

# 用 Eppendorf 的 cMaster RT<sub>plus</sub> PCR 系统 分析番茄点状枯萎病毒的外壳蛋白编码序列

## 前言

番茄点状枯萎病毒 (TSWV) 是 Bunyaviridae 家族 (Moyer, 1999) 的 Tospovirus 属的典型成员, TSWV 具有很强的适应性, 宿主范围超过 900 个植物品种, 从单子叶植物、双子叶植物, 到十字花科植物, 是世界上影响最大的植物病源之一。TSWV 有三个 ssRNA 基因组, 长片段 (L) 约 9 kb, 编码一个 RNA 依赖的 RNA 聚合酶; 中等长度片段 (M), 约 4.8 kb, 编码 NSm 蛋白和 G1/G2 前体糖蛋白; 小片段 (S) 约 3 kb, 编码 NSs 非结构蛋白和外壳蛋白 N (如图 1)。N 蛋白包装病毒 RNA, 在病毒外壳内部, 是以能抵抗抗血清识别的前体方式存在, 在复制复合物中, 以及在 Bunyavirus 中, 已经证明 N 蛋白可以控制从转录到翻译的开关。在此, 我们第一次用 Eppendorf 的 cMaster RT<sub>plus</sub> PCR 系统, 用一步法反转录 PCR (RT-PCR) 方法, 从 14 个宿主和地域差别很大的病毒分离株中, 扩增 TSWV 的 N 基因。所有的 Eppendorf cMaster RT<sub>plus</sub> PCR 系统表现良好, 从少量的目标样品得到特异性的大量扩增, 而且, 一步法 RT-PCR 反应节省时间, 适合于多个病毒株和病毒基因的扩增。

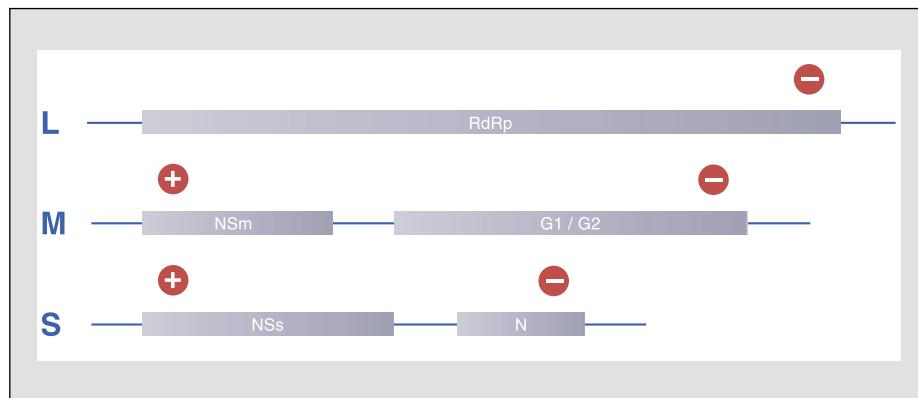


图 1

TSWV 有三个 ssRNA 基因组, 长片段 (L) 约 9 kb, 其反义序列编码一个 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (-), 中等长度片段 (M), 约 4.8 kb, 编码 NSm 蛋白 (+) 和 G1/G2 前体糖蛋白 (-), 小片段 (S) 约 3 kb, 编码 NSs 非结构蛋白 (+) 和外壳蛋白 N(-)。M 与 S 均为双意义链, 相反意义链的 ORF 位于同一基因片段上。

● 表 1: 分离株的来源与宿主

RNA	分离株来源	宿主
RT-PCR Control	<i>In vitro</i> transcript	Dahlia
0317703	CA (Gilroy)	Pepper
0317702	CA (San Luis Rey)	Aster
0215703	NC (Sampson County)	Pepper
0215803	NC (Wayne County)	Pepper
0214402	NC (Pender County)	Tobacco
0214401	NC (Jones County)	Tobacco
0217902	NC (Haywood County)	Tobacco
0213501	NC (Moore County)	Tomato
0213502	NC (Lee County)	Tomato
0213702	NC (Lincoln County)	Tomato
0213703	NC (Duplin County)	Tomato
0213701	NC (Dare County)	Tomato
0213601	NC (Pamlico County)	Potato
0214103	NC (Pamlico County)	Potato

