

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)04-0200-04

## 马铃薯 S 病毒的 RT-PCR 检测

吴丽萍<sup>1,2</sup>, 王 蒂<sup>1,2\*</sup>, 司怀军<sup>2,3</sup>, 王化俊<sup>1,2</sup>, 路 平<sup>1,2</sup>, 贾笑英<sup>1,2</sup>

( 1. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070;  
3. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070 )

**摘 要:** 根据马铃薯 S 病毒 PVS 的外壳蛋白基因序列, 设计合成了一对寡核苷酸引物。以感染 PVS 的马铃薯组织和健康的组织为材料, 对提取植物总 RNA 的两种方法进行了比较, 并对总 RNA 的提取方法进行改进, 获得了纯度较高, 完整性较好的总 RNA。以此为模板, 进行 cDNA 合成及 PCR 扩增, 从感病组织扩增得到一段长度约 642 bp 的特异 PCR 扩增产物, 与理论设计的外壳蛋白基因大小一致, 而健康组织无此扩增产物。从而建立了检测 PVS 快速灵敏简便的新方法, 在基因水平上为 PVS 的检测提供了新手段。

**关键词:** 马铃薯 S 病毒; 反转录-聚合酶链式反应; 病毒检测

马铃薯病毒是危害马铃薯生产的一类主要病害, 常引起马铃薯退化, 一般使马铃薯减产 20%~50%, 严重时达 80% 以上<sup>[1]</sup>, 严重制约了马铃薯的生产。马铃薯 S 病毒 PVS 是影响马铃薯产量和品质的主要病毒之一, 分布广泛, 在世界各马铃薯种植区均有发生。PVS 单独侵染时不表现症状, 一般可使马铃薯减产 10%~20%<sup>[1]</sup>。在田间 PVS 经常与其他病毒混合侵染, 当与马铃薯 X 病毒或马铃薯 M 病毒混合侵染时, 可减产 20%~30%<sup>[2]</sup>。由于其症状潜隐难以辨认, 目前主要采用指示植物和 ELISA 等方法进行检测<sup>[3]</sup>。指示植物法耗时长, 对症状的观察需要很多经验的积累, 因此其中以 ELISA 应用最广<sup>[4]</sup>。ELISA 可以在短时间内检测大量样品, 但存在着假阳性或假阴性现象, 而且只是检测了病毒的外壳蛋白 (CP), 其遗传信息量只占整个病毒遗传信息量的 5%~10%, 无法区分因 CP 基因有一定同源性的病毒类型<sup>[5]</sup>。

随着分子生物学的发展, 聚合酶链式反应 (PCR) 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,

而且可检测出植物组织中含量极低的病毒 RNA<sup>[6-7]</sup>, 为植物病毒检测提供了更有效的手段。本文比较了 2 种总 RNA 提取方法及 PVS 的 RT-PCR 检测, 旨在建立检测 PVS 有效、快速的方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材 料

感染有 PVS 的马铃薯试管苗由黑龙江省农业科学院克山马铃薯研究所提供。脱毒试管苗由甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室提供。

#### 1.2 方 法

##### 1.2.1 植物总 RNA 提取

以感染 PVS 马铃薯植株的叶片和健康叶片为材料, 采用 TRIZOL 试剂法和 LiCl 法<sup>[8-9]</sup>提取植物总 RNA。

##### 1.2.1.1 TRIZOL 试剂法

TRIZOL 试剂法提取 RNA 的具体方法如下: 称取 100 mg 样品, 迅速在液氮中研磨成粉末, 然后加入 1.0 mL TRIZOL 研磨成匀浆组织; 倒入 1.5 mL 离心管中, 室温放置 5 min, 4 下 12000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 10 min; 取上清至一新离心管中, 加氯仿 0.2 mL, 混匀, 用手剧烈摇晃 15 s, 室温静置 2~3 min, 4 下 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min; 取最上层 (0.5~0.6 mL) 至一新离心管中, 加入异丙醇 0.5 mL, 混匀, 室温静置 10 min, 4 下 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min; 取

