

应用 DPO 技术检测番茄斑萎病毒方法的建立

刘忠梅¹,罗佳²,潘仲乐¹,刘洪义¹,李丹丹³,韩政坤¹,魏冬旭¹,马微⁴

(1. 黑龙江出入境检验检疫局 检验检疫技术中心,黑龙江 哈尔滨 150001; 2. 辽宁出入境检验检疫局,辽宁 大连 116001; 3. 海南出入境检验检疫局 检验检疫技术中心,海南 海口 570125;
4. 东宁出入境检验检疫局,黑龙江 东宁 157299)

摘要:为了准确、高效地检出番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV),利用双启动寡核苷酸引物(DPO)技术,以TSWV外壳蛋白(CP)基因为靶基因,设计了一对DPO引物,对PCR反应体系中的引物、dNTPs、Taq DNA聚合酶用量进行优化,建立了TSWV的DPO-PCR检测方法,并对其灵敏度、特异性以及退火温度敏感性进行了评价。结果表明,应用DPO引物建立的PCR技术能够成功地扩增出TSWV的208 bp特异性条带,与预期目标相符。经过优化后,DPO-PCR反应体系(25 μL)为:DNA模板1 μL,10×Buffer(含Mg²⁺)2.5 μL,dNTPs(每种2.5 mmol/L)2.0 μL,Taq DNA聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,上、下游DPO引物(20 μmol/L)各1.0 μL,以去离子水补充至25 μL。利用该检测方法,在49.8~70.0 °C的退火温度范围内,均可实现目标基因片段的高效扩增,说明其对退火温度不敏感;利用病毒RNA进行检测,该方法的灵敏度为7.5 ng;通过对TSWV、番茄环斑病毒、烟草环斑病毒和番茄黑环病毒的检测表明,仅TSWV呈现阳性反应,说明该方法特异性强。所建立的DPO-PCR检测方法能够准确、高效地检测TSWV,可用于进出境种苗检疫筛查及田间病害诊断。

关键词:番茄斑萎病毒;双启动寡核苷酸引物;DPO-PCR;检测

中图分类号:S432.4⁺1 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2017)11-0093-05

Development of DPO-PCR Detection Method for Tomato Spotted Wilt Virus

LIU Zhongmei¹, LUO Jia², PAN Zhongle¹, LIU Hongyi¹, LI Dandan³,
HAN Zhengkun¹, WEI Dongxu¹, MA Wei⁴

(1. Technical Centre of Heilongjiang Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China;
2. Liaoning Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 3. Technical Centre of Hainan
Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou 570125, China; 4. Dongning Entry-exit Inspection
and Quarantine Bureau, Dongning 157299, China)

Abstract: In order to accurately and efficiently detect tomato spotted wilt virus(TSWV), in this study, a pair of dual-priming oligonucleotide(DPO) primers was designed based on TSWV coat protein(CP) gene by DPO technology and through optimization of reaction system factors including concentrations of primer, dNTPs and Taq DNA polymerase, a DPO-PCR detection method for TSWV was established. Its sensitivity, specificity and annealing temperature sensitivity were also evaluated. The results showed that the expected fragment of 208 bp was successfully amplified by the DPO-PCR system. The optimal DPO-PCR system (25 μL) was as follows:DNA 1 μL,10×Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μL,dNTPs (2.5 mmol/L for each) 2.0 μL,Taq DNA polymerase(5 U/μL)0.2 μL,each primer(20 μmol/L)1.0 μL,with deionized water to supplement the system. The target gene could be efficiently amplified by the DPO primers in the anneal-

收稿日期:2017-05-13

基金项目:哈尔滨市科技创新人才研究专项(2012RFQQN029);国家质检总局科技计划项目(2013IK051)

作者简介:刘忠梅(1976-),女,山东莱州人,高级农艺师,博士,主要从事植物检疫工作。E-mail:liuzhmei@163.com

ling temperature range from 49.8 °C to 70.0 °C, showing that the method was insensitive to annealing temperature. The detection sensitivity of the method was 7.5 ng when viral RNA was used as template. TSWV, tomato ringspot virus, tobacco ring spot virus and tomato black ring virus were simultaneously detected by the method, and positive reaction appeared only for TSWV, indicating that the method had strong specificity. The established method can detect TSWV accurately and efficiently, and thus can be used for quarantine screening and disease diagnosis of entry and exit seedlings.

