

库尔勒香梨脉黄病毒 RT-PCR 检测技术研究

牛建新, 刘连科, 王小兵, 覃伟铭

(石河子大学新疆作物高产研究中心, 石河子 832003)

摘要: 以库尔勒香梨叶片和皮层为材料, 对总 RNA 提取方法进行了研究, 从中筛选出了适合库尔勒香梨总 RNA 的提取方法。结果表明, 要获得良好的 RT-PCR 扩增, RT 体系中 dNTPs 浓度、互补引物、AMV、模板的浓度要分别达到 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.05 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 、 $0.01 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 以上。此外, 使用 RNasin 能有效抑制 RT 体系中 RNase 对病毒 RNA 的降解作用, 可使 RT 过程顺利进行; PCR 体系中 dNTPs 浓度至少要达到 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.2 \sim 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以获得最佳的扩增效果; Taq E 浓度要达到 $0.015 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 以上; 引物浓度适宜范围 $0.3 \sim 0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Mg^{2+} 要达到 $1.26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上。

关键词: 库尔勒香梨; 梨脉黄病毒; RT-PCR

Studies on RT-PCR Detection Technology of Viral Diseases in Kuala Pear

NIU Jian-xin, LIU Lian-ke, WANG Xiao-bing, QIN Wei-ming

(Research Centre of Xinjiang High-yield Crops, Shihezi University, Shihezi 832003)

Abstract: Using Kuala pear leaves and cortexes as materials, total RNA was extracted using three methods, and these methods were studied. The fittest methods for Kuala pear were screened out. Because pear tissues are abundant in amylase and hydroxybenzene, these methods were modified in order to obtain high quality products. Based on the effective RT-PCR detection system of two viruses, the concentration of RT reaction ingredients dNTPs, primer, AMV, template and RNasin were optimized. The concentration of RCR reaction ingredients dNTPs, primer, Mg^{2+} ; Taq E and cDNA were also optimized. Influences of denaturalization temperature, and RT time on PCR were studied. Results indicated that concentration of dNTPs, primer, AMV, template should not lower than $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.05 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $0.01 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ in RT system. RNasin restrained the action of RNase, insured the process of RT go on wheels. Denaturalization temperature, time of dsRNA should be at 95°C for $3 \sim 5 \text{ min}$. RT time should no less than 40 min ; Concentration of dNTPs and primer should be $0.2 \sim 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.3 \sim 0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in PCR system, respectively. The proper concentration of Mg^{2+} should be more than $1.26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: Kuala pear; Pear vein yellow virus (PVYV); RT-PCR

我国北方梨产区主栽品种普遍带有病毒, 平均带毒率达 86.3%, 其中梨脉黄病毒(PVYV)为 61.8% 感染率最高^[1]。据报道, PVYV 与苹果茎痘病毒(ASPV)为同一种病毒^[1, 2]。植物病毒的检测方法有生物学检测(指示植物法)、血清学检测和分子生物学检测。生物学检测是传统的、经典的检

测方法, 准确可靠, 但耗时长; 血清学检测主要是用各种酶联免疫吸附方法检测(ELISA), 目前已经制备出包括 ASPV 在内的 16 种果树病毒的抗血清, 但抗血清的制备很困难, 因此价格昂贵。另外, ELISA 只是检测病毒的外壳蛋白, 其遗传信息量只占整个病毒遗传信息的 5% ~ 10%, 无法区分 CP 基因有一

定同源性的病毒^[3]。因此,为满足果树苗木检疫和无毒化生产的需要,摸索一种准确、灵敏、快速、简便的检测方法十分必要。近年来聚合酶链式反应(PCR)技术的发明和应用,为果树病毒的检测提供了新的有力工具,使果树病毒的检测提高到了一个新水平。国外已有用 PCR 检测 ASPV 和 PVYV 的报道^[3~9],但国内尚未见用 PCR 检测 PVYV 的报道。

