

苹果褪绿叶斑病毒 RT-LAMP 检测方法的建立

张双纳, 李正男, 范旭东, 张尊平, 任芳, 胡国君, 董雅凤

(中国农业科学院果树研究所国家落叶果树脱毒中心, 辽宁兴城 125100)

摘要:【目的】建立一种利用反转录环介导等温扩增 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) 技术简便、快速检测苹果褪绿叶斑病毒 (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) 的方法。【方法】在 ACLSV 基因组序列的 3 个保守区域设计 3 组引物, 每组引物包括一对外引物 (F3/B3) 和一对内引物 (FIP/BIP), 从 3 组引物中筛选出一组效果最好的引物。对 RT-LAMP 反应体系, 即 Mg^{2+} 、dNTPs、Betaine、FIP/BIP、B3/F3 浓度进行优化, Mg^{2+} 浓度梯度设置为 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mmol·L⁻¹, dNTPs 浓度为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mmol·L⁻¹, Betaine 浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mol·L⁻¹, FIP/BIP 浓度为 0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 μ mol·L⁻¹, F3/B3 浓度为 0、0.1、0.2、0.3、0.4 μ mol·L⁻¹; 优化 RT-LAMP 反应条件, 采用已优化的反应体系, 设置 65、63、61、59、57℃ 5 个不同的反应温度, 反应时间设定为 90 min。在引物筛选和反应体系反应条件优化过程中, 使用荧光定量 PCR 仪, 在反应体系中加入荧光染料, 利用荧光信号积累实时监测整个反应过程, 根据扩增曲线判断反应结果。以携带苹果茎沟病毒 (*Apple stem grooving virus*, ASGV)、苹果茎痘病毒 (*Apple stem pitting virus*, ASPV)、苹果花叶病毒 (*Apple mosaic virus*, ApMV) 的植株叶片中提取的总 RNA 为模板测试 RT-LAMP 检测方法的特异性。将含 ACLSV 的叶片总 RNA 原液进行 10 倍梯度稀释, 以 RNA 原液和 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释液作为模板, 进行 RT-LAMP 反应, 测试 RT-LAMP 检测方法的灵敏性。随机采集 23 株苹果树的叶片, 同时进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测, 加入 SYBR Green I 进行可视化检测。【结果】建立了 ACLSV RT-LAMP 检测方法, 优化的检测体系为: 6.0 mmol·L⁻¹ Mg^{2+} 、1.2 mmol·L⁻¹ dNTPs、0.2 mol·L⁻¹ Betaine、1.6 μ mol·L⁻¹ FIP/BIP 和 0.2 μ mol·L⁻¹ F3/B3 引物, 最佳反应条件为 59℃, 60 min。特异性检测中, 仅 ACLSV 检测结果为阳性, 对照组均为阴性。灵敏性检测中, RT-LAMP 方法最低可检测到 10⁻³ RNA 稀释液, 灵敏度是 RT-PCR 方法的 100 倍。随机采取的 23 株苹果叶片样品 RT-PCR 阳性检出率为 52.2%, RT-LAMP 阳性检出率为 65.2%, RT-LAMP 的检出率高于 RT-PCR。【结论】建立的 ACLSV RT-LAMP 检测方法具有简便、快速、灵敏性高、成本低等特点, 可满足基层、科研部门在田间调查、种苗繁育和海关检疫中快速检测 ACLSV。

关键词: 苹果; 苹果褪绿叶斑病毒; 反转录环介导等温扩增; real-time PCR; 病毒检测

Establishment of RT-LAMP Assay for Detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV)

ZHANG ShuangNa, LI ZhengNan, FAN XuDong, ZHANG ZunPing, REN Fang, HU GuoJun, DONG YaFeng

(National Center for Eliminating Viruses from Deciduous Fruit Tree, Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, Liaoning)

Abstract: 【Objective】The objective of this study is to establish a method which uses reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technology, and to detect *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) simply and quickly. 【Method】Three sets of specific primers were designed based on conserved region of ACLSV genomes. Each set of primers includes

收稿日期: 2017-09-26; 接受日期: 2017-11-27

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610182016017)、中国农业科学院科技创新工程 (ZX75-2018)

联系方式: 张双纳, E-mail: zsnjer@163.com。通信作者董雅凤, E-mail: yfdong1234@163.com

a pair of outer primer (F3/B3) and a pair of inner primer (FIP/BIP). One feasible set of primers was selected for the RT-LAMP reaction. RT-LAMP reaction system was optimized, that is, the concentration of Mg^{2+} (0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 $mmol \cdot L^{-1}$), dNTPs (0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 $mmol \cdot L^{-1}$), Betaine (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 $mol \cdot L^{-1}$), FIP/BIP (0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 $\mu mol \cdot L^{-1}$) and F3/B3 (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 $\mu mol \cdot L^{-1}$), respectively. The RT-LAMP reaction condition was optimized, using optimized reaction system, reaction temperature was set to 65, 63, 61, 59, 57 $^{\circ}C$ and reaction time was set for 90 min. In the process of primers screening and optimizing the reaction system, fluorescent pigment was added to the reaction system and real-time PCR instrument was used. The whole process was detected in real-time by fluorescence signal accumulation. Finally, the amplification curve was used to analyze the reaction result. The specificity detection of RT-LAMP was tested by using different RNA templates of infected leaves from ACLSV, *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV) and *Apple mosaic virus* (ApMV). To assess the detection sensitivity, 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} diluents of original RNA were used as templates of RT-LAMP. To evaluate the application value of this method, 23 apple leaf samples were collected randomly in the field, the optimized RT-LAMP and RT-PCR were used to detect the samples, SYBR Green I was added to visualize the detection. 【Result】The RT-LAMP method to detect ACLSV was established. The optimized detection system was 6.0 $mmol \cdot L^{-1}$ Mg^{2+} , 1.2 $mmol \cdot L^{-1}$ dNTPs, 0.2 $mol \cdot L^{-1}$ Betaine, 1.6 $\mu mol \cdot L^{-1}$ FIP/BIP and 0.2 $\mu mol \cdot L^{-1}$ F3/B3 primer. The optimum reaction conditions were 59 $^{\circ}C$ and 60 min. In the specificity test, only the ACLSV test result was positive, the controls were all negative. In the sensitivity test, the 10^{-3} RNA dilution could be detected by RT-LAMP method. It was 100 times higher sensitivity than RT-PCR method. The positive rate of RT-PCR of randomly selected 23 apple leaf samples was 52.2%, and RT-LAMP was 65.2%. Detection rate of RT-LAMP was higher than that of RT-PCR.

【Conclusion】The established ACLSV RT-LAMP detection method is simple, quick, sensitive and low cost. It can be applied in field investigation, seeding breeding and customs quarantine.

