



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104450975 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410854297. 8

C12Q 1/68(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 12. 31

C12N 15/11(2006. 01)

(71) 申请人 山东出入境检验检疫局检验检疫技
术中心

地址 266002 山东省青岛市市南区瞿塘峡路
70 号

(72) 发明人 吴兴海 陈长法 魏晓棠 纪瑛
林超 唐静 宋涛 王英超

(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

代理人 褚庆森

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70(2006. 01)

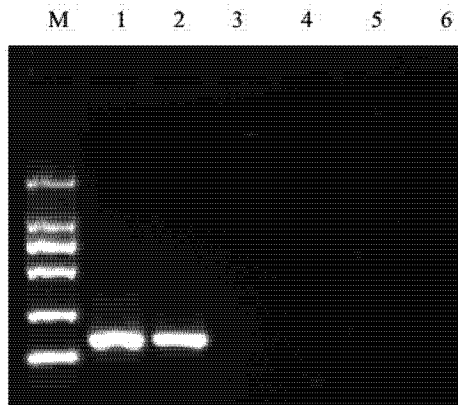
权利要求书2页 说明书6页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

检测番茄斑萎病毒的 RT-HDA 引物、试剂盒及
方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测番茄斑萎病毒的 RT-HDA 引物, 试剂盒及方法, 所述引物为序列表 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID No :2 所示的寡核苷酸序列。所述的试剂盒包含如下组分 :1) RT-HDA 扩增反应液 ;2) 无 RNA 酶的去离子水, 作为空白对照 ; 3) 阳性对照样品 :含番茄斑萎病毒 RNA 模板 ;4) 阴性对照样品 :不含番茄斑萎病毒的健康番茄组织 RNA 模板 ;检测方法包括下列步骤 :1)待检样品 RNA 提取, 2)番茄斑萎病毒 RNA 进行 RT-HDA 扩增 ; 3)电泳检测结果及描述及判定。本发明的 HDA 检测方法更快、更快捷, 安全可靠, 与 PCR 相比不需要 PCR 仪, 设备要求简单, 适用于对番茄斑萎病毒进行快速检测确证, 可广泛应用于农业生产及环境中的疫情监控及进出口贸易中该类病毒的监测及检测。



1. 一组检测番茄斑萎病毒的引物,其特征在于,所述的引物组的序列分别为序列表 SEQ ID NO:1~2所示,其中 SEQ ID NO:1 为检测番茄斑萎病毒的引物 HD-P1, SEQ ID NO:2 为检测番茄斑萎病毒的引物 HD-P2。

2. 权利要求 1 所述的引物组在检测番茄斑萎病毒中的应用。

3. 权利要求 1 所述的引物组在制备检测番茄斑萎病毒的试剂盒中的应用。

4. 一种检测番茄斑萎病毒的 RT-HDA 试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包含如下组分:

1) RT-HDA 扩增反应液:

包含 10×RT-HDA 缓冲液 5 μL、MgSO₄ (100mM) 2 μL, NaCl (500mM) 4 μL, dNTP (3.0mM) 3.5 μL, 酶混合液 3.5 μL、RNase-Free Water 20 μL、HD-P1 和 HD-P2 各 1 μL;

其中 10×RT-HDA 缓冲液包括 10mmol/L KCl、20mmol/L Tris-Cl (pH8.8, 25℃), 所述引物 HD-P1 和 HD-P2 分别具有序列表 SEQ ID NO:1~2 的碱基序列;

所述的酶混合液包括 DNA 解旋酶 0.4 μg、AMV-Bst 40U 和 ThermoScript 反转录酶 4U;

2) 无 RNA 酶的去离子水,作为空白对照模板;

3) 阳性对照样品:含番茄斑萎病毒 RNA 模板,作为阳性模板;

4) 阴性对照样品:不含番茄斑萎病毒的健康番茄组织 RNA 模板,作为阴性模板。

5. 一种应用权利要求 4 所述的试剂盒检测样品中番茄斑萎病毒的方法,其特征在于,所述的方法包括下列步骤:

1) 待检样品 RNA 提取

采取 Trizol 法或 RNA 提取试剂盒抽提 RNA 模板,

2) 番茄斑萎病毒 RNA 进行 RT-HDA 扩增;

3) 电泳检测结果及描述及判定

1. 电泳检测

2. 结果描述及判定

①质控标准:

阳性对照在 131bp 处由特异性扩增条带;

阴性对照无特异性扩增条带;

如阴性对照和阳性条件不满足以上条件,此次试验视为无效;

②结果判断:

阳性:在 131bp 处由特异性扩增条带,表示样本中含有番茄斑萎病毒;

阴性:无特异性扩增条带,表明样品中无番茄斑萎病毒。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,扩增完成后对 RT-HDA 扩增产物测序验证。

7. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,步骤 2) 番茄斑萎病毒 RNA 进行 RT-HDA 扩增具体为:

A: 在反应管中依次加入待检模板 RNA 10 μL 和 RT-HDA 扩增反应液 40 μL,充分混匀;

B: 在 65℃ 恒温反应条件下,进行 RT-HDA 扩增反应 90min;

扩增时,设立 3 个对照:阳性对照番茄斑萎病毒 RNA 模板代替样品 RNA 模板、阴性对照以阴性模板 RNA 代替样品 RNA 模板、空白对照 DEPC 水代替样品 RNA 模板。

8. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,步骤 3) 中的电泳检测具体为:

取 1.5g 琼脂糖,于 100mL 电泳缓冲液中加热,充分溶化,加入溴化乙锭贮存液至终浓度为 0.5 μ g/mL,制胶,在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶;将 3 μ L ~ 6 μ L HDA 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合,点样;9V/cm 恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部;紫外检测仪下观察电泳结果并记录。

9. 上述番茄斑萎病毒 RT-HDA 检测方法在番茄、辣椒上检测番茄斑萎病毒的应用。

检测番茄斑萎病毒的 RT-HDA 引物、试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测番茄斑萎病毒的 RT-HDA 引物, 试剂盒及方法, 属于病毒检测技术领域。

背景技术

[0002] 近年来, 番茄斑萎病毒 (Tomato spotted wilt virus, TSWV) 以其广泛的寄主范围和造成的巨大经济损失已被列为世界危害最大的十种植物病毒之一。在 20 世纪 60 ~ 80 年代, 该病毒曾在欧美及非洲的烟草和番茄上大流行, 每年的发病率为 20% ~ 50%, 造成高达数 10 亿美元的损失。在美国夏威夷、巴西、意大利和南非, TSWV 在 20 世纪 80 ~ 90 年代的流行曾导致番茄、莴苣等作物近乎绝产。近年来, 番茄斑萎病毒属病毒特别是 TSWV, 已成为全世界引起多种经济作物和观赏植物极大经济损失的重要因子。

[0003] 我国目前种植的辣椒、洋葱、生菜等蔬菜种子很多来自于世界各地, 尤其是番茄种子基本依赖进口, 进口国别包括美国、日本、荷兰、泰国等国, 这些进口国目前都有番茄斑萎病毒的发生与报道, 我国口岸曾于 2012 年在进境的种子中截获 TSWV 病毒。而传统的 TSWV 检测及确证方法一般通过生物寄主、形态学试验判定植株是否具有植物病毒, 这些方法费时, 操作繁琐, 不能满足病害防治的需要。

[0004] 在现有的核酸检测方法中, 常用的有聚合酶链式反应 (常规 PCR 和实时荧光 PCR), 该方法灵敏、特异, 但需要高品质热循环仪, 而且因为温度循环导致较长。其他新开发的核酸扩增方法, 比如 NASBA (nucleic acid sequence-based amplification)、3SR (self-sustained sequence replication)、SDA (strand displacement amplification) 等, 在扩增循环, 都有各自的创新点。NASBA 和 3SR 使用一系列转录和反转录过程来循环以避免高温变性作用, SDA 则使用限制性内切酶和修饰过的模板来循环扩增。虽然它们的敏感性都很高, 可以检测并扩增小于 10 个拷贝的核酸样本, 但是它们还有各自需要克服的缺点。技术要求、材料要求、技术本身特异性缺陷等方面严重束缚了这些技术的推广应用。因此, 有必要提供一种更便捷, 检测灵敏度更高的检测番茄斑萎病毒的方法。

