

柑橘 4 种病毒多重 PCR 检测技术的建立及应用

黄爱军*, 王莹, 丁敏, 卢占军, 易龙

(赣南师范大学生命科学学院, 国家脐橙工程技术研究中心, 江西赣州 341000)

摘要: 柑橘衰退病毒 (CTV)、柑橘碎叶病毒 (CTLV)、柑橘黄化脉明病毒 (CYVCV) 和柑橘叶斑驳病毒 (CLBV) 是影响柑橘生产的重要病毒性病害, 建立快速、准确的检测方法是防控该病害的基础。本研究通过筛选针对 4 种病毒基因组保守区域设计的特异性引物, 优化影响多重 RT-PCR 扩增的引物浓度、退火温度, 建立了可同时扩增 4 种病毒的多重 RT-PCR 检测体系。该检测体系扩增的特异片段大小分别是 CTLV 889 bp、CYVCV 612 bp、CTV 462 bp 和 CLBV 294 bp, 扩增产物清晰, 特异, 检测灵敏度较普通单重 RT-PCR 灵敏度低约 10 倍。采用多重 RT-PCR 和单重 RT-PCR 对收集到的 59 份田间样品分别进行检测, 结果显示 2 种方法检测结果一致, 4 种病毒的检出率在 11.9% ~ 54.2% 之间。建立的多重 RT-PCR 方法可准确、快速、灵敏地检测单一或复合侵染的 4 种柑橘病毒。

关键词: 柑橘; 柑橘衰退病毒; 柑橘碎叶病毒; 柑橘黄化脉明病毒; 柑橘叶斑驳病毒; 多重 PCR

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 08-1616-07

Establishment and Application of Multiplex PCR Rapid Detection of Four Citrus Viruses

HUANG Aijun*, WANG Ying, DING Min, LU Zhanjun, and YI Long

(College of Life Sciences, Gannan Normal University, National Navel Orange Engineering Research Center, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

Abstract: *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus tatter leaf virus* (CTLV), *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV), and *Citrus leaf blotch virus* (CLBV) are important graft-transmissible pathogens of citrus. Rapid and accurate detection methods are of great significance for the prevention and control of viral diseases. Four compatible sets of primers specific for each virus were designed based on conserved sequences of coat protein gene for multiplex PCR assay. The crucial factors of multiple PCR including primer concentration and annealing temperature were optimized for the highest sensitivity and specificity. Four specific fragments were simultaneously amplified in one PCR reaction. Their molecular weights were determined to be 889 (CTLV), 612 (CYVCV), 462 (CTV) and 294 bp (CLBV). The sensibility assay showed that the sensibility of this one-step multiplex PCR is about 10 times lower than that of regular single RT-PCR. Finally, this detection system was used to detect these viruses from 59 field samples. The results revealed that the detection rate of these viruses was between 11.9% and 54.2%. In conclusion, this one-step multiplex PCR system is suitable for rapid detection of the 4 citrus viruses from field samples

收稿日期: 2019-01-21; 修回日期: 2019-06-10

基金项目: 江西省重点研发计划项目 (20161ACF60016); 国家自然科学基金项目 (31860488)

* E-mail: hajgnu@sina.com

with accuracy, rapidity and sensitivity.

Keywords: citrus; *Citrus tristeza virus*; *Citrus tatter leaf virus*; *Citrus yellow vein clearing virus*; *Citrus leaf blotch virus*; one-step multiplex PCR

柑橘病毒性病害是影响其生产的重要因素之一。柑橘碎叶病毒 (*Citrus tatter leaf virus*, CTLV) 可引起嫁接部位肿大, 导致树势衰弱, 甚至枯死 (Zhang et al., 1988)。柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV) 可引起幼苗黄化, 幼树或成龄树出现树体衰退、茎陷点等症状, 果实产量下降 (Bar-Joseph et al., 1989)。柑橘黄化脉明病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV) 和柑橘叶斑驳病毒 (*Citrus leaf blotch virus*, CLBV) 是近年来国内新报道两种的柑橘病毒 (陈洪明 等, 2015; Chen et al., 2016; 项周 等, 2017)。CYVCV 主要引起柠檬、酸橙类脉明及叶片畸形症状, CLBV 可引起橘橙 (‘Dweet’ tangor) 叶片斑驳变色症状。

