

## 以马铃薯 ND2 mRNA 为内对照双重 RT-PCR 法检测马铃薯纺锤块茎类病毒

马 恢<sup>1</sup>, 谢晓亮<sup>2</sup>, 尹 江<sup>1</sup>, 温春秀<sup>2</sup>, 吴志明<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 河北省高寒作物研究所, 河北张家口 076450; <sup>2</sup> 河北省农林科学院经济作物研究所, 石家庄 050051)

**摘 要:** 根据马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd) 基因序列设计特异引物, 采用反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术进行 PSTVd 检测研究。为避免由于提取的 RNA 降解或者 RT-PCR 反应质量不高所造成的假阴性问题, 在检测过程中引入马铃薯线粒体 NADH 脱氢酶 ND2 亚基基因 mRNA 为内对照, 该内对照的一个引物跨越了该基因内含子区域, 只对剪接后的 mRNA 进行特异扩增而不扩增其本身 DNA。利用内对照引物和 PSTVd 特异引物进行双重 RT-PCR 检测, 分别扩增出 190 bp 的内对照基因特异片段和 360 bp 的 PSTVd 特异条带, 与预期引物设计大小一致。引入的内对照可以较好地监控 PSTVd 的 RT-PCR 检测过程。

**关键词:** 马铃薯; 马铃薯纺锤块茎类病毒; 双重 RT-PCR; 马铃薯线粒体 NADH ND2 mRNA

中图分类号: S 532 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 05-1213-04

## Duplex RT-PCR Detection of *Potato spindle tuber viroid* with an Internal Control of Potato ND2 mRNA

MA Hui<sup>1</sup>, XIE Xiao-liang<sup>2</sup>, YIN Jiang<sup>1</sup>, WEN Chun-xiu<sup>2</sup>, and WU Zhi-ming<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Zhangjiakou High-land and Cold Crop Research Institute, Zhangjiakou, Hebei 076450, China; <sup>2</sup> Institute of Economic Crop Research, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

**Abstract:** The specific primers were designed according to the highly conserved regions of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) gene sequence, and were used to detect PSTVd by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In order to avoid false negative results from RNA degradation or the poor reaction quality of RT-PCR, an internal control which based on the genomic mRNA sequence of potato mitochondrial NADH dehydrogenase ND2 subunit was incorporated in the PSTVd detection protocol. One of the internal control primers was designed and located over the spliced junction of mRNA, the primers were shown to amplify only the spliced RNA derived cDNA but not the genomic DNA itself. Using the internal control primers and the PSTVd primers, two specific PCR fragments were amplified by duplex RT-PCR, which were expected the size of 190 bp for internal control gene and 360 bp for PSTVd, respectively. The internal control could effectively inspect the detection process of PSTVd by duplex RT-PCR.

**Key words:** Potato; *Potato spindle tuber viroid*; Duplex RT-PCR; Potato NADH ND2 subunit mRNA

马铃薯纺锤块茎类病毒 (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) 是严重危害马铃薯的主要病害, 特别是与马铃薯卷叶病毒 (*Potato leafroll virus*, PLRV) 或马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY) 等复合感染, 常造成较大的经济损失。PSTVd 不能通过茎尖脱毒除去, 在脱毒时首先需要进行严格检测, 淘汰感染类病毒的植株后进行脱毒 (Diener, 1987)。建立快速、灵敏和特异的 PSTVd 检测方法在脱毒种薯产业中极为重要。PSTVd 的检测方法主要有指示植物法、双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (return-

收稿日期: 2007-07-24; 修回日期: 2007-08-27

基金项目: 河北省科技攻关项目 (04225505)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhiming71@126.com)

PAGE)、核酸杂交和反转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)等,其中指示植物法可以提高症状出现比率和加快症状出现速度,但是所需要时间长,不同类病毒在寄主上引起的症状很难区分,有一定的局限性(Takahashi & Diener, 1975)。双向电泳法对试验条件和技术要求较低,但是操作繁琐,且RNA易降解(Schumacher et al., 1983; Singh & Boucher, 1987)。核酸杂交技术特异性强、灵敏度高,但是操作繁琐,对技术的要求水平高(Owens & Diener, 1981; Nakahara et al., 1998)。RT-PCR法具有特异性强、灵敏度高、快速和简便等优点,理论上只需知道病毒和类病毒的基因序列,设计一对特异引物,便能对其进行特异检测,且可检测出pg级的植物病毒RNA,已经越来越多地用于常规检测(Schumacher et al., 1986; 马秀芬等, 1996; 吴志明等, 2003)。

