

两种蚜虫携带百合无症病毒、烟草花叶病毒的基因芯片检测

贾 慧¹, 郑 洁², 孟庆江¹, 曹志艳¹

(1. 河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学 科技处, 河北 保定 071000)

摘要:蚜虫作为病毒的传播介体为害植物造成的经济损失远远超过蚜虫本身,因此急需建立快速、准确、灵敏的蚜虫带毒检测方法。根据百合无症病毒(LSV)和烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因保守序列设计引物与探针,制备基因芯片;用Cy3标记下游引物,提取饲毒(LSV和TMV)棉蚜、桃蚜总RNA,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,该芯片可以同时检测上述2种蚜虫的带毒情况,此方法有较好的特异性和重复性,能快速、准确地对介体蚜虫的带毒情况进行检测。

关键词:棉蚜;桃蚜;百合无症病毒;烟草花叶病毒;基因芯片;检测

中图分类号:S432.4;Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)01-0020-05

Detection of Two Kinds of Aphids Carried LSV, TMV with DNA Microarray

JIA Hui¹, ZHENG Jie², MENG Qing-jiang¹, CAO Zhi-yan¹

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

2. Technology Management Office, Agriculture University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: Aphid transmission of the virus as a mediator harm plants far more than economic losses caused by aphids themselves. So, rapid, sensitive and specific method, by which viruses carried by aphids can be detected simultaneously, is needed urgently. In this study, according to the Lily symptomless virus (LSV) and the Tobacco mosaic virus (TMV) coat protein gene sequence, primers and probes were designed, gene chip was prepared. The downstream primers were labeled by Cy3. The total RNA was extracted from *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* raised with lily infected by LSV and TMV respectively. 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 chip can simultaneously detect both aphids infected cases, this method has good specificity and reproducibility, fast and accurate on the mediator infected aphids were detected.

Key words: *Aphis gossypii*; *Myzus persicae*; Lily symptomless virus; Tobacco mosaic virus; Gene chip; Detection

自20世纪80年代初SBH(Sequencing by hybridization)概念提出,以美国为主开始进行各种生物芯片的研制,90年代以来,芯片技术得以迅速发展,并呈现发展高峰^[1]。基因芯片也叫DNA微阵列(DNA microarray),先将预先设计好的无数寡核苷酸、cDNA、基因组(Genomic)DNA固定于玻璃片基上形成矩阵,并与待测样品中同源核酸分子序列杂交,然后解读和分析样品序列信息,高效、大规模获取相关生物信息^[2]。与传统核酸印迹杂交(South-

ern Blot和Northern Blot等)技术相比,基因芯片技术将大量的核酸分子同时固定于载体上,一次性检测、分析DNA/RNA信息,解决了传统杂交技术的操作复杂、自动化程度低、检测目标分子数量有限等不足;目前,在发掘新基因、疾病诊断、基因表达规律及新靶标药物筛选等各个领域有广泛应用^[3]。在病毒病诊断方面,基因芯片技术已经应用于人体,如乙肝病毒^[4]、甲型H1N1流感病毒^[5]等;动物,如口蹄疫^[6]、禽流感^[7]等的检测和检疫;且近年来在植物

收稿日期:2013-10-28

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:曹志艳(1978-),女,河北昌黎人,副研究员,博士,主要从事植物真菌毒素及植物分子病理学研究。

病毒检测中也有一些探索和应用,如:检测和区别 4 种感染葫芦科植物的烟草花叶病毒组成员^[8],检测马铃薯 A 病毒等^[9]、百合无症病毒等^[10]、木槿褪绿环斑病毒等^[11]。

在植物病毒病的发生流行过程中,介体蚜虫传播病毒的为害远远超过蚜虫本身所造成的危害^[12],快速、灵敏的蚜虫带毒情况的检测方法对于植物病毒病的预测、发生、流行和综合防治有重要意义。本研究用基因芯片技术分别对桃蚜 (*Myzus persicae*)、棉蚜 (*Aphis gossypii*) 体内的百合无症病毒 (*Lily symptomless virus*, LSV) 和烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 进行测定,为进一步开展 VAS 的分离、VAS 基因克隆和序列分析、体外表达及功能分析、传毒识别机制的完善提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 试验材料

桃蚜和棉蚜为北京农学院昆虫实验室采集保存,将其分别置于防虫沙笼内的喜食无毒健康植株上饲养,获得的后代无毒蚜繁殖后备用。饲毒前将蚜虫饥饿 2 h,再饲毒 4 h 或过夜。

