

## 利用原位杂交及原位 RT-PCR 技术检测梨树组织中 苹果茎痘病毒的分布

赵英, 牛建新

(石河子大学农学院园艺系, 新疆石河子 832003)

**摘要:** 【目的】摸清苹果茎痘病毒在梨树组织中的分布, 为茎尖脱毒提供直接的理论依据和技术支撑。【方法】以库尔勒香梨茎尖、叶片为材料, 利用非放射性标记物地高辛 (DIG), 通过 RT-PCR 反应体系, 合成了苹果茎痘病毒的 cDNA 探针, 利用核酸探针斑点杂交检测方法对该探针特异性及灵敏度进行验证。研究制作了适合原位 PCR 及原位杂交的石蜡切片, 利用原位反转录酶聚合酶链式反应 (IS-RT-PCR) 技术检测石蜡切片组织中苹果茎痘病毒 RNA 的定位及分布, 并对影响实验结果的重要因素进行优化。【结果】梨树中的苹果茎痘病毒 RNA 阳性信号主要位于叶片的叶肉细胞、茎尖的外围皮层组织及相应的初生维管束。蛋白酶 K 消化时间以 20 min 为宜, 要获得良好的扩增效果, RT 反应体系中 RNasin 的量需大于  $0.2 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , dNTPs 大于  $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , SuperScript II 在  $0.1 \sim 1.3 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , 引物在  $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  以上。PCR 反应体系中适宜的退火温度为  $60^\circ\text{C}$ , 循环 35 次, 引物浓度应在  $0.8 \sim 1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , LA Taq 酶浓度大于  $0.5 \text{ U} \cdot 100 \mu\text{l}^{-1}$ 。【结论】梨树茎尖顶端分生组织 0.25 mm 的区域为无病毒区域。

**关键词:** 库尔勒香梨; 苹果茎痘病毒; cDNA 探针; 地高辛; 原位 PCR

## A Study of the Distribution of Apple Stem Pitting Virus in Tissues of Pear Tree Using *in situ* Hybridization and *in situ* RT-PCR

ZHAO Ying, NIU Jian-xin

(Horticultural Department, Agricultural College of Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang)

**Abstract:** 【Objective】To understand the distribution of ASPV in tissues of pear tree and provide direct theoretical and technical support for viruses-elimination of shoot tips. 【Method】With shoot pits and leaves of Korla pear trees, labeled by non-radioactivity Digoxigenin (DIG), cDNA probe for ASPV was synthesized through RT-PCR reaction system, and the characteristics and sensitivity of probe was verified using blot hybridization. Paraffin slice for *in situ* PCR and *in situ* hybridization was made and the location and distribution of ASPV RNA was detected in paraffin slices using inverse transcriptase RNA polymerase reaction (IS-RT-PCR), and the factors affecting experimental results were optimized. 【Result】Positive signals of ASPV were mainly distributed in mesophyll cells of leaves, outside cortex and corresponding primary vascular bundles of shoot tips. Twenty minutes was the suitable digestive time for proteinase K. For the better amplification, the amount in RT reaction system should be above  $0.2 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  for RNasin, above  $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  for dNTPs,  $0.1$  to  $1.3 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  for SuperScript II, and beyond  $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for primer. The suitable annealing temperature in PCR reaction was  $60^\circ\text{C}$ , with 35 times cycles, primer concentration  $0.8$  to  $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , and LA Taq over  $0.5 \text{ U} \cdot 100 \mu\text{l}^{-1}$ . 【Conclusion】Shoot tip within 0.25 mm of pear trees was virus-free area.

**Key words:** Korla pear; Apple stem pitting virus; cDNA probe; Digoxigenin; *In situ* PCR

收稿日期: 2007-12-14; 接受日期: 2008-02-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30360066); 国家科技攻关计划引导项目 (2003BA546C); 兵团科委项目 (NKB02SDXNK01SW)

作者简介: 赵英 (1974—), 女, 山东济南人, 博士研究生, 研究方向为果树与生物技术。通讯作者牛建新 (1962—), 男, 河南漯河人, 教授, 博士, 研究方向为果树与生物技术。Tel: 0993-2096770; E-mail: njx105@163.com



## 0 引言

【研究意义】原位逆转录 PCR 是一种特异、敏感分子生物学—细胞学方法，结合了 PCR 和原位杂交的优点，既可检测出样品中低拷贝的核酸，细胞来源和在细胞中的位置。开展该研究，可通过观察扩增的 cDNA 在组织中的分布，进行病毒感染分析。这样既可为果树病毒检测提供一种新的途径，又可为研究病毒在组织中的生成、分布和转移途径提供帮助，也为果树无毒化生产提供理论依据，因而具有重要的理论价值和生产实践意义。【前人研究进展】RT-PCR 已在苹果茎痘病毒 (*Apple stem pitting virus*, ASPV) 检测中得到应用<sup>[1-12]</sup>。但是该技术需从组织细胞提取核酸，因而无法将扩增的核酸片段进行细胞定位分析。1990 年 Hasse 等<sup>[13]</sup>首次报道了原位 PCR 技术，该技术结合了 PCR 和原位杂交的优点，既可在组织切片、细胞等样品中检测出低拷贝的核酸，又可进行细胞形态学的准确定位，并在人类和动物的各种疾病和基因研究获得了广泛应用<sup>[14-20]</sup>。近年来，在植物方面也有所进展<sup>[21-23]</sup>。牛建新等<sup>[24]</sup>报道了梨组织中苹果褪绿叶斑病毒的原位 RT-PCR 检测，但关于梨树组织中苹果茎痘病毒的原位 RT-PCR 检测尚未见报道。【本研究切入点】研究制作适合原位 PCR 及原位杂交的石蜡切片，利用原位逆转录聚合酶链式反应 (IS-RT-PCR) 技术检测石蜡切片组织中苹果茎痘病毒 RNA 的定位及分布，并对影响试验结果的重要因素进行优化。【拟解决的关键问题】研究制备适合原位 RT-PCR 和原位杂交的石蜡切片以及原位 RT-PCR 优化检测体系，进而确定苹果茎痘病毒在组织中的分布。

