

大豆花叶病毒的组织印迹与 RT-PCR 检测

战 勇^{1,2}, 喻德跃¹

(1. 南京农业大学 大豆研究所, 国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 2. 新疆农垦科学院 作物研究所, 新疆 石河子 832000)

摘 要:用改进的组织印迹方法批量检测黄淮地区 69 份 SMV 样品, 结果显示 42 个标样呈现非常清晰的蓝紫色阳性反应, 26 个标样显色较弱而无法确证, 1 个标样呈阴性反应。进一步对图片进行 600 dpi 扫描并放大 200 倍进行分析, 发现 26 个显色弱的标样中有 25 个呈阳性反应, 1 个标样显色很弱仍无法确证, 使得检出率提高了 37%。利用 RT-PCR 程序对随机选取的 8 个样品进行验证, 发现纯化与未纯化的 RNA 模板均能得到较为清晰的扩增条带, 而只有纯化后的 PCR 产物二次扩增才有预期的条带, 且双酶切可产生 245 bp、255 bp 和 307 bp 3 个预期的片段。表明改进的组织印迹方法能够用于批量、高效地检测 SMV, 而 RT-PCR 可用于更为精确的检验。

关键词:大豆花叶病毒检测; 组织印迹; RT-PCR

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)06-0915-05

Tissue Blotting and RT-PCR Detection of Soybean Mosaic Virus

ZHAN Yong^{1,2}, YU De-yue¹

(1. National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, National Center for Soybean Improvement, Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu; 2. Crop Research Institute, Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation Science, Shihezi 832000, Xinjiang, China)

Abstract: With improved tissue blotting approach, 69 SMV samples from the Yellow and Huaihe River areas were detected and the results showed that 42 samples presented a very clear blue-violet-positive reaction, 26 samples could not made conclusion for weaker color and one sample was negative. Further analysis by 600 dpi scan and enlarging the picture for 200 times, it was observed that 25 from 26 samples suffering from weak color showed positive results, and the negative standard sample were still unable to confirm the color, which makes the detection rate increased by 37%. RT-PCR verification were used in random selected eight samples and the results showed that both purified and unpurified RNA templates could obtain distinct bands, however, only the purified PCR products could be amplified repeatedly with the expected secondary bands, and the double-digestion could also produce three expected fragments, 245 bp, 255 bp and 307 bp. The results above indicated that the improved tissue blotting method could detect soybean SMV efficiently and bulkily, RT-PCR detection could be used in more precise testing.

Key words: Soybean mosaic virus; Tissue blotting; RT-PCR; Detection

酶联免疫吸附 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) 技术多用于大豆花叶病毒的血清检测, 可检测 $1 \sim 5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗原样品^[1-2], 但具有要求严格、耗时、对大量样品检测困难等缺点。组织印迹法 (Tissue blotting) 是在 ELISA 基础上发展起来的一种病毒检测技术, 在国外大规模病毒调查中具有有良好的应用效果, 可快速简便地进行检测, 在解剖镜辅助下可检测到 $1.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗原样

品^[3-5], 但也存在对操作技术要求高、试验成本高等不足之处。RT-PCR 技术灵敏度更高、特异性更强, 在病毒检测上已有广泛应用^[6-8], 但目前使用 RT-PCR 检测大豆花叶病毒的研究较少, 且批量检测较困难。该研究利用改进的组织印迹与 RT-PCR 相结合的技术, 检测该技术在黄淮地区大豆花叶病毒^[9]上的应用效果, 初步建立了有效的大豆花叶病毒的组织印迹与 RT-PCR 检测方法。

收稿日期: 2010-07-14

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目 (2010CB125906)。

第一作者简介: 战勇 (1972-), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事大豆育种与高产栽培研究。E-mail: shzzhy@163.com。

通讯作者: 喻德跃, 教授, 博士生导师。E-mail: dyu@njau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 组织印迹

1.1.1 植物材料 69个SMV标样(61个SMV分离物),阳性对照(CK1)为SC-7^[10]。在寄主南农1138-2(南京农业大学国家大豆改良中心提供)上繁殖保存。取刚发病5~10 d的嫩叶用于试验,阴性对照(CK2)为不接种的健康叶。

