

烟草 PVY Real-Time PCR 定量检测体系的建立及应用

刘晓霞^{1,2}, 杨金广¹, 王凤龙^{1*}, 钱玉梅¹, 申莉莉¹, 张 帅^{1,2}, 王长栓³, 黄 瑾³

(1. 国家烟草专卖局烟草病虫害监测与综合治理重点开放实验室, 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3. 广西壮族自治区烟草公司百色市分公司, 广西 百色 533000)

摘 要: 马铃薯 Y 病毒是近年来危害烟草生产的重要病毒之一, 严重影响烟草的产量与品质。本研究利用 DNAMAN 软件对 GenBank 数据库中已登录的马铃薯 Y 病毒 (Potato virus Y, PVY) 全基因组序列进行序列比对, 设计引物, 以烟草肌动蛋白基因为内参, 建立了烟草 PVY 的实时定量检测体系。获得的 real-time PCR 扩增基线平整, 指数扩增明显, 斜率大; 稳定性和重现性好, 变异系数小; 循环阈值与 PCR 起始模板量对数之间存在良好的线性关系。与 DAS-ELISA 相比, 该方法具有高效、灵敏、特异性强等优点, 为从分子生物学水平上检测烟草中 PVY 提供了新的技术手段。

关键词: Real-time PCR; PVY; 检测

中图分类号: S435.72

文章编号: 1007-5119(2010)01-0009-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2010.01.003

Establishment and Application of Real-time PCR for Detection of Potato Virus Y in Tobacco

LIU Xiaoxia^{1,2}, YANG Jinguang¹, WANG Fenglong^{1*}, QIAN Yumei¹, SHEN Lili¹,
ZHANG Shuai^{1,2}, WANG Changshuan³, HUANG Jin³

(1. Key Laboratory of Tobacco Pest Monitoring & Integrated Management, State Tobacco Monopoly Bureau, Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of CAAS, Beijing 100081, China; 3. Baise Branch, Guangxi Tobacco Corporation, Baise, Guangxi 533000, China)

Abstract: Potato virus Y (PVY) is one of the most important viruses with huge damage to tobacco yields and quality in recent years. A quantitative method using real-time PCR technique basing on fluorescence dye SYBR Green was employed to detect PVY in tobacco in this study. PVY genome sequence alignments logged in Genebank were analyzed using DNAMAN software. Primer 5.0 software was used to design specific primers of PVY gene and *actin* gene. Results showed that the amplification curve had flat baseline, distinct exponential area, large and stable slope, and the coefficient of variation was very small. There was a linear relationship between threshold cycle values where samples crossed threshold and the logarithmic values of template concentration. Compared with DAS-ELISA, real-time PCR can be used as a new method to detect PVY in tobacco quantitatively, which is faster, more sensitive and specific.

Keywords: Real-time PCR; PVY; detection

马铃薯 Y 病毒(PVY)是近年严重危害烟草生产的病毒之一, 影响烟叶的产量和品质^[1]。当前, 检测 PVY 的方法主要集中于生物学鉴定、光镜和电镜观察、免疫学方法、RT-PCR 检测技术、核酸杂交检测技术等^[2-3], 应用 Real-time PCR 技术对烟草 PVY 进行定量检测报道较少。笔者应用 SYBR Green Real-time PCR 技术, 以烟草肌动蛋白基因为

内参, 建立了烟草中 PVY 的定量检测方法, 旨在为快速、灵敏、高效检测 PVY 含量提供有力的技术支持, 同时也为烟草中其它病毒检测技术的改进提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PVY 毒源: 纯化的 PVY 用接种缓冲液(0.01

作者简介: 刘晓霞, 女, 在读硕士, 主要从事烟草病毒学研究。E-mail: happygirlnan@sina.com。*通信作者, E-mail: wangfl64@sohu.com

收稿日期: 2009-07-24

mol/L PBS, PH7.0)研磨后, 摩擦接种于枯斑三生烟 (*Nicotiana tabacum* var. samsun NN), 在防虫温室中培养, 每月扩繁 1 次, 以保持病毒侵染活性。

SYBR Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)、RNAiso Plus、Reverse Transcriptase M-ML(RNase H)、Ribonuclease Inhibitor、dNTP Mixture、DL500 DNA Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司 (TaKaRa)。PVY DAS-ELISA 检测试剂盒购自 ADGEN 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计

