

逆转录环介导等温扩增技术检测草莓 潜隐环斑病毒的研究

张吉红¹, 余澍琼¹, 徐 瑛¹, 张慧丽¹, 陈先锋^{1*}, 陈剑平², 陈 炯³

(1. 宁波出入境检验检疫局, 宁波 315012; 2. 浙江省农业科学院, 杭州 310021; 3. 宁波大学, 宁波 315211)

摘要 采用环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 建立了草莓潜隐环斑病毒(*Strawberry latent ringspot virus*, SLRSV)检测方法。根据 SLRSV 外壳蛋白编码基因上的 8 个位点, 共设计了 6 条引物, 通过逆转录环介导等温扩增得到特征性的瀑布状条带。特异性试验表明, 引物对 SLRSV 的检测具有良好的特异性; 灵敏度试验显示 RT-LAMP 的灵敏度比普通 RT-PCR 高出 100 倍。该方法无需特殊的试剂和设备, 只需在水浴锅中 65 ℃ 等温扩增, 整个检测周期约 1.5 h, 结果采用 SYBR green I 染色显示, 易于观察和判定。

关键词 草莓潜隐环斑病毒; 环介导等温扩增; 检测

中图分类号: S 436. 639 **文献标识码:** A **DOI:** 10. 3969/j. issn. 0529 - 1542. 2013. 06. 014

Detection of *Strawberry latent ringspot virus* by RT-LAMP

Zhang Jihong¹, Yu Shuqiong¹, Xu Ying¹, Zhang Huili¹, Chen Xianfeng¹, Chen Jianping², Chen Jiong³

(1. *Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315012, China*; 2. *Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China*; 3. *Ningbo University, Ningbo 315211, China*)

Abstract A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was established for detection of *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) in the study. Based on eight sites on SLRSV coat protein coding genes, six primers were designed, and characteristic waterfall-like bands were obtained by RT-LAMP. Specificity tests showed that the primers are specific for SLRSV. The sensitivity of RT-LAMP is 100-fold higher than that of RT-PCR. The method does not need special equipment and reagents and the reaction condition is that the incubation temperature is 65 ℃ and the reaction time 1.5 h. The results can be easily observed by using SYBR green I.

Key words *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV); loop-mediated isothermal amplification (LAMP); detection

草莓潜隐环斑病毒(*Strawberry latent ringspot virus*, SLRSV)隶属于伴生豇豆病毒科(Secoviridae)^[1], 是蔷薇科果实类作物上的重要病害之一, 也是国家质检总局发布的重要检疫性有害生物。该病害主要分布在欧洲、美国和俄罗斯等地区。SLRSV 能侵染种子、种球、块茎和苗木等, 病毒侵染植株后, 主要表现为叶片褪绿、畸形、植株矮化、产量以及品质下降等现象, 严重时可引起毁灭性灾害。SLRSV 主要通过长剑线虫(*Xiphinema* sp.) 传播, 机械、嫁接和种子均可传播。目前, SLRSV 的检测方法主要有指示植物小叶嫁接法、血清学检测和分子生物学检测等。指示植物小叶嫁接法, SLRSV 的症状表现比较复杂, 同种病毒在不同的指示植物上, 症状变化比较大, 而且该方法对于病毒种类的鉴定检测耗时长; 血清学检

测法具有快速简便和高通量的优点, 目前已有 10 多种草莓病毒或类似病毒可用 ELISA 进行检测; 另外, 实时荧光 RT-PCR 技术检测草莓病毒也有报道^[2], 该方法具有较高的灵敏度和特异性, 但是对设备和人员技术能力的要求较高。

环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)作为一种新的核酸扩增方法, 具有检测速度快、操作简单和灵敏度高优点。首先, LAMP 技术是呈瀑布式扩增, 故其扩增效率非常高; 其次, LAMP 识别靶序列上的 6~8 个特异性位点, 因此特异性很强; 再次, LAMP 技术是在 60~65 ℃ 恒温下扩增, 只要恒温水浴锅即可, 无需特殊仪器, 所以操作方便, 对设备要求低; 最后, LAMP 的整个反应周期只需 1~2.5 h, 检测周期非常短。基于

收稿日期: 2013-02-05

修订日期: 2013-05-14

基金项目: 宁波市科研项目(2011C50080); 国家质检总局项目(2013IK279); 质检公益性行业科研专项(201010256); 浙江省重点科技创新团队(2010R50028)

