

香蕉 3 种病毒的多重PCR检测体系

谭小勇, 阮小蕾, 吴丽婷, 翟国会, 李华平*

(华南农业大学植物病毒研究室, 广州 510642)

摘要: 根据GenBank中已发表的香蕉束顶病毒 (*Banana bunchy top virus*, BBTV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 和香蕉线条病毒 (*Banana streak virus*, BSV) 的基因序列, 找出保守序列分别设计出特异引物, 在建立各种病毒单项PCR技术的基础上, 通过优化多重PCR反应条件, 建立了能同时检测 3 种病毒的多重PCR检测体系。该体系可同时扩增BBTV的 615 bp、CMV的 480 bp和BSV的 945 bp的特异片段。这些片段克隆测序结果表明, 多重PCR扩增的不同病毒片段是特异和专化的, 其核苷酸序列与相应的病毒基因片段的相似性都达 91%以上。该体系的灵敏度测定结果表明, 从相当于或大于 10^{-2} mg 感病植物组织中均能检测到这 3 种病毒。

关键词: 香蕉; 病毒; 黄瓜花叶病毒; 香蕉束顶病毒; 香蕉线条病毒; 多重 PCR

中图分类号: S 668.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 05-0829-06

Development of a Multiplex PCR Protocol for the Detection of Three Viruses in Banana

TAN Xiao-yong, RUAN Xiao-lei, WU Li-ting, ZHAI Guo-hui, and LI Hua-ping*

(Laboratory of Plant Virology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Based on the establishment of the optimal PCR and RT-PCR for the detection of single virus, a multiplex PCR protocol for the detection of three main viruses (*Banana bunchy top virus*, BBTV; *Cucumber mosaic virus*, CMV; *Banana streak virus*, BSV) in banana is developed. Three specific fragments with molecular weights at 615 bp for BBTV, 480 bp for CMV and 945 bp for BSV were simultaneously amplified in one PCR reaction system. The sequence analysis of amplified fragments indicates that three virus fragments shared above 91 percent identities with that of other relative viruses. It was showed that the sensitivity of this protocol equaled to be able to detect the three viruses at the level of 10^{-2} mg banana tissue.

Key words: banana; virus; *Cucumber mosaic virus*; *Banana bunchy top virus*; *Banana streak virus*; multiplex PCR

由香蕉束顶病毒 (*Banana bunchy top virus*, BBTV) 引起的香蕉束顶病是香蕉生产上最主要的病毒病害之一, 限制和威胁着世界上 25% 的香蕉种植区域的香蕉生产 (Dale, 1987)。香蕉花叶病毒病是由黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 引起, 是我国南方香蕉生产上的主要的病毒病害, 近年来由于工厂化香蕉组培苗的生产, 使得发病情况更加严重 (陈锐 等, 2001)。香蕉线条病毒 (*Banana streak virus*, BSV) 引起的香蕉线条病已在世界上所有香蕉出产国都有报道 (Harper

收稿日期: 2009 - 12 - 28; 修回日期: 2010 - 04 - 04

基金项目: 国家公益性行业科研专项 (nyhyzx07-29); 国家香蕉产业技术体系项目 (nycyt-33-06); 广东省产业化推进项目专项 (2009B020201011)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: huaping@scau.edu.cn)

& Hull, 1998; Lockhart & Jones, 2000; Fauquet et al., 2005), 造成香蕉减产 (Laura et al., 2008) 和果实成熟延迟 (Daniells et al., 1998)。目前香蕉生产上主要通过组织培养无病毒来预防这些病毒病害的发生, 而稳定和有效的检测方法则是无病毒生产的重要保证。目前这些病害的主要检测方法有酶联免疫法 (ELISA), PCR 及免疫捕捉 PCR 等技术 (李华平等, 1997; 肖火根和胡晋生, 1999; 费继锋等, 2001; 周莉娟和郑伟文, 2001, 2003; 饶雪琴等, 2005)。Selvarajan 等 (2004) 建立了 BSV 和 BBTv 印度分离物的多重 PCR 检测体系, 彭军等 (2006) 建立了 CMV 和 BBTv 两步 PCR 法检测体系, 管维等 (2008) 在此基础上成功建立了一步 PCR 法同时检测这两种病毒的检测体系。为了提高病毒检测速度, 作者通过从田间采集样品, 优化反应条件, 建立了能同时检测华南地区香蕉产区广泛分布的 BBTv、CMV 和 BSV 这 3 种病毒的多重 PCR 法。该法不但灵敏度高、稳定性强, 而且简化了操作步骤, 降低了检测成本, 缩短了检测时间, 为实际生产提供了有力的技术保障。

