

烟草中 TMV、CMV 和 PVY 多重 RT-PCR 检测体系的建立与应用

杨金广¹, 张 帅¹, 申莉莉¹, 钱玉梅¹, 陈德鑫¹, 王长栓², 黄 瑾², 王凤龙¹

¹ 农业部烟草类作物质量控制重点开放实验室, 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101;

² 广西区烟草公司百色市公司, 百色右江城区东大道 533000

摘 要: 利用 DNAMAN 软件对 GenBank 数据库中已登录的烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 和马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY) 全基因组序列进行序列比对, 选择最保守的区域, 进行相应病毒的引物设计, 建立了多重 RT-PCR 检测烟草中 TMV、CMV 和 PVY 的技术体系。对 3 条扩增片段进行回收、测序和 BLAST 比较, 结果表明多重 RT-PCR 所扩增的片段序列均与预期设计序列相符, 同源性均在 98% 以上。利用多重 RT-PCR 对广西区 132 个烟草病毒病样品进行检测分析, 结果表明 TMV 检出率为 91.7%, CMV 检出率为 18.2%, PVY 检出率为 55.3%。较单一的 RT-PCR, 具有简便、快速和经济的特点。与酶联免疫吸附法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 相比, 其检测限度高出 ELISA 的检测限度 104 级数, 具有更高的特异性与准确性。该方法可以同步快速、特异地检测出烟草中 TMV、CMV 和 PVY 病毒的侵染。

关键词: 烟草; 多重 RT-PCR; 病毒检测; 应用

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2010.04.017

中图分类号: S432.41 文献标识码: A 文章编号: 1004-5708(2010)04-0083-06

Establishment and application of multiple RT-PCR for detection of TMV, CMV and PVY in tobacco

YANG Jin-guang¹, ZHANG Shuai¹, SHEN Li-li¹, QIAN Yu-mei¹, CHEN De-xin¹,
WANG Chang-shuan², HUANG Jin², WANG Feng-long¹

¹ Key Laboratory for Tobacco Quality Control, Ministry of Agriculture, Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China;

² Baise Tobacco Company of Guangxi Province, Baise 533000, China

Abstract: Sequences of tobacco mosaic virus (TMV), cucumber mosaic virus (CMV) and potato virus Y (PVY) in GenBank database were aligned using DNAMAN 6.0 version software, with primers designed on conserved regions. Multiple RT-PCR for detection of TMV, CMV and PVY were established and PCR products were purified and sequenced. BLAST analysis showed that these PCR products were TMV, CMV and PVY respectively with homology of sequences well above 98%. A total of 132 tobacco samples collected from Baise in Guangxi province were analyzed by multiple RT-PCR to detect TMV, CMV and PVY. Results indicated that positive rates of TMV, CMV and PVY were 91.7%, 18.2% and 55.3% respectively. Multiple RT-PCR was simple, rapid and economic in comparison with conventional RT-PCR. The limitation of detection of Multiple RT-PCR was 104 times higher than that of ELISA while more specific and accurate than ELISA. Therefore, multiple RT-PCR can synchronously detect TMV, CMV and PVY in one RT-PCR assay, which is important for the prediction, forecast and prevention of tobacco virus diseases.

Key words: tobacco; multiple RT-PCR; virus detection

作者简介: 杨金广, 男, 博士, 研究方向为烟草病毒病综合防治与分子病毒学, E-mail: jinguangyang@126.com

王凤龙(通讯作者), 男, 研究员, 主要从事烟草病虫害预测预报与综合防治研究, E-mail: wangfl64@sohu.com

基金项目: 广西区烟草专卖局科技项目(合同号: 2008-12; 2008-14)