Key words: apple; *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV); reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP); real-time PCR; virus detection

0 引言

【研究意义】苹果褪绿叶斑病毒 (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) 是一种重要的落叶果树病毒病原, 在世界各地水果产区广泛分布^[1], 可侵染苹果^[2]、梨^[3]、杏^[4]、桃^[5]、樱桃^[6]、李子^[7]等多种果树, 对果树生长和果实产量、品质造成一定的影响。高效灵敏的检测技术是病毒病防控的基础, 可为无毒苗木培育和推广提供重要保障^[8]。【前人研究进展】在 ACLSV 检测技术中, 指示植物法费时费力^[9]; 酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法简单低廉^[10], 但 ELISA 检测效果受抗体质量限制^[11]; 目前, PCR 技术应用最为广泛, 但 RT-PCR 的灵敏性受到限制^[12]; RT-nested PCR 检测敏感性和特异性较高, 但需要进行两轮 PCR, 操作较为繁琐、耗时较长^[13-14]; real-time RT-PCR 比 RT-nested PCR 的检测敏感性和特异性更高, 且后续不需要电泳检测, 但需较为昂贵的荧光定量 PCR 仪, 实验及仪器操作也需要专业指导, 不利于广泛应用^[15-16]。ACLSV 在大多数寄主植物中潜伏侵染, 在寄主叶片和果实上不表现明显症状^[17-18], 所以无法通过症状观察进行初步诊断, 而且病毒在树体中的含量一般很低, 有时会出现假阴性结果^[19]。因此, 开发一种更加灵敏、简便的 ACLSV 检测方法十分必要。

LAMP 是一种新型的核酸扩增技术, 该技术采用 4 条特异性引物识别靶序列上的 6 个特异区, 利用 DNA 置换聚合酶 (Bst DNA polymerase) 在恒温条件下对靶基因扩增^[20], RT-LAMP 是在 LAMP 的基础上加入反转录酶, 使得反转录和核酸扩增同时进行^[21]。LAMP 反应产物可以进行电泳检测 (阳性出现瀑布状条带, 阴性样品无条带), 也可在反应产物中加入 SYBR Green I 核酸染料直接观察颜色变化 (阳性为绿色, 阴性为橙色) 或 LAMP 反应也可以在实时浊度仪 (扩增超过阈值为阳性 (有核酸扩增), 未超过阈值为阴性 (无核酸扩增))^[22]和实时荧光定量 PCR 仪 (若有“S”型扩增曲线, 则判断为阳性 (有核酸扩增), 若无“S”型扩增曲线, 则判断为阴性 (无核酸扩增)) 中进行, 直接根据扩增曲线判断反应结果, 此方法适用于有条件的实验室。近年来, LAMP 方法已逐渐应用于各种动物、植物体的病原微生物以及外源基因的检测中^[23-27]。【本研究切入点】使用荧光定量 PCR 仪, 对 ACLSV RT-LAMP 反应体系和反应条件进行优化, 并对此方法的灵敏性、特异性和应用特点进行评价。【拟解决的关键问题】建立 ACLSV 的 RT-LAMP 检测方法, 以期为该病毒的田间检测和防控提供更好的技术支持, 同时也可在开展无毒苗木培育和生产的科研单位及企业推广应用。

1 材料与方法

试验于 2017 年在中国农业科学院果树研究所国家落叶果树脱毒中心实验室完成。

1.1 试验材料

1.1.1 生物材料 用于 LAMP 反应体系和条件优化的植株样品为实验室保存的经 RT-PCR 和 ELISA 鉴定为 ACLSV 阳性的富士苹果组培苗；在特异性反应中，感染苹果茎沟病毒（*Apple stem grooving virus*, ASGV）、苹果茎痘病毒（*Apple stem pitting virus*, ASPV）、苹果花叶病毒（*Apple mosaic virus*, ApMV）样品和健康植株均为实验室保存的经 RT-PCR 和 ELISA 鉴定的富士苹果组培苗；田间样品采自辽宁省兴城市的果园。

1.1.2 主要试剂和器材 BIO-RAD 实时荧光定量 PCR 仪（型号：CFX Connect™ Optics Module）；Bst DNA 聚合酶购自 NEB 公司，随酶提供 100 mmol·L⁻¹ MgSO₄ 和 10×等温缓冲液（20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 10

mmol·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 50 mmol·L⁻¹ KCl, 2 mmol·L⁻¹ MgSO₄, 0.1% Tween-20, pH 8.8）；M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司, 10 mmol·L⁻¹ dNTP 购自 TaKaRa 公司, Betaine 购自 Sigma-Aldrich 公司, 荧光试剂购自广州迪澳生物公司, DL2000 Plus DNA Marker 购自近岸蛋白质科技有限公司, DEPC 处理水购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取 称取苹果叶片样品 50 mg, 采用柱式法从采集的苹果叶片样品中提取总 RNA。采用 Eppendorf BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪测定提取总 RNA 的浓度, 通过琼脂糖凝胶电泳检测提取总 RNA 的完整性, 于-80℃保存备用。

1.2.2 引物设计和合成 根据 GenBank 公布的 18 条 ACLSV 基因组序列, 通过 Vector NTI 软件进行同源性分析, 分别在 3 个相对保守的区域设计 3 组 RT-LAMP 检测引物（I、II、III），并设计一对 RT-PCR 检测引物（表 1）。上述引物由上海生工生物公司合成。

表 1 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测 ACLSV 所用引物
Table 1 Primers used for ACLSV detection by RT-LAMP and RT-PCR

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')	引物位置 Primer location	用途 Application
I	T1FIP	GTCAAAACCTGATGATAATTCA	5651-5672, 5602-5620
		GCCTACAAATTAGGTGAGA	
	T1F3	TTTTCTGGAATTTTCATT	5583-5600
	T1BIP	GATGGCGATGATGATAAGGGGTC	5755-5777, 5807-5825
II	T1B3	TCAGAATAAATTCTGGAG	5827-5844
	T2FIP	TAAACACCCGACTTAGTGAACCA	247-265
		GAGAAGAAGGTGGAAAACCT	270-288
	T2F3	ATGAACGCATTCAAAAGGA	321-343
III	T2BIP	CTGGAGAACCACCTTTTATTTAA	369-391
		TTACTAATATAACTAGCTAC	420-439
	T2B3	TACTAAGACATGCTACATA	447-464
	T3FIP	AGAACTGCTGCCATCCTCCTTC	6740-6757, 6767-6786
		GATAACATTTCTGCAAGAGA	6814-6835
	T3F3	TCCATTGCTTCAGAAGGG	
	T3BIP	GTGGACGCAGATCTGAAAGCGT	6852-6873, 6900-6918
		TTGCCCTGTCTTTCCATG	6922-6940
ACLSV7	T3B3	GACTCCAGTATCTGTTCCA	
		CAGACCYCTTCATGGAAAGACAG	6834-6959
ACLSV8		GTAGTAAATATTTAAAAGTCTAC	7537-7557