* 通信作者 E-mail: chenxf@nbciq.gov.cn

LAMP 技术以上的优点,本文针对草莓潜隐环斑病毒的 RT-LAMP 检测方法的建立进行了研究报道。

1 材料与方法

1.1 供试材料

含有 SLRSV 的阳性样品物质购自美国 Agdia 公司。经 DAS-ELISA 检测呈 SLRSV 阳性的百合样品由上海检验检疫局提供。番茄环斑病毒 (*Tomato ringspot virus*, ToRSV)、香石竹环斑病毒 (*Carnation ringspot virus*, CRSV)、黄瓜绿斑驳花叶病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGM-MV)、南芥菜花叶病毒 (*Arabis mosaic virus*, ArMV) 以及马铃薯 V 病毒 (*Potato virus V*, PVV) 等阳性标准

物质也都购自美国 Agdia 公司。

RT-LAMP 引物由上海英骏生物技术公司合成。核酸提取试剂 Trizol 购自上海生物工程公司。RT-LAMP 扩增试剂盒由本实验室研制。One-step RNA PCR kit 与 DL-2000 marker 购自大连 TaKaRa 公司。

引物序列见表 1, 根据 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中已登录的草莓潜隐环斑病毒的外壳蛋白基因序列 (AY860979), 采用 Blast 程序进行同源性比较, 在序列的保守区, 使用 Primer Express 3.0 软件, 设计得到 F3、B3、FIP (F1c+TTTT+F2)、BIP (B1c+TTTT+B2)、Loop1 和 Loop2 共 6 条引物, 分别识别外壳蛋白编码基因的 8 个位点。

表 1 草莓潜隐病毒 RT-LAMP 检测引物

Table 1 The RT-LAMP primers for identification of SLRSV

引物名称 Primers	序列 Sequences	来源 Source
F3	5'-gagaatcaccgttactggaagg-3'	
B3	5'-acagcaaacagagaaccactacc-3'	
Loop1	5'-gcaaagcccatttccacagt-3'	AY860979/
Loop2	5'-ggttgctacgtgccaaggtt-3'	X77466/X75165
FIP	5'-cgataggcatcgctctcccttttagaggtgatctttaacctccc-3'	
BIP	5'-tactttggttcgacagtgggtggatttcccattagataaccaccataacca-3'	

1.2 草莓潜隐环斑病毒的 RT-LAMP 扩增

总 RNA 提取: 采用 Trizol 试剂方法提取^[3]。

反应体系: 2×RT-LAMP Mix 10 μL, 引物 F3 和 B3 各为 0.2 μmol/L, Loop1 和 Loop2 的终浓度各为 0.8 μmol/L, FIP 和 BIP 的终浓度各为 1.6 μmol/L, Bst DNA 聚合酶 (5 U/μL) 1.5 μL, AMV RNA 聚合酶 (5 U/μL) 1 μL, 模板 RNA 1 μL, 用 ddH₂O 补充至总体积 20 μL。

LAMP 反应液配制完成后, 取 SYBR green I (10 000×) 染色剂 0.1 μL 加至反应管的管盖上, 待反应结束, 离心反应管使染色剂与反应产物混合。当扩增结果为阳性时, 反应液呈绿色, 结果为阴性时呈橙红色。在紫外灯下, 阳性样品管发出白色荧光, 无扩增产物的样品管没有白色荧光。

反应条件如下: 在恒温 60 °C 的水浴锅中扩增 1 h。

RT-LAMP 结果分析: 反应结束后, 取 10 μL 扩增产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 在 GelDoc-2000 (Bio-Rad) 凝胶成像系统上观察并记录结果。

1.3 RT-LAMP 的检测反应条件优化试验

以草莓潜隐环斑病毒 RNA 为模板, 按照建立的 RT-LAMP 检测方法, 分别在 60、63 °C 和 65 °C 3 个温度条件下进行扩增, 反应时间为 1 h。每个温度条件设置 2 个 RNA 样品重复, 一个空白对照。

以草莓潜隐环斑病毒 RNA 为模板, 按照建立的 RT-LAMP 检测方法, 分别在 30、60 min 和 90 min 3 个时间条件下进行扩增, 反应温度为 60 °C。每个时间条件设置 2 个 RNA 样品重复, 一个空白对照。

1.4 RT-LAMP 的特异性和灵敏度试验

抽提得到 SBMV、BPMV、SMV、TRSV 以及 ToRSV 等病毒 RNA, 按照建立的 ArMV RT-LAMP 检测方法, 进行特异性研究。健康大豆种子提取液作为阴性对照。

