

用聚合酶链式反应 (PCR) 检测马铃薯纺锤块茎类病毒

何小源 周广和 成卓敏 王立阳 陈剑波

(中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

提 要

用 DNA 合成仪合成两个马铃薯纺锤块茎类病毒 (Potato spindle tuber viroid, PSTVd) 特异性引物, 从感病的马铃薯块茎组织的核酸抽提液中, 用反转录酶合成 PSTVd cDNA, 然后用 PCR 法进行扩增, 扩增产物用电泳检测, 建立了用 PCR 法检测 PSTVd 的新方法。结果表明, 该方法特异性强, 灵敏度可达 0.15pg, 比现有其它检测方法高, 而且样品用量少。

关键词: 马铃薯纺锤块茎类病毒

聚合酶链式反应 检测

马铃薯纺锤块茎类病毒

聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 是近年来发展起来的分子生物学新技术^[1], 该技术能在体外迅速、特异地将目的 DNA 扩增百万倍以上。PCR 技术在植物病毒方面的应用发展迅速, 应用这一技术成功地检测了携带大麦黄矮病毒的单头蚜虫^[2]。用 PCR 技术对洋李痘病毒进行了检测^[3]。1990年, Hadidi 等^[4]用这一技术检测梨果类病毒, 以含类病毒 RNA 的总核酸为模板, 加入一个与该类病毒 RNA 完全互补的人工合成的 DNA 引物, 用反转录酶合成类病毒 cDNA, 再用两个类病毒特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增产物用 Southern 杂交可检测出 0.001ng 总核酸样品中的类病毒。迄今为止尚未见用 PCR 法检测马铃薯纺锤块茎类病毒的报道。

本文报道了用 PCR 法检测马铃薯纺锤块茎类病毒的结果。

材 料 与 方 法

一、主要试剂 M-MuLV 反转录酶 (New England Biolabs 公司产品), RNasin (120u/μl) dNTP 和 TaqDNA 聚合酶 (购于华美公司) 等。

二、DNA 引物 引物 1 (P1) 与 PSTVd RNA 的第 345-359 位核苷酸互补, 碱基序列为: 5'-AGGAACCAACTGCGG-3'。引物 2 (P2) 与 PSTVd RNA 的第 1-15 位核苷酸同源, 碱基序列为: 5'-CGGAACTAAACTCGT-3'。用 Applied Biosystem 391 型 DNA 合成仪合成这两个引物。

三、低分子总核酸提取 按文献^[5]并简化。1g 马铃薯块茎组织, 加 5ml 核酸提取缓冲液

本文于 1991 年 8 月 20 日收到, 12 月 25 日修回。

(100mmol/L Tris, 100mmol/L NaCl, 75mmol/L HCl, 10mmol/L EDTA, 10mmol/L 2-巯基乙醇, pH7.0), 10ml Tris-饱和的酚和10ml氯仿, 匀浆, 15000r/m, 3分钟。离心, 4℃, 10000r/m, 10分钟。取上清, 加2.5倍体积的冷乙醇, -20℃ 5小时以上。离心, 10000r/m, 10分钟。弃上清, 沉淀用500μl 2mol/L LiCl溶解, 4℃放置过夜。次日离心, 4℃, 10000r/m, 10分钟。取上清, 加1/10体积3mol/L 乙酸钠(pH5.2)和2.5倍体积冷乙醇, -20℃ 5小时以上。离心, 10000r/m, 10分钟。沉淀用100μl 灭菌双蒸水溶解, 即为半提纯核酸样品, -70℃保存备用。

四、cDNA合成和PCR扩增

(一)cDNA合成:按文献[4]并略加修改。半提纯核酸样品1μl, 40pmol的DNA引物P1, 6μl 5×cDNA第一链合成缓冲液(250mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 375mmol/L KCl, 15mmol/L MgCl₂, 50mmol/L DTT), 加灭菌无离子水至终体积30μl。100℃水浴5分钟, 立即置冰浴5分钟。然后在室温放置1小时, 使类病毒RNA与引物P1退火。加6μl 灭菌无离子水, 4μl 5×第一链合成缓冲液, 5μl 0.3mol/L 2-巯基乙醇, 2.5μl 10mmol/L dNTP, 0.5μl RNasin(120u/μl)和2μl M-MuLV反转录酶(25u/μl), 42℃水浴保温30分钟。

(二)PCR扩增:取上述合成的cDNA 5μl于一个新的Eppendorf管中, 加36μl 灭菌无离子水, 100℃2分钟, 迅速置冰浴2分钟。然后加5μl 10×PCR反应缓冲液[670mmol/L Tris-HCl(pH8.8), 67mmol/L MgCl₂, 166mmol/L (NH₄)₂SO₄, 100mmol/L 2-巯基乙醇, 1.7mg/ml BSA, 67μmol/L EDTA], 1μl 10mmol/L dNTP, DNA引物P1和P2各40pmol, 1μl TaqDNA聚合酶(3u/μl)。混匀后用50μl液体石蜡复盖, 用PCR仪(ERICOMP公司)进行扩增。依94℃45秒、55℃30秒和72℃60秒(最后一次10分钟)顺序, 进行40次循环。

