

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2009)06-0329-03

## 应用RT-PCR技术检测马铃薯A病毒

耿宏伟<sup>1</sup>, 白艳菊<sup>1\*</sup>, 范国权<sup>1</sup>, 高艳玲<sup>1</sup>, 张威<sup>1</sup>, 申宇<sup>1</sup>, 马纪<sup>1</sup>, 郭怡璠<sup>2</sup>

(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:** 参考 GenBank 中马铃薯 A 病毒(potato virus A, PVA)的保守序列, 利用 Primer 6.0 引物设计软件设计并合成了一对特异性引物 PVAF、PVAR, 以此引物利用 RT-PCR 方法对 PVA 保守序列基因进行了特异性扩增。结果表明: 引物 PVAF、PVAR 能从已知的感染 PVA 病毒的植株中扩增出 834 bp 的 cDNA 特异性片段; 该 RT-PCR 的检测灵敏度为 1 pg 的病毒核酸, 特异性强, 重复性好, 可用于 PVA 病毒的快速检测。

**关键词:** RT-PCR; 检测; 马铃薯 A 病毒

马铃薯 A 病毒(Potato virus A, PVA), 是导致马铃薯病毒病发生的重要病毒之一, 是 2007 年《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中列出的检疫性病害, 并受到进出口检验检疫部门的严格监控。它广泛的分布于马铃薯种植区, 致使马铃薯种薯及商品薯质量退化, 降低马铃薯产量<sup>[1]</sup>, 但中国马铃薯生产中该病毒并不常见。PVA 病毒单独侵染马铃薯, 使马铃薯减产 20%~30% 左右, 它与马铃薯其它病毒复合侵染可导致马铃薯减产 50% 以上, 给马铃薯生产造成了巨大损失。

目前, 国际上检测 PVA 病毒的主要方法是基于免疫学的“双抗体夹心-酶联免疫吸附”(DAS-ELISA)法, 该方法可有效检测出马铃薯块茎或植株中是否含有 PVA 病毒<sup>[2]</sup>, 但其缺点在于检测时间长、精度低, 同时季节性的不确定变化问题常阻碍阳性与阴性样品的区分<sup>[3]</sup>, 不适于大批量进出口的马铃薯种薯质量检测及病毒含量低的样品检测。

随着分子生物学的发展, 聚合酶链式反应即 PCR 技术得到了迅速而广泛的应用。应用此项技术检测植物病毒具有快速、灵敏、简便、特异性强等优点, 而且可以检测出植物组织中含量极低的病毒

RNA<sup>[4]</sup>。本研究在国内首次利用基于分子生物学的 RT-PCR 技术对 PVA 病毒进行检测, 该方法的检测灵敏度可达到 1 pg 的病毒核酸, 并较“DAS-ELISA”有更高的特异性及重复性, 适宜于大量样品检测。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

感染有 PVA、PVY、PVX、PVS 的马铃薯田检样品由农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心(哈尔滨)提供。脱毒试管苗由黑龙江省脱毒马铃薯工程中心提供<sup>[5]</sup>。

#### 1.2 主要试剂及耗材

TRIZOL 提取试剂盒, 购自 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒, 购于 Promega 公司; 2000 bp DNA Marker、100 bp DNA Marker, 购自宝生物工程(大连)有限公司; 其它试剂均为分析纯级。试验过程中所用的试剂、枪头、离心管等须经高压蒸汽灭菌, 但不用 DEPC 处理<sup>[6]</sup>。

#### 1.3 引物设计及合成

根据 Genbank 及已发表文章上的马铃薯 A 病毒的基因序列<sup>[7-8]</sup>, 设计了 1 对引物。上游引物 PVAF: 5'-CCA ACA CAG ACG CCC AAA AC-3'; PVAR: 5'-TCC TCG CCA GAA AAC ATC CC-3', 其扩增长度为 834 bp。引物由上海生物工程公司合成。

收稿日期: 2009-06-30

基金项目: 马铃薯产业创新体系(NYCYTX-15)

作者简介: 耿宏伟(1982-), 男, 硕士, 从事马铃薯病毒病血清学与分子生物学研究。

\* 通讯作者: E-mail: yanjubai@163.com

#### 1.4 样品处理

称取 100 mg 样品叶片, 迅速在液氮中研磨成粉末<sup>[9]</sup>, 然后加入 1.0 mL TRIZOL 研磨成匀浆组织。

#### 1.5 RNA 提取及浓度测定

按 TRIZOL 说明书中的植物总 RNA 提取法提取 RNA, 用无 RNase 的灭菌双蒸水溶解 RNA, 分装备用,  $-70^{\circ}\text{C}$  冻存。