1 材料与方法

1.1 样品采集及引物设计

取感染 BBTv 的香蕉叶脉组织 (从广州番禺地区采样)、感染 BSV 和 CMV 的香蕉叶片组织 (从本实验室基地采样) 0.2 g, 将其混合 (Avijit et al., 2005) 提取总核酸。抽提物于 -20°C 下保存。

根据 GenBank 收录的 BBTv、CMV、BSV 全部序列, 通过对比找到这些病毒的特异性区域, 依据保守序列设计引物, 其中 BBTv 的扩增片段为复制酶编码区域, CMV 和 BSV 的扩增片段均为病毒衣壳蛋白编码区域 (表 1)。

表 1 用于建立香蕉 3 种病毒检测体系的 PCR 扩增引物序列
Table 1 Nucleotide sequence of primers used for PCR experiments

病毒 Virus	引物名称 Name of primer	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	PCR 产物大小/bp Size of PCR product
BBTv	P1	ATGTGGTATGCTGGATGTTT	618
	P2	GTTTCATATTTCCCGCTTTGA	
CMV	P1	TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG	480
	P2	GCCGTAAGCTGGATGGACAA	
BSV	P1	AAGCTTCGGGTACACAAAATATCATC	945
	P2	GGATCCGGTTTCTTAACTTCTTC	

1.2 两步法单重 RT-PCR 反应体系的建立

CMV 反转录体系 20 μL , 含下游引物 1 μL , CMV 的 RNA 模板 1 μL , dNTPs 1 μL , RNA 酶抑制剂 (RNase Inhibitor, $20\text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 反转录酶 (Reverse Transcriptase M-MLV) 0.2 μL , 反转录酶缓冲液 4 μL , DEPC 处理 ddH₂O 16.3 μL , 以上所用试剂均购自宝生物工程有限公司。反应条件为 30°C 10 min, 42°C 30 min, 99°C 5 min, 5°C 5 min。

取感染 BBTv、BSV 植株的总核酸及 CMV 反转录产物各 1 μL 为模板, 上下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 0.5 μL , PCR buffer 2.5 μL , Taq 酶 0.2 μL , 用 ddH₂O 补足至 25 μL 。

将 3 种病毒分别按照上述反应体系配制成反应液, 将装有反应液的 PCR 管放入不同温度 ($48 \sim 58^{\circ}\text{C}$) 中进行单重 PCR, 每 10 μL 的 PCR 反应产物混入 1 μL $10 \times$ PCR 上样缓冲液, 加入到 1.0% 的琼脂糖凝胶中在 90 V 电压下电泳, 在紫外灯下观察, 条带最亮的产物的退火温度为最佳退火温度。

1.3 两步法多重 RT-PCR 体系的建立

取混合抽提的总核酸 3 μL 作为模板, 依次加入 CMV 下游引物 1 μL , $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 1 μL ,

RNA 酶抑制剂 (RNase Inhibitor $20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$, 反转录酶 $0.2 \mu\text{L}$, 反转录酶缓冲液 $4 \mu\text{L}$, DEPC 处理 ddH₂O $14.3 \mu\text{L}$ 。反应条件为 30°C 10 min , 42°C 30 min , 99°C 5 min , 5°C 5 min 。取反应液 $3.6 \mu\text{L}$ 作为多重 PCR 的模板, 加入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs $1.2 \mu\text{L}$, *Taq* (5 U) $0.5 \mu\text{L}$, BSV 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1.5 \mu\text{L}$, BBTv 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1.2 \mu\text{L}$, CMV 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1.0 \mu\text{L}$, PCR buffer $5.0 \mu\text{L}$, 加 ddH₂O 补足为 $50 \mu\text{L}$ 。反应条件为 94°C 5 min , 94°C 30 s , $48 \sim 58^\circ\text{C}$ 30 s , 72°C 1 min , 30 个循环, 72°C 10 min 。在每 $10 \mu\text{L}$ 的 PCR 反应产物混入 $1 \mu\text{L}$ $10 \times \text{PCR}$ 上样缓冲液, 加入到 1.0% 琼脂糖凝胶中 90 V 电压下电泳, 利用凝胶成像系统观察结果。