感染百合无症病毒 (LSV) 的百合植株由天津市出入境检验检疫局提供、烟草花叶病毒 (TMV) 由中国农科院植保所馈赠,本实验室扩繁于普通烟上。阴性样品由天津市出入境检验检疫局、中国农科院植保所、中国农业大学、浙江农业科学院提供,为玉米粗缩病毒 (MRDV)、辣椒轻型斑驳病毒 (PM-MoV)、芋花叶病毒 (DsMV)、木槿褪绿环斑病毒 (HCRSV)、双生病毒 (WTG)。

1.2 试剂

Cy3 亚磷酰胺试剂 (Cy3-Amidite)、Cy3-dUTP/dCTP 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司,Trizol-RNA 提取试剂盒购自美国 GIBCO 公司,AMV 逆转录酶、Rnasin 抑制剂购自日本 TaKaRa 公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、购自日本 TaKaRa 公司,点样液、杂交液、洗脱液及 PCRMix 由中国人民解放军军事医学科学院芯片实验室配制。

1.3 引物、探针的设计与合成

根据 GenBank 数据库中的 LSV 和 TMV 各自株系 (GenBank 序号 AY620984, AF165190) 序列同源性,用 Primer 5.0 软件设计特异引物,扩增片段长度分别为 256, 327 bp。同时根据 LSV 和 TMV 外壳蛋白基因及阴性对照大鼠脑基因,用 Mprobe 软件 (由中国人民解放军军事医学科学院芯片实验室开发) 设计备选探针,设计原则为 T_m 值接近, GC% 含量

40% ~ 60%, 碱基长度 (40 ± 10) mer, AT 和 GC 尽量分布均匀一致,经 Blast 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>),得到 2 种病毒 CP 基因特异的寡核苷酸探针序列。

在 DNA 自动合成仪 (ABi 8909) 上,采用标准亚磷酰胺化学方法合成引物和探针,合成后用 55 °C 浓氨水育 15 h 脱保护/切割, OPC 反相柱纯化。固定探针在 3' 端以氨基修饰,氨基与探针序列之间以间隔臂 (Spacer, 聚乙二醇亚磷酰胺试剂) 相连; 荧光标记引物在 5' 端用 Cy3-Amidite 进行荧光标记。

1.4 基因芯片的制备

合成的引物用无菌去离子水稀释至 20 $\mu\text{mol/L}$, 探针用 2 \times 点样液稀释至 50 $\mu\text{mol/L}$, 按设计矩阵顺序加入 96 孔板, 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。芯片上共有 10 个杂交区域, 每个区域内 P1 为 LSV 探针、P2 为 TMV 探针, C1 为点样液、C2 为阴性探针 (大鼠脑基因), 每个样品都有 4 次重复, 以保证试验的可靠性。基因芯片探针矩阵排列图如图 1 所示。

| | | | |
|----|----|----|----|
| P1 | P1 | P2 | P2 |
| P1 | P1 | P2 | P2 |
| P1 | P1 | P2 | P2 |
| P1 | P1 | P2 | P2 |
| C1 | C1 | C2 | C2 |

图 1 基因芯片矩阵排列

Fig. 1 Distribution of the probes on chips

1.5 饲毒蚜虫总 RNA 的提取

参照文献^[13]并略有改进。用毛笔小心挑取饲毒蚜虫 20 头, 在经含 0.1% DEPC 的无菌水处理、干热灭菌后的小型研磨器中加入 1 mL Trizol 提取液, 磨至匀浆, 收集提取液于离心管; 加入 0.5 mL 氯仿并颠倒混匀, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min; 小心收集上清到新离心管中, 加入等体积的异丙醇, 混匀充分, 室温放置 10 min; 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min; 弃上清, 沉淀用 1 mL 75% 乙醇 (DEPC 水配置) 洗涤 2 次; 4 °C 7 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 真空环境中干燥沉淀约 5 min, 溶于 30 μL DEPC 水中。DU640 紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度后, 将提取的 RNA 保存于 -80 °C 备用。

1.6 RT-PCR 扩增

参照逆转录试剂盒使用说明, 取一 DEPC 水处理过的 0.5 mL 离心管, 依次加入 RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

