

RT-PCR 检测甜菜坏死黄脉病毒 及总 RNA 提取方法研究

牛素清¹, 白晨¹, 张惠忠¹, 李晓东¹, 付增娟¹, 赵尚敏¹,
斯琴巴特尔², 轩继雨¹, 李树生¹

(内蒙古农牧业科学院 甜菜研究所, 内蒙古 呼和浩特 010031; 2. 内蒙古农牧业科学院 生物中心, 内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要: 为选择较为适合甜菜总 RNA 的提取方法, 构建和优化 RT 有效体系。以田间甜菜叶片、根毛及根表皮为材料, 研究了提取甜菜总 RNA 的方法以及利用 RT-PCR 技术进行甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)的检测。研究表明, 获得良好的 RT-PCR 扩增效果, RT 体系中 dNTPs 浓度、引物、AMV、模板 RNA 的浓度要分别达到 1 mmol/L, 1 μ mol/L, 0.1 U/ μ L, 0.01 μ g/ μ L 较好。PCR 体系中 dNTPs 浓度、引物、TaqDNA 聚合酶、Mg²⁺ 的浓度要分别达到 0.1 mmol/L, 0.1 μ mol/L, 0.01 U/ μ L, 1.48 mmol/L 效果较好。RT-PCR 法对 BNYVV 检测, 可作为甜菜品种(育种材料)早期抗丛根病性鉴定的依据之一。

关键词: 甜菜; 甜菜坏死黄脉病毒; RT-PCR

中图分类号: S566.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)01-0207-04

The Studies on RT-PCR Detection Method of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) and the Extraction Method of Total RNA

NIU Su-qing¹, BAI Chen¹, ZHANG Hui-zhong¹, LI Xiao-dong¹, FU Zeng-juan¹,
ZHAO Shang-min¹, SI Qin Bater², XUAN Ji-yu¹, LI Shu-sheng¹

(1. Sugarbeet Institute, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry
Sciences, Huhhot 010031, China; 2. Biotechnology Centre Inner Mongolia Academy of
Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract: Two methods of extraction of total RNA from sugarbeet leaves, cortexes and root hair were discussed. Optimized conditions for RT-PCR method for detecting BNYVV were also studied in this paper. The results were as follow, for getting the effective RT-PCR detection system, the better concentration of RT reaction ingredients dNTPs, primer, AMV and template RNA were 1 mmol/L, 1 μ mol/L, 0.1 U/ μ L, 0.01 μ g/ μ L respectively. The concentration of ingredients dNTPs, primer, Taq DNA polymerase and Mg²⁺ should achieve 0.1 mmol/L, 0.1 μ mol/L, 0.01 U/ μ L, 1.48 mmol/L in PCR reaction system.

Key words: Sugarbeet; Bat Necrotic Yellow Vein Virus; RT-PCR

甜菜坏死黄脉病毒(Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV)引起的甜菜丛根病是一种世界性的毁灭性病害^[1]。该病是 20 世纪 50 年代在意大利帕河流域首次发现^[1,2], 后在许多栽培甜菜的国家广泛而迅速蔓延。70 年代末, 我国先后在呼和浩特、包头、新疆、宁夏等地也相继发现^[3-5]。该病典型病状是在植株的主根和侧根上大量增生须根, 须根和侧

根变褐、变细, 逐渐坏死, 随之主根微管束变褐, 并木质化, 地上部呈叶片褪绿黄化、叶丛矮小等不同症状。感病甜菜减产 30%~80%, 含糖率降低 10%~75%^[6-8], 给制糖业造成威胁, 引起世界各国的广泛重视。各国专家学者对其开展了深入研究, 发现 BNYVV 是一种多分体病毒, 含 4 条(内蒙古、日本分离株含 5 条)正链 RNA, 病毒颗粒为杆状^[9-12]。

收稿日期: 2007-09-28

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2001AA241193)

作者简介: 牛素清(1972-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 助理研究员, 在读硕士, 主要从事甜菜育种及生物技术研究工作。

