

# 番茄黑环病毒 RT-LAMP 检测方法的建立

辛言言<sup>1</sup>,刘洪义<sup>2\*</sup>,杨长志<sup>2</sup>,刘忠梅<sup>2</sup>,杨立群<sup>2</sup>,张永江<sup>1\*</sup>

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100121;  
2. 黑龙江出入境检验检疫局 检验检疫技术中心/国家马铃薯病毒检测重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要:** 为了快速有效地检测出植物样品中的番茄黑环病毒(tomato black ring virus, TBRV), 根据 TBRV 的保守序列设计 RT-LAMP 反应的特异引物, 通过试验成功建立了 TBRV 的 RT-LAMP 特异性检测方法。该方法检测快速, 约 27 min 即可检测到扩增曲线; 特异性强, 可有效区分同样侵染马铃薯的马铃薯 A 病毒(PVA)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、番茄斑萎病毒(TSWV)及番茄环斑病毒(ToRSV); 灵敏度高, 比普通 RT-PCR 灵敏度至少高 10 倍; 并可通过肉眼观察反应颜色的变化直接进行结果判断。该方法适用于 TBRV 的快速检测。

**关键词:** 番茄黑环病毒; 反转录-环介导等温扩增; 检测

**中图分类号:** S41-30      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2015)04-0088-05

## Detection of Tomato Black Ring Virus by Loop-mediated Isothermal Amplification

XIN Yanyan<sup>1</sup>, LIU Hongyi<sup>2\*</sup>, YANG Changzhi<sup>2</sup>, LIU Zhongmei<sup>2</sup>,  
YANG Liqun<sup>2</sup>, ZHANG Yongjiang<sup>1\*</sup>

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100121, China;  
2. Technical Center of Inspection and Quarantine, Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau/  
National Key Laboratory for Potato Viruses Detection, Harbin 150001, China)

**Abstract:** A one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method for detection of tomato black ring virus (TBRV) was developed, providing a quick and effective way to detect TBRV in plant materials. Using the Primer Explorer software, RT-LAMP primers were designed based on a conserved region of TBRV. The method only needed about twenty-seven minutes for obtaining of the amplification curve. The amplification curve result of specificity test using TBRV, potato virus A (PVA), potato virus Y (PVY), tomato spotted wilt virus (TSWV), tomato ringspot virus (ToRSV), healthy potato leaves and water as template showed that the assay could amplify TBRV specifically, in consistent with the fluorescent detection reagent (FDR) reaction result. The sensitivity comparison showed that the RT-LAMP method was at least 10 times more sensitive than conventional reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using serial dilutions of total RNA extracts. In addition, the result could be judged directly by observing the changes in color of the reaction using the RT-LAMP method. Overall, RT-LAMP is a sensitive, simple, specific diagnostic tool, which should be of value in more accurate and quick determination of the distribution of TBRV.

**Key words:** tomato black ring virus; RT-LAMP; detection

收稿日期:2014-10-11  
基金项目:国家质检总局科技计划项目(2013IK274); 质检公益性行业科研专项(201210214)  
作者简介:辛言言(1990-),女,山东聊城人,实验员,本科,主要从事病毒检疫工作。E-mail: xinyanyan2010@aliyun.com  
\* 通讯作者:刘洪义(1966-),男,黑龙江哈尔滨人,研究员,硕士,主要从事病毒检疫工作。E-mail: liuhongyi665@163.com  
张永江(1977-),男,山东潍坊人,副研究员,博士,主要从事病毒检疫工作。E-mail: zhangyjpvi@yeah.net

番茄黑环病毒(tomato black ring virus, TBRV)属于豇豆病毒科(*Comoviridae*)线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)。该病毒寄主范围较广,可侵染马铃薯和葡萄等多种重要经济作物,对这些产业存在严重威胁。该病毒除了通过介体、种子和机械传播之外,也可通过无性繁殖材料的运输长距离传播,一旦传入我国,很容易定殖扩散,造成严重的经济损失。因此针对该病毒建立快速高效的检测方法,防止其传入及扩散是非常必要的<sup>[1]</sup>。目前,针对该病毒的检测方法有生物学检测、电镜观察、血清学检测及多种分子生物学检测方法<sup>[2-4]</sup>,利用环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术检测该病毒的方法国内外还未见报道。

