

网络出版时间:2019-01-14 09:36

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.07.015

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190114.0935.030.html>

苹果潜隐性病毒一步三重检测体系的建立与优化

王李芳,张越,刘聪,蔡洋洋,刘浪,孙建春,王雷存

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】在两步单重检测体系基础上,建立能同时检测苹果茎痘病毒(ASPV)、苹果茎沟病毒(ASGV)和苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)的一步三重检测体系,以简化苹果潜隐性病毒检测方法。【方法】以携带 ASPV、ASGV、ACLSV 的苹果优系‘浓果-25’组培苗为试材,比较一步单重、一步两重和一步三重 RT-PCR 3 种检测体系的检测效果,对一步三重检测法中的退火温度、反转录时间、延伸时间、循环数和引物加量进行优化,并用带毒情况不同的苹果田间根茎叶、组培苗、脱毒苗对优化后的 RT-PCR 一步三重检测体系进行验证。【结果】一步单重 RT-PCR 体系一次只能检测 1 种病毒,一步两重 RT-PCR 体系一次能同时检测 2 种病毒,一步三重 RT-PCR 体系一次能同时检测 3 种病毒。优化后的一步三重 RT-PCR 检测体系为:50 ℃ 反转录 20 min;94 ℃ 预变性 20 min;94 ℃ 变性 30 s,53~56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环,引物加量为各病毒上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL,无需进行终延伸。优化后的一步三重检测体系验证结果与两步单重检测结果一致,初步证明该检测体系合理。【结论】建立了苹果潜隐性病毒一步三重检测体系,该体系能同时对苹果样品中 ASPV、ASGV 和 ACLSV 3 种病毒进行检测。

【关键词】 苹果;潜隐性病毒;病毒检测;检测体系

【中图分类号】 S661.1;S432.4⁺1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)07-0109-09

Establishment and optimization of one-step triple RT-PCR detection system of apple latent viruses

WANG Lifang,ZHANG Yue,LIU Cong,CAI Yangyang,LIU Lang,
SUN Jianchun,WANG Leicun

(College of Horticulture,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】Based on the two-step single detection system, a one-step triple detection system capable of simultaneously detecting apple stem pox virus (ASPV), apple stem groove virus (ASGV) and apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) was established and optimized to simplify apple virus detection. 【Method】The apple seedlings of ‘Nongguo-25’ carrying ASPV, ASGV and ACLSV were used and the detection results of single-step, one-step double and one-step triple RT-PCR detection systems were compared. The annealing temperature, reverse transcription time, extension time, number of cycles and amount of primers in the one-step triple detection method were optimized. Apple roots, tissue cultured seedlings and virus-free seedlings with different toxic conditions were used to verify the established system. 【Result】One step single RT-PCR system can detect only one virus at a time, one step double RT-PCR system can detect two viruses at one time, while one step triple RT-PCR system can detect three viruses simultaneously. The optimized conditions of one-step triple RT-PCR system were: reversing transcription at 50 ℃ for 20 min, predenaturation at 94 ℃ for 20 min, denaturation at 94 ℃ for 30 s, annealing at 53—56 ℃ for

〔收稿日期〕 2018-06-06

〔基金项目〕 陕西省科技攻关项目“苹果种质创新与新品种选育及资源保存”(2015KTCL02-26)

〔作者简介〕 王李芳(1994—),女,山西沁水人,在读硕士,主要从事苹果新品种脱毒快繁研究。E-mail:670100217@qq.com

〔通信作者〕 王雷存(1963—),男,陕西韩城人,研究员,硕士生导师,主要从事苹果新品种选育研究。E-mail:501275706@qq.com

30 s, extension at 72 ℃ for 30 s, 30 cycles, 10 μmol/L upstream primer 1.0 μL, 10 μmol/L downstream primer 1.0 μL, and no final extension. The verification results were consistent with the two-step single method, showing that the established detection system was reasonable. 【Conclusion】 One-step triple detection system for apple latent viruses was established to simultaneously detect ASPV, ASGV and ACLSV viruses.

Key words: apple; latent virus; virus detection; detection system

苹果是我国的第一大水果^[1], 据统计, 2017 年我国苹果总产量约 4 450.0 万 t, 占世界苹果总产量的 58.4%^[2], 且在我国苹果种植面积还有扩大趋势^[3]。随着种植面积扩大, 苹果病毒通过嫁接途径传播的范围也随之扩大^[4]。苹果病毒病是制约苹果生产的重要生物因素, 病毒侵入树体后在树体内迅速增殖, 使其终身带毒, 不仅影响果树正常的生理代谢和生长, 而且会导致果实品质下降^[5]和减产。

苹果病毒包括非潜隐病毒和潜隐病毒两大类^[6]。非潜隐病毒感染的植株较少, 一般为零星发生, 且症状明显易识别, 危害较小; 潜隐病毒感染植株后虽一般表现不出明显症状, 但危害严重, 且必须通过相关的病毒检测才能明确树体的带毒状况。生产上广泛分布的潜隐病毒主要有茎痘病毒(ASPV)、苹果茎沟病毒(ASGV)和苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)^[7]。病毒病防治已经成为我国苹果产区亟待解决的突出问题之一, 目前生产上的主要手段是培育和栽培无病毒苗木, 而科学、适宜的病毒检测技术是生产无病毒苗木的技术保障。