## 1 材料与方 法

试验材料取自新疆库尔勒沙依东园艺场香梨园中已通过 RT-PCR 检测确定带苹果茎痘病毒的库尔勒香梨叶片及茎尖为试材。对照采用无病毒的健康香梨茎尖和叶片。

大肠杆菌 XL1-Blue 菌株为石河子大学果树学科生物技术实验室保存菌株。克隆载体 puCm-T vector 购自上海生工生物工程技术有限公司。根据已发表的 ASPV 序列设计合成引物，ASPV 引物 P<sub>1</sub> 同源：ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA；P<sub>2</sub> 互补：TTGG GATCAACTTTACTAAA AAGCATAA。

### 1.1 试剂及酶类

Taq DNA 聚合酶、4 种碱基混合物 (dNTPs)、

M-MLV、RNA 酶抑制剂 (RNasin)，NBT，BCIP 购自上海生工生物工程技术有限公司；AMV Reverse Transcriptase、Tth DNA Polymerase、T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品；SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase 为 Invitrogen 公司产品。鲑精 DNA、聚蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮、牛血清白蛋白、去离子甲酰胺购于华美生物工程公司；LA Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司；多聚赖氨酸为上海普飞产品；蛋白酶 K 为 Merk 公司产品；地高辛-11-dUTP、碱性磷酸酶标记抗地高辛、DNaseI 为 ROCH 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

PCR 仪为 BIO-RAD MY Cyclor Thermal Cyclor 和上海复生公司的 FS-919 型 DNA 自动扩增仪；手摇切片仪；Motic B5 数码显微镜；烘箱；恒温水浴锅。

### 1.2 试验方法

1.2.1 梨组织中总 RNA 的提取 取香梨叶片或皮层组织 0.2 g，液氮中研磨至粉末状，迅速转入 1.5 ml Eppendorf 管，加入 800 μl [50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 140 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 4% SDS, 3% PVP, 15% 无水乙醇, 5% β-巯基乙醇 (现用现加)] 提取缓冲液，振荡混匀后加入 250 μl 水饱和酚和 250 μl 氯仿：异戊醇 (24 : 1) 混匀，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min；取上相加入等体积酚：氯仿：异戊醇 (25 : 24 : 1) 振荡混匀，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min；取上相，加等体积的氯仿：异戊醇振荡混匀 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min；取上相，加入 1/10 体积的 NaAc (3 mol·L<sup>-1</sup>, pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇，-20℃ 放置 2~3 h；4℃ 12 000 r/min 离心 15 min；沉淀用 70% 乙醇洗 2 次，空气干燥 5 min，溶于 20~30 μl TE 或 DEPC 水中。

### 1.2.2 梨树苹果茎痘病毒 RT-PCR 体系

1.2.2.1 cDNA 的合成 在一个预冷的离心管中加入样品总 RNA 11.5 μl，反义引物 [P<sub>2</sub> (20 pmol·L<sup>-1</sup>)] 1 μl，DEPC H<sub>2</sub>O 3.2 μl 轻轻混合均匀，离心 3 s，70℃ 变性 5 min，冰浴 5 min，离心 3 s；依次加入 M-MLV 5× Buffer (Mg<sup>2+</sup> 40 mmol·L<sup>-1</sup>) 5 μl，dNTPs (10 mol·L<sup>-1</sup>) 各 2.5 μl，RNasin (40 U·μl<sup>-1</sup>) 0.8 μl。轻轻混匀，离心 3 s，37℃ 温育 5 min，然后加入 M-MLV 反转录酶 1 μl，反应总体积 25 μl。37℃ 温育 1 h，92℃ 灭活 4 min，立即置于冰上，-20℃ 保存待用。

1.2.2.2 PCR 扩增 以上述合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，20 μl 总体积中 D.D.W 11.4 μl，10× Buffer 2.0 μl，Mg<sup>2+</sup> 1.2 μl，dNTPs 0.4 μl，P<sub>1</sub> 1 μl，P<sub>2</sub> 1 μl，

cDNA 2.5  $\mu\text{l}$ , Taq E 0.5  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 32 次循环: 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  45 s, 最后 1 个循环延伸 10 min。

1.2.3 电泳检测 PCR 仪为 BIO-RAD MY Cycler Thermal Cycler, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 电泳缓冲液用 1 $\times$ TAE, Gold View 染料染色, 电压 120 V, 电泳 20 min, 以华美生产的 PCR Marker 为核酸长度对照。

