

张永江,辛言言,李桂芬,等. 实时荧光 RT-PCR 方法检测马铃薯 V 病毒[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):36-38.

# 实时荧光 RT-PCR 方法检测马铃薯 V 病毒

张永江<sup>1</sup>, 辛言言<sup>1</sup>, 李桂芬<sup>1</sup>, 马 洁<sup>1</sup>, 魏梅生<sup>1</sup>, 朱水芳<sup>1</sup>, 沈建国<sup>2</sup>

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100029; 2. 福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建福州 350001)

**摘要:**为了给马铃薯 V 病毒提供快速灵敏的检测技术以防止其传播扩散,根据其外壳蛋白基因核苷酸保守序列设计引物和 TaqMan 探针,通过特异性及灵敏度试验建立该病毒的实时荧光 RT-PCR 检测方法。该方法检测灵敏度高,至少可检测到 36 pg/μL 的总 RNA;对马铃薯 V 病毒、马铃薯 Y 病毒、马铃薯 A 病毒、李痘病毒及马铃薯 X 病毒具有良好的特异性。该方法快速、灵敏、无需任何 PCR 后处理且交叉污染风险小,可用于马铃薯 V 病毒的快速检测。

**关键词:**马铃薯 V 病毒;实时荧光 RT-PCR 方法;检测

**中图分类号:** S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0036-02

马铃薯 V 病毒为马铃薯 Y 病毒科马铃薯 Y 病毒属成员<sup>[1]</sup>。目前,该病毒主要分布在欧洲的法国、德国、荷兰、爱尔兰、英国以及南美洲的玻利维亚高原和秘鲁等地区,自然寄主包括马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 和番茄 (*Lycopersicon esculentum*),可通过机械接种、嫁接及蚜虫传播<sup>[2-3]</sup>,受侵染马铃薯表现轻或较重的花叶、叶背生绿斑或环,部分叶脉坏死,对马铃薯的生产构成严重威胁<sup>[4]</sup>,被我国政府列为进境检疫性有害生物。随着马铃薯产业的不断发展,我国已成为世界上第一大马铃薯生产国,在生产和科研中引进相关繁殖材料的频率越来越高,该病毒随之传入的可能性也越来越大,因此需要建立快速灵敏的检测技术来加强检疫,以防止该病毒的传入扩散。马铃薯 V 病毒可通过生物学接种方法进行检测,如接种在番茄、德氏烟 (*Nicotiana debneyi*) 或马铃薯野生种 A 上,可分别产生系统脉明、褪绿斑、花叶或环斑及系统坏死的症状,可通过商业化的抗体进行血清学 (ELISA) 方法检测。在测定基因组序列后<sup>[5]</sup>,Carl 设计了一对寡核苷酸引物用于 RT-PCR 检测马铃薯 V 病毒<sup>[6]</sup>。刘梅等则研究了一种双启动寡核苷酸引物 (dual priming oligonucleotide, DPO) 技术,可同时检测包括马铃薯 V 病毒在内的 5 种马铃薯病毒<sup>[7]</sup>。近年来,出现的实时荧光 RT-PCR (real-time fluorescent PCR) 技术是在 PCR 反应过程中加入荧光基团,利用荧光信号的积累实时检测 PCR 产物的生成,从而判断是否存在目标物的技术。该技术灵敏快速、实时、无交叉污染且不需要进行电泳检测,因此被迅速应用于植物病毒和类病毒如黄瓜绿斑驳花叶病毒<sup>[8]</sup>、李痘病毒<sup>[9]</sup>、香石竹环斑病毒<sup>[10]</sup>、玉米褪绿斑驳病毒<sup>[11]</sup>、啤酒花潜隐类病毒<sup>[12]</sup>、菜豆荚斑驳病毒<sup>[13]</sup>、小麦线条花叶病毒<sup>[14]</sup>、苹果茎沟病毒<sup>[15]</sup>及辣椒轻斑驳病毒<sup>[16]</sup>等的检测鉴定;但目前还没有关于该方法检测马铃薯 V 病毒的报道,因此,本研究以马铃薯 V 病毒外壳蛋白基因的保守序列设计特异性引物和探针,通过试验建立马铃薯 V 病毒的实时荧光 RT-PCR 检测技术,以便为马铃薯繁殖材料的快速检测

