

应用逆转录环介导等温扩增技术检测大豆种子中烟草环斑病毒

郭立新¹, 陈先锋², 徐亚飞¹, 邱志君¹, 朱迪琦¹, 段维军²

(1. 北仑出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315800; 2. 宁波出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315012)

摘要: 根据烟草环斑病毒 (TRSV) 外壳蛋白基因序列设计并合成了 1 组 RT-LAMP 引物, 利用实时浊度仪监测反应过程, 初步建立了烟草环斑病毒的 RT-LAMP 检测方法, 并进行了特异性与灵敏度检测。结果显示, RT-LAMP 灵敏度与普通 RT-PCR 法相当, 但检测时间明显缩短, 1 h 即可完成反应。此外, 体系中加入钙黄绿素, 反应结束后, 可通过肉眼观察荧光的有无来判断是否有扩增。对大豆种子中携带的烟草环斑病毒进行了 RT-LAMP 检测, 裸眼判定与仪器监测结果一致。结果证明所建立的 TRSV RT-LAMP 方法具有快速、特异、灵敏、操作简单等特点, 不需复杂仪器设备, 适合于 TRSV 的现场快速检测。

关键词: 烟草环斑病毒; 逆转录环介导等温扩增; 检测

中图分类号: S412 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841 (2012) 06-0980-04

Detection of Tobacco Ringspot Virus in Soybean Seeds by the Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Method

GUO Li-xin¹, CHEN Xian-feng², XU Ya-fei¹, QIU Zhi-jun¹, ZHU Di-qi¹, DUAN Wei-jun²

(1. Beilun Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315800, Zhejiang; 2. Ningbo Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315012, Zhejiang, China)

Abstract: A sets of primers were designed and synthesized based on the coat protein coding region of tobacco ringspot virus (TRSV) for reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay. The amplification was detected using the real time turbidimeter. An accelerated RT-LAMP procedure with one step was developed for the detection of TRSV. The specificity and sensitivity of the RT-LAMP assay were tested. RT-PCR compared to RT-LAMP by serial dilutions of total RNA extracts, they had the same sensitivities, but RT-LAMP was quicker, and the reaction could be finished within 1 hour. In addition, the presence or absence of the fluorescent display in daylight allowed naked easy detection of the amplification of TRSV genomic RNA using Calcein. The RT-LAMP assay was applied successfully to detect TRSV in soybean seeds, and the result by the addition of Calcein was consistent with the result detected by the real time turbidimeter. The method is rapid, specific, sensitive and suitable for rapid field detection of TRSV.

Key words: Tobacco ringspot virus (TRSV); Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP); Detection

烟草环斑病毒 (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) 是豇豆花叶病毒科 (*Comoviridae*) 线虫传多面体病毒属 (*Nepovirus*) 的代表种^[1]。该病毒分布于日本、韩国、美国、加拿大及中国台湾等 50 多个国家和地区; 其寄主范围非常广泛, 可侵染大豆、马铃薯、唐菖蒲等 54 科 300 多种植物, 造成叶片系统褪绿斑、坏死环斑, 茎顶枯, 根腐烂, 危害严重时导致植株矮化, 结果少及果实变小畸形; TRSV 能经线虫介体传播, 并能经种子远距离传播, TRSV 在大豆上的种传率有时可达到 100%^[2]。

目前, 检测 TRSV 的方法主要有生物学^[3]、免疫电镜^[3]、双抗体夹心酶联免疫吸附法^[2,3]、RT-PCR 技术^[2,4] 及实时荧光 RT-PCR 技术^[2,4], 而近年来开发的环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal am-

plification, LAMP) 技术未见有应用于检测 TRSV 的报道。LAMP 是一种新的核酸扩增技术, 该技术依赖于能够识别靶序列上 6 个特异区域的引物和一个具有链置换特性的 DNA 聚合酶 (*Bst* DNA polymerase), 在等温条件下高效扩增靶基因, 灵敏度和特异性高^[5]。目前该方法已应用于病毒^[6]、类病毒^[7]、细菌^[8] 及真菌^[9] 的检测。本研究利用 RT-LAMP 方法对烟草环斑病毒进行检测, 以期 TRSV 的快速检测提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 烟草环斑病毒 (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) 阳性质控物购自美国 Agdia 公司, 样品