Key words: tomato spotted wilt virus; dual-priming oligonucleotide; DPO-PCR; detection

番茄斑萎病是 1915 年在澳洲番茄上首次发现的,其病原于 1930 年被命名为番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)^[1]。该病毒为世界性分布,特别是热带、温带和亚热带地区比较常见^[2]。其寄主范围广,可侵染 80 科 1 000 多种植物,其中包括番茄、烤烟、辣椒、花生等作物,也包括非洲紫罗兰、万寿菊等多种观赏植物^[3-4]。TSWV 在全世界范围内都导致了重大的农业经济损失^[5]。据报道,该病毒曾造成澳大利亚花生产量损失高达 90%,印度花生产量损失达 80%^[6];也曾造成夏威夷生菜和番茄产量亏损 50%~90%^[7];而在法国和西班牙等欧洲地区,随着传播介体蓟马的定殖与扩散,该病毒能够对番茄、辣椒等造成毁灭性危害,损失最高可达 100%^[8]。因此,TSWV 被列为世界危害最大的 10 种植物病毒之一^[9]。TSWV 可以通过汁液接种、种子传染,蓟马也能传播。感病种苗的贸易是该病毒远距离传播的方式之一。TSWV 是《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中列明的有害生物,也是欧洲及地中海植物保护组织(EPPO)检疫性有害生物。建立该病毒快速、精准的检测方法,能有效地阻止外来种苗携带的病毒入侵,保护我国的农业生产。

双启动寡核苷酸引物(DPO)技术 2007 年由韩国的 Seegene 公司首次研制成功^[10],应用于感染性疾病诊断,极大地提高了 PCR 的敏感性和特异性。

Kommedal 等^[11]在人类临床标本细菌 16S rRNA 研究中,通过试验证实 DPO 的设计可以防止 DNA 的交叉反应所产生的假阳性和假阴性。刘梅等^[12]将该技术应用于马铃薯病毒的检测,表明其特异性强和敏感度高。徐义刚等^[13]将该技术应用于食源性致病菌大肠杆菌 O157:H7 的检测,可以有效阻断非特异性扩增从而避免了假阳性的检测结果,显示出其特异性强。本研究拟采用 DPO 技术,建立特异性检测 TSWV 的 DPO-PCR 方法,为进出境种苗检疫筛查及田间病害诊断提供良好的检测手段。

1 材料和方法

1.1 材料

TSWV、番茄环斑病毒、烟草环斑病毒和番茄黑环病毒的阳性材料均由中检院检疫科学研究院提供。

M-MLV 反转录酶为 Promega 公司产品,RNasin、dNTPs、Taq DNA 聚合酶和 100 bp DNA Ladder (Dye Plus) 为大连宝生物(TaKaRa)公司产品,核酸提取试剂为 Qiagen RNeasy Plant Mini Kit。

1.2 引物设计与合成

根据 TSWV 外壳蛋白(CP)基因的保守序列,设计了普通引物以及 DPO 引物(表 1),均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 引物序列及产物大小

引物类型	名称	序列(5'-3')	产物大小/bp
普通引物	TSWV - F	GGATTGGAGCCACTGACATGACCTTCAGAAGGCTTGA	208
	TSWV - R	GCAATAAGAGGTAAAGCTACCTCCCAGCATTATGGCAAGCC	
DPO 引物	TSWV - D - F	GGATTGGAGCCACTGACATGACCTIIIAGGCTTGA	208
	TSWV - D - R	GCAATAAGAGGTAAAGCTACCTCCCAGCHHIGGCAAGCC	

1.3 总 RNA 提取

称取 100 mg TSWV 阳性材料,用 Qiagen RNeasy Plant Mini Kit 提取总 RNA,用 ND-1000 超微量分光光度计测定其浓度。