1.0 μL 、3'端引物 0.5 μg , ddH₂O (DEPC 处理) 补足至 8 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 冰浴 5 min; 再加入 5 \times AMV 反转录酶缓冲液 4.0 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 4.0 μL , 10 mmol/L dNTP 2 μL , 40 U/ μL Rnasin 1 μL , 20 U/ μL AMV 逆转录酶 1 μL , DEPC 处理的 ddH₂O 补足至 20 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 95 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min 后置冰上; 取上述逆转录产物 1 μL , 加入 PCRmix 15 μL , 5'引物和 3'引物 (Cy3 荧光标记) 各 0.5 μL , Taq 酶 0.4 μL , ddH₂O 补足至 20 μL 。

PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 结束后取 5 μL 扩增产物用 1.5% ~ 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

在 PCR 扩增的过程中, 把 Cy3 荧光标记物掺入到扩增产物中, PCR 产物于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.7 芯片的杂交与扫描

将点制好的芯片用 0.2% SDS 漂洗 1 min, 无菌去离子水漂洗 1 min, 室温晾干; 将扩增产物煮沸 5 min 变性后立即置冰上; 取 1 μL PCR 产物与 9 μL 杂交液充分混匀, 并将 10 μL 混合物加入芯片反应区, 涂布均匀, 置于杂交盒中, 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴杂交 1 h; 杂交反应结束后, 取出芯片按顺序经洗液 A (1 \times SSC, 0.2% SDS)、B (0.2 \times SSC)、C (0.1 \times SSC) 室温各漂洗 1 min, 取出后甩去芯片上的残留液体, 室温晾干后用 GenePix4000B 扫描仪扫描, PMT 和激光强度分别为 650 与 33、激发波长为 532 nm。

2 结果与分析

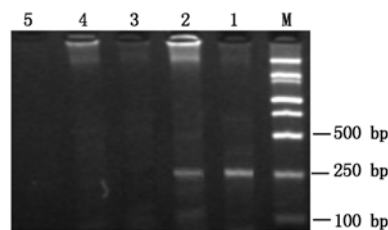
2.1 饲毒蚜虫的 RT-PCR 检测

提取吸食 LSV、TMV 侵染的百合和烟草的棉蚜和桃蚜及无毒棉蚜、桃蚜中的总 RNA, 逆转录进行 RT-PCR 特异扩增。经琼脂糖凝胶电泳图谱看出, 从吸食 LSV 的棉蚜和桃蚜体内扩增得到长度为 256 bp 的 DNA 片段, 而无毒棉蚜和桃蚜未出现任何

条带 (图 2); 从吸食 TMV 的棉蚜和桃蚜体内扩增得到长度为 327 bp 的 DNA 片段, 而无毒棉蚜和桃蚜未出现任何条带 (图 3)。说明扩增的条带是 LSV、TMV 病毒基因组特异扩增得到的, 即在棉蚜、桃蚜体内检测到 LSV 和 TMV 病毒。

2.2 基因芯片的检测结果

将带有 Cy3 荧光标记 PCR 产物变性后分别与芯片杂交, 吸食 LSV 的棉蚜和桃蚜均有较强的荧光信号, 而无毒棉蚜和桃蚜基本没有杂交信号 (图 4); 吸食 TMV 的棉蚜和桃蚜均有较强的荧光信号, 而无毒棉蚜和桃蚜基本没有杂交信号 (图 5)。芯片杂交结果与琼脂糖凝胶电泳结果一致, 说明所制备的基因芯片可用于蚜虫携带病毒的快速检测。



M. DL2000 Marker; 1. 饲毒棉蚜; 2. 饲毒桃蚜; 3. 无毒棉蚜; 4. 无毒桃蚜; 5. 阴性对照。图 3 同。
M. DL2000 Marker; 1. *A. gossypii* acquired virus; 2. *M. persicae* acquired virus; 3. Virus-free *A. gossypii*; 4. Virus-free *M. persicae*; 5. Negative control. The same as Fig. 3.

图 2 蚜虫携带 LSV RT-PCR 扩增产物
Fig. 2 Amplification products of RT-PCR LSV carried by aphids

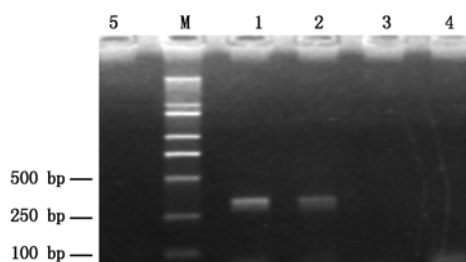
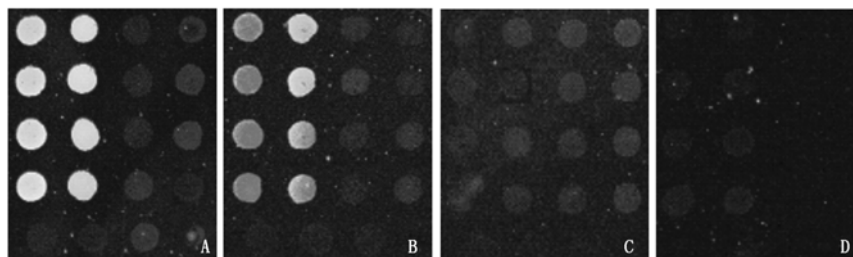