1.1.2 试验工具与设备 参照已报道的研究方法^[3,5],备好小自封口袋、手术刀片、干净的吸水滤纸、硝酸纤维素膜、大培养皿、摇床和4℃冰箱等。

1.1.3 试验药品及试剂 SMV包被抗体、酶标A蛋白(购自北京动植物植检实验所病毒检测中心);BCIP/NBT、BSA(购买于南京博彩公司)。

1.1.4 溶液配制 参见北京动植物植检实验所病毒检测中心随抗体提供的说明资料。

1.1.5 试验程序 参照已报道的研究方法^[3,5],主要包括切割样品、组织印迹、封闭、洗涤、加特异抗体、洗涤、加酶标A蛋白、洗涤、显色反应、终止显色和图片处理等步骤。略作改动如下:以酶标A蛋白代替酶标抗体;特异抗体和酶标A蛋白温育方式为37℃下2 h;显色液为BCIP/NBT 7 mg/14 mg,溶于40 mL底物溶液;在扫描仪下进行600 dpi扫描放大200倍,在电脑下对显色较弱的进行图片分析。

1.2 RT-PCR方法

1.2.1 酶制剂及缓冲液 DNase I、DEPC、RNasin、Hind III、Xho I(购于南京生兴公司);AMV、Taq酶、oligo(dT)18(购于南京申能博彩公司);引物参照周雪平等^[6]所用的序列(由上海申能博彩合成):5'-CATATGTCAGGCAAGGAGAAGGAA-3'(引物1),5'-TTTATTACTGCGGTGGGCCCATGCC-3'(引物2),在引物2的5端引入起始密码子ATG和NdeI酶切位点;在引物2的3端引入终止密码子TAATAA。

1.2.2 材料 同1.1.2,按张七仙^[11]的方法提取叶片的总RNA,按梁国栋^[12]的方法纯化RNA,总RNA和纯化的RNA保存在-70℃的超低温冰箱备用。

1.2.3 试验方法 RT-PCR反应^[6,13]:总RNA(5~6 μg)5 μL、oligo(dT)18(1 μg·μL⁻¹)1 μL、DEPC-SDW 4 μL,70℃温育10 min,迅速冰浴2 min。在冰浴上依次加入:5×RT buffer 4 μL、dNTP mix

(10 mmol·L⁻¹) 2 μL、RNasin (40 U·μL⁻¹) 0.5 μL、AMV (10 U·μL⁻¹) 2 μL、DEPC-SDW 1.5 μL,总20 μL,混匀,42℃反转录1 h,95℃变性5 min。取2 μL用于下一步的PCR扩增,其余放于-20℃冰箱。

取一新的离心管,冰浴上依次加入:cDNA 2 μL、10×PCR buffer 5 μL、MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 4 μL、dNTP mix (10 mmol·L⁻¹) 1 μL、正向引物(20 pmol·μL⁻¹) 0.5 μL、反向引物(20 pmol·μL⁻¹) 0.5 μL、Taq酶(5 U·μL⁻¹) 0.5 μL、DEPC-SDW 36.5 μL,共50 μL。进入30个PCR循环:93℃ 30 s,55℃ 1.5 min,65℃ 2 min。30个循环后,65℃保温5 min。取4 μL产物用于琼脂糖凝胶电泳,条带清楚后可再多扩增2管,均存于-20℃。

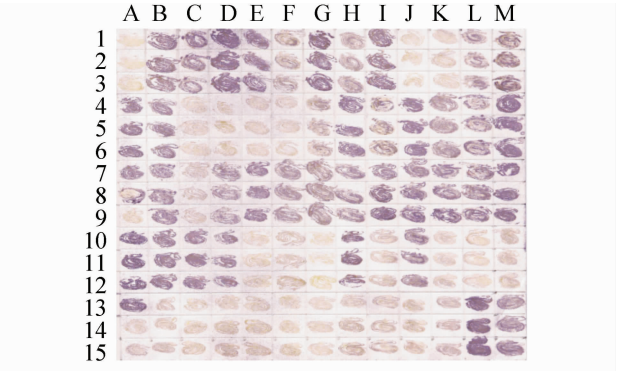
PCR产物二次扩增与酶切鉴定:取2 μL PCR产物及2 μL纯化后的PCR产物,参照上述PCR扩增体系再次扩增;PCR纯化产物的双酶切鉴定^[14]:建立如下体系:取一洁净的PCR管,冰浴上依次加入水26 μL、10×buffer Y + /TANQTM 8 μL、纯化产物(约3 μg)4 μL、Hind III (16 U·μL⁻¹) 1 μL、Xho I (10 U·μL⁻¹) 1 μL,总体积40 μL,将管置于PCR仪上37℃温育3 h,反应后分别取1.5 μL、2.5 μL、1 μL于8%的聚丙烯酰胺电泳。