[0005] 依赖解旋酶恒温基因扩增技术 (Helicase-Dependent Isothermal Amplification, HDA) 是 2004 年 BioHelix 的研究人员模拟动物体内 DNA 的复制机制发明的一种新的体外恒温扩增技术。该技术利用 DNA 双链解旋酶打开双链 DNA, 同时在单链结合蛋白 (SSB) DNA 聚合酶的作用下, 扩增靶片段, 实现目的基因的体外扩增。HDA 技术与其他基因扩增技术比较, 具有如下优势:

[0006] 1、与 PCR 技术相比, HDA 技术模仿自然界 DNA 合成方式, 凭借 DNA 解旋酶解开双链并完成扩增, 而传统 PCR 是通过变性 - 退火 - 延伸过程的多次循环实现。由于原理的不同, 使得 HDA 的优点尤其突出: ① HDA 反应在同一温度下进行, 因而不需要昂贵的 PCR 仪, 有利于在基层实验室推广应用。② 由于只用一种温度扩增使得 HDA 反应时间明显缩短, 仅需 1h 左右。③ HDA 技术采用去除了 5' - 3' 外切酶活性的 BstDNA 聚合酶, 该酶兼具耐高温性、高效扩增反应性、极好的条带均一性及高准确性等特点, 不易引起非特异性扩增, 使得 HDA 技

术具有更高的特异性和敏感性。

[0007] 2、与其他恒温扩增技术相比,HDA 是一种真正意义上的恒温基因扩增方法。例如:SDA、LAMP 等均需要热变性,而 HDA 不需此部即可完成反应。此外,尽管 HDA 的反应体系组稍显复杂,但操作简单易学。尤其引物设计简单。SDA 技术需要四条引物,同时还需要经修饰过的 dNTP 作底物,而且靶序列的复杂性也限制了其应用范围。LAMP 技术具有简单、快速、高效、特异性强等优点,但引物设计复杂,难度较大,且对靶序列的要求较高:目的序列长度限制在 200bp 左右,从中设计的四至六条引物 T_m 互有差别,且能识别 6 个不同的区域。而 HDA 技术的引物设计与常规 PCR 方法相同,仅需两条普通引物即可。总之,与同类新型 PCR 技术相比,HDA 技术更简单,更有效,具有良好的应用前景。

[0008] 据最新报道,现有的 HDA 技术还包括一种不仅可扩增大分子 DNA 片段,还可直接扩增完整环状质粒 DNA 的环 HDA 法(T 和 circular helicase-dependent amplification, cHDA)。利用 cHDA 的特异性扩增环状 DNA 能力,可直接从病原体中检测含有环状 DNA 的病毒等。HDA 技术与荧光标记技术相结合还可以实现实时检测。研究表明,HDA 技术能够扩增微生物基因组 DNA、RNA、质粒 DNA 和 cDNA 等。HDA 方法扩增能力强,现用的 UvrD 系统扩增可达 100 多万倍,能够从基因组 DNA 中检测到低于 10 个拷贝的靶基因。综上所述,HDA 技术是一种不可比拟的真正实用的恒温基因扩增方法,有望成为一种重要的诊断工具。

[0009] 目前,国内外还没有关于 HDA 检测植物病毒的研究。我们将首次建立起快速检测番茄斑萎病毒的 HDA 技术。该发明成果将有望成为植物疫病分子诊断领域的突破性技术,是植物流行病学检测技术体系的进一步完善和发展。

发明内容

[0010] 本发明所要解决的技术问题是:一种用于检测番茄斑萎病毒的 RT-HDA 扩增引物及试剂盒,即利用 RT-HDA 扩增方法检测番茄斑萎病毒的引物和试剂盒,克服其他检测方法在病毒检测的局限性,为番茄斑萎病毒的检测提供有效工具,能够快速、特异性强、灵敏度高而且低成本的检测番茄斑萎病毒。

