

# 马铃薯 X 病毒的 RT-PCR 检测

孙 琦 张春庆\*

(山东农业大学农学院, 泰安 271018)

**摘 要:** 通过对“一步法”RNA 提取方法的改进, 简化了提取程序, 并保证了 RNA 的质量。根据马铃薯 X 病毒 (PVX) 基因序列设计合成了一对特异性引物, 运用反转录 PCR (RT-PCR) 对 PVX-RNA 进行扩增, 成功得到了与预期大小相一致的 308 bp 片段, 而对照未得到任何产物, 同时对反转录酶 AMV 用量做了不同的处理, 得出 AMV 仅用 1U 仍能得到较好扩增的效果。从而建立了经济简便的 PVX 的 RT-PCR 检测体系, 为 PVX 的防治、脱毒苗的检测提供有效手段。

**关键词:** 马铃薯 X 病毒; 病毒; 检测; 反转录 PCR

**中图分类号:** S 432.4<sup>+</sup>1; S 532 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0687-03

马铃薯 X 病毒 (potato virus X, PVX) 严重危害马铃薯生产, 其自然传播主要依靠种薯和介体, 主要症状是轻型花叶, 病叶稍有波纹, 小叶片上有大小不等、形状不规则的黄绿色斑驳<sup>[1]</sup>, 可引起种薯大量减产, 品种严重退化。近年来, 马铃薯脱毒苗的生产为病毒的控制起到良好的作用。然而寻求一种好的病毒检测方法将对脱毒苗的检测和该病毒的控制起到重要作用。

植物病毒的检测除传统的免疫学方法<sup>[2,3]</sup>以外, 近年来发展的反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法因其具有灵敏、快速、特异性强等优点, 在植物病毒的检测上显示出强大的优势<sup>[4]</sup>。自 1990 年起, 国内外已相继用 RT-PCR 方法检测了多种病毒, 如: 马铃薯 Y 病毒 (PVY)<sup>[4,5]</sup>、马铃薯卷叶病毒 (PLRV)<sup>[6,7]</sup>、马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd)<sup>[8]</sup>等, 但是对 PVX 病毒的检测报道还很少。因此本试验设计了一对特异性外壳蛋白 (CP) 基因引物, 建立了一个经济简便的 PVX 的 RT-PCR 检测体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

PVX 毒源 (山东分离物) 由山东农业大学生命科学学院提供; 其他分子生物学试剂购于大连宝生物工程股份有限公司与上海生工生物工程技术有限公司。用 PVX 毒源接种感染寄主植物烟草, 发病后用于病毒 RNA 的提取检测, 同时以未接种的健康植株为对照。

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 的提取** 采用异硫氰酸胍—酚氯仿一步法, 并在此基础上进行改进。称取 0.15~0.2 g 材料放于预冷的研钵中, 加入 500  $\mu$ L 冷冻的氯仿, 少许石英砂迅速研磨。转移粉末至预冷的离心管中, 加入 500  $\mu$ L 变性溶液 (4 mol·L<sup>-1</sup> 异硫氰酸胍, 25 mmol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠, 5 g·L<sup>-1</sup> 十二烷基肌氨酸钠, 1% 巯基乙醇), 用力摇匀。按顺序依次加入 2 mol·L<sup>-1</sup> NaAc 50  $\mu$ L, 酚—氯仿 (1:1) 500  $\mu$ L, 混匀, 冰浴 15 min。4℃, 12000 r/min 离心 30 min, 转移上清至一个新的离心管中, 加入等体积的异丙醇, 混匀, -20℃放置 2~3 h 或过夜。4℃ 12000 r/min 离心 25 min, 去上清液, 加入 200  $\mu$ L 变性溶液溶解沉淀, 加入 60  $\mu$ L NaAc, 200  $\mu$ L 异丙醇, 置 -20℃ 2~3 h。4℃, 12000 r/min 离心 20 min, 用 75% 的乙醇冲洗沉淀, 然后离心去上清液, 加入 50  $\mu$ L DEPC·H<sub>2</sub>O 溶解沉淀。用 1% 非变性凝胶电泳检测 RNA 质量 (图 1)。

**1.2.2 特异性引物的合成** 对 Marianne 等发表的 PVX 核苷酸序列<sup>[9]</sup>与 Morozol 等发表的 CP 基因序

收稿日期: 2002-12-23; 修回日期: 2003-03-10

\* 通讯作者

列<sup>[10]</sup>进行比较,利用 Dnasis 引物设计程序,在其同源区设计一对引物。5'端引物:5'-AGTGATGG-AACTGGATG3' (6045~6063 bp), 3'端引物:5'-TTATGGTGGTGGTAGAGTGA3' (6344~6363 bp), 并且这对引物序列也与我国已公布的 PVX-CP 基因序列、PVX 福建分离物 CP 基因序列同源。

