

## 半巢式 RT-Realtime PCR 方法检测藜草花叶病毒

贺丽娜<sup>1</sup>, 李金庆<sup>2\*</sup>, 厉艳<sup>3</sup>, 栗智平<sup>2</sup>, 封立平<sup>3</sup>, 鲁闽<sup>2</sup>, 段效辉<sup>2</sup>, 王颖<sup>2</sup>, 刘宁<sup>2</sup> (1. 蓬莱检验检疫综合技术服务中心, 山东烟台 265600; 2. 烟台出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 山东烟台 264000; 3. 山东检验检疫技术中心, 山东青岛 266002)

**摘要** [目的]根据藜草花叶病毒(SoMV)全基因组中多聚蛋白质基因序列保守区,分别设计2套TaqMAN探针和引物,建立半巢式实时荧光PCR检测SoMV的新方法。[方法]提取病毒核酸进行反转录操作合成cDNA,依据设计好的2套TaqMAN探针和引物,分别进行实时荧光PCR特异性与灵敏度检测,并进行2套引物探针的扩增效率对比试验。[结果]方法特异性强,灵敏度高达0.4 fg/ $\mu$ L植物总RNA,2套引物探针的扩增效率试验对比结果显示扩增效率几乎完全一样。[结论]该方法适用于藜草花叶病毒的检疫鉴定。

**关键词** 藜草花叶病毒;半巢式实时荧光PCR;检测

中图分类号 S412 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)02-0194-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.02.060

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Detection of *Sowbane mosaic virus* by Semi-nested Real-time PCR Method

HE Li-na<sup>1</sup>, LI Jin-qing<sup>2</sup>, LI Yan<sup>3</sup> et al (1. Penglai Inspection and Quarantine Integrated Technical Service Center, Yantai, Shandong 265600; 2. Inspection and Quarantine Technology Center of Yantai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai, Shandong 264000; 3. Shandong Inspection and Quarantine Technology Center, Qingdao, Shandong 266002)

**Abstract** [Objective] Two sets of TaqMAN probes and primers were designed according to the conserved region of the polyprotein gene sequence in the whole genome of *Sowbane mosaic virus* (SoMV), and a new semi-nested real-time fluorescent PCR method for detecting SoMV was established. [Method] The virus nucleic acid was extracted for reverse transcription to synthesize cDNA. The specificity and sensitivity of real-time fluorescent PCR were detected by two sets of TaqMAN probes and primers. The amplification efficiency of two sets of primer-probes was compared. [Result] The method was highly specific and sensitive, reaching 0.4 fg/ $\mu$ L of plant total RNA. The efficiency of the two sets of primer probes was almost the same. [Conclusion] This method is suitable for quarantine and identification of *Sowbane mosaic virus*.

**Key words** *Sowbane mosaic virus* (SoMV); Semi-nested real-time fluorescent PCR; Detection

藜草花叶病毒(*Sowbane mosaic virus*, SoMV),属于南方菜豆花叶病毒属(*Sobemovirus*)成员。该病毒分布在世界近30个国家和地区,主要分布于欧洲及南北美洲国家及南非、日本、土耳其等国家或地区<sup>[1-3]</sup>,可通过汁液、昆虫及种子传播,具有种传率极高、抗逆性强和极易传播蔓延的特点<sup>[4]</sup>。目前该病毒在中国无报道,被我国列为禁止进境的检疫性有害生物。藜草花叶病毒可侵染藜科杂草、葡萄、苹果、樱桃、香石竹、菊花等5个属的24种植物<sup>[4-5]</sup>,这些寄主植物在我国都有大面积的种植,我国的气候条件也与世界上该病毒的许多疫区的气候条件相似,因此该病毒一旦传入我国,可导致严重危害。

为了保障我国苹果、葡萄等相关产业的健康发展,开发先进的检测技术,防止藜草花叶病毒传入我国具有重要意义。目前,国内外已建立了SoMV的RT-PCR检测方法<sup>[6-7]</sup>、IC-RT-PCR检测方法免疫捕获抗原<sup>[8]</sup>、Real-time PCR检测方法<sup>[1]</sup>、反转录环介导等温扩增方法<sup>[9]</sup>,但尚未见采用半巢式-Real time PCR检测SoMV的研究报道。笔者建立了具有更快速、简便、准确、灵敏等特点的半巢式-Real time PCR检测SoMV的方法,旨在进一步丰富藜草花叶病毒的检疫鉴定技术。

