

## 逆转录环介导等温扩增技术快速检测大豆花叶病毒

张雯娜<sup>1</sup>, 李晋玉<sup>1</sup>, 田金艳<sup>1</sup>, 卫其巍<sup>1</sup>, 智海剑<sup>2</sup>, 陶小荣<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学 植物保护学院, 江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:**大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV)是一种在世界很多国家广泛分布并极具破坏性的植物病毒, 导致大豆严重减产和种质衰退, 每年都会给很多国家带来巨大的农业经济损失, 为此, 建立了一种逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)全新的SMV检测技术, 利用该技术可以快速、准确与有效地检测大豆植株和种子中携带的SMV。根据GenBank数据库中大豆花叶病毒的外壳蛋白基因序列, 设计并筛选到了SMV RT-LAMP特异性引物组, 应用该引物组优化了RT-LAMP反应参数, 灵敏度实验结果表明, RT-LAMP检测SMV比普通RT-PCR灵敏度高10~100倍。结合RNA粗提法, 建立了一步法RT-LAMP快速、灵敏地检测到植物叶片中的SMV。加入荧光染料SYBR Green I则可在反应管中直接观察检测结果, 实现了检测的可视化。该RT-LAMP技术还可灵敏地检测到大豆种子中携带的SMV。RT-LAMP检测方法第一次应用于SMV的检测, 具有灵敏度高、速度快和特异性强的优点, 可应用于实验室和田间大豆样品SMV的快速检测。

**关键词:**大豆花叶病毒; 快速检测; RT-LAMP; 大豆; 种子带毒检测

中图分类号: S435.651

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.03.0422

## Rapid Detection of Soybean Mosaic Virus by Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification

ZHANG Wen-na<sup>1</sup>, LI Jin-yu<sup>1</sup>, TIAN Jin-yan<sup>1</sup>, WEI Qi-wei<sup>1</sup>, ZHI Hai-jian<sup>2</sup>, TAO Xiao-rong<sup>1</sup>

(1. Plant Protection College of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University/National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, National Center for Soybean Improvement, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** *Soybean mosaic virus* (SMV) is a widely distributed and highly destructive plant virus worldwide. Infection by SMV usually results in severe yield losses and seed quality reduction. SMV infected disease has caused a huge economic losses in many countries. Therefore, reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP), a method to achieve rapid, sensitive and accurate detection of SMV in soybean leaves and seeds was established. Using SMV coat protein gene sequences from GenBank database, the RT-LAMP primers sets were designed and the best primers set was selected. Then they were used for the optimization of the RT-LAMP parameters. The sensitivity of the RT-LAMP was 10-100 times higher than the conventional RT-PCR. When crude RNA was integrated in this assay, the developed one-step RT-LAMP could rapidly and sensitively detect SMV in soybean leaves. The reaction product could be directly visualized in tube by adding the fluorescent dye SYBR I. The developed RT-LAMP could also successfully detect SMV in soybean seeds. This is the first report of the application of the RT-LAMP assay to detect SMV in soybean leaves and seeds. The rapid, sensitive and specific RT-LAMP assay developed in this study can be applied widely in laboratories and the field detection of SMV.

**Key words:** Rapid detection; *Soybean mosaic virus*; RT-LAMP; Soybean; Detection of infected seeds

大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV)是一种在世界很多国家广泛分布并极具破坏性的植物病毒, 导致大豆严重减产和种质衰退, 每年都会给很多国家带来巨大的农业经济损失。因此, 加强对该病毒的检测具有重要的意义。目前, 对SMV的检测方法主要有生物学鉴定、酶联免疫反应(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)<sup>[1]</sup>、电镜鉴定和逆转录聚合酶链式扩增反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)<sup>[2]</sup>等方法。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplifica-

tion, LAMP)<sup>[3]</sup>作为近几年新发展的扩增方法, 具有检测速度快、灵敏度高及不需要昂贵的循环扩增仪器等优点, 在Bst DNA聚合酶的作用下, 可高效、快速和特异地扩增出目的片段。LAMP技术已应用于多种动物病毒<sup>[4-7]</sup>和植物病毒<sup>[8-10]</sup>的检测, 但目前尚未应用于SMV的快速检测上。为此, 本研究采用逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)技术, 结合总RNA粗提法, 通过特异性和灵敏度测定, 建立了一种快速、灵敏、高效的检测大豆叶片和种子中的SMV的RT-LAMP方法。

