

许泳清, 李华伟, 邱思鑫, 等. 甘薯羽状斑驳病毒和褪绿矮化病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 福建农业学报, 2014, 29 (11): 1114-1117.

XU Y-Q, LI H-W, QIU S-X, et al. Development of Dutiplex RT-PCR for the Detection of SPF MV and SPCSV in Sweet Potato [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29 (11): 1114-1117.

甘薯羽状斑驳病毒和褪绿矮化病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立

许泳清¹, 李华伟¹, 邱思鑫^{1*}, 刘中华¹, 邱永祥¹, 罗文彬¹, 纪荣昌¹,
汤 浩¹, 余 华^{2*}

(1. 福建省农业科学院作物研究所, 福建 福州 350013; 2. 福建省农业科学院中心实验室, 福建 福州 350003)

摘要: 根据 GenBank 中公布的甘薯羽状斑驳病毒 (Sweet potato feathery mottle virus, SPF MV) 外壳蛋白 (CP) 基因和甘薯褪绿矮化病毒 (Sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV) 热激蛋白 (Hsp70) 基因序列保守区域设计了 2 对特异性引物, 通过 RT-PCR 反应程序的优化, 建立了能同时检测 SPF MV 和 SPCSV 的双重 PCR 检测体系。该检测体系能够 1 次扩增出 SPF MV 和 SPCSV 的特异性片段, 片段大小为 461 bp 和 304 bp, 测序结果表明, 2 种病毒序列与参考序列的同源性达 93% 以上。

关键词: 甘薯; 甘薯羽状斑驳病毒; 甘薯褪绿矮化病毒; 双重 RT-PCR

中图分类号: S 435

文献标识码: A

Development of Dutiplex RT-PCR for the Detection of SPF MV and SPCSV in Sweet Potato

XU Yong-qing¹, LI Hua-wei^{1*}, QIU Si-xin¹, LIU Zhong-hua¹, QIU Yong-xing¹, LUO Wen-bin¹,
JI Rong-chang¹, TANG hao, YU Hua^{2*}

(1. Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;

2. Central Laboratory of Agricultural Sciences of Fujian Academy, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: A duplex PCR protocol for the detection of two main viruses in sweet potato was developed based on the coat protein (CP) gene of Sweet potato feathery mottle virus (SPF MV) and the (Hsp70) gene of Sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV). They were able to amplify unique DNA fragments of 461 bp and 304 bp in a single PCR reaction. The sequence analysis suggest that the two viruses shared at least 93 percent homology with other related viruses.

Key words: sweet potato; SPCSV; SPF MV; duplex RT-PCR

甘薯病毒病害 (Sweet potato virus disease, SPVD) 是由毛形病毒属 *Crinivirus* 的甘薯褪绿矮化病毒 (Sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV) 和马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus* 的甘薯羽状斑驳病毒 (Sweet potato feathery mottle virus, SPF MV) 协生共侵染甘薯引起的病毒病害^[1-3]。SPVD 对我国甘薯生产造成极大的损害, 它分布广, 传播性强, 给甘薯生产带来重大的经济损失^[4]。当前甘薯病毒尚无特别有效的化学防治方法, 加之甘薯属于无性繁殖作物, 极易造成病毒继

代传染及传播扩散。因此, 解决防治病毒病的根本措施是进行茎尖组织脱毒培育无病毒种苗, 其中病毒检测是不可或缺的一环, 由此, 建立一种快速、准确和灵敏的甘薯病毒检测技术有利于加速育种进程, 对保障种苗质量和田间甘薯病毒检测具有重要意义。

用于甘薯病毒检测的方法主要有指示植物嫁接法、酶联免疫吸附技术 (ELISA) 和电镜观察法等, 但其都存在局限性。由于甘薯病毒多数是由多种病毒复合侵染造成的, 单一的 RT-PCR 检测技