1.2.3 cDNA 的合成 参照大连宝生物工程有限公司 D2620cDNA 合成试剂盒操作程序,合成 cDNA 的第一条链。在 20  $\mu$ L 反应体系中,加入反转录缓冲液 4  $\mu$ L, 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 2  $\mu$ L, Rnasin 20 U, Oligod (T)<sub>18</sub> 50 pmol, 反转录酶 AMV 10 U, PVX RNA 1  $\mu$ g, 加 ddH<sub>2</sub>O 使总体积达 20  $\mu$ L。室温下放置 10 min, 然后 42℃水浴 1 h, 取出放于冰水中冷却 2 min。此外,对反转录酶用量进行比较试验。

1.2.4 PCR 扩增 在 25  $\mu$ L 反应体系中,取上述反转录产物 2  $\mu$ L, 加 5'端引物和 3'端引物各 5 pmol, Taq 酶缓冲液 2.5  $\mu$ L, 25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ L, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 1.5  $\mu$ L, 1 U Taq 酶加水至总体积 25  $\mu$ L, 在 PCR 仪 (PTC-100) 上扩增,反应条件是 95℃预变性 3 min, 94℃变性 30 s, 52℃复性 40 s, 72℃延伸 1 min, 40 个循环。72℃后延伸 10 min。取出扩增产物 5  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测 (图 2)。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 的质量

由图 1 可看出,用本文改进的方法提取的 RNA 在非变性胶上可清晰分出 28S 和 18S 两条带,且比较完整,这说明本方法提取的 RNA 完整性较好。RNA 纯度检验表明, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.7~2.0 范围内,这表明 RNA 的纯度也很理想。

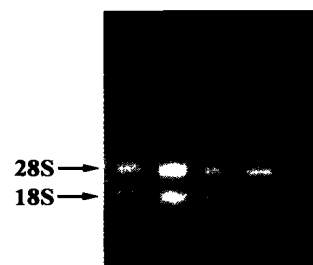


图 1 用改进的方法提取的 RNA 质量

Fig. 1 Quality test of RNA extracted with improved method

### 2.2 PVX 的 RT-PCR 测定结果

由图 2 可以看出,用本方法提取的病叶 RNA 反转录 PCR 扩增后,在琼脂糖凝胶上出现阳性反应谱带,与理论设计长度 308 bp 相一致,而对照未出现任何条扩增带。由此可以看出本试验设计的引物与扩增的序列适于 PVX 山东分离物的检测。

### 2.3 不同反转录酶用量的 PCR 结果

由图 3 可以看出,AMV 由 10U 降到 5U、2.5U、1U,其扩增结果基本不变,这说明在反转录中,加入 1U 的 AMV 足以完成 cDNA 第一条链的合成及与扩增。

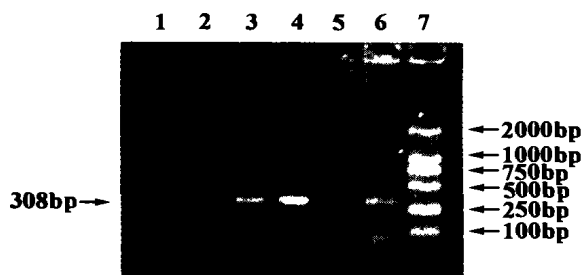


图 2 烟草病叶中 PVX 的 RT-PCR 检测

1~2. 健康叶, 3~6. 病叶, 7. DNA size marker

Fig. 2 Detection of PVX RNA from tobacco infected leaves by RT-PCR

1~2. Healthy leaves, 3~6. PVX infected leaves, 7. DNA marker DL-2000

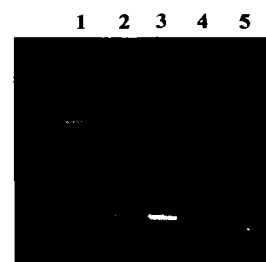


图 3 不同反转录酶用量合成 cDNA 的 PCR 结果

Fig. 3 PCR results of cDNA synthesized by different quantity of AMV

1. Marker; 2. 10U AMV; 3. 5U AMV; 4. 2.5U AMV; 5. 1U AMV

## 3 讨论

RT-PCR 技术中,如何简单、快速获得 RNA 是至关重要的,也是 RT-PCR 能够推广应用的基础。本试验采用“一步法”快速提取 RNA,并在此基础上进行改进。一方面在提取材料上,应用微量提取,另一方面在研磨时,加入氯仿使 RNA 酶变性失活,起到液氮的作用。这些举措简化了操作程序,

