

孙洁,王婉,周翎,等.黄瓜花叶病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].华南农业大学学报,2014,35(2):53-56.

# 黄瓜花叶病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立

孙洁,王婉,周翎,阮小蕾,饶雪琴,李华平

(华南农业大学资源环境学院,广东广州510642)

**摘要:**【目的】建立检测香蕉中黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 的实时荧光定量方法。【方法】根据 CMV 外壳蛋白 (CP) 保守序列设计了 TaqMan 实时荧光定量 PCR 特异性探针及引物,优化反应体系检测 TaqMan 探针实时荧光定量方法的灵敏度、特异性和重复性。【结果和结论】该方法检测灵敏度为  $4.2 \times 10^2 \mu\text{L}^{-1}$ ,比普通 PCR 高 100 倍,且与香蕉束顶病毒 *Banana bunchy top virus* (BBTV)、香蕉线条病毒 *Banana streak virus* (BSV) 无交叉反应,特异性和重复性都较好。用实时荧光定量 PCR 检测 14 份田间香蕉样品有 5 份样品为阳性,进一步证明建立的实时荧光定量方法可用于香蕉 CMV 的检测。

**关键词:** 黄瓜花叶病毒; TaqMan 探针; 荧光定量 PCR 检测方法

中图分类号: S436.421

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2014)02-0053-04

## Real-time PCR for quantification of *Cucumber mosaic virus* in banana

SUN Jie, WANG Wan, ZHOU Ling, RUAN Xiaolei, RAO Xueqin, LI Huaping

(College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** 【Objective】 To develop a real-time quantitative PCR method with TaqMan probes to quantify *Cucumber mosaic virus* (CMV) in banana. 【Method】 The primers and probes were designed based on the conserved coat protein (CP) sequences of CMV and were applied to real-time PCR assays. The reaction system was optimized, and its sensitivity, specificity and repeatability were evaluated. 【Result and conclusion】 The detection sensitivity of the real-time PCR assay was  $4.2 \times 10^2 \mu\text{L}^{-1}$ , which was 100 times more sensitive than PCR. The specificity of the assay was analyzed with *Banana bunchy top virus* (BBTV) and *Banana streak virus* (BSV), and no cross reaction were observed. The assay also had good repetitions. The real-time PCR assay was evaluated with field samples. 5 of the 14 tissue samples collected from field suspected CMV infected bananas were positive, which further confirmed that the real-time PCR method should be suitable for detection and quantitation of CMV in banana.

**Key words:** *Cucumber mosaic virus* (CMV); TaqMan probes; real time PCR detection method

香蕉广泛种植于热带亚热带地区,在进出口贸易中占有很重要的位置。植物病毒病是影响香蕉繁殖和种质资源交流的重要因素,在世界很多香蕉种植区均有报道黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 引起的香蕉花叶心腐病对香蕉生产造成重大

损失<sup>[1-2]</sup>。在黄瓜花叶病毒侵染的叶片上,特别是嫩叶,出现黄绿相间的花叶状条纹或褪绿的梭状斑,叶缘有轻微卷曲<sup>[3]</sup>。CMV 属于雀麦花叶病毒科 Bromoviridae 黄瓜花叶病毒属 *Cucumovirus*, 是典型的三分体单链正义 RNA 病毒。研究<sup>[4-6]</sup>发现 CMV 外壳蛋白

收稿日期:2013-07-10 优先出版时间:2014-01-03

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140103.0829.020.html>

作者简介:孙洁(1987—),女,硕士研究生,E-mail:sj721230@sina.com;通信作者:饶雪琴(1969—),女,副教授,博士,E-mail:snow26@sina.com;李华平(1961—),男,教授,博士,E-mail:huaping@scau.edu.cn

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201203076-07)

(Coat protein, CP)与病毒粒子组装和蚜虫传播相关; CP序列的遗传多样性分析表明 CMV 主要有 2 个亚组. 目前对 CMV 尚未形成一套安全、高效、稳定的病毒防控技术,因此有必要对此进行研究.

香蕉中 CMV 的检测方法主要有 ELISA、斑点杂交法、RT-PCR、免疫捕获 RT-PCR<sup>[7-10]</sup>、核酸分子杂交<sup>[11]</sup>、基因芯片技术<sup>[12]</sup>及 RT-LAMP<sup>[13]</sup>等,这些方法在检测速度、灵敏度及特异性等方面有一定的局限性. 目前,基于 PCR、荧光标记和激光技术<sup>[14]</sup>的定量 PCR,灵敏度高、特异性强、重复性好,在植物病毒检测中已得到广泛的运用<sup>[15-17]</sup>. 利用荧光定量方法检测花卉、桃蚜中的 CMV 虽有报道<sup>[18-19]</sup>,但香蕉中 CMV 的荧光定量检测方法鲜见报道. 本研究根据 CMV CP 基因保守序列设计了荧光定量 PCR 特异性探针及引物,建立了香蕉中 CMV 的荧光定量 PCR 检测方法.

