

应用三重 RT-PCR 技术检测三种马铃薯病毒

张威¹, 白艳菊^{1*}, 范国权¹, 高艳玲¹, 申宇¹, 张抒¹, 孟宪欣²

(1. 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086;

2. 黑龙江省农业科学院作物育种研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 M 病毒(PVM)和马铃薯 A 病毒(PVA)是导致马铃薯种薯退化的重要病毒, 有时复合侵染, 因此建立快速、准确检测体系尤为重要。试验从中、英文文献中查找引物, 通过筛选和综合评价, 每种病毒确定 1 对特异性引物, 再通过对 PCR 部分 Mg²⁺、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶浓度梯度优化, 最终建立了稳定的三重 RT-PCR 反应体系, 得到长度分别为 711、520、273 bp 的特异性条带。应用该体系和 DAS-ELISA 方法同时对田间 150 份马铃薯毒源样品进行检测, 两种方法检测结果吻合, 三重 RT-PCR 体系的灵敏度更高、特异性更强, 可以用于马铃薯田间样品检测。

关键词: 三重 RT-PCR; 马铃薯; PVX; PVM; PVA; 检测

Apply Triplex RT-PCR Technology to Detect Three Potato Viruses

ZHANG Wei¹, BAI Yanju^{1*}, FAN Guoquan¹, GAO Yanling¹, SHEN Yu¹, ZHANG Shu¹, MENG Xianxin²

(1. Institute of Virus-free Seedling Research, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

2. Institute of Crop Breeding, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: Potato virus X (PVX), potato virus M (PVM) and potato virus A (PVA) are important viruses which can cause potato seed degeneration and sometimes complex infection. Therefore, it is very important to establish a fast and exact detection system. In this research, specific primer for each virus was identified by reading both Chinese and English literatures, and evaluation and selection. Then, a stable RT-PCR reaction system was established through optimized density of Mg²⁺, dNTPs and *Taq* DNA polymerase and the expected fragments of 711 bp (PVX), 520 bp (PVM) and 273 bp (PVA) were successfully amplified. This system and DAS-ELISA method were simultaneously used to detect 150 potato field samples, and the results were the same. The triplex RT-PCR system is more sensitive and specific, and could be used to detect potato field samples.

Key Words: triplex RT-PCR; potato; PVX; PVM; PVA; detection

中国各马铃薯主产区均有病毒病的发生^[1-5], 目前, 已报道的侵染马铃薯的病毒及类病毒有 40 余种^[6,7], 但发生率较高、危害较严重的病毒只有几种, 如马铃薯卷叶病毒(Potato leaf roll virus, PLRV)、马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY)、马

铃薯 S 病毒(Potato virus S, PVS)、马铃薯 X 病毒(Potato virus X, PVX)、马铃薯 M 病毒(Potato virus M, PVM)和马铃薯 A 病毒(Potato virus A, PVA)^[8], 它们广泛分布于各马铃薯种植区, 在田间经常复合侵染, 导致马铃薯产量降低、品质下降^[9]。

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(C201234); 黑龙江省农业科技创新工程重点资助项目(2012ZD015); 现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-10-P14); 国家科技支撑项目(2012BAD06B02-02C2)。

作者简介: 张威(1981-), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向为分子植物病理学。

*通信作者(Corresponding author): 白艳菊, 研究员, 研究方向为分子植物病理学, E-mail: yanjubai@163.com。

目前,主要使用马铃薯脱毒种薯来降低病毒病的发生比率,为保障种薯质量,病毒检测应贯穿于整个脱毒种薯的生产过程,为了能准确、高效、特异性强地检测多种病毒,需要建立经济、高效的多重RT-PCR分子检测体系,以保障马铃薯脱毒种薯的质量。

本研究通过对PVX、PVM和PVA多对引物的综合评价与筛选,再通过对PCR部分各试剂用量进行优化,最终建立了这三种病毒的重重RT-PCR检测体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 毒源材料

毒源材料于2012~2014年分别采自内蒙古、黑龙江、甘肃等马铃薯主产区。应用血清学DAS-ELISA方法检测有PVX、PVM和PVA的样品于-20℃保存备用。健康植株(阴性对照)和病毒阳性对照由黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所提供。

1.1.2 试验试剂

Trizol购自Invitrogen公司;M-MLV反转录酶

购自Promega公司;RNA酶抑制剂、dNTPs、TaqDNA聚合酶、pMD18-T购自TaKaRa公司;B型小量DNA片段快速回收试剂盒和B型质粒小样快速提取试剂盒均购自北京博大泰克生物基因技术有限公司;大肠杆菌*Escherichia coli* GM109由本实验室保存;其他药品为国产分析纯;引物合成及序列测定委托北京赛百盛公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 引物的筛选