[0011] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

[0012] 本发明提供的番茄斑萎病毒 RT-HDA 检测引物组,包括引物对 HD-P1 和 HD-P2,它们的碱基序列分别为 SEQ ID NO:1 ~ 2。

[0013] 本发明的试剂盒,包含如下组分:

[0014] 1) RT-HDA 扩增反应液:

[0015] 包含 10×RT-HDA 缓冲液 5 μ L、MgSO₄ (100mM) 2 μ L, NaCl (500mM) 4 μ L, dNTP (3.0mM) 3.5 μ L, 酶混合液酶混合液 (DNA 解旋酶 0.4 μ g、AMV-Bst 40U 和 ThermoScript 反转录酶 4U) 3.5 μ L、RNase-Free Water 20 μ L、HD-P1 和 HD-P2 各 1 μ L。

[0016] 其中 10×RT-HDA 缓冲液包括 10mmol/L KCL、20mmol/L Tris-Cl (Ph8.8, 25℃), 所述引物 HD-P1 和 HD-P2 分别具有序列表 SEQ ID NO:1 ~ 2 的碱基序列;

[0017] 2) 阳性对照样品:含番茄斑萎病毒 RNA 模板,作为阳性模板;

[0018] 3) 阴性对照样品:不含番茄斑萎病毒的健康番茄组织 RNA 模板,作为阴性模板;

[0019] 4) 空白对照样品:为 DEPC 去离子水;

- [0020] 使用以上试剂盒,检测样品中番茄斑萎病毒的方法,依次包括下列步骤:
- [0021] 1) 待检样品 RNA 提取
- [0022] 采取 Trizol 法或 RNA 提取试剂盒抽提 RNA 模板,
- [0023] 2) 番茄斑萎病毒 RT-HDA 扩增
- [0024] A: 在反应管中依次加入待检模板 RNA 10 μ L 和 RT-HDA 扩增反应液 40 μ L,充分混匀;
- [0025] B: 在 65 $^{\circ}$ C 恒温反应条件下,进行 RT-HDA 扩增反应 90min;
- [0026] 扩增时,应设立 3 个对照:阳性对照(番茄斑萎病毒 RNA 模板代替样品 RNA 模板)、阴性对照(以阴性模板 RNA 代替样品 RNA 模板)、空白对照(DEPC 水代替样品 RNA 模板)
- [0027] 3) 电泳检测
- [0028] 取 1.5g 琼脂糖,于 100mL 电泳缓冲液中加热,充分溶化,加入溴化乙锭贮存液至终浓度为 0.5 μ g/mL,制胶,在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶;将 3 μ L ~ 6 μ L HDA 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合,点样;9V/cm 恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部;紫外检测仪下观察电泳结果并记录。如果扩增片段为 131bp,说明待检病毒是 TSWV,如果没有出现 131bp 扩增片段,则说明待检病毒不是 TSWV。
- [0029] 上述番茄斑萎病毒 RT-HDA 检测方法在番茄、辣椒上的应用。
- [0030] 本发明提供的快速检测番茄斑萎病毒的分子生物学方法,具有灵敏度高、特异性强等特点,与现有技术相比,本发明的有益结果是:
- [0031] 1、简便易行:该检测方法通过恒温水浴锅或有稳定热源的设备就能进行实验,通过反应产物颜色变化即可判定结果,省去了昂贵的仪器设备、繁琐的电泳过程;
- [0032] 2、检测高效性:该检测方法所用检测时间不足 1 小时,而 PCR 扩增时间较长,一般需要 2 小时以上,这样能大大提高了检测的效率;
- [0033] 3、灵敏度高:以番茄斑萎病毒 RNA 为模板,该方法的检测下限为 10fg/ μ L,是常规 PCR 的 100 倍;
- [0034] 4、准确性高:该不需要从样本中纯化 RNA,可直接利用发病组织或病残体提取 RNA 快速检测,大大提高了检测的准确度;
- [0035] 5、特异性强:HDA 技术采用去除了 5'-3' 外切酶活性的 BstDNA 聚合酶,该酶兼具耐高温性、高效扩增反应性、极好的条带均一性及高准确性等特点,不易引起非特异性扩增,使得 HDA 技术具有更高的特异性。