目前针对以上 4 种病毒已建立了一些单一病毒的快速检测方法, 包括血清学、RT-PCR 以及基于环介导等温核酸扩增技术的检测方法等 (Atta et al., 2012; 宾羽 等, 2015; 金鑫 等, 2016; 张艳慧 等, 2017; 赵恒燕 等, 2017)。其中血清学检测是病毒病检验的常用方法, 已在多种柑橘病毒检测鉴定中使用, 但不能实现多种病毒病害同时检测。而多重 PCR 技术, 可通过添加多种引物, 优化反应体系等, 提高检测效率, 实现多种病害的同时检测, 在实际病害检测鉴定中具有重要的意义。

本研究旨在建立 CTV、CTLV、CYVCV 和 CLBV 4 种病毒的多重 RT-PCR 检测方法, 以期提供更简便、快速、高效的检测方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

感染 CTLV、CYVCV、CTV 和 CLBV 的纽荷尔脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 以及对照材料均保存于江西省赣州市国家脐橙工程技术研究中心温网室内。

2017 年 9 月到 2018 年 5 月在江西省赣州市章贡区内 3 个果园采集纽荷尔脐橙样品共 59 份。样品植株均表现出一定感病症状, 如叶片扭曲、卷曲、黄化等。每株采集 5~10 片叶混合在一起抽提 RNA, 所有样品抽提总 RNA 后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 样品 RNA 提取与病毒检测引物设计

植物总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus、One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、PmdTM 19-T Vector Cloning 试剂盒、*E.coli* DH5 α 感受态细胞均购自 TaKaRa 公司。所有操作均参照试剂盒说明书进行。

所得总 RNA 采用 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国) 检测其浓度和纯度。

CTLV 和 CYVCV 病毒引物序列来源于文献 (宋震, 2013; Chen et al., 2014)。CTV 和 CLBV 病毒引物分别根据 GenBank 上公布的病毒 *p25* 基因和外壳蛋白基因序列的保守区域设计 (表 1)。所有引物由金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1 柑橘 4 种病毒检测用引物
Table 1 Primers sequences for the detection of CTLV, CYVCV, CTV and CLB

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence	产物大小/bp Product size	退火温度 T _m	参考文献 Reference
CTLV-F	F: AGAGTGGACAAACTCTAGAC	889	56	宋震, 2013
CTLV-R	R: CCCTCTCAGCTAGAATTGAA			
CYVCV-F	F: TACCGCAGCTATCCATTTCC	612	56	Chen et al., 2014
CYVCV-R	R: GCAGAAATCCCGAACCACTA			
CTV-F	F: ACTCTGATAGCGATGAACGA	462	58	
CTV-R	R: AGCACACTTTAAATCAGTCAAGC			
CLBV-F	F: ACGCTTAAGATTACAGACACGAA	294	57	
CLBV-R	R: AAAAGCTGCAAACTTTGTCC			

1.3 单一 RT-PCR 检测

以提取的阳性样品总 RNA 为模板, 分别用 CTLV、CYVCV、CTV、CLBV 的特异性引物对样品进行 PCR 扩增。反应体系为 25 μL: RNA 模板 1 μL, 病毒的上、下游引物 (10 μmol · L⁻¹) 各 0.5 μL, 2× one Step Buffer 缓冲液 12.5 μL, PrimeScript one Step 酶混合液 1.0 μL, RNase Free 蒸馏水 9.5 μL。反应条件: 50 °C 反转录 30 min, 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 20 s, 退火 20 s (具体退火温度见表 1), 72 °C 延伸, 延伸时间随扩增产物长度改变 (1 000 bp · min⁻¹ 来计算), 共循环 35 次, 72 °C 延伸 7 min。PCR 反应结束后采用 1.2% 琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳。上样量为 5 μL, 120 V 稳压电泳 30 min, 凝胶成像仪观察拍照。

