

基因芯片技术检测黄瓜花叶病毒、烟草花叶病毒和马铃薯 Y 病毒

贾 慧¹,王艳辉¹,王进忠²,王升启³,董金皋¹

(1. 河北农业大学 生命科学学院,河北 保定 071000;2. 北京农学院,北京 102206;
3. 中国人民解放军军事医学科学院 放射医学研究所,北京 100850)

摘要: 黄瓜花叶病毒、烟草花叶病毒和马铃薯 Y 病毒是世界性分布的重要植物病毒,对农业生产危害较大。农作物感病多为复合侵染,症状表现较为复杂,急需建立快速、准确、能够一次检测多种病毒的检测方法。本研究根据 3 种病毒的外壳蛋白基因序列,设计引物和探针,制备基因芯片;用 Cy3 标记下游引物,RT-PCR 扩增产物与芯片杂交,荧光扫描仪检测并分析信号。结果表明,该芯片可以从病毒侵染样本中检测到特异性识别信号,检测灵敏度比 RT-PCR 高 10~100 倍,该技术能对植物病毒做出快速、准确的检测。

关键词: 黄瓜花叶病毒;烟草花叶病毒;马铃薯 Y 病毒;基因芯片;检测

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2011)01-0083-04

Technique for Cucumber Mosaic Virus, Tobacco Mosaic Virus and Potato Virus Y by Gene Chip

JIA Hui¹, WANG Yan-hui¹, WANG Jin-zhong², WANG Sheng-qi³, DONG Jin-gao¹

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China;

2. Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

3. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, PLA, Beijing 100850, China)

Abstract: The Cucumber mosaic virus (CMV), Tobacco mosaic virus (TMV) and Potato virus Y (PVY) are significant worldwide plant viruses, which harm to agricultural production. Mixed infection with several viruses usually occurs complex symptom. So rapid, sensitive and specific method by which several viruses can be detected simultaneously is needed urgently. In this study, according to three kinds of viral coat protein gene sequence, primers and probes were designed, gene chip was prepared. The downstream primers were labeled by Cy3. The product amplified by RT-PCR using the labeled primers was hybridized with the gene chip. The hybridization signal was detected and analyzed by a fluorescence scanner. The result showed that the specific signals were identified from virus-infected plants. The detection sensitivities of gene chip were 10-100 times higher than RT-PCR. The results indicate that gene chip can be used for detection of plant viruses fast and accurately.

Key words: Cucumber mosaic virus; Tobacco mosaic virus; Potato virus Y; Gene chip; Detection

黄瓜花叶病毒 Cucumber mosaic virus (CMV)、烟草花叶病毒 Tobacco mosaic virus (TMV) 和马铃薯 Y 病毒 Potato virus Y (PVY) 分别可侵染 1 000 多种、300 多种和 60 余种植物,严重影响农作物的产量和质量^[1,2]。实践证明,植物病毒病至今生产上尚无有效的防治药剂,对病毒病害的控制主要通过种植

无毒种子、脱毒苗木和繁殖材料,清除感病植株及其传毒介体,加强植物检疫等措施^[3]。如何对种子、苗木和无性繁殖材料以及在发病早期对植株进行快速准确地检测、鉴定就显得尤为重要。

目前对植物病毒的检测、鉴定虽然有一些方法,如电镜、ELISA、PCR 技术等,但每次试验只能针对 1

收稿日期:2010-12-08

基金项目:北京市自然科学基金项目(5043026)

作者简介:贾 慧(1977-),女,河北涿源人,讲师,在读博士,主要从事植物分子病理学研究。

通讯作者:董金皋(1963-),男,河北平乡人,教授,博士,博士生导师,主要从事植物真菌毒素研究及植物分子病理学工作。

种病原菌进行检测。近年来发展的基因芯片技术是一种高效、快速并可同时测定基因组成千上万个基因活动的新方法,该技术的原理是将大量 DNA 探针片段有序地固定于支持物表面,然后与已标记的生物样品中 DNA 分子杂交,再对杂交信号进行检测分析,从而识别样品中存在的特异性核酸序列^[4]。它最大的优点在于高通量、并行化和微型化,在基因芯片上,单位面积可以高密度排列大量的生物探针,1 次试验就可以同时分析多种生物靶点,其效率远远高于传统检测手段。基因芯片检测技术已经用于人类病毒如 HBV、HIV、SARS、甲型 H1N1 流感病毒的检测和鉴定^[5-8],动物病毒如口蹄疫、禽流感的检测和检疫^[9,10],在植物病毒检测中也有很多探索和应用: Lee 等^[11]设计了一种芯片可以检测和区别 4 种感染葫芦科植物的烟草花叶病毒组成员, Abdullahi 等^[12]应用该技术成功检测了马铃薯 A 病毒(PVA) 等 12 种病毒,马新颖等^[13]建立了黄瓜花叶病毒、烟草花叶病毒、木槿褪绿环斑病毒等 10 种植物病毒的基因芯片检测方法。本研究结合 RT-PCR,制备了用于检测 CMV、TMV 和 PVY 3 种植物病毒的基因芯片,以期为病毒病的防治提供一种简单、快速、准确的理想方法。