五、电泳检测 取上述反应混合物5—10μl, 用2%琼脂糖进行电泳检测, 电泳缓冲液为1×TBE缓冲液(89mmol/L Tris, 89mmol/L 硼酸, 2.5mmol/L EDTA, pH8.3), 电泳完毕, 用0.5μg/ml EB染色。在紫外灯下观察结果。

结果与讨论

一、PCR扩增的产物分析

本研究所设计的DNA引物P1和P2的核苷酸序列位于PSTVd RNA分子的T端, P1与RNA的第345—359位核苷酸互补, P2与RNA的第1—15位核苷酸序列同源。用这两个引物对PSTVd cDNA进行扩增, 其主要产物应是359bp含全长序列的dsDNA。从感病或健康马铃薯块茎中提取的总核酸样品, 经反转录后, 进行PCR扩增, 经2%琼脂糖电泳后, 在紫外灯下观察结果。在感病样品中能观察到含359bp的特异性电泳区带, 这是含全长序列的PSTVd dsDNA, 与预期结果相一致。在健康样品的扩增产物和两者未扩增的产物中没有这条特异性电泳区带。结果见图1。

二、PCR法检测PSTVd的灵敏度测定

为了测定PCR法检测PSTVd的灵敏度, 将纯化的PSTVd RNA按下列浓度稀释: 150pg、15pg、1.5pg和0.15pg。在体积为50μl的反转录体系中进行反转录, 取5μl反转录产物进行PCR扩增。经40次循环后, 取10μl反应混合物, 用2%琼脂糖电泳检测。结果表明, 0.15pg的PSTVd RNA经反转录并PCR扩增后, 在电泳图谱上仍能显示清晰的区带(结果见图2)。说明在本实验条件下, PCR法测定PSTVd的灵敏度可达0.15pg。

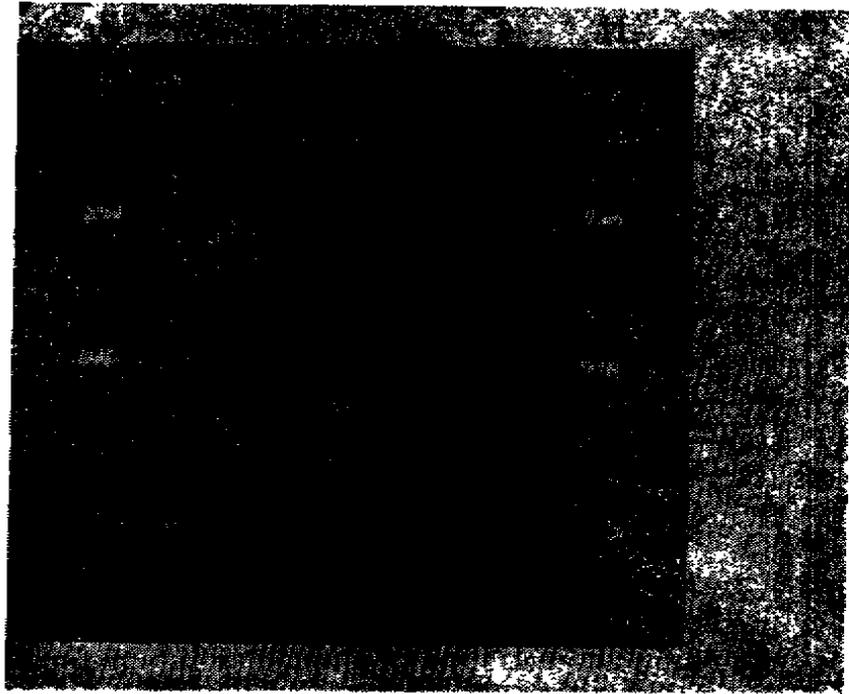


图 1. PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶中的电泳分析

1和11: *Hinf*I酶解pBR322作为DNA长度的标准物 2: 健康未扩增样品 3: 健康扩增样品
4: 感病未扩增样品 5—10: 感病扩增样品(5—6为克新4号, 7—8为晋薯8号, 9—10为
呼薯79076)

Fig. 1. Electrophoretic analysis of the PCR-amplified PSTVd cDNA products on 2% agarose gel

*Hinf*I fragments of plasmid pBR322 (lane 1 and 11), the length of the marker fragments in nucleotides are indicated. Transcript samples of total nucleic acids from uninfected tissue, unamplified (lane 2) and amplified (lane 3). Transcript samples of total nucleic acids from infected tissue, unamplified (lane 4) and amplified (lane 5—6, Kexin No.4; lane 7—8, Jinshu No.8; lane 9—10, Hushu No.79076).