1.4 反转录

反转录体系 20 μL:先加入 2 μL 总 RNA、9 μL

DEPC 水,70 °C 保温 5 min,冰上放置 2 min;再加入 4 μL 5 × Buffer、2 μL dNTPs (10 mmol/L)、0.5 μL Oligo(dT)₁₈ (100 μmol/L)、1 μL Random 6 mer (100 μmol/L)、0.5 μL RNasin (40 U/μL)、1 μL M-MLV (200 U/μL),42 °C 保温 1 h。95 °C 灭活 5 min,放置冰上待用。

1.5 DPO - PCR 反应

DPO - PCR 反应体系 25 μL : dNTPs (每种 2.5 mmol/L) 用量范围为 0.01 ~ 5.0 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 用量范围为 0.001 ~ 0.5 μL , DPO 引物 (上、下游引物各 20 $\mu\text{mol/L}$) 用量范围为 0.05 ~ 2.0 μL , 10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL , 模板 1 μL , 以 ddH₂O 补充至 25 μL 。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s、60 °C 45 s、72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。反应结束后, 取 5 μL 扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并记录结果。

1.6 DPO - PCR 退火温度敏感性试验

将 DPO - PCR 退火温度范围设为 49.8 ~ 70.0 °C, 用 DPO 引物进行扩增试验, 以普通 PCR 引物作为参照, 经琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

1.7 DPO - PCR 灵敏度试验

分别取 TSWV 样品总 RNA 5、2.5、1、0.5、0.25、0.1、0.05、0.025 μL 作为反转录模板, 进行 RT - PCR, 对 DPO - PCR 的灵敏度进行测定。

1.8 DPO - PCR 特异性试验

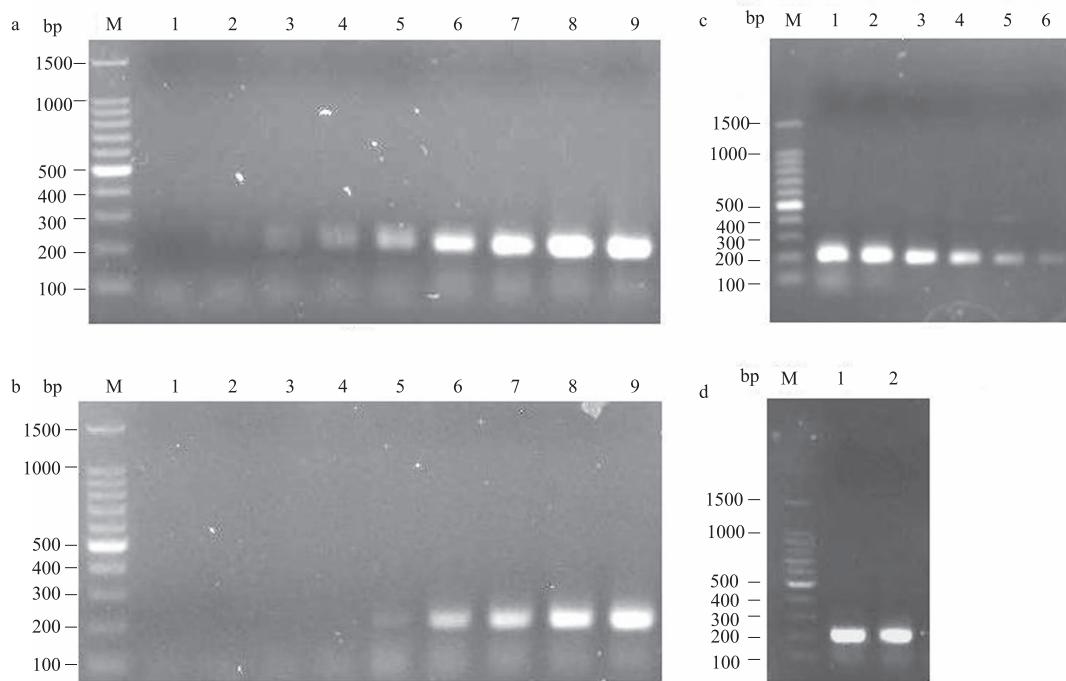
取 TSWV、番茄环斑病毒、烟草环斑病毒和番茄黑环病毒等 4 种均能侵染茄科植物的检疫性病毒的 cDNA 作为模板, 同时用健康马铃薯植株叶片作阴