## 1 材料与方法

**1.1 供试材料** 藜草花叶病毒(SoMV)、番茄黑环病毒(TBRV)、草莓潜环斑病毒(SLRV)、番茄丛矮病毒(TBSV)和桃丛簇花叶病毒(PRMV)由中国检验检疫科学研究院植物检疫研究所提供。

**1.2 仪器设备** 实时荧光PCR仪ABI 7000(美国,应用生物公司);PCR扩增仪PTC-200(美国,MJ公司);纯水仪Milli-Q(美国,Millipore);高压灭菌锅MLS 3020(日本,SANYO);高速冷冻离心机5417R(德国,Eppendorf);涡旋振荡器MS1 minishaker(美国,IKA);金属浴ALB 128(美国,Thermo);多用电泳系统PROTEAN II(美国,BIO-RAD);凝胶成像系统Universal HoodIII(美国,BIO-RAD);核酸蛋白分析仪Bio Photometer(德国,eppendorf)。

**1.3 试剂** 植物总RNA提取试剂盒(DP432)购自天根生化科技(北京)有限公司;反转录试剂盒(货号:RR037A)购自TaKaRa公司;实时荧光PCR试剂盒Platinum<sup>®</sup>购自Invitrogen公司等。

**1.4 TaqMAN探针与引物的设计与合成** 根据NCBI数据库中藜草花叶病毒全基因组中多聚蛋白质基因序列保守区,分别设计2套TaqMAN探针和引物,探针5'端发光基因为FAM,3'端淬灭基因为TAMRA,引物和探针由上海生工合成。

该研究共设计了3条引物和1条探针,其中引物包括1条上游引物和2条下游引物,上游引物SoMV1:5'-CCGATG-GAACACTTATTCAACAGT-3'。下游引物用SoMVR表示,其中SoMVR1:5'-TGGAGTTGGTGGAGGAAGTACA-3';SoMVR2:5'-GCCATAAGGCAGCGGACTC-3'。探针SoMVP:5'-

**基金项目** 国家质量基础的共性技术研究与应用(NQI)重点专项项目(2017YFF0211103);山东出入境检验检疫局科技项目(SK201628, SK201754);烟台市科技发展计划项目(2008324);质检总局科技项目(2016IK312, 2016IK313, 2015IK200)。

**作者简介** 贺丽娜(1979—),女,山东烟台人,主管医师,从事实验室检测工作。\*通信作者,从事植物检疫工作。

**收稿日期** 2018-08-20;修回日期 2018-08-27

FAM-TCGCCGGGTGTATGAAGTCAGGATC-TAMARA-3'; PCR 产物长度 SoMVf/SoMVR1 为 78 bp, SoMVf/SoMVR2 为 97 bp。3 条引物及探针组成 2 套不同的反应组合, 套 1 为 SoMVf/SoMVR1/SoMVP, 套 2 为 SoMVf/SoMVR2/SoMVP。

**1.5 病毒核酸提取与质量控制** 采用试剂盒提取病毒叶片及健康叶片 (CK) 中总 RNA, 操作步骤详见试剂盒 DP432 说明书。提取的核酸用核酸蛋白分析仪测定浓度与纯度值, 确保核酸质量。

**1.6 cDNA 合成** 病毒总 RNA 及水对照 CK 采用反转录试剂盒在 PTC-200 普通 PCR 扩增仪上分别进行反转录过程合成 cDNA。反应体系: 5×Primer Script Buffer 2.0 μL, oligo dT Primer (50 μmol/L) 0.5 μL, Primer Script RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Random 6 mers (100 μmol/L) 0.5 μL, 总 RNA 2.0 μL, 加 DEPC 水至 10.0 μL。反转录反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。

### 1.7 实时荧光 PCR 检测

**1.7.1 特异性检测。** 以上述不同病毒的 cDNA 及 2 种阴性对照为模板, 在实时荧光 PCR 仪 96 孔板中进行半巢式实时荧光 PCR 特异性检测。反应体系: 2×PCR buffer 12.5 μL, 上游引物 (15 μmol/L) 1.0 μL, 下游引物 (15 μmol/L) 1.0 μL, 探针 (10 μmol/L) 1.0 μL, ROX 0.5 μL, cDNA 2.0 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25.0 μL。反应条件: 50 °C 2 min; 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 45 cycles。

**1.7.2 灵敏度检测。** 将提取的藜草花叶病毒总 RNA, 用 ddH<sub>2</sub>O 从 10<sup>-1</sup> 稀释到 10<sup>-10</sup> 及 ddH<sub>2</sub>O 共 11 个梯度, 分别按照“1.6”中的反应体系和反应条件进行 cDNA 合成, 然后进行半巢式实时荧光 PCR 灵敏度检测, 反应体系和反应条件同“1.7.1”。