以 ToRSV、CRSV、CGMMV、ArMV 以及 PVV 等多种植物病毒 RNA 为模板, 按照建立的草莓潜隐环斑病毒 RT-LAMP 检测方法, 进行特异性研究。其中, 草莓潜隐环斑病毒设置 2 个 RNA 样品重复, 其余病毒设置 1 个 RNA 样品, 并设置 1 个空白对照。

将提取好的草莓潜隐环斑病毒 RNA 模板进行 10 倍系列稀释, 得到 10⁻¹~10⁻⁵ 稀释的病毒 RNA 样品。采用建立的 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法进行扩增灵敏度比对试验。

1.5 草莓潜隐环斑病毒 RT-PCR 检测方法的建立

RT-PCR 反应体系参照 One-step RNA PCR kit 试剂盒说明进行, 其中引物为 F3 和 B3。反应条件如下: 50 °C cDNA 合成 30 min, 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸

1 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

1.6 RT-LAMP 扩增产物的观察

将灵敏度试验中的 RT-LAMP 扩增产物, 用凝胶电泳法观察扩增结果, 剩下的产物中, 直接加入 0.1 μL 的荧光染料 SYBR green I, 混匀后肉眼观察颜色变化, 或置于凝胶成像系统中紫外观察。

1.7 百合样品中 SLRSV 的 RT-LAMP 快速检测

取已用 DAS-ELISA 检测呈 SLRSV 阳性的进境百合样品, 采用本研究建立的 RT-LAMP 方法进行扩增检测, 结果采用 SYBR green I 染色观察。

2 结果与分析

2.1 RT-LAMP 的检测反应温度优化试验结果

在相同反应时间, 本试验设计的草莓潜隐环斑病毒的引物在 60、63 °C 和 65 °C 均出现明显的条带(图 1), 扩增产物亮度在 3 个不同温度之间没有明显的差异, 反应温度最终确定为 60 °C。

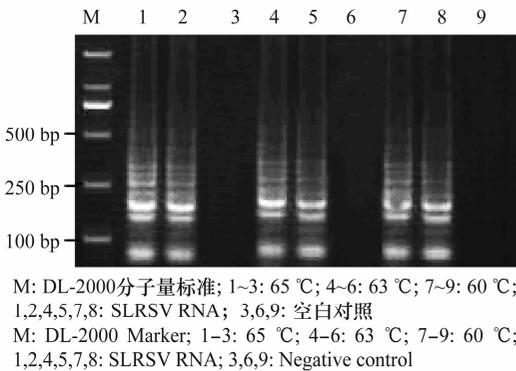


图 1 SLRSV RT-LAMP 方法的温度优化

Fig. 1 Optimization of temperature in RT-LAMP for SLRSV

2.2 RT-LAMP 的检测反应时间优化试验结果

在 60 °C 时, 本试验设计的草莓潜隐环斑病毒的引物在 60 min 和 90 min 均出现明显的条带(图 2), 但在 30 min 条件下未出现扩增条带, 反应时间确定为 60 min。

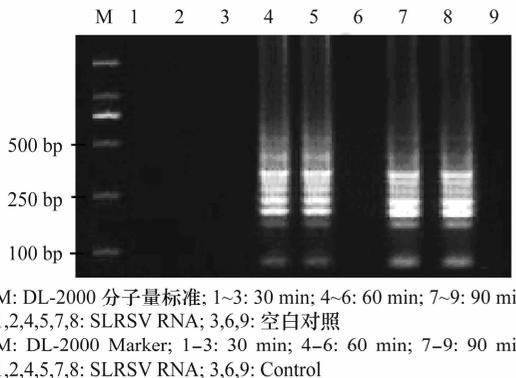


图 2 SLRSV RT-LAMP 检测的时间优化

Fig. 2 Optimization of time in RT-LAMP for SLRSV

2.3 草莓潜隐环斑病毒的 RT-LAMP 特异性扩增结果

草莓潜隐环斑病毒的阳性标准物质经过 RT-LAMP 扩增后, 能够得到特异性的瀑布状条带, 而其他病毒毒株的 RNA 模板则无扩增条带出现, 空白对照中无特异性基因条带(图 3)。这表明本研究的 6 条引物针对 SLRSV 的检测具有非常好的特异性。

