

马铃薯卷叶病毒 PLRV RT-LAMP 检测方法优化

高彦萍^{1,3}, 张 武^{1,3}, 王国祥², 席春艳¹, 吴雁斌^{1,3}, 梁宏杰^{1,3}, 吕和平^{1,3*}

(1. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院中药材研究所, 兰州 730070;

3. 甘肃省马铃薯脱毒种薯(种苗)病毒检测及安全评价工程技术研究中心, 兰州 730070)

摘要 马铃薯卷叶病毒 *Potato leafroll virus* (PLRV) 是目前严重影响马铃薯产量与品质的主要病毒之一, 给马铃薯产业造成巨大损失。本研究采用环介导等温核酸扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术建立 PLRV 的 RT-LAMP 检测方法。采取单因素变化试验, 对 RT-LAMP 反应体系中多个因素包括引物组合、温度条件及 Mg^{2+} 、betaine、Bst 3.0 DNA 聚合酶、dNTPs、UNG、SYBR Green I 和引物组合的浓度进行一系列试验和优化。采用 RT-PCR 检测方法进行平行对比试验, 对优化后的 RT-LAMP 反应体系进行了验证。结果表明, 最佳引物组合为 P3, 最适反应温度 62°C , $25\ \mu\text{L}$ 反应体系中, Mg^{2+} 、betaine、Bst 3.0 DNA 聚合酶和 UNG 的最佳终浓度分别为 $4\ \text{mmol/L}$ 、 $0\ \text{mmol/L}$ 、 $0.64\ \text{U}/\mu\text{L}$ 和 $0.08\ \text{U}/\mu\text{L}$, dNTPs 的最佳用量为 $1\ \mu\text{L}$ (dATP、dGTP、dCTP 各 $0.4\ \text{mmol/L}$, dUTP $1.2\ \text{mmol/L}$), SYBR Green I ($20\times$) 的最佳用量 $1\ \mu\text{L}$, primer mix 的最佳用量 $2.5\ \mu\text{L}$ (PLRV-FIP/BIP、PLRV-F3/B3 和 PLRV-LF/LB 的浓度分别为 0.8 、 $0.2\ \mu\text{mol/L}$ 和 $0.6\ \mu\text{mol/L}$), RNA 模板 $1\ \mu\text{L}$ ($2\ \text{ng}/\mu\text{L}$), 加 DEPC- H_2O 至 $25\ \mu\text{L}$, 反应时间 $50\ \text{min}$ 。优化后的 RT-LAMP 检测结果与 RT-PCR 一致, 且可视化判读结果。因此, 建立的 PLRV RT-LAMP 检测方法为进一步开发 RT-LAMP 检测试剂盒及其实际应用奠定了基础。

关键词 马铃薯卷叶病毒(PLRV); 反转录环介导等温扩增(RT-LAMP); 检测方法

中图分类号: S 435.32 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018484

Optimization of the PLRV RT-LAMP detection method

GAO Yanping^{1,3}, ZHANG Wu^{1,3}, WANG Guoxiang², XI Chunyan¹, WU Yanbin^{1,3}, LIANG Hongjie^{1,3}, LÜ Heping^{1,3}

(1. *Potato Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China*; 2. *Institute of Chinese Herbal Medicines, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China*; 3. *Gansu Engineering Technology Research Center of Potato Seed (Seedling) Virus Detection and Evaluation, Lanzhou 730070, China*)

Abstract *Potato leafroll virus* (PLRV) is currently one of the main threats for the yield and quality of potatoes, having caused tremendous damages to the potato industry. In this study, a PLRV reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method was established based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Single-factor experiments were conducted to test and optimize the RT-LAMP reaction system, including the primers, temperature, Mg^{2+} , betaine, Bst 3.0 DNA polymerase, dNTPs, UNG, SYBR Green I and primer mix concentrations. The optimized RT-LAMP reaction system was then verified through parallel-controlled test using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. The results showed that, in the optimized reaction conditions, the primer pair was P3 and the reaction temperature was 62°C ; in the $25\ \mu\text{L}$ reaction system, the concentrations of Mg^{2+} , betaine Bst 3.0 DNA polymerase, and UNG were $4\ \text{mmol/L}$, $0\ \text{mmol/L}$, $0.64\ \text{U}/\mu\text{L}$, and $0.08\ \text{U}/\mu\text{L}$, respectively; the dosage for dNTPs was $1\ \mu\text{L}$ ($0.4\ \text{mmol/L}$ for dATP, dGTP, and dCTP, respectively, and $1.2\ \text{mmol/L}$ for dUTP); the dosage for SYBR Green I ($20\times$) was $1\ \mu\text{L}$; the dosage for the primer mix was $2.5\ \mu\text{L}$ (the corresponding concentrations for PLRV-FIP/BIP, PLRV-F3/B3, and PLRV-LF/LB was $0.8\ \mu\text{mol/L}$, $0.2\ \mu\text{mol/L}$, and $0.6\ \mu\text{mol/L}$, respectively); for the $1\ \mu\text{L}$ RNA template ($2\ \text{ng}/\mu\text{L}$), additional DEPC- H_2O was added to get a final $25\ \mu\text{L}$ volume, and the reaction time was $50\ \text{min}$. The