LAMP是2000年由日本学者Notomi等开发的一种在恒温条件下特异、高效且快速扩增核酸的技术<sup>[5]</sup>。该技术针对目的序列设计2对特异引物,在具有链置换活性的DNA聚合酶的作用下实现高效扩增,具有高灵敏度和特异性,且操作简单的特点<sup>[6-9]</sup>。为此,本研究根据TBRV的基因保守序列设计RT-LAMP引物,通过试验建立TBRV的RT-LAMP检测方法,为TBRV的检测提供一种快速高效、特异灵敏的新方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

材料:番茄黑环病毒(TBRV)、马铃薯A病毒(PVA)、马铃薯Y病毒(PVY)、番茄斑萎病毒(TSWV)、番茄环斑病毒(ToRSV)阳性材料及阴性对照(健康马铃薯叶片,用NC表示)由中国检验检疫科学研究院植物病毒实验室保存。

试剂:Loopamp RNA扩增反应试剂盒、Loopamp FD荧光检测试剂购自日本Eiken Chemical公司, RNA提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,反转录试剂盒购自TransGen公司,PCR所需10×Ex Taq Buffer、Ex Taq(5 U/μL)购自日本Takara公司,dNTP Mix(10 mmol/L)购自美国Promega公司,其他试剂均为常规分析纯试剂。

仪器:浊度仪为日本Eiken Chemical公司生产的LA-320C实时浊度仪,PCR仪为美国ABI公司Veriti 96 Well快速PCR仪。

### 1.2 核酸提取

分别称取TBRV、PVA、PVY、TSWV、ToRSV及NC材料0.1 g,使用RNA快速提取试剂盒(离心柱型)提取样品总RNA。

### 1.3 RT-PCR 检测

根据TBRV基因组保守序列设计RT-PCR检测引物,由北京赛百盛有限公司合成。TBRV-F: 5'-GGCATTTCTTATAGAGAATATCCCTCC-3'; TBRV-R: 5'-GCTTTTTCAGAAAAAYATTTTATCAT-3';扩增产物长度约为277 bp。

cDNA合成:在0.2 mL的反应管中加入2 μL总RNA、1 μL下游引物(10 μmol/L)、10 μL 2×TS II Reaction Mix、1 μL TransScript II RT/RI Enzyme Mix及6 μL DEPC-H<sub>2</sub>O;混匀后于50℃孵育30 min,然后85℃加热5 min,获得cDNA。

PCR扩增:在0.2 mL的反应管中加入cDNA 2 μL、上游引物(10 μmol/L)1 μL、下游引物(10 μmol/L)1 μL、dNTP Mix(10 mmol/L)0.5 μL、Ex Taq(5 U/μL)0.3 μL、10×Ex Taq Buffer(含Mg<sup>2+</sup>)2.5 μL及DEPC-H<sub>2</sub>O 17.7 μL,然后按照PCR反应程序进行扩增。PCR程序:95℃5 min;94℃30 s,56℃30 s,72℃20 s,30个循环;72℃5 min。

反应结束后,取5 μL RT-PCR产物进行1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 RT-LAMP 检测

1.4.1 RT-LAMP引物设计 下载GenBank数据库中已登录的TBRV基因序列,运用DNAMAN软件进行序列的同源性比对,选择TBRV基因序列特异保守区域为靶序列,对靶序列进行必要的修改处理,并将处理后的序列上传至日本Eiken Chemical公司提供的在线LAMP引物设计软件Primer Explore 4.0(<http://primerexplore.jp/elamp4.0.0/index.html>),设计出LAMP引物,包括内引物(FIP/BIP)和外引物(F3/B3),由北京赛百盛有限公司合成。TBRV-F3:5'-TGTTGAGATAACCGATCTGA-3'; TBRV-B3:5'-ATAGCAAACCAAGGAAAAGG-3'; TBRV-FIP:5'-CTATATTTTCGCTGCGGGACCAATAACTCAACTTTC-TTCTAGAGTG-3'; TBRV-BIP:5'-GTTTAGGTTTA-ATTTCTGCAGGGTACAAACCTTGATTATCGCCA-3'。

