

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2008)01-0009-05

马铃薯 Y 病毒一步 RT-PCR 检测试剂盒的研制

刘在东^{1,2}, 于德才^{1*}, 白艳菊¹, 高艳玲¹, 徐凤花²

(1. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 马铃薯 Y 病毒 (Potato virus Y, PVY) 对马铃薯的危害最大, 可导致马铃薯退化, 降低马铃薯产量。解决这一问题的途径就是培养脱毒种薯, 但是否完全脱毒需要经过检测才能证实。本研究依据 PVY CP 基因序列设计合成了一对引物 PY1、PY2, 以带毒样品植物总 RNA 为模板, 在同一个反应中同时加入反转录和 PCR 反应所需试剂, 反应程序包括反转录和 PCR 反应所需条件, 进行反应扩增, 带毒样品扩增得到 340 bp 的目的条带, 而健康对照无此目的条带, 从而建立了 PVY 的一步 RT-PCR 检测技术, 并组装成试剂盒。该试剂盒具有良好的稳定性和特异性, 灵敏度可以检测到带毒植物组织下限的 6.25 μg , 高于 ELISA (100 μg) 和 NASH (15 μg) 的灵敏度, 虽然和常规方法的灵敏度相同, 但更为快速、简便、易于操作, 适合脱毒苗和脱毒种薯生产单位做大量样品的检测。

关键词: PVY; 一步 RT-PCR; 检测试剂盒

马铃薯 Y 病毒 (Potato virus Y, PVY) 对马铃薯的危害最大^[1], 可导致马铃薯退化, 降低马铃薯产量, 严重的减产可达 80% 以上, 甚至绝产^[2]。PVY 是马铃薯 Y 病毒科 (Potyviridae)、马铃薯 Y 病毒属 (Potyvirus) 的代表种, 分布于所有的马铃薯种植区。目前通常认为 PVY 有三个株系, 即普通株系 (PVY⁰)、烟草脉坏死株系 (PVYⁿ) 和条痕花叶株系 (PVY^g)^[3], 病毒粒体呈线状、弯杆形, 螺旋对称^[4]。植株被 PVY 侵染后, 表现重型花叶、叶脉坏死和垂叶条斑坏死等症状^[5-6], 它通过汁液摩擦传播和嫁接传播, 是导致马铃薯病毒病发生的重要病毒^[7]。

PVY 的检测技术经历了传统生物学检测技术、免疫学检测技术和核酸分子检测技术三个阶段。生物学检测技术周期长, 而且费时费工, 受环境条件影响大, 所以在检测 PVY 时不够快速、准确, 且不能满足脱毒苗生产的要求。免疫学中的酶联免疫技术自建立以来不断改进, 已形成多种测试方法,

其中主要包括双抗夹心法、间接法等^[8]。Ellis 等^[9]采用双抗夹心技术进行了 PVY 鉴定和 PVY 血清型地理分布工作。国内也广泛应用双抗夹心法检测 PVY, 并且应用于脱毒苗生产中。PCR 技术用于植物病毒诊断, 最重要的特征是高度灵敏性。对大多数植物 RNA 病毒来说, 可以先通过逆转录酶的作用合成 cDNA, 然后以 cDNA 作为 PCR 模板进行 PCR 扩增, 即 RT-PCR 技术。目前 RT-PCR 技术广泛的应用于 RNA 病毒的检测。常规的 PCR 技术与免疫学、酶学等技术结合, 产生了一系列改良的 PCR 技术, 如免疫 PCR 技术、免疫捕捉 PCR 技术、生物素化引物模板捕捉 PCR 技术, 以及 PCR-ELISA 定量分析技术。Barker 等^[10]应用 RT-PCR 技术检测马铃薯块茎的 PVY。Singh 等^[11]分析了应用 RT-PCR 检测马铃薯块茎中的 PVY 时, 影响灵敏度的因素。国内的李浩戈等^[12]也采用 RT-PCR 技术检测马铃薯块茎及烟草中的 PVY, 并用其对东北地区的马铃薯种薯中带毒情况进行了调查。

