

重组酶聚合酶扩增技术(RPA)快速检测玉米褪绿斑驳病毒

Detection of maize chlorotic mottle virus by recombinase polymerase amplification

冯黎霞^{1*} 魏霜¹ 余辛² 张永江³ 武目涛¹ 胡学难¹

(1. 广州海关技术中心, 广州 510623; 2. 广州机场海关, 广州 510470; 3. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

FENG Lixia^{1*} WEI Shuang¹ YU Xin² ZHANG Yongjiang³ WU Mutao¹ HU Xuenan¹

(1. Guangzhou Customs Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, Guangdong Province, China;

2. Guangzhou Airport Customs, Guangzhou 510470, Guangdong Province, China;

3. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

玉米褪绿斑驳病毒(maize chlorotic mottle virus, MCMV)是我国颁布的一种禁止进境的检疫性有害生物,自然寄主有玉米、小麦、黍、大麦等。自然情况下,MCMV常与甘蔗花叶病毒(sugarcane mosaic virus, SCMV)、玉米矮花叶病毒(maize dwarf mosaic virus, MDMV)、小麦线条花叶病毒(wheat streak mosaic virus, WSMV)共同侵染玉米,可造成玉米产量损失高达10%~90%(Hilker et al., 2017)。重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)是近几年出现的一种体外核酸恒温扩增检测技术,在病原体诊断、食品安全检测等方面都有应用(杜亚楠等, 2018)。本研究针对MCMV拟建立了一种操作简便、特异性强、灵敏度高的RPA检测技术,以期MCMV田间诊断、口岸现场检疫提供更好的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:MCMV阳性对照为经PCR鉴定为阳性的玉米叶片,MCMV阴性对照采自广州玉米大田的健康玉米叶片,SCMV、MDMV、WSMV、玉米褪绿矮缩病毒(maize chlorotic dwarf virus, MCDV)阳性对照(叶片)均购自美国Agdia公司。

试剂及仪器:植物RNA提取试剂盒,天根生物科技有限公司;TwistAmp Basic RPA试剂盒,英国TwistDx公司;PrimeScript RT-PCR试剂盒,日本TaKaRa公司;其它试剂为国产分析纯。600SI电泳仪,上海博彩生物科技有限公司;T100 PCR扩增仪、Image Lab凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

引物设计:根据GenBank MCMV CP基因序列

(登录号JQ982468.1),参照RPA引物设计要求设计4对引物:引物M1(5'-AGCTACAATAGCTCTGAAGAACAGAGGGCC-3')/M2(5'-GCACGAGTACGAGATTTTGATTGGCCTAC-3')、M3(5'-GATTACATGTTATCAATACCCACTGGGGTG-3')/M4(5'-CACTAGCTTTAGGGATAGCCACAATGAATC-3')、M5(5'-TGGCAGCACAATCACAGATGTGGAATCAAT-3')/M6(5'-TGGCCCTCTGTTCTTCAGAGCTATTGTAGCTGA-3')、M7(5'-TGCCCTCAGCTACAATAGCTCTGAAGAACAGA-3')/M8(5'-TTGCATAGCTTTAGGGATAGCCACAATGAATC-3'),扩增片段大小分别为199、217、192、165 bp。引物均由生物工程(上海)股份有限公司合成。

模板制备、cDNA合成:各取5种病毒阳性对照以及MCMV阴性对照叶片0.1 g,按照植物RNA提取试剂盒说明书,提取叶片总RNA,-80℃保存备用。以提取的RNA为模板反转录合成第一链cDNA,4℃保存。

RPA扩增及检测引物筛选:以cDNA为模板,利用本研究设计的4对引物分别进行RPA扩增。50 μL RPA扩增体系:向已装有冻干酶粉的PCR试管中加入Rehydration Buffer 29.5 μL、无RNAase水12 μL、10 μmol/L上、下游引物各2 μL、模板cDNA 2 μL、280 mmol/L醋酸镁2.5 μL。40℃温浴40 min;反应结束后,加入50 μL苯酚/氯仿溶液,充分混匀,12 000 r/min离心2 min,取上清液5 μL进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统上观察结果。按照上述RPA扩增反应体系,以MCMV阳性对照为模板,分别用引物对M1/M2、M3/M4、M5/M6、M7/M8进行RPA检测,筛选出最合适的RPA反应引物对。

RPA 检测方法特异性及灵敏度评价:利用筛选的最佳引物对,根据上述 RPA 扩增反应体系,以 MCMV、SCMV、MDMV、WSMV 及 MCDV 阳性对照为模板进行 RPA 检测来对所建立的 RPA 检测方法特异性进行评价。以 MCMV 阳性对照总 RNA 反转录合成的第一链 cDNA 为模板进行稀释,浓度梯度为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 六个稀释度,按照上述反应体系进行 RPA 灵敏度试验。参照龚海燕等(2010)建立 MCMV 的普通 PCR 方法进行灵敏度试验。25 μ L PCR 反应体系:cDNA 模板 2 μ L、20 μ mol/L 上、下游引物 0.4 μ L、 $10\times$ PCR Buffer 2 μ L、10 mmol/L dNTPs 1 μ L、5 U/ μ L *Taq* 酶 0.5 μ L,补双蒸水至 25 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s;58 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。比较本研究所建立的 RPA 检测方法与普通 PCR 方法的灵敏度。