收稿日期: 2009-09-16

烟草是我国主要的经济作物之一,由烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)和马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)侵染所致的病毒病是烟草的主要病害,严重影响烟叶产量和品质。尚无有效的防治药剂,烟叶生产中,多采用截断传播途径进行预防。由于 TMV 多是通过农事操作进行传播,而 CMV 和 PVY 多以带毒蚜虫刺吸烟株进行传播,要截断其传播途径,必需提前对 3 种病毒进行有效、快速和准确的诊断和预测预报。并且这 3 种病毒侵染烟草后,在烟草上表现的症状较为相似,均表现为花叶、皱缩、褪绿、斑驳和坏死等症状。单纯依靠生物学症状进行诊断和鉴定误差较大,这就给烟草病毒病病害的预测预报和防治造成一定的困难。因此,建立一种可以快速简便,准确检测 TMV、CMV 和 PVY 的技术方法成为生产上的当务之急。目前,关于 TMV、CMV 和 PVY 的检测研究较多,主要集中在病毒生物学测定、ELISA、RT-PCR 和电镜技术等^[1-4],而关于 TMV、CMV 和 PVY 的多重 RT-PCR 检测鲜见报道。本文针对烟田间烟草病毒病多为 TMV、CMV 和 PVY 混合侵染的现象,建立了多重 RT-PCR 检测 TMV、CMV 和 PVY 的技术体系,并进行了初步应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒毒源

TMV、CMV 和 PVY 毒源存于中国农科院烟草研究所防虫温室。2008 年和 2009 年在广西百色烟田中采集呈典型烟草病毒病症状(褪绿、黄化、皱缩、矮化和坏死等)的烟草病叶,于-80℃条件下保存备用。

1.1.2 试剂

Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (200 U/ μ L)、RNase Inhibitor (40 U/ μ L)、dNTP Mixture (10 mmol/L)、Premix LA Taq (Loading dye mix) 和 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver2.0 均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。TMV、CMV 和 PVY ELISA 完全试剂包购自英国 Adgen 公司,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

利用 DNAMAN 6.0 软件(Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)对 GenBank 中已有的 TMV、CMV 和 PVY 各分离物的全序列进行比对,选择每个病毒序列最为保守的区域采用 Primer 5.0 软件进行引物设计,然后利用 Oligo 6.0 软件和在线数据库 Oligo Calc(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)对所设计的 6 条引物彼此之间进行评价,并通过在线 BLSAT 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)进行 blast,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,引物序列见表 1。

表 1 本研究中所应用的引物序列、序列位置、片段大小和退火温度

名称	序列	检测病毒	片段大小	退火温度
T5	5'-AAAATGAGGGATATGGTS-3'	TMV	496 bp	52.4℃
T3	5'-WMACTAAYCTRTCRTGGA-3'			
C5	5'-AGGTYCTWACAGCAATHA-3'	CMV	706 bp	52.4℃
C3	5'-ACAATGGTGTACCGAAG-3'			
P5	5'-ARATAACYTGCCCYACCT-3'	PVY	234 bp	52.4℃
P3	5'-GTGMITGTYTGTCTCYC-3'			

注: R = A/G, Y = C/T, M = A/C, S = C/G, W = A/T, H = A/C/T

1.2.2 总 RNA 提取

利用 TRIZOL 裂解液进行烟草总 RNA 的提取。取新鲜的烟叶或冻存叶片 0.1 g(干叶和种子各 0.05 g),置于灭菌研钵中,于液氮条件下研磨成匀浆;加入 1 mL TRIZOL 裂解液,充分混匀,室温静置 5 min;4℃条件下,12000 rpm 离心 6 min,取上清液,置于灭菌后的 Eppendorf 管中,加 200 μ L 氯仿,充分混匀,室温静置 5 min;4℃条件下,12000 rpm 离心 6 min,取上清液,置于灭菌后的 Eppendorf 管中,加等体积预冷的异丙醇,充

分混匀,-20℃静置 20 min;4℃条件下,12000 rpm 离心 6 min,弃上清液;75%乙醇洗涤沉淀 2 次,待乙醇挥发完全,用适量的 RNase-free H₂O 溶解,溶解后的液体即为总 RNA。-80℃条件下保存备用或立即进行反转录反应。

1.2.3 RT-PCR

取 3 μ L 总 RNA,依次加入 1 μ L 反向引物(T3、C3 和 P3)(10 μ mol/L)和 6.5 μ L RNase-free H₂O,于 70℃条件下,反应 10 min 后,迅速置于冰上,冰浴 5 min。依次

加入以下试剂: 5 × M-MUL Buffer, 4 μL; Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-)(200 U/μL), 0.5 μL; RNase Inhibitor (40 U/μL), 0.5 μL; dNTP Mixture (10 mmol/L), 0.5 μL, 反应总体积为 20 μL。然后进行以下反应: 42℃, 保温 1 h; 70℃, 10 min, cDNA 产物于 -20℃ 保存备用。

