

建立基于 TaqMan 探针的李坏死环斑病毒 实时荧光 RT-PCR 检测方法

朱建裕^{1*} 黄秋霞¹ 高必达² 朱水芳³

(1. 中南大学 资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

(2. 湖南农业大学 生物安全学院 湖南 长沙 410128)

(3. 中国检验检疫科学研究院动植检所 北京 100029)

摘要: 李坏死环斑病毒(*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV)是世界部分范围内分布的有害生物,亦是我国重点关注的检疫对象。根据 PNRSV 各株系衣壳蛋白基因的保守序列,设计特异性引物和 TaqMan 荧光探针,进行了探针、引物和 Mg^{2+} 浓度等反应体系和条件的优化实验,确定最佳的引物浓度为 400 nmol/L、探针浓度为 333 nmol/L、 Mg^{2+} 离子浓度为 5 mmol/L 和 dNTPs 浓度为 0.43 mmol/L 时,其灵敏度达 23 个拷贝数。利用建立的实时荧光 RT-PCR 检测方法对 PNRSV 樱桃分离物进行了成功检测。这个方法具有灵敏、准确、简便、快速的特点,适合于李坏死环斑病毒的检测和鉴定。

关键词: 李坏死环斑病毒, 分子检测, 实时荧光 RT-PCR

Development of real-time fluorescent RT-PCR assays for the detection of prunus necrotic ringspot virus with a TaqMan probe

ZHU Jian-Yu^{1*} HUANG Qiu-Xia¹ GAO Bi-Da² ZHU Shui-Fang³

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

(2. College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

(3. Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China)

Abstract: *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) is considered a quarantine pathogen of fruit trees disease in some parts of the world, and also a plant quarantine virus issued by Chinese government. A pair of primer and a TaqMan probe based on the conserved nucleotide sequence of coat protein gene of different PNRSV strains were designed and synthesized. Then through optimizing the concentration of primers, probe, Mg^{2+} and dNTPs, a real-time fluorescent RT-PCR was developed for detection of

PNRSV in fruit trees. when optimal concentrations of primers, probe, Mg^{2+} and dNTPs was 400 nmol/L, 333 nmol/L, 5 mmol/L and 0.43 mmol/L, the assay for specific detection was highly sensitive, which could detect the template concentration as low as 23 copies, and could detect PNRSV in leaves tissues of cherry trees successfully. This reliable, sensitive, quick and easy-handling method is suitable for detection and identification of *Prunus necrotic ringspot virus*.

Keywords: *Prunus necrotic ringspot virus*, Molecular detection, Real-time fluorescent RT-PCR

李坏死环斑病毒(*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV)属雀麦花叶病毒科等轴不稳环斑病毒属的正单链 RNA 病毒, 寄主范围广, 可侵染许多种重要的果树、蔬菜、花卉作物, 引起严重病害甚至死亡, 造成巨大的经济损失, 种子、花粉、嫁接、根系接触等多种传染方式使该病在世界范围内迅速传播和蔓延^[1-2]。目前, 该病害的发生已遍及欧洲、亚洲、非洲、南美和北美洲及大洋洲的 40 多个国家和地区, 但该病害在中国仅个别地区有发生的报道, 是中国对外检疫二类危险性生物。

由于该病毒引起的症状类型多多样, 以及其在植株体内常常分布不均匀、含量低、且浓度随着生长季节的变化而发生改变, 常常给病毒的发现和检测带来很大难度^[3-4], 因此建立一种高效、快速、精确、灵敏的检测方法十分必要, 同时加强对果树、蔬菜、花卉作物等种苗质量的监督检测, 特别是对检疫部门的进出口检验也非常重要。为解决对该病毒检测鉴定带来的困难问题, 近年来开展了诸多 PNRSV 的检测技术研究, 如 RT-PCR、巢式 RT-PCR、免疫捕获反转录 PCR 等检测技术方法^[5-9]。尽管上述方法有一定的有效性, 但仍然需要较长的时间, 且最终结果需进一步分子杂交或克隆测序鉴定, 难以满足口岸检疫快速放行的需要。实时荧光 PCR 技术已广泛应用于植物病原微生物的检测与鉴定^[10-13], 本研究建立的基于 TaqMan 探针的实时荧光 RT-PCR 检测技术可对该病毒快速检测提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PNRSV 标准毒株外壳蛋白基因阳性克隆质粒由 Dr. R. Hammond 惠赠, 由朱建裕等亚克隆于

