

应用多重 RT - PCR检测草莓斑驳病毒和草莓轻型黄边病毒

张志宏 杨洪一* 代红艳 李贺 肖敏

(沈阳农业大学园艺学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要: 建立了多重 RT - PCR同时检测草莓斑驳病毒 (SMoV) 和草莓轻型黄边病毒 (SMYEV) 的技术体系, 对草莓田间植株和试管苗都可以有效进行检测。多重 PCR引物根据引物之间的互补性及引物的 T_m 值进行筛选。适宜的 PCR缓冲液的浓度为 2 ×, 退火温度为 57 °C, 延伸温度为 66 °C。分别利用单一 PCR和多重 PCR对微茎尖培养获得的草莓品种宝交早生的 11个株系进行了脱毒效果鉴定。

关键词: 多重 RT - PCR; 病毒检测; 草莓

中图分类号: S 668.4; S 432.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 03-0507-04

Detection of Strawberry mottle virus and Strawberry mild yellow edge virus by Multiplex RT - PCR

Zhang Zhihong, Yang Hongyi*, Dai Hongyan, Li He, and Xiao Min

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: A multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT - PCR) assay was developed for simultaneously detecting Strawberry mottle virus (SMoV) and Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV). Both field-grown strawberries and microplants were detected effectively. The primers of multiplex PCR were selected by primer-primer interactions and melting temperature. In multiplex PCR for detecting SMoV and SMYEV, the appropriate concentration of PCR buffer was 2 ×, and the appropriate temperatures for anneal and extension were 57 °C and 66 °C respectively. Eleven lines of strawberry (*Fragaria ×ananassa*) cultivar 'Hokowase', which were obtained by mini shoot tip culture in vitro, were screened for virus elimination by standard RT - PCR and multiplex RT - PCR.

Key words: Multiplex RT - PCR; Virus detection; Strawberry

病毒对无性繁殖的多年生草本植物草莓 (*Fragaria ×ananassa*) 危害严重, 导致植株矮化, 匍匐茎减少, 果实品质变劣, 减产 30% ~ 80%。侵染草莓的 20多种病毒中草莓斑驳病毒 (Strawberry mottle virus, SMoV) 和草莓轻型黄边病毒 (*Strawberry mild yellow edge virus*, SMYEV) 分布较广, 危害较重。

解决病毒危害草莓生产的关键是大面积推广应用无病毒苗, 实行无病毒化生产。病毒检测手段是病毒研究的一个重要环节。多重 PCR (Multiplex polymerase chain reaction) 是在 1次 PCR反应中加入多于 1对的引物, 特异性地扩增多个基因位点的反应。与常规的单一 PCR相比, 多重 PCR可以同时检测多种病毒或区分病毒的不同株系, 极大地提高检测效率, 降低检测成本。由于草莓病毒多为混合侵染, 综合表现症状, 利用单一 PCR对多种病毒进行系统检测的工作量较大, 因而多重 PCR在草莓病毒检测中的优越性更为明显。

本研究在利用单一 RT - PCR检测 SMoV 和 SMYEV的基础上^[1,2], 通过调节和优化影响多重 RT - PCR的因子, 旨在探索建立利用多重 RT - PCR技术同时检测 SMoV 和 SMYEV的技术体系。

收稿日期: 2005 - 05 - 20; 修回日期: 2005 - 07 - 01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30200187)

* 通讯作者 Author for correspondence

1 材料与方法

1.1 植物材料、试剂和引物

春香 (Harunoka)、高斯克 (Governor Simcoe)、布兰登堡 (Brandenburg) 等草莓品种生长于露地。通过单一 RT-PCR 检测证明带有 SMoV 和 SMYEV 的草莓品种宝交早生 (Hokowase) 生长于温室。通过 0.5 mm 微茎尖培养获得的宝交早生的 11 个株系离体保存于 100 mL 三角瓶中。

反转录酶 M-MLV 为 Invitrogen 公司产品, *Taq* DNA 聚合酶 (*TaKaRa LA TaqTM*)、dNTPs、RNA 酶抑制剂、DNA Marker 购于 TaKaRa 公司, 其它药品为国产分析纯。

根据 GenBank 中 SMoV (登录号 AJ311875, AJ311876) 和 SMYEV (登录号 D12517) 的基因组序列和文献 [1~4] 分别设计和合成针对 SMoV、SMYEV 和 *ndh B* 基因 (mRNA 专化内标) 的引物 (表 1)。

表 1 扩增 SMoV、SMYEV 及内标片段的引物对
Table 1 The primer pairs for amplifying segments of SMoV, SMYEV and internal control