1.4 多重 RT-PCR 检测体系优化和建立

在单一 RT-PCR 的基础上对多重 RT-PCR 反应体系进行优化。分别对多重 RT-PCR 体系中的引物浓度 (图 1)、退火温度 (52、52.8、53.9、55.2、57、58.5、59.5 和 60 °C) 进行试验。优化引物浓度时, 首先将所有病毒引物浓度设定为 0.12 μmol · L⁻¹, 扩增模板为阳性植株总 RNA 梯度稀释 10⁰ ~ 10⁻² 倍, 以确定引物浓度变化是否对扩增灵敏度造成影响。

1.5 多重 RT-PCR 灵敏度检测

取 5 μL 提取的含有 4 种病毒柑橘总 RNA, 进行 10 倍梯度稀释, 依次稀释为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 倍, 相同反应条件下, 以未稀释 RNA 和 10⁻¹ ~ 10⁻⁶ 稀释 RNA 为模板, 分别应用单一 RT-PCR 和多重 RT-PCR 体系检测, 比较两种检测方法的灵敏度。

1.6 多重 RT-PCR 产物的克隆、测序与序列分析

多重 RT-PCR 扩增产物用 TaKaRa 公司 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化, 纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T vector 连接, 连接产物转化至 DH5α 感受态, 经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后获得阳性克隆。获得的阳性克隆菌液送金斯瑞生物科技有限公司进行测序。测序所得结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析。

1.7 多重 RT-PCR 检测体系的应用

提取从田间采集的疑似感病的纽荷尔脐橙 59 份样品的总 RNA, 采用多重 RT-PCR 体系和单一 RT-PCR 分别检测感染 4 种病毒的情况。

2 结果与分析

2.1 多重 RT-PCR 反应体系的优化

4 种病毒引物浓度优化试验结果见图 1。当所有病毒引物浓度设定为 $0.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CTLV 和 CTV 扩增条带最亮, CYVCFV 扩增条带较亮, CLBVF 扩增条带亮度较弱, 且在模板稀释至 10^{-1} 和 10^{-2} 时更弱或看不到扩增条带。提高 CYVCFV 引物浓度至 $0.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CYVCFV 扩增亮度有所提升, 提高 CLBVF 引物浓度至 0.16、0.20 和 $0.24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CLBVF 扩增条带亮度改善较大, 在稀释模板 10^{-2} , 仍有较弱条带扩增, 三者比较, 选择条带亮且浓度较低的 $0.20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为优化浓度。最终确定 CTLV、CYVCFV、CTV、CLBVF 这 4 种病毒引物浓度比为 $0.12 : 0.12 : 0.16 : 0.20 (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 。

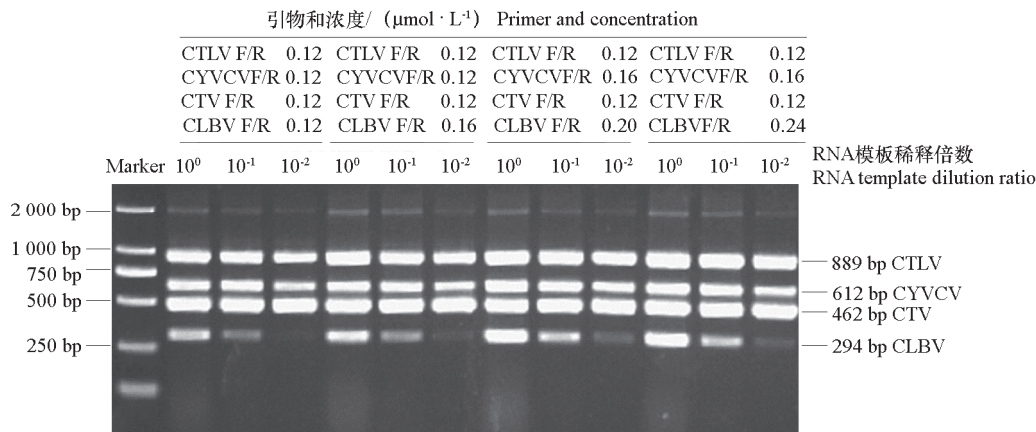


图 1 多重 RT-PCR 反应体系引物浓度优化
Fig. 1 Optimization of primer concentration of the multiplex RT-PCR