1.2.4 目的片段克隆及酶切鉴定 本试验 PCR 扩增产物克隆采用常规分子生物学方法, 通过连接、转化和筛选转入大肠杆菌中, 采用碱裂法小量提取质粒, 利用 Pst I 酶切。10  $\mu\text{l}$  反应总体积中提纯质粒 5  $\mu\text{l}$ 、Pst I 限制性内切酶 1  $\mu\text{l}$ 、适宜的反应缓冲液 1  $\mu\text{l}$ 、ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu\text{l}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$  保温 40 min。取适量酶切产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 分析插入片段的大小, 确定克隆是否成功。

1.2.5 地高辛标记的 cDNA 探针制备 以含有目的 DNA 片段的质粒为模板, 通过 PCR 方法合成地高辛标记的 cDNA 探针。标记扩增 50  $\mu\text{l}$  总体积中 10 $\times$ Taq 酶缓冲液 5  $\mu\text{l}$ 、质粒 DNA 2  $\mu\text{l}$ 、引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 各 3  $\mu\text{l}$ 、dNTPs 3  $\mu\text{l}$ 、TaqDNA 聚合酶 1.5  $\mu\text{l}$ 、ddH<sub>2</sub>O 32.5  $\mu\text{l}$ 。

(其中 Dig-11-dUTP: pH 为 7.0) PCR 地高辛标记的混合物是 dATP、dCTP、dTTP、dCTP 的钠盐混合物和 Dig-11-dUTP 锂盐。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s; 60 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 32 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增产物通过凝胶电泳并用 UNIQ-10 Gel Extraction Kit (Sangon) 回收进行纯化。或者用 1/10 体积 4 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  的氯化锂和 3 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$  沉淀 2 h, 然后 70% 乙醇洗涤, 溶于 30  $\mu\text{l}$  TE (pH 8.0)。

探针显色灵敏度的检测: 将探针经一系列稀释, 在硝酸纤维素膜上各点 1  $\mu\text{l}$ 。进行显色反应。

1.2.6 石蜡切片制备 玻片处理: 玻片经洗液浸泡、超声清洗及高温烘烤后, 用多聚赖氨酸处理 5 min, 26 $^{\circ}\text{C}$  过夜。密封保存于室温, 10 d 以内使用; 材料固定: 用解剖针剥取新鲜的香梨茎尖 5 mm 和将叶片剪成小片 (3 mm $\times$ 2 mm)。立即投入 4% 多聚甲醛中, 固定 1 h; 脱水: 用 PBS 冲洗组织两次, 每次 5 min。将组织放入 50%、70%、85%、95%、100% 系列浓度的酒精中各 1 h, 室温进行脱水; 透明: 将材料放入 1 : 1 的纯酒精/二甲苯, 纯二甲苯, 分别 1 h, 进行透明; 浸蜡: 低温渗蜡, 将组织放入有透明剂及碎石蜡的容器中, 盖上盖子放入 38 $^{\circ}\text{C}$  温箱中过夜。高温渗蜡, 将

容器的盖子打开放入 58 $^{\circ}\text{C}$  温箱中, 2 h 换一次纯蜡共 3 次; 包埋: 将融化的石蜡倒入预先叠好的纸盒进行包埋; 切片: 按所需的厚度 (2~16  $\mu\text{m}$  不等) 切片, 制备所需厚度的组织切片带; 展片: 用大培养皿装满 DEPC 水, 使温度加热到 45 $^{\circ}\text{C}$  左右时, 将切下的组织蜡带放入, 待展平后缓慢捞出, 将载玻片侧立在烘箱中 40 $^{\circ}\text{C}$  左右过夜, 取出后装在盒子里放入 -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

1.2.7 组织预处理 脱蜡: 从冰箱中取出切片, 在烘箱中 60 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1~3 h, 以熔化石蜡。将切片浸泡于二甲苯溶液中 5 min, 再转入无水乙醇 5 min, 重复 1~2 次, 完全除去组织中的石蜡后, 室温干燥; 蛋白酶 K 处理: 切片加上 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  蛋白酶 K 溶液 (1 $\times$ PBS 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$  处理切片 15~60 min。用 1 $\times$ PBS 清洗载玻片 5 min, 再用 DEPC 水清洗载玻片 5 min, 室温干燥; DNase I 处理: 0.5 ml Eppendorf 管中加入 DNase I (10 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 4  $\mu\text{l}$ , RNA 酶抑制剂 (40 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$ DNase I 缓冲液 4  $\mu\text{l}$ , 其余用 DEPC 处理过的水补足。混匀加于切片上, 切片放于湿盒, 密封 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜; 用 DEPC 水冲洗切片 10 min 两次, 用 100% 酒精清洗 5 min, 室温干燥。

1.2.8 库尔勒香梨切片中苹茎痘病毒的原位 RT-PCR 检测

1.2.8.1 反转录体系 在 0.2 ml Eppendorf 管中加入总体积 20  $\mu\text{l}$  的 SuperScript II RT 预混液: DEPC H<sub>2</sub>O 9  $\mu\text{l}$ 、5 $\times$ Frist-Strand Buffer (MgCl<sub>2</sub> 15 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 4  $\mu\text{l}$ 、dNTPs (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  each) 2  $\mu\text{l}$ 、RNasin (40 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、Antisense Primer (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、DDT (0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{l}$ 、SuperScript II RT (200 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 。将该混合液加于切片上, 切片放于湿盒, 密封 42 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h。92 $^{\circ}\text{C}$  灭活 1 min。用重蒸水冲洗切片两次 10 min, 室温干燥。