2 结果与分析

2.1 组织印迹法

根据图1将显色反应分为4个等级(表1),“++++”和“+++”表示呈现非常清晰和较为清晰的蓝紫色阳性反应(与SC-7显色度相近),可明确为阳性反应,共发现包括42个标样(39个SMV分离物);“++”和“+”表示显色较弱和很弱,介于CK1与CK2之间,无法明确判断是否为阴性反应,共包括26个标样(21个SMV分离物);“-”表示阴性反应,仅1个标样与CK相同,呈阴性反应,检出率仅为62%。

用扫描仪将图1以600 dpi扫描并放大200倍,可以清楚地分辨出颜色反应,甚至着色部位也很清楚。对等级为显色弱及以下的共27个标样进行图片分析表明,JS2081(G10)呈阴性反应,JS2161(F13)显色很弱,需要进一步检测,其余25个均可确定为阳性反应(图2)。检出率提高到99%,提高了37个百分点。



A1 ~ A3: 阴性对照; A4 ~ A6: 阳性对照; A6 ~ A15: 单个标样; B 列 ~ M 列: 每列 5 个标样, 重复 3 次。
A1 ~ A3: Negative control; A4 ~ A6: Positive control;
A6 ~ A15: Single sample; B line ~ M line: Five samples per line and three repetitions per sample in the same column.

图 1 SMV 标样的组织印迹测定
Fig. 1 Tissue blotting detection of SMV

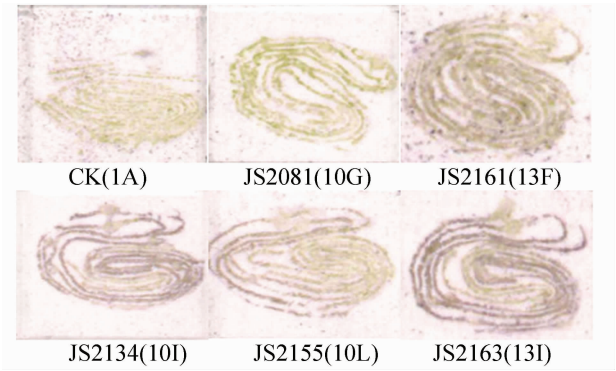


图 2 组织印迹扫描放大图片 (括号内是本页片在图 1 中的位置)
Fig. 2 Tissue blotting scan pictures, the numbers and letters in the bracket indicate the corresponding positions of it in Fig. 1

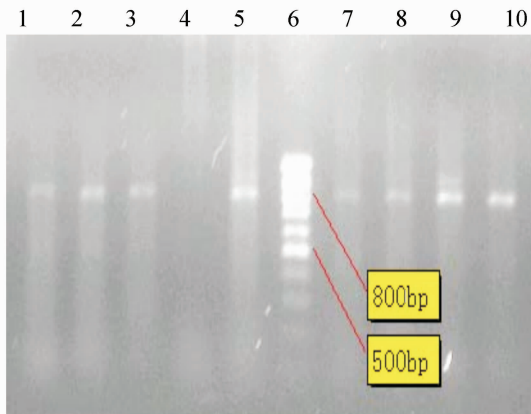
表 1 大豆 SMV 标样的组织印迹显色分级
Table 1 The color reaction classification of tissue blotting of SMV

