

菜豆荚斑驳病毒 RT-PCR 扩增产物胶体金层析检测方法的建立

曹 成¹, 魏梅生², 吴兴泉¹, 张永江², 李桂芬²

(1. 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 中国检验检疫科学研究院 动植物检疫研究所, 北京 100029)

摘 要: 菜豆荚斑驳病毒是我国进境植物检疫性有害生物, 为了能在现场快速检测出该病毒, 将 PCR 核酸扩增的高灵敏度和胶体金层析方法快速简便、直观的优点结合起来, 建立了 PCR 扩增产物的胶体金层析检测方法。该方法是用生物素标记上一个引物, 用荧光素(或地高辛)标记上另一个引物, 通过 PCR 扩增产生双标记的扩增产物。将兔抗生物素多克隆抗体与 20~30 nm 大小的胶体金颗粒结合上并固定在释放垫上, 同时在硝酸纤维素层析膜上点上抗荧光素(或地高辛)的单克隆抗体作为 T 检测点, 点上羊抗兔多克隆抗体作为 C 质控点。这种 RT-PCR 扩增产物可在 T 点上被检测到, 同时 C 点也要显色。用所建立方法在 15 min 内可检测出菜豆荚斑驳病毒的 RT-PCR 扩增产物, 免去了溴化乙锭染色和电泳的过程。

关键词: 胶体金; 试纸条; 菜豆荚斑驳病毒; RT-PCR; 核酸检测

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)06-1024-04

Detection of Bean Pod Mottle Virus RT-PCR Amplicon by Dipstick Assay

CAO Cheng¹, WEI Mei-sheng², WU Xing-quan¹, ZHANG Yong-jiang², LI Gui-fen²

(1. College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, Henan; 2. Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China)

Abstract: Bean pod mottle virus (BPMV) is a quarantine pest for China. In order to detect the virus on site, we have developed a rapid method for detection of RT-PCR amplicon of the virus. The method is performed by labeling one primer with biotin the other primer with fluorescein (or digoxigenin). The dual-labeled amplicon can be generated from routine polymerase chain reaction. Rabbit polyclonal antibody against biotin is conjugated with 20~30 nm colloidal gold particles fixed in a conjugate pad. Monoclonal antibody against fluorescein (or digoxigenin) is spotted on nitrocellulose membrane as T dot. Goat anti-rabbit polyclonal antibody is spotted on nitrocellulose membrane as C dot. The RT-PCR amplicon is detected on the test dot(T dot), while the C dot serves as a control. Using this method we have detected the RT-PCR amplicon of bean pod mottle virus within 15 minutes without the staining of ethidium bromide and the running of agarose gel.

Key words: Colloidal gold; Dipstick; BPMV; RT-PCR; Nucleic acid detection

菜豆荚斑驳病毒(Bean pod mottle virus, BPMV)是我国进境植物检疫性有害生物, 主要分布于美国^[1]、加拿大^[2]、巴西^[3]、秘鲁^[4]、厄瓜多尔^[5]、伊朗^[6]等国。该病毒可对大豆、菜豆和豇豆等植物造成产量损失和品质下降等危害。对该病毒的检测主要有双抗体夹心 ELISA^[7], 胶体金免疫层析(GICA), GICA-RT-PCR^[8], RT-PCR^[9-10], 实时荧光 PCR^[11](RTF-PCR)和生物芯片等方法, 但是这些方法都有着各自的缺点。

ELISA 和 GICA 等方法的基本原理是抗原和抗体的特异性反应, 是用植物病毒的抗体来检测植物病毒外壳蛋白抗原, 当植株体内病毒浓度低到一定

程度超出血清学方法的检测灵敏度时, 或者无某种病毒的抗体, 或病毒的抗体难以制备时, 则无法建立这种检测。聚合酶链式反应技术(PCR)或 RT-PCR 是对植物病毒目标核酸片段进行扩增放大进而检测的技术。普通 PCR 扩增后, 需要进行经溴化乙锭染色后的电泳检测才能判断 PCR 产物的有无和片段的大小, 因此试验人员要接触致癌物质溴化乙锭, 处理不当易造成环境污染。RTF-PCR 和生物芯片检测方法具有对仪器和软件的要求高, 检测试剂贵, 检测费用高, 普通实验室难以承受等缺点, 客观上限制了这种方法的广泛使用。