提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试材料 马铃薯 V 病毒、马铃薯 Y 病毒、马铃薯 A 病毒、李痘病毒及马铃薯 X 病毒阳性材料由中国检验检疫科学研究院植物检疫研究所实验室保存。

1.1.2 试剂与仪器 M-MLV 及 RNasin 为普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司的产品;核酸提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;GoldStar TaqMan Mixture 试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 为 TaKaRa 产品;荧光定量 PCR 仪为 Roche Light Cycler 480 II 型。

1.1.3 引物与探针 TaqMan 探针和引物根据马铃薯 V 病毒外壳蛋白基因保守序列设计,由 Invitrogen 公司合成,扩增产物长度约为 164 bp,序列如下:马铃薯 V 病毒 F:5'-CGG-TATGTTTGGTGAGAAATTTGC-3',马铃薯 V 病毒 R:5'-ACCATCCAATCCAAACAAGCGAGT-3',马铃薯 V 病毒 P:5'-FAM-TCCCCGCACATCCGTCCGAGCAC-TAMRA-3'。

### 1.2 试验方法

1.2.1 核酸提取 分别称取马铃薯 V 病毒、马铃薯 Y 病毒、马铃薯 A 病毒、李痘病毒及马铃薯 X 病毒的阳性材料 0.1 g,用核酸提取试剂盒提取样品总 RNA,具体操作按说明进行。

1.2.2 普通 RT-PCR 检测 取马铃薯 V 病毒的总 RNA,按 5<sup>1</sup>~5<sup>7</sup> 倍梯度稀释后用作模板进行普通 RT-PCR 灵敏度试验。反转录 (RT) 反应如下所示:0.2 mL PCR 管中加入 1 L 总 RNA、1 L 10 mmol/L dNTP Mixture、10 L DEPC-H<sub>2</sub>O、2 L 10 μmol/L 马铃薯 V 病毒 R、70 ℃ 保温 5 min,冰上放置 5 min;再加入 4 L 5 × buffer、1 L 40 U/μL RNasin、1 L 200 U/μL M-MLV、42 ℃ 保温 1 h,得到 cDNA 后用作 PCR 的模板。PCR 反应体系如下所示:10 × PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2 μL,10 mmol/L dNTP Mixture 0.6 μL,10 μmol/L 马铃薯 V 病毒 F 及 10 μmol/L 马铃薯 V 病毒 R 各 0.5 μL,2 U/μL Taq 酶 1 μL,模板 2 μL 和 DEPC-H<sub>2</sub>O 13.4 μL。PCR 反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 8 min。反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,

收稿日期:2012-12-04

基金项目:科技部质检公益性行业科研专项 (编号:201010256)

作者简介:张永江 (1977—),男,山东潍坊人,博士,副研究员,从事植物检疫工作。Tel: (010)85393944;E-mail: zhangyjipvi@yeah.net。

根据不同浓度稀释样品目的条带判断该方法检测的灵敏度。

**1.2.3 实时荧光 RT-PCR 检测** 以 5 种病毒的总 RNA 为模板进行特异性试验。取马铃薯 V 病毒的总 RNA,按  $5^1 \sim 5^7$  梯度稀释后用作模板进行灵敏度试验。反应体系:  $2 \times$  One Step RT-PCR Buffer III  $10 \mu\text{L}$ ,  $5 \text{ U}/\mu\text{L}$  Ex TaqHS (TaKaRa)  $0.4 \mu\text{L}$ , PrimeScript RT Enzyme Mix II  $0.4 \mu\text{L}$ , ROX Reference Dye II ( $50 \times$ )  $0.4 \mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{mol/L}$  马铃薯 V 病毒 F 及  $10 \mu\text{mol/L}$  马铃薯 V 病毒 R 各  $0.4 \mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{mol/L}$  马铃薯 V 病毒 P  $0.6 \mu\text{L}$ , 模板  $2 \mu\text{L}$ , DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  补至  $20 \mu\text{L}$ 。反应程序:  $42^\circ\text{C}$   $10 \text{ min}$ ;  $95^\circ\text{C}$   $10 \text{ s}$ ;  $95^\circ\text{C}$   $10 \text{ s}$ ,  $62^\circ\text{C}$   $60 \text{ s}$ , 40 个循环。反应结束后,由荧光定量 PCR 仪自带软件对结果进行分析,根据 5 种病毒能否生成扩增曲线判断该方法的特异性;根据不同浓度稀释样品检测的  $C_T$  判断该方法检测的灵敏度。

