

SYBR Green 实时荧光 PCR 快速鉴定枣实蝇技术

程晓甜¹, 阿地力·沙塔尔^{1, 2}, 张伟³

(1 北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室 北京 100083; 2 新疆农业大学林学与园艺学院, 乌鲁木齐 830052; 3 新疆出入境检验检疫局技术中心 830083;)

摘要: 本文应用SYBR Green实时荧光PCR技术, 建立了SYBR Green实时荧光PCR快速鉴定枣实蝇的方法。利用枣实蝇mtDNA COI基因序列, 设计筛选出1对种的特异引物CarF/CarR。引物的特异性分别用桔小实蝇、瓜实蝇、南瓜实蝇、番石榴实蝇和桃果实蝇等5种实蝇来验证。实时荧光PCR反应的产物扩增曲线分析得出枣实蝇产生了特异性反应, 而其它实蝇样品和水空白对照没有特异性PCR扩增。实时荧光PCR反应的产物熔解曲线分析结果显示: 所有样品中只有枣实蝇样品出现产物峰($T_m=75.5^{\circ}\text{C}$); 同时PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果进一步验证了PCR反应的特异性, 在205bp处枣实蝇样品有一条扩增电泳带, 而其它5种实蝇样品和水对照则没有。SYBR Green PCR实时荧光反应的灵敏度用40ng, 20ng, 10ng, 1ng, 0.1ng, 0.01ng, 0.001ng等7个不同浓度系列枣实蝇DNA模板用来检测。SYBR Green PCR的检测限度达1pg以下, 最适模板DNA浓度为1~20ng。SYBR Green实时荧光PCR的可靠性可用枣实蝇不同虫态(幼虫、蛹、成虫)的扩增曲线、熔解曲线及PCR产物的琼脂糖凝胶电泳来检验。成虫、幼虫和蛹等3种不同虫态的枣实蝇有一致的扩增曲线, 熔解曲线分析和琼脂糖凝胶电泳分别用来确认实时荧光PCR产物的特异性。其平均熔解温度为 $75.3^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, 并获得1段长为205bp的特异性目标片段, 说明在枣实蝇成虫为模板的基础上建立的SYBR Green实时荧光PCR方法同时适用于幼虫、蛹的快速鉴定。说明不同虫态的枣实蝇均能够与近似种类区分开来。本研究建立的分子生物学方法不仅能鉴定枣实蝇的成虫而且能快速鉴定幼虫、蛹和卵等虫态, 使枣实蝇的鉴定周期从传统的形态学鉴定所需20天时间缩短到4个小时以内, 在植物检疫检疫性枣实蝇的日常鉴定中有极大的优势。该研究搭建了出入境植物检疫性害虫分子生物学鉴定的技术平台, 为检疫性害虫枣实蝇的检疫提供了一种新的方法, 同时为逐步建立昆虫的分子鉴定体系奠定了基础。

关键词: 枣实蝇; SYBR Green; 实时荧光PCR; 熔解曲线; 鉴定

Rapid identification of *Carpomya vesuviana* Costa by real-time PCR using SYBR Green chemistry

Cheng Xiaotian², Adili Shataer^{1,2}, Zhang Wei³,

(1. Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. College of Forestry & Horticulture, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China; 3. Xing Jiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi 830083)

Abstract: The technique of a real-time PCR using SYBR Green I dye was introduced in this study. We had developed a SYBR Green real-time PCR to rapidly identify *Carpomya vesuviana* Costa. BIOER FQD-48A sequence detection system. A *Carpomya vesuviana* Costa specific PCR primers set was obtained based on mtDNA COI gene of *Carpomya vesuviana* Costa. Five Bactrocera fruit flies, *B. dorsalis*, *B. cucurbitae*, *B. tau*, *B. correcta* and *B. zonata* were used to determine the specificity of primers set CarF/CarR. Real-time PCR curve analysis of *Carpomya vesuviana* Costa produced the specific reaction, while the other fruit fly samples and water without specific amplification. Melting curve analysis (MCA) of real-time PCR reaction product showed that only of *Carpomya vesuviana* Costa product peak $T_m=75.5^\circ\text{C}$. At the same time, agarose gel electrophoresis (AGE) further validated the specificity of the PCR reaction: in a 205bp length fragment target was amplified respectively, while the other five kinds of fruit fly samples and water controls are not. A series of genomic DNA dilution of *Carpomya vesuviana* Costa, 0ng, 20ng, 10ng, 1ng, 0.1ng, 0.01ng, 0.001ng, were used to detect the sensitivity of SYBR Green PCR. The template DNA concentration was one of the sources of variability in cycle threshold values (CT) and the optimum DNA concentration was between 1ng and 20ng in SYBR Green PCR. The template DNA isolated from the larva, pupa and adult specimens of *Carpomya vesuviana* Costa respectively were used to detect the reliability of SYBR Green PCR. Melting curve analysis (MCA) and agarose gel electrophoresis (AGE) was followed to confirm the specificity reliability of PCR products, respectively. The results showed the similar amplification plots were gotten in three different stages of *Carpomya vesuviana* Costa. The average melting temperature (T_m) of the PCR product from *B. latifrons* was $75.3^\circ\text{C}\pm 0.1^\circ\text{C}$. And a 205bp length fragment target was amplified respectively. Except for the adult of fruit flies, the molecular techniques established in this study can also rapidly identify the larvae, pupae and eggs stages. The set techniques were cut off the period of fruit fly identification from more than 20d by morphological characters to within 4h molecular techniques, which showed great advantage in routine quarantine practice. This study was successfully to establish the molecular detection platform for plant quarantine pests, and constructed the foundation for further research.