病毒检测技术有指示植物法、电子显微镜技术、血清学方法和分子生物技术等, 其中分子生物学技术相对方便、快捷、准确。目前较好的分子生物学技术是反转录聚合酶链反应(RT-PCR)。近年来, 从初期的多步一重 RT-PCR 发展到一步多重 RT-PCR^[8], 该技术更加快速、便捷、高效、准确。目前, 一步多重 RT-PCR 技术已被广泛应用于不同植物

病毒病检测^[9-11]、人体病毒研究^[12-13]、其他动物病毒研究^[14-17]以及食品病毒检测中^[18], 应用前景广阔。但一步多重 RT-PCR 技术在不同植物种类上形成的技术体系不同。‘浓果-25’是西北农林科技大学培育的综合性状表现优良的苹果新优系, 针对‘浓果-25’需要建立一套潜隐性病毒检测技术体系。本研究在课题组两步单重检测体系和前人一步多重检测体系的基础上, 进一步优化、简化了苹果病毒病检测方法, 使反应体系和反应程序更简便, 以实现快速、高效的目标。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料‘浓果-25’苹果组培苗来自西北农林科技大学黄土高原优质苹果生产技术研究团队, 验证材料为‘中秋王’苹果未完全脱毒苗、完全脱毒苗及西北农林科技大学白水苹果试验站‘中秋王’和‘玉华早富’苹果组培苗及其根、茎、叶。

主要试剂为无水乙醇、核酸染料(智达康生物公司)、RNA 试剂盒(TaKaRa 公司)、PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) 试剂盒(TaKaRa 公司)、凝胶试剂盒(天根公司)。ASPV、ASGV 和 ACLSV-1 的引物序列分别参考 Menzel 等^[19]、李文慧等^[20]的研究方法, ACLSV-2 的引物序列由中国农业大学周涛教授提供, 以上 4 对引物均由杨凌奥科公司合成, 引物序列如表 1 所示。

表 1 RT-PCR 方法检测苹果病毒病的引物序列
Table 1 Primers used for detection of apple viruses by RT-PCR

引物名称 Name of primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	目标片段/bp Target segment	退火温度/℃ Annealing temperature	参考文献 Reference
ASPV	F: ATGCTCTGGAACCTCATGCTGCAA R: TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA	370	53	[19]
ASGV	F: CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTC R: CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT	524	57	[20]
ACLSV-1	F: TTCATGGAAAGACAGGGGCAA R: AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA	677	57	[19]
ACLSV-2	F: GAGARTTTCAGTTTGCTMGA R: AGTCTACAGGCTATTTATTATAAGT	794	55	—

1.2 方 法

1.2.1 ‘浓果-25’组培苗总 RNA 提取及 PCR 反应

‘浓果-25’组培苗总 RNA 提取采用 RNA 试剂盒 (TaKaRa 公司)说明书中的多糖多酚植物组织的裂解步骤。用 Nano Drop 2000 型超微量紫外分光光度计测定所提取 RNA 的浓度及 OD_{260/280} 值。反应体系:Prime Script 1 Step Enzyme Mix 1.0 μ L, 2 $\times$ One-Step Buffer (Dye Plus) 12.5 μ L, 总 RNA 1.0 μ L, 不同引物的上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, RNase Free ddH₂O 4.5 μ L。反应程序:50 $^{\circ}$ C 反转录 30 min, 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环。

1.2.2 ‘浓果-25’组培苗病毒一步三重检测体系中引物组合的筛选 在 PCR 基本反应体系和程序的基础上,首先对一步多重的引物组合进行筛选。组合 1: ASPV、ASGV、ACLSV-1; 组合 2: ASPV、ASGV、ACLSV-2。针对 2 个组合均设置 53, 54, 55, 56 和 57 $^{\circ}$ C 的退火温度,用同一株带 ASPV、ASGV 和 ACLSV 的‘浓果-25’苹果组培苗为材料,比较不同引物组合的扩增效果。

1.2.3 ‘浓果-25’组培苗病毒一步单重、一步两重及一步三重 RT-PCR 检测 一步单重 RT-PCR 检测是在 PCR 基本反应体系和程序的基础上,每个反应体系中只加入 1 种病毒的上、下游引物,检测该体系是否能够成功检测单一病毒。

一步两重 RT-PCR 检测是在 PCR 基本反应体系和程序的基础上,每个反应体系中同时加入 2 种病毒的上、下游引物,检测该体系是否能够成功检测 2 种复合病毒。

一步三重 RT-PCR 检测是在 PCR 基本反应体系和程序的基础上,每个反应体系中同时加入 3 种病毒的上、下游引物,检测该体系是否能够成功检测 3 种复合病毒。

1.2.4 3 种病毒基因的克隆及同源性比较 将经核酸染料染色凝固后的 15 g/L 琼脂糖凝胶放入 1 $\times$ TBE 缓冲液中,用得到的病毒 RT-PCR 反应产物点样,每孔点样 7.0 μ L,在 150 V 恒压条件下电泳 25~30 min,通过凝胶成像系统拍照,观察照片得到检测结果并记录。

将经核酸染料染色凝固后的 15 g/L 琼脂糖凝胶放入 1 $\times$ TBE 缓冲液中,用得到的病毒 RT-PCR 反应产物点样,每孔点样 50.0 μ L,在 150 V 恒压条件下电泳 30 min 左右,通过紫外灯核对目标条带。用凝胶试剂盒进行切胶回收(消毒切胶小刀),然后