一步 RT-PCR 是指在同一管子中, 利用同一种优化的缓冲液, 在反转录酶和热稳定 DNA 聚合酶等存在下, 直接以 RNA 或 mRNA 为起始材料进行 RT 和 PCR。它与常规 RT-PCR 的最大区别是 RT 和 PCR 在同一管子中进行。国内外关于一步

收稿日期: 2007-11-10

基金项目: 黑龙江省农业科学院青年基金项目“马铃薯 Y 病毒 (PVY) 分子检测技术体系建立与黑龙江地区 PVY 株系分析”。

作者简介: 刘在东 (1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。

* 通讯作者: E-mail: yudecai2008@yahoo.com.cn

RT-PCR 用于检测植物病毒报道不多。Vera 等^[13]利用一步 RT-PCR 技术对休眠苹果树的 ASGV 病毒进行了检测。周国辉等^[14]用一步 RT-PCR 技术检测了番木瓜叶组织中的环斑病毒, 其灵敏度可达 10^{-5} 。关翠萍^[15]利用一步 RT-PCR 技术检测了马铃薯的主要病毒, 建立了一步 RT-PCR 检测技术。

目前, 我国主要利用免疫学方法进行脱毒苗的检测, 还没有用于马铃薯病毒检测的一步 RT-PCR 检测试剂盒。一旦需要时, 主要从国外进口, 由于价格昂贵, 又不能及时供应, 所以在国内推广有一定的困难。况且 ELISA 方法不能准确可靠的检测马铃薯块茎中的 PVY, 而且在检测 PVY 之前需要打破休眠。因此, 为了满足脱毒种薯检测的需要, 有必要进一步开展马铃薯检测试剂盒的研制工作, 建立适合不同级别种薯检测需要的试剂盒。

本研究针对当前迫切需要解决的马铃薯 Y 病毒的检测问题, 旨在开发出供脱毒苗生产单位使用的简便实用的一步 RT-PCR 检测试剂盒, 以便及时淘汰脱毒种薯工厂化生产过程中不合格的产品, 降低马铃薯原种的带毒率, 促进脱毒马铃薯生产的规范化和标准化。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 毒源

供试毒源一部分来自黑龙江省和内蒙古地区, 一部分是来自加拿大的样品。

1.1.2 试剂及酶类

DNAase, DTT (Invitrogen); M-MLV Reverse Transcriptase (Promega); r-Tag 酶, dNTP Mixture, DNAmarker, Ribonuclease Inhibitor (TAKARA); Ethidium Bromide, Agarose (Solarbio); 其他试剂为国产分析纯和化学纯。

1.1.3 仪器

超低温冰箱 (美国 Alpha); PCR 仪 (BIOMETRA-TGRADIENT); 电泳仪 (北京六一 DYY-2C); 凝胶成像系统 (Bio-RADGELPOLXR); 制冰机 (SIM IF300-150); 漩涡混合仪 (沪西 WH-3); 台式离心机 (SORUALL-D-37520/MIKRO 22R)。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取

总 RNA 的提取参照[16]。称取植物组织 50~

100 mg, 液氮下研磨成粉末, 移入玻璃匀浆器加 1 mL Trizol 抽打匀浆, 再移入 1.5 mL 离心管中用 5 mL 针头抽打, 冰上孵育 5 min; 离心 (12 000 g, 5 min, 4 °C), 取上清液移入 1.5 mL 新离心管中, 加 200 μ L 氯仿, 震荡混匀, 冰上孵育 5 min; 离心 (12 000 g, 10 min, 4 °C), 取上清液移入 1.5 mL 新离心管中, 加 500 μ L 异丙醇, 震荡混匀, 冰上孵育 5 min; 离心 (12 000 g, 5 min, 4 °C), 弃上清, 加入无水乙醇, 震荡冲洗; 离心 (7 500 g, 5 min, 4 °C), 弃上清, 室温下干燥后, 加入 10~35 μ L DEPC-H₂O 溶解 RNA, 于 -20 °C 下保存备用。

1.2.2 引物设计

根据 GeneBank 中所报道的 PVY-CP 基因序列 [gi:56759616], 利用 Primer 引物设计程序, 设计并合成了一对特异性引物: PY1 (5'端引物): 5' CATAGGAGAAAC TGAG ATGCCAACT 3'; PY2 (3'端引物): 5' CTTCCCTAGCCCTCACTGGT 3', 扩增序列理论长度为 340 bp。