退火温度优化试验结果见图 2, 当退火温度为 52°C 时, 4 种病毒扩增条带均较亮, 但在目的条带上方存在有明显的非特异性扩增条带, 随着退火温度的升高, 特异性条带逐渐减弱, 在 58.5°C 时, 4 种病毒目的条带较亮且非特异性扩增最弱, 退火温度再升高时, CTLV 和 CLBVF 目的条带扩增减弱, 因此确定退火温度为 58.5°C 。

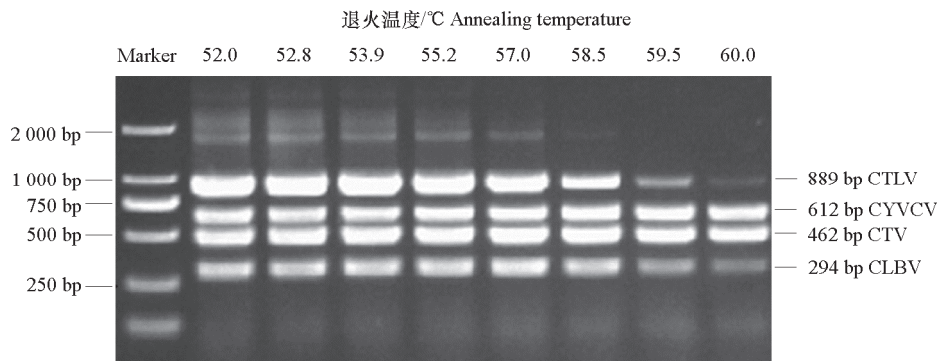


图 2 多重 RT-PCR 反应体系退火温度优化
Fig. 2 Optimization of annealing temperature of multiplex RT-PCR

根据以上试验结果, 确定 4 种柑橘病毒的多重 RT-PCR 反应体系和反应条件如下, 反应体系为 25 μL : RNA 模板 1 μL , CTLV 上、下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.3 μL , CYVCV 上、下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.4 μL , CTV 上、下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.3 μL , CLBVB 上、下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL , $2\times$ Step Buffer 缓冲液 12.5 μL , PrimeScript one Step 酶混合液 1.0 μL , RNase Free 蒸馏水 7.5 μL 。反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 58.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 共循环 35 次, 再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。利用该多重检测体系进行 4 种病毒扩增, 与单一 RT-PCR 扩增所得条带进行比较, 4 种病毒目的条带特异且清晰分明 (图 3)。

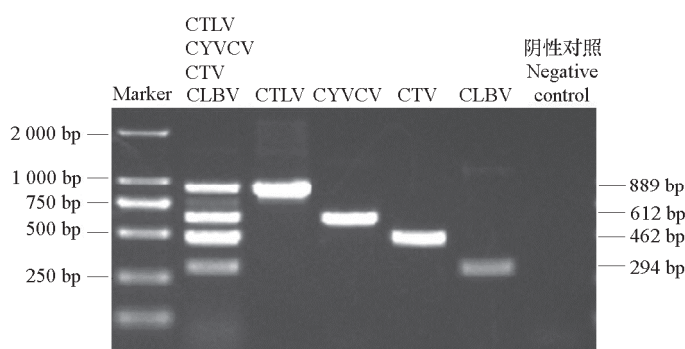


图 3 柑橘 4 种病毒多重 RT-PCR 和单一病毒 RT-PCR 扩增结果比较
Fig. 3 Detection of the 4 viruses by multiplex RT-PCR and single virus RT-PCR

2.2 多重 RT-PCR 灵敏度的检测

RNA 模板初始浓度为 $530 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 经过梯度稀释后, 在相同的反应条件下, 分别使用单一 RT-PCR 和多重 RT-PCR 进行扩增, 进行灵敏度比较分析 (图 4)。

