

一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 对蜜蜂病毒诊断研究的比较*

贾慧茹^{1**} 周 婷¹ 高夫超^{2***}

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 农业部授粉昆虫生物学重点开放实验室, 北京 100093;

2. 黑龙江省农业科学院牡丹江分院, 牡丹江 157041)

摘 要 【目的】探讨适合蜜蜂病毒病诊断的 RT-PCR 技术。【方法】从感染蜜蜂以色列急性麻痹病毒、残翅病毒、囊状幼虫病毒、急性麻痹病毒、黑蜂王台病毒以及慢性麻痹病毒的阳性样品中, 分别提取这 6 种病毒的 RNA。然后, 同时应用一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 的反应体系对 6 种病毒扩增, 并对两种方法的灵敏性进行比较和分析。【结果】上述两种方法分别得到 158 (IAPV)、269 (DWV)、342 (SBV)、460 (ABPV)、536 (BQCV) 和 774 bp (CBPV) 的扩增片段, 测序结果证实扩增片段符合预期。两步法 RT-PCR 可检测到更低浓度的病毒颗粒。【结论】结果表明, 该 2 种方法均可快速、有效地诊断蜜蜂病毒。但两步法 RT-PCR 灵敏性更高。

关键词 蜜蜂病毒, 一步法 RT-PCR, 两步法 RT-PCR

Research on the detection of bee viruses by one step and two step RT-PCR

JIA Hui-Ru^{1**} ZHOU Ting¹ GAO Fu-Chao^{2***}

(1. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology of Agriculture, Institute of Apiculture Research, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100093, China;

2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang, 157041, China)

Abstract [Objectives] To find which RT-PCR technology can effectively detect bee viruses. [Methods] Bee viruses (IAPV, DWV, SBV, ABPV, BQCV, and CBPV) were extracted from bees and the sensitivity of one and two step RT-PCR in detecting these six virus was compared. [Results] Both methods amplified viral fragments, which were 158 (IAPV), 269 (DWV), 342 (SBV), 460 (ABPV), 536 (BQCV) and 774 bp (CBPV), in length. Serial dilutions assay showed that two-step RT-PCR detected much lower concentrations of virus particles. [Conclusion] Comparison of one-step and two-step RT-PCR indicates that both methods can effectively detect many bee viruses under optimized conditions, however, two-step RT-PCR is more sensitive than one-step RT-PCR.

Key words bee virus, one-step RT-PCR, two-step RT-PCR

近年来蜂群数量急剧下降, 有研究表明, 蜜蜂病毒病的高发是导致蜂群损失的最重要的诱因之一 (Cox-Foster *et al.*, 2007; van Engelsdorp and Meixner, 2010)。在目前已分离确认的 20 种蜜蜂病毒病中 (Bromenshenk *et al.*, 2010),

以色列急性麻痹病毒 (Israeli acute paralysis virus, IAPV)、囊状幼虫病毒 (Sacbrood bee virus, SBV)、残翅病毒 (Deformed wing virus, DWV)、急性麻痹病毒 (Acute bee paralysis virus, ABPV)、黑蜂王台病毒 (Black queen cell virus,

* 资助项目 Supported projects: 国家蜂产业技术体系 (CARS-45-KXJ6)

**第一作者 First author, E-mail: jhuru@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: mdjgfc@126.com

收稿日期 Received: 2014-11-14, 接受日期 Accepted: 2015-01-16

BQCV) 以及慢性麻痹病毒 (Chronic bee paralysis virus, CBPV), 这 6 种蜜蜂病毒在蜂群中的分布非常广泛 (Chen and Siede, 2007)。

