

马铃薯病毒一步法多重 RT-PCR 检测技术的构建

董代幸¹ 张祥林² 罗明^{1*} 韩剑¹ 冯世强³ 唐德贤³ 岳仲海³

(1. 新疆农业大学农学院 新疆 乌鲁木齐 830052)

(2. 新疆出入境检验检疫局 新疆 乌鲁木齐 830063)

(3. 新疆乌鲁木齐县种子站 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: 根据马铃薯病毒 PVX、PVY、PVA、PLRV 的 CP 基因序列设计 4 对特异性引物, 通过对试剂浓度和反应条件进行优化, 建立了能够同步检测 PVX、PVY、PVA、PLRV 的一步法多重 RT-PCR 检测方法。该方法对 PVX、PVY、PVA、PLRV 扩增出的靶带大小分别为 732、422、132 和 336 bp, 凝胶电泳易辨别区分。病毒 RNA 最低检测限度为 7.8 pg/ μ L, 对 PVM、PVS、AMV、TMV 及 PSTVd 的扩增为阴性。研究表明, 该方法特异、灵敏, 比两步法多重 RT-PCR 检测更加快速、简便, 提高了检测效率, 降低检测成本, 为马铃薯病毒的高效检测提供了有效手段。

关键词: 一步法, 多重 RT-PCR, 病毒检测, 马铃薯

Development of one-step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four potato viruses

DONG Dai-Xing¹ ZHANG Xiang-Lin² LUO Ming^{1*} HAN Jian¹ FENG Shi-Qiang³
TANG De-Xian³ YUE Zhong-Hai³

(1. Agronomy College, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

(2. Xinjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi, Xinjiang 830063, China)

(3. The Seeds Station of Urumqi County, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: One-step multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (M-RT-PCR) was established and optimized for the simultaneous detection of potato virus X, potato virus Y, potato virus A and potato leafroll virus. The primers for PVX (732 bp), PVY (422 bp), PVA (132 bp) and PLRV (336 bp) fragments were designed based on viral coat protein gene. The sensitivity of detection was about 7.8 pg/ μ L RNA. No fragments were obtained from PVM, PVS, AMV, TMV and PSTVd. The results showed that it was a specific, sensitive detecting method and quicker, simpler, more efficient and cheaper than two-step multiple RT-PCR. It was provided an effective method of the detection for potato virus.

基金项目: 国家农业综合开发农业部良种繁育专项(农业部农计函 201080); 新疆乌鲁木齐县科学技术计划项目

* 通讯作者: ✉ luomingxjau@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-06-11; 接受日期: 2010-11-01

Keywords: One-step, Multiplex reverse transcription and polymerase chain reaction (M-RT-PCR), Virus detection, Potato

新疆是我国马铃薯的优势产区之一, 马铃薯在南北疆皆广泛种植, 产量高, 品质好, 素有“天山白玉”之美称, 是本地区重要的农作物品种。大力发展马铃薯产业, 对促进新疆农业经济结构的调整优化, 提高农业综合效益具有重要意义。当前在马铃薯生产中病毒病发生严重而普遍, 引起品种退化、品质下降, 是生产上亟待解决的突出问题。目前已报道的马铃薯病原病毒、类病毒达 40 多种, 其中危害严重的主要有马铃薯 A 病毒(PVA)、马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、马铃薯卷叶病毒(PLRV)、马铃薯潜隐花叶病毒(PVS)、马铃薯皱缩花叶病毒(PVM)及马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)等^[1-2], 在田间常常是几种病毒复合侵染, 使其危害加剧^[3-4]。采用茎尖培养技术生产的脱毒种薯排除了病毒的干扰, 从源头上杜绝病原, 能显著减轻病害, 保持优良种质, 是防控马铃薯病毒病、实施无公害生产的最为经济有效的措施。优质脱毒种薯繁育和推广是马铃薯产业持续健康、安全高效发展的重要保障, 而建立快速、灵敏、准确的马铃薯病毒检测技术是脱毒种薯生产的关键。