与 T 载体连接后转化大肠杆菌菌株感受态细胞,通过筛选蓝白斑,挑取白色的菌落进行培养。对经 PCR 鉴定证实插入片段正确的阳性菌落,由杨陵奥科公司进行测序。将一步多重检测中各引物所得扩增片段的测序结果与 GenBank 数据库中已登录的 ASPV (登录号 KF735125.1)、ASGV (登录号 KP772666.1) 和 ACLSV (登录号 JQ320100.1) 核苷酸序列进行同源性比较。

1.2.5 ‘浓果-25’组培苗病毒一步三重检测体系的优化 一步三重 RT-PCR 反应体系共 25 μ L: Prime Script 1 Step Enzyme Mix 1.0 μ L, 2 $\times$ One-step Buffer (Dye Plus) 12.5 μ L, 3 种病毒上游和下游引物各 1.0 μ L, Template RNA 1.0 μ L, 用 RNase Free dH₂O 补足 25 μ L。反应程序: 50 $^{\circ}$ C 反转录 20 min, 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环。在进行以下各项条件优化时,其他条件保持不变。

(1) 退火温度。退火温度设置为 48~63 $^{\circ}$ C, 梯度为 1 $^{\circ}$ C, 共 16 个处理,以确定最佳退火温度。

(2) 反转录时间。根据 Prime ScriptTM One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) 试剂盒 (TaKaRa 公司)说明书及原多步单重检测中反转录时间的要求,设置 15, 20, 25, 30 min 4 个处理,从时间及效果等方面确定最佳反转录时间。

(3) 延伸时间。根据 Prime ScriptTM One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) 试剂盒 (TaKaRa 公司)说明书中 1 kb/min 的延伸速率,结合 ASPV (370 bp)、ASGV (524 bp)、ACLSV (677 bp) 中的最长目标片段以及所有片段总和的大小,设置 30, 40, 50, 70, 90, 100, 120 s 7 个处理,从时间及效果等方面确定最佳延伸时间。

(4) 循环数。设置循环数为 20, 25, 30, 35, 40 共 5 个处理,从时间及效果等方面确定最佳循环数。

(5) 引物加量。依据范旭东等^[21]提出的引物量与其片段长度成正比的原理,结合 Prime ScriptTM One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) 试剂盒 (TaKaRa 公司)说明书中的要求,对不同引物 (10 μ mol/L) 的加量进行筛选,以确定最适宜的引物加量。不同引物加量组合如表 2 所示。

1.2.6 优化后一步三重检测体系检测准确性验证 为了验证该检测体系是否能准确检测苹果病毒病,先用两步单重 RT-PCR 技术检测‘中秋王’未完全脱毒苗、完全脱毒苗和‘玉华早富’、‘中秋王’组培苗及其根、茎、叶的带毒情况,结果如表 3 所示。

表 2 ‘浓果 25’组培苗病毒一步三重 RT-PCR 检测中不同引物加量组合

Table 2 Combinations of primers for one-step triple RT-PCR of viruses in ‘Nongguo-25’ apple tissue cultured seedlings

体积组合编号 Volume combination number	ASPV/ μ L	ASGV/ μ L	ACLSV-1/ μ L	体积组合编号 Volume combination number	ASPV/ μ L	ASGV/ μ L	ACLSV-1/ μ L
1	0.7	1.0	1.3	6	1.3	1.0	0.7
2	0.7	1.3	1.0	7	0.7	0.7	0.7
3	1.0	0.7	1.3	8	1.0	1.0	1.0
4	1.0	1.3	0.7	9	1.3	1.3	1.3
5	1.3	0.7	1.0				

表 3 供检苹果材料携带 3 种潜隐性病毒的情况

Table 3 Three latent viruses carried by apple material for testing

序号 Number	材料 Material	ASPV	ASGV	ACLSV
1	‘中秋王’未完全脱毒苗 Not completely virus-free plantlets of ‘Zhongqiuwang’	—	+	—
2	‘中秋王’完全脱毒苗 Tissue culture plantlets of ‘Zhongqiuwang’	—	—	—
3	‘玉华早富’组培苗 Tissue culture plantlets of ‘Yuhuazaofu’	—	+	+
4	‘中秋王’组培苗 Tissue culture plantlets of ‘Zhongqiuwang’	+	+	+
5	‘中秋王’根 Roots of ‘Zhongqiuwang’	+	+	+
6	‘中秋王’茎 Stems of ‘Zhongqiuwang’	+	+	+
7	‘中秋王’叶 Leaves of ‘Zhongqiuwang’	+	+	+
8	‘玉华早富’根 Roots of ‘Yuhuazaofu’	—	+	+
9	‘玉华早富’茎 Stems of Yuhuazaofu’	—	+	+
10	‘玉华早富’叶 Leaves of ‘Yuhuazaofu’	—	+	+

注：+表示带毒，—表示不带毒。
Note: + indicates with virus, — indicates no virus.