1.2.3 一步 RT-PCR 反应

一步 RT-PCR 反应是反转录和 PCR 在同一个管中进行的两个连续的酶催化反应, 简化了实验步骤。取 2.0 μ L 病毒 RNA 为模板, 加入 5'端引物 (100 μ M) 和 3'端引物 (100 μ M) 各 2.0 μ L、DTT (0.1 M) 0.3 μ L、dNTP (10 mmol·L⁻¹) 2.0 μ L、MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 2.4 μ L、20 \times buffer 1.5 μ L、RT-PCR 酶混合物 2.0 μ L、加 DEPC-H₂O 至总体积 20.0 μ L, 在 PCR 仪上扩增, 条件为: 37 °C 温育 45 min; 96 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 40 s, 60 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min 后取出扩增产物 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 试剂盒的组装和验证

根据最佳反应条件, 按照生产的要求对试剂盒组装, 并对其效果进行验证。本研究将组装成的试剂盒与 DAS-ELISA 试剂盒及其他公司生产的 RT-PCR 检测试剂盒进行了比较。

2 结果与分析

2.1 一步 RT-PCR 检测技术的建立

利用 PVY 引物 PY1、PY2, 采用一步 RT-PCR 方法对带毒植物样品的 RNA 进行了检测, 成功得到了 0.34 kb 的目的片段, 而健康样品无目的片段, 从而建立了 PVY 的一步 RT-PCR 检测技术,

其灵敏度可以检测带毒植物组织下限为 6.25 μg (图 1, 2)。

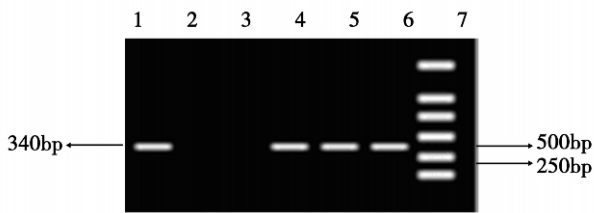


图 1 一步 RT-PCR 检测 PVY

泳道 1: 带毒烟草 RNA RT-PCR 产物; 泳道 2: 水对照; 泳道 3: 健康烟草 RNA RT-PCR 产物; 泳道 4,5,6: 带毒马铃薯样品 RNA RT-PCR 产物; 泳道 7: 核酸标准分子量。

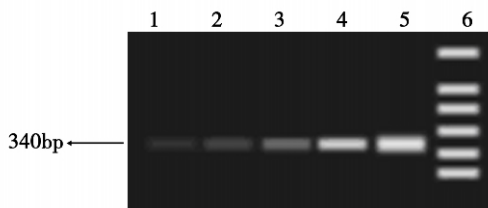


图 2 RT-PCR 检测不同稀释度的样品

泳道 1,2,3,4,5: PVY 感染叶片 RNA 提取物分别稀释 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 和 10^0 的 RT-PCR 产物; 泳道 6: 核酸标准分子量。

同时利用建立的一步 RT-PCR 检测技术, 检测感染 PVY 的休眠马铃薯以及同一株马铃薯植株不同部位, 以进一步验证该技术。结果休眠马铃薯以及马铃薯植株不同部位均扩增得到 0.34 kb 的目的片段 (图 3, 4)。

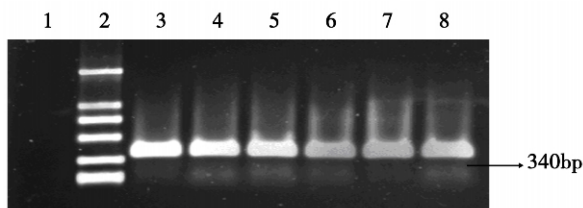


图 3 休眠马铃薯的检测结果

泳道 1: 健康烟草 RNA RT-PCR 产物; 泳道 2: 核酸标准分子量; 泳道 3,4,5: 打破休眠的马铃薯样品的检测结果; 泳道 6,7,8: 休眠马铃薯样品的检测结果。