pMD18-PNRSV 上; 西安出入境检疫局的 PNRSV 樱桃分离物、北京机场出入境检疫局的樱桃样品、健康樱桃、健康黄瓜由中国检验检疫科学研究院动植物检所 -70°C 保存或温室种植。

1.2 植物总 RNA 的提取

取保存的各种待测样品各 0.5 g 的叶片, 用 TRIzol 试剂盒分别提取植物样品总 RNA, 然后溶于适量的 DEPC 处理的水中, 用分光光度计测得浓度和纯度, 于 -70°C 保存备用。

1.3 TaqMan 引物探针的设计与合成

根据 NCBI 的 GenBank 核酸序列数据库中 PNRSV 基因组 RNA3 衣壳蛋白基因序列比对后的保守区, 用引物和探针设计软件 Primer5.0, 除引物和探针通用的设计原则外, 确定引物 T_m 值在 58°C – 60°C 之间, 探针 T_m 值在 68°C – 70°C 之间。上游引物(PR-F)为 5'-GGTCCCCTCAGGGCTC AAC-3'; 下游引物(PR-R)为 5'-CGAAAAGTGTGCG AAATCTAAATC-3'; 探针(PR-P) 5'-CCTCCACCAT CCCAATCCAACCATT-3', 其 5'端以 FAM 作荧光标记, 3'端以 TAMRA 作标记。设计好的引物和探针返回 GenBank BLAST 数据库进行特异性分析, 由商业性公司合成。

1.4 实时荧光 PCR 检测

本研究使用的荧光 PCR 仪为 ABI PRISM7700 扩增仪。使用 PCR Core reagent Kit (PE 公司提供), 总体积采用 25 μL 反应体系, 包括 2.5 μL 10 \times 反应缓冲液, 0.2 μL Gold TaqDNA 聚合酶(5 U/ μL), 1 μL 模板 DNA, 上下游引物、探针、镁离子和 dNTPs 浓度通过体系参数优化确定, 最终体积用 DDW 水补足至 25 μL 。反应程序为: 95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环。在延伸阶段使用实时数据采集模式, Sequence Detection 1.71 软件分析实验结果, 输出报告染料信号值(ΔR_n)对循环数(Cycle)图。

1.4.1 反应体系参数优化: 对实时荧光 PCR 反应体系进行探针、引物、镁离子和 dNTPs 浓度的优化, 探针浓度从 133 nmol/L 至 533 nmol/L, 以约 66 nmol/L 递增梯度; 引物浓度从 50 nmol/L 至 1 000 nmol/L, 以 2 的倍数递增梯度; 镁离子浓度从 0 mmol/L 至 10 mmol/L, 以 1.67 mmol/L 递增梯度; dNTPs 从 0.13 mmol/L 至 0.73 mmol/L, 以 0.1 mmol/L 递增梯度; 以 1 μ L pMD18-PNRSV (0.044 9 g/L) 质粒为模板 DNA; 以反应体系达到最小循环阈(C_t 值)和最大 ΔR_n 值来优化反应体系各参数浓度。

1.4.2 实时荧光 PCR 检测的灵敏度: 为了测试该反应体系最低 DNA 浓度检测极限, 以反应体系优化后的参数, 以 pMD18-PNRSV 为模板 DNA, 并从起始浓度 0.044 9 g/L 到 0.044 9 $\times 10^{-8}$ g/L, 按 10 倍连续稀释成 9 个浓度梯度, 取对应的稀释液 1 μ L 为模板进行实时荧光 PCR 检测; 同时用设计的引物对每个 DNA 稀释液取 1 μ L 为模板进行常规 PCR 电泳检测。