1.4.2 最佳反应温度的确定 RT-LAMP操作按照Loopamp RNA扩增试剂盒说明进行,反应体系为20 μL,包括:2×反应缓冲液(RM)10 μL,酶溶液(EM)0.8 μL,引物FIP和BIP(浓度均为40 pmol/μL)各0.8 μL, F3和B3(浓度均为10 pmol/μL)各0.4 μL, RNA模板1.6 μL,去离子水(DW)5.2 μL。

反应温度分别设为59℃、61℃、63℃和65℃,反应时间为60 min。扩增反应在实时浊度仪上进行,根据60 min内出现扩增曲线的最短时间确定最

佳反应温度。

1.4.3 特异性试验 以 TBRV、PVA、PVY、TSWV、ToRSV 及 NC 的总 RNA 和水(作为空白对照,用 BC 表示)为模板进行 RT-LAMP 反应,体系中同时加入 1.0 μL 钙黄绿素荧光染料(即 Loopamp FD 荧光检测试剂),验证该方法的特异性。

1.4.4 灵敏度试验 将所提取的 TBRV 总 RNA 按  $10^1 \sim 10^6$  倍进行浓度梯度稀释后用作模板,分别进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测,根据反应结果比较 2 种方法的灵敏度。

1.4.5 扩增产物检测 实时扩增曲线检测:扩增进行时,如果有产物出现,反应液会产生一定的浊度;浊度仪会将浊度信号收集,以扩增曲线的形式反映,从而对结果进行判断。

染料颜色反应检测:在 LAMP 反应体系中加入 Loopamp FD 荧光检测试剂,反应结束后会产生肉眼可见的荧光颜色反应。如果反应体系变为绿色即为阳性反应,若为橙色则为阴性反应。

2 结果与分析

2.1 RT-LAMP 的最佳反应温度

以 TBRV 的总 RNA 为模板,进行 RT-LAMP 反应,实时浊度仪输出的扩增时间曲线结果如图 1。由图 1 可以看出,在 63 ℃ 的反应条件下最快产生扩增曲线(27 min)且浊度值最高,因此,确定 63 ℃ 为最佳反应温度。

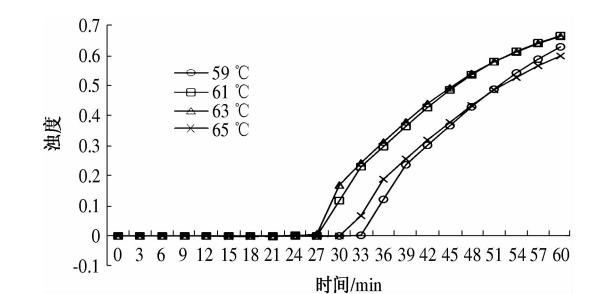
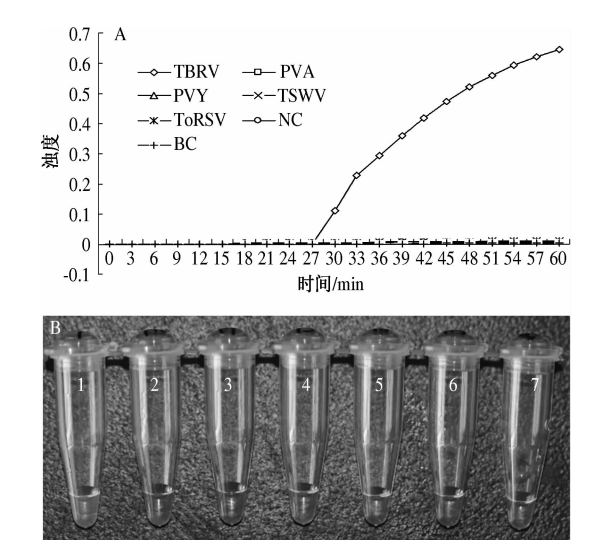