蜜蜂病毒病的快速诊断是对其进行有效防控的基础, RT-PCR 技术诊断病毒病具有快速、灵敏度高、特异性强的特点, 是蜜蜂病毒病诊断中运用最为广泛的技术 (张炫等, 2012)。两步法 RT-PCR 中, cDNA 合成和 PCR 是 2 个独立的复杂的酶催化反应, 与两步法 RT-PCR 相比, 一步法 RT-PCR 的 cDNA 合成和 PCR 反应可在一个管中完成, 缩短了反应时间。

目前, 蜜蜂病毒检测中, 多应用两步法 RT-PCR, 一步法 RT-PCR 用于检测蜜蜂病毒报道相对较少, 但对两种方法检测蜜蜂病毒的灵敏度进行比较, 国内还未见报道。因而, 本研究运用一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 对蜜蜂的 IAPV、SBV、DWV、ABPV、BQCV 和 CBPV 这 6 种常见病毒进行了检测, 并对检测结果进行了比较, 旨在为建立一个快速、简便、灵敏度高、特异性强的 RT-PCR 检测技术提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病样 6 种病毒的阳性样品系 2013 年对北京 30 个蜂场的成年工蜂进行病毒病的流行病学调查所得 (贾慧茹等, 2014)。

1.1.2 主要试剂与仪器 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司, M-MLV II Two step RT-PCR Kit 和 M-MLV II One step RT-PCR Kit 等 PCR 反应试剂为博迈德生物公司产品。

高速冷冻离心机 (Eppendorf 5417R)、移液枪 (Eppendorf 公司)、电泳仪 (北京六一仪器厂)、PCR 仪 (Eppendorf)、凝胶成像系统 (上海复日科技有限公司)、微型振荡器 (基因有限公司)、恒温水浴锅 (北京长安永创科学仪器有限公司) 等。

1.2 总 RNA 的提取

根据 Wang 等 (2003) 的方法, 用 Trizol 提

取蜜蜂总 RNA, 作为待测的病毒 RNA。用琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 质量并用 NanodropND-2000 分析其浓度和纯度, 最终将 RNA 置于 -70°C 冰箱中保存备用。

1.3 引物的设计与合成

检测 IAPV、DWV、SBV、ABPV、BQCV 和 CBPV 这 6 种病毒的引物参照 Sguazza 等 (2013) 设计的序列, 由北京华大基因科技有限公司合成。

1.4 一步法 RT-PCR

反应体系为 (总体积 $25\ \mu\text{L}$): 病毒总 RNA $1\ \mu\text{L}$, $2\times\text{one-step Reaction Mix}$ $12.5\ \mu\text{L}$, $10\ \text{pmol/L}$ 上游引物和下游引物各 $1\ \mu\text{L}$, M-MLV II Enzyme Mix $1\ \mu\text{L}$, DEPC 处理水补足 $25\ \mu\text{L}$ 。反应程序: 42°C 30 min, 94°C 3 min; 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 39 个循环, 72°C 延伸 10 min。扩增反应在 Eppendorf PCR 扩增仪中进行。反应结束后, 用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5 两步法 RT-PCR

1.5.1 cDNA 的合成 以提取的总 RNA 为模板, 按照博迈德公司 M-MLV II Two step RT-PCR Kit 反转录试剂盒说明书, 逆转录合成 cDNA。反转录体系 ($20\ \mu\text{L}$): 总 RNA $1\ \mu\text{L}$, 随机引物 $1\ \mu\text{L}$, $5\times\text{RT Mix}$ $5\ \mu\text{L}$, $200\ \text{U}/\mu\text{L}$ M-MLV II 反转录酶 $1\ \mu\text{L}$, DEPC 处理水补足 $20\ \mu\text{L}$ 。反应条件为: 25°C 10 min, 42°C 60 min, 70°C 15 min, 4°C 保存。