分子生物学检测法从核酸水平检测病毒, 因而灵敏度高、特异性强, 能克服血清学及其他检测方法中的一些缺点, 可以进行大批量的样本检测, 是目前发展最快、最有发展前景的病毒检测技术。如 RT-PCR、核酸杂交、双链 RNA (dsRNA)电泳、指示分子 NASBA^[5-7]、环介导等温扩增^[8]及基因芯片技术^[9]等在病毒检测中的应用日趋广泛。目前国内多采用单重 RT-PCR, 即在 1 个反应管中只能检测 1 种病毒。如要检测复合感染样品中的几种病毒, 则需进行数次 RT-PCR 反应, 不仅操作步骤繁琐、易造成交叉污染, 而且成本高、耗时长, 已不能满足现代生产的需求。本研究针对侵染新疆马铃薯的主要病原病毒 PVX、PVY、PVA 和 PLRV, 建立、优化了在同一反应管中同步检测 4 种病毒的一步法多重 RT-PCR 技术体系, 提高了检测的准确性和检测效率, 为马铃薯无病毒原种材料的筛选和培育, 种薯

调运的检疫检验, 实施病毒病害有效的防治措施提供科学基础和技术保障。

1 材料与方 法

1.1 毒源

从新疆乌鲁木齐县南郊三乡、104 团、西山农场等种薯、商品薯生产基地采集, 经鉴定为 PVX、PVY、PVA、PLRV 单独或复合感染的感病马铃薯叶片为阳性材料, 健康马铃薯叶片为阴性材料。

1.2 主要试剂

植物总 RNA 提取试剂盒(RNA-plant)、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (TIANGel Midi Purification Kit)、质粒小提试剂盒(TIANprep Mini Plasmid Kit)、RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor)、*Taq* DNA 聚合酶、氨苄青霉素、X-gal、IPTG、反转录酶(TIANScript M-MLV)、限制性内切酶 *EcoR* I 等均购自北京天根生化科技有限公司。

1.3 引物筛选与合成

根据文献报道及 GenBank 中公布的 PVX、PVY、PVA 和 PLRV 分离物的 *CP* 基因序列的保守片段, 并结合本实验室测定的各病毒乌鲁木齐分离物的 *CP* 基因序列, 分别设计了 4 对引物(表 1), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 总 RNA 的提取

采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。将感病、健康叶片组织在液氮中研磨成粉状, 取 0.1 g 加入 0.5 mL 提取试剂混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心。取上清加入 0.1 mL 5 mol/L NaCl 温和混匀, 加入 0.3 mL 氯仿混匀, 离心。上清加入等体积异丙醇沉淀 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心。弃上清, 加 1 mL 75%乙醇。离心后将所得 RNA 加入无 RNase 的 ddH₂O 水中溶解, -70 °C 保存。

1.5 两步法多重 RT-PCR 体系的建立

1.5.1 cDNA 合成: 以提取的各病毒总 RNA 为模板, 反转录合成病毒 cDNA 链。反转录反应体系为 20 μL: 总 RNA 1 μL, 反向引物(10 μmol/L)各 1 μL,

dNTPs (10 mmol/L) 2 μ L, M-MLV 反转录酶(200 U) 1 μ L, RNasin (40 U/ μ L) 0.5 μ L, DTT (0.1 mol/L) 1 μ L, 5 \times First-Strand Buffer 4 μ L, ddH₂O (经 DEPC 处理过) 补足至 20 μ L。反转录反应条件为: 42 $^{\circ}$ C 50 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min。

1.5.2 PCR 反应体系: 单一 PCR 反应体系: 反转录产物 1.5 μ L, 正向引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 反向引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 10 \times buffer (with Mg²⁺) 3 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, 补足去离子水至 25 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取 PCR 产物经 1.7%琼脂糖凝胶电泳检测。

多重 PCR 反应体系: 与单一体系相比, dNTPs (2.5 mmol/L)增加到 2.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L)增加到 0.8 μ L, 正向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 其他条件均相同。

