

烟草环斑病毒 RT-Realtime PCR 检测方法

杨伟东 郑耘 陈枝楠 章桂明 吴绍精

(深圳出入境检验检疫局,广东 深圳 518001)

摘要: 烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot virus*, TRSV)是我国公布的二类检疫危险性有害生物,对农业生产危害较大。受该病毒侵染的一些寄主植物出现隐症,并伴随病毒浓度降低,给检测工作造成困难。根据 TRSV 外壳蛋白基因序列设计合成了一对引物及一条 MGB 探针,优化了反应条件,建立了 TRSV 实时荧光 RT-PCR 检测方法。该方法与常规的 DAS-ELISA 方法和 RT-PCR 方法相比,灵敏度分别提高了 200 倍和 4 倍,并且对不同寄主上的 TRSV 均有较好的检测效果。

关键词: 烟草环斑病毒; RT-PCR

Detection of *Tobacco ringspot virus* by RT-Realtime PCR

YANG Wei-dong ZHENG Yun CHEN Zhi-nan ZHANG Gui-ming WU Shao-jing

(Shenzhen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. China,
Shenzhen 518001, Guangdong Province, China)

Abstract: *Tobacco ringspot virus* was dangerous quarantine pest defined by P. R. China. Some hosts infected by the virus appeared masking symptom with lower virus concentration. Therefore, it is difficult for the virus detection. In the study, according to coat protein gene sequence, a pair of primers and a MGB probe were designed. The reaction condition was optimized. As a result, the detection method of TRSV by RT-Realtime PCR was established. This detection method was 200 and 4 times more sensitive than DAS-ELISA and RT-PCR respectively, and suitable to detect TRSV from different host plants.

Key words: *Tobacco ringspot virus*; RT-PCR

烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot virus*, TRSV)为我国公布的二类进境检疫有害生物,是豇豆花叶病毒科 Comoviridae 线虫传多面体病毒属 *Nepovirus* 的成员,病毒球形,核酸类型为正单链 RNA,基因组有 RNA-1 和 RNA-2 两个组分^[1]。该病毒分布于欧、亚、美、澳和非洲的 39 个国家,我国至今没有分布的报道^[2]。该病毒寄主范围广,可侵染 54 科 246 种植物,是侵染豆类、瓜类、花卉、果树及经济作物的重要致病病原^[3,4]。

目前,国内外普遍使用 ELISA、胶体金免疫层析法和电化学酶联免疫分析法检测 TRSV。李明福等^[5]研制开发 TRSV DAS-ELISA 试剂盒用于日常检疫。魏梅生等^[6]采用柠檬酸三钠还原法制备胶体

金颗粒,标记 TRSV 的抗体,制成免疫层析检测试纸条。检测粗提纯病毒的灵敏度为 1000ng/mL,病汁液稀释 1000 倍后仍可快速检出。对大豆病种子、烟草冻干病叶等不同材料进行检测也有良好的效果。封立平等^[7]将酶联免疫吸附技术同电化学检测结合起来,建立了电化学酶联免疫分析法检测 TRSV 提纯液,检测的灵敏度为 10 ng/mL。

根据 TRSV RNA-2 组分上衣壳蛋白基因序列设计引物,以感染 TRSV 的普通烟总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 方法检测 TRSV,检测灵敏度比 DAS-ELISA 方法有大幅度提高^[3]。孔宝华等^[8]根据 TRSV 外壳蛋白基因序列设计的引物 P1、P2,分别用感病及健康飞燕草组织总 RNA 为模板,进行 RT-PCR

基金项目:国家质量监督检验检疫总局课题资助项目(2002IK113)

作者简介:杨伟东,男,1963 年生,研究员,主要从事植物检疫工作, email: wdy@szciq.gov.cn, Tel: 0755-82111100

收稿日期:2006-07-13

检测,从感病组织中扩增出了 600 bp 的目的片段,而健康组织中无此扩增带,从而建立了 RT-PCR 检测 TRSV 的方法。

在前人研究的基础上,作者综合利用了高灵敏度的实时荧光 PCR 仪和分子杂交技术的优点,解决 TRSV 检测工作中由于隐症、病毒浓度低和干扰物质存在而影响检测结果的问题,避免漏检情况的出现,使灵敏度、准确性和稳定性等方面都有所提高。

