

番茄环斑病毒 HC-RT-PCR-ELISA 检测*

赵文军^{1,2} 安德荣² 朱水芳^{1**} 黄文胜¹ 陈红运¹

(¹ 国家质检总局动植物检疫实验所 北京 100029) (² 西北农林科技大学 杨凌 712100)

摘 要 番茄环斑病毒(ToRSV)是我国对外检疫一类有害生物,目前国内尚无存在的报道。PCR 技术是一种快速灵敏的植物病毒检测方法,但核酸内的聚合酶抑制物会导致漏检现象,而只通过凝胶电泳进行结果判定会出现假阳性,这两方面限制了 PCR 技术在对外检疫中的应用。利用共价结合在 PCR 管壁上的引物特异性杂交诱捕核酸粗提液中的靶标核酸,洗掉杂质及抑制物质,在同一管内作 RT-PCR,凝胶电泳检测液相产物的同时对固相产物进行杂交检测,提高了结果的可靠性及灵敏度。利用所建立的 HC-RT-PCR-ELISA 成功地从法国进口葡萄苗中检出 ToRSV。本方法还可用于其他植物病毒及转基因产品的检测。

关键词: 番茄环斑病毒,植物检疫,杂交诱捕 PCR

中图分类号 S432.1 文献标识码:A 文章编号 1001-6209(2003)02-0174-06

番茄环斑病毒(Tomato ringspot virus, ToRSV)广泛分布于欧美及大洋洲,能侵染葡萄、桃、苹果、樱桃、番茄及烟草等 150 多种作物,引起多种病害,严重时导致绝产^[1,2]。ToRSV 为豇豆花叶病毒科线虫传多面体病毒属的成员,主要通过嫁接传播,远距离传播主要靠种子苗木等^[3]。目前国内尚无存在的报道,但它适生于我国大部分地区,自然寄主遍及全国,且许多为重要的经济作物。一旦传入,可导致严重的经济损失,因此 ToRSV 被我国列为一类检疫有害生物,实施严格检疫。

反转录聚合酶链式反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)是一种快速灵敏的核酸检测方法,被广泛应用于植物病毒的检测^[4-6]。但 RT-PCR 有时会出现漏检和假阳性现象,降低了检测的可靠性。国外有报道利用杂交诱捕 PCR(HC-PCR)检测粪便中的病原微生物,取得良好效果^[7]。在建立的杂交诱捕反转录 PCR 酶联免疫法(Hybridization capture RT-PCR-ELISA, HC-RT-PCR-ELISA)中,利用共价结合在 PCR 管壁上的引物进行特异性核酸诱捕,去除了核酸粗提液中的杂质及聚合酶抑制物,避免了 RT-PCR 的漏检问题,凝胶电泳检测液相产物的同时对固相产物进行杂交检测,有效避免了假阳性现象。

1 材料和方法

1.1 实验材料

带毒番杏由动植物检疫实验所提供,带毒苹果、葡萄、李、樱桃、普通烟、桃由法国进口

* 国家转基因植物研究与产业化专项课题(J-00-C-005)

** 通讯作者。E-mail: zhushf@sina.com

作者简介 赵文军(1975-)男,山东人,硕士,主要从事植物病原学研究, E-mail: zhaowenj@sohu.com

收稿日期:2002-07-08,修回日期 2002-12-12

苗木中截获,健康样品采自北京郊区。

1.2 引物及探针的设计

根据 ToRSV RNA1 复制酶基因 4 个株系序列保守区,利用 primer 5.0 设计引物及探针。

TR-F : 5'-gacgaagttatcaatggcagcg-3'

TR-R 5'-tccgtccaatcacgcgaata-3'

探针 : 5'DIG -catgcaagttaatagcctcgtctagcatg-3'

