

# 草莓斑驳病毒的 RT-PCR 技术检测

却志群

(宜春学院 生命科学与资源环境学院,江西 宜春 336000)

**摘要:**针对草莓斑驳病毒(SMV)基因组外壳蛋白保守序列设计特异引物,利用改进的 CTAB 法提取出优质的草莓斑驳病毒的总 RNA,然后进行 RT-PCR 分子检测以期建立草莓斑驳病毒的 RT-PCR 检测体系。结果表明:RNA 质量完好,证明改进的 CTAB 法应用于草莓总 RNA 的提取是切实可行的。

**关键词:**草莓斑驳病毒;引物;CTAB;RNA;RT-PCR;特异片段

**中图分类号:**S 436.639 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)07-0132-03

草莓斑驳病毒最早由 Harris(1938)报道,当时称为“温和性皱缩”,Prentice(1948)和 Thomas(1949)后改称为草莓斑驳病毒(Strawberry mottle virus, SMV),草莓受此病毒侵染后表现出植株衰弱、褪绿,叶片和果实变小等症状<sup>[1-3]</sup>。因此,它对草莓危害较为严重,其单独侵染就可导致草莓产量减少约 30%<sup>[2]</sup>,且该病毒常与草莓其它病毒病害混合侵染,导致更加严重的危害。

当前,在草莓的种植和生产过程中,解决克服病毒病害带来的危害的最主要的方法是种植无病毒草莓苗,实行草莓的无病毒化生产。因此,病毒检测方法的优劣成了草莓的无病毒化生产的一个关键环节。目前检测植物病毒病害的主要方法有植株直观测定法、小叶嫁接法、血清学检测、电子显微镜检测法和分子生物学检测技术<sup>[4-6]</sup>。以聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)和反转录-聚合酶链式反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术为代表的分子生物学检测技术,因其在病毒检测过程中具有快速、灵敏度高、费用相对较低等优点,正逐渐成为植物病毒检测的主要方法和手段<sup>[6]</sup>。

据报道,草莓斑驳病毒(Strawberry mottle virus, SMV)是一种单链 RNA 病毒<sup>[6-7]</sup>,故可采用 RT-PCR 技术对其进行检测。该研究针对草莓斑驳病毒(SMV)基因组外壳蛋白保守序列设计特异引物,利用改进的 CTAB 法提取出优质的草莓和斑驳病毒的总 RNA,然后对草莓斑驳病毒进行 RT-PCR 的分子检测,旨在建立草

莓斑驳病毒的 RT-PCR 检测体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 试验草莓品种“丰香”、“章姬”采自江西省宜春市西村镇草莓基地,用于提取总 RNA 的草莓叶片都具有典型的草莓斑驳病毒侵染症状(图 1)。

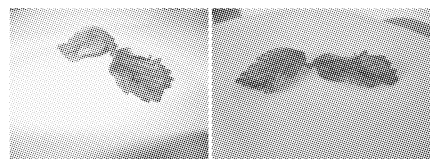


图 1 草莓叶片材料

Fig. 1 Strawberry cultivar used in the present study

1.1.2 PCR 和反转录相关试剂 Taq 酶、DNA Marker (DL 3 000)、Prime Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒均购自 Takara 生物技术有限公司;酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),2% CTAB, Tris-HCl, EDTA, NaCl, β-巯基乙醇,无水乙醇, NaAc, DEPC 均为分析纯。

1.1.3 引物 参照 Genbank 上已公布 SMV 的序列(全基因组序列登录号:AJ311875 和 AJ311876),在外壳蛋白保守结构区域,利用 Premier 5.0 和 DNA STAR 分子生物学专业软件设计用于病毒检测的特异引物。由上海生工生物技术公司合成,引物相关信息见表 1。

表 1 用于 SMV 检测的引物序列

Table 1 Tested primer pairs for detection of SMV

引物名称	引物位点	序列	片段大小
Primer pairs	Primer binding site	Sequence (5'~3')	Target fragment/bp
SMV1F	1 973~1 990	TCGAGGCTTGGTTGATGC	443
SMV1R	2 557~2 577	GAAAACCTTGAACGCTGGAATC	
SMV2F	916~934	ATTCTCGGTGGACACTTGC	584
SMV2R	1 518~1 538	GATAGAACACACGCCTCACC	