取 3 μL cDNA 产物, 与 25 μL *Premix LA Taq* 和相应引物(T5/T3、C5/C3 和 P5/P3)(10 μmol/L)各 2 μL, 用 DDW 定容于 50 μL。然后进行以下反应: 首先 94℃ 变性 5 min; 94℃, 30 s, 48℃, 30 s, 72℃, 1 min, 进行 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 16℃ 保存。PCR 结束后, 取 8 μL 反应液在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 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。

1.2.4 PCR 产物回收、测序与序列分析

利用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver2.0 试剂盒对 PCR 目的电泳条带进行回收, 操作过程参照 TaKaRa 试剂盒说明书。回收后的 PCR 产物由宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)进行序列测定。对测定的序列在 GenBank 数据库进行 Blast 比较。

1.2.5 ELISA

取 0.1 g 新鲜病叶(干叶和种子各 0.05 g)于液氮条件下, 研磨成匀浆, 加 1 mL Extraction Buffer, 10000 rpm 离心 5 min。取 100 μL 上清液进行 DAS-ELISA 检测, 操作过程参照 Adgen 公司 ELISA 完全试剂包使用说明。以健康叶片为阴性对照, 每个样品检测 2 次, 并进行 3 次重复。

1.2.6 多重 RT-PCR、常规单一 RT-PCR 和 ELISA 在 TMV、CMV 和 PVY 检测中的应用比较

对广西百色 132 个烟草病毒病样进行多重 RT-PCR、常规单一 RT-PCR 和 ELISA 双重检测, 检测条件同上。取 0.1 g 病样, 加 500 μL DDW, 研磨成匀浆, 等体积分成 2 份, 每份均通过 DDW 按照 10n 的级数进行稀释, 稀释后产物分别用于 RT-PCR 和 ELISA 检测。共进行 3 个生物重复, 每个样品重复检测 3 次。

2 结果与分析

2.1 TMV、CMV 和 PVY 单一 RT-PCR 检测体系的验证

以健康烟草叶片为阴性对照, 提取 TMV、CMV 和 PVY 烟草病株叶片的总 RNA, 分别利用 T5/T3、C5/C3 和 P5/P3 进行 RT-PCR, 结果表明 TMV 扩增片段约为

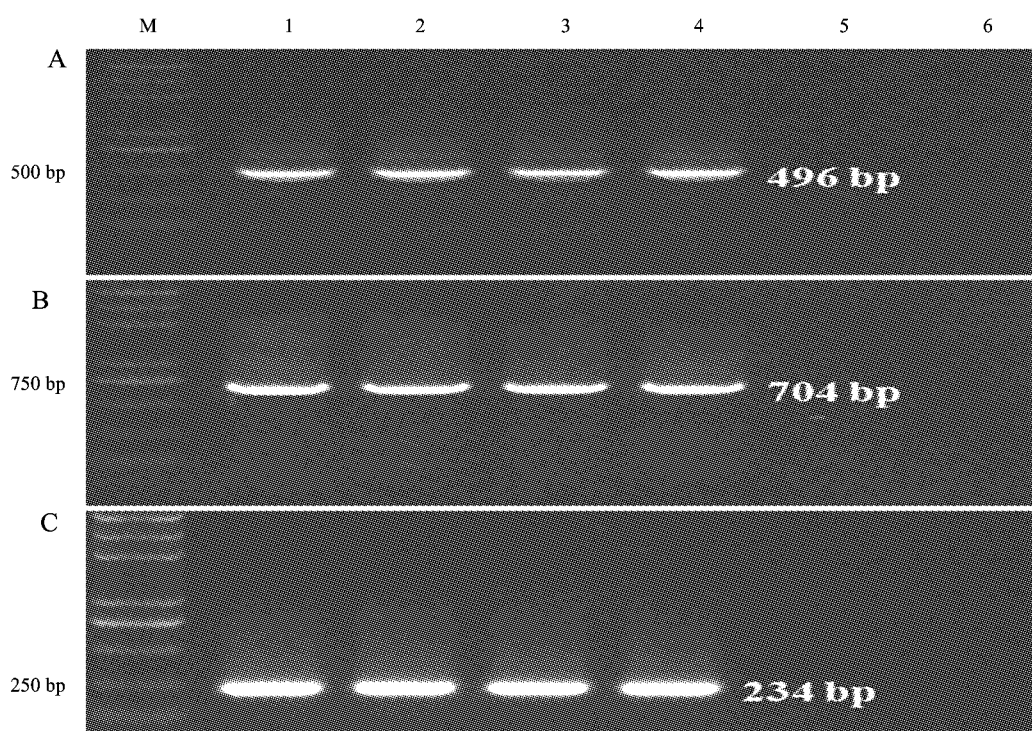
496 bp, CMV 扩增片段约为 706 bp, PVY 扩增片段约为 234 bp, 片段大小与引物设计预期相符, 而在健康烟草中均未检测到 3 个病毒片段的存在(图 1)。为进一步验证所扩增的核酸片段为目的病毒基因组序列, 对所扩增的片段进行回收纯化, 直接送于 TaKaRa 公司进行序列测定, 所测序列通过 BLAST 比较分析, 结果显示在相应毒源中所检测到的目的条带, 均为目的病毒基因组片段, 同源性均在 98% 以上, 片段含有的碱基数与电泳条带迁移率相一致。因此, 表明本研究所设计的 T5/T3、C5/C3 和 P5/P3 等 3 对引物, 分别对烟草中的 TMV、CMV 和 PVY 检测具有很高的特异性。

