3017	0.975
S ₁₁	0.2900	0.488
S ₁₂	0.2837	0.244
CK	0.2310	0.000

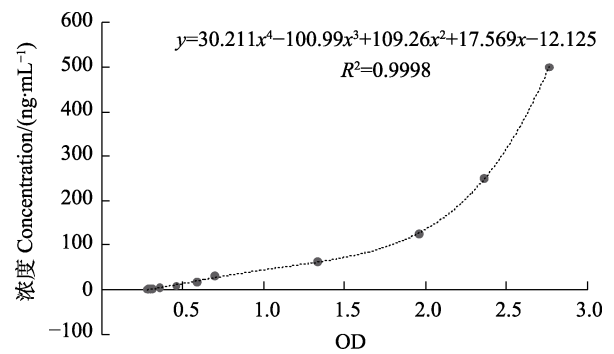


图 1 PRSV 测定的标准曲线
Fig. 1 Standard curve of PRSV determination

2.1.2 番木瓜植株的 PRSV 含量测定 各个时期转基因植株与非转基因植株样品的 PRSV 的含量

如图 2 所示, 非转基因番木瓜在 11 个月的时候就能检测到少量的 PRSV, 在 14 个月的时候, 非转基因番木瓜的病毒含量达到较高的水平, 随后, PRSV 含量持续升高。大部分转基因植株感染前期只能检测到少量的 PRSV, 随着感染时间的推移, 病毒含量也开始升高, 在 18 个月的时候病毒含量达到较高的水平, 部分植株的 PRSV 含量仍然在较低的水平, 个别植株的病毒含量在后期反而降低。

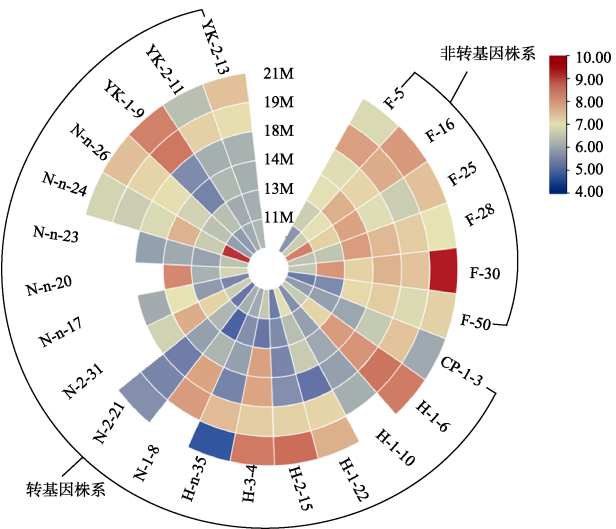


图 2 ELISA 法测定番木瓜植株的 PRSV 含量
Fig. 2 ELISA detection of PRSV content of papaya plants

2.2 qRT-PCR 法测定番木瓜植株中 PRSV 的含量

2.2.1 引物验证 随机选择 3 份感染 PRSV 的番木瓜叶片样品对引物进行验证, 结果 (图 3) 表明, 利用内参基因 *Cpa03g018830* 和目的基因 *Ni1b* 的引物扩增后, 均有明显的扩增曲线, 且熔解曲线均具有唯一的吸收峰, 因此这 2 对引物可用于 qRT-PCR 法检测番木瓜的 PRSV 含量。

2.2.2 *Cpa03g018830* 基因的稳定性验证 qRT-PCR 分析中的定量循环值 (CT) 反映目的基因的表达量, CT 值越低, 目的基因的表达量越高。对不同阶段的番木瓜叶片 *Cpa03g018830* 基因的 qRT-PCR 结果分析发现, 番木瓜植株各生长期该基因的 CT 值在 23.37~23.72 之间 (图 4)。这表明各生长期的番木瓜植株 *Cpa03g018830* 基因的表达量较稳定。为了进一步综合评估 *Cpa03g-018830* 基因在番木瓜不同生长时期的稳定性, 将荧光定量实验得到的 CT 值进行校正, 综合 geNorm 进一步分析数据。geNorm 分析原理是将