收稿日期: 2006-02-01

基金项目: 教育部春晖计划项目 (Z2004-1-62023); 甘肃省科技厅项目 (Q5031-C31-27)

作者简介: 吴丽萍 (1980-), 女, 硕士研究生, 从事植物病毒分子生物学检测研究。

\* 通讯作者: E-mail: wangdl@gsau.edu.cn

沉淀, 加 75%乙醇 1.0 mL, 涡旋 30 s, 4 下 7500  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min; 取沉淀, 置真空或空气中 5~10 min, 干燥 RNA 沉淀, 加 DEPC 处理的无菌水 或其他, 如水, TE 等) 15  $\mu\text{L}$ , -20 保存备用。

### 1.2.1.2 LiCl 法

LiCl 法略有改动, 具体方法如下: 称取 200 mg 样品, 迅速在液氮中研磨成粉末, 然后加入 0.5 mL 80 预热的 LiCl 提取缓冲液 (100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  LiCl, 1% SDS, 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris·Cl, 1%  $\beta$ - 巯基乙醇, 3% PVP), 研磨成匀浆组织, 加入等体积的水饱和苯酚 (pH=8.0), 室温振荡悬浮后加入 1.5 mL 离心管中, 4 下 12000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min (以下同), 上清液加等体积的苯酚 氯仿 异戊醇 (25:24:1), 振荡混匀, 离心, 上清液用 2 倍体积的乙醇和 10% 的 3  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaAc (pH=5.2) 沉淀, -20 下 1 h 后离心沉淀用 70% 的乙醇洗涤离心, 然后用 3  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  LiCl 溶解, -20 过夜后离心 10 min, 沉淀于室温下充分干燥后, 溶于 30  $\mu\text{L}$  DEPC 处理的无菌水中, -20 保存备用。

### 1.2.2 PVS 外壳蛋白基因特异引物的合成

对已报道<sup>[10-13]</sup>的 PVS 的外壳蛋白基因序列软件进行比较, 利用 Primer 引物设计软件, 在其同源区设计一对引物。5 端引物: 5'-ATGGGTGATTCAAC-GAAGAAGCTG-3', 3 端引物: 5'-GCTTGCGAC-CTTGCAAAATAGCAC-3', 由上海生物工程公司合成。预计 PVS 两引物间序列长 642 bp。

### 1.2.3 cDNA 的合成

以总 RNA 为模板, 在引物 S<sub>2</sub> 的引导下, 合成 PVS 的 cDNA 第一链。反应体系组成为: 总 RNA 2.0  $\mu\text{L}$ , 引物 S<sub>2</sub> (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , dNTP $\phi$  (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2.0  $\mu\text{L}$ , Rever Tra Ace 1.0  $\mu\text{L}$ , RNase Inhibitor 1.0  $\mu\text{L}$ , 5 $\times$ RT buffer 4.0  $\mu\text{L}$ , 灭菌重蒸水 9.0  $\mu\text{L}$ 。混合均匀后, 将上述反应体系按如下程序运行: 30 , 10 min; 42 , 20 min; 99 , 5 min; 4 , 5 min; 瞬时离心。

### 1.2.4 PCR 扩增

PCR 扩增在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中进行。反应体系中含 2.0  $\mu\text{L}$  cDNA 反应物, 1.0  $\mu\text{L}$  引物 S<sub>1</sub> (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 1.0  $\mu\text{L}$  引物 S<sub>2</sub> (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 2.0  $\mu\text{L}$  dNTP $\phi$  (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 2.0  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PCR buffer, 2.0  $\mu\text{L}$  MgCl $\phi$  (25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶 (5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 14.5  $\mu\text{L}$  灭菌重蒸水。扩增反应条件