2.2 TMV、CMV 和 PVY 多重 RT-PCR 体系的建立

为建立完善的检测烟草中 TMV、CMV 和 PVY 多重 RT-PCR 体系, 本研究利用 *Premix LA Taq* (Loading dye mix) 试剂盒, 主要对多重 PCR 的退火温度进行了验证分析。在退火温度验证中, 选取了 45℃-58℃ 进行温度梯度 PCR, 结果显示在 52.4℃ 时, TMV、CMV 和 PVY 的检测条带单一、稳定(图 2)。因此, 在 50 μL 的反应体积中, dNTP Mixture 的浓度为 0.4 mmol/L, Taq 酶的浓度为 1.25 U/μL, Mg²⁺ 的终浓度为 2.5 mmol/L, 退火温度为 52.4℃ 时, TMV、CMV 和 PVY 的多重 PCR 检测最为稳定。

2.3 多重 RT-PCR、单一 PCR 和 ELISA 在 TMV、CMV 和 PVY 检测中的比较应用

同一初始样品通过连续稀释, 当样品稀释到 1/10⁷ 时, ELISA 已不能检测到 TMV、CMV 和 PVY 任何阳性信号, 而多重 RT-PCR 可在样品稀释到 1/10¹⁰ 时, 依然能够同时检测到 TMV、CMV 和 PVY 病毒粒子的存在(图 3)。病毒生物学试验结果也进一步验证了上述结论, 在多重 PCR 检测 CMV 和 PVY 呈阳性, 而 ELISA 检测结果呈阴性的 TMV 病样中, 通过汁液摩擦接种桔三生 3 叶期幼苗发现, 接种后的烟株均呈现枯斑和典型花叶症状, 通过单一 PCR 检测均能够检测出 CMV 或 PVY, 进一步验证了上述多重 PCR 检测结果(结果未显示)。单一 RT-PCR 对这 3 种病毒检测稀释限度中发现, TMV 的检测效率显著提高, 在初始样品稀释到 1/10¹² 时, 单一 PCR 能够稳定地检测到 TMV 的存在, 而多重 PCR 在样品稀释到 1/10¹¹ 时, 检测到的信号非常微弱, 甚至观察不到(图 4-A)。单一 PCR 在检测 CMV 比多重 PCR 检测的稀释限度高出 10 倍(图 4-B), 在检测 PVY 中, 两种方法检测的稀释极限相同, 均为初始样品的 1/10¹⁴(图 4-C)。