1.6 一步法多重 RT-PCR 体系的构建及优化

1.6.1 检测体系的构建: 在已建立的两步法多重 RT-PCR 体系的基础上试验建立一步法多重 RT-PCR

体系。反应体系组成为: 各病毒 RNA 模板各 2 μ L, 正向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 5 \times First RT Buffer 5 μ L, 10 \times buffer (无 Mg²⁺) 2.5 μ L, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 2 μ L, M-MLV 反转录酶 (200 U/ μ L) 1 μ L, RNasin (40 U/ μ L) 0.5 μ L, 补足去离子水至 50 μ L。反应条件为: 42 $^{\circ}$ C 50 min; 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取 PCR 产物经 1.7%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6.2 体系优化: 对构建体系的主要影响因素 *Taq* 酶、M-MLV 反转录酶、Mg²⁺、dNTPs 浓度及退火温度进行实验、筛选, 每个影响因素设置 8 个梯度(表 2)。在此基础上选取效果最好的一组, 进一步对各病毒的引物浓度配比做四因素(PVX、PVY、PVA 和 PLRV)三水平(0.16、0.24、0.32 μ mol/L) L₉(3⁴)正交实验^[10], 获得优化后的反应体系。

1.7 一步法多重 RT-PCR 检测的特异性

以提取的马铃薯皱缩花叶病毒(PVM)、马铃薯

表 1 用于 RT-PCR 反应的马铃薯病毒引物对

Table 1 List of Primers pairs used for detection of potato viruses in RT-PCR

正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	目标片段
Sequence of forward primer	Sequence of reverse primer	Target fragment size (bp)
PVX-CP1: TCGGTTATGTAGACGTAGTTA	PVX-CP2: ATGTCAGCACCAGCTAGCACA	732
PVY-CP1: ACTCGGGCAACTCAATCACAG	PVY-CP2: GCGGCCTTCATTTGAATGT	422
PVA-CP1: TGTCGATTTAGTACTGCTGGGAC	PVA-CP2: TGCTTTGGTTTGTAAAGATAGCAAGTG	132
PLRV-CP1: CGCGCTAACAGAGTTCAGCC	PLRV-CP2: GCAATGGGGGTCCAATCAT	336

表 2 *Taq* 酶、M-MLV 反转录酶、Mg²⁺、dNTPs 浓度及退火温度梯度

Table 2 The concentrations gradient of *Taq* DNA polymerase, M-MLV reverse transcriptase, Mg²⁺, dNTPs and annealing temperature

<i>Taq</i> 酶	M-MLV 反转录酶	Mg ²⁺ (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	退火温度 ($^{\circ}$ C)
<i>Taq</i> DNA polymerase (U/ μ L)	M-MLV reverse transcriptase (U/ μ L)			Annealing temperature
0.5	40	0.3	0.04	50
1.0	80	0.4	0.12	52
2.0	120	0.5	0.20	54
3.0	160	0.6	0.28	56
4.0	200	0.7	0.36	58
5.0	240	0.8	0.44	60
6.0	280	0.9	0.52	62
7.0	320	1.0	0.60	64

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

潜隐花叶病毒(PVS)、苜蓿花叶病毒(AMV)、烟草花叶病毒(TMV)及马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的RNA为模板,以设计的PVX、PVY、PVA和PLRV特异性引物进行多重RT-PCR扩增,以检测体系的特异性。

1.8 一步法和两步法多重RT-PCR检测的灵敏度比较

用ND1000核酸检测仪测定PVX、PVY、PVA和PLRV的RNA浓度,混合并作10倍系列稀释,用一步法和两步法多重RT-PCR检测,比较两种体系的灵敏度。

1.9 RT-PCR产物的克隆与测序

将RT-PCR扩增产物中各病毒对应的特异性条带切胶,用普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收、纯化。回收的RT-PCR产物与载体按pGM-T反应体系在16℃下过夜连接。取连接产物转化*E. coli* TOP10感受态细胞,涂布于含Amp(100 mg/L)、X-Gal(20 g/L)和IPTG(50 g/L)的LB培养基平板上,37℃培养14-16 h,4℃放置数小时后进行蓝白斑筛选。将筛选出的阳性单菌落接种于含Amp(50 mg/L) LB液体培养基中,37℃培养过夜。提取阳性克隆质粒,*EcoR*I酶切鉴定后,提交上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 引物对适用性检测