收稿日期: 2014-07-30 初稿; 2014-08-25 修改稿

作者简介: 许泳清 (1980-), 女, 助理研究员, 主要从事薯类作物组织培养与病毒检测研究 (E-mail: qingqing0722@126.com)

* 通讯作者: 邱思鑫 (1974-), 男, 博士, 研究员, 主要从事甘薯病虫害防控技术研究 (E-mail: qiusixin@yahoo.com.cn)

余华 (1957-), 女, 研究员, 主要从事甘薯病虫害防控技术研究 (E-mail: yuhua@faas.cn)

基金项目: 国家甘薯产业技术体系项目 (CARS-11-B-10-2013); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (CXTD-1-1301)

术只能检测一种病毒, 费时费力, 近年来发展起来的多重 RT-PCR 检测技术, 可以同时加入多于 1 对的引物, 同时检测多个病毒或区分不同株系, 大大提高了工作效率^[5-6], 并取得了很好的效果。张业辉等^[7], 张盼等^[8]对河南省采集的甘薯病毒样品进行了多重 RT-PCR 检测。本课题组前期也已建立了福建省甘薯羽状斑驳病毒单重 RT-PCR 检测方法, 但是无法满足同时检测甘薯羽状斑驳病毒和甘薯褪绿矮化病毒 2 种病毒协生共侵染引起的甘薯病毒病 (SPVD), 因此, 亟须建立能同时检测 SPVD 双重 RT-PCR 检测方法, 为田间侵染 SPVD 病毒的甘薯样品和室内组培苗的快速鉴别提供

依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料和引物设计

于田间采集具有 SPVD 典型症状的甘薯叶片, 液氮处理后, -80℃ 保存备用。

根据 SPCSV 热激蛋白 (Hsp70) 基因及 SPFMV 病毒的外壳蛋白 (CP) 基因核苷酸序列的保守区域, 并应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件分别设计这 2 种病毒的特异性引物。引物由大连宝生物公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 扩增 SPFMV、SPCSV 的引物对

Table 1 The primer pairs for amplifying segments of SPFMV and SPCSV

病毒	引物	引物序列 (5'-3')	PCR 产物/bp
甘薯羽状斑驳病毒 (SPFMV)	SPFMV-S SPFMV-A	GCATGGTATGARGGAGTYAA TCTTCTTCTTGCGTGGAG	461
甘薯褪绿矮化病毒 (SPCSV)	SPCSV-S SPCSV-A	CGGTCARATTGGAAGGTA TTCGCTATCAAAGAAGTRTC	304

1.2 病毒基因组的提取及反转录

按照试剂盒提供的操作方法提取病毒基因组 RNA, 分别以 SPFMV 和 SPCSV 混合物基因组 RNA 为模板进行反转录, cDNA 第一链合成分后保存于-20℃ 冰箱备用。

1.3 单一 RT-PCR 检测

以上述反转录产物为模板, 分别利用 SPFMV 和 SPCSV 2 种病毒的特异性引物对病毒样品进行 PCR 扩增。单个 RT-PCR 反应体系为 25 μL, 即 2.0 μL cDNA; 上下游引物 (1.0 μmol · L⁻¹) 各 1.0 μL; 0.30 μL Ex Taq 酶 (5 U · μL⁻¹); 2.0 μL dNTP (1.5 mmol · L⁻¹); 2.5 μL 10 × PCR buffer; 总体积 25 μL, 其余部分 ddH₂O 补足。PCR 扩增反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 扩增循环 30 次; 最后 72℃ 延伸 10 min, PCR 反应结束后保存于 4℃。

1.4 双重 RT-PCR 反应体系的建立

1.4.1 引物浓度优化筛选 对 SPFMV 和 SPCSV 2 种甘薯病毒的引物浓度组合进行分析, 设定 6 种不同引物浓度组合, SPFMV、SPCSV 的浓度分别为 ① 0.1、0.2 μmol · L⁻¹; ② 0.2、0.4 μmol · L⁻¹; ③ 0.4、0.4 μmol · L⁻¹; ④ 0.4、1.2 μmol · L⁻¹; ⑤ 0.6、1.0 μmol · L⁻¹; ⑥ 0.6、

