

马铃薯纺锤块茎类病毒 RT-PCR 检测及全序列分析

吴志明¹, 贾晓梅², 谢晓亮¹, 温春秀¹, 田伟¹, 张庆良³

(1. 河北省农林科学院经济作物研究所, 河北 石家庄 050051; 2. 河北农业大学园艺学院, 河北 保定 071001;
3. 河北科润农业技术有限公司, 河北 石家庄 050051)

摘要: 根据马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)基因序列设计合成引物,以感病组织和健康组织总RNA为模板,经RT-PCR法扩增出全长的cDNA片段,结果从感病组织中扩增出与预期的360 bp大小的目标片段,而健康组织无此扩增产物;将其克隆到质粒pGEM-T载体上,进行全序列分析。结果表明,与国内外的报道相比较,核苷酸同源率高达98%以上。PCR产物克隆作为RT-PCR反应的阳性对照,解决了毒源保存和传播的问题,为进一步进行抗PSTVd基因工程研究打下了良好基础。

关键词: 马铃薯纺锤块茎类病毒; 反转录-聚合酶链式反应; 检测; 克隆; 序列分析

中图分类号: S432 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)院庆专辑-0063-03

Detection of Potato Spindle Tuber Viroid by RT-PCR and Analysis of Its Complete Sequences

WU Zhi ming¹, JIA Xiao mei², XIE Xiao liang¹, WEN Chun xiu¹,
TIAN Wei¹, ZHANG Qing liang³

(1. Institute of Economic Crop, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 2. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 3. Hebei Science Green Agricultural Technology CO. Ltd, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: A pair of primers were designed and synthesized based on PSTVd gene. The expected size 360bp was amplified by RT-PCR from the infected samples, while no amplified products were obtained from the healthy tissue samples. The unique amplified product was then cloned into the pGEM-T vector and sequenced. Comparison of the civil and foreign nucleotide sequence showed that the homology are 98%. Acting as the positive control of RT-PCR, the clone of PCR product helped resolve the problem of storing the viroid source and preventing it from spreading. This paved a path for breeding the transgenic potato resistant to PSTVd.

Key words: PSTVd; RT-PCR; Detection; Cloning; Sequence analysis

在马铃薯生产中,普遍存在的病毒和类病毒有几十种^[1],其中马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato Spindle Tuber Viroid, PSTVd)是在生长季节里唯一在高温和强光照环境下感染马铃薯的类病毒,是引起马铃薯品种退化和产量降低的主要病害之一。PSTVd具有高度的侵染性,极易通过接触、农具、衣物和切刀等进行汁液传播。PSTVd发现于美国新西兰州,后在加拿大、阿根廷、前苏联、波兰和保加利

亚等地均有发现^[2]。我省马铃薯病毒病发生最普遍的是PVY, PVX, PLRV和PSTVd,而且多数是复合侵染, PSTVd在我国北方马铃薯主产区严重危害马铃薯生产和实生种子的品质,是我国种薯生产中急待解决的问题^[3]。

有效控制类病毒病害需要一种快速、准确、灵敏的检测方法,由于类病毒没有蛋白质外壳,不具有抗原性,故不能用血清学方法检测。常用的检测方法

有生物学接种、电镜观察、往返聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Return PAGE)、分子杂交以及 RT-PCR 检测等^[4~6]。由于生物接种、电镜观察的准确性不高,而往返电泳法操作技术复杂、不易掌握,在许多情况下难以进行准确可靠的诊断,因此利用分子杂交和 PCR 检测技术越来越受欢迎。本试验以患病马铃薯叶片为研究材料,进行 PSTVd 的 RT-PCR 检测技术体系研究,以期摸索出 PSTVd 的快速、准确、灵敏的检测方法,为马铃薯种薯生产工厂化无病毒检测提供技术支持和依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 患病的马铃薯植株的叶片由河北科润农业技术有限公司提供。

1.1.2 菌株和质粒 克隆载体 pGEM-T easy vector kit 购自 Promega 公司,受体大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH 5 α 由本实验室保存。

1.1.3 生化和分子生物学试剂 RNA 酶抑制剂 (Rnasin)、DNA 回收试剂盒购自 Takara 公司, M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶、dNTP 等购自鼎国生物技术有限公司, 抗生素氨苄青霉素及 X-gal 等购自华美生物工程公司。其他化学试剂购自北京化学试剂公司。

1.1.4 引物设计 根据报道的 PSTVd 基因序列设计合成一对引物^[7], 5' 端同源引物 5H: 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3', 3' 端互补引物 3C 5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3'。