从中、英文文献中查找多对引物,分别筛选出在CP保守区的引物,然后用Primer Premier 5.0软件进行评价,再对每种病毒的多对引物进行单重RT-PCR扩增,筛选出扩增效果好的引物。再筛选PVX、PVM和PVA引物 T_m 值较一致且兼容性较好、同时三重RT-PCR体系目的条带能有效区分开的引物,最终每种病毒筛选一对特异性引物(表1)。

1.2.2 总RNA提取

分别称取0.05~0.10g感病植株和健康植株的叶片,按照Trizol使用说明书提取总RNA。沉淀溶解

表1 病毒特异性引物

Table 1 Specific primers of viruses

病毒 Virus	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	PCR扩增片段长度(bp) Fragment length of PCR amplification
PVX ^[10]	PVX-F	ATGTCAGCACCAGCTAGCA	711
	PVX-R	TGGTGGTGGTAGAGTGACAA	
PVM ^[11]	PVM-F	ACATCTGAGGACATGATGCGC	520
	PVM-R	TGAGCTCGGGACCATTTCATAC	
PVA	PVA-F	GATGTCGATTTAGGTACTGCTG	273
	PVA-R	TCCATTCTCAATGCACCATAC	

注:PVA引物由加拿大食品检验机构的徐慧民老师提供。

Note: The primer of PVA was provided by Huimin Xu from Canadian Food Inspection Agency.

于40 μL经DEPC处理的ddH₂O中,即得到总RNA,-70℃保存备用。

1.2.3 单重RT-PCR

反转录体系:取2.5 μL RNA,65℃8 min预变性,冰上放置2 min;再加入5×RT buffer 1 μL,dNTPs(各2.5 mmol/L)1 μL,下游引物(100 ng/μL)0.5 μL,RNase Inhibitor 5 U,M-MLV反转录酶100 U,用ddH₂O补足至10 μL,混匀,短暂离心。反应程序:42℃反应1 h,92℃灭活2 min,-20℃保存待用。

PCR反应体系:取2 μL cDNA,再加入1.5 μL MgCl₂(25 mmol/L),10×PCR buffer 2.5 μL,dNTPs(各2.5 mmol/L)0.5 μL,上、下游引物(100 ng/μL)

各0.5 μL,TaqDNA聚合酶0.625 U,ddH₂O补足至总体积为25 μL。

PCR反应程序:92℃预变性5 min;92℃变性30 s,55.5℃退火30 s,72℃延伸45 s,循环30次;72℃延伸7 min。取5 μL PCR产物用1.4%琼脂糖凝胶电泳分析实验结果。

1.2.4 三重RT-PCR

反转录体系:取有PVX、PVM和PVA病毒的RNA 2.5 μL,65℃8 min预变性,冰上放置2 min;再加入5×RT buffer 1 μL,dNTPs(各2.5 mmol/L)1 μL,三种病毒下游引物(100 ng/μL)各0.5 μL,RNase Inhibitor 5 U,M-MLV反转录酶100 U,用

ddH₂O补足至10 μL, 混匀, 短暂离心。反应程序: 42 °C反应1 h, 92 °C灭活2 min, -20 °C保存待用。

PCR反应体系: 取cDNA 2 μL, 三种病毒上、下游引物(100 ng/μL)各0.5 μL, 加入10 × PCR buffer 2.5 μL。并对Mg²⁺、dNTPs、TaqDNA聚合酶浓度进行优化, Mg²⁺浓度在1.0~3.0 mmol/L, dNTPs浓度在0.08~0.4 mmol/L, TaqDNA聚合酶浓度在0.01~0.05 U/μL。

PCR反应程序: 92 °C预变性5 min; 92 °C变性30 s, 55.5 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 循环30次; 72 °C延伸7 min。取5 μL PCR产物经1.4%琼脂糖凝胶电泳分析比较。

1.2.5 PCR产物的克隆与序列测定

将PVX、PVM和PVA三种病毒的RT-PCR产物纯化后分别连接到pMD18-T载体上, 转化到GM109感受态细胞中, 挑取的抗性单菌落扩繁后, 试剂盒提取质粒, 再应用EcoRI和SalI对重组质粒进行酶切鉴定。目的片段进行测定, 采用DNAMAN软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 病毒总RNA质量的检测结果

