

西伯利亚百合病毒 RNA 提取及 RT-PCR 方法的比较与优化

赵庆芳, 韩 静, 马平霞, 丁文龙, 李巧峡

(西北师范大学 生命科学学院 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 在对感染西伯利亚百合的 CMV、LSV、LmoV 3 种病毒的检测上, 对 4 种常见的 RNA 提取方法及影响 RT-PCR 体系的因素进行了比较研究。改良优化了的 RNA 提取方法, 不需 DEPC 水处理和高温烘器皿, 省去液氮研磨过程, 采用该法从百合叶片中提取总 RNA, 整个过程及后继反应均不需使用 RNasin, 降低了成本, 同时提取的 RNA 质量高, 适于后期 RT-PCR 的检测, 更适合于百合幼嫩叶片和试管苗 RNA 的提取。运用一步法, 建立了 CMV、LSV、LmoV 3 种病毒的 RT-PCR 优化体系, 最优反应体系为: M-MLV 5× Reaction Buffer 1 μL, 10× PCR buffer 0.5 μL, 2.5 mM dNTPs (each) 0.8 μL, 10 pmol/μL 下游引物 0.2 μL, 10 pmol/μL 上游引物 0.2 μL, M-MLVRT 200 U/μL 0.1 μL, 2.5 U/μL Taq polymerase 0.1 μL; 0.4 μL 感病材料 RNA 提取液, 剩余部分用无菌双蒸水补足, 使反应体系达到 10 μL。

关键词: 西伯利亚百合; RNA 提取; 病毒检测; RT-PCR

中图分类号: S 682.2⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)07-0201-04

百合 (*Lilium* spp.) 属百合科 (Liliaceae) 多年生草本。近年来, 从国外引进作为鲜切花的百合品种越来越多, 其栽培规模也不断扩大。百合由于遭受病毒侵染并出现生长势降低、枝、叶、花畸形等衰退现象的情况越来越严重, 给相关产业造成了巨大的经济损失。严重危害百合的病毒主要有黄瓜花叶病毒 (CMV)、百合无症病毒 (LSV) 和百合斑驳病毒 (LmoV), 国内外对一些品种的百合做了一些主要针对以上 3 种主要病毒的检测研究^[1-3], 但是对西伯利亚百合 (*Siberia Lilium*) 没有进行过相关分析。对百合其它品种的病毒检测多采用生物学或血清学方法, 现已证明分子生物学方法的检测灵敏度远远高于这 2 种方法^[4], 单一的采用生物学或血清学方法检测脱毒结果有可能因植物体内病毒浓度低而出现假阴性的现象^[5], 得出错误的病毒脱除结论。现系统的研究感染西伯利亚百合的 CMV、LSV、LmoV 的分子生物学检测方法, 为西伯利亚百合脱毒试管苗生产技术应用提供可靠的指导。

1 材料与方法

1.1 材料

感病的西伯利亚百合叶片。

1.2 病毒 RNA 的提取

1.2.1 试剂盒法 采用 2 种试剂盒作为比较, 上海生工公司生产的超绝 UNIQ-10 总 RNA 抽提试剂盒和植物总 RNA 抽提试剂盒。

1.2.2 异硫氰酸胍法 将感病的百合叶片 2~3 g 放入 Rnase-free 的预冷的研钵中加入液氮, 迅速研成粉末状分装到 DEPC 处理过的 Rnase-free 的 2 mL Eppendorf 管中, 每管 200 mg 材料。加入 500 μL 异硫氰酸胍 Rna 提取缓冲液, 迅速振荡。之后加入 50 μL 10 M NaAc。加入 500 μL 饱和酚试剂和 100 μL 氯仿, 振荡 15 s。在 4℃ 离心 10 min。将上清液移入新的 DEPC 处理过的 Rnase-free 的 2 mL Eppendorf 管中, 重复加入 500 μL 饱和酚试剂和 100 μL 氯仿, 振荡 15 s, 放置 15 min 后离心 10 min。上清液加入等体积异丙醇, -20℃ 下静置 20 min。离心 15 min 后弃去上清液, 沉淀用 70% 1 mL 乙醇冲洗后离心重新沉淀。重复 2 次。加入 30 μL Rnase-free 溶解沉淀。

1.2.3 改良 RNA 提取法 称取 0.15 g 感病的叶片, 在预冷的研钵中研磨成匀浆。向匀浆中加入 1 mL RNA 提取缓冲液和 8 μL β-巯基乙醇, 将混合液吸入离心管中, 振荡混匀。离心管中加入 1 mL 水饱和酚, 1 mL 氯仿异戊醇 (49:1), 充分混匀, 冰浴中放置 10 min, 中间混匀

第一作者简介: 赵庆芳 (1962), 女, 山东莱芜市人, 博士, 教授, 主要从事植物生理生态学的研究。E-mail: zhaopingfang2001@163.com.