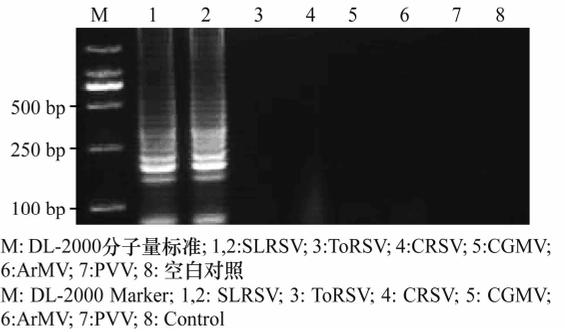


图 3 RT-LAMP 特异性扩增 SLRSV 结果

Fig. 3 Specificity results of LAMP for SLRSV

2.4 RT-LAMP 检测灵敏度试验

不同稀释梯度的草莓潜隐环斑病毒 RNA 经过 RT-LAMP 扩增后, 其检测灵敏度为 10^{-3} 病毒稀释液, 比普通 RT-PCR 的灵敏度高出 100 倍(图 4)。

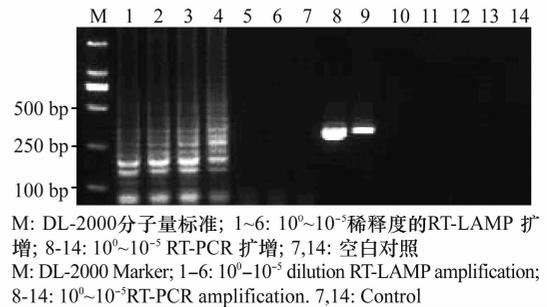
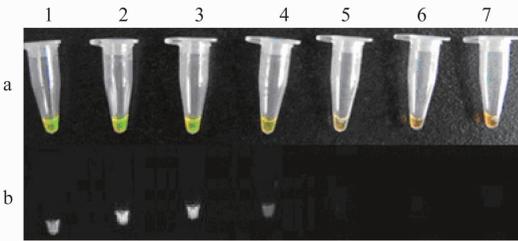


图 4 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测 SLRSV 灵敏度结果

Fig. 4 Sensitivity results of RT-LAMP and RT-PCR for SLRSV

2.5 扩增产物的结果观察

本研究利用沉淀法和染色法对 LAMP 产物进行了检测。LAMP 沉淀较少, 肉眼较难分辨沉淀的有无; LAMP 产物中加入 SYBR green I 染色剂, 对照颜色呈橙红色, 而有扩增产物则呈绿色(图 5a)。在紫外灯下观察, 空白对照和无 RT-LAMP 产物的样品管均没有发出白色荧光, 而有 RT-LAMP 扩增产物的样品管则发出白色荧光, 且白色荧光的亮度与 RNA 模板浓度的高低成正比(图 5b)。RT-LAMP 扩增产物, 用凝胶电泳法观察结果和用荧光染料 SYBR green I 观察的结果一致。

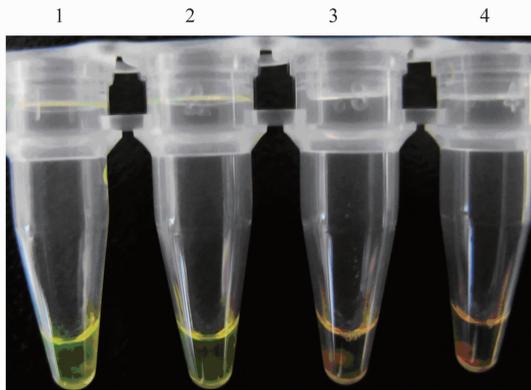


a. 肉眼观察; b. 紫外观察; 1~6: 10^0 ~ 10^{-5} 稀释度; 7: 空白对照
a. Observation with naked-eyes; b. Observation with ultraviolet light; 1-6: 10^0 ~ 10^{-5} dilution; 7: Control

图 5 荧光染料 SYBR green I 处理 RT-LAMP 产物的观察结果
Fig. 5 Observation of RT-LAMP products treated by SYBR green I

2.6 百合样品中 SLRSV 的 RT-LAMP 快速检测结果

采用本研究建立的 RT-LAMP 方法对百合 SLRSV 阳性样品进行检测,并用荧光染料 SYBR Green I 法观察,结果显示,阳性样品均显示明显的绿色。



1,2: SLRSV 阳性百合; 3: LRSV 阴性百合; 4: 空白对照
1,2: Lily with SLRSV; 3: Healthy lily; 4: Negative control