1 材料与方法

1.1 供试材料

分别于 2000 年 12 月和 2001 年 11 月采集香梨枝条催芽,于 2001 年 3 月、5 月、9 月采集香梨叶片和嫩枝,以叶片和皮层为试验材料。采集地点为库尔勒 28 团、29 团、沙依东园艺场。以无病毒实生苗为对照。苹果材料采自于石河子大学农学院园艺园林工程系实验站。

1.2 供试试剂

1.2.1 总 RNA 提取缓冲液 方法 1(CTAB 法): 0.1 mmol·L⁻¹ 甘氨酸-NaOH pH 9.0, 50 mmol·L⁻¹ NaCl, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 2% SDS, 2% PVP, 1% SLS 2-巯基乙醇(现用现加)。方法 2(SDS 法): 参考侯义龙的方法^[10],有改动(不使用 RNasin)。50 mmol·L⁻¹ TrisCl pH 8.0, 140 mmol·L⁻¹ NaCl, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 1% SDS, 2% PVP, 2% 2-巯基乙醇(现用现加)。方法 3(热酚法): 参考张振臣的方法^[11]。20 mmol·L⁻¹ (NH₄)₂CO₃ pH 9.0, 140 mmol·L⁻¹ NaCl, 2 mmol·L⁻¹ EDTA, 2% SDS, 2% PVP, 2% 2-巯基乙醇(现用现加);其它常规试剂均为国产分析纯。λDNA/Hind III Markers、PCR Markers 购于华美生物工程公司。

1.2.2 RT-PCR 试剂及主要仪器 逆转录酶 AMV (附 5 × Buffer, 250 mmol·L⁻¹ TrisCl pH 8.3), 375 mmol·L⁻¹ KCl, 40 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 50 mmol·L⁻¹ DDT) 购于大连宝生物工程公司和 Promerge 公司; Taq DNA 多聚酶(附 10 × Buffer, 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂, dNTPs 2.5 mmol·L⁻¹) 购于华美生物工程公司。

PVYV 与 ASPV 是同一种病毒^[1,2,12],根据已发表的 ASPV 序列^[4,9]设计合成引物, P1(互补引物 23 bp) 5'-TGCCTCAAAGTACACCCCTCAG-3'、P2(同源引物 19 bp) 5'-CGCCAAGAAATGC-CACAGC-3',由华美生物工程公司合成。PVYV 两引物间序列长 316 bp。

1.3 试验方法

1.3.1 总 RNA 提取方法 方法 1(CTAB 法)(1)称取叶片或皮层组织 200 mg,液氮中研磨至粉末状,迅速转入 1.5 ml Eppendorf 管,加入 600 μl 抽提缓冲液,振荡混匀,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min;(2)取上相加入等体积水饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),振荡混匀,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min;(3)取上相,用 5 mol·L⁻¹ NaCl 调整盐离子浓度到 0.7 mol·L⁻¹,加入 1/10 体积 10% CTAB,混匀,再加入 2 倍体积氯仿:异戊醇(24:1),4℃ 12 000 r/min 离心 10 min;(4)取上相,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),振荡混匀,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,重复 1~2 次,以蛋白层不出现为止;(5)取上相,加入 0.6 倍体积异丙醇,-20℃ 放置 2h;(6)4℃ 12 000 r/min 离心 20 min,沉淀用 70% 乙醇洗 2 次,空气干燥 5 min,溶于 40 μl TE。方法 2(SDS 法): 采用侯义龙^[10]和 Lewinsohn E 等^[12]的方法进行改进。(1)和(2)步同方法 1;(3)取上相,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),振荡混匀,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,重复 1~2 次,以蛋白层不出现为止;(4)取上相,加 2.5 倍体积的无水乙醇、1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc(pH 5.3),-20℃ 放置 3 h;(5)同方法 1 的(6)。方法 3(热酚法):参考张振臣的方法^[11]提取缓冲液成分略有改动,缓冲液成分见供试试剂。

1.3.2 总 RNA 的纯化 用 Tesniere 等^[13]的方法。以香梨、苹果皮层或苹果叶片为材料时,有时需对提取的总 RNA 进行纯化。在总 RNA 溶液中加入无水乙醇至浓度 30%,4℃ 放置 0.5 h,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取液相,进行核酸沉淀。

