

应用real-time RT-PCR技术监测柑橘衰退病毒弱毒株在甜橙中的时序变化

邹勤^{1, 2}, 周彦², 刘永清^{1, 2}, 周常勇^{1, 2*}, 李中安²

(1.西南大学植物保护学院, 重庆 400716; 2.中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

摘要: 本研究以柑橘 18S rRNA 及 *nad5* 基因为内参基因, 应用 real-time RT-PCR 技术, 对柑橘衰退病毒 (CTV) 弱毒株嫁接接种到甜橙后 6 个月内 CTV *p25* 基因的时序变化进行监测。结果显示: 不同 CTV 毒源 *p25* 基因表达量存在差异, 并且随着时间和季节推移, 其表达量也会出现波动。

关键词: 柑橘衰退病毒; 含量变化; *nad5* 内参基因; real-time RT-PCR

Monitoring the Temporal Chang of Citrus Tristeza Virus Mild Strain in Sweet Orange by Real-time RT-PCR

ZOU Qin^{1, 2}, ZHOU Yan², LIU Yong-qing^{1, 2}, ZHOU Chang-yong^{1, 2*}, LI Zhong-an²

(1.College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China., 2.Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: Monitored the loading dynamics of two CTV mild strains in infected sweet orange by real-time RT-PCR in 6 months, using 18S rRNA and *nad5* as internal control. The results showed that: the expression peak of *p25* gene between plants are not consensus. Nevertheless, it all experience increasing stage, decreasing stage and increasing again.

Key words: Citrus tristeza virus; dynamic change; *nad5* internal control; real-time RT-PCR

由柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV) 引起的柑橘衰退病是世界范围内一种重要的植物病害, 在我国分布也极为普遍。目前对该病的防治措施主要是依赖弱毒株交叉保护 (MSCP) 来降低病害损失^[1, 2]。

CTV 主要的检测方法为指示植物鉴定, 血清学检测和 RT-PCR 的方法。近两年, 国内外陆

基金项目: 重庆市自然科学基金项目 (CSTC, 2007BB1342; 2008BB1270)

第一作者: 邹勤 (1984-), 女, 重庆南川人, 硕士研究生, 主要从事柑橘衰退病毒快速检测研究;
E-mail: zouqin0428@163.com

*通讯作者: 周常勇, 研究员, 博士生导师, 主要从事柑橘病害研究; Tel: 023-68349007, E-mail: zhouchangyong@vip.sina.com

续建立了 CTV 的实时荧光定量 RT-PCR 检测体系^[3~5], 但该技术还未运用于研究 CTV 在寄主中的时序变化。本研究建立了以 18S rRNA 及柑橘 *nad5* 基因为内参基因的荧光定量检测体系, 采用相对定量的方法, 监测了 6 个月内 CTV *p25* 基因的相对表达量。其动态变化规律将为研究 CTV 侵染机制、病毒与寄主互作及弱毒株交叉保护提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 毒源及植物材料

CTV 弱毒株 CT11 和 PB61 以及脱毒锦橙实生苗等所用试材均由中国农业科学院柑桔研究所国家柑橘苗木脱毒中心提供。其中 PB61 由澳大利亚 SMAT 实验室的 Patricia Barkley 教授赠送。

1.2 毒源接种及核酸提取

2008 年 9 月将两个 CTV 弱毒株通过嫁接分别接种于一年生无毒锦橙实生苗, 放置于防虫网室保存。在嫁接接种后第 1, 2, 3, 5 和第 6 个月, 按照周常勇等^[6]的方法用一次性刀片取植株顶部皮和叶各 5~10 mg 用于抽提核酸。

1.3 real-time RT-PCR

引物序列见表 1。

表 1 本试验所用的 3 对引物

引物	序列 (5'-3')	片段大小 (bp)
Y4 ^[7]	ACCGCACTAACGCCCTTC	183
Y3	CAGCACATTCCAAATCAGTCAAG	
<i>nad5F</i> ^[8]	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT	
<i>nad5R</i>	GCGGATCCTCGGACATATATGA	115
18S rRNA ^[9]	AATTGTTGGTCTTCAACGAGGAA	
18S rRNAR	AAAGGGCAGGGACGTAGTCAA	74

采用两步法 RT-PCR, 5μl 反转录体系为: 取 1μl 总 RNA 作模板, 加入 1.5μl 灭菌水, 95℃ 4 min 解链, 然后进行反转录。解链模板 2.5μl, ddH₂O 0.73μl, 10 mmol/L dNTP 0.1μl, 5×RT-Buffer 1μl, 10pm/μl Reverse 引物 0.25μl, RNAsin 0.2μl 及 RTase 0.22μl。在 42℃ 条件下反转录 30 min, 反转录完后将 cDNA 放于 -20℃ 保存备用。18S rRNA 的 cDNA 稀释 10 倍后再作为模板。

构建体系时, 首先对各基因的退火温度进行优化: 从 50~65℃ 进行温度梯度 PCR, 选择 *C_t* 值最小, 扩增曲线最好的一个温度。然后对引物浓度从 50~500nM 进行了优化, 减少非特异扩增对结果的干扰。最后确定了各基因的反应体系。