## 2 结果与分析

### 2.1 实时荧光 RT-PCR 特异性试验

图 1 表明,只有马铃薯 V 病毒的模板能够扩增出典型的曲线,其  $C_T$  为 18,而其他 4 种参试病毒的模板均无典型扩增曲线,结果与预期相符,说明引物与荧光探针针对马铃薯 V 病毒具有良好的特异性。图 2 也显示,只有马铃薯 V 病毒的模板可以扩增出  $164 \text{ bp}$  的特异性条带,而其他 4 种病毒的模板和空白对照中均未有扩增产物,进一步说明本研究设计的引物与荧光探针针对马铃薯 V 病毒具有非常好的特异性。

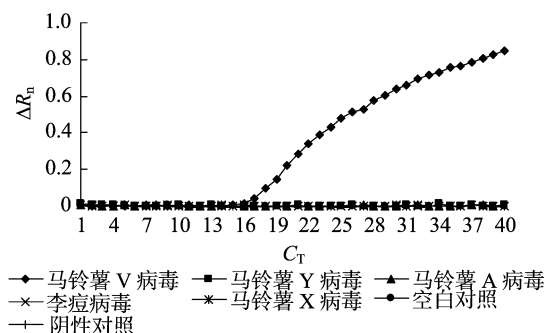
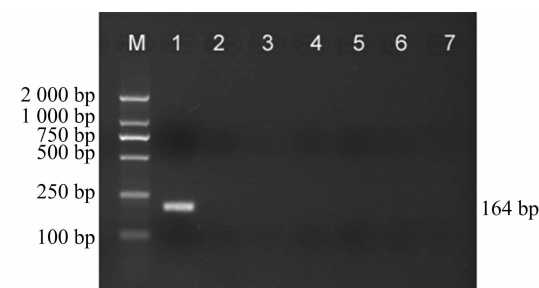


图1 实时荧光RT-PCR特异性扩增曲线



M—分子量标准; 1—马铃薯 V 病毒; 2—马铃薯 Y 病毒; 3—马铃薯 A 病毒; 4—李痘病毒; 5—马铃薯 X 病毒; 6—空白对照; 7—阴性对照

图2 实时荧光RT-PCR扩增产物凝胶电泳结果

### 2.2 实时荧光 RT-PCR 灵敏度试验

由图 3 可知,按  $5^1 \sim 5^7$  倍稀释后的马铃薯 V 病毒样品经实时荧光 RT-PCR 检测得到  $C_T$ , 分别是 15.8、17.9、20.4、22.7、24.9、27.6、30, 所对应的总 RNA 浓度分别是 565、113、22.6、4.5、0.9、0.18、0.036  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。普通 RT-PCR 产物经

1% 琼脂糖凝胶电泳监测结果(图 4)显示,  $5^1 \sim 5^7$  倍稀释梯度的样本均可扩增出约  $164 \text{ bp}$  的目的条带(图 2-B), 与实时荧光 RT-PCR 扩增曲线结果(图 3)一致。说明实时荧光 RT-PCR 至少可检测到浓度为  $36 \text{ pg}/\mu\text{L}$  的总 RNA。

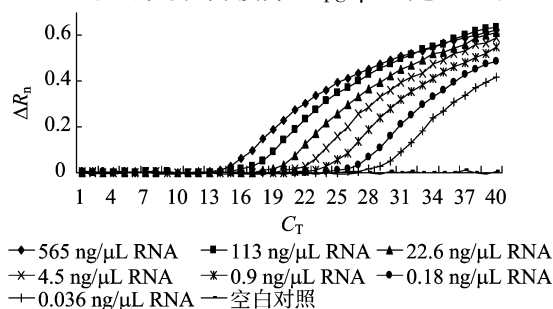
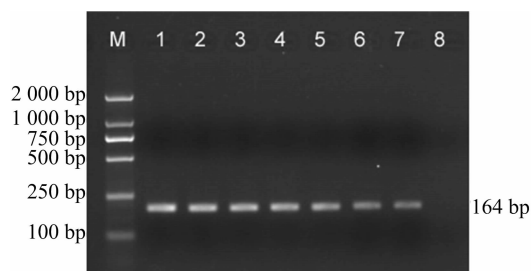


