

葡萄灰皮诺病毒微滴数字 RT-PCR 检测方法的建立

Establishment of droplet digital RT-PCR assay for detection of Grapevine Pinot gris virus

赵晓丽¹ 齐 玮¹ 骆卫峰¹ 张永江^{2*} 郑祖亮³ 邓丛良^{1*}

(1. 北京海关, 北京 100026; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 3. 北京爱普拜生物技术有限公司, 北京 100011)

ZHAO Xiaoli¹ QI Wei¹ LUO Weifeng¹ ZHANG Yongjiang^{2*} ZHENG Zuliang³ DENG Congliang^{1*}

(1. Beijing Customs District, Beijing 100026, China; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 3. Apexbio Biotechnology (Beijing) Co., Ltd., Beijing 100011, China)

葡萄灰皮诺病毒(Grapevine Pinot gris virus, GPGV)最早于2012年由意大利研究人员利用高通量测序技术发现(Giampetruzzi et al., 2012),该病毒可引起葡萄叶片褪绿、斑驳、皱缩、变形等症状,导致葡萄植株发育不良、成熟期延迟、产量降低、果实腐烂,还可与其它病毒共同作用产生复合负面效应。目前,葡萄灰皮诺病毒病尚缺乏有效防治药剂,为防控该病毒病的发生和传播,本研究拟设计特异性引物和探针,建立 GPGV 微滴数字 RT-PCR(droplet digital reverse transcription-polymerase chain reaction, ddRT-PCR)检测方法,以期提高 GPGV 截获率,为及时防控葡萄灰皮诺病毒病的发生和蔓延提供技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试材料:阳性材料包括感染 GPGV 的巨峰葡萄叶片、感染葡萄双生病毒 A(Grapevine geminiviruses A, GGA)的紫甜无核葡萄叶片和感染南芥菜花叶病毒(Arabis mosaic virus, ArMV)的烟草冻粉;前两者采自北京园博园,由北京海关技术中心分离并提供,后者购自美国模式培养物保藏所。阴性材料为健康巨峰葡萄叶片,采自北京市顺义区葡萄园。

试剂及仪器:RNA 提取试剂 Trizol 和 DNA 提取试剂盒,美国英杰生命技术有限公司;一步法 RT-qPCR 试剂盒,日本 TaKaRa 公司;qScript™ XLT One-Step RT-qPCR ToughMix®,美国 Quanta BioSciences 公司;荧光素,美国 Amresco 公司。ABI 7900 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司;数字 PCR 仪,法国 Stilla 公司。

1.2 方法

ddRT-PCR 方法的特异性检测:ddRT-PCR 系统可通过 FAM、VIC 和 CY5 三个荧光通道实现同一反

应中不同样品的检测。根据 NCBI 核酸序列数据库中 GPGV *cp* 基因保守序列(序列号 KU508673)设计特异性引物 GPGV-F(5'-GGACAACATTGATAGGT-AC-3')/GPGV-R(5'-CCCAACATCATTTCTGTG-3')和探针 GPGV-P-FAM(5'-FAM-TACCTTCGGACAGTTCATCCATTGT-BHQ-3');同理,设计 GGA 特异性引物 GGA-F(5'-GACCTATCCCTCTCTTTATC-3')/GGA-R(5'-CTCGTCATCATGGTATCC-3')和探针 GGA-P-VIC(5'-VIC-CCGCAGGTCAAGTCAGTCAGTCA-GTA-BHQ-3')、ArMV 特异性引物 ArMV-F(5'-CAC-TGTAGCCCTTGAGATAATCC-3')/ArMV-R(5'-GCCCTCAGGTCCCACATTAACCTTT-3')和探针 ArMV-P-CY5(5'-CY5-CTCACATGATAGCTTGTTCATGG-ACTCC-BHQ-3'),引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。称取感染 GPGV、ArMV 阳性材料和阴性材料各 100 mg,按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA;称取感染 GGA 阳性材料和阴性材料各 100 mg,利用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。分别以提取的 RNA 和 DNA 为模板进行特异性检测。25 μL 反应体系:2×qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix® 12.5 μL、1 μmol/L 荧光素 2.5 μL、10 μmol/L 引物 GPGV-F/GPGV-R/GGA-F/GGA-R/ArMV-F/ArMV-R 各 1 μL、10 μmol/L 探针 GPGV-P-FAM/GGA-P-VIC/ArMV-P-CY5 各 0.5 μL、模板 1 μL,DEPC-H₂O 补足至 25 μL。反应条件:50℃ 逆转录 10 min,95℃ 预变性 10 min,1 个循环;95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,45 个循环。

ddRT-PCR 方法的灵敏度和重复性检测:将提取的感染 GPGV 阳性材料 RNA 以 10 倍梯度稀释至 10⁰~10⁵ 后作为模板进行灵敏度检测,以健康葡萄叶片 RNA 为阴性对照,与实时荧光定量 RT-PCR(real-time fluorescent quantitative RT-PCR, RT-qPCR)法进行比

较。ddRT-PCR反应体系同上,仅将GGA和ArMV特异性引物和探针去掉;反应条件同上。20 μL RT-qPCR反应体系:2 \times One Step RT-PCR Buffer III 10 μL 、TaKaRa Ex Taq HS 0.4 μL 、PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ GPGV-F/GPGV-R各1 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ GPGV-P 0.5 μL 、模板1 μL 、DEPC- H_2O 补至20 μL 。反应条件:42 $^\circ\text{C}$ 逆转录5 min,95 $^\circ\text{C}$ 预变性10 s,1个循环;95 $^\circ\text{C}$ 变性5 s,60 $^\circ\text{C}$ 退火20 s,40个循环。将提取的感染GPGV阳性材料RNA作为模板进行重复性检测,重复3次,反应体系和条件同灵敏度检测。

