

实时荧光 RT-PCR 技术检测南瓜花叶病毒

Detection of *Squash mosaic virus* by real-time RT-PCR

孙 宁^{1,2} 邓丛良^{2*} 郑雪明³ 陈继峰^{1*}

(1. 郑州大学生物工程系, 郑州 450001; 2. 北京出入境检验检疫局, 北京 101312;
3. 烟台出入境检验检疫局, 烟台 265000)

Sun Ning^{1,2} Deng Congliang^{2*} Zheng Xueming³ Chen Jifeng^{1*}

(1. Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China; 2. Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 101312, China; 3. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 265000, Shandong Province, China)

南瓜花叶病毒 *Squash mosaic virus* (SqMV) 属 ssRNA 的豇豆花叶病毒属 *Comovirus*。病毒颗粒为球形, 主要危害葫芦科植物, 可通过种子、汁液和昆虫介体传播。在黄瓜、甜瓜、西葫芦、哈密瓜等葫芦科植物上能引起较为严重的系统侵染症状, 严重危害葫芦科植物的生长发育。

近年来, 实时荧光 RT-PCR 由于在植物病毒检测中灵敏度较高、速度快而倍受青睐, 目前已对南芥菜花叶病毒^[1]、黄瓜绿斑驳花叶病毒^[2-3] 等多种植物病毒进行了检测。本研究根据南瓜花叶病毒外壳蛋白基因的保守序列设计引物和 *TaqMan* 探针, 建立了 SqMV 实时荧光 RT-PCR 检测体系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

携带南瓜花叶病毒、南芥菜花叶病毒 (ArMV)、黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV)、黄瓜花叶病毒 (CMV)、小西葫芦黄花叶病毒 (ZYMV)、西瓜花叶病毒 (WMV) 的阳性材料和健康材料, 均由北京出入境检验检疫局提供。RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。

1.2 引物和探针设计与合成

根据 NCBI 核酸序列数据库中 SqMV 外壳蛋白基因 (EU421060、NC_003800、DQ868881、AF059533、AF059532、M96148) 的保守序列, 设计检测引物和探针, 由 TaKaRa 公司合成。

普通 RT-PCR 引物: 上游引物 SqMV-cp-Pf; 5'-TT-

GCAAGATAGCAATGAGAGGGCC-3' (151 ~ 174 nt); 下游引物 SqMV-cp-Pr; 5'-GGGCTGTACTTTCTAAGGG-CGTAC-3' (1 172 ~ 1 195 nt)。实时荧光 RT-PCR 引物与探针: 上游引物 SqMV-TF; 5'-CGCACCCATGT-TATAAGAGGC-3' (190 ~ 210 nt); 下游引物 SqMV-TR; 5'-ATAGCCAAAGCACAACCTGTATT-3' (247 ~ 269 nt)。TaqMan 探针 SqMV-P; 5'-FAM-ACGCTGT-GTTGCTTCTATCAATGTTCCA-BHQ1-3' (216 ~ 243 nt)。引物与探针位点参照 GenBank 中 DQ868881 核酸序列。

1.3 植物总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

按照 Invitrogen 公司推荐步骤, 提取阳性材料 (SqMV、ArMV、CGMMV、CMV、ZYMV、WMV) 和健康材料的总 RNA, 溶于 500 μ L 经 DEPC 处理的去离子水。在 0.2 mL 离心管中加入 RNA 2 μ L、10 μ mol/L 引物 SqMV-cp-Pr 1 μ L、水 3 μ L、70 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 立即放于冰上 2 min, 然后依次加入 5 \times M-MLV Reverse Transcription Buffer 2 μ L、10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μ L、200 U/ μ L M-MLV 0.2 μ L、40 U/ μ L RNase 抑制剂 0.2 μ L, 加水至 10 μ L, 42 $^{\circ}$ C 温育 60 min, 70 $^{\circ}$ C 加热 15 min, 在冰上放置 2 min。

1.4 普通 RT-PCR 与实时荧光 RT-PCR 检测

PCR 反应体系 (20 μ L): 10 \times PCR Buffer 2 μ L、10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μ L、10 μ mol/L SqMV-cp-f 和 SqMV-cp-r 各 0.5 μ L、cDNA 2 μ L、5 U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L, 补水至 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C

基金项目: 国家质检总局课题 (2009IK256, 2007IK230)

作者简介: 孙宁, 男, 1984 年生, 硕士研究生, 研究方向为应用微生物学及微生物生物技术, email: steamsn@163.com

* 通讯作者 (Authors for correspondence), email: chenjifeng@zzu.edu.cn, dengcl@bjciq.gov.cn

收稿日期: 2009-12-02

30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, 40 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳后染色观察。