图3 实时荧光RT-PCR灵敏度结果



M—分子量标准; 1~7—模板稀释的7个梯度, 稀释倍数分别为  $5^1$ 、 $5^2$ 、 $5^3$ 、 $5^4$ 、 $5^5$ 、 $5^6$ 、 $5^7$ ; 8—空白对照

图4 普通RT-PCR灵敏度结果

## 3 结论与讨论

马铃薯 V 病毒为我国进境检疫对象,由于其可通过种薯等繁殖材料进行远距离传播,在田间则可通过蚜虫进行非持久性传毒扩散,因此对马铃薯的生产威胁很大。为了提高马铃薯繁殖材料中该病毒的检出率,本研究根据马铃薯 V 病毒外壳蛋白基因区域编码序列,设计特异性 TaqMan 荧光探针,建立了该病毒的实时荧光 RT-PCR 检测方法。为了评估该方法的特异性,笔者选择了均可侵染马铃薯的 5 种病毒(马铃薯 V 病毒、马铃薯 Y 病毒、马铃薯 A 病毒、李痘病毒及马铃薯 X 病毒),同时进行荧光 RT-PCR 检测,结果表明只有感染马铃薯 V 病毒的样本呈阳性,而其他 4 种病毒都没有检测信号,说明设计的探针具有很好的特异性。实时荧光 RT-PCR 技术具有很高的灵敏度,可检测到  $40 \sim 50$  拷贝的病毒 RNA<sup>[8,17]</sup>。本研究中的方法至少可检测到  $36 \text{ pg}/\mu\text{L}$  总 RNA,具有较高的灵敏度;同时实时荧光 RT-PCR 方法具有快速的特点,可以大大缩短检测时间,对马铃薯 V 病毒实现灵敏快速的检测,满足检验检疫的需要,从而防止该病毒的传入扩散,进而保护我国的马铃薯生产。

### 参考文献:

- [1] King A M Q, Lefkowitz E, Adams M J, et al. Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2011: 1076.
- [2] 姚文国, 崔茂森. 马铃薯有害生物及其检疫[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 234-235.

丁锦平. 棉花病毒诱导基因沉默体系构建[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 38–40.

# 棉花病毒诱导基因沉默体系构建

丁锦平

(商丘师范学院生命科学院/商丘师范学院植物与微生物互作重点实验室, 河南商丘 476000)

**摘要:**探索了病毒诱导基因沉默载体在棉花上的应用, 由烟草脆裂病毒 (TRV) 改造的 pTV00 载体, 构建了棉花标记 *PDS* 基因病毒诱导基因沉默的载体, 成功建立了棉花病毒诱导基因沉默体系。

**关键词:**棉花; 基因沉默; 病毒载体; TRV; *PDS*

**中图分类号:** Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)06–0038–03

病毒诱导基因沉默 (VIGS) 技术是指携带一段目标基因表达序列的重组病毒侵染植物, 引起植物内同源基因沉默而发生表型变异, 通过表型变异进行基因功能分析的方法<sup>[1–2]</sup>。该技术具有快速、高通量分析植物基因功能的优点。

*PDS* 即八氢番茄红素脱氢酶, 是类胡萝卜素合成所必需的酶, 具有保护叶绿素免受光漂白的作用, 而 *PDS* 基因发生沉默, 植物就会表现出光漂白症状。*PDS* 表型变异易于辨别, 因此 *PDS* 基因成为 VIGS 体系评价的参照基因。最早 *PDS* 基因构建的 VIGS 载体是由烟草花叶病毒 (TMV) 发展的, Kumagai 等成功构建了 TMV–*PDS* 沉默载体, 侵染本氏烟后诱导了 *PDS* 基因的沉默<sup>[3]</sup>。并由烟草脆裂病毒 (TRV) 发展的载体<sup>[4]</sup>, 诱导基因沉默的效率、持久性都比较好, 并且只引起温和的病症, 而且能侵染分生组织和花。随后病毒载体快速发