Tamada 等国外的研究者已经完成了 BNYVV RNA₁₋₅ 的全序列测定。对 BNYVV 的检测方法有田间鉴定法、血清学检测和分子生物学检测。田间鉴定法是传统的、经典的检测方法,耗时长;血清学检测主要是用各种酶联免疫吸附方法检测(ELISA),但 BNYVV 的繁殖和提纯困难,不易获得高纯度的病毒粒子,抗血清的制备很困难。近年来,聚合酶链式反应(PCR)技术的发明和应用,为该病毒提供了一种准确、灵敏的检测方法。国内外学者在这方面做了很多的工作,但从田间取样直接检测的报道很少。为此,我们采用 RT-PCR 方法对田间样品直接进行检测,希望能摸索出一种快速、准确、灵敏的检测方法,为育种和大田生产提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

表 1 RNA₂, RNA₃, RNA₅ 的核苷酸引物

Tab. 1 Nucleotide Primer of RNA₂, RNA₃, RNA₅

RNA	编号 NO.	寡聚核苷酸 Oligo nucleotide	位置 Site	扩增产物大小 Size
RNA ₂	RNA ₂ -1	5'-ATGTCGAGTGAAGGTAGATATA-3'	与 1—22 nt 对应	567 bp
	RNA ₂ -2	5'-CTATTGTCCGGGTGGACTGGT-3'	与 566—588 nt 互补	
RNA ₃	RNA ₃ -1	5'-ATGGGTGATATATTAGCGCA-3'	与 446—467 nt 对应	660 bp
	RNA ₃ -2	5'-CTAATCATCATCAACACG-3'	与 1 105—1 085 nt 互补	
RNA ₅	RNA ₅ -1	5'-AAATTCAAAGTACTTTCA-3'	与 1—18 nt 对应	1.35 kb
	RNA ₅ -2	5'-GTCAATACACTGACAGAG-3'	与 1 347—1 230 nt 互补	

1.3 供试试剂

1.3.1 总 RNA 提取缓冲液的配制 方法 1(CTAB)法: 0.1 mmol/L 甘氨酸-NaOH pH 9.0, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 2%CTAB, 2%PVP, 1%SLS, 巯基乙醇 1 滴(现用现加)。方法 2(SDS 法): 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 140 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 1%SDS, 2%PVP, 巯基乙醇 1 滴(现用现加)。

1.3.2 RT-PCR 所用试剂及主要仪器 逆转录酶 AMV(附 5× Buffer)购于 Promega 公司, TaqDNA 聚合酶和 DNA Marker 购于华美生物工程公司, 美国产 PTC-100 型 PCR 仪, 美国产 DU-640 型紫外分光光度计。

1.4 试验方法

1.4.1 总 RNA 提取方法 方法 1(CTAB 法): 采用牛建新^[19]的方法进行改进。(1)分别称取甜菜叶片、根毛和根表皮 2 g 左右, 液氮中研磨至粉末状, 迅速转入 1.5 mL Eppendorf 管, 分别加入 600 μL 抽提缓冲液, 振荡混匀, 4℃12 000 r/min 离心 15 min; (2)取上相加入等体积水饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 振荡混匀, 4℃12 000 r/min 离心 15 min; (3)取上相, 用 5 mol/L NaCl 调整盐离子浓度到 0.7

甜菜品种(系)5 份, 分别是内甜抗 201、HBB-1、AB8301、S4303、甜研 309, 在甜菜幼苗期(6 月 10 日左右)、叶丛形成期(6 月 10 日至 7 月 20 日)、块根增长期(7 月 20 日至 8 月 30 日)、糖分积累期(9 月至 10 月上旬)4 个生育期每隔 10 d 取各材料的幼叶、根毛及根表皮, 清洗后置于-70℃冰箱备用, 采集地点为内蒙古农科院甜菜丛根病圃。以组培甜菜无病毒实生苗为对照。