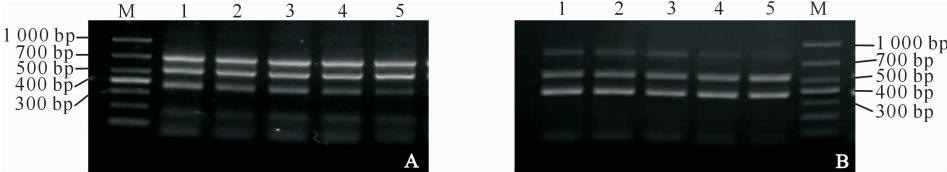
2 结果与分析

2.1 ‘浓果-25’组培苗总 RNA 的提取

‘浓果-25’总 RNA 的质量浓度为 1 124. 0 ng/ μ L,OD_{260/280} 值为 2. 12,证明提取的 RNA 质量好,可用于后续试验。参考 RNA 试剂盒说明书中建议的 50 μ L 体系总 RNA 使用量在 1. 0 ng 以下,并结合本研究采用 21 μ L 体系的实际情况,将所提取的 RNA 质量浓度稀释 400 ng/ μ L 左右进行后续研究。

2.2 ‘浓果-25’组培苗病毒一步三重检测体系中引物组合的筛选

图 1-A、图 1-B 分别为引物组合 1(ASPV、ASGV、ACLSV-1)和组合 2(ASPV、ASGV、ACLSV-2)的一步三重 RT-PCR 电泳结果。由图 1-B 可知,在适宜退火温度下,ACLSV-2 的条带较 ASPV 和 ASGV 条带明显浅,说明 ACLSV-2 引物浓度较低;而图 1-A 中,在适宜退火温度下,3 条目标条带可达到基本一致的亮度,故选用引物组合 1 进行后续试验。



A. ASPV、ASGV、ACLSV-1 组合电泳结果;B. ASPV、ASGV、ACLSV-2 组合电泳结果
M. 1 000 bp DNA Marker;1~5. 退火温度依次为 53,54,55,56,57 °C ;

A. ASPV,ASGV and ACLSV-1 combination electrophoresis results;B. ASPV,ASGV and ACLSV-2 combination electrophoresis results
M. 1 000 bp DNA Maker;1—5. Annealing temperature was 53,54,55,56,and 57 °C , respectively

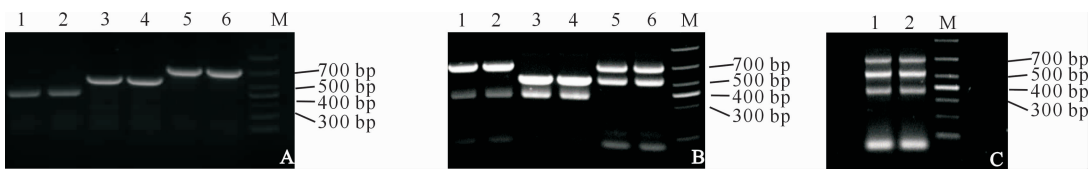
图 1 ‘浓果 25’组培苗病毒的一步三重 RT-PCR 检测体系中引物组合的筛选结果

Fig. 1 Screening results of primer combinations of one-step triple RT-PCR in the tissue culture plantlets viruses of ‘Nongguo-25’ apple

2.3 ‘浓果 25’组培苗病毒一步单重、一步两重和一步三重 RT-PCR 检测

一步单重检测体系可从携带 ASPV、ASGV、ACLSV 的苹果组培苗样品中分别成功扩增出对应

的特异性目标条带(图 2-A),一步两重检测体系则可成功扩增出 2 个复合的特异性目标条带(图 2-B),一步三重检测体系成功扩增出了 3 种病毒的特异性目标条带(图 2-C)。



A. 一步单重 RT-PCR; B. 一步两重 RT-PCR; C. 一步三重 RT-PCR

1~6. 携带 ASPV、ASGV、ACLSV 的‘浓果 25’组培苗;M. 1 000 bp DNA Marker

A. Amplification results of one-step single RT-PCR;B. Amplification results of one-step two fold RT-PCR;C. Amplification results of one-step triple RT-PCR;1~6 ‘Nongguo-25’ tissue culture seedlings carrying ASPV,ASGV and ACLSV;M. 1 000 bp DNA Marker

图 2 ‘浓果 25’苹果组培苗病毒一步单重、一步两重和一步三重 RT-PCR 检测结果

Fig. 2 Detection results of plantlets viruses in ‘Nongguo-25’ apple seedlings by one-step single RT-PCR, one-step two fold RT-PCR and one-step triple RT-PCR

2. 4 3 种病毒基因的克隆及同源性比较分析

GenBank 数据库中对对应病毒核苷酸序列的同源性

ASPV、ASGV 和 ACLSV-1 扩增片段与 比较结果见图 3。



A. ASPV 与 KF735125.1 比较结果;B. ASGV 与 KP772666.1 比较结果;C. ACLSV-1 与 JQ320100.1 比较结果

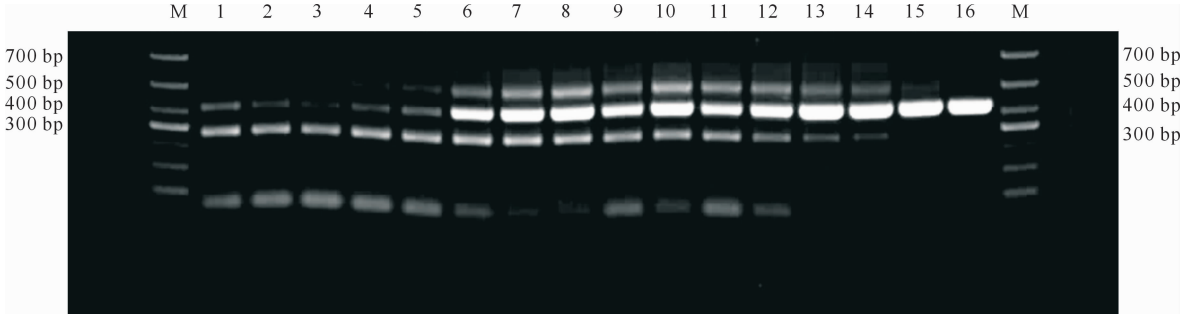
A. Comparison of ASPV and KF735125.1; B. Comparison of ASGV and KP772666.1;C. Comparison of ACLSV-1 and JQ320100.1

