实 验 方 法 与 技 术
Experimental Method & Technology

环介导等温扩增技术检测小苍兰花叶病毒

樊荣辉， 黄敏玲*， 钟淮钦， 叶秀仙， 罗远华

（福建省农业科学院作物研究所，福建省农业科学院花卉研究中心，福建省特色花卉工程技术研究中心，福州 350013）

摘要 小苍兰花叶病毒 *Freesia mosaic virus*（FreMV）是侵染兰花的主要病毒，严重影响其观赏价值。本研究根据FreMV的外壳蛋白基因序列设计了一组特异性引物，经过一系列条件优化，建立了该病毒的RT-LAMP检测方法。结果显示设计引物能特异扩增FreMV，与其他4种病毒（菜豆黄花叶病毒 *Bean yellow mosaic virus*、黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus*、建兰花叶病毒 *Cymbidium mosaic virus* 和齿兰环斑病毒 *Odontoglossum ringspot virus*）不发生反应；该方法灵敏度为RT-PCR的10倍。田间检测20份样品中，RT-LAMP和RT-PCR检测结果一致，检出率为60%。在产物中加入荧光染料SYBR Green Ⅰ直接用肉眼观察就可判断样品是否感染FreMV，可省去电泳分析的时间。该方法具有特异性强、灵敏度高、操作简单、快速等特点。

关键词 小苍兰花叶病毒； RT-LAMP； 检测

中图分类号： S 436.8 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2018164

Establishment of a RT-LAMP assay for detection of *Freesia mosaic virus*

FAN Ronghui， HUANG Minling， ZHONG Huaiqin， YE Xiuxian， LUO Yuanhua

（*Crop Research Institute*, *Fujian Academy of Agricultural Sciences*, *Flower Research Center*, *Fujian Academy of Agricultural Sciences*, *Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture*, *Fuzhou* 350013, *China*）

Abstract *Freesia mosaic virus*（FreMV）is one of the main viruses infecting orchids, seriously affecting the ornamental value. In order to establish a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification（RT-LAMP）assay, the primers were designed based on the conserved region of the coat protein（CP）gene of FreMV available in GenBank, and the reaction conditions were optimized. FreMV was specifically identified by RT-LAMP by using these primers, but *Bean yellow mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* were not amplified. The sensitivity of the RT-LAMP assay was 10-fold higher than that of RT-PCR. The positive rate of 20 samples by using the RT-LAMP was 60%, which was consistent to that of RT-PCR, validating the accuracy of the RT-LAMP assay. In addition, PCR products could be visualized by using SYBR Green Ⅰ, and gel electrophoresis was not a necessity. Hence, this RT-LAMP assay is a specific, sensitive and rapid method for detecting FreMV.

Key words *Freesia mosaic virus*； RT-LAMP； detection

小苍兰 *Freesia hybrida* 为鸢尾科香雪兰属花卉，因其花色艳丽、高雅芳香、花序柔美摇曳，深受消费者喜爱。小苍兰花叶病毒 *Freesia mosaic virus*（FreMV）是危害小苍兰最严重、最常见的病毒之一，造成花色杂，植物生长不良，观赏价值降低，甚至造成种球退化，失去再利用的价值，已经成为小苍兰大规模生产的主要限制因素。目前，小苍兰病毒尚无特别有效的化学防治方法，培育和栽培无病毒苗成为防治小苍兰病毒的根本措施，在无毒苗培育过程中，经常需要对母本及脱毒苗进行病毒检测，建立快速、灵敏的检测技术显得尤为重要。

目前，病毒检测主要有酶联免疫法[1]和PCR检测法[2-3]等方法。酶联免疫法是目前较常用的一种方法[4]，但其存在灵敏度不高、假阳性等缺点。近几年，灵敏度较高的PCR技术已成为常规的病毒检测手段[5]，但其对实验设备要求比较高，不利于向基层

收稿日期： 2018-04-11 **修订日期**： 2018-05-23
基金项目： 省属公益类科研院所基本科研专项（2018R1026-6）；福建省农业科学院科技创新团队项目（STIT2017-2-9）
* 通信作者 E-mail：huangml618@163.com

检验部门推广。环介导等温核酸扩增技术(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)采用 6 区域 4 条特异引物,在 DNA 链置换聚合酶(Bst DNA polymerase)作用下,对靶基因进行恒温扩增[6],具有灵敏度高、特异性强、操作简单、快速、检测结果肉眼可判等特点,摆脱了对昂贵仪器的依赖[7-9],能满足基层的检测需要。本研究以 FreMV 的外壳蛋白(CP)基因为靶标基因,设计 4 条引物,建立了可特异检测该病毒的 RT-LAMP 检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