收稿日期: 2012-08-11

基金项目: 宁波检验检疫局科研项目 (甬 K07-2011); 国家质检总局课题 (2011IK169); 质检公益性行业科研专项项目 (201010256); 浙江省重点科技创新团队项目 (2010RS0028)。

第一作者简介: 郭立新 (1976-), 女, 硕士, 工程师, 主要从事植物检疫研究。E-mail: guolx7649@tom.com。

通讯作者: 段维军 (1977-), 男, 博士, 高级农艺师, 主要从事植物检疫研究。E-mail: weijunduan@yahoo.com.cn。

状态为新鲜叶片经液氮处理,磨成粉末状,简称为 TR-A;美国进口的大豆种子由宁波出入境检验检疫局植物检疫实验室提供,经普通 RT-PCR 与 DAS-ELISA 检测确证含有 TRSV,简称为 YP-2。其他 4 种可侵染大豆的病毒,即:番茄环斑病毒(*Tomato ring-spot virus*, ToRSV)、南芥菜花叶病毒(*Arabidopsis mosaic virus*, ArMV)、南方菜豆花叶病毒(*Southern bean mosaic virus*, SBMV)及菜豆荚斑病毒(*Bean pod mottle virus*, BPMV)阳性质控物均购自美国 Agdia 公司。

1.1.2 分子生物学试剂 RNeasy Plant Mini Kit 购自 Qiagen 公司, TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) 购自大连宝生物公司, Fluorescent Detection Reagent、RNA Amplification Kit 购自 EIKEN CHEMICAL CO., LTD.。RT-LAMP 引物及 RT-PCR 引物^[10]由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2 主要仪器

LA-320C 实时浊度仪(Loopamp Realtime Turbiditymeter LA-320C) 购自 EIKEN CHEMICAL CO., LTD.。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取 分别对样品及健康烟草叶片,使用 RNeasy Plant Mini Kit 进行植物总 RNA 提取,具体操作见试剂盒说明书。用核酸蛋白分析仪测 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀, 计算核酸的浓度和纯度。

1.3.2 RT-LAMP 引物的设计与合成 从 GenBank 调出所有烟草环斑病毒外壳蛋白基因序列,利用 DNAMAN 6.0.40 软件进行比对分析,找出 TRSV 外壳蛋白基因序列的保守区,利用 LAMP 引物设计软件 PrimerExplorer V4 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) 设计特异性引物(表 1、图 1)。