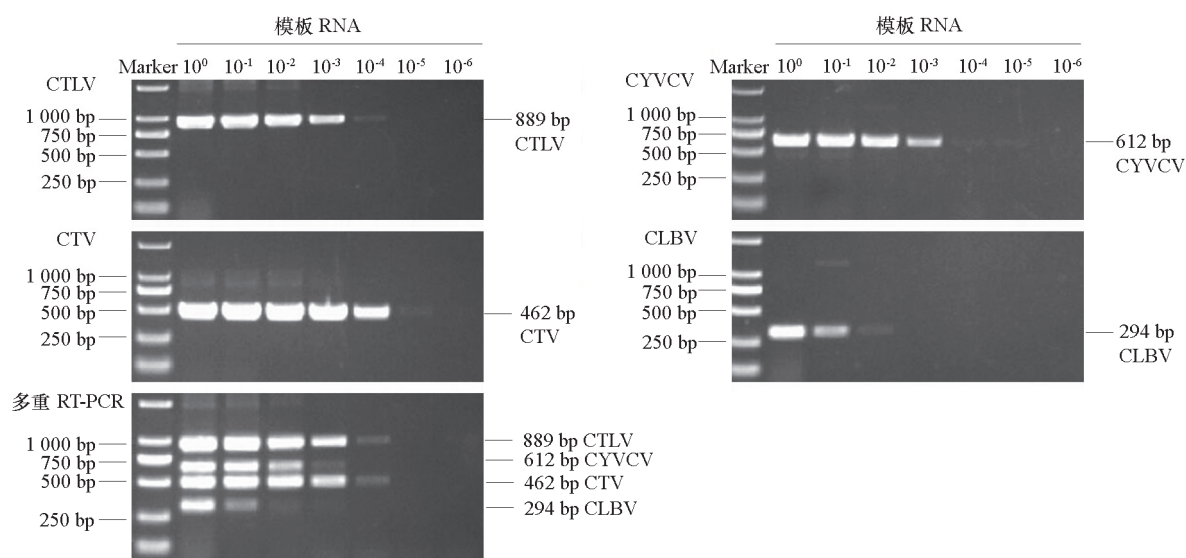


图 4 多重 RT-PCR 和单一 RT-PCR 扩增结果比较
Fig. 4 Detection of the 4 viruses by multiplex RT-PCR and single RT-PCR

两种检测体系对 CTLV 的检测灵敏度相当, 在模板稀释至 10^{-4} 时仍可观察到微弱条带扩增。单一 RT-PCR 对于 CYVCV、CTV、CLBV 的检测灵敏度分别可达模板稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-2} , 而多重检测体系仅可达到 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-1} , 因此, 总的比较来说, 单一检测体系灵敏度更高, 其检测灵敏度约为多重检测体系的 10 倍。所建立的多重检测体系最低能从 $0.053 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 总 RNA 中检测出 CTLV 和 CTV, 从 $0.53 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 总 RNA 中检测出 CYVCV, 从 $53 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 总 RNA 中检测出 CLBV。

2.3 多重 RT-PCR 体系应用

应用建立的多重 RT-PCR 方法检测田间采集的疑似感病的 59 份样本, 结果显示, 以 CYVCV 的检出率最高, 达到 54.2% (32/59), 其次为 CTV, 检出率为 49.2% (29/59), CTLV 和 CLBV 检出率分别为 23.7 (14/59) 和 11.9% (7/59)。图 5 为部分田间样品的检测结果。检测结果与单一 RT-PCR 方法检测结果一致, 说明建立的多重 RT-PCR 方法准确度较高。