图 3 ASPV、ASGV 和 ACLSV-1 扩增片段与 GenBank 数据库中对对应病毒核苷酸序列的同源性比较

Fig. 3 Homology comparison between amplified fragments of ASPV,ASGV and ACLSV-1 viruses and corresponding nucleotide sequences in GenBank database

ASPV、ASGV 和 ACLSV-1 3 对引物在原参考文献中已被证明可成功检测对应病毒,本试验为进一步验证 3 对引物在同一反应体系中仍可用来检测 3 种病毒,特进行了测序试验,将 ASPV、ASGV、ACLSV-1 引物的扩增片段序列与 GenBank 数据库中登录号为 KF735125. 1 (与 ASPV 对应)、KP772666. 1 (与 ASGV 对应)、JQ320100. 1 (与 ACLSV 对应)的核苷酸序列进行同源性比较,相似率分别为 94%,98%和 95%(图 3),说明该一步三重 RT-PCR 可以用来准确检测 ASPV、ASGV、

ACLSV 3 种病毒。
2.5 ‘浓果 25’组培苗病毒一步三重检测体系的优化
2.5.1 退火温度 由图 4 可见,退火温度为 48~52 ℃时,只有 ASPV 可成功扩增出目标条带,ASGV 条带模糊,ACLSV 则无目标条带;退火温度为 53~56 ℃时,3 种病毒均可检测到明显的条带,但在 57~59 ℃有轻微的非特异性扩增;在退火温度为 60~63 ℃时,随着温度的升高,ASGV 仍可成功扩增到目标条带,但 ASPV、ACLSV 的目标条带逐渐消失。故本试验认为退火温度选择 53~56 ℃较佳。



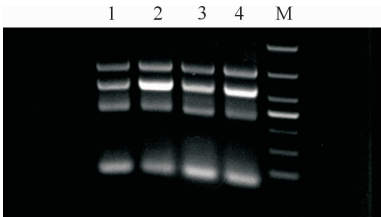
M. 1 000 bp DNA Marker;1~16. 退火温度依次为 48~63 ℃
M. 1 000 bp DNA Marker;1-16. Annealing temperature was 48-63 ℃, respectively

图 4 ‘浓果 25’组培苗 ASPV、ASGV 和 ACLSV 一步三重检测体系中退火温度的优化

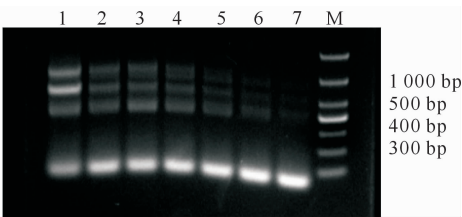
Fig. 4 Optimization of annealing temperature in ASPV,ASGV and ACLSV one-step triple detection system for ‘Nongguo-25’ tissue culture plantlets

2.5.2 反转录时间 试验设置了 15,20,25,30 min 4 个不同的反转录时间处理,由图 5 可知,这 4 个处理均可成功扩增出 ASPV、ASGV、ACLSV 的特异性目标条带。4 个处理间比较,反转录 15 min 时的条带较 20,25,30 min 时略浅。所以,本试验认为 20~30 min 的反转录时间较好,基于时间效率考

虑,推荐反转录时间为 20 min。
2.5.3 延伸时间 由图 6 可见,延伸时间为 30,40,50 s 时,ASPV、ASGV 和 ACLSV 3 种病毒均可检测到明显的条带;之后随着延伸时间的延长,条带逐渐模糊,甚至消失。因此认为 30~50 s 的延伸时间较好,出于时间效率考虑,推荐延伸时间为 30 s。



1~4. 反转录时间依次为 15,20,25 和 30 min;
M. 1 000 bp DNA Marker
1-4. Reverse transcription time was 15,20,25 and 30 min, respectively;M. 1 000 bp DNA Marker



1~7. 延伸时间依次为 30,40,50,70,90,100,120 s;
M. 1 000 bp DNA Marker
1-7. Extension time was 30,40,50,70,90,100,120 s, respectively;M. 1 000 bp DNA Marker
图 6 ‘浓果 25’组培苗中 ASPV、ASGV 和 ACLSV 的一步三重检测体系中延伸时间的确定
Fig. 6 Determination of extension time of ASPV,ASGV and ACLSV in ‘nongguo-25’ tissue culture system by one step triple detection system

图 5 ‘浓果 25’组培苗 ASPV、ASGV 和 ACLSV 的一步三重检测体系中反转录时间的优化
Fig. 5 Optimization of reverse transcription time of ASPV,ASGV and ACLSV in ‘nongguo-25’ tissue culture system

2.5.4 循环数 由图 7 可见,循环数为 20 时,ASPV 未能正常扩增出目标片段;循环数为 25,30 和 35 时,3 种病毒均可成功检测,且无非特异性扩增,但循环数为 25 时,条带颜色较浅;循环数为 40 时,3 种病毒仍可成功检测,但有轻微的非特异性扩增。因此,基于时间、效果和效率综合考虑,推荐循环数为 30。

