

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^[1-2]。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^[3]。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^[4-6]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^[7-10]、核酸分子杂交^[11]、基因芯片技术^[12]及 RT-LAMP^[13]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^[14]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^[15-17]。利用荧光定量方法检测花卉、桃蚜中的 CMV 虽有报道^[18-19],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、PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time)、Premix Ex TagTM、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'-CGATAAGAAGCTTGTTCGGC-3', CMV-R: 5'-CGCCCTACTTTCTCATGTCAC-3', 探针 P: 5'-ROX-CGTTACCGCCATCTCTGCTATGTTCCGBH-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^[20]方法进行 RNA 抽提,放于 -20℃ 保存。根据 PrimeScriptTM 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 ddH₂O 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⁻¹), 加 RNase-free ddH₂O 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 4.2×10^{10} μL⁻¹, 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⁻¹), P (10 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, 模板 2 μL, 加灭菌的 ddH₂O 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 4.2×10^7 μL⁻¹ 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 BBTV、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⁻¹), 10 × Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol · L⁻¹) 2.0 μL, 模板 1 μL, 加灭菌的 ddH₂O 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)。

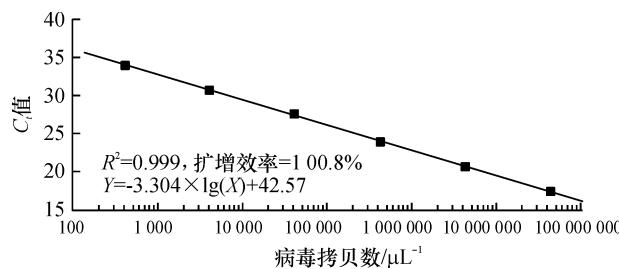
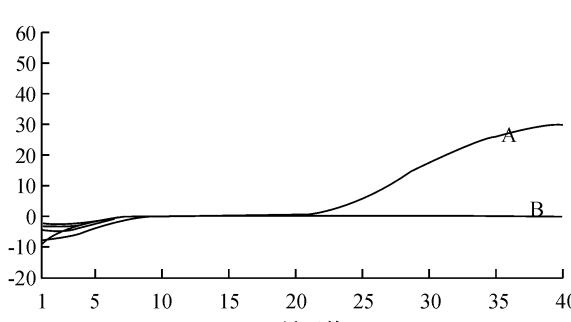
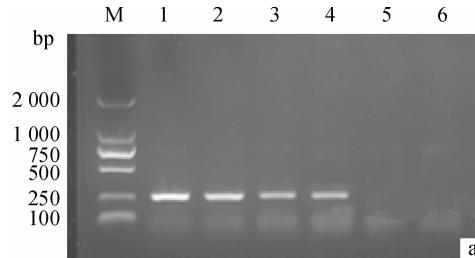


图1 荧光定量PCR检测黄瓜花叶病毒标准曲线

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)。



A: CMV; B: BBTV、BSV 和阴性对照.

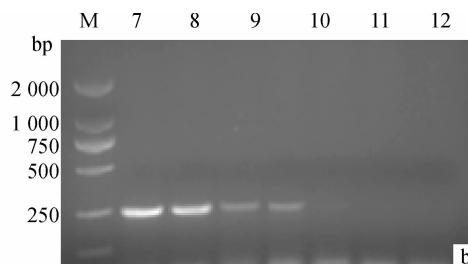
图2 黄瓜花叶病毒荧光定量PCR特异性试验

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)。



M: DNA Marker DL2000; 1~6:标准品稀释浓度分别为 4.2×10^7 、 4.2×10^6 、 4.2×10^5 、 4.2×10^4 、 4.2×10^3 、 $4.2 \times 10^2 \mu\text{L}^{-1}$; 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份样品与阳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 5.14×10^7 个病毒拷贝,0.1 g叶片与叶脉混合物中约含有 1.1×10^8 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。

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^[21]。王芳等^[22]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^[23]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^[24-25]。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^[26], 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] 刘志昕, 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] 伊鋆, 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-neuronal 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 Jingguang, 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】