Key words: *Carpomya vesuviana* Costa; SYBR Green; real-time PCR; melting curve; rapid identification

枣实蝇 *Carpomya vesuviana* Costa 是我国 2007 年新增补的进境植物检疫性有害生物, 枣实蝇的入侵可能对我国枣产业生产构成毁灭性危害, 枣实蝇目前主要分布在意大利、高加索、毛里求斯、巴基斯坦、泰国、阿富汗等国家, 在中国仅分布在新疆的吐鲁番地区, 且疫情有

向其它地区扩散的趋势^[1-2]。在口岸检疫中截获的枣实蝇以幼虫和蛹等虫态为主,然而,实蝇类害虫的种的鉴定主要依据成虫的形态特征,因此依据形态学鉴定方法很难保证鉴定的准确度。即使枣实蝇的幼虫能依据形态学进行鉴定,但很大程度上依赖鉴定人员丰富的鉴定经验,这就制约了不同地区相关工作的进一步开展。通常在口岸检疫中截获的枣实蝇的幼虫和蛹要将其培养到成虫再进行鉴定,整个检疫鉴定过程时间长达数周,无法适应实际工作需要。显然,仅仅依靠形态学分析进行枣实蝇的鉴定研究,不能与日益增长的水果蔬菜贸易发展相协调,从而造成检疫和防控工作具有相当大的困难。因此,非常有必要研究枣实蝇快速鉴定的新方法,特别是枣实蝇幼虫、蛹等未成熟虫态的快速鉴定方法。近些年来,AFLP 和 RFLP 等分子诊断技术已先后应用于实蝇的分类鉴定^[3~7]。

SYBR Green 实时荧光 PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入过量的 SYBR Green 荧光染料,在 PCR 每个循环结束时,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 反应的进程。SYBR Green 是一种小分子 DNA 染料,游离时不会发射任何荧光信号,但当与双链 DNA(dsDNA)特异地结合时,荧光染料掺入 DNA 双链,发射出强烈的荧光信号^[8]。同时 PCR 产物的特异性可以用溶解曲线分析作进一步的确认。近年来,SYBR Green 实时荧光 PCR 技术已广泛应用于科学研究和医学临床诊断分析^[9~11]。余道坚等 2005 分别建立了 SYBR Green 实时荧光 PCR 鉴定辣椒实蝇 *Bactrocera latifrons*、地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、杨桃实蝇 *B.carambolae*、番石榴实蝇 *B.correcta*、桔小实蝇 *B.dorsalis*、芒果实蝇 *B.oc cipitalis*、木瓜实蝇 *B.papayae*、菲律宾实蝇 *B.philippinensis*、瓜实蝇 *B.cucurbitae* 和南瓜实蝇 *B.tau* 的方法^[12]。然而,自从枣实蝇发生以来,除了形态学鉴定之外,目前国内外还没有一套枣实蝇 SYBR Green 实时荧光 PCR 鉴定技术。

