

实验方法与技术

Experimental Method & Technology

一种基于 RPA 的番茄褪绿病毒检测方法

宋建, 薛俊, 孙海波, 王姝, 金凤媚*

(天津市农业生物技术研究中心, 天津 300192)

摘要 番茄褪绿病毒 *Tomato chlorosis virus* (ToCV) 引起番茄褪绿病毒病, 给番茄生产造成严重危害。开发快速准确的检测方法对该病害的防控具有重要意义。利用番茄褪绿病毒外壳蛋白(CP)基因序列, 设计特异性引物, 建立了 ToCV 的重组酶聚合酶等温扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)检测方法, 同时分析了该方法的灵敏度和特异性。结果表明, 建立的 ToCV-RPA 方法在 38℃ 恒温下 40 min 可从 ToCV 阳性的番茄样品中扩增出 246 bp 的特异性条带。扩增时间短, 对设备要求低, 且与番茄其他病毒无交叉反应, 特异性好, 灵敏度可达到 PCR 方法的 10 倍, 适用于 ToCV 的快速检测。

关键词 番茄; 番茄褪绿病毒; 重组酶聚合酶等温扩增

中图分类号: S 436.421.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019168

Detection of *Tomato chlorotic virus* based on RPA

SONG Jian, XUE Jun, SUN Haibo, WANG Shu, JIN Fengmei*

(Tianjin Agricultural Biotechnology Research Center, Tianjin 300192, China)

Abstract *Tomato chlorosis virus* (ToCV) is the pathogen of tomato chlorosis virus disease, which causes serious damage to tomato production. It is important to develop rapid and accurate detection methods for the prevention and control of tomato chlorosis virus disease. Based on the CP gene sequence of ToCV, the specific primers were designed for the detection of virus via recombinase polymerase amplification (RPA). The specificity and sensitivity of the method were evaluated. The result showed that 246 bp specific band from ToCV-positive tomato samples could be amplified by the established ToCV-RPA method. The reaction condition was 38℃ for 40 min. The method has advantages of short operation time, low equipment requirement, and good specificity and there was no cross-reaction with other tomato viruses. The sensitivity was 10 times higher than that of the PCR method. It was suitable for rapid detection of ToCV.

Key words tomato; *Tomato chlorosis virus*; recombinase polymerase amplification (RPA)

番茄褪绿病毒 *Tomato chlorosis virus* (ToCV) 是一种由烟粉虱传播的病毒, 由其引起的番茄褪绿病毒病在我国迅速蔓延, 且逐年加重。番茄褪绿病毒属于长线形病毒科 *Closteroviridae* 毛线病毒属 *Crinivirus*^[1]。ToCV 可以侵染茄科、菊科、藜科、苋科、番杏科、夹竹桃科及白花丹科等科的多种植物^[2], 其中以茄科寄主最多, 如: 番茄^[3]、甜椒^[4]、马铃薯^[5]等。被病毒侵染后植株下部叶片叶脉间慢慢褪绿或黄化, 然后逐渐蔓延至上部叶片, 叶脉逐渐变成深绿色, 染病叶片增厚变脆, 植株长势也变弱, 病症与生

理性缺素症或营养元素缺乏相似^[6]。目前, 番茄褪绿病毒病已经成为我国番茄生产中一种毁灭性的病害, 严重威胁着我国番茄产业的健康发展。

目前, 检测番茄褪绿病毒主要采用 RT-PCR 技术^[7], 而血清学检测方法应用得较少^[8]。分子生物学检测主要是通过病毒的核酸来检测病毒, 它比血清学方法灵敏度高, 能检测到更低数量级的病毒, 特异性强、操作简便、可用于大量样品检测。PCR 技术目前已经成为一种广泛采用的病毒检测方法, 但该技术对仪器的依赖度高, 完成扩增过程需要精密的温度循环

收稿日期: 2019-04-03 修订日期: 2019-06-27

基金项目: 天津市农业科学院青年科研人员创新研究与实验项目(2018011); 天津市种业科技重大专项(16ZXZYNC00070); 天津市农业科技成果转化与推广项目(201901020)

