

花生矮化病毒和番茄环斑病毒的双重DPO-RT-PCR检测

Duplex DPO-RT-PCR detection of peanut stunt virus and tomato ringspot virus

袁俊杰¹ 袁淑珍² 卢乃会¹ 马新华¹ 杨卓瑜¹ 龙阳^{1*}

(1. 湛江海关, 广东 湛江 524000; 2. 二连浩特海关, 内蒙古 二连浩特 011100)

Yuan Junjie¹ Yuan Shuzhen² Lu Naihui¹ Ma Xinhua¹ Yang Zhuoyu¹ Long Yang^{1*}

(1. Zhanjiang Customs, Zhanjiang 524000, Guangdong Province, China; 2. Erlianhaote Customs, Erlianhaote 011100, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

花生矮化病毒(peanut stunt virus, PSV)和番茄环斑病毒(tomato ringspot virus, ToRSV)是我国进境植物检疫性有害生物,存在通过染病大豆传入我国的风险。双启动寡核苷酸引物(dual-priming oligonucleotide, DPO)是一种新型PCR引物,具有特异性高、引物自身及引物间难形成二级结构和对退火温度不敏感等优点(Chun et al., 2007),在多重PCR中引入DPO引物可以有效降低多重PCR体系构建难度,提高多重PCR的特异性,该技术已广泛应用于如大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*、黑白轮枝菌 *Verticillium albo-atrum*、番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)等植物病原的鉴定(刘忠梅等, 2017; 乾义柯等, 2017)。本研究拟建立PSV和ToRSV的双重DPO-RT-PCR体系,以期用于口岸一线对这2种病毒的快速筛查,提高口岸疫情截获率。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:PSV、ToRSV、南芥菜花叶病毒(*Arabis mosaic virus*, ArMV)、南方菜豆花叶病毒(*southern bean mosaic virus*, SBMV)、菜豆荚斑驳病毒(*bean pod mottle virus*, BPMV)、烟草环斑病毒(*tobacco ring spot virus*, TRSV)、玉米褪绿斑驳病毒(*maize chlorotic mottle virus*, MCMV)、小麦线条花叶病毒(*wheat streak mosaic virus*, WSMV)、玉米矮花叶病毒(*maize dwarf mosaic virus*, MDMV)及大豆花叶病毒(*soybean mosaic virus*, SMV)阳性样本均购自美国 Agdia 公司;阴性大豆样本由湛江海关技术中心植检实验室提供。由湛江口岸进口大豆样本中挑选皱缩、带病斑的大豆种子,经粉碎均匀后作为实际样品供试,共取10份,每份0.1 g。

试剂及仪器:植物总RNA提取试剂盒、FastK-

ing一步法RT-PCR试剂盒、Marker II DNA Marker, 天根生化科技(北京)有限公司;其余试剂均为国产分析纯。Veriti PCR仪、Nanodrop 2000核酸蛋白分析仪,美国Thermo公司;Wide Mini-sub+ Basic Power电泳仪、Geldoc XR+凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

引物设计:根据PSV(MF170160.1)和ToRSV(KM083895.1)保守序列分别设计DPO-PCR引物PSV-DPOF(5'-ACCTTTTGGGTTCAATTCHIIIGGTCAATTT-3')/PSV-DPOR(5'-ATGGACAACCCGTT-CACCAGIIIIACTGTTTAG-3')和ToRSV-DPOF(5'-TGTAATGTAGTGGTATGTTAAGIIIIACTAACTTA-3')/ToRSV-DPOR(5'-CCTGCGAAAACAACGTCCTIIIIITAGTTAAGAT-3'),序列中的I为次黄嘌呤,预期扩增目的片段分别为918 bp和278 bp,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

双重DPO-RT-PCR体系的建立及特异性评价:按照植物总RNA提取试剂盒说明书提取所有供试材料的总RNA,分别用核酸蛋白分析仪标定浓度为20 ng/μL,于超低温冰箱保存备用。50 μL反应体系:2×FastKing One Step RT-PCR MasterMix溶液25 μL、25×RT-PCR Enzyme Mix 2 μL、10 μmol/L上下游引物各1.25 μL、RNA模板各2 μL, RNase-Free ddH₂O补足至50 μL。反应条件:42℃逆转录30 min;95℃预变性3 min;94℃变性30 s,60℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃再延伸5 min。PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统中成像分析。以PSV、ToRSV、ArMV、SBMV、BPMV、TRSV、MCMV、WSMV、MDMV以及SMV阳性样本为模板进行DPO-RT-PCR检测以验证该方法的特异性。

退火温度敏感性评价:将前述反应条件中的退火温度设为45、49、53、57、61、65℃,分别进行DPO-RT-PCR扩增试验以验证该方法对退火温度的敏感性。

适用性评价:将1份PSV及ToRSV阳性样本掺入2g已粉碎的阴性大豆样品中,充分混匀后作为模拟样品,共取10份,每份0.1g。利用建立的DPO-RT-PCR方法对10份模拟样品及10份实际样品进行扩增,总RNA提取方法同上。并与普通RT-PCR检测方法进行比对,其中PSV检测按照GB/T 29582—2013附录D、ToRSV检测按照SN/T 2670—2010附录C进行,以验证该方法在实际检测中的适用性。