通讯作者: 李巧峡。

基金项目: 甘肃省科技攻关计划资助项目 (2GS042-A41-001-11); 兰州市科技局资助项目 (06-2-19)。

收稿日期: 2008-02-24

2~3次。离心 15 min 后取出水相 加入 0.1 倍体积的 NaAc(3 M, pH=5.2)和等体积的异丙醇,上下颠倒混匀。将混合液放入-20℃冰箱沉淀 3 h。离心 20 min 后弃去上清液。加入 600 μL 预冷的 70%乙醇洗涤沉淀 2 次,室温干燥 15 min,加入 50 μL 提取的 RNA。

1.3 RT-PCR 检测百合中 3 种主要病毒

采用一步法 RT-PCR 对病毒进行检测。扩增反应在 Bionmetra UNOII PCR 仪上进行。扩增产物在含有 0.5 μg/mL EB 的 1.5%的琼脂糖凝胶上电泳。使用 Uvi 凝胶图像分析系统进行鉴定。Marker 分子量为 100~600 bp。用于 RT-PCR 反应的 CMV, LSV, LMoV 3 种病毒的引物序列见表 1。阳性对照引物序列如下:上游 TCCGTAGGTGACCTGCGG, Tm = 60; 下游 CCTC-CGCTTATTGATATGCT, Tm=60。

2 试验结果

2.1 RNA 的质量、纯度鉴定和浓度测定

取 4~5 μL RNA 样品在 15 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳,然后观察检验 RNA 的完整性,观察 28 S、18 S 和 5 S 这三条带是否清晰,有无降解,检查 RNA 的质量。

取 1~2 μL RNA 样品溶于 1 mL 超纯水中,测定 D 值。以 D₂₆₀/D₂₈₀的比值表示其纯度,比值在 1.8~2.0 之间为纯的 RNA,比值低于 1.8,说明 RNA 样品有蛋白质或酚的污染。经检测,超绝 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提与改良的 RNA 提取新方法 2 种方法提取的 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值接近 2.0,说明 RNA 的纯度较高。其他方法提取的 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀比值约为 1.6,纯度低于上 2 种方法。不同 RNA 提取方法对 RNA 纯度的影响,如图 1~3。

表 1 RT-PCR 反应的 CMV, LSV, LMoV 3 种病毒引物

病毒	上下游	序列	长度/bp	位点/bp	片段/bp
CMV	Upstream	5'- ACCCT(A/G)AA(A/G)CC(A/G)CC (T/A/G)(A/G)AAAT(T/A)GA-3'	23	220~243	409
	downstream	5'- CG(T/C)TG(A/G)TG(T/C)TC(A/G)A (T/C)GTC(A/G)AC(A/G)TG-3'	23	626~605	
LSV	Upstream	5'-GA(T/C)GA(A/G)(C/T)T(T/C)TT (T/C)AA(A/G)ATGAA(A/G)GT-3'	23	280~303	483
	downstream	5'-A(G/A)(T/C)TG(T/C)TT(A/G)TG (T/C)GCC(A/G)TT(A/G)TG-3'	20	716~743	
LMoV	Upstream	5'-CA(A/G)TT(T/C)GA(A/G)AC (T/C)TGTA(T/C)AA(T/C)GC-3'	23	817~840	513
	downstream	5'-TGCAT(A/G)TT(T/C)TT(A/G)TT (A/G)ACCA(G)TC(A/G)TC-3'	23	1328~1307	

2.2 RT-PCR 反应产物的电泳检测

RT-PCR 过程主要有以下成分参加反应: dNTPs、Mg²⁺、M-MLVRT、Taq poly 酶、病毒 RNA、互补引物。根据检验 PCR 扩增效果的几个重要指标和实际应用中的要求,确定试验的优化原则为:特异性强,谱带清晰,