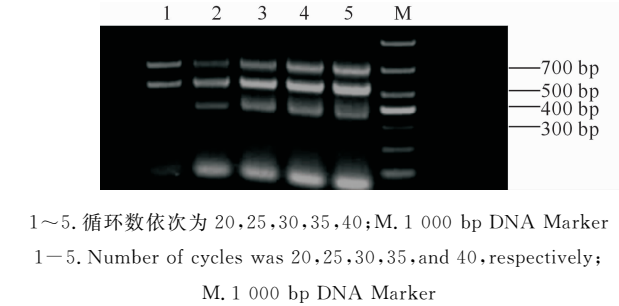


图 7 ‘浓果 25’组培苗中 ASPV、ASGV 和 ACLSV 的一步三重检测体系循环数的确定
Fig. 7 Determination of cycle number of ASPV, ASGV and ACLSV in ‘Nongguo-25’ tissue culture system by one step triple detection

2.6 优化一步三重检测体系的准确性验证

为了进一步验证优化后的一步三重检测体系检测苹果潜隐性病毒的准确性,采用优化后的一步三重检测体系对表 3 中供检苹果材料进行了潜隐性病毒检测,结果见图 9。由图 9 可见,优化后的一步三重检测体系可准确检测到‘中秋王’未完全脱毒苗带有 ASGV,‘中秋王’完全脱毒苗不带毒,‘中秋王’组培苗及其根、茎、叶均带有 ASPV、ASGV 和 ACLSV 3 种病毒,‘玉华早富’组培苗及其根、茎、叶则均带有 ASGV 和 ACLSV 2 种病毒,该检测结果与表 3 材料的带毒状况完全一致。

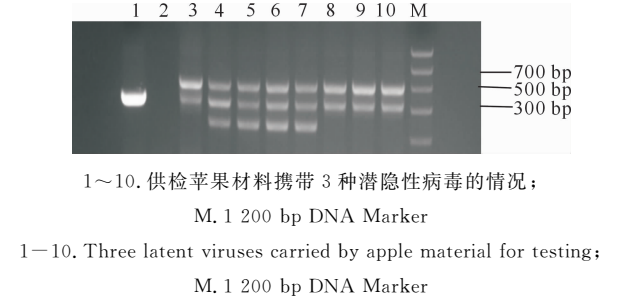


图 9 改进的一步三重 RT-PCR 法对供检苹果材料带毒情况的验证
Fig. 9 Verification of improved one-step triple RT-PCR method for testing apple material with viruses

3 讨论

在筛选一步三重 RT-PCR 法的引物组合时,

2.5.5 引物加量 由图 8 可见,3 种引物加量组合以表 2 中组合 1,3,5,8 的效果较好,3 种病毒的目标条带清晰且较亮,其余组合虽然也能扩增出目标条带,但效果相对较差。试验证明组合 1,3,5,8 的引物加量均可,但是考虑到操作的便捷性,优选组合 8,即 ASPV 1.0 μ L,ASGV 1.0 μ L,ACLSV-1 1.0 μ L。

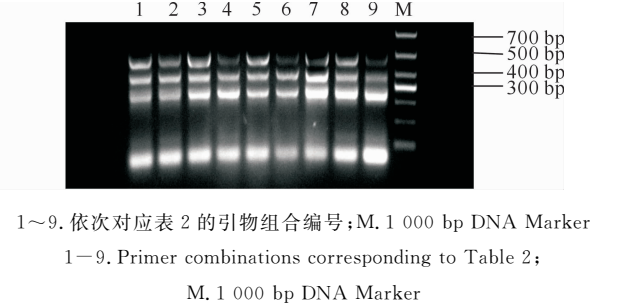


图 8 ‘浓果 25’组培苗中 ASPV、ASGV 和 ACLSV 的一步三重检测体系引物加量的优化
Fig. 8 Optimization of primer addition of ASPV, ASGV and ACLSV in ‘Nongguo-25’ tissue culture system

ASPV、ASGV、ACLSV-2 引物组合未能很好地扩增出 3 条目标条带,可能是这 3 对引物存在竞争性扩增问题。在多重检测体系中,除了对引物有要求外,对引物的目标片段长度、退火温度及碱基 G+C 含量等也有要求,即不能造成引物间自身不匹配和竞争性扩增。如陈红霞等^[22]对苹果潜隐性病毒进行两步多重检测时,就因为 ASPV 的目标片段与另一引物目标片段长度相差太小,导致电泳时不易区分。所以,在进行多重检测时,引物的选择非常重要。

在本试验中,优化后的一步三重 RT-PCR 法对 ASPV、ASGV 和 ACLSV 3 种潜隐病毒检测时所需反转录时间为 20 min,比张强等^[23]检测脱苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)所需反转录时间 1 h 缩短了 40 min,比陈红霞等^[24]检测脱苹果潜隐性病毒所需反转录时间 30 min 缩短了 10 min。本研究不仅缩短了反转录时间,而且检测体系的循环数也优化为 30 次,与同样检测 3 种病毒的陈红霞等^[24]试验中的 35 个循环相比减少了 5 个循环。本试验一步三重 RT-PCR 中延伸时间为 30 s,仅是朱海生等^[25]检测脱草莓病毒、姚炳羽^[26]检测脱梨病毒所需时间的 1/3。此外,本研究检测体系中目标条带均小于 1 000 bp,不需要终延伸也可以补齐所有 DNA 链,使其具有完整的双链 DNA,相对范旭东等^[27]、Yu 等^[28]、李科^[29]、沈建国等^[30]不同时长的终延伸节省了检测时间。