1.2.8.2 原位 PCR 扩增 在 0.2 ml Eppendorf 管中按顺序加入 ddH<sub>2</sub>O 11.5  $\mu\text{l}$ 、10 $\times$ LA PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup>free) 2.5  $\mu\text{l}$ 、dNTP (10 mmol $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ 、引物 P<sub>1</sub> (20 pmol $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 和 P<sub>2</sub> (20 pmol $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 各 1.0  $\mu\text{l}$ 、Dig-11-dUTP (1 nmol $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$ 、LA Taq DNA 多聚酶 (5 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{l}$ 。总体积 25  $\mu\text{l}$ 。载片贴上基因框, 加上反应液, 用配套盖膜封好, 放于 PCR 仪扩增, ASPV 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 35 循环: 94 $^{\circ}\text{C}$  2 min, 60 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  2 min, 最后一个循环延伸 7 min。去掉基因框 94 $^{\circ}\text{C}$  灭活 2 min。用洗液振荡载片 10 min 两次。

1.2.8.3 对照的设置 原位 RT-PCR 检测中以健康梨树、PCR 中省去引物、省去 Taq 酶及省略 RT 骤作为阴性对照。

1.2.8.4 原位杂交 将经变性处理的探针按  $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  加入杂交液 (50% 去离子甲酰胺,  $5\times$  Denhardt's, 0.1% SDS,  $5\times$  SSC,  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸钠 pH 7.0,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  鲑精 DNA)。每个玻片加  $100 \mu\text{l}$ 。放置于湿盒,  $95^\circ\text{C}$ , 5 min, 然后  $42^\circ\text{C}$ , 120 min。用  $2\times$  SSC 室温洗 2 次, 各 10 min。

1.2.8.5 原位 RT-PCR 及原位杂交产物免疫检测 封闭: 每个切片加  $100 \mu\text{l}$  封闭液 ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7.5,  $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 3% BSA), 放于湿盒  $37^\circ\text{C}$  30 min, 用吸水纸放在玻片的边缘, 吸去每块玻片的封闭液; 结合抗体: 每个切片加  $100 \mu\text{l}$  碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体 (在新鲜封闭液中以 1:100 稀释), 湿盒在室温中放置 30 min; 清洗: 将玻片浸泡于清洗液中 ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7.5,  $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl), 室温振荡洗 2 次, 每次 10 min; 显色: 每个切片加  $100 \mu\text{l}$  NBT/BCIP 液, 将切片放于湿盒中静置 60 min 显色。组织形成不溶性蓝紫色的地方就是扩增的位置; 终止: 用蒸馏水清洗切片 5 min 终止显色; 脱水: 用 50%、70%、80%、90%、100% 乙醇脱水, 每级 2 min; 透明: 用二甲苯浸泡 3 min 1 次; 封固: 每块盖玻片加 1 滴中性树脂胶封片剂; 显微镜下观察, 阳性信号为蓝紫色。

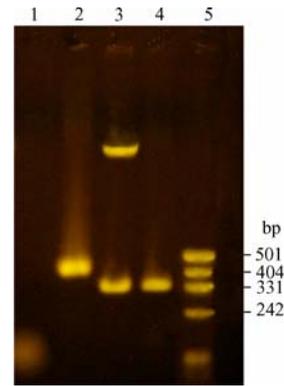
## 2 结果与分析

### 2.1 原位杂交与原位 RT-PCR 的优化

2.1.1 非放射性标记 Dig 探针的鉴定 PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖电泳后, 体系中加入 Dig-11-dUTP 的扩增产物较相应的未标记的扩增产物稍大, 这是由于扩增片段中掺入了 Dig-11-dUTP, 因此分子量较大, 泳动较慢, 亦表明 PCR 地高辛探针标记成功 (图 1)。

2.1.2 探针显色灵敏度的检测 本试验将探针按 50、10、5、0  $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  系列稀释, 进行显色反应。试验结果表明: 显色深浅与探针浓度成正相关, 当探针稀释至 5  $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  仍能显色, 即探针显色灵敏度为 5  $\text{pg}$  (图 2)。

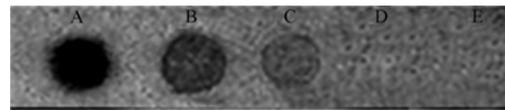
2.1.3 碱性磷酸酶显色系统可靠性检测 将  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  蛋白酶 K  $37^\circ\text{C}$  消化 20 min、DNA 酶  $37^\circ\text{C}$  过夜消化、未加地高辛标记的核苷酸的扩增组织载玻片用 PBS 振荡洗 10 min 2 次, 加上封闭液,  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 再加上碱性磷酸酶标记的抗体室温孵育 60 min, PBS 振荡



1: 阴性对照; 2: ASPV 标记探针 PCR 产物; 3: ASPV 质粒 PCR 对照产物; 4: ASPV PCR 对照产物; 5: M 核酸分子量标准  
1: Negative control; 2: ASPV's Digoxigenin labeled cDNA probe; 3: Amplification product as a control of ASPV plasmid; 4: Amplification product as a control of ASPV; 5: Marker

图 1 用 PCR 标记探针的电泳分析

Fig. 1 Electrophoretogram of ASPV's Digoxigenin labeled cDNA probe by PCR amplification



A:  $50 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; B:  $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; C:  $5 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; D:  $0 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; E: 阴性对照  
A:  $50 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; B:  $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; C:  $5 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; D:  $0 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; E: Negative control