综上所述, 如何建立一种简便、快速、灵敏的在

收稿日期: 2010-08-05

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局资助项目(2009IK322)。

第一作者简介: 曹成(1986-), 男, 在读硕士, 从事检疫性植物病毒检测研究。E-mail: lllaohucuo@163.com。

通讯作者: 魏梅生, 研究员。E-mail: wms02@yahoo.com.cn。

现场检测中发挥作用的分子生物学检测方法是口岸检测急需解决的问题。

该研究以菜豆荚斑驳病毒为材料,将 PCR 核酸扩增的高灵敏度和胶体金层析方法快速简便、直观的优点结合起来,通过对 PCR 特异性引物进行修饰,再用胶体金标记特异性修饰物的抗体,最终实现对所扩增的目标核酸片段的特异性检测,建立胶体金核酸层析检测方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

毒原为 BPMV 分离物,接种在大豆 Essex 品种上保存。

1.2 引物设计

引物设计参照文献[12],预期扩增的片段大小为 653 bp。

普通引物:BPMVf;5'-ATA GTT CCA TTA GAG GGC GTG-3';BPMVr;5'-AGT GGA CCA TGT GAG AAA C-3'。

修饰引物:BPMVf - BI;5'-BI- ATA GTT CCA TTA GAG GGC GTG-3';BPMVr -FI;5'-FI- AGT GGA CCA TGT GAG AAA C-3';BPMVr -DI;5'-DI- AGT GGA CCA TGT GAG AAA C-3'。

1.3 大豆病叶中总 RNA 提取

取 0.1 g 新鲜病叶,加液氮研细,加入 1 mL Trizol,混匀,倒入 1.5 mL 离心管中。12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,将上清液倒入一个新的离心管中。加入 0.5 mL 三氯甲烷,猛烈振荡 15 s,4℃ 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min。小心吸取上层无色水相到新离心管中。加入等体积异丙醇,混匀,室温静置 10 min,4℃ 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,保留沉淀。加入 1 mL 75% 冷乙醇,悬浮沉淀,4℃ 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。沉淀真空离心干燥。加入 20 μL DEPC 水,溶解沉淀(必要时可于 55℃ ~60℃ 水浴,加速溶解),-80℃ 保存备用。

1.4 反转录和 PCR 扩增(RT-PCR)

1.4.1 反转录体系 10 μL 反转录体系(3.5 μL DEPC 水、2 μL 5 × Buffer 缓冲液、0.5 μL 下游引物、1 μL dNTP、0.5 μL RNasin、2 μL 的 RNA、0.5 μL 的 M-MLV 反转录酶),42℃ 水浴 50 min 后,合成 cDNA 链。

1.4.2 PCR 反应体系 取 2 μL 的反转录产物,加

10 × PCR Buffer(含有 Mg²⁺)2.5 μL、DEPC 水 18.2 μL、上游引物 0.5 μL、下游引物 0.5 μL、dNTP 1 μL、Taq 酶 0.3 μL,总体系为 25 μL 混匀后进行 PCR。

普通引物的 PCR 上下游引物用 BPMVf、BPMVr。修饰引物的 PCR 上下游引物用:BPMVf - BI, BPMVr - FI(或 BPMVr -DI)。

BI:生物素;FI:荧光素;DI:地高辛。

1.4.3 PCR 程序 94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s、61℃ 复性 30 s、72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 5 min 后保存于 4℃ 环境下。