PCR 反应体系为 25μl。CTV 及 18S rRNA 的反应成分包括 ddH₂O 9.5μl, 2×SYBR Green

Supermix(Bio-rad) 12.5μl , 10pm/μl 正反引物各 0.5μl , cDNA 2μl。扩增程序为: 95℃ 3 min; 95℃, 10s; 60℃ 15s; 72℃ 20s, 40 个循环, 在 72℃采集荧光信号。nad5 的反应体系为: Forward 引物 1μl, Reverse 引物 1.5μl, 退火温度为 55℃, 其他条件与前面的相同。每个样品 2 个技术重复。real-time PCR 在 icycle iQ (Bio-Rad) 上进行。

1.4 标准曲线建立及数据分析

建立标准曲线, 验证各个基因的扩增效率的方法: 用 ddH₂O 对 PCR 产物进行 10 倍梯度稀释, 将稀释为 10⁻⁴ 至 10⁻¹⁰ 的 7 个梯度分别作为模板进行扩增, 最后软件则会计算出扩增效率。

荧光阈值统一设为 300, 测得的阈值循环数 (threshold cycle, C_t 值) 经 Bio-Rad 的 iQ5 软件自动计算相对表达量并生成柱形图, 其计算相对定量是根据 Pfaffl 法^[10]。

2 结果与分析

2.1 扩增效率及特异性

Y3, Y4 引物的扩增效率见图 1 (A, B), 熔解曲线见图 1 (C), 仅有单一峰说明该体系仅扩增单一目标产物, 而阴性对照没有较高的峰, 所以确定该体系为 CTV 的最终检测体系。

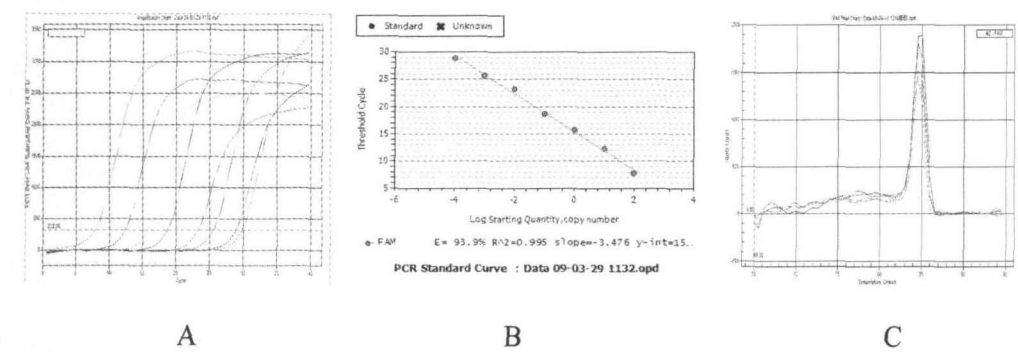


图 1 Y3Y4 引物的扩增效率图及熔解曲线图

A, B: PCR 产物 10 倍梯度稀释的扩增曲线及标准曲线; C: 熔解曲线图

以 PCR 产物或 cDNA 进行梯度稀释, 验证了各基因的扩增效率一致, 都在 90%~100%之间, 所以可以进行相对定量的分析。

2.2 内参基因的稳定性

分析 real-time RT-PCR 的结果时, 为了验证两个内参基因的稳定性, 对其相对表达量进行了比较。以 18S rRNA 为内参基因分析了 nad5 的相对表达量, 结果见图 2。两个内参基因的表达基本上稳定, 但是有少数样品之间两个内参基因的相对表达量不一致。

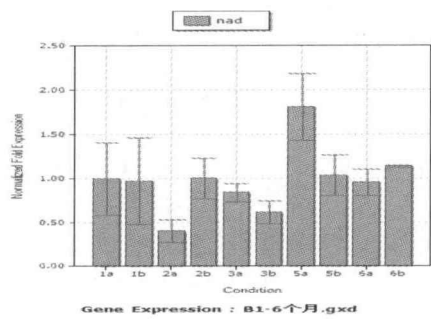


图 2 nad5 的相对表达量（以 18S rRNA 为内参基因）

图中 a 表示样品组织为皮，b 为叶。

2.3 应用 real-time RT-PCR 监测 CTV 在甜橙中的时序变化

分别以植株嫁接接种第一个月时皮中 CTV *p25* 的基因量为对照（即相对表达量为 1），后面各处理的表达量以对照的倍数表示的方式，对不同 CTV 分离株在甜橙中的变化趋势进行监测。结果发现，不同 CTV 毒源 *p25* 基因表达量存在差异，通常植株皮内 CTV *p25* 基因的表达量高于叶，并且随着时间和季节推移，其表达量也会出现波动(图 3)。