1.2 方法

1.2.1 PSTVd 抽提 按参考文献提供的方法进行^[8], 略有改动。称取 0.2 g 马铃薯病株的病叶组织, 迅速在液氮中研磨成粉末, 然后加入 2 倍体积的 LiCl 提取缓冲液 (50 mmol/L LiCl, 1% SDS, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris·Cl, 1% β -巯基乙醇), 研磨成匀浆组织, 加入等体积的水饱和苯酚 (pH 8.0) 混匀, 移入 1.5 mL 微量离心管中, 室温振荡悬浮 5 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 12 min (以下同), 上清加等体积的水饱和苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 振荡混匀, 离心, 上清用 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 和等体积的异丙醇沉淀, -20 °C 下静置 30 min 后离心, 沉淀用 70% 的乙醇洗涤离心, 然后用 2 mol/L LiCl 溶解, 4 °C 过夜后离心 15 min, 沉淀用适量的 DEPC 处理的无菌水悬浮。

1.2.2 cDNA 的合成及 PCR 扩增 以提纯的病毒总 RNA 为模板, 在互补引物 3C 的引导下, 合成 PSTVd 的 cDNA 第 1 链。在 0.2 mL 的微量离心管中加入以下试剂: RNA 样品 5 μ L, 20 μ mol/L 3C 2 μ L, 补 4 μ L 灭菌重蒸水, 88 °C 下变性 10 min, 冰上冷却 3 min; 置于 37 °C, 保温 20 min; 然后加入以下试剂: 5 \times 第 1 链缓冲液 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, RNasin 抑制剂 0.5 μ L, M-MLV 反转录酶 1 μ L, 补足灭菌重蒸水到 20 μ L, 混匀后 42 °C 下温育 1 h, 即合成了 PSTVd RNA 的 cDNA 第 1 链。

PCR 扩增在 25 μ L 反应体系中进行。反应体系中含 3 μ L cDNA 反应物, 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2 μ L dNTPs (每份 2.5 mmol/L), 1 μ L PCR 引物 (25 μ mol/L), 15.8 μ L 无菌水, 0.7 μ L Taq DNA 聚合酶 (5 u / μ L)。扩增反应条件为: 94 °C 变性 4 min; 94 °C, 45 s, 60 °C, 45 s, 72 °C, 45 s, 5 个循环; 94 °C, 45 s, 56 °C, 45 s, 72 °C, 45 s, 34 个循环; 72 °C 延伸 10 min。取 3 μ L PCR 产物经 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行银染检测。

1.2.3 PCR 产物的克隆及序列测定 所涉及的有关分子生物学内容见 Sambrook 的方法^[9]。PCR 扩增产物经 DNA 回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收, 回收 PCR 产物和质粒 pGEM-T 载体进行连接, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布在 LB 固体培养基 (含氨苄青霉素 100 μ g/mL, X-gal), 进行蓝白斑和细菌 PCR 法筛选阳性克隆, 随机筛选 1, 2 个含重组质粒的阳性克隆进行序列分析, 由宝生物 TaKaRa 工程大连有限公司进行。

2 结果与分析

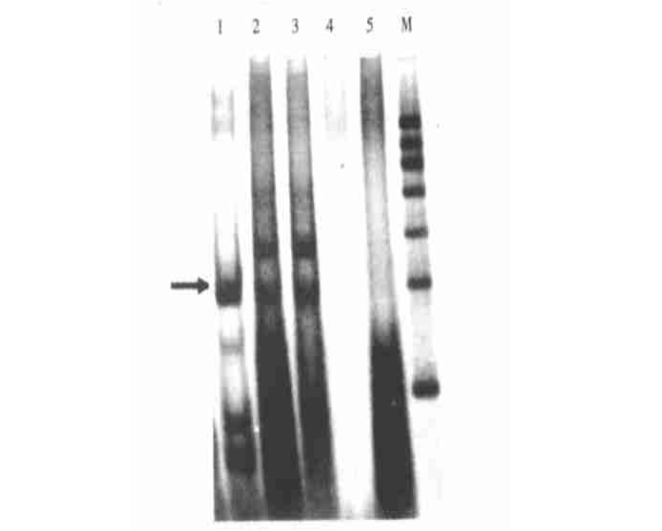
2.1 PSTVd PCR 检测

从感染 PSTVd 的马铃薯病叶组织中提取核酸, 设计合成 PSTVd 基因的特异性引物, 经 RT-PCR 扩增后, 将扩增产物进行 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行银染检测, 得到一条大小约 360 bp 的特异 DNA 片段, 与预期设计的 PSTVd 的全长基因片段大小一致 (图 1)。