根据 PVY strain NTN isolate HR1 全基因组序列(FJ204166)和 *actin* 基因(U60495), 按照标准荧光定量 PCR 引物设计原则, 用 Primer 5.0 进行设计, 然后通过 Oligo 6.0 软件对所设计的引物进行评价, 并通过在线 BLSAT 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)进行验证, 以避免引物序列与烟草基因组任何序列同源。引物由宝生物工程(大连)有限公司 (TaKaRa) 合成。PVY 基因的上游引物为 5'-TTCATCTCCATCCATCATAACC-3', 下游引物为 5'-TACAACCTTGCATACGACATAGG-3', 产物长度为 127 bp。Actin 基因上游引物为 5'-AAGGGATGCGAGGATGGA-3', 下游引物为 5'-CAAGGAAATCACCGCTTTGG-3', 产物长度为 105 bp。

1.3 方法

1.3.1 烟草总 RNA 的提取 利用 RNAiso Plus 进行烟草总 RNA 的提取, 详细方法参照试剂盒说明书。

1.3.2 反转录体系及条件 反转录体系和条件参照 Reverse Transcriptase M-ML(RNase H)的说明书, 反应在东胜基因扩增仪上进行。

1.3.3 Real-time PCR 反应体系及条件 参照 SYBR Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)的说明书, 反应体系为 25 μ L: SYBR Premix Ex Taq™ II (2 \times) 12.5 μ L, 上下游引物(10 μ M)各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, ROX Reference Dye II (50 \times) 0.5 μ L, ddH₂O 10 μ L。

反应采用两步法 PCR 反应的标准程序, 并且制作融解曲线。反应程序设置为 3 个阶段。预变性阶段: 95 $^{\circ}$ C 10 s; PCR 反应阶段: 95 $^{\circ}$ C 6 s, 62 $^{\circ}$ C 35 s 重复 35 个循环; 融解阶段: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 62 $^{\circ}$ C 60

s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 62 $^{\circ}$ C 15 s。在 PCR 反应阶段每个循环的延伸结束时收集荧光信号。

1.3.4 Real-time PCR 标准曲线的制定和结果计算 将 PVY 基因和 *actin* 基因的 cDNA, 采用 5 倍稀释法稀释成 6 个梯度, 每个梯度设计 3 个重复, 分别进行 Real-time PCR 反应, 同时设立空白对照。利用 AB7500 Real-Time PCR system 自带的 SDS 软件对数据进行分析, 生成标准曲线。根据标准曲线得到的线性公式, 将样品的 Ct 值代入计算, 经过归一化处理后得到 PVY 基因和 *actin* 基因的起始模板量, 二者比值即为烟草中 PVY 基因的相对含量。

1.3.5 PVY Real-Time PCR 定量检测体系的应用 2008 年和 2009 年采自广西百色呈典型烟草病毒病的样品 30 个, 分别用 PVY DAS-ELISA 检测试剂盒 (按照试剂盒操作说明进行, Thermo Multiskan spectrum 测定)和 Real-time PCR 定量检测体系检测 PVY, 比较二者检测结果。

取 PVY 病样 0.1 g, 液氮研磨后平均分为两份, 用提取缓冲液 (DAS-ELISA 试剂盒中提供)和 RNAiso Plus 以 10 倍稀释法各稀释成 10 个梯度, 分别进行 DAS-ELISA 检测和 Real-time PCR 检测, 比较二者的检测稀释极限。

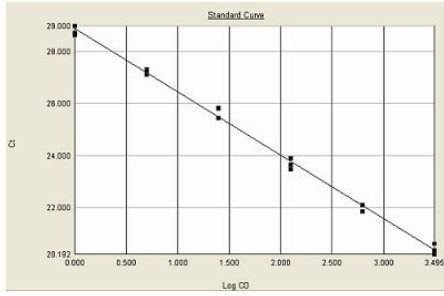
2 结果

2.1 PVY 基因和 *actin* 基因的标准曲线

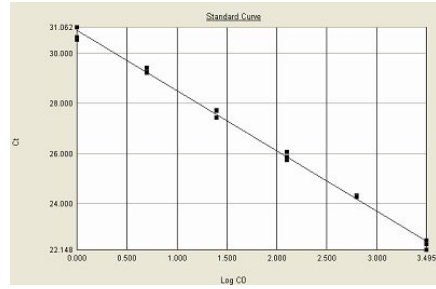
经稀释的系列 cDNA 起始模板量和循环阈值 Ct 的线性关系曲线见图 1。PVY 基因的标准曲线斜率和线性相关系数分别为 -2.4447 和 0.9960, *actin* 基因的标准曲线斜率和线性相关系数分别为 -2.4106 和 0.9961, 两者的线性相关系数均大于 0.99, 说明扩增效率高, 可用于准确定量。

2.2 Real-time PCR 定量检测的准确性分析

PVY 基因和 *actin* 基因在 AB7500 Real-Time PCR system 进行扩增, 分析后得到的扩增曲线和熔解曲线如图 2 和图 3 所示, 两个基因的扩增曲线均呈典型的 S 型, 基线平整, 指数区斜率较大且比较平滑, 空白对照一直保持水平, 扩增曲线比较理想; 熔解曲线只有单一峰, 说明没有引物二聚体和非特异性扩增的产生。