**作者简介:**却志群(1980-),女,湖北仙桃人,硕士,讲师,研究方向为植物组织培养与分子植物病理学。E-mail: zhiqunq@163.com。

**基金项目:**江西省宜春学院院级资助项目。

**收稿日期:**2011-12-19

## 1.2 试验方法

**1.2.1 RNA 提取和完整性检测** 总 RNA 的提取结合了 Chang S 等<sup>[8]</sup>和 Bekesiova I 等<sup>[9]</sup>的方法并进行部分改进,方法为:称取约 0.1 g 草莓幼嫩叶片于液氮中迅速研碎成粉末,分别取一半加入 2 个盛有大约 500  $\mu$ L CTAB 提取缓冲液(2% CTAB;100 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;20 mmol/L EDTA;1.4 mol/L NaCl;使用前加入 2%  $\beta$ -巯基乙醇)的 1.5 mL 离心管中,65℃水浴保温 15 min;用等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提 2 次,吸取上清液并加入 1/4 体积 10 mol/L LiCl,-20℃放置 2 h;10 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 350  $\mu$ L TE 溶解,14 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,上清液分别用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇抽提,然后加入 1/30 体积 NaAc(pH 5.2)、1/10 体积无水乙醇,冰浴 10 min;12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入新的离心管中,加入 1/10 体积 NaAc(pH 5.2)、3 倍体积无水乙醇,-20℃放置 20 min;12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 70%乙醇洗涤沉淀 2 次,放置超净工作台上吹干,加入 25  $\mu$ L DEPC 水溶解。将 1.2%变性琼脂糖凝胶放入水平电泳槽中,加 1×MOPS 电泳缓冲液,覆盖凝胶约 1 mm。将 RNA 样品加到凝胶点样孔中,在 5 V/cm 条件下电泳 30 min,以观察提取的 RNA 的质量。

**1.2.2 RT-PCR** 以 PCR 下游引物 SMV1R 作为 cDNA 第 1 链合成的反转录引物,使用 Takara 生物技术有限公司的 Prime Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒进行反转录,获得 cDNA 第 1 链。以此为模板使用表 1 中的引物对进行 PCR 反应。PCR 反应的总体积为 25  $\mu$ L,反应条件为 94℃预变性处理 7 min;94℃变性 30 s,54℃复性 45 s,72℃延伸 1 min,总共进行 35 个循环;最后于 72℃延伸 10 min;4℃保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 提取

从具有明显发病症状的草莓植株上采集幼嫩叶片,采用改进的 CTAB 法提取总 RNA,分别取 4  $\mu$ L RNA 样品于 2 个胶孔同时电泳,结果证实 28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA 谱带清晰(图 2),表明总 RNA 没有发生严重的降解,完整性较好。

### 2.2 RT-PCR 检测及扩增产物分析

该研究 2 对引物中其中 1 对引物扩增出与目的片段相近的特异性条带,其大小介于 500~750 bp。大小恰好与 SMV2F 和 SMV2R 引物对的预期扩增片段大小相近,很有可能就是该位点的目的片段,说明该研究有可能在草莓栽培品种中检测出了 SMV 阳性的植株,而且结果稳定(图 3)。但另一对引物 SMV1F 和 SMV1R 并没有得到目的片段。

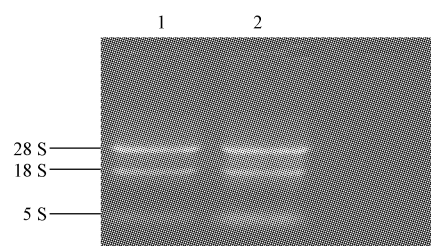


图 2 总 RNA 完整性电泳检测

注:泳道 1~2:草莓品种总 RNA。

Fig. 2 Electrophoresis of total RNA

Note: Lane1~Lane2: total RNA of strawberry cultivar.

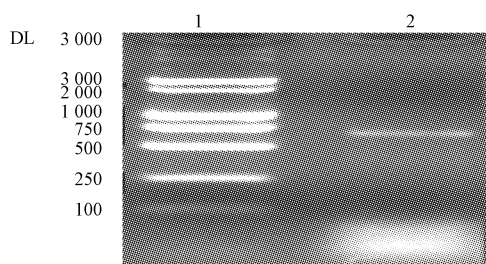


图 3 SMV 的 RT-PCR 电泳检测

注:泳道 1:DL 3 000 bp;泳道 2:草莓品种感染 SMV。

Fig. 3 Detection of SMV in strawberry with RT-PCR

Note: Lane1: DL 3 000 bp; Lane2: Strawberry cultivar infected with SMV.

## 3 讨论

植物总 RNA 的提取是基因体外翻译、构建 cDNA 文库、研究基因的表达和调控以及进行基因克隆和基因转化分析等的基础,所得总 RNA 的质量高低直接影响到后续试验的结果。因此对不同植物组织中的总 RNA 提取方法的改进一直是目前分子生物学的研究重点。该研究利用改进的 CTAB 法<sup>[10]</sup>提取草莓总 RNA,并对 RNA 的质量和完整性进行了电泳检测,结果表明 RNA 的质量完好,证明改进的 CTAB 法应用于草莓总 RNA 的提取是切实可行的,能够达到预期的目的。

该研究中使用的 2 对引物,只有 1 对获得了与预期大小基本一致的特异片段,2 对引物都设计在外壳蛋白保守区域,分析出现上述情况的原因可能是该研究草莓材料中携带的病毒株在外壳蛋白区域存在一定的序列差异,导致该研究设计的引物与模板不能很好地匹配,因此,没有能够获得相应的片段。