1.4 两步法灵敏度检测 and 一步法 RT-PCR 体系的建立

将提取的总核酸用 TE 缓冲液按照 10 倍浓度进行系列稀释, 取每个稀释后的样品 $3 \mu\text{L}$ 作为反应模板, 按照前述反应体系进行灵敏度试验。

RT-PCR 反应体系: PrimeScript 1 Step Enzyme Mix $2 \mu\text{L}$, $2 \times 1 \text{ Step Buffer}$ $25 \mu\text{L}$, BSV 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1.5 \mu\text{L}$, BBTv 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1.2 \mu\text{L}$, CMV 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1.0 \mu\text{L}$, RNA 酶抑制剂 (RNase Inhibitor $20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$, 加入 RNase Free ddH₂O 使得体系到 $50 \mu\text{L}$ 。反应条件为 50°C 30 min , 94°C 2 min , 94°C 30 s , 53°C 30 s , 72°C 1 min , 35 个循环, 72°C 10 min 。将所得产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像系统观察并记录图片。

2 结果与分析

2.1 单重 RT-PCR 反应体系最佳温度的确定

根据 PCR 反应产物在胶中的特异性和明亮程度, CMV、BBTV 和 BSV 的最佳退火温度分别为 58°C 、 56°C 和 51°C 。在最佳温度下, 各病毒的 PCR 扩增产物条带明亮、清晰, 且只有一条带, 其扩增片段长度分别为 480 、 618 和 945 bp , 符合设计预期大小。

2.2 两步法多重 RT-PCR 反应体系最佳退火温度的确定

在 PCR 仪上设置 12 个温度梯度 ($48 \sim 58^\circ\text{C}$), 先在 30°C 反应条件下完成反转录后, 再分别进行不同温度下的 PCR 扩增反应。由图 1 可以看出, CMV 在 $48 \sim 58^\circ\text{C}$ 间都有一条明亮的扩增条带, BSV 在 $48 \sim 53.6^\circ\text{C}$ 也可见明亮的条带, 但从 54.8°C 后则没有扩增条带。BBTV 则在 $52.4 \sim 54.8^\circ\text{C}$ 扩增相对较好, 其他都为弱带或没有扩增。综合 3 种病毒的扩增情况, 认为 3 种病毒在两步法中, PCR 反应的最佳退火温度为 53°C 。

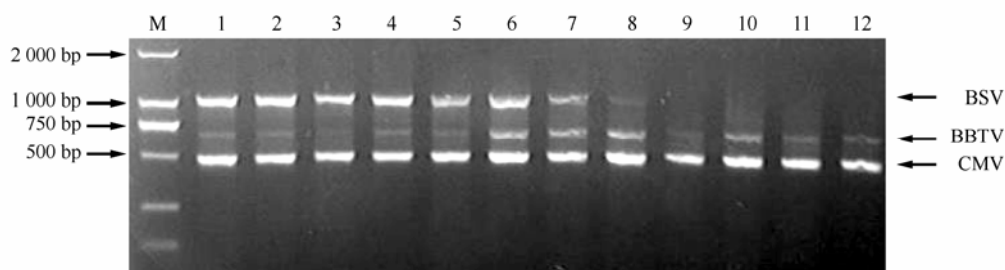


图 1 两步多重 RT-PCR 法在不同退火温度下扩增产物的凝胶电泳

M: DNA 标准 DL2000; 1~12: 退火温度分别为 48°C 、 48.5°C 、 49°C 、 50°C 、 51.2°C 、 52.4°C 、 53.6°C 、 54.8°C 、 56°C 、 57°C 、 57.5°C 、 58°C 。

Fig. 1 Electrophoresis analysis of the two-step-multiplex RT-PCR under different annealing temperatures

M: DNA MARKER DL 2000; 1~12: The PCR products under different annealing-temperature

48°C , 48.5°C , 49°C , 50°C , 51.2°C , 52.4°C , 53.6°C , 54.8°C , 56°C , 57°C , 57.5°C , 58°C .