图 1 不同反应温度扩增曲线

2.2 RT-LAMP 检测方法的特异性

分别以 TBRV、PVA、PVY、TSWV、ToRSV、NC 的总 RNA 及 BC 为模板,进行 RT-LAMP 反应,温度为 63 ℃,时间为 60 min。体系中加入钙黄绿素荧光染料使得反应结束后可以通过反应管内所产生的颜色变化判断是否扩增,结果如图 2 所示。由图 2A 可以看出,只有 TBRV 能够检测到扩增曲线,其他样品在反应时间内都未检测到扩增曲线。反应结束后,加入 TBRV 总 RNA 的反应管变成了绿色,为阳性反应;而其他反应管均为橙色,为阴性反应(图 2B)。扩增曲线结果与颜色反应结果一致,符合预期,表明本研究所建立的 RT-LAMP 检测方法具有

良好的特异性,检测结果准确。

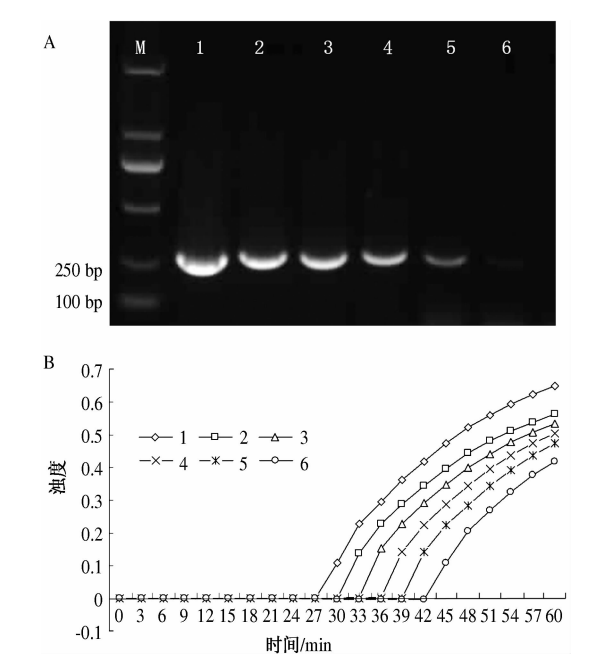


A:扩增曲线; B:颜色反应。1: TBRV; 2: PVA; 3: PVY; 4: TSWV; 5: ToRSV; 6: NC; 7: BC

图 2 RT-LAMP 特异性试验结果

2.3 RT-LAMP 检测方法的灵敏度

RT-PCR 检测表明,当 RNA 浓度稀释  $10^5$  倍时,PCR 电泳条带非常弱;当稀释  $10^6$  倍时,已经不能够产生明显的 PCR 电泳条带(图 3A)。在 LAMP 检测中,当 RNA 的浓度稀释  $10^6$  倍时,在 42 min 左右仍然能够产生阳性的扩增曲线(图 3B),表明本研究建立的 RT-LAMP 方法比 PCR 方法灵敏度至少高 10 倍。



A:RT-PCR 检测; B:RT-LAMP 检测。M:DL2000 Marker; 1—6:分别为  $10^1 \sim 10^6$  倍稀释

图 3 RT-LAMP 灵敏度试验结果

### 3 结论与讨论

TBRV 是我国检疫性有害生物。本研究针对 TBRV 所建立的 RT-LAMP 检测方法,在约 27 min 时即可检测到 TBRV 的扩增,从核酸提取到反应完成整个检测周期只需 1.5 h 左右,检测方法快速、简便。RT-LAMP 检测方法能够快速准确地检测出 TBRV,而其他病毒和健康样品均无扩增,说明该方法具有高度的特异性。灵敏度方面,RT-LAMP 检测方法比普通 RT-PCR 检测方法高 10 倍;同时反应结果不需要凝胶电泳分析,可通过扩增曲线或肉眼观察产生的颜色反应进行结果判断,检测方法直观简捷。本研究成功建立了针对 TBRV 的 RT-LAMP 检测方法,可用于口岸的现场检测。