2.2 PCR 产物的克隆及序列分析

将 PCR 产物克隆, 进行序列分析, 结果表明 DNA 片段大小为 360 bp, 与 PSTVd 大小一致, 说明我们所克隆的分离物基因为 PSTVd 基因。与国内外报道的 PSTVd 基因序列相比较, 核苷酸的同源率为 98% 以上, 说明所检测的病原为 PSTVd (图

2)。



M. 200 bp Maker(1 400, 1 200, 1 000, 800, 600, 400, 200 bp);
1, 2, 3. PSTVd PCR 产物; 4. 健康对照; 5. 空白对照

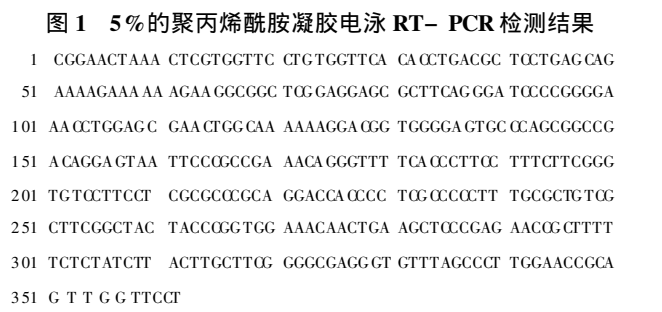


图 2 PSTVd 基因序列

3 讨论

马铃薯是一类经济价值很高的作物, 由于病毒病的危害造成良种退化、产量下降, 严重制约着优质马铃薯的生产与出口, 由于尚无有效药剂防除的病毒病, 使用无毒种苗、及早清除带毒材料是防止病毒病危害的主要措施, 培育抗病品种和脱毒种苗是减轻病毒病害、提高马铃薯产量和品质的重要措施, 而建立起快速、准确、灵敏、特异的病毒检测方法是保证脱毒效果和无病种苗生产的关键环节, 在脱毒种薯和种苗产业中占有极其重要的地位。由于 PSTVd

不能用常规的高温脱毒法脱除^[10], 在培育脱毒种苗时, 首先要对待脱毒的种薯进行 PSTVd 检测, 选择无 PSTVd 的材料进行常规病毒脱毒研究。类病毒不具有免疫原性, 因此不能用检测其他病毒的血清学方法来检测, 所以 PCR 法成为检测类病毒的理想方法。本文采用的 RT-PCR 法, 具有特异性强、灵敏度高、所需样品量少等优点, 该方法的确立对于 PSTVd 的病害防治和检测有重要意义, 更便于普及应用。

参考文献:

[1] 袁青, 殷幼平, 王中康. 马铃薯病毒病分子检测技术研究[J]. 中国马铃薯, 2003, 17(1): 33- 36.

[2] 白艳菊, 李学湛, 吕典秋, 等. 用 NASH 方法检测马铃薯纺锤块茎类病毒[J]. 杂粮作物, 2001, 21(3): 42- 43.

[3] 庞万福, 王清玉, 张恭, 等. 河北省马铃薯病毒鉴定研究初报[J]. 河北农业科学, 1997, 1(4): 19- 23.

[4] 李学湛, 吕典秋, 何云霞, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法检测马铃薯类病毒技术的改进[J]. 中国马铃薯, 2001, 15(4): 213- 214.

[5] 张鹤岭, 贾先维, Ilse Balbo. 用生物素标记的 cDNA 探针检测马铃薯纺锤块茎类病毒[J]. 病毒学报, 1989, 5(1): 72- 75.

[6] 张彤, 哈斯阿古拉, 张鹤岭, 等. 用逆转录-聚合酶链式反应检测马铃薯卷叶病毒[J]. 病毒学报, 1996, 12(4): 385- 387.

[7] Verhoeven J TH J, Arts M S J, Owens R A, *et al.* Natural infection of petunia by chrysanthemum stunt viroid [J]. European Journal of Plant Pathology, 1998, 104: 383 - 386.

[8] 吴志明, 朱水芳, 田文会, 等. 马铃薯卷叶病毒张家口分离物外壳蛋白基因和 17 K 蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 河北农业大学学报, 2000, 25(4): 62- 66.

[9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual (Second editon) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[10] Lizarraga R E, Salazar L F, Roca W M, *et al.* Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature and meristem culture [J]. Phytopathology, 1980, 70: 754- 755.