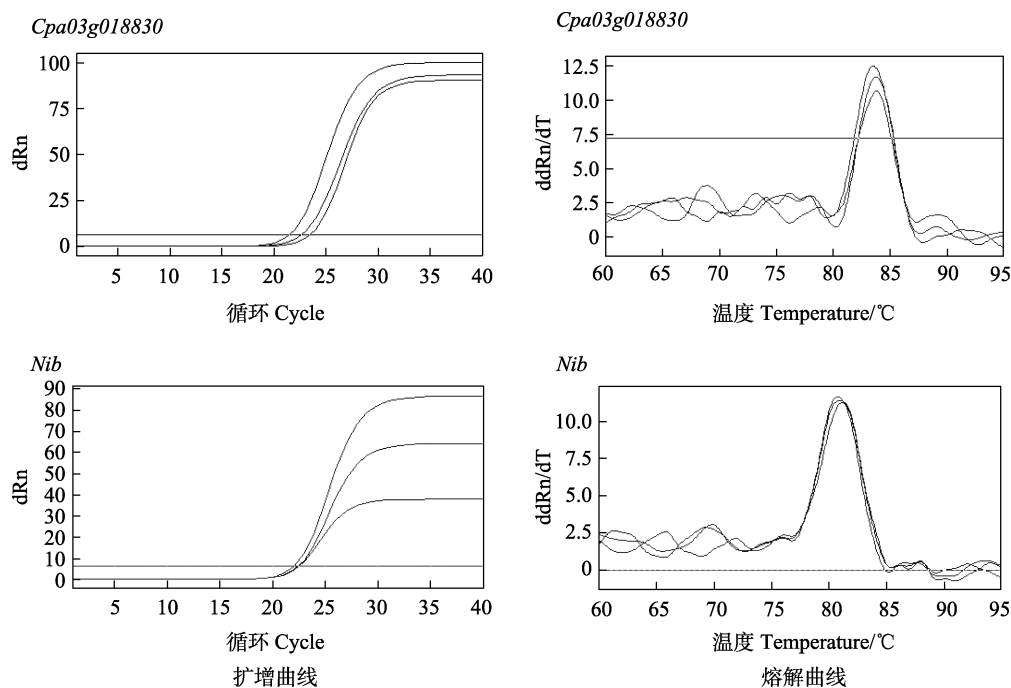


图 3 qRT-PCR 引物的验证
Fig. 3 Validation of fluorescent quantitative primers

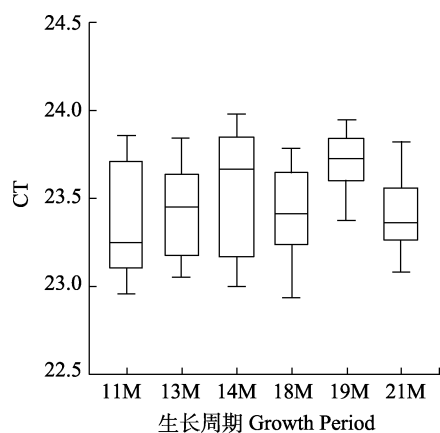


图 4 *Cpa03g018830* 基因的扩增 CT 值分布
Fig. 4 Distribution of amplified CT values for *Cpa03g018830*

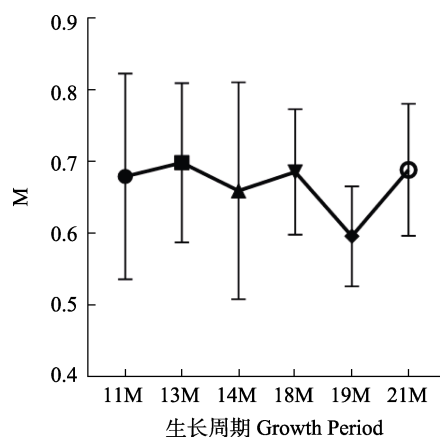


图 5 *Cpa03g018830* 基因表达稳定性的 geNorm 分析
Fig. 5 GeNorm analysis of expression stability of *Cpa03g018830*

候选内参基因的 CT 值转换成相对表达量 (M), M 值较小时, 表示基因的稳定性较高, 如果 $M > 1.5$, 则表示此基因并不适宜用作内参基因^[22]。*Cpa03g018830* 基因的 geNorm 分析如图 5 所示, 各生长期 *Cpa03g018830* 基因的 M 值都在 1.5 以下, 说明 *Cpa03g018830* 基因在番木瓜的不同生长阶段均稳定表达, 因此可作为 PRSV 含量测定的内参基因。

2.2.3 qRT-PCR 法测定番木瓜植株的 PRSV 含量
各个生长时期的转基因植株与非转基因植株对照样本中 PRSV 的积累量如图 6 所示, 6 棵非转基因番木瓜植株中, 随着时间的推移, PRSV 含量