收稿日期: 2018-11-23

修订日期: 2019-02-17

基金项目: 甘肃省农业生物技术与应用开发项目(GNSW-2016-15); 国家重点研发计划(2017YFD0201602-4, 2018YFD020080501); 甘肃省农业科学院院列项目(2019GAAS04, 2017GAAS29, 2017GAAS90)

* 通信作者 E-mail: lhaping@qq.com

optimized RT-LAMP provided the same detection result as RT-PCR and the interpretation could be visualized. These results confirmed that our PLRV RT-LAMP reaction system provides a basis for further developing RT-LAMP detection kits and for their practical application.

Key words *Potato leafroll virus*(PLRV); RT-LAMP; reaction system

马铃薯 *Solanum tuberosum* 是世界第四大粮食作物^[1]。病毒病是引起马铃薯退化的主要原因。马铃薯卷叶病毒 *Potato leafroll virus* (PLRV)是目前严重影响马铃薯产量与品质的主要病毒之一,给马铃薯产业造成巨大损失^[2-3]。病毒检测是马铃薯病毒病害防治、预测预报、脱毒种薯(苗)培育等过程中的一个重要环节。PLRV 检测主要有 ELISA^[4]、RT-PCR^[5]、多重 RT-PCR^[6]、real-time RT-PCR^[7]、基因芯片亦称为 DNA 微点阵(DNA microarray)等方法。ELISA 法虽然高通量,但耗时长、程序不简便、灵敏度较低;而 RT-PCR、多重 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 核酸检测技术虽然具有灵敏度和特异性高以及同步性等优点,但存在仪器昂贵、成本高、专业性强,技术难度大和成本高问题,难以在生产实际中推广应用。环介导等温核酸扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是 Notomi 等^[8]2000 年建立的一种的分子检测技术,该技术针对靶基因的 6 个特定区域设计 4 种特异性引物,利用 DNA 链置换聚合酶(Bst DNA polymerase),在恒温(60~65℃)条件下对靶基因进行扩增,具有特异性强、灵敏度高、操作简单、快速且适合于多种检测环境等优点。自开发以来,被广泛应用于许多领域的基因检测^[9-12]。RT-LAMP 技术在植物病毒检测方面亦表现出简便、快捷、准确的特点^[13-14]。本研究对 PLRV RT-LAMP 反应体系中多个因子进行了优化,建立了 PLRV RT-LAMP 检测方法,旨在为 PLRV RT-LAMP 检测试剂盒的进一步开发及实际应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 生物材料

本试验所用 PLRV 阴、阳性对照是甘肃省马铃薯脱毒种薯(种苗)病毒检测及安全评价工程技术研究中心实验室保存的离体组培苗。

1.1.2 主要试剂

植物多糖多酚 RNA 提取试剂盒[RNAprep Pure Plant Kit(Q5613)]购自天根公司, RNasin ribonuclease inhibitor、M-MLV reverse transcriptase、rTaq

DNA polymerase、UNG(RNase inhibitor)、MgSO₄、dNTP mix 等购自 TaKaRa 公司, Bst 3.0 DNA polymerase 购自 New England Biolabs 公司, Betaine、SYBR Green I 等购自索莱宝公司, DEPC 购自 Vetec 公司, GeneFinder™ 购自至善生物公司, 硝基四氮唑蓝(NBT)、琼脂糖等购自 Promega 公司, DAS-ELISA 试剂盒购自 Bio-Rad 公司。

1.1.3 主要仪器

VORTEX-GENIE2/2T 漩涡混匀仪(美国 SI)、iCEN-24 台式高速离心机(杭州奥盛公司)、君意-JY600C 电泳仪(北京君意公司)、Tanon-3500R 琼脂凝胶成像系统(上海天能公司)、Nano Drop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)、BIO-RAD T100™ Thermal Cycler(BIO-RAD)、笔式紫外灯 11SC-1(Spectronics 公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

已有研究表明,世界上已报道 PLRV 全基因序列高度同源,较其他种类病毒存在序列的保守性^[7,15];PLRV 的 CP 基因同样具有高度的同源性及核酸一致率^[16]。从 GenBank 检索并下载 PLRV 的 CP 基因序列,通过比对获得保守区域,利用 Primer Explorer V 4.0 软件设计 4 组 RT-LAMP 引物,经试验筛选出 1 组特异性引物。RT-PCR 采用标准 SN/T 2627-2010 中的引物序列^[17]。引物信息见表 1。引物由上海生工生物公司合成。