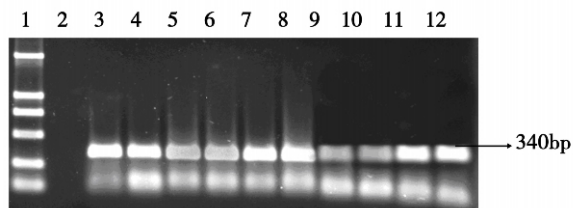


图 4 马铃薯植株不同部位的检测结果

泳道 1: 核酸标准分子量; 泳道 2: 健康烟草 RNA RT-PCR 产物; 泳道 3,4: 马铃薯叶片的检测结果; 泳道 5,6: 马铃薯茎部的检测结果; 泳道 7,8: 马铃薯芽的检测结果; 泳道 9,10: 马铃薯块的检测结果; 泳道 11,12: 马铃薯芽眼的检测结果。

2.2 试剂盒的组装结果

2.2.1 试剂盒配方

根据最佳反应条件, 按照生产要求组装试剂盒 (表 1)。

表 1 一步 RT-PCR 试剂盒配方

试剂编号	成分	含量
1#	裂解液	100 mL
2#	氯仿	25 mL
3#	异丙醇	20 mL
4#	醋酸钠 (3M)	20 mL
5#	75%乙醇	1 mL
6#	反应液	2 mL
7#	DEPC- H_2O	1.5 mL·管 ⁻¹

* 反应液包括: RT-PCR 酶混合物, $20\times$ buffer, MgCl_2 , dNTP, 上游引物, 下游引物, DTT, DEPC- H_2O 。

2.2.2 试剂盒操作方法

(1) 病毒 RNA 的提取

称取植物组织 50~100 mg, 液氮下研磨, 加入 1 mL 1# 液抽打匀浆, 冰上孵育 5 min。

离心 ($12\ 000\ \text{g}$, 5 min, 4 $^\circ\text{C}$), 取上清, 加 200 μL 2# 液, 震荡混匀, 冰上孵育 5 min。

离心 ($12\ 000\ \text{g}$, 10 min, 4 $^\circ\text{C}$), 取上清液移入新离心管中, 分别加入 1/2 上清液体积的 3# 和 4#, 震荡混匀, 冰上孵育 5 min。

离心 ($12\ 000\ \text{g}$, 5 min, 4 $^\circ\text{C}$), 弃上清, 加入 5#, 震荡冲洗。

离心 ($7\ 500\ \text{g}$, 5 min, 4 $^\circ\text{C}$), 弃上清, 室温下干燥后加入 10~35 μL 7# 溶解 RNA, 于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 下保存备用。

(2) RT-PCR 扩增反应

根据扩增样品数量, 取 6# 液按每管 18 μL 分装, 盖管盖备用。

取各标样 RNA 2.0 μL 加入对应的反应管中, 充分混匀后, 瞬离 5 s, 取出放入 PCR 扩增仪内。

按下列步骤循环:

a. 37 $^\circ\text{C}$ 45 min; b. 96 $^\circ\text{C}$ 2 min;

c. 95 $^\circ\text{C}$ 1 min; d. 60 $^\circ\text{C}$ 1 min;

e. 72 $^\circ\text{C}$ 1 min 35 个循环;

f. 72 $^\circ\text{C}$ 10 min; g. 4 $^\circ\text{C}$ 终止反应。

(3) 取出扩增产物 5 μL 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 最后经过 EB 染色和紫外观察。

2.3 试剂盒的验证

本研究组装成的试剂盒与 DAS-ELISA 试剂盒及其他公司生产的 RT-PCR 检测试剂盒检测同一批样品, 得到的结果相一致。

2.3.1 DAS-ELISA 试剂盒检测结果: 用 DAS-ELISA (Agdia 公司) 试剂盒检测一批被 PVY 侵染, 带有明显症状的田间样品。所有样品均属阳性 (表 2)。

表 2 DAS-ELISA 试剂盒检测结果

样品编号	结果(A ₄₀₅)	样品编号	结果(A ₄₀₅)	样品编号	结果(A ₄₀₅)
a	2.045	g	1.865	m	1.977
b	2.655	h	2.321	n	1.324
c	1.999	i	2.421	o	2.032
d	1.132	j	1.465	阴性	0.133
e	1.996	k	2.620	阳性	2.121
f	3.005	l	2.887		