国内外在马铃薯类病毒的RT-PCR检测上,主要通过类病毒基因的特异扩增产物来判断结果,通过设置阴性对照和阳性对照解决假阳性的问题(Boonham et al., 2004; Bostan et al., 2004; 周国辉等, 2004)。由于马铃薯组织中富含多糖和酚类物质,在提取RNA时不易去除,造成RNA提取质量不高,影响了随后的酶反应活性,同时RNA很容易降解,极易造成假阴性结果。本文首次报道了以马铃薯的线粒体NADH脱氢酶ND2亚基基因mRNA为内对照进行PSTVd的双重RT-PCR检测的技术体系研究,为PSTVd检测提供更为可靠和有效的手段。

## 1 材料与方法

马铃薯感病植株叶片采自河北省高寒作物研究所马铃薯种质资源圃。阴性对照为经过RT-PCR检测证明没有感染PSTVd的脱毒试管苗,阳性对照为经过RT-PCR和基因测序确证感染了PSTVd的试管苗,上述对照均由河北省农林科学院经济作物研究所脱毒马铃薯研究室提供。

引物由北京赛百盛基因有限公司合成。通过检验引物的特异性和灵敏度(马秀芬等, 1996; 吴志明等, 2003)筛选确定了复合RT-PCR引物,其中PSTVd引物1: 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3', 引物2: 5'-AGA ATC GTG CCA TTC TAC CC-3'。根据国际基因库上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)马铃薯线粒体NADH脱氢酶ND2亚基基因(登录号: X93575)设计内对照引物: N1: 5'-AAG ATC ACT GCA GTT CCT TTT C-3'和N2: 5'-TAA GAT CAT AGA AGC AAT GCT GC-3'。

根据吴志明等(2003)建立的LiCl法进行RNA的提取, RNA沉淀用DEPC处理的无菌水悬浮, -20℃保存。以提取的RNA为模板,用N2引物、PSTVd的引物2进行复合cDNA合成。在0.5 mL的微量离心管中加入下列试剂: RNA样品5 μL, 互补引物(20 μmol·L<sup>-1</sup>)各1 μL, 灭菌重蒸水4 μL, 88℃变性10 min, 冰上冷却3~5 min; 然后再加入RNasin(20 μmol·L<sup>-1</sup>)1 μL, 5×buffer 4 μL, dNTPs(10 mmol·L<sup>-1</sup>)2 μL, M-MLV反转录酶(200 U·μL<sup>-1</sup>)1 μL, DEPC水补足到20 μL, 混匀后37℃保温10 min, 42℃反应1.5 h, 即合成cDNA第一链产物。

取0.5 mL微量离心管加入以下试剂, 同时设置不加模板的对照, 用NADH和PSTVd引物进行双重扩增, 10×PCR buffer 5 μL, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol·L<sup>-1</sup>)1 μL, dNTPs(10 mmol·L<sup>-1</sup>)1 μL, NADH引物1 μL, PSTVd引物1 μL, Taq DNA聚合酶1.4 μL, 加灭菌双蒸水补足到50 μL, 加入1滴矿物油, 88℃变性5~10 min后, 加入2 μL cDNA产物进行PCR循环扩增。PCR扩增条件: 94℃ 3 min, 94℃ 50 s; 54℃ 50 s, 72℃ 1.5 min, 35个循环; 72℃ 10 min。取5 μL PCR产物经5%聚丙烯酰胺凝胶电泳观察结果。利用建立的以内对照为基础的PSTVd双重RT-PCR检测技术体系进行实际检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 复合RT-PCR检测结果

以阳性对照为研究对象, 进行单重和双重RT-PCR检测, 结果(图1)表明, 内对照引物可扩增出一条约190 bp的特异片段, PSTVd特异引物可扩增出一条约360 bp的特异片段, 双重RT-PCR扩

增出两个目的条带,说明以 NADH ND2 亚基基因的 mRNA 为内对照进行病毒复合 RT-PCR 检测是可行的。

## 2.2 PSTVd 复合 RT-PCR 实际应用

部分大田采集样品检测结果如图 2 所示,其中阴性对照仅扩增出 190 bp 内对照基因片段,阳性对照同时扩增出 190 bp 的内对照基因片段和 360 bp 的类病毒特异基因片段。共检测 12 个样品,如果样品的内对照基因没有扩增出来,那么可能由于 RNA 降解或者 RT-PCR 反应没有成功,由此产生的结果不可靠,可以看出,该内对照可较好地监测整个马铃薯类病毒的 RT-PCR 检测过程,可有效克服马铃薯病毒和类病毒 RT-PCR 检测过程中易出现假阴性结果的问题。