收稿日期: 2013-12-05

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863计划”(2012AA101501); 公益性行业(农业)科研专项(201303028); 教育部高校博士点基金(20130097110004); 江苏省基础研究计划(自然科学基金)(BK2012769)。

第一作者简介: 张雯娜(1988-), 女, 硕士, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: wenna\_521@163.com。

通讯作者: 陶小荣(1977-), 男, 教授, 主要从事植物病毒学研究。E-mail: taoxiaorong@njau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆花叶病毒由本实验室在 1138-2 大豆品种上扩繁保存,田间疑似感染 SMV 的大豆叶片样品由本实验室采集并保存,携带 SMV 的大豆种子由南京农业大学大豆研究所提供。烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)及黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)由本实验扩繁保存。RT-LAMP 引物由上海英骏生物技术公司合成。Bst DNA 聚合酶购自 New England Biolabs 公司,AMV 逆转录酶购自 Promega 公司, RNA 提取试剂盒购自 TianGen Biotech 公司, SYBR Green I 购自 Life Technologies 公司, MgSO<sub>4</sub> 购自 TOYOBO 公司, 甜菜碱(Betaine) 购

自 Sigma 公司, dNTPs 购自上海生工生物公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中已登录的大豆花叶病毒的外壳蛋白基因序列( GenBank 序列登录号: HM590055.1) 采用 BLAST 程序进行同源性比较, 在序列保守区, 使用软件 Primer Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>), 设计 4 组引物, 每组 4 条引物(表 1)。

1.2.2 总 RNA 提取 根据 TianGen 公司 RNA 抽提试剂盒的方法分别对健康及带病大豆叶片进行总 RNA 的抽提, 并将提取的总 RNA 分装, 保存于 -70℃ 冰箱, 待用。

表 1 RT-LAMP 检测大豆花叶病毒的引物组  
Table 1 RT-LAMP primer sets for SMV detection

引物组 Primer sets	引物 Primer	序列 Sequence
引物组 I Primer set I	F3-I	GCCATTAGCATCTGGAGAT
	B3-I	CTTGCTTGAGTACAAACCTAA
	FIP-I	ACGATGAGCAGATGGGTGTGTACCATTTGTCATGCACCATA
	BIP-I	TCTTTAACTGCATTGTACCACGCGTTGATTATTCAACACTCGA
引物组 II Primer set II	F3-II	AGATGTAAATGTTGGATC
	B3-II	TCATCATCAAGCTCATATT
	FIP-II	ATCTTCCCTTCAACCATTGGAAGAAGGTGGTTCCGCGTTTGCAGAAG
	BIP-II	CCTAATCAGGTTGATTTATTCAAATCTTTAACTGCATTGTACCACGC
引物组 III Primer set III	F3-III	TTGGATCAAAAGGAAAGGTG
	B3-III	TCATCATCAAGCTCATATTTCATC
	FIP-III	ATRATCTTCCCTTCAACCATTGGAAGGCGTTTGCAGAAGATTACAAG
	BIP-III	TTGCTTGAGTATAAGCCTAATCAGGAACTGCATTGTACCAYGC
引物组 IV Primer set IV	F3-IV	GCAGCAGAAGCTTACATTGA
	B3-I V	TTCCCATCAAGTCCAAACA
	FIP-IV	GCTCTCTATCTCTCAAATTCCTCAGGATGAGAAATCTGAAAGTCCG
	BIP-IV	ATGAGGTTACTTCCAAAACACCAATTGTGTGTTAACTCCCGAAAG

1.2.3 反应条件优化 Mg 离子浓度优化按反应体系依次添加 25 mmol·L<sup>-1</sup> 的 MgSO<sub>4</sub>: 使其终浓度依次为 2, 3, 4, 5, 6 与 7 mmol·L<sup>-1</sup>; 甜菜碱浓度优化按反应体系依次添加 5 mol·L<sup>-1</sup> 的甜菜碱: 终浓度依次为 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 与 1.4 mol·L<sup>-1</sup>; dNTP 浓度进行优化, 按反应体系依次添加 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP: 终浓度依次为 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 与 1.4 mmol·L<sup>-1</sup>; 最后, 对内外引物(FIP + BIP; F3 + B3) 浓度比进行优化, 按反应体系依次分别添加内引物(FIP 与 BIP): 终浓度分别为 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 与 1.4 μmol·L<sup>-1</sup>, 此时外引物(F3 与 B3) 均用 0.2 μL, 终浓度为 0.2 μmol·L<sup>-1</sup>。实验中, 阴性对照添加健康植物所提取的 RNA, 阳性对照用带有 SMV-CP 的质粒, 优化的反应管中加提取的带 SMV 大豆样品的总 RNA。

