

张永江,魏 霜,袁俊杰,等.一步法逆转录重组酶聚合酶常温扩增(RT-RPA)技术检测菜豆荚斑驳病毒[J].江苏农业科学,2018,46(21):96-98.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.023

一步法逆转录重组酶聚合酶常温扩增(RT-RPA)技术检测菜豆荚斑驳病毒

张永江¹,魏 霜²,袁俊杰³,乾义柯⁴,李桂芬¹,魏梅生¹

(1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100176; 2. 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心,广东广州 510632;

3. 湛江出入境检验检疫局,广东湛江 524000; 4. 伊犁出入境检验检疫局,新疆伊宁 835221)

摘要:菜豆荚斑驳病毒(bean pod mottle virus,简称 BPMV)是我国进境植物检疫性有害生物,建立快速灵敏的一步法逆转录重组酶聚合酶扩增(reverse transcription-recombinase polymerase amplification,简称 RT-RPA)技术用于对 BPMV 的检测。根据 BPMV 基因组的保守序列,设计重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification,简称 RPA)技术特异性引物,对 BPMV、南方菜豆花叶病毒(southern bean mosaic virus,简称 SBMV)、大豆花叶病毒(soybean mosaic virus,简称 SMV)、南芥菜花叶病毒(arabis mosaic virus,简称 ArMV)及烟草环斑病毒(tobacco ringspot virus,简称 TRSV)共 5 种病毒进行 RT-RPA 特异性验证;并设计 5 个模板浓度梯度,以验证 RT-RPA 方法的灵敏性。结果表明,建立的 RT-RPA 检测方法能够从 BPMV 样品中检测到 198 bp 的特异性条带,且仅需在 40 ℃ 下恒温反应 40 min,不需要特殊的仪器设备;特异性验证试验表明,除 BPMV 能检测到特异性条带外,其他 4 种病毒 SBMV、SMV、ArMV、TRSV 均未检测到特异性条带,证明该方法特异性好;RT-RPA 检测 BPMV 的灵敏度达到 10^{-4} 稀释度,说明所建立的 RT-RPA 方法灵敏度高。综上所述,建立的 RT-RPA 方法检测 BPMV 特异性强、灵敏度高,无需特殊的仪器设备,适合实验室或者现场快速检测。

关键词:菜豆荚斑驳病毒;RT-RPA 检测;植物检疫

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)21-0096-03

菜豆荚斑驳病毒(bean pod mottle virus,简称 BPMV)属于豇豆花叶病毒科(Comoviridae)豇豆花叶病毒属(Comovirus),其自然寄主为大豆、豇豆、菜豆等豆科植物,实验寄主多达 20 属 25 种;分布广泛,在巴西、加拿大、美国、厄瓜多尔、秘鲁等大豆产区均发现其危害^[1-5]。该病毒通过汁液接触、介体昆虫及种子进行传播,根据侵染程度的不同,能够造成 3%~52% 的产量损失并使大豆品质降低^[3],如与大豆花叶病毒(soybean mosaic virus,简称 SMV)复合侵染,可造成大豆减产 85%,其在美国发生严重,在我国目前尚未发现分布^[6],已被列入新修订的植物检疫性有害生物名单中。我国是全球最大的大豆进口国,近年来,全国多个口岸检疫部门多次从进境美国、加拿大大豆中截获 BPMV,目前尚无有效的病毒防治方法,一旦 BPMV 传入我国并定殖下来,将很难根除,加强出入境检验检疫工作是防止该病毒传入的有效途径之一。为保护我国农业生产安全,迫切须要建立一套准确快速的检测方法应用于进出口快速检疫。

目前,对 BPMV 的检测方法主要有生物学检测、血清学检测、电镜观察、PCR 技术等,近年来多 RT-PCR、重 RT-PCR、免疫捕获巢式 RT-PCR、环介导等温扩增等分子检测

