

实验方法与amp;技术

Experimental Method & Technology

单管多重 RT-PCR 同时检测大豆种子中
三种检疫性植物病毒易汪雪¹, 宋绍祎¹, 吴东妮², 代欢欢³, 杨翠云¹, 于 翠^{1*}

(1. 上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135; 2. 中国科学院上海生命科学研究院, 上海生命科学信息中心, 上海 200031; 3. 合肥师范学院, 合肥 230601)

摘要 我国大豆年进口量持续增长, 快速、准确地检测进境大豆种子中可能携带的病原物是防止检疫性有害生物入境传播和扩散的有效手段。菜豆荚斑驳病毒(BPMV)、烟草环斑病毒(TRSV)和番茄环斑病毒(ToRSV)均是被大豆种子携带的检疫性有害生物。本研究建立了在单一 PCR 管中同时检测这 3 种检疫性植物病毒及大豆内源基因 Bd-30 K 的多重 RT-PCR 方法。研究表明, 所建立的多重 RT-PCR 方法具有较好的特异性和灵敏度, 检测含 BPMV、TRSV 和 ToRSV RNA 的最低浓度分别为 0.45、0.0093 和 0.004 ng/ μ L, 从大豆种子中同时检测 3 种病毒的最低 RNA 浓度为 0.58 ng/ μ L。

关键词 菜豆荚斑驳病毒; 烟草环斑病毒; 番茄环斑病毒; 多重 RT-PCR; 同时检测

中图分类号: S 435.651, S 432.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.05.019

Simultaneous detection of three quarantine plant viruses from
soybean seeds by multiplex RT-PCR in single PCR tubeYi Wangxue¹, Song Shaoyi¹, Wu Dongni², Dai Huanhuan³, Yang Cuiyun¹, Yu Cui¹

(1. Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China; 2. Shanghai Information Center for Life Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 3. Hefei Normal College, Hefei 230601, China)

Abstract The quantity of soybean seeds imported were continually increased in recent years. Rapid detection of seed-borne pathogens is essential to efficiently prevent pest invading and spreading. *Bean pod mottle virus* (BPMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV) and *Tomato ringspot virus* (ToRSV) are the quarantine pest which could be carried by the soybean seeds. We developed the multiplex RT-PCR approach for simultaneous detection of BPMV, TRSV, ToRSV and one endogenous gene Bd 30K in the single PCR tube from soybean seeds. The results indicated that good specificity and sensitivity for simultaneous detection were obtained. The limit detection of RNA with BPMV, TRSV and ToRSV were 0.45 ng/ μ L, 0.009 3 ng/ μ L and 0.004 ng/ μ L, respectively. The limit detection of RNA with three viruses mixture was 0.58 ng/ μ L.

Key words *Bean pod mottle virus*; *Tobacco ringspot virus*; *Tomato ringspot virus*; multiplex RT-PCR; simultaneous detection

大豆是我国重要的经济作物, 是日常食物和食用油的重要原材料。由于国内大豆产量与实际消费量之间存在很大差距, 我国每年都从美国、巴西、阿

根廷等国进口大量大豆。大豆在生长过程中会遭受多种真菌、细菌、病毒或线虫的侵染, 其中菜豆荚斑驳病毒(*Bean pod mottle virus*, BPMV)、烟草环斑

收稿日期: 2015-11-06 修订日期: 2015-12-24

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科字(2012)第 2-8 号]; 上海出入境检验检疫局科研项目(HK005-2014)

* 通信作者 E-mail: yuc@shciq.gov.cn

病毒(*Tobacco ringspot virus*, TRSV)和番茄环斑病毒(*Tomato ringspot virus*, ToRSV)是在进境大豆中经常检出的3种检疫性病毒^[1-2]。据报道, ToRSV和TRSV大豆种传率可分别达到76%和40%~100%, BPMV种传率虽然较低(0.01%~0.013%)但经常种皮带毒^[3]。大豆遭病毒侵染后会影 响大豆的生长发育, 严重时导致豆荚不发育或败育、种子活力丧失, 产量和品质严重下降。更为重要的是, 大豆易携带的检疫性病毒 BPMV、ToRSV 和 TRSV 寄主范围广泛, 如果随国际贸易传入我国, 不仅会对我国大豆产业带来严重影响, 也会对其他经济、蔬菜或花卉作物造成严重威胁。建立准确、快速和灵敏的病毒检测方法是防止检疫性病毒随大豆种子贸易传入我国的有效手段。