## 1 材料与方法

### 1.1 样品、仪器与试剂

感染 CMV、BSV、BBTV 的香蕉植株采自华南农业大学农场和云南省保山市.

Ex *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、pMD18-T 载体、质粒纯化试剂盒、PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)、Premix Ex *Taq*™、实时荧光定量 PCR 仪 (Thermal Cycler Dice) 均购于 TaRaKa 公司. 大肠埃希菌 JM109 由华南农业大学植物病毒室提供. 核酸蛋白分析仪 (Nanophotometer, 产自 IMPLEN).

### 1.2 试验方法

1.2.1 引物与探针的设计 根据 GenBank 上已登录的 CMV CP 基因序列 (登录号: AY965892.1) 设计引物和探针, MF1: 5'-CGATAAGAAGCTTGTTCGCG-3', CMV-R: 5'-CGGCGTACTTTCTCATGTAC-3', 探针 P: 5'-ROX-CGTTACCGCCATCTCTGCTATGTTTCGBH-Q2-3', 引物和探针均由 TaRaKa 公司合成.

1.2.2 模板 RNA 的提取及 cDNA 的制备 按照王玉成等<sup>[20]</sup>方法进行 RNA 抽提,放于 -20℃ 保存. 根据 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 说明进行 RNA 的反转录以合成 cDNA. 反应体系: 5 × Prime-Script RT Master Mix 2 μL, RNA 2 μL, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 6 μL. 反应条件为: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s.

1.2.3 质粒标准品的制备 以抽提出的 RNA 为模板进行 RT-PCR, 反应体系为: PrimeScript 1 step Enzyme Mix 1 μL, 2 × step Buffer 12.5 μL, MF1、CMV-R 各 1 μL (10 μmol · L<sup>-1</sup>), 加 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL. 反应条件为: 50℃ 30 min; 95℃ 5 min, 95℃

30 s, 59℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min. 反应得到目的大小片段后, 用切胶回收试剂盒回收 PCR 产物. 依试剂盒说明将目的片段连接至 pMD18-T 载体, 并转化至 JM109 感受态细胞中. 涂板, 挑出白色菌落进行摇菌, 用质粒抽提试剂盒抽提质粒, 并测序. 经鉴定正确的作为阳性质粒, 用核酸蛋白仪测定其质量浓度, 然后计算拷贝数:

$$\text{拷贝数} = [6.02 \times 10^{23} \times \rho] \div [\text{碱基数} \times 660 \times 10^{-3}].$$

经计算本试验所得质粒 DNA 拷贝数为  $4.2 \times 10^{10}$  μL<sup>-1</sup>, 以 10 倍梯度稀释, 作为绝对定量的标准品.

病毒拷贝数的计算: 将未知样品的  $C_t$  值代入所得标准曲线中, 即可得到未知样品的病毒拷贝数. 其中,  $C_t$  值是指每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数.

1.2.4 荧光定量 PCR 反应条件的优化与标准曲线的制作 以制备的标准品为模板, 对实时荧光定量的引物与探针的浓度及退火温度进行优化, 确立最佳反应体系. 25 μL 反应体系: Real-time 2 × *Taq* 12.5 μL, MF1、CMV-R 各 1 μL (10 μmol · L<sup>-1</sup>), P (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, 模板 2 μL, 加灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 25 μL. 最佳反应条件为: 95℃ 10 s; 95℃ 5 s, 59℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环. 以 10 倍梯度稀释的标准品为模板, 建立 25 μL PCR 反应体系, 根据优化的反应条件, 荧光定量 PCR 仪扩增. 反应结束后, 仪器自动生成标准曲线.

1.2.5 荧光定量 PCR 灵敏性、特异性和重复性试验 以制备的 CMV 标准品按 10 倍梯度稀释为模板, 进行荧光定量 PCR 和普通 PCR 试验, 根据各模板的  $C_t$  值确定检测下限. 以  $4.2 \times 10^7$  μL<sup>-1</sup> 为模板, 重复 7 次, 进行统计分析, 根据变异系数确定该体系的可重复性. 以感染 BBTB、BSV 的香蕉植株 DNA, 及 CMV 的 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR, 进行荧光定量特异性试验.