* 通信作者 E-mail: jinfm414@163.com

仪器,加之成本高、耗时长,使其应用大多限制于条件完善的实验室内,难以广泛应用于现场检测。

近年来,等温核酸扩增技术的出现解决了 PCR 技术的局限性,该技术降低了对仪器的要求,缩短了反应时间,因而日益受到关注。重组酶聚合酶扩增技术(RPA)是一种等温核酸扩增技术,可在常温下进行反应,具有反应快、灵敏度高、特异性强、操作简便等优点。目前 RPA 技术在医学病原物的快速诊断中得到了一些应用^[9-10],农业领域中主要用于转基因作物的检测^[11-12],用于植物病毒检测的报道较少。番茄褪绿病毒病是近年来番茄上最严重的病害之一,准确、快速地检测其病原对于病害防治至关重要。本研究建立了基于 RPA 检测番茄褪绿病毒的方法,以期为基础单位提供一种简便适用的快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

感染番茄褪绿病毒 *Tomato chlorosis virus* (ToCV)、番茄黄化曲叶病毒 *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)、番茄花叶病毒 *Tomato mosaic virus* (ToMV)、黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV)、烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV)的番茄叶片采自天津市西青区第六埠温室,阴性对照为脱毒番茄苗,样品经 PCR 检测和序列测定确认后-80℃冻干保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

采用植物总 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa) 提取番茄叶片的总 RNA。用反转录试剂盒 (PrimeScript RT-PCR Kit, TaKaRa) 将提取的总 RNA 反转录合成 cDNA,于-20℃保存备用。

1.2.2 引物设计

根据已发表的 ToCV 外壳蛋白(CP)基因的保守序列设计番茄褪绿病毒的 RPA 检测引物(表 1)。

表 1 设计的 RPA 引物
Table 1 Primers for RPA assay

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence
F1	GATTTGATAAATGAGGTTAGACCCAAAATG
R1	CGTTTCTTTTCATAAGTAGGTTTCGAGATAA
R2	GATCATCTGAGATATTAATCAACGAACCAT
F3	ATCATTTACAATTCAAACATGGCGTATTAC
R3	CATAAGTAGGTTTCGAGATAAGTTGATCATC
F4	TGTTGAACCCGGATACTATTAATTATAACG

1.2.3 RPA 反应

以 1.2.1 合成的 cDNA 为模板,利用设计的 RPA 引物进行扩增,以脱毒番茄苗叶片 cDNA 为阴性对照。RPA 扩增体系(50 μL):向 0.2 mL TwistAmp 反应管 (TwistAmp Basic kits, Twist) 中加入 Rehydration Buffer 29.5 μL,正、反向引物(终浓度为 0.4 μmol/L)各 2.5 μL,模板 cDNA 3 μL,去离子水 10 μL,最后再加入 280 mmol/L 醋酸镁溶液 2.5 μL。将 RPA 扩增体系混合充分后置置于 38℃ 的金属浴上反应 40 min。反应结束后,利用纯化试剂盒(DNA Fragment Purification Kit, TaKaRa)对扩增产物进行回收纯化。

1.2.4 常规 PCR

PCR 反应体系(25 μL):cDNA 2.5 μL,10×PCR buffer(含 Mg²⁺)2.5 μL,去离子水 14 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 2.5 μL,10 mmol/L dNTPs 0.5 μL、5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL。反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,60℃复性 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环;72℃延伸10 min,反应结束后于 4℃保存。

1.2.5 电泳

取 RPA 或 PCR 反应产物 5 μL 于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 20 min,然后通过凝胶成像系统观察电泳结果。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选

分别利用引物对 F1/R1、F1/R2、F1/R3、F3/R1、F3/R3、F4/R1、F4/R2、F4/R3 进行扩增,产物片段的大小分别为 246、115、125、130、150、92、112、440 bp。从图 1 中可以看出各对引物都扩增出目标片段,但 F1/R2、F1/R3、F4/R1、F4/R2 4 对引物的扩增产物不够清晰,F4/R3 除了扩增出目的条带,还有非特异性条带产生,而 F3/R1、F3/R3 在后续试验中重复性不够好,因此最终选定引物组合 F1/R1 作为检测引物。