本研究应用 SYBR Green 实时荧光 PCR 技术,建立了 SYBR Green 实时荧光 PCR 快速鉴定枣实蝇的方法。利用枣实蝇 mtDNA COI 基因序列,筛选出种特异引物 CarF/CarR。引物的特异性分别用桔小实蝇、瓜实蝇、南瓜实蝇、番石榴实蝇和桃果实蝇等 5 种果实蝇来验证。并分别从引物特异性验证、SYBR Green 实时荧光 PCR 反应的灵敏度和在枣实蝇幼虫、蛹的快速鉴定上的应用等三个方面进行研究,实时荧光 PCR 产物的特异性通过溶解曲线分析和琼脂糖凝胶电泳来验证,从而建立 SYBR Green 实时荧光 PCR 快速鉴定枣实蝇方法。该技术打破了常规仅仅依靠形态学鉴定枣实蝇的方法,而是建立了从分子方面快速检测枣实蝇的技术,为检疫性害虫枣实蝇的检疫提供了一种新的方法。本研究建立的分子生物学方法不仅能鉴定实蝇的成虫而且能快速鉴定幼虫、蛹和卵等虫态,使实蝇的鉴定周期从传统的形态学鉴定所需

20天时间缩短到4个小时以内，在植物检疫检疫性实蝇的日常鉴定中有极大的优势。本研究搭建了出入境植物检疫性害虫分子生物学鉴定的技术平台，为逐步建立昆虫的分子鉴定体系奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

枣实蝇(幼虫、蛹和成虫):采自新疆吐鲁番。桔小实蝇、瓜实蝇、南瓜实蝇、番石榴实蝇、桃果实蝇为成虫,由新疆出入境检验检疫局提供。所有实验材料都是经专家鉴定的新鲜标本。用于分子生物实验的实蝇标本用100%酒精浸泡并保存于4℃冰箱。本实验所有的PCR反应试剂购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。所用荧光PCR仪型号为BIOER FQD-48A。

1.2 供试试剂

动物组织基因组DNA提取试剂盒、2×SYBR Green MasterMix、琼脂糖、EB、DL2000DNA Marker均购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。设计的引物交至北京华大中生科技发展有限公司负责合成。

1.3 主要仪器

高速冷冻离心机(CF16R×II型)、荧光定量PCR检测仪(BIOER FQD-48A)(杭州博日科技有限公司)、多功能电泳仪、数字图像分析仪(Alpha220V型)、超微量紫外分光光度计(Thermo NANODROP 1000)、全自动高压灭菌仪、金属浴(HB-1000)(杭州博日科技有限公司)、超低温冰箱。

1.4 试验方法

1.4.1 基因组DNA和测序

实蝇基因组DNA采用动物组织基因组DNA提取试剂盒提取。DNA浓度通过超微量紫外分光光度计(Thermo NANODROP 1000)测定的OD260值来换算得到。引物Uea7/Uea10[12]用来PCR扩增实蝇COI基因约670bp的片段和DNA序列分析。PCR反应在BIOER FQD-48A 荧光定量PCR检测系统上进行,反应条件:预变性94℃ 5min;95℃ 40s, 48℃ 30s, 72℃ 1min,重复35个循环;72℃ 7min。测序交至北京华大中生科技发展有限公司,每个样品上下游引物各测1次,序列用seqman软件拼接。

1.4.2 引物设计

以枣实蝇线粒体DNA(mtDNA)中COI基因部分序列(GenBank序列号:HQ687210)为目标

序列, Mega4软件(DNASTAR公司, 美国)中CLUSTAL方法, 与已知其它种类的实蝇的COI基因序列(包括本研究和其它公开报道的序列)进行比较分析, 人工设计引物, 引物用primer5软件检查引物错配、二聚体和发夹结构, 并用GenBank中提供的Blast程序检查同源序列[13]。

1.4.3 SYBR Green 实时荧光 PCR

SYBR Green实时荧光PCR扩增反应在BIOER FQD-48A 荧光定量PCR检测仪的48孔板上进行,PCR反应总体为50 μ L,其中25 μ L 2 \times SYBR Green MasterMix,上下游引物(10pmol)各0.5 μ L,模板DNA 1 μ L(\approx 20ng),去离子水23 μ L。桔小实蝇、瓜实蝇、南瓜实蝇、番石榴实蝇、桃果实蝇等口岸检疫中截获几率最高的5种果实蝇用来验证引物CarF/CarR的特异性。为确定SYBR Green实时荧光PCR反应的检测限度, 40ng,20ng,10ng,1ng,0.1ng,0.01ng 0.001ng等7个不同的浓度系列的枣实蝇成虫DNA作为模板进行试验;同时分别以枣实蝇的幼虫、蛹和成虫DNA作为模板来验证SYBR Green实时荧光PCR的稳定性,所有PCR扩增反应用水作为空白对照。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C, 10s;95 $^{\circ}$ C,15s; 55 $^{\circ}$ C,30s;35个循环,空白设两个重复。