**1.7.3 扩增效率对比试验。** 采用藜草花叶病毒同一 cDNA 为模板, 分别用 2 套引物-探针进行半巢式实时荧光 PCR 检测, 以比较这 2 套引物探针的扩增效率。实时荧光 PCR 操作同“1.7.1”。

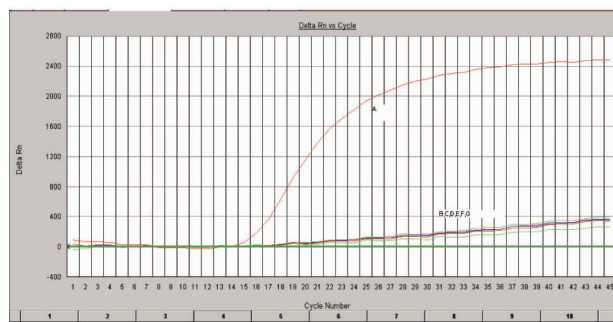
## 2 结果与分析

**2.1 特异性检测结果** 套 1 (SoMVf/SoMVR1/SoMVP) 和套 2 (SoMVf/SoMVR2/SoMVP) 结果分别见图 1、2。结果显示, 2 套引物探针分别只有在 SoMV 的 cDNA 为模板的反应中出现扩增曲线, 其他 4 种病毒和 2 种阴性对照 cDNA 均未出现扩增信号, 说明 2 套引物探针的特异性很好, 符合预期。

**2.2 灵敏度检测结果** 该试验中所提取 RNA 浓度与纯度值为 39.8 (约为 40) ng/μL, 核算蛋白分析仪测定结果为 OD<sub>260/280</sub> = 2.16, OD<sub>260/230</sub> = 2.33。稀释后各个梯度所对应的 RNA 浓度从 4 ng/μL ~ 0.004 fg/μL 及 ddH<sub>2</sub>O。反转录分别合成 cDNA 后, 进行半巢式实时荧光 PCR 扩增。套 1、套 2 结果分别见图 3、图 4。荧光 PCR 扩增的结果表明, 当 RNA 稀释至 10<sup>-9</sup> (即 0.04 fg/μL) 时, 检测不到信号, 因此该方法检测的灵敏度可达 10<sup>-8</sup>, 即 0.4 fg/μL 植物总 RNA。

**2.3 扩增效率对比试验结果** 套 1 组合 (SoMVf/SoMVR1/SoMVP) 和套 2 组合 (SoMVf/SoMVR2/SoMVP) 引物探针的扩增效率结果对比见图 5。由图 5 可见, 2 套引物探针

的扩增效率几乎等同。

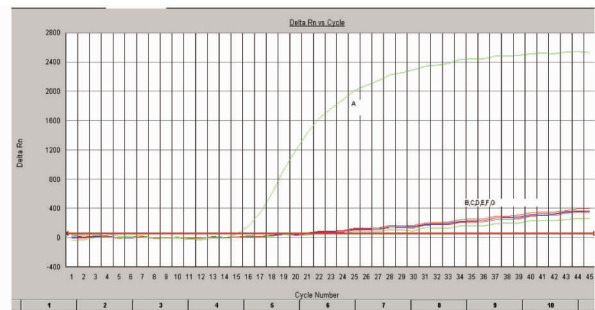


注: A. SoMV; B. TBRV; C. SLRSV; D. TBSV; E. PRMV; F. 健康叶 (CK1); G. ddH<sub>2</sub>O (CK2)

Note: A. SoMV; B. TBRV; C. SLRSV; D. TBSV; E. PRMV; F. Healthy leaf (CK1); G. ddH<sub>2</sub>O (CK2)

图 1 套 1 (SoMVf/SoMVR1/SoMVP) 引物探针特异性试验 PCR 扩增结果

Fig.1 Set 1 (SoMVf/SoMVR1/SoMVP) primer-probe specificity test results of PCR amplification

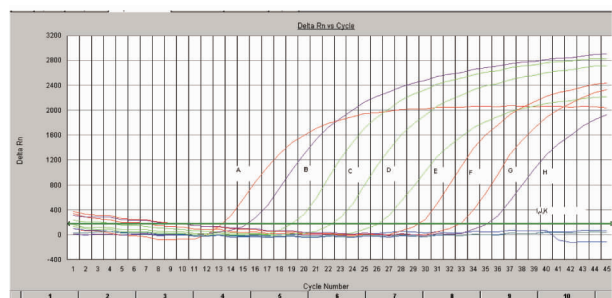


注: A. SoMV; B. TBRV; C. SLRSV; D. TBSV; E. PRMV; F. 健康叶 (CK1); G. ddH<sub>2</sub>O (CK2)