节省了试验成本, 并且能够保证提取质量, 因此这个方法是可行的。

同一种病毒有不同的株系或分离物, 其基因序列存在一定的差异。应用 RT-PCR 方法对同一种病毒的不同分离物的检测还很少报道。本试验就是由 PVX 的几种不同分离物的 CP 基因的同源序列设计一对特异性引物, 并且成功检测了 PVX 山东分离物。因此推测所设计的引物与扩增的核酸序列对 PVX 不同分离物或株系的检测具有一定的广谱性。但是否如此, 还有待于进一步试验证明。

RT-PCR 方法运用于生产的限制性因素主要是 AMV 比较昂贵, 不利于生产应用。本试验所用 AMV 为原来的 1/10, 大大降低了试验成本, 对于 RT-PCR 方法在生产上的推广应用具有重要价值。

#### 参考文献:

- 1 姚文国, 催茂森. 马铃薯有害生物及其检疫. 北京: 中国农业出版社, 2000. 235 ~ 238
- 2 李云海, 何云昆, 张仲凯, 等. 马铃薯脱毒苗试管苗的酶联免疫吸附检测. 云南农业大学学报, 1993, 8 (3): 223 ~ 224
- 3 仲乃琴. ELISA 技术检测马铃薯病毒的研究. 甘肃农业大学学报, 1998, 33 (2): 178 ~ 181
- 4 李浩戈, 吴元华, 赵秀香. 马铃薯 Y 病毒的 RT-PCR 检测. 沈阳农业大学学报, 1999, 30 (3): 244 ~ 246
- 5 Barker H, Webster K D, Reavy B. Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. Potato Research, 1993, 36: 13 ~ 20
- 6 Spiegel S, Martin R R. Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers by the polymerase chain reaction and ELISA. Ann. Appl. Biol., 1993, 121: 493 ~ 500
- 7 张 彤, 哈斯阿古拉, 张鹤龄, 等. 用逆转录聚合酶链反应检测马铃薯卷叶病毒. 病毒学报, 1993, 12 (6): 385 ~ 387
- 8 Shanloul A M, Hadidi A, Zhu S F, et al. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of viroid variant naturally infecting pepino plants. Can. J. Plant Pathol., 1997, 19: 89 ~ 96
- 9 Marianne J. The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologues at the amino acid level with various plus - stranded RNA viruses. J. Gen. Virol., 1988, 69: 1789 ~ 1798
- 10 Morozov S, Yu Zakhariev. The analysis of the primary structure and localization of the coat protein gene on the genomic RNA of potato virus X. Doklady Akademii Nauk SSSR, 1983, 271: 211 ~ 215

## Detection of Potato Virus X by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Sun Qi and Zhang Chunqing

(Agronomy College, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** Total RNA was extracted with an improved one-step method from tobacco leaves infected with potato virus X (PVX). The more quality of tested RNA was very good, which indicated that the improved method was very effective and simple. A pair of specific primers were designed and synthesized based on the homologous nucleotide sequence of different isolates of PVX by the reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR), a 308 bp DNA fragment was amplified successfully from PVX of Shandong isolate, and no fragment was obtained from control. With only 1U Reverse Transcriptase XL (AMV), the amplified result were still very good. The results showed that an economical and convenient RT-PCR detection system of PVX was set up.

**Key words:** PVX (Potato virus X); Virus; Detection; Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

### 欢迎购阅下列新书

- |                         |                                  |                                  |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 2-1 《英汉农业大词典》218 元      | 2-10 《柑橘学》207 元                  | 2-18 《中国科学技术专家传略》(农学编综合卷 2) 66 元 |
| 2-2 《英汉园艺学词典》23 元       | 2-12 《中国水生蔬菜》62 元                | 2-27 《芽苗蔬菜生产技术图册》32 元            |
| 2-3 《花卉资源原色图谱》218 元     | 2-13 《花卉病虫害防治手册》42 元             | 3-4 《新编拉汉英植物名称》185 元             |
| 2-5 《农业百科全书·观赏园艺卷》165 元 | 2-14 《花卉病虫害防治彩色图说》20 元           | 3-5 《果品品质研究》30 元                 |
| 2-6 《农业百科全书·果树卷》61 元    | 2-15 《中国蔬菜花粉扫描电镜图解》40 元          | 3-6 《中国蔬菜品种志》(上、下) 卷 490 元       |
| 2-8 《葡萄学》141 元          | 2-17 《中国科学技术专家传略》(农学编园艺卷 2) 57 元 |                                  |
| 2-9 《苹果学》176 元          |                                  |                                  |

以上价格已含邮资。购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号《园艺学报》编辑部, 邮编: 100081。