1 材料与方法

1.1 材料

毒源:烟草环斑病毒、南芥菜花叶病毒(*Arabidopsis mosaic virus*, AMV)、番茄环斑病毒(*Tomato ringspot virus*, ToMV)、番茄黑环病毒(*Tomato black ring virus*, TBRV);鉴别寄主:白肋烟 *Nicotiana tabacum* cv. White Burly、“Pinto”菜豆 *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto、长豇豆 *Vigna sesquipedalis*、黄瓜 *Cucumis sativus*;繁殖寄主:白肋烟、番杏 *Tetragonia expansa*、昆诺藜 *Chenopodium quinoa*、大豆 *Glycine max*。以上均由中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所提供。仪器及试剂:实时荧光 PCR 仪为 ABI PRISM 7700 PCR 扩增仪,ABI 公司;实时荧光 PCR 所用试剂购自 ABI 公司。

1.2 病毒接种及病毒粗提液的制备

取经 121℃ 蒸汽灭菌 30 min 的营养土装入育苗盆中,播入种子,当苗长出第 3 片真叶时,采用摩擦接种法接种病毒于幼叶上。

称取病毒侵染的白肋烟叶组织 0.1 g,加入抽提缓冲液 1 mL,经研磨、离心后制成病毒粗提液。

1.3 病毒的 DAS-ELISA 检测及植物病毒总 RNA 的抽提

称取受病毒侵染的白肋烟叶组织 100 mg,采用 Agdia 公司的 DAS-ELISA 检测试剂盒,具体操作同常规 DAS-ELISA 方法。

采用加拿大 BBI 公司生产的柱式 RNA 抽提试剂盒抽提 RNA,随试剂盒附带 RLT、RW、RPE 溶液。称取 0.1 g 受 TRSV 侵染的白肋烟,加入液氮研磨成粉末,加入 450 μ L RLT 溶液,转移至 1.5 mL 离心管中,在涡旋仪上充分混匀,50℃ 水浴 2 min,加入 60 μ L 氯仿,充分混匀 15 s,10 000 g 离心 10 min,小心吸取上清液 300 μ L,加入 0.5 倍无水乙醇,混合均匀,转移至 RNA 抽提柱中,再将柱放在收集管中,10 000 g 离心 1 min,弃滤液,将柱重新放回同一收集

管,向柱中加入 500 μ L RW 溶液,10 000 g 离心 1 min,弃滤液。加入 500 μ L RPE 溶液,10 000 g 离心 1 min,弃滤液,重复离心 1 次。将柱转移至一个 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管中,加入 50 μ L 无 RNA 酶 ddH₂O 至柱膜中部,50℃ 孵育 2 min,10 000 g 离心 1 min,制得 RNA,置于 -70℃ 冰箱备用。

1.4 引物、探针设计及检测方法

引物与探针设计:目前已有 4 个 TRSV 分离物(AF461163, AF461164, L09205, AY363727)RNA-2 组分的衣壳蛋白基因序列在美国 NCBI 核酸数据库上公布,通过 DNASTAR 软件对比分析,发现衣壳蛋白序列的保守性强,在不同分离物间变化较小,适合设计 TRSV 实时荧光检测引物及 Taq Man-MGB 探针。引物和探针由上海基康生物技术有限公司合成。其序列如下:上游引物 Trsv-FP 5'-GGGGTGCT-TACTGGCAAGG-3';下游引物 Trsv-RP 5'-GCAC-CAGCGTAAGAACCCAA-3';Taq Man-MGB 探针 Trsv-FAM 5'-FTGATTTGCGCGCTACTGP,分别对应于 RNA-2 组分的 1323 ~1341、1394 ~1413、1357 ~1371 bp 区段,扩增产物大小 91 bp。

RT-Realtime PCR 反应体系及扩增程序:一步法实时荧光 PCR 缓冲液 5 μ L, RNase 抑制剂 0.25 μ L,下游引物(20 μ mol/L)0.5 μ L, Taq Man 探针(10 μ mol/L)0.2 μ L。50℃ 30 min,95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 30 s,30 个循环。

1.5 检测方法的适应性、特异性

不同寄主中 TRSV 的检测:将 TRSV 接种在黄瓜、大豆、长豇豆和白肋烟上,7 天后采用 RT-Realtime PCR 方法检测 TRSV,比较在不同寄主中 TRSV 的检测结果。

线虫传多面体病毒属四种病毒的检测比较:采用 RT-Realtime PCR 检测分别被 TRSV、ToRSV、TBRV 和 ArMV 侵染的寄主,比较其对 TRSV 检测的特异性。

1.6 灵敏度比较

DAS-ELISA 检测方法的灵敏度:称取感染 TRSV 的白肋烟叶片 0.1 g,加病毒抽提缓冲液 1 mL,经研磨,1 $\times 10^4$ g 离心 10 min,上清液即为浓度为 1 $\times 10^5$ μ g 叶组织/mL 的病毒粗提液。再用病毒抽提缓冲液将上述病毒粗提液稀释至浓度分别为 1 $\times 10^4$ 、1 $\times 10^3$ 、1 $\times 10^2$ 和 10 μ g 叶组织/mL 的病毒粗提液,并设阴性对照、阳性对照,每个浓度吸取 100 μ L 粗提液用于 DAS-ELISA 灵敏度检测。