PCR 体系: *Taq* 酶 0.2 μL, MF1、CMV-R 各 1 μL (10 μmol · L<sup>-1</sup>), 10 × Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol · L<sup>-1</sup>) 2.0 μL, 模板 1 μL, 加灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL. 反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 59℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min.

1.2.6 荧光定量 PCR 的实际应用 采集不同香蕉植株叶片抽提的 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR. 此外, 还抽提了同一感染 CMV 的香蕉植株不同部位的 RNA, 包括只有叶片和含叶脉的叶片, 各 0.1 g, 以确定植株的不同部位的病毒含量是否存在差异.

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒标准品的制备

以抽提的香蕉 RNA 为模板,应用 MF1、CMV-R 进行 RT-PCR,获得了与目的片段大小一致的扩增产物,经测序比对,与 GenBank 中的 CMV 序列具有高度相似性,表明已成功构建了 CMV 重组质粒标准品。

### 2.2 标准曲线的构建

以梯度稀释的 CMV 质粒 DNA 为模板,进行荧光定量 PCR,得到 CMV 的标准曲线(图 1)。标准品模板拷贝数在  $4.2 \times 10^2 \sim 4.2 \times 10^7 \mu\text{L}^{-1}$  范围内,与  $C_t$  值呈现良好的线性关系(本试验中  $C_t$  值  $> 35$  视为阴性)。

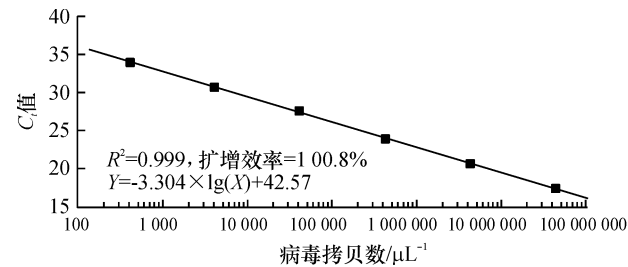
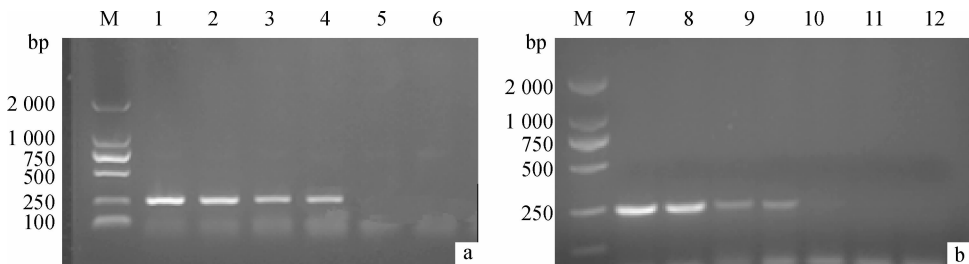


图1 荧光定量 PCR 检测黄瓜花叶病毒标准曲线

Fig.1 Standard curve of the real-time PCR of CMV detection

### 2.3 荧光定量 PCR 的特异性

以感染 BBTV、BSV 的香蕉植株 DNA 及 CMV 的 cDNA 进行荧光定量 PCR,除 CMV 的 cDNA 之外,其他均为阴性,表明该方法具有良好的特异性(图 2)。



M: DNA Marker DL2000; 1~6: 标准品稀释浓度分别为  $4.2 \times 10^7$ 、 $4.2 \times 10^6$ 、 $4.2 \times 10^5$ 、 $4.2 \times 10^4$ 、 $4.2 \times 10^3$ 、 $4.2 \times 10^2 \mu\text{L}^{-1}$ ; 7~11: cDNA 稀释倍数分别为 1、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ ; 12: 阴性对照。

a: CMV 标准品梯度稀释普通 PCR 电泳图; b: cDNA 梯度稀释电泳图。

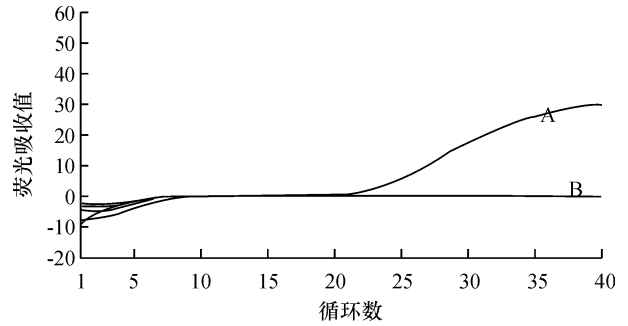
图3 黄瓜花叶病毒 PCR 电泳图

Fig.3 Electrophoresis analysis of CMV by PCR

### 2.5 荧光定量 PCR 的应用

采集田间香蕉样品共 14 份,抽提 RNA,反转录成 cDNA 后进行荧光定量 PCR,结果显示,5 份样品与阴性对照一样有明显的扩增曲线,且  $C_t$  值为 19.85 ~ 25.62,其余样品同阴性对照相同,无扩增曲线。

