

草莓镶脉病毒检测方法研究

陈晓军, 王敬东, 马洪爱, 陈虞超, 宋玉霞

(宁夏回族自治区农业生物技术重点实验室, 宁夏 银川 750002)

摘要:以携带草莓镶脉病毒的植株为试材, 运用一种新的信息生物学算法—Insignia 设计特异性扩增引物, 以现行技术标准为对照验证其准确性和可行性。通过 RNA 反转录扩增内标基因、病毒特异性序列和技术标准特异性序列, 扩增产物大小分别为 295、289、600 bp, 与设计一致。结果表明: 该算法得到的特异性引物能较好地满足草莓病毒检测的标准, 从而为草莓病毒的准确、快速检测方法提供了一条新途径。

关键词: 草莓镶脉病毒; 检测; Insignia

中图分类号: S 668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)22—0123—03

草莓病毒病在世界各地分布广泛, 削弱植株生长势, 降低产量和品质, 危害草莓生产。目前已报道的可侵染草莓的病毒有 20 多种, 其中草莓镶脉病毒 (Strawberry vein banding virus, SVBV) 是危害草莓较为严重的一种潜隐性病毒, 也是危害我国草莓生产的 4 种主要病毒之一^[1-3]。

目前, 已知数百种细菌和病毒的基因组序列, 研究人员能够根据它们的 DNA 来设计出可迅速检测这些种类存在与否的方法。这些检测方法能够检测出一种复杂有机混合物中的某种病原物。美国马里兰大学的 Adam Phillippy 和同事开发出了一种计算机程序, 这种程序能够以比以往更高的精确度确定出这些细菌、病毒中特异性的 DNA 标签。研究人员将这种新的计算机系统称之为 Insignia, 并且已经成功用于鉴定 46 个霍乱弧菌。Insignia 利用高效的运算法则, 将已知的细菌和病毒基因组相互比较, 并与背景基因组 (包括植物、动物和人) 进行比较。这个程序具有广泛的应用价值, 如诊断人类感染以及检测水中的有害微生物。为了让不同学科的研究人员能够最充分地利用这个新成果, Insignia 可以在作者的网页上获得, <http://insignia.cbcb.umd.edu>。

第一作者简介: 陈晓军(1977-), 男, 硕士, 助理研究员, 现主要从事植物分子生物学应用研究工作。

通讯作者: 宋玉霞(1963-), 女, 硕士, 研究员, 现主要从事特色野生植物资源利用研究工作。E-mail: songyx666@163.com。

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目 (NZ0974); 宁夏科技攻关资助项目 (KGZ-16-07-02)。

收稿日期: 2010-08-30

传统的草莓病毒检测方法是利用病毒指示植物的“小叶嫁接法”, 但是这种方法周期长、灵敏度较低、费时费工。聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 技术检测病毒具有快速、灵敏等优点, 正逐渐成为病毒检测的主要方法。现拟通过已建立的草莓病毒检测系统, 对来自 Insignia 程序的结果用现行的一个检测标准来进行验证, 从而为草莓病毒的准确、快速检测方法提供了一条新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

携带草莓病毒 SVBV 的草莓叶片材料由宁夏回族自治区农业生物技术重点实验室提供; RNA 提取试剂盒购于天泽生物公司; 反转录试剂盒购于 Promega 生物公司, DNA marker D2000、PCR 扩增试剂盒购于北京天根时代生物公司, 试验所用引物均由北京奥科生物技术公司合成, 其它化学试剂均为化学纯。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据文献[4], 通过 Insignia 程序在线设计引物, 从中优选一特异性片段来鉴定 SVBV (GenBank Accession No. X97304), 扩增产物为 289 bp。根据文献[5-6]合成扩增 SVBV 特异性引物 SVBV 600, 扩增产物为 600 bp (命名为 SVBV 600); 另外, 根据草莓肌动蛋白基因 *Actin* (GenBank Accession No. AB116565) 利用 DNA man 6.0 软件设计 1 个内标 *Actin* 295 (命名为 SVBV 295), 扩增产物为 295 bp (命名为 SVBV 289)。SVBV 289: 上游引物 AGAGGCGAACACACACACAG; 下游引物 TGTTTCAGCTTCTGTCCAACG。SVBV 600: 上游引物 GAATGGGACAATGAAATGAG; 下游引物 GTGAGGAGAACTTAGGACA。*Actin* 295: 上游引物