Note: A. SoMV; B. TBRV; C. SLRSV; D. TBSV; E. PRMV; F. Healthy leaf (CK1); G. ddH<sub>2</sub>O (CK2)

图 2 套 2 (SoMVf/SoMVR2/SoMVP) 引物探针特异性试验 PCR 扩增结果

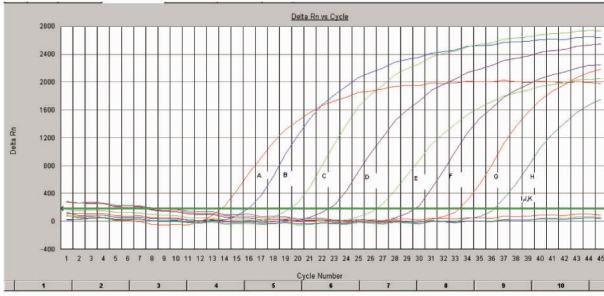
Fig.2 Set 2 (SoMVf/SoMVR2/SoMVP) primer-probe specificity test results of PCR amplification



注: A. 4 ng/μL; B. 400 pg/μL; C. 40 pg/μL; D. 4 pg/μL; E. 400 fg/μL; F. 40 fg/μL; G. 4 fg/μL; H. 0.4 fg/μL; I. 0.04 fg/μL; J. 0.004 fg/μL; K. ddH<sub>2</sub>O

图 3 套 1 (SoMVf/SoMVR1/SoMVP) 引物探针特灵敏度试验 PCR 扩增结果

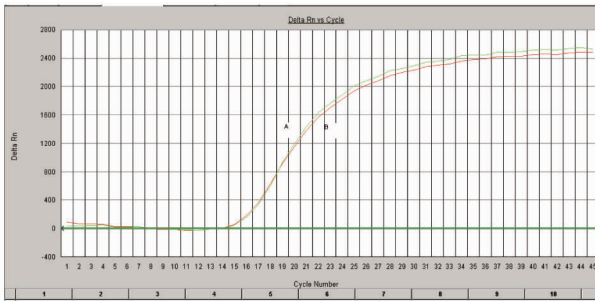
Fig.3 Set 1 (SoMVf/SoMVR1/SoMVP) primer-probe sensitivity test PCR amplification results



注:A.4 ng/ $\mu$ L;B.400 pg/ $\mu$ L;C.40 pg/ $\mu$ L;D.4 pg/ $\mu$ L;E.400 fg/ $\mu$ L;  
F.40 fg/ $\mu$ L;G.4 fg/ $\mu$ L;H.0.4 fg/ $\mu$ L;I.0.04 fg/ $\mu$ L;  
J.0.004 fg/ $\mu$ L;K.ddH<sub>2</sub>O

图4 套2 (SoMVf/SoMVR2/SoMVP) 引物探针灵敏度试验 PCR 扩增结果

Fig.4 Set 2 (SoMVf/SoMVR2/SoMVP) primer-probe sensitivity test PCR amplification results



注:A为套1组合 (SoMVf/SoMVR1/SoMVP);B为套2组合 (SoMVf/SoMVR2/SoMVP)

Note:A is set 1 combination (SoMVf /SoMVR1/SoMVP);B is set 2 combination (SoMVf /SoMVR2/SoMVP)

图5 套1组合 (SoMVf/SoMVR1/SoMVP) 和套2组合 (SoMVf/SoMVR2/SoMVP) 引物探针扩增效率结果对比

Fig.5 Comparison of amplification efficiency of primer-probe pairs by set 1 (SoMVf/SoMVR1/SoMVP) and set 2 (SoMVf/SoMVR2/SoMVP)

### 3 结论与讨论

近年来,随着国际贸易的发展,进口植物种苗批次和货值急剧增加,进口植物种苗口岸呈现集中化与专一化特点,各个种苗口岸截获了大量的植物疫情,特别是检疫性的植物病毒。进境种苗中植物病毒的检测一直是我国检验检疫系统的重点难点,绝大多数的口岸局都没有掌握植物病毒室内的检测技术,很多都还停留在初步判断阶段<sup>[10]</sup>,如果要鉴定到种,往往需要送到鉴定能力强的省局实验室进行鉴定,费时费力。特别是其中木本植物中病毒的检测,由于它们在植株体内含量低、分布不均,且时有复合侵染等特殊特性,传统的方法,极易出现漏检和误检<sup>[11]</sup>,藜草花叶病毒就是其中之一。SoMV侵染症状常常表现较轻或无症状,且在一些寄主