取 5 μL PCR 产物于 1.0% 琼脂凝胶上 135 V 电泳 20 min,EB 染色,在凝胶成像仪上观察并记录结果。

1.5 层析试纸条的制作

1.5.1 20 ~30 nm 胶体金颗粒的制备 取 1% 氯金酸 0.6 mL,加 30 mL 超纯水加热煮沸。一次性快速加入 1% 柠檬酸钠 0.9 mL (37℃ 预温),溶液由蓝逐渐变为紫红色,煮沸 3 ~5 min,补水至原体积。冷却后,用 0.2 mol · L⁻¹ 碳酸钾调 pH 至 7.2 ~7.5,用 0.22 μm 滤膜无菌注射器压滤。

1.5.2 胶体金-抗体结合物的制备 取纯化好的抗体(兔抗生物素多克隆抗体)400 μg,在磁力搅拌下缓慢加入 20 ~30 nm 颗粒的胶体金液 20 mL(抗体浓度为 20 μg · mL⁻¹),室温搅拌 30 min。加入 10% 牛血清白蛋白(BSA)0.8 mL(终浓度为 0.4%),室温搅拌 5 min。加入 10% 的聚乙二醇(PEG20000)0.4 mL(终浓度为 0.2%),室温搅拌 5 min。取少量进行检定,其余置 4℃ 保存。

1.5.3 空白试纸条的制作 在 80 ×300 mm 双面胶塑料板 25 mm 端内侧粘附 25 ×300 mm 抗体固相硝酸纤维素层析膜(Whatman 公司的 RP,FP,SP 膜)。在双面胶塑料板 25 mm 端粘附 20 ×300 mm 玻璃纤维素条带,并与抗体固相 NC 膜重叠 2 mm。在双面胶塑料板 30 mm 端粘附 25 ×300 mm 宽的吸水纸与抗体固相 NC 膜重叠 2 mm。用 BioDot CM4000 切条机切成 4 mm 宽的空白试纸条。

1.5.4 T 检测点和 C 质控线点的点样 用切好的空白试纸条,针对不同的引物修饰可在空白试纸条层析膜上靠近玻璃纤维素端点上 1 μL 的 Anti-FI(或 Anti-DI)单克隆抗体作为 T 检测点。

在空白试纸条层析膜靠近吸水纸端点上 1 μL

羊抗兔抗体作为C质控点。

1.6 PCR产物的胶体金层析检测和结果判断

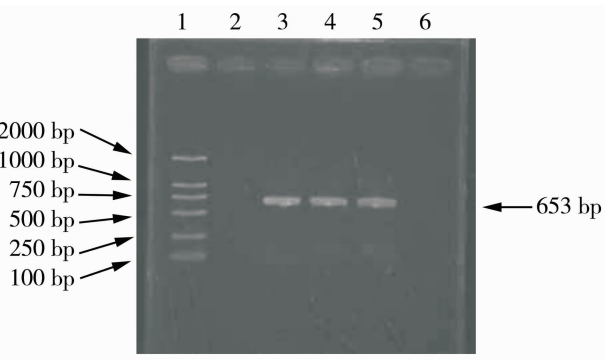
在小离心管中加入150 μL 胶体金标记的兔抗生物素多克隆抗体,加入50 μL 0.01 mol · L⁻¹,pH 7.2 的 PBS 缓冲液,再分别加入5 μL BI 和 FI (或 DI) 修饰引物的 PCR 产物。插入试纸条,计时15 min。

结果判断: C 点和 T 点都显色检测结果阳性;C 点显色而 T 点不显色则检测结果阴性。若 C 点不显色则结果不能判断。

2 结果与分析

2.1 PCR产物扩增结果

用普通引物反转录的 cDNA 作为模板,用1对普通引物和2对修饰的引物均能扩增出预期的653 bp 大小的 PCR 产物,健康对照则无相应的条带(图1)。表明用生物素、荧光素和地高辛修饰的引物可以正常工作,扩增出目标片段。