1.5.2 PCR 反应 用 6 种病毒的特异性引物分别进行 PCR 反应。反应体系: 模板 $1\ \mu\text{L}$, $10\ \mu\text{mol/L}$ 病毒的上游引物和下游引物各 $1\ \mu\text{L}$, $2\times\text{MasterMix}$ $12.5\ \mu\text{L}$, ddH_2O $9.5\ \mu\text{L}$, 共 $25\ \mu\text{L}$ 。反应条件为: 94°C 5 min, 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min, 共 39 个循环; 72°C 再延伸 10 min。PCR 反应结束后, 用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.6 一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 灵敏度检测

含有 IAPV、DWV、SBV、ABPV、BQCV 和 CBPV 的病毒 RNA, 进行 10 倍浓度梯度稀释 ($10^0 \sim 10^{-5}$) 后, 分别用一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 进行检测。

1.7 PCR 产物的测序及序列分析

将各个病毒的 PCR 产物送至博迈德生物公司测序, 利用 NCBI 中 Blast 软件将各种病毒的测序结果同 GenBank 中已发表序列进行同源性比对。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

先用琼脂糖凝胶电泳对提取的样品总 RNA 进行定性质量, 然后用 NanodropND-2000 进行定量检测, 测得阳性样品的 RNA 浓度处于 (860.5 ± 57.1) ng/ μ L 范围内, A_{260}/A_{280} 为 1.87~2.20, 符合进行 RT-PCR 反应的要求。

2.2 蜜蜂病毒检测结果比较

用一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 对分别感染以色列急性麻痹病毒、囊状幼虫病毒、残翅病毒、急性麻痹病毒、黑蜂王台病毒以及慢性麻痹病毒的阳性样品检测, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果得到与预期大小一致的病毒扩增片段, 结果如图 1 所示。

2.3 一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 灵敏度检测

每一种病毒 RNA 经过浓度梯度稀释 (分别稀释 10^1 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍) 后, 再分别用一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 进行检测 (表 1)。由表 1 可知, SBV 和 CBPV 的 RNA 稀释 10^5 倍后, 用两步法 RT-PCR 和一步法 RT-PCR 都能扩增出靶标条带, 但是两步法 RT-PCR 扩增出的靶标条带亮度更高, 质量更好。IAPV、ABPV 的 RNA 稀释 10^4 倍后用两步法 RT-PCR 可以扩增出靶标条带, 而用一步法

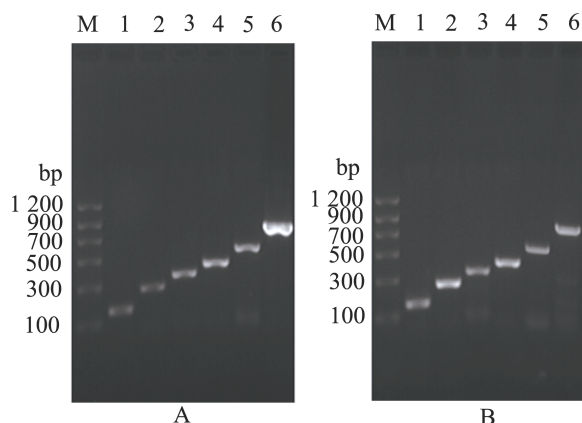


图 1 两种方法检测蜜蜂病毒扩增产物电泳结果

Fig. 1 Amplification of six bee virus by one step RT-PCR and two step RT-PCR

A: 一步法; B: 两步法。

A: One step RT-PCR; B: Two step RT-PCR.

M: DNA marker II 泳道 1: IAPV (158 bp); 泳道 2: DWV (269 bp); 泳道 3: SBV (342 bp); 泳道 4: ABPV (460 bp); 泳道 5: BQCV (536 bp); 泳道 6: CBPV (774 bp)。

M: Molecular marker II; Lane 1: IAPV (158 bp); Lane 2: DWV (269 bp); Lane 3: SBV (342 bp); Lane 4: ABPV (460 bp); Lane 5: BQCV (536 bp); Lane 6: CBPV (774 bp)。