取 2  $\mu\text{L}$  回溶后 RNA, 于 ND-1000 紫外分光光度计下测定其浓度及纯度。

#### 1.6 反转录(cDNA 合成)

采用 20  $\mu\text{L}$  体系, 在 PCR 反应管中先加 1  $\mu\text{L}$  20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  下游引物, 2  $\mu\text{L}$  模板 RNA(RNA 浓度  $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), 用  $95^{\circ}\text{C}$  5 min,  $4^{\circ}\text{C}$  10 min 处理后, 分别加入 4  $\mu\text{L}$  25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 4  $\mu\text{L}$   $5\times$  反转录 Buffer, 2  $\mu\text{L}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP, 1  $\mu\text{L}$  反转录酶, 0.5  $\mu\text{L}$  RNA 酶抑制剂(40 U), 用无 RNase 灭菌双蒸水调至总体积 20  $\mu\text{L}$ , 瞬时离心混匀。反应程序:  $42^{\circ}\text{C}$  60 min,  $95^{\circ}\text{C}$  5 min,  $4^{\circ}\text{C}$  10 min。

#### 1.7 PCR 扩增

采用 25  $\mu\text{L}$  体系, 在 PCR 反应管中加入 2  $\mu\text{L}$  cDNA, 0.5  $\mu\text{L}$  20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  上游引物, 0.5  $\mu\text{L}$  20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  下游引物, 2  $\mu\text{L}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP, 2.5  $\mu\text{L}$   $10\times$  PCR Buffer, 2.0  $\mu\text{L}$  25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{L}$  rTaq DNA 聚合酶( $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), 15  $\mu\text{L}$  灭菌双蒸水。

反应程序:

$92^{\circ}\text{C}$  2 min;  $92^{\circ}\text{C}$  30 s,  $62^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 4 个循环;  $92^{\circ}\text{C}$  30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 5 个循环;  $92^{\circ}\text{C}$  30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 9 个循环;  $92^{\circ}\text{C}$  30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  45 s, 9 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min,  $4^{\circ}\text{C}$  10 min<sup>[10-12]</sup>。

#### 1.8 PCR 产物鉴定

取 RT-PCR 产物 10  $\mu\text{L}$  在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色后, 在凝胶成像仪下拍照, 与 DNA Marker 比较, 分析产物大小。

#### 1.9 RT-PCR 特异性测定

将提取的各马铃薯病毒 RNA 及脱毒试管苗 RNA 在同一条件下进行 RT-PCR, 以评价该 RT-PCR 的特异性。

#### 1.10 RT-PCR 敏感性测定

将所提取的 PVA 病毒 RNA, 作 10 倍梯度稀释后进行 RT-PCR, 测定其敏感性。

#### 1.11 RT-PCR 重复性测定

用引物 PVAF、PVAR 对提取的各马铃薯病毒 RNA 及脱毒试管苗 RNA 样品分别进行 3 次 RT-PCR 扩增。

### 2 结果与分析

#### 2.1 RNA 浓度及纯度

利用 ND-1000 型紫外分光光度计分别测定所提取 RNA 230 nm、260 nm 和 280 nm 的 OD 值, 计算  $A_{260}/A_{230}$ 、 $A_{260}/A_{280}$  及 RNA 的浓度, 数据统计见表 1 (该数据由 ND-1000 型紫外分光光度计自动生成)。

由表 1 可以看出, 提取总 RNA 的  $A_{260}/A_{230}$  值介于 2.0~2.4 之间, 说明盐类小分子的污染较少;  $A_{260}/A_{280}$  值介于 1.8~2.0 之间, 说明所提取的总 RNA 中没有蛋白质及其它有机溶剂的污染。可以说明所提取的 RNA 样品纯度较高、完整性较好。

表 1 提取马铃薯总 RNA 的紫外吸收结果

| 日期         | 时间   | $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ | $A_{260}$ | $A_{280}$ | $A_{260}/A_{280}$ | $A_{260}/A_{230}$ |
|------------|------|----------------------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| 2008-12-12 | 9:36 | 1868.78                          | 37.376    | 18.456    | 1.93              | 2.07              |
| 2008-12-12 | 9:38 | 523.61                           | 10.472    | 5.371     | 1.95              | 2.08              |
| 2008-12-12 | 9:39 | 1512.61                          | 30.252    | 14.535    | 1.98              | 2.04              |
| 2008-12-12 | 9:41 | 754.40                           | 15.088    | 7.296     | 1.97              | 2.00              |
| 2008-12-12 | 9:42 | 2284.21                          | 45.684    | 23.274    | 1.96              | 2.07              |