RT-PCR 技术是当前口岸检疫性病毒检测的重要手段之一, 具有准确、快速、灵敏、操作简单和经济实用等优点。尽管已有利用多重 PCR 技术对数种植物病毒同时检测的研究报道^[4-6], 但这些研究所用的试验样品多为感病叶片材料, 在国内尚未见直接从大豆种子中同时检测多种检疫性植物病毒 的报道。为了应对国际贸易中快速、准确地对多种检疫性植物病毒同时检测的需要, 我们开展了从大豆种子中同时检测 BPMV、TRSV 和 ToRSV 的检测方法研究, 同时为控制整个试验过程, 我们设置了大豆内源基因 Bd 30K 作为内控对照。本文报道单管多重 RT-PCR 同时检测这 3 种检疫性植物病毒的方法。

1 材料和方法

1.1 供试材料

带有 BPMV 的大豆由上海出入境检验检疫局口岸截获。TRSV 和 ToRSV 毒源由实验室保存, 在隔离检疫温室中将两种病毒分别接种大豆幼叶, 待其结籽后获得。南方菜豆花叶病毒(*Southern bean mosaic virus*, SBMV)和花生矮化病毒(*Peanut stunt virus*, PSV)作为特异性对照, 购自 Agdia 公司, 于实验室-20℃冰箱保存。

1.2 引物的设计

根据 GenBank 发表的 TRSV(GenBank 登录号: AF461163, AY363727, AY787756, L09205, NC-005096)和 ToRSV(GenBank 登录号: AF135407, AB451183, FJ577795, EF370299 和 NC-003839)CP 基因的序列保守区分别设计特异性引物, BPMV 和 大豆内源基因 Bd 30K 的引物按照文献^[7-8], 均由上海 Invitrogen 生

物技术有限公司合成。引物的序列及扩增片段的长度见表 1。

表 1 检测 BPMV、TRSV、ToRSV 和 大豆内源基因 Bd 30K 的引物序列及扩增长度

Table 1 Sequences of primers used for PCR detection of BPMV, TRSV, ToRSV and Bd 30K

引物 Primer	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	扩增 长度/bp Length
BPMV F	CTGCTGATGTTCTTGCAAAGCG	275
BPMV 1-R	AGACAGAATTTCTCCTGTGCCAT	
TRSV F-2	GATGCAAAGAAAGGAAAGC	580
TRSV R-2	AGATATGGACAACATGGAGG	
ToRSV RNA1F	AGTCGCCATCTTGAAGGTGG	794
ToRSV RNAR	CCTTAGACGGTTTGAGTCTCTC	
Bd 30K-F	TGTCATCACCCAAGTAAAGTACCA	104
Bd 30K-R	CAAGGTCTCCTGTTGCTATTGC	

1.3 RNA 提取

将携带 BPMV、TRSV、ToRSV 及健康的大豆种子粉碎成大豆粉后, 分别称取 60 mg, 利用 Tiangen 公司的 RNAprep 植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用于建立单个病毒及内源基因 RT-PCR 方法。

分别称取 30 mg 携带 BPMV、TRSV、ToRSV 的大豆粉, 两两混合后, 利用 Tiangen 公司的 RNAprep 植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用于建立双重 RT-PCR 方法。

分别称取 20 mg 携带 BPMV、TRSV、ToRSV 的大豆粉, 三者混合后, 利用 Tiangen 公司的 RNAprep 植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。用于建立 3 种病毒的三重 RT-PCR 方法及 3 种病毒和 大豆内源基因 Bd 30K 的四重 RT-PCR 方法。

1.4 cDNA 第一链的合成

单一反应 cDNA 的合成: 每种病毒各自进行反转录。反转录体系: 2 μL 模板 RNA、1 μL AMV 反转录酶(10 U/μL, Promega)、0.25 μL RNase 抑制剂(40 U/μL, Promega)、0.5 μL 下游引物(20 μmol/L)、4 μL dNTPs(各 2.5 mmol/L)和 5 μL 5×AMV buffer, 加水补足 25 μL。

双重和多重反应 cDNA 的合成: 提取含混合病毒样本的总 RNA, 在单一管中进行反转录。反转录体系同单一反应 cDNA 的合成, 但需同时加入合成相应病毒 cDNA 的下游引物。