1.2.4 灵敏度和特异性检测 采用建立的 RT-

LAMP 和 RT-PCR 方法进行扩增灵敏度比较实验。将提取好的 SMV RNA 模板进行 10 倍梯度稀释, 得到 100 ~ 0.001 ng 稀释病毒 RNA 样品, 采用引物组 II, 对不同浓度的模板进行 RT-LAMP 反应, 取 2 μL 扩增产物上样, 在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳。同时采用对应量的 RNA 模板, B3-II 为反转录引物, 参照 AMV 反转录酶说明进行反转录合成 cDNA 第一链, 以 RT 合成的 cDNA 为模板, 以 F3-II 与 B3-II 为引物进行 PCR 扩增, 使用常规 RT-PCR 反应体系<sup>[11]</sup>。取 2 μL 扩增产物上样, 在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳。

RT-LAMP 特异性检测时, 将扩繁的烟草花叶病毒 TMV、黄瓜花叶病毒 CMV、大豆花叶病毒 SMV 的带病叶片分别进行总 RNA 的抽提, 各自 RNA 分别取 1 μL 作为模板, 采用引物组 II, 进行特异性的检测, 以确定该方法可以特异地检测到 SMV。

表 2 RT-LAMP 优化后反应体系  
Table 2 RT-LAMP optimized reaction system

组分(终浓度) Component	加入体积(每 10 $\mu\text{L}$ 反应体系) Adding volume/ $\mu\text{L}$
灭菌超纯水	1.95
10 $\times$ ThermoPol 缓冲液(New England Biolabs)	1.00
25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4$ (5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (TAKARA)	2.00
10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP's (0.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (TAKARA)	0.80
20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FIP (0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Invitrogen)	0.40
20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BIP (0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Invitrogen)	0.40
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ F3 (0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Invitrogen)	0.20
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ B3 (0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Invitrogen)	0.20
5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甜菜碱 (0.8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Sigma)	1.60
8 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Bst DNA 聚合酶 (0.32 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) (New England Biolabs)	0.40
10 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ AMV 逆转录酶 (0.05 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) (Promega)	0.05
RNA 提取液	1.00

实验中, 阴性对照添加健康植物所提取的 RNA, 阳性对照采用带有 SMV-CP 质粒。

1.2.5 一步法 RT-LAMP 检测大豆花叶病毒方法的建立 对已知携带 SMV 大豆样品进行 RNA 粗提取, 方法为: 取 100 mg 叶片, 用 400  $\mu\text{L}$  0.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH, 快速研磨, 低速离心后快速取 10  $\mu\text{L}$  上清于 490  $\mu\text{L}$  的 100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-Cl (pH8.0) 溶液中, 混匀待用。按表 2 配制 RT-LAMP 反应溶液: 以总反应体积 10  $\mu\text{L}$  为例, 依次按优化后的反应体系加入相应剂量的试剂于反应管中; 其中核酸模板即为 RNA 粗提匀液。将配好的 RT-LAMP 反应溶液于 65 $^{\circ}\text{C}$  的反应温度中进行反应, 反应时间为 60 min, 80 $^{\circ}\text{C}$  进行 5 min 结束反应, 之后在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳。

1.2.6 RT-LAMP 检测田间样品及结果的可视化检测 应用建立的一步 RT-LAMP 检测法对不同采集地的田间疑似带 SMV 大豆样品进行检测, 即分别对样品进行 RNA 的粗提取, 加入到 RT-LAMP 反应液中, 65 $^{\circ}\text{C}$  反应 60 min, 85 $^{\circ}\text{C}$  进行 5 min 终止反应。接着对反应产物进行结果分析: 取 2  $\mu\text{L}$  扩增产物于 2% TBE 琼脂凝胶中电泳, 同时向 PCR 管中加入 SYBR Green I (1:1000)<sup>[12]</sup>, 1~5 min 后观察结果, 根据 SYBR Green I 的显色原理, 阳性扩增产物会迅速变为绿色, 阴性及无扩增产物保持染料的橙色。