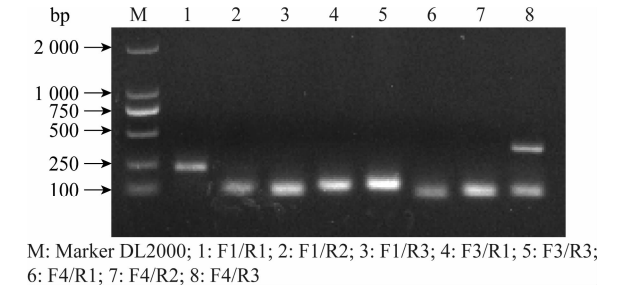


图 1 RPA 引物扩增检测结果
Fig. 1 Amplification result of RPA primer pairs

2.2 RPA 检测方法的灵敏度

将带毒植株的 cDNA 进行 10 倍梯度稀释,浓度分别为 100、10、1、0.1、0.01、0.001 ng/ μ L,按照 1.2.3 所示的反应体系进行 RPA 灵敏度试验,同时参考已经报道的 ToCV 检测引物 CP-F/CP-R^[13]

(扩增产物长度为 840 bp)进行 PCR 灵敏度试验,比较两种方法的检测灵敏度。结果表明,RPA 法的检测灵敏度为 1 ng/ μ L(图 2a),PCR 法的检测灵敏度为 10 ng/ μ L(图 2b),RPA 法的灵敏度要优于 PCR 法。

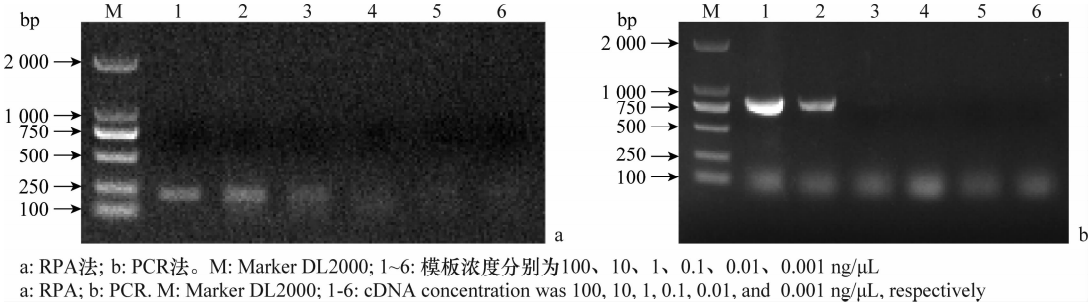


图 2 RPA 法和 PCR 法灵敏度检测结果
Fig. 2 Sensitivity test results of RPA and PCR methods

2.3 RPA 检测方法的特异性

按照 1.2.3 的 RPA 反应体系,检测番茄褪绿病毒、番茄黄化曲叶病毒、番茄花叶病毒、黄瓜花叶病毒、烟草花叶病毒共 5 种病毒的 cDNA,同时以脱毒番茄苗的 cDNA 为阴性对照,评价所建立的 RPA 检测方法的特异性。从图 3 中可以看出只有感染番茄褪绿病毒的番茄叶片对应的 RPA 反应扩增出了目的条带,感染其他种对照病毒的番茄叶片均未扩增出条带,由此证明本试验的 RPA 引物特异性高,可有效检测番茄褪绿病毒。

测番茄褪绿病毒的灵敏度优于常规 PCR 法,缩短了反应时间,也不需要昂贵的仪器,可在简易实验室和田间完成快速检测,为番茄褪绿病毒病的诊断和预警提供了一种高效简便的技术方法,在植物病毒快速检测方面具有一定的实践意义。

RPA 对引物有严格要求,用于扩增反应的引物一般由 30~35 个核苷酸组成,这种较长的引物与模板序列互补性好,使扩增获得的产物特异性更高。RPA 引物的设计没有特殊的方法,只能通过筛选较好的引物进行下一步试验。此外 RPA 对仪器设备的要求较低,不需要 PCR 仪,反应可以通过水浴锅或小型金属浴完成,如果配合琼脂糖凝胶电泳或小型便携式设备,短时间内即可获得检测结果,适合基层单位的快速检测,具有广泛的应用前景。

参考文献

[1] KING A M, ADAMS M J, CARSTENS E B. Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2011.
[2] WINTERMANTEL W M, WISLER G C. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus* [J]. Plant Disease, 2006, 90(6): 814-819.
[3] 赵黎明,李刚,刘永杰,等. 侵染番茄的番茄褪绿病毒山东泰安分离物的分子鉴定和序列分析[J]. 植物保护, 2014, 40(5): 34-39.
[4] 赵汝娜,王蓉,师迎春,等. 侵染甜椒的番茄褪绿病毒的分子鉴定[J]. 植物保护, 2014, 40(1): 128-130.