性对照, 分析 DPO - PCR 的特异性。

2 结果与分析

2.1 TSWV DPO - PCR 检测方法的建立

基于 DPO 引物设计方法, 以 TSWV CP 基因的保守序列为靶序列, 设计了一对 DPO 引物, 经反应体系优化, 建立 TSWV 的 DPO - PCR 检测方法。从图 1a 可以看出, 随着 dNTPs 加入量的增加, 扩增到的目的条带逐渐变亮, 当加入量为 2.0 μL 时达到最亮, 之后不再随加入量的增加而增强。从图 1b 可以看出, *Taq* DNA 聚合酶加入量与 PCR 扩增效率呈正相关, 当加入量为 0.2 μL 时足以有效地扩增到目标条带。从图 1c 可以看出, 随着引物量的减少, 扩增的目标条带总体上越来越弱, 当加入量为 1.0 μL 时扩增效果最佳。因此, TSWV DPO - PCR 检测方法中最优化的反应体系 (25 μL) 为: DNA 模板 1 μL , 10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL , dNTPs (每种 2.5 mmol/L) 2.0 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , 上、下游 DPO 引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.0 μL , 以去离子水补充至 25 μL 。采用该最优体系检测 TSWV 阳性样品, 可以有效地扩增到目标条带 (图 1d)。



a. dNTPs(每种 2.5 mmol/L)用量优化, 其中, M:100 bp DNA Ladder(下同); 1—9:dNTPs 用量分别为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 μL 。b. *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)用量优化, 其中, 1—9:*Taq* DNA 聚合酶用量分别为 0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 μL 。c. DPO 引物(20 $\mu\text{mol/L}$)用量优化, 其中, 1—6:DPO 引物用量分别为 2.0、1.0、0.5、0.25、0.1、0.05 μL 。

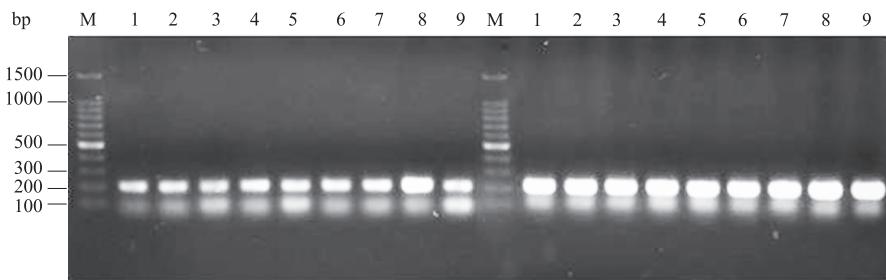
d. TSWV DPO - PCR 最优化的反应体系, 其中, 1—2:DPO - PCR 反应结果

图 1 TSWV DPO - PCR 检测体系的优化和建立

2.2 TSWV DPO - PCR 检测方法退火温度敏感性试验结果

图 2 结果显示,所建立的 DPO - PCR 方法在 49.8 ~ 70.0 °C 的退火温度范围内均能进行高效率

的扩增,且扩增效率基本保持一致,说明 DPO 引物的退火温度范围较宽;而普通 PCR 方法则存在最适退火温度。



M: 100 bp DNA Ladder; 1—9: 退火温度分别为 49.8、51.5、53.4、58.3、61.0、
63.7、66.1、68.0、70.0 °C, 其中, 左边 1—9 泳道为普通 PCR 结果,
右边 1—9 泳道为 DPO - PCR 结果