1.2 引物合成

根据 Bouzoubaa 等^[13-14]报道的 BNYVV RNA₁, RNA₂, RNA₃, RNA₄ 序列, Koenig 等^[15]对 BNYVV 株系的研究结果和李大伟等^[16]对中国甜菜 BNYVV RNA₅ 检测的引物序列设计合成 3 对引物(表 1), 由上海生工合成。

mol/L, 加入 1/10 体积 10%CTAB, 混匀, 再加入 2 倍体积氯仿:异戊醇(24:1), 4℃12 000 r/min 离心 10 min; (4)取上相, 加入等体积氯仿:异戊醇(24:1), 振荡混匀, 4℃12 000 r/min 离心 10 min, 重复 1~2 次, 以蛋白层不出现为止; (5)取上相, 加入 1/2 体积异丙醇, -20℃放置 2 h; (6)4℃12 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用 70%乙醇洗 2 次, 空气干燥 5 min, 溶于 20 μL DEPC 水中, -20℃保存备用。

方法 2(SDS 法): (1)分别称取甜菜叶片、根毛和根表皮 2 g 左右, 液氮中研磨至粉末状, 迅速转入 1.5 mL Eppendorf 管, 每管分别加入 500 μL 酚:氯仿(以防止 RNA 降解), 振荡混匀, 再分别加等体积抽提缓冲液, 混匀, 4℃12 000 r/min 离心 15 min; (2)取上相加入等体积水饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 振荡混匀, 4℃12 000 r/min, 离心 15 min; (3)取上相, 加入等体积氯仿:异戊醇(24:1), 振荡混匀, 4℃12 000 r/min离心 10 min, 重复 1~2 次, 以蛋白层不出现为止; (4)取上相, 加入 2.5 倍体积无水乙醇, -20℃放置过夜; (5)4℃12 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用 70%乙醇洗 2 次, 空气干燥 5 min, 溶于 20 μL DEPC 水中, -20℃保存备用。

1.4.2 总 RNA 的纯化 提取的总 RNA 合并后经

苯酚/氯仿(1:1)反复抽提 2~3 次,上清加 2 倍体积无水乙醇沉淀,70%乙醇洗 2 次,空气干燥 5 min,溶于 20 μ L DEPC 水中, -20°C 保存备用。

1.4.3 总 RNA 含量、纯度和完整性检测 用 DU-640 型紫外分光光度计分析含量和纯度。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 完整性。

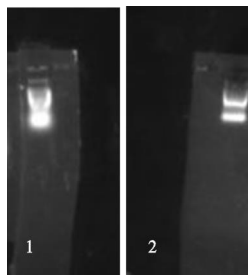
1.4.4 逆转录(RT) 参考侯义龙等^[17]的方法,对 RT 主要成分 dNTPs 浓度、3'端引物、AMV、模板 RNA 的浓度分别设置 6 个不同的浓度梯度。反转录程序: 42°C 保温 1.5 h, 95°C 5 min 结束反应。

1.4.5 PCR 扩增 扩增过程: 94°C 预变性 5 min 后, 94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1.5 min, 共 30 个循环; 72°C 8 min 结束反应。各取 5 μ L 扩增产物,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色后,观察结果。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的纯度

本试验采用 2 种方法提取的总 RNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值都达到了 1.90 以上,说明提取的总 RNA 达到了较高的纯度。其中,方法 2 提取的总 RNA 纯度更高一些。方法 1 从甜菜的叶片中、方法 2 从甜菜的叶片和根表皮及根毛中提取的总 RNA 完整性较好。综合考虑认为,以叶片为材料提取总 RNA 时,方法 1、方法 2 都可以,但方法 2 较好,以根表皮及根毛为材料时宜采用方法 2(图 1)。



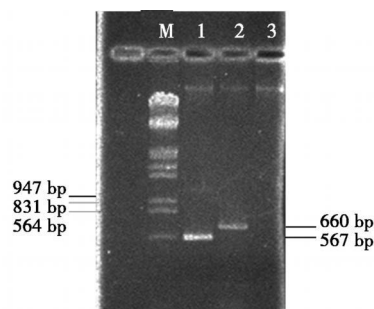
1. 方法 1 提取的 S4303 总 RNA; 2. 方法 2 提取的 S4303 总 RNA
1. The total RNA of S4303(method 1); 2. The total RNA of S4303 (method 2)