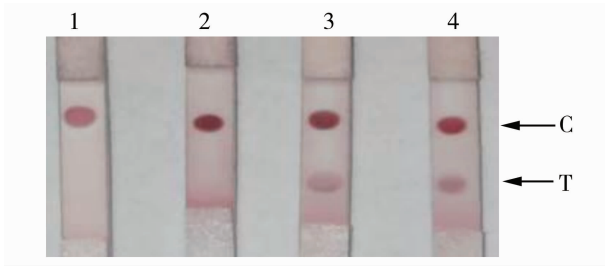
1:Marker (TaKaRa DL2000);2:健康对照;
3:普通 PCR 产物;4: BI 和 FI 修饰的 PCR 产物;
5: BI 和 DI 修饰的 PCR 产物;6:水空白对照
1:DNA Marker(TaKaRa DL2000); 2: Healthy soybean leaves control;3:Routine PCR amplicon; 4: PCR amplicon using biotin and fluorescein labeled primers; 5: PCR amplicon using biotin and digoxigenin labeled primers;
6:water control

图1 BPMV 的 RT-PCR 电泳图

Fig.1 Detection of BPMV by RT-PCR with routine and labeled primers

2.2 PCR 扩增产物的胶体金层析检测

2 对修饰的引物(分别为生物素和荧光素,生物素和地高辛修饰的引物对)的 PCR 产物胶体金层析(层析膜为 RP 膜)检测 C 和 T 都显色,检测结果为阳性,而1对普通引物 PCR 产物以及 PBS 缓冲液空白对照仅 C 显色而 T 不显色,结果为阴性(图2)。



1:PBS 缓冲液对照;2:普通 PCR 产物;3:FI 和 BI 修饰的 PCR 产物;4:DI 和 BI 修饰的 PCR 产物。

1:Buffer control ; 2: Routine PCR amplicon; 3: PCR amplicon using biotin and fluorescein labeled primers; 4: PCR amplicon using biotin and digoxigenin labeled primers.

图2 BPMV 的 RT-PCR 产物试纸条检测

Fig.2 Detection of BPMV RT-PCR amplicon by dipstick

2.3 不同层析膜的检测情况

采用 Whatman 公司不同流速的 SP, FP,RP 膜,其中 SP 膜流速最慢,FP 膜居中,RP 膜流速最快。BI 和 FI 修饰引物的 PCR 扩增产物用这3种流速不同的层析膜检测,当 PCR 产物为4 μL 和2 μL 时均可检测出来,在检测的 PCR 产物量为1 μL 时则 T 点没有显色,表明3种膜检测 PCR 产物的灵敏度无明显差别,鉴于 RP 的流速较快,故可优先使用 RP 膜,用于 PCR 产物的胶体金核酸层析检测。

2.4 对 BPMV 不同分离物的检测

采用胶体金核酸层析的方法和 RT-PCR 方法对菜豆荚斑驳病毒的不同分离物进行检测结果(表1),2 种方法均可有效地检测到 BPMV 的不同亚组的分离物,而健康对照结果为阴性。

表1 对 BPMV 不同分离物的检测结果

Table 1 Detection of different BPMV isolates by RT-PCR and dipstick

BPMV 分离物	RT-PCR	胶体金核酸层析
BPMV isolates	RT-PCR	Nucleic acid lateral flow dipstick
G7	+	+
Han	+	+
Hop	+	+
CB1	+	+

+ 表明检测结果为阳性。
+ indicated a positive result.

3 讨论

用生物素、荧光素(或地高辛)对用于菜豆荚斑驳病毒 PCR 扩增的引物进行修饰,扩增的双链 PCR

产物用所建立的胶体金核酸层析试纸条检测 15 min 即可显示结果。该研究建立的胶体金核酸层析检测方法,层析膜上的 T 点和 C 点的检测具有通用性,只要是经 BI 和 FI(或 DI)修饰的引物扩增出的双链 PCR 产物,均可检测到。这种方法检测的特异性是通过引物的特异性来实现的,特异性引物才能扩增出特定的目标片断,由于 BPMV 外壳蛋白基因高度保守,故这种方法可用于对 BPMV 不同亚组分离物的快速检测。