0.3 μmol · L⁻¹。电泳观察 PCR 产物条带, 确定适宜引物组合。

1.4.2 筛选最佳的退火温度 根据 2 种甘薯病毒的单一 RT-PCR 的最佳退火温度, 分别设定双重 PCR 的退火温度为 50、52、54、56、58 和 60℃, PCR 产物经电泳观察条带, 以确定最佳 PCR 退火温度。

1.5 双重 RT-PCR 的灵敏度检测

提取总 RNA 后测定其浓度, 并对总 RNA 进行 10⁰、10¹、10²、10³、10⁴、10⁵ 倍稀释, 检测其灵敏度。

1.6 PCR 产物的克隆与序列分析

双重 RT-PCR 扩增产物用大连宝生物公司 DNA 纯化试剂盒回收纯化, 纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T vector 连接, 连接产物转化大肠杆菌, 经蓝白斑筛选挑取阳性克隆质粒, 质粒经 PCR 鉴定为阳性的样品送自上海生物工程有限公司进行测序。测序结果经 NCBI BLAST 比对分析。

2 结果与分析

2.1 SPVD 症状

田间受甘薯病毒病侵染的甘薯植株出现植株矮化、畸形, 叶片主要症状为叶片褪绿、皱缩、黄斑花叶、紫色和淡绿色斑点和畸形等, 受侵染的甘薯

薯块出现产量降低, 品质下降, 主要症状薯块变小、出现裂纹、畸形等现象。



图 1 感染 SPVD 甘薯症状

Fig. 1 Symptoms of infected sweet potato by SPVD

2.2 双重 PCR 反应条件筛选

试验结果表明, 2 种不同 SPF MV 和 SPC SV 引物用量组合的扩增结果 (图 2) 显示, 当 SPF MV 引物浓度为 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, SPC SV 为 $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, SPF MV 和 SPC SV 引物浓度比为 $1:3$ 时双重 PCR 有较好的扩增效果。

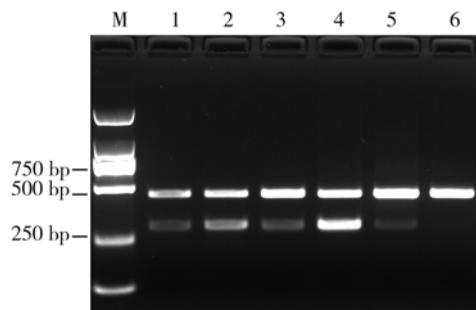


图 2 双重 RT-PCR 引物浓度优化

Fig. 2 Optimization of primer concentration of the duplex RT-PCR

注: M 为 Marker DL2000; 泳道 1~6 为 SPF MV 和 SPC SV 引物浓度组合 (分别是 0.1 ; 0.2 ; 0.2 ; 0.4 ; 0.4 ; 0.4 ; 1.2 ; 0.6 ; 1.0 ; 0.6 ; $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

退火温度在 $50\sim60^\circ\text{C}$ 的扩增效果都比较好, 均可以扩增出目的条带 (图 3), 综合考虑选择最佳退火温度为 56°C 。

综上, 建立了双重 RT-PCR 反应体系为 $25 \mu\text{L}$: $2.0 \mu\text{L}$ cDNA, $0.4 \mu\text{L}$ SPF MV 引物, $1.2 \mu\text{L}$ SPC SV 引物, $0.30 \mu\text{L}$ Ex Taq 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $2.0 \mu\text{L}$ dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $2.5 \mu\text{L}$ $10\times$ PCR buffer, ddH_2O 补足 $25 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增参数为: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 30 s , 56°C 退火 30 s , 72°C 延伸 1 min , PCR 循环 30 次; 最

