

实时荧光 RT-PCR 检测 By33 蛋白抑制 TMV 复制的作用

申莉莉, 杨金广, 王凤龙, 钱玉梅, 陈德鑫

农业部烟草类作物质量控制重点开放实验室, 中国农科院烟草研究所, 青岛科苑经四路 11 号 266101

摘要: 供试烟草 NC89 接种 TMV 后 6 h, 接种叶悬浮于 By33 无菌活性蛋白、无菌水中 48 h, 实时荧光 RT-PCR 检测病毒 RNA 复制量, 结果显示: 悬浮于 By33 蛋白 50、100 倍液的处理, 病毒 RNA 复制量分别为 0.302434 和 0.411478, 低于悬浮于无菌水处理 (0.438963)。悬浮叶研磨接种三生烟, 悬浮于 By33 蛋白 50、100 倍液处理与悬浮于无菌水处理比, 枯斑抑制率分别为 96.97 和 97.92%, 与 PCR 检测结果一致。

关键词: 实时荧光定量 PCR; 活性蛋白; 复制

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2010.03.019

中图分类号: TS413, Q7

文献标识码: A

文章编号: 1004-5708(2010)03-0086-04

Detection of inhibition effect of By33 active protein on RNA replication by real time quantitative PCR

SHEN Li-li, YANG Jin-guang, WANG Feng-long, QIAN Yu-mei, CHEN De-xin

Key Laboratory of Tobacco Quality Control, Tobacco Research Institute, CAAS, Qingdao 266101, China

Abstract: RNA content of tobacco NC89 which had floated for 48 hours in active protein and sterile water after being inoculated by TMV for 6 hours was detected by real time quantitative PCR. Results showed that RNA replication content of floating in active protein (50 and 100 dilute) were 0.302434 and 0.411478 respectively, lower than floating in sterile water (0.438963). The inhibition ratio by friction method was 96.97% and 97.92%, respectively. The two detection methods had the same results.

Key words: real time quantitative PCR; active protein; replication

实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR) 反应是在反应体系中加入荧光信号, 利用荧光信号 (SYBR、TaqMan 等) 积累, 对整个 PCR 过程进行实时监测, 在目的基因扩增的指数期, 对起始模板进行定量分析的方法。以细胞中的表达量或基因组中的拷贝数恒定的作为内参 (看家) 基因, 通过建立标准曲线, 分析样品中 RNA 的量。从而避免了由于不同样品 RNA 提取浓度的差异而带来的影响, 实现准确定量。目前 real time quantitative PCR 已经广泛应用于医学和农业科研中。

吴元华等^[1]应用竞争 PCR (Competitive PCR) 揭示噬肽霉素能显著抑制烟草花叶病毒 RNA 的蓄积量。郭京泽^[2]研究表明实时荧光 RT-PCR 能准确快速的检测辣椒轻斑驳病毒病 (PMMoV), 灵敏度是传统 ELISA 方法的 100 倍。本文采用实时荧光定量 PCR 和摩擦接种两种方法, 研究了拮抗菌 By33 分泌活性蛋白抑制 TMV 体内增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* By33; 普通烟 NC89 (*Nicotiana tabacum* var. NC89) 和三生 NN 烟 (*Nicotiana tabacum* var. Sam sum NN); TMV 活体毒源 (保存于 NC89)。TMV 基因引物 (Cp-F: 5'-ATTAGACC-CGCTAGTCACAGCAC-3', Cp-R: 5'-GTGGGGTTCGCT-GATTTT-3', 扩增片段长度 84 pb; 烟草的看家基因 Actin-F: 5'-CAAGGAAATCACCCTTTGG-3', Actin-R: 5'-

作者简介: 申莉莉, 女, 硕士, 助研, E-mail: sdrzell@tom.com; 杨金广, 男, 博士, 助研, E-mail: jinguangyang@126.com 本文为申莉莉、杨金广共同完成。

王凤龙 (通讯作者), 男, 博士, 研究员, E-mail: wangfl64@sohu.com

基金项目: 山东中烟工业公司合作研究项目“防治烟草病毒病提高原料安全性研究”(080605097)