为保障多重RT-PCR检测结果准确, 必须使用纯度较高、完整性较好的RNA。本试验提取的总RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在1.80~1.89范围内(表2), 表明植物组织中的酚类化合物、多糖和蛋白质等杂质已基本去除, 总RNA纯度较理想, 可用于后续研究。

在凝胶中可见28 s和18 s两条清晰的条带(图1), 说明本方法提取的总RNA未降解。

2.2 PVX、PVM和PVA三重RT-PCR检测体系的建立

分别以感染PVX、PVM和PVA病毒的马铃薯

表2 RNA的紫外吸收值

Table 2 Ultraviolet absorption value of RNA

样品编号 Sample number	OD _{260nm}	OD _{280nm}	OD _{260nm} /OD _{280nm}
1	1.385	0.759	1.82
2	3.545	1.870	1.89
3	2.578	1.401	1.84
4	1.456	0.814	1.80

注: OD_{260nm} - 260 nm处紫外吸收值; OD_{280nm} - 280 nm处紫外吸收值。

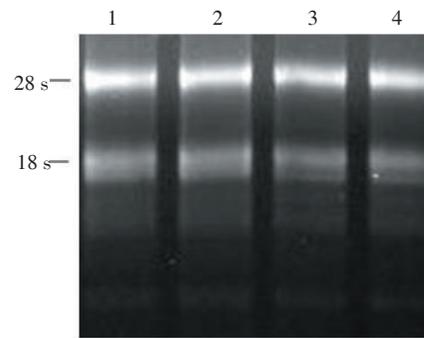
Note: OD_{260nm} - ultraviolet absorption value of 260 nm; OD_{280nm} - ultraviolet absorption value of 280 nm.

叶片总RNA为模板进行单重RT-PCR扩增, 从图2可以看出, 泳道4、3、2分别得到长度为711、520、273 bp的3条特异性条带。

以感染三种病毒的马铃薯叶片总RNA为模板, 进行三重RT-PCR扩增, 通过对Mg²⁺、dNTPs、TaqDNA聚合酶浓度梯度进行优化后, 当Mg²⁺浓度在2.6 mmol/L、dNTPs浓度在0.1 mmol/L、TaqDNA聚合酶浓度在0.03 U/μL时, 三重RT-PCR扩增效果最佳。从图2可看出, 泳道5同时扩增得到三种病毒的特异性条带, 而阴性对照无此条带。

2.3 PCR产物的序列测定与分析

将PVX、PVM和PVA病毒RT-PCR扩增产物

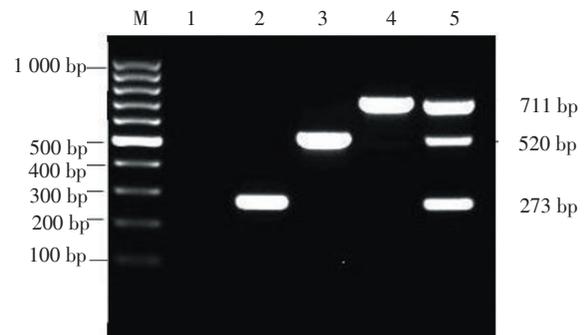


1: 1号样品; 2: 2号样品; 3: 3号样品; 4: 4号样品

1: number one sample; 2: number two sample; 3: number three sample; 4: number four sample

图1 总RNA电泳

Figure 1 Gel electrophoresis of the total RNA



M: 100 bp marker; 1: 阴性对照; 2: PVA样品; 3: PVM样品; 4: PVX样品; 5: PVX+PVM+PVA样品

M: 100 bp marker; 1: negative control; 2: sample of PVA; 3: sample of PVM; 4: sample of PVX; 5: sample of PVX+PVM+PVA

图2 PVX、PVM和PVA三重RT-PCR检测体系建立

Figure 2 Triplex RT-PCR detection system establishment of PVX, PVM and PVA

纯化后, 克隆到 pMD18-T 载体上。重组质粒的插入片段的测序结果经 DNAMAN 软件分析显示, PVX、PVM 和 PVA 扩增产物均与预期片段大小相同, 与 Genbank 上相应病毒序列同源性均在 98.7% 以上, 证明三重 RT-PCR 检测结果准确。

2.4 应用三重 RT-PCR 检测体系与 DAS-ELISA 方法同时对马铃薯田间样品进行检测

为验证三重 RT-PCR 检测体系的准确性与稳定性, 应用该检测体系与血清学 DAS-ELISA 方法对来自内蒙古、黑龙江、陕西等主产区的 150 份马铃薯田间样品进行 PVX、PVM 和 PVA 三种病毒的检测。RT-PCR 检测结果与 DAS-ELISA 吻合, 表 3 是

