

# 苹果褪绿叶斑病毒双引物对PCR检测体系的建立及应用

## Establishment and application of duplex PCR detection method for apple chlorotic leaf virus

胡国君<sup>1</sup> 董雅凤<sup>1\*</sup> 张尊平<sup>1</sup> 范旭东<sup>1</sup> 任芳<sup>1</sup> 鲁兴凯<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院果树研究所, 国家落叶果树脱毒中心, 辽宁 兴城 125100; 2. 昭通苹果产业研究所, 云南 昭通 657000)

Hu Guojun<sup>1</sup> Dong Yafeng<sup>1\*</sup> Zhang Zunping<sup>1</sup> Fan Xudong<sup>1</sup> Ren Fang<sup>1</sup> Lu Xingkai<sup>2</sup>

(1. National Center for Eliminating Viruses from Deciduous Fruit Trees, Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, Liaoning Province, China; 2. Research Institute of Apple Industry in Zhaotong, Zhaotong Yunnan 657000)

病毒病在我国苹果树上普遍发生,其中苹果褪绿叶斑病毒(apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、苹果茎沟病毒(apple stem grooving virus, ASGV)和苹果茎痘病毒(apple stem pitting virus, ASPV)最常见,常混合侵染,引起树体衰弱,苹果产量和品质下降,经济损失严重(Cieniewicz & Fuchs, 2016)。因此,建立快速、准确的检测技术对病毒病防控具有重要意义。Hu et al.(2015)认为在病毒检测过程中,需要增加检测频率来提高准确率,但也会增加检测成本。针对 ACLSV,本研究在常规 PCR 基础上,增加 1 对检测引物,为确保高检测效率和准确性、减少扩增程序、降低检测成本,在 1 个反应体系中同时进行 2 个目标片段的扩增,建立双引物对 PCR 检测方法,以期为该病毒的分子鉴定提供技术支持。

### 1 材料与方

#### 1.1 材料

供试毒源及植物:感染 ACLSV 的苹果试管苗样品 4 份,品种为富士、粉红女士、新红将军和烟富 0,以及健康山丁子于中国农业科学院果树研究所保存。供试检测样品 86 份,包括从辽宁省、河北省、陕西省及山东省收集的田间苹果样品 44 份(12 份嫩叶和 32 份韧皮部)、中国农业科学院果树研究所的苹果试管苗 37 份以及接种苹果病毒的西方烟 5 份。

试剂及仪器:rTaq<sup>®</sup> DNA 聚合酶、dNTP Mixture、克隆载体 pMD18-T 和大肠杆菌 *Escherichia coli* DH 5 $\alpha$  感受态细胞,宝生物工程(大连)有限公司;其它试剂为国产分析纯。S1000 型 PCR 仪,美国伯乐公司。

#### 1.2 方法

引物筛选及鉴定:根据 NCBI 中 ACLSV 全基因

组序列 AB326223-5、AJ243438、D14996、HE980332 和 EU223295 设计 5 条引物,分别为 ACL-F1(5'-TTGTGAGAGGCTCTATTACATCT-3')、ACL-F2(5'-TGCTGGGGTGAAAAGCTCCAGA-3')、ACL-R2(5'-GCTGTGCGAAGAACCTGCACAT-3')、ACL-F3(5'-CAGACCCCTTCATGGAAAGACAG-3')和 ACL-R3(5'-CGGGTCCGAAGAGGTAGTCTTG-3'),均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。设 ACL-F1/R2、ACL-F2/R2 和 ACL-F3/R3 三种引物对进行常规 PCR 进行扩增。克隆片段送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序,在 NCBI 中进行比对分析。

总 RNA 提取和常规 PCR:供试毒源及供试检测样品的总 RNA 提取和常规 PCR 扩增均参照 Hu et al.(2015)的方法。称取 0.1 g 样品,加入 1 mL 提取缓冲液研磨;取匀浆加入 10% *N*-十二烷基肌氨酸钠 150  $\mu$ L, 70 $^{\circ}$ C 保温,冰上放置 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min;吸上清液加入混合液(无水乙醇、6 mol/L 碘化钠和 10% 二氧化硅悬浮液)中,室温振荡 20 min;洗涤 2 次,室温风干;重悬浮后所获得上清液即为 RNA,于 -20 $^{\circ}$ C 保存,取 3  $\mu$ L RNA 反转录合成第一链 cDNA。常规 PCR 反应体系:cDNA 2  $\mu$ L、10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTP Mixture 0.5  $\mu$ L、上下游引物各 0.5  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L rTaq<sup>®</sup> DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 定容至 25  $\mu$ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

双引物对 PCR 扩增及条件优化:在上述常规 PCR 扩增基础上,每个反应体系中加入 1 对扩增引物(第 1 对引物对-第 2 对引物对),即 ACL-F1/R2-

ACL-F3/R3 和 ACL-F2/R2-ACL-F3/R3。引物分别设3个用量,即体系I、II和III(表1);在体系II的基础上,设2个cDNA用量,即体系IV和V,比较不同组合反应体系的扩增效果。扩增程序中,反应体系I、II和III分别设52℃和57℃两个退火温度。