收稿日期: 2009-05-07

AAGGGATGCGAGGATGGA-3', 扩增片段长度 105 bp。) cDNA 合成和 real time quantitative PCR 反应采用 TaKaRa 生物工程有限公司(大连)试剂盒。试验仪器为 TaKaRa 公司 Thermal Cycler Dice PCR 仪、APPLIED Biosystems 7500 Real Time PCR System 及 Alpha Innotech Alphamager 凝胶成像系统。

1.2 方法

1.2.1 处理方法

By33 活性蛋白 0.2 μm 细菌过滤器除菌,以牛血清白蛋白标准曲线计算原液浓度为 0.9867 mg/mL,稀释 50 倍(19.7 μg/mL)、100 倍(9.867 μg/mL)备用。

选取长势一致的 6 叶期 NC89 幼苗,每株选上部同大小同叶位接种 TMV 6 h 后,取接种叶无菌水冲洗,分别悬浮于 By33 活性蛋白 50 倍、100 倍稀释液和无菌水中(试验在灭菌培养皿内进行),放置在 24℃ 光照培养箱内。每处理 3 株,3 次重复^[3]。

48 h 后取出均分为 2 份,1 份研磨汁液接种三生-NN 烟,每处理 6 株,3 次重复,4 d 后调查枯斑数,计算抑制率;1 份做荧光定量 PCR 测定(real time quantitative PCR)。分别从症状表现、核酸水平研究活性蛋白对 TMV 体内复制的抑制作用。

1.2.2 real time quantitative PCR 反应^[4]

(1)总 RNA 提取:取烟叶 0.1 g,用 Biozol 提取。

(2)cDNA 合成:以 Cp-R 和 Actin-R 为引物配置反转录体系,进行 cDNA 合成。

(3)标准曲线制作 将合成的 cDNA 按 3⁰、3¹、3²、3³、3⁴、3⁵ 稀释成 6 个浓度,采用 Cp 和 Actin 的一对引物配置 real time quantitative PCR 反应体系,3 次重复,制作标准曲线。

(4)样品定量:提取样品总 RNA,采用 Cp 和 Actin 的 R 引物反转录合成 cDNA 后,稀释 10 倍,采用 Cp 和 Actin 的一对引物配置 real time quantitative PCR 反应体系,3 次重复。根据标准曲线计算样品 RNA 浓度。

(5)real time quantitative PCR 反应产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 标准曲线

Cp 和 Actin 基因的标准曲线分别为: $Y = -3.674389X + 19.676403$, $Y = -3.866727X + 36.324451$ 。相关系数达到 0.98 以上,溶解曲线峰单一,无非特异性扩增,符合 real time quantitative PCR 要求。

2.2 样品 RNA 定量

将标准曲线的阈值(Threshold)输入 ABI7500 计算

软件系统的样品结果分析中,得到样品的 Ct 值,将 Ct 替换标准曲线中的 Y,计算得到样品的 Co 值,将 Cp 和 Actin 基因的 Co 值比较,得到各处理的 RNA 浓度。结果发现,悬浮于 By33 蛋白 50 倍(19.7 μg/mL)和 100 倍(9.867 μg/mL)处理的病毒 RNA 量分别为 0.302434 和 0.411478,均低于悬浮于无菌水的对照处理 0.438963,说明 By33 蛋白能抑制病毒 RNA 在体内的复制,19.7 μg/mL 浓度效果好于低浓度 9.867 μg/mL。

表 1 Cp 和 Actin 基因的标准曲线参数

	斜率	截距	相关系数	阈值
Cp	-3.674389	19.676406	0.988255	0.0542304
Actin	-3.866727	36.324451	0.982021	0.0500196