GCTGGGTTTGCTGGAGATG; 下游引物 CACGATT-AGCCTTGGGATTC。

1.2.2 RNA 提取与反转录 RNA 的提取与反转录均按试剂盒说明书进行^[7]。

1.2.3 目标基因的检测 将反转录产物 2 倍稀释, 分别取 1 μ L 为模板 DNA, 进行 SVBV 600、SVBV 289、*Actin* 295 PCR 扩增。反应体系按标准 PCR 配制, 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min。

1.2.4 灵敏度检测 为了检测新设计的 DNA 标签的灵敏度, 将反转录产物进行了梯度稀释, 稀释倍数为 2、4、8、16、32、64、128、256、512。分别取以上稀释产物 1 μ L 为模板 DNA, 以 SVBV 289 的 2 对引物进行 PCR 扩增程序同上, 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖电泳。

2 结果与分析

2.1 目标基因的扩增结果

由图 1 可知, SVBV 600 扩增产物大小为 600 bp; SVBV 289 扩增产物大小为 289 bp, 特异性扩增非常好; *Actin* 295 扩增产物大小为 295 bp, 反转录较为成功; 空白取双蒸水为模板, 对照十分干净体系没有污染。

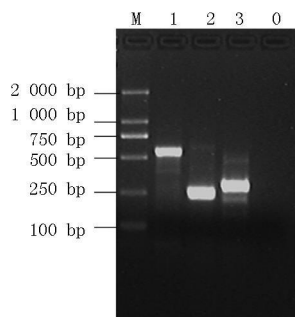


图 1 目标基因的扩增

注: M; DNA marker; 1; SVBV 600; 2; SVBV 289; 3; *Actin* 295; 0; 空白对照。

2.2 灵敏度检测结果

由图 2 可见, 反转录产物 512 倍稀释后仍然可见扩增, 完全可以达到此病毒的检测灵敏度; 空白取双蒸水为模板, 对照中亮条带为引物二聚体。

3 结论与讨论

草莓病毒常规的检测方法有指示植物检测法、双抗体夹心酶联免疫吸附检测法与分子生物学检测法。指示植物检测法周期长, 灵敏度不高, 一般受指示植物的限制; 双抗体夹心酶联免疫吸附检测法虽然灵敏度很高, 但仍需要购买或制备大量高质量的抗体, 且操作步骤繁琐, 在判读结果时存在组间与组内误差。核酸水平

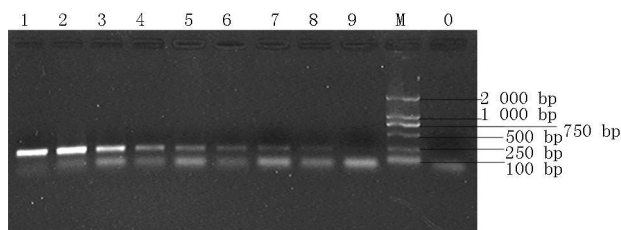


图 2 病毒检测的灵敏度

注: 泳道 1~9 分别为 2、4、8、16、32、64、128、256、512 倍稀释 0 为空白对照; M 为 DNA marker。

上的病毒检测技术因具有灵敏度高、特异性强、适应范围广、不受检测时间的限制和操作简便快速等优势正逐步成为最实用的病毒检测方法。

Petrzik 等完成了 SVBV 基因组的全序列测定, 在此基础上, 它们进行了 PCR 检测 SVBV 的研究, 虽然可以从草莓中扩增出外壳蛋白基因的特异片段, 但经常出现弥散现象^[8-10]。该试验中应用 Insignia 设计合成的引物得到的 PCR 产物条带清晰, 特异性强, 能达到草莓病毒检测的要求^[11], 能够根据需要扩增特异性片段的大小, 减少了非特异性扩增所带来的困难。另外, 此程序为其它植物源病毒的检测提供了一个有利工具。

参考文献

- [1] 洪健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 39-42.
- [2] 王国平, 刘福昌. 我国草莓主温表栽区病毒种类的鉴定[J]. 植物病毒学报, 1991, 21(1): 9-14.
- [3] 肖敏, 张志宏. 草莓镶脉病毒研究进展[J]. 辽宁农业科学, 2005(4): 36-38.
- [4] Adam M, Philipp Y, Jacqueline A, et al. Comprehensive DNA Signature Discovery and Validation[J]. Plos computational biology, 2007(3): 1-8.
- [5] Thompson J R, Wetzel S. 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, 111: 85-93.
- [6] 草莓脱毒种苗, 浙江省地方标准 DB33/ 594. 1-2005[M]. 杭州: 浙江省技术监督局.
- [7] Schneiderbauer A, Sandermann H, Ernst D. Isolation of functional RNA from Plant Tissues Rich in Phenolic Compounds[J]. Analytical biochemistry, 1991, 197: 91-95.
- [8] 隋春, 吴禄平, 张志宏, 等. 利用 PCR 技术检测草莓镶脉病毒[J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 82-84.
- [9] 周厚成, 李思源, 何水涛, 等. 草莓镶脉病毒的 PCR 检测及特异片段的序列分析[J]. 果树学报, 2005, 22(3): 286-288.
- [10] 肖敏, 张志宏, 代红艳, 等. PCR 检测草莓镶脉病毒的稳定性研究[J]. 果树学报, 2005, 22(5): 483-487.
- [11] 脱毒草莓种苗病毒检测技术规程[M]. 中华人民共和国农业行业标准 NY/T 406-2000 2000-9-22.