## 材料与方法

### ● 病毒分离与宿主植物

本次研究所用的 14 个病毒分离株来自加利弗尼亚 ( CA ), 北卡罗来纳 ( NC ), 它们是从野生环境中大量的宿主植物中分离得到, 在 2002-2003 年期间, 这些分离株的信息如表 1 示。

### ● RNA 抽提和 RT - PCR

用标准的商业 RNA 抽提试剂, 从感染有 TSWV 的野生型植物叶片中抽提植物总 RNA, 作为 RT - PCR 的模板。根据在 Genbank 上已发表的 TSWV 序列设计引物, 扩增 sRNA 的 N 基因的一个长度为 777 nt 的片段 ( Qiu, Geske 等 1998 ), RT - PCR 反应总体积为 50  $\mu$ l, 含 Eppendorf cMaster RT<sub>plus</sub> PCR 缓冲液, 它可以自行调节 Mg 离子浓度, dNTP mix、cMaster RT 酶、引物、RNase 抑制溶液, 病毒正义和反义引物及 cMaster PCR 酶 mix。10  $\mu$ l RNA 代表大约 2  $\mu$ g 总 RNA 模板, 加入反应体系 ( 表 2 ), 进行 40 个循环 ( 表 2 )。对照反应, 如表 2 示, 用克隆的 TSWV 序列, 作体外转录, 扩增 20 个循环, 体外转录用 Riboprobe<sup>®</sup>结合系统 – SP6/T7 ( Promega, Madison, WI ) 进行, 使用方法按照试剂盒生产商提供的程序操作。

● 表 2: 一步法 RT - PCR

制 备		
组分	体积	最终浓度
dNTP mix (each 10 mM)	1.0 $\mu$ l	200 $\mu$ M
Forward primer (20 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
Reverse primer (20 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
RT <sub>plus</sub> PCR buffer with 25 mM Mg <sup>2+</sup>	5.0 $\mu$ l	1x
RNase inhibitor (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l
cMaster RT enzyme (15 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	0.15 U/ $\mu$ l
cMaster PCR enzyme mix (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	0.05 U/ $\mu$ l
RNase-free water	30.5 $\mu$ l	
Template (viral RNA)	10.0 $\mu$ l*	
总体积	50.0 $\mu$ l	

\*For the control (*in vitro* transcript) only 1.0  $\mu$ l was used, adjusting adequately the volume of water.

### 一步法 RT-PCR 参数设定

步骤	温度	时间
cDNA synthesis	50 °C	50 min
Initial denaturation	94 °C	3 min
Denaturation	94 °C	15 s
Annealing	50 °C	20 s
Elongation	68 °C	45 s
Cooling	4 °C	Hold

## 结果和讨论

Eppendorf cMaster RT<sub>plus</sub> PCR 系统用于一步法扩增植物病毒 RNA，从加利弗尼亞 ( CA )、北卡羅來納 ( NC ) 野生环境中大量的被感染宿主植物中分离得到 14 种病毒株，从而进行扩增，扩增区代表了 TSWV ( 图 1 ) 的包被蛋白 ( N 基因， 777 nts )，扩增结果如图 2 所示，扩增强度不同的原因是起始病毒 RNA 浓度不同。用低浓度病毒作模板，

Eppendorf cMaster RT<sub>plus</sub> PCR 系统仍可以在极短的时间里扩增出特异性高、量多的产物，而且，扩增产物用于克隆作进一步分析发现，扩增结果没有问题 ( 数据未公布 )。结论：Eppendorf cMaster RT<sub>plus</sub> PCR 系统能在低浓度模板情况下，很短的时间内快速扩增出特异性高、量多的产物。