图 2 ASPV 探针显色灵敏度检测

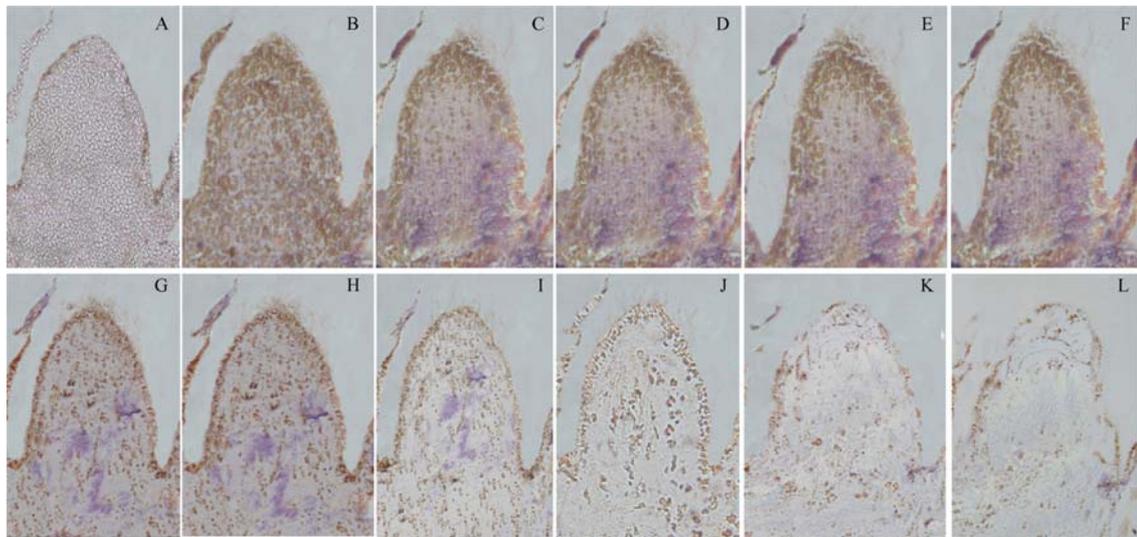
Fig. 2 Detection results of coloured sensitivity of cDNA probes

10 min 2 次, 加上 BCIP 与 NBT,  $37^\circ\text{C}$  孵育 60 min, 然后用蒸馏水冲洗终止显色, 结果为载片上的组织未显示蓝紫色。

2.1.4 茎尖切片厚度对检测效果的影响 通过对不同厚度的茎尖切片进行原位 RT-PCR, 结果发现 (图 3), C~I 组织中分别有蓝紫色出现, 而 A、B 组织未出现蓝紫色, 说明切片太厚 ( $12\sim 14 \mu\text{m}$ ) 会影响检测效果, 不利于病毒分布的观察。

2.1.5 蛋白酶处理时间的影响 蛋白酶处理 10 min 和 15 min 的组织显色后, 表现一片蓝, 说明消化不足; 处理 25 min、30 min 和 40 min 的组织形态模糊, 说明蛋白酶消化过度; 处理 20 min 的则较为适度。

2.1.6 RT 组分浓度对原位 PCR 效果的影响 试验结果表明 (图略), RNasin 的用量小于  $0.2 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  时, 几乎看不到信号。随 RNasin 量的加大, 信号的强度也增



A: 16  $\mu\text{m}$ ; B: 12  $\mu\text{m}$ ; C: 10  $\mu\text{m}$ ; D: 8  $\mu\text{m}$ ; E: 6  $\mu\text{m}$ ; F: 5  $\mu\text{m}$ ; G: 4  $\mu\text{m}$ ; H: 3  $\mu\text{m}$ ; I: 2.5  $\mu\text{m}$ ; J: 2  $\mu\text{m}$ ; K: 1  $\mu\text{m}$ ; L: 0.6  $\mu\text{m}$

图 3 不同厚度的茎尖切片原位 IS-RT-PCR

Fig. 3 IS-RT-PCR results of different thickness paraffin slice samples

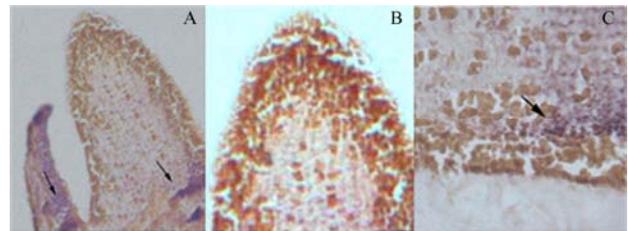
强。当 dNTPs 浓度大于  $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 切片才出现信号。在 SuperScript II  $0.1\sim 1.3 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  浓度范围内, 产物的量随 SuperScript II 浓度提高而增多。引物浓度为  $0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以上时才能进行有效地逆转录, 而  $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以下, 不能合成足量的 cDNA。超过  $1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时容易产生非特异性产物。

**2.1.7 原位扩增中各因素对 PCR 效果的影响** 试验结果表明 (图略), 只有退火温度为  $60^\circ\text{C}$  时, 切片显示出阳性信号, 而其它温度未出现阳性信号。这说明原位扩增 cDNA 合适退火温度为  $60^\circ\text{C}$ 。循环 10~20 均次未出现蓝色信号, 循环 25 次出现较弱的蓝色信号, 30、35 次出现较强的蓝色信号。说明循环次数过低合成不足。引物浓度小于  $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  几乎不显色, 而  $0.8\sim 1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 均显示较深的蓝色。LA Taq 酶浓度在  $0.5 \text{ U}\cdot 100 \mu\text{l}^{-1}$  以上就能满足扩增的要求。当 Dig-11-dUTP 浓度在  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  以下均不表现信号, 而  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  以上, 能显示信号, 且随着 Dig 浓度的加大而加强。