用荧光定量 PCR 检测感病香蕉植株不同部位的 CMV,结果表明,0.1 g 香蕉叶片中约含有  $5.14 \times 10^7$  个病毒拷贝,0.1 g 叶片与叶脉混合物中约含有  $1.1 \times 10^8$  个病毒拷贝。由试验结果可知相同质量的香蕉组织,叶脉和叶片混合样中 CMV 含量高于叶片。



A: CMV; B: BBTV、BSV 和阴性对照。

图2 黄瓜花叶病毒荧光定量 PCR 特异性试验

Fig.2 Specificity of real-time PCR of CMV detection

### 2.4 荧光定量 PCR 重复性和灵敏性检测

重复扩增试验所得  $C_t$  值 (17.84 ~ 19.06) 的变异系数小于 1.04%,表明本试验建立的荧光定量 PCR 检测方法重复性好。

以梯度稀释的标准品为模板,进行荧光定量 PCR 和普通 PCR,结果表明,荧光定量 PCR 检测标准品的灵敏度为  $4.2 \times 10^2 \mu\text{L}^{-1}$  ( $C_t$  值为 33.37),普通 PCR 检测的灵敏度为  $4.2 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$  (图 3a)。对感染 CMV 的香蕉叶片进行 RNA 抽提,反转录成 cDNA 后,进行稀释,分别以稀释后的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 和普通 PCR,结果表明,荧光定量 PCR 检测 cDNA 的灵敏度为  $10^4$  ( $C_t$  值为 33.25),普通 PCR 检测 cDNA 的灵敏度为  $10^3$  (图 3b)。

## 3 讨论

本研究根据 CMV 的 CP 基因的保守序列设计了荧光定量 PCR 的探针及引物,保证了所扩增基因的特异性,且所建立的 CMV 荧光定量 PCR 检测方法具有重复性和可靠性。然而荧光定量 PCR 在检测过程中,相同模板不同重复间  $C_t$  值常存在差异,这可能是由于加样时人为误差造成的,或是 PCR 仪的边缘效应造成的<sup>[21]</sup>。王芳等<sup>[22]</sup>建立的烟草 CMV 的 SYBR 荧光定量检测法,未对其重复性、灵敏度及特异性进

行探讨. 有研究<sup>[23]</sup>表明, TaqMan 探针法比 SYBR 染料法特异性更强, 灵敏度更高.

在灵敏度比较试验中, 笔者分别以 CMV 质粒 DNA 及 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 与普通 PCR, 以质粒 DNA 为模板时, 荧光定量 PCR 灵敏度是普通 PCR 的 100 倍, 而以 cDNA 为模板时, 其灵敏度是普通 PCR 的 10 倍. 不同模板间灵敏度的差异可能是由于质粒 DNA 经过处理后纯度较 cDNA 高, 而 cDNA 中所含的反转录酶、酚等可能影响了 PCR 扩增的原因<sup>[24-25]</sup>. 在同一香蕉植株中, 叶脉与叶片混合物中 CMV 病毒含量高于叶片, 可能与 CMV 在香蕉中的运输特性相关<sup>[26]</sup>, 这将为田间香蕉样品的采样提供一定的依据.

本研究建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法, 可检测香蕉中 CMV 并可对其进行绝对定量, 也可用于研究 CMV 在植株体内的运动、抗病种质资源的筛选、寄主-病毒-介体间相互作用等.