附图说明

- [0036] 图 1 是本发明的 RT-HDA 特异性实验图。1:番茄斑萎病毒;2:阳性对照;3:凤仙花坏死斑病毒;4:番茄花叶病毒;5:番茄黄化曲叶病毒;6:番茄黑环病毒。
- [0037] 图 2 是本发明的 RT-HDA 灵敏性实验图。其中 1~7:1.56 $\times 10^{-1}$ 、1.56 $\times 10^{-2}$ 、1.56 $\times 10^{-3}$ 、1.56 $\times 10^{-4}$ 、1.56 $\times 10^{-5}$ 、1.56 $\times 10^{-6}$ 、1.56 $\times 10^{-7}$ ng/ μ L TSWV 感病材料总 RNA。
- [0038] 图 3 是本发明的 RT-PCR 灵敏性实验图。其中 1~6:1.56 $\times 10^{-1}$ 、1.56 $\times 10^{-2}$ 、1.56 $\times 10^{-3}$ 、1.56 $\times 10^{-4}$ 、1.56 $\times 10^{-5}$ 、1.56 $\times 10^{-6}$ ng/ μ L TSWV 感病材料总 RNA。

具体实施方式

[0039] 本发明采用 RT-HDA 技术,并根据番茄斑萎病毒 N 片段的基因序列设计了相应的 RT-HDA 检测引物组,包括引物对:HD-P1 和 HD-P2,由此发明了用于检测番茄斑萎病毒的 RT-HDA 检测方法及试剂盒。应用本发明的检测方法及试剂盒,仅需通过对辣椒、番茄等疑似感染植株样品进行 RNA 提取并进行 RT-HDA 扩增,即可快速检测出是否感染番茄斑萎病毒,方便基层快速、准确、简便地进行病害诊治,进而采取适当的防治措施,减少病害带来的损失。

[0040] 实施例 1 特异性实验

[0041] (1) 引物设计

[0042] 本发明根据 NCBI 核酸序列数据库中 TSWV 的 N 基因全长序列 (KC294570.1(昆明分离物)、HM581936.1(南京分离物)、JF730744.1(韩国分离物)、HM180089(台湾分离物)、HQ406984.1(美国分离物)、KC494503.1(新西兰分离物)、KM379142.1(土耳其分离物)、KF146703.1(委内瑞拉分离物)),在保证扩增的兼并性和通用性的前提下通过比较分析 TSWV N 基因的高度保守区,设计 RT-HDA 引物对 HD-P1 和 HD-P2,设计完成后将引物在数据库的 Primer-Blast 模块下进行比对验证,最后选取以下 RT-HDA 检测引物组:

[0043] 上游引物 HD-P1 :GGCTTGAATCAGAGGGTGAGA(见序列表 SEQ ID NO:1),

[0044] 下游引物 HD-P2 :TTGGAGCCACTGACATGACC(见序列表 SEQ ID NO:2)。

[0045] (2) 病毒 RNA 的提取

[0046] 取 0.1g 番茄斑萎病毒、番茄黑环病毒、凤仙花坏死斑病毒、番茄花叶病毒、番茄黄化曲叶样品,加液氮研磨成粉末状,将研磨物迅速移入 1.5mL 离心管中,加入 1mL Trizol Reagent,颠倒混匀,2℃~8℃,12000g,离心 10min。取上清,15℃~30℃,放置 5min;加入 0.2mL 氯仿,用手剧烈震荡(勿涡旋振荡),15s。15℃~30℃,放置 2min~3min;2℃~8℃,12000g,离心 15min。小心吸取约为 600 μL 的上层水相,勿扰动中间相和下层相。加 500 μL 异丙醇混合上清液,15℃~30℃,放置 10min。2℃~8℃,12000g,离心 10min。去除上清液,沉淀中加入 1mL 75%乙醇,洗涤;2℃~8℃,7500g,离心 5min。去除上清液,沉淀自然干燥后,将其溶于 30 μL~50 μL 无 RNase 的水中,即为待检模板 RNA。