从中选择 13 个有代表性的样品的比较结果。

2.4.1 三重 RT-PCR 体系对马铃薯田间样品的检测结果

有代表性的 13 份马铃薯田间病叶的检测结果如图 3 所示, PVX 的检出率较高, PVA 的检出率较低, 且 5 个样品为复合感染。

2.4.2 三重 RT-PCR 与 DAS-ELISA 方法检测结果比较分析

从表 3 可以看出, 13 份样品的 RT-PCR 检测结果与 DAS-ELISA 检测结果完全吻合。从而可以看出, 本试验建立的重三重 RT-PCR 检测体系的准确性很高, 稳定性很强。

表 3 三重 RT-PCR 与 DAS-ELISA 方法检测结果比较

Table 3 Comparison of detection results between triplex RT-PCR and DAS-ELISA methods

样品编号 Sample number	RT-PCR 检测结果 Detection result of RT-PCR			DAS-ELISA 检测结果 Detection result of DAS-ELISA		
	PVX	PVM	PVA	PVX	PVM	PVA
1(阴性对照)(Negative control)	-	-	-	0.051(-)	0.058(-)	0.048(-)
2(阳性对照)(Positive control)	+	+	+	1.230(+)	1.123(+)	1.656(+)
3	+	-	+	1.120(+)	0.043(-)	1.546(+)
4	+	-	-	1.969(+)	0.056(-)	0.049(-)
5	+	-	-	1.878(+)	0.058(-)	0.054(-)
6	+	+	-	1.792(+)	1.562(+)	0.056(-)
7	-	-	+	0.046(-)	0.042(-)	2.012(+)
8	-	+	-	0.048(-)	2.564(+)	0.049(-)
9	-	+	+	0.059(-)	0.191(+)	1.486(+)
10	+	+	-	1.845(+)	1.523(+)	0.065(-)
11	+	-	-	1.986(+)	0.061(-)	0.053(-)
12	+	+	+	0.681(+)	0.139(+)	0.452(+)
13	+	-	-	2.013(+)	0.052(-)	0.061(-)
14	-	+	-	0.063(-)	2.413(+)	0.058(-)
15	-	+	-	0.059(-)	2.456(+)	0.046(-)

注: 检测结果为阳性用 + 表示; 检测结果为阴性用 - 表示; DAS-ELISA 检测结果大于 2 倍阴性对照为阳性, 小于 2 倍阴性对照为阴性。

Note: "+" was used when the detection result was positive; "-" was used when the detection result was negative. The detection result of DAS-ELISA was considered positive if it was two times negative control; the detection result of DAS-ELISA was considered negative if it was within two times negative control.



M: 100 bp marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3~15: 马铃薯田间样品

M: 100 bp marker; 1: negative control; 2: positive control; 3-15: potato sample in field

图 3 应用三重 RT-PCR 对马铃薯田间样品的检测结果

Figure 3 Detection results of potato field samples using triplex RT-PCR

3 讨论

目前, 中国主要使用脱毒种薯来降低病毒病的发生比率, 然而茎尖脱毒是否彻底, 种薯生产过程中是否再感染病毒等都会对生产造成严重影响。因此, 在整个过程中必须选择准确、快速的检测技术对病毒进行检测, 才能保障种薯质量。

血清学 DAS-ELISA 方法是目前病毒检测最常用的一种方法, 可对大规模样品进行检测, 而且操作简单, 易于学习, 但此方法不适用于病毒浓度较低的马铃薯脱毒试管苗及休眠薯块的检测。马铃薯试管苗是各级种薯的源头, 需要配套更灵敏的检测技术, 以保障彻底脱毒。而 RT-PCR 分子检测技术以其灵敏度高、特异性强等优点可以弥补 DAS-ELISA 检测方法的不足。近年来, 该技术在很多领域的病毒检测上都得到了应用, 如樊荣辉等^[12]建立了小苍兰 3 种病毒多重 RT-PCR 检测体系, 陈红霞等^[13]对 3 种苹果潜隐性病毒一步多重 RT-PCR 检测体系进行优化等。本研究针对马铃薯田间较易发生的 PVX、PVM 和 PVA 病毒建立了三重 RT-PCR 体系。