为: 94 , 3.5 min; 94 , 40 s; 54 , 40 s; 72 , 1.5 min, 30 个循环; 72 , 10 min。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 经溴化乙锭染色 5 min, 然后在紫外灯下观察结果, 照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同提取方法总 RNA 质量比较

总 RNA 的完整性, 对病毒 RNA 的逆转录和 PCR 过程有很大影响。本试验采用 2 种方法提取植物的总 RNA, 在 RNA 提取过程中, 发现用 TRIZOL 试剂法处理样品的各级沉淀物呈现明显褐色, 说明其中有多酚等杂质污染; 用 LiCl 法则无此现象, 最终的 RNA 沉淀呈半透明状。

LiCl 法和 TRIZOL 试剂法提取得到的总 RNA 在琼脂糖凝胶上的电泳结果分别见图 1、图 2。从图 1 中可以看出, 用 LiCl 法提取的总 RNA 电泳后可见 3 条较清晰的条带, 它们分别是 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA。从图 2 中可以看出, TRI-ZOL 试剂法提取的总 RNA 电泳后, 条带不清晰, 泳道中背景较深, 说明 RNA 有一定程度的降解, 有杂质未除去, 纯度较差。

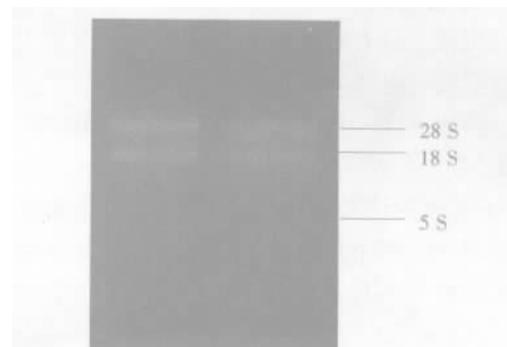


图 1 LiCl 法提取总 RNA 电泳结果

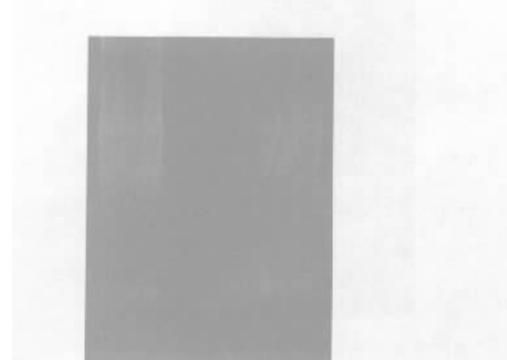


图 2 TRIZOL 试剂法提取总 RNA 电泳结果

利用紫外分光光度计分别测定 230 nm、260 nm 和 280 nm 的 OD 值, 计算  $A_{260}/A_{230}$ 、 $A_{260}/A_{280}$  及 RNA 产率, 数据统计见表 1。由表 1 中可以看出, LiCl 法提取总 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 中没有蛋白质及其他有机溶剂的污染; 而 TRIZOL 试剂法提取总 RNA 的  $A_{260}/A_{230}$  值小于 2.0,  $A_{260}/A_{280}$  值小于 1.8, 说明 TRIZOL 试剂法提取的总 RNA 的质量较差。从表中还可以看出, LiCl 法提取的总 RNA 产率明显高于 TRIZOL 试剂法。以上实验结果表明, LiCl 法提取 RNA 样品纯度较高、完整性较好, 与 TRIZOL 试剂法相比是较理想的提取马铃薯叶片组织总 RNA 方法。

表 1 提取马铃薯总 RNA 的紫外吸收结果

方法	$A_{230}$	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	产率 ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
LiCl	0.17	0.39	0.20	2.30	1.95	234.00
TRIZOL	0.15	0.26	0.16	1.73	1.63	156.00