用筛选的PVX、PVY、PLRV和PVA引物分别对相应病毒的RNA模板进行单重RT-PCR扩增,分别能够扩增出732、422、336和132 bp特异性单一条带,与相应病毒的理论预期值一致。将4对引物混合在同一个反应体系中,分别以2种、3种、4种病毒的RNA作模板,均能够同时扩增出对应的特异条带,无杂带出现,而阴性和空白对照样品则无扩增条带出现,由此说明这4对引物特异性好,无交叉和相互干扰现象,适合多重检测。

2.2 一步法多重RT-PCR体系的优化结果

在本实验建立的两步法多重RT-PCR检测体系的基础上,进一步构建一步法多重RT-PCR体系,对主要影响因素Taq酶、M-MLV反转录酶、Mg²⁺、

dNTPs浓度及退火温度进行实验、筛选,以获得更加灵敏、准确、经济的扩增反应优化体系。

2.2.1 Taq酶浓度的影响:如图1所示,随着Taq酶浓度的增加目标条带逐渐变亮,当达到5 U/μL时已出现清晰条带。从节约成本角度考虑,Taq酶用量可选用5 U/μL。

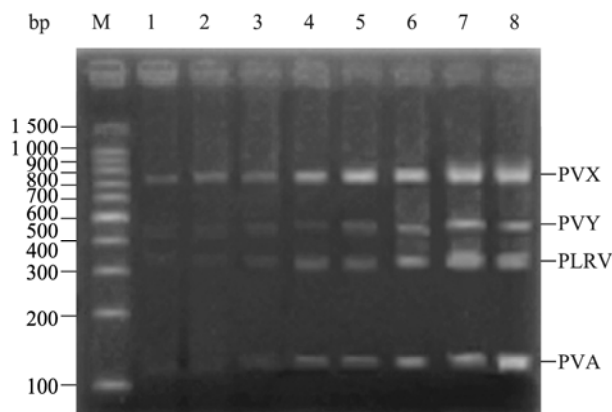


图1 Taq酶浓度对多重RT-PCR扩增的影响

Fig. 1 Effect of Taq DNA polymerase concentration on multiplex RT-PCR amplification

Note: M: 100 bp DNA marker; 1-8: PCR products of Taq DNA polymerase concentration, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 U/μL, respectively.

2.2.2 M-MLV反转录酶浓度的影响:如图2所示,从80 U/μL开始有条带出现,至160 U/μL时条带清晰。因此确定160 U/μL为最佳用量。

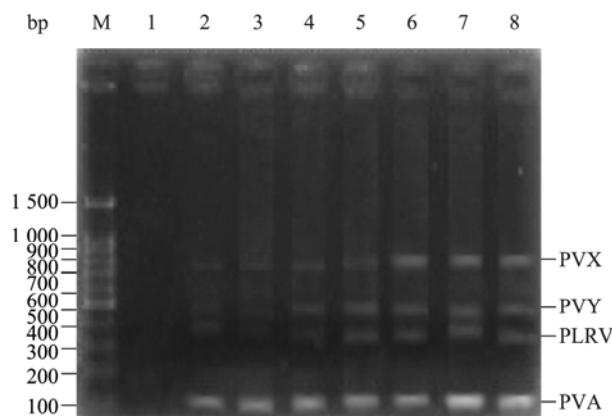


图2 M-MLV反转录酶浓度对多重RT-PCR扩增的影响

Fig. 2 Effect of M-MLV reverse transcriptase concentration on multiplex RT-PCR amplification

Note: M: 100 bp DNA marker; 1-8: PCR products of M-MLV reverse transcriptase concentration of 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 U/μL, respectively.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