2.3 灵敏度检测分析

将提取的总核酸进行系列稀释后,采用两步RT-PCR法进行3种病毒灵敏度检测试验。由图2可知,BSV在样品浓度稀释100倍后仍能扩增出特异条带,稀释1000倍后条带非常微弱;BBTV在样品稀释1000倍后仍能扩增出清晰的特异条带,稀释10000倍后扩增条带很微弱;CMV在模板稀释10000倍后仍能有清晰条带出现。这些结果表明,不同病毒可能由于在植株中病毒含量的不同,而导致其检测灵敏度不同,其中对CMV的检测灵敏度最高,其次为BBTV,BSV检测灵敏度最低。依据抽提核酸的样品质量,可以得出CMV、BBTV和BSV的检测灵敏度分别相当于 10^{-4} 、 10^{-3} 和 10^{-2} mg组织量。

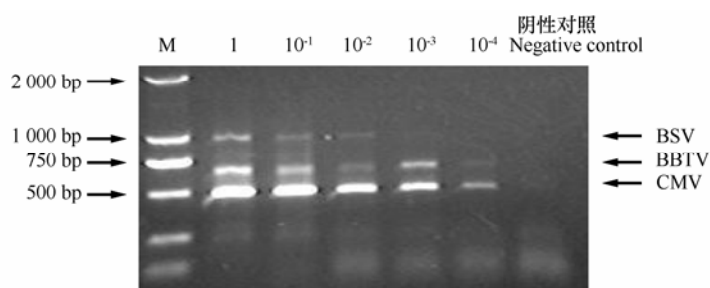


图2 香蕉3种病毒两步多重RT-PCR法检测灵敏度分析

Fig. 2 The sensitivity analysis of detection of three kinds of banana viruses with two-step multiplex RT-PCR

2.4 一步RT-PCR检测方法的建立

采用TAKARA一步RT-PCR法试剂盒,将病毒反转录和PCR扩增在一个试剂管中一步完成,其扩增产物分析结果见图3。检测单个病毒(CMV、BBTV、BSV)的单重PCR方法和同时检测这3种病毒的多重PCR方法,均能够各自扩增出符合预期要求的各种病毒的单一条带。两种方法扩增的各自病毒条带分子量大小一致,而且均没有产生非特异带。这表明我们所建立的一步RT-PCR法不仅可以用于香蕉单个病毒的检测,而且可同时检测香蕉的这3种病毒的检测。从实用性和有效性来考虑,一步RT-PCR法、特别是一步多重RT-PCR法将明显优于两步RT-PCR法。

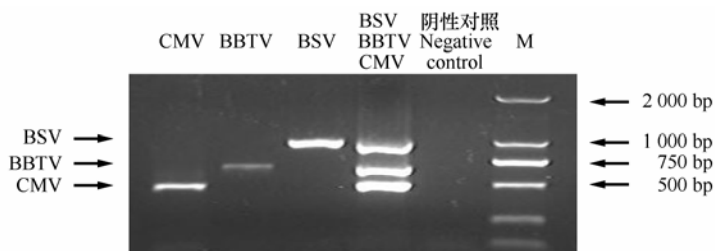


图3 一步单重及一步多重RT-PCR法检测香蕉单个和多个病毒的凝胶电泳分析

Fig. 3 Electrophoresis analysis of the one-step single and multiplex RT-PCR for detection of single and multiple viruses on banana

2.5 PCR产物序列分析

将扩增的不同病毒的部分PCR产物,用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化后连接到Simple-T载体,将连接产物转化到*E.coli* JM109感受态中,送交上海英骏生物技术有限公司广州分公司进行序列测定。序列测定结果表明,BBTV扩增片段为618 bp,符合预期产物大小,是BBTV DNA-1的

部分序列,与 GenBank 中其他众多分离物相似性在 91%到 99%之间。CMV 的扩增产物大小为 480 bp,符合预期大小,是 CP 基因的部分序列,与 GenBank 中其他分离物的相似性达到 93%以上。BSV 扩增片段长度为 945 bp,是 CP 基因的部分序列,和 BSV-GD 分离物的相似度达到 100%,和 BSV-OL、BSV-TRY 分离物及 *Musa* ABB Group clone musa6 *Banana streak virus* 序列的相似性达到 99%,与 BSV-GF 及 BSV-Vietnam 分离物的相似性分别为 68%和 69%。3 次重复测序结果一致。这表明我们所建立的一步 RT-PCR 法和两步 RT-PCR 法所扩增的条带都是专化的,是对各自病毒基因片段的扩增,可以用于香蕉 3 种病毒的检测。