1.2.3 RT-PCR 检测 反转录体系为 1.0 ng RNA、1.0 μL 2 μmol·L⁻¹ oligod(T)₁₈、DEPC 水补至 10 μL, 65℃ 5 min; 体系中加入 4.0 μL M-MLV 5×buffer、

4.0 μL 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs、1.0 μL M-MLV, 42℃ 60 min, 70℃ 15 min。合成的 cDNA 于-20℃保存备用。

PCR 反应体系为 2.0 μL cDNA 模板、2.5 μL 10 $\times$ PCR buffer、2.0 μL 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs、1.0 μL rTaq、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游引物各 1.0 μL 、DEPC 水补至 25 μL 。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 90 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 进行 35 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.4 RT-LAMP 检测方法建立 RT-LAMP 基本检测体系以 100—200 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 RNA 为模板进行, 各成分含量如下: 10 $\times$ Isothermal Amplification Buffer、6.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 、1.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs、1.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FIP/BIP Primers、0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ F3/B3 Primers、320 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bst DNA 聚合酶、40 U M-MLV、荧光染料、1.0 μL 模板 RNA、DEPC 水补至 25 μL 。反应体系如下: 2.5 μL 10 $\times$ Isothermal Amplification Buffer, 1.0 μL 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 , 3.5 μL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, 1.0 μL 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FIP/BIP Primers, 1.0 μL 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ F3/B3 Primers, 1.0 μL Bst DNA 聚合酶, 0.2 μL M-MLV, 0.5 μL 荧光染料, 1 μL RNA 模板, DEPC 补至 25 μL 。反应条件为 63 $^{\circ}\text{C}$, 70 min。

采用表 1 中 3 组引物 (I、II、III) 用于上述 RT-LAMP 基本反应体系进行反应, 确定适宜的引物。

RT-LAMP 反应体系优化, Mg^{2+} 浓度梯度设置为 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其余组分按 RT-LAMP 基本反应体系添加, DEPC 补至 25 μL (下同); 采用最适 Mg^{2+} 浓度, dNTPs 浓度梯度设置为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 采用最适 Mg^{2+} 浓度和 dNTPs 浓度, Betaine 浓度梯度设置为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 采用最适 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度和 Betaine 浓度, FIP/BIP 浓度梯度设置为 0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 采用最适 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、Betaine 浓度和 FIP/BIP 浓度, F3/B3 浓度梯度设置为 0、0.1、0.2、0.3、0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

RT-LAMP 反应条件优化, 采用已优化的反应体系, 设置 65、63、61、59、57 $^{\circ}\text{C}$ 5 个不同的反应温度, 反应时间设定为 90 min。

以上 RT-LAMP 反应均以实验室保存的 ACLSV 阳性组培苗为样品, 在实时荧光定量 PCR 仪中进行, 根据扩增曲线出峰快慢和曲线的光滑程度确定最适反应条件。

1.2.5 RT-LAMP 特异性验证 采用优化好的反应体系和反应条件, 对常见的苹果病毒进行检测。以感染

ASGV、ASPV、ApMV、ACLSV、健康植株叶片的 RNA 为模板, 以无菌水为空白对照进行 RT-LAMP 特异性检测。通过观察实时荧光定量扩增曲线, 肉眼观察加入 2.0 μL 1 000 $\times$ SYBR Green I 后反应液颜色变化 (绿色为阳性, 橙色为阴性)、琼脂糖凝胶电泳 (出现特征性梯状条带为阳性, 否则为阴性) 等方法判定结果。

1.2.6 RT-PCR 和 RT-LAMP 灵敏性检测 提取感染 ACLSV 叶片总 RNA, 浓度为 408 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 10 倍浓度梯度稀释至 10^{-6} , 以无菌水为空白对照采用 RT-LAMP 和 RT-PCR 进行检测灵敏度对比试验。采用肉眼观察加入 2.0 μL 1 000 $\times$ SYBR Green I 后反应液颜色变化和琼脂糖凝胶电泳分析判定结果。

1.2.7 ACLSV 田间样品检测 在辽宁省兴城市的果园中随机采集 23 个苹果植株叶片, 分别进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测, 采用琼脂糖凝胶电泳、反应液加入 2.0 μL 1 000 $\times$ SYBR Green I 观察颜色变化分析判定结果。

2 结果

2.1 RT-LAMP 引物筛选

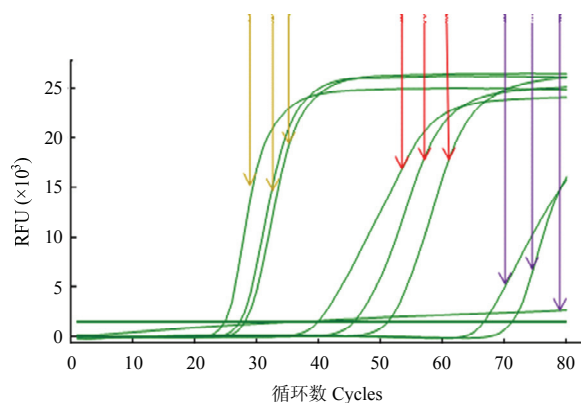
用 3 组引物分别对 ACLSV 阳性样品进行 RT-LAMP 扩增, 每组引物设 3 个重复, 结果如图 1 所示。III 组引物扩增效果最好, 出峰最早且曲线光滑; II 组引物在出峰时间和曲线的光滑度上都不及 III 组引物; I 组引物没有扩增出 “S” 型曲线。所以采用 III 引物作为 ACLSV RT-LAMP 的检测引物。

2.2 RT-LAMP 反应体系优化

2.2.1 最适 Mg^{2+} 浓度 随 Mg^{2+} 浓度的增加 RT-LAMP 反应出峰时间越早, 当 Mg^{2+} 浓度到达 6.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 出峰时间最早且扩增曲线较光滑, 当浓度超过 6.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 随 Mg^{2+} 增加反应效果越来越差。故选择 6.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 作为 ACLSV RT-LAMP 检测的最佳浓度 (图 2)。

2.2.2 最适 dNTPs 浓度 随着 dNTPs 浓度的增加, 其反应规律同 Mg^{2+} 反应规律, dNTPs 浓度为 1.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时扩增曲线光滑出峰时间早, 故 1.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs 为 ACLSV RT-LAMP 检测最适反应浓度 (图 3)。

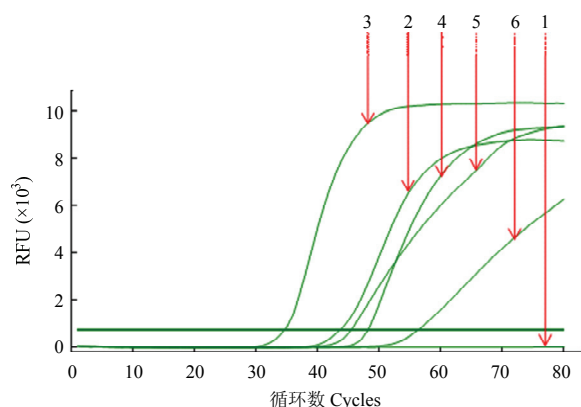
2.2.3 最适甜菜碱浓度 加入甜菜碱后扩增效果明显较好, 甜菜碱浓度在 0.2—0.8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 RT-LAMP 扩增效果影响差异不大且效果好, 所以综合考虑成本因素, 选择 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甜菜碱为最适反应浓度 (图 4)。