图 2 TSWV DPO - PCR 检测方法退火温度不敏感性试验结果

2.3 TSWV DPO - PCR 检测方法灵敏度试验结果

经分光光度计测定,提取的 TSWV 样品总 RNA 质量浓度为 150 ng/μL。对不同用量的总 RNA 进行反转录,然后采用 DPO - PCR 方法扩增检测,结果表明,随着反转录模板用量的降低,目标条带逐渐变弱。当总 RNA 取 5 ~ 0.05 μL 时,DPO - PCR 均能扩增到目标条带,而总 RNA 取 0.025 μL 时,DPO - PCR 不能扩增到目标条带(图 3)。因此,利用建立的 DPO - PCR 方法能有效地检出 7.5 ng 的 TSWV RNA,该方法的检测灵敏度为 7.5 ng。

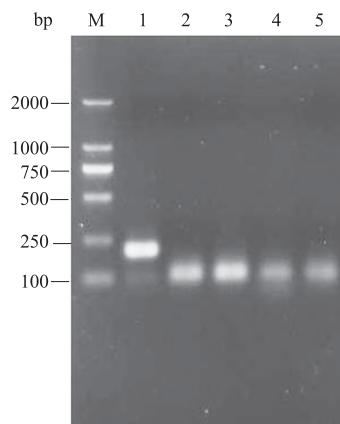


M: DL2000 DNA Marker; 1—8: 分别取 5、2.5、1、0.5、0.25、0.1、0.05、
0.025 μL TSWV RNA 作为模板, 进行反转录和 DPO - PCR 反应
图 3 TSWV DPO - PCR 检测方法灵敏度试验结果

2.4 TSWV DPO - PCR 检测方法特异性试验结果

利用建立的 DPO - PCR 方法检测 4 种供试植物病毒,结果表明,以 TSWV cDNA 为模板能够扩增出 208 bp 条带,与预期目标条带大小一致,而其他病毒阳性材料和阴性对照均未扩增到目的条带,且无非特异性扩增(图 4),说明本研究建立的 TSWV

DPO - PCR 检测方法特异性强。



M: DL2000 DNA Marker; 1—4: 分别取 TSWV、番茄环斑病毒、
烟草环斑病毒和番茄黑环病毒的 cDNA 作为模板,
进行 DPO - PCR 反应; 5: 阴性对照

图 4 TSWV DPO - PCR 检测方法特异性试验结果

3 结论与讨论

植物检疫是种传病害风险管理中一个重要的措施,各国政府制定相应的政策法规对种苗健康进行检测和管理,阻止外来病原物(病毒、真菌、细菌等)的进入,保护本国的农业生产。随着种苗调运和国际种苗贸易的迅速发展,植物病毒检疫在国际种苗贸易中受到越来越多的重视,研究一些快速、准确、灵敏的种苗病毒检疫技术成为各国植物检疫技术研究的重点。目前,TSWV 快速检测最常见的方法是普通 PCR 和实时荧光定量 PCR。引物设计是制约该类检测方法成败的关键性因素^[14-15]。本研究引入一种利用 DPO 引物的 PCR 技术,用于检测 TSWV。与普通 PCR 引物和实时荧光定量 PCR 引

物相比,DPO 引物设计简单,不需要反复比对引物的特异性,也不需要优化引物的各项参数与反应条件。本研究还表明,采用 DPO - PCR 方法检测 TSWV 时,在 49.8 ~ 70.0 ℃ 的退火温度下,均能保持高效扩增,不同于普通 PCR 和实时荧光定量 PCR 需要选择最适的退火温度。因此,DPO - PCR 大大地简化了引物设计、试验操作,且节约成本。经过对引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶用量的优化,建立了 TSWV DPO - PCR 反应体系(25 μL):DNA 模板 1 μL,10 × Buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL,dNTPs(每种2.5 mmol/L)2.0 μL,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,上、下游 DPO 引物(20 μmol/L)各 1.0 μL,以去离子水补充至 25 μL。采用该最优体系检测 TSWV 阳性样品,可以有效地扩增到目标条带。