引物对 Primer pairs	序列 Sequence (5' 3')	目的片段来源 Source of target fragment	大小 Size (bp)
D1/D2	TAAGCGACCACGACTGTGACAAAAG (正义引物 Sense primer) ATTCGGTTCACGTCTAGTCTCAC (反义引物 Antisense primer)	SMoV	461
D1/D3	TAAGCGACCACGACTGTGACAAAAG (正义引物 Sense primer) TCTTGGGCTTGGATCGTCACCTG (反义引物 Antisense primer)	SMoV	219
C1/C2	GGACCTACGGATCTTGGAAGT (正义引物 Sense primer) ACCCGCACAACTTGTCGGAAG (反义引物 Antisense primer)	SMoV	461
Y1/Y2	GTGTGCTCAATCCAGCCAG (正义引物 Sense primer) CATGGCACTCATTTGGAGCTGGG (反义引物 Antisense primer)	SMYEV	271
YT1/YT2	CCGCTGCAGTTGTAGGGTA (正义引物 Sense primer) TTTTTTTTTTTTTTAAGGAAAAA GAAAAACAAAC (反义引物 Antisense primer)	SMYEV	932
YT1/Y2	CCGCTGCAGTTGTAGGGTA (正义引物 Sense primer) CATGGCACTCATTTGGAGCTGGG (反义引物 Antisense primer)	SMYEV	861
N1/N2	GGACTCCTGACGTA TACGAAGGATC (正义引物 Sense primer) AAACAACGCTTGTAAGGAGTCC (反义引物 Antisense primer)	<i>ndh B</i>	571

1.2 RNA 的提取和 RT-PCR

从待检测草莓植株上取幼嫩的叶片, 采用 CTAB 法提取总 RNA^[1]。反转录反应体积为 20 μ L, 其中包括模板 1 μ L, 反转录酶 M-MLV 60 U, 随机 9 引物 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 OLIGO dT 引物 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 μ L, 其它成分与操作步骤参考 Invitrogen 反转录酶说明书, 37 反转录 2.5 h。取 1 μ L 进行 PCR 反应, 反应体积 20 μ L, 含 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, *Taq* 酶 1 U。对于单一 PCR 反应, 缓冲液浓度为 1 \times , 引物为 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 对于多重 PCR 反应, 缓冲液浓度为 2 \times , 引物对 D1/D3、Y1/Y2、N1/N2 的浓度依次为 0.27、0.20 和 0.02 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。单一 PCR 反应程序分别为: (1) 引物对 D1/D3, 94 2 min, 94 30 s, 55 40 s, 72 60 s, 35 个循环, 最后 72 延伸 5 min; (2) 引物对 N1/N2 的反应程序与 D1/D3 的相同; (3) 引物对 Y1/Y2 的退火温度为 56 , 其它与 D1/D3 的相同。多重 PCR 的反应程序为: 94 2 min; 94 30 s, 57 40 s, 66 2 min, 35 个循环; 最后 72 延伸 5 min。用含 EB 的 1.6% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 引物的筛选

采用单一 RT-PCR 技术, 引物对 D1/D2、D1/D3 和 C1/C2 分别从感染 SMoV 的草莓植株中稳定

地扩增出 SMoV 的特异片段^[1]; 引物对 Y1/Y2 和 YT1/YT2 分别从感染 SMYEV 的草莓植株中稳定地扩增出 SMYEV 的特异片段^[2]; 引物对 N1/N2 从草莓病毒指示植物和草莓品种的反转录产物中扩增出了 571 bp 的 *ndh B* 基因特异片段, 而未加反转录酶则没有任何扩增产物, 说明 *ndh B* 基因存在于草莓中, 跨越内含子的引物设计是有效的, *ndh B* 基因适合作为草莓 RNA 病毒检测的内标^[1]。

引物对 D1/D2 的退火温度为 50, 远低于其它引物对的退火温度, 因而不宜作为多重 PCR 反应的引物。利用软件 OMIGA 2.0 对其它引物进行引物互补性测试, 发现引物 C1-Y1、C1-YT1、C1-N1、C1-N2、C2-YT1、C2-YT2、C2-Y1 间存在着较大的互补性, 因此这些引物不适合互相组合来作为多重 PCR 反应的引物。此外, 利用软件 DNAMAN 计算引物 Tm 值的结果表明, D1、D3、Y1、Y2、N1、N2 的 Tm 值较一致。基于此, 本研究选择引物对 D1/D3、Y1/Y2 和 N1/N2 作为多重 PCR 检测 SMoV 和 SMYEV 的引物。在相同的 PCR 反应体系和反应程序 (94 2 min; 94 30 s, 54 40 s, 72 2 min, 35 个循环; 72 延伸 5 min) 下, 这些引物单独扩增时都可以得到较好的扩增效果 (图 1)。