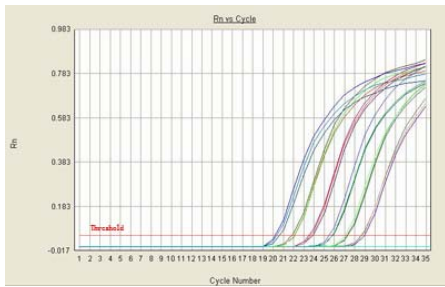


PVY 基因标准曲线方程: $Y=-2.445X+28.901$ $R^2=0.9\ 960$

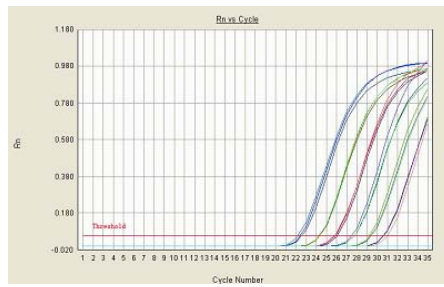


Actin 基因标准曲线方程: $Y=-2.411X+30.922$

图 1 PVY 基因和 actin 基因的标准曲线
Fig 1. Standard curve of PVY and actin gene



基线以上从左到右模板量分别是稀释 5^0 、 5^1 、 5^2 、 5^3 、 5^4 、 5^5 倍的 PVY 基因。



基线以上从左到右模板量分别是稀释 5^0 、 5^1 、 5^2 、 5^3 、 5^4 、 5^5 倍的 actin 基因。

图 2 PVY 基因和 actin 基因标准系列扩增曲线
Fig. 2 Amplification plots of PVY gene and actin gene at different template amounts

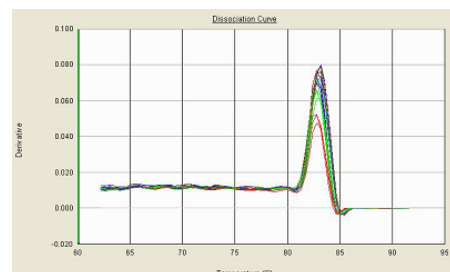
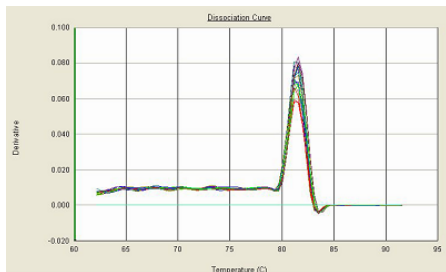
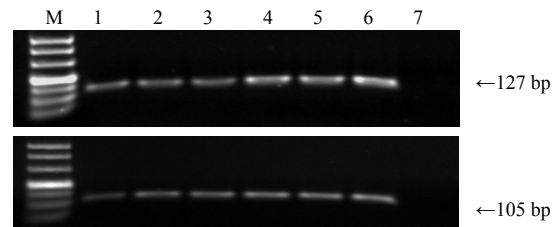


图 3 PVY 基因和 actin 基因熔解曲线
Fig. 3 Melting curve of PVY gene and actin gene

1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PVY 基因和 actin 基因的 Real-time PCR 产物, 溴化乙锭染色后置于紫外凝胶成像系统(Pharmacia Biotech, Imagemaster VDS)采集图像, 结果如图 4 所示。目的条带单一, 条带大小与预期设计相符, 进一步说明无引物二聚体和非特异性扩增的产生。

2.3 Real-time PCR 定量检测的重现性分析

以 6 个稀释的系列 cDNA 为模板进行 Real-time PCR, 3 次重复的 Ct 值误差和变异系数如表 1 所示, 均较小, 说明该体系的重现性好。



注: M. TaKaRa DL500 Marker; 1-6. 分别为最初模板量稀释 5^5 、 5^4 、 5^3 、 5^2 、 5^1 、 5^0 倍的 Real-time PCR 产物; 7 为空白对照

图 4 1.5%琼脂糖电泳检测 PVY 基因和 actin 基因 Real-time PCR 产物
Fig. 4 PVY gene and actin gene Real-time PCR products detected by 1.5% agarose gel