#### 2.2 RT-PCR 的特异性

用引物 PVAF 和 PVAR 从感染 PVA 病毒的马铃薯样品和 PVA 阳性毒株中能扩增出一条 834 bp 的特异性片段, 而不能从脱毒试管样品和感染了 PVY、PVX、PVS 病毒的样品中扩增出任何片段, 与试验预期结果一致(图 1)。

#### 2.3 RT-PCR 的敏感性

用引物 PVAF 和 PVAR 对不同浓度的 PVA 核酸进行 RT-PCR 扩增, 结果表明, 该 RT-PCR 能检测出 1 pg 的病毒 RNA(图 2)。

#### 2.4 RT-PCR 的重复性

将脱毒试管苗、PVY、PVX、PVS 及 PVA 病毒 RNA 经过 3 次重复的 RT-PCR 检测, 结果均一致, 表明该 RT-PCR 系统重复性好。

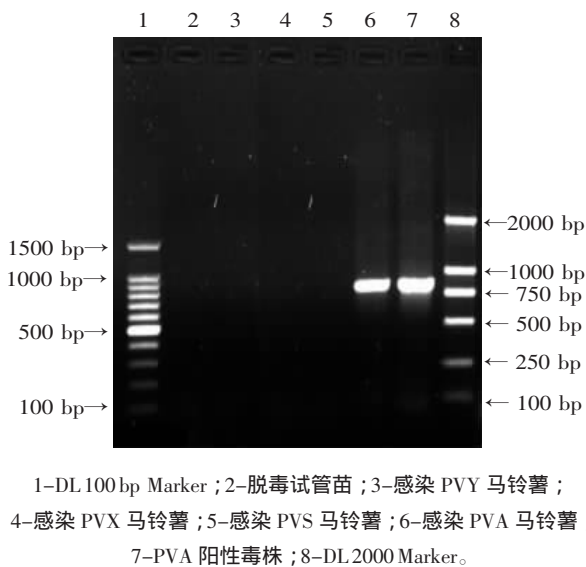


图 1 RT-PCR 特异性电泳图

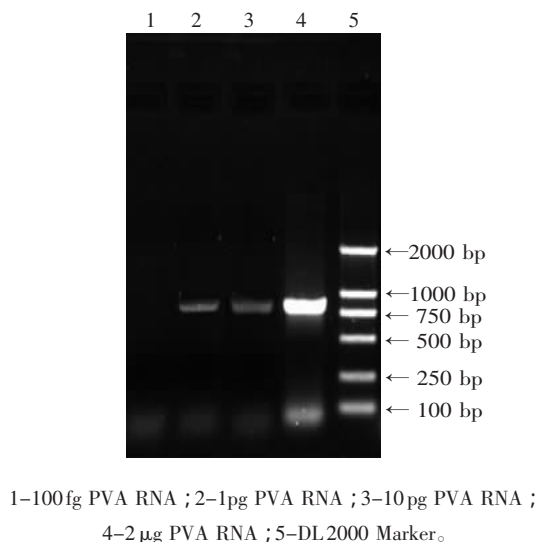


图 2 RT-PCR 敏感性电泳图

### 3 讨 论

PCR 作为近年来发展起来的一种特异性扩增 DNA 或 RNA 片段的方法, 因其具有快速、特异、灵敏和简便的优点, 已被广泛应用于植物病毒的诊断和检测。

本试验应用 1 对特异性引物, 对马铃薯 A 病毒基因进行扩增, 在国内尚属首次。试验结果显示, 从所提供的马铃薯 A 病毒阳性样品中可扩增

出 834 bp 的特异性片段, 而从其它病毒的阳性样品及脱毒试管苗中不能扩增出任何条带, 表明这对引物对 PVA 是特异的, 该 RT-PCR 用于检测 PVA 病毒具有很强的特异性。