逐渐升高, 在 18 个月的时候, 病毒含量均急剧升高至较高的水平; 转基因番木瓜植株中, 在受到 PRSV 侵染前期, 大部分转基因番木瓜植株的 PRSV 含量都较低, 随着病毒侵染时间的推移, 大部分转基因植株中的 PRSV 含量都开始上升, 但一些植株的 PRSV 含量仍在较低的水平, 少数植株中的 PRSV 含量上升至较高的水平后又逐渐减低。

3 讨论

PRSV 作为一种世界性的番木瓜病毒, 番木瓜被其侵染后无法得到有效防治, 严重影响番木

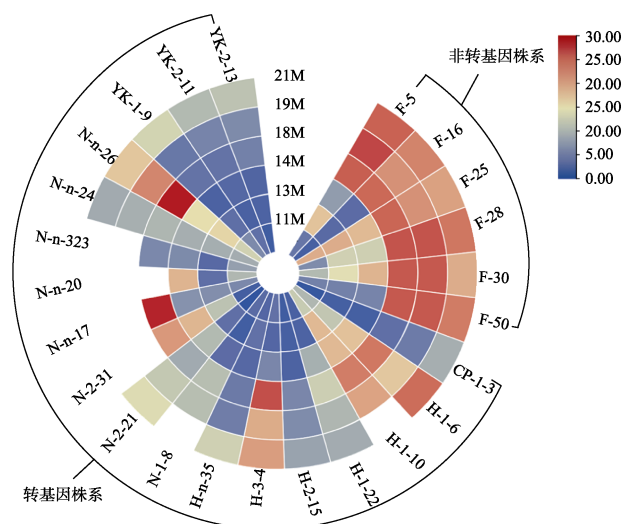


图 6 qRT-PCR 法测定番木瓜植株的 PRSV 含量

Fig. 6 Determination of PRSV content in papaya plants using qRT-PCR method

瓜的产量与品质。因此, PRSV 感染番木瓜后的早期检测至关重要, 一旦发现感染植株, 应立即将其连根拔除并销毁, 可有效延缓 PRSV 的传播速度, 降低发病率。

常用的检测病毒的方法有 qRT-PCR 法和 ELISA 法。BRUISSO 等^[23]开发了多重 TaqMan 的 qRT-PCR 分析方法, 用于检测 9 种不同的病毒, 并与 ELISA 法进行比较, 发现大部分情况下, 2 种实验方法可获得相同的结果, 但在某些情况下, 仅可通过 2 种技术之一检测到病毒。TORRE 等^[24]基于 TaqMan 技术建立了 qRT-PCR 方法, 用来检测 3 种在葫芦中传播的种子病毒, 并将这些检测方法与 DAS (双抗夹心)-ELISA 进行了比较, 其灵敏度分别是 DAS-ELISA 法测定的南瓜花叶病毒 (SqMV) 和黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV) 的 1000 倍和 10 000 倍, 说明 qRT-PCR 分析方法较 DAS-ELISA 灵敏度更高。然而, RNA 检测具有许多局限性, 如时间久、成本高昂, 且必须在专门的实验室中进行。XIANG 等^[25]通过酶 ELISA 和金免疫层析测定 (GICA) 对血液进行 SARS-CoV-2 IgG/IgM 检测, 在候选血液指标中, 与标准的 RNA 检测相比, 通过 ELISA 检测的血清 IgG 和 IgM 具有最佳的一致性和有效性, 表明该方法可用于初步的病毒筛选, 以满足没有 RNA 检测能力的实验室的检测需求, 或作为 RNA 检测的补充。

随着现代生物技术的发展, 抗体制备技术不断完善。为了建立更好的番木瓜植株中的 PRSV

检测方法, 本研究以直接合成的多肽抗原制备 PRSV 的多克隆抗体, 建立了 ELISA 检测 PRSV 病毒的方法, 无需病毒的提取制备或原核表达等繁琐的步骤, 极大地简化了抗体制备的步骤, 缩短了实验时间。此外, 本研究以番木瓜中稳定表达的基因 *Cpa03g018830* 为内参基因, 首次建立了番木瓜植株中 PRSV 含量的 qRT-PCR 的相对定量检测方法, 该方法无需制备 PRSV 的标准品及建立标准曲线, 操作简单, 经济实用, 适合大批量的样品检测。