1.2.2 RNA 的提取

使用天根公司的植物多糖多酚 RNA 提取试剂盒,根据试剂盒提供的步骤抽提病毒 RNA 总核酸,测定浓度后-80℃下保存备用。

1.2.3 RT-LAMP 基本体系

基本反应体系参考 Bst 3.0 DNA polymerase 说明书。25 μL 反应体系: 2.5 μL 10×Bst buffer, 1.5 μL 100 mmol/L MgSO₄ (10×Bst buffer 中已包含 20 mmol/L MgSO₄), 0~1.2 μL 1 mmol/L betaine, 0.5~2.0 μL Bst 3.0 DNA polymerase (8 U/μL), 0.5~2.0 μL dNTPs (10 mmol/L dATP、dGTP 和 dCTP, 30 mmol/L dUTP), 1~4.0 μL 10×primer

mix (8 $\mu\text{mol/L}$ FIP/BIP; 2 $\mu\text{mol/L}$ F3/B3; 6 $\mu\text{mol/L}$ Loop F/R), 0.5~1.5 μL UNG(2 U/ μL), 0.5~2.0 μL 20 $\times$ SYBR Green I, 1 ng~1 μg 模板 RNA, 加 DEPC-H₂O 至 25 μL , 60~70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min~1 h。

表 1 RT-LAMP 和 RT-PCR 特异性检测 PLRV 的引物
Table 1 Primers used for PLRV detection by RT-LAMP and RT-PCR

扩增类型 Amplification type	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'-3')
RT-LAMP	PLRV-F3	GGAAGGAAAACCGGTGGAA
	PLRV-B3	GTTCAGGTGGGTGCCCTTG
	PLRV-FIP	CATCGGATACGTCGTCAGACGGAGGGACGAAACCCCGATAC
	PLRV-BIP	ACTGAGTCGCTGCGATTGGAGTGGGCCAGTCTGTACCAT
	PLRV-LF	CAGGTTGTCTTTCTGCGTTT
	PLRV-LB	AGTACCTACGATGCTACAGTCG
RT-PCR	PLRV-F	CGCGCTAACAGAGTTCAGCC
	PLRV-R	GCAATGGGGGTCCAACTCAT

1.2.4 RT-LAMP 检测体系优化

通过单因素变化试验分别对 RT-LAMP 体系中的反应温度和引物浓度等条件进行优化。设置反应温度 50、55、60、62.5、65、70 $^{\circ}\text{C}$, Mg^{2+} 浓度 1、2、4、6、8 mmol/L, betaine 浓度 0、0.4、0.8、1.0、1.2 mmol/L, Bst 3.0 DNA 聚合酶(8 U/ μL)加入量 0.1、0.3、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 μL , dNTPs 加入量 0.4、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 μL 等(10 mmol/L dATP、dCTP 和 dGTP, 30 mmol/L dUTP); UNG 浓度(2 U/ μL), 加入量 0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 μL , SYBR Green I (20 $\times$) 加入量 0.5、1.0、1.5、2.0 μL , 10 $\times$ primer mix (8 $\mu\text{mol/L}$ FIP/BIP; 2 $\mu\text{mol/L}$ F3/B3; 6 $\mu\text{mol/L}$ LF/LR)加入量 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 μL , 反应时间根据实时荧光 PCR 的扩增曲线进行判断。为了及时发现 RT-LAMP 试验过程中的气溶胶污染, 设置不加 RNA 模板对照(no template control, NTC)和阴性对照(negative control)。qPCR 测定反应条件和主要组分不同梯度的 C_t 值变化, 结合琼脂糖凝胶电泳扩增条带分析, 确定不同因子的最佳条件或浓度。

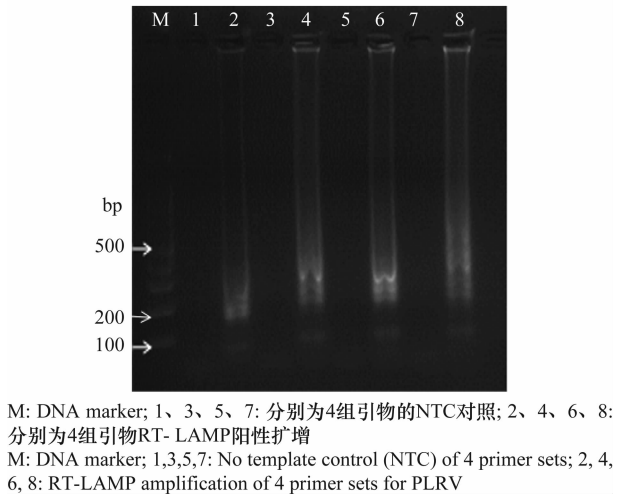
1.2.5 RT-LAMP 反应体系验证

对优化的 RT-LAMP 反应体系, 采用 RT-PCR 进行平行比对验证, RT-PCR 检测按标准 SN/T 2627-2010^[14] 的改进方法进行。结果判读: RT-PCR 扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳分析。RT-LAMP 扩增产物(1)反应结束后, 取产物 5 μL 用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析; (2)加入 1 μL 1 000 $\times$ SYBR Green I, 振荡混匀, 直接目视观察结果, 或者加入 1 μL 50 $\times$ SYBR Green I, 振荡混匀, 紫外线下观察结果。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

