

番茄黑环病毒液相芯片快速检测方法的建立

张永江¹, 辛言言¹, 李桂芬¹, 刘忠梅², 刘洪义²

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100029; 2. 黑龙江出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:为建立番茄黑环病毒(Tomato black ring virus, TBRV)的液相芯片检测技术,对 GenBank 中的 TBRV 核苷酸序列进行分析,设计其特异性探针并用生物素标记。探针偶联荧光编码微球后与 TBRV 的 RT-PCR 产物进行杂交,用液相芯片检测仪检测荧光信号。结果表明:建立的方法具有良好的特异性,能够有效区分侵染马铃薯的 TBRV、马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)、马铃薯 A 病毒(PVA)及番茄斑萎病毒(TSWV);检测灵敏度约为 1 pg/ μ L 总 RNA,与常规 RT-PCR 灵敏度相当。实际样品检测结果表明该方法可用于 TBRV 的日常检测。

关键词:番茄黑环病毒(TBRV);液相芯片技术;检测

中图分类号:S 436.412.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)01-0127-04

番茄黑环病毒(Tomato black ring virus, TBRV)为小核糖核酸病毒目(Picornavirales)伴生豇豆病毒科(Secoviridae)豇豆病毒亚科(Comoviridae)线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)成员。该病毒可侵染葡萄、草莓、水仙、甜菜、马铃薯、番茄、黄瓜、洋葱和莴苣等多种重要经济作物,因此具有重要的经济意义。该病毒可通过机械接种、嫁接、花粉、种子及介体等多种途径传播,而且该病毒的寄主在我国广泛种植,因此一旦传入,很容易定殖扩散,进而对上述产业构成威胁,因此具有非常高的检疫重要性,已被列入新修订的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》^[1]。随着近年来我国种苗进境数量的增多,该病毒传入的风险也是日积月累,为有效防止该病毒的传入,除了加强监管措施外,高效灵敏的检测技术也是必要的手段。目前国内外仅有少量关于 TBRV 检测方法研究的报道:国内高焕利等^[2]通过汁液摩擦接种的方法,筛选出昆诺藜(*Chenopodium quinoa*)、珊西烟(*Nicotiana tabacum* var. *xanthi*-NC)、白肋烟(*Nicotiana tabacum* cv. White Burley)和本氏烟(*Nicotiana glauca*)作为检测 TBRV 的一套鉴别寄主,从而建立了该病毒的生物学检测方法;通过免疫学试验建立了该病毒的 DAS-ELISA 及免疫电镜检测方法;建立了针对 TBRV 6 个不同分离物的 RT-PCR 检测方法。杨翠云

等^[3]利用 TBRV 蛋白基因的保守序列设计特异性引物,建立了 TBRV 的 RT-PCR 和免疫捕获 RT-PCR 的分子检测方法。崔学慧等^[4]将核酸免疫磁珠分离(Immunomagnetic separation, IMS)与 RT-PCR 扩增相结合,建立了 TBRV 的 IMS-RT-PCR 检测方法。国外 Pospieszny H 等^[5]应用 IC-RT-PCR 技术成功的对波兰黄瓜上的 TBRV 进行了检测;Harper S J 等^[6]建立了一步法实时荧光 RT-PCR 技术用于 TBRV 的快速检测。

液相芯片检测技术是一种快速高通量检测技术,是对生物芯片技术的继承和发展,该技术集多种生化技术于一体,具有独特的优点^[7]:可通过不同荧光编码微球同时检测上百种不同的病原分子,满足高通量检测需要;反应在液态体系中进行,可大大缩短检测时间;检测所需样本少(最少可至 1 μ L)。该技术已用于李痘病毒(Plum pox virus, PPV)的检测^[8];到目前为止,国内外还鲜见应用该技术检测番茄环斑病毒的报道;为了丰富番茄环斑病毒的检测技术,为其检测提供更多的选择,研究了番茄环斑病毒液相芯片快速的检测方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料:番茄黑环病毒(Tomato black ring virus, TBRV)、马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid, PSTVd)、马铃薯 A 病毒(Potato virus A, PVA)、番茄斑萎病毒(Tomato spotted wilt virus, TSWV)及马铃薯样品由中国检验检疫科学研究院实验室保存。

引物与探针:根据 GenBank 中 TBRV 的核苷酸序列设计,引物由上海英骏生物技术公司合成,探针由北京奥科生物技术有限责任公司合成,序列如下:TBRV-F: 5'-AAATATAGGCCGCTTTGAA-3'; TBRV-R: 5'-

第一作者简介:张永江(1977-),男,博士,副研究员,现主要从事植物检疫研究工作。E-mail:zhangyjpvi@yeah.net.