1.3 诱捕用 PCR 管的包被

向杂交诱捕管(由动植物检疫实验所研制)中加入 100 μ L 包被缓冲液(100mmol/L 5'端氨基化 TR-R, 10mmol/L EDC, 100mmol/L 甲基咪唑 pH 7.0), 50 $^{\circ}$ C 密封温育 5h。洗液(100mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)洗管 3 次,然后用无菌水洗 3 次 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 植物材料总 RNA 提取

0.2~0.5g 植物材料加液氮研磨至粉末,按 1g:2mL 的比例悬浮于 RNA 抽提液(1mmol/L EDTA, 1% SDS, 0.2% 巯基乙醇)混匀,2 倍体积的水饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提 3 次,无水乙醇沉淀,室温干燥,溶于 100 μ L 无菌水中, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 总 RNA 的诱捕

取酚/氯仿/异戊醇抽提 1 次后的上清液 50~100 μ L,加入到包被有反向引物的杂交诱捕管中,70 $^{\circ}$ C 5min,45 $^{\circ}$ C 保温 30min,STE(20mmol/L Tris-Cl pH8.0, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA)洗 2 次后直接在该管内作 RT-PCR。

1.6 RT-PCR

每管加入 10 \times buffer 5 μ L(含 25mmol/L Mg²⁺), 10mmol/L dNTP 1 μ L, 20 μ mol/L TR-F 1 μ L, 20 μ mol/L TR-R 1 μ L, RNA 2 μ L, Fast Taq 酶 2U, M-MLV 200U, RNasin 40U, 加水至 50 μ L, 矿物油 2 滴。反转录及扩增条件为:48 $^{\circ}$ C 30min, 94 $^{\circ}$ C 10min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 54 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 8min。

1.7 液相产物的电泳检测及固相产物的杂交检测

取液相产物 8 μ L 于 100V 电压下 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 40min, EB 染色,在紫外观察仪上观察结果。弃液相产物,新配变性液(0.2mol/L NaOH, 0.1% Tween-20)洗管 3 次,然后洗液(同上)洗 3 次,加入 100 μ L 杂交液(50nmol/L Dig-probe, 5 \times SSC, 0.1% Tween-20, 0.5% Blocking Reagent), 50 $^{\circ}$ C 密封温育 20min, 弃杂交液, 0.5 \times SSC, 0.1% Tween-20 洗 3 次,每次浸 3 min, 加入 100 μ L 稀释的 Anti-Dig-AP, 50 $^{\circ}$ C 密封温育 1h, 洗液洗后 100 μ L 显色液(0.1% PNPP, 1 mol/L 二乙醇胺 pH9.8, 1mmol/L MgCl₂), 室温显色 30min, 用酶标仪在 405nm 下测 OD 值。扣除空白本底值,高于 1.0 为阳性,低于 0.2 为阴性。

1.8 测序验证

液相产物回收后克隆到 PMD18-T 载体上,送至上海基康生物技术公司测序,测序结果与 GenBank 中 ToRSV RNA1 复制酶基因序列比较。

2 结果

2.1 RT-PCR

用苯酚法同时提取带毒番杏、樱桃、葡萄、苹果、烟草、桃 6 种材料总 RNA 后进行 RT-PCR,电泳结果显示:在 449bp 左右有特异性扩增带,与预期扩增的 449bp 片段大小吻合。而在阳性苹果材料中却未扩增出预期条带,樱桃扩增条带模糊,结果难以判定(见图 1)。

2.2 RNA 诱捕条件的优化

在 PTC-200 PCR 仪上同时进行不同温度梯度的 RNA 诱捕,STE 洗后进行 RT-PCR,电泳结果显示,在 40°C、45°C、50°C、55°C、60°C 都能得到清晰的电泳条带,肉眼看不出差别(见图 2),本实验中,诱捕探针的 T_m 值为 60°C,即使比 T_m 值低 20°C 时诱捕,亦扩增出清晰的电泳条带,说明在 40°C ~ 60°C 之间的在任何温度,该探针都能得到好的诱捕效果。但诱捕温度与诱捕探针的 T_m 值相关,不同探针的诱捕温度有所差别。在 50°C 温度下作诱捕时间实验,10 ~ 60min 都能得到清晰电泳条带(未附电泳照片)。

