

苹果茎沟病毒实时荧光 RT-PCR 反应体系的优化

郭立新^{1,2}, 向本春³, 朱水芳⁴

(1. 福建出入境检验检疫局, 福建 福州 350001; 2. 北仑出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315800; 3. 石河子大学 农学院

新疆 石河子 832003; 4. 中国检验检疫科学研究院 动植物检疫研究所, 北京 100029)

摘要:以健康昆诺阿藜叶片和受 ASGV 侵染的昆诺阿藜叶片为试材, 利用 Trizol 试剂提取植物总 RNA, 将实时荧光 RT-PCR 体系的主要成分设定梯度, 根据每个成分的变化引起的(Rn 值和 Ct 值的差异, 探讨苹果茎沟病毒实时荧光 RT-PCR 技术中反应体系的主要成分对扩增结果的影响。最终确定了 RT-PCR 反应体系的最佳条件为: 25 μ L 体系中, Mg^{2+} 浓度为 3.5 mM, 引物浓度为 0.6 μ M, 探针浓度为 0.6 μ M, 总 RNA 含量为 20 ng。利用此反应体系进行扩增 ΔRn 值比未优化时高出一个数量级, 表明该体系适合 ASGV 实时荧光 RT-PCR 检测分析。

关键词:苹果茎沟病毒(ASGV); 实时荧光 RT-PCR; 优化

中图分类号:S 436.611.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)03-0008-04

苹果茎沟病毒为发形病毒属(*Capillivirus*)的代表种, 分布于所有苹果种植地区^[1], 在世界各地普遍流行, 是果树上的一种重要潜隐病毒^[2]。该病毒除危害苹果、梨外, 还可危害百合、柑桔等^[1,3]。

目前检测该病毒的方法有生物学鉴定、血清学检测和逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术、免疫捕捉 RT-PCR(IC RT-PCR)技术等。生物学鉴定方法耗工费时。血清学方法虽然简单易行, 但由于该病毒颗粒富于柔性, 颗粒之间相互盘绕, 很难制备出高质量的血清, 且该病毒在果树体内含量较低, 易出现漏检现象^[2,4]。RT-PCR 技术和 IC RT-PCR 技术需进行 PCR 后处理, 易发生交叉污染, 造成假阳性现象^[5-11]。

近年来开发的 TaqMan 探针实时荧光 RT-PCR 技术为果树病毒的检测提供了新方法。该技术是在常规 RT-PCR 反应体系中添加了一条 TaqMan 探针。探针的 5' 端含有报告荧光基团, 3' 端含有荧光的猝灭基团。探针完整时, 报告基团发射的荧光信号被猝灭基团吸收, 进行 PCR 扩增时, TaqDNA 聚合酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解, 使报告荧光基团和猝灭荧光基团分离, 发出荧光信号, 从而使荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步^[12]。目前国外已成功应用了该技术检测了苹果茎痘病毒(ASPV)、苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)^[13,14]。该研究通过多次试验优化了 ASGV 的实时荧光 RT-PCR 反应体系, 以期为该病毒的检测提供

技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒源 感染 ASGV 库尔勒香梨分离物(KRL-1)的昆诺阿藜叶片, 保存于 -80℃ 冰箱中。

1.1.2 主要试剂和仪器 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司, $MgCl_2$ 等购自上海 Promega 公司, Ready-to-Go RT-PCR Beads 购自 Amersham Biosciences 公司; ABI-PRISM 7700 扩增仪购自 ABI 公司, DU 640 核酸蛋白分析仪购自 BECKMAN 公司, 台式冷冻离心机购自 BECKMAN 公司。

1.1.3 引物和探针 表 1 为引物和探针序列^[15], 由上海基康公司合成。

表 1 实时荧光 RT-PCR 的引物和探针

Table 1 Primers and probe used for real time fluorescent RT-PCR

名称	序列	添加号	产物大小
Name	Sequence(5'-3')	Accession No.	Product size/bp
ASG-Pr(forward)	GAGTTTGGGAAGAGCTGCTCA	D14995	165
ASG-Pr(reverse)	TTGCAGAGAAG AAGTAAAGCTC		
MGB-ASG (forward)	CCACCGG TAGGAGT		

注: 探针 MGB-ASG 5' 端含有 FAM 报告荧光染料, 3' 端含有不发荧光的猝灭基团并具有 MGB 分子。Probe with 6-carboxyfluorescein (FAM) as the reporter dye covalently attached at the 5' end, a non-fluorescent quencher and the MGB moiety at the 3' end.

