

百合病毒的 DNA 芯片检测技术研究*

王进忠^{1,2**}, 贾慧¹, 文思远³, 王升启³, 张民照¹, 赵祥云², 董金皋⁴

(1. 北京农学院植物科学技术系, 北京 102206; 2. 北京市农业应用新技术重点实验室; 北京 102206; 3. 军事医学科学院放射医学研究所; 北京 100850; 4. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001)

Detection for CMV, LSV, LMoV Infected Lily with DNA Microarray Techniques

WANG Jin-zhong^{1,2}, JIA Hui¹, WEN Si-yuan³, WANG Sheng-qi³, ZHANG Min-zhao¹,
ZHAO Xiang-yun², DONG Jin-gao⁴

(1. Department of Plant Science and Technology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China; 2 Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, China; 3. Beijing Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China; 4. College of Life Sciences, Agriculture University of HeBei, Baoding 071001, China)

Abstract: Specific primers and probes were designed according to conservative and specific DNA sequence of CMV, LSV and LMoV. The probes were spotted on glass slides to form microarrays. The Cy3-labeled single strand DNA fragments prepared by dissymmetrical RT-PCR were hybridized with the probes on the glass slides. The microarrays were scanned and analyzed with a scanner. DNA microarray could detect different typed DNA of CMV, LSV and LMoV with adequate specificity and sensitivity. Microarray techniques establish a rapid, sensitive and specific diagnostic assay for lily viruses. The successfully developed DNA microarray and techniques might be a very useful method for diagnosis and prevention, and widely applied in specific pathogen detection of diseases such as lily virus.

Key words: *Cucumber mosaic virus* (CMV); *Lily symptomless virus* (LSV); *Lily mottle virus* (LMoV); DNA microarray; Detection

摘要: 根据已知的黄瓜花叶病毒、百合无症病毒、百合斑驳病毒基因核苷酸序列, 设计引物和探针, 制备寡核苷酸芯片。用 Cy3 标记核苷酸引物, 不对称 RT-PCR 扩增产物与芯片上的寡核苷酸探针杂交, 荧光扫描仪检测并分析信号。研究制备的基因芯片能够检测侵染百合的 3 种重要病毒核酸的特异性荧光信号, 该项技术具有特异、灵敏、快速的优点。

关键词: 黄瓜花叶病毒; 百合无症病毒; 百合斑驳病毒; 基因芯片; 检测

中图分类号: Q939.46 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)04-0429-05

百合 (*Lilium*) 是集观赏、食用、药用于一身的重要经济作物, 现已成为国际上重要切花观赏花卉之一^[1]。近年来, 随着百合种植面积的迅速增加, 从国内外引进种球的数量和批次的不断增长, 病毒病开始在各百合种植区发生流行^[2]。据报道, 侵染百合的病毒有 20 多种但以百合无症病毒 (*Lily symptomless virus*, LSV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 和百合斑驳病毒 (*Lily mottle virus*, LMoV) 最为严重^[3]。当前我国百合切花生产

用种球主要来源于荷兰进口和国内自繁, 为防止百合病毒病随种球扩散与传播, 就必须加强百合检疫和检测, 而这有赖于建立灵敏、快速和可靠的病毒检测方法^[2]。目前, 检测百合病毒的方法主要有酶联免疫吸附测定 (ELISA)、电镜技术和 RT-PCR^[1,4]。这些技术在实际应用上有的方法提纯过程繁琐, 耗时长, 有的操作繁琐, 易于造成污染, 出现假阳性。近几年发展起来的基因芯片技术已经用于人类病毒如乙型肝炎病毒 (*Hepatitis B virus*, HBV),

收稿日期: 2005-01-31, 修回日期: 2005-03-18

* 基金项目: 北京市自然科学基金 (5043026)

** 通讯作者: 王进忠, 副教授, 研究方向为昆虫生理和分子生物技术。E-mail: jinzhw9276@163.com

人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV), 严重急性呼吸系统综合征病毒 ((Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-cov)^[5-7] 等医学诊断和动物病毒如口蹄疫、禽流感^[8] 的检测和检疫。基因芯片是将大量已知序列的核酸片段按设计好的排列方式固化于支持物表面制备成芯片,检测样品用荧光标记引物进行 PCR 扩增后与芯片杂交,洗脱后扫描,用图象显示杂交结果,该技术在百合病毒检测方面尚未见报道。本研究旨在探讨百合重要病毒的 DNA 芯片检测技术,为百合病毒病的检测、诊断和预防提供参考方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