1 材料和方法

1.1 材料

CMV、TMV 和 PVY 毒源,分别由中国农业科学院植物保护研究所、中国农业大学、天津进出境检验检疫局馈赠,本实验室扩繁于普通烟上。Cy3TM/Cy5TM Amidite 购自 Amersham 公司; TrizolRNA 试剂盒 购自 GIBCO 公司; TaqDNA 聚合酶、AMV 逆转录酶等 购自 TaKaRa 公司; PCRMix 点样液、杂交液、洗脱液等,由中国人民解放军军事医学科学院放射研究所芯片实验室配制。

1.2 引物与探针的设计与合成

根据 GenBank 数据库中的 CMV、TMV 和 PVY 各自株系序列同源性(CMV 为亚组 I),设计用于扩增外壳蛋白(CP) 基因中 326、327 和 200 bp 序列的寡核苷酸引物和探针(各 2 条)。下游引物合成时标记 Cy3 荧光,探针合成采用标准亚磷酸胺化学方法在 DNA 自动合成仪(ABI 8909) 上进行,合成完毕用浓氨水 55℃ 作用 15 h 脱保护/切割, OPC 反相柱纯化。固定探针在 3'末端合成 5 个硫代腺苷酸,最后用氨基亚磷酸胺试剂添加游离氨基。

1.3 芯片的制备

用 2 × 点样液将合成的探针稀释成 50 μmol/L,

按顺序加入 96 孔板后,用 Genemachines Omnigrid 芯片制备仪将寡核苷酸探针点到醛基化玻片上,点间距为 0.4 ~ 0.5 mm。点样完毕后室温放置过夜(18 h 以上),用 0.2% SDS 溶液清洗 1 min,水洗 1 min,室温备用。芯片外观和探针排布如图 1, P1、P2 为 CMV 探针, P3、P4 为 TMV 探针, P5、P6 为 PVY 探针, Pa、Pb 为侵染百合的 2 种病毒, C1 为点样液、C2 为阴性对照。

P1	P2	Pa	Pa	Pb	Pb	P3	P4	P5	P6
P1	P2	Pa	Pa	Pb	Pb	P3	P4	P5	P6
P1	P2	Pa	Pa	Pb	Pb	P3	P4	P5	P6
P1	P2	Pa	Pa	Pb	Pb	P3	P4	P5	P6
C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2

图 1 芯片外观示意图及其阵列排布

Fig. 1 Distribution of the probes on chips

1.4 植物总 RNA 的提取与 RT-PCR 扩增

以病毒侵染的植物叶片为材料,参照文献[14]提取植物总 RNA。以提取的总 RNA 1 μg 为模板, 20 μL 反应体系中加入 3'端引物 0.5 μg, ddH₂O (DEPC 处理) 补足至 8 μL, 70℃ 10 min 后置冰上, 再加入 5 × AMV 缓冲液 4 μL, Mg²⁺ 4 μL, dNTP 2 μL, Rnasin 1 μL, AMV 反转录酶 1 μL, 42℃ 反应 1 h, 95℃ 5 min 后置冰上。取上述反转录产物 1 μL, 加入 PCRMix 15 μL, 5'、3'端引物各 10 pmol/L, Taq 酶 0.4 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 72℃ 延伸反应 5 min, 4℃ 保存。RT-PCR 结束后取 6 μL 扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

荧光标记 RT-PCR 反应体系及扩增条件同上, 上游引物浓度为 2 pmol/L, Cy3 标记的下游引物浓度为 10 pmol/L。

1.5 基因克隆与阳性质粒构建

用靶序列特异引物对 CMV、TMV 和 PVY 侵染的叶片总 RNA 分别进行 RT-PCR 扩增, 扩增出的 DNA 片段经纯化后, 连接 pGEM-T 载体, 转化 *E. coli* DH5α, 挑取阳性克隆, 提取质粒, 经纯化后测序, 鉴定阳性克隆, 阳性克隆经扩大培养后 -70℃ 保存。