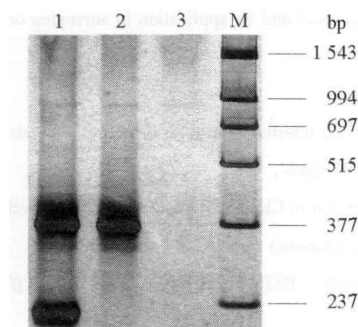


图 1 以马铃薯 ND2 亚基基因 mRNA 为内对照  
双重 RT-PCR 检测 PSTVd 结果

1. ND2 和 PSTVd 双重; 2. PSTVd 单重;  
3. 空白对照; M. Marker。

Fig. 1 PSTVd detection results by duplex RT-PCR based on  
potato NADH ND2 subunit gene mRNA as internal control

1. ND2 and PSTVd duplex; 2. PSTVd single;  
3. Water control; M. Marker.

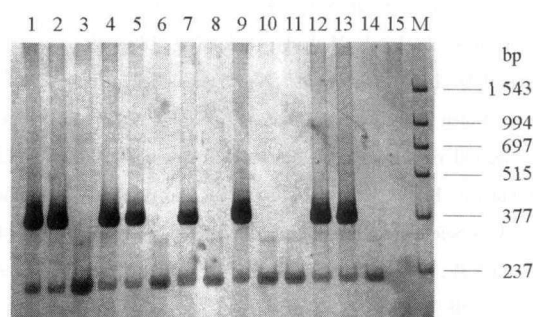


图 2 双重 RT-PCR 检测样品 PSTVd 结果

- 1~12. 马铃薯样品; 13. 阳性对照;  
14. 阴性对照; 15. 空白对照; M. Marker。

Fig. 2 Detection of PSTVd in potato samples  
by duplex RT-PCR

- 1 - 12. Different potato samples; 13. Positive control;  
14. Negative control; 15. Water control; M. Marker.

## 3 讨论

在植物病毒的 RT-PCR 检测中引入内对照是一个有效解决检测中出现假阴性结果的方法, Bariana 等 (1994) 为了监测 RNA 的质量和 RT-PCR 反应的正常进行, 在 RT-PCR 检测豆类病毒体系中首次引入了内对照, 但是该内对照在健康植株上产生非特异带, 因而没有达到有效监控假阴性结果的目的。Nassuth 等 (2000) 在果树病毒的 RT-PCR 检测研究中, 利用苹果酸脱氢酶基因和 2-磷酸核酮糖羧化氧化酶基因作为内对照, 虽然可以应用于多种果树的不同组织, 但无法有效区分 DNA 模板和 RNA 模板, 只有在 RT-PCR 反应前进行 DNA 酶解才可以起到监测作用, 由此引入的内对照也没有较好地解决假阴性的问题。Menzel 等 (2002, 2003) 在对苹果病毒进行 RT-PCR 检测时, 应用苹果线粒体脱氢酶 NADH 的 ND5 亚基基因为内对照, 设计了跨越内含子区域的引物, 实现了只对剪接后的 mRNA 的特异扩增, 有效解决了假阴性问题。Thompson 等 (2003) 采用 Menzel 的方法进行了草莓病毒的复合 RT-PCR 检测, 解决了假阴性问题。He 等 (2006) 利用蚜虫细胞色素氧化酶亚基 1 (COX1) 基因, 建立了以 COX1 为内对照复合 RT-PCR 法检测蚜虫携带的马铃薯卷叶病毒和马铃薯 Y 病毒的方法, 解决了带毒蚜虫 RT-PCR 法检测的假阴性问题。

作者在对 PSTVd 进行 RT-PCR 检测时, 根据马铃薯线粒体 NADH 脱氢酶 ND2 亚基基因的基因组序列, 设计的内对照引物 N1 的 3' 末端跨越了该基因的外显子和内含子区域, 它只能选择性地扩增该亚基基因的 mRNA 序列, 而不扩增其基因组 DNA, 避免由于提取的 RNA 模板中存在 DNA 污染而影响内对照的可靠性的问题, 该内对照可有效用于监测整个 RT-PCR 检测过程, 且所用的内对照基因在