RT-PCR 则呈阴性。IAPV、DWV 的 RNA 经浓度梯度稀释后, 用一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 检测的电泳结果见图 2 和图 3。

2.4 序列分析

将测得的序列用 NCBI Blast 比对, 扩增的 6 种蜜蜂病毒的序列与靶序列同源性极高, 均达到 98% 以上, 结果表明确实检测到这 6 种病毒。

3 讨论

许多研究表明, 蜜蜂病毒病的广泛流行是导致世界蜂群数量持续下降的一个重要原因, 而以色列急性麻痹病毒(IAPV)、囊状幼虫病毒(SBV)、残翅病毒(DWV)、黑蜂王台病毒(BQCV)和慢性麻痹病毒(CBPV)是世界范围内的蜂群中最为常见的几种病毒 (Chen and Siede, 2007)。本研究应用一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 对这 6 种病毒分别进行诊断, 试验证明, 运用一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 都能准确地诊断出蜜蜂的这 6 种常见病毒。

表 1 病毒 RNA 稀释梯度一步法 RT-PCR 和两步法 RT-PCR 检测结果
Table 1 Detection results of different concentration of RNA by one step RT-PCR and two step RT-PCR

病毒 Virus	诊断方法 Detection method	稀释倍数 Dilution gradient				
		10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
IAPV	一步 RT-PCR	++	++	+	—	—
	两步 RT-PCR	++	++	++	+	—
DWV	一步 RT-PCR	++	++	+	+	—
	两步 RT-PCR	++	++	++	+	+
SBV	一步 RT-PCR	++	++	++	+	+
	两步 RT-PCR	++	++	+	+	+
ABPV	一步 RT-PCR	++	++	++	—	—
	两步 RT-PCR	++	++	++	+	—
BQCV	一步 RT-PCR	++	++	++	+	—
	两步 RT-PCR	++	++	++	+	+
CBPV	一步 RT-PCR	++	++	++	+	+
	两步 RT-PCR	++	++	++	+	+

“+”代表阳性；“—”代表阴性。“+”：Positive；“—”：Negative.

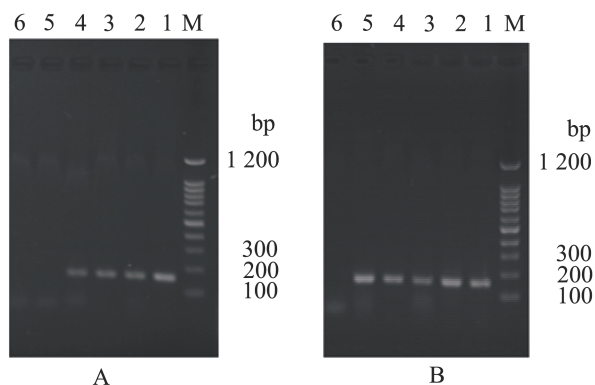


图 2 两种方法检测 IAPV

Fig. 2 Amplification of IAPV by one step RT-PCR and two step RT-PCR

A：一步法；B：两步法。

A: One step RT-PCR; B: Two step RT-PCR.

1: 100 bp DNA marker; 2~8: RNA 分别稀释 10⁰ 倍、10¹ 倍、10² 倍、10³ 倍、10⁴ 倍、10⁵ 倍。下图同。

1: 100 bp DNA marker; 2~8: RNA were diluted 10⁰ times、10¹ times、10² times、10³ times、10⁴ times、10⁵ times

The same with Fig. 3.

