

纳米磁珠结合实时荧光 RT-PCR 技术检测大丽花潜隐类病毒

Detection of *Dahlia latent viroid* by real-time RT-PCR combined with magnetic nanoparticles赵晓丽¹ 迟海英² 邓丛良^{1*} 张丽杰¹ 吕玉峰¹ 田 婧³

(1. 北京出入境检验检疫局, 北京 100026; 2. 山东出入境检验检疫局, 青岛 266002; 3. 农业部规划设计研究院, 北京 100125)

Zhao Xiaoli¹ Chi Haiying² Deng Congliang^{1*} Zhang Lijie¹ Lü Yufeng¹ Tian Jing³

(1. Beijing Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China; 2. Shandong Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, Shandong Province, China; 3. Chinese Academy of Agricultural Engineering, Beijing 100125, China)

大丽花潜隐类病毒(*Dahlia latent viroid*, DLVd)是 Verhoeven et al.(2013)用 Return-PAGE 和 s-PAGE 技术从大丽花中鉴定出的一种新类病毒。根据 2015 年国际病毒分类委员会分类报告,DLVd 为马铃薯纺锤形块茎类病毒科啤酒花矮化类病毒属成员。该病毒单独侵染时,大丽花没有明显的症状,其与马铃薯纺锤形块茎类病毒(*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd)复合侵染时可使大丽花叶片卷曲(Tsushima et al., 2015)。目前,只有荷兰 Verhoeven et al.(2013)和日本 Tsushima et al.(2015)发现了 DLVd,国内尚未见相关报道。本研究通过纳米磁珠法(magnetic nanoparticles, MNP)提取样品中核酸,结合实时荧光 RT-PCR 技术,建立了 DLVd 的检测方法,以期对 DLVd 的早期监测与及时防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病毒样品:分别单独被 DLVd 和大丽花花叶病毒(*Dahlia mosaic virus*, DMV)侵染的大丽花叶片、被马铃薯纺锤形块茎类病毒(*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd)侵染的马铃薯叶片和被啤酒花矮化类病毒(*Hop stunt viroid*, HSVd)侵染的葡萄叶片均由本实验室口岸截获,经测序比对后保存于北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心植物实验室。

试剂与仪器:植物类病毒核酸纳米磁珠快速提取试剂盒,武汉哇哇噤纳技术有限公司;Taq 酶、DNA Marker DL2000、胶回收试剂盒、PCR 所用试剂,宝生物工程(大连)有限公司;iCycler Thermal Cycler T100™ PCR 仪、Sub-Cell® GT Cell 电泳槽、PowerPac Basic Power Supply 电泳仪电源、Universal Hood II 凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;ABI

7900 实时荧光定量 PCR 仪,美国应用生物系统公司。

1.2 方法

引物及 RNA 提取:常规 RT-PCR 引物参考 Verhoeven et al.(2013);DLVd-P1/P2 分别为 5'-GGG-GCAACTCCGAGAGTGCTG-3'和 5'-GGGGCTCC-TCAGAGAGTCTC-3';DLVd-FP:5'-CCGCTCCTT-GTAGCTTTGAGA-3',DLVd-RP:5'-GGTCGCGTC-CTCGAGTCA-3',TaqMan 探针(DLVd-P:5'-TACC-GCCCTTTTGCTTCCTTCTCGC-3'),均由宝生物工程(大连)有限公司合成。每种供试材料分别取 100 mg 叶片,参照连海燕等(2015)的 MNP 法提取 RNA。

RT-PCR 反应体系的建立:20 μL RT 反应体系:DEPC-H₂O 3.5 μL、10 mmol/L dNTP Mixture 1 μL、10 μmol/L DLVd-P2 1 μL、总 RNA 5 μL;65℃ 温育 5 min,立即置于冰上;加入 10×SuperScript™ III first-strand RT Buffer 2 μL、25 mmol/L MgCl₂ 4 μL、0.1 mol/L DTT 2 μL、40 U/μL RNaseOUT™ 1 μL、200 U/μL SuperScript™ III RT 0.5 μL;50℃ 50 min,85℃ 5 min。25 μL PCR 反应体系:ddH₂O 16.3 μL、10×PCR Buffer 2.5 μL、10 mmol/L dNTP Mixture 2 μL、10 μmol/L DLVd-P1 1 μL、10 μmol/L DLVd-P2 1 μL、Taq DNA 聚合酶 0.2 μL、cDNA 2 μL。扩增程序:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 50 s,40 个循环;72℃ 延伸 5 min。PCR 反应结束后,取 5 μL 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶下电泳观察,照相。

Real-time PCR 反应体系的建立:将合成的 cDNA 用作模板进行 real-time PCR 反应。25 μL real-time PCR 反应体系:ddH₂O 6.3 μL、2×Taq Man PCR masterMix 12.5 μL、10 μmol/L DLVd-FP1 μL、10 μmol/L DLVd-RP 1 μL、10 μmol/L DLVd-P 0.2 μL、cDNA

基金项目:国家质检公益性项目(201310068),国家质检总局科技计划项目(2015IK022)

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: dengcl@bjciq.gov.cn

收稿日期:2016-08-12

2 μ L。反应条件:50℃ 2 min;95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 60 s,采集荧光信号,40个循环。