用 RT-LAMP 基本反应体系(各组分参考数值范围取中值), 对设计的 4 组引物(P1~P4)进行筛选, 反应产物琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 4 组引物均能扩增出条带, 其中 P3 组扩增条带亮度最好, 故选用 P3 组作为体系优化的引物(图 1)。

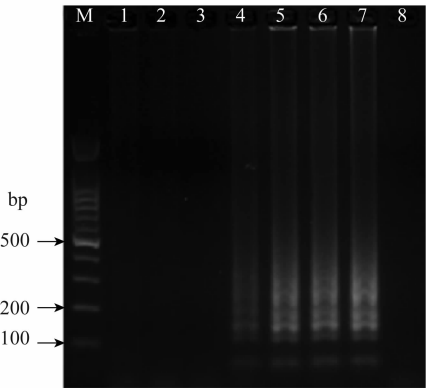


M: DNA marker; 1、3、5、7: 分别为4组引物的NTC对照; 2、4、6、8: 分别为4组引物RT-LAMP阳性扩增
M: DNA marker; 1,3,5,7: No template control (NTC) of 4 primer sets; 2, 4, 6, 8: RT-LAMP amplification of 4 primer sets for PLRV

图 1 PLRV RT-LAMP 不同引物组扩增结果电泳分析
Fig. 1 Electrophoresis analysis of RT-LAMP amplified products in different primer sets for PLRV

2.2 反应温度优化

利用筛选获得的引物组, 设置 6 个反应温度梯度 50、55、60、62.5、65、70 $^{\circ}\text{C}$, NTC 对照和阴性对照温度 62.5 $^{\circ}\text{C}$ 。结果显示该引物的反应温度条件较为宽松, 温度 55~65 $^{\circ}\text{C}$ 均有扩增条带, 60~65 $^{\circ}\text{C}$ 扩增条带亮度清晰, 试验体系反应温度确定为 62 $^{\circ}\text{C}$ (图 2)。



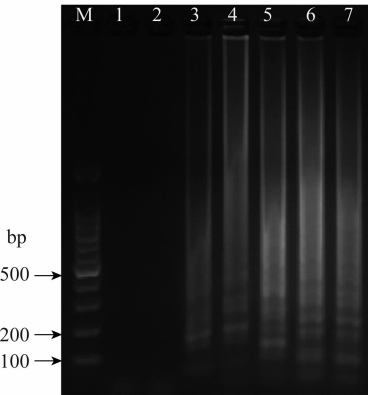
M: DNA marker; 1: NTC对照; 2: 阴性对照; 3~8: 50、55、60、62.5、65、70℃
M: DNA marker; 1: NTC; 2: Negative control; 3-8: 50, 55, 60, 62.5, 65, 70℃

图2 PLRV RT-LAMP 反应温度优化

Fig. 2 Optimization of reaction temperature for PLRV RT-LAMP

2.3 Mg²⁺ 浓度优化

设置 Mg²⁺ 浓度 5 个梯度 1、2、4、6、8 mmol/L 进行试验, NTC 对照和阴性对照 Mg²⁺ 浓度为 4 mmol/L。结果显示 RT-LAMP 反应在 Mg²⁺ 浓度为 2~8 mmol/L 4 个反应条件下均有扩增, Mg²⁺ 浓度大于 4 mmol/L, 瀑布状条带清晰明显(图 3), 扩增曲线的 Ct 值随 Mg²⁺ 浓度变化呈先降后升的趋势, Mg²⁺ 浓度为 4 mmol/L 时, Ct 值最低(表 2)。因此, RT-LAMP 检测 Mg²⁺ 浓度采用 4 mmol/L。



M: DNA marker; 1: NTC对照; 2: 阴性对照; 3~7: 1、2、4、6、8 mmol/L
M: DNA marker; 1: NTC; 2: Negative control; 3-7: 1, 2, 4, 6, 8 mmol/L

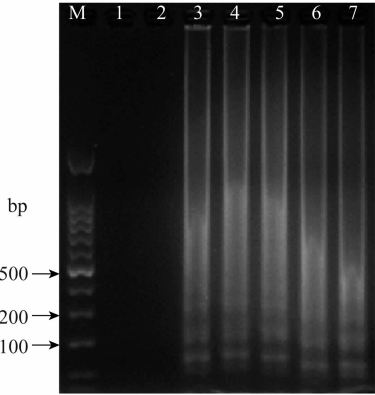
图3 PLRV RT-LAMP Mg²⁺ 反应浓度优化

Fig. 3 Concentration optimization of Mg²⁺ for PLRV RT-LAMP

2.4 Betaine 浓度优化

分别设置 5 个 betaine 浓度梯度 0、0.4、0.8、1.0、1.2 mmol/L, NTC 对照和阴性对照的 betaine 浓度为 0.8 mmol/L。结果显示, RT-LAMP 反应在 betaine 浓度为 0~1.2 mmol/L 5 个浓度梯度下均有扩增, 随 betaine 浓度的变化, 瀑布状条带变化不明显