## 2.2 茎尖切片直接原位 RT-PCR 检测结果

茎尖切片经直接 IS-RT-PCR 后, 采用亲和素-碱性磷酸酶显色系统进行免疫检测。在碱性磷酸酶作用下 NBT/BCIP 发生氧化还原反应形成蓝紫色沉淀, 标明扩增的 cDNA 在组织中存在的位置 (图 4)。通过观察测定出现蓝紫色的部位是在茎尖大于  $0.25 \text{ mm}$  的

地方, 表明小于  $0.25 \text{ mm}$  的茎尖分生组织不带苹果茎痘病毒。



A: 病样茎尖全图; B: 病样茎尖图放大; C: 病样茎尖皮层  
A: Complete picture of stem tip's infected sample; B: Zoom out picture of stem tip's infected sample; C: The part of cortex of stem tip's infected sample

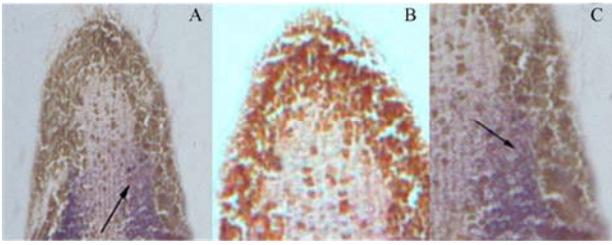
图 4 病样植株茎尖组织直接 IS-RT-PCR

Fig. 4 Direct IS-RT-PCR results of infected samples

对标本做 4 种空白处理对照、用经过检测的无毒苗作阴性对照, 4 种对照在经充分洗涤后, 表现一致, 组织均未出现蓝紫色 (图略)。

## 2.3 茎尖切片间接原位 RT-PCR 检测结果

切片在 PCR 扩增体系中不加 Dig-11-dUTP, 扩增后用 Dig-11-dUTP 标记 cDNA 探针作原位杂交, 杂交后经洗涤和免疫检测, 杂交信号形成蓝紫色沉淀。从图 5 可知, 出现蓝紫色沉淀的地方主要集中在茎尖



A: 病样全图; B: 病样茎尖放大; C: 病样皮层  
A: Complete picture of stem tip's infected sample; B: Zoom out picture of stem tip's infected sample; C: The part of cortex of stem tip's infected sample

图 5 感病植株茎尖组织间接 IS-RT-PCR

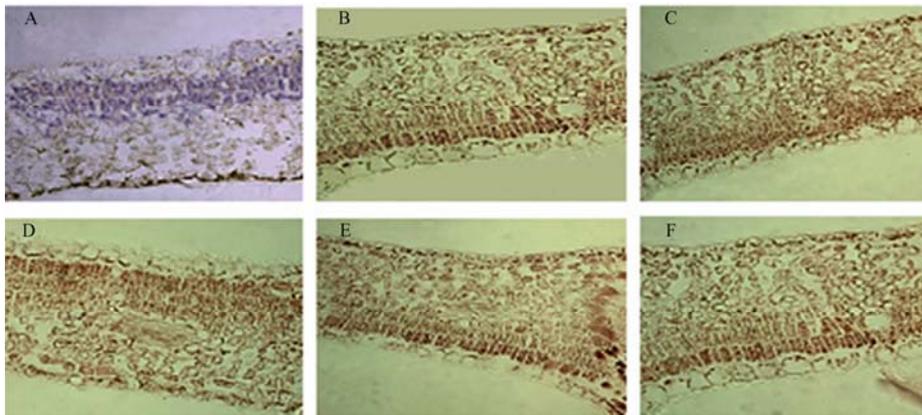
Fig. 5 Indirect IS-RT-PCR results of different infected samples

初生维管束系细胞（初生韧皮部和初生木质部）中，皮层和髓的薄壁细胞中也有少量分布，且蓝紫色沉淀出现在茎尖 0.25 mm 以下的组织中。表明在茎尖 0.25 mm 以下的初生维管束是 ASPV 病毒分布集中地方。

用经过检测的无病毒茎尖作间接原位 RT-PCR 的阴性对照，茎尖切片组织未有蓝紫色沉淀出现（图略）

#### 2.4 梨叶片中 ASPV 在组织中的分布

叶片经 IS-PCR 后，在碱性磷酸酶的作用下，NBT/BCIP 发生氧化还原反应形成蓝紫色沉淀，表明是扩增 cDNA 在组织中存在的位置，设置的五种对照经充分洗涤后，切片均未出现蓝紫色。而阳性材料的组织被染成了蓝紫色，且主要集中在栅栏组织细胞内（图 6）。



A: 为阳性材料; B: 为 PCR 中省去 Taq 酶; C: 为省去逆转录步骤; D: 为 PCR 中省去引物; E: 为健康梨材料; F: 为省去  $Mg^{2+}$   
A: display distinct staining; B: Negative control with DNA polymerase omitted; C: Negative control with reverse transcription step omitted; D: Negative control with primers omitted; E: Known negative sample; F: Negative control with  $Mg^{2+}$