1.4.3 实时荧光 RT-PCR 检测的应用: 应用该技术进行了对西安出入境检疫局 PNRSV 樱桃分离物、

北京机场出入境检疫局樱桃样品、以及健康樱桃、健康黄瓜等阴性材料的实际检测, 以 pMD18-PNRSV 为阳性对照。所有试验均采用上述最优参数反应体系。利用 Gold Taq DNA 热启动聚合酶, 可使反转录和实时荧光 PCR 合并成一管进行反应^[14], 按如下反应体系加样: 12.8 μ L DDW, 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 1 μ L dNTPs (10.8 mmol/L), 0.5 μ L 上游引物 PR-F (20 μ mol/L), 0.5 μ L 下游引物 PR-R (20 μ mol/L), 1 μ L 探针 Probe PR-P (8.3 μ mol/L), 0.2 μ L Gold Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 0.5 μ L M-MLV (200 U/ μ L), 1 μ L RNA。其热循环反应参数为 48 $^{\circ}$ C 30 min; 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 实时荧光 PCR 检测体系的优化

用反应过程中具有最小循环阈值(C_t)和最大 ΔR_n 值来优化探针、引物、镁离子和 dNTPs 的浓度。研究结果如图 1 所示, 当探针浓度从 133 nmol/L

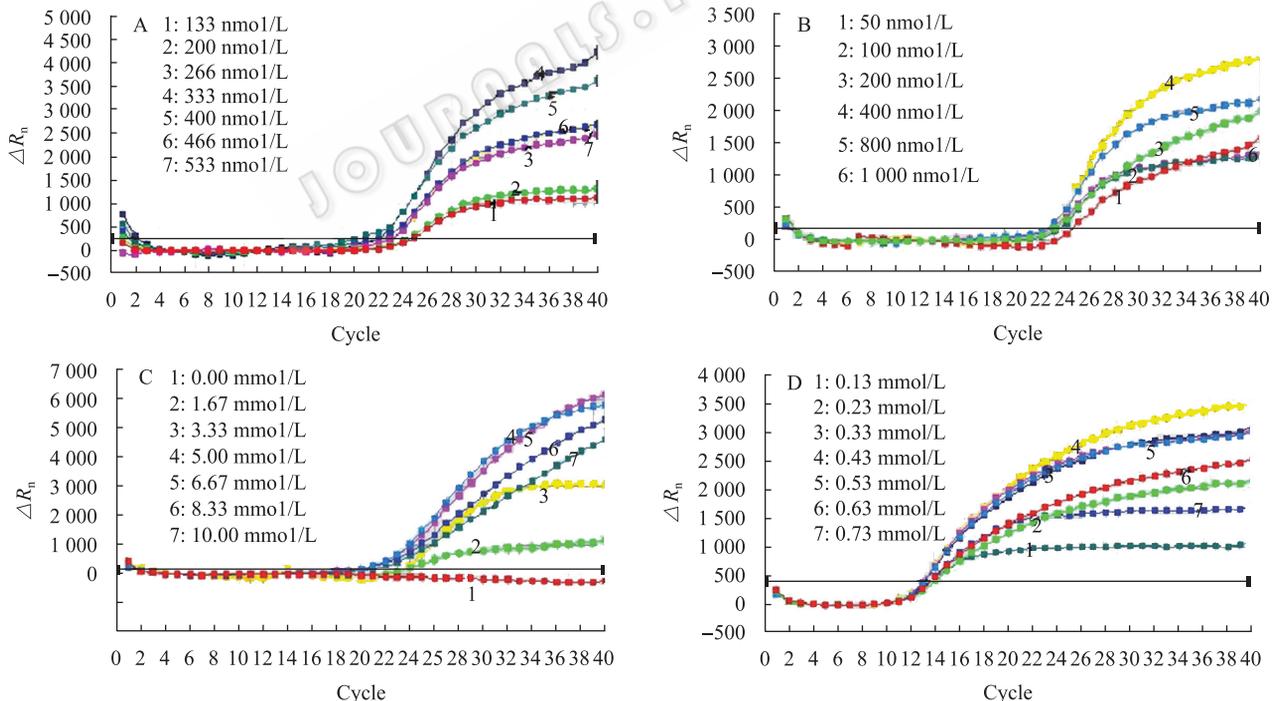


图 1 实时荧光 PCR 体系的优化

Fig. 1 Real-time fluorescence PCR system optimization

注: A: 探针浓度的优化; B: 引物浓度的优化; C: Mg²⁺离子浓度的优化; D: dNTPs 浓度的优化。

Note: A: Optimizing concentration of the probe; B: Optimizing concentration of the primers; C: Optimizing concentration of the Mg²⁺; D: Optimizing concentration of dNTPs.