1.5 PCR 检测

单一 PCR 检测: 分别完成 3 种病毒和内源基因 Bd 30K 的 PCR 检测。PCR 检测体系: cDNA 1 μL、10

× buffer (含 Mg^{2+}) 3 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L、上下游引物 (20 μ mol/L) 各 0.25 μ L, *rTaq* 0.25 μ L, 灭菌水补足 30 μ L。PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min 后保存于 4 $^{\circ}$ C。

双重和多重 PCR: 在同一管中完成双重或多重 PCR 反应。其反应体系和条件基本同单一 PCR 检测, 但在添加引物时, 需同时加入扩增相应目的基因的引物, 如检测内源基因, 其引物浓度为病毒引物浓度的 2 倍。

1.6 引物的特异性试验

分别提取带有 BPMV、TRSV、ToRSV 的大豆粉总 RNA, 侵染大豆的 SBMV、PSV 阳性对照 RNA, 及健康大豆种子的总 RNA, 以 BPMV、TRSV、ToRSV 及 Bd 30K 引物分别进行扩增, 检测 4 对引物的特异性。

1.7 PCR 检测灵敏度

将分别携带 BPMV、TRSV、ToRSV 的大豆总 RNA 和健康的大豆总 RNA, 利用分光光度计测定总 RNA 的浓度分别为 0.045、0.093、0.004 和 0.19 μ g/ μ L。将提取的总 RNA 进行 10 倍梯度稀释, 用于单一病毒 RT-PCR 灵敏度测定。

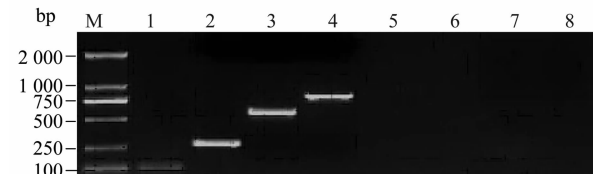
将同时含有 3 种病毒的大豆总 RNA (浓度为 0.058 μ g/ μ L) 进行 10 倍梯度稀释, 用于四重 RT-PCR 灵敏度测定。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测的特异性

分别从携带 BPMV、TRSV、ToRSV 及健康的大

豆种子中提取总 RNA 进行反转录后, 以设计的特异引物对其 RT-PCR 检测, 结果均能扩增出预期大小的 DNA 条带, 而从南方菜豆花叶病毒 (图 1)、花生矮化病毒、健康大豆中未能扩增到病毒特异条带 (图片未显示), 表明针对 BPMV、TRSV、ToRSV 设计的引物特异性好。



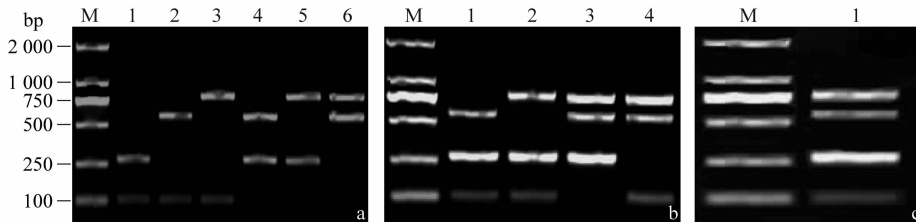
M: DL2000 marker; 1: Bd 30K; 2: BPMV; 3: TRSV; 4: ToRSV; 5: 以 BPMV F/1-R 引物扩增 SBMV 对照; 6: 以 TRSV F-2/R-2 引物扩增 SBMV 对照; 7: 以 ToRSV RNA 1F/R 引物扩增 SBMV 对照; 8: 以 Bd 30K F/R 引物扩增 SBMV 对照

图 1 BPMV、TRSV、ToRSV 和 Bd 30K 引物特异性的检测

Fig. 1 Specificity of primers for detection of BPMV, TRSV, ToRSV and Bd 30K in soybean seeds

2.2 双重和多重 RT-PCR 检测结果

将携带 BPMV、TRSV、ToRSV 的大豆种子两两混合和三者混合后提取总 RNA 进行反转录, 以相应引物进行双重或多重 PCR 反应, 结果每个双重 RT-PCR 反应都能扩增到 2 条预期大小的 DNA 条带 (见图 2a), 在三重 RT-PCR 中均能扩增出 3 条预期大小的 DNA 条带 (见图 2b), 在四重 RT-PCR 中能扩增出 BPMV、TRSV、ToRSV 和内源基因的特异性片段 (见图 2c)。多重 RT-PCR 均能扩增出目的片段, 为在实践中进行病毒的检测节省了成本和时间, 同时以内源基因作为参照, 避免了假阴性结果的产生。