国外已有在 LAMP 扩增的基础上,建立对栎树猝死病菌(*Phytophthora ramorum*)等疫霉属真菌和对虾桃拉综合征病毒(Shrimp Taura syndrome virus)的核酸侧流快速检测方法^[13-14]。该研究中的胶体金核酸层析检测方法,是以普通 RT-PCR 对目标片段的扩增为基础。如何结合扩增效率更高的等温核酸扩增方法,建立更加简便有效的检测体系,还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Giesler L J, Ghabrial S A, Hunt T E, et al. Bean pod mottle virus a threat to U. S. soybean production[J]. Plant Disease, 2002, 86:1280-1289.
- [2] Michelutti R, Tu J C, Hunt D W A, et al. First report of Bean pod mottle virus in soybean in Canada [J]. Plant Disease, 2002, 86(3): 330.
- [3] Anjos J R N, Brioso P S T, Charchar M J A. Partial characterization of bean pod mottle virus in soybeans in Brazil [J]. Fitopatologia Brasileira, 1999, 24(1):85-87.
- [4] Fribourg C E, Perez W. Bean pod mottle virus (BPMV) affecting *Glycine max* (L) Merr. in the Peruvian jungle[J]. Fitopatologia, 1994, 29(3): 207-210.
- [5] Zettler F W, Stansly P A, Elliott M S, et al. Report of bean pod mottle virus in Southern American [J]. Plant Disease, 1989, 73(6): 518.
- [6] Shahraeen N, Ghotbi T, Salati M. First report of Bean pod mottle virus in soybean in Iran [J]. Plant Disease, 2005, 89(7):775.
- [7] 魏梅生,相宁,张春泉,等. 菜豆荚斑驳病毒的 RT-PCR 检测[J]. 大豆科学, 2005, 24(4):317-319. (Wei M S, Xiang N, Zhang C Q, et al. Detection of Bean pod mottle virus by RT-PCR [J]. Soybean Science, 2005, 24(4):317-319.)
- [8] 张晓雷,檀根甲,魏梅生,等. GICA-RT-PCR 检测菜豆荚斑驳病毒的新方法[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1019-1023. (Zhang X L, Tan G J, Wei M S, et al. A new method for detecting Bean pod mottle virus by GICA-RT-PCR [J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 1019-1023.)
- [9] 于翠,杨翠云,宋绍祎,等. 进口大豆上菜豆荚斑驳病毒的免疫捕获巢式 RT-PCR 检测[J]. 植物检疫, 2006, 20(4):201-203. (Yu C, Yang C Y, Song S W, et al. Detection of Bean pod mottle virus by immuno-capture nested RT-PCR from the imported soybean [J]. Plant Quarantine, 2006, 20(4):201-203.)
- [10] 闻伟刚,崔俊霞,赵秀玲,等. 半巢式 RT-PCR 检测进口大豆中菜豆荚斑驳病毒的研究[J]. 植物病理学报, 2006, 34(4):296-300. (Wen W G, Cui J X, Zhao X L, et al. Detection of Bean pod mottle virus by semi-nested RT-PCR in imported soybean [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(4): 296-300.)
- [11] 闻伟刚,谭钟,张吉红,等. 应用 TaqMan MGB 探针技术检测菜豆荚斑驳病毒[J]. 植物保护学报, 2009, 36(1):51-54. (Wen W G, Tan Z, Zhang J H, et al. Detection of Bean pod mottle virus using TaqMan MGB probe [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2009, 36(1): 51-54.)
- [12] Gu H, Clark A J, de Sa P B, et al. Diversity among isolates of Bean pod mottle virus[J]. Phytopathology, 2002, 92: 446-452.
- [13] Tomlinson J A, Dickinson M J, Boonham N. Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device [J]. Phytopathology, 2010, 100: 143-149.
- [14] Kiatpathomchai W, Jaroenram W, Arunrut N, et al. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 153:214-217.