2.3 正反向引物浓度比对电泳和杂交信号的影响

诱捕引物作为反向引物参与 PCR 扩增,液相中反向引物浓度低时有利于固相产物的扩增。正反向引物浓度比设为 1:1、4:1、8:1、16:1,正向引物浓度为 0.4 μ mol/L,从电泳图看出:引物浓度比为 1:1、4:1、8:1 时电泳条带均十分清晰,而 16:1 则条带模糊,观察固相产物的杂交信号,8:1 时杂交信号最高,达到 1.98,其余处理的杂交信号强度都低于该值。因此,正反向引物浓度比为 8:1 时既能得到清晰的电泳条带,又能得到最高的固相产物杂交信号(见图 3 及表 1)。

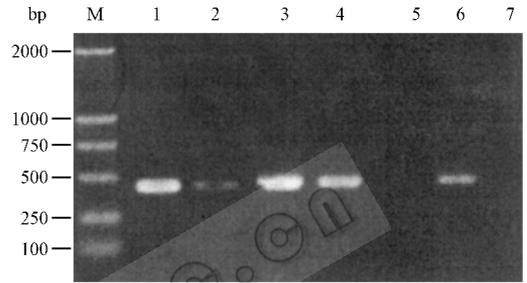


图 1 RT-PCR 检测 ToRSV

Fig.1 ToRSV detection by RT-PCR

- 1. New Zealand spinach; 2. Cherry; 3. Grape; 4. Tobacco; 5. Apple; 6. Peach; 7. Negative.

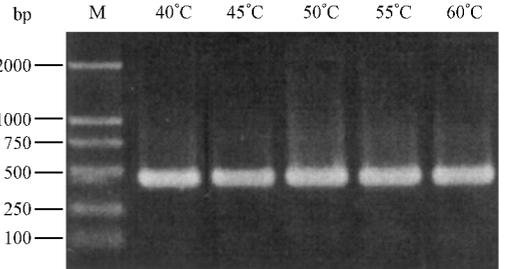


图 2 诱捕温度对诱捕后扩增效果的影响

Fig.2 The effect of hybridization capture temperature to PCR amplification

表 1 不同正反向引物浓度比对杂交信号强度数影响

Table 1 The hybridization signal with different concentration ratio between forward and reverse primer

Concentration ratio	1:1	4:1	8:1	16:1	Control
OD_{405}	1.52	1.72	1.98	1.58	0.16

Note : The average value of three repeats.

2.4 RT-PCR 与 HC-RT-PCR-ELISA 检测的相对灵敏度比较

取 10mg 带有 ToRSV 的番杏叶片的 RNA 抽提上清液,用健康番杏叶片的 RNA 抽提上清液稀释,然后对稀释液进行杂交诱捕 PCR-ELISA 检测,当稀释到 10 000 倍时,相当于 $10\mu\text{g}$ 材料还能得到较强的杂交信号(扣除空白本底值为 1.08),而用同样方法稀释后提取 RNA 进行 RT-PCR 电泳检测,当稀释 1 000 倍时还能看到电泳条带,而稀释 10 000 倍时,即使扩增 40 个循环,也几乎看不到电泳条带,因此,HC-RT-PCR-ELISA 比 RT-PCR 灵敏度大约高一个数量级(见表 2)。

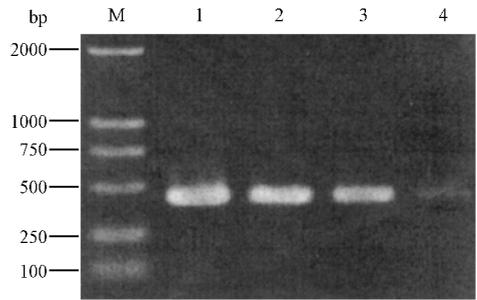


图 3 不同引物浓度比对扩增的影响

Fig.3 The effect of the concentration ratio between forward and reverse primer

The ratio between forward and reverse primer of number 1, 2, 3 and 4 is 1:1, 4:1, 8:1 and 16:1 Respectively; M. DNA marker.