RT-Realtime PCR 检测方法的灵敏度,称取 0.1 g 感病叶组织,按 1.6 方法抽提 RNA,溶于 50 μ L ddH₂O 中。分别稀释为相当于从 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 和 50 pg 叶组织中抽提出 RNA 的浓度。并设置阴、阳性对照。

2 结果与分析

2.1 不同寄主中 TRSV RT-Realtime PCR 检测

对感染 TRSV 后的白肋烟、大豆、黄瓜和长豇豆

进行检测,结果表明 RT-Realtime PCR 方法可以检出不同寄主中的 TRSV,不同寄主中 TRSV 浓度存在差异,浓度大小依次为白肋烟($C_t = 17.19$)、大豆($C_t = 20.93$)、长豇豆($C_t = 22.80$)、黄瓜($C_t = 25.63$)(图 1)。

2.2 线虫传多面体病毒属四种病毒的检测比较

结果显示,RT-Realtime PCR 对 TRSV 检测有特异性(C_t 值 = 15.18),而对其它三种病毒没有特异性(图 2)。

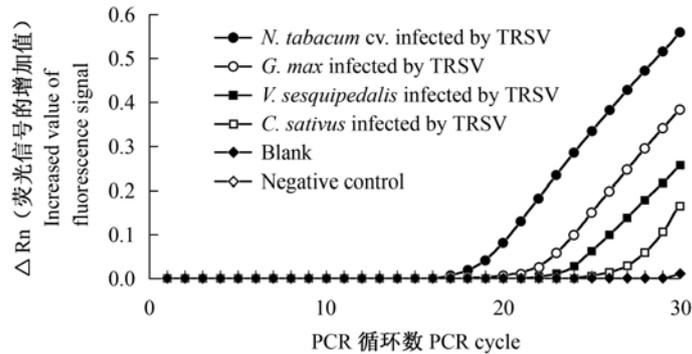


图 1 不同寄主中 TRSV RT-Realtime PCR 检测结果

Fig. 1 Detecting result of *Tobacco ringspot virus* by RT-Realtime PCR

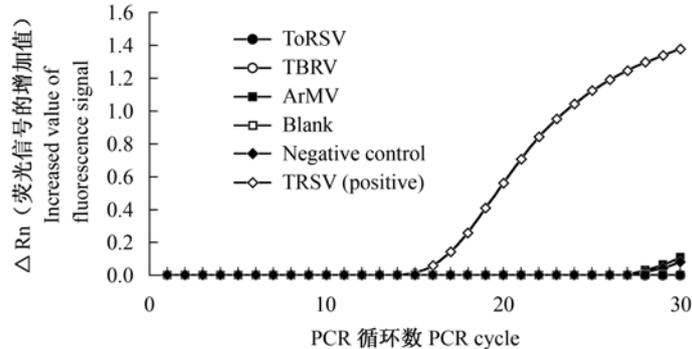


图 2 TRSV RT-Realtime PCR 检测方法的特异性

Fig. 2 Specificity of detection for *Tobacco ringspot virus* by RT-Realtime PCR

2.3 灵敏度比较

2.3.1 DAS-ELISA 检测方法的灵敏度

分别吸取各浓度的病毒粗提液 100 μ L,采用 DAS-ELISA 方法进行检测。其中,浓度为每毫升 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 μ g 叶组织和阳性对照的样品都有阳性反应($OD_{405} > 0.012$),而 10 μ g 叶组织/mL 的样品和阴性对照($OD_{405} = 0.006$)(表 1)的反应为阴性,表明 DAS-ELISA 检测方法的灵敏度为 10 μ g 叶组织。

2.3.2 RT-Realtime PCR 检测方法的灵敏度

采用 RT-Realtime PCR 方法,对相当于从 $5 \times$

10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 和 50 pg 叶组织中抽提出的 RNA 进行检测,其中 5×10^5 (C_t 值 = 21.12)、 5×10^4 (C_t 值 = 22.88)、 5×10^3 (C_t 值 = 26.01) 和 500 pg (C_t 值 = 27.56) 叶组织检测结果呈阳性反应,而 50 pg 叶组织和阴性对照的检测结果显示为阴性反应,表明 RT-Realtime PCR 检测方法的灵敏度为 500 pg 叶组织(图 3)。