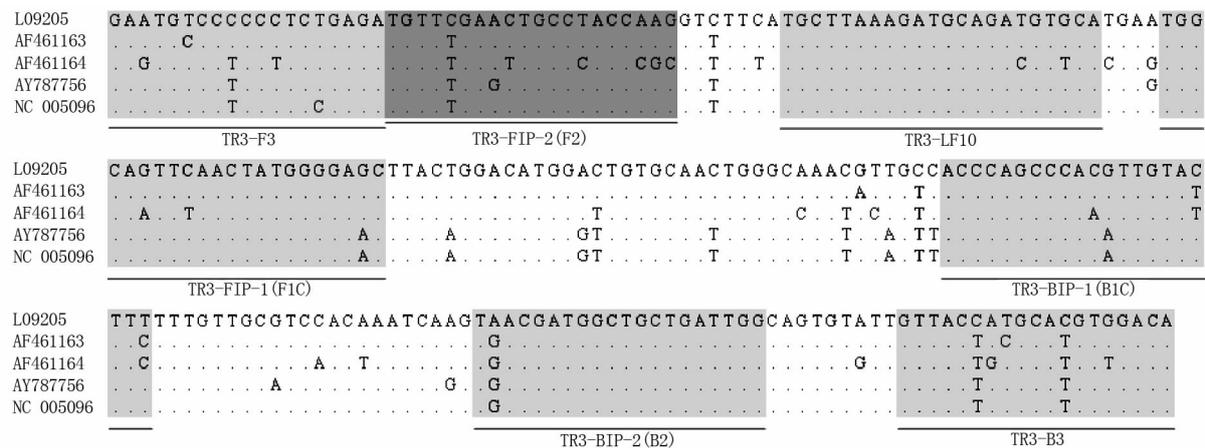
表 1 烟草环斑病毒 RT-LAMP 检测引物

Table 1 Attributes of primers used for the RT-LAMP detection of TRSV

引物名称 Primer name	引物类型 Type	长度 Length	位置 ^a Genome position ^a	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
TR3-F3	外侧上游引物	19-mer	282-300	GAATGTCCCCCTCTGAGA
TR3-B3	外侧下游引物	19-mer	486-504	TGTCCACGTGCATGGTAAAC
TR3-FIP	内侧上游引物	42-mer	354-375,301-320	GCTCCCATAGTTGAACTGCCATGTTGCAACTGCCTACCAAG
TR3-BIP	内侧下游引物	41-mer	414-434,457-476	ACCCAGCCCACGTTGTACTTTCCAATCAGCAGCCATCGTTA
TR3-LF10	环状上游引物	22-mer	328-349	TGCACATCTGCATCTTTAAGCA

^a在 NCBI 基因库登录号 L09205 上的位置。

^a Genome position refers to reference NCBI, accession L09205.



左边列出 NCBI 基因库中的登录号。

The accession numbers from NCBI GenBank are listed on the left.

图 1 RT-LAMP 扩增引物在烟草环斑病毒各分离物外壳蛋白基因序列上的位置

Fig. 1 Alignment of the TRSV coat protein (CP) coding region recognized by the LAMP primers, showing the location of the primers used for RT-LAMP amplification

1.3.3 RT-LAMP 环引物的效果 以 TR-A 总 RNA 为模板,健康烟草叶片总 RNA 为阴性对照,水为空白对照,进行 RT-LAMP 检测,即在 25 μ L 反应体系中加入 2 μ L TR3-FIP(20 μ mol \cdot L⁻¹), 2 μ L TR3-BIP

(20 μ mol \cdot L⁻¹), 0.25 μ L TR3-F3 (20 μ mol \cdot L⁻¹), 0.25 μ L TR3-B3 (20 μ mol \cdot L⁻¹), 1 μ L TR3-LF10 (20 μ mol \cdot L⁻¹), 12.5 μ L 2 \times Reaction Mix, 1 μ L Enzyme Mix, 2.5 μ L RNA, RNase Free dH₂O 补充至