树莓组织培养技术的研究

曹 慧, 薛佳桢, 孙京波

(潍坊学院 生物工程学院, 山东 潍坊 261061)

摘 要:以树莓带芽茎段为外植体, 摸索树莓组织培养快速繁殖技术体系, 着重研究各阶段的最佳培养基配方及培养程序。结果表明: 树莓组培外植体最佳取材时间应在5月初, 半木质化的带芽茎段为其理想的外植体材料, 外植体灭菌用 75%乙醇 0.5 min、2%NaClO 15 min 效果最好; 分化增殖最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L+GA₃ 6 mg/L; 最佳生根培养基为 1/2MS+NAA 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+活性炭 0.5%; 组培苗移栽基质以有机肥: 土: 蛭石=1:1:1 时成活率最高。

关键词: 树莓; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: Q 949.751.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)22—0125—03

树莓(*Rubus idaeus* L.)为蔷薇科悬钩子属多年生落叶小灌木, 俗称托盘、覆盆子。树莓适应性强, 喜光、耐旱、耐瘠薄, 对土壤要求中性或微酸性, 最适宜 pH 5.5~7.0^[1]。树莓不仅可作为鲜食的美味水果, 也可用于加工果酱、果汁、果冻等多种食品的添加剂, 除富含果糖、维生素、氨基酸, 风味香醇、酸甜可口外, 还具有几大药用保健功能: 人体可吸收的 SOD 含量居各种水果之首, 可清除氧自由基、提高免疫力, 具有美容和抗衰的功效; 天然抗癌物质“鞣花酸”含量居各类可食物之首, 欧美人

美其名曰“癌症克星”; 富含天然阿司匹林, 可镇痛解热、抗血凝, 也可减少心脑血管栓塞的发生率^[2]。

欧洲、北美是树莓栽培史较早, 面积和产量较多的地区。据联合国粮农组织统计, 世界上有 30 多个国家栽培树莓, 形成规模的国家仅有 10 个, 大面积栽培的主要集中在波兰、南斯拉夫、美国和英国。国内树莓的优良品种多从欧美引进, 栽培面积小, 产量较低。到目前为止, 我国已从美国、俄罗斯、波兰等国引进 50 余个树莓品种, 在我国的东北、西北、华北、华东等地适合树莓栽培地区进行试种研究, 筛选出了一批适合各地栽培的品种。我国目前树莓栽培面积约有 2 667 hm², 发展空间约有 5 万 hm², 产品供不应求, 其经济效益是种植玉米、水稻等作物的 10~15 倍^[2-3]。

生产上采用扦插、根蘖、压条等传统繁殖方法, 其繁殖系数低, 速度慢, 受季节限制, 苗木供应不足已成为目前发展树莓生产的主要限制因素, 采用组培快繁技术可

第一作者简介: 曹慧(1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向为果树逆境生理与分子生物学。E-mail: hui5232@163.com。
基金项目: 潍坊学院试验资助项目; 潍坊学院青年科研基金资助项目(2009Z19)。
收稿日期: 2010-08-30

Study of Detection Method on Strawberry Vein Banding Virus

CHEN Xiao-jun, WANG Jing-dong, MA Hong-ai, CHEN Yu-chao, SONG Yu-xia
(Key Lab of Agricultural Biotechnology of Ningxia, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract: The strawberry with strawberry vein banding virus was studied, employed a new bioinformatics arithmetic-insignia to design a specific primer and current technology stands as a control to check its veracity and feasibility, RT-PCR amplification produced internal control sequence (295 bp), virus specific sequence (289 bp) and stand specific sequence (600 bp), accorded with the length of design. The results showed that bioinformatics arithmetic meted to detection stand of straw berry virus and enlarged a new approach of rapid detection.
Key words: SVBV; detection; insignia