A: TMV 样品和引物验证; B: CMV 样品和引物验证; C: PVY 样品和引物验证

图 1 TMV、CMV 和 PVY 单一 RT-PCR 扩增

注: M: DL2000 Marker; 1-2: 新鲜毒源叶片; 3-4: 毒源干叶; 5-6: 健康叶片

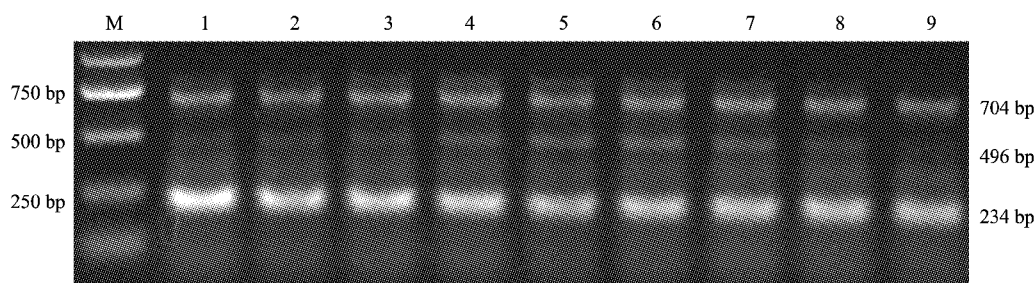


图 2 不同退火温度对多重 PCR 检测 TMV、CMV 和 PVY 效率的影响

注: M: DL2000 Marker; 1-9 分别表示退火温度为 45.7℃、46.5℃、47.8℃、49.5℃、51.1℃、52.4℃、54℃、55.6℃ 和 56.7℃ 的 PCR 产物。

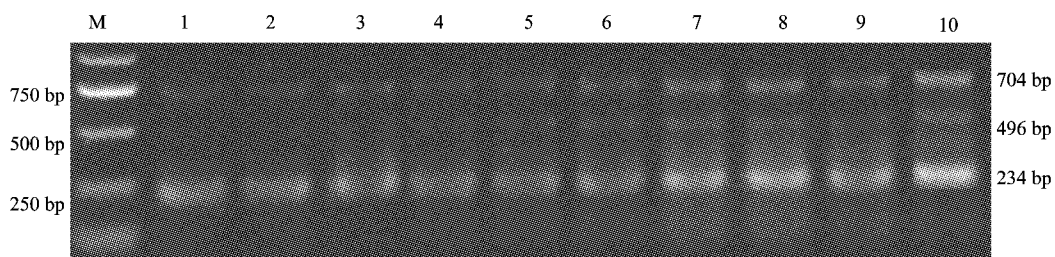


图 3 多重 PCR 检测 TMV、CMV 和 PVY 稀释限度

注: M: DL2000 Marker; 1-9 分别表示初始模板稀释了 10^{12} 、 10^{11} 、 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 和 10^3 时的 PCR 产物。