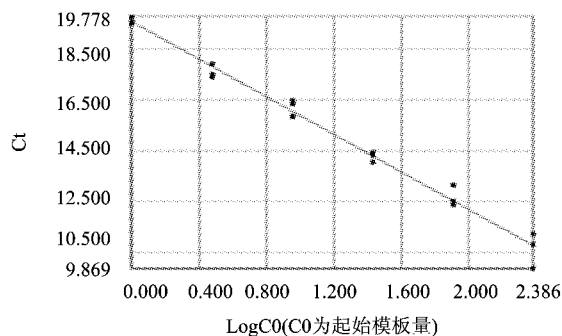


图 1 Cp 标准曲线

注:Ct:扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环数。

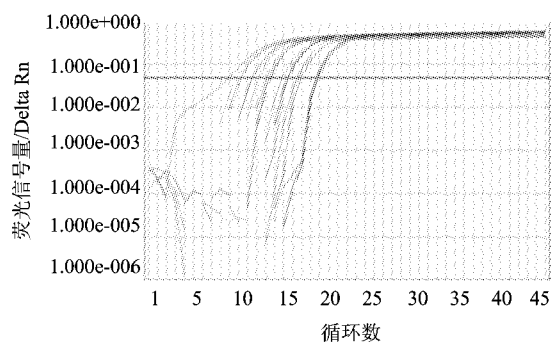


图 2 Cp 基因 3 的 0~5 次方稀释扩增曲线

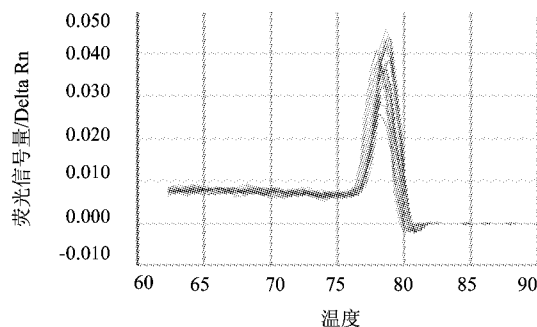


图 3 Cp 溶解曲线

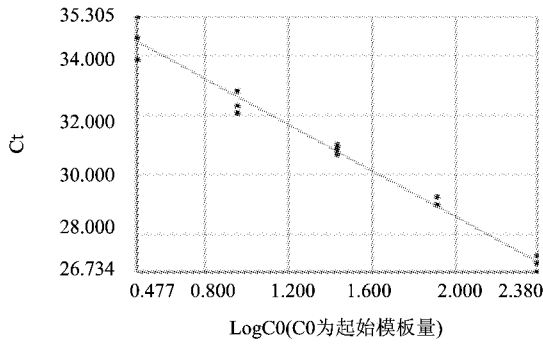


图4 Actin标准曲线

注: Ct: 扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环数。

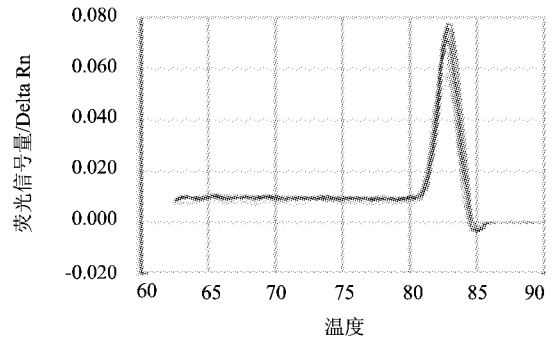


图6 Actin溶解曲线

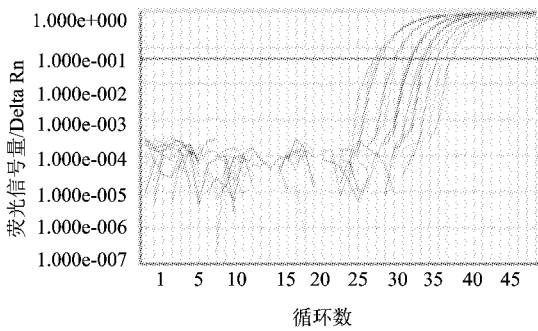


图5 Actin基因3'的1~5次方稀释扩增曲线

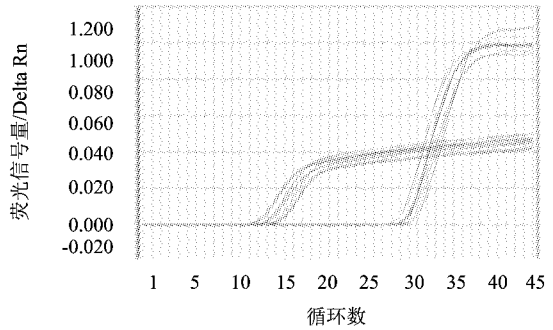


图7 样品 Cp 和 Actin 基因 PCR 曲线(3次重复)