2.2.3 Mg^{2+} 浓度的影响: 随着 Mg^{2+} 用量的增加, 扩增条带的亮度也随之增强(图3), 在泳道6达到最亮; 随着 Mg^{2+} 用量进一步加大, 泳道7开始出现非特异性条带, 之后随着浓度增加泳道8中条带出现严重拖尾, 因此确定最佳浓度 Mg^{2+} 是 0.8 mmol/L。

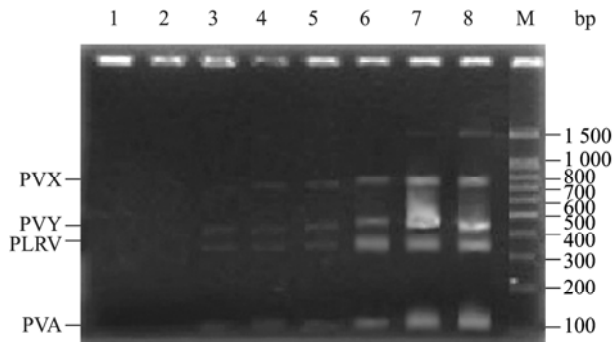


图3 Mg^{2+} 浓度对多重 RT-PCR 扩增的影响

Fig. 3 Effect of Mg^{2+} concentration on multiplex RT-PCR amplification

Note: M: 100 bp DNA marker; 1-8: PCR products of Mg^{2+} concentration, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 mmol/L, respectively.

2.2.4 dNTPs 浓度的影响: 如图4所示, 在 dNTPs 浓度 0.04–0.60 mmol/L 范围内, 随着 dNTPs 用量的增加, 条带亮度逐渐增强, 0.36 mmol/L 达到最强; 之后随着 dNTPs 浓度增加, 引物二聚体也越来越多。因此, 最佳 dNTPs 用量是 0.36 mmol/L。

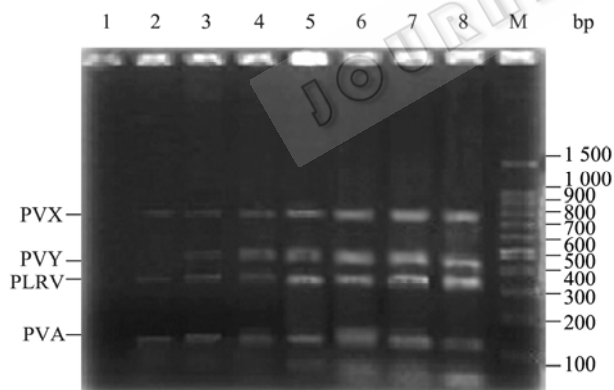


图4 dNTPs 浓度对多重 RT-PCR 扩增的影响

Fig. 4 Effect of dNTPs concentration on multiplex RT-PCR amplification

Note: M: 100 bp DNA marker; 1-8: Amplification products of dNTPs concentration, 0.04, 0.12, 0.20, 0.28, 0.36, 0.44, 0.52, 0.60 mmol/L, respectively.

2.2.5 退火温度的影响: 在 50 °C–64 °C 的退火温度范围内, 54 °C–60 °C 都有扩增产物, 62 °C 没有扩增条带。在 58 °C 时扩增的 4 条条带均比较清晰(图5), 因此选定最佳退火温度为 58 °C。

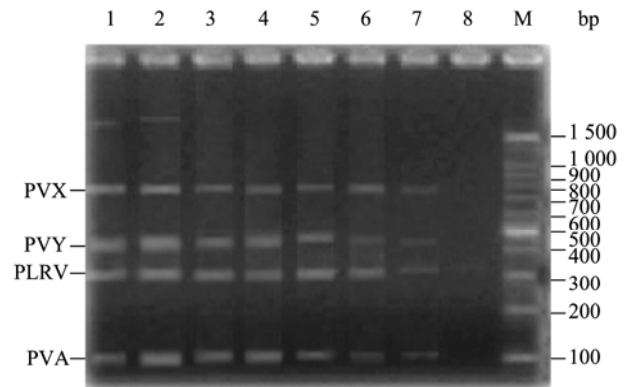


图5 退火温度对多重 RT-PCR 扩增的影响

Fig. 5 Effect of annealing temperature on multiplex RT-PCR amplification

Note: M: 100 bp DNA marker; 1-8: PCR products of annealing temperature, 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C, 64 °C, respectively.