图 6 苹果茎痘病毒在组织中的分布

Fig. 6 Location of ASPV in leaf tissues paraffin slice detected by *in situ* RT-PCR

### 3 讨论

自 Langer 等成功地合成了 DIG-11-dUTP，并将其掺入到 cDNA 分子中用于杂交检测。Leary<sup>[25]</sup>等发展了一项迅速、灵敏的斑点杂交技术，这极大简化了核酸杂交过程。PCR 技术又为 cDNA 探针标记提供了高效简捷的方法，它降低了探针合成成本，在此基础上又发展了更为方便快捷的原位 IS-RT-PCR 检测技术。试验发现适度的蛋白酶处理十分重要，处理过度会使细胞形态结构受到破坏，甚至脱片。处理不足，大量的蛋白-DNA 交联存在，影响靶核酸暴露，PCR 反应难以充分与模板接触，也影响 DNA 酶对基因组 DNA 的

消化。在扩增中 Dig-dUTP 的直接掺入使得免疫检测与显影结合，直接原位 PCR 中循环次数过多会造成假阳性，因此有必要限制 PCR 的循环次数<sup>[26]</sup>，笔者的试验结果表明以 30~35 次循环为宜。

原位扩增结束后，要除去弥散到细胞外的扩增产物，洗涤不充分，则会造成背景过高或出现假阳性结果。反之，洗涤过度，可能将包在细胞内的扩增产物洗脱，而造成阳性信号减弱。原位 PCR 过程中使用的 TaqDNA 聚合酶、引物、和  $Mg^{2+}$  的浓度比常规 PCR 要高，而且反应中的变性、退火和延伸时间则需适当延长<sup>[27]</sup>。

本试验是以病毒 RNA 为模板通过逆转录为 cDNA，

然后进行原位扩增。扩增前均用无 RNA 酶的外切 DNA 酶对切片进行过夜处理, 消化掉了组织中原有基因组 DNA。从而避免了因聚合酶对内源性 DNA 片段的修复而造成的假扩增现象<sup>[28]</sup>。本试验用已知无病毒梨树材料作对照, 进行同样处理。结果无病毒梨树材料均未出现有阳性材料中那种特异性蓝紫色。同时对部分香梨材料在处理过程省去 RT 步骤、PCR 中省去引物、PCR 中省去 Taq 酶作为阴性对照。结果表现与无病毒梨树材料一致。省去 RT 步骤未显示信号, 说明扩增的是 cDNA。本试验发现病毒在茎尖组织中主要集中在分布于外围皮层及维管束, 而在 0.25  $\mu\text{m}$  以下的茎尖分生区不带病毒, 这为茎尖分生区不带病毒提供了直接的实验依据。另外还发现阳性材料的部分叶肉细胞表现出明显的蓝紫色, 而阴性对照组织中均未显现蓝紫色。说明苹果茎痘病毒在叶片中主要分布于叶肉细胞的栅栏组织中。试验还发现在切片的薄厚对扩增的影响很大, 太厚和太薄均不适合原位 RT-PCR, 最好采用 4~6  $\mu\text{m}$  厚度的切片。

## 4 结 论

梨树组织中的苹果茎痘病毒主要位于叶肉细胞的栅栏组织细胞内、茎尖的外围皮层组织及相应的初生维管束, 茎尖顶端分生组织 0.25 mm 的区域为无病毒区域。要获得良好扩增效果, RT 反应体系中 RNasin 的量必须大于 0.2  $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , dNTPs 大于 0.4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , SuperScript II 在 0.1~1.3  $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , 引物浓度大于 0.9  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。PCR 反应体系中适宜的退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ , 循环 35 次, 引物浓度应在 0.6~0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  之间, LA Taq 酶浓度大于 0.5  $\text{U}\cdot 100\ \mu\text{l}^{-1}$ 。