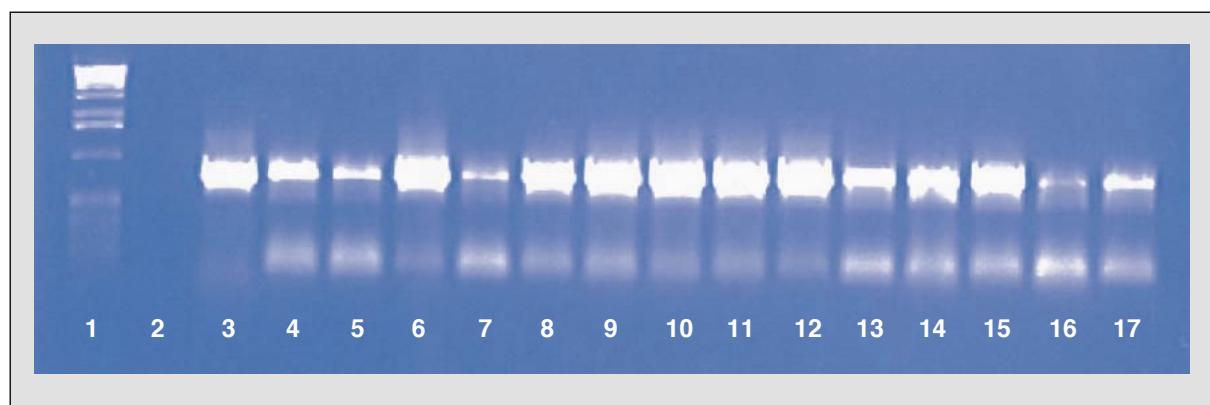


图 2

用 cMaster RT<sub>plus</sub> PCR 系统扩增不同宿主来源的 TSWV 的 N 基因，将扩增产物按以下顺序用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 1) 1 kb ladder,    | 2) 水 ( 阴性对照 ),     |
| 3) 体外转录本 ( 阳性对照 ), | 4) 病毒分离株 0215703,  |
| 5) 病毒分离株 0215802,  | 6) 病毒分离株 0213601,  |
| 7) 病毒分离株 0214103,  | 8) 病毒分离株 0213701,  |
| 9) 病毒分离株 0213501,  | 10) 病毒分离株 0213502, |
| 11) 病毒分离株 0213702, | 12) 病毒分离株 0213703, |
| 13) 病毒分离株 0217902, | 14) 病毒分离株 0214402, |
| 15) 病毒分离株 0214401, | 16) 病毒分离株 0317702, |
| 17) 病毒分离株 0317703。 |                    |

作者 Maria Tsompana, Ph.D.,  
Department of Plant Pathology,  
North Carolina State University, Raleigh M. Arun Kumar, Ph.D.,  
Eppendorf North America, Westbury, NY

## Centrifuge 5418/5424

Silence  
Speed  
Simplicity



5418 离心机

5424 离心机

气密性  
转子标配



## 静若处子，璇如劲风 —— Eppendorf 超静音版小型台式离心机

40 多年前，Eppendorf 成功推出了世界上第一台小型台式离心机，从此创造了离心机生产的一个神话。在离心机的研发与生产中，我们不断地精益求精，现在我们倾情推出两款新型超静音版离心机，把一种新的离心理念引入您的实验室。

气密性离心已成为实验室的安全操作的保障，适合于那些致病性细菌微生物、有毒有害样品的离心，气密性离心转子是您实验室的标准配置，经英国 Porton Down 的应用微生物研究中心测试和认证，符合欧洲 IEC1010-2-020 安全标准。

新款离心机把气密性转子作为一种标配 **NEW**

离心更安全！

离心机 5418: 18 × 1.5/2.0ml 16,873 × g ( 14,000 rpm )

离心机 5424: 24 × 1.5/2.0ml 20,238 × g ( 14,680 rpm )

### ● 安静的令人愉悦

它是如此的安静，也许你会问自己：“它真的在运转吗？”为了消除各种惹人的噪音，我们的工程师们尽他们最大可能完美地平衡了每一个零部件，非常显著地降低了噪音，它甚至不需要转子盖，依然可以保持低的噪音水平——您可以在一种安静的环境下工作。

### ● 快速的难以置信

离心力高达  $20,238 \times g$  ( 5424 )，您可以随意地选择哪种方式离心您的样品：高速离心或温和离心。

### ● 简单的易如反掌

每一个旋钮、每一个按钮、每一个显示屏都建立在人机界面 HMI ( Human-machine-interface ) 最新研究的基础上，被置于非常科学的位置，因此操作更直观，更简单。

eppendorf  
*In touch with life*

上海艾本德生物技术国际贸易有限公司：上海浦东新区世纪大道1600号浦项商务广场1511–1515室

电话：021-68760880 传真：021-50815371 邮编：200122 中文网址：[www.eppendorf.cn](http://www.eppendorf.cn)

上海：021-68760880

北京：010-88360998

广州：020-38361160