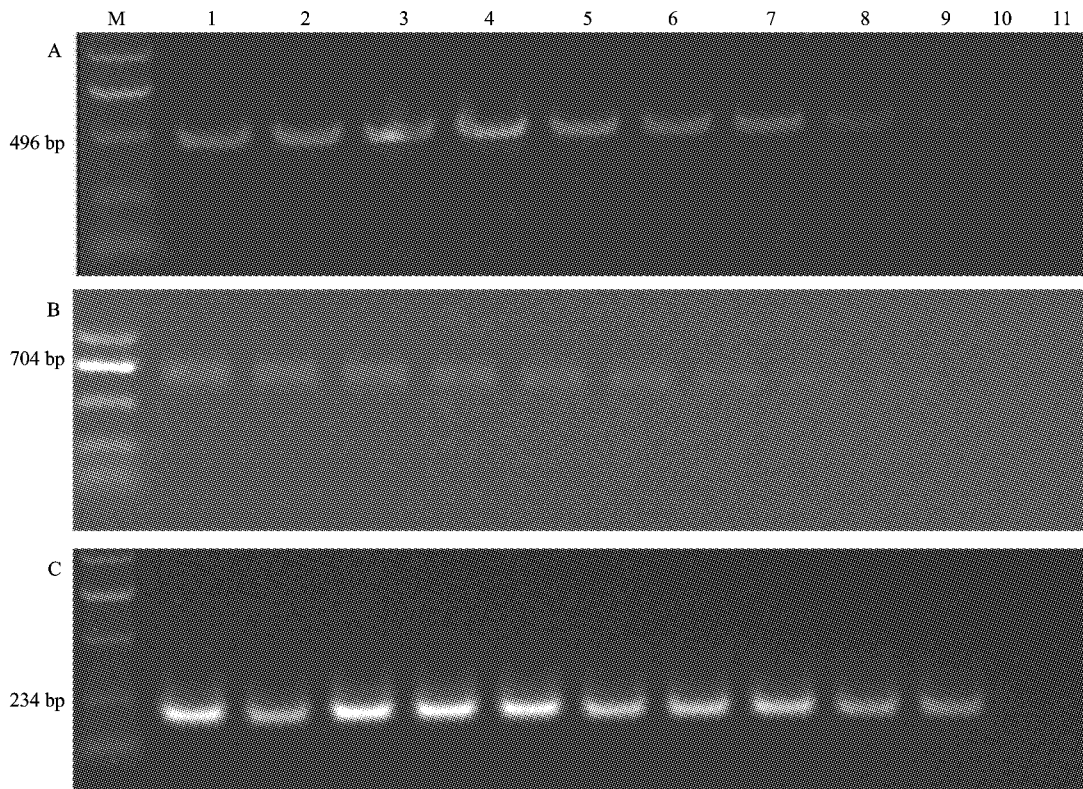


图 4 单一 PCR 检测 TMV(A)、CMV(B) 和 PVY(C) 的稀释限度

注: M: DL2000 Marker; 1-11 分别表示初始模板稀释了 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 和 10^{15} 时的 PCR 产物。

为了进一步验证该技术对同时检测 TMV、CMV 和 PVY 的灵敏性与特异性,本研究还利用常规单一 RT-PCR、多重 RT-PCR 和 ELISA 分别对广西百色 132 个烟草病毒样品进行比较检测,结果发现,常规单一 RT-PCR 和多重 RT-PCR 检测结果相同(表 2),单一 TMV 侵染为 48 个,单一 CMV 病样有 2 个,只有 PVY 侵染的病样为 6 个; TMV 与 CMV 混合侵染的有 9 个,检出率为 6.8%; TMV 与 PVY 混合侵染的 38 个,检出率为 28.8%; CMV 与 PVY 混合侵染的有 3 个,检出率为

2.2%; TMV、CMV 和 PVY 共同侵染有 26 个,检出率为 19.7%。而利用 ELISA 技术对上述样品进行检测,每种病毒和各种混合侵染的检出率均低于多重 RT-PCR 和单一 RT-PCR 的检测结果,最为明显的是 ELISA 检出 3 种病毒混合侵染率仅为 9.8%,不及多重 RT-PCR 检出率的 1/2。由此可见多重 RT-PCR 和单一 RT-PCR 较 ELISA 在检测 TMV、CMV 和 PVY 上具有较高的灵敏性和特异性。

表 2 多重 RT-PCR 与 ELISA 对 TMV、CMV 和 PVY 检测的比较分析

检测方法	数值	TMV*	CMV*	PVY*	T 和 C	T 和 P	C 和 P	T、C 和 P
多重 PCR	检出数	48	2	6	9	38	3	26
	检出率	36.4%	1.5%	4.5%	6.8%	28.8%	2.2%	19.7%
常规单一 PCR	检出数	48	2	6	9	38	3	26
	检出率	36.4%	1.5%	4.5%	6.8%	28.8%	2.2%	19.7%
ELISA	检出数	48	1	4	8	32	3	13
	检出率	36.4%	0.8%	3.3%	6.1%	24.2%	2.3%	9.8%

注: * 分别表示单一 TMV、CMV 和 PVY 侵染; T: TMV; C: CMV; P: PVY

3 讨论

研究室多年来的实地调查和检测发现,在生产中,烟草病毒病害多数为 TMV、CMV 和 PVY 混合侵染所致。准确、快速、简捷的检测和鉴定是对烟草病毒病进行正确预测预报和有效防治的前提。宋婷婷等^[5]建立了利用多重 RT-PCR 同步检测烟草上的 TMV 和 CMV 的技术体系,而对于 TMV、CMV 和 PVY 的同步检测未见报道,为了提高对这 3 种病毒的检测效率并降低检测成本,本研究建立了多重 RT-PCR 同步检测 TMV、CMV 和 PVY 的技术体系。

