

基因芯片和单一RT-PCR在甘薯试管苗病毒检测中的应用

侯夫云¹, 翟会青², 王庆美¹, 秦 桢¹, 周媛媛¹, 李爱贤¹

¹山东省农业科学院作物研究所/农村农业部黄淮海薯类科学观测实验站(济南), 山东 济南

²石家庄慧谷农业科技有限公司, 河北 石家庄

收稿日期: 2022年7月7日; 录用日期: 2022年8月5日; 发布日期: 2022年8月12日

摘 要

以120份不同甘薯品种试管苗为材料, 利用单一RT-PCR和基因芯片两种技术进行病毒检测比较研究。单一RT-PCR结果表明, 供试样品中甘薯曲叶病毒SPLCV的阳性率最高, 达62.5%; 依次是甘薯褪绿矮化病毒SPCSV、甘薯羽状斑驳病毒SPFMV、甘薯G病毒SPVG以及潜隐病毒SPLV。基因芯片在SPLCV、SPCSV、SPFMV及SPVG等4种病毒的检出率结果显著低于单一RT-PCR。因此, 单一RT-PCR较适用于试管苗病毒检测, 基因芯片快速、便捷、高通量, 但是对甘薯病毒的检测尚需进一步优化。

关键词

甘薯, 单一RT-PCR, 基因芯片, 病毒

Application Analysis of Gene Chip and Single RT-PCR in Virus Detection of Sweet Potato Tube Plantlet

Fuyun Hou¹, Huiqing Zhai², Qingmei Wang¹, Zhen Qin¹, Yuanyuan Zhou¹, Aixian Li¹

¹Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Scientific Observation and Experimental Station of Tuber and Root Crops in Huang-Huai-Hai Region, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Jinan Shandong

²Shijiazhuang Huigu Agricultural Science and Technology Company, Shijiazhuang Hebei

Received: Jul. 7th, 2022; accepted: Aug. 5th, 2022; published: Aug. 12th, 2022

Abstract

120 tube plantlets of sweet potato were used as materials to detect sweet potato virus by single

文章引用: 侯夫云, 翟会青, 王庆美, 秦桢, 周媛媛, 李爱贤. 基因芯片和单一 RT-PCR 在甘薯试管苗病毒检测中的应用[J]. 农业科学, 2022, 12(8): 704-708. DOI: 10.12677/hjas.2022.128100

RT-PCR and gene chip. Single RT-PCR results showed that the positive rate of sweet potato curl virus (SPLCV) was the highest up to 62.5%. The detection rates of sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV), sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), sweet potato virus G (SPVG) and Sweet potato latent virus (SPLV) decreased successively. The detection rates of SPLCV, SPCSV, SPFMV and SPVG using gene chips were significantly lower than single RT-PCR. Single RT-PCR has strong specificity, good repeatability and good stability. However, single RT-PCR is more suitable for detecting sweet potato virus, gene chip has the characters of fast, convenient and high throughput, but its application in sweet potato is not mature yet and the detection of SPLCV, SPCSV and SPFMV needs further optimization.

Keywords

Sweet Potato, Single RT-PCR, Gene Chip, Virus

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

甘薯病毒病已成为制约我国甘薯产业发展的主要因素之一,自2014年开始,甘薯卷叶病毒和甘薯SPVD病毒病复合体在生产上大爆发,发病严重田块产量损失达60%~80% [1]。目前,生产上没有抗病毒的甘薯品种及有效的防控药剂,甘薯茎尖脱毒是解决甘薯病毒病最有效的途径。病毒检测是甘薯茎尖脱毒及健康种薯繁育过程中重要的环节。目前,甘薯病毒常用检测方法主要有血清学检测(ELISA)、指示植物嫁接法、诊断学检测、单一RT-PCR以及基因芯片等[2] [3]。指示植物嫁接法、诊断学检测主要在甘薯病毒初步鉴定中使用[4],单一RT-PCR和基因芯片是甘薯病毒应用较多的检测方法。与血清学检测相比,单一RT-PCR根据甘薯病毒的外壳蛋白或运动蛋白序列设计引物,进行病毒检测,具有灵敏、高效快速等优点[5]。基因芯片技术则是将分子生物学、信息科学与计算机等技术于一体形成的核酸固相杂交技术,具有高通量、灵敏度高及微型化的优点[6]。本研究将基因芯片与单一RT-PCR甘薯病毒检测技术进行比较研究,以期甘薯种苗繁育企业、科研单位对甘薯病毒检测方法提供参考依据。