1.6 杂交与扫描

将扩增产物煮沸 5 min 进行热变性, 取出后立即置于冰浴中。将点制好的芯片于 0.2% SDS 中漂洗 1 min 后, 无菌去离子水中漂洗 1 min, 取出后室温晾干。3 个 PCR 产物分别或一并与杂交液混匀, 均匀涂布于芯片反应区后置于杂交盒中, 42℃ 水浴 1 h。杂交反应结束后, 取出芯片按顺序在洗液 A

($1 \times \text{SSC}$ 0.2% SDS)、B($0.2 \times \text{SSC}$)、C($0.1 \times \text{SSC}$)中漂洗 1 min,取出并用去残留在芯片上的液体,室温晾干后用 GenePix4000B 扫描仪扫描,PMT 和激光强度分别设置为 650 与 33,激发波长为 532 nm 扫描。

2 结果与分析

2.1 CMV、TMV 和 PVY 的 RT-PCR 检测结果

以 CMV、TMV 和 PVY 侵染的烟草总 RNA 为模板,经 RT-PCR 扩增后,在琼脂糖凝胶电泳中均呈现出产量很高的阳性反应谱带,与预期长度为 326,327 200 bp 大小基本一致(参照 Marker 的分子量),而健康烟草未出现任何条带(图 2)。这说明扩增的条带是 CMV、TMV 和 PVY 病毒基因组特异扩增产物。

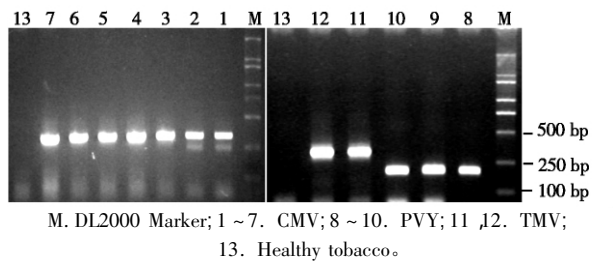


图 2 RT-PCR 扩增产物

Fig.2 Amplification products of RT-PCR

2.2 CMV、TMV 和 PVY 的芯片杂交结果

分别对 CMV、TMV 和 PVY 进行检测,结果发现,制备的芯片可以有效的检测这 3 种植物病毒(图 3)。所设计的探针与对应病毒均有杂交信号,

相互之间无干扰,病毒的 PCR 产物混合杂交则可以同时检测 3 种病毒,其他 9 种病毒样本和阴性对照无杂交信号。杂交所设立的 3 次重复都得到相同结果,表明制备的芯片检测结果准确,具有很好的特异性和重复性,杂交结果可靠。

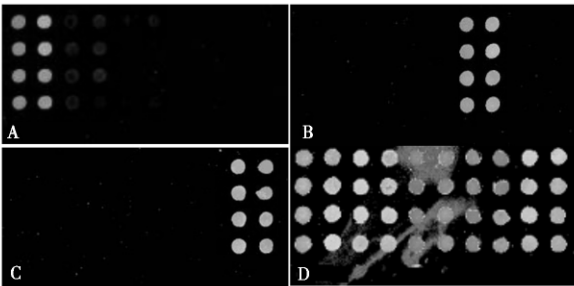


图 3 CMV、TMV 和 PVY 杂交信号扫描结果

Fig.3 Hybridization result of CMV、TMV and PVY

2.3 芯片的灵敏度试验

CMV、TMV 和 PVY 质粒经 PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳结果显示 3 种病毒质粒在 10^3 拷贝时条带较清晰,在 10^2 拷贝时 TMV 条带微弱,CMV 和 PVY 未见条带;芯片杂交结果显示 3 种病毒在 10^3 拷贝时信号均很强,TMV 在 10^2 拷贝时信号较强,CMV、PVY 在 10^2 拷贝时稍弱,经重复验证发现 CMV 信号均值为 477、PVY 信号平均值为 1 878,故芯片检测的灵敏度为 10^2 拷贝,优于 PCR 技术 1~2 个数量级(表 1)。根据对病毒质粒 DNA 的检测试验可估算芯片的检测灵敏度为 10^{-4} pg 的病毒核酸。

表 1 PCR 和芯片检测方法的灵敏度

Tab.1 The sensitivity of PCR and gene chip

Dilution of plasmid DNA(copies)	Result of PCR	Result of chip hybridization
10^5	CMV(+) TMV(+) PVY(+)	CMV(+) TMV(+) PVY(+)
10^4	CMV(+) TMV(+) PVY(+)	CMV(+) TMV(+) PVY(+)
10^3	CMV(-) TMV(+) PVY(-)	CMV(+) TMV(+) PVY(+)
10^2	CMV(-) TMV(-) PVY(-)	CMV(+) TMV(+) PVY(+)

注: +. PCR 反应有扩增条带,芯片杂交有阳性信号; -. PCR 反应无扩增条带,芯片杂交无阳性信号。

Note: +. Indicate PCR can amplify frangments; there are signal when chip hybridize; -. Indicate PCR can note amplify frangments; there are no signal when chip hybridize.