25 μL 。在 63 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。

1.3.4 RT-LAMP 引物特异性检测 以 TR-A、ToRSV、ArMV、SBMV 和 BPMV 总 RNA 为模板,按 1.3.3 体系和条件进行 RT-LAMP 反应。

1.3.5 灵敏度对比试验 以 TR-A 总 RNA 为模板,用 RNase Free dH₂O 稀释总 RNA 进行相对灵敏度检测,在 25 μL 反应体系中,总 RNA 分别为 20 ng、2 ng、200 pg、20 pg、2 pg、200 fg、20 fg,进行实时 RT-LAMP 反应。同时对稀释的 RNA 按试剂盒说明书进行普通 RT-PCR 检测,即在 25 μL 反应体系中加入 2.5 μL 10 \times One Step RNA PCR Buffer,5 μL MgCl₂ (25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$),2.5 μL dNTP Mixture (各 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$),0.5 μL RNase Inhibitor (40 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$),0.5 μL AMV RTase XL (5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$),0.5 μL AMV-Optimized Taq (5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$),0.5 μL 引物 TRSV-F^[10] (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 5'-GATGCAAAGAAAGGAAAGC-3'),0.5 μL 引物 TRSV-R^[10] (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 5'-AG-ATATGGACAACATGGAG-3'),2.5 μL RNA, RNase Free dH₂O 补充至 25 μL 。反应条件为:50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,51 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.6 大豆样品检测 以 YP-2 总 RNA 为模板,健康烟草叶片总 RNA 为阴性对照,水为空白对照,TR-A 为阳性对照,按 1.3.3 体系和条件进行 RT-LAMP 实时浊度检测。同时也进行目视荧光检测,即在 25 μL 反应体系中加入 2 μL TR3-FIP (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),2 μL TR3-BIP (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),0.25 μL TR3-F3 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),0.25 μL TR3-B3 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),1 μL TR3-LF10 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),12.5 μL 2 \times Reaction Mix,1 μL Enzyme Mix,1 μL Fluorescent Detection Reagent,2.5 μL RNA, RNase Free dH₂O 补至 25 μL 。反应条件为:63 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min。

2 结果与分析

2.1 RT-LAMP 环引物的效果

从图 2 可知,加入环引物浊度在 16 min 后就开始增加,而未加入环引物直到 25 min 后浊度才开始增加,很明显环引物可加速反应。

2.2 RT-LAMP 引物特异性检测

如图 3 所示,引物有较强的特异性,5 种大豆病毒中仅能检出 TRSV,不能检出 ToRSV、ArMV、SBMV 和 BPMV,与预期结果相符。

2.3 灵敏度对比试验

灵敏度试验结果显示,试验所建立的 RT-LAMP

检测方法最小检测限为 20 pg (图 4),与 RT-PCR 检测结果一致 (图 5)。

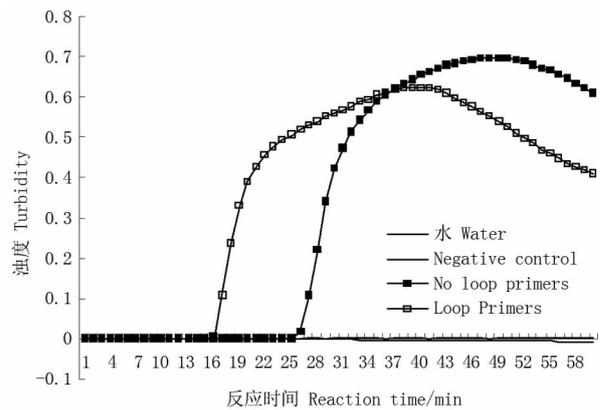


图 2 RT-LAMP 反应中环引物效果
Fig. 2 RT-LAMP assay to examine the effect of the loop primers

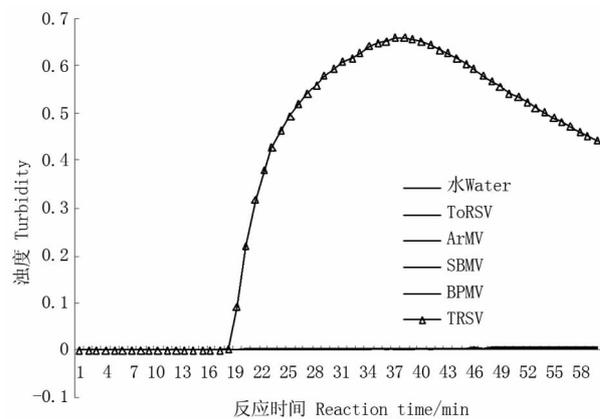


图 3 RT-LAMP 的特异性试验结果
Fig. 3 Specificity of the RT-LAMP assay for the detection of TRSV