2.2.6 引物浓度的影响: 经过筛选优化后, 4 种检测病毒 PVX、PVY、PVA 和 PLRV 的最佳正、反向引物浓度比例是 0.24:0.32:0.16:0.24 或 0.24:0.24:0.16:0.32。

2.3 一步法多重 RT-PCR 检测的特异性

以提取的马铃薯皱缩花叶病毒(PVM)、马铃薯潜隐花叶病毒(PVS)、苜蓿花叶病毒(AMV)、烟草花叶病毒(TMV)及马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的 RNA 作模板, 利用研究建立的多重 RT-PCR 体系进行检测。结果显示, 除阳性对照外, 其余均未扩增出特异性条带, 说明本检测体系特异性强, 与其他病毒无交叉反应。

2.4 一步法多重 RT-PCR 检测灵敏度

一步法多重 RT-PCR 最低限度为可以从最低稀释至 7.8 μ g/L(稀释浓度为 10^6)的植物叶片总 RNA 中扩增出预期产物(图7), 灵敏度明显高于单重 RT-PCR(检测下限为 139 μ g/L), 也比两步法多重 RT-PCR 高(检测下限为 78 μ g/L)。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

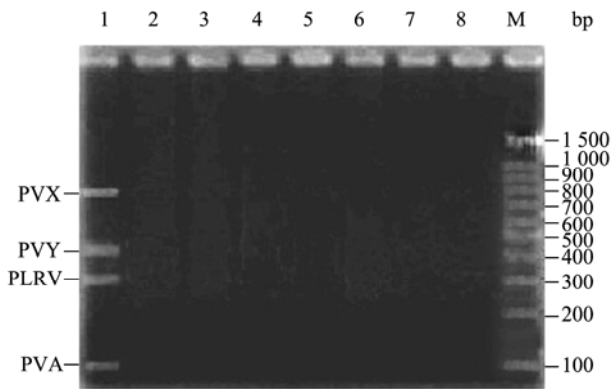


图 6 多重 RT-PCR 特异性检测

Fig. 6 The specificity of the multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four potato viruses

Note: M: 100 bp DNA marker; 1: PCR product of mixture RNA templates of PVX, PVY, PVA, PLRV; 2-6: PCR product of RNA templates of PMV, PVS, AMV, TMV and PSTVd, respectively; 7: negative control of only adding ddH₂O; 8: Negative control of only adding primers.

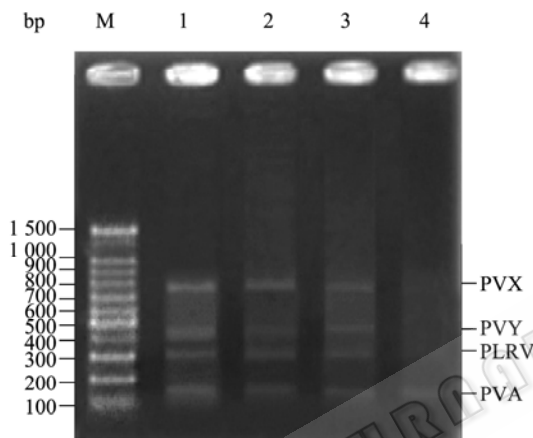


图 7 一步法和两步法多重 RT-PCR 灵敏度检测

Fig. 7 Sensitivity analysis of one-step M-RT-PCR and two-step M-RT-PCR

Note: M: 100 bp DNA marker; 1-2: PCR products of RNA dilution in one-step RT-PCR, 78, 7.8 μg/L, respectively; 3-4: PCR products of RNA dilution, 78, 7.8 μg/L in two-step RT-PCR, respectively.