经过 ELISA 和电子显微镜检测,确定是 CMV、LSV、LmoV 的百合样品由天津市动植物检疫所、北京市农林科学院蔬菜花卉研究中心馈赠。田间百合植株标本采自北京市延庆县张三营百合种植基地,4 个标本根据症状和地点编号分别为:样本 1 号,样本 2 号,样本 3 号,样本 4 号,百合组培脱毒苗由北京农学院植物科学技术系和北京市农业应用新技术重点实验室提供。

玉米粗缩病毒 (*Maize rough dwarf virus*, MRDV)、小麦黄矮病毒 (*White yellow stunt virus*)、水稻条纹病毒 (*Rice stripe virus*, RSV)、大麦黄矮病毒 (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV)、辣椒轻型斑驳病毒 (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV)、芋花叶病毒 (*Dasheen mosaic virus*, DsMV)、番茄花叶病毒 (*Tomato mosaic virus*, ToMV)、木槿褪绿环斑病毒 (*Hibiscus chlorotic ringspot virus*, HCRSV)、粉虱传双生病毒 (*Whitefly transmitted geminivirus* WTG)。阴性标本由中国农业科学院植物保护研究所,中国农业大学,浙江农业科学院、河北省农林科学院植物保护研究所馈赠。

TrizolRNA 提取试剂盒购自美国 GIBCO 公司, TaqDNA 聚合酶、AMV 逆转录酶等购自 Takara 公司。PCRmix, 点样液、杂交液、洗脱液实验室自配。

1.2 寡核苷酸引物、探针设计与合成

根据病毒 CMV、LSV、LmoV 外壳蛋白基因序列,结合核酸序列特异性分析设计了 3 对引物和 6 条探针,引物序列为:

CMV F1: AACCTGGGTACACGTTTCACTC,
R1: CATCGCCGAAA GATCA TACAAC;
LSV F2: GTCGTA TCTAACAACA TGGCAA

CC, R2: CCGGCA GACTTTCCGCACTCC;
LmoV F3: CATGGTACAACGCCGTGAAAG,
R3: CATCA TCTGCTGTA TGCCTCTC。

探针序列为:

CMV P1: GTTTA TCA GTA TGCTGCA TCCG
GATCCAA GCCAACAATAAACT
P2: CTCTGCTA TGTTT GCGGACGGA GCCT
CACCGGTACTGGTTTA TCA;
LSV P3: GCGGTGCCCGTCGACTCCA TCGC
TGCGA TCA TGAA GAA GCACGC,
P4: GCA GTTCGGCGTTCCTTGACCCTGA G
GGCA GCA TTGA GTA TGA GA;
LmoV P5: CTA TTTGGGTTA GATGGAAA G
GTGACCACCAA GATGA GGACACG,
P6: CGCGGAAAACAA TCGAA GCTA TTTG
GGTTA GATGGAAA GGTGACC

探针的 5 端加臂和氨基化修饰,另合成 5 端标记 Cy3 的引物 R1、R2 和 R3。以上寡核苷酸均由本实验室合成。合成的寡核苷酸用无菌去离子水稀释至合适的浓度,去离子水做空白对照。UV 测浓度,分别读 260 nm 光密度值 (OD 值),按照公式计算寡核苷酸的含量。

1.3 芯片制备

用 2 × 点样液将探针稀释成 50 μmol/L,按顺序加入 384 孔板后,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。点样完毕后室温放置过夜,用 0.2 % SDS 溶液清洗,水洗,室温备用。芯片矩阵见图 1。Ctrl1 为空白对照 (点样液), Ctrl2 为阴性对照 (大鼠脑基因)。

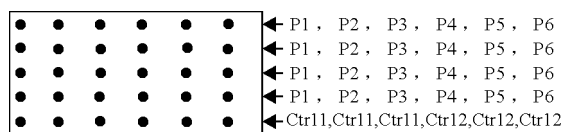


图 1 芯片杂交区中寡核苷酸阵列排布

Table 1 Distribution of the oligonucleotide on hybridization area of chips

1.4 PT-PCR 扩增

植物总 RNA 的提取参见文献^[9]。

以提取的总 RNA 1 μg 为模板, 20 μL 反应体系中加入 3 端引物 0.5 μg, ddH₂O (DEPC 处理) 补足至 8 μL, 70 °C 10 min 后置冰上, 再加入 5 × AMV 缓冲液 4 μL, Mg²⁺ 4 μL, dNTP 2 μL, Rnasin 1 μL, AMV 反转录酶 1 μL, 42 °C 反应 1 h, 95 °C 5 min 后置冰上; 取上述反转录产物 1 μL, 加入 PCRmix 15 μL, 5 引物