马铃薯的根、茎、叶、花、果实、以及休眠的块茎等组织中普遍存在,具有良好的通用性和实用性。这是首次以马铃薯 ND2 亚基基因 mRNA 为内对照复合 RT-PCR 检测 PSTVd 的报道,对提高马铃薯病毒和类病毒的检测技术水平具有重要的理论意义和应用价值。

## References

- Bariana H S, Shannon A L, Chu P W G. 1994. Detection of five legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. *Phytopathology*, 84 (10): 1201 – 1205.
- Boonham N, Perez L G, Mendez M S, Peralta E L, Blockley A, Walsh K, Barker I, Mumford R A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods*, 116 (2): 139 – 146.
- Bostan H, Nie X, Singh R P. 2004. A RT-PCR primer pair for the detection of pospiviroid and its application in surveying ornamental plants for viroids. *J. Virol. Methods*, 116 (2): 189 – 193.
- Diener T O. 1987. *The viroids*. New York: Plenum Press: 344.
- He C, Molen T A, Xiong X, Boiteau G, Nie X. 2006. Cytochrome oxidase mRNA as an internal control for detection of potato virus Y and potato leafroll virus from single aphids by a co-amplification RT-PCR assay. *J. Virol. Methods*, 138 (1–2): 152 – 159.
- Ma Xiu-fen, Liu Li, Zhang He-ling, Pang Rui-jie. 1996. Identification of strains of PSTVd in China and effect of PSTVd-infection on potato yield. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimongol*, 27 (4): 562 – 567. (in Chinese)
- 马秀芬, 刘 莉, 张鹤龄, 庞瑞杰. 1996. 中国流行的马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd) 株系鉴定及其对产量的影响. *内蒙古大学学报*, 27 (4): 562 – 567.
- Menzel W, Jelkmann W, Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99 (1–2): 114 – 117.
- Menzel W, Zahn V, Maiss E. 2003. Multiplex RT-PCR – ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. *Journal of Virological Methods*, 110: 153 – 157.
- Nakahara K, Hataya T, Hayashi Y, Sugimoto T, Kimura I, Shikata E. 1998. A mixture of synthetic oligonucleotide probes labeled with biotin for the sensitive detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods*, 71: 219 – 227.
- Nassuth A, Pollari E, Helmecczy K, Stewart S, Kofalvi S A. 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *Journal of Virological Methods*, 90 (1): 37 – 49.
- Owens R A, Diener T O. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid spot hybridization. *Science*, 213: 670 – 672.
- Schumacher J, Randles J W, Riesner D. 1983. A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.* 135 (2): 288 – 295.
- Schumacher J, Meyer N, Riesner D, Singh R P, Boucher A. 1986. Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by “return” gel electrophoresis. *Journal of Phytopathology*, 115 (2): 332 – 343.
- Singh R P, Boucher A. 1987. Electrophoretic separation of a severe from mild strains of potato spindle tuber viroid. *Phytopathology*, 77 (1): 1588 – 1591.
- Takahashi T, Diener T O. 1975. Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nuclei isolated from infected leaves. *Virology*, 64 (1): 106 – 114.
- Thompson J R, Wetzel S, Klerks M M, Vaskova D, Schoen C D, Spak J, Jelkmann W. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *J. Virol. Methods*, 111 (2): 85 – 93.
- Wu Zhi-ming, Jia Xiao-mei, Xie Xiao-liang, Wen Chun-xiu, Tian Wei, Zhang Qing-liang. 2003. Detection of potato spindle tuber viroid by RT-PCR and its complete sequences analysis. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 18: 63 – 66. (in Chinese)
- 吴志明, 贾晓梅, 谢晓亮, 温春秀, 田 伟, 张庆良. 2003. 马铃薯纺锤块茎类病毒 RT-PCR 检测 and 全序列分析. *华北农学报*, 18: 63 – 66.
- Zhou Gou-hui, Li Mei-hui, Xu Dong-lin, Cai Yan-qing. 2004. Molecular identification and detection of potato leafroll virus by RT-PCR. *Acta Photophylacica Sinica*, 31 (3): 329 – 330. (in Chinese)
- 周国辉, 李梅辉, 许东林, 蔡艳清. 2004. 马铃薯卷叶病毒分子鉴定及一步 RT-PCR 检测. *植物保护学报*, 31 (3): 329 – 330.