展, 研究者根据病原–寄主植物相互作用的依赖性等特点, 已经在一些植物和病毒之间成功构建了 VIGS 病毒载体, Turnage 等利用大白菜曲叶病毒 (CBLCV) 在模式植物拟南芥上建立了 VIGS 体系<sup>[5]</sup>; Holzberg 等利用大麦条纹花叶病毒 (BSMV) 首次在单子叶植物大麦上成功抑制了 *PDS* 基因的表达<sup>[6]</sup>; John 等首次报道利用棉花皱叶病毒 (cotton leaf crumple virus, CLCrV) 改造成 VIGS 病毒载体<sup>[7]</sup>。目前 VIGS 技术已广泛用于植物功能基因的研究<sup>[7]</sup>。

利用 *PDS* 作为标记基因, 进行棉花病毒载体诱导基因沉默 (VIGS) 体系的构建, 建立了以烟草脆裂病毒 (TRV) 为基础改造的 pTV00 载体的棉花 *PDS* 基因的沉默体系, 为棉花基因功能验证打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

棉花材料: 中棉所 41、中棉所 24。载体: 该 pTV00、pBINTRA6 (TRV 病毒改造) 载体由 University of Cambridge 的 David Baulcombe 惠赠。

检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(1): 77–80.

[3] Jeffries C J. Technical guidelines for the safe movement of germplasm: Potato[M]. Rome: Food Agricultural Organization and International Plant Genetics Institute, 1998: 67.

[4] 季 良. 植物病毒病防治与检疫[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 287–289.

[5] Oruetebarria I, Kekarainen T, Spetz C, et al. Molecular characterization of potato virus V genomes from Europe indicates limited spatio-temporal strain differentiation[J]. Phytopathology, 2000, 90(4): 437–444.

[6] Carl S. Molecular studies on a complex of Potyviruses infecting Solanaceous crops, and some specific virus–host interactions[D]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences Doctoral thesis, 2003.

[7] 刘 梅, 黄 新, 马占鸿, 等. 应用 DPO 引物检测马铃薯病毒的多重 RT–PCR 技术研究[J]. 植物病理学报, 2009, 39(4): 431–434.

[8] Chen H Y, Zhao W J, Gu Q S, et al. Real time TaqMan RT–PCR assay for the detection of cucumber green mottle mosaic virus[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 149(2): 326–329.

[9] 高雅红, 王进忠, 李明福, 等. 李痘病毒实时荧光定量 RT–PCR

[10] 崔学慧, 陈舜胜, 于 翠, 等. 实时荧光 RT–PCR 方法检测香石竹环斑病毒[J]. 植物病理学报, 2012, 42(4): 381–386.

[11] 闻伟刚, 张建成, 崔俊霞, 等. 玉米褪绿斑驳病毒实时荧光 RT–PCR 检测方法研究[J]. 植物检疫, 2011, 25(1): 39–42.

[12] 郭立新, 段维军, 张祥林, 等. 啤酒花潜隐类病毒的实时荧光 RT–PCR 检测[J]. 植物病理学报, 2012, 42(5): 466–473.

[13] 廖 芳, 郭京泽, 刘 鹏, 等. RT–PCR 和实时荧光 RT–PCR 一步法检测大豆中菜豆荚斑驳病毒[J]. 植物保护学报, 2009, 36(2): 141–145.

[14] 闻伟刚, 谭 钟, 张吉红, 等. 检测小麦线条花叶病毒的 TaqMan MGB 探针技术[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(2): 351–355.

[15] 郭立新, 向本春, 朱水芳. 苹果茎沟病毒实时荧光 RT–PCR 反应体系的优化[J]. 北方园艺, 2009(3): 8–11.

[16] 郭京泽, 李兴红, 廖 芳, 等. 实时荧光 RT–PCR 检测辣椒轻斑驳病毒的初步研究[J]. 植物保护, 2008, 34(2): 117–120.

[17] Olmos A, Bertolini E, Gil M, et al. Real–time assay for quantitative detection of non–persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids[J]. Journal of Virological Methods, 2005, 128(1/2): 151–155.

收稿日期: 2013–01–01

基金项目: 河南省科技攻关 (编号: 122102110213); 河南省软科学研究 (编号: 122400410015)。

作者简介: 丁锦平 (1976—), 女, 河南长垣人, 博士, 讲师, 研究方向为棉花种质创新及分子生物学。E–mail: jinpinding@163.com。