

研究报告

三重 RT-PCR 同步检测马铃薯多种病毒影响因素*

袁青¹ 王中康^{2**} 殷幼平² 夏玉先²(西南农业大学植保学院 重庆 400716)¹ (重庆大学生物工程学院 重庆 400044)²

摘要: 根据病毒外壳蛋白区序列设计 PVX、PVS 特异性引物对, 根据 PI 基因区序列设计 PVA 特异性引物对, 应用三重 RT-PCR 同步检测马铃薯 X 病毒, 马铃薯 A 病毒及马铃薯 S 病毒, 分别得到 562 bp、255 bp、182 bp 大小的扩增片段。试验从反转录反应、PCR 反应及循环条件 3 方面讨论了试剂和循环条件对三重 RT-PCR 同步检测 3 种病毒的影响。结果表明反转录反应中 dNTPs 浓度、3 种病毒下游引物浓度比例对整个反应影响较大; 其次是 PCR 反应中 MgCl₂ 浓度和退火温度; 反转录时间, 循环条件对 RT-PCR 影响较小。

关键词: RT-PCR, 多种病毒检测

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 05-0001-04

Multiplex RT-PCR: The Factors Affected Simultaneous Detection of Potato Viruses

YUAN Qing¹ WANG Zhong-Kang^{2**} YIN You-Ping² XIA Yu-Xian²(College of Plant Protection, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716)¹(College of Biotechnology, Chongqing University, Chongqing 400044)²

Abstract: A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (m-RT-PCR) was developed for the simultaneous detection of potato virus X, potato virus A and potato virus S. The primers for PVX (562bp) and PVS (182bp) fragments were designed based on the coat protein region and primers for PVA (255bp) based on the PI gene region. The factors of reagent concentrations, reaction conditions at reverse transcription stage (RT) and reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) stage to the detection were evaluated. The result showed that the dNTPs concentration, antisense primers ratios of three viruses at RT stage had a great impact on the detection performance, others were the MgCl₂ concentration and annealing temperature at PCR stage. While the reverse transcription time and PCR reaction condition had very little effect to the detection results.

Key words: RT-PCR, Multiplex viruses detection

马铃薯是全世界性的高产作物, 我国的种植面积居全世界第二位。马铃薯病毒病是马铃薯生产中一个重要的影响因素, 它严重影响了马铃薯的品质和产量。快速诊断马铃薯病毒病是种薯品质鉴定的重要内容。传统的病毒检测方法费时费力, 并且灵敏度不高, 以病毒抗血清为基础的免疫学方法虽然检测灵敏度有了提高, 但仍不足以检测含量极少的韧皮部病毒及休眠种薯中的病毒^[1]。RT-PCR 方法以其灵敏、快速、特异等优点在病毒的检测方面日益显示了强大的优势。在国内, 已经有单一 RT-PCR 检测

* 农业部全国疫情调查监测项目 (No. 农技植保 2002-110)

** 联系人 Tel: 023-66178808, E-mail: zkwang@cqu.edu.cn

收稿日期: 2003-09-20, 修回日期: 2003-10-30

PVY、PLRV 的应用^{2,3}。通过两年田间调查及分子检测发现在重庆、四川等地区, 马铃薯 X 病毒、马铃薯 A 病毒以及马铃薯 S 病毒往往复合侵染, 迫切需要经济方便的多重检测方法。但目前仅国外的 Rudra 讨论了二重 RT-PCR 反转录反应中试剂浓度对 PCR 的影响⁴。本研究设计了 3 种病毒的引物, 并从反转录反应、PCR 反应及循环条件等方面讨论了试剂和循环条件对 RT-PCR 的影响, 优化了反应条件, 设计的优化的三重 RT-PCR, 可以同时检测田间复合侵染的 3 种马铃薯病毒。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从田间采集感染有马铃薯 X 病毒、马铃薯 A 病毒和马铃薯 S 病毒的发病植株, 将 3 种病毒同时接种到防虫网室中种植的健康马铃薯植株上, PVA 采用蚜虫接种, PVX、PVS 采用摩擦接种, 分别以感染病毒的马铃薯叶片、叶梗、茎干、薯块为供试材料进行三重病毒病检测, 以防虫网室中未接种病毒的健康马铃薯为阴性对照。

1.2 病毒 RNA 的提取

病毒浸提液的制备: 将 Triton X-100 R 配成 0.5% 的溶液, 加入终浓度为 0.4% 的 Na_2SO_3 抑制马铃薯样品浸提过程中色素和多元酚的产生。

用 ϕ 5 cm 打孔器将罹病马铃薯叶片 (5~10 mg)、叶梗 (20~30 mg)、茎干 (20~30 mg) 或薯块 (40~50 mg) 打成圆片, 加入到 100 μL 病毒浸提液中, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中浸提 20 min 或室温放置 1 h, 移取上清, 离心 5 min (15,000 r/min, 微量台式离心机), 取上清液 (含有病毒总 RNA) 保存于 -20 $^\circ\text{C}$ 供试。