本试验建立的 RT-PCR 能检测出 1 pg 的 PVA RNA, 说明该方法用于检测 PVA 病毒具有很高的敏感性。

基于本试验方法的特异性强及敏感性高的优点, 该方法将对马铃薯病毒快速检测试剂的研发奠定基础, 对马铃薯种薯质量的提高提供了前提保障, 也对马铃薯产业的健康发展提供技术支持。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 吴兴泉, 谭晓荣, 陈士华. 马铃薯 A 病毒复制相关蛋白研究进展[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(4): 231-234.
- [ 2 ] 白艳菊, 李学湛, 文景芝, 等. 中国与荷兰马铃薯种薯标准化程度比较分析[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(6): 357-359.
- [ 3 ] 袁小环, 李青. 血清学方法和分子生物学方法检测植物病毒研究进展[J]. 热带农业科学, 2001(6): 63-68.
- [ 4 ] 吴丽萍, 王蒂, 司怀军, 等. 马铃薯 S 病毒的 RT-PCR 检测[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(4): 200-203.
- [ 5 ] 白艳菊, 李学湛, 何云霞, 等. 优质、低成本工厂化生产马铃薯脱毒试管苗[J]. 中国农学通报, 2001, 17(2): 82-83.
- [ 6 ] 俞键, 祁骥, 杜荣. 一种马铃薯病毒 RT-PCR 诊断新方法[J]. 南开大学学报, 2005, 38(5): 40-43.
- [ 7 ] Puurand U, Makinen K, Paulin L, et al. The nucleotide sequence of potato virus A genomic RNA and its sequence similarities with other *potyviruses*[J]. J Gen virol, 1994, 75(2): 457-461.
- [ 8 ] Kekarainen T, Merits A, Oruetebarria I, et al. Comparison of the complete sequences of five different isolates of Potato virus A (PVA), genus *Potyvirus* [J]. Arch Virol, 1999, 144(12): 2355-2366.
- [ 9 ] 张威, 张匀华, 李学湛, 等. 应用 RT-PCR 分子检测技术快速检测大蒜普通潜隐病毒[J]. 植物保护, 2008, 34(1): 133-137.
- [ 10 ] Zhang Y, Guo D, Geng H, et al. Characterization of M-class genome segments of Muscovy duck reovirus S14[J]. Virus Research, 2007, 125: 42-53.
- [ 11 ] Rouis S, Lafaye P, Jaoua-Aydi L, et al. Cloning and expression of functional single-chain Fv antibodies directed against NIa and coat proteins of potato virus Y [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 137: 1-6.
- [ 12 ] Nie X, Singh R P. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2000, 86: 179-185.

中图分类号: S532; Q578 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2009)06-0332-06

## Patatin启动子驱动的人胰岛素原基因的植物表达载体的构建

马建忠\*, 马雪青, 王永刚, 宋国伟, 周贤靖, 王 倩

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

**摘 要:** 使用马铃薯的偏爱密码子设计合成人胰岛素原基因, 以植物表达载体 pCambia1301 为基础, 构建由 patatin 启动子调控的人胰岛素原基因植物表达载体 p1301Ph, 并将导入根癌农杆菌 LBA4404 中, 经 PCR 鉴定证明, 此基因已整合到农杆菌 Ti 上。表达载体的建立为日后转基因工作奠定了基础。

**关键词:** patatin 启动子; 人胰岛素原基因; 植物表达载体

糖尿病是继心血管疾病、癌症之后致残率、致死率最高的第三大疾病。目前主要治疗方法多依赖于胰岛素的使用, 胰岛素主要通过化学提取和基因工程等方法合成。化学提取法主要从猪、牛等动

物胰腺中提取, 但产品纯度低, 与人胰岛素天然构象存在差异, 有免疫原性, 注射后易引发胰岛素过敏、注射部位肌肉萎缩及胰岛素抗性等副作用, 且收率低、成本高, 无法广泛应用于临床用药。此外世界各国科学家们先后构建了大肠杆菌及酵母表达系统, 高效地表达出具生物活性的重组人胰岛素<sup>[1-4]</sup>。其构象虽接近于人胰岛素的天然构象, 但大都需要经过体外加工, 程序复杂, 成本较高, 活性亦不及天然人胰岛素。本研究用马铃薯偏好的密

收稿日期: 2009-10-21

基金项目: 甘肃省自然科学基金马铃薯块茎生产天然人胰岛素的研究资助(3ZS062-B25-023)。

作者简介: 马建忠(1963-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为植物基因工程。

\* 通讯作者: E-mail: majz@lut.cn

## Detection of Potato Virus A by RT-PCR

Geng Hongwei<sup>1</sup>, Bai Yanju<sup>1</sup>, Fan Guoquan<sup>1</sup>, Gao Yanling<sup>1</sup>,  
Zhang Wei<sup>1</sup>, Shen Yu<sup>1</sup>, Ma Ji<sup>1</sup>, Guo Yifan<sup>2</sup>

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

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

**Abstract:** A pair of primers PVAF and PVAR were designed according to the segmental nucleotide sequence of conservative gene of potato virus A (PVA) in GenBank to amplify the gene from the healthy plants and the plants which were infected with PVA, potato virus Y (PVY), potato virus X (PVX) and potato virus S (PVS), respectively. Only one PVA specific 834 bp cDNA product was amplified from the plants which were infected with PVA, but not from the others. The detectable viral dsRNA amount of this RT-PCR was 1 pg. This RT-PCR has the good sensitivity and specialty. These results indicate that this RT-PCR could be used for rapid detection of the PVA disease.

**Key Words:** RT-PCR; detection; potato virus A