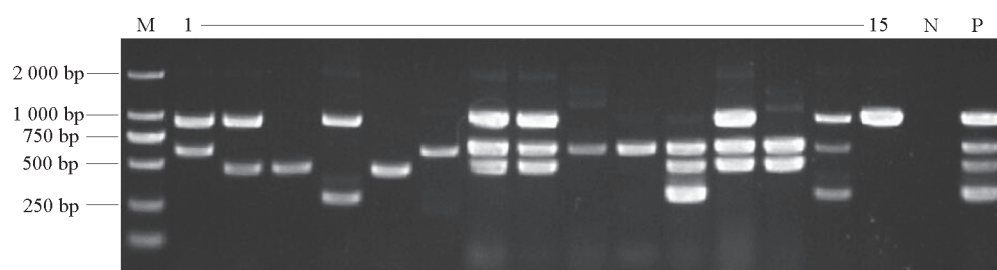


图 5 多重 RT-PCR 田间样品检测结果

M: DNA 标准分子量 DL2000; 泳道 1 ~ 15: 15 份田间样品; N: 阴性对照; P: 阳性对照。

Fig.5 Detection results of field samples by multiplex RT-PCR

M: Marker DL2000; Lane 1 - 15: 15 field samples; N: Negative control; P: Postive control.

3 讨论

本研究建立的多重 RT-PCR 检测体系, 可同时检测 CTLV、CYVCV、CTV 和 CLBV, 扩增所得条带清晰特异。扩增产物大小分别为 889、612、462、294 bp, 多重 PCR 结果一目了然, 容易辨认特异条带所对应的病毒。引物浓度优化过程中, 提高 CLBV 引物浓度至 0.20 和 $0.24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 但扩增亮度并未进一步提升, 结合本试验中灵敏度比较试验结果判断, 可能与病毒在植物体内浓度的相关, 因灵敏度试验中, CLBV 单重 PCR 检测灵敏度低于其他 3 种病毒。灵敏度测试发现, 建立的多重 RT-PCR 较单重 RT-PCR 灵敏度低 10 倍左右, 可能是不同引物间存在竞争, 从而影响其灵敏度。类似情况, 也出现在马铃薯、番茄等病毒多重病害检测中 (罗文彬 等, 2015; 刘欢 等, 2016)。运用本研究建立的检测体系, 对田间样品检测结果与单重 RT-PCR 检测结果完全相符, 表明其准确性较高。

本试验建立的多重 RT-PCR 体系可实现 4 种柑橘病毒的同时检测, 与已有多重 PCR 检测体系相比, 包含了近年来两种新发现的柑橘黄化脉明病毒及柑橘叶斑驳病毒, 且具有良好的特异性及准确度, 适合大批量样品多病害检测, 对病毒病害的发生、流行监控具有重要意义。