(图 4), betaine 浓度为 0 mmol/L 时, 扩增曲线 Ct 值最小(表 2)。因此, betaine 的最佳浓度为 0 mmol/L。



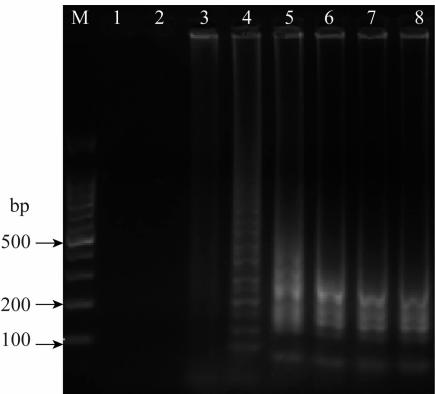
M: DNA marker; 1: NTC对照; 2: 阴性对照; 3~7: 0、0.4、0.8、1.0、1.2 mmol/L
M: DNA marker; 1: NTC; 2: Negative control; 3-7: 0, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2 mmol/L

图4 PLRV RT-LAMP betaine 反应浓度优化

Fig. 4 Concentration optimization of betaine for PLRV RT-LAMP

2.5 dNTPs 浓度优化

设置 6 个 dNTPs (dATP、dGTP 和 dCTP 10 mmol/L each, dUTP 30 mmol/L) 浓度梯度, 加入量分别为 0.4、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 μL, NTC 对照和阴性对照的加入量为 1.0 μL。结果显示, dNTPs 加入量在 0.4~1.6 μL 均有扩增, 加入量 1.0 μL 时, 扩增条带最亮(图 5)。扩增反应的 Ct 值随 dNTPs 加入量呈先降后升的趋势, dNTPs 加入量为 1.0 μL 时 Ct 值最小(表 2)。因此, RT-LAMP 检测时 dNTPs 加入量采用 1.0 μL(对应浓度 dATP、dGTP 和 dCTP 0.4 mmol/L, dUTP 1.2 mmol/L)。



M: DNA marker; 1: NTC对照; 2: 阴性对照; 3~8: 0.4、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 μL
M: DNA marker; 1: NTC; 2: Negative control; 3-8: 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 μL

图5 PLRV RT-LAMP dNTPs 反应浓度优化

Fig. 5 Concentration optimization of dNTPs for PLRV RT-LAMP

2.6 Bst 3.0 DNA 聚合酶浓度优化

设置 Bst 3.0 DNA 聚合酶(8 U/μL)加入量为 0.1、0.3、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 μL,NTC 对照和阴性对照的加入量为 1.0 μL。结果显示,酶的加入量越多,凝胶电泳的瀑布状条带越明显。酶的加入量为 0.1~0.5μL 时,有较弱的扩增,Ct 值较大;当酶的加入量为 0.75~2.0 μL 时,Ct 值随酶加入量增大而减小,酶的加入量 2.0 μL 时,Ct 值最小(表 2)。因此,选择 BST 3.0 DNA 聚合酶(8 U/μL)的加入量为 2.0 μL(对应浓度为 0.64 U/μL)。

2.7 UNG 浓度优化

UNG(2 U/μL),设置 6 种不同的浓度梯度,加入量分别为 0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 μL,NTC 对照和阴性对照的加入量为 1.0 μL。结果显示,UNG 加入量在 0.5~1.25 μL 有扩增,1.5 μL 无扩增,在 0.5~1.25 μL,Ct 值随 UNG 加入量增加呈先降后升的趋势,UNG 加入量为 1 μL 时 Ct 值最低(表 2),因此,RT-LAMP 检测时 UNG 加入量为 1 μL。

2.8 SYBR Green I 浓度优化

设置 4 个 SYBR Green I (20×)浓度,加入量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 μL,NTC 对照和阴性对照的加入量为 1.0 μL。结果显示,SYBR Green I 加入量在 0.5~2.0 μL 时均有扩增;Ct 值随 SYBR Green I 加入量的增加并无显著降低,表明染料浓度在一定范围内对 RT-LAMP 扩增反应无显著影响,加入量 1 μL 时 Ct 值相对较低(表 2)。因此,RT-LAMP 检测时 SYBR Green I 加入量为 1 μL。

2.9 Primer mix 浓度筛选

设置 7 组 primer mix(10×,8 μmol/L FIP/BIP,2 μmol/L F3/B3,6 μmol/L LF/LR)浓度,加入量分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 μL,阴性对照加入 2.5 μL。结果显示,primer mix 加入量在 1.0~4.0 μL 时均有扩增,在 2.5~4.0 μL 时扩增效率较高,但扩增 Ct 值差别不大,表明 primer mix 加入量在超过 2.5 μL 时达到饱和(表 2)。由于 primer mix 加入量为 2.5 μL 时 Ct 值相对最小,因此,RT-LAMP 检测时 primer mix 加入量为 2.5 μL(0.8 μmol/L PLRV-FIP/BIP,0.2 μmol/L PLRV-F3/B3,0.6 μmol/L PLRV-LF/LB)。