2.5 RT-PCR 产物的克隆及测序

将回收的 PVX、PVY、PVA 和 PLRV 的 RT-PCR 产物克隆到 pGM-T 载体中, 提取阳性克隆质粒进行序列测定, 经用 NCBI 的 BLAST 程序比对, 结果表明, 扩增的 4 种马铃薯病毒序列与已报道序列的同源性达到 95% 以上。

2.6 马铃薯样品的实际检测结果

采用本研究建立的检测技术, 对来自乌鲁木齐

及周边地区马铃薯生产区的试管苗、种薯、田间及网室植株共 58 个样品提取总 RNA 进行多重 RT-PCR 检测, 同时设置阳性和阴性质控。结果显示有 5 个样品同时检出 PVY、PVA 和 PLRV, 7 个样品检出 PVY、PVX, 13 个样检出 PVY, 20 个样品检出 PVX, 2 个检出 PVX, 1 个检出 PVA, 3 个有症状样未检出病毒, 有可能为其他病毒侵染, 无症状样品 10 份。实际检测应用的结果证明, 该技术能有效检测出带病毒的样品, 可靠性、稳定性良好。

3 讨论

(1) 多重 RT-PCR 是在一个反应体系中加入多对引物, 能同时扩增多个目的片段。与单一 PCR 相比, 多重 PCR 具有高效、高产率、能降低实验成本等优点, 在植物病毒检测中具有突出的优势^[11]。多重 RT-PCR 受到许多因素的影响, 建立一个多重 RT-PCR 方法要比单重 RT-PCR 方法复杂得多。多重 RT-PCR 的引物设计要避免各个引物对之间的相互干扰和各目的片段之间的非特异性扩增; 要保证各个引物有相近的退火温度, 使各目的片段有相近的扩增效率, 同时其灵敏度要达到或接近单重 RT-PCR 的水平^[12-13], 因此建立多重 RT-PCR 方法时需对体系中各种参数进行优化。引物的特异性是多重 RT-PCR 检测成功的关键。本研究针对 PVX、PVY、PVA 和 PLRV 的 CP 基因的高度保守区设计的 4 对引物, 相互之间及与其他病毒之间均无同源性, GC% 含量、T_m 值相近, 扩增靶带大小适中, 凝胶电泳易辨别区分, 避免了引物之间因序列互补而形成二聚体, 从而保证了引物的特异性。各引物对的浓度比例也是一个重要的影响因素, 比例不当可能导致某些靶病毒扩增不出来或产生非特异性 DNA 条带。经过试验优化后, 4 种检测病毒的正、反向引物浓度比例为 PVX : PVY : PVA : PLRV 为 0.24 : 0.32 : 0.16 : 0.24 或 0.24 : 0.24 : 0.16 : 0.32。由于检测体系中的 RNA 酶抑制剂价格昂贵, 祁骥^[14]等在体系中不加入该抑制剂。本试验参照其方法但扩增效果不佳, 通过试验筛选获得了既能得到理想的扩增效果又能降低检测成本的 RNA 酶抑制剂添

加浓度。同时本研究还从 *Taq* 酶、M-MLV 反转录酶、 Mg^{2+} 、dNTPs 浓度及退火温度等方面进行多轮筛选, 获得了具有高特异性和灵敏性的检测体系。

(2) 现有的多重 RT-PCR 检测中较多采用的是两步法, 如王中康^[15]研究建立的对马铃薯种苗 5 种病毒的两步法多重 RT-PCR 检测, 肖远辉针对柑橘衰退病毒(CTV)、柑橘裂皮病类病毒(CEVd)、柑橘碎叶病毒(CTLV)建立了以 oligo(dT)为反转录引物的两步法三重 RT-PCR 检测体系^[16]。两步法 RT-PCR 在两个体系中由逆转录酶和 *Taq* 酶分别催化下由 RNA 反转录为 cDNA, 再以模板 cDNA 进行 PCR 扩增, 操作步骤较为繁琐、成本高, 易造成交叉污染, 出现假阳性。为了提高马铃薯复合感染病毒的检测效率, 本试验研究建立了能使 PVX、PVY、PVA 和 PLRV 4 种马铃薯病毒的反转录和 PCR 扩增在同一反应管中、同一反应条件下完成的一步法多重 RT-PCR 反应体系, 使检测灵敏度达到 $7.8 \mu\text{g/L}$, 比两步法提高了 10 倍。检测时间从样品 RNA 提取到获得结果约需 3 h, 更加快速简便, 大大提高了检测效率, 降低检测成本, 为马铃薯病毒的快速诊断提供了有效手段。目前关于一步法多重 RT-PCR 的研究还鲜见报道, 对马铃薯 PVX、PVY、PVA 和 PLRV 病毒的一步法多重 RT-PCR 检测未见报道。