后 72°C 延伸 10 min , 4°C 保存。

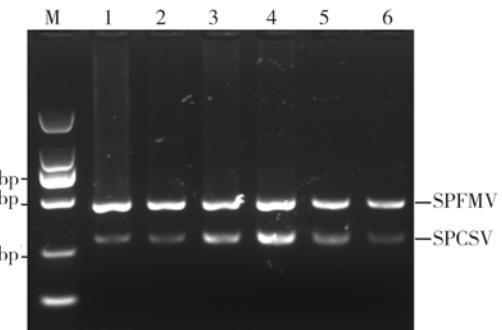


图 3 双重 RT-PCR 退火温度优化

Fig. 3 Optimization of anneal temperature

注: M 为 Marker DL2000; 泳道 1~6 为退火温度 (分别为 50°C , 52°C , 54°C , 56°C , 58°C , 60°C)。

2.3 双重 RT-PCR 与单一 RT-PCR 扩增效果比较

以 SPF MV 和 SPC SV 2 种病毒的反转录产物作为 PCR 反应的模板, 利用建立的双重 RT-PCR 检测体系, 进行双重 RT-PCR 扩增分别得到大小为 461 bp 和 304 bp 的 2 条特异条带 (图 4), 结果显示双重与单一 RT-PCR 扩增结果一致。

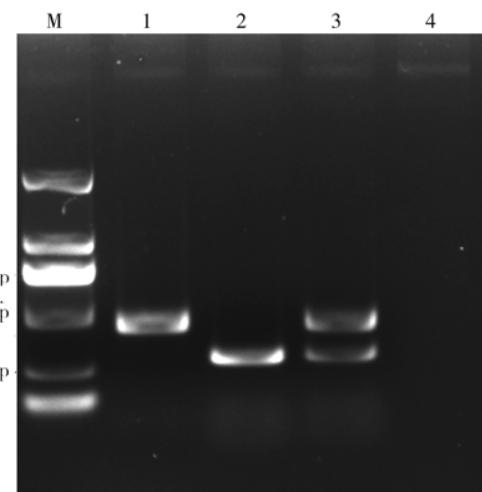


图 4 甘薯 2 个病毒单重和双重 RT-PCR 扩增结果

Fig. 4 Detection of two viruses in sweet potato by single or duplex RT-PCR

注: M 为 Marker DL2000, 泳道 1 为 SPF MV, 泳道 2 为 SPC SV, 泳道 3 为 SPF MV、SPC SV 组合, 泳道 4 为阴性对照。

2.4 灵敏度检测分析

将总 RNA 进行 10 倍梯度浓度稀释, 采用双重 RT-PCR 法检测 2 种病毒的灵敏度。由图 5 可以看出, 当总 RNA 10 倍梯度稀释至 10^{-4} 其反转录的产物, 可以扩增出目的片段。说明 SPF MV 和 SPC SV 的检测灵敏度相当于 $10^{-4} \mu\text{L}$ 的模板 RNA。

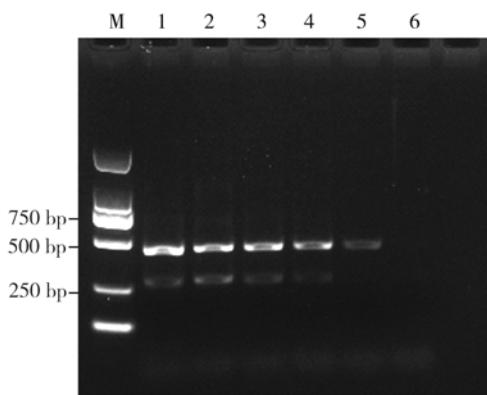


图 5 双重 RT-PCR 灵敏度分析

Fig. 5 Sensitivity of duplex RT-PCR

注: M 为 DL2000 DNA marker; 泳道 1~6 为总 RNA 稀释 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 倍 PCR 扩增条带。