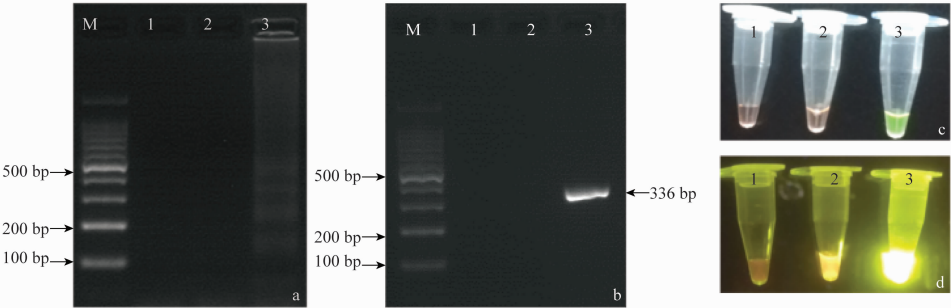
表 2 不同因素的不同浓度处理及其对应的 Ct 值

Table 2 Responses of the Ct values to different treatments of multiple factors in the PLRV RT-LAMP reaction system													
Mg ²⁺ / mmol·L ⁻¹	Ct	Betaine/ mmol·L ⁻¹	Ct	dNTPs/ μL	Ct	Bst 3.0/ U·μL ⁻¹	Ct	UNG/μL	Ct	SYBR Green I/μL	Ct	Primer mix/μL	Ct
1	31.12	0	23.48	0.4	36.96	0.10	36.78	0.50	38.12	0.5	30.66	1.0	36.54
2	26.25	0.4	26.00	0.8	29.42	0.30	35.64	0.75	35.36	1.0	27.14	1.5	33.35
4	27.25	0.8	24.45	1.0	26.42	0.50	27.54	1.00	26.22	1.5	30.26	2.0	30.92
6	32.43	1.0	25.96	1.2	28.62	0.75	26.44	1.25	30.41	2.0	30.31	2.5	24.96
8	38.82	1.2	25.82	1.4	35.55	1.00	25.55	1.50	36.87	—	—	3.0	26.78
—	—	—	—	1.6	>38	1.50	23.32	—	—	—	—	3.5	26.86
—	—	—	—	—	—	2.00	22.36	—	—	—	—	4.0	26.00

2.10 RT-LAMP 反应体系验证

对上述优化后的 RT-LAMP 反应体系采用 RT-PCR 进行平行比对验证。结果表明:RT-LAMP 检测结果与 RT-PCR 一致(图 6a~b)。RT-LAMP 反应产物中加入高浓度(1 000×)SYBR Green I 后,

阳性产物颜色变为绿色,NTC 和阴性对照产物颜色为褐色,加入低浓度(50×)SYBR Green I 后,紫外线下(笔式紫外灯)阳性样品发出强荧光,NTC 和阴性对照没有荧光(图 6c~d)。因此,RT-LAMP 检测可通过肉眼观察直接判断结果,较 RT-PCR 简单容易。



M: DNA marker; 1: NTC对照; 2: 阴性样品。a: RT-LAMP; b: RT-PCR; c: RT-LAMP扩增产物加SYBR Green I 自然光显色; d: RT-LAMP扩增产物加SYBR Green I 紫外显色
M: DNA marker; 1: NTC control; 2: Negative control; 3: Positive sample of PLRV. a: Detection of PLRV by RT-LAMP; b: Detection of PLRV by RT-PCR; c: RT-LAMP products detected directly by chromogenic method of SYBR Green I; d: RT-LAMP products detected directly by SYBR Green I under the ultraviolet

图 6 RT-LAMP 反应体系验证

Fig. 6 Validation of the PLRV RT-LAMP reaction system by RT-PCR

3 结论与讨论

本研究基于 PLRV CP 基因序列,设置了 4 组 LAMP 引物,筛选出最佳引物组 P3,对反应条件及主要组分,包括反应温度、 Mg^{2+} 、betaine、Bst 3.0 DNA 聚合酶、dNTPs、UNG、SYBR Green I 和引物组合等的浓度,采用单因素变化法进行了筛选优化。从结果看出,对 PLRV RT-LAMP 检测影响较明显的因子有引物及其浓度、 Mg^{2+} 浓度、Bst 3.0 DNA 聚合酶浓度、dNTPs 浓度和 UNG 浓度,影响较小的因子是 SYBR Green I 浓度和反应温度。最佳引物组为 P3,在 25 μ L 反应体系中:primer mix 的最佳加入量为 2.5 μ L (PLRV-FIP/BIP、PLRV-F3/B3 和 PLRV-LF/LB 的终浓度分别为 0.8 μ mol/L、0.2 μ mol/L 和 0.6 μ mol/L), Mg^{2+} 的最佳终浓度为 4 mmol/L, Bst 3.0 DNA 聚合酶 (8 U/ μ L) 的最佳加入量为 2 μ L, dNTPs (dATP、dGTP、dCTP 各 0.4 mmol/L, dUTP 1.2 mmol/L), UNG (2 U/ μ L) 的最佳用量均是 1 μ L, SYBR Green I (20 $\times$) 加入量为 1.0 μ L, 反应温度是 62 $^{\circ}$ C。