技术也被应用于 BPMV 的检测^[7-11]。PCR 检测方法具有灵敏度高、特异性强、可用于大量样品检测的特点,然而这种经典的技术需要复杂的温度循环仪,且检测时间较长,不符合口岸快速检测通关的要求。重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification,简称 RPA)技术是近几年出现的一种有望替代 PCR 的核酸恒温扩增技术,在 2006 年由英国 TwistDx Inc 公司研发出^[12],该技术主要依赖于 3 种酶分别为能结合单链寡核苷酸引物的重组酶、单链 DNA 结合蛋白、DNA 聚合酶^[13],反应过程中不需要模板链的热变性,可以在恒定的低温条件下完成核酸的快速扩增,产物根据引物设计位点有特定大小的条带。经探索发现,在 RPA 体系中加入逆转录酶可以将 RNA 作为模板合成 cDNA 后再进行扩增,进而实现一步法扩增,利于 RNA 病毒核酸检测^[14-15]。该技术对设备依赖程度较低,在植物病害诊断、进出口快速检疫等方面具有巨大的应用前景和市场。目前,国内利用逆转录重组酶聚合酶扩增(reverse transcription-recombinase polymerase amplification,简称 RT-RPA)技术检测 BPMV 的研究尚未见报道,本研究根据 BPMV 基因组的保守序列,设计特异性 RPA 引物,建立 BPMV 的 RT-RPA 检测方法,并验证其特异性和灵敏度,旨在建立一种快速检测 BPMV 的简便高效、特异性强、灵敏度高、适用于口岸快速检测的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菜豆荚斑驳病毒、南方菜豆花叶病毒(southern bean

收稿日期:2017-07-01

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFF0203200);广东出入境检验检疫局科技计划(编号:2017GDK76)。

作者简介:张永江(1977—),男,山东潍坊人,博士,研究员,主要从事植物病毒检测研究。E-mail:zhangyjpi@yeah.net。

mosaic virus, 简称 SBMV)、大豆花叶病毒 (soybean mosaic virus, 简称 SMV)、南芥菜花叶病毒 (arabis mosaic virus, 简称 ArMV) 及烟草环斑病毒 (tobacco ringspot virus, 简称 TRSV) 大豆种子样品均保存于中国检验检疫科学研究院, 同时设置阴性对照为健康大豆种子, 样品经 PCR 检测和序列测定确认后于 -80°C 冻干保存。植物总 RNA 提取试剂盒为天根生物科技有限公司产品; TwistAmp Basic RT 购自 TwistDx Inc 公司。

1.2 主要仪器与设备

金属浴 (Eppendorf ThermoMixer, 由 Eppendorf 公司提供)、电泳仪 (600SI, 由上海博彩生物科技有限公司提供)、凝胶成像系统 (GBOX-F3, 由基因公司提供)。

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取 参照试剂盒操作说明, 提取 5 种病毒样品及阴性对照的总 RNA, -80°C 保存备用。

1.3.2 RPA 引物设计 参考 RPA 引物的设计要求, 根据 BPMV 基因组 (GenBank 登录号 M62738.1) 的保守序列, 设计其 RPA 引物, 扩增片段大小为 198 bp。上游引物为 BPMV-F: $5'-\text{TATTTGTATGCTATGTCATGATAGTTCAGTGTG}-3'$; 下游引物为 BPMV-R: $5'-\text{TGTTCTCACTGTTGCCATTGATTCCAAAC}-3'$ 。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.3.3 RT-RPA 检测 以“1.3.1”节中制备的总 RNA 为模板, 采用 BPMV-F 和 BPMV-R 引物进行 RT-RPA 扩增, 同时设置阴性对照。RT-RPA 扩增体系 (50 μL) 的配制方法如下: 向含有冻干酶粉的反应管中加入再水化缓冲液 (rehydration buffer) 29.5 μL , 去离子水 14.0 μL , 上、下游引物 (终浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.0 μL , 模板 RNA 2.0 μL , 最后再加入醋酸镁溶液 (280 mmol/L) 2.5 μL 。将 RT-RPA 扩增体系充分混匀, 置于 40°C 金属浴中反应 40 min。RT-RPA 反应结束后, 向 RT-RPA 扩增产物中加入 50 μL 苯酚/四氯化碳溶液, 充分混匀后在 12 000 r/min 的转链下离心 2 min, 取 5 μL 上清液在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 在凝胶成像系统上观察结果。