2.2 引物浓度、退火温度和 PCR 缓冲液浓度对多重 PCR 反应的影响

以被 SMoV 和 SMYEV 混合侵染的草莓品种宝交早生为试材, 进行基于内标的多重 PCR 检测 SMoV 和 SMYEV 的体系建立和优化研究。按照 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的终浓度等量加入引物 D1/D3、Y1/Y2 和 N1/N2, 采用 50 的退火温度, 结果显示内标片段过强, SMoV 片段较弱, 而且未能扩增出 SMYEV 片段。增加 SMYEV 引物的浓度 ($0.2 \sim 0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、降低内标引物的浓度 ($0.05 \sim 0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 未能有效解决该问题; 当 SMYEV 引物浓度提高至 $0.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 虽能扩增出 SMYEV 片段, 但是有大量弥散的碎片, 而且 SMoV 片段和内标片段消失。

当引物浓度为 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对退火温度和延伸温度进行调节。降低退火温度至 46, 扩增效果未见提高; 而提高退火温度至 57, 可以扩增出 SMYEV 的特异片段。在多重 PCR 反应中, 延伸温度也是重要的因素, 高的延伸温度 (72) 可能更利于单一片段的扩增。因此, 在退火温度为 57 的条件下, 对不同的延伸温度 (65 ~ 72) 进行试验, 结果表明延伸温度为 66 时扩增效果最佳, 且扩增结果较稳定, 但是短片段扩增效果仍相对较差。

PCR 缓冲液浓度可以调节大小片段扩增产物间的强弱。由于高盐浓度会影响长片段扩增产物的变性解链^[5], 通常长片段扩增产物在低盐浓度下扩增效果较好, 而短片段扩增产物在高盐浓度下扩增结果较好。在退火温度为 57、延伸温度为 66 的情况下, 对 PCR 缓冲液浓度 ($0.5 \sim 3.5 \times$) 对扩增效果的影响进行比较, 结果显示 $2 \times$ PCR 缓冲液最优。

进一步对引物浓度进行优化, 得到检测 SMoV 和 SMYEV 的多重 PCR 体系的最终优化结果为: 加入 $2 \times$ PCR 缓冲液, 引物 D1/D3、Y1/Y2 和 N1/N2 的浓度依次为 0.27 、 0.20 和 $0.02 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。PCR 反应程序为 94 2 min; 94 30 s, 57 40 s, 66 2 min, 35 个循环; 最后 72 延伸 5 min。

2.3 利用多重 RT-PCR 检测草莓样品

利用多重 RT-PCR 对沈阳农业大学草莓试验园露地保存的春香、高斯克、布兰登堡进行病毒检测, 结果表明均感染有 SMYEV 而没有感染 SMoV。

对被 SMYEV 和 SMoV 混合侵染的宝交早生进行微茎尖 (0.5 mm) 培养脱毒处理, 然后对获得的 11 个株系分别利用单一 RT-PCR 和多重 RT-PCR 进行脱毒效果鉴定。结果显示, 单一 RT-PCR 和

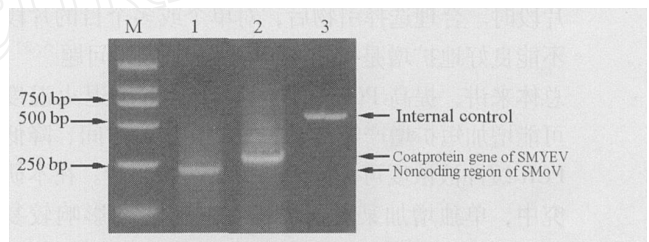


图 1 单一 PCR 中不同引物对的扩增

M: DNA Marker DL2000; 1: 利用引物对 D1/D3 扩增 SMoV;
2: 利用引物对 Y1/Y2 扩增 SMYEV; 3: 利用引物对 N1/N2 扩增内标。

Fig 1 The amplification with different primer pairs in standard PCR

M: DNA marker DL2000; 1: Amplification of SMoV with primer pair D1/D3; 2: Amplification of SMYEV with primer pair Y1/Y2; 3: Amplification of internal control with primer pair N1/N2

多重 RT-PCR 进行脱毒效果检测的结果一致 (图 2), 有 6 个株系脱除了 SMoV 和 SMYEV, 有 3 个株系仅脱除了 SMoV, 另两个株系没有脱毒。