#### 参考文献:

- [1] HOOKS C R R, WRIGHT M G, KABASAWA D S, et al. Effect of banana bunchy top virus infection on morphology and growth characteristics of banana[J]. *Ann Appl Biol*, 2008, 153(1): 1-9.
- [2] JERIDI M, ESCOUTE J, FONDI E, et al. Homoeologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. revealed by genomic *in situ* hybridization[J]. *Ann Bot*, 2011, 108(5): 975-981.
- [3] AYO-JOHN E I, EKPO E J A, ODEDARA O O, et al. Virus symptom expressions on *Musa* landraces in 1999, 2000 and 2004 in Southern Nigeria: *Cucumber mosaic virus* (CMV) disease incidence and subgroup differentiation[J]. *Arch Phytopathol Plant Protect*, 2011, 44(6): 547-557.
- [4] JACQUEMOND M. *Cucumber mosaic virus*: Vol. 84[M]. Montfavet: *Adv Virus Res*, 2012: 439-504.
- [5] ROOSSINCK M J. *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution[J]. *Mol Plant Pathol*, 2001, 2(2): 59-63.
- [6] 王达新, 郭刚, 殷晓敏, 等. 黄瓜花叶病毒研究进展[J]. *现代农业科技*, 2013(3): 121-123.
- [7] 黄孟群, 廖志松. 检测香蕉花叶心腐病原 CMV 的 PAS-ELISA 方法的改进[J]. *生物工程学报*, 1996, 12(3): 335-339.
- [8] HU Jinsheng, LI Huaping, BARRYK, et al. Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two *Cucumber mosaic virus* isolates infecting banana in Hawaii[J]. *Plant Dis*, 1995, 79(9): 902-906.
- [9] 刘志听, 潘俊松, 郑学勤. 香蕉花叶心腐病的血清学诊断及检测方法的建立[J]. *热带作物学报*, 1994(S1): 19-26.
- [10] 金羽, 文景芝. 植物病毒检测方法研究进展[J]. *黑龙江农业科学*, 2005(3): 37-40.
- [11] 覃佐东, 徐燕慧, 李峰, 等. 核酸分子杂交检测黄瓜花叶病毒[J]. *湖南文理学院学报: 自然科学版*, 2007, 19(1): 69-71.
- [12] 贾慧, 王艳辉, 王进忠, 等. 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.
- [13] PENG Jun, SHI Minjing, XIA Zihao, et al. Detection of *Cucumber mosaic virus* isolates from banana by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. *Arch Virol*, 2012, 157(11): 2213-2217.
- [14] 伊璠, 蔡雪凤. TaqMan 荧光探针技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. *食品工业科技*, 2013(7): 374-377.
- [15] ABRAHAMIAN P E, JAWDAH Y. Detection and quantitation of the new world *Squash leaf curl virus* by TaqMan real-time PCR[J]. *J Virol Methods*, 2013, 191(1): 76-81.
- [16] WANG Yawen, LI Yiping, YANG Cuiling, et al. Development and application of a universal TaqMan real-time PCR for quantitation of duck hepatitis B virus DNA[J]. *J Virol Methods*, 2013, 191(1): 41-47.
- [17] WACHARAPLUESADEE S, TEPSUMETHANON, SUPAVONWONG P, et al. Detection of rabies viral RNA by TaqMan real-time RT-PCR using non-neural specimens from dogs infected with rabies virus[J]. *J Virol Methods*, 2012, 184(1/2): 109-112.
- [18] WEI T, LEBAS B S M, SHILLER J B, et al. Detection of five viruses infecting dormant bulbs by TaqMan-based real-time RT-PCR[J]. *Australasian Plant Pathol*, 2012, 41(1): 93-98.
- [19] WANG Fenglong, YANG Jinguang, ZHAI Xilun, et al. A real-time reverse transcription PCR assay for detection of *Cucumber mosaic virus* in individual peach aphid (*Myzus persicae*)[J]. *ICIEA*, 2011(3): 2624-2627.
- [20] 王玉成, 张国栋, 姜静. 一种适用范围广的总 RNA 提取方法[J]. *植物研究*, 2006, 26(1): 85-88.
- [21] 郑卫东, 袁仕伟. 荧光定量 PCR 仪的边缘效应与实验误差分析[J]. *医疗卫生装备*, 2013(2): 113-115.
- [22] 王芳, 高正良, 周本国, 等. 利用 Real-time RT-PCR 法检测抗病毒活性物质对 CMV 复制的影响[J]. *烟草科技*, 2011(1): 70-73.
- [23] 袁亚男, 刘文忠. 实时荧光定量 PCR 技术的类型、特点与应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(3): 27-30.
- [24] SCHEFE J H, LEHMANN K E, BUSCHMANN I R, et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel "gene expression's  $C_T$  difference" formula[J]. *J Mol Med*, 2006, 84(11): 901-910.
- [25] WINTZINGERODE F, GOBEL U B, STACKEBRANDT E. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, 21(3): 213-229.
- [26] MORENO I M, THOMPSON J R, GARCIA-ARENAL F. Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by *Cucumber green mottle mosaic virus* [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt3): 749-759.

【责任编辑 霍欢】