1.4.4 熔解曲线分析

SYBR Green实时荧光PCR产物的特异性可用熔解曲线分析来确定,实时荧光PCR反应结束后,直接在BIOER FQD-48A 荧光定量PCR检测系统上再运行Melting alias程序进行熔解曲线分析,程序的反应程序:目标温度: 95 $^{\circ}$ C; 起始温度: 60 $^{\circ}$ C; 恒温时间: 20s; 采集模式: 台阶。

1.4.5 琼脂凝胶电泳分析

将实时荧光PCR产物过夜,等荧光信号散失之后,再次用琼脂糖凝胶电泳检查扩增目标片段的大小。取PCR产物5 μ L加入溴酚蓝1 μ L,在含溴化乙锭的1.5%琼脂凝胶上电泳分离,凝胶图像分析仪上检查结果。

1.4.6 数据分析

在SYBR Green实时荧光PCR扩增反应中,原始数据由SDS软件(Version 1.7)自动收集。CT值是指荧光值开始达到指数增长时的循环数。数据以EXCEL工作表形式导出,在PC机上作出扩增曲线图(荧光值 R_n Vs循环数)。在熔解曲线分析程序中,在PCR产物缓慢从60 $^{\circ}$ C增至95 $^{\circ}$ C的同时,荧光信号持续被仪器收集,荧光值数据由熔解软件(Version 1.0)转换成熔解曲线图($F_{vs}T$)和熔解峰值曲线($-dF/dT_{vs} T$)[11]。

2.结果分析

2.1 引物 AF/AR 特异性验证

SYBR Green实时荧光PCR反应扩增曲线(图1:A)显示了6种实蝇样品随反应循环数的增

加,荧光值的变化关系,当PCR反应开始之初,SYBR GreenI荧光染料信号很弱, ΔRn 未超过仪器设定的基值,所有样品的图形十分一致[12]。到15个循环以后,荧光信号出现分化,枣实蝇样品出现荧光信号的强烈增加,扩增曲线到达指数增长期,CT值为16,说明枣实蝇产生了特异性反应,PCR产物开始急剧增加,而其它实蝇样品和水空白对照没有特异性PCR扩增.实时荧光PCR反应的产物熔解曲线分析结果显示:所有样品中只有枣实蝇样品出现产物峰($T_m=75.5^{\circ}C$)(图1:B);同时PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果进一步验证了PCR反应的特异性,在205bp处,枣实蝇样品有一条扩增电泳带,而其它6种实蝇样品和水对照则没有(图1:C)