采用以上 2 种方法对 24 株转基因番木瓜及非转基因番木瓜的不同生长阶段的样品进行了 PRSV 病毒的检测, 并对检测得到的 PRSV 的含量进行比较。结果发现, 相同的样品用 2 种方法测定的病毒含量大部分都较为一致, 少数结果不一致的可能为样品采样误差导致。从整体变化趋势可以看出, 非转基因番木瓜从开始感染 PRSV 到发病, PRSV 含量持续升高, 一旦病毒侵袭, 则毫无抵抗能力, 直至减产死亡。而大部分转基因番木瓜株系则表现出对 PRSV 较好的抗性, 即使初期受到病毒侵袭, PRSV 含量开始上升, 但随着 small RNA 的基因沉默开始发挥作用, 病毒含量又开始降低。然而, 部分转基因番木瓜株系在感染 PRSV 后含量持续增加, 可能是由于插入位点干扰了番木瓜代谢过程, 从而影响 RNAi 对抗病毒的作用; 或者是由于不同株系在田间自然发病时期存在差异, 导致 small RNA 尚未开始发挥抗病作用。

综上所述, 本研究建立的检测 PRSV 的 ELISA 法与 qRT-PCR 法可以共同使用, 提高番木瓜植株早期感染 PRSV 的检出率, 可为 PRSV 的实验室诊断、含量测定提供支持, 提高检测效率, 减少工作量。

参考文献

- [1] 麦新敏. 2006—2016 年广东四大佳果出口分析研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
MAI X M. Analysis and study on the export of four major fruits in Guangdong from 2006 to 2016[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [2] 禾本. 墨西哥: 全球最大番木瓜出口国[J]. 中国果业信息, 2021, 38(7): 40.
HE B. Mexico: the world's largest papaya exporter[J]. China Fruit Industry Information, 2021, 38(7): 40. (in Chinese)