检测效果比较:利用常规PCR和双引物对PCR方法分别对86份样品进行病毒检测,并对感染ACLSV的苹果韧皮部、嫩叶、试管苗的ACLSV检出率进行对比分析。以山丁子作阴性对照,新红将军苹果作阳性对照。

表1 双引物对PCR扩增中的不同反应体系

试剂 Reagent	I	II	III	IV	V
10×RCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
dNTP Mixture	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
10 μmol/L ACL-F1/ACL-F2	0.50	0.60	0.40	0.60	0.60
10 μmol/L ACL-R2	0.50	0.60	0.40	0.60	0.60
10 μmol/L ACL-F3	0.50	0.40	0.60	0.40	0.40
10 μmol/L ACL-R3	0.50	0.40	0.60	0.40	0.40
5 U/μL rTaq <sup>®</sup> DNA聚合酶	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
5 U/μL rTaq <sup>®</sup> DNA polymerase					
cDNA	4.00	4.00	4.00	2.00	3.00
ddH <sub>2</sub> O	15.25	15.25	15.25	17.25	16.25
总量 Total	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00

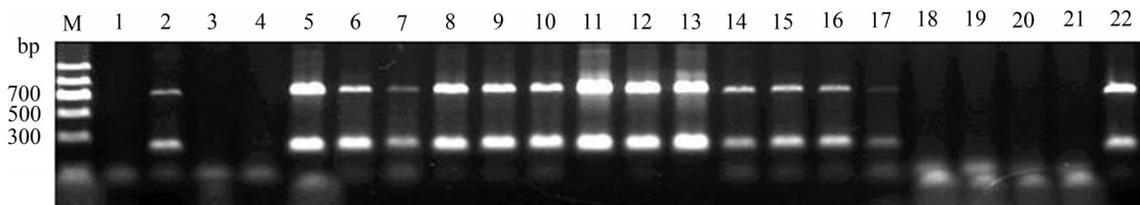


图1 双引物对PCR检测不同组织中的苹果褪绿叶斑病毒

Fig. 1 Detection results of apple chlorotic leaf spot virus in different tissues by duplex PCR

M: DNA marker II; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3~7: 嫩叶; 8~12: 试管苗; 13~17: 韧皮部; 18~22: 接种苹果病毒的烟草。M: DNA marker II; 1: negative control; 2: positive control; 3~7: new leaves; 8-12: *in vitro* plant; 13-17: phloem; 18-22: tobacco inoculated with apple virus.

### 3 讨论

已知的10个ACLSV全基因组的核苷酸序列同源率为74.1%~95.1%,且ACLSV不同寄主间、同一寄主不同分离物间以及同一分离物不同分子变种间的序列均存在较大差异,因此,需选用多对引物来增强检测的准确性(Hu et al., 2015)。本研究建立的双引物对PCR检测体系,可以同时检测1种病毒的2个位置,检出率是Hu et al.(2017)研究中2个常规PCR检出率的总和。本方法灵敏度高、特异性强,为苹果病毒病预防及监控提供了准确的检测体系;且该方法不具有材料特异性,也为ACLSV在其

## 2 结果与分析

### 2.1 ACLSV引物的特异性

ACL-F1/R2、ACL-F2/R2、ACL-F3/R3三对引物均可从阳性样品扩增出清晰的目标条带,扩增出来片段大小分别为712、511和214 bp,与已知ACLSV序列的核苷酸同源率为85%~98%。

### 2.2 双引物对PCR扩增体系和条件的优化

退火温度为52℃时,反应体系I、II和III中均能扩增出2条目标条带;当升至57℃时能降低非特异性扩增,其中反应体系II的扩增效果最佳。cDNA用量降低到2 μL仍能扩增出2个条带。确定反应体系IV为最优体系(表1);扩增程序为94℃预变性3 min,94℃变性30 s,57℃退火40 s,72℃延伸40 s,共35个循环;72℃延伸10 min。

### 2.3 双引物对PCR的检测效果比较

本研究所建立的反应体系能在待检样品中特异性的扩增出2条清晰条带。苹果韧皮部、嫩叶、试管苗和西方烟的检测效果未发现明显差别(图1)。引物ACL-F1/R2和ACL-F2/R2对ACLSV的检出率分别为73.3%和72.1%,而ACL-F1/R2-ACL-F3/R3两对引物组合的检出率为75.8%,说明双引物对PCR检测效果较优于常规PCR的检测效果。

它寄主中的检测提供了技术支撑。

## 参考文献 (References)

- Cieniewicz E, Fuchs M. 2016. *Apple chlorotic leaf spot virus*. New York State IPM Program, New York, pp. 1-2
- Hu GJ, Dong YF, Zhang ZP, Fan XD, Ren F, Li ZN. 2017. Efficacy of virus elimination from apple by thermotherapy coupled with *in vivo* shoot-tip grafting and *in vitro* meristem culture. *Journal of Phytopathology*, 165(10): 701-706
- Hu GJ, Dong YF, Zhang ZP, Fan XD, Ren F, Zhou J. 2015. Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121: 435-443

(责任编辑:王璇)