2pmol 和 3 端引物 10pmol, Taq 酶 0.4 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L;反应程序为:94 预变性,94 变性,退火 58 ,72 延伸,35 个循环,72 延伸反应,保存。取扩增产物用 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 构建质粒

以逆转录 cDNA 第一链为模板,三对引物分别进行扩增,产物转化进大肠杆菌 DH5 中,37 摇菌过夜后,Promega 试剂盒提取质粒。用 T 载体上的通用引物进行测序验证。

1.6 杂交与扫描

将扩增产物煮沸进行热变性,取出后立即置于冰浴中;将点制好的芯片于 0.2%SDS 中漂洗,再用无菌去离子水漂洗,取出后,室温晾干;三个 PCR 产物各取 1 μ l 与 7 μ l 杂交液充分混匀后,吸取混合物加入芯片反应区,涂布均匀后,将芯片置于杂交盒中,于水浴中杂交 1h;杂交反应结束后,取出芯片按顺序分别在 A(1 \times SSC,0.2%SDS),B(0.2 \times SSC),C(0.1 \times SSC)的洗液中,室温漂洗,取出后甩去残留在芯片上的多余液体,室温晾干后用 GenePix4000B 扫描仪扫描,PMT 和激光强度分别设置为 650 与 33,激发波长为 532nm 扫描。

2 结果

2.1 CMV, LSV, LMoV 的 RT-PCR 检测结果

以 CMV, LSV, LMoV 侵染的百合的总 RNA 为模板,经 RT-PCR 扩增后,在琼脂糖凝胶电泳中均呈现出产量很高的阳性反应谱带,与预期长度为 326bp,256bp 和 486bp 的大小基本一致(参照 Marker 的分子量),而对照处理(百合脱毒组育苗)中未出现任何条带。这说明扩增的条带是 CMV, LSV, LMoV 病毒基因组特异扩增得来的,结果见图 2。疑似病毒侵染的百合田间标本 1 号、2 号、3 号和 4 号分别经 CMV, LSV, LMoV 引物扩增,RT-PCR 结果见图 3、4、5。经 CMV 特异引物扩增

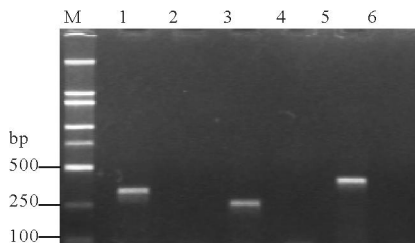


图 2 百合病毒 RNA 的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplification results of RT-PCR about lily virus RNA

M, DL2000marker; 1/3/5,CMV, LSV, LMoV; 2/4/6,Control of CMV, LSV, LMoV

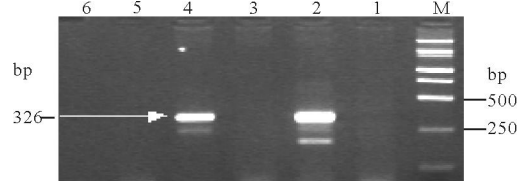


图 3 百合田间标本 CMV 引物扩增结果

Fig. 3 Amplification results of lily field samples by primer of CMV

M, DL2000marker; 1/2/3/4,Lily samples of field; 5,Free-virus of lily;6,Negative control.

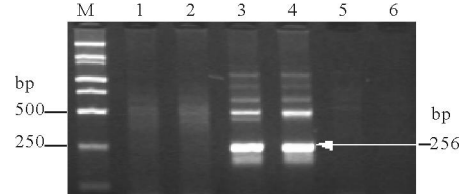


图 4 百合田间标本 LSV 引物扩增结果

Fig. 4 Amplification results of lily field samples by primer of LSV

M, DL2000marker; 1/2/3/4,Lily samples of field; 5,Free-virus of lily;6,Negative control.

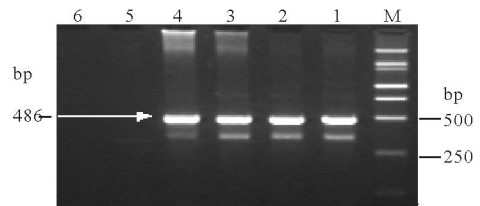


图 5 百合田间标本 LMoV 引物扩增结果

Fig. 5 Amplification results of lily field samples by primer of LMoV

M, DL2000marker;1/2/3/4,Lily samples of field; 5,Free-virus of lily;6,Negative control.