责任作者:刘洪义(1966-),男,硕士,研究员,现主要从事植物检疫研究工作。E-mail:liuhongyi665@yahoo.com.cn.

基金项目:国家质检总局科技计划资助项目(2009IK255);质检行业科研专项资助项目(201110035)。

收稿日期:2012-09-11

Biotin-TCTTTTTTGTGTCCAACATAGC-3'; TBRV-P: 5'-NH₃-C12-GGTGTTTAATTTCCGCTTTTATGTG-GCGATAATCAAGGTT-3'; 扩增产物长度约为 138 bp。

主要试剂: 微球 (Bio-Plex COOH Bead)、鞘液 (Sheath Fluid)、校准试剂盒 (Bio-Plex Validation kit) 及校正试剂盒 (Bio-Plex Calibration kit) 购自 Bio-Rad 公司; EDC(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride]) 为 Pierce 公司产品; MES(2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid hydrate) (0.1 mol/L, pH 4.5)、1% SDS(十二烷基硫酸钠)、Sarkosyl (N-lauroylsarcosine)、Streptavidin-R-phycoerythrin 为 Roche Applied Science 公司产品; Tween 20、TE(Tris-EDTA) 缓冲液 (pH 8.0, 100×)、5 mol/L TMAC(Tetramethylammonium chloride solution)、1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 为 Sigma 公司产品; 纳米磁珠核酸提取试剂盒购自武汉哇哇噻纳技术开发有限公司。

主要仪器: Bio-plex 液相芯片系统 (Bio-Rad 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 核酸提取 分别称取 TBRV、PSTVd、PVA、TSWV 及马铃薯样品材料各 0.1 g, 使用纳米磁珠核酸提取试剂盒提取样品总 RNA, 具体操作按试剂说明进行。

1.2.2 RT-PCR 扩增 cDNA 合成: 即在 0.2 mL 的反应管中加入 1 μL 总 RNA、2 μL (10 μmol/L) 下游引物、1 μL dNTP Mix (10 mmol/L) 及 10 μL DEPC-H₂O; 混匀后于 70℃ 加热 10 min, 迅速转移到冰上骤冷 5 min, 瞬时离心; 然后向反应管中加入 5× 反转录缓冲液 5 μL、0.5 μL RNA 酶抑制剂 (40 U/μL)、0.5 μL 反转录酶 (200 U/μL); 轻轻混匀, 瞬时离心; 42℃ 反应 1 h, 冰上骤冷 5 min, 获得 cDNA。PCR 扩增: 即在 0.2 mL 的反应管中加入 1 μL cDNA、上游引物 (10 μmol/L) 1 μL、下游引物 (10 μmol/L) 1 μL、dNTP Mix (10 mmol/L) 0.5 μL、Taq 酶 (5 U/μL) 0.3 μL、PCR 缓冲液 (10×) 2.5 μL、MgCl₂ (25 μmol/L) 2.5 μL 及 DEPC-H₂O 16.2 μL, 然后按照 PCR 反应程序进行扩增。PCR 程序: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 20 s, 30 个循环; 72℃ 5 min。

1.2.3 探针与荧光编码微球偶联 取 100 μL 微球涡旋 30 s 后超声 30 s, 将其加入滤管中, 13 000 r/min 离心 15 min; 再加入 30 μL 的 MES, 13 000 r/min 离心 15 min; 加入 8.5 μL 的 MES, 13 000 r/min 离心 1~2 min; 弃上清, 以 8.5 μL MES 重悬微球; 加入 1 μL 的探针 (0.1 nmol/L) 及 10 μL NHS (10 mg/mL) 并立即涡旋; 加入 0.5 μL 新鲜的 EDC (10 mg/mL) 并立即涡旋; 避光室温孵育 30 min; 加入 10 μL NHS (同上) 并立即涡旋; 加入 0.5 μL 新鲜的 EDC (同上) 并立即涡旋; 避光室温孵育 30 min; 加入 1 mL Tween 20 (0.02%) 并涡旋; 微球经