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
	CK	SD1012	SD1052	SD1066	SD1068	SD1073	SD1077	HN1080	HN1081	AH2001	AH2002	AH2007	AH2008
1	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	++	++++	++++
2	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	++	++++	++++
3	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	++	++++	++++
	Sc - 7	AH2010	AH2030	AH2030	AH2034	AH2035	AH2040	AH2171	HN2220	HN2226	HN2228	HN2230	HN2236
4	++++	++++	++	++	++	++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
5	++++	++++	++	++	++	++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
6	++++	++++	++	++	++	++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
	1070	HN2237	HN2238	HN2240	HN2241	HN2242	HN2242	HN2243	HN2243	HN2244	HN2244	HN2245	HN2247
7	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1072	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	2006	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
9	-	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	2009	HN2248	HN2249	JS2007	JS2011	JS2011	JS2081	JS2087	JS2134	JS2139	JS2152	JS2155	JS2155
10	++++	++++	++++	++++	++	++	-	++++	++	++++	++	++	++
	2020	++++	++++	++++	++	++	-	++++	++	++++	++	++	++
11	++++	++++	++++	++++	++	++	-	++++	++	++++	++	++	++
	2021	++++	++++	++++	++	++	-	++++	++	++++	++	++	++
12	++++	js2006	JS2157	JS2158	JS2158	JS2160	JS2161	JS2162	JS2162	JS2163	JS2164	JS2165	JS2186
13	++++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+++	++++	++++
	js2151	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+++	++++	++++
14	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+++	++++	++++
	js2154	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+++	++++	++++
15	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+++	++++	++++

++++、+++、++、+、-: 显色由强到弱的等级; -: 阴性反应; A1 ~ A3: 阴性对照; A4 ~ A6: 阳性对照; A6 ~ A15: 单个标样; B 列 ~ M 列: 每列 5 个标样, 重复 3 次。
++++、+++、++、+、-: Symbol of color reaction classification from dark color to light color; -: Symbol of negative reaction; A1 ~ A3: Negative control; A4 ~ A6: Positive control; A6 ~ A15: single sample; B line ~ M line: Five samples per line and three repetitions per sample in the same column.

2.2 RT-PCR 方法

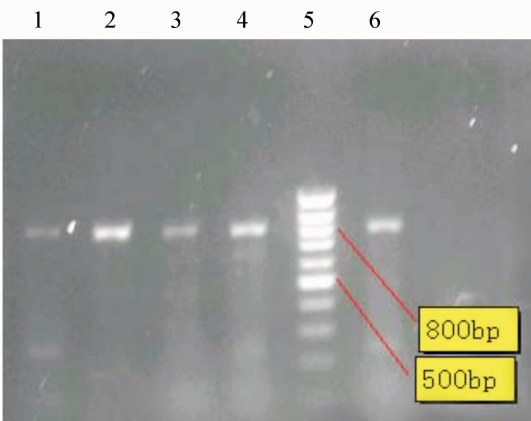
2.2.1 RT-PCR 的扩增 选取纯化和未纯化的 RNA 样品共 8 个,设 1 个阳性对照(CK1)和 1 个阴性对照(CK2),进行 RT-PCR 扩增,并取扩增产物 4 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,结果表明:纯化的 RNA 可扩增出清晰的条带(图 3);未经纯化的 RNA 除阴性对照未能扩增出预期条带外,其余 8 个标样及阳性对照均能扩增出预期条带,其中阳性对照 SC-7 的含量低且杂质含量较多,也有较为清晰的条带(图 4)。表明此体系非常敏感、稳定,可以很好地用于 SMV 的快速检测。



1:SD1012;2:SD1068;3:AH2008;4 CK2; 5:CK1; 6:DNA Marker,100 bp;7:HN2228;8:HN2236;9:JS2007;10:JS2087.

图 3 未纯化 RNA 的 RT-PCR

Fig.3 RT-PCR products of non-purified RNA



1:SD1012;2:JS2087;3:HN2228;4:AH2040;
5: DNA Marker,100bp;6:HN2236.

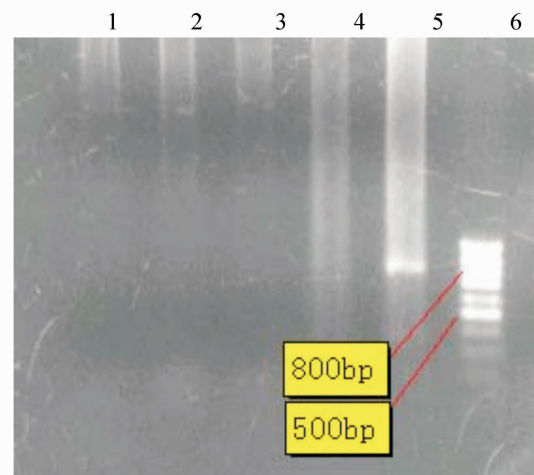
图 4 纯化 RNA 的 RT-PCR 产物

Fig.4 RT-PCR products of purified RNA

2.2.2 PCR 产物的二次扩增与酶切鉴定 取 SD1073 纯化和 4 个未纯化的 PCR 产物各 2 μL ,其它组分同上述扩增体系,直接进行二次扩增,结果只有纯化后的产物可扩增出预期条带(图 5),表明要进行二次扩增,最好将产物纯化后再进行。二次扩增扩出了预期大小的片段同时也表明,反转录及产物扩增正确。