1.3.3 总 RNA 含量、纯度和完整性检测 用 UV-8500 紫外可见分光光度计分析含量和纯度。用 0.7% 琼脂糖凝胶(EB 0.5 μg·ml⁻¹)电泳分析 RNA 完整性(上样量 3 μl)。电压 5V·cm⁻¹,电泳至谱带完全分开为止,紫外灯观察电泳结果,并照相记录。

1.3.4 PVYV 有效 RT-PCR 体系的建立 cDNA 合成和 PCR 扩增:参考已发表的方法^[9,14]。PVYV 扩增程序:94℃ 预变性 3 min;94℃ 30s,68℃ 45s,72℃ 105s,循环 35 次,最后一个循环延伸 7 min。PCR 仪为美国 GeneAmp® PCR System 2400;PVYV RT 体系的优化:对 RT 时间、RT 主要成分 dNTPs、互补引物 P1、RNasin、AMV、模板总 RNA 浓度各设 6 个不同处理。阴性对照采用建立起来的有效体系中相应浓度。对 PCR 主要反应成分

dNTPs、 Mg^{2+} 、引物 P1、P2、Taq DNA 多聚酶各设 6 个不同处理。阴性对照采用建立起来的有效体系中相应浓度。 $0.5 \times TBE$ 电泳缓冲液,1.2% 琼脂糖凝胶 (EB $0.5 \mu g \cdot ml^{-1}$)。上样量 $2 \mu l$,以华美产 PCR Markers 为核酸分子量标准。 $5V \cdot cm^{-1}$ 稳压电泳至谱带完全分开,紫外灯观察电泳结果,并照相记录。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的纯度和浓度

本试验所采用的 3 种方法提取的总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值都达到了 1.94 以上(表),说明提

取的总 RNA 没有杂蛋白、多糖和酚类等污染物的干扰,达到了很高的纯度。方法 3 提取的总 RNA 纯度最高。方法 1、方法 2 从香梨叶片中、方法 3 从香梨叶片和皮层中提取的总 RNA 完整性较好。方法 1、方法 2 从香梨皮层中提取的总 RNA 完整性较差。方法 2 从香梨皮层中提取的总 RNA 的 RT 活性相对较弱。综合考虑认为提取总 RNA,以叶片为材料时可采用方法 1、方法 2、方法 3,但从方法 3 最好,以皮层为材料时宜采用方法 3。春夏季节的材料比秋季的材料效果好。本试验中提取产物 RNA 浓度取 $0.5 \mu g \cdot \mu l^{-1}$ 。

表 3 种方法提取的梨、苹果细胞总 RNA 的纯度和浓度¹⁾

Table The quality and the concentration of total RNA

材料 Materials	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀			浓度 Concentration($\mu g \cdot \mu l^{-1}$)		
	方法 1 Method 1	方法 2 Method 2	方法 3 Method 3	方法 1 Method 1	方法 2 Method 2	方法 3 Method 3
梨叶片 Pear leaf	2.02	1.96	2.09	0.57	0.63	0.54
梨皮层 Pear phloem	2.01	1.99	2.03	0.51	0.50	0.50
苹果叶片 Apple leaf	1.99	2.00	2.05	0.58	0.61	0.50
苹果皮层 Apple phloem	1.95	1.94	2.02	0.54	0.58	0.55

¹⁾ 数值为平均值 Values are means

2.2 总 RNA 的完整性

本试验采用琼脂糖凝胶电泳。多次试验结果表明(图 1),方法 1、方法 2 从香梨叶片中,方法 3 从香

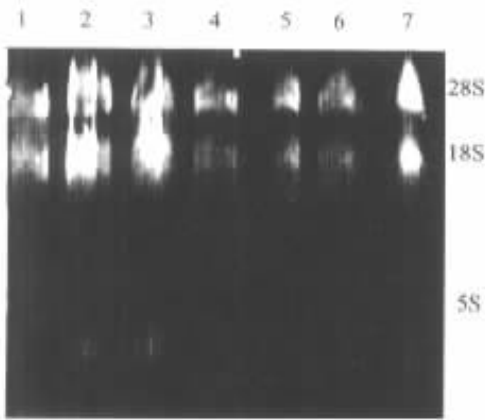
梨叶片和皮层中提取的总 RNA 完整性较好,电泳时出现清晰的 28S、18S 和 5S 谱带,表明提取的总 RNA 没有发生严重的降解。方法 1、方法 2 从香梨皮层中提取的总 RNA 完整性稍差。