出谱带的有样本 2 号和 4 号;经 LSV 特异引物扩增出谱带的有样本 3 号和 4 号;LMoV 特异引物扩增出谱带的是样本 1、2、3、4 号,而脱毒苗和阴性无谱带说明样本 4 号被 CMV, LSV, LMoV 复合侵染,样本 3 号由 LSV, LMoV 复合侵染,样本 2 号 CMV, LMoV 复合侵染,样本 1 号 LMoV 单独侵染。

2.2 基因芯片的检测结果

百合三种病毒 CMV, LSV, LMoV 核酸经不对称 RT-PCR 扩增、荧光标记后所得片段与点于芯片上的探针杂交。扫描结果显示阳性标本,百合田间标本 1 号在芯片杂交区 LMoV 探针处、样本 2 号在 LSV、LMoV 探针处、样本 3 号在 CMV、LMoV 探针处、样本 4 号在 CMV, LSV, LMoV 探针处均有较强的荧光信号,而脱毒组育苗、阴性对照没有信号。结果见图 6,和上述 RT-PCR 结果一致,则说明基因芯片可用于田间百合病毒病的检测。

2.3 芯片的灵敏度

测序结果与预期一致。CMV、LSV、LMoV 质粒,紫外定量后按 10 倍梯度稀释成 10^5 - 10^2 拷贝/ μ l,每个稀释度各取 1 μ l 作为模板荧光标记不对称 PCR 扩增,将荧光标记产物与芯片杂交,扫描,结果如图 7 所示。从图 3 中可以看出,随着质粒模板量

的降低,杂交信号也逐渐减弱。 10^4 拷贝时检测的荧光信号很强,CMV、LSV、LMoV 都可检出; 10^3 拷贝时检测的荧光信号较强,CMV、LSV、LMoV 也可检出; 10^2 拷贝时,检测的荧光信号很弱,只检出 LMoV。以检出所有基因为标准,本方法的灵敏度可达到 10^3 拷贝。

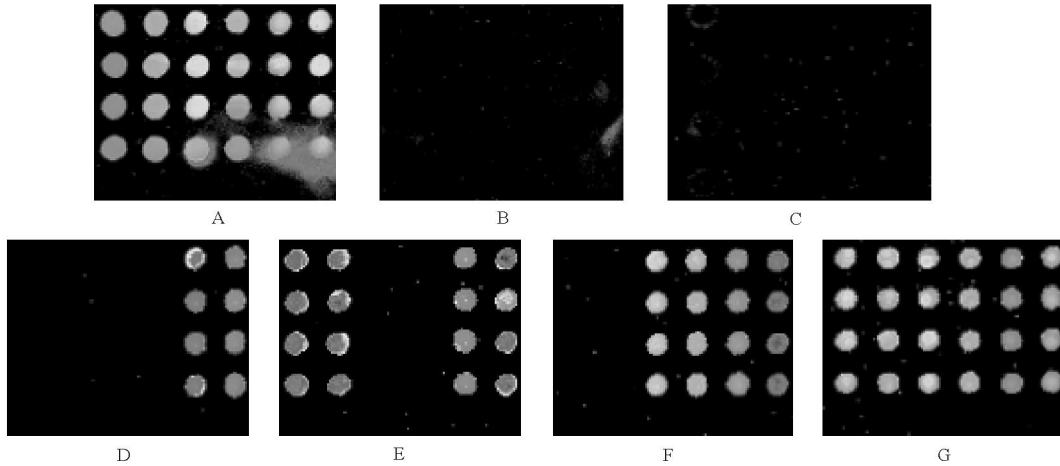


图 6 芯片检测百合病毒 CMV、LSV、LMoV

Fig. 6 The detection of Lily virus CMV, LSV, LMoV with DNA microarray

A, Positive sample; B, Virus-free seedling; C, Negative control; D, Field sample-1; E, Field sample-2; F, Field sample-3; G, Field sample-4

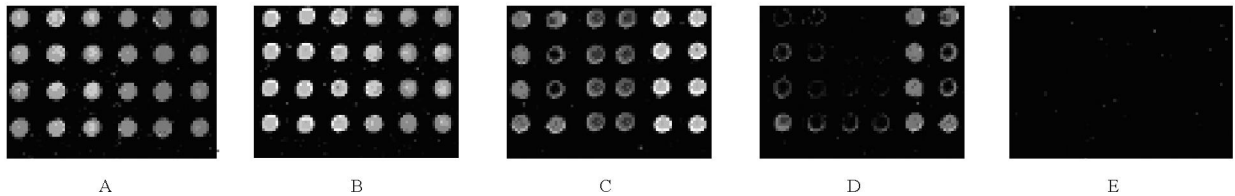


图 7 芯片检测百合病毒 CMV、LSV、LMoV 的灵敏度实验杂交结果

Fig. 7 The sensitivity of lily virus CMV, LSV, LMoV detected by DNA microarray

A/B/C/D, The plasmid of lily virus CMV, LSV, LMoV 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 copies respectively; E, Negative control.