表 1 重现性分析(Ct 值)
Table 1 Repeatability test

稀释系列 cDNA	重复 1	重复 2	重复 3	平均	变异系数/%
PVY5 ⁰	20.60	20.33	20.19	20.37±0.21	1.02
PVY5 ¹	21.85	22.10	22.10	22.02±0.14	0.66
PVY5 ²	23.88	23.48	23.65	23.67±0.20	0.85
PVY5 ³	25.83	25.80	25.45	25.69±0.21	0.82
PVY5 ⁴	27.32	27.28	27.11	27.24±0.11	0.41
PVY5 ⁵	29.66	29.00	28.73	29.13±0.48	1.64
actin5 ⁰	22.53	22.15	22.40	22.36±0.19	0.86
actin5 ¹	24.32	24.27	24.27	24.29±0.03	0.12
actin5 ²	26.06	25.75	25.86	25.89±0.16	0.61
actin5 ³	27.73	27.71	27.44	27.63±0.16	0.59
actin5 ⁴	29.37	29.24	29.44	29.35±0.10	0.35
actin5 ⁵	30.65	30.56	31.06	30.76±0.27	0.87

2.4 Real-time PCR 定量检测体系的应用分析

采自广西百色呈典型烟草病毒病的 30 个样品, 用 ELISA 试剂盒检测出 8 个烟草样品被 PVY 侵染, 用 Real-time PCR 定量检测体系检测出被 PVY 侵染的样品有 12 个。DAS-ELISA 试剂盒的检测稀释极限为 10⁵, 而 Real-time PCR 定量检测体系的检测稀释极限为 10⁹。以上结果说明, PVY Real-time PCR 定量检测体系与 DAS-ELISA 相比, 具有较高的灵敏性。并且, 使用 DAS-ELISA 检测耗时两个工作日, 而利用 Real-time PCR 检测在 1 个工作日内可以得到检测结果, 具有高效性。

3 讨 论

目前, 检测 PVY 的方法主要集中于生物学鉴定、光镜和电镜观察、免疫学方法、RT-PCR 检测技术、核酸杂交检测技术等。对 PVY 的生物学鉴定主要依据寄主植物和传播方式, 耗时长, 受环境影响较大, 检测结果不可靠。光学显微镜观察主要是基于 PVY 在寄主细胞内形成风轮状、柱状、片层状的内涵体^[1]。电镜负染技术鉴定病毒优点是直接、快速, 尤其是免疫吸附电镜, 具有较高的灵敏性和特异性, 但是不适合于样品过多时使用。并且电镜昂贵, 操作电镜需要一定的技术水平, 不能达到普遍应用的效果。RT-PCR 检测技术, 耗时较短, 成本低, 具有较高的灵敏性和特异性, 因此一直受到普遍应用。核酸斑点杂交技术(NASH)检测病毒应用也比较广泛, Singh 等^[4]利用此技术检测了马铃薯休眠块茎中的 PVY 病毒, 发现 NASH 比 ELISA 法

更灵敏, 更可靠, 但是灵敏度和特异性比 RT-PCR 差, 而且在检测大量样品时, 探针分离比较困难^[5]。随着分子生物学的发展, 各种新技术不断推出, 需要建立更为精确的检测 PVY 的技术体系。

本研究通过与 DAS-ELISA 检测技术的比较, 发现 Real-time PCR 定量检测技术具有更高的灵敏性, 且检测耗时短, 效率高; 但是 Real-time PCR 定量检测技术需要较昂贵的仪器设备, 不适合于规模较小的实验室, 这是该技术体系在应用过程中的一个弊端。

孙淑斌等^[6]研究指出, Real-time PCR 可以通过 3 种主要方法, 达到理想的扩增效果: 缩短操作时间, 尽量在冰上操作; 专业设计软件设计适合的实时 PCR 引物; 优化反应条件, 改变退火、延伸温度, 反应物浓度等。本研究设计按照标准荧光定量 PCR 引物设计原则, 用 Primer 5.0 进行设计, 然后通过 Oligo 6.0 软件对所设计的引物进行评价, 并在线 BLSAT 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 进行验证, 设计的引物具有较高的特异性和最小的二级结构。并且通过优化反应条件, 最终确立了 PVY Real-time PCR 定量检测体系, 为快速、灵敏、高效地定量检测马铃薯 Y 病毒提供了有力的技术支持。

参考文献

- [1] 朱贤朝, 王彦亭, 王智发. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 209-216.
- [2] 路平. 马铃薯三种主要病毒的 ELISA 和 RT-PCR 检测技术的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
- [3] 杜志游. 马铃薯病毒和类病毒的分子诊断方法研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [4] Singh M, Singh P R, Moore L. Evaluation of NASH and RT-PCR for the detection of PVY in the Dormant Tubers and its comparison with visual symptoms and ELISA in plants[J]. Amer J of Potato Res, 1998, 76(2): 61-66.
- [5] Rudra P Singh. Development of the molecular methods for potato virus and viroid detection and prevention[J]. Genome, 1999, 42: 592-604.
- [6] 孙淑斌, 李宝珍, 胡江, 等. 水稻低丰度表达基因 OsAMT1;3 荧光定量 PCR 方法的建立及其应用[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(1): 8-12.