1.3 cDNA 的合成

根据病毒外壳蛋白区序列设计 PVX、PVS 特异性引物对, 根据 PI 基因区序列设计 PVA 特异性引物对 (见表 1)。cDNA 合成反应总体积为 10 μL /管, 反应试剂包括病毒总 RNA 2.5 μL , 1 \times MMLV 缓冲液 (Promega, 内含 3 mmol/L MgCl_2), 5 U RNA 酶抑制剂 (Promega), 50 U MMLV 反转录酶 (MMLV RT, Promega), dNTPs 分别选用 0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、1.2 mmol/L、1.5 mmol/L, 3 种病毒下游引物 PVX: PVA: PVS 分别选用 0.2: 1.2: 1.2、0.4: 1.0: 1.0、0.6: 0.8: 0.8、0.8: 0.6: 0.6、1.0: 0.4: 0.4、1.2: 0.2: 0.2。反转录程序是 25 $^\circ\text{C}$ 10 min, 42 $^\circ\text{C}$ 设 5 个时间梯度: 15 min、20 min、30 min、45 min、60 min, 95 $^\circ\text{C}$ 2 min; 扩增反应在 Icyler PCR 扩增仪 (Bio-Rad, USA) 中采用 Block 方式进行。

表 1 用于 RT-PCR 反应的 3 种马铃薯病毒引物对

靶病毒	引物序列	正反义	在基因组中的位置	扩增片段大小 (bp)
马铃薯 X 病毒	5'TAGCACAACACAGGCCACAG3'	正义	5664 ~ 5683	562
	5'GGCAGCAATTCATTTCAGCTTC3'	反义	6225 ~ 6205	
马铃薯 A 病毒	5'GTTGGAGAATTCAGATCCTGG3'	正义	183 ~ 204	255
	5'TTCTCTGCCACCTCATCG3'	反义	437 ~ 419	
马铃薯 S 病毒	5'TGGCGAACACCGAGCAAATG3'	正义	外壳蛋白区	182
	5'ATGATCGAGTCCAAGGGCACTG3'	反义	(Y 15623)	

1.4 PCR扩增

PCR反应总体积为25 μ L,取4 μ L合成的cDNA作为PCR反应模板。反应试剂包括1 \times Taq缓冲液(Promega),0.5 mmol/L dNTPs,2 U Taq酶(Promega),MgCl₂溶液分别加2.5 mmol/L、3.0 mmol/L、3.5 mmol/L、4.0 mmol/L、5.0 mmol/L;3种病毒引物对PVX:PVA:PVS为0.4:0.4:0.4,退火温度从55 $^{\circ}$ C设到62 $^{\circ}$ C;PCR反应条件是94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸时间设为30 s、1 min、2 min,共30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min;PCR反应在Icycler PCR扩增仪(Bio-Rad, USA)中进行。PCR反应结束后,取10 μ L扩增反应物加1 μ L含溴酚蓝的上样缓冲液,用2%的琼脂糖凝胶电泳检测,缓冲液为1 \times TAE,在100V条件下电泳30 min,溴化乙锭染色,凝胶成像系统(VersaDoc 2000)观察电泳结果并照相记录。

1.5 RT-PCR产物的克隆和测序

RT-PCR产物切胶回收后,按标准方法克隆到PMD18-T中(宝生物工程大连有限公司),PCR法筛选阳性菌落,提取质粒DNA,酶切验证后分别测序(上海申友生物技术有限公司)。

2 结果与分析

2.1 反转录(RT)

通过测试表明,优化后的三重RT-PCR可同时检测马铃薯X病毒、马铃薯A病毒和马铃薯S病毒。试验中RT-PCR分为两步,首先是反转录反应(RT)合成cDNA,然后将4 μ L cDNA进行PCR扩增。如果反转录没有合成cDNA或合成的较少,将直接影响到PCR扩增的效果,所以反转录反应显得尤为重要。影响反转录反应重要的因素是dNTPs浓度和3种病毒下游引物比例。如果dNTPs浓度不够,会影响PVA、PVS病毒RNA反转录合成cDNA,导致PCR扩增效果不好。从图1可以看出,如果dNTPs小于1.0 mmol/L,PVA、PVS扩增靶带很弱。当dNTPs增加至1.2 mmol/L,就合成了相当浓度的cDNA,PCR扩增效果较好。

在反转录反应中加入了3种马铃薯病毒下游引物,合成cDNA时,引物之间会相互竞争,所以应当协调好3种下游引物浓度比例。引物浓度比例不恰当,可能产生非特异性带或有些病毒扩增不出靶带或扩增的靶带较弱。试验表明,设计的几种引物浓度比例,效果较好的是PVX:PVA:PVS为0.4:1.0:1.0(资料未显示)。

2.2 聚合酶链式反应(PCR)