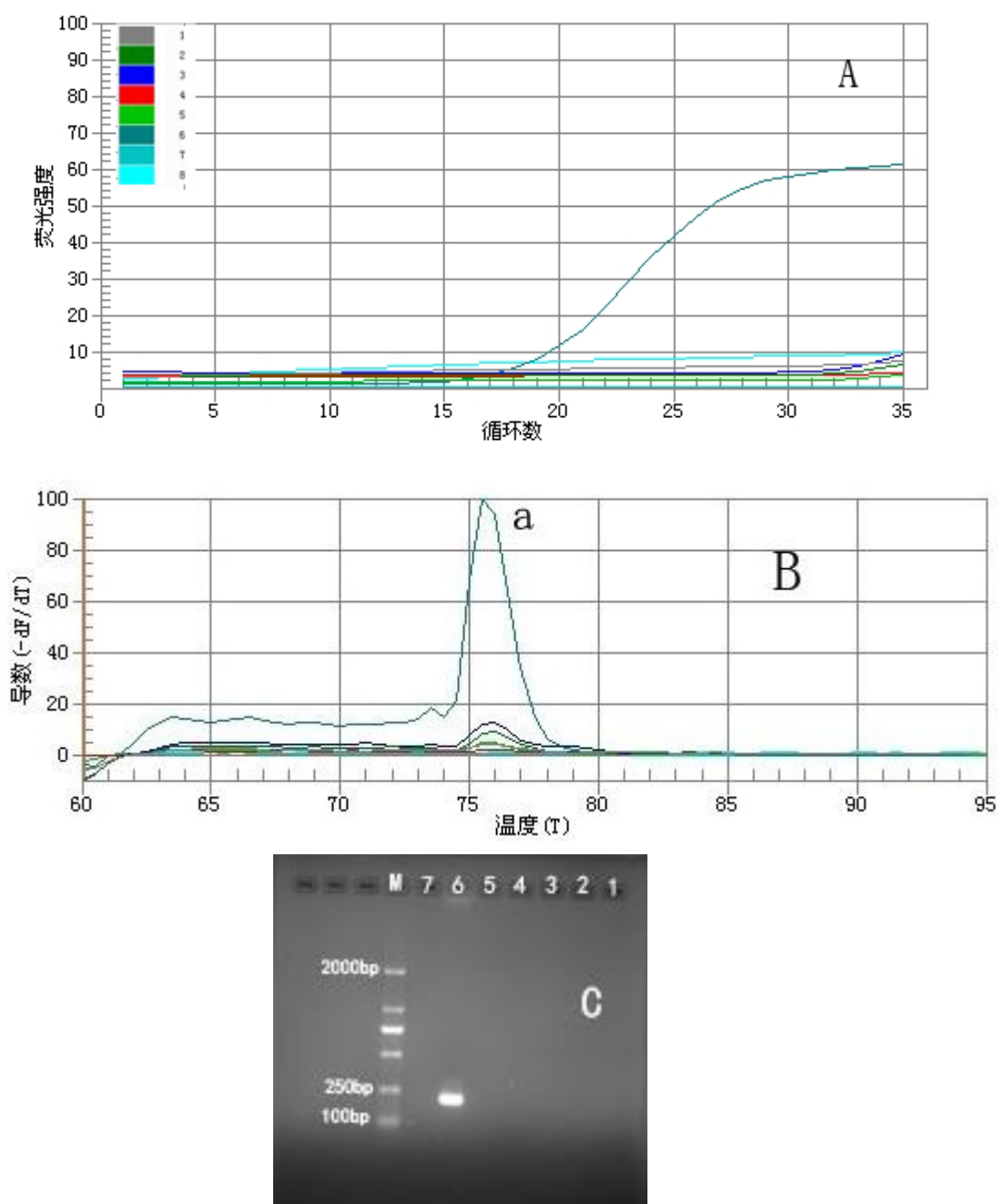