根据储瑞银^[15]、刘俊君^[16]等发表的 SMV-CP 基因的序列,采用 DNAssist Version2.0 软件分析序

列的酶切位点,在 500 bp 处有 1 个 *Hind* III 酶切位点(A/AGCTT),在 245 bp 处有 1 个 *Xho* I 酶切位点(C/TCGAG)。理论上,用双酶切可产生 245 bp、255 bp 和 307 bp 3 个片段。取 SD1073(后面的鉴别寄主鉴定结果表明 SD1073 属 SC-4 株系群)的纯化后的 PCR 产物 4 μL ,进行双酶切反应,反应后分别取 1.5 μL 、2.5 μL 、1 μL 上样于 8% 的聚丙烯酰胺胶。由图 6 可知:在 300 bp 稍上一点有 1 条带,其下 250 bp 左右有 2 条带,与理论上的预期片段大小相符。因此可初步确定,可以用这 2 种酶将 SMV-CP 切割为预期大小的 3 个片段,即从侧面证明了扩增产物的正确性。



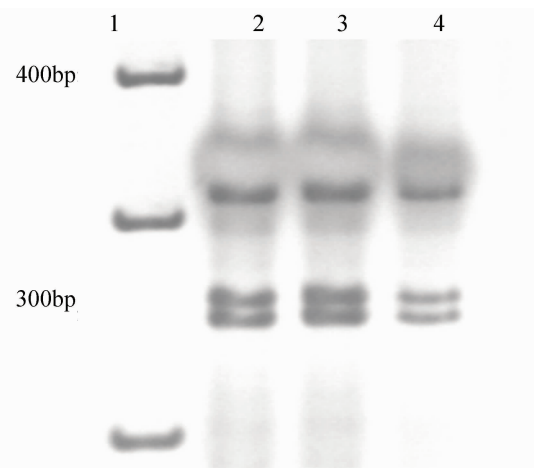
1~4:HN2237, HN2241, JS2134, SD1073;5:SD1073 纯化产物的二次扩增条带。6: DNA Marker,100bp.

1~4: HN2237, HN2241, JS2134, SD1073;

5:Re-amplified band of purified RT-PCR product of SD1073; 6:DNA Marker,100bp.

图 5 RT-PCR 产物的再扩增

Fig.5 Re-amplified of RT-PCR products



1: DNA Marker, 100 bp;2~4: SD1073 纯化物双酶切产物的上样量分别为 1.5 μL 、2.5 μL 、1 μL .

1: DNAMarker,100 bp; 2~4: 1.5 μL , 2.5 μL , 1 μL of Enzyme-digested products.

图 6 RT-PCR 纯化产物的双酶切

Fig.6 Two-enzymatic hydrolysis of purified RT-PCR products

3 结论与讨论

该研究将组织印迹检测程序在抗体和显色液用量及在对待轻度感病样品的检测上做了改进,能够更加快速高效地对大量样品进行检测,尤其是高分辨率的扫描放大后,图片可非常直观地显示出病毒的附着部位。

利用周雪平等^[6]采用的 1 对特异引物建立了一套 RT-PCR 体系,随机选取的 8 个标样都能扩增出与阳性对照相同的特异条带,而阴性对照无任何条带。对 1 个阳性产物进行了二次扩增和双酶切鉴定,也得到了证实。这些标样在后来的株系鉴定中^[9]分别归为 SC-3、SC-4、SC-5、SC-7、SC-8 5 个株系群,1 个未归入原先的株系群,表明本体系程序简便、稳定,适用性好。