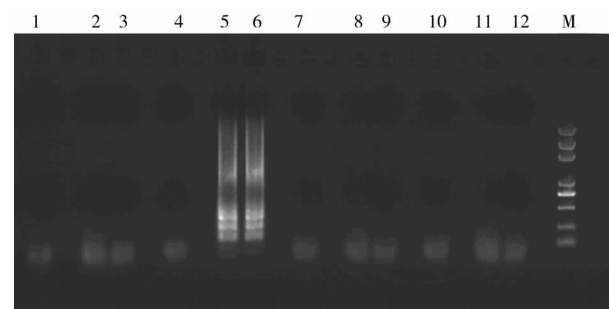
1.2.7 RT-LAMP 检测大豆种子中的 SMV 将带病及健康种子分别用灭菌超纯水浸泡 1 h, 灭菌超纯水的用量为每颗种子约 150  $\mu\text{L}$ , 浸泡的上清分别通过粗提法抽取 RNA 及天根试剂盒进行 RNA 的提取, 然后用于 RT-LAMP 的检测, 将所得的产物分别在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 RT-LAMP 检测 SMV 引物组的筛选

通过筛选设计的针对 SMV 的 4 组 RT-LAMP 引物对中, 发现引物组 II 可以扩增出明显的 LAMP、

RT-LAMP 的特异性条带(图 1), 其他 3 组都无法扩增出条带, 也没出现模糊条带的迹象, 因此选定引物组 II 为后续试验所用引物组。



1~3: 引物组 I; 4~6: 引物组 II; 7~9: 引物组 III; 10~12: 引物组 IV; 其中: M 为 DL2000 Plus Marker, 1、4、7、10 为阴性对照 (健康大豆叶片提取的 RNA), 2、5、8、11 为带 SMV CP 片段的阳性质粒对照, 3、6、9、12 带 SMV 大豆叶片上分离提取的总 RNA。1-3: Primer set I; 4-6: Primer set II; 7-9: The primer set III; 10-12: The primer set IV; M is DL2000 Plus Marker, 1, 4, 7, 10: Negative control (RNA from healthy soybean leaves); 2, 5, 8, 11: Plasmid positive control, 3, 6, 9, 12: Positive RNA controls.

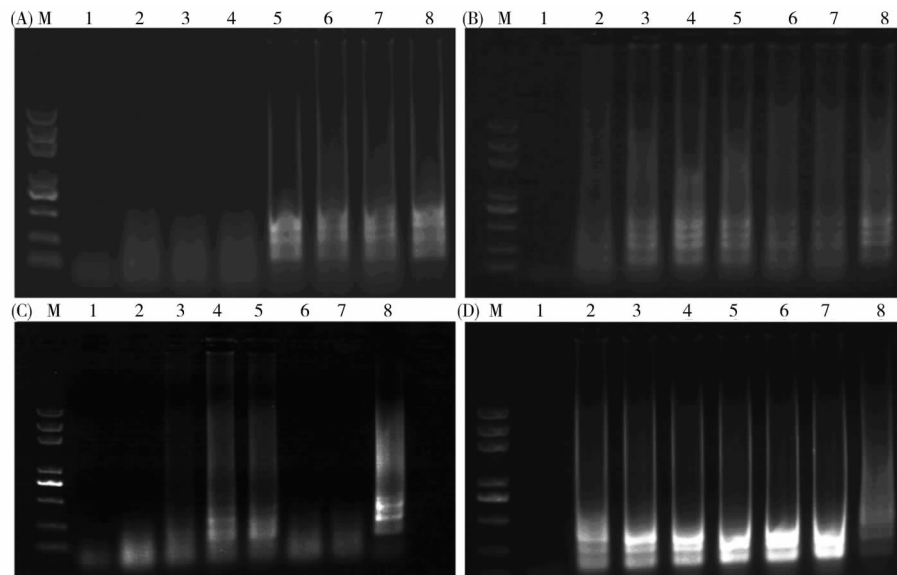
图 1 SMV RT-LAMP 引物组的筛选

Fig. 1 Screening for the SMV RT-LAMP primer set

### 2.2 RT-LAMP 反应条件的优化

对 RT-LAMP 反应条件进行了一系列的优化, 如图 2 所示, 镁离子在 5~7  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度时, 才出现电泳条带, 且 Mg 离子终浓度在 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 条带最清晰; 随着甜菜碱浓度的增加, 电泳条带先是逐渐清晰, 后再次变模糊, 甜菜碱在 0.8  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  为最适合浓度; 随着 dNTP 浓度的增加, 电泳条带先渐渐出现, 后消失, 首先出现的条带不是很清晰, 在终浓度为 0.8  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 电泳条带最清晰; 在外引物浓度一定时, 随着内引物浓度逐渐增加, 电泳条带逐渐变亮, 内引物浓度为 0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, LAMP 条带最清晰。

