

# 利用 RT-PCR 对脱毒草莓苗病毒检测研究

陈晓军, 王敬东, 马洪爱, 陈虞超, 宋玉霞

(宁夏自治区农业生物技术重点实验室, 宁夏 银川 750002)

**摘要:** 利用 RT-PCR 技术, 以草莓肌动蛋白基因序列为内标, 结合 4 种草莓病毒特异性扩增, 检测草莓组培脱毒苗是否脱毒情况。结果表明: 此内标与这 4 种草莓病毒的特异性扩增的结合, 能较好达到病毒检测的目的, 减少了结果判断的盲目性, 为准确、快速检测草莓脱毒苗提供了一套较为完整的试验方法。

**关键词:** 草莓脱毒苗; RT-PCR; SMoV; SMYEV; SVBV; SCV

**中图分类号:** S 668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0146-03

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.) 是一种营养价值和  
经济价值较高的多年生草本植物, 因其色、香、味俱佳,  
深受消费者青睐。近年来, 我国草莓栽培面积迅速增  
长, 但目前生产中大量栽培的品种, 多是从国外引入的,  
多年种植后普遍存在着抗病虫能力降低及品质下降等  
问题, 其中草莓病毒病更是限制了草莓产业的进一步发  
展的主要疾病。主要有四类草莓病毒病原: 草莓斑驳病  
毒(*Strawberry Mottle Virus*, SMoV)、草莓镶脉病毒  
(*Strawberry Vein Banding Virus*, SVBV)、草莓皱缩病毒  
(*Strawberry Crinkle Virus*, SCV)、草莓轻型黄边病毒  
(*Strawberry Mild Yellow Edge Virus*, SMYEV)。草莓  
脱毒的传统检测方法是利用病毒指示植物的“小叶嫁接  
法”<sup>[5]</sup>, 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。现利用 RT-PCR 技术同时检测 4 种草莓病  
毒, 以期建立脱毒草莓检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

脱毒草莓试材由宁夏自治区农业生物技术重点实  
验室经花药组培脱毒得到, 取幼叶 2 片, 约 500 mg 为试  
验材料。RNA 试剂提取盒购于绵阳天泽生物技术公  
司; Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子量 Marker  
D2000 购于北京天根时代生物技术公司; 反转录试剂盒

购自 Promega 生物技术公司, 其它化学试剂均为分  
析纯。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 特异性扩增与参照引物设计** 根据 GenBank 中  
SMoV (Genbank Accession No. AJ311875, AJ311876)、  
SMYEV (Genbank Accession No. D12517)、SCV (Genbank  
Accession No. AY005146.1)、SVBV (Genbank Accession  
No. NC 001725) 的基因组序列和文献[4-5] 分别设计和  
合成针对 SMoV、SMYEV、SCV 和 SVBV 的引物(表 1)。  
为了验证扩增的阴性条带的真伪性, 该研究特引用草莓  
肌动蛋白基因 *Actin* (GenBank Accession No. AB116565)  
作为内部体系参照。研究中所用引物均由北京奥科生  
物技术公司合成。

表 1 4 种草莓病毒及内标扩增引物序列

引物对	引物序列	来源	产物大小 bp
SCVF	CATTGGTGGCAGACCCATCA	SCV	345
SCVR	TTCAGGACCTATTTCATGACA		
SMoVF	TAAGCGACCAAGACTGTGACAAAG	SMoV	219
SMoVR	TCTTGGGCTTGGATCGTCACCTG		
SMYEVF	GTGTGCTCAATCCAGCCAG	SMYE	271
SMYEVVR	CATGGCACTCATTTGGAGCTGGG		
SVBVF	GAATGGGACAATGAAATGAG	SVBV	600
SVBVR	GTGAGGAGAACTTAGGACA		
<i>Actin</i> F	GCTGGGTTTGCTGGAGATG	<i>Actin</i>	295
<i>Actin</i> R	CACGATTAGCCTTGGGATTC		

**1.2.2 RNA 的制备** RNA 的提取根据 RNA 试剂盒说  
明进行。RNA 的检测步骤为: 取 5 mL RNA 与 0.1 mL 6×  
RNA 上样缓冲液混合进行 130 V 恒压琼脂糖凝胶快速  
电泳, 用 0.1% 溴已啶染色, 紫外灯下观察试验结果。

**1.2.3 反转录** 按照试剂盒说明进行反转录。

**1.2.4 病毒特异性扩增** 将反转录产物稀释 3 倍后作  
为 PCR 扩增的模板 DNA, 将每一样品同时进行 SMoV、  
SMYEV、SCV、SVBV 和 *Actin* 的扩增。

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

2 结果与分析

2.1 RNA 制备的检测

由图 1 可见, 上样量为 5、10 mL 的 1、2 泳道中 5、18、28 S 3 条带比较清晰, RNA 没有降解, 可以满足反转录的质量要求<sup>[9]</sup>。