M: DL2000 marker; a: 双重 RT-PCR, 1: BPMV 和 Bd 30K; 2: TRSV 和 Bd 30K; 3: ToRSV 和 Bd 30K; 4: BPMV 和 TRSV; 5: ToRSV 和 BPMV; 6: ToRSV 和 TRSV; b: 三重 RT-PCR, 1: BPMV, TRSV 和 Bd 30K; 2: ToRSV, BPMV 和 Bd 30K; 3: BPMV, TRSV 和 ToRSV; 4: TRSV, ToRSV 和 Bd 30K; c: 四重 RT-PCR, 1: BPMV, TRSV, ToRSV 和 Bd 30K

M: DL2000 marker; a: Duplex RT-PCR, 1: BPMV and Bd 30K; 2: TRSV and Bd 30K; 3: ToRSV and Bd 30K; 4: BPMV and TRSV; 5: ToRSV and BPMV; 6: ToRSV and TRSV; b: Triplex RT-PCR, 1: BPMV, TRSV and Bd 30K; 2: ToRSV, BPMV and Bd 30K; 3: BPMV, TRSV and ToRSV; 4: TRSV, ToRSV and Bd 30K; c: Quadruplex RT-PCR, 1: BPMV, TRSV, ToRSV and Bd 30K

图 2 两重、三重和四重 RT-PCR 的建立

Fig. 2 Development of multiplex RT-PCR

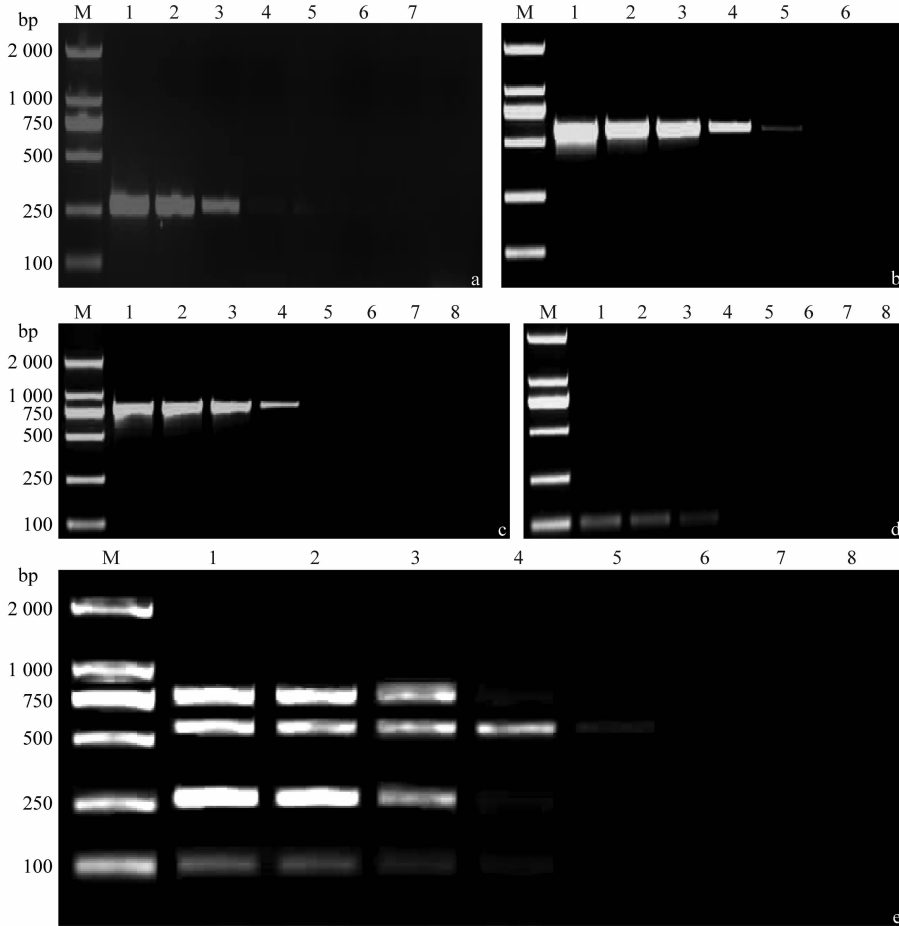
2.3 单一 RT-PCR 与多重 RT-PCR 灵敏度比较

将提取的含单一病毒的 RNA、混合病毒 RNA 及

健康大豆 RNA 按 10 倍梯度稀释后反转录成 cDNA 进行单一和多重 RT-PCR 灵敏度检测。结果表明随着

RNA 含量的逐渐减少,扩增条带也越来越弱。当含有 BPMV、TRSV、ToRSV 和 Bd 30K 的 RNA 分别稀释至 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 和 10^{-2} 时,条带开始变弱(图 3a~d),即单一 RT-PCR 检测 BPMV、TRSV、ToRSV 和 Bd 30K

RNA 最低浓度分别是 0.45、0.009 3、0.004 和 1.9 ng/ μ L。含有 3 种病毒及大豆内源基因的 RNA 稀释低于 10^{-2} 时,则只能扩增 TRSV 的特异性条带,及多重 RT-PCR 检测的最低浓度为 0.58 ng/ μ L(图 3e)。



a: BPMV; b: TRSV; c: ToRSV; d: Bd 30K; e: BPMV+TRSV+ToRSV+Bd 30K
M: DL 2000 marker; 1~8: RNA 稀释倍数分别是 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7}
M: DL 2000 marker; 1-8: Dilution factor of RNA is 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} and 10^{-7} , respectively

图 3 单一 RT-PCR 和多重 RT-PCR 检测灵敏度测定

Fig. 3 Sensitivity of detection for BPMV, TRSV, ToRSV and Bd 30K by single RT-PCR and multiplex RT-PCR