紫色 Purple: I 组引物扩增曲线 Amplification curves of group I primers;
红色 Red: II 组引物扩增曲线 Amplification curves of group II primers;
黄色 Yellow: III 组引物扩增曲线 Amplification curves of group III primers

图 1 不同引物 ACLSV RT-LAMP 扩增

Fig. 1 The RT-LAMP amplification using different primers



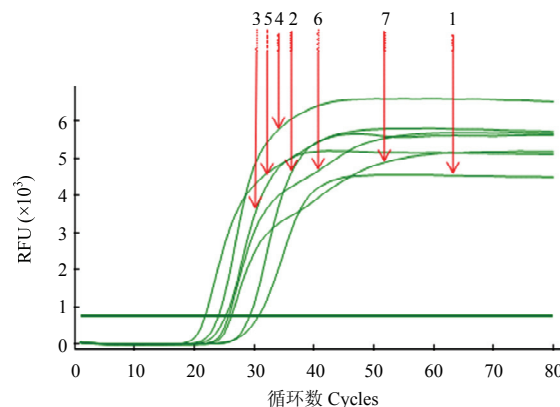
1: 2.0 mmol·L⁻¹; 2: 4.0 mmol·L⁻¹; 3: 6.0 mmol·L⁻¹; 4: 8.0 mmol·L⁻¹; 5: 10.0 mmol·L⁻¹; 6: 12.0 mmol·L⁻¹

图 2 Mg²⁺ 浓度对 RT-LAMP 影响的实时荧光定量扩增曲线

Fig. 2 The real-time amplification curves of effect of Mg²⁺ concentrations on the RT-LAMP reaction

2.2.4 最适 FIP/BIP 浓度 当 FIP/BIP 浓度为 1.6—2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时反应, 出峰时间早且曲线光滑, 当 FIP/BIP 浓度高于或低于这个范围时, 出峰时间均较晚且曲线不够光滑, 故选择 1.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 FIP/BIP 最适反应温度 (图 5)。

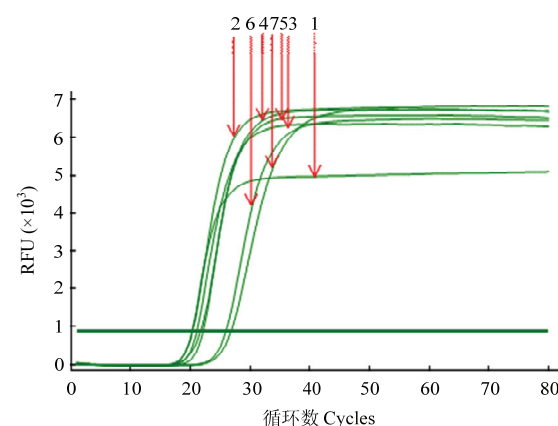
2.2.5 最适 F3/B3 浓度 当 F3/B3 浓度为 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 出峰时间最早且曲线光滑, 当 F3/B3 浓度高于或低于 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 出峰时间均较晚, 且曲线不够光滑, 所以选择 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 F3/B3 最适反应浓度 (图 6)。



1: 0.6 mmol·L⁻¹; 2: 0.8 mmol·L⁻¹; 3: 1.0 mmol·L⁻¹; 4: 1.2 mmol·L⁻¹; 5: 1.4 mmol·L⁻¹; 6: 1.6 mmol·L⁻¹; 7: 1.8 mmol·L⁻¹

图 3 dNTPs 浓度对 RT-LAMP 影响的实时荧光定量扩增曲线

Fig. 3 The real-time amplification curves of effect of dNTPs concentrations on the RT-LAMP reaction



1: 0 mol·L⁻¹; 2: 0.2 mol·L⁻¹; 3: 0.4 mol·L⁻¹; 4: 0.6 mol·L⁻¹; 5: 0.8 mol·L⁻¹; 6: 1.0 mol·L⁻¹; 7: 1.2 mol·L⁻¹

图 4 甜菜碱浓度对 RT-LAMP 影响的实时荧光定量扩增曲线

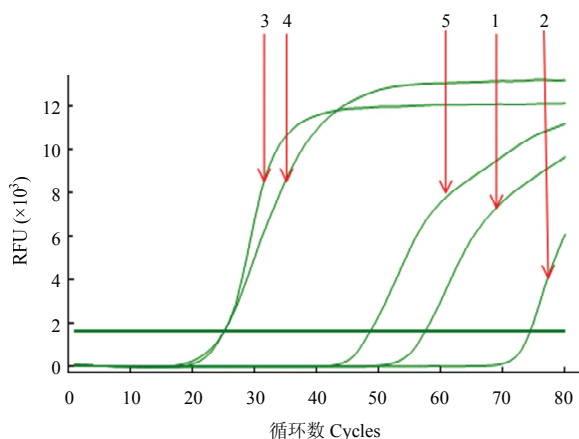
Fig. 4 The real-time amplification curves of effect of betaine concentrations on the RT-LAMP reaction

2.3 最适反应条件

在所设置的 4 个不同反应温度下, 65℃ RT-LAMP 反应不能进行, 63、61℃ 出峰较晚, 59℃ 时出峰时间最早, 且曲线光滑, 故选择 59℃ 为 RT-LAMP 最适反应温度; 从在 59℃ 下扩增的两条曲线来看, 当反应时间到达 60 min 时, 反应的扩增量已经达到最大值, 故选择 60 min 为反应最适时间 (图 7)。

2.4 特异性检测

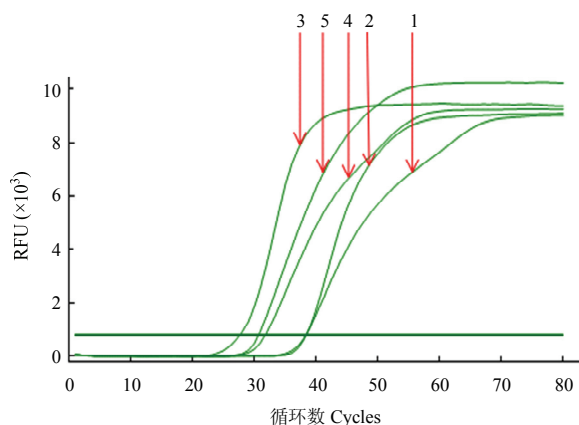
以感染 ASGV、ASPV、ApMV、ACLSV 和健康



1: $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 2: $1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 3: $1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 4: $2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 5: $2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 5 FIP/BIP 浓度对 RT-LAMP 影响的实时荧光定量扩增曲线