注: A₄₀₅ 表示在 405 nm 处的吸光值, 大于 2 倍阴性对照值的为有此病毒。

2.3.2 其他公司的 RT-PCR 试剂盒检测结果

利用一步 RT-PCR (TaKaRa) 试剂盒检测同一批被 PVY 侵染的样品, 所有样品扩增得到大小 889 bp 的目的条带, 与 DAS-ELISA 试剂盒检测结果一致 (图 5)。

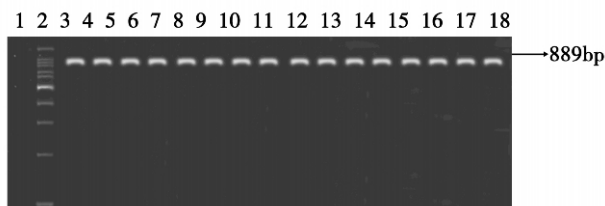


图 5 一步 RT-PCR (Takara) 试剂盒检测结果

泳道 1: 健康烟草 RNA RT-PCR 产物; 泳道 2: 核酸标准分子量; 泳道 3-17: 样品 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o 的 RT-PCR 产物; 泳道 18: 阳性对照。

2.3.3 本研究组装的一步 RT-PCR 试剂盒检测结果

利用组装的一步 RT-PCR 试剂盒检测同一批被 PVY 侵染的样品, 所有样品扩增得到大小 340 bp 的目的条带, 与 DAS-ELISA 试剂盒检测结果、一步 RT-PCR (Takara) 试剂盒检测结果一致 (图 6)。

3 讨论

加拿大、荷兰等一些马铃薯生产大国, 在种薯

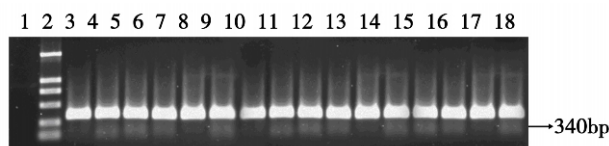


图 6 组装的一步 RT-PCR 试剂盒检测结果

泳道 1: 健康烟草 RNART-PCR 产物; 泳道 2: 核酸标准分子量; 泳道 3-17: 样品 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o 的 RT-PCR 产物; 泳道 18: 阳性对照。

生产中已开始采用 RT-PCR 和 NASH 等方法检测马铃薯病毒, 已弥补免疫学检测方法的不足。我国大陆, 在种薯生产和马铃薯脱毒苗组织培养上主要采用免疫学的检测方法进行病毒检测, 目前尚无基于分子生物学技术的检测试剂盒。但由于 PVY 的提纯较为困难, 不易制备高效价的抗血清, 因此抗血清检测容易出现假阳性的结果。此外, 在马铃薯储存期间, 块茎中的病毒含量迅速降低, 血清学检测技术常常无法检测到马铃薯块茎中的病毒, 也无法检测休眠的马铃薯块。

由于上述免疫学检测技术对于 PVY 的局限性, 本研究着重利用分子生物学方法中的 RT-PCR 检测技术来研制 PVY 检测试剂盒。两步 RT-PCR 技术的反转录和 PCR 反应在两个管中进行, 所需试剂多, 成本高, 步骤繁琐, 费时。一步 RT-PCR 技术的反转录和 PCR 反应在一个管中进行, 步骤简便, 省时, 成本低。因此, 本研究制备了马铃薯 Y 病毒一步 RT-PCR 检测试剂盒。

本研究制备的一步 RT-PCR 检测试剂盒检测带毒样品可扩增得到 0.34 kb 的目的片段, 与理论值一致, 而健康样品无此目的片段, 灵敏度可检测到带毒植物组织的下限为 6.25 μg, 明显高于 ELISA 检测技术和 NASH 检测技术, 并可以检测到休眠马铃薯及同株马铃薯不同部位 (叶片、茎、块) 中的 PVY。组装完成后, 对试剂盒的稳定性和特异性做了验证, 将组装成的试剂盒与 Agdia 公司生产的 DAS-ELISA 试剂盒及 TaKaRa 公司生产的 RT-PCR 检测试剂盒检测同一批样品, 得到的结果相一致, 没有出现假阳性和假阴性的情况, 说明该试剂盒具有良好的稳定性和特异性, 能够满足 PVY 检测和研究的需要, 而且所用的试剂种类少, 成本低, 实验步骤简单, 易于操作, 因此具有一定的开发推广潜力。