重现性好,成本低及时间短。研究主要对以上参加反应各成分浓度(因 Mg²⁺是 M-MLV 和 TaqDNA 聚合酶反应缓冲液中本来就带有的,试验没有对其浓度设处理)进行梯度设计,筛选最优体系。优化后的 RT-PCR 扩增产物电泳结果如图 4。

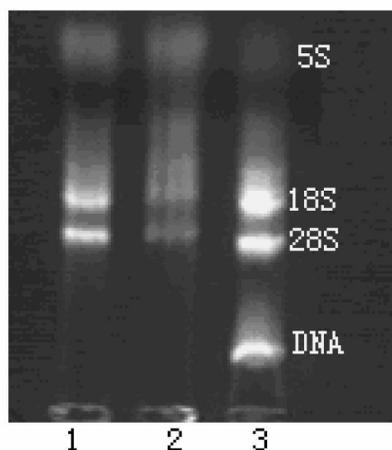


图 1 1~2 号为超绝 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒提取的 RNA; 3 号为植物 RNA 抽提试剂盒提取的 RNA

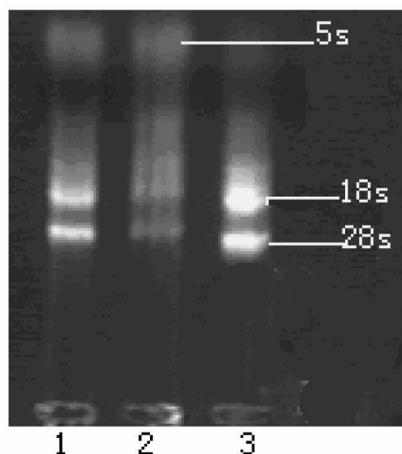


图 2 改良的 RNA 提取法提取的 RNA

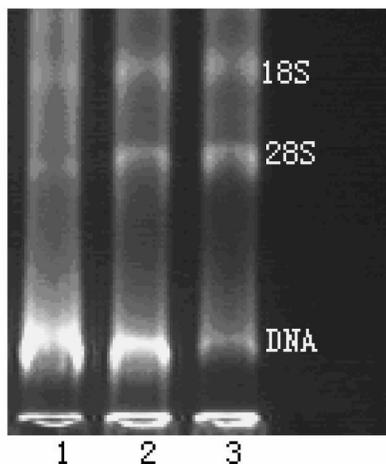


图3 异硫氰酸胍法提取的 RNA

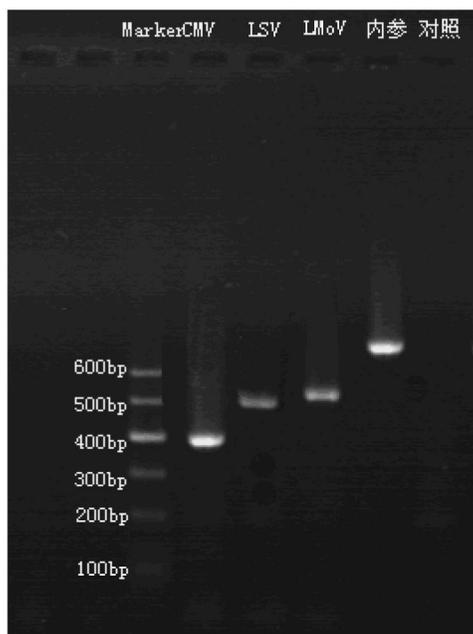


图4 RT-PCR 优化体系扩增产物

3 讨论

3.1 4 种 RNA 提取方法对 RNA 纯度影响的研究

有关植物组织总 RNA 的提取方法已有很多报道,包括采用异硫氰酸胍^[7]、SDS(十二烷基硫酸钠)^[8]或 CTAB(十六烷基-三甲基-溴化铵)^[9]裂解细胞,用有机溶剂酚、氯仿^[9]去除蛋白,采用酚抽提、降低提取缓冲液中的 pH 值或盐浓度使大部分 DNA 存在于有机相中除去,提取缓冲液中加入聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和 β -巯基乙醇防止酚类化合物的氧化等^[10],但这些植物组织总 RNA 的提取方法在实践中重复性差,主要是大量酚类物质和水溶性多糖不易去除,破碎细胞时组织匀浆易引起酚类化合物的氧化,使其与核酸不可逆的结合而无法去除。