图 6 RT-LAMP 检测百合样品中 SLRSV 的结果
Fig. 6 Detection of SLRSV in the lily by RT-LAMP

3 讨论

目前,草莓潜隐环斑病毒的主要检测方法为 ELISA 和 RT-PCR 技术。两种方法较以前的生物学接种方法来说,在灵敏度、特异性和检测周期等方面已有了很大的进步,但是检测周期仍然在 3.5 h 以上,耗时长,在现场快速检验方面仍显不足;另外,RT-PCR 技术在产物扩增和结果判断方面,均对设备要求较高,不便于口岸对病毒检测的快速筛查。

张跃伟等应用荧光显色检测猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV),结果显示,在敏感性检测中,RT-LAMP 与 RT-PCR 都能检测包含靶基因片段的重组质粒,荧光显色剂判断的结果与浊度判断结果一致^[4];何琳等建立了白斑综合征病毒环介导等温扩增快速检测方法,同时与巢式 PCR 进行了比较分析,结果为最适反应在 64 °C,恒温条件 60 min 内完成,灵敏度较巢式 PCR 高出 100 倍,在 1 h 内即可完成检测^[5];刘佳等建立的 LAMP 技术检测菊花中番

茄不孕病毒的方法为 65 °C 保温 1 h,加入 2 μL 稀释 10 倍的 SYBR Green I,结果表明该方法检测番茄不孕病毒具有高效、快速和灵敏度高等特点^[6]。孙颖杰等建立了牙鲆弹状病毒环介导等温扩增(LAMP)检测方法,该方法的检测限为 30 fg RNA,比常规 RT-PCR 灵敏度高出 100 倍,与其他病毒没有交叉反应,检测时间短,在 1 h 内即可完成检测^[7]。

LAMP 反应后打开盖加染色剂及使用凝胶电泳验证会造成不必要的污染过程,使结果出现假阳性。因此本研究 LAMP 检测方法进行优化时采用电泳观察的方式,以选择最佳的反应体系,从而提高草莓潜隐环斑病毒检测效率。但在实际检测过程中,该方法采用在 LAMP 反应管盖上滴加 SYBR green I 染色剂,待反应结束后在不开盖的情况下直接使染色剂与扩增产物混合,以此减少反复开盖而造成的污染问题。

本试验的 LAMP 检测方法在 1.5 h 内完成了检测的全过程,耗时短;产物扩增只需要恒温水浴锅,对设备要求低;试验发现,本研究建立的 RT-LAMP 检测方法比 RT-PCR 的灵敏度高出 100 倍;且特异性好;结果判断时在 LAMP 反应体系中加入 0.1 μL 荧光染料 SYBR green I,反应结果通过肉眼观察绿色是否生成而进行判定,实现反应及产物检测一步完成,其判断结果和琼脂糖凝胶电泳结果完全一致,快速准确方便;另外,本研究取已用 DAS-ELISA 检测呈 SLRSV 阳性的进境百合样品进行试验,准确率达到 100%。本研究建立的方法适合植物中草莓潜隐环斑病毒的现场筛查及实验室快速检测。

参考文献

- [1] Sanfacon H, Iwanami T, Karasev A V, et al. Family Secoviridae. [M] // King A M Q, Adams M J, Carstens E B, eds. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, 2012: 881-899.
- [2] 周厚成,何水涛. 草莓病毒病研究进展[J]. 果树学报,2003,20(5):421-426.
- [3] 闻伟刚,崔俊霞,赵秀玲,等. 半巢式 RT-PCR 检测进口大豆中菜豆荚斑病毒的研究[J]. 植物病理学报,2006,36(4):296-300.
- [4] 张跃伟,李旭妮,郭盼盼,等. 荧光显色在环介导等温扩增(LAMP)检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的应用[J]. 农业生物技术学报,2010,18(3):508-513.
- [5] 何琳,徐海圣,王美珍,等. 白斑综合征病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 水产学报,2010,34(4):598-603.
- [6] 刘佳,黄丛林,吴忠义,等. 环介导等温扩增技术检测菊花中番茄不孕病毒[J]. 中国农业科学,2010,43(6):1288-1294.
- [7] 孙颖杰,岳志芹,刘莹,等. 牙鲆弹状病毒环介导等温扩增检测方法的建立与应用[J]. 华中农业大学学报,2010,29(2):203-207.