[0047] (3) 五种病毒 RT-HDA 扩增

[0048] A: 分别在反应管中依次加入五种病毒的待检模板 RNA 10 μL 和 RT-HDA 扩增反应液 40 μL,充分混匀。

[0049] B: 在 65℃恒温反应条件下,进行 RT-HDA 恒温扩增反应 90min。

[0050] (4) 电泳检测

[0051] 取 1.5g 琼脂糖,于 100mL 电泳缓冲液中加热,充分溶化,加入溴化乙锭贮存液至终浓度为 0.5 μg/mL,制胶,在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶;将 3 μL~6 μL RT-HDA 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合,点样;9V/cm 恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部;紫外检测仪下观察电泳结果并记录。如果扩增片段为 131bp,说明待检病毒是 TSWV,如果没有出现 131bp 扩增片段,则说明待检病毒不是 TSWV。

[0052] 该组引物经在线 BLAST 的结果证实,具有很高的特异性,不会与其他病毒交叉反应。番茄斑萎病毒为番茄斑萎病毒属病毒,因此研究选择了同属近似种病毒凤仙花坏死斑病毒及其他三种番茄上常见的主要病毒为测试毒种。经验证,除番茄斑萎病毒 RNA 出现扩增 131bp 条带外,其余病毒均无相应扩增条带,与预期相符,证明该组引物的良好特异性,

与上述毒株均无交叉反应（见图 1）。

[0053] 实施例 2 敏感性实验

[0054] (1) 用 DEPC 水将 TSWV 病毒 RNA 模板液向下做 10 倍梯度稀释,依次为 1.56×10^{-1} 、 1.56×10^{-2} 、 1.56×10^{-3} 、 1.56×10^{-4} 、 1.56×10^{-5} 、 1.56×10^{-6} 、 1.56×10^{-7} ng/ μ L, 各取 2μ L 为模板分别进行 RT-HDA 及 RT-PCR 扩增反应。扩增引物组包含:

[0055] 上游引物 HD-P1 :GGCTTGAATCAGAGGGTGAGA(见序列表 SEQ ID NO:1),

[0056] 下游引物 HD-P2 :TTGGAGCCACTGACATGACC(见序列表 SEQ ID NO:2)。

[0057] (2) 病毒 RNA 的提取

[0058] 取 0.1g 不同稀释浓度的样品,加液氮研磨成粉末状,将研磨物迅速移入 1.5mL 离心管中,加入 1mL Trizol Reagent,颠倒混匀, $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$,12000g,离心 10min。取上清, $15^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$,放置 5min;加入 0.2mL 氯仿,用手剧烈震荡(勿涡旋振荡),约 15s。 $15^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$,放置 2min \sim 3min; $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$,12000g,离心 15min。小心吸取约为 600μ L 的上层水相,勿扰动中间相和下层相。加 500μ L 异丙醇混合上清液, $15^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$,放置 10min。 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$,12000g,离心 10min。去除上清液,沉淀中加入 1mL 75%乙醇,洗涤; $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$,7500g,离心 5min。去除上清液,沉淀自然干燥后,将其溶于 30μ L \sim 50μ L 无 RNase 的水中,即为待检模板 RNA。

[0059] (3) 不同浓度的番茄斑萎病毒 RT-HDA 扩增

[0060] A: 分别在反应管中依次加入不同稀释倍比的待检模板 RNA 10μ L 和 RT-HDA 扩增反应液 40μ L,充分混匀。

[0061] B: 在 65°C 恒温反应条件下,进行 RT-HDA 扩增反应 60min。

[0062] (4) RT-PCR 扩增及检测

[0063] RT-PCR 扩增体系参照 TIANGEN 公司的 Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒说明配置,反应条件为 50°C 反转录 30min; 94°C 预变性 2min; 94°C 30s, 53°C 30s, 72°C 30s,循环反应 35 次; 65°C 延伸 10min。