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 分别对健康昆诺阿藜叶片和受 ASGV 侵染的昆诺阿藜叶片, 使用 Trizol Reagent 进行植物总 RNA 的提取, 具体操作如下: 取叶片加液氮研磨成粉末并迅速移入 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL Trizol Reagent, 颠倒混匀, 2~8℃ 12 000 g 离心 10 min; 取上清, 15~30℃ 放置 5 min; 加入 0.2 mL 氯仿, 用手剧

第一作者简介: 郭立新(1976-), 女, 工程师, 现从事进出口商品检验检疫工作。E-mail: guolx7649@tom.com。

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2006J0291)。

收稿日期: 2008-11-11

烈震荡(勿旋涡振荡), 约 15 s; 15~30℃, 放置 2~3 min; 2~8℃, 12 000 g, 离心 15 min; 小心吸取约为 600 μ L 的上层水相, 勿扰动中间相和下层相; 加 500 μ L 异丙醇混合上清液, 15~30℃, 放置 10 min; 2~8℃, 12 000 g, 离心 10 min; 去除上清液, 沉淀中加入 1 mL 75%乙醇, 洗涤; 2~8℃, 7 500 g, 离心 5 min; 去除上清液, 沉淀自然干燥后, 将其溶于 30~50 μ L 无 RNase 的水中。用核酸蛋白分析仪测 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀, 计算核酸的浓度和纯度。

1.2.2 探针适用性检测 以总 RNA 为模板, 进行实时荧光 RT-PCR 反应, 即在 25 μ L 反应体系中加入 18.75 μ L DEPC 处理水, 0.25 μ L 引物 ASG-Pf (20 μ mol/L), 0.25 μ L 引物 ASG-Pr (20 μ mol/L), 0.5 μ L 探针 MGB-ASG (10 μ mol/L), 半粒 Ready-to-Go RT-PCR Beads, 200 ng 总 RNA。反应程序为: 42℃ 30 min, 95℃ 5 min; 然后 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 共 40 个循环。

1.2.3 实时荧光 RT-PCR 反应体系中 Mg²⁺ 浓度优化 在 1.2.2 体系中其它成分浓度不变, 加入镁离子, 使其浓度从 1.5 mM 至 4.5 mM 以 0.5 mM 递增。反应条件同 1.2.2。

1.2.4 实时荧光 RT-PCR 反应体系中引物浓度优化 在 1.2.2 体系中其它成分浓度不变, 固定优化后的镁离子终浓度, 将引物浓度从 0.2 μ M 至 0.7 μ M 以 0.1 μ M 递增。反应条件同 1.2.2。

1.2.5 实时荧光 RT-PCR 反应体系中探针浓度优化

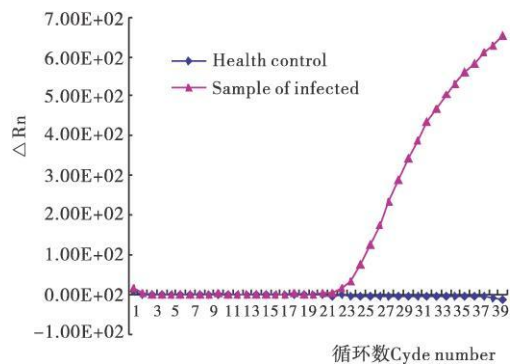


图1 实时荧光 RT-PCR 扩增(ΔR_n 荧光信号的增加值)

Fig. 1 Amplification plot real-time fluorescent RT-PCR
(ΔR_n : Increased value of fluorescence signals)

2.3 实时荧光 RT-PCR 反应体系中引物浓度优化

此步骤的目的是确定能获得最大 ΔR_n 值的最低引物浓度。由图 3 可知, ΔR_n 扩增曲线先随引物浓度的增加而升高, 当它的浓度为 0.6 μ M 时, ΔR_n 值达最大, 后随引物浓度增加而降低。经过 3 次重复试验, 最后确定 0.6 μ M 为引物最佳浓度。

2.4 实时荧光 RT-PCR 反应体系中探针浓度优化

在 1.2.2 体系中其它成分浓度不变, 固定优化后的镁离子和引物终浓度, 将探针浓度从 0.1 μ M 至 0.8 μ M 以 0.1 μ M 递增。反应条件同 1.2.2。