图 1 总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of total RNA of S4303

2.2 利用 RT-PCR 对 BNYVV 进行检测

本试验利用 2 种方法提取甜菜总 RNA,用 RT-PCR 法对 BNYVV 进行检测,以组培甜菜无病毒实生苗为对照。结果表明,使用方法 2 在甜菜叶丛形成末期至块根增长初期(7 月 10 日至 8 月 20 日)均得到了较清晰的特异性片段(图 2),在 AB8301, S4303 和甜研 309 中都检测到 RNA₂ 和 RNA₃ 的存在,未检测出 RNA₅;在内甜抗 201 及 HBB-1 中未检测到病毒的存在。



M. λ DNA/ *Eco*RI and *Hae* III;

1. RNA₂ 片段; 2. RNA₃ 片段; 3. 无病毒苗对照
1. RT-PCR product of RNA₂; 2. RT-PCR product of RNA₃;
3. CK (negative control)

图 2 RT-PCR 产物凝胶电泳

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of total RNA RT-PCR products of S4303

2.3 RT-PCR 检测 BNYVV 的有效体系

试验对 RT 体系和 PCR 体系的 dNTPs 浓度、互补引物、AMV、模板 RNA 的浓度、TaqDNA 聚合酶、 Mg^{2+} 的浓度分别设置了浓度梯度,试验结果表明以下体系扩增效果较好。

2.3.1 逆转录(RT)体系 20 μ L 体系中,加入 $10\times$ Buffer 2 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 4 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 20 单位 Rnasin 0.5 μ L, 10 μ mol/L 的 3'端引物 2 μ L, 2 单位 AMV 逆转录酶 1 μ L, 总 RNA 5 μ L, 反应总体积 20 μ L。 42°C 保温 1.5 h, 95°C 5 min 结束反应,立即置于冰上。

2.3.2 PCR 扩增体系 50 μ L 体系中,加入 $10\times$ Buffer 5 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 3 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L, 10 μ mol/L 的 3'端引物和 5'端引物各 0.5 μ L, 逆转录产物 5 μ L, 2.5 U/ μ L TaqDNA 聚合酶 2 μ L, 反应总体积 50 μ L。 94°C 预变性 5 min 后, 94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1.5 min, 共 30 个循环, 72°C 8 min 结束反应。各取 5 μ L 扩增产物,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色后,观察记录结果(图 2)。

3 讨论

3.1 RT 体系的建立和优化

RT 过程中合成的 cDNA 是 PCR 扩增的模板,有效的 RT 体系是 PCR 扩增的基础。研究表明,RT 体系中 dNTPs 浓度、互补引物、AMV、模板 RNA 的浓度要分别达到 1 mmol/L, 1 μ mol/L, 0.1 U/ μ L, 0.01 μ g/ μ L 以上效果较好,与牛建新和侯义龙等^[17, 18]的研究结果相近。

3.2 PCR 体系的建立和优化

PCR 体系中 Mg^{2+} 会影响反应的效率,主要表现在 Mg^{2+} 影响 Taq 酶的活性、引物的退火及模板和产物的变性。萨姆布鲁克等^[13]认为 Mg^{2+} 的最佳浓度

为 1.5 ~ 2.0 mmol/L, 同时又指出这种浓度并非对任何一种模板与引物组合都是最佳的。本研究表明, Mg^{2+} 浓度在 1.30 ~ 1.50 mmol/L 之间可以获得良好的扩增效果。dNTPs 浓度过低会导致反应速度下降, 产物减少; 浓度过高, 会影响 Taq 聚合酶的活性^[9]。本研究表明, dNTPs 浓度在 0.10 ~ 0.25 mmol/L 均可获得良好的扩增效果。Taq 酶是 PCR 反应体系中的关键因子之一, 酶量不足, PCR 产物量就会降低, 酶量过多, 往往导致非特异性扩增, 本试验在 50 μ L 体系中, 采用 0.01 ~ 0.02 U/ μ L 即可。

3.3 取样时间及品种的差异

在供试材料中, AB8301, S4303 和甜研 309 在叶丛形成末期至块根增长初期 (7 月 10 日至 8 月 20 日) 均检测出病毒 RNA₂ 和 RNA₃ 的存在, 未检测出病毒 RNA₅ 的存在。内甜抗 201, HBB-1 中未检测到病毒的存在, 说明这两个材料较抗丛根病, 与田间鉴定相一致。