目前多种植物的病毒检测采用了便捷、快速、高效的 RT-LAMP 技术,如柑橘衰退病毒^[13]、葡萄 A 病毒、潜隐环斑病毒和轻型黄边病毒^[18-20]、辣椒黄脉病毒^[21]、水稻多种病毒^[14, 22]等。本研究实现了对马铃薯卷叶病毒 RT-LAMP 检测方法的全面优化,对优化的检测方法采用了 RT-PCR 标准检测方法进行平行比对验证,二者检测结果一致。而且,RT-LAMP 检测可通过肉眼观察直接判断结果(可视化判读结果),较 RT-PCR 简单容易,可满足科研、基层单位和简陋现场等对该病毒检测的需要。

RT-LAMP 技术采用 6 条引物扩增,有极高的特异性,但试验中也存在假阳性现象。主要由于其具有高的灵敏性,能检测到空气中的阳性气溶胶微粒造成^[22-23]。在同一地方长期操作,易在空气中形成气溶胶,操作过程中若样品混有阳性的气溶胶颗粒就易污染。本试验总结前人试验经验,严格操作规范,不同操作分区进行,反应液分装备用,保持实验室空气清洁,勤换手套和实验服,做到了有效避免气溶胶污染的发生。同时,每次试验设计空白对照和阴性对照,以便及时发现气溶胶假阳性污染和及时采取防污染措施。试验中需要开盖操作,操作周围空气中可能易形成阳性气溶胶,造成试验交叉污染;生产检测实践中,将可视化试剂 1 μ L SYBR

Green I 在反应前滴加到 PCR 管盖子内侧顶部,反应结束后振荡 3 s,瞬时离心 5 s,然后观察结果,这样可以避免因开盖引起的气溶胶交叉污染,从而避免结果判读的假阳性。

参考文献

- [1] 关佳晨,蔡海龙. 我国马铃薯生产格局变化特征及原因分析[J]. 中国农业资源与区划, 2019, 40(3): 92-100.
- [2] 白艳菊,文景芝,杨明秀,等. 西南地区与东北地区马铃薯主要病毒发生比较[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(6): 733-736.
- [3] ZHANG Wei, ZHANG Zhixiang, FAN Guoquan, et al. Development and application of a universal and simplified multiplex RT-PCR assay to detect five potato viruses [J]. Journal of General Plant Pathology, 2017, 83(1): 33-45.
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 马铃薯种薯:GB 18133-2000 & 2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [5] 中华人民共和国农业部. 马铃薯 6 种病毒的检测 RT-PCR 法: NY/T 2678-2015 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [6] 罗文彬,李华伟,汤浩,等. 马铃薯 5 种病毒多重 PCR 检测技术的建立及应用[J]. 园艺学报, 2015, 42(2): 280-288.
- [7] 丁铭,方琦,李婷婷,等. 马铃薯卷叶病毒云南分离物外壳蛋白基因的克隆与序列分析[J]. 植物病理学报, 2006(5): 473-476.
- [8] NOTOMI T, OKAYMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [9] FUKUTA S, MIZUKAMI Y, ISHIDA A, et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms [J]. European Food Research & Technology, 2004, 218(5): 496-500.
- [10] SASAKI Y, KOMATSU K, NAGUMO S. Rapid detection of *Panax ginseng* by loop-mediated isothermal amplification and its application to authentication of ginseng [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2008, 31(9): 1806-1808.
- [11] LEE D, KIM Y T, LEE J W, et al. An integrated direct loop-mediated isothermal amplification microdevice incorporated with an immunochromatographic strip for bacteria detection in human whole blood and milk without a sample preparation step [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 79: 273-279.
- [12] CARTER C, AKRAMI K, HALL D, et al. Lyophilized visually readable loop-mediated isothermal reverse transcriptase nucleic acid amplification test for detection Ebola Zaire RNA [J]. Journal of Virological Methods, 2017, 244: 32-38.
- [13] 王永江,周彦,李中安,等. 柑橘衰退病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2013, 46(3): 517-524.
- [14] LE D, NETSU O, UEHARA-ICHIKI T, et al. Molecular detection of nine rice viruses by a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Journal of Virological Methods, 2010, 170: 90-93.

M. cannonballus 引起的甜瓜突然枯萎显示出较好的田间防效;咯菌腈 fludioxonil 高剂量使用时也有防效,但对甜瓜有药害;氟啶胺 fluazinam(这是发现的第一种能够抑制黑点根腐病的杀菌剂,自 2000 年以来一直在以色列使用)防效不佳^[10]。

意大利的 Aleandri 等研究发现:利用茉莉酸甲酯(MeJA)诱导甜瓜对 *Monosporascus* 根腐和倒秧的抗性(浸泡种子和叶面施用),可降低病害的严重度^[11]。

突尼斯的 Rhouma 等的研究结果显示:绿色木霉 *Trichoderma viride* 和哈茨木霉 *T. harzianum* 对 *M. cannonballus* 菌丝生长的抑制率超过 90%;盆栽试验中可明显降低发病率和病情指数,具有病害防治的潜能^[12]。