2.2 病毒特异性扩增

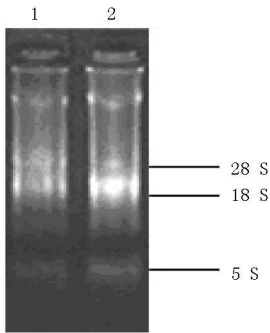


图 1 RNA 快速电泳结果

注: 上样量 1-5 mL; 下样量 2-10 mL。

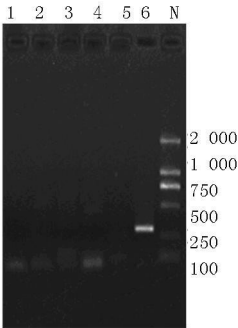


图 2 无毒苗的检测

注: 泳道 1~4 分别为 SCV、SMoV、SMYEV、SVBV; 5 为 dd H<sub>2</sub>O 为模板; 6 为内标。引物为 4 种病毒引物。

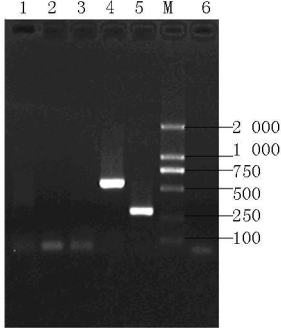


图 3 带病毒苗的检测

注: 泳道 1~4 分别为 SCV、SMoV、SMYEV、SVBV5 为内标; 6 为 dd H<sub>2</sub>O 为模板; 引物为 4 种病毒引物。

3 结论与讨论

3.1 RNA 的制备

由于植物材料本身的内源 RNA 酶和外源 RNA 酶的影响, RNA 比 DNA 更容易降解。因此植物总 RNA 的提取条件比 DNA 要苛刻。而且很多植物材料中, 或富含类黄酮和酚类化合物, 或富含多糖, 或含有某些尚无法确定的次级代谢产物, 增加了 RNA 的提取难度。草莓果实、叶片富含芳香族的酚类化合物、类黄酮类色素和多糖类化合物, 使其核酸的提取变得困难<sup>[7-9]</sup>。特别是总 RNA 的提取, 常规提取方法很难奏效, 该试验所用试剂盒能较好解决此问题。

试验还尝试采用 TRIZOL 的方法提取制备 RNA, 但很难达到理想的结果, 往往出现降解的迹象。另外, 还使用低浓度乙醇沉淀多糖的方法、醋酸钾沉淀多糖法、高浓度 NaCl 去多糖法, 但结果都不是很满意, 可能是操作过程中步骤繁多, 从而加速了 RNA 的降解。由于 PCR 扩增检测灵敏度较高, 在 RNA 制备、反转录、及特异性扩增的整个过程中, 所用 Tip 头及 EP 试管应进行严格的高压灭菌, 在使用过程中避免手直接接触。

3.2 病毒检测

为了确保阴性对照的可靠及可行性, 引入内标可解决此问题<sup>[10-11]</sup>。Actin 是高等植物中肌动蛋白基因, 以此基因作为内标, 可避免外加模板与病毒模板的竞争, 减少假阴性出现, 使检测的程序简化, 费用降低。研究中将 Actin 基因扩增与浙江省地方标准公布的草莓 4 种病毒特异性扩增相结合, 较好地解决了阴性对照的可靠

由图 2 可见, 1~4 泳道为阴性, 说明此脱毒苗脱毒比较彻底, 没有 SCV、SMoV、SMYEV、SVBV 病毒的感染; 图 3 中, 1~3 泳道为阴性, 说明没有 SCV、SMoV、SMYEV 感染, 但是 4 泳道为阳性, 扩增大小 600 bp 与设计大小一致, 说明此样品脱毒不彻底, 携带 SVBV 病毒。

性问题, 提高了检测结果的准确性。

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。随着分子生物学的广泛应用, PCR 分子检测具有周期短、灵敏度更高, 判读结果准确等特点, 分子检测法越来越受到人们的青睐。

参考文献

[ 1 ] 王国平, 刘福昌, 薛光荣 等. 草莓病毒病种类鉴定及无病毒种苗的技术研究[ J ]. 中国农业科学, 1990(4): 43-49.  
[ 2 ] 陈海霞. 草莓轻型黄边病毒脱毒技术研究[ D ]. 长沙: 湖南农业大学, 2003.  
[ 3 ] 戴子林, 马鸿翔. 长江流域草莓生产调查[ J ]. 中国果树, 1995(3): 42-43.  
[ 4 ] 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.  
[ 5 ] 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.  
[ 6 ] 萨姆布鲁克 E. F. 弗里奇. 分子克隆试验指南[ M ]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1995.  
[ 7 ] Alos S G, Heinrich E S. Isolation of functional RNA from Plant Tissues Rich in Phenolic Compounds [ J ]. Analytical biochemistry, 1991, 197: 91-95.  
[ 8 ] 周波, 张旻, 李玉花, 等. 富含多糖草莓果实总 RNA 提取方法的改进[ J ]. 生物技术通讯, 2004 15(1): 48-50.