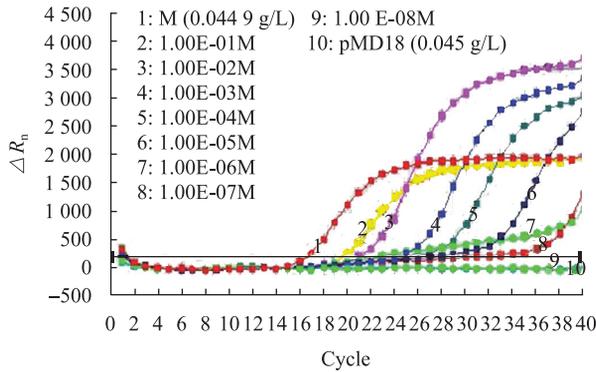


图2 实时荧光 PCR 检测的灵敏度

Fig. 2 Sensibility of real-time fluorescent PCR method

至 533 nmol/L, 以约 66 nmol/L 递增时, 特异性 ΔR_n 扩增报告曲线的最大 ΔR_n 值随探针浓度增加先增大然后减少, 而 C_t 值随探针浓度增加先减少然后增大, 在 333 nmol/L (图 1A 扩增曲线 4) 达到了最小 C_t 值和最大 ΔR_n 值, 因此确定探针优化浓度为 333 nmol/L。根据同样的原理, 确定优化引物浓度为 400 nmol/L (图 1B 扩增曲线 4)、优化 Mg^{2+} 离子浓度为 5 mmol/L (图 1C 扩增曲线 4)、优化 dNTPs 的浓度为 0.43 mmol/L (图 1D 扩增曲线 4)。

2.2 检测体系的灵敏度

图 2 的结果表明, 所建立的实时荧光 PCR 能检测到最低 DNA 极限为 $0.044 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ (扩增曲线 8), 即 4.49 fg 阳性质粒 DNA, 约为 23 个拷贝数; 用设计的同一对引物对每个浓度 DNA 进行常规 PCR, 电泳检测结果如图 3 所示, 结果表明其检测最低 DNA 极限为 $0.044 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ (泳道 7), 可见实时荧光 PCR 检测比 PCR 产物凝胶电泳检测高 10 倍以上。另外, 从图 3 上会看到在主带上面有非特异的条带或看到主带有拖尾现象, 这给我们对 PCR 电泳检测结果的判断带来困难; 实时荧光 PCR 检测正好避免了这个问题, 因为其除了保证引物正确配对外, 其探针也要在正确的配对下才会有荧光信号增加, 这双重保证下使非特异性荧光信号增加发生的概率几乎为零, 所以实时荧光 PCR 检测结果的判断更加准确, 不容易受到干扰。