通过琼脂糖凝胶上的电泳图检测 RNA 的质量,可以看出超绝 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒提取 RNA 质量最好,5S、18S、28S 条带清晰,无降解,无 DNA 污染;植物 RNA 抽提试剂盒提取 RNA 的 5S、18S、28S 条带清晰,无降解,但有 DNA 的污染;异硫氰酸胍法提取的 RNA 质量最差,5S、18S、28S 条带不清晰,降解,有 DNA 污染;改良的 RNA 提取方法提取的 RNA 效果较好,5S、18S、28S 条带较清晰,无降解,无 DNA 污染。从结果可以看出,超绝 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒和改良方法提取 RNA 质量最好,但试剂盒费用较高,因此改良的 RNA 提取法适用于西伯利亚百合总 RNA 的提取。

试验运用异硫氰酸胍法和植物 RNA 抽提试剂盒提取的 RNA 经检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值约为 1.6,说明 RNA 纯度不够。超绝 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提与改良的 RNA 提取新方法 2 种方法提取的 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值接近 2.0,说明 RNA 的纯度较高,可用于病毒的 RT-PCR 反应。与传统的病毒 RNA 提取法相比,改良后的方法不需要 EDPC 的处理,更环保,实用经济,适用于叶片 RNA 提取。

3.2 CMV、LSV、LMoV 3 种病毒 RT-PCR 优化体系的建立

3.2.1 M-MLV 反转录酶浓度对 RT-PCR 的影响 试验对 M-MLV 反转录酶的浓度设了以下处理:10、20、30、40、50 U/ μ L。结果表明:M-MLV 浓度为 10 U/ μ L 时无 PCR 产物,而 M-MLV 浓度从 20~50 U/ μ L 均能进行正常的 RT-PCR,在此范围内随着 M-MLV 浓度的增高,PCR 产物的产量增加。从而既降低成本又保证 PCR 产物产量考虑,M-MLV 的恰当浓度应为 20 U/ μ L。

3.2.2 dNTPs 浓度对 RT-PCR 的影响 对 dNTPs 设如下几个浓度梯度:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mmol/L。结果表明:dNTPs 浓度为 0.2~0.6 mmol/L 均能进行有效的 RT-PCR,在此范围内随着浓度的增加,RT-PCR 产物的产量也增加。因此,dNTPs 的有效浓度为 0.2 mmol/L。

3.2.3 引物浓度对 RT-PCR 的影响 对引物浓度设了 5 个浓度梯度,分别为:1、2、3、4、5 pmol/L。结果表明:引物浓度 2~5 pmol/L 时均能进行有效的 RT-PCR,在此范围内随着浓度的增加,PCR 扩增时非特异性增强;浓度低于 2 pmol/L 时,不能产生足够的 RT-PCR 产物,其最适浓度为 2 pmol/L。

3.2.4 病毒 RNA 模板的浓度对 RT-PCR 的影响 对模板浓度设了如下的处理:0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μ L/L。试验结果表明:病毒模板浓度 0.3~0.6 μ L/L 时 RT-PCR 都能检测到病毒模板的存在,较低的病毒模板浓度也能进行有效的 RT-PCR 扩增,验证 RT-PCR 检测病毒具有很高

的灵敏度。效果最佳的浓度为 0.4 $\mu\text{L}/\text{L}$ 。

3.2.5 TaqDNA 聚合酶浓度对 RT-PCR 扩增的影响

对 TaqDNA 聚合酶浓度设了 5 个梯度的处理: 0.1、0.2、0.25、0.35、0.5 $\text{U}/\mu\text{L}$ 。试验结果表明: TaqDNA 聚合酶浓度为 0.2~0.35 $\text{U}/\mu\text{L}$ 时扩增效果良好, 浓度低于 0.2 $\text{U}/\mu\text{L}$ 时扩增产物量很少, 几乎看不到扩增谱带。浓度大于 0.35 $\text{U}/\mu\text{L}$ 时, 非特异性扩增明显, 因此, TaqDNA 聚合酶最适浓度应为 0.25 $\text{U}/\mu\text{L}$ 。

3.3 RT-PCR 优化体系的建立

研究建立了 CMV、LSV、LMOV 的 RT-PCR 优化体系。具体操作如下: 向 100 μL 薄壁管中依次加入 M-MLV 5 \times Reaction Buffer 1 μL 、10 \times PCR buffer 0.5 μL 、2.5 mM dNTPs (each) 0.8 μL 、10 pmol/ μL 下游引物 0.2 μL 、10 pmol/ μL 上游引物 0.2 μL 、M-MLV RT 200 $\text{U}/\mu\text{L}$ 0.1 μL 、2.5 $\text{U}/\mu\text{L}$ Taq polymerase 0.1 μL ; 再向体系中加入 0.4 μL 感病材料 RNA 提取液, 剩余部分用无菌双蒸水补足, 使反应体系达到 10 μL 。然后在液面上加 2 滴石蜡油, 依次进行如下反应: 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 7 min, 1 次循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 55.6 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 延伸 10 min。