对反应中各种试剂浓度进行比较后, 得出各参数优化后的反应浓度: 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ , 0.8  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

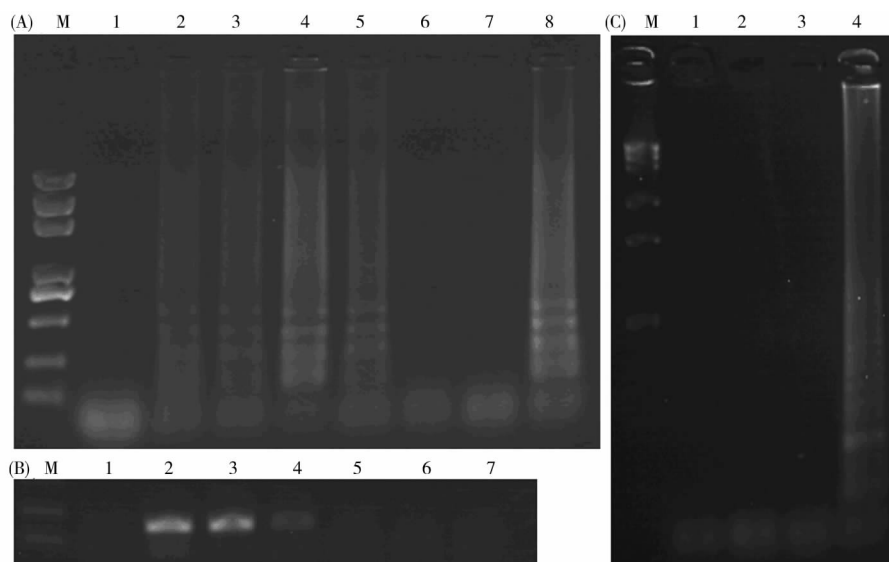


M; DL2000 Plus Marker; 1; 阴性对照 (健康大豆叶片提取的 RNA); 8; 阳性对照 (带 SMV CP 片段的质粒)。(A)  $Mg^{2+}$  离子浓度优化, 2~7: 终浓度依次为 2, 3, 4, 5, 6 与 7  $mmol \cdot L^{-1}$   $Mg^{2+}$ ; (B) 甜菜碱浓度优化, 2~7: 终浓度依次为 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4  $mol \cdot L^{-1}$  甜菜碱; (C) dNTP 浓度优化, 2~7: 终浓度依次为 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4  $mmol \cdot L^{-1}$  dNTP; (D) 内外引物浓度比优化, 2~7: 内引物终浓度 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 与 1.4  $\mu mol \cdot L^{-1}$ , 外引物浓度用 0.2  $\mu mol \cdot L^{-1}$ , 内外引物浓度比依次为 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 与 7:1。

M; DL2000 Plus Marker; 1; Negative control (RNA from healthy soybean leaves); 8; Positive control (plasmid). (A) Optimization of  $Mg^{2+}$  concentration. 2-7;  $Mg^{2+}$  final concentration of 2, 3, 4, 5, 6 and 7  $mmol \cdot L^{-1}$ ; (B) Optimization of the betaine concentration. 2-7; Betaine final concentrations were 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.4  $mol \cdot L^{-1}$ ; (C) Optimization of dNTP concentrations. 2-7 dNTP final concentration were 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.4  $mmol \cdot L^{-1}$ ; (D) Inside and outside the primer concentration ratio optimization. 2-7; The inner primer concentration were 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.4  $\mu mol \cdot L^{-1}$ , the concentration of outer primers 0.2  $\mu mol \cdot L^{-1}$ , the ratio of the outer and inner primers are as follows: 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 and 7:1.