1.2.6 实时荧光 RT-PCR 反应体系中总 RNA 量的优化 在 1.2.2 体系中其它成分浓度不变, 固定优化后的镁离子、引物及探针终浓度, 用 DEPC 处理水稀释总 RNA, 在 25 μ L 反应体系中, 总 RNA 分别为 200、20.2、0.2、0.02、0.002 ng, 进行实时荧光 RT-PCR 检测, 其体系与条件同 1.2.2。

1.2.7 利用优化后的体系进行实时荧光 RT-PCR 反应 在 1.2.2 体系中其它成分浓度不变, 固定优化后的镁离子、引物、探针终浓度及总 RNA 的量。反应条件同 1.2.2。

2 结果与分析

2.1 探针适用性检测

由图 1 可知, 以表现症状的昆诺阿藜叶片总 RNA 为模板, 通过实时荧光 RT-PCR 检测, 可观察到荧光强度变化, 而健康对照的荧光强度没有变化。

2.2 实时荧光 RT-PCR 反应体系中 Mg²⁺ 浓度优化

此步骤的目的是确定能获得最大 ΔR_n 值的最佳 Mg²⁺ 浓度。由图 2 可知, ΔR_n 扩增曲线先随 Mg²⁺ 浓度的增加而升高, 当它的浓度为 3.5 mM 时, ΔR_n 值达最大, 后随 Mg²⁺ 浓度增加而降低, 经过 3 次重复试验, 确定最佳镁离子终浓度为 3.5 mM。

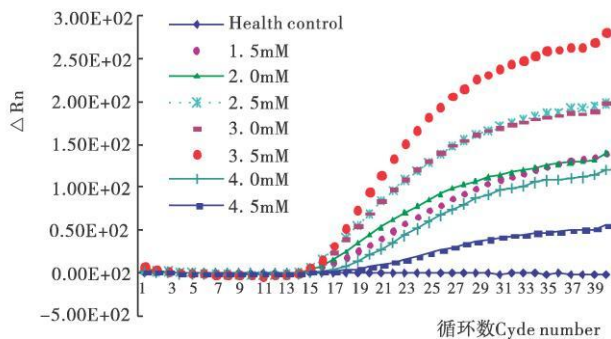


图2 镁离子浓度的优化(ΔR_n 荧光信号的增加值)

Fig. 2 Mg²⁺ concentration optimization
(ΔR_n : Increased value of fluorescence signals)

此步骤的目的是确定能获得最大 ΔR_n 值的最适探针浓度。由图 4 可知, 当探针浓度为 0.8 μ M 时, ΔR_n 值不是最大的, 而在浓度为 0.6 μ M 时达到最大, 后随探针浓度增加而降低。经过 3 次重复试验, 选定 0.6 μ M 为最佳探针浓度。

2.5 实时荧光 RT-PCR 反应体系中总 RNA 量的优化

由图 5 可知, ΔR_n 扩增曲线先随模板量的增加而

升高,当总 RNA 为 20 ng 时, ΔR_n 值达最大,后随模板量增加而降低。经过 3 次重复试验,最后确定 20 ng 为最佳模板量。由此可知,并不是模板浓度越高,扩增效

率就越高,模板浓度越高,可检测到荧光增加信号所进行的 PCR 循环数越少,当模板浓度为零时,即使 PCR 循环数达到最大(40 个循环),也检测不到荧光增加信号。

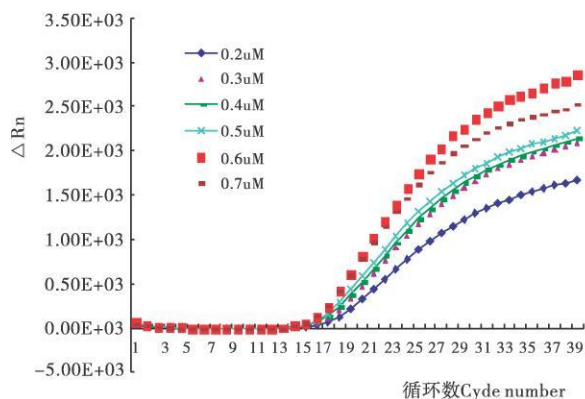


图 3 引物浓度的优化(ΔR_n 荧光信号的增加值)

Fig. 3 Primers concentration optimization
(ΔR_n : Increased value of fluorescence signals)