图 3 蚜虫携带 TMV RT-PCR 扩增产物
Fig. 3 Amplification products of RT-PCR TMV carried by aphids



A. 饲毒棉蚜; B. 饲毒桃蚜; C. 无毒棉蚜; D. 无毒桃蚜。图 5 同。
A. *A. gossypii* acquired virus; B. *M. persicae* acquired virus; C. Virus-free *A. gossypii*; D. Virus-free *M. Persicae*. The same as Fig. 5.

图 4 蚜虫携带 LSV 的芯片检测

Fig. 4 The detection of LSV carried by aphids with DNA microarray

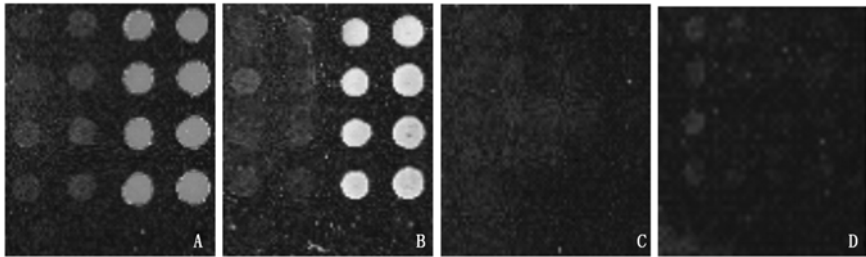


图 5 蚜虫携带 TMV 的芯片检测

Fig. 5 The detection of TMV carried by aphids with DNA microarray

2.3 芯片检测的特异性

为验证芯片的特异性,用 LSV、TMV 下游引物分别对 10 种病毒侵染的植物组织总 RNA 进行逆转录合成的 cDNA、荧光素酶基因质粒 DNA 为模板,用 LSV、TMV 引物扩增,PCR 产物变性后与芯片杂

交,统计杂交信号强度值(表 1)。荧光信号值均远低于 400,相当于背景信号;琼脂糖凝胶电泳无目的条带出现,说明芯片质量和杂交体系正常。芯片检测结果同 PCR 检测所得结果相互验证。

表 1 用于评价病毒病检测芯片特异性的阴性样本杂交结果

Tab. 1 The hybridization signal of negative samples used to evaluating differential quality

| 阴性样本 Negative samples | LSV 杂交信号 Hybridization signal of LSV | TMV 杂交信号 Hybridization signal of TMV |
|---|---|---|
| 大麦黄矮病毒 <i>Barley yellow dwarf virus</i> | 64 | 56 |
| 大麦条纹花叶病毒 <i>Barley stripe mosaic virus</i> | 80 | 63 |
| 玉米粗缩病毒 <i>Maize rough dwarf virus</i> | 55 | 50 |
| 小麦黄矮病毒 <i>Wheat yellow dwarf virus</i> | 96 | 67 |
| 小麦丛矮病毒 <i>Wheat rosette stunt virus</i> | 27 | 93 |
| 水稻条纹病毒 <i>Rice stripe virus</i> | 69 | 81 |
| 木槿褪绿环斑病毒 <i>Hibiscus chlorotic ringspot virus</i> | 73 | 86 |
| 辣椒轻型斑驳病毒 <i>Pepper mild mottle virus</i> | 80 | 70 |
| 芋花叶病毒 <i>Dasheen mosaic virus</i> | 23 | 54 |
| 双生病毒 <i>Geminivirus</i> | 16 | 85 |
| 荧光素酶基因 <i>Luciferase gene</i> | 51 | 75 |

2.4 芯片的重复性

以随机挑选的 6 种阴性、阳性样本为试验材料,连续进行 3 次检测,并设立空白对照和阴性对照。结果表明,3 次检测的杂交信号基本一致,说明芯片杂交检测体系的结果稳定;利用饲毒蚜虫的同一 RT-PCR 产物与随机挑选的不同批次制备的芯片进行检测,观察不同批次芯片间的差异性,结构证明芯片间有较好的重复性。