[0064] (4) 电泳检测

[0065] 取 1.5g 琼脂糖,于 100mL 电泳缓冲液中加热,充分溶化,加入溴化乙锭贮存液至终浓度为 0.5μ g/mL,制胶,在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶;将 3μ L \sim 6μ L 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合,点样; $9\text{V}/\text{cm}$ 恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部;紫外检测仪下观察电泳结果并记录。

[0066] (5) 结果判定

[0067] RT-HDA 产物鉴定:电泳结果显示,番茄斑萎病毒使用 RT-HDA 方法能够得到 10^{-5} 稀释倍数的模板(见图 2),可达到 fg 级水平,使用 RT-PCR 方法能够得到 10^{-3} 稀释倍数(图 3),只有 pg 级水平。这说明本发明的 RT-HDA 方法的检测灵敏度高出 PCR 方法一个数量级。

[0068] 实施例 3:实际样品检测及对比实验

[0069] 将从云南、山东、四川等地田间采集的具有典型 TSWV 症状的病样及实验室留样,分别采用 RT-HDA、RT-PCR 进行检测,比较两种方法的效果,以进一步评估 RT-HDA 方法的可靠性。

[0070] 1、实际样品 RT-HDA 检测

[0071] 1) 病毒 RNA 的提取

[0072] 取 0.1g 样品,加液氮研磨成粉末状,将研磨物迅速移入 1.5mL 离心管中,加入 1mL Trizol Reagent,颠倒混匀,2℃~8℃,12000g,离心 10min。取上清,15℃~30℃,放置 5min;加入 0.2mL 氯仿,用手剧烈震荡(勿涡旋振荡),约 15s。15℃~30℃,放置 2min~3min;2℃~8℃,12000g,离心 15min。小心吸取约为 600 μL 的上层水相,勿扰动中间相和下层相。加 500 μL 异丙醇混合上清液,15℃~30℃,放置 10min。2℃~8℃,12000g,离心 10min。去除上清液,沉淀中加入 1mL 75%乙醇,洗涤;2℃~8℃,7500g,离心 5min。去除上清液,沉淀自然干燥后,将其溶于 30 μL~50 μL 无 RNase 的水中,即为待检模板 RNA。

[0073] (2) 不同来源样品的番茄斑萎病毒 RT-HDA 扩增

[0074] A: 分别在反应管中依次加入不同稀释倍比的待检模板 RNA 2 μL 和 RT-HDA 扩增反应液 A 23 μL,充分混匀。

[0075] B: 在 65℃ 恒温反应条件下,进行 RT-HDA 恒温扩增反应 60min。

[0076] 3) RT-HDA 产物鉴定

[0077] 紫外检测仪下观察电泳结果并记录,电泳结果显示,在 9 份样品中 3 份样品为阳性,其他样品为阴性。

[0078] 2、PCR 扩增

[0079] 1) 方法:普通 RT-PCR 反应条件为 50℃ 反转录 30min;94℃ 预变性 2min;94℃ 30s,53℃ 30s,72℃ 30s,循环反应 35 次;65℃ 延伸 10min。

[0080] 2) 琼脂糖凝胶电泳结果:在 9 份样品中,3 份为阳性,其余为 6 份。

[0081] 结论:利用上述 RT-HDA 和 PCR 方法同时检测实际样品,两种方法的符合率 100%,但 RT-HDA 对设备要求更低,便捷性更高。

[0082] 本发明所建立的检测方法能快速、准确的检测出番茄斑萎病毒,为科学研究和生产实践提供了一种简便、快速、成本低廉的检测技术,也为斑萎病的早期预警及合理用药提供了理论基础和技术指导,对增加生态、社会和经济效益都具有现实而深远的意义。