表2 样品 real time quantitative PCR 病毒 RNA 分析结果

	Cp			Actin			Cp/ Actin
	Y	X	Co	Y	X	Co	Co
对照	15.905	1.026403	10.62681	30.973	1.383974	24.20886	0.438963
By33 100倍	15.152	1.231335	17.03471	30.072	1.616988	41.39882	0.411478
By33 50倍	17.025	0.72159	5.267326	31.526	1.240959	17.41644	0.302434

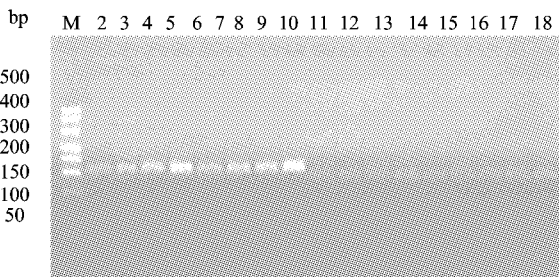


图8 real time quantitative PCR 电泳图谱

注: 从左起第1泳道为 MarkDI500[从下到上各条带分子量为 50、100、150、200、300、400、500], 第2~6泳道为 Actin 标准曲线中 3¹、3²、3³、3⁴、3⁵ 稀释, 第7~9泳道为样品 Actin 的清水、By33 蛋白 50、100 倍; 第10~15泳道为 Cp 标准曲线中 3⁰、3¹、3²、3³、3⁴、3⁵ 稀释, 第16~18泳道为样品 Cp 的清水、By33 蛋白 50、100 倍。

2.3 对反应产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳

将标准样品和待测样品的 real time quantitative PCR 扩增产物进行琼脂糖电泳, 结果(图 8)显示 Cp 和

Actin 的 RT-PCR 产物无非特异性条带。说明 real time quantitative PCR 反应体系中的引物设计和溶解曲线符合要求。

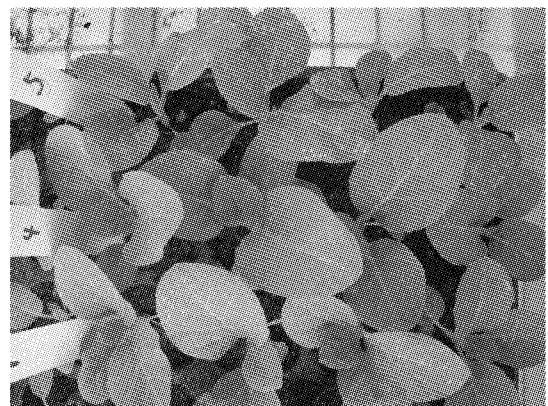


图9 By33 蛋白抑制 RNA 复制生物学检测

注: 图中 1、4、5 标签分别为 By33 蛋白 50、100 倍稀释液和清水对照处理

2.4 枯斑数调查

接种 TMV 6 h 后,叶片悬浮于 By33 无菌活性蛋白 50、100 倍稀释液中 48 h 后取出,研磨汁液摩擦接种三生烟,结果(图 9,表 3)表明悬浮于 By33 无菌活性蛋白 50、100 倍稀释液的枯斑数均比悬浮于无菌水中的 CK 处理明显降低,抑制率分别为 96.97%、97.92%。说明 By33 活性蛋白能抑制 TMV 在烟叶中的复制,与 real time quantitative PCR 病毒 RNA 分析结果相一致。

表 3 By33 蛋白抑制 RNA 复制枯斑数调查

	By33 蛋白 50 倍	By33 蛋白 100 倍	CK
重复 1	0.83	0.83	29.00
重复 2	1.33	0.83	40.00
重复 3	1.00	0.50	34.83
平均	1.05	0.72	34.61
抑制率/%	96.97	97.92	