2.5 PCR 产物序列分析

双重 RT-PCR 扩增产物经回收纯化后与 pMD18-T vector 连接, 连接后挑取阳性克隆质粒并进行测序。测序结果表明, SPF MV 和 SPC SV 序列分别由 304 和 461 个核苷酸组成, 与预期扩增片段大小相符。所得序列与 GenBank 中其他分离的核苷酸序列同源性达到 93% 以上, 扩增结果可靠。

3 讨论与结论

本研究建立的双重 RT-PCR 检测体系, 能够同时检测甘薯羽状斑驳病毒和甘薯褪绿矮化病毒, 检测灵敏度高, 省时省力, 大大降低了检测成本, 为检测田间受侵染的甘薯植株和室内组培苗提供了有利的技术支撑。

引物设计和退火温度是影响 RT-PCR 扩增的关键因素。其中引物设计是 RT-PCR 最重要的一环, 范旭东等^[9]的研究认为, 引物的设计要求特异性强, 各个引物的退火温度应尽量相近。本研究根据 2 种病毒保守区序列设计的引物, 选择退火温度接近, 且扩增的目的片段大小有明显差异, 易于区分的引物对作为单重和双重 RT-PCR 的引物, 保证了引物具有较高特异性。甘薯受到 SPF MV 和 SPC SV 2 种病毒共同侵染时, SPC SV 的含量基本不变或者变化不明显, SPF MV 的含量会增加 600

倍比其单独侵染甘薯时的含量^[10], 因此本研究在双重 RT-PCR 检测 SPF MV 和 SPC SV 2 种病毒时, 适当地提高了 SPC SV 引物的浓度, 取得了较好的扩增效果。

由于能侵染甘薯的病毒种类较多, 田间常常出现多种病毒复合侵染, 给田间症状识别带来一定的困难, 因此建立能同时检测其他几种主要病毒的多重的 PCR 检测体系还需进一步的研究和验证。

参考文献:

- [1] GIBSON R W, MPEMBE I, ALICAI T, et al. Symptoms, aetiology and serological analysis of sweet potato virus disease in Uganda [J]. Plant Pathology, 1998, 47: 95—102.
- [2] GUTIERREZ D L, FUENTES S, SALAZAR L F. Sweet potato virus disease (SPVD): distribution, incidence, and effect on sweet potato yield in Peru [J]. Plant Disease, 2003, 87: 297—302.
- [3] NJERU R W, MBURU M W K, CHERAMGOI E, et al. Studies on the physiological effects of viruses on sweet potato yield in Kenya [J]. Annals of Applied Biology, 2004, 145: 71—76.
- [4] 张振臣, 乔奇, 秦艳红, 等. 我国发现由甘薯褪绿矮化病毒和甘薯羽状斑驳病毒协生共侵染引起的甘薯病毒病害 [J]. 植物病理学报, 2012, 43 (3): 328—333.
- [5] MENZELW, JELKMANN W, MAISS E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control [J]. Journal of Virological Methods, 2002, 99: 81—92.
- [6] THOMPSON J R, WETZEL S, KLERKS M M, et al. Multiplex RT PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp in combination with a plant mRNA specific internal control [J]. Journal of Virological Methods, 2003, 11 (2): 85—93.
- [7] 张业辉, 张振臣, 蒋士君, 等. 3 种甘薯病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 植物病理学报, 2010, 40 (1): 95—98.
- [8] 张盼, 兰新芝, 乔奇, 等. 甘薯病毒病害 (SPVD) 的多重 RT-PCR 检测方法及其应用 [J]. 植物保护, 2013, 39 (2): 86—90.
- [9] 范旭东, 董雅凤, 张尊平. 3 种苹果潜隐病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立 [J]. 园艺学报, 2009, 36 (12): 1821—1826.
- [10] KARYEJA R F, KREUZE J F, GIBSON R W, et al. Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem limited crinivirus in sweet potato plants [J]. Virology, 2000, 269: 26—36.

(责任编辑: 林海清)