注: RNA 的产率以  $OD_{230\text{nm}}$  的度数计算, 公式如下: RNA 产率 =  $OD_{230\text{nm}} \times 40 (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) \times \text{稀释倍数} \times \text{RNA 溶解体积} / \text{样品重量}$ 。

## 2.2 PVS 的 RT-PCR 的检测结果

以提取的 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增后, 在琼脂糖凝胶电泳中呈现出条带, 与预期的 642 bp 的扩增产物大小一致, 而以马铃薯无毒苗的扩增产物作对照, 未得到任何扩增产物 (图 3)。用 RT-PCR 检测 PVS 特异性强, 重复性好, 并能准确地检测到目的片段的存在, 从而建立了有效的 PVS 的 RT-PCR 检测技术。

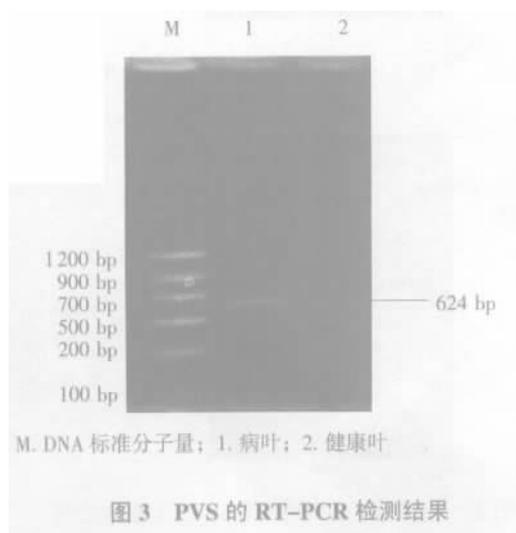


图 3 PVS 的 RT-PCR 检测结果

## 3 讨论

从感病组织中提取高质量的 RNA 是进行 RT-PCR 检测的前提, 本研究采取直接提取感染病毒的植物总 RNA 的方法, 与传统的先提纯病毒粒, 然后酶解植物病毒的外壳蛋白获得 RNA 的方法相比<sup>[14]</sup>, 具有快速简单、灵敏有效的优点。

用 TRIZOL 试剂法和 LiCl 法提取马铃薯组织总 RNA 时发现, TRIZOL 试剂法的各级沉淀物明显呈现褐色, LiCl 法无此现象, 由于高等植物组织中富含酚类化合物, 在匀浆的时候极易被氧化成褐色的醌类化合物, 它可以与 RNA 结合形成褐色复合物, 从而导致 RNA 完全丧失生物学活性<sup>[15]</sup>。可见 TRIZOL 试剂法不能有效地去除样品中的多酚等物质, 而且 RNA 降解严重; 而改进的 LiCl 法试剂中含有的  $\beta$ -巯基乙醇和 PVP 两种抗氧化剂, 可有效防止酚类化合物的氧化, 而且 LiCl 可特异性地沉淀出核酸中的 RNA。从而保证了病毒 RNA 具有较好的完整性。

TRIZOL 法由于操作简单, 所需试剂少, 适于小样品提取等优点受到欢迎。然而在实验过程中发现用 LiCl 法提取总 RNA 实验结果稳定, 从经济角度考虑, 该方法所用试剂可自己配制, 方法灵活, 价格较 TRIZOL 试剂便宜, 成本低。

目前发表的关于植物 RNA 提取的文献很多, 但不同植物或同一植物的不同种往往因种属差异, 材料内含物组分及含量有很大不同, 而需要采用不同的 RNA 提取方法<sup>[16]</sup>。通过对比两种提取马铃薯总 RNA 的方法, 发现 LiCl 法更有效, 更经济。