2 结果与分析

2.1 双重DPO-RT-PCR检测方法的建立及特异性评价

通过调整优化DPO-RT-PCR反应体系,确定引

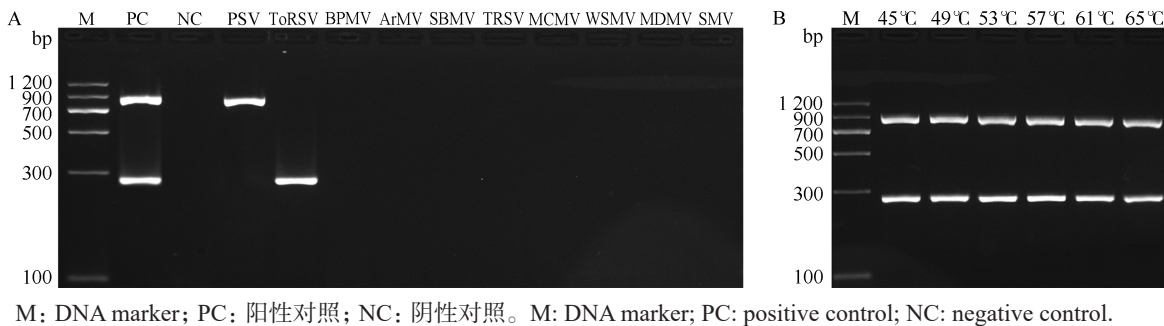
物终浓度为0.2 μmol/L时扩增效果最佳。特异性评价结果显示仅含PSV及ToRSV的样品扩增获得目的条带,其余8个样品及阴性对照无特异性条带(图1-A),表明所建立的双重DPO-RT-PCR检测方法具有良好的特异性。

2.2 双重DPO-RT-PCR检测方法对退火温度的敏感性

退火温度敏感性试验结果显示,在45~65℃退火温度下建立的DPO-RT-PCR检测体系均能扩增到目的条带,且扩增结果无明显差异(图1-B),表明该体系对退火温度不敏感。

2.3 双重DPO-RT-PCR检测方法的适用性评价

利用双重DPO-RT-PCR对10份模拟样品及10份实际样品进行检测,检测结果与常规RT-PCR法一致,表明该体系具有良好的适用性。



M: DNA marker; PC: 阳性对照; NC: 阴性对照。M: DNA marker; PC: positive control; NC: negative control.

图1 双重DPO-RT-PCR特异性评价(A)和退火温度敏感性试验结果(B)

Fig. 1 Evaluation of the specificity (A) and sensitivity to annealing temperature (B) of the duplex DPO-RT-PCR

3 讨论

反应条件优化是制约多重PCR反应体系构建的关键因素,DPO引物间以及引物本身较少形成二级结构,特异性好且对退火温度不敏感,使得DPO引物设计更简便,极大地降低了多重PCR体系构建难度(刘梅等,2009)。但病毒来源多样,变异速度快,而DPO引物相对普通PCR引物更长,一般可达24~37个碱基,因此在引物设计过程中应尽量多收集目标基因,选择高度保守序列,以确保所设计引物兼具种间特异性与种内通用性。植物病毒潜在危害大,隐蔽性强,相对于昆虫、杂草等疫情,需要增加检测频率来提高准确率。传统的双抗体夹心酶联免疫吸附测定(double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA)法和RT-PCR检测方法通量低,较难直接应用于病毒的大规模筛查检测。本研究建立的PSV和ToRSV双重DPO-RT-PCR检测方法特异性强,适用范围广,可用于这2种病毒的快速筛检,以期植物病毒的高通量检测提供新思路。

参考文献 (References)

- Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, Kim JK. 2007. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of *CYP2C19* gene. *Nucleic Acids Research*, 35(6): e40
- Liu M, Huang X, Ma ZH, Chen HJ, Li MF. 2009. Multiplex RT-PCR for detection of potato viruses with a dual priming oligonucleotide (DPO) system. *Acta Phytopathologica Sinica*, 39(4): 431-434 (in Chinese) [刘梅, 黄新, 马占鸿, 陈洪俊, 李明福. 2009. 应用DPO引物检测马铃薯病毒的多重RT-PCR技术研究. *植物病理学报*, 39(4): 431-434]
- Liu ZM, Luo J, Pan ZL, Liu HY, Li DD, Han ZK, Wei DX, Ma W. 2017. Development of DPO-PCR detection method for tomato spotted wilt virus. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 46(11): 93-97 (in Chinese) [刘忠梅, 罗佳, 潘仲乐, 刘洪义, 李丹丹, 韩政坤, 魏冬旭, 马微. 2017. 应用DPO技术检测番茄斑萎病毒方法的建立. *河南农业科学*, 46(11): 93-97]
- Qian YK, Zhang N, Wei S, Lu P, Yi JP. 2017. Multiplex DPO-PCR detection of *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum* from sunflower *Verticillium* wilt. *Journal of Plant Protection*, 44(1): 115-120 (in Chinese) [乾义柯, 张娜, 魏霜, 陆平, 易建平. 2017. 向日葵黄萎病原菌轮枝菌的多重DPO-PCR检测方法. *植物保护学报*, 44(1): 115-120]

(责任编辑:李美娟)