2.3 总 RNA RT-PCR 活性检验

本试验对方法 1、2 提取的梨总 RNA 和方法 3 提取的苹果总 RNA 进行了 RT-PCR 检验(图 2)。结果都得到了特异片段,说明均具有较强的 RT 活性,可作为 PVYV RT-PCR 优化体系建立的病毒 RNA 模板,但方法 2 从香梨皮层中提取的总 RNA 的 RT 活性相对较弱。

2.4 PVYV 总 RNA RT-PCR 有效体系

PVYV RT 体系: $20 \mu l$ 体系中总 RNA 约 $0.05 \mu g \cdot \mu l^{-1}$ 、 $5 \times Buffer$ ($Mg^{2+} 40 mmol \cdot L^{-1}$) $4 \mu l$ 、dNTPs $1 mmol \cdot L^{-1}$ 、互补引物 P1 $0.3 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、RNasin $2.5 U \cdot \mu l^{-1}$ 、AMV $0.125 U \cdot \mu l^{-1}$;PVYV RT 反应程序: $42^\circ C$ 温浴 1 h、 $95^\circ C$ 酶灭活 3 min,立即置于冰上 $4^\circ C$ 保存待用。PVYV PCR 体系: $25 \mu l$ 体系中 $10 \times Buffer 2.5 \mu l$ 、dNTPs $0.3 mmol \cdot L^{-1}$ 、 $Mg^{2+} 1.66 mmol \cdot L^{-1}$ 、引物 P1、P2 $0.3 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、cDNA $3 \mu l$ 、Taq E $0.03 U \cdot \mu l^{-1}$;PVYV PCR 反应程序: $94^\circ C$ 预变性 3 min; $94^\circ C 45s$ 、 $68^\circ C 1 min$ 、 $72^\circ C 2 min$,循环 35 次,最后一个循环延伸 7 min。经多次



1. 香梨叶片(方法 1);2. 香梨皮层(方法 1);3. 苹果皮层(方法 3);4. 香梨叶片(方法 3);5. 香梨叶片(方法 3);6. 香梨叶片(方法 2);7. 香梨皮层(方法 2)

1. The total RNA of Kuala pear leaf(method 1);2. The total RNA of Kuala pear phloem (method 1);3. The total RNA of apple phloem (method 3);4. The total RNA of Kuala pear leaf(method 3);5. The total RNA of Kuala pear leaf(method 3);6. The total RNA of Kuala pear leaf(method 2);7. The total RNA of Kuala pear phloem(method 2)

图 1 香梨、苹果组织总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of total RNA of Kuala pear and apple