试验由福建省农业科学院花卉育种科技创新团队完成。感染了小苍兰花叶病毒 *Freesia mosaic virus*(FreMV)、菜豆黄花叶病毒 *Bean yellow mosaic virus*(BYMV)、黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus*(CMV)、建兰花叶病毒 *Cymbidium mosaic virus*(CyMV)和齿兰环斑病毒 *Odontoglossum ringspot virus*(ORSV)的阳性样品及健康对照样品的叶片均由本实验室保存。

荧光染料 SYBR Green Ⅰ购自北京鼎国公司;Bst 聚合酶、$MgSO_4$ 购自 New England Biolabs(美国);RNAiso Plus 购自 TaKaRa;甜菜碱购自 Sigma(美国)。

1.2 RT-LAMP 体系的建立

取待测样品的叶片,液氮研磨,按照 RNAiso Plus 说明书提取样品总 RNA,使用 M-MLV 反转录酶逆转录成 cDNA。

根据 GenBank 公布的 FreMV CP 基因保守序列为靶标(FJ618531),设计得到 6 区域的 4 条特异性引物,其中 F3 和 B3 为外引物,FIP 和 BIP 为内引物(表 1)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

反应体系(25 μL):2.5 μL 10× Bst buffer,4 μL $MgSO_4$(25 mmol/ L),4 μL Betaine(5 mmol/L),4 μL dNTPs (2.5 mmol/L),1 μL Bst 聚合酶(8 U/μL),2 μL FIP(20 μmol/L),2 μL BIP(20 μmol/L),0.5 μL F3(10 μmol/L),0.5 μL B3(10 μmol/L),2 μL ddH_2O,2.5 μL cDNA。反应条件为:65℃ 60 min,80℃ 5 min。取 5 μL 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳分析;同时在产物中加入 1 μL 100 倍稀释的 SYBR Green Ⅰ,振荡混匀,目视观察结果。

表 1 RT-LAMP 检测 FreMV 的引物[1)]

Table 1 Primers for RT-LAMP detection of FreMV

引物 Primer code	序列(5′-3′) Sequence	退火温度/℃ Annealing temperature
F3	GACGAGGTGCGATACCAAGC	60.6
B3	CCTTCAATTTTGCCAACCTTGG	58.7
FIP	CACTCCTTGCTTTTCGCCTTCGCgaattcAGCAACTTGACGCTGGGGCT	81.4
BIP	GAGCGCGAAATTGCAAAGAATAGCGgaattcTTGCTCGTGAACCCACATCCAC	79.3

1) gaattc: *Eco*RⅠ酶切位点。
gaattc: Restriction site of *Eco*RⅠ.

1.3 RT-LAMP 产物酶切鉴定

为了确定 LAMP 扩增正确,在设计 LAMP 引物时在 FIP 和 BIP 中引入了 *Eco*RⅠ酶切位点。LAMP 反应产物电泳后,将梯形条带进行胶回收,再用 *Eco*RⅠ于 37℃酶切过夜,连接于 pMD18-T 载体上,转化 JOM109 感受态细胞,测序。

1.4 特异性验证和灵敏度比较

分别提取 BYMV、CMV、CyMV、ORSV、FreMV 阳性样品的总 RNA,采用 RT-LAMP 技术进行检测,琼脂糖凝胶电泳进行分析。

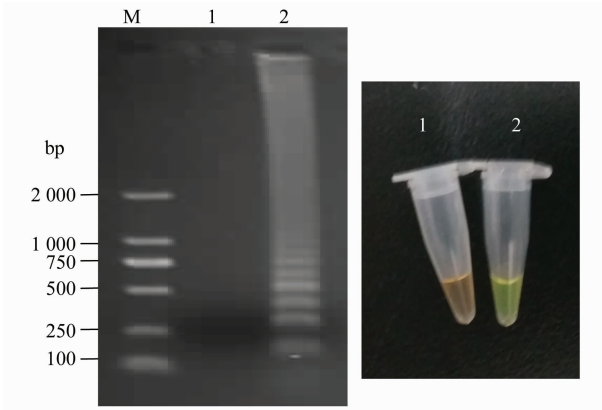
以 FreMV 阳性样品的总 RNA 为模板,进行 10 倍梯度稀释,至 10^{-5} 倍,分别用 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法进行检测。

应用建立的 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法分别对采自田间的 20 份小苍兰样品进行检测。