Fig. 5 The real-time amplification curves of effect of FIP/BIP concentrations on the RT-LAMP reaction



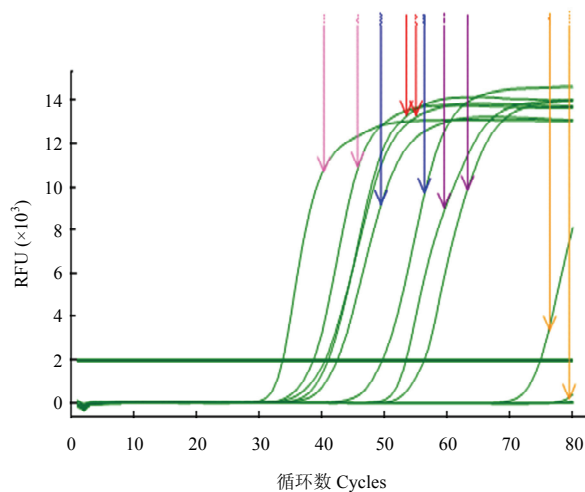
1: $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 2: $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 3: $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 4: $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 5: $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 6 F3/B3 浓度对 RT-LAMP 影响的实时荧光定量扩增曲线

Fig. 6 The real-time amplification curves of effect of F3/B3 concentrations on the RT-LAMP reaction

植株叶片的 RNA 为模板, 以无菌水为空白对照进行 RT-LAMP 特异性检测。RT-LAMP 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 仅 ACLSV 阳性样品呈现特征性梯状条带, 其他样品均未见特征性扩增条带 (图 8-A); 各管中加入 $2.0 \mu\text{L}$ $1\ 000\times$ SYBR Green I 后, 仅有 ACLSV 阳性样品反应液颜色变绿, 其他各管均为橙色 (图 8-B); 实时荧光定量 PCR 仪观测结果同样, ACLSV

阳性样品扩增曲线为光滑的“S”型, 其他 3 个病毒阳性样品未形成“S”型曲线 (图 8-C)。



黄色 Yellow: 65°C ; 紫色 Purple: 63°C ; 蓝色 Blue: 61°C ; 粉色 Pink: 59°C ; 红色 Red: 57°C

图 7 反应温度和反应时间对 RT-LAMP 影响的实时荧光定量扩增曲线

Fig. 7 The real-time amplification curves of effect of time and temperature on the RT-LAMP reaction

2.5 RT-PCR 和 RT-LAMP 灵敏性检测

将 ACLSV 阳性样品总核酸进行 10 倍梯度浓度稀释至 10^{-6} , 分别进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 反应。各管中加入 $2.0 \mu\text{L}$ $1\ 000\times$ SYBR Green I 结果显示总核酸稀释至 10^{-3} 时, RT-LAMP 仍能检测出 ACLSV (图 9-A、9-B), RT-PCR 检测 ACLSV 的总核酸最大稀释倍数为 10^{-1} (图 9-C), 表明 RT-LAMP 检测 ACLSV 的灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍。

2.6 田间疑似病株检测

将田间随机采集的 23 个 ACLSV 疑似感染植株, 进行 RT-PCR 和 RT-LAMP 检测。结果 23 个疑似感染植株 RT-LAMP 检测出 15 个阳性样品 (图 10-A、10-B), 检出率为 65.2%; RT-PCR 检测出 12 个阳性样品 (图 10-C), 检出率为 52.2%。RT-LAMP 检测出 ACLSV 阳性样品多于 RT-PCR, 表明 RT-LAMP 较高的灵敏性。