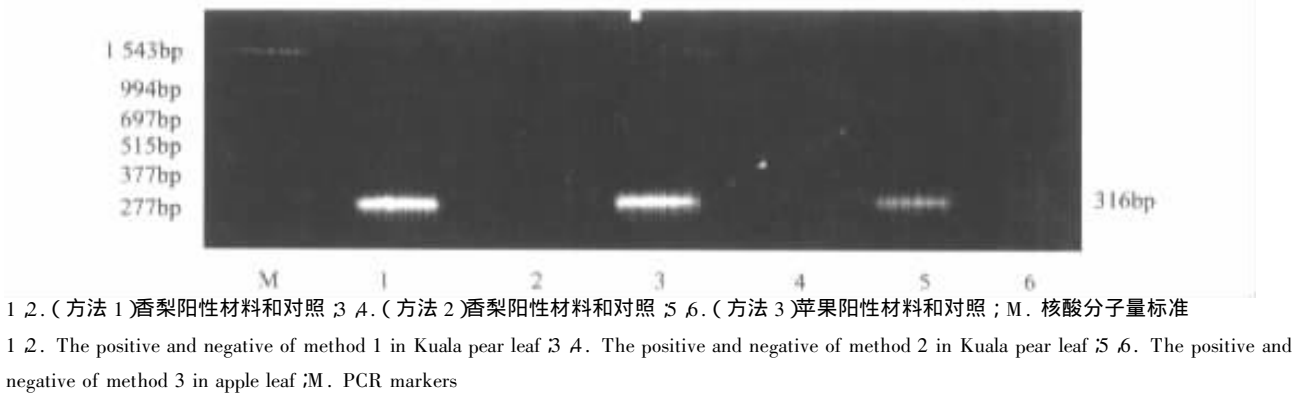


图 2 香梨、苹果叶片不同总 RNA 提取方法的 RT-PCR 产物凝胶电泳

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of total RNA RT-PCR products of the different total RNA extraction methods of Kuala pear and apple leaf

试验表明用该体系能成功进行 PVYV RT-PCR 扩增。

2.5 PVYV RT-PCR 体系的优化

2.5.1 RT 成分浓度对 PVYV RT 的影响

在 PVYV RT-PCR 有效体系的基础上,分别对 AMV 浓度、dNTPs 浓度、互补引物 P1 浓度、RNasin 浓度、病毒模板浓度设置了梯度处理。结果表明,AMV 浓度从 $0.050 \sim 0.175 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 均能进行正常的 RT, 在此范围内随着 AMV 浓度的增高,cDNA 产量增加。从既降低成本又保证 cDNA 产量考虑,AMV 最佳浓度为 $0.05 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 。dNTPs 浓度 $0.3 \sim 1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 均能进行有效的 RT, 在此范围内随着浓度的增加,cDNA 产量也随之增加。dNTPs 浓度低于 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不能产生足够量的 cDNA,最佳浓度为 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。互补引物 P1 浓度 $0.2 \sim 1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时均能进行有效的 RT, 在此范围内随着浓度的增加,PCR 扩增时非特异性增强,最佳浓度为 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。RNasin 浓度 $0.5 \text{ U} \sim 3.0 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 时均能进行有效的 RT, RNasin 浓度 $1.5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 时扩增产量明显增加,说明加入 RNasin 可降低 RNase 对 RNA 的降解作用,具有保护 RNA 的作用。最佳浓度为 $1.5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 。病毒模板浓度在 $0.005 \sim 0.05 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 时,RT-PCR 都能检测到病毒模板的存在,很低的病毒模板浓度也能进行有效的 RT-PCR 扩增,说明 RT-PCR 检测病毒具有很高的灵敏度,最佳浓度为 $0.01 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 。为了缩短检测时间对 RT 时间做了梯度试验,结果表明,RT 时间 $50 \sim 120 \text{ min}$ 均能产生足够的 cDNA,最佳时间为 60 min ,RT 时间低于 40 min 时不能产生足够量的 cDNA。

2.5.2 PVYV PCR 体系各反应成分的浓度对 PCR 扩增的影响

分别对 Taq DNA 聚合酶、dNTPs 浓度、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度设置了梯度试验,结果表明,Taq DNA 聚合酶浓度 $0.020 \sim 0.030 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 时扩增效果良好,浓度 $0.015 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 时扩增产物量很少,谱带很弱,浓度 $0.005 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 时扩增产物量极少,几乎看不到扩增谱带。浓度大于 $0.04 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 时,非特异性扩增明显,最佳浓度为 $0.020 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 。dNTPs 浓度 $0.1 \sim 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增效果良好,dNTPs 浓度低至 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增产物极少,谱带极弱,dNTPs 浓度达 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时非特异性扩增产物明显增加,最佳浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。可见 dNTPs 浓度不宜低于 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,也不宜高于 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。引物浓度 $0.3 \sim 0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增效果均良好,浓度 $0.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时产生非特异性扩增,最佳浓度为 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5.3 PVYV RT-PCR 优化体系