1.3.4 RT-RPA 检测方法特异性评价 按照“1.3.3”节 RT-RPA 检测反应体系, 对供试样品 BPMV、SBMV、SMV、ArMV 及 TRSV 共 5 种病毒的总 RNA 进行检测, 同时设置阴性对照, 对所建立的 RT-RPA 检测方法特异性进行评价。

1.3.5 RT-RPA 检测方法灵敏度评价 将 BPMV 样品总 RNA 进行 10 倍梯度稀释, 共 5 个稀释度, 以梯度稀释的 RNA 为模板, 按照“1.3.3”节的反应体系进行 RT-RPA 灵敏度试验。

2 结果与分析

2.1 RT-RPA 检测方法的特异性评价

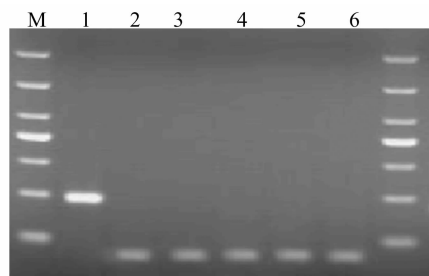
由图 1 可知, BPMV 样品能够检测到 198 bp 的特异性条带, 而 SBMV、SMV、ArMV、TRSV 样品及阴性对照均未检测到该条带, 证明该方法具有较强的特异性。

2.2 RT-RPA 检测方法的灵敏度评价

由图 2 可知, 当稀释度为 10^{-4} 时, 也可以检测到约 198 bp 的目的条带, 当稀释度为 10^{-5} 时, 未能扩增到目的条带。

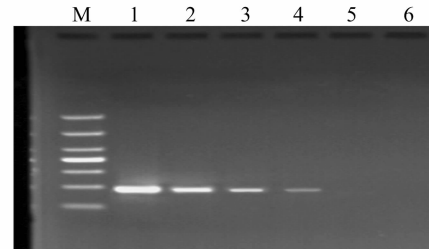
3 结论与讨论

RPA 技术是一种可使微量核酸在体外恒温高效快速扩



M—Marker DL 1000; 1—BPMV; 2—SBMV; 3—SMV; 4—ArMV; 5—TRSV; 6—阴性对照

图1 BPMV 的 RT-RPA 特异性检测结果



M—Marker DL 1000; 1~5— 10^{-1} ~ 10^{-5} 稀释度; 6—阴性对照

图2 BPMV 的 RT-RPA 检测灵敏度

增的新技术, 已被广泛应用于转基因、病原菌检测及食品安全等领域^[16-20]。与基于 PCR 的核酸扩增技术相比, RPA 技术不需要复杂的温度循环装置, 操作简便、反应时间短、特异性强、敏感度高。与其他核酸恒温扩增方法 (如核酸依赖性扩增检测、环介导恒温扩增、链替代扩增、滚环扩增、依赖解旋酶的恒温基因扩增及转录介导的扩增技术等^[21-23]) 相比, RPA 技术不须要完成目标核酸的热变性, 反应时间更短, 并且可以多通道同时检测多个靶基因, 检测扩增产物时可以根据不同的条件选择恰当的检测方法, 非常实用。当然 RPA 技术从发展至今才十余年, 也存在一些不足: RPA 体系运行时, 对体系中酶活性的要求较高, 任何一种酶失活都能导致反应停止; RPA 反应一般在 $37 \sim 42^{\circ}\text{C}$ 条件下进行, 低温环境容易出现序列不匹配的产物^[24]; RPA 体系中, 当目的基因含量较低时, 引物之间偶尔会形成引物二聚体, 可能导致非特异性产物产生^[25]; 利用琼脂糖凝胶电泳技术对 RPA 产物进行检测时, 凝胶成像的结果会受到反应体系中缓冲液等组分的影响, 因此须要对产物进行纯化处理^[26]。