2 结果与分析

2.1 RT-LAMP 体系建立

通过反应体系的优化,建立了能检测 FreMV 的 RT-LAMP 反应体系(图 1)。FreMV 阳性样品产生特殊的阶梯状条带,而阴性对照没有条带;产物中加入 SYBR Green Ⅰ后,阳性产物颜色变为黄绿色,阴性对照为红棕色。



M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: LAMP产物
M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2: LAMP product

图 1　RT-LAMP 检测 FreMV

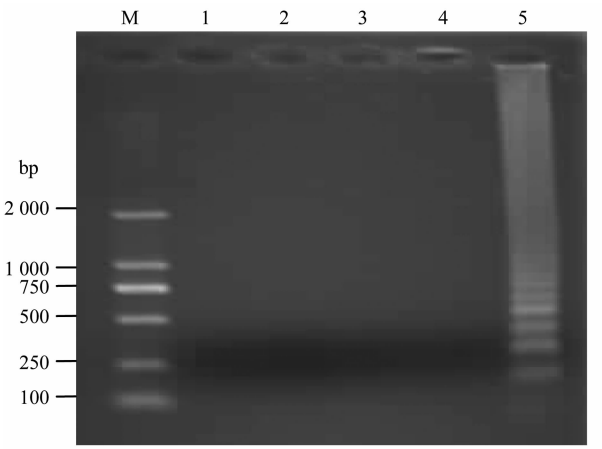
Fig. 1　Detection of FreMV by RT-LAMP

2.2　RT-LAMP 产物酶切鉴定

将 LAMP 产物胶回收后,用 *Eco*R Ⅰ酶切如图 2,并进行转化测序,结果表明,酶切片段为靶基因上 F2 至 B2 的片段,大小为 141 bp(包括酶切碱基)。证明该体系扩增产物为靶基因。

2.3　特异性验证

分别以 CMV、BYMV、CyMV、ORSV 和 FreMV 阳性样品总 RNA 为模板,进行 RT-LAMP 扩增。如图 2 所示,只有 FreMV 有梯状条带,检测结果为阳性,其他样品未扩增出条带,说明建立的检测体系对 FreMV 检测有较好的特异性。



M: DL2000 DNA Marker; 1~5: BYMV、CMV、CyMV、 ORSV和 FreMV
M: DL2000 DNA Marker; 1–5: BYMV、CMV、CyMV、 ORSV and FreMV, respectively

图 2　RT-LAMP 检测 FreMV 的特异性分析

Fig. 2　Specificity assay of RT-LAMP for detection of FreMV

2.4　RT-LAMP 和 RT-PCR 灵敏度比较

对 FreMV 阳性样品的总 RNA 进行不同浓度稀释后,分别进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 反应。结果显示,RT-LAMP 在稀释 1 000 倍时,仍能检测出 FreMV,而 RT-PCR 在稀释 100 倍还能检测出 FreMV,稀释 1 000 倍时,未检出 FreMV(图 3),表明 RT-LAMP 检测 FreMV 的灵敏度是 RT-PCR 的 10 倍。

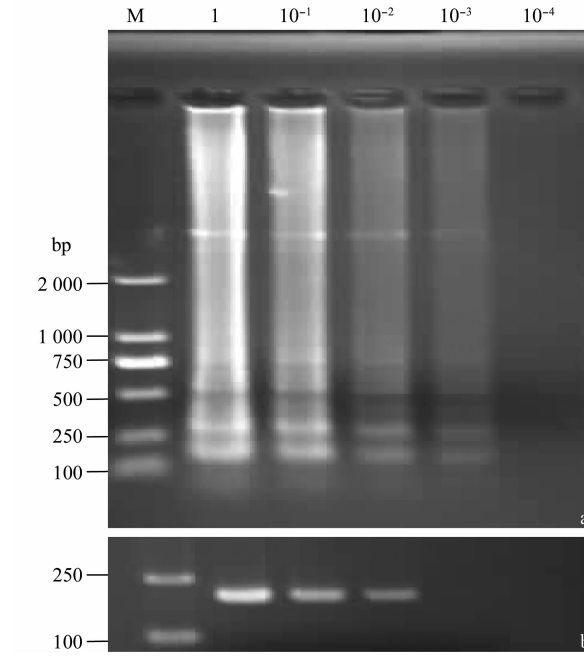


图 3　RT-LAMP(a)与 RT-PCR(b)检测 FreMV 灵敏度比较

Fig. 3　Comparison of sensitivity of RT-LAMP (a) and RT-PCR (b) for detection of FreMV

2.5　田间样品检测

随机采取小苍兰样品 20 份,分别进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测,结果显示,两种方法检测结果一致,12 份样品呈阳性(表 2),表明 RT-LAMP 可应用于田间样品的检测。