Real-time RT-PCR 体系的评价:利用MNP方法分别提取携带DLVd、PSTVd、HSVd、DMV的植物叶片的总RNA,利用建立的real-time RT-PCR对其进行DLVd检测,评价其特异性。再将含DLVd的RNA进行10倍梯度稀释,获得 $10^1 \sim 10^8$ 稀释倍数的RNA模板,对RNA模板进行RT-PCR和real-time RT-PCR检测,设置ddH₂O为空白对照,评价其灵敏度;每个稀释倍数的RNA模板在同一批次内3次重复及3个不同批次间进行real-time RT-PCR重复检测,计算平均C_t值、标准差和变异系数。利用同一试验内和不同试验间对同一样品检测的C_t值的变异系数,评价该方法的重复性。

样品检测:取4份荷兰进口大丽花种苗和4份北京植物园种植的大丽花叶片,MNP法提取核酸,进行real-time RT-PCR检测。对检测为阳性的大丽花叶片的RT-PCR扩增产物进行测序,并将测序结果在GenBank中进行序列比对。

2 结果与分析

2.1 实时荧光RT-PCR特异性、灵敏度和重复性

只有DLVd模板有明显扩增曲线,而PSTVd、HSVd、DMV模板中未得到扩增曲线,说明建立的实时荧光RT-PCR特异性强。利用常规RT-PCR只能检测到稀释倍数为 10^6 的模板(图1),而实时荧光RT-PCR可以检测到稀释倍数为 10^8 的模板(图2)。同批次和不同批次的不同稀释浓度的RNA组内重复的最大变异系数为1.40%,组间重复的最大变异系数为2.78%,表明所建立的实时荧光RT-PCR具有较好的重复性。

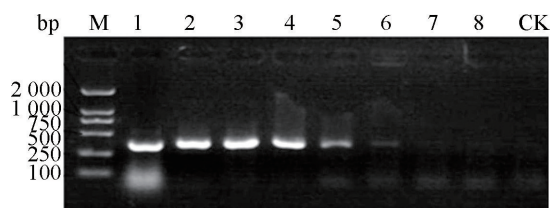


图1 RT-PCR对DLVd的检测灵敏度

Fig. 1 Sensitivity of RT-PCR for DLVd detection

M: 标准分子量。1~8: 稀释倍数分别为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 和 10^8 的cDNA模板;CK: 空白对照。M: DNA marker DL2000。1~8: Eight dilutions of template for 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 , respectively; CK: negative control.

2.2 MNP-real-time RT-PCR检测大丽花样品

阳性对照、荷兰进口的大丽花种苗及北京植物

园种植的大丽花叶片均出现明显的扩增曲线,表明其为DLVd阳性,而阴性对照和空白对照无扩增曲线。阳性样品测序结果与GenBank中登录序列为LC036322.1的同源性为100%。因此,确认通过RT-PCR扩增出的特异片段为大丽花潜隐类病毒序列。

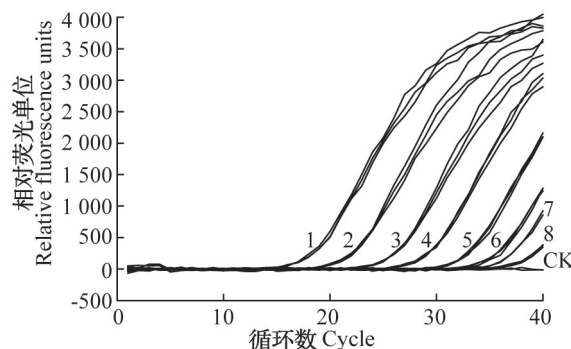


图2 Real-time RT-PCR对DLVd的检测灵敏度

Fig. 2 Sensitivity of real-time RT-PCR for DLVd detection

M: 标准分子量。1~8: 稀释倍数分别为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 和 10^8 的cDNA模板;CK: 空白对照。M: DNA marker DL2000。1~8: Eight dilutions of template for 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 , respectively; CK: negative control.

3 讨论

本试验建立的DLVd MNP-real-time RT-PCR检测方法采用了MNP核酸提取方法,省去了有毒、有害试剂的使用,减少了对环境的污染,减少了操作步骤,有效缩短了类病毒RNA的提取时间,同时real-time RT-PCR不需要凝胶电泳来检测PCR产物,因而减少了样品交叉污染的概率。本方法操作简单、特异性强、灵敏度高、重复性好,为DLVd的快速检验和防止DLVd的传播与扩散提供有力的支持。

参考文献 (References)

- Lian HY, Li JG, Zhao XL, Lü YF, Sun N, Deng CL, Xu ZC. 2015. Research on RNA extraction and detection based on MNP-RT-qPCR assay of *Hop latent viroid*. Acta Phytopathologica Sinica, 45(3): 288-296 (in Chinese) [连海燕, 李建光, 赵晓丽, 吕玉峰, 孙宁, 邓丛良, 许志春. 2015. 啤酒花潜隐类病毒RNA提取方法及检测技术的研究. 植物病理学报, 45(3): 288-296]
- Tsushima T, Matsushita Y, Fuji S, Sano T. 2015. First report of *Dahlia latent viroid* and *Potato spindle tuber viroid* mixed-infection in commercial ornamental dahlia in Japan. New Disease Reports, 31: 11
- Verhoeven JT, Meekes ET, Roenhorst JW, Flores R, Serra P. 2013. *Dahlia latent viroid*: a recombinant new species of the family *Pospiviroidae* posing intriguing questions about its origin and classification. Journal of General Virology, 94(4): 711-719

(责任编辑:张俊芳)