DPO 引物中加入了多聚次黄嘌呤(polyI),该多聚次黄嘌呤由弱的氢键连接,所以它比其他碱基的熔点低,同时多聚次黄嘌呤把 DPO 引物分成了两部分,起到了固定作用并决定着引物的特异性延伸。由于 DPO 引物特殊的结构,使其自身或者引物之间很少形成发夹结构或二级结构,提高了扩增效率,DPO 引物与模板发生错配的概率很小,一旦有 3 个以上碱基错配,就不会成功扩增,保证了扩增的特异性^[16-17]。本研究中特异性试验结果表明,DPO 技术能准确地鉴定出目标植物病毒,其他植物病毒无交叉反应和非特异性反应。该技术显示出了良好的可靠性和实用性,为 TSWV 的准确检测提供了新手段,为种苗调运和国际种苗贸易的迅速发展提供了技术保障。

参考文献:

- [1] 洪霓. 番茄斑萎病毒的检疫技术[J]. 植物检疫, 2006, 20(6):389-392.
- [2] German T L, Ullman D E, Moyer J W. Tospoviruses: Diagnosis, molecular biology phylogeny and vector relationships[J]. Annual Review of Phytopathology, 1992, 30: 315-348.
- [3] Momol M T, Funderburk J E, Olson S, et al. Management of TSWV on tomatoes with UV-reflective mulch and acibenzolar-S-methyl[C]//Thrips and tospoviruses: Proceeding of the 7th international symposium on Thysanoptera. Italy:CSIRO Publisher, 2001:111-116.
- [4] 郑元仙, 刘雅婷. 番茄斑萎病毒属病毒检测技术研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2009, 24(4):607-613.
- [5] Whitfield A E, Ullman D E, German T L. Tospoviruses-thrips interactions[J]. Annu Rev Phytopathol, 2005, 43: 459-489.
- [6] Ghanekar A M, Reddy D V R, Lizuka N, et al. Bud necrosis of groundnut(*Arachis hypogaea* L.) in India caused by tomato spotted wilt virus[J]. Annals of Applied Biology, 1979, 93:173-179.
- [7] Cho J J, Mau R F L, Mitchell W C, et al. Host list of plants susceptible to tomato spotted wilt virus (TSWV) [J]. Research Extension Series, 1987, 78:1-12.
- [8] 洪霓,高必达. 植物病害检疫学[M]. 北京:科学技术出版社,2005:120-123.
- [9] Scholthof K B G, Adkins S, Czosnek H, et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(9):938-954.
- [10] Chun J Y, Kim K J, Hwang I T, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of *CYP2C19* gene[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35:40-46.
- [11] Kommedal O, Simmon K, Karaca D, et al. Dual-priming oligonucleotides for broad-range amplification of the bacterial 16S rRNA gene directly from human clinical specimens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(4):1289-1294.
- [12] 刘梅,黄新,马占鸿,等.应用 DPO 引物检测马铃薯病毒的多重 RT - PCR 技术研究[J].植物病理学报, 2009, 39(4):431-434.
- [13] 徐义刚,李丹丹,崔丽春,等.应用 DPO - PCR 技术检测肠出血性大肠杆菌 O157:H7[J].食品科学, 2014, 35(8):160-164.
- [14] 徐义刚,李丹丹,刘忠梅,等.产肠毒性大肠杆菌 DPO - PCR 检测方法的建立与应用[J].中国生物工程杂志, 2013, 33(11):75-80.
- [15] 辛言言,刘洪义,杨长志,等.番茄黑环病毒 RT - LAMP 检测方法的建立[J].河南农业科学, 2015, 44(4):88-92.
- [16] Bergstrom D E, Zhang P, Johnson W T. Comparison of the base pairing properties of a series of nitroazole nucleobase analogs in the oligodeoxyribonucleotide sequence 5'-d(CGCXAATTYGG)-3' [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25:1935-1942.
- [17] Woo H Y, Park H, Kim B I, et al. Evaluation of dual priming oligonucleotide-based multiplex PCR for detection of HBV YMDD mutants[J]. Arch Virol, 2008, 153(11):2019-2025.