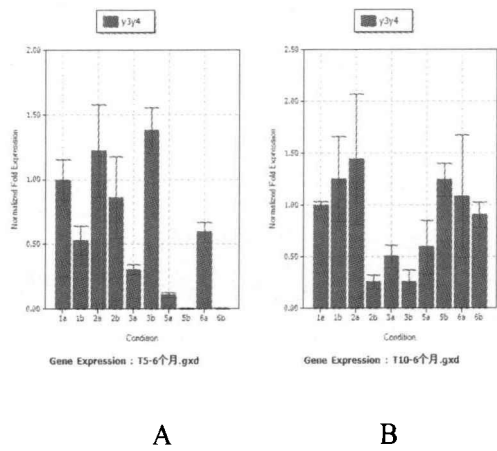


图 3 real-time RT-PCR 监测各植株内 6 个月的 CTV 表达量

图中 a 表示样品组织为皮，b 为叶。A：植株 T5；B：植株 T10

3 讨论

本研究 real-time RT-PCR 的数据分析采用相对定量的方法，以表达相对恒定的管家基因作为标准来检测目的基因表达量的差异。管家基因可作为内源性对照补偿待测样本的体积变异、核酸抽提过程中造成细胞起始数不同及 RNA 抽提效率不同，均一化样品；也可以反映反应体系内是否存在 PCR 扩增的影响因素。根据 Livak K J 等^[11]采用的 FQ-RT-PCR 的相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法，只要目的基因和内参基因的扩增片段不大（70~300bp），扩增效率基本一致，且接近 100% 扩增（90%~110%），就可以采用比较 ΔC_t 方法比较目的基因在不同条件的表达差异。本研究测得的 C_t 值经 Bio-Rad 的 iQ5 软件自动计算相对表达量并生成柱形图，其计算相对定量是根据 Pfaffl 法^[8]，在进行比较 ΔC_t 时，将目的基因和参考基因的实际扩增效率纳入其中，从而消除了

二者扩增效率的差异对结果产生的误差。

选择稳定表达的内参基因是进行相对定量分析的关键。对于研究病毒在植物中的表达量, 18S rRNA 在不同的环境条件下或者病毒侵染前后表现很好的稳定性, 且表达量很高, 为了保证其浓度在 real-time RT-PCR 的动态范围, 需将 cDNA 稀释十倍作为模板^[12]。由于没有任何基因在不同组织或各种实验处理条件下其表达量维持恒定, 所以要想得到准确的检测结果, 必须使用多个参考基因来进行均一化处理, 消除参考基因表达量差异对结果的影响。本试验的另外一个内参基因 *nad5* 的特点是仅扩增剪接后的 mRNA^[8], 能减少假阴性的可能。本试验表明两个内参基因的表达基本上稳定。*nad5* 基因在一些文献中被用作多重 PCR 的内参基因。

应用 real-time RT-PCR 监测 CTV 时, 结果表明 2 个弱毒株的 CP 基因在甜橙中表达的高峰期是先后不等的, 植株间存在差异。前人的研究表明病毒的含量变化有明显对数增长期、稳定期和回落期^[13]。本研究也发现随着时间和季节推移, CTV 的 cp 量会经历上升、下降和回升的过程。由于本研究暂时做的重复株树较少, 且取样时植株顶部皮和叶前后老嫩程度不太一致, 所以结果有一定的波动。Ruiz-Ruiz 等人^[4]的研究表明同一植株不同的组织病毒含量相比, 皮比叶高, 本研究中皮多数比叶高, 但也有少数叶比皮高。后续研究可以加大重复株数和缩短前期检测的时间间隔。

CTV 因其为害的普遍性和严重性, 引起了国内外众多的研究。本研究构建的体系及发现的弱毒株消长规律将进一步开展弱毒株交叉保护等相关研究提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] 周常勇. 我国柑橘衰退病的发生概况与展望. 第一次全国植物病毒与病毒病防治研究学术讨论会论文集 [C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997. 182-187
- [2] 周彦. 弱毒株交叉保护防治柑桔衰退病毒研究[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2007. 15-20
- [3] Saponari M, Manjunath K, Yokomi R K. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan (R)) [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 147(1): 43-53
- [4] Ruiz-Ruiz S, Moreno P, Guerri J, et al. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of Citrus tristeza virus in different plant tissues [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 145: 96-105
- [5] Bertolini E, Moreno A, Capote N, et al. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR [J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 120(2): 177-188
- [6] 周常勇, Deborah H, Rachael C, et al. 一种微量快速抽提柑桔衰退病毒(CTV)核酸应用于 RT-PCR 扩增的方法[J]. 福建农业大学学报, 2001, 30(增刊): 200
- [7] 于庆涛. 检测 CTV 的实时荧光 RT-qPCR 技术研发与应用[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2008. 18, 34
- [8] Menzel W, Jelkmann W, Maiss E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control [J]. Virol.Methods, 2002, 99(1/2), 81-92

- [9] Brunner A M, Yakovlev I A, Strauss S H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies [J]. BMC Plant Biol, 2004, 4: 14
- [10] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): 2002-2007
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. Methods, 2001, 25:402-408
- [12] Jain M, Nijhawan A, Tyagi A K, et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 345(2): 646-651
- [13] FU T Z, GAO Y S, CHEN J S. Temporal change of Cucumber mosaic virus in systemic infected tomato seedlings (in Chinese) [J]. ACTA PHYTOPATHOLOGICA SINICA, 2006, 36(4): 359-365