2.3 实时荧光 RT-PCR 检测的应用

图 4 的结果表明西安出入境检验检疫局的 PNRSV 樱桃分离物、北京机场出入境检验检疫局的樱桃样品和

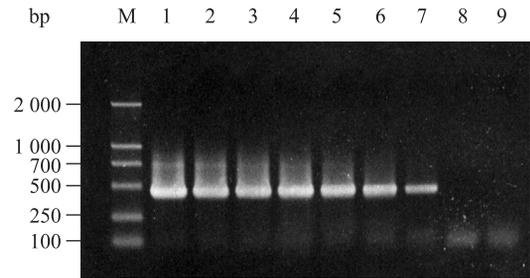


图3 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测的灵敏度

Fig. 3 Sensitivity of agarose gel electrophoretic detected for PCR products

注: M: Marker; 1-9: 9 个连续 10 倍稀释梯度为 $0.044 \times 10^{-8} \text{g/L}$ 。

Note: M: Marker; 1-9: Ten times continuous dilution of DNA from $0.044 \times 10^{-8} \text{g/L}$ to $0.044 \times 10^{-8} \text{g/L}$.

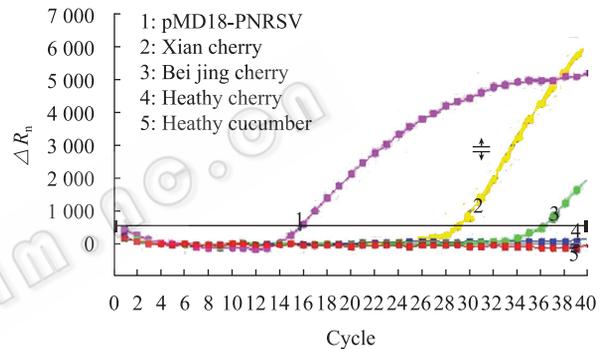


图4 实时荧光 RT-PCR 检测 PNRSV 的扩增曲线

Fig. 4 Amplification plot of real-time fluorescent PCR of detecting PNRSV in leaves tissues

pMD18-PNRSV 都有较明显的特异性 ΔR_n 扩增曲线, 而健康樱桃、健康黄瓜的特异性 ΔR_n 曲线均无扩增, 表明该方法检测到北京机场出入境检验检疫局的樱桃样品有 PNRSV 的存在, 我们将阳性结果进行克隆测序并在 GenBank 中 BLAST 分析, 共得出 92 个 PNRSV 序列, 与同源性最高 PNRSV 仅具 7 个碱基突变, 具有 98% 同源性, 进而证明实验结果的准确性和特异性。

3 结论与讨论

迄今为止, 已经有许多分子技术用于检测和鉴定 PNRSV, 包括 RT-PCR、探针杂交和核酸测序等方法, 这些方法需要有制胶电泳或转膜、克隆等繁琐的过程, 仍然需要较长的时间, 不能称为严格意义的快速检测方法。本研究所建立的实时荧光

RT-PCR 检测方法系统地结合了荧光探针检测系统、反转录和 PCR 扩增系统, 在同一 PCR 试管内完成 RNA 的反转录、PCR 扩增、荧光探针杂交和信号检测, 不需要 PCR 后的电泳、杂交等后续处理, 大大降低了污染的可能性, 提高了检测的特异性, 使得这一技术准确性达到了最严格的法检要求。荧光 PCR 检测比常规的 PCR 电泳凝胶染色检测灵敏度提高一个数量级甚至更高, 本研究的检测灵敏度达到 23 个拷贝数, 为目前报道检测 PNRSV 的最高灵敏度。同时, 荧光 PCR 方法可使检测时间大大缩短, 在 1-2 h 内完成全部检测工作, 一次最多能同时检测 90 多个样品; 而且自动化程度很高, 真正做到快速、准确、灵敏和高通量的标准化检测。

PNRSV 基因组 RNA3 的衣壳蛋白基因已被广泛用于该病毒的检测与多样性研究^[5-8,15-17], 本试验根据 PNRSV 衣壳蛋白区域编码序列设计的 PNRSV 的引物和特异性 TaqMan 荧光探针, 从检测结果上可以看出: 样品阳性对照西安出入境检疫局的 PNRSV 樱桃分离物组织检测呈阳性, 而样品阴性对照健康黄瓜叶组织、樱桃叶组织检测都呈阴性, 送检的北京机场出入境检疫局的樱桃样品呈阳性, 并通过克隆测序佐证呈阳性, 说明所设计的探针具有很好的特异性, 所建立的实时荧光 RT-PCR 检测技术实现了对 PNRSV 的灵敏、准确、简便、快速检测。