3 讨论

本体系将 CMV 反转录和 3 种病毒的 PCR 扩增同时在一个试剂管中完成,不但简化了操作步骤,缩短了检测时间,而且更重要的是能够减少和防止在整个检测操作过程中的污染。从灵敏度比较来看,一步 RT-PCR 法和二步 RT-PCR 法基本相当,二者在检测过程中都显示出特异、稳定而有效,但一步 RT-PCR 法需要购置专用试剂盒,其花费较二步 RT-PCR 法要高。

本研究中引物的设计非常重要。一方面要保证不同病毒间扩增片段的专化性和保守性,另一方面要保证扩增出来的不同病毒基因片段大小相差最好在 150 bp 以上,以便扩增后不同病毒基因片段的鉴别。同时不同引物之间互补碱基要尽可能的少,以免引物之间发生配对,影响反应的发生。在此检测体系中,要根据不同的模板和引物对其加以调整,以保证结果的特异性和可靠性(黄留玉,2005)。由于 BSV 株系间基因组差异较大,很难找到一个引物能检测所有的 BSV 病毒,Provost 等(2006)通过设计多对引物建立了多重免疫捕捉 PCR (multiplex immunocapture PCR, M-IC-PCR) 来检测 BSV 的不同株系。本研究根据 GenBank 中 BSV 广东分离物的序列和其他序列具有最大相似性的区域来设计引物,通过 PCR 扩增产物序列分析可知,该体系扩增的 BSV 基因序列和来源于尼日利亚的 BSV-OL 分离物,来源于印度的 BSV-TRY 分离物及香蕉序列中一个内源基因的相似性达到 99%,而与来源于厄瓜多尔的 BSV-GF 分离物及来源于越南的 BSV-vietnam 分离物的相似性则只有 68%和 69%。从引物序列匹配性来看,作者设计的 BSV 引物序列与 BSV-GF 和 BSV-vietnam 分离物分别只有 83%和 85%的相似性,由于没有该两种株系的样品,因而我们所建立的检测体系能否对这两种株系进行检测,有待今后研究证实。

本试验使用含有上述 3 种病毒核酸的样品进行稳定性试验表明,该体系准确率达到了 99%以上。对采自华南地区不同蕉区的 49 份田间样品进行初步检测结果表明,该体系可有效检测上述 3 种病毒。

References

- Avijit R, Amer F, Barthe G, Brlansky R H. 2005. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. *Journal of Virological Methods*, 129: 47 - 55.
- Chen Xian, Lai Zhen-ru, Chen Shu-bang. 2001. The demonstrative trial of 36% 'Xianghuanglong' WP in preventing banana bunchy top disease and banana mosaic disease. *Guangdong Agricultural Sciences*, (2): 44 - 45. (in Chinese)
- 陈 锐, 赖真如, 陈树帮. 2001. 36%降黄龙可湿性粉剂防治香蕉花叶心腐病和香蕉束顶病示范试验. *广东农业科学*, (2): 44 - 45.
- Daniells J W, Geering A, Thomas J E. 1998. Banana streak virus investigations in Australia. *Info Musa*, 7 (2): 20 - 21.
- Dale J L. 1987. Banana bunchy top: An economically important tropical plant virus disease. *Advances in Virus Research*, 33: 301 - 325.
- Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L A. 2005. *Virus taxonomy: 8th report of the international committee of the taxonomy of viruses*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