References

- Atta S, Zhou C Y, Zhou Y, Cao M J, Wang X F. 2012. Distribution and research advances of *Citrus tristeza virus*. Journal of Integrative Agriculture, 11 (3): 346 - 358.
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee R F. 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. Annual Reviews Phytopathology, 27: 291 - 316.
- Bin Yu, Song Zhen, Li Zhong-an, Zhou Chang-yong. 2015. Direct tissue blot immunoassay for detection of *Citrus yellow vein clearing virus*. Acta Horticulturae Sinica, 42 (9): 1843 - 1850. (in Chinese)
- 宾 羽, 宋 震, 李中安, 周常勇. 2015. 柑橘黄化脉明病毒 DTBIA 检测方法的建立. 园艺学报, 42 (9): 1843 - 1850.
- Chen H M, Li Z A, Wang X F, Zhou Y, Tang K Z, Zhou C Y, Zhao X Y. 2014. First report of *Citrus yellow vein clearing virus* on lemon in Yunnan, China. Plant Disease, 98: 1747.
- Chen Hong-ming, Wang Xue-feng, Zhou Yan, Zhou Chang-yong, Guo Jun, Li Zhong-an. 2015. Biological characterization and RT-PCR detection of a new disease in Eureka lemon. Journal of Plant Protection, 42 (4): 557 - 563. (in Chinese)
- 陈洪明, 王雪峰, 周 彦, 周常勇, 郭 俊, 李中安. 2015. 尤力克柠檬上一种新病害的生物学特性及 RT-PCR 检测. 植物保护学报, 42 (4): 557 - 563.
- Chen Hongming, Zhou Yan, Wang Xuefeng, Zhou Changyong, Yang Xiuyan, Li Zhongan. 2016. Detection of *Citrus yellow vein clearing virus* by Quantitative Real-time RT-PCR. Horticultural Plant Journal, 2 (4): 188 - 192.
- Jin Xin, Zhang Yan-hui, Tang Meng, Zhou Yan. 2016. Advances of diagnosis techniques for citrus virus and virus-like diseases. Acta Horticulturae Sinica, 43 (9): 1675 - 1687. (in Chinese)
- 金 鑫, 张艳慧, 唐 萌, 周 彦. 2016. 柑橘病毒类病害诊断技术研究进展. 园艺学报, 43 (9): 1675 - 1687.
- Liu Huan, Liu Fei, Zhao Lei, Hao Xing-an, Wu Yun-feng. 2016. Establishment and application of multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four viruses infecting tomato. Acta Phytopathologica Sinica, 46 (5): 716 - 720. (in Chinese)
- 刘 欢, 刘 斐, 赵 磊, 郝兴安, 吴云峰. 2016. 4 种番茄病毒多重 RT-PCR 检测及应用. 植物病理学报, 46 (5): 716 - 720.
- Luo Wen-bin, Li Hua-wei, Tang Hao, Qiu Si-xing, Ji Rong-chang, Xu Yong-qing, Liu Zhong-hua, Qiu Yong-xiang. 2015. Establishment and application of multiplex PCR rapid detection of potato viruses. Acta Horticulturae Sinica, 42 (2): 280 - 288. (in Chinese)
- 罗文彬, 李华伟, 汤 浩, 邱思鑫, 纪荣昌, 许泳清, 刘中华, 邱永祥. 2015. 马铃薯 5 种病毒多重 PCR 检测技术的建立及应用. 园艺学报, 42 (2): 280 - 288.
- Song Zhen. 2013. Construction of infectious clones for *Citrus tatter leaf virus* and development of a CTLV-based virus-induced gene silencing (VIGS) system [Ph. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University.
- 宋 震. 2013. 柑橘碎叶病毒侵染性克隆构建及其诱导的基因沉默 (VIGS) 体系建立 [博士论文]. 重庆: 西南大学.
- Xiang Zhou, Cheng Qiao, Xie Zong-zhou, Wang Guo-ping, Hong Ni. 2017. Incidence and molecular Characteristics of *Citrus leaf blotch virus* and *Citrus tatter leaf virus* infecting *Citrus* in China. Acta Horticulture Sinica, 44 (1): 113 - 119. (in Chinese)
- 项 周, 程 桥, 谢宗周, 王国平, 洪 霓. 2017. 中国柑橘叶斑驳病毒和碎叶病毒发生状况及其分子特性研究. 园艺学报, 44 (1): 113 - 119.
- Zhang T M, Liang X Y, Roistacher C N. 1988. Occurrence and detection of *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) in Huangyan, Zhejiang Province, China. Plant Disease, 72 (6): 543 - 545.
- Zhang Yan-hui, Liu Ying-jie, Jin Xin, Zhou Yan. 2017. Progress in study of new citrus viruses and viroids diseases in China. Journal of Fruit Science, 34 (9): 1213 - 1221. (in Chinese)
- 张艳慧, 刘莹杰, 金 鑫, 周 彦. 2017. 我国柑橘近年来新发生的病毒及类似病害研究进展. 果树学报, 34 (9): 1213 - 1221.
- Zhao Heng-yan, Guan Gui-jing, Zhou Chang-yong, Yu Yun-qi, Wang Hong-su, Li Zhong-an, Liu Jin-xiang. 2017. Establishment and application of duplex RT-PCR for the detection of *Citrus yellow vein clearing virus* and *Citrus tristeza virus*. Acta Horticulture Sinica, 44 (7): 1405 - 1414. (in Chinese)
- 赵恒燕, 关桂静, 周常勇, 于云奇, 王洪苏, 李中安, 刘金香. 2017. 柑橘黄化脉明病毒和衰退病毒的二重 RT-PCR 检测体系的建立与应用. 园艺学报, 44 (7): 1405 - 1414.