2. 材料与方

2.1. 实验材料

龙薯9号、烟薯25、普薯32、济薯25、哈密、商薯19、红瑶、以名门金石等甘薯品种的试管苗,取其带有叶柄的叶片,液氮处理后,-80℃保存备用。

2.2. 酶和试剂

甘薯病毒检测基因芯片试剂盒组GeneTop SPV Kit购自台湾巨合生物有限公司。DNA、RNA提取试剂盒购自山东思科捷生物技术有限公司。

2.3. 基因芯片检测

利用甘薯病毒基因芯片试剂盒进行甘薯SPFMV、SPCSV、SPVG、SPLV、SPLCV病毒检测。核酸的提取按照其试剂盒说明书进行。RT-PCR反应体系:SPV Mix 9.6 μl、Taq酶0.3 μl、RT反转录酶0.1 μl、

样品 2 μL 。PCR 反应条件: 45 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min。将 RT-PCR 产物根据试剂盒说明书进行杂合反应。将芯片结果与对照表对比, 判断感染甘薯病毒种类。

2.4. 单一 RT-PCR

SPFMV、SPCSV、SPVG、SPLV、SPLCV 等 5 种病毒的特异性引物参照乔奇等(2012) [2]。根据 Sparkzol reagent RNA 提取试剂盒以及 Spark classic 植物基因组 DNA 提取试验盒的操作步骤进行 RNA 和 DNA 的提取。利用 SparkscriptII RT Plus Kit 试剂盒进行第一链 cDNA 的合成。以第一链 cDNA 为模板, 分别利用 5 种病毒的特异性引物进行 PCR 扩增。反应体系如下: cDNA 1 μL 、10 \times PCRmix (含 MgCl_2) 2 μL 、正向引物和反向引物各 1 μL 、ExTaqDNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.2 μL , 补充 ddH₂O 至总体积 20 μL 。反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 36 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 根据电泳结果判断感染甘薯病毒种类。

3. 结果与分析

3.1. 5 种病毒的单一 RT-PCR 检测结果

单一 RT-PCR 检测结果表明, 在 120 份供试材料中, 检测出带病毒的株系 77 份, 占 64.1%。其中 SPLCV 的阳性检出率最高, 达到 62.5% (见表 1); 其次是 SPCSV 的阳性检出率为 6.67% (表 1)、SPFMV 的阳性检出率为 5.0% (表 1)、SPVG 的阳性检出率 3.33% (表 1), 和 SPLV 病毒的阳性检出率为 0%。

Table 1. Detection of viruses infecting sweet potato using single RT-PCR

表 1. 单一 RT-PCR 病毒检测结果

	株系数	SPCSV	SPFMV	SPVG	SPLV	SPLCV
龙薯 9 号	16	0*	0	2	0	8
烟薯 25	28	0	0	0	0	7
普薯 32	16	6	4	2	0	11
济薯 25	8	0	0	0	0	5
哈密	22	0	0	0	0	14
商薯 19	12	2	2	0	0	12
名门金时	4	0	0	0	0	4
红瑶	14	0	0	0	0	14
	120	8	6	4	0	75
Percent/%		6.67	5.0	3.33	0	62.5

*代表病毒阳性株系数。

3.2. 基因芯片检测结果

利用基因芯片方法对同样的 120 份供试材料进行病毒检测。结果发现, 在所有材料中, 2 份材料含有 SPFMV (见表 2), 2 份材料含有 SPVG 病毒(表 2), 其余材料均未发现 5 种病毒(表 2)。

Table 2. Detection of viruses infecting sweet potato using gene chip
表 2. 基因芯片病毒检测结果

	株系数	SPCSV	SPFMV	SPVG	SPLV	SPLCV
龙薯 9 号	16	0*	0	0	0	0
烟薯 25	28	0	0	0	0	0
普薯 32	16	0	2	2	0	0
济薯 25	8	0	0	0	0	0
哈密	22	0	0	0	0	0
商薯 19	12	0	0	0	0	0
名门金时	4	0	0	0	0	0
红瑶	14	0	0	0	0	0
	120	0	2	2	0	0
Percent/%		0	1.67	1.67	0	0

*代表病毒阳性株系数。

3.3. 两种检测方法结果比较

从上面的检测结果可以看出, 利用两种检测方法中 SPCSV、SPFMV、SPVG、SPLCV 等 4 种病毒的检测结果差异显著, 其中单一 RT-PCR 方法的 SPLCV 阳性检出率达到 62.5%。但是, 基因芯片的 SPLCV 阳性检出率为 0。由此可以看出, 单一 RT-PCR 在病毒检测中相对较稳定, 而使用试剂盒的基因芯片属于多重 RT-PCR, 敏感度较低。