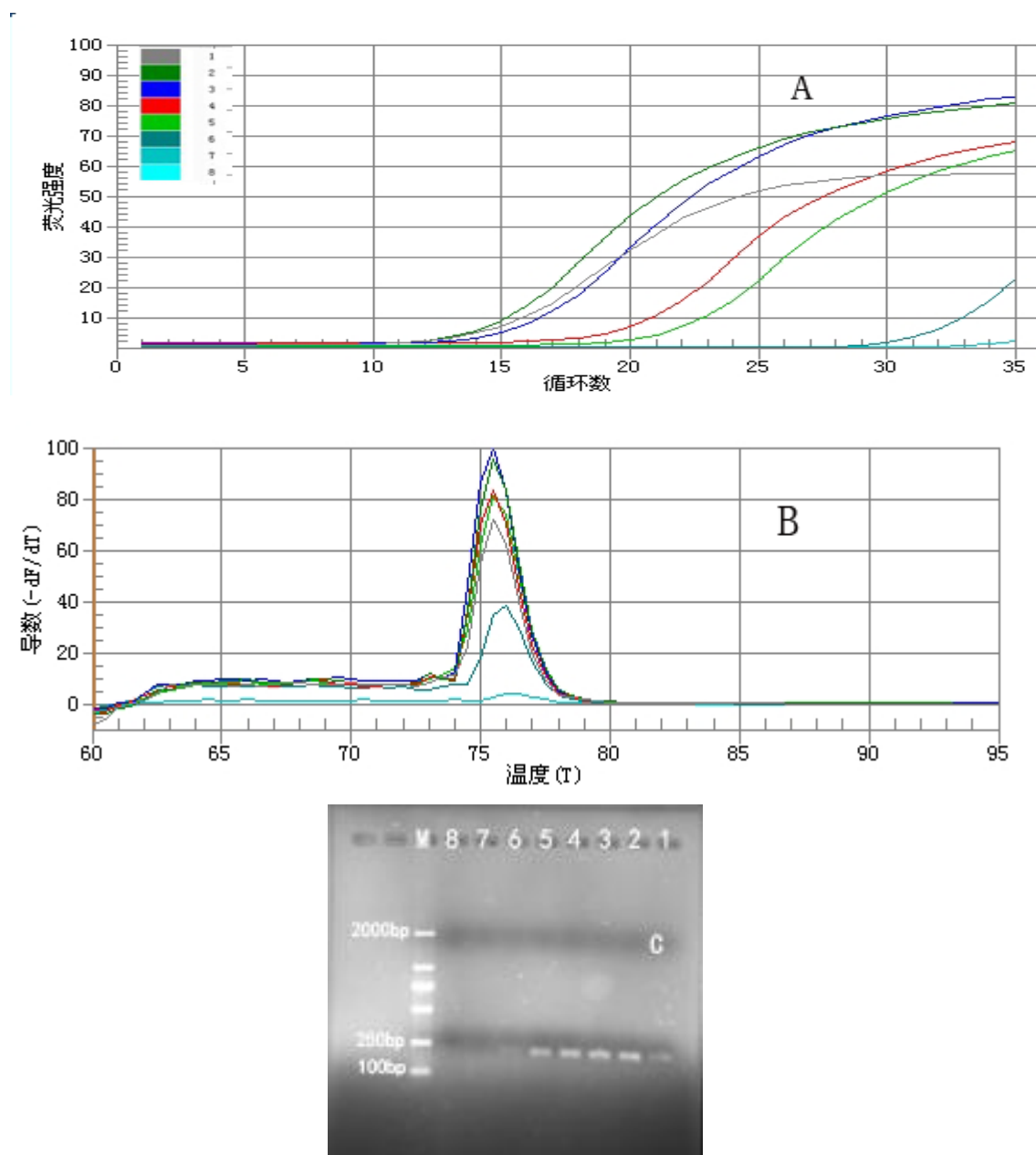