表 1 比较了不同的 PSTVd 检测方法的灵敏度。PCR 法的灵敏度比 ^{32}P 标记的 cDNA 探针高 65 倍左右, 比 ^{32}P 标记的 RNA 探针高约 10 倍, 而与往返-聚丙烯酰胺凝胶电泳比较, 其灵敏度高约 5000 倍左右。表明 PCR 法检测 PSTVd 比其它检测方法灵敏度高。

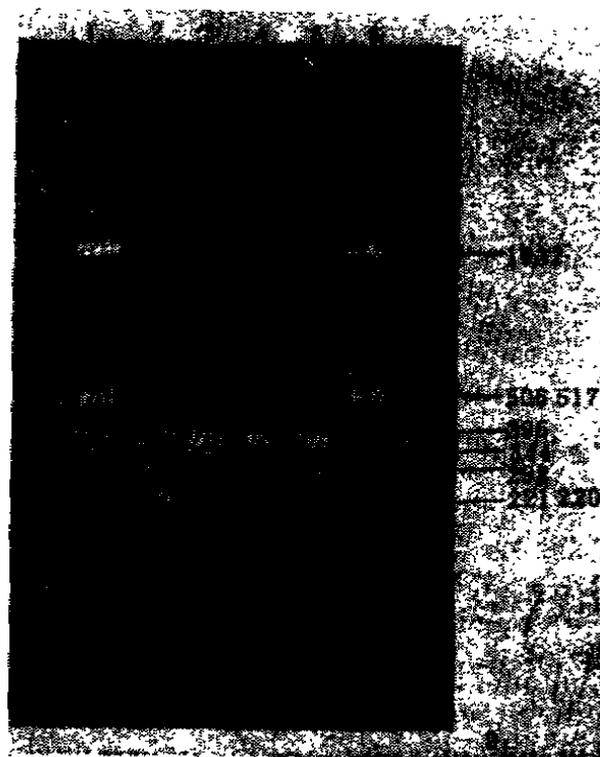


图 2. PCR 法检测 PSTVd 的灵敏度测定

1和6: *Hinf*I 酶解的 pBR 322 作为 DNA 长度的标准物 2: 0.15pg 纯化的 PSTVd RNA 3: 1.5pg 纯化的 PSTVd RNA 4: 15pg 纯化的 PSTVd RNA 5: 150pg 纯化的 PSTVd RNA

Fig. 2. Determination of the sensitivity of PCR for detecting PSTVd. *Hinf*I fragments of plasmid pBR322 (lane 1 and 6), the length of the marker fragments in nucleotides are indicated. Amplified PSTVd cDNA products from the following initial amounts of purified PSTVd RNA: 0.15pg (lane 2), 1.5pg (lane 3), 15pg (lane 4) and 150pg (lane 5).

表 1. 不同的 PSTVd 检测方法灵敏度比较

Table 1. Comparison of the sensitivity of different methods for detecting PSTVd

检测方法 Detection methods	灵敏度 (pg) Sensitivity (pg)	参考文献 Reference
PCR 法 PCR	0.15	
³² P 标记 cDNA 探针 ³² P-labelled cDNA probe	10	(6)
³² P 标记 RNA 探针 ³² P-labelled RNA probe	1.4	(7)
往返-聚丙烯酰胺凝胶电泳 Return-polyacrylamide gel electrophoresis	800	(8)

综上所述,本研究用PCR技术成功地从感染PSTVd的马铃薯块茎组织的核酸抽提液中检测了PSTVd。该法不但能增加检测速度,而且无需构建探针和进行分子杂交,其灵敏度高,样品用量少,可以预计这一技术也适用于其它类病毒的检测。

参 考 文 献

- (1) Saiki, P.K. et al., 1985, *Science*, 230: 1350—1354.
- (2) 成卓敏等, 1992, *病毒学报*, (1): 80—84.
- (3) Korachineck, J. et al., 1991, *J. Virol. Methods*, 31: 139—146.
- (4) Hadidi, A. et al., 1990, *J. Virol. Methods*, 30: 261—270.
- (5) Martin, T. et al., 1989, *J. Virol. Methods*, 23: 111—126.
- (6) Bernardy, M.G. et al., 1987, *J. Phytopathology*, 118: 171—180.
- (7) Lakshman, D.K. et al., 1986, *J. Virol. Methods*, 14: 309—319.
- (8) Schumacher, J. et al., 1986, *J. Phytopathology*, 115: 332—343.

Detection of Potato Spindle Tuber Viroid by Polymerase Chain Reaction(PCR)

He Xiao-yuan Zhou Guang-he Cheng Zhuo-min
Wang Li-yang Chen Jian-bo

(Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094)

A new detection method has been developed by a new technique of polymerase chain reaction (PCR). According to the sequence of PSTVd, two primers were designed and synthesized with automated DNA synthesizer. The cDNA was synthesized by reverse transcription of PSTVd RNA, the cDNA was then amplified by polymerase chain reaction, the amplified products were detected by gel electrophoresis. The results showed that the method was highly specific and the sensitivity was 0.15 pg. It was more sensitive than other methods so far.

Key words, Potato spindle tuder viroid (PSTVd) Polymerase chain reaction (PCR) Detection