4. 讨论

目前, 应用于甘薯小量样品的病毒检测技术主要有 RT-PCR 和基因芯片技术。本研究对 120 份甘薯试管苗同时利用单一 RT-PCR、基因芯片技术进行病毒检测, 并将结果进行比较分析, 结果发现两种检测方法在 SPCSV、SPFMV、SPVG、SPLCV 等 4 种病毒的检测结果差异较显著。我们采用的 RT-PCR 属于单一 RT-PCR, 相对与多重 RT-PCR, 单一 RT-PCR 具有特异性强、重复性好、稳定性好的优点, 但是对于多种病毒的检测, 单一 RT-PCR 相对费时、费工。基因芯片技术在马铃薯、苹果、草莓、百合等植物病毒检测中应用较多[7] [8] [9], 具有快速便捷、高通量的优点[10]。基因芯片在甘薯病毒检测中应用较少。基因芯片的类型较多, 芯片的杂交条件因研究对象、试验材料的不同而不同。目前, 本研究所采用试剂盒的基因芯片是根据甘薯 5 种病毒的外壳蛋白或复制酶序列设计了 5 条引物和探针, 利用多重 RT-PCR, 再将 PCR 产物经过杂合反应形成杂交信号。在本研究中, 基因芯片在 SPCSV、SPFMV、SPVG 等 RNA 病毒及 DNA 病毒 SPLCV 等 4 种病毒的检测结果显著低于单一 RT-PCR 技术。这说明用于基因芯片的甘薯病毒检测试剂盒还需进一步优化。

5. 结论

对于小样的甘薯试管苗样品, 建议根据实际需要, 选择单一 RT-PCR 或基因芯片进行多次检测或 2 种方法交叉应用, 以期提高病毒株检出率, 服务甘薯生产。

基金项目

国家甘薯产业技术体系(CARS-10-B06)、泰山产业领军人才工程(LJNY202113)山东省良种工程(2020LZGC004)及山东省农业科学院农业创新工程项目(CXG2022A14)资助。

参考文献

- [1] Aritua, V., Barg, E., Adipala, E. and Vetten, H.J. (2007) Sequence analysis of the Entire RNA Genome of a Sweet Potato Chlorotic Fleck Virus Isolate Reveals that It Belongs to a Distinct Carlavirus Species. *Archives of Virology*, **152**, 813-818. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0891-z>
- [2] 乔奇, 张振臣, 张德胜, 秦艳红, 田雨婷, 王永江. 中国甘薯病毒种类的血清学和分子检测[J]. 植物病理学报, 2012, 42(1): 10-16.
- [3] 马居奎, 张成玲, 杨冬静, 谢逸萍, 孙厚俊. 我国甘薯病毒病研究进展[J]. 河北农业科学, 2020, 24(1): 51-56.
- [4] 张希太, 张彦波, 肖磊, 谢淑芹. 利用巴西牵牛试管苗检测甘薯组培苗病毒技术研究[J]. 农学学报, 2013, 3(12): 16-22.
- [5] 王丽, 王振东, 乔奇, 秦艳红, 张德胜, 田雨婷, 王爽, 张立军, 张振臣. 甘薯褪绿矮化病毒西非株系实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 植物病理学报, 2014, 44(5): 461-468.
- [6] 马新颖, 汪琳, 任鲁风, 高文娜, 邓丛良, 张永江, 吴小兵, 相宁, 周琦. 10 种植物病毒的基因芯片检测技术研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(6): 561-565.
- [7] 贾慧, 郑洁, 曹志艳, 王进忠, 董金皋. 百合病毒检测芯片的杂交条件优化[J]. 北方园艺, 2015(21): 110-115.
- [8] 贾慧, 王艳辉, 王进忠, 王升启, 董金皋. 基因芯片技术检测黄瓜花叶病毒、烟草花叶病毒和马铃薯 Y 病毒[J]. 华北农学报, 2011, 26(1): 83-86.
- [9] 王永志, 王忠伟, 张胜利, 等. 中国马铃薯病毒血清学和核酸检测技术[C]//中国作物学会. 2017 年中国马铃薯大会论文集: 2017 年卷. 哈尔滨: 哈尔滨地图出版社, 2017: 219-221.
- [10] 陈定虎, 何春梅, 苏斐, 等. 利用基因芯片技术检测李痘病毒主要株系的研究[J]. 科技创新与应用, 2017(10): 1-4.