3 结论与讨论

对蚜虫带毒、传毒,传统的生物学方法费时长,血清学方法需要制备或购买抗血清,检测灵敏度低^[14]。基因芯片以其集成化和大规模并行处理的特点,很适合同时检测大量的同一种类蚜虫携带不同病毒、不同种类蚜虫携带同一病毒情况。本试验根据 LSV、TMV 壳蛋白基因保守序列设计寡核苷酸引物和探针,用 RT-PCR 方法和芯片杂交方法对棉蚜、桃蚜体内的 LSV、TMV 分别进行检测。结果饲毒蚜虫呈阳性,无毒蚜虫呈阴性,特异性、重复性好,

说明 2 种检测方法有效。

对于 LSV, RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳得到条带和芯片检测信号桃蚜比棉蚜弱,原因可能是桃蚜非持久、棉蚜持久传播 LSV。非持久传毒,蚜虫所获得的病毒仅存在于蚜虫口器内;持久传毒,病毒获得后经喙进入蚜虫肠道,再由血淋巴输送到唾腺,病毒可在蚜虫体内扩大增殖^[12]。相同数量的桃蚜、棉蚜在取样时可能对口针有损坏。据报道, TMV 在自然界没有传播介体,主要以机械传染的方式传播^[15-18]。本试验中在饲毒棉蚜和桃蚜体内都检测到 TMV 核酸,而且棉蚜信号比桃蚜强,这 2 种蚜虫是否获得 TMV 但并不传播,棉蚜获毒后 TMV 在其体内增殖、桃蚜仅存在于口器有待于继续研究。另外,从杂交信号强度可以看出, LSV、TMV 芯片杂交信号强弱有所不同, TMV 更强,最高可达 16 000,而 LSV 相对较弱,均值约为 6000,原因可能是与病毒本身外壳蛋白基因的核酸含量不同,也可能是由于探针与 PCR 产物杂交形成的复合物空间位阻的不同而导致。

基因芯片技术仍在发展之中,目前一些科学研

究正在探索将样品的制备、标记扩增、检测分析等集成于一体,实现全过程的自动化,即所谓的芯片上的实验室(Lab-on-chip),从而缩短实验时间。

参考文献:

- [1] 刘琪琦,王升启. 军事医学科学院生物芯片研究进展[J]. 中国科学:生命科学,2011,41(10):790-795.
- [2] 邹立扣,王红宁. 基因芯片技术检测细菌耐药性的研究进展[J]. 微生物学杂志,2003,23(1):30-32.
- [3] Yershov G, Barsky V, Belgovsky A, *et al.* DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microarray[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1996, 93(10):4913-4918.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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,2004,44(4):479-482.
- [7] 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.
- [8] Lee G P, Min B E, Kim C S, *et al.* Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting Tobamo viruses[J]. *Journal of Virological Methods*, 2003, 110(1):19-24.
- [9] Abdullahi I, Koerbler M. The 18S rDNA sequence of *Synchytrium endobioticum* and it's utility in microarrays for the simultaneous detection of fungal and viral pathogens of potato[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2005, 68(3):368-375.
- [10] 王进忠,贾慧,文思远,等. 百合病毒的 DNA 芯片检测技术研究[J]. 中国病毒学,2005,20(4):429-433.
- [11] 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.
- [12] 张广学,钟铁森. 中国昆虫经济志-同翅目 蚜虫类(一)[M]. 北京:科学出版社,1983(25 册):27-37.
- [13] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯, 著. 金冬雁, 黎孟枫. 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京:科学技术出版社,2002.
- [14] Shijun Zhou, Zuorui Shen, Huaifang Li, *et al.* The detection of *Cucumber mosaic virus* in single aphids[J]. *Entomologia Sinica*, 1994, 1(2):172-182.
- [15] 王惠哲,李淑菊,庞金安,等. 黄瓜上烟草花叶病毒的 RT-PCR 检测[J]. 天津农业科学,2004,10(2):11-13.
- [16] 陈永对,李宏光,刘春明,等. 2 种不同类型病毒抑制剂防控 WMV 的田间药效比较[J]. 河南农业科学,2013,42(6):80-84.
- [17] 刘金亮,王凤婷,魏毅,等. 烟草花叶病毒南瓜分离物 CP 基因的克隆、序列分析及其原核表达[J]. 华北农学报,2010,25(5):6-10.
- [18] Samad A, Zaim M, Ajayakumar P V, *et al.* Isolation and characterization of a TMV isolate infecting scotch spearmint (*Mentha gracilis* sole) in India[J]. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 2000, 107(6):649-657.