PCR阶段相对于RT对整个RT-PCR反应影响较小。PCR反应中较为重要的影响因素是MgCl₂浓度和退火温度。从图2可以看出,2.5 mmol/L MgCl₂相对较少,扩增不出靶带,效果较好的是3.5~4.0 mmol/L。退火温度从58 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C扩出的靶带效果较好,为了提高特异性,选用60 $^{\circ}$ C(图表未显示)。

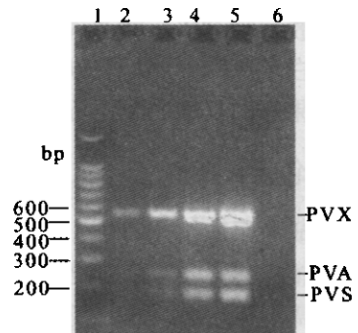


图1 RT反应中dNTPs浓度对RT-PCR的影响

1 100bp DNA marker, 2~5 反应中分别加入0.5mmol/L、1.0mmol/L、1.2mmol/L、1.5mmol/L dNTPs, 6 阴性对照

2.3 反应程序

反转录反应设计的反转录时间梯度, 从 20~60 min 都能反转录得到 cDNA, 从而扩增出靶带, 15 min 不足以产生足够的 cDNA, 扩增不出 PVX 靶带, 如图 3 所示。PCR 反应中, 延伸时间 30 s、1 min 和 2 min 都能扩增出靶带, 但考虑到 2 min 时间过长, 可能产生非特异性带, 所以选用 1 min。总的来说, 反应程序整个反应影响不大。

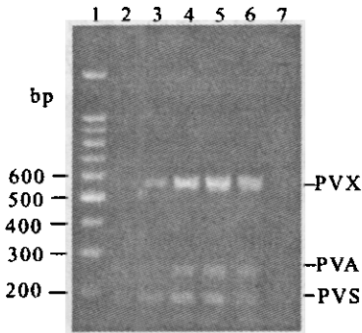


图2 PCR反应中 MgCl₂ 浓度对 RT-PCR 反应的影响

1 100bp DNA marker, 2~6 MgCl₂ 浓度分别为 2.5mmol/L, 3.0mmol/L, 3.5mmol/L, 4.0mmol/L, 5.0 mmol/L, 7 阴性对照

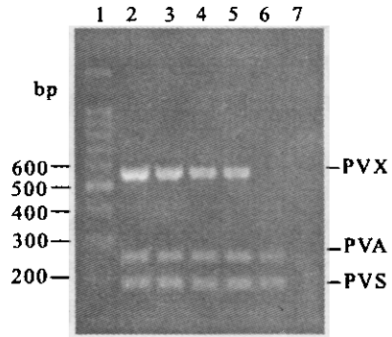


图3 RT-PCR 反转录时间梯度

1 100bp DNA marker, 2~6 反转录时间分别为 1h, 45min, 30min, 20min, 15min, 7 阴性对照

2.4 RT-PCR 产物的克隆及测序

切胶回收 PVX、PVA、PVS RT-PCR 产物, 克隆到 PMD18-T 载体中, 通过 PCR 验证得到的白色菌落分别含有以上几种病毒的 cDNA, 提取质粒测序, 经用 NCBI BLAST 比对, 结果表明扩增的 3 种马铃薯病毒靶带的序列与靶序列完全一致。

3 讨论

本研究采取快速简单、灵敏有效的浸提法提取马铃薯病毒 ssRNA, 与传统的酚/氯仿/异戊醇抽提, 异丙醇或乙醇沉淀提取方法相比较, 直接法操作步骤大为简化, 提取过程只需要 15~20 min, 直接以浸提液作为 RNA 模板, 就能得到很好的扩增效果, 为研制高效实用的快速检测试剂盒提供了一种简洁的制样方法。研究采用三重 RT-PCR 同时扩增 3 种病毒, 并从反转录、PCR 以及反应程序等 3 方面进行了条件优化。综合考虑各种影响因素, 能否反转录得到 cDNA 是 RT-PCR 反应的关键, 而反转录过程中的 dNTPs 和 3 种下游引物浓度比例对整个反应影响较大, 其他因素影响较小。与单重 RT-PCR 相比, 三重 RT-PCR 更适合于检测田间复合侵染的多种病毒, 可以缩短检测周期, 降低检测成本, 更有利于马铃薯种苗病毒实际检测。研究结果表明, 采用样品浸提法和优化的 RT-PCR 反应程序可以稳定性地检出田间自然感染的几种主要马铃薯病毒。

参考文献

[1] Hadidi A, Montasser M S, Levy L. Plant Disease, 1993, 77: 595~601.
 [2] 李浩戈, 吴远华, 赵秀香. 沈阳农业大学学报, 1999, 30 (3): 244~246.
 [3] 吴志明, 朱远芳, 张成良, 等. 河北农业大学学报, 2000, 23 (4): 77~79.
 [4] Rudra P, Singh X N, Mathuresh S. J Virol Meth, 2000, 99: 121~129.