3 讨论

在 RT-LAMP 反应体系和反应条件的优化试验中笔者采用了实时荧光定量 PCR 仪对结果进行了实时

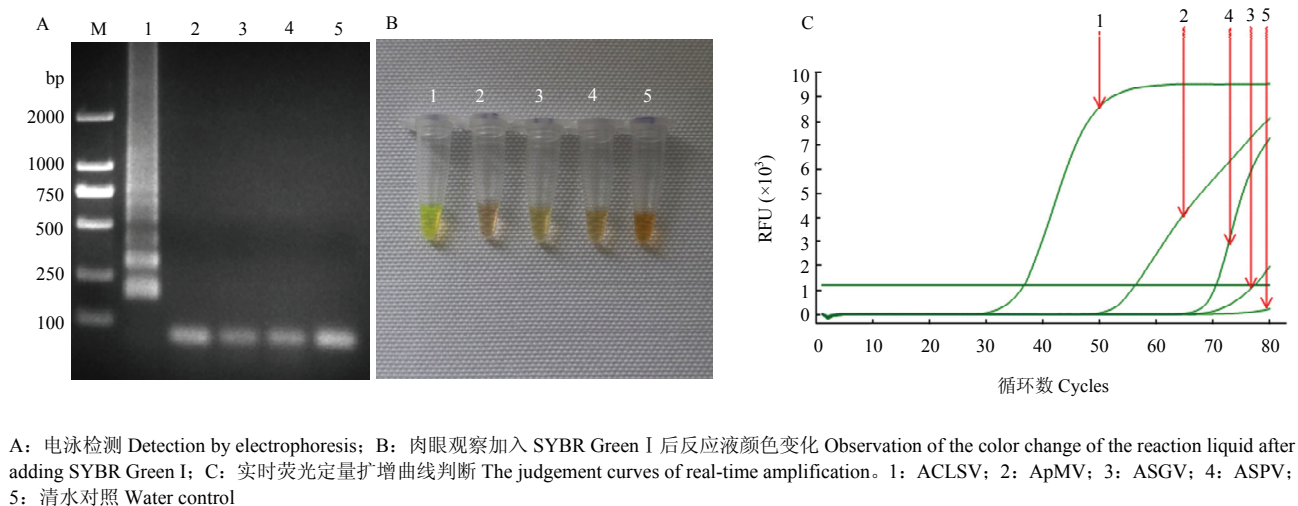


图 8 RT-LAMP 特异性反应
Fig. 8 The LAMP specificity test

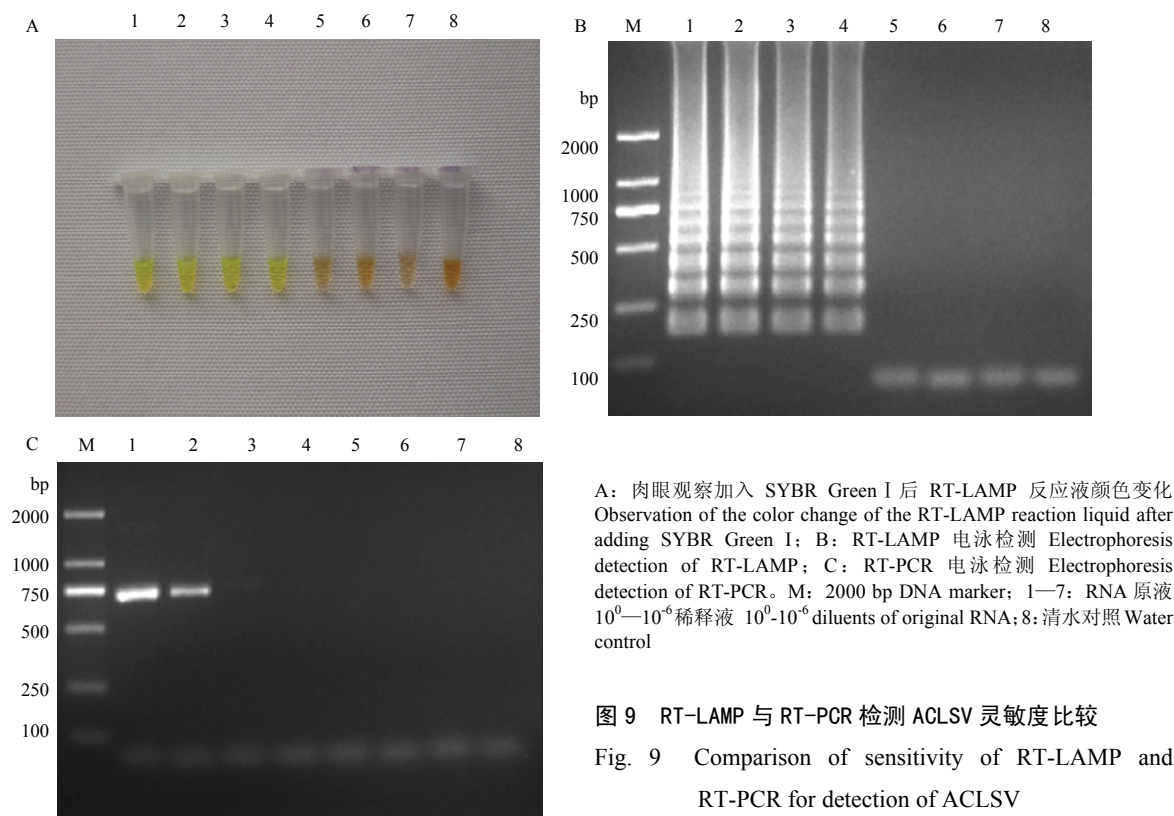
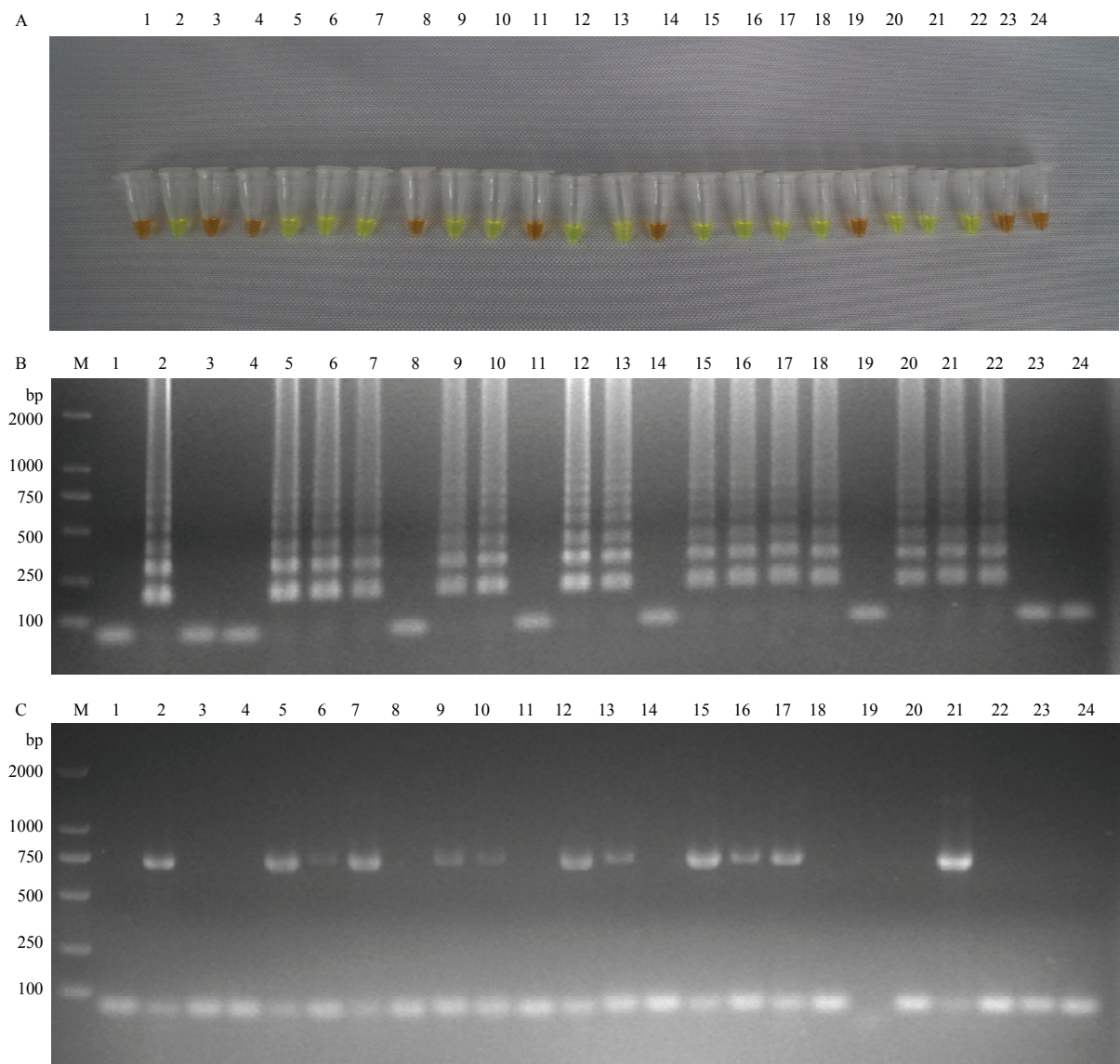


图 9 RT-LAMP 与 RT-PCR 检测 ACLSV 灵敏度比较

Fig. 9 Comparison of sensitivity of RT-LAMP and RT-PCR for detection of ACLSV

观测，保证了试验结果更为精确和客观，同时也可避免 RT-LAMP 产物对实验室造成污染的威胁。实时荧光定量 PCR 仪在反应体系中加入荧光基团，反应体系中荧光显色物质的参与，使得扩增过程中的荧光强度和产物之间建立对应的线性关系，最终通过电脑分析

收集的信号形成扩增曲线。理想状态下扩增曲线符合 2N 方程（N 为循环次数），线型应为“J”型，但本研究中扩增曲线通常表现为“S”型。在 PCR 扩增曲线初期信号的背景值与产生的荧光值不能明显区分，荧光信号随着 PCR 的产物扩增进入指数期、线性期和