PVS 等植物病毒, 在植物体内含量低, 而且常发生隐症现象, 用常规检测方法, 如指示植物法、ELISA 等方法有可能出现漏检现象, 而 RT-PCR 技术具有特异性强、灵敏度高、所需样品量少等优点, 是 PVS 诊断、检测的较好方法, 可以为一些难检测植物病毒所借鉴。随着 PCR 仪等相应仪器的普及, RT-PCR 技术在马铃薯病毒检测中的应用也越来越多, 而且该方法简单、快速、重复性好, 整个实验不费时, 是目前应用最广泛也将是最有前途的一项分子检测技术, 为脱毒种薯和种苗的检测和鉴定提供了更为快速灵敏简便的检测手段, 具有极其重要的理论意义和应用价值。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 李济宸, 唐玉华, 谭宗九, 等. 马铃薯病害及其防治 [M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1992.
- [ 2 ] 吴兴泉, 吴祖建, 谢联辉, 等. 马铃薯 S 病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达 [J]. 中国病毒学, 2002, 17(3): 248-251.
- [ 3 ] Salazar L F. Potato viruses and their control [M]. Lima: International Potato Center, 1996.
- [ 4 ] 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.
- [ 5 ] Jelkmann W, Keimkonrad R. An immuno-capture polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for the detection of apple stem spitting virus [J]. Phytopathology, 1997, 145: 499-504.
- [ 6 ] 朱水芳, 张成良, 张作芳. PCRDig- cRNA 探针检测番茄环斑病毒 [J]. 中国进出境动植物检疫, 1995, 4: 29-31.
- [ 7 ] Vnsh R, Roser A, Stein A. The use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus [J]. Annals of Applied Biology, 1990, 117: 561-569.
- [ 8 ] Faccioli G, Rosener A, Forni M. Use of the polymerase chain reaction to clone the potato leafroll virus coat protein gene directly from totato RNA of infected plants [J]. Potato Research, 1995, 38: 211-218.
- [ 9 ] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [ 10 ] Boonham N, Walsh K, Smith P, et al. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a genetic method for plant viral disease diagnosis [J]. Virol Methods, 2003, 108 (2): 181-187.
- [ 11 ] Matousek J, Schubert J, Dedic P, et al. A broad variability of potato virus S (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. Plant Pathol, 2000, 22: 22-29.
- [ 12 ] MacKenzie D J, Tremaine J H, Stace-Smith R. Organization and intervirial homologies of the 3-terminal portion of potato virus S RNA [J]. Gen Virol, 1989, 70 (5): 1053-1056.
- [ 13 ] Foster G D, Mills P R. The 3-nucleotide sequence of an ordinary strain of potato virus S [J]. Virus Genes, 1992, 6 (3): 213-220.
- [ 14 ] 吴志明, 朱永芳, 张成良, 等. 应用 RT-PCR 法快速检测马铃薯卷叶病毒 [J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(4): 77-79.
- [ 15 ] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [ 16 ] Ainsworth C, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. Biotechniques, 1992, 13: 52-56.

## Detection of Potato Virus S by Reverse Transcription-polymerase Chain Amplification

Wu Liping<sup>1,2</sup>, Wang Di<sup>1,2</sup>, Si Huaijun<sup>2,3</sup>, Wang Huaijun<sup>1,2</sup>, Lu Ping<sup>1,2</sup>, Jia Xiaoying<sup>1,2</sup>

( 1. Agricultural College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Gansu Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3. Life Science and Technology College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China )

**Abstract:** A pair of DNA primers were designed and synthesized based on the nucleotide sequence of the coat protein (CP) gene of potato virus S (PVS). Two methods were compared for isolation of total RNA from virus-infected and healthy potato tissue. The total RNA with high purity and quality was obtained using the improved method. The RNA could be used for cDNA synthesis and polymerase chain reaction (PCR). A specific PCR fragments about 642 bp was obtained, which was same as the length of PVS CP gene, while no amplified products were obtained from the healthy tissue samples. The experiment established a rapid, sensitive and simple means for PVS detection and provided a new method for PVS detection at the level of gene.

**Key Words:** potato virus S (PVS); RT-PCR; virus detection