西北地区是我国甜瓜优势主产区之一,2011 年播种面积为 8.38 万 hm^2 ,产量约为 265.9 万 t,分别占全国甜瓜总播种面积和产量的 21.1%和 20.8%^[13]。在栽培方式改变、品种更迭以及全球变暖等因素的影响下,甜瓜病害也发生了重要变化^[14]。

在西北甜瓜产区中,有部分区域是甜瓜黑点根腐病的适生区,建议相关部门尽早组织开展病害发生情况调查,并针对病害发生区的自然条件和栽培模式开展病害综合防治技术研究,以保障和促进西北地区甜瓜产业的健康发展。

参考文献

- [1] MARTYN R D, MILLER M E. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging disease of melons worldwide[J]. Plant Disease, 1996, 80(17): 716–725.
- [2] COHEN R, PIVONIA S, BURGER Y, et al. Toward integrated management of *Monosporascus* wilt of melons in Israel [J]. Plant Disease, 2000, 84(5): 496–505.
- [3] 何苏琴,白滨. 甜瓜黑点根腐病菌 *Monosporascus cannonballus* 在中国大陆的首次报道[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 116–119.
- [4] POLLACK F G, UECKER F A. *Monosporascus cannonballus* an unusual ascomycete in cantaloupe roots [J]. Mycologia, 1974, 66(2): 346–349.
- [5] LOVIC B R, MARTYN R D, MILLER M E. Sequence analysis of the ITS regions of rDNA in *Monosporascus* spp. to evaluate its potential for PCR-mediated detection [J]. Phytopathology, 1995, 85(6): 655–661.
- [6] PICO B, ROIG C, FITA A, et al. Quantitative detection of *Monosporascus cannonballus* in infected melon roots using real-time PCR [J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 120(2): 147–156.
- [7] SARPELEH A, CHERAGHALI V, RAZAVI M. Detection of *Monosporascus cannonballus* from melon plants using PCR [J]. Journal of Crop Protection, 2012, 1(4): 349–359.
- [8] MEDEIROS E V, SILVA K J P, OLIVEIRA L A, et al. *Monosporascus cannonballus* density in soils cultivated with different crops in Rio Grande do Norte State, Brazil [J]. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, 2008, 3(1): 1–5.
- [9] WAUGH M M, KIM D H, FERRIN D M, et al. Reproductive potential of *Monosporascus cannonballus* [J]. Plant Disease, 2003, 87(1): 45–50.
- [10] PIVONIA S, GERSTL Z, MADUEL A, et al. Management of *Monosporascus* sudden wilt of melon by soil application of fungicides [J]. European Journal of Plant Pathology, 2010, 128(2): 201–209.
- [11] ALEANDRI M P, REDA R, TAGLIAVENTO V, et al. Effect of chemical resistance inducers on the control of *Monosporascus* root rot and vine decline of melon [J]. Phytopathologia Mediterranea, 2010, 49(1): 18–26.
- [12] RHOUMA A, SALEM I B, M'HAMDI M, et al. Antagonistic potential of certain soilborne fungal bioagents against *Monosporascus* root rot and vine decline of watermelon and promotion of its growth [J]. Novel Research in Microbiology Journal, 2018, 2(5): 85–100.
- [13] 吴敬学,赵姜,张琳. 中国西甜瓜优势产区布局及发展对策 [J]. 中国蔬菜, 2013(17): 1–5.
- [14] 赵廷昌,宋凤鸣,古勤生,等. 我国西瓜甜瓜病虫害防控现状、存在问题与发展趋势 [J]. 中国瓜菜, 2014, 27(6): 1–5.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 264 页)

- [15] 冯光惠,杜虎平,李夏隆,等. 陕北地区马铃薯卷叶病毒的 RT-PCR 检测与序列分析 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(19): 4734–4736.
- [16] 韩树鑫,张俊华,白艳菊,等. 30 个马铃薯卷叶病毒 CP 基因序列分析 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2016, 47(3): 353–358.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 马铃薯卷叶病毒检疫鉴定方法: SN/T2627–2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [18] 张永江,辛言言,李桂芬,等. 葡萄 A 病毒 RT-LAMP 检测方法的建立 [J]. 中国农业科学, 2016, 49(1): 103–109.
- [19] 张吉红,余澍琼,徐瑛,等. 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 [J]. 植物保护, 2013, 39(6): 74–77.

- [20] 陈柳,尚巧霞,陈笑瑜,等. 草莓轻型黄边病毒 RT-LAMP 检测方法的建立 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(3): 613–620.
- [21] 汤亚飞,何自福,余小漫,等. 辣椒黄脉病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立 [J]. 植物保护, 2016, 42(6): 100–104.
- [22] 周彤,杜琳琳,范永坚,等. 水稻黑条矮缩病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(7): 1285–1292.
- [23] 秦文韬,王忠跃,张昊. 环介导恒温扩增技术在植物病原物检测中的应用 [J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(3): 169–174.

(责任编辑:杨明丽)