RT-PCR 检测是在组织印迹检测之前进行的,由于随机取样的原因未能选入印迹结果中的弱显色样品。因此,对弱显色样品的 RT-PCR 验证还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 吴云锋. 植物病毒学原理与方法[M]. 西安:西安地图出版社, 1999. (Wu Y F. Principles and methods of plant virology [M]. Xi'an: Xi'an Map Press, 1999.)
- [2] 张仲凯,李毅. 云南植物病毒[M]. 北京:科学出版社, 2001. (Zhang Z K, Li Y. Plant virus in Yunnan [M]. Beijing: Science Press, 2001.)
- [3] 徐明全,郑平. 植物病毒检测技术——组织印迹法[J]. 微生物学通报, 2000, 27(5):360-363. (Xu M Q, Zheng P. A technique for detection of plant viruses-tissue blotting[J]. Microbiology, 2000, 27(5):360-363.)
- [4] Hsu H T, Lawson R H. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in impatiens [J]. Plant Disease, 1991, 75(3):292-295.
- [5] Lin N S, Hsu Y H, Hsu H T. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes [J]. Phytopathological, 1990, 80(9): 824-828.
- [6] 周雪平,濮祖芹,方仲达,等. 大豆花叶病毒外壳蛋白基因克隆及在病毒检测中的应用[J]. 病毒学报, 1994, 10(1): 81-85. (Zhou X P, Pu Z Q, Fang Z D, et al. Construction and use of cloned soybean mosaic virus (SMV) coat protein gene as probe for the detection of SMV[J]. Chinese Journal of Virology, 1994, 10(1): 81-85.)
- [7] 赵玖华,尚佑芬,杨崇良,等. RT-PCR 技术检测大豆花叶病毒的研究[J]. 山东农业科学, 2000(4): 34-35. (Zhao J H, Shang Y F, Yang C L, et al. Study on the detection of soybean mosaic virus with RT-PCR technique[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2000(4): 34-35.)
- [8] 张景凤,赵慧,桂晋刚,等. 利用 RT-PCR、DNA 序列分析及原核基因表达对我国大豆花叶病毒进行分子鉴定[J]. 植物学报, 1999, 41(9): 932-935. (Zhang J F, Zhao H, Gui J G, et al. Molecular characterization of a chinese soybean mosaic virus isolate by RT-PCR, cDNA sequence analysis and direct expression of PCR products in bacteria[J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(9):932-935.)
- [9] 战勇,智海剑,喻德跃,等. 黄淮地区大豆花叶病毒株系的鉴定与分布[J]. 中国农业科学, 2006, 39(10): 2009-2015. (Zhan Y, Zhi H J, Yu D Y, et al. Identification and distribution of SMV strains in Huang-Huai valleys[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(10):2009-2015.)
- [10] 杨雅麟. 长江中下游地区大豆花叶病毒(SMV)株系组成、分布及抗性研究[D]. 南京:南京农业大学, 2000. (Yang Y L. Classification and distribution of strains of soybean mosaic virus in the middle and lower Changjiang river valleys and the resistance to soybean mosaic virus in soybeans [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2000.)
- [11] 张七仙,刘俊起,李成霞,等. 一种简捷的同时提取植物总 DNA 和总 RNA 的方法[J]. 中国农业科学, 2001, 34(4): 458-460. (Zhang Q X, Liu J Q, Li C X, et al. A simple and rapid method for preparing genomic DNA and total RNA from plant tissues[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2001, 34(4): 458-460.)
- [12] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京:科学出版社, 2001. (Liang G D. Newest molecular biology experimental technique[M]. Beijing: Science Press, 2001.)
- [13] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 北京:科学出版社, 2002. (Yang J X. Laboratory techniques course of biochemistry and molecular biology[M]. Beijing: Science Press, 2002.)
- [14] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社, 1993. (Lu S D. Current protocols for molecular biology [M]. Beijing: Higher Education Press, 1993.)
- [15] 储瑞银,冷晓红,鲍一明,等. 应用聚合酶链式反应扩大大豆花叶病毒外壳蛋白基因及其序列分析[J]. 植物学报, 1992(7):523-527. (Chu R Y, Leng X H, Bao Y M, et al. Amplification of soybean mosaic virus coat protein gene by polymerase chain reaction and its sequence analysis[J]. Acta Botanica Sinica, 1992(7):523-527.)
- [16] 刘俊君,彭学贤,李荔,等. 大豆花叶病毒外壳蛋白基因的克隆和在大肠杆菌中的表达[J]. 生物工程学报, 1993, 9(3): 198-203. (Liu J J, Peng X X, Li L, et al. Cloning and expression of coat protein gene of soybean mosaic virus in *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1993, 9(3): 198-203.)