根据试验结果,RT 体系中 dNTPs、互补引物、AMV、模板的浓度要分别达到 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.05 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 、 $0.01 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 以上;PCR 体系中 dNTPs 至少要达到 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,在 $0.2 \sim 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间可以获得最好的扩增效果;Taq E 要达到 $0.015 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 以上;引物浓度不宜低于 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,但不宜高于 $0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Mg^{2+} 要达到 $1.26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上。RT 优化体系为 $5 \times \text{Buffer } 4 \mu\text{l}$ ($\text{Mg}^{2+} 40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、dNTPs $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、RNasin $1.5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 、引物 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、AMV $0.05 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 、总 RNA 约 $0.01 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$,总体积 $20 \mu\text{L}$;RT 反应程序: 42°C 温育 60 min , 95°C 酶灭活 3 min ,立即置于冰桶 4°C 保存待用;PCR 优化体系: $10 \times \text{Buffer } 2.5 \mu\text{l}$, dNTPs

0.2 mmol·L⁻¹、Mg²⁺ 1.26 mmol·L⁻¹、引物 0.3 μmol·L⁻¹、cDNA 3 μL、Taq DNA 聚合酶 0.02 U·μl⁻¹、总体积 25 μl；PCR 反应程序：94℃ 预变性 3 min、94℃ 45s、68℃ 1 min、72℃ 2 min，循环 30 次，最后一个循环延伸 7 min。该优化体系得到了充分的实验验证。

3 讨论

3.1 RT 体系的建立和优化

RT 过程中合成的 cDNA 是 PCR 扩增的模板，有效的 RT 体系是 PCR 扩增的基础。因此，本研究对 RT 体系进行了详细研究。结果表明，RT 体系中 dNTPs 浓度、互补引物、AMV、模板的浓度要分别达到 0.1 mmol·L⁻¹、0.2 μmol·L⁻¹、0.05 U·μl⁻¹、0.01 μg·μl⁻¹ 以上，与侯义龙^[10]的结果相近。

3.2 PCR 体系的建立和优化

PCR 体系中 Mg²⁺ 会影响反应的效率，主要表现在 Mg²⁺ 影响 Taq E 的活性、引物的退火以及模板和产物的变性。另外 Mg²⁺ 还会与 dNTPs 等比例结合，降低了两者的有效浓度。萨姆布鲁克等^[15]认为 Mg²⁺ 的最佳浓度为 1.5 ~ 2.0 mmol·L⁻¹，同时又指出这种浓度并非对任何一种模板与引物组合都是最佳的。结果表明，Mg²⁺ 浓度在 1.06 ~ 1.86 mmol·L⁻¹ 之间可以获得良好的扩增效果，与侯义龙^[10]的结果相近。dNTPs 是 PCR 扩增的底物，直接影响扩增产量的高低。dNTPs 浓度过低会导致反应速率下降，产物减少；浓度过高时，会因与 Taq E 竞争 Mg²⁺ 而使其活性发挥受到影响，同时会使碱基的错误掺入率大大增加^[16]。本研究结果表明，dNTPs 浓度在 0.1 ~ 0.3 mmol·L⁻¹ 之间均可获得良好的扩增效果，这一结果与侯义龙^[10]、苏慧慈^[16]报道的结果相近。

萨姆布鲁克等^[15]、卢圣栋^[17]、苏慧慈^[16]认为，PCR 体系中引物浓度通常为 0.1 ~ 1.0 μmol·L⁻¹，更高浓度的引物可能导致异位引导，出现非靶序列扩增。本试验的结果表明，0.15 ~ 0.7 μmol·L⁻¹ 范围内扩增效果良好，低于 0.15 μmol·L⁻¹ 产物量明显降低，高于 0.7 μmol·L⁻¹ 产生非特异性扩增，与前人的结果一致。

Taq E 是 PCR 反应体系中的关键因子之一，酶量不足，PCR 产物量就会降低，酶量过多，往往导致非特异性扩增。本试验结果表明，25 μl 体系中 Taq E 浓度 0.02 ~ 0.03 U·μl⁻¹ 均可获得良好的扩增效果，这与萨姆布鲁克等^[15]的结果相似。从降低成本