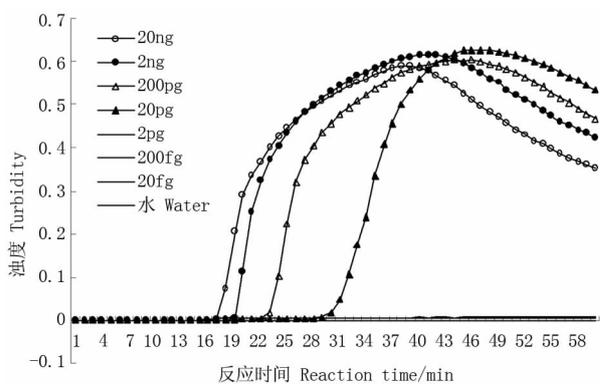
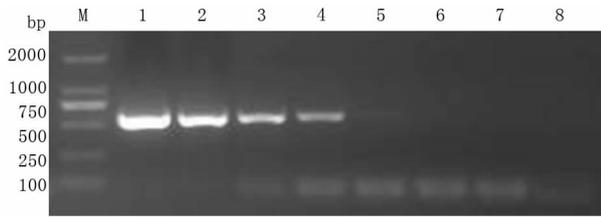


图 4 烟草环斑病毒的 RT-LAMP 相对灵敏度检测结果
Fig. 4 Relative sensitivity of RT-LAMP for the detection of TRSV

2.4 大豆样品检测

大豆样品 YP-2 通过实时浊度 RT-LAMP 反应,检出 TRSV,而水和阴性对照浊度强度没有变化,阳性对照浊度有明显增加 (图 6)。



M:DL2000; 1~7:20 ng,2 ng,200 pg,20 pg,2 pg,200 fg,20 fg 总 RNA; 8:水。
M:DL2000; 1-7:20 ng,2 ng,200 pg,20 pg,2 pg,200 fg,20 fg of total RNA; 8: Water.

图 5 烟草环斑病毒的 RT-PCR 相对灵敏度检测结果

Fig. 5 Relative sensitivity of RT-PCR for the detection of TRSV

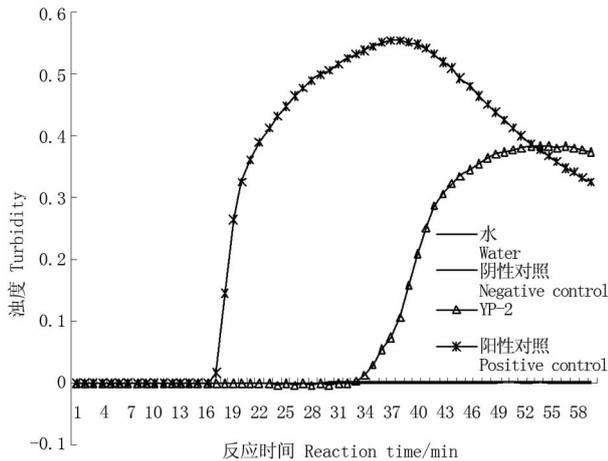


图 6 利用 RT-LAMP 方法检测大豆样品中的烟草环斑病毒

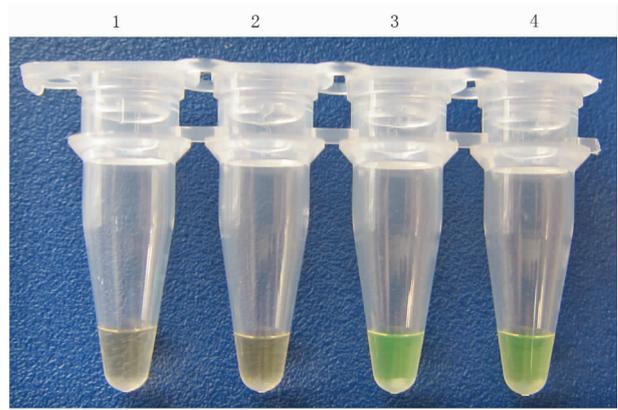
Fig. 6 Detection of TRSV from soybean samples using RT-LAMP method

RT-LAMP 扩增结束后,在正常光照条件下,肉眼可观察到大豆样品 YP-2 和阳性对照反应管颜色明显变为黄绿色,而空白对照与阴性对照反应管颜色没有改变(图 7)。