3 讨论

DAS-ELISA 的灵敏度为 1×10^5 pg 叶组织/mL, RT-PCR 检测方法的灵敏度为 2×10^3 pg 叶组织^[9],

表 1 DAS-ELISA 检测方法的灵敏度

Table 1 Sensitivity of DAS-ELISA

项目 Item	病毒粗提液浓度 Crud viral extraction solution(leaf tissue /mL)					阴性对照 Negative control	阳性对照 Positive control
	$1 \times 10^5 \mu\text{g}$	$1 \times 10^4 \mu\text{g}$	$1 \times 10^3 \mu\text{g}$	$1 \times 10^2 \mu\text{g}$	$10 \mu\text{g}$		
OD ₄₀₅	1.321	0.523	0.096	0.052	0.009	0.006	1.436
反应类型 Reaction type	+	+	+	+	-	-	+

注: + 阳性反应, - 阴性反应。Note: + positive, - negative.

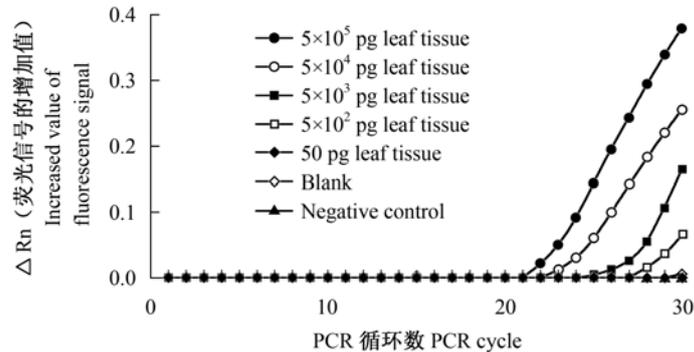


图 3 RT-Realtime PCR 检测方法的灵敏度

Fig. 3 Sensitivity of the RT-Realtime PCR method

而 RT-Realtime PCR 方法检测 TRSV 的灵敏度为 500 pg 叶组织,即 RT-Realtime PCR 检测方法的灵敏度是 RT-PCR 的 4 倍,是 DAS-ELISA 方法的 200 倍。另外,RT-Realtime PCR 方法具有良好的稳定性和重复性,在多次重复试验中检测结果一致。基于 RT-Realtime PCR 的这些优点,该方法非常适合检测 TRSV 等病毒浓度较低的种类货物。

不同寄主中烟草环斑病毒含量的检测结果直接反应各寄主中病毒含量的高低。RT-Realtime PCR 方法的检测结果表明,白肋烟、大豆、长豇豆和黄瓜中病毒浓度依次降低,这与各寄主本身的症状反应类型一致,反映了寄主症状与病毒浓度之间的相关关系,在今后实际应用中具有广泛的用途。如在抗病毒育种工作中,可以定量的检测病毒浓度的高低,来选择培育抗病、耐病品种。在检疫工作中,特别是针对一些限制非检疫性病毒病害,如菜豆黄花叶病毒、黄瓜花叶病毒等的检测,具有重要应用价值。

参考文献(References)

- 1 相宁,孙彤,刘宏迪,等. 烟草环斑病毒 PCR 产物的克隆及部分序列分析. 植物检疫, 1998, 12(5): 260 - 263
- 2 陈燕芳,陈京,宋淑敏,等. 烟草环斑病毒的检疫检测方法. 植物检疫, 1999, 13(4): 215 - 217
- 3 相宁,周雪荣,孙彤,等. RT-PCR 检测烟草环斑病毒的研究. 植物检疫, 1995, 9(6): 337 - 339
- 4 朱常香,宋云枝,王玫玫,等. 烟草环斑病毒外壳蛋白基因的原核表达及抗血清的制备. 中国病毒学, 2005, 20(4): 434 - 437
- 5 李明福,魏梅生,朱水芳,等. 烟草环斑病毒-马铃薯 X 病毒碱性磷酸酶酶联诊断试剂盒的研制简报. 植物检疫, 2001, 15(2): 89
- 6 魏梅生,李桂芬,张周军,等. 胶体金免疫层析法快速检测烟草环斑病毒. 植物检疫, 2002, 16(2): 81 - 83
- 7 封立平,陈长法,孙伟,等. 电化学酶联免疫分析法检测烟草花叶病毒和烟草环斑病毒. 检验检疫科学, 2003, 13(2): 4 - 5, 3
- 8 孔宝华,蔡红,陈海如,等. RT-PCR 方法检测烟草环斑病毒的研究. 云南农业大学学报, 2001, 16(1): 13 - 15
- 9 王继华,瞿素萍,孔宝华,等. 百合无症病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测. 云南农业大学学报, 2004, 19(2): 148 - 150, 173