[参 考 文 献]

- [1] 田波, 张广学, 张鹤龄, 等. 马铃薯无病毒种薯生产的原理和技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1980: 16-24.
- [2] 谷爱仙. 马铃薯病毒病及其防治[J]. 植物医生, 1998, 1(5) : 11-12.
- [3] 白艳菊. 马铃薯主要病毒发生状况及检测试剂盒的研制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006.
- [4] Riechmann J L, Lain S, Garcia J A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology[J]. J Gen Virol, 1992, 73: 1-16.
- [5] 张鹤龄. 马铃薯病毒和种薯生产[M]. 北京: 中国农业出版社, 1981.
- [6] Delgado-Sanchez S, Grogan R G. 植物病毒志 (第一集) [M]. 郑礼, 译. 上海: 上海科学技术出版社, 1970.
- [7] 张成良, 张作芳, 李蔚民, 等. 植物病毒学分类[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 150-152.
- [8] Matthews R E F. Plant virology [M]. 2nd ed. New York: Academic Press, 1981.
- [9] Ellis P, Stace-smith R, de Villiers G. Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y[J]. Plant Disease, 1997, 81(5) : 481-484.
- [10] Barker H, Webster K D, Reavy B. Detection of potato Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Potato Res, 1993, 36: 13-20.
- [11] Singh M, Singh R P. Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization[J]. J Virol Methods, 1996, 60: 47-57.
- [12] 李浩戈, 吴元华, 赵秀香, 等. 马铃薯 Y 病毒的 RT-PCR 检测[J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 30(3) : 244-246.
- [13] Vera L A, Kummert J, Rufflard G, et al. Detection of apple stem grooving virus in dormant apple trees with crude extracts as templates for one-step RT-PCR [J]. Plant Disease, 1998, 785-790.
- [14] 周国辉, 李华平, 张曙光, 等. RT-PCR 一步法检测番木瓜环斑病毒体内运转状态 [J]. 中国病毒学, 1999, 12(30) : 172-175.
- [15] 关翠萍. 马铃薯病毒一步法 RT-PCR 诊断研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2001.
- [16] Nie X, Singh R P. Detection of multiple potato viruses using an digoxigenin as a common cDNA primer[J]. Journal of Virological Methods, 2000, 86(2) : 179-185.

One-step RT-PCR Kit Developed for Detection of Potato Virus Y

Liu Zaidong^{1,2}, Yu Decai¹, Bai Yanju¹, Gao Yanling¹, Xu Fenghua²

(1. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;
2. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Potato virus Y (PVY) is a main factor that affects the potato production, leading to significant yield losses and quality degradation. One of the ways to deal with this problem is to get virus-free plantlets by meristem tip culture, but whether or not the plantlets recovered from meristem culture is virus-free needs confirmation. Primers PY1 and PY2 were designed and synthesized based on PVY CP gene sequence. One fragment of 0.34 kb was amplified by one-step RT-PCR using the total RNA of the PVY infected plant; however, for the healthy sample nothing was got. One-step RT-PCR detection method for PVY is established by mixing all the reagents used in RT and PCR and designing the reaction conditions used in RT and PCR reactions based on the detection method for PVY. One-step RT-PCR detection kit accordingly was also established. The kit had high stability and specificity. The sensitivity of detection in leaves is about 100 µg by ELISA and 15 µg by NASH, while the sensitivity for the kit was about 6.25 µg. Though the sensitivity of the kit was the same as routine RT-PCR, but the use of the kit was time-saving and cost-effective. So the kit can be used as a useful tool for routine testing, and selection of virus-free potatoes, especially when a large number of samples are detected.

Key Word: PVY; one-step RT-PCR; detection Kit