13 000 r/min 离心 1~2 min; 移出上清液, 1 mL SDS (0.1%) 悬浮微球并涡旋 40 s; 13 000 r/min 离心 1~2 min; 用 20 μL TE (pH 8.0) 重悬微球; 涡旋 30 s 后 4℃ 条件下避光保存。

1.2.4 TBRV 液相芯片检测体系的建立 悬摇超声处理已交联探针的微球 20 s; 用 1.5× TMAC 杂交液将各组微球稀释至 150 个/μL; 向每个反应孔及空白对照孔中加入 33 μL 稀释液; 向每个空白孔中加入 17 μL TE (pH 8.0); 向每个样品孔中分别加入已生物素化的扩增产物 5 μL 及 TE (pH 8.0) 12 μL; 用枪上下吹吸数次以混匀各反应孔; 盖好反应板以防止挥发, 将其置于 98℃ 5 min 以使 PCR 产物双链变性; 之后再将反应板置于 52℃ 15 min; 用 1× TMAC 杂交液将链霉亲和素-藻红蛋白配成 2~4 μg/mL (注: 每孔需 75 μL 显色液); 用 1× TMAC 杂交液将 1.2 μm 的 Millipore filter plate 预湿, 之后再负压抽空; 将杂交好的反应液移入已预湿的孔中, 用负压抽空以去除上清; 用 1× TMAC 100 μL 清洗 2 次, 之后再每孔加入 75 μL 显色液, 并用排枪上下吹吸数次以重悬反应液; 迅速将反应液移回 PCR 板中; 将反应板再置于 52℃ 杂交 15 min, 用 Bio-plex 液相芯片系统检测。液相芯片定性比值结果 (Luminex qualitative ratio result, LQRR) 等于样品荧光强度中位值 (Median fluorescence intensity, MFI) 平均值 (MFIs) 与空白对照 MFI 的平均值 (MFIb) 的比值, 即 $LQRR = MFIs / MFIb$ 。LQRR ≥ 2, 结果判为阳性; LQRR < 2, 结果判为阴性。

1.2.5 液相芯片特异性试验 分别取 TBRV、PSTVd、TSWV 及 PVA 的 RNA 作为模板, 按照 1.2.2 的方法进行扩增, 将扩增产物与 TBRV 基因探针偶联的相应荧光编码微球按照 1.2.4 的方法进行杂交, 检测所建方法的特异性; 设置空白对照。

1.2.6 液相芯片与 RT-PCR 灵敏度比较试验 将 TBRV 的总 RNA (100 ng/μL) 进行 10~10⁵ 梯度稀释后用作模板, 分别按照 1.2.2 和 1.2.4 的方法进行液相芯片与 RT-PCR 检测, 比较二者的灵敏度。

1.2.7 液相芯片实际样品检测 利用该研究建立的液相芯片检测方法, 检测 4 份实验室保存的实际样品。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测方法的建立

对 TBRV、PSTVd、TSWV 及 PVA 进行 RT-PCR 检测, 只有 TBRV 特异性扩增出约 138 bp 的目的条带, 其它病毒无产物出现, 结果与理论结果相符 (图 1)。

2.2 液相芯片检测方法特异性试验结果

将 TBRV 探针与荧光编码微球偶联, 分别与 TBRV、PSTVd、TSWV 及 PVA 的 PCR 产物杂交, 结果见表 1。TBRV 的 PCR 产物的 MFI 明显大于空白对照的值, 其 LQRR 为 209.37, 大于 2; 而 PSTVd、TSWV 及

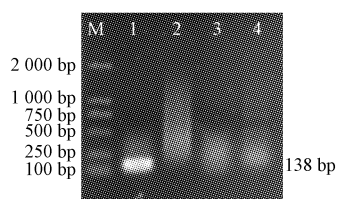


图1 TBRV PCR 特异性检测结果

注:M;子量标准;1:番茄黑环病毒;2:马铃薯纺锤块茎类病毒;3:番茄斑萎病毒;4:马铃薯 A 病毒。

Fig. 1 Specific detection of PCR for TBRV

Note:M;DNA marker;1:TBRV;2:PSTVd;3:TSVW;4:PVA.

PVA 的 LQRR 均小于 2,表明所建立的液相芯片检测体系具有良好的特异性。

表1 液相芯片检测方法特异性结果

Table 1 The specificity test of liquichip for TBRV

病毒种类 Virus species	TBRV	PSTVd	PVA	TSWV
病毒荧光值(MFI)	8 165.5	6.5	23.5	21.0
空白荧光值(MFIb)		39		
定性比值(LQRR)	209.37	0.17	0.60	0.54
结果 Results	+	-	-	-

注:“+”表示结果为阳性;“-”表示结果为阴性。

Note:“+”means positive result;“-”means negative result.