3 讨论

单一 PCR 中效果极佳的引物作为多重 PCR 的引物时, 很可能因为引物间相互作用而未能建立多重 PCR 体系^[6]。Bariana 等^[7]在检测豆类病毒中, 加入内标引物后则多重 PCR 扩增出较多非特异片段, 且未能通过优化反应体系来解决。因此, 慎重选择引物可以使反应更容易优化, 特别在扩增多个片段时。合理选择引物后, 对单个或多个目的片段不能良好地扩增是多重 PCR 中最主要的问题^[5, 8]。总体来讲, 提高 PCR 缓冲液浓度、调节退火温度可能增加短扩增产物的量, 而增加延伸时间、降低 PCR 缓冲液浓度可能增加长扩增产物的量。在本研究中, 单独增加某对引物的量对反应的影响较复杂, 该引物对应的扩增产物未必增加, 且易引起其它扩增片段的缺失或弥散, 即使扩增产物增加了, 其重复性也不好。只有当其它因子较适合时, 再调节引物的量才有较好的效果。

多重 PCR 比单一 PCR 中的退火温度低 4~6 °C 一般有更好的扩增效果, 短扩增条带弱或缺失多采用降低退火温度来解决^[5], 而本研究中提高退火温度反而增加了弱带的亮度, 这可能在于高的退火温度抑制了长内标片段的扩增, 从而利于短片段的扩增。

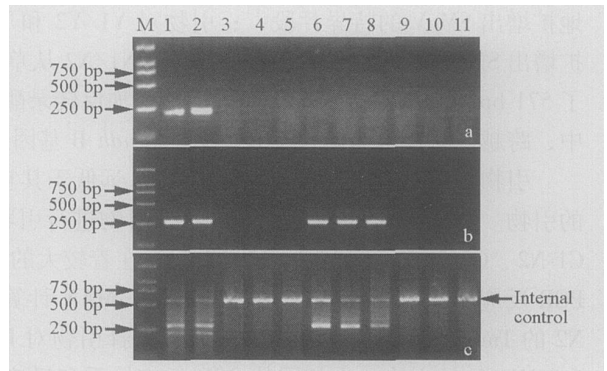


图 2 利用单一 PCR 和多重 PCR 检测草莓微茎尖组培苗
M: DNA marker DL2000; 1~11: 通过微茎尖培养获得的草莓品种宝交早生的 11 个株系。

a: 利用单一 PCR 检测 SMoV; b: 利用单一 PCR 检测 SMYEV;
c: 利用多重 PCR 检测 SMoV 和 SMYEV。

Fig. 2 Strawberry microplants arisen from mini shoot tip culture were screened for virus elimination by standard RT-PCR and multiplex RT-PCR

M: DNA marker DL2000; 1-11: Eleven lines obtained by mini shoot tip culture of strawberry cultivar 'Hokowase'; a: The detection of SMoV by standard RT-PCR; b: The detection of SMYEV by standard RT-PCR; c: The detection of SMoV and SMYEV by multiplex RT-PCR.

参考文献:

- 1 杨洪一, 张志宏, 杜国栋, 代红艳, 高秀岩. 利用内标为基础的 RT-PCR 技术检测草莓斑驳病毒. 植物病理学报, 2005, 35 (2): 116~122
Yang H Y, Zhang Z H, Du G D, Dai H Y, Gao X Y. RT-PCR detection Strawberry mottle virus based internal control Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35 (2): 116~122 (in Chinese)
- 2 杨洪一, 张志宏, 高秀岩, 杜国栋, 代红艳, 李 贺. 草莓轻型黄边病毒的 RT-PCR 检测及其 3' 端序列分析. 园艺学报, 2005, 32 (3): 403~407
Yang H Y, Zhang Z H, Gao X Y, Du G D, Dai H Y, Li H. Detection of Strawberry mild yellow edge virus with RT-PCR and analysis of the sequences of 3' terminal region Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (3): 403~407 (in Chinese)
- 3 Thompson J R, Wetzel S, Klerks M M, Vařkov á D, Schoen C D, Špak J, Jelkmann W. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control Journal of Virological Methods, 2003, 111 (2): 85~93
- 4 Thompson J R, Jelkmann W. Strain diversity and conserved genome elements in *Strawberry mild yellow edge virus* Archives of Virology, 2004, 149 (10): 1897~1909
- 5 Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, Vance G H, Vogt P H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol BioTechniques, 1997, 23 (3): 504~511
- 6 迪芬巴赫, 德维克斯勒. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 1998 88~119
Dieffenbach C W, Dveksler G S. PCR primer: a laboratory manual Beijing: Science Press, 1998 88~119 (in Chinese)
- 7 Bariana H S, Shannon A L, Chu P W G. Detection of five legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test Phytopathology, 1994, 84 (10): 1201~1205
- 8 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 高 宇, 冯继东, 孙 汉, 李 宁. 影响多重 PCR 扩增效果的因素. 遗传, 2003, 25 (1): 65~68
Huang Y H, Hu X X, Xu W Z, Gao Y, Feng J D, Sun H, Li N. The factors affecting the efficiency of multiplex PCR. Hereditas, 2003, 25 (1): 65~68 (in Chinese)