实时荧光 PCR 反应体系 (20 μ L): cDNA 2 μ L、Premix Ex *Taq* (2 \times) 10 μ L、10 μ mol/L SqMV-F 和 SqMV-R 各 0.4 μ L、10 μ mol/L SqMV-P 0.2 μ L, 加水至 20 μ L。扩增程序: 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环。将 cDNA 用经 DEPC 处理的去离子水进行梯度稀释, 稀释梯度为 10^n (n 为 1 ~ 8), 取 2 μ L 不同稀释度的 cDNA 分别进行普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR, 以检测其灵敏度。

2 结果与分析

2.1 普通 RT-PCR 检测 SqMV

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 引物 SqMV-cp-f 和 SqMV-cp-r 可扩增出约 1 000 bp 的条带, 与 SqMV 目的条带 (1 045 bp) 大小一致, 而 ArMV、CGMMV、CMV、WMV、ZYMV 和健康材料均无此条带出现, 说明所使用的阳性材料没有交叉感染。

2.2 实时荧光 RT-PCR 检测 SqMV

结果显示, 只有携带 SqMV 西葫芦叶片的 Δ Rn 随着循环数增加而增大, 出现典型的扩增曲线, Ct 值为 27.96, 而 ArMV、CGMMV、CMV、WMV、ZYMV 和健康西葫芦叶片 Δ Rn 无增长, Ct 值均为 40。表明所用引物和 *TaqMan* 探针对 SqMV 有特异性反应。

2.3 灵敏度比较

当 cDNA 稀释倍数达 10^6 时, 普通 RT-PCR 仍可检测出 SqMV (图 1), 而当 cDNA 稀释倍数达 10^7 时, 实时荧光 RT-PCR 仍可以有效检测 (图 2)。因此, 普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 的稀释限点分别为 10^6 和 10^7 , 实时荧光 RT-PCR 的检测灵敏度比普通 RT-PCR 高 10 倍。

3 讨论

本研究通过对南瓜花叶病毒 (SqMV) 外壳蛋白设计引物与探针, 建立了 SqMV 的实时荧光 RT-PCR 检测技术。结果表明, 实时荧光 RT-PCR 对 SqMV 的检测具有特异性, 其检测灵敏度比普通 RT-PCR 高 10 倍, 并且具有快速、简便的优点, 适合于 SqMV 的检测。

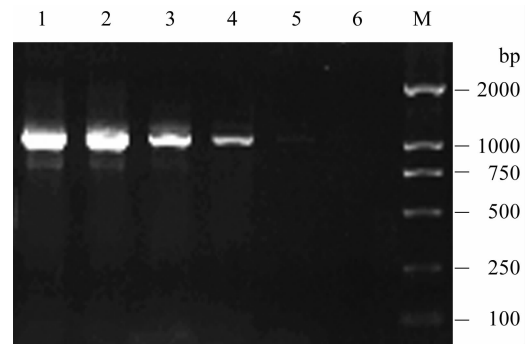


图 1 SqMV 常规 RT-PCR 检测灵敏度

Fig. 1 The sensibility of detecting SqMV by conventional RT-PCR

注: 1 ~ 6: cDNA 稀释倍数依次为 $10^2 \sim 10^7$ 倍; M: DL2000 marker。Note: Lane 1 ~ 6: The dilution times of cDNA from 10^2 to 10^7 , respectively; M: DL2000 marker.

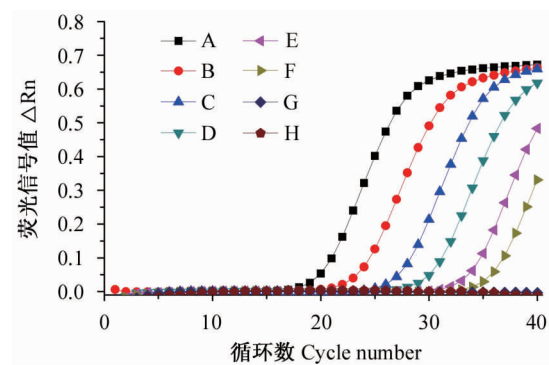


图 2 SqMV 实时荧光 RT-PCR 灵敏度检测

Fig. 2 The sensibility of detecting SqMV by real-time RT-PCR

注: A ~ G: SqMV 的 cDNA 稀释倍数为 $10^2 \sim 10^8$; H: 健康材料。Note: A ~ G: Samples of SqMV cDNA with different dilution times from 10^2 to 10^8 , respectively; H: healthy leaves.

参考文献 (References)

- [1] 邓丛良, 吕玉峰, 梁新苗, 等. 应用 RT-Realtime PCR 检测南芥菜花叶病毒, 植物检疫, 2008, 22(2): 80 - 82
- [2] 邓丛良, 黄峰, 吕玉峰, 等. 实时荧光 RT-PCR 技术检测黄瓜绿斑驳花叶病毒, 植物检疫, 2009, 23(4): 29 - 31
- [3] Chen H Y, Zhao W J, Gu Q S, et al. Real-time *TaqMan* RT-PCR assay for the detection of *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Journal of Virological Methods*, 2008, 149: 326 - 329