特异性引物的设计是建立某种病毒 LAMP 检测方法的关键点之一,它取决于所选序列的特异性。因此,需要利用序列分析软件筛选保守特异的目的序列,然后将序列上传至引物设计服务器设计引物,才能够得到较为理想的引物组。在进行结果判定时,尽量避免开盖检测,防止产生二次污染导致出现假阳性结果。

Fukuta 等<sup>[10]</sup>在 2003 年用 RT-LAMP 方法直接从感染花叶病毒的植物组织中快速检测出日本山药花叶病毒(JYMV);紧接着 Shiro 等<sup>[11]</sup>在 2004 年对番茄斑萎病毒进行检测的结果显示,免疫捕获 RT-LAMP 的灵敏度比 RT-PCR 高 100 倍;2009 年 Boubourakas 等<sup>[12]</sup>通过对桃潜花叶类病毒(PLMVd)的 RT-LAMP 检测,建立了类病毒的 RT-LAMP 检测方法;2012 年,郭木金等<sup>[13]</sup>采用产物沉淀反应和加入荧光染料产生颜色变化的检测方法,直接观察 RT-LAMP 的阳性结果。随后,在植物病毒检测领域,RT-LAMP 方法得到了越来越多的应用<sup>[14-25]</sup>,技术也愈加完善,这对植物病毒检验检疫领域的发展具有重大意义。

#### 参考文献:

[1] Pospieszny H, Jonczyk M, Borodynko N. First record of tomato black ring virus(TBRV) in the nature in ffection of *Cucumis sativus* in Poland[J]. Journal of Plant Protection Research, 2003, 43(1): 11-18.

[2] Harper S J, Delmiglio C, Ward L I, et al. Detection of tomato black ring virus by real-time one-step RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2011, 171(1): 190-194.

[3] 高焕利, 杨翠云, 周国梁, 等. 番茄黑环病毒检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2007, 21(3): 149-152.

[4] 杨翠云, 于翠, 宋绍祎, 等. 番茄黑环病毒分子生物学检测方法 & 分离物序列分析[J]. 植物检疫, 2006, 20(5): 275-278.

[5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.

[6] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerate detection by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16: 223-229.

[7] 陈金松, 黄丛林, 张秀海, 等. 环介导等温扩增技术检测含有 CaMV35S 的转基因玉米[J]. 华北农学报, 2011, 26(4): 8-14.

[8] 洪艳, 贺凡, 王晓闻. LAMP 检测沙门氏菌方法的建立[J]. 山西农业科学, 2014, 42(4): 340-342.

[9] 许紫建, 杨兵, 苏霞, 等. 空肠弯曲菌环介导等温扩增检测方法的建立和优化[J]. 华北农学报, 2013, 28(3): 222-226.

[10] Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, et al. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP[J]. Arch Virol, 2003, 148: 1713-1720.

[11] Shiro F, Kazushi O, Keiko Y, et al. Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Tomato spotted wilt virus from chrysanthemum[J]. Journal of Virological Methods, 2004, 121: 49-55.

[12] Boubourakas I N, Fukuta S, Kyriakopoulou P E. Sensitive and rapid detection of Peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 160: 63-68.

[13] 郭木金, 廖富荣, 陈庆, 等. 豇豆重花叶病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 植物保护, 2012, 38(1): 123-127.

[14] Peng J, Shi M J, Xia Z H, et al. Detection of cucumber mosaic virus isolates from banana by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Arch Virol, 2012, 157: 2213-2217.

[15] Wei Q W, Yu C, Zhang S Y, et al. One-step detection of Bean pod mottle virus in soybean seeds by the reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Virology Journal, 2012, 9: 187-194.

[16] Zhao L, Cheng J L, Hao X G, et al. Rapid detection of tobacco viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Arch Virol, 2012, 157: 2291-2298.