2.4 芯片的特异性

8 种阴性病毒侵染的植株组织总 RNA 分别用三种下游引物逆转录再分别进行 PCR 扩增,PCR 产物与芯片杂交,结果芯片上无阳性信号产生,在琼脂糖凝胶电泳中也没有预期大小的扩增子产生,说明该芯片对检测百合的 CMV、LSV、LMoV 病原体具有良好的特异性。

3 讨论

百合病毒检测常用的电镜技术需要依赖大型精密仪器电子显微镜,血清学方法需要制备或购买抗血清,检测灵敏度低,不宜于病毒病的早期诊断等^[2],RT-PCR 检测技术具有快速、准确、可用于感染早期的诊断等优点,此技术已应用于百合病毒的基因克隆^[10]、病原检测等^[4],但容易造成污染,若样

品成分复杂给检测带来难度,如百合种球多糖和酚类化合物含量高影响 PCR 扩增,可能产生假阴性或假阳性结果^[11],而基因检测芯片通过多个基因片段之间的验证则可克服这些缺点。笔者根据百合病毒病的三种病原 CMV、LSV、LMoV 的核苷酸序列,结合计算机软件及生物信息学分析,设计并筛选出 3 对特异性引物和 6 条特异性探针,发展了一种以荧光标记不对称 PCR 为基础的基因芯片检测方法,具有较高的敏感性,能够检测 10^2 ~ 10^3 拷贝的质粒相当于 10^{-3} - 10^{-4} pg 的 DNA。另外,田间百合样本通过 LSV 特异引物扩增琼脂糖凝胶电泳检测样本 3 号、4 号有非特异谱带(图 7),而芯片检测未出现非特异信号,则该项基因芯片检测技术要比逆转录 PCR-琼脂糖凝胶检测有极好的特异性。运用基因芯片可以同步检测百合病毒病的三种病原体,结合

基因芯片的高通量特点,即可实现芯片的多种病原体的同时检测,为出入境危险性生物检验检疫、大规模筛查探索了一种很有效的、有前景的检测体系和方法。

致谢 本实验是在北京市农业应用新技术重点实验室和全军生物芯片重点实验室进行的。中国农业大学李怀方教授、中国农业科学院植物保护研究所王锡锋研究员、天津市动植物检疫所郭京泽研究员、浙江省农业科学院病毒学和生物技术研究所陈炯博士、河北省农林科学院植物保护研究所苗洪芹研究员、路银贵研究员馈赠病毒样本。王树栋、孙淑玲和尚巧霞老师参加了部分实验工作,在此一并表示感谢。

参考文献

- [1] 刘文洪,洪 健,陈集双,叶美琴.百合病毒病原的检测诊断[J].电子显微镜学报,2004,23(3):225-228
- [2] 王继华,翟素萍,孔宝华等.百合无症病毒的 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测[J].云南农业大学学报,2004,19(2):148-173。
- [3] 沈淑琳.百合病毒病及其检验[J].植物检疫,1996,10(4):223-226.
- [4] Niimi Y, Han D S, Mori S, Kobayashi H. Detection of cucumber mosaic virus, Lily symptomless virus and Lily mottle virus in Liliun species by RT-PCR technique. [J]. Scientia Horticulturae,2003,97(1):57-63
- [5] 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
- [6] 吴守丽,严延生,蒋 岩. HIV 耐药性检测方法及其临床应用[J].中国艾滋病性病,2004(10)4:312-315
- [7] 肖 白,周一鸣,任丽丽,等.基因芯片用于 SARS 早期诊断和病毒载量时相监测研究[J].诊断学理论与实践,2004,3(3):200-205
- [8] 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
- [9] 黄培堂.分子克隆实验指南[N].第三版.科学出版社,2002
- [10] 王继华,丁元明,王丽花.百合无症病毒云南分离物的 CP 基因克隆和序列分析[J].植物病理学报,2004,33(6):562-563
- [11] Henson J M, Frenchr. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis [J]. Ann Rev Plant Pathol,1993,31:81-109