本研究确定的引物加量试验结果与范旭东等^[21]引物片段长度与加量成正比的研究结果不完全一致,且陈红霞等^[24]在优化一步多重检测体系的试验中也未得出范旭东等^[21]的结论,故引物片段长度与其加量的关系仍需进一步验证。另外,本试验优化后的检测体系也需大量检测样本来验证。以前对大多数木本植物进行病毒检测时,都是每次只能检测 1 种病毒,而本试验的一步三重检测是在一个反应体系中同时加入 3 对引物,因此能同时扩增 3 个目的条带,也就是说能同时检测 3 种病毒,具有快速、高效、节约成本等优点。这一方法在草本园艺植物唐菖蒲和百合^[31]及马铃薯^[32]上已有应用。

4 结 论

本试验对一步三重 RT-PCR 的退火温度、反转录时间、延伸时间、循环数、引物加量等共性指标进行了优化,并用由两步单重 RT-PCR 检测法确定了带毒情况的供检苹果材料进行验证,此外对 ASPV、ASGV、ACLSV-1 引物的扩增序列进行测序,表明其与相应病毒的同源性均在 94% 以上,证明本方法确实可成功检测 ASPV、ASGV 和 ACLSV 3 种苹果潜隐性病毒。

优化一步三重 RT-PCR 反应程序: 50 °C 反转录 20 min; 94 °C 预变性 20 min; 94 °C 变性 30 s, 53 ~ 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 引物加量为各病毒上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 无需终延伸。

[参考文献]

- [1] 赵克令. 论我国水果品质标准体系建设 [J]. 世界标准信息, 2006(10): 78-82.
Zhao K L. On the construction of standard system of fruit quality in China [J]. Word Standards News, 2006(10): 78-82.
- [2] 孙平平, 王文辉. 2017/2018 年世界苹果、梨、葡萄、桃及樱桃产量、市场与贸易情况 [J]. 中国果树, 2018(2): 99-108.
Sun P P, Wang W H. 2017/2018 world production, market and trade of apple, pear, grape, peach and cherry [J]. China Fruit, 2018(2): 99-108.
- [3] 张洪胜. 今年全球苹果普遍丰产 中国苹果产量再创新高 [J]. 烟台果树, 2017(1): 47.
Zhang H S. The global apple production is generally high and China's apple output hits a record high in this year [J]. Yantai Fruit, 2017(1): 47.
- [4] 刘月英, 朱世新, 万惠民, 等. 几种苹果潜隐性病毒传播途径的研究 [J]. 北方园艺, 1997(4): 33-34.
Liu Y Y, Zhu S X, Wan H M, et al. Research on the transmission path of several apple latent viruses [J]. Northern Horticulture, 1997(4): 33-34.
- [5] 郝璐, 叶婷, 陈善义, 等. 我国北方部分苹果主产区病毒病的发生与检测 [J]. 植物保护, 2015, 41(2): 158-161.
Hao L, Ye T, Chen S Y, et al. Occurrence and detection of virus diseases in some major apple-producing regions in northern China [J]. Plant Protection, 2015, 41(2): 158-161.
- [6] Ye T, Chen S Y, Wang G R, et al. Identification and molecular characterization of apple dimple fruit viroid in China [J]. Journal of Plant Pathology, 2013, 95(3): 637-641.
- [7] 胡国君, 张尊平, 任芳. 我国主要苹果病毒及其研究进展 [J]. 中国果树, 2017(3): 71-74.
Hu G J, Zhang Z P, Ren F. The main apple virus and research progress in China [J]. China Fruit, 2017(3): 71-74.
- [8] Menzel W, Azhn V, Maiss E. Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses [J]. Journal of Virological Methods, 2003(7): 153-157.
- [9] Jarošová J, Kundu J K. Simultaneous detection of stone fruit tree viruses by one-step multiplex RT-PCR [J]. Scientia Horticulture, 2010, 125(1): 68-72.
- [10] Khan S, Mackay J, Liefting L, et al. Development of a duplex one-step RT-qPCR assay for the simultaneous detection of apple scar skin viroid and plant RNA internal control [J]. Journal of Virological Methods, 2015, 221: 100-105.
- [11] Osman F, Hodzic E, Kwon S J, et al. Development and validation of a multiplex reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay for the rapid detection of citrus tristeza virus, citrus psorosis virus, and citrus leaf blotch virus [J]. Journal of Virological Methods, 2015, 220: 64-75.
- [12] Sas M A, Vina-rodriguez A, Mertens M, et al. A one-step multiplex real-time RT-PCR for the universal detection of all currently known CCHFV genotypes [J]. Journal of Virological Methods, 2018, 255: 38-43.
- [13] Cui D, Zhao D, Xie G, et al. Simultaneous detection of influenza A subtypes of H3N2 virus, pandemic (H1N1) 2009 virus and reassortant avian H7N9 virus in humans by multiplex one-step real-time RT-PCR assay [J]. Springer Plus, 2016, 5(1): 2054.
- [14] Liu D, Liu F, Guo D, et al. One-step triplex PCR/RT-PCR to detect canine distemper virus, canine parvovirus, and canine kobovirus [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2018, DOI: 10.1292/jvms.17.0442.
- [15] Laamiri N, Aouini R, Marnissi B, et al. A multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of four most common avian respiratory viruses [J]. Virology, 2018, 515: 29-37.
- [16] Zhang Z, Liu D, Sun W, et al. Multiplex one-step Real-time PCR by Taqman-MGB method for rapid detection of pan and H5 subtype avian influenza viruses [J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0178634.
- [17] Hoferer M, Braun A, Skrypski J, et al. One-step cross-genogroup multiplex RT-qPCR with an internal control system for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) [J]. Journal of Virological Methods, 2017, 247: 68-76.