(下转 184 页)

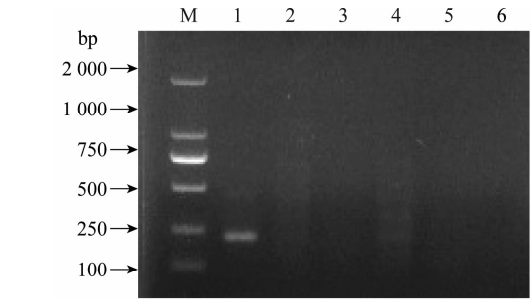


图 3 RPA 法检测番茄褪绿病毒的特异性
M: Marker DL2000; 1: ToCV; 2: TYLCV; 3: ToMV; 4: CMV; 5: TMV; 6: 阴性对照

图 3 RPA 法检测番茄褪绿病毒的特异性
Fig. 3 Specificity test results of RPA for ToCV

3 讨论

本研究建立了一种番茄褪绿病毒的 RPA 检测方法,可以在 38℃等温条件并且在 40 min 内完成目标 cDNA 的快速扩增,可特异性检测番茄褪绿病毒,其他 4 种植物病毒的检测结果均为阴性,RPA 法检

动性极强,可在同一寄主不同部位取食^[26],在嗜食作物不充足的情况下,草地贪夜蛾可能会转移到非嗜食植物上继续取食,此时田间非作物生境可能成为草地贪夜蛾的临时避难场所,其中的杂草等非作物植物也可成为草地贪夜蛾临时产卵和取食的对象。目前,关于草地贪夜蛾对于杂草的取食和产卵偏好性的差异机制还未见详细报道,对此进行进一步探索有利于未来对其进行有效的防控。

参考文献

- [1] LUGINBILL P. The fall army worm [M]. USDA Technology Bulletin, 1928, 34: 91.
- [2] SPARKS A N. A review of the biology of the fall armyworm [J]. Florida Entomologist, 1979, 62(2): 82–87.
- [3] 郭井菲,何康来,王振营. 草地贪夜蛾的生物学特性、发展趋势及防控对策[J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(3): 361–369.
- [4] MONTEZANO D G, SPECHT A, SOSA-GÓMEZ D R, et al. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas [J]. African Entomology, 2018, 26(2): 286–300.
- [5] 赵雪晴,陈福寿,尹艳琼,等. 草地贪夜蛾在云南元谋县青稞、燕麦、糜子田的发生为害特征[J]. 植物保护, 2020, 46(2): 216–221.
- [6] 刘银泉,王雪倩,钟宇巍. 草地贪夜蛾在浙江为害甘蓝[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 90–91.
- [7] 赵猛,杨建国,王振营,等. 山东发现草地贪夜蛾为害马铃薯[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 84–86.
- [8] 何莉梅,赵胜园,吴孔明. 草地贪夜蛾取食为害花生的研究[J]. 植物保护, 2020, 46(1): 28–33.
- [9] 高兴祥,李尚友,李美,等. 土层深度对三种麦田禾本科杂草出苗及生长的影响[J]. 植物保护学报, 2019, 46(5): 1132–1137.
- [10] 孙艳侠. 麦田杂草的发生、危害特点及综防措施[J]. 安徽农业, 2004(1): 28–29.
- [11] 汤清波,王琛柱. 一种测定鳞翅目幼虫取食选择的方法——叶

