

基于巢式反转录-聚合酶链式反应技术检测葡萄病毒 A 和葡萄病毒 B

Identification of *Grapevine virus A* and *Grapevine virus B* by using nested reverse transcription-polymerase polymerase chain reaction

胡国君 董雅凤* 张尊平 范旭东 任 芳

(中国农业科学院果树研究所, 国家落叶果树脱毒中心, 辽宁 兴城 125100)

Hu Guojun Dong Yafeng* Zhang Zunping Fan Xudong Ren Fang

(National Center for Eliminating Viruses from Deciduous Fruit Tree, Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, Liaoning Province, China)

皱木复合病在世界范围内普遍发生,是引起葡萄木质部畸形的一类病害的统称,在沙地葡萄、Kober5BB 和 LN33 品种上表现茎痘、茎沟和栓皮等症状,其中葡萄病毒 A(*Grapevine virus A*, GVA)与 Kober5BB 品种上出现茎沟症状有关,而葡萄病毒 B(*Grapevine virus B*, GVB)与 LN33 品种上出现栓皮症状有关。GVA 和 GVB 属葡萄病毒属,主要通过嫁接和粉蚧传播,建立快速、准确、高效的检测技术对其防控具有重要意义。本研究在分析前人检测方法的基础上,设计 GVA 和 GVB 的巢式扩增引物,建立巢式 RT-PCR 检测方法,以期为该病毒的分子鉴定、脱毒检测等提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试毒源及植物:感染 GVA 和 GVB 的葡萄样品于 2017 年采自中国农业科学院果树研究所国家落叶果树脱毒中心保存圃。供检样品为在辽宁省、山东省等地随机采集的 60 份感病葡萄样品。

试剂及仪器:*rTaq* DNA 聚合酶、dNTPs、克隆载体 pMD18-T 和大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,宝生物工程(大连)有限公司;莫洛尼鼠白血病病毒(*Maloney-murine leukemia virus*, M-MLV),普洛麦格(北京)生物技术有限公司;其它试剂均为国产分析纯。S1000 型 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;DS-11 超微量紫外可见分光光度计,美国 Denovix 公司。

1.2 方法

引物的筛选及鉴定:根据 Osman & Rowhani (2006)的 GVA 和 GVB 检测引物,在内部分别设计巢式引物 GVA-F2(5'-ACTCTCTTCGGGTACATC-

GCCTTGGTC-3')/R2(5'-GCGAAAGGCTCGCATCTGCCT-3')和 GVB-F2(5'-GTGCGGCTAA-ACGAAGGGCTACTC-3')/R2(5'-AACAAACGATTGGTACTCAGGCTTCC-3'),引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将片段克隆转化,送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序,采用 DNAMAN 6.0 在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对。

总 RNA 提取:参照 Foissac et al.(2001)方法略有修改。称取 0.1 g 样品,加入 1 mL 提取缓冲液研磨;取 500 μ L 匀浆液,加入到 150 μ L 10% 月桂酰基肌氨酸钠溶液中。

巢式反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增及条件优化:利用反转录酶 M-MLV 反转录合成 cDNA。第 1 次常规 PCR 反应体系:cDNA 2 μ L、10 $\times$ RCR Buffer 2.5 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 0.5 μ L、10 mmol/L 同源和互补引物各 0.5 μ L、5 U/ μ L *rTaq* DNA 聚合酶 0.2 μ L,用 ddH₂O 定容至 25 μ L。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。第 2 次扩增以第 1 次 PCR 扩增产物为模板,用量为 1 μ L,其它试剂及用量同第 1 次扩增,其中 10 mmol/L 浓度引物设置 0.1、0.3、0.5 μ L 三个用量。扩增程序中退火温度设置 55、57、59、61 $^{\circ}$ C,其它同上。

巢式引物灵敏度的测定及检测效果比较:先测定总 RNA 的 A_{260 nm}/A_{280 nm} 比值和浓度,将总 RNA 浓度用无菌水按 10 倍梯度稀释至 1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 倍,再进行巢式 RT-PCR。利用常规 PCR 和巢式 RT-PCR 分别对采集的 60 份葡萄

样品枝条韧皮部进行检测,比较2种方法对GVA和GVB的检出率。

2 结果与分析

2.1 GVA和GVB巢式引物的特异性

GVA和GVB巢式引物均能从葡萄病毒阳性样品扩增出清晰条带。获得的序列(登录号MH350849和MH350850)均为目标基因序列。其中,扩增片段在GVA和GVB基因组的位置分别为6 654~6 874 nt和7 111~7 338 nt。

2.2 GVA和GVB引物用量和退火温度的优化

GVA引物GVA-F2/R2用量0.3 μL 、退火温度59 $^{\circ}\text{C}$ 或61 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增效果最佳(图1-A);GVB引物GVB-F2/R2用量0.3 μL 或0.5 μL 、4个退火温度下,均有较好的扩增效果(图1-B)。