参考文献

[1] Kim J Y, Choi S T, Hsu H T. Comparison of detection efficiency of lily

symptomless virus in lily bulbs by ELISA, DBIA and tissue blotting method [J]. Journal of The Korean Society for Horticultural Science (Korea Republic), 1995, 36: 560-566.

[2] Kim J Y, Choi S T, Roh M S, et al. Production and detection of virus-free lily plants by shoot tip culture and virazole treatment of bulbs [J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1996, 37: 64-69.

[3] Kim J Y, Han Y H, Soh H S, et al. Occurrence of lily viruses and damages of viral diseases in oriental lilies [J]. RDA Journal of Crop Protection, 1998, 40: 58-65.

[4] Lee J S, Nou H S, Hong D K, et al. Detection of viral diseases in *Lilium* oriental plants using RT-PCR technique [J]. RDA Journal of Crop Protection, 1998, 40: 50-56.

[5] Niimi Y, Gondaira T, Kutsuwada Y, et al. Detection by ELISA and DBIA tests of lily symptomless virus (LSV), tulip breaking virus-lily (TBV-L) and cucumber mosaic virus (CMV) in *Lilium* spp. grown in the field [J]. J Jpn Soc Hort Sci, 1999, 68: 176-183.

[6] Niimi Y, Han D S, Makoto F. Production of virus-free plantlets by anther culture of *Lilium* [J]. Scientia Horticulturae, 2001, 90(16): 325-334.

[7] 王文锋, 肖月华, 侯磊, 等. 棉花总 RNA 的快速提取方法 [J]. 河南农业大学学报, 2002, 36(3): 229-231.

[8] 侯义龙, 张开春, 胡文玉, 等. 逆转录-聚合酶链式反应检测果树 RNA 病毒 [J]. 病毒学报, 2002, 18(1): 71-73.

[9] 夏兰芹, 郭三维. 棉花 RNA 的快速提取方法 [J]. 棉花学报, 2000, 12(4): 205-207.

[10] Michael G, Mason, Susanne S. Rapid isolation of total RNA and genomic DNA from *Hakea actinifolia* [J]. Funct Plant Biol, 2002, 29: 1013-1016.

Comparison and Optimization of the Methods on RNA Extraction of Three Viruses and RT-PCR in Siberia *Lilium*

ZHAO Qing-fang, HAN Jing, MA Ping-xia, DING Wen-long, LI Qiao-xia

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: CmV, LSV and LMOV are three viruses that damage lily seriously. The application of molecular biology method of RT-PCR technology was to exam the virus of Siberia *Lilium*. The methods of RNA extraction and RT-PCR were compared and optimized in Siberia *Lilium*. In this research, the improved method of RNA extraction that had the following merits: it neither needs to dry the household utensils with the DEPC water treatment and high temperature, nor needs the fluid nitrogen to grind the material, which save a lot of preparatory work. The application of this method to extract RNA from the lily leaves without using RNasin in the whole process and its successive reaction could reduce the cost, save resources and time, and was more suitable for the extraction of the young tender lily leaves and test tube seedling RNA. What's more, the extracted RNA was suitable for the later RT-PCR examination. The optimization of the RT-PCR examination system of cmV, LSV, and LmoV were established by using the one-stage process of RT-PCR. The optimized reacting system was M-MLV 5 Reaction Buffer 1 μL 、10 \times PCR buffer 0.5 μL 、2.5 mM dNTPs (each) 0.8 μL 、10 pmol/ μL Down primer 0.2 μL 、10 pmol/ μL Up primer 0.2 μL 、M-MLV RT 200 $\text{U}/\mu\text{L}$ 0.1 μL 、2.5 $\text{U}/\mu\text{L}$ Taq polymerase 0.1 μL 、0.4 μL Infected materials such as extracted liquid RNA. Surplus part can be supplemented by aseptic double steam water to enables the reacting system to reach 10 μL .

Key words: Siberia *Lilium*; RNA extraction; Virus detection; RT-PCR