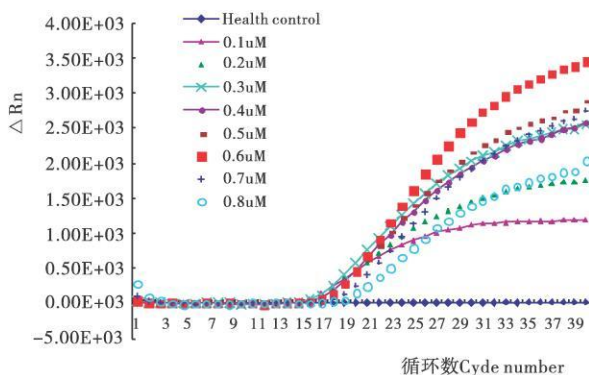


图 4 探针浓度的优化(ΔR_n 荧光信号的增加值)

Fig. 4 Probe concentration optimization
(ΔR_n : Increased value of fluorescence signals)

2.6 利用优化后的体系进行实时荧光 RT-PCR 反应

由图 6 可知,以表现症状的昆诺藜叶片总 RNA 为模板,利用优化后的体系,通过实时荧光 RT-PCR 检测

可观察到明显的荧光强度变化,其 ΔR_n 值比优化体系前高出一个数量级,而健康对照检测不到荧光信号。

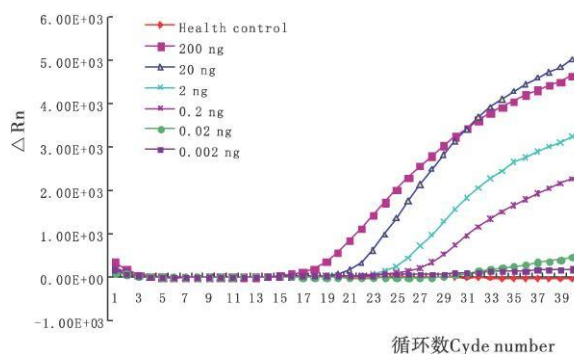


图 5 总 RNA 量的优化(ΔR_n 荧光信号的增加值)

Fig. 5 Total RNA concentration optimization
(ΔR_n : Increased value of fluorescent signals)

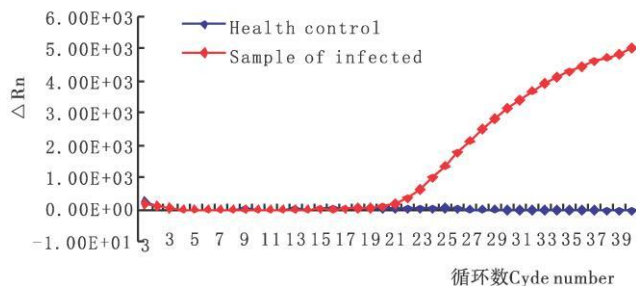


图 6 利用最优反应体系进行实时荧光 RT-PCR 扩增

(ΔR_n 荧光信号的增加值)

Fig. 6 Amplification plot of real-time fluorescent RT-PCR using the optimal reaction system (ΔR_n : Increased value of fluorescent signals)

3 讨论

该研究利用荧光探针实时监测目的基因的扩增,实现 RT-PCR 扩增与探针检测同时进行,整个检测过程完全闭管,不需 PCR 后处理,消除了 PCR 产物的污染,解决了 ASGV 以往检测方法存在的不足之处,具有较好的应用前景。PCR 体系中 Mg^{2+} 会影响反应的效率,所有的热稳定 DNA 聚合酶都要求有游离的二价阳离子,通常 Mg^{2+} 用于激活。由于 dNTP 与寡核苷酸结合 Mg^{2+} ,因而反应体系中阳离子的摩尔浓度必须超过 dNTP 和引物来源的磷酸盐基团的摩尔浓度。近年来已有一些

报道,适当增加镁离子的浓度至 4.5 mM 或 6 mM 可减少非特异性引导,也有一些相反的报道。因此镁离子的最佳浓度必须结合不同的引物与模板用经验方法通过预试验予以确定^[19]。通过梯度试验确定, Mg^{2+} 浓度为 3.5 mM 时能达到最佳扩增效果。标准 PCR 反应每条引物的典型浓度是 0.1~0.5 μM ,这个浓度对扩增 1kb DNA 片段的少于 30 个循环的 PCR 反应是绰绰有余的。更高浓度的引物可能会引发错配,导致非特异性扩增^[19]。该试验结果表明,引物最优浓度为 0.6 μM ,比标准 PCR 典型浓度稍高,这可能是由于 RT-PCR 反应中