要想应用三重 RT-PCR 体系对三种病毒同时进行有效检测, 其中, 引物的选择对试验的成败起着关键的作用^[14], 既要避免三对引物之间的相互影响, 又要使每对引物都具有特异性, 以达到最佳组合, 基于此, 本研究 PVX、PVM 和 PVA 分别查找 3 对、3 对和 4 对引物。每种病毒首先筛选出在其不同分离物 CP 保守区的引物, 然后用 Primer Premier 5.0 软件进行综合评价, PVX 筛选出 2 对, PVM 筛选出 3 对, PVA 筛选出 3 对, 再用单重 RT-PCR 对每种病毒的多对引物进行验证, PVX 筛选出 1 对, PVM 筛选出 2 对, PVA 筛选出 2 对, 最后考虑建立三重 RT-PCR 检测体系, 目的条带要有效区分开, T_m 值较一致且互相兼容的引物, 最终每种病毒筛选到一对特异性引物。

三重 RT-PCR 检测体系除了引物选择非常重要外, PCR 反应体系也非常重要, 本研究对 PCR 部分 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq*DNA 聚合酶浓度梯度进行优化, 当 Mg^{2+} 浓度在 2.6 mmol/L、dNTPs 浓度在 0.1 mmol/L、*Taq*DNA 聚合酶浓度在 0.03 U/ μ L 时, 三重 PCR 体系达到检测稳定且节约成本的目的。应用该体系对来自中国马铃薯主产区的 150 份样品进行检测, 检测结果与 DAS-ELISA 吻合, 表 3 是从中选择 13 个有代表性的样品进行比较, 从结果可以看出, 当样

品 12 PVM 的 DAS-ELISA 检测结果比较接近临界值时, RT-PCR 更能体现检测结果的准确性, 因此, 当对脱毒试管苗等病毒含量较低的样品进行检测时一定要同时进行 RT-PCR 试验。

该三重 RT-PCR 检测体系的建立, 突破以往只应用于研究领域, 完全可以对脱毒试管苗和田间样品进行有效检测, 由于三重体系, 不但可以降低检测成本, 而且也可以提高检测效率, 弥补现有检测技术的不足, 为马铃薯脱毒种薯的推广普及保驾护航。

[参 考 文 献]

- [1] 刘洪义, 张洪祥, 李明福, 等. 黑龙江省马铃薯病毒病的普查及鉴定 [J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(3): 307-310.
- [2] 钟婷婷, 蒲志刚, 何俊蓉, 等. 四川省马铃薯主产区最新病毒病普查及血清学鉴定 [J]. 西南农业学报, 2008, 21(1): 96-99.
- [3] 张仲凯, 丁铭, 方琦, 等. 云南马铃薯病毒种类及脱病毒种苗筛选技术体系 [J]. 云南农业科技, 2003(增刊): 121-130.
- [4] 王培伦, 王振东, 杨元军, 等. 山东省脱毒马铃薯研究进展及推广现状 [J]. 中国马铃薯, 2002, 16(3): 154-157.
- [5] 白艳菊, 文景芝, 杨明秀, 等. 西南地区与东北地区马铃薯主要病毒发生比较 [J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(6): 733-736.
- [6] Wang B, Ma Y, Zhang Z, et al. Potato viruses in China [J]. Crop Protection, 2011, 30 (9): 1117-1123.
- [7] Gebhardt C, Valkonen J. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome [J]. Annual Review of Phytopathology, 2001, 39 (1): 79-102.
- [8] Solomon-Blackburn R M, Barker H. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches [J]. Heredity, 2001, 86: 17-35.
- [9] 张威, 白艳菊, 高艳玲, 等. 马铃薯主产区病毒病发生情况调查 [J]. 黑龙江农业科学, 2010(4): 71-74.
- [10] 张威, 白艳菊, 申宇, 等. 马铃薯 X 病毒黑龙江分离物外壳蛋白基因克隆与序列分析 [J]. 黑龙江农业科学, 2010(8): 1-5.
- [11] Xu H, D'Aubin J, Nie J. Genomic variability in potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes [J]. Virology Journal, 2010: 25(7): 1-7.
- [12] 樊荣辉, 黄敏玲, 吴建, 等. 小苍兰 3 种病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立 [J]. 福建农业学报, 2012, 27(4): 363-366.
- [13] 陈红霞, 邵建柱, 孙建设, 等. 3 种苹果潜隐性病毒一步多重 RT-PCR 检测体系的优化 [J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(4): 51-57.
- [14] 郑轩, 成巨龙, 赵震, 等. 五种烟草病毒 TMV、CMV、TEV、PVY 及 TVBMV 的多重 RT-PCR 同步检测 [J]. 植物病理学报, 2011, 41(2): 146-153.