2 结果与分析

2.1 引物筛选结果

引物筛选结果显示,引物 M1/M2 无目的条带扩增,故不选用;其余 3 对引物均有特异性扩增,引物 M3/M4 和 M5/M6 虽扩增到目标条带,但有较明显的非特异性扩增;而 M7/M8 扩增条带单一,扩增效率与 M3/M4 和 M5/M6 两对引物相近,且无非特异性条带,故本试验选用引物 M7/M8 进行后续试验。

2.2 RPA 检测方法的特异性评价

对 MCMV RPA 引物的特异性进行评价,结果显示,只有 MCMV 阳性样品扩增得到 165 bp 的目的片段,而 SCMV、MDMV、WSMV、MCDV 阳性对照以及 MCMV 阴性对照均未检测到条带,表明引物 M7/M8 对 MCMV 具有良好的特异性。

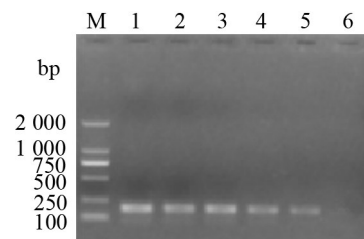
2.3 RPA 检测方法灵敏度评价

以不同稀释梯度 MCMV 反转录 cDNA 为模板进行检测,结果显示,RPA 检测方法的反应时间设置 40 min、稀释度为 10^{-4} 时,仍然可以检测到大小 165 bp 的目的条带;普通 PCR 反应设置为 35 个循环、稀释度为 10^{-4} 时,也可以检测到 700 bp 的目的条带。当稀释度为 10^{-5} 时,2 种检测方法均未扩增出目的条带(图 1)。说明这 2 种方法检测灵敏度相当;但是 RPA 检测方法较普通 PCR 反应时间短,且只需单一温度即可完成,在保证检测质量的前提下,RPA 检测方法具备更好的实用性。

3 讨论

MCMV 是很多国家玉米生产上的重要病毒病害的病原,近年来频繁的贸易往来和人员交流加剧了 MCMV 在世界各地的快速蔓延(Isabirye & Rwo-

mushana, 2016),在我国云南省也有发现(Xie et al., 2011)。本研究建立的 MCMV RPA 快速检测方法,引物具有良好的特异性,操作简便,反应在恒温仪器如水浴锅或电浴锅中就可完成核酸的快速扩增。与传统的 PCR 技术相比,二者灵敏度相当,RPA 反应时间更短;与其它核酸恒温扩增方法相比较(Chen et al., 2017),RPA 技术反应过程中不需要模板链的热变性,反应只需一对引物,更简便有效。RPA 检测方法具有操作简便、实用、特异性强、灵敏度高等优点,更适合 MCMV 在口岸和田间的快速检测。



M: DL2000; 1: 10^0 ; 2: 10^{-1} ; 3: 10^{-2} ; 4: 10^{-3} ; 5: 10^{-4} ; 6: 10^{-5} .

图 1 MCMV RPA 检测方法的灵敏度检测结果

Fig. 1 The sensitivity of MCMV RPA test

参考文献 (References)

- CHEN L, JIAO ZY, LIU DM, LIU XL, XIA ZH, DENG CL, ZHOU T, FAN ZF. 2017. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal Amplification for the detection of maize chlorotic mottle virus in maize. *Journal of Virological Methods*, 240: 49–53
- DU YN, ZHAO X, FAN XR, ZHANG Q, ZHAO K, XU Y. 2018. Advances and applications of recombinase polymerase amplification. *Acta Agriculturae Shanghai*, 34(6): 117–122 (in Chinese) [杜亚楠, 赵笑, 范小瑞, 张琪, 赵凯, 许燕. 2018. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展及其应用. *上海农业学报*, 34(6): 117–122]
- GONG HY, ZHANG YJ, ZHANG ZY, CHEN HJ, GAO BD, ZHU SF. 2010. Detection and identification of maize chlorotic mottle virus from imported maize seeds. *Acta Phytopathologica Sinica*, 40(4): 426–429 (in Chinese) [龚海燕, 张永江, 张治宇, 陈洪俊, 高必达, 朱水芳. 2010. 进境玉米种子携带玉米褪绿斑驳病毒的检测与鉴定. *植物病理学报*, 40(4): 426–429]
- HILKER FM, ALLEN LJS, BOKIL VA, BRIGGS CJ, FENG ZL, GARRET KA, GROSS LJ, HAMELIN FM, JEGER MJ, MANORE CA, et al. 2017. Modeling virus coinfection to inform management of maize lethal necrosis in Kenya. *Phytopathology*, 107(10): 1095–1108
- ISABIRYE BE, RWOMUSHANA I. 2016. Current and future potential distribution of maize chlorotic mottle virus and risk of maize lethal necrosis disease in Africa. *Journal of Crop Protection*, 5(2): 215–228
- XIE L, ZHANG JZ, WANG Q, MENG CM, HONG J, ZHOU XP. 2011. Characterization of maize chlorotic mottle virus associated with maize lethal necrosis disease in China. *Journal of Phytopathology*, 159(3): 191–193

(责任编辑:王璇)