表 2 HC-RT-PCR-ELISA 检测的相对灵敏度

Table 2 The relative sensitivity of HC-RT-PCR-ELISA

Dilution times	1 ×	10 ×	100 ×	1000 ×	10000 ×	Control
OD_{405}	1.98	1.96	1.82	1.59	1.24	0.16
Justification	1.82	1.80	1.66	1.43	1.08	

Note: The average value of three repeats.

2.5 实际检测应用

利用 HC-RT-PCR-ELISA 对保存在温室中的法国进口葡萄苗进行 ToRSV 检测,PCR 液相产物电泳,结果如图 4 2、4 及阴性材料未扩增出任何条带,3、5、6、7 四株扩增出清晰的电泳条带,显示阳性结果。对固相产物在同一管内作杂交检测,杂交结果同电泳结果完全一致,3、5、6、7 四株的杂交信号很高,扣除空白对照值后均高于 1.0,证明 4 株为带 ToRSV 葡萄,而 2、4 及阴性材料只能得到很低的本底信号,均低于 0.2。(见图 4 及表 3)。

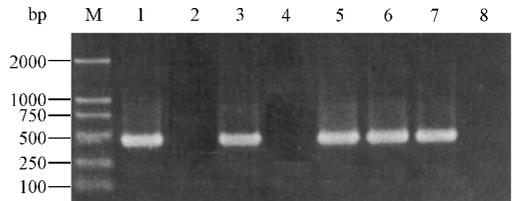


图 4 HC-RT-PCR-ELISA 检测法国进口葡萄苗

Fig.4 ToRSV detection by HC-RT-PCR-ELISA from imported grape

1. Positive; 2, 3, 4, 5, 6, 7. Six imported grapes
8. Negative; M. DNA marker.

表 3 固相产物的杂交检测

Table 3 The result of hybridization detection

No.	1	2	3	4	5	6	7	Negative	Control
OD_{405}	2.04	0.30	1.89	0.23	2.16	1.99	1.92	0.21	0.19
Justification	1.85	0.11	1.70	0.04	1.97	1.80	1.73	0.02	
Conclusion	+	-	+	-	+	+	+	-	

Note: The average value of three repeats.

2.6 测序验证

测序结果同 GenBank 中的 ToRSV RNA1 复制酶基因比较,结果显示,扩增序列同葡萄黄脉株系的同源性最高,达 85%,证明了扩增结果的正确性及 HC-RT-PCR-ELISA 检测结果的可靠性。

3 讨论

本实验设计了 ToRSV 杂交诱捕 RT-PCR-ELISA 的引物探针,并优化了参数,建立了起来一套 ToRSV 快速灵敏可靠的检测体系。本实验室还将该技术应用于其他植物病毒如 TMV、CMV SqMV 及转基因产品(GMOs)的检测,并取得了良好的效果。

PCR 扩增技术是植物病毒检测中最有效和最灵敏的方法,并得到了广泛应用,常规 PCR 技术在诊断中的主要限制因素是需要高质量的核酸,大多数核酸提取方法都不能完全去除来自植物组织尤其是木本植物的多糖及酚类化合物,而这些物质对随后的 PCR 或 RT-PCR 有抑制作用,易造成漏检现象。本方法利用诱捕引物特异性诱捕核酸粗提液中的靶标片段,很好的解决了核酸纯化难的问题。诱捕引物是共价交链在管壁上的,所以可以经受住 PCR 30~40 个热循环而不脱落,这是优于链亲和素非特异性捕诱之处。