3 讨论

B. amyloliquefaciens 最早是由日本科学家 Fukumoto 于 1943 年从土壤中分离到的,因分泌解淀粉酶故命名为“解淀粉芽孢杆菌”(Fukumoto, 1943)。*B. amyloliquefaciens* 属于革兰氏阳性菌,可以刺激植物生长和产生次生代谢产物抑制植物病原物。其代表株系 FZB42 的基因组大小为 3918 kb,约包含 3693 个编码区域(Chen et al., 2008)^[5]。权春善等^[6]、陈士云等^[7]、Kim 等^[8]都曾报道 *B. amyloliquefaciens* 能有效控制尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、油菜核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、番茄炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*)。Algam1 等^[9]报道 *B. amyloliquefaciens* 能促进植株生长,有效控制由青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的烟草青枯病,Idriss 等^[10]报道 *B. amyloliquefaciens* FZB45 具有肌醇六磷酸酶(phytase)活性,在缺磷的条件下可刺激植物生长。Yoshida 等^[11]从桑树上分离到的 *B. amyloliquefaciens* RC-2 具有抑制桑树炭疽病原菌(*Colletotrichum dematium*)、白纹羽菌(*Rosellinia necatrix*)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和水稻白叶枯病(*Xanthomonas campestris*)等植物病原真菌和细菌,并分离到的一种环肽类化合物伊枯草菌素 A (iturin)。

Murphy 等对部分土壤杆菌研究表明,*B. amyloliquefaciens* 可以通过刺激植物生长来抑制黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)的侵染^[12]。关于其对烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)的抑制作用研

究较少。本实验室研究发现 By33 分泌 27 KDa 蛋白,60℃稳定,耐碱性强并具蛋白酶耐性。而在室内对 By33 蛋白进行柱层析纯化时,发现不同收集液其分子量均为 27KDa,可能是 *B. amyloliquefaciens* 分泌的 27KDa 蛋白有几种,生物测定发现都具有抗 TMV 活性,至于哪一种蛋白是对植物病毒有作用的,尚不清楚。因此,深入研究 By33 活性蛋白,对揭示其病毒的作用机理具有重要意义。

参考文献

- [1] 吴元华,朱春玉,杜春梅,等. 嗜肽霉素影响烟草花叶病毒 RNA 蓄积量的研究[J]. 病毒学报,2005,21(4):311-313.
- [2] 郭京泽,李兴红,廖芳,等. 实时荧光 RT-PCR 检测辣椒轻斑病毒的研究[J]. 植物保护,2008,34(2):117-120.
- [3] 申莉莉,王凤龙,钱玉梅,等. 拮抗细菌对烟草花叶病毒的抑制作用研究[J]. 中国烟草科学,2007,28(5):9-11.
- [4] 刘晓霞,杨金广,王凤龙,等. 烟草 PVY Real-Time PCR 定量检测体系的建立及应用[J]. 中国烟草科学,2010,31(1):9-12.
- [5] Chen X H, Koumoutsis A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 25: 1007-1014.
- [6] 权春善,王军华,徐洪涛,等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 2006,46(1):7-12.
- [7] 陈士云,杨宝玉,高梅影,等. 一株抑制油菜核盘菌核形成的解淀粉芽孢杆菌[J]. 应用与环境生物学报,2005,11(3): 373-376.
- [8] Pyoung Il Kim, Ki-Chul Chung. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 234(1):177-183.
- [9] Soad A Algam, XIE Guan-lin, LI Bin. Comparative performance of *Bacillus* spp. in growth promotion and suppression of tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2004, 30(6): 603-610.
- [10] Idriss E E, Makarewicz O, Farouk A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth promoting effect[J]. *Microbiology*, 2002, 148: 2097-2109.
- [11] Yoshida A, Hiradate S, Tsukamoto T, et al. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves[J]. *Phytopathology*, 2001, 91: 181-187.
- [12] Murphy J F, Reddy M S, Ryu C-M, et al. Rhizobacteria-Mediated Growth Promotion of Tomato Leads to Protection Against *Cucumber mosaic virus* [J]. *Phytopathology*, 2003, 93: 1301-1307.