2 结果与分析

2.1 ddRT-PCR方法的特异性

微滴生成是ddRT-PCR检测的关键步骤,微滴数在10 000个以上时才能满足定量检测要求,微滴数越多,定量结果越准确。检测结果显示,感染GPGV、GGA和ArMV阳性样品微滴生成总数分别为24 279、

24 934和26 241个,均大于10 000个,且阳性样品与阴性样品的微滴能够明显区分,满足ddRT-PCR微滴分析要求。感染GPGV阳性样本的ddRT-PCR检测中,仅FAM通道(GPGV)有荧光信号,VIC和CY5通道无荧光信号,表明感染GPGV阳性样本中仅检出GPGV,所建ddRT-PCR检测方法特异性良好。

2.2 ddRT-PCR方法的灵敏度和重复性

ddRT-PCR检测结果显示,GPGV的最低检出限为 10^5 倍稀释模板,且生成的微滴数与原始模板稀释倍数成反比,稀释10倍模板的扩增数为3 509拷贝/ μL ,而稀释 10^5 倍模板的扩增数仅为1.19拷贝/ μL ,阴性对照扩增数为0(图1-A);而RT-qPCR检测曲线均呈S型, 10^5 倍稀释模板和阴性对照无阳性扩增曲线(图1-B);表明ddRT-PCR方法的检测灵敏度较RT-qPCR方法高10倍。重复性检测结果显示,试验最大变异系数为1.5%,表明ddRT-PCR方法检测重复性良好。

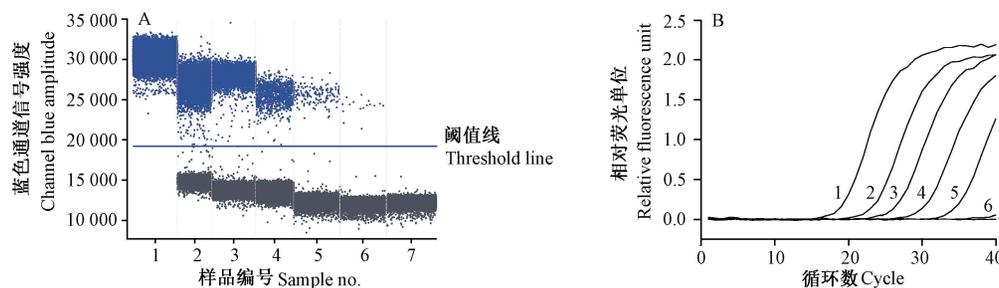


图1 ddRT-PCR(A)和RT-qPCR(B)技术对葡萄灰皮诺病毒的检测灵敏度
 阈值线以上为阳性微滴,以下为阴性微滴。1~6: 分别为 10^0 ~ 10^5 倍梯度稀释模板;7: 阴性对照。Above the threshold line are positive microdrops and below are negative microdrops. 1~6: Dilutions of template for 10^0 ~ 10^5 , respectively; 7: negative control.

图1 ddRT-PCR(A)和RT-qPCR(B)技术对葡萄灰皮诺病毒的检测灵敏度

Fig. 1 Sensitivity of ddRT-PCR (A) and RT-qPCR (B) for grapevine Pinot gris virus detection

3 讨论

葡萄病毒检测方法主要有鉴别寄主法、ELISA法、普通RT-PCR法和RT-qPCR法。近年来新发展的ddPCR技术通过把稀释到一定浓度的核酸分子分布到10 000~20 000个微滴中,利用PCR扩增和阳性信号累积来读取阳性反应单元数,根据泊松分布公式计算样本中的核酸分子数。该技术相较于qPCR技术具备以下优势:对核酸分子的绝对定量避免了由PCR扩增效率差异导致的偏差;无需依赖标准物质和标准曲线;灵敏性和重复性更高,易于标准化;更适用于低拷贝数的核酸检测;通过不同的荧光信号标记,更易实现在同一反应体系中多种基因的多重扩增,降低检测成本。因此ddRT-PCR技术已被用于转基因成分定量检测(胡佳莹等,2016)和病毒检测(张永江等,2017)等方面的研究。本研究所建GPGV的ddRT-PCR检测方法特异性强、灵敏度高、重复性好;且不依赖任何外部标准样品就能实现绝对定量检测,能够满足葡萄生产中质量控制和田间病害监测的需要。

参考文献 (References)

- GIAMPETRUZZI A, ROUMI V, ROBERTO R, MALOSSINI U, YOSHIIKAWA N, LA NOTTE P, TERLIZZI F, CREDI R, SALLARELLI P. 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research*, 163(1): 262-268
- HU JY, JIANG Y, YANG LT. 2016. Quantification of genetically modified maize (*Zea mays*) MON863 by QuantStudio™ 3D digital PCR. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 24(8): 1216-1224 (in Chinese) [胡佳莹, 姜羽, 杨立桃. 2016. 利用QuantStudio™ 3D数字PCR分析转基因玉米MON863含量. *农业生物技术学报*, 24(8): 1216-1224]
- ZHANG YJ, HUANG JF, WANG XQ, ZHOU H, LI XY, FU W, ZHU PY, WANG CG. 2017. Detection of *Potato virus S* (PVS) by droplet digital PCR (ddPCR). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 25(10): 1721-1728 (in Chinese) [张永江, 黄洁芳, 王溪桥, 周慧, 李晓宇, 付伟, 朱鹏宇, 王晨光. 2017. 微滴数字PCR(ddPCR)检测马铃薯S病毒(PVS). *农业生物技术学报*, 25(10): 1721-1728]

(责任编辑:李美娟)