一步法 RT-PCR 的反转录和 PCR 反应可在一个管中完成，与两步法 RT-PCR 相比，能够避免多次取样造成的污染，而且会缩短反应的时间，更快速、简便。但是从灵敏度检测实验可看

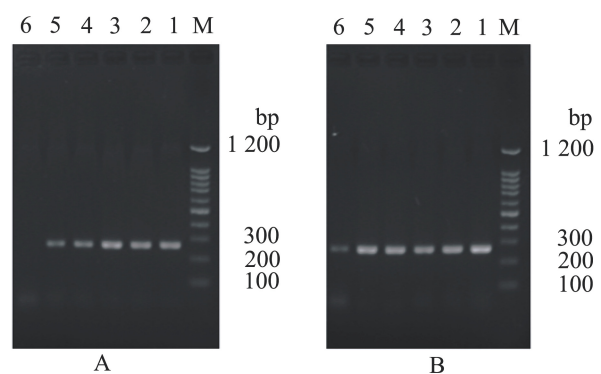


图 3 两种方法检测 DWV

Fig. 3 Amplification of DWV by one step RT-PCR and two step RT-PCR

A：一步法；B：两步法。

A: One step RT-PCR; B: Two step RT-PCR.

出，其灵敏度比两步法 RT-PCR 低。

越来越多的研究证明，现今蜂群中的病毒感染多呈现为混合感染 (Ellis and Munn, 2005; Sguazza *et al.*, 2013)，因而，许多学者致力于将能够在同一 PCR 体系中对多种病毒进行检测的多重 RT-PCR 技术应用于蜜蜂病毒病的检测中。Sguazza 等 (2013) 建立了能够同时对本研究中的 6 种病毒进行检测的多重 RT-PCR 技术；

Carletto 等 (2010) 建立了应用 4 种多重 PCR 技术对包括 7 种病毒在内的 14 种病原体进行检测; Grabensteiner 等 (2007) 建立了能够对 SBV、ABPV 和 BQCV 的多重 RT-PCR 技术。但这些多重 RT-PCR 技术均为两步法 RT-PCR, 而一步法多重 RT-PCR 技术还未见应用于蜜蜂病毒病的诊断的报道。随着分子生物学技术的发展, 一步法 RT-PCR 技术经不断改进, 提高其反应的灵敏度, 建立更加快速、简捷一步法多重 RT-PCR 的诊断方法, 应用于生产实践中, 将对蜜蜂病毒病的检测和早期监测具有重要作用。

参考文献 (References)

- Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, Deshpande SV, McCubbin PE, Seccomb RA, Welch PM, Williams T, Firth DR, Skowronski E, Lehmann MM, Bilimoria SL, Gress J, Wanner KW, Cramer RA, 2010. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS ONE*, 5(10): e13181.
- Carletto J, Gauthier A, Regnault J, Blanchard P, Schurr F, Ribière-Chabert M, 2010. Detection of main honey bee pathogens by multiplex PCR. *Euro Reference*, 4: 13–15.
- Chen YP, Siede R, 2007. Honey bee viruses. *Advances in Virus Research*, 70: 33–80.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes E, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briesse T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, van Engelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848): 283–287.
- Ellis JD, Munn PA, 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 86(4): 88–101.
- Grabensteiner E, Bokonyi T, Ritter W, Pechhacker H, Nowotny N, 2007. Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): acute bee paralysis virus, black queen cell virus and Sacbrood virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3): 222–225.
- Jia HR, Liu JZ, Wang X, Wu YY, Zhou T, 2014. Occurrence and prevalence of six bee viruses in Beijing. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(3): 772–780. [贾慧茹, 刘进祖, 王星, 吴艳艳, 周婷, 2014. 北京地区六种蜜蜂病毒病的流行病学研究. 应用昆虫学报, 51(3): 772–780.]
- Sguazza GH, Reynaldi FJ, Galosi CM, 2013. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, 194(1/2): 102–106.
- van Engelsdorp D, Meixner MD, 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.*, 103(1): 80–95.
- Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2003. Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein gene from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(1): 115–124.
- Zhang X, Chen YP, He SY, 2012. A review of bee virology progress. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1095–1116. [张炫, 陈彦平, 和绍禹, 2012. 蜜蜂病毒学研究进展. 应用昆虫学报, 49(5): 1095–1116.]