参 考 文 献

- [1] Moury B, Cardin L, Onesto JP, et al. Survey of Prunus necrotic ringspot virus in rose and its variability in rose and *Prunus* spp.[J]. *Phytopathology*, 2001, 91(1): 84-91.
- [2] Uyemoto JK, Asai WK, Luhn CF. Ilarviruses: evidence for rapid spread and effects on vegetative growth and fruit yields of peach trees[J]. *Plant Dis*, 1992, 76(1): 71-74.
- [3] Moury B, Cardin L, Onesto JP, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay testing of shoots grown *in vitro* and the use of immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction improve the detection of Prunus necrotic ringspot virus in rose[J]. *Phytopathology*, 2000, 90(5): 522-528.
- [4] Massart S, Brostaux Y, Barbarossa L, et al. Inter-laboratory evaluation of a duplex RT-PCR method using crude extracts for the simultaneous detection of Prune dwarf virus and Prunus necrotic ringspot virus[J]. *Eur J Plant Pathol*, 2008, 122(4): 539-547.
- [5] Spiegel S, Scott SW, Bowman-Vance V, et al. Improved detection of prunus necrotic ringspot virus by the polymerase chain reaction[J]. *Eur J Plant Pathol*, 1996, 102(7): 681-685.
- [6] Rosner A, Malesnin L, Spiegel S. The use of short and long PCR products for improved detection of prunus necrotic ringspot virus in woody plants[J]. *J Virol Methods*, 1997, 67(2): 135-141.
- [7] Kölber M, Németh M, Krizbai L, et al. Detectability of Prunus necrotic ringspot and plum pox viruses by RT-PCR, multiPlex RT-PCR, ELISA and indexing on woody indicators[J]. *Acta Horticulturae*, 1998, 472: 243-248.
- [8] Helguera PR, Taborda R, Docampo DM, et al. Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of Prunus necrotic ringspot virus in the peach[J]. *J Virol Methods*, 2001, 95(1/2): 93-100.
- [9] 李春艳, 丁元明, 何月秋, 等. 侵染昆明玫瑰的李坏死环斑病毒的鉴定及其分子检测[J]. *植物检疫*, 2007, 21(3): 142-145.
- [10] 朱建裕, 廖晓兰, 高必达, 等. 梨火疫细菌实时荧光 PCR 和诱捕 PCR-ELISA 检测方法的建立[J]. *植物检疫*, 2003, 17(1): 7-10.
- [11] 朱建裕, 朱水芳, 廖晓兰, 等. 实时荧光 RT-PCR 一步法检测番茄环斑病毒[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(4): 338-341.
- [12] 苏丹, 任安芝, 高玉葆. 黑麦草内生真菌感染状况的检测及定量分析[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(5): 12-16.
- [13] 李小焦, 王中康, 章桂明, 等. 小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑粉菌检测标准分子构建[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(10): 1541-1547.
- [14] Mumford RA, Walsh K, Barker I, et al. Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay[J]. *Phytopathology*, 2000, 90(5): 448-453.
- [15] Hammond RW, Crosslin JM. Virulence and molecular polymorphism of Prunus necrotic ringspot virus isolates[J]. *J Virol Methods*, 1998, 79(7): 1815-1823.
- [16] Hammond RW, Crosslin JM, Pasini R, et al. Differentiation of closely related but biologically distinct cherry isolates of Prunus necrotic ringspot virus by polymerase chain reaction[J]. *J Virol Methods*, 1999, 80(2): 203-212.
- [17] Oliver JE, Freer J, Andersen RL, et al. Genetic diversity of Prunus necrotic ringspot virus isolates within a cherry orchard in New York[J]. *Plant Dis*, 2009, 93(6): 599-606.