图1 PCR 仪上引物 CarF/CarR 的特异性验证

A. SYBR Green 实时荧光 PCR 扩增曲线;B.实时荧光 PCR 后的熔解曲线分析;a.枣实蝇的峰值;C.PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果,泳道 1~8:橘小实蝇、桃果实蝇、番石榴实蝇、瓜实蝇、南瓜实蝇、枣实蝇、阴性对照、阴性对照; M:DL2000 DNA Marker

2.2 SYBR Green 实时荧光 PCR 检测灵敏度

分别用辣椒实蝇成虫 7 个不同浓度的模板 DNA 用来确定 SYBR Green 实时荧光 PCR 的检测灵敏度。实验结果显示,所有辣椒实蝇样品均扩增,CT 值与 DNA 模板浓度有关,模板浓度为 40ng,20ng,10ng,1ng,0.1ng,0.01ng, 0.001ng 时,CT 值分别为 9.36,10.34, 10.77, 15.22,17.06, 29。在 50 μ L 反应体系下,SYBR Green 实时荧光 PCR 的检测限度可达 10pg 以下,模板 DNA 最适浓度为 1ng~20ng。所有扩增的 PCR 产物均在预期的熔点处有相同的熔解曲线峰。如图 2

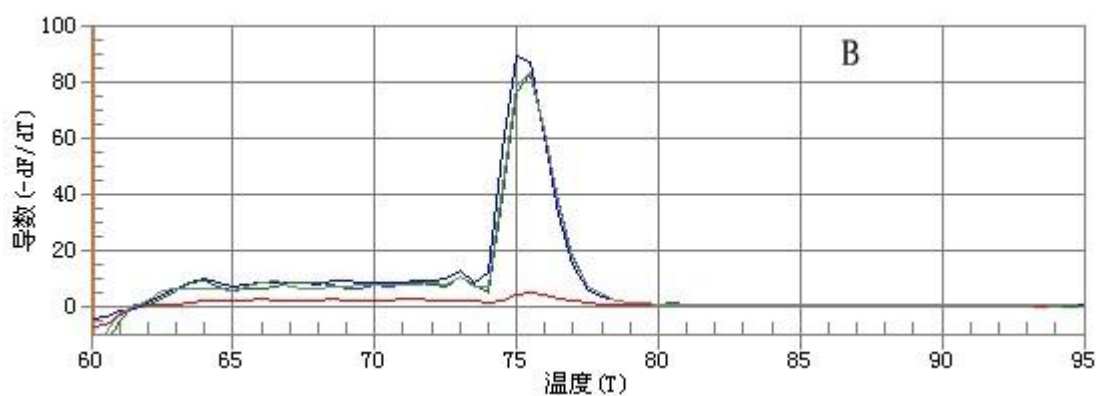
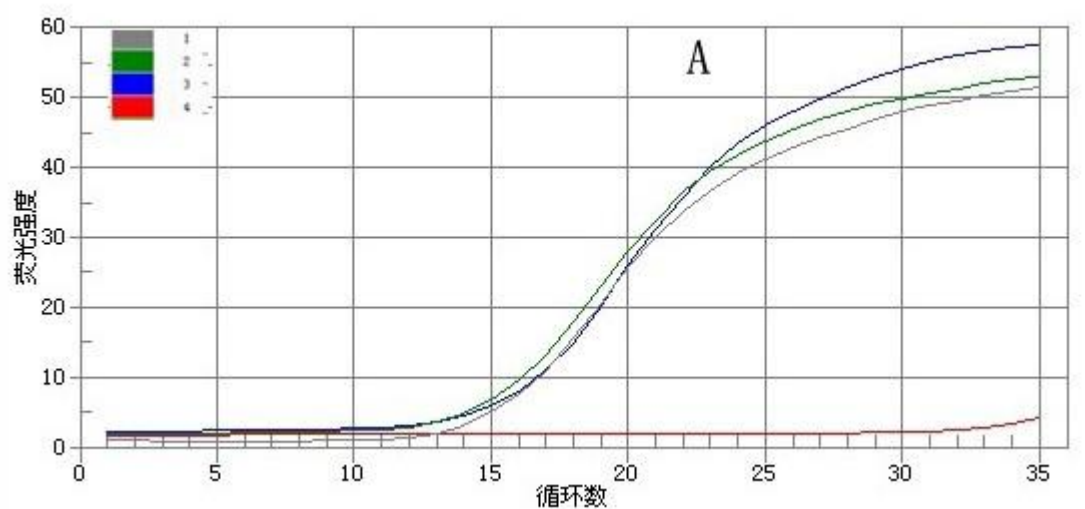