2.3 液相芯片检测方法灵敏度试验结果

将 TBRV 的总 RNA 进行 $10 \sim 10^5$ 梯度稀释后用作模板,分别进行液相芯片与 RT-PCR 检测。液相芯片结果表明(表 2),其检测灵敏度为 10^5 (约为 $1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 总 RNA),LQRR 值为 2;RT-PCR 检测灵敏度为 10^5 (图 2),表明二者灵敏度相当。

表2 液相芯片检测方法灵敏度结果

Table 2 The sensitivity test of liquichip for TBRV

样品稀释倍数 Sample dilutions	10	10^2	10^3	10^4	10^5
样品荧光值(MFI)	4 927.5	1 599.0	1 587.0	1 167.0	32.0
空白荧光值(MFIb)			16		
定性比值(LQRR)	307.97	99.93	99.19	72.94	2.00
结果 Results	+	+	+	+	+

注:“+”表示结果为阳性。

Note:“+” means positive result.

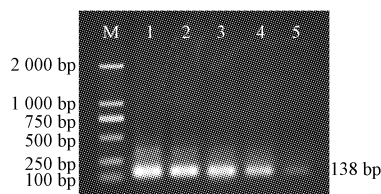


图2 TBRV PCR 灵敏度检测结果

注:M;分子量标准;1~5:模板稀释的 5 个梯度,分别为:10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 。

Fig. 2 The sensitivity detection of PCR for TBRV

Note:M;DNA marker;1~5:five dilutions of template,10, 10^2 , 10^3 , 10^4 and 10^5 , respectively.

2.4 液相芯片与 RT-PCR 检测实际样品比对结果

对实验室保存的经 RT-PCR 检测的实际样品进行液相芯片检测,检测结果见表 3,与 RT-PCR 检测结果(图 3)一致,表明该方法可用于实际样品的检测。

表3 液相芯片方法检测实际样品结果

Table 3 The samples detection of liquichip for TBRV

样品 Samples	样品 1 Sample 1	样品 2 Sample 2	样品 3 Sample 3	样品 4 Sample 4
样品荧光值(MFI)	6 479.0	15.0	31.5	12.5
空白荧光值(MFIb)		39		
定性比值(LQRR)	166.12	0.03	0.81	0.32
结果 Results	+	-	-	-

注:“+”表示结果为阳性;“-”表示结果为阴性。

Note:“+” means positive result;“-” means negative result.

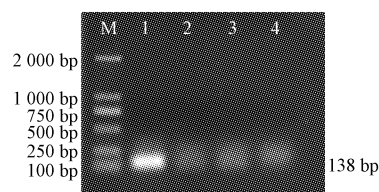


图3 实际样品 RT-PCR 检测电泳图

注:M;分子标准;1:样品 1;2:样品 2;3:样品 3;4:样品 4。

Fig. 3 Detection of RT-PCR products by agarose gel electrophoresis

Note:M;DNA marker;1:sample 1;2:sample 2;3:sample 3;4:sample 4.

3 讨论

番茄黑环病毒作为一种危险性植物病毒,被列入中国新修订的进境植物检疫性有害生物名录。该病毒一旦传播扩散防治极为困难,快速有效的检测方法对预防该病毒的发生和传播具有特别重要的意义。为此该试验进行了番茄黑环病毒液相芯片检测方法的研究。研究结果表明,该方法的灵敏度可达到 RT-PCR 的检测水平,但液相芯片技术更能体现高通量的特点,而且不需要凝胶电泳,检测更加快速。为了明确该方法的特异性,选择能够侵染马铃薯的 4 种重要病毒(TBRV、PSTVd、TSWV 及 PVA)进行验证试验,证实该方法具有较强的特异性。

在液相芯片检测体系建立过程中,微球和探针的偶联直接决定着液相芯片检测的灵敏度,高效的微球和探针偶联技术能够将大量的探针偶联到微球上,增加检测靶标与探针的杂交几率,从而增加检测信号值,增强检测灵敏度。在试验过程中需要注意以下几点:微球要充分涡旋,防止微球聚集影响偶联;偶联需用偶联专用离心管,普通离心管会黏附微球,造成微球损失;MES 的 pH 一定要准确,微小的 pH 差异都会对偶联效果产生巨大影响;偶联用探针要用 MQ 回溶,而不能用 TE;整个试验过程中微球要避免光。