- 碟法及其改进和注意事项[J]. 昆虫知识, 2007(6): 912–915.
- [12] GRIPENBERG S, MAYHEW P J, PARNELL M, et al. A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects [J]. Ecology Letters, 2010, 13(3): 383–393.
 - [13] 成卫宁,仵均祥,李修炼,等. 美洲斑潜蝇寄主抗虫性与寄主叶片化学物质和物理结构的关系[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2006, 45(5): 71–75.
 - [14] 李子玲,韦绥概,覃爱枝,等. 寄主营养成分含量与甜菜夜蛾生长繁殖的关系[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2006, 28(6): 986–989.
 - [15] 程禹铭. 不同寄主植物对甜菜夜蛾生长发育的影响及甜菜夜蛾寄主选择的化学机制[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
 - [16] 俞晓平,巫国瑞,胡萃. 不同水稻品种对白背飞虱产卵的影响[J]. 浙江农业大学学报, 1990, 16(1): 63–67.
 - [17] 吕仲贤,俞晓平,谢忠平,等. 不同生物型褐飞虱的取食和产卵行为[J]. 植物保护学报, 1999, 26(3): 203–207.
 - [18] 李定银,鄧军锐,张涛,等. 草地贪夜蛾对4种寄主植物的偏好性[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 50–54.
 - [19] 黄芊,凌炎,蒋婷,等. 草地贪夜蛾对三种寄主植物的取食选择性及其适应性研究[J]. 环境昆虫学报, 2019, 41(6): 1141–1146.
 - [20] 袁志华. 亚洲玉米螟寄主种类及其对寄主植物的选择性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
 - [21] 张娜,郭建英,万方浩,等. 甜菜夜蛾对不同寄主植物的产卵和取食选择[J]. 昆虫学报, 2009, 52(11): 1229–1235.
 - [22] 张娜. 甜菜夜蛾对寄主植物的选择性及寄主植物对其发育的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
 - [23] 蒋婷,黄芊,蒋显斌,等. 3种粘虫幼虫对4种寄主植物的取食选择[J]. 南方农业学报, 2017, 48(8): 1415–1420.
 - [24] 徐丽娜,胡本进,苏卫华,等. 安徽发现草地贪夜蛾为害早播小麦[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 87–89.
 - [25] 王芹芹,崔丽,王立,等. 草地贪夜蛾对小麦的为害风险: 取食为害性及解毒酶活性变化初探[J]. 植物保护, 2020, 46(1): 63–68.
 - [26] 唐庆峰,房敏,姚领,等. 取食玉米不同组织对草地贪夜蛾生长发育及营养指标的影响[J]. 植物保护, 2020, 46(1): 24–27.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 170 页)

- [5] FREITAS D, NARDIN I, SHIMOYAMA N, et al. First report of *Tomato chlorosis virus* in potato in Brazil [J]. Plant Disease, 2012, 96(4): 593–594.
- [6] 周涛,杨普云,赵汝娜,等. 警惕番茄褪绿病毒在我国的传播和危害[J]. 植物保护, 2014, 40(5): 196–199.
- [7] 李洁,李慧,丁天波,等. 胶东半岛地区番茄褪绿病毒的快速检测与鉴定[J]. 山东农业科学, 2015, 47(2): 86–89.
- [8] JACQUEMOND M, VERDINER E, DALMON A, et al. Serological and molecular detection of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in tomato [J]. Plant Pathology, 2009, 58(2): 210–220.
- [9] 吴耀东,徐民俊,郑文斌,等. 重组酶聚合酶扩增技术及其在动物病原快速检测中的应用[J]. 中国兽医学报, 2016, 36

(10): 1797–1802.

- [10] 樊晓旭,赵永刚,李林,等. 重组酶聚合酶扩增技术在疾病快速检测中的研究进展[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(8): 72–77.
- [11] 邓婷婷,黄文胜,程奇,等. 重组酶聚合酶扩增技术检测转基因水稻中的 *Cry1Ab/c* 基因[J]. 中国食品学报, 2015, 15(3): 187–193.
- [12] 刘静,武国干,吴潇,等. 重组酶聚合酶扩增技术快速检测转基因玉米 Bt11[J]. 上海农业学报, 2018, 34(1): 20–24.
- [13] HIROTA T, NATSUAKI T, MURAI T, et al. Yellowing disease of tomato caused by *Tomato chlorosis virus* newly recognized in Japan [J]. Journal of General Plant Pathology, 2010, 76(2): 168–171.

(责任编辑: 杨明丽)