[17] Fukuta S, Tamura M, Maejima H, et al. Differential detection of Wheat yellow mosaic virus, Japanese soil-borne wheat mosaic virus and Chinese wheat mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction[J]. Journal of Virological Methods, 2013,

189(2):348-354.

[18] Li J Y, Wei Q W, Liu Y, *et al.* One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 193(2):583-588.

[19] Jaroszewska B H, Borodynko N. Detection of *Pepino mosaic virus* isolates from tomato by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *Arch Virol*, 2013, 158:2153-2156.

[20] Shen W T, Tuo D C, Yan P, *et al.* Detection of *Papaya leaf distortion mosaic virus* by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 195:174-179.

[21] Bhat A I, Siljo A, Deeshma K P, *et al.* Rapid detection of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification(LAMP) [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 193(1):190-196.

[22] Almasi M A, Jafary H, Moradi A, *et al.* Detection of coat protein gene of the *Potato leafroll virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Plant Pathol Microb*, 2013, 4:156-161.

[23] Park J G, Jung Y C, Kil E J, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*(CChMVd) [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 193(1):232-237.

[24] Wang Z Y, Gu Q S, Sun H, *et al.* One-step reverse transcription loop mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Cucurbit chlorotic yellows virus* [J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 195:63-66.

[25] Siljo A, Bhat A I. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Banana bract mosaic virus* in cardamom (*Elettaria cardamomum*) [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2014, 138:209-214.

\*\*\*\*\*

(上接第 45 页)

参考文献:

[1] 王琳清,陈秀兰,柳学余. 小麦突变育种学[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2004.

[2] Zhu Y, Zhao H F, Ren G D, *et al.* Characterization of a novel developmentally retarded mutant(*drm1*) associated with the autonomous flowering pathway in *Arabidopsis* [J]. *Cell Research*, 2005, 15(2):133-140.

[3] Ray S K, Rajeshwari R, Sonti R V. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(4):394-401.

[4] 陈绍江,宋同明. EMS 花粉诱变获得高油玉米突变体 [J]. *中国农业大学学报*, 2002, 7(3):12-16.

[5] 王英培. 人工诱变改良大豆品质的研究 [J]. *核农学报*, 2000, 14(1):21-23.

[6] 郝西,郭晓琴,邓士政. 水稻高温敏感侧根缺失突变体表型性状的初步研究 [J]. *河南农业科学*, 2013, 42(6):32-36.

[7] McCallum C M, Comai L, Greene E A, *et al.* Targeted screening for induced mutations [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(4):455-457.

[8] 吴军,陈佳颖,赵剑,等. 2 个水稻温敏感叶色突变体的光合特性研究 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28(21):

16-21.

[9] Till B J, Reynolds S H, Weil C, *et al.* Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING [J]. *BMC Plant Biology*, 2004, 4:12-19.

[10] Caldwell D G, McCallum N, Shaw P, *et al.* A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Plant Journal*, 2004, 40(1):143-150.

[11] Gottwald S, Bauer P, Komatsuda T, *et al.* TILLING in the two-rowed barley cultivar ‘Barke’ reveals preferred sites of functional diversity in the gene *HvHox1* [J]. *BMC Research Notes*, 2009, 2:258-262.

[12] 赵天祥,孔秀英,周荣华,等. EMS 诱变六倍体小麦偃展 4110 的形态突变体鉴定与分析 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(3):755-764.

[13] 徐艳花,陈锋,董中东,等. EMS 诱变的普通小麦豫农 201 突变体库的构建与初步分析 [J]. *麦类作物学报*, 2010, 30(4):625-629.

[14] Lupton F G H. Wheat breeding: Its scientific basis [M]//New York: Chapman and Hall Ltd, 1987:130-131.

[15] 刁钰婵,陈志斌,焦杨,等. EMS 诱变玉米花粉 M<sub>2</sub> 代生物学效应研究 [J]. *河南农业科学*, 2008(3):33-35,68.