SEQUENCE LISTING

<110> 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心

<120> 检测番茄斑萎病毒的 RT-HDA 引物、试剂盒及方法

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 上游引物 HD-P1

<400> 1

GGCTTGAATCAGAGGGTGAGA

22

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 下游引物 HD-P2

<400> 2

TTGGAGCCACTGACATGACC

20

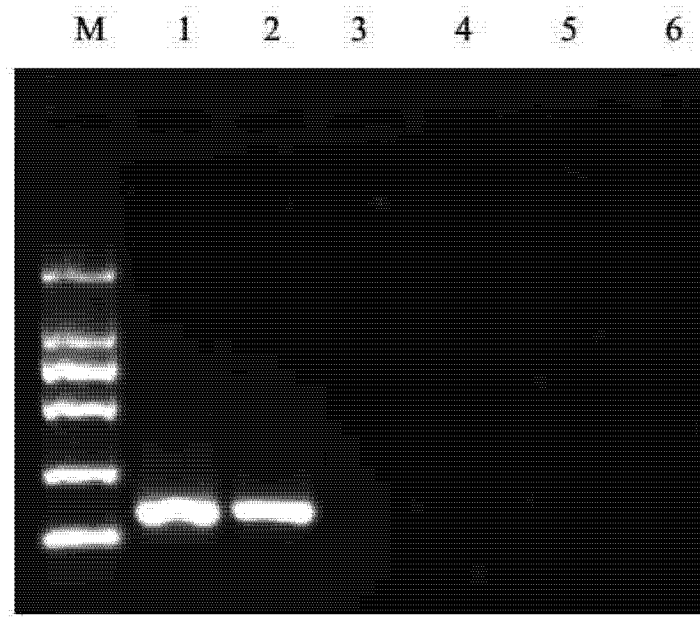


图 1

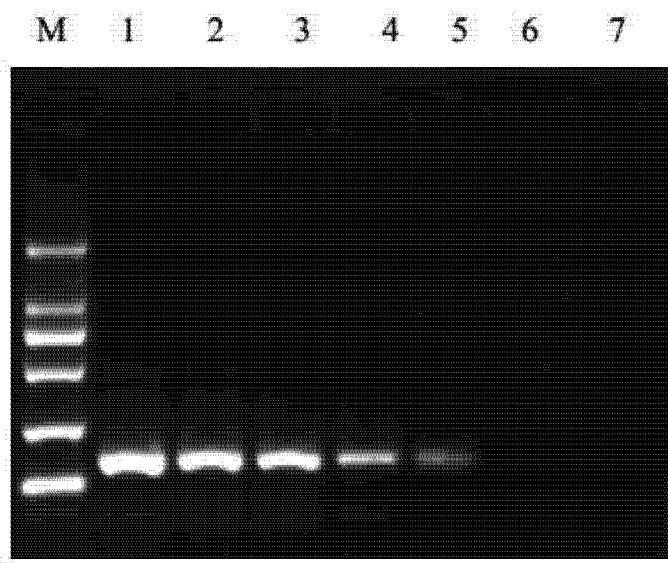


图 2

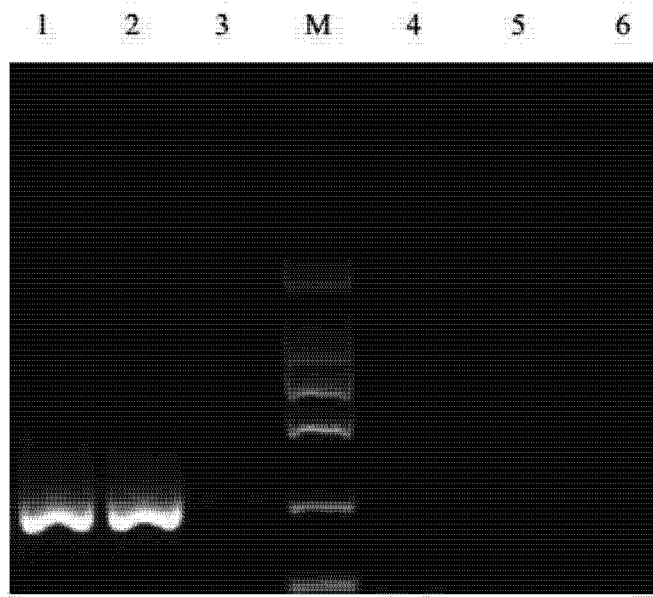


图 3