- Fei Ji-feng, Xiao Huo-gen, Li Hua-ping, Fan Huai-zhong. 2001. Advances in Research of Banana Streak Disease, Chinese Journal of Virology, 17 (4): 381 - 385. (in Chinese).
- 费继锋, 肖火根, 李华平, 范怀忠. 2001. 香蕉线条病毒病研究进展, 病毒学报, 17(4): 381 - 385.
- Guan Wei, Yang Lei-liang, Qiu De-yi. 2008. Detection of *Banana bunchy top virus* and *Cucumber mosaic virus* simultaneously by one-step method. Plant Quarantine, 22 (4): 213 - 215. (in Chinese)
- 管 维, 杨雷亮, 邱德义. 2008. 用一步 PCR 法同时检测香蕉束顶病毒和香蕉花叶心腐病毒. 植物检疫, 22 (4): 213 - 215.
- Harper G, Hull R. 1998. Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA. Virus Genes, 17 (3): 271 - 278.
- Huang Liu-Yu. 2005. Principle and method of latest PCR technology and its applications. Beijing: Chemical Industry Press: 56. (in Chinese)
- 黄留玉. 2005. PCR 最新技术原理、方法及应用. 北京: 化学工业出版社: 56.
- Li Hua-ping, John Hu, Fan Huai-zhong. 1997. Detection techniques of banana mosaic disease. Chinese Journal of Virology, 13 (3): 273 - 277. (in Chinese)
- 李华平, 胡晋生, 范怀忠. 1997. 香蕉花叶病检测技术的比较. 病毒学报, 13 (3): 273 - 277.
- Lockhart B, Jones D. 2000. Banana streak // Jones D R. Diseases of banana, abaca and enset. Wallingford: CABI: 263 - 274.
- Laura K, Anne W, Glyn H, Ram S P. 2008. Molecular identification of *Banana streak virus* isolates in Kenya. J Phytopathology, 156: 678 - 686.
- Peng Jun, Wang Guo-fen, Huang Jun-sheng, Dai Peng, Xie Yu-ping, Li Wei-dong. 2006. Development of a multiplex PCR protocol for the detection of two viruses of banana. Acta Horticulturae Sinica, 33 (4): 845 - 848. (in Chinese)
- 彭 军, 王国芬, 黄俊生, 代 鹏, 谢玉萍, 李伟东. 2006. 香蕉两种主要病毒多重 PCR 检测方法的建立. 园艺学报, 33 (4): 845 - 848.
- Provost G L. 2006. Improved detection of episomal *Banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. Journal of Virological Methods, 137: 7 - 13.
- Rao Xue-qin, Zhang Shu-guang, Gao Qiao-wan. 2005. Detecting viruses in banana differentiated shoots from tissue culture. Journal of South China Agricultural University, 2005, 26 (1): 64 - 66. (in Chinese)
- 饶雪琴, 张曙光, 高乔婉. 2005. 工厂化组培香蕉分化芽中病毒的检测. 华南农业大学学报, 26 (1): 64 - 66.
- Selvarajan R, Balasubramanian V, Dayakar S, Sathaimoorthy S, Ahlawat Y S. 2004. Simultaneous detection of Indian isolates of *Banana bunchy top virus*, *Banana streak virus* and *Banana bract mosaic virus* by multiplex-PCR technique // Proceedings of national seminar on banana industry-present scenario and future strategies at the Bidhan Chandra Krishi Viswavidyala, Kalyan, West Bengal, India: FTC: 11 - 13.
- Xiao Hyo-gen, Hu Jin-sheng. 1999. Detection of *Banana bunchy top virus* by polymerase chain reaction assays. Journal of South China Agricultural University, 20 (1): 5 - 8. (in Chinese)
- 肖火根, 胡晋生. 1999. 香蕉束顶病毒 PCR 检测技术研究. 华南农业大学学报, 20 (1): 5 - 8.
- Zhou Li-juan, Zheng Wei-wen. 2001. Detection of banana bunchy top virus (BBTV) by PCR. Fujian Journal of Agricultural Science, 16 (4): 45 - 48. (in Chinese)
- 周莉娟, 郑伟文. 2001. PCR 法检测香蕉束顶病毒. 福建农业学报, 16 (4): 45 - 48.
- Zhou Li-juan, Zheng Wei-wen. 2003. Comparative studies on two-step and one-step RT-PCR for detection of banana mosaic disease. Journal of Jiangxi Agricultural University, 25 (5): 776 - 779. (in Chinese)
- 周莉娟, 郑伟文. 2003. 香蕉花叶心腐病检测的两步法及一步法 RT-PCR 比较研究. 江西农业大学学报, 25 (5): 776 - 779.
- Provost G L. 2006. Improved detection of episomal *Banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. Journal of Virological Methods, 137: 7 - 13.