为进一步确认试验结果,目前该研究正在对 SMV2F 和 SMV2R 引物对扩增出的目的片段进行 TA 克隆,以期获得相应的阳性克隆,并送生物公司进行克隆样品测序,最终确定该研究结果的真实性与准确性。以(RT)PCR 为基础的分子生物学技术因其在草莓病毒检测中具有特异性强、检测快速灵敏和费用相对较低,适应范围广泛等特点,所以具有广阔的应用前景,而且随着分子生物学研究手段的不断深入发展,以及草莓病

毒分类体系的逐步完善,越来越多的新的分子生物学检测技术,诸如核酸杂交技术、多重(RT)PCR 和基因芯片等技术都将会运用到草莓病毒鉴定与检测中,这将为草莓病毒病的防治提供可靠的技术保证。

### 参考文献

- [1] 王国平,刘福昌.带病毒和无病毒草莓生长和结果的比较[J].北方果树,1990(3):9-12.  
[2] 韦石泉,吴元华.我国草莓斑驳病毒研究鉴定[J].植物病理学报,1994,24(4):293-298.  
[3] 周厚成,何水涛.草莓病毒病研究进展[J].果树学报,2003,20(5):423-426.  
[4] 贾慧,王进忠,陈忠斌,等.百合病毒检测技术研究进展[J].北京农学院学报,2004,19(4):73-76.  
[5] 王正华,邵永春,尹涛.草莓病毒的检测方法 & 症状识别[J].山东农

业科学,1999(1):31-33.

- [6] 杨洪一,张志宏,杜国栋,等.利用内标为基础的 RT-PCR 技术检测草莓斑驳病毒[J].植物病理学报,2005,35(2):116-122.  
[7] Thompson J R, Leone G, Lindner J L, et al. Characterization and complete nucleotide sequence of Strawberry mottle virus; a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses [J]. Journal of General Virology, 2002, 83(1): 229-239.  
[8] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2): 114-117.  
[9] Bekesiova I, Nap J P, Mlynarova L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the Carnivorous plant *Drosera rotundifolia* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17(3): 269-277.  
[10] 程水源,陈昆松,杜何为,等.银杏 RNA 的提取[J].果树学报,2005, 22(4):428-429.

## Detection of Strawberry Mottle Virus with RT-PCR

QUE Zhi-qun

(College of Life Sciences and Resources Environment Sciences, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000)

**Abstract:** Special primers were design based on the sequence of coat protein which was a conservative region of strawberry mottle virus. Highly pure total RNA including strawberry and strawberry mottle virus was extracted with modified CTAB method. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out in order to establish detection system of strawberry mottle virus. The results showed that a good RNA quality was obtained and modified CTAB method was feasible for extraction of total RNA of strawberry.

**Key words:** strawberry mottle virus; primer; CTAB; RNA; RT-PCR; specific fragment

## 提高杀菌剂功效七招

杀菌剂是农药家族的重要方面军,如何高效使用杀菌剂,对提高农作物产量具有十分重要的意义。

**合理配置浓度** 不同的杀菌剂其使用浓度都有特殊要求,配置一定要严格按照“使用说明书”操作,不可随意加大或缩小。

**选准喷施时间** 喷施杀菌剂时间过迟或过早都会影响防治效果。应根据作物不同病害的发生规律和具体情况及时用药。通常在发病前(保护用药)或发病初期(防患于未然)使用为佳。

**掌握用药次数** 杀菌剂的喷药次数主要是根据药剂持效期的长短和气象条件来确定。一般每隔 10~15 d 喷 1 次,共喷 2~3 次。遇特殊情况,如施药后遇雨,应及时补喷 1 次。

**提高用药质量** 用药数量要适宜,用药过多会增大成本、易造成药害,而用药过少则无法达到用药目的。用药质量要讲究,喷药时要求喷雾均匀,力求做到不漏喷。

**严格防止药害** 杀菌剂造成药害有多种原因,首先一般水溶性较强的药剂容易发生药害,其次不同作物对药剂的敏感性也不同,例如波尔多液一般不会造成药害,但对铜敏感的作物也会产生药害。豆类、马铃薯、棉花则对石硫合剂敏感。再者作物的不同生长发育阶段对药剂的反应也不同,一般幼苗和孕穗开花阶段容易产生药害。另外,一般高温干旱、日照强烈或雾重、高湿等条件下用药易引起作物药害。

**谨慎药物混用** 杀菌剂不少为碱性农药,故不能与遇碱性物质易分解失效的杀虫剂混用,如波尔多液、石硫合剂等呈碱性。还有一些杀菌剂如多菌灵不能与波尔多液、石硫合剂、托布津等杀菌剂混用,同样会造成杀虫(菌)微生物丧失生理活性和杀虫(菌)能力而失效。

**注意规避抗药性** 使用杀菌剂也存在作物病害的抗药性问题。为规避病害抗药性,要在科学选用农药的基础上,切实做好不同类型的药剂的交替(轮换)使用,严禁长期单独使用一种农药。

(来源:农民日报)