- [3] TRIPATHI S, SUZUKI J Y, FERREIRA S A, GONSALVES D. *Papaya ringspot virus* - P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(3): 269-280.
- [4] JENSEN D D. Papaya virus diseases with special reference to papaya ringspot[J]. *Phytopathology*, 1949, 39(3): 191-211.
- [5] CLARK M F, ADAMS A N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses[J]. *Journal of General Virology*, 1977, 34(3): 475-483.
- [6] GONSALVES D, ISHI M. Purification and serology of *Papaya ring spot virus*[J]. *Phytopathology*, 1980, 70: 1028-1032.
- [7] 陈枝楠, 林孔勋, 范怀忠. 番木瓜环斑病毒检测技术研究[J]. *中国病毒学*, 1993, 9(3): 263-270.
CHEN Z N, LIN K X, FAN H Z. Studies on techniques of detecting *Papaya ring spot virus*[J]. *Virologica Sinica*, 1993, 9(3): 263-270. (in Chinese)
- [8] 肖火根, 范怀忠. 植物组织粗汁液中的番木瓜环斑病毒的 DAC-ELISA 检测技术[J]. *中国病毒学*, 1994, 9(3): 249-255.
XIAO H G, FAN H Z. Studies on the detection of *Papaya ring spot virus* in infected tissue of plant by ELISA[J]. *Virologica Sinica*, 1994, 9(3): 249-255. (in Chinese)
- [9] 赵芹, 李华平, 谢大森, 何晓明, 张曙光, 罗少波. 番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因原核表达蛋白的抗血清制备及其检测应用[J]. *园艺学报*, 2012, 39(8): 1457-1464.
ZHAO Q, LI H P, XIE D S, HE X M, ZHANG S G, LUO S B. Preparation of antiserum of prokaryotic expression protein of papaya ring spot virus coat protein gene and its detection application[J]. *Acta Horticulture Sinica*, 2012, 39(8): 1457-1464. (in Chinese)
- [10] CHEN L, RUAN F, SUN Y, CHEN H, LIU M, ZHOU J, QIN K. Establishment of sandwich ELISA for detecting the H7 subtype influenza A virus[J]. *Journal of Medical Virology*, 2019, 91(6): 1168-1171.
- [11] MARTINEZ VIEDMA M D P, PANOSSIAN S, GIFFORD K, GARCÍA K, FIGUEROA I, PARHAM L, PICKETT B E. Evaluation of ELISA-based multiplex peptides for the detection of human serum antibodies induced by Zika virus infection across various countries[J]. *Viruses*, 2021, 13(7): 1319.
- [12] PASIN F, KULASEKARAN S, NATALE P, SIMÓN-MATEO C, GARCÍA J A. Rapid fluorescent reporter quantification by leaf disc analysis and its application in plant-virus studies[J]. *Plant Methods*, 2014, 10(1): 1-12.
- [13] CANDLAN E P, KHORAN F P, HANA L. Molecular identification of peste des petits ruminants virus in wild goat and domestic small ruminants by real-time-PCR technique in Erbil-Iraq[J]. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 2017, 31(1): 51-54.
- [14] LU S, LI X, CALDERONE R, ZHANG J, MA J, CAI W, XI L. Whole blood nested PCR and real-time PCR amplification of *Talaromyces marneffe* specific DNA for diagnosis[J]. *Medical Mycology*, 2016, 54: 162-168.
- [15] NORLELAWATI A T, MOHD DANIAL G, NORA H, NADIA O, ZATUR RAWIHAN K, NOR ZAMZILA A, NAZNIN M. Detection of SYT-SSX mutant transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded sarcoma tissues using one-step reverse transcriptase real-time PCR[J]. *The Malaysian Journal of Pathology*, 2016, 38: 11-18.
- [16] ABEL P P, NELSON R S, DE B, HOFFMANN N, ROGERS S G, FRALEY R T, BEACHY R N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. *Science*, 1986, 232(4751): 738-743.
- [17] HARJU V A, SKELTON A, CLOVER G R G, RATTI C, BOONHAM N, HENRY C M, MUMFORD R A. The use of real-time RT-PCR (TaqMan) and post-ELISA virus release for the detection of Beet necrotic yellow vein virus types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2005, 123(1): 73-80.
- [18] CHENG W, HE X, JIA H, CHEN G, WANG C, ZHANG J, JING Z. Development of a SYBR Green I real-time PCR for detection and quantitation of orthopoxvirus by using ectromelia virus[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2018, 38: 45-50.
- [19] COERTSE J, MORTLOCK M, GROBBELAAR A, MOOLLA N, MARKOTTER W, WEYER J. Development of a pan-*filoviridae* SYBR green qPCR assay for biosurveillance studies in bats[J]. *Viruses*, 2023, 15(4): 987.
- [20] 苗得园, 杨兵, 李富强, 张培君, 龚玉梅, 李永清, 付磊, 高配亮. 单抗夹心 LAB-ELISA 检测猪伪狂犬病病毒的研究[J]. *华北农学报*, 2001, 16(1): 127-131.
MIAO D Y, YANG B, LI F Q, ZHANG P J, GONG Y M, LI Y Q, FU L, GAO P L. Study of monoclonal antibodies sandwich LAB-ELISA detecting *Pseudorabies virus* [J]. *North China Journal of Agronomy*, 2001, 16(1): 127-131. (in Chinese)
- [21] 赵辉, 张雨良, 孔华, 贾瑞宗, 朱芸, 郭安平, 曾会才, 彭明. 番木瓜环斑病毒海南株系植物 RNAi 表达载体的构建[J]. *热带作物学报*, 2015, 36(12): 2210-2215.
ZHAO H, ZHANG Y L, KONG H, JIA R Z, ZHU Y, GUO A P, ZENG H C, PENG M. Construction of plant RNAi expression vector in Hainan strains of *Papaya ringspot virus*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(12): 2210-2215. (in Chinese)

- [22] 吴建阳, 何冰, 杜玉洁, 李伟才, 魏永赞. 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法[J]. 现代农业科技, 2017, 691(5): 278-281.
- WU J Y, HE B, DU Y J, LI W C, WEI Y Z. Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm, NormFinder and BestKeeper[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2017, 691(5): 278-281. (in Chinese)
- [23] BRUISSON S, LEBEL S, WALTER B, PREVOTAT L, SEDDAS S, SCHELLENBAUM P. Comparative detection of a large population of grapevine viruses by TaqMan RT-qPCR and ELISA[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 240: 73-77.
- [24] TORRE C, AGÜERO J, GÓMEZ-AIX C, ARANDA M A. Comparison of DAS-ELISA and qRT-PCR for the detection of cucurbit viruses in seeds[J]. Annals of Applied Biology, 2020, 176(2): 158-169.
- [25] XIANG J, CHEN Z, ZHOU J, TIAN D, RAN X, ZHANG Z, ZHOU Y. Comparative analysis of the main haematological indexes and RNA detection for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection[J]. BMC Infectious Diseases, 2020, 20(1): 1-7.