3 讨论

本研究根据烟草环斑病毒外壳蛋白基因序列设计特异性引物,利用实时浊度仪对 TRSV RT-LAMP 检测方法进行了特异性及灵敏度试验,初步建立了 TRSV 的 RT-LAMP 检测方法,并对大豆种子进行了检测。该方法的灵敏度与普通 RT-PCR 一致。而反应时间明显缩短,整个检测 1 h 内可完成。且通过加入钙黄绿素,可肉眼观察判定结果,整个检测过程不需要复杂仪器设备,只需维持恒温的水浴锅或金属浴就可完成,克服了以往检测方法需要依赖昂贵仪器、检测周期长等不足,尤其适合现场快速检测。

本研究在反应体系中加入一条环引物,反应时



1:水; 2:阴性对照; 3:阳性对照; 4:YP-2
1: Water; 2: Negative control; 3: Positive control; 4: YP-2

图 7 目视 RT-LAMP 法检测大豆样品中的烟草环斑病毒

Fig. 7 Visual observation of the TRSV RT-LAMP products from soybean samples after the reaction

间减少约一半,与 Nagamine 等^[11]研究结论相符。同时由于环引物的特异性结合,提高了反应的特异性。

LAMP 法的特征是针对目标 DNA 链上的 6 个区段设计 4 条不同的引物,然后再利用链置换反应在一定温度下进行反应^[5]。对于同一病毒的不同分离物,要找到完全一致的序列设计 LAMP 引物较难,其最有效的办法是找到较为保守的序列设计引物,采用尽可能多的分离物来筛选引物。本研究仅对 1 个 TRSV 阳性质控物、1 份大豆样品进行了检测,有待于采用更多的分离物进行验证。

参考文献

[1] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. Virus taxonomy [R]. San Diego: Academic Press, 2004: 813-818.
[2] 陈青, 林石明, 杨翠云, 等. GB/T 28081-2011 烟草环斑病毒检疫鉴定方法 [S]. 中华人民共和国国家标准. (Chen Q, Lin S M, Yang C Y, et al. GB/T 28081-2011 Detection and identification of tobacco ringspot virus [S]. National standards of the People's Republic of China.)
[3] 陈枝楠, 邓琼, 郑耘, 等. SN/T 1146-2010 烟草环斑病毒检疫鉴定方法 [S]. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准. (Chen Z N, Deng Q, Zheng Y, et al. SN/T 1146-2010 Detection and identification of tobacco ringspot virus [S]. Entry-Exit Inspection and Quarantine of the People's Republic of China industry standards.)
[4] 杨翠云, 于翠, 魏梅生, 等. SN/T 1146. 2-2009 烟草环斑病毒分子生物学检测方法 [S]. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准. (Yang C Y, Yu C, Wei M S, et al. SN/T 1146. 2-2009 Molecular detection of tobacco ringspot virus [S]. Entry-Exit Inspection and Quarantine of the People's Republic of China industry standards)

表 2 豆浆与 SPC 蛋白乳中硫胺素
热变化的反应动力学参数
Table 2 Kinetic parameters for thiamine
changes in soymilk and SPC milk

体系 System	反应级数 n	K_0 /min ⁻¹	E_a /kJ·mol ⁻¹
豆浆 Soymilk	1	2.42×10^8	72.87
SPC 蛋白乳 SPC milk	1	2.51×10^9	67.11

从表 2 可以看出两体系中硫胺素的热破坏均遵循一级反应动力学,但由于二者的体系不相同所以其反应动力学参数也不同。豆浆的反应活化能要大于 SPC 蛋白乳,所以豆浆体系比 SPC 蛋白乳体系对热稳定。

3 结 论

豆浆和 SPC 蛋白乳中硫胺素的破坏速率随着加热温度的升高而增加,低温、长时间同样可以达到高温、短时间对硫胺素的破坏效果。高温、短时间的热处理能够使硫胺素的保留率达到最大。2 个体系中硫胺素的热破坏反应都属于一级反应动力学,但是二者的动力学参数不同,豆浆的热稳定性强于 SPC 蛋白乳。

参考文献

[1] 王维亮. 大蒜硫胺素的制取[J]. 农产品加工,2009(1):32. (Wang W L. Making up thiamine from garlic[J]. Agricultural Products Processing,2009(1):32.)