3 讨论

此前针对大豆携带病毒的检测已有较多的分子检测方法研究^[9-10],但大多是针对单一病毒研究建立 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 方法。进境大豆主要是以种子的形式入境,所以针对种子建立快速、灵敏的检测方法是既实现快速通关又防止检疫性有害生物传播的有效途径。但由于病毒在种子中的含量很低且分布不均匀,建立多重 RT-PCR 检测方法需要从 RNA 提取、引物配对筛选等方面进行优化。同时对样品的检测过程中,极有可能造成假阴性的结果。因此我们在设计多重 RT-PCR 试验时,以

大豆的一个内源基因作为参照,以保证整个 PCR 过程正确,防止由于操作失误引起假阴性结果。

尽管多重实时荧光 RT-PCR 检测的灵敏度更高,在医学检测上也有采用三重以上的实时荧光 RT-PCR 方法^[11-12],此前我们也建立过双重实时荧光 RT-PCR 方法,灵敏度高^[13],操作简便,但如果在此试验中再增加一种病毒,其灵敏度会显著下降。此外,多重实时荧光 RT-PCR 方法还需在探针上标记不同的荧光集团,费用较高,保存期限短,因此采用多重 RT-PCR 方法是一种满足口岸实际检测需求的方法。本研究利用 4 对特异性引物,在一次 RT-PCR 反应中扩增出病毒 BPMV(275 bp)、TRSV(580

bp)、ToRSV (794 bp) 及内源基因 Bd 30K (104 bp) 的特异性片段, 建立了 BPMV、TRSV、ToRSV、Bd 30K 的四重 PCR 检测方法, 结果表明该方法的特异性和灵敏度能达到检测要求, 比单项检测减少了 70% 左右的时间和 2/3 左右的试剂, 对这 3 种植物病毒的鉴别诊断和混合感染检测具有重要的应用价值。

参考文献

- [1] 廖芳, 郭京泽, 刘鹏, 等. RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 一步法检测大豆中菜豆荚斑驳病毒[J]. 植物保护学报, 2009, 36(2): 141-145.
- [2] 闻伟刚, 崔俊霞, 盛蕾. 进境大豆种子种烟草环斑病毒的快速检测[J]. 大豆科学, 2007, 26(5): 748-751.
- [3] 魏梅生. 美国大豆种传病毒简介[J]. 植物检疫, 2003, 17(S1): 13-18.
- [4] Ito T, Leki H, Ozaki K. Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction [J]. Journal of Virological Methods, 2002, 106(2): 235-239.
- [5] Thompson J R, Wetzel S, Klerks M M, et al. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control [J]. Journal of Virological Methods, 2003, 111(2): 85-93.
- [6] Menzel W, Jelkmann W, Maiss E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with complication of plant

mRNA as internal control [J]. Journal of Virological Methods, 2002, 99: 81-92.