# 低温处理过程中 B<sub>9</sub>对蝴蝶兰叶片生理指标的影响

乔永旭

(唐山师范学院 生命科学系 河北 唐山 063000)

**摘 要:**以蝴蝶兰叶片为试材,研究 4℃低温胁迫 4~12 h 期间不同浓度的 B<sub>9</sub>(二甲基氨基琥珀酰胺酸)处理下,叶片的活性氧系统、可溶性糖、可溶性蛋白、MDA、细胞膜透性和电渗率等生理指标的变化情况。结果表明:低温胁迫期间,叶片的可溶性糖、可溶性蛋白含量先上升后下降,MDA 含量和膜透性上升趋势减缓。O<sub>2</sub><sup>-</sup>含量有先上升再下降的趋势,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量则是先上升再下降,在 4~8 h,500~2 000 mg/L 的 B<sub>9</sub>浓度范围内二者出现了相反的变化趋势。这说明喷施 B<sub>9</sub>明显增强了蝴蝶兰叶片的抗低温能力。试验证明,1 000~2 000 mg/L 浓度的 B<sub>9</sub>能够提高蝴蝶兰叶片的耐低温能力。

**关键词:**蝴蝶兰;低温;B<sub>9</sub>;生理指标

中图分类号:S 682.2<sup>+</sup>9 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2010)23-0148-03

蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)属于兰科蝴蝶兰属,又名蝶兰,有“洋兰皇后”之美誉,是目前国内外花卉市场上最畅销的高档花卉之一<sup>[1]</sup>。其属于热带植物,在我国北方需要生长在日光温室内,必要时需要加温提高温度。目前通过施用水杨酸等生长调节剂,可以明显提高植物的耐低温能力。也有报道 B<sub>9</sub>可以提高菊花<sup>[2]</sup>等植物的抗寒性,但对于 B<sub>9</sub>能否提高蝴蝶兰的耐寒性没有

报道。为了减轻低温对植株的伤害,该试验研究 B<sub>9</sub>对低温胁迫下蝴蝶兰抗寒性的影响,探究提高蝴蝶兰抗寒性的 B<sub>9</sub>的最佳浓度,为提高蝴蝶兰的抗寒性提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2010 年 3 月至 4 月间进行,以唐山师范学院生命科学系花卉示范基地 1 a 生的生长良好、具 3 片叶龄的蝴蝶兰为试材。

### 1.2 试验方法

在室温下,分别将蝴蝶兰幼苗喷施 0(CK)、500、1 000、2 000、4 000 mg/L B<sub>9</sub>的水溶液,每周喷施 1 次,连

**作者简介:**乔永旭(1978-),男,硕士,讲师,研究方向为植物细胞工程和植物资源开发与利用。E-mail:qiaoyx123@163.com。

**基金项目:**河北省科技厅生物工程资助项目(04547008D-2)。

**收稿日期:**2010-09-06

[9] 夏然.草莓果实特异表达基因 amfaf 的克隆体外表达及遗传转化的研究[D].沈阳:辽宁师范大学,2002.

[10] 张志宏,杨洪一,代红艳等.应用多重 RT-PCR 检测草莓斑驳病毒和草莓轻型黄边病毒[J].园艺学报,2006,33(3):507-510.

[11] 牛建新,李西平,赵英,等.利用内标为基础的 RT-PCR 技术检测葡萄茎痘伴随病毒[J].园艺学报,2006,33(5):1083-1086.

## Study of Detection Virus on Seedling of Virus-free Strawberry by RT-PCR

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:** Using RT-PCR technology to the actin gene sequence of strawberry as the internal standard, with 4 strawberry virus-specific amplification, the virus-free conditions of virus-free seedlings of strawberry were detected. The results showed that the internal standard and the specific amplification of strawberry virus binding, can better achieve the purpose of virus detection, reducing the blindness of estimate on results, for accurate, rapid detection of virus-free seedlings of strawberry to provide a set more complete test method.

**Key words:** strawberry virus-free plantlets; RT-PCR; SmoV; SMYEV; SVBV; SCV