A: RT-LAMP 产物加入 SYBR Green I SYBR Green I dye result of RT-LAMP product; B: RT-LAMP 产物电泳检测 Electrophoresis detection of RT-LAMP product; C: RT-PCR 电泳检测 Electrophoresis detection of RT-PCR product. M: 2000 bp DNA marker; 1—23: 待测样品 Samples; 24: 清水对照 Water control

图 10 RT-PCR 和 RT-LAMP 方法检测田间样品

Fig. 10 Field-infected samples detected by RT-PCR and RT-LAMP

最终的平台期后，PCR 产物的量就可以在指数期的线型上被检测出来^[28]。本试验正是利用了这一原理，在反应体系中加入荧光染料，实时监测扩增过程，后通过扩增曲线确定反应的扩增效果。

引物在整个反应中起着重要的作用，不同引物其退火温度及引物间序列碱基大小的不同，直接影响 RT-LAMP 反应中茎环结构的形成^[29]，从而影响 RT-LAMP 反应。本试验依据 RT-LAMP 反应原理，在

18 条已报道的 ACLSV 基因组保守区域设计了 3 组引物。3 组引物设计过程中，在满足反应原理的基础上，尽量将引物位置定位在保守区域，再通过试验验证引物的可用性。由图 1 可得出的第 3 组引物效果最好，原因应该是该组引物与 ACLSV 基因组匹配度更高，其余两组引物可能是不符合 RT-LAMP 的反应要求。

本试验对 RT-LAMP 反应体系，即 Mg^{2+} 、dNTPs、

Betaine、FIP/BIP、F3/B3 浓度,反应时间和反应温度均进行了优化,确保了反应在最佳的条件下进行,节省了材料和时间。对 4 种常见的苹果病毒病原进行了 RT-LAMP 特异性研究,结果表明 RT-LAMP 检测 ACLSV 具有很高的特异性。2016 年,卢永灿^[30]针对梨寄主建立了 ACLSV RT-LAMP 检测方法。本研究针对苹果寄主,进一步完善了用 RT-LAMP 法检测不同寄主感染 ACLSV 的情况,而且通过实时荧光定量 PCR 仪进行实时监测,试验结果更精确更具有说服力。

高效灵敏是 LAMP 反应的一大优点,本研究表明 RT-LAMP 的确具有很高的特异性,RT-LAMP 的灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍。周彤等^[21]利用 RT-LAMP 方法检测水稻黑条矮缩病毒 (*Rice black-streaked dwarf virus*, RBSDV),结果表明 RT-LAMP 检测方法可特异地检测植物和飞虱体内的 RBSDV,与 RT-PCR 灵敏度基本一致;刘科宏等^[24]研究表明,RT-LAMP 方法检测柑橘黄化脉明病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*) 灵敏度是 RT-PCR 方法的 10 倍;王永江等^[31]研究表明,RT-LAMP 方法检测柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV) 灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍;JU^[32]利用 RT-LAMP 技术检测马铃薯卷叶病毒 (*Potato leafroll virus*) 的灵敏度是 RT-PCR 技术的 2000 倍;姜珊珊等^[33]研究表明,RT-LAMP 检测甘薯羽状斑驳病毒 (*Sweet potato feathery mottle virus*, SPFMV) 灵敏度是 RT-PCR 的 10 倍。由此可见,不同的 RT-LAMP 反应中,RT-LAMP 的灵敏度差异较大,原因可能是在不同的反应中设计的引物长度、引物间距离、引物溶解温度、引物末端稳定性、GC 含量与二级结构不同,引物和模板的结合率受到了不同的影响,也可能与反应中酶活性、化学试剂、人为操作有关。

目前世界上报道的苹果病毒有 39 种之多^[1],培育无毒苗木以及开展苹果病毒种类调查均需要对病毒进行检测。RT-LAMP 作为一种敏感、特异、简便、快速的新型检测技术,具有一定的优越性,已经广泛应用于医学、农业等各个领域。本研究建立的 RT-LAMP 检测方法,无需专门的仪器,直接以待测样品 RNA 为模板,一步反应即可完成检测,反应仅需 1 h,更适合基层单位对大量样品进行 ACLSV 检测。

4 结 论

成功建立了苹果褪绿叶斑病毒 (ACLSV) RT-

LAMP 检测方法,该方法具有较好的特异性、灵敏性,可以快速地通过肉眼观察试验结果,适合基层单位大量检测 ACLSV。

References

- [1] 李文慧,牛建新. 苹果病毒的研究现状. 北方果树, 2006(4): 3-5.
LI W H, NIU J X. The research status of apple viruses. *Northern Fruits*, 2006(4): 3-5. (in Chinese)
- [2] SATO K, YOSHIKAWA N, TAKAHASHI T. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *The Journal of General Virology*, 1993, 74(9): 1927-1931.
- [3] ZHU H, WANG G P, HU H J, TIAN R, HONG N. The genome sequences of three isolates of *Apple chlorotic leaf spot virus* from pear (*Pyrus* sp.) in China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2014, 36(3): 396-402.
- [4] WANG M, DAI H. First report of *Apple chlorotic leaf spot virus* in Hawthorn in China. *Plant Disease*, 2015, 99(1): 164.
- [5] NIU F, PAN S, WU Z, JIANG D, LI S. Complete nucleotide sequences of the genomes of two isolates of *Apple chlorotic leaf spot virus* from peach (*Prunus persica*) in China. *Archives of Virology*, 2012, 157(4): 783-786.
- [6] GERMAN-RETANA S, BERGEY B, DELBOS R P, CANDRESSE, DUNEZ J. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of *Apple chlorotic leaf spot trichovirus* (ACLSV). *Archives of Virology*, 1997, 142(4): 833-841.
- [7] JELKMANN W. The nucleotide sequence of a strain of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) responsible for plum pseudopox and its relation to an apple and plum bark split strain. *Phytopathology*, 1996, 86(Suppl. 11): S101.
- [8] 陈柳, 尚巧霞, 陈笑瑜, 邢冬梅, 冉策, 魏艳敏, 赵晓燕, 刘正坪. 草莓轻型黄边病毒 RT-LAMP 检测方法的建立. 中国农业科学, 2015, 48(3): 613-620.
CHEN L, SHANG Q X, CHEN X Y, XING D M, RAN C, WEI Y M, ZHAO X Y, LIU Z P. Detection of *Strawberry mild yellow edge virus* RT-LAMP. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(3): 613-620. (in Chinese)
- [9] 洪霓, 王国平. 苹果褪绿叶斑病毒生物学及生化特性研究. 植物病理学报, 1999, 29(1): 77-81.
HONG N, WANG G P. The biological and biochemical characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1999, 29(1): 77-81. (in Chinese)
- [10] 耿超, 牟安丽, 刘志强, 李向东, 周涛. 苹果褪绿叶斑病毒外