A.SYBR Green 实时荧光不同浓度的模板 DNAPCR 扩增曲线;B.实时荧光 PCR 后的熔解曲线分析;C.PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

1~8: 46ng,23ng,10ng,1ng,0.1ng,0.01ng 0.001ng 阴性对照、M:DL2000 DNAMarker

2.3 SYBR Green 实时荧光 PCR 的可靠性

SYBR Green 实时荧光 PCR 的可靠性可用枣实蝇不同虫态（幼虫、蛹、成虫）的扩增曲线、熔解曲线及 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳来检验。图 2:A 表明:枣实蝇的 3 种虫态均能扩增, CT 值分别是 10.79, 10.56 和 11.21,而阴性对照没有扩增反应。枣实蝇成虫、幼虫和蛹的熔解曲线完全一致,均只有单一产物峰,熔点分别为 75.5°C, 75.5°C和 75°C(图 2:B),平均 75.3°C $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 。上述实验说明了在以枣实蝇成虫 DNA 为模板基础上建立的 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法同样适用于幼虫和蛹的种类鉴定。



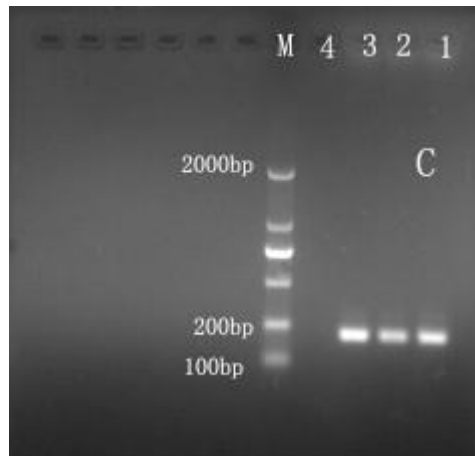


图2 枣实蝇不同虫态下的 SYBR Green 实时荧光 PCR 特异性检测

A. 实时荧光 PCR 扩增曲线;B.PCR 产物的熔解曲线分析 C PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果.
1:幼虫;2: 蛹;3: 成虫;4: 阴性对照

3.小结与讨论

SYBR Green 荧光染料能与所有的 DNA 双链相结合,不必因模板不同而特别定制,试验设计简单,成本低廉,可用于多种目标基因的检测.通过熔解曲线分析可以识别扩增产物和引物二聚体,因而可以区分非特异扩增【13-14】.与常规 PCR 相比 SYBR Green 实时荧光 PCR 具有灵敏度高、特异性更强、自动化程度高和有效解决 PCR 污染问题等优点,其扩增反应灵敏度较常规 PCR 高,更为重要的是因不需凝胶电泳检查结果,避免了溴化乙锭(EB)对环境和人体的危害. SYBR Green 实时荧光 PCR 与另一种应用于医学基因诊断、环境微生物和动植物病原真菌、细菌、病毒、转基因成分的检测等领域中的 TagMan 探针实时荧光 PCR 技术相比较,因后者在普通 PCR 原有的一对引物基础上,增加了一条特异性的荧光双标记探针,可将非特异性产物区分开(易建平 2005; Weller et al .20 01;)[15-16],因此虽然 SYBR Green 实时荧光 PCR 的特异性不如 TagMan 探针实时荧光 PCR,但是溶解曲线分析技术能有效地区分特异性 PCR 产物,较好地克服特异性这一缺陷.由于检疫性实蝇种类很多,相对昂贵的 TagMan 探针, SYBR Green 实时荧光 PCR 不需要合成探针,成本低廉,具广谱性,因此该方法更适用于枣实蝇的快速鉴定。

该技术是国内外首次建立的枣实蝇快速检测技术;首次筛选出枣实蝇种的特异性引物,而且六大优点于一体——方便,适用,准确,快速,便宜,灵敏.其最大的优点是将以往长达数周的鉴定缩短到四个小时,结果分析更加快捷方便,而且不受虫态的限制——四个虫态皆可(枣实蝇卵、幼虫、蛹、成虫).该技术可快速准确地鉴定枣实蝇,为检疫性害虫枣实蝇的检疫提供了一种新的方法。

参考文献:

- [1] 张润志,汪兴鉴,阿地力·沙塔尔.检疫性害虫枣实蝇的鉴定与入侵威胁 [J].昆虫知识,2007,44(6):928~930.
- [2]中华人民共和国农业部公告第 862 号 [EB/OL].(2007-05-29)[2009-05-15].
http://www.agr.gov.cn/blgg/t20070604_827310.htm.
- [3]吴佳教,胡学难,赵菊鹏等.9种检疫性实蝇PCR-RFLP快速鉴定研究.植物检疫, 2005,19(1):2~6
- [4]Naeole C K M,HaymerD S.Use of oligonucleotide arrays for molecular taxonomic studies of closely related species in the oriental fruit fly(*Bactrocera dorsalis*)complex. Molecular Ecology Notes ,2003,3 (4):662~66
- [5]Muraji M, Nakahara S. Discrimination among pest species of *Bactrocera*(Diptera, Tephritidae) based on PCR-RFLP of the mitochondrial DNA.Applied Entomology and Zoology, 2002,37 (3) :437~446
- [6]Armstrong K F, Cameron C M, Frampton E R. Fruit fly (Diptera:Tephritidae) species identification: a rapid diagnostic technique for quarantine application. Bulletin of Entomological Research, 1997,87(2):111~118
- [7]Nakahara S, Kato HM, Kaneda T Sugimoto et al. Identification of the *Bactrocera dorsalis* Complex(Diptera: Tephritidae) by PCR-RFLP Analysis. III. Discrimination between *B. philippinensis* and *B. occipitalis*. Res Bull Pl Prot Japan,2002,38 (4) :73~80
- [8]Giulietti A, Overbergh L, Valckx D et al.. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression.Methods, 2001,25(4):386~401
- [9]Ponchel F, Toomes C, Bransfield K et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. BMC Biotech 2003,3,18
- [10]Giolio S, Monis PT & Saint CP. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR.Nucleic Acids Research, 2003, 31 (22): 136 -137
- [11]Tanriverdi S, Tanyeli A, Baslamish F et al. Detection and Genotyping of Oocysts of *Cryptosporidium parvum* by Real-Time PCR and Melting Curve Analysis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002,40(9):3237~3244
- [12] 余坚道.检疫性实蝇分子生物学快速鉴定技术的研究 [D].上海:中国科学院上海生命科学研究院,2005.
- [13] 余道坚; 章桂明; 陈志彝等. SYBR Green 实时荧光 PCR 快速鉴定辣椒实蝇. 植物检疫. 2006. 20(1) :10~14
- [14] 刘建越,邓欣,康林等. SYBR-Green 实时荧光 PCR 检测转基因番木瓜. 湖南农业大学学报(自然科学版). 2006.32(4):371~374
- [15]易建平,刘素萍,印丽萍等. TaqMan-MGB探针在小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑穗病菌鉴定上的应用. 植物检疫,2005,19(1):15~19
- [16] Moody A, Sellers S & Bumstead N. Measuring infectious bursal disease virus RNA in blood by multiplex real-time quantitative RT-PCR.Virol.Methods,2000,85(3):55 ~64.