- [18] Lee S Y, Kim M J, Kim H J, et al. Simultaneous detection of four foodborne viruses in food samples using a one-step multiplex reverse transcription PCR [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 28(2): 210-217.
- [19] Menzel W, Jelkmann W, Maiss E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant m RNA as internal control [J]. *Journal of Virological Methods*, 2002(1): 81-92.
- [20] 李文慧, 牛建新. 苹果茎沟病毒 RT-PCR 检测技术 [J]. *西北农业学报*, 2006, 15(4): 105-107.
Li W H, Niu J X. Detection of apple stem grooving virus by reverse transcription-polymerase Chain reaction (RT-PCR) [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2006, 15(4): 105-107.
- [21] 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 等. 3 种苹果潜隐病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立 [J]. *园艺学报*, 2009, 36(12): 1821-1826.
Fan X D, Dong Y F, Zhang Z P, et al. Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of three latent apple viruses [J]. *Acta Horticulture Sinica*, 2009, 36(12): 1821-1826.
- [22] 陈红霞, 邵建柱, 孙建设, 等. 两步多重 RT-PCR 快速检测苹果潜隐性病毒 [J]. *果树学报*, 2012, 29(4): 695-701.
Chen H X, Shao J Z, Sun J S, et al. Quick detection of apple latent viruses by two-step multiplex RT-PCR assay [J]. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(4): 695-701.
- [23] 张 强, 牛建新, 李西萍. 苹果褪绿叶斑病毒一步法 RT-PCR 检测 [J]. *西北农业学报*, 2006, 15(4): 67-69.
Zhang Q, Niu J X, Li X P. A study on the one-step RT-PCR for detection of apple chlorotic leaf spot virus [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2006, 15(4): 67-69.
- [24] 陈红霞, 邵建柱, 孙建设, 等. 3 种苹果潜隐性病毒一步多重 RT-PCR 检测体系的优化 [J]. *河北农业大学学报*, 2012, 35(4): 51-57.
Chen H X, Shao J Z, Sun J S, et al. Quick detection of three apple latent viruses by one-step multiplex RT-PCR [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2012, 35(4): 51-57.
- [25] 朱海生, 花秀凤, 陈敏敏, 等. 四种草莓病毒 SMoV、SVBV、SCV、SMYEV 多重 RT-PCR 检测 [J]. *核农学报*, 2013, 27(11): 1630-1635.
Zhu H S, Hua X F, Chen M D, et al. Detection of four viruses (SMoV, SVBV, SMYEV and SCV) infecting strawberry by multiplex RT-PCR [J]. *Journal of Nuclear Agriculture Sciences*, 2013, 27(11): 1630-1635.
- [26] 姚炳羽. 三种梨潜隐病毒 TR-PCR 和 RT-LAMP 检测技术研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
Yao B Y. Studies on the detection of three pear latent viruses by TR-PCR and RT-LAMP [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.
- [27] 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 等. 葡萄 4 种病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(5): 949-956.
Fan X D, Dong Y F, Zhang Z P, et al. Multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four grapevine viruses [J]. *Acta Horticulture Sinica*, 2012, 39(5): 949-956.
- [28] Yu Y, Zhao Z, Jiang D, et al. A one-step multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four viruses that infect peach [J]. *Applied Microbiology*, 2013, 57: 350-355.
- [29] 李 科. 山东和陕西苹果病毒病原鉴定及多重 RT-PCR 检测体系的建立 [D]. 重庆: 西南大学, 2014.
Li K. The identification of pathogens causing apple virus disease in Shandong and Shaanxi province and the establishment of multiplex RT-PCR detection system [D]. Chongqing: Southwest University, 2014.
- [30] 沈建国, 高芳莹, 蔡 伟, 等. 进境大豆种子上菜豆荚斑驳病毒和大豆花叶病毒的多重 RT-PCR 检测 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49(4): 667-676.
Shen J G, Gao F L, Cai W, et al. Multiplex RT-PCR for simultaneous detection of bean pod mottle virus and soybean mosaic virus in imported soybean seeds [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(4): 667-676.
- [31] 郑 耘, 陈枝楠, 陈富华, 等. 侵染唐菖蒲和百合 3 种病毒的多重 RT-PCR 检测方法 [J]. *植物检疫*, 2010, 24(3): 19-22.
Zheng Y, Chen Z N, Chen F H, et al. Detection of gladiolus and lily viruses by multiplex RT-PCR [J]. *Phytopathology*, 2010, 24(3): 19-22.
- [32] 董代幸, 张祥林, 罗 明, 等. 马铃薯病毒一步法多重 RT-PCR 检测技术的构建 [J]. *微生物学通报*, 2011, 38(1): 131-137.
Dong D X, Zhang X L, Luo M, et al. Construction of a one step multiplex RT-PCR for detecting potato virus [J]. *Microbiology Bulletin*, 2011, 38(1): 131-137.