(3) 本研究中发现一步法多重 RT-PCR 检测复合感染样品时, 若检测模板中几种病毒 RNA 浓度相差较大时, 高浓度模板对低浓度模板会产生一定干扰现象。低浓度模板会因为高浓度模板竞争 dNTPs、*Taq* 酶等而使结果呈假阴性。为了避免此现象的发生, 还需进一步调整引物对的比例。

(4) 在研究建立对马铃薯 PVX、PVY、PVA 和 PLRV 同步检测的一步法多重 RT-PCR 体系的基础上, 将进一步研究开发适合生产中大批样品快速检测的固相化试剂盒, 使马铃薯病毒检测更加规范化和标准化。

参 考 文 献

- [1] 关翠萍, 张鹤龄, 门福义, 等. 马铃薯病毒一步法 RT-PCR 诊断研究[J]. 内蒙古大学学报, 2005, 36(2): 178-185.
- [2] 白艳菊, 文景芝, 杨明秀, 等. 西南地区与东北地区马铃薯主要病毒发生比较[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(6): 733-736.
- [3] Agindotan BO, Shiel PJ, Berger PH. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 142(1/2): 1-9.
- [4] Bostan H, Guclu C, Ozturk E, et al. Influence of aphids on the epidemiology of potato virus diseases (PVY, PVS and PLRV) in the High Altitude Areas of Turkey[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2006, 9(4): 759-765.
- [5] 刘在东, 于德才, 白艳菊, 等. 马铃薯 Y 病毒一步 RT-PCR 检测试剂盒的研制[J]. 中国马铃薯, 2008, 22(1): 9-13.
- [6] 袁青, 殷幼平, 王中康, 等. 二重 RT-PCR 快速检测马铃薯病毒的方法[J]. 植物检疫, 2005, 19(3): 135-138.
- [7] 李入贤, 张文龙, 施文娟. 马铃薯脱毒种薯(苗)病毒检测技术研究进展[J]. 种子, 2009, 28(4): 60-62.
- [8] Hussain K, Mushtaq F, Afroza B, et al. Review on detection of potato viruses[J]. International Journal of Tropical Agriculture, 2008, 26(1/2): 83-88.
- [9] 谷宇, 杜志游, 郎秋蕾, 等. 用反转录标记法制备马铃薯病毒的检测芯片[J]. 植物检疫, 2009, 23(5): 5-8.
- [10] 易道生, 娄高明. 二重正交设计用于多重 PCR 条件优化[J]. 韶关学院学报, 2007, 28(12): 75-79.
- [11] 郑耘, 陈枝楠, 陈富华, 等. 侵染唐菖蒲和百合 3 种病毒的多重 RT-PCR 检测方法[J]. 植物检疫, 2010, 24(3): 19-22.
- [12] 侯义宏, 林祥梅, 张晓臣, 等. 禽流感病毒 4 个亚型一步法多重 RT-PCR 检测方法研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(8): 29-33.
- [13] Huang C, Hung JJ, Wu CY, et al. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses[J]. Veterinary Microbiology, 2004, 101(3): 209-214.
- [14] 祁骥. 马铃薯病毒检测的研究及其试剂盒的开发[D]. 南开大学硕士学位论文, 2004.
- [15] 王中康, 夏玉先, 袁青, 等. 马铃薯种苗复合感染病毒多重 RT-PCR 同步快速检测[J]. 植物病理学报, 2005, 35(2): 109-115.
- [16] 肖远辉, 曾继吾, 张秋明, 等. 柑橘衰退病、裂皮病和碎叶病的多重 RT-PCR 检测方法研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 31-35.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>