- 壳蛋白基因的原核表达及抗血清制备. 果树学报, 2012, 29(5): 755-758.
- GENG C, MU A L, LIU Z Q, LI X D, ZHOU T. Preparation of antiserum to *Apple chlorotic leaf spot virus* with coat protein expressed in *E. coli*. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(5): 755-758. (in Chinese)
- [11] 郑佩燕, 孙宝清, 黄惠敏, 韦妮莉, 李靖, 陈德晖. 采用酶联免疫捕获法和荧光酶联免疫吸附法检测过敏原 IgE 抗体的比较分析. 重庆医科大学学报, 2011, 36(5): 595-598.
- ZHENG P Y, SUN B Q, HUANG H M, WEI N L, LI J, CHEN D H. Capture ELISA and FEIA assay for allergen-specific IgE antibody: a comparative analysis. *Journal of Chongqing Medical University*, 2011, 36(5): 595-598. (in Chinese)
- [12] LIEN K Y, LEE W C, LEI H Y, LEE G B. Integrated reverse transcription polymerase chain reaction systems for virus detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(8): 1739-1748.
- [13] 王婧, 毕阳, 朱艳, 韩舜愈, 祝霞, 盛文军, 李敏. 巢式 PCR 快速检测西瓜细菌性果斑病菌. 中国农业科学, 2014, 47(2): 284-291.
- WANG J, BI Y, ZHU Y, HAN S Y, ZHU X, SHENG W J, LI M. Nested-PCR rapidly detect *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from watermelon seeds. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(2): 284-291. (in Chinese)
- [14] GUNDERSEN D E, LEE I M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 1996, 35(3): 144-151.
- [15] 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 任芳, 胡国君, 朱红娟. 葡萄病毒分子检测技术研究进展. 园艺学报, 2014, 41(5): 1009-1019.
- FAN X D, DONG Y F, ZHANG Z P, REN F, HU G J, ZHU H J. Progress on molecular detection of grapevine viruses. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(5): 1009-1019. (in Chinese)
- [16] ČEPIN U, GUTIÉRREZ-AGUIRRE I, BALAZIĆ L, POMPE-NOVAK M, GRUDEN K, RAVNIKAR M. A one-step reverse transcription real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of Virological Methods*, 2010, 170(1/2): 47-56.
- [17] WATPADE S, RAIGOND B, THAKUR P D, HANDA A, PRAMANICK K K, SHARMA Y P, TOMAR M. Molecular detection of latent *Apple chlorotic leaf spot virus* in elite mother plants of apple. *Indian Journal of Virology*, 2012, 23(3): 359-363.
- [18] HAO L, XIE J, CHEN S, WANG S, GONG Z, LING K S, GUO L, FAN Z, ZHOU T. A multiple RT-PCR assay for simultaneous detection and differentiation of latent viruses and apscarviroids in apple trees. *Journal of Virological Methods*, 2016, 234: 16-21.
- [19] PENG D, XIE J, QIANG W, LING K S, GUO L, FAN Z, ZHOU T. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of Virological Methods*, 2017, 248: 154-158.
- [20] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): e63.
- [21] 周彤, 杜琳琳, 范永坚, 周益军. 水稻黑条矮缩病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立. 中国农业科学, 2012, 45(7): 1285-1292.
- ZHOU T, DU L L, FAN Y J, ZHOU Y J. Development of a RT-LAMP assay for rapid detection of *Rice black-streaked dwarf virus*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(7): 1285-1292. (in Chinese)
- [22] MORI Y, KITAO M, TOMITA N, NOTOMI T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2004, 59(2): 145-157.
- [23] MORI Y, NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2009, 15(2): 62-69.
- [24] 刘科宏, 陈洪明, 周彦, 李中安. 柑橘黄化脉明病毒 RT-LAMP 检测方法的建立. 园艺学报, 2015, 42(5): 997-1002.
- LIU K H, CHEN H M, ZHOU Y, LI Z A. Establishment of RT-LAMP assay for detection of *Citrus yellow vein clearing virus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(5): 997-1002. (in Chinese)
- [25] THAI H T C, LE M Q, VUONG C D, PARIDA M, MINEKAWA H, NOTOMI T, HASEBE F, MORITA K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome Coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(5): 1956-1961.
- [26] HARPER S J, WARD L I, CLOVER G R. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology*, 2010, 100(12): 1282-1288.
- [27] 李健, 陈沁, 熊炜, 方雪恩. 口蹄疫病毒 RT-LAMP 检测方法的建立. 病毒学报, 2009, 25(2): 137-142.
- LI J, CHEN Q, XIONG W, FANG X N. Establishment of RT-LAMP for rapid detection of *Foot-and-mouth disease virus*. *Chinese Journal of Virology*, 2009, 25(2): 137-142. (in Chinese)
- [28] 李月华. LAMP 与 SYBR GREEN I 实时荧光定量 PCR 方法检测酸奶中葡糖杆菌的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2015.
- LI Y H. Study on LAMP and SYBR GREEN I real time PCR for detection of *Gluconobacter* in yoghurt[D]. Baoding: Agricultural

- University of Hebei, 2015. (in Chinese)
- [29] 朱韩武, 曹俊, 周华云, 李菊林, 朱国鼎, 顾亚萍, 王伟明, 刘耀宝, 陶志勇, 高琪. 环介导等温扩增技术检测蚊体内间日疟原虫子孢子的研究. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 22(2): 158-163.
- ZHU H W, CAO Y, ZHOU H Y, LI J L, ZHU G D, GU Y P, WANG W M, LIU Y B, TAO Z Y, GAO Q. Detection of *Plasmodium vivax* sporozoites-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2010, 22(2): 158-163. (in Chinese)
- [30] 卢永灿. 三种梨病毒实时荧光定量 RT-PCR 和 RT-LAMP 检测技术的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- LU Y C. The establishment of real-time RT-PCR and RT-LAMP techniques for the detection of three viruses infecting pear plants[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [31] 王永江, 周彦, 李中安, 苏华楠, 黄爱军, 唐科志, 周常勇. 柑橘衰退病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立. 中国农业科学, 2013, 46(3): 517-524.
- WANG Y J, ZHOU Y, LI Z A, SU H N, HUANG A J, TANG K Z, ZHOU C Y. A RT-LAMP assay for detection of *Citrus tristeza virus*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(3): 517-524. (in Chinese)
- [32] JU H J. Simple and rapid detection of *Potato leafroll virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Plant Pathology Journal*, 2011, 27(4): 385-389.
- [33] 姜珊珊, 冯佳, 张眉, 王升吉, 辛志梅, 吴斌, 辛相启. 甘薯羽状斑驳病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立. 中国农业科学, 2018, 51(7): 1294-1302.
- JIANG S S, FENG J, ZHANG M, WANG S J, XIN Z M, WU B, XIN X Q. Development of RT-LAMP assay for rapid detection of *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV). *Scientia Agricultura Sinica*, 51(7): 1294-1302. (in Chinese)
- (责任编辑 岳梅)