PCR 技术检测病毒的另一个问题是结果判定的假阳性现象,本方法利用固相产物的杂交检测有效避免了这一现象,并提高了检测灵敏度。实时荧光 PCR 在植物病原菌检测中有其独特优势,荧光探针直接在 PCR 反应中杂交,快速、灵敏、结果可靠且无遗留污染,国外已有很多报道^[8]。但仪器昂贵,目前国内还难以普及,将核酸诱捕与实时荧光 PCR 结合是一种很有应用前景的病毒检测方法。

参 考 文 献

- [1] 姚文国. 中国出入境植物检疫手册. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [2] Tuttle M, Golebe R. Graft union history and distribution of tomato ringspot virus in infected McIntosh malling merton 106 apple trees. *Phytopathology*, 1975, **3**: 347~351.
- [3] 安德荣, 吴际云, 郑文华. 植物病毒分类和鉴定的原理与方法. 西安: 陕西科学技术出版社, 1995.
- [4] Stace-Smith R. Tomato ringspot virus. *CMI/AAB descriptions of plant virus*. 1984, **12**: 290.
- [5] Gonzague M, Plin C, Bakkali-Kassimi L, et al. Development of an internal control for the detection of the African swine fever virus by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, **3**: 237~242.
- [6] 朱水芳. PCR 和 Dig-cRNA 探针检测番茄环斑病毒. 中国进出境动植物检疫, 1995, **4**: 29~31.
- [7] Marsh I, Whittington R, Millar D. Quality control and optimized procedure of hybridization capture-PCR for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces. *Molecular and Cellular Probes*, 2000, **3**: 219~232.
- [8] Lydia L, Dworkin M D, Gibler B S. Therese real-time quantitative polymerase chain reaction diagnosis of infectious posterior uveitis. *laboratory sciences*, 2002, **6**: 1534~1539.

Development of a Hybridization Capture HC-RT-PCR-ELISA Method for Reliable and Sensitive Detection of Tomato Ringspot Virus*

Zhao Wenjun^{1,2} An Derong² Zhu Shuifang^{1**} Huang Wensheng¹ Chen Hongyun¹

(¹ Animal and Plant Quarantine Institute, State Administration of Entry-Exit Inspection and Quarantine of China, Beijing 100029, China)

(² Northwest Sci-Tech University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: Tomato ringspot virus is a very important quarantine virus (on the A1 list of China), which has not been reported from China yet. RT-PCR is a fast and sensitive method for ToRSV detection, but non-detectable and false positive result is often occurred. A novel hybridization capture RT-PCR-ELISA was developed based on the above mentioned RT-PCR. The main contributions to the development of the method are that a solid primer is successfully bound to PCR tube wall specially for aimed RNA capture in order to raise RNA purification and reduce time consumption. DIG labeled probe hybridization with solid PCR product was performed as well as electrophoresis of liquid product to reduce false positive result. The method was successfully used to detect the virus from the imported grape.

Key words: Tomato ringspot virus, Plant quarantine, Hybridization capture RT-PCR-ELISA

* Supported by the state special funds for transgene and industrialization foundation (J-00-C-005)

** Corresponding author. E-mail: zhaowenjun@sohu.com

欢迎订阅《微生物学报》

《微生物学报》(双月刊)创刊于1953年,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学核心期刊。主要报道我国普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、病毒学、免疫学以及生物工程等方面的研究成果和科研进展。

2003年本刊全新改版,更换了彩色封面,由原来的128页扩增到144页,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局或直接与本刊编辑部联系购买,每册定价28元,全年168元,我们将按期免费邮寄。

另,本刊编辑部现存有少量过期刊,如有需要者可直接与编辑部联系,每册定价20元,款到即免费寄上。(请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址:100080 北京海淀中关村 中国科学院微生物研究所内

《微生物学报》编辑部

Tel (010) 62630422; E-mail: actamicro@sun.im.ac.cn