表 2　田间小苍兰样品的检测

Table 2　Detection of field samples of *Freesia hybrida*

方法 Method	检测样品数/份 No. of samples detected	阳性样品数/份 No. of positive samples	阳性检出率/% Positive rate
RT-LAMP	20	12	60.0
RT-PCR	20	12	60.0

3　讨论

小苍兰由于香气浓郁,花色种类丰富,颜色鲜艳,备受人们喜爱,是重要的切花及盆花。但当病毒病积累时会造成种球退化,限制小苍兰大规模生产。对种球进行复壮及培育无病毒苗是防止病毒病的重要措施,因此,建立快速、准确、高效的检测方法,及

时检测出带毒种球或脱毒苗，对阻止病毒病的传播，从根源上预防病毒病具有重要意义。本试验针对小苍兰花叶病毒建立的环介导等温扩增技术具有扩增快速、高效、特异性好、操作简便、不需要特殊仪器等优点，可以针对性地对小苍兰复壮种球和脱毒种苗进行检测，从种源遏制病毒病的发生。本研究技术具有较高的应用价值，在基层和现场检测中有很好的应用前景。

目前，常用的病毒检测方法是 PCR 和酶联免疫技术，这些方法均具有较好的检测效果，但也存在耗时长，成本高的特点，不太适用于基层检测。与常规 PCR 方法相比，本研究建立的 LAMP 技术保持了 PCR 技术优点，且不需特殊仪器，成本低，由于不需要热循环，整个过程可以在 60 min 内完成，更加省时。若在 PCR 产物中加入 SYBR Green Ⅰ可目测检测结果，检测更快捷方便，适合在基层应用。

LAMP 技术使用 4～6 条引物，会进一步增强反应的特异性[10-11]。引物设计至关重要，也较复杂和困难，除要遵循一般引物设计原则外，还有 LAMP 引物设计自身要注意的事项[12]。对于 GC 含量较高序列或较短序列其引物设计更加困难[13]。本试验针对小苍兰花叶病毒 CP 基因设计引物，经验证该引物的特异性良好。同时，本试验建立的 LAMP 方法检测 FreMV 具有较高的灵敏度，是 RT-PCR 的 10 倍，在病毒含量很少的脱毒苗的快速检测方面有一定的优势。

参考文献

[1] HU J S, FERREIRA S, WANG M, et al. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *Tomato spotted wilt virus*, and potyviruses infecting orchids in Hawaii [J]. Plant Disease, 1993, 77(5): 464－468.

[2] MENZEL W, JELKMANN W, MAISS E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control [J]. Journal of Virological Methods, 2002, 99: 81－92.

[3] THOMPSON J R, WETZEL S, KLERKS M M, et al. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control [J]. Journal of Virological Methods, 2003, 111(2): 85－93.

[4] 梁敏国，刘光华. 广东兰花病毒病调查和病原检测[J]. 江西植保，2004，27(3)：97－100.

[5] 柳爱春，赵芸，刘超，等. 双重一步法 RT-PCR 检测 2 种主要兰花病毒[J]. 安徽农业科学，2009，37(27)：12960－13009.

[6] NOTOMI T, OKAYMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.

[7] HARPER S J, WARD L I, CLOVER G R G. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications[J]. Phytopathology, 2010, 100(12): 1282－1288.

[8] RANJAN R, KANJAYAN M, SUBRAMANIAM S, et al. Development and evaluation of a one-step reverse transcription-loop mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP) for rapid detection of foot and mouth disease virus in India [J]. Virus Disease, 2014, 25(3): 358－364.

[9] SINGH P, MIRDHA B R, AHUJA V, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Entamoeba histolytica* in amoebic liver abscess [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2013, 29(1): 27－32.

[10] 高宏伟，徐彪，朱来华，等. 应用 LAMP 检测方法检测肉制品中的单增李斯特菌[J]. 食品安全质量检测学报，2010，27(1)：12－17.

[11] ZHANG Yaoqi, SHAN Xiaoxiao, SHI Lei, et al. Development of a *fim Y*-based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Salmonella* in food [J]. Food Research International, 2012, 45(2): 1011－1015.

[12] 王永，兰青阔，赵新，等. 转基因作物外源转基因成分环介导等温扩增技术检测方法的建立及应用[J]. 中国农业科学，2009，42(4)：1473－1477.

[13] CHEN Lili, GUO Jinchao, WANG Qidi, et al. Development of the visual loop-mediated isothermal amplification assay for seven genetically modified maize events and their application in practical samples analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(11): 5914－5918.

（责任编辑：杨明丽）