的角度考虑，可采用 0.02 U·μl⁻¹。

3.3 RT-PCR 技术的应用和推广

随着 PCR 技术的完善和相关试剂、耗材价格的下降，用 PCR 技术进行疾病诊断的费用将仍会降低，而市场会日益扩大。结合世界果树病毒病的危害日益严重和果树无病毒化生产的趋势，笔者认为在果树病毒检测方面 PCR 技术有巨大市场。利用 RT-PCR 优化体系，检测果树病毒每次的费用（只计消耗品）约为 10 元，应用多重 RT-PCR 体系费用将会更低。从这两方面来看，RT-PCR 技术具有很好的推广前景。

References

- [1] 王国平, 洪 霓, 张尊平. 我国北方梨产区主栽品种病毒种类的鉴定研究. 中国果树, 1994, 5(2): 1-4.
Wang G P, Hong N, Zhang Z P. Identification of kinds of viruses for main pear cultivars in pear growing areas in northern China. *China Fruits*, 1994, 5(2): 1-4. (in Chinese)
- [2] 邓晓云, 王国平. 梨病毒病研究新进展. 果树学报, 2002, 19(5): 321-325.
Deng X Y, Wang G P. Advances in research on pear viruses. *Journal of Fruit Science*, 2002, 19(5): 321-325. (in Chinese)
- [3] Jelkmann W, KeimKonrad R. An immuno-capture polymerase China reaction and plate-trapped ELISA for the detection of apple stem spitting virus. *Phytopathology*, 1997, 145: 499-504.
- [4] Witchelm Jelkmanm. Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellow disease and their relationship with Protex-and Carlariruses. *Journal of General Biology*, 1994, 75: 1532-1542.
- [5] MacKenzie D J, Mclean M A. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 1997, 80(2): 222-225.
- [6] 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: 97-104.
- [7] 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: 87-95.
- [8] Nechinov L, Hadidi A, Faggioli F. PCR-detection of apple stem spitting virus from pome fruit hosts and sequence variability among viral isolates. *Acta Horticultnurae*. 1998, 472: 63-67.
- [9] 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: 75-86.

- [10] 侯义龙. 果树主要病毒 RT-PCR 检测体系建立、优化及病毒特异 DNA 片段克隆测序研究. 沈阳 沈阳农业大学博士学位论文 2000 : 11 - 13.
Hou Y L. *Study on the Establishment and Optimization of RT-PCR Detection Systems of the Main Viruses in Fruit Trees and the Cloning and Sequencing of RT-PCR Products*. Shenyang :Shenyang Agricultural University , Ph D Dissertation. 2000 :11 - 13. (in Chinese)
- [11] 张振臣. 黄瓜花叶病毒运动蛋白基因介导的抗病行研究. 北京 :中国农业大学博士学位论文 ,1997.
Zhang Z C . *Study on Resistance Mediated CMV MP Gene*. Beijing :China Agricultural University , Ph D Dissertation. 1997. (in Chinese)
- [12] Lewinsohn E , Steelecl , Croteauk . Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. *Plant Molecular Biology Reporter* , 1994 , 12 : 20 - 25 .
- [13] Tesniere C , Vayda M E . Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contamination tannins or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter* , 1991 , 9 : 242 - 251 .
- [14] Kummert J , Marinho VLA , Rufflard G . Sensitive detection of apple stem grooving and apple stem pitting viruses from infected apple trees by RT-PCR. *Acta Horticulturae* , 1998 , 472 : 97 - 104 .
- [15] 金冬雁 黎孟枫译. 分子克隆实验指南. 北京 :科学出版社 , 1998.
Jin D Y , Li M F. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Beijing :Science Press , 1998. (in Chinese)
- [16] 苏慧慈 刘彦仿. 原位 PCR. 北京 :科学出版社 , 1995.
Su H C , Liu Y F. *In Situ PCR*. Beijing : Science Press , 1995 . (in Chinese)
- [17] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京 :高等教育出版社 . 1993.
Lu S D. *Current Protocols for Molecular Biology*. Beijing : Higher Education Press , 1993. (in Chinese)

(责任编辑 卞海军)