3 讨论

本研究根据 CMV、TMV 和 PVY 的 CP 基因保守序列,分别设计 2 条探针,建立了可同时检测 5 种病毒的基因芯片检测方法。从扫描结果可以看出,每条探针都有阳性杂交信号,但信号的强弱有所不同,原因可能是与病毒本身的核酸含量有关,也可能是由于探针在 PCR 产物上的位置不同使得二者形成的复合物空间位阻的不同而导致。

目前检测植物病毒的方法有很多种,如生物学测定、免疫学方法、电镜技术、核酸杂交法和 PCR 检测^[15,16]。电镜技术需要依赖大型精密仪器,ELISA 是使用最广泛的免疫学方法,它具有反应灵敏、特异性强的优点,但检测灵敏度低,不宜于病毒病的早期诊断。核酸杂交具有特异性强、灵敏度高和适用面积广等特点。PCR 方法是检测病毒病最为有效分子生物学方法之一,可对来自任何植物病毒基因组的少量 DNA 或 cDNA 进行扩增,但容易造成污染,

若样品成分复杂给检测带来难度。而基因芯片检测通过多个基因片段之间的相互验证克服这些缺点。本试验建立的检测 CMV、TMV 和 PVY 3 种植物病毒的基因芯片,灵敏度高、特异性好、重复性较稳定,为植物病毒病的大规模筛查探索了一种很有效的、有前景的检测体系和方法。

参考文献:

- [1] 张仲凯,李 毅. 云南植物病毒[M]. 北京: 科学出版社 2001.
- [2] 植物病毒志(第一集),联邦真菌研究所. 应用生物学家汇编[M]. 上海: 上海科技出版社,1980: 98-99.
- [3] 韩 盛,向本春. 植物病毒分子检测方法研究进展[J]. 石河子大学学报 2006 24(5): 551-553.
- [4] 王升启. 基因芯片技术及应用研究进展[J]. 生物工程进展,1999,19(4): 45-51.
- [5] 孙朝晖,郑文岭,张 宝,等. DNA 芯片技术检测乙型肝炎病毒及丁型肝炎病毒的初步研究[J]. 中华肝脏病杂志 2004,12(9): 563-565.
- [6] 吴守丽,严延生,蒋 岩. HIV 耐药性检测方法及其临床应用[J]. 中国艾滋病性病 2004 4(10): 312-315.
- [7] 肖 白,周一鸣,任丽丽,等. 基因芯片用于 SARS 早期诊断和病毒载量时相监测研究[J]. 诊断学理论与实践 2004 3(3): 200-205.
- [8] 孙珊珊,沈国顺,田明尧,等. 甲型 H1N1 与季节性 H1N1 流感病毒检测基因芯片的制备与初步应用[J]. 中国兽医学报 2010 30(5): 634-638.
- [9] 杨 素,花群义,徐自忠,等. 口蹄疫等 5 种动物病毒基因芯片检测技术的研究[J]. 微生物学报,2004 4(44): 479-482.
- [10] 杨 素,花群义,徐自忠,等. 几种动物病毒的基因芯片检测技术[J]. 中国兽医科技,2004,34(3): 35-39.
- [11] Lee G P,Min B E, Kim C S *et al.* Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting *Tobamoviruses* [J]. Journal of Virological Methods 2003,110: 19-24.
- [12] Abdullahi I,Koerbler M. The 18S rDNA sequence of *Synchytrium endobioticum* and its utility in microarrays for the simultaneous detection of fungal and viral pathogens of potato[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2005 68: 368-375.
- [13] 马新颖,汪 琳,任鲁风,等. 10 种植物病毒的基因芯片检测技术研究[J]. 植物病理学报,2007,37(6): 561-565.
- [14] J 萨姆布鲁克,E F 弗里奇,T 曼尼阿蒂斯. 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学技术出版社 2002.
- [15] 商明清,魏梅生. 植物病毒检测技术研究进展[J]. 植物检疫 2004,18(4): 236-240.
- [16] 徐晓静,文思远,韩 毅. 应用基因芯片方法检测几种肠道菌[J]. 华北农学报 2007 22(1): 186-187.