由于液相芯片检测技术具有特异性强、通量高及快

速的特点,适合在进境种苗量较大的口岸应用,可以在保障安全的情况下有效的提高通关速度,从而促进国际贸易的发展。该方法还适用于经常发生复合侵染的块茎类种苗的口岸检疫及田间监测,可以大幅提高检测效率。这为防止番茄黑环病毒进入我国提供了技术储备,也为其它同类病毒的快速高通量检测提供了借鉴和经验。

参考文献

- [1] 季良. 植物检疫病毒防治与检疫[M]. 北京:中国农业出版社,2009:786-792.
- [2] 高焕利,杨翠云,周国梁,等. 番茄黑环病毒检测方法的建立[J]. 植物检疫,2007,21(3):149-152.
- [3] 杨翠云,于翠,宋绍伟,等. 番茄黑环病毒分子生物学检测方法及其分离物序列分析[J]. 植物检疫,2006,20(5):275-278.

- [4] 崔学慧,陈舜胜,胡亚萍,等. 应用 IMS-RT-PCR 方法检测番茄黑环病毒[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2011,29(4):21-24.
- [5] Pospieszny H,Jonczyk M,Borodynko N. First record of Tomato black ring virus (TBRV) in the natural infection of *Cucumis sativus* in Poland[J]. Journal of plant protection research,2003,43(1):11-18.
- [6] Harper S J,Delmiglio C,Ward L I,et al. Detection of Tomato black ring virus by real-time one-step RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods,2011,171(1):190-194.
- [7] 代欢欢,陈舜胜,杨翠云,等. 液相芯片技术在植物病毒检疫中的应用展望[J]. 植物检疫,2010,24(6):44-48.
- [8] Croft H,Malinowski T,Krizbai L,et al. Use of Luminex xMAP-derived Bio-Plex bead-based suspension array for specific detection of PPV W and characterization of epitopes on the coat protein of the virus[J]. Journal of Virological Methods,2008,153(2):203-213.

Development of Liquid Chip Technique for Rapid Detection of Tomato Black Ring Virus

ZHANG Yong-jiang¹, XIN Yan-yan¹, LI Gui-fen¹, LIU Zhong-mei², LIU Hong-yi²

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029; 2. Technical Center of Inspection and Quarantine, Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin, Heilongjiang 150001)

Abstract: To develop liquid chip technique for detecting Tomato black ring virus (TBRV), the nucleotide sequence of TBRV was analyzed by using the software Primer Premier 5.0, and specific probe labeled with biotin was prepared and coupled with fluorescence-coded microspheres, which was used for hybridization reaction to RT-PCR products of TBRV. Liquid chip detection method for TBRV was established by using Bio-Rad liquid chip to detect fluorescence signal in the reaction system. The specificity of this method was evaluated by applying the proposed method to detect four viruses infecting potato, TBRV, Potato spindle tuber viroid (PSTVd), Potato virus A (PVA) and Tomato spotted wilt virus (TSWV). The results showed that better specificity to TBRV and no reaction with other three viruses. The sensitivity of the method was 1 pg/ μ L of total RNA, which was equal to the conventional RT-PCR method. The successful detection of TBRV in potato samples suggested the feasibility of this procedure for routine testing.

Key words: Tomato black ring virus(TBRV); liquid chip technique; detection

“基因芯片”快速检测禽流感

美国研究人员研发出了一种“基因芯片”,以流感病毒基因为模板,可快速检测各种流感病毒,其中包括 H5N1 型高致病性禽流感病毒。这种基因芯片名为“M 芯片”,测试感冒病毒十分准确,可轻易区分 H5N1 型禽流感病毒与普通感冒病毒。

科学家通过总结以往经验,确定了流感病毒基因中最稳定的 1 段作为“M 芯片”检测基础,而现有传统病毒检测方法需要 3 段基因。“M 芯片”检测的这段基因变异速度慢,不需因病毒变异而经常更新。

科学家使用“M 芯片”检测了 24 种人、畜身上不同的 H5N1 型禽流感病毒,结果成功测出其中 21 种,没有一例错误阳性。这意味着“M 芯片”不会把非禽流感病毒误诊为 H5N1 型禽流感。且使用“M 芯片”检测只需 7 h 就可检测出病人是否感染禽流感。