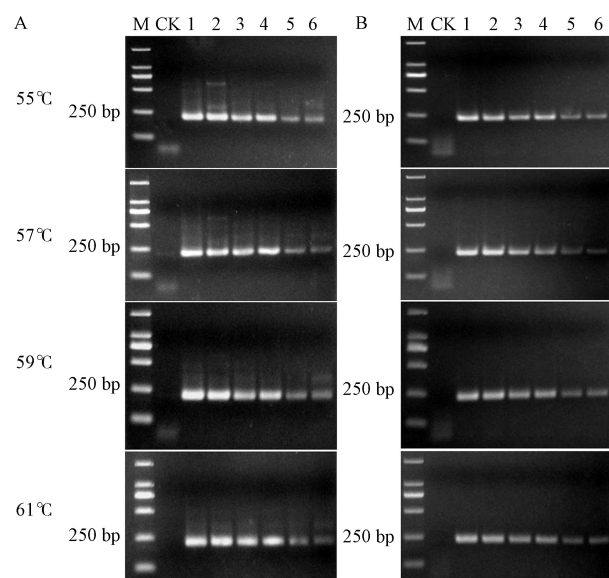


图1 巢式PCR扩增GVA(A)和GVB(B)引物用量和退火温度的优化

Fig. 1 Optimization of the annealing temperature and concentration of primer for nested RT-PCR of GVA (A) and GVB (B)

M: DNA marker D2000; CK: 阴性对照; 图A中1、3、5的葡萄品种为奇妙无核,2、4、6的葡萄品种为红地球; 图B中1、3、5的葡萄品种为蛇龙珠,2、4、6的葡萄品种为霞多丽; 1和2, 3和4, 5和6引物用量为0.5, 0.3和0.1 μL 。M: DNA marker D2000; CK: negative control; 1, 3, 5 in Fig. A: Fantasy Seedless grape; 2, 4, 6: Red Globe grape; 1, 3, 5 in Fig. B: Cabernet Gernischt grape; 2, 4, 6: Chardonnay grape; dosage of primer for 1 and 2, 3 and 4, 5 and 6 are 0.5, 0.3, 0.1 μL , respectively.

2.3 巢式引物的灵敏度测定

样品总RNA的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 平均值为2.06,平均浓度为107.77 ng/ μL 。模板稀释至 10^{-3} 倍时,

GVB-F2/R2条带的亮度开始降低,当稀释至 10^{-7} 倍时,则不能扩增出条带;而在此浓度下,GVA-F2/R2仍能扩增出目标带(图2)。

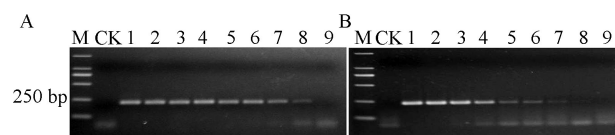


图2 GVA和GVB巢式引物GVA-F2/R2(A)和GVB-F2/R2(B)的扩增电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of nested primer GVA-F2/R2 (A) and GVB-F2/R2 (B) of GVA and GVB

CK: 阴性对照; 1~9: 模板的稀释倍数分别为 1 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 。CK: Negative control; 1~9: the dilution multiple of templates are 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , respectively.

2.4 2种病毒常规PCR和巢式RT-PCR检测效果比较

利用引物GVA-F1/R1时,GVA和GVB的常规PCR检出率分别为10.0%和3.3%;利用引物GVA-F2/R2时,GVA和GVB的常规PCR检出率分别为8.0%和3.3%;GVA和GVB的巢式RT-PCR检出率分别为23.3%和20.0%,较常规PCR检出率高。

3 讨论

近年来,巢式RT-PCR技术越来越多地被应用到果树病毒的快速检测中(周彦等,2016)。本研究根据已有的GVA和GVB检测引物设计了巢式检测引物,通过引物筛选、反应条件优化及检测灵敏度测定,建立了2种病毒的巢式RT-PCR检测体系,二者检测的灵敏性均明显高于常规RT-PCR。本方法操作简单、特异性强、灵敏度高、重复性好,为2种病毒的快速检验和防控研究提供了有力的支持。

参考文献 (References)

1. Foissac X, Svanella-Dumas L, Dulucq MJ, Candresse T, Gentil P. 2001. Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 550: 37-43
2. Osman F, Rowhani A. 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (*TaqMan*). *Journal of Virological Methods*, 133(2): 130-136
3. Zhou Y, Chen HM, Wang XF, Li ZA, Wang L, Zhou CY. 2016. Development and application of nested RT-PCR assay for detection of *Citrus yellow vein clearing virus*. *Journal of Plant Protection*, 43(2): 255-259 (in Chinese) [周彦, 陈洪明, 王雪峰, 李中安, 王亮, 周常勇. 2016. 柑橘黄化脉明病毒巢式RT-PCR检测方法的建立及应用. *植物保护学报*, 43(2): 255-259]

(责任编辑:张俊芳)