本试验采用 RT-PCR 方法对田间样品直接进行了检测。试验表明, 利用 RT-PCR 法检测出有 BNYVV 存在的材料, 在田间表现抗丛根病性较差, 未检测出 BNYVV 存在的材料, 田间表现较抗丛根病, 检测结果与田间鉴定结果相一致。因此, 采用 RT-PCR 法对 BNYVV 检测, 可作为品种 (育种材料) 早期抗丛根病性鉴定的依据之一。

鸣谢: 此试验得到中国农业大学农业生物技术国家重点实验室分子病毒室师生及内蒙古农牧业科学院生物中心全体员工的大力支持和帮助, 在此表示衷心感谢!

参考文献:

[1] Tamada T. Beet necrotic yellow vein virus [C] // CMI/AAB Descrip Plant Virus, Wellesbourne UK: Association of Applied Biologist, 1975: 144.

[2] Shirako Y, Brakke M K. Two purified RNAs of soil-borne wheat mosaic viruses are needed for infection [J]. J Gen Virol, 1984, 65: 119—127.

[3] 高锦梁, 邓 峰, 翟蕙琴, 等. 在我国发生的甜菜坏死黄脉病毒病 [J]. 植物病理学报, 1983, 13(2): 1—4.

[4] 白 晨, 云和义, 王友平, 等. 我国甜菜生产概况 [J]. 内蒙古农业科技, 1997(5): 8—10, 26.

[5] 白 晨, 云和义. 内蒙古甜菜生产概况 [J]. 内蒙古农业科技, 1997(3): 13—15.

[6] 曲文章, 崔广臣, 陈连江. 中国甜菜学 [M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 2003: 351—352.

[7] 牛素清, 白 晨, 张惠忠, 等. 甜菜抗 (耐) 丛根病品种引种试验 [J]. 内蒙古农业科技, 2001(6): 19—21.

[8] 董 立, 白 晨, 宫前恒, 等. 甜菜耐丛根病杂交组合 C9203 的选育 [J]. 内蒙古农业科技, 1997(1): 5—8.

[9] 姚华建, 于嘉林, 刘 仪. 甜菜坏死黄脉病毒分子生物学研究进展 [J]. 中国病毒学, 1995, 10(1): 8—14.

[10] 牛建新, 刘连科, 王小兵, 等. 库尔勒香梨黄病毒 RT-PCR 检测技术研究 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 561—566.

[11] 斯钦巴特尔, 莫日根, 哈斯阿古拉, 等. BNYVV 基因的克隆及载体构建 [J]. 华北农学报, 2004, 19(2): 37—39.

[12] 张惠忠, 白 晨, 云和义, 等. 甜菜抗 (耐) 丛根病育种进展 [J]. 内蒙古农业科技, 1999(3): 17—18.

[13] Bouzoubaa S, Quillet L, Gulley H, *et al.* Nucleotide sequence of beet necrotic yellow veins RNA—1 [J]. Journal of General Virology, 1987, 68: 615—626.

[14] Bouzoubaa S, Gulley H, Jonard G, *et al.* Nucleotide sequence analysis of RNA₃ and RNA₄ of beet necrotic yellow vein virus isolates F₂ and G1 [J]. Journal of General Virology, 1985, 66: 1 553—1 564.

[15] Koenig R, L U ddecke P, Haebeler A M. Detection of beet necrotic yellow vein virus strains variants and mixed infection by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products [J]. Journal of General Virology, 1995, 76: 2051—2055.

[16] 李大伟, 于嘉林, 韩成贵, 等. 中国甜菜坏死黄脉病毒 RNA₅ 的检测及其核苷酸序列分析 [J]. 生物工程学报, 1999, 15(4): 461—465.

[17] 侯义龙. 果树主要病毒 RT-PCR 检测体系建立、优化及特异 DNA 片段克隆测序研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2000: 11—13.

[18] 金冬燕, 黎孟枫. 分子克隆指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.