[2] 钱文. 维生素的分类和特性[J]. 食品与健康,2001(2):14.

(Qian W. Classification and characteristics of vitamin[J]. Food and Health,2001(2):14.)

- [3] 左进华,董海洲,侯汉学. 大豆蛋白生产与应用现状[J]. 粮食与油脂,2007(5):12-15. (Zuo J H, Dong H Z, Hou H X. Production and application situation of soybean protein[J]. Journal of Cereals and Oils,2007(5):12-15.)
- [4] 关荣发,叶兴乾. 乳制品加工过程中热处理对营养成分的影响[J]. 食品科技,2004(z1):167-170. (Guan R F, Ye X Q. Influence of heat treatment on nutrient component in dairy processing[J]. Food Science and Technology,2004(z1):167-170.)
- [5] Kin-Chor K, Keshavan N. Review: Effect of thermal processing on milk[J]. Food Science and Technology, 1995, 30:263-295.
- [6] 赵洪静,杨晓莉,周瑞华,等. 蔬菜维生素 B1、维生素 B2 保留因子的研究[J]. 卫生研究,2008,37(1):92-96. (Zhao H J, Yang X L, Zhou R F, et al. Study on vitamin B1, vitamin B2 retention factors in vegetables[J]. Journal of Hygiene Research, 2008, 37(1):92-96.)
- [7] Kwok K C, Shiu Y W, Yeung C H, et al. Effect of thermal processing on available lysine, thiamine, thiamine and riboflavin content in soymilk[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1988, 77:473-478.
- [8] 王淑兰,梁英教. 物理化学[M]. 第3版. 北京:北京冶金工业出版社,2007. (Wang S L, Liang Y J. Physical chemistry. The Third Edition[M]. Beijing:Beijing Metallurgy Industry Press,2007.)
- [9] 黄惠华,郭乾初,梁汉华,等. 豆浆热处理过程中 3 种大豆异黄酮苷原的热降解比较[J]. 食品科学,2006,27(9):132-135. (Huang H H, Guo Q C, Liang H H, et al. Comparison study on heat-induced degradation of aglycones of soy isoflavones in soymilk[J]. Food Science,2006,27(9):132-135.)
- [10] Kwok K C, Liang H H, Keshavan N. Optimizing conditions for thermal processes of soy milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2002,50:4832-4838.

(上接第 983 页)

- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12):e63.
- [6] Lee M S, Yang M J, Hseu Y C, et al. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Cymbidium mosaic virus[J]. Journal of Virological Methods, 2011, 173:43-48.
- [7] 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.
- [8] Qiao Y M, Guo Y C, Zhang X E, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Bacillus anthracis* spores[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(12):1939-1946.

- [9] 张裕君,刘跃庭,廖芳,等. 基于 LAMP 方法的苜蓿疫霉根腐病菌分子检测研究[J]. 中国植保导刊,2011,31(10):7-9. (Zhang Y J, Liu Y T, Liao F, et al. Research on molecular detection of *Phytophthora medicaginis* based on LAMP[J]. China Plant Protection, 2011, 31(10):7-9.)
- [10] 张晓雷,檀根甲,魏梅生,等. 大豆种传南方菜豆花叶病毒和烟草环斑病毒的 GICA-RT-PCR 检测[J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36(2):319-322. (Zhang X L, Tan G j, Wei M S, et al. Detection of southern bean mosaic virus and tobacco ringspot virus in soybean seed by GICA-RT-PCR[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2009, 36(2):319-322.)
- [11] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16:223-229.