- [7] 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, 36(4): 296-300.
- [8] Torp A M, Olesen A, Sten E, et al. Specific, semi-quantitative detection of the soybean allergen Gly m Bd 30K DNA by PCR [J]. Food Control, 2006, 17: 30-36.
- [9] 李彬, 吴新华, 栗寒, 等. 进境美国大豆幼苗中菜豆荚斑驳病毒的检测和鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(2): 139-141.
- [10] 杨翠云, 于翠, 沈禹飞, 等. 番茄环斑病毒的普通 RT-PCR 和巢式 RT-PCR 检测方法[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2005, 23(4): 396-400.
- [11] Templeton K E, Scheltinga S A, Beersma M F C, et al. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(4): 1564-1569.
- [12] Suwannakarn K, Payungporn S, Chieochansin T, et al. Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 152(1/2): 25-31.
- [13] 易汪雪, 陈舜胜, 杨翠云, 等. 单管实时荧光 RT-PCR 方法同时检测大豆种子中的菜豆荚斑驳病毒和烟草环斑病毒[J]. 植物病理学报, 2011, 41(1): 85-92.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 112 页)

- [5] Emmert C J, Mizell R F, Andersen P C, et al. Diet effects on intrinsic rate of increase and rearing of *Proprioseiopsis asetus* (Acari: Phytoseiidae) [J]. Annals of the Entomological Society of America, 2008, 101(6): 1033-1040.
- [6] Emmert C J, Mizell R F, Andersen P C, et al. Effects of contrasting diets and temperatures on reproduction and prey consumption by *Proprioseiopsis asetus* (Acari: Phytoseiidae) [J]. Experimental and Applied Acarology, 2008, 44(1): 11-26.
- [7] Huang J H, Freed S, Wang L S, et al. Effect of temperature on development and reproduction of *Proprioseiopsis asetus* (Acari: Phytoseiidae) fed on asparagus thrips, *Thrips tabaci* [J]. Experimental and Applied Acarology, 2014, 64(2): 235-244.
- [8] 何琦琛, 陈文华. 马氏捕植螨及少毛捕植螨捕食南黄蓟马之生活史和捕食量[J]. 台湾昆虫, 2001, 21(4): 321-328.
- [9] Goleva I, Zebitz C P W. Suitability of different pollen as alternative food for the predatory mite *Amblyseius swirskii* (Acari, Phytoseiidae) [J]. Experimental and Applied Acarology, 2013(3): 259-283.
- [10] Delisle J F, Shipp L, Brodeur J. Apple pollen as a supplemental food source for the control of western flower thrips by two

predatory mites, *Amblyseius swirskii* and *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae), on potted chrysanthemum [J]. Experimental and Applied Acarology, 2015, 65(4): 495-509.

- [11] 陈霞, 张艳璇, 季洁, 等. 斯氏小盲绥螨取食 3 种花粉和椭圆食粉螨的实验种群生命表[J]. 植物保护, 2013, 39(5): 149-152.
- [12] 陈文龙, 顾振芳, 孙兴全, 等. 尼氏钝绥螨的室内繁殖及其对二斑叶螨捕食作用的研究[J]. 上海农学院学报, 1996, 14(2): 101-105.
- [13] 赵志模, 陈艳, 吴仕元. 不同食物对普通钝绥螨发育和繁殖的影响[J]. 蛛形学报, 1992, 1(2): 49-56.
- [14] 黄建华, 秦文婧, 罗任华, 等. 两种花粉对巴氏钝绥螨生长发育与繁殖的影响[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 180-182.
- [15] 李德友, 何永福, 李宏度, 等. 间泽钝绥螨植物花粉食性研究[J]. 西南农业学报, 1992, 5(4): 72-77.
- [16] 黄建华, 王丽思, 秦文婧, 等. 一种捕食螨饲养观察装置[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(3): 776-779.
- [17] Birch L C. The intrinsic rate of natural increase in an insect population [J]. Journal of Animal Ecology, 1948, 17(1): 15-26.
- [18] 丁若钦. 昆虫数学生态学[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 153-170.

(责任编辑: 田 喆)