## References

- [1] Kummert J, Marinho V L A, Rufflard G. Sensitive detection of *apple stem grooving* and *apple stem spitting* viruses from infected apple trees by RT-PCR. *Acta Horticulturae*, 1998, 472(2): 97-104.
- [2] Malionwski T, Komorowska B, Gokis T. Detection of *apple stem spitting virus* and *pear vein yellow virus* using reverse transcription-polymerase Chain reaction. *Acta Horticulturae*, 1998, 472(1): 87-95.
- [3] Nechinov L, Hadidi A, Faggioli F. PCR-detection of *apple stem spitting virus* from pome fruit hosts and sequence variability among viral isolates. *Acta Horticulturae*, 1998, 472(2): 63-67.
- [4] Schwarz K, Jelkmann W. Detection and characterization of European *apple stem spitting virus* isolates of apple and pear by PCR and partial sequence analysis. *Acta Horticulturae*, 1998, 472(2): 75-86.
- [5] Kummert J, Vendrame M, Lepoivre P, Steyer S. Development of routine RT-PCR elosa tests for fruit tree certification. *Acta Horticulturae*, 2001, 550(2): 45-52.
- [6] 牛建新, 马兵钢, 何梅, 李海生, 赵英, 李西平, 周多进. 库尔勒香梨主要病毒多重 RT-PCR 检测技术研究. *植物病理学报*, 2006, 36(1): 12-21.  
Niu J X, Ma B G, He M, Li H S, Zhao Y, Li X P, Zhou D J. Multiple RT-PCR detection of viruses in pear. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2006, 36(1): 12-21. (in Chinese)
- [7] 牛建新, 刘连科, 王小兵, 覃伟铭. 库尔勒香梨脉黄病毒 RT-PCR 检测技术研究. *中国农业科学*, 2003, 36(5): 561-566.  
Niu J X, Liu L K, Wang X B, Qin W M. Studies on RT-PCR detection technology of PVYV in Kuala pear. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(5): 561-566. (in Chinese)
- [8] 牛建新, 刘连科, 朱军, 覃伟铭. 以 dsRNA 为模板的梨脉黄病毒 RT-PCR 检测技术研究. *果树学报*, 2003, 20(2): 144-146.  
Niu J X, Liu L K, Zhu J, Qin W M. Study on RT-PCR detection system for Pear vein yellow virus using dsRNA as template. *Journal of Fruit Science*, 2003, 20(2): 144-146. (in Chinese)
- [9] 牛建新, 刘连科. 苹果两种病毒 RT-PCR 检测技术研究. *园艺学进展*(第 5 辑). 广州: 广州人民出版社, 2002: 85-88.  
Niu J X, Liu L K. Study on RT-PCR detection technology of two viruses in apple. *Horticulture Development in China* (Vol. 5). Guangzhou: Guangzhou Renmin Press, 2002: 85-88. (in Chinese)
- [10] Klerks M M, Leone G, Lindner J L, Schoen C D, van den Heuvel J F J M. Rapid and sensitive detection of apple stem pitting virus in apple trees through RNA amplification and probing with fluorescent molecular beacons. *Phytopathology*, 2001, 91(11): 1085-1091.
- [11] Menzel W, Jelkmann W, Maiss E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 2002, 99(1-2): 81-92.
- [12] Menzel W, Zahn V, Maiss E. Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. *Journal of Virological Methods*, 2003, 110(2): 153-157.
- [13] Haase A T, Retzl E F, Staskus K. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87: 4971-4975.
- [14] Gressens P, Martin J R. *In situ* polymerase chain reaction: Localization of HSV2 DNA sequence in infections of the nervous system. *Journal of Virological Methods*, 1994, 46(1): 61.
- [15] Staskus K A, Couch L, Bitterman P, Retzel E F, Zupancic M J, Haase A T. *In situ* amplification of visna virus DNA in tissue sections reveals a reservoir of latently infected cells. *Microbial Pathogenesis*,

- 1991, 11: 67-76.
- [16] Nuovo G J, MacConnell P, Forde B, Delvenne P. Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization after amplification by polymerase chain reaction. *American Journal of Pathology*, 1991, 139(4): 847-854.
- [17] Bagasra O, Hauptman S P, Lischner H W, Sachs M, Pomerantz R J. Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by *in situ* polymerase chain reaction. *England Journal of Medicine*, 1992, 326(21): 1385-1391.
- [18] Cohen N S. Intracellular localization of the mRNAs of argininosuccinate synthase and argininosuccinate lyase around liver mitochondria, visualized by high-resolution *in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1996, 61: 81-96.
- [19] Raymond H Chen, Susan V Fuggle. *In situ* cDNA polymerase chain reaction a novel technique for detecting mRNA expression. *American Journal of Pathology*, 1993, 143: 1527-1533.
- [20] Höfler H, Putz B, Mueller J D, Neubert W, Sutter G, Gais P. *In situ* amplification of measles virus RNA by the self-sustained sequence replication reaction. *Laboratory Investigation*, 1995, 73(4): 577-585.
- [21] Greer C E, Peterson S L, Kiviat N B, Manos M M. PCR Amplifications from paraffin embedded tissues: Effects of fixative and fixation time. *American Journal of Clinical Pathology*, 1991, 95: 117-124.
- [22] Johansen. B. *In situ* PCR on plant material with sub-cellular resolution. *Annals of Botany*, 1997, 80: 697-700.
- [23] Matsuda Y, Toyoda H, Kurita, Ouchi S. *In Situ* PCR technique based on pircking microinjection for cDNA cloning in single cells of barley coleoptile and powdery mildew pathogen. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 612-618.
- [24] 牛建新, 周民生, 马兵钢, 赵 英, 刘 宏. 梨树组织苹果褪绿叶斑病毒的 RT-PCR 检测. 园艺学报, 2007, 34(1): 53-58.  
Niu J X, Zhou M S, Ma B G, Zhao Y, Liu H. Detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* in pear by *in situ* RT-PCR. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(1): 53-58. (in Chinese)
- [25] O'Leary J J, Browne G, Landers R J, Crowley M, Healy I B, Street J T, Pollock A M, Murphy J, Johnson M I, Lewis F A, Mohamadee O, Cullinane C, Doyle C T. The importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution-phase polymerase chain reaction and PCR *in situ* hybridization. *Histochemical Journal*, 1994, 26: 337-346.
- [26] Komminoth P. *In situ* polymerase chain reaction: past, present, future. *Nature*, 1997, 362, 359-362.
- [27] Komminoth P, Long A A, Ray R, Wolfe H J. *In situ* polymerase chain reaction detection of viral DNA, single copy genes and gene rearrangements in cell suspensions and cytopins. *Diagnostic Molecular Pathology*, 1992, 1(2): 85-97.
- [28] Long A A, Komminoth P, Lee E, Wolfe H. Comparison of indirect and direct *In situ* polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. *Histochemistry*, 1993, 99(2): 151-162.

(责任编辑 毕京翠)