本研究中所建立的多重 RT-PCR 检测 TMV、CMV 和 PVY 的技术体系,在引物设计时,参考了 GenBank 中已登录的 TMV、CMV 和 PVY 所有序列,包括全基因组序列和部分基因片段序列,力争所设计的引物能够检测到这 3 种病毒的所有株系和基因型,同时要严格避免同烟草基因组的任何序列同源,为此在引物序列中存在许多兼并引物。而兼并引物的存在必然造成 PCR 条件的复杂化和检测效率的降低。因此,本研究重点对多重 PCR 的退火温度进行了验证,在引物设计过程中,软件推算出的退火温度均为 45℃-49℃,而在实际试验过程中,结果并不理想,通过提高退火温度显著提高了多重 PCR 在同步检测 TMV、CMV 和 PVY 的稳定性,最后将退火温度固定在 52.4℃。通过比较多重 RT-PCR、单一 PCR 和 ELISA 检测灵敏度发现,多重 RT-PCR 和单一 PCR 在检测 TMV、CMV 和 PVY 中灵敏度显著高于 ELISA,但单一 PCR 的灵敏度却优于多重 PCR,特别是在检测 TMV 过程,单一 PCR 的灵敏度是多重 PCR 灵敏度的 100 倍,推测可能是检测 TMV 的引物对中兼并引物过多,致使在多重 PCR 反应中灵敏性降低。但在实际应用中,对广西 132 个烟草病毒样品进行检测发现,常规单一 RT-PCR 和多重 RT-PCR 检测结果相同,可能是由于病样中相应病毒含量较高的缘故。

但多重 RT-PCR 检测体系较单一 PCR 检测体系具

有显著的优点。首先操作量减少,检测效率得以较大提高。对于烟草中 TMV、CMV 和 PVY 的检测,多重 RT-PCR 检测体系将单一 PCR 检测体系中的 3 次反应归为 1 次,节约了 2/3 的时间,极大的提高了检测效率。其次多重 RT-PCR 检测体系较单一 PCR 检测体系具有更好的经济性,试验成本减少了 2/3。当前,生产上常用的植物病毒检测体系为间接 ELISA,在本研究中,多重 RT-PCR 检测体系较间接 ELISA 具有更高的准确性和灵敏性,其检测稀释限度高出间接 ELISA 稀释限度的 10^4 的级数。同时,多重 RT-PCR 检测体系还可以稳定地检测到烟草干叶中(烘烤后)病毒的存在。而在种子带毒情况的检测中,只检测到了 TMV 的存在(结果未显示)。多重 RT-PCR 检测体系也存在自身的弊端,由于总 RNA 提取和 RT-PCR 过程均需要昂贵的试剂、仪器设备和专业实验室,这就造成在基层生产上很难得以推广使用。因此,还需要开发更加便捷、快速的检测技术和工具来指导服务基层生产。

本研究基于 GenBank 中已经登录的 TMV、CMV 和 PVY 所有的基因序列,并进行序列比对,选取最为保守的区域,进行引物设计,通过对这 3 对引物的退火温度的验证,建立了多重 RT-PCR 同步检测 TMV、CMV 和 PVY 导报技术体系。该技术将为烟草 TMV、CMV 和 PVY 等病毒病的预测预报和防治提供更加准确的科学数据。

参考文献

- [1] 陈瑞泰,韩晓东,史万华,等. 五省烟区烟草病毒类型的初步研究[J]. 中国烟草科学, 1986(1): 18-21.
- [2] 王海河,高文臣,魏宁生. 渭北烟区黄瓜花叶病毒酶联免疫检测方法[J]. 西北农业大学学报, 1999(4): 7-11.
- [3] 龙华,木崇俊,周庆,等. 澄江烟草病毒的初步电子显微研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 1995(17): 65-67.
- [4] 谷瑞华,王进忠,文思远,等. RT-PCR 快速检测 3 种烟草病毒技术[J]. 华北农学报, 2007(22): 21-23.
- [5] 宋婷婷,陈荣溢,杨雷亮. 应用多重 RT-PCR 检测烟草上的 TMV 和 CMV[J]. 辽宁农业科学, 2007(1): 53-54.