本研究建立的利用 RT-RPA 检测 BPMV 的方法, 逆转录和 RPA 恒温扩增反应在同一反应管中连续进行, 操作简单, 制备好 RNA 后仅须配制反应体系, 其后的逆转录和 RPA 扩增过程仅依靠简单的恒温装置即可完成, 大大简化了试验流程。利用凝胶电泳法检测其扩增引物, 能够检测到 BPMV 的特异性条带, 而其他几种植物病毒的检测结果均为阴性, 说明 RPA 方法特异性高, 这是因为 RPA 引物设计原理虽与 PCR 大体相同, 也一样需要上、下游 2 条引物, 但 RPA 引物的长度较 PCR 引物长, 通常由 30~35 个核苷酸组成, 这就大大提高了 RPA 反应中目的基因扩增的准确度。

目前, 学者们已经针对 BPMV 建立了多种检测方法。张明哲等利用纳米上转换荧光技术检测 BPMV, 检测限度为 1 $\mu\text{g/mL}$, 然而检测时间需要 2.5 h, 且磁性纳米粒子的制备步骤较为繁琐, 成本高, 不适合大范围推广^[27]; 邓丛良等利用

细菌磁颗粒实时荧光 RT-PCR 检测 BPMV, 灵敏度为 10^{-3} 稀释度, 但是大豆种子中蛋白质和油脂的含量高, 细菌磁颗粒对 BPMV 粒子的吸附效果不佳^[28]; 易汪雪等利用单管实时荧光 RT-PCR 方法同时检测大豆种子中的菜豆荚斑驳病毒和烟草环斑病毒, 二者的检测限度相当, 均可达到 35 pg/mL, 但该方法在样品中同时含有 BPMV 和 TRSV, 且在含量较低时的检测中比较有优势^[29]; 郭立新等利用逆转录环介导等温扩增技术检测 BPMV, 灵敏度为 200 fg/25 μ g, 但该技术对引物设计要求较高, 需要 6 条引物才能完成扩增^[30]。本研究建立的 RT-RPA 检测 BPMV 的灵敏度为 10^{-4} 稀释度, 该技术检测时间短, 成本低廉, 引物设计简便, 仅需 1 对引物即可完成目的基因的扩增, 更适用于核酸快速检测领域, 可作为口岸快速筛查菜豆荚斑驳病毒的有效手段。

4 总结与展望

我国食用油业规模巨大, 大豆需求量大, 须要长期大量地从国外进口, 但其携带的多种病毒会威胁我国大豆产业的发展。RPA 技术操作方便、特异性强、检测灵敏度高, 扩增产物检测方便, 虽然存在一定的缺点, 但随着 RPA 技术的不断发展、进一步完善以及检测步骤的改良, 将有望在 BPMV 田间诊断、口岸检验等领域得到广泛的应用, 为 BPMV 的快速检测和一线国门检疫提供有效的技术支持。

参考文献:

- [1] Anjos J R N, Brioso P S T, Charchar M J A. Partial characterization of bean pod mottle virus in soyabeans in Brazil. [J]. Fitopatologia Brasileira, 1999, 24(1): 85-87.
- [2] Michelutti R, Tu J C, Hunt D W A, et al. First report of bean pod mottle virus in soybean in Canada [J]. Plant Disease, 2007, 86(3): 330.
- [3] Giesler L J, Ghabrial S A, Hunt T E, et al. Bean pod mottle virus: a threat to U. S. soybean production [J]. Plant Disease, 2002, 86(12): 1280-1289.
- [4] Zettler F W, Stansly P A, Elliott M S, et al. Report of bean pod mottle virus in Southern American [J]. Plant Disease, 1989, 73(6): 518.
- [5] Fribourg C E, Perez W. Bean pod mottle virus (BPMV) affecting *Glycinemax* (L) Merr. in the Peruvian jungle [J]. Fitopatologia, 1994, 29(3): 207-210.
- [6] 张明哲, 李可, 周宏斌, 等. 一种快速检测菜豆荚斑驳病毒的新方法 [J]. 植物保护学报, 2012, 39(1): 91-92.
- [7] Wei Q W, Yu C, Zhang S Y, et al. One-step detection of bean pod mottle virus in soybean seeds by the reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. Virology Journal, 2012, 9(1): 187.
- [8] 闻伟刚, 杨翠云, 崔俊霞, 等. RT-LAMP 技术检测菜豆荚斑驳病毒的研究 [J]. 植物保护, 2010, 36(6): 139-141.
- [9] 李孝军, 殷汉华, 陈宇, 等. 4 种大豆种传病毒多重 RT-PCR 检测 [J]. 植物检疫, 2011, 25(6): 33-36.
- [10] 于翠, 杨翠云, 宋绍伟, 等. 进口大豆上菜豆荚斑驳病毒的免疫捕获巢式 RT-PCR 检测 [J]. 植物检疫, 2006, 20(4): 201-204.
- [11] 张晓雷, 檀根甲, 魏梅生, 等. GICA-RT-PCR 检测菜豆荚斑驳病毒的新方法 [J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1019-1023.
- [12] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [13] 吴耀东, 徐民俊, 郑文斌, 等. 重组酶聚合酶扩增技术及其在动物病原快速检测中的应用 [J]. 中国兽医学报, 2016, 36(10): 1797-1800.
- [14] Mekuria T A, Zhang S, Eastwell K C. Rapid and sensitive detection of little cherry virus 2 using isothermal reverse transcription recombinase polymerase amplification [J]. Journal of Virological Methods, 2014, 205(1): 24-30.
- [15] Wahed A A E, Eldeeb A, Eltholoth M, et al. A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71642.
- [16] Xu C, Li L, Jin W J, et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) of CaMV-35S promoter and nos terminator for rapid detection of genetically modified crops [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(10): 18197-18205.
- [17] 邓婷婷, 黄文胜, 程奇, 等. 重组酶聚合酶扩增技术检测转基因水稻中的 *CryIAb/c* 基因 [J]. 中国食品学报, 2015, 15(3): 187-193.
- [18] Euler M, Wang Y, Nentwich O, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of rift valley fever virus [J]. Journal of Clinical Virology, 2012, 54(4): 308-312.
- [19] Milena E, Yongjie W, Peter O, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of francisella tularensis [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(7): 234-238.
- [20] Boyle D S, Lehman D A, Lorraine L, et al. Rapid detection of hiv-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification [J]. Mbio, 2013, 4(2): 49-52.
- [21] Yan L, Zhou J, Zheng Y, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA [J]. Molecular Biosystems, 2014, 10(5): 970-1003.
- [22] Fakruddin M, Mannan K S B, Chowdhury A, et al. Nucleic acid amplification: alternative methods of polymerase chain reaction [J]. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences, 2013, 5(4): 245-252.
- [23] Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point of care diagnostics: a critical review [J]. Lab Chip, 2012, 12(14): 2469-2486.
- [24] Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review [J]. Nucleosides & Nucleotides, 2008, 27(3): 224-243.
- [25] Zaghoul H, El-Shahat M. Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis [J]. World Journal of Hepatology, 2014, 6(12): 916-922.
- [26] 高威芳, 朱鹏, 黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术: 一种新的核酸扩增策略 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6): 627-634.
- [27] 张明哲, 李可, 周宏斌, 等. 一种快速检测菜豆荚斑驳病毒的新方法 [J]. 植物保护学报, 2012, 39(1): 91-92.
- [28] 邓丛良, 赵晓丽, 双龙海, 等. 细菌磁颗粒实时荧光 RT-PCR 检测菜豆荚斑驳病毒 [J]. 植物保护学报, 2013, 40(1): 91-92.
- [29] 易汪雪, 陈舜胜, 杨翠云, 等. 单管实时荧光 RT-PCR 方法同时检测大豆种子中的菜豆荚斑驳病毒和烟草环斑病毒 [J]. 植物病理学报, 2011, 41(1): 85-92.
- [30] 郭立新, 段维军, 徐亚飞, 等. 逆转录环介导等温扩增技术检测菜豆荚斑驳病毒 [J]. 植物保护学报, 2013, 40(5): 473-474.