的 RT 反应消耗了部分引物,且试验中 PCR 反应循环数较多所致。模板梯度试验结果显示,并不是模板浓度越高,扩增效率就越高,过高的 RNA 量中含有的杂质会影响 RT-PCR 的效率。综上所述,该研究最终确定了 ASGV 的实时荧光 RT-PCR 最佳反应条件为:25 μ L 体系中, Mg^{2+} 浓度为 3.5 mM,引物浓度为 0.6 μ M,探针浓度为 0.6 μ M,总 RNA 含量为 20 ng。利用此反应体系进行扩增, ΔR_n 值比未优化时高出一个数量级,表明该体系适合 ASGV 实时荧光 RT-PCR 检测分析,为该病毒的检测提供了技术支持。

参考文献

- [1] 洪健,李德葆,周雪平,等.植物病毒分类图谱[M].北京:科学出版社,2001:209-212.
- [2] 王小凤,李秋波,王荣,等.苹果褪绿叶斑病毒和茎沟病毒的鉴定提纯和酶联法检测[J].微生物学报,1992,32(2):137-144.
- [3] Van RMHV, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses [R]. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2000: 952-956.
- [4] 洪霓,王国平,于济民,等.苹果茎沟病毒的分离纯化及血清学检测[J].中国农业科学,1997,30(5):6-12.
- [5] MacKenzie D J, McLean M A, Mukerji S, et al. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction[J]. Plant Disease, 1997, 81(2): 222-226.
- [6] Marinho V L A, Kummert J, Rufflard G, et al. Detection of apple stem grooving virus in dormant apple trees with crude extracts as templates

for one-step RT-PCR[J]. Plant Disease, 1998, 82(7): 785-790.

- [7] 张开春,侯义龙,胡文玉,等.采用 RT-PCR 技术检测苹果病毒[J].果树学报,2001,18(6):370-371.
- [8] 侯义龙,张开春,胡文玉,等.逆转录-聚合酶链式反应检测果树 RNA 病毒[J].病毒学报,2002,18(1):71-73.
- [9] Kinard G R, Scott S W, Barnett O W. Detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving viruses using RT-PCR[J]. Plant Disease, 1996, 80(6):616-621.
- [10] Kummert J, Marinho V L A, Rufflard G, et al. Sensitive detection of apple stem grooving and apple stem pitting viruses from infected apple trees by RT-PCR[J]. Acta Hort, 1998, 472: 97-104.
- [11] Clover G R G, Pearson M N, Elliott D R, et al. Characterization of a strain of Apple stem grooving virus in Actinidia chinensis from China[J]. Plant Pathology, 2003, 52(3):371-378.
- [12] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR[J]. Genome Research, 1996(6):986-994.
- [13] Salmon M, Vendrame M, Kummert J, et al. Rapid and homogenous detection of Apple stem pitting virus by RT-PCR and a fluorogenic 3' minor groove binder-DNA probe[J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108:755-762.
- [14] Salmon M, Vendrame M, Kummert J, et al. Detection of Apple chlorotic leaf spot virus using a fluorogenic 3' minor groove binder-DNA probe[J]. Journal of Virological Methods, 2002, 104: 99-106.
- [15] 郭立新,向本春,陈红运,等.实时荧光 RT-PCR 一步法检测苹果茎沟病毒[J].植物病理学报,2006,36(1):57-61.
- [16] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔.分子克隆实验指南[M].3版.北京:科学出版社,2002:598-599.

Optimization of Real-time Fluorescent RT-PCR Reaction System of Apple Stem Grooving Virus

GUO Li-xin^{1,2}, XIANG Ben-chun³, ZHU Shui-fang⁴

(1. Fujian Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. C., Fuzhou, Fujian 350001, China; 2. Beilun Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. C., Ningbo, Zhejiang 315800, China; 3. Department of Plant Pathology, Institute of Agriculture, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 4. Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China)

Abstract: Total RNA of the health leaves and the leaves infected by ASGV was extraction by Trizol reagent. Every factor of real-time fluorescent RT-PCR had different concentrations and its variation changed the result of ΔR_n and Ct. Then the factors affecting the real-time fluorescent RT-PCR results of ASGV were studied. The results showed that the best reaction system was: 3.5 mM of Mg^{2+} , 0.6 μ M of either primer, 0.6 μ M probe, and 20 ng total RNA in 25 μ L reaction mixture. ΔR_n was ten times as high using above optimal real-time fluorescent RT-PCR system than original system. This indicated this system was suitable for detection of ASGV.

Key words: Apple stem grooving virus (ASGV); Real-time fluorescent RT-PCR; Optimization