上,病毒含量很低,导致生物学检测或血清学检测较为困难<sup>[1]</sup>。

使用不同的方法,其检测灵敏度差异较大<sup>[11]</sup>。为了确认结果的正确性,经常需要对一个结果进行另一种方法的确认试验,例如通过 RT-PCR 方法检出一种病毒,往往需要通过 ELISA 方法进行确认,但是 ELISA 方法检测灵敏度较低,有可能导致漏检,这就为结果的判断增加了难度,尤其是在检测目标含量极少的情况下,极易造成结果判断错误。但如果方法之间检测灵敏度相近的话,漏检问题就迎刃而解,很少造成漏检情况。

基于上述原因,笔者建立了半巢式 RT-Realtime PCR 检测藜草花叶病毒的方法。该方法充分利用了实时荧光 PCR 方法所固有的特异性强、可重复性好、定量分析较准确、PCR 污染少、自动化程度高等特点<sup>[12]</sup>,同时巧妙地将巢式 PCR 的原理,运用到实时荧光 PCR 技术中<sup>[11,13]</sup>。设计上仅仅在一般实时荧光 PCR 的基础上增设了一条引物,就形成了 2 套完全独立的检测体系,2 套引物探针相互印证,可以减少假阳性的出现,又进一步提高了准确性。这 2 套引物探针的扩增效率极高且近乎等同,这样就避免了藜草花叶病毒漏检情况的出现。与单一的巢式 PCR 或 Realtime PCR 等方法相比,其检测的准确性、灵敏度更高,同时也解决了由于灵敏度不同导致结果漏检的问题。该试验结果表明,方法检测的灵敏度可达 0.4 fg/ $\mu$ L 植物总 RNA。

### 参考文献

- [1] 辛言言,张永江,马洁,等.实时荧光 RT-PCR 方法检测藜草花叶病毒 [C]//郭泽建,吴元华.中国植物病理学会 2014 年学术年会论文集.北京:中国农业科学技术出版社,2014.
- [2] CORNELIA B O.Soubane mosaic virus [EB/OL].(2005-04-05) [2012-03-15].http://ictvdb.biomirror.cn/ICTVdb/00.067.0.01.008.htm.
- [3] GRATSIA M E, KYRIAKOPOULOU P, VOLOUDAKIS A. First report of Olive mild mosaic virus and Soubane mosaic virus in Spinach in Greece [J]. Plant disease, 2012, 96(8): 1230.
- [4] 沈淑琳.介绍一种极易从国外传入的种传病毒——藜草花叶病毒 [J]. 植物检疫, 1990, 4(4): 246-247.
- [5] 冯黎霞,赵立荣,武日涛,等.藜草花叶病毒的研究概述 [J]. 中国蔬菜, 2016(8): 17-21.
- [6] 陈青,李桂芬,董菁,等.藜草花叶病毒外壳蛋白基因的克隆与 RT-PCR 检测 [J]. 植物病理学报, 2010, 40(4): 438-441.
- [7] 董菁,陈青,陈红运,等.应用简并引物检测南方菜豆花叶病毒属病毒 [J]. 植物保护学报, 2010, 37(4): 377-378.
- [8] 冯黎霞,何瑞芳,钟国强,等.进境菠菜种子中藜草花叶病毒的免疫捕获 RT-PCR 检测 [J]. 植物检疫, 2013, 27(1): 33-35.
- [9] 杨姗姗,廖富荣,艾洪水.反转录环介导等温扩增技术检测藜草花叶病毒 [J]. 植物保护学报, 2018, 45(2): 391-392.
- [10] 张京宣,曹秀芬,宋涛,等.植物病毒检测技术研究进展分析 [J]. 北京农业, 2011(30): 79-80.
- [11] 栗智平,张静,黄迎波,等.半巢式-RT-RealtimePCR 检测李痘病毒 [J]. 植物检疫, 2012, 26(3): 26-29.
- [12] 周晓丽,朱国波,李雪华,等.实时荧光定量 PCR 技术原理与应用 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(2): 87-89.
- [13] 栗智平,杨益娥,赵伟铨,等.半巢式 RT-Realtime PCR 检测番茄矮病毒 [J]. 现代农业科技, 2015(18): 148-150.