图 2 RT-LAMP 反应参数的优化

Fig. 2 Optimization of RT-LAMP reaction parameters



(A) RT-LAMP 检测 SMV 的灵敏度, 2~7 为从 100~0.001 ng 呈  $10^{-1}$  倍递减的阳性 RNA 模板, 1: 阴性对照, 8: 阳性对照; (B) RT-PCR 检测 SMV 的灵敏度, 2~7 为从 100~0.001 ng 呈  $10^{-1}$  倍递减的阳性 RNA 为模板的 RT-PCR 结果, 1: 阴性对照; (C) RT-LAMP 检测 SMV 的特异性测定, M 为 DL2000 Plus Marker, 1: 阴性对照, 2: 带 TMV 样品, 3: 带 CMV 样品, 4: 带 SMV 样品。

(A) RT-LAMP detection. 2-7; For the positive RNA template descending from 100 to 0.001 ng was  $10^{-1}$ , 1: Negative control, 8: Positive plasmid control; (B) RT-PCR detection. 2-7; For the positive RNA template descending from 100 to 0.001 ng was  $10^{-1}$  for RT-PCR results, 1: Negative control; (C) The detection of specific RT-LAMP. M is a DL2000 Plus Marker, 1: Negative control, 2: Samples with TMV, 3: Samples with CMV, 4 samples with SMV.

图 3 RT-LAMP 与 RT-PCR 检测 SMV 的灵敏度比较及 RT-LAMP 检测 SMV 的特异性测定

Fig. 3 Comparison of the sensitivity of RT-LAMP with RT-PCR and specificity of RT-LAMP in the detection of SMV

dNTP,  $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甜菜碱与 2:1 内外引物 (FIP + BIP) : (F3 + B3) 比 (图 2)。

### 2.3 RT-LAMP 检测 SMV 的灵敏度和特异性

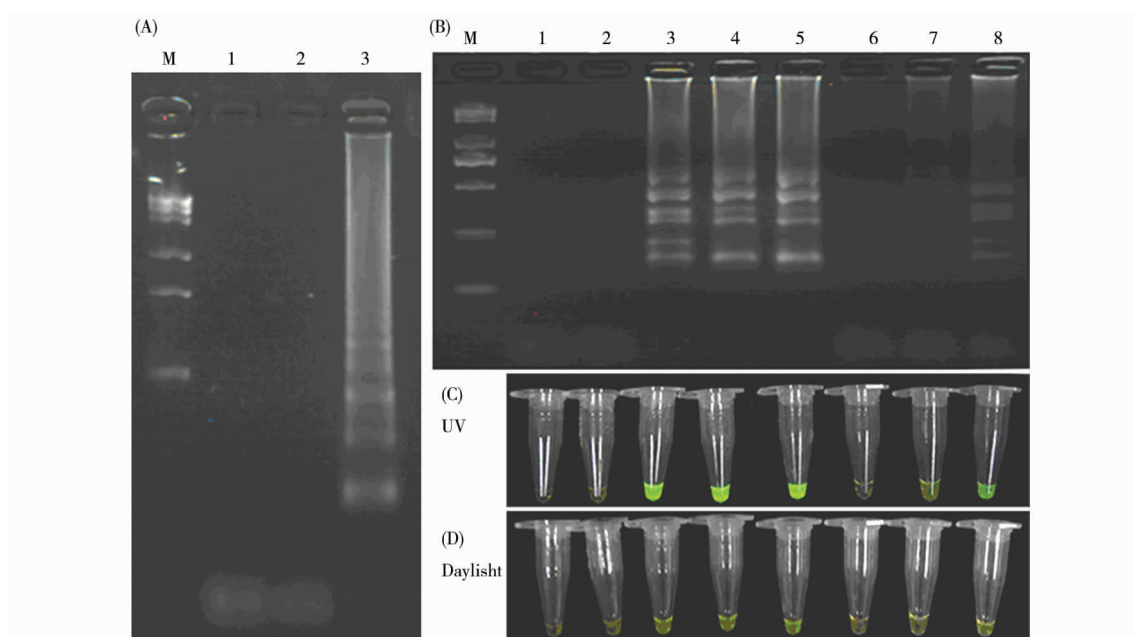
对 RT-LAMP 和 RT-PCR 的灵敏度进行了比较,按照 TianGen 公司试剂盒提取带病大豆植株叶片总 RNA,测定浓度后,将 RNA 稀释为  $100 \sim 0.001 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,分别进行 RT-LAMP 及 RT-PCR 检测,从图 3A 可以看出,2~5 孔都扩增出清晰且典型的 RT-LAMP 条带,表明 RT-LAMP 可以灵敏地检测到  $0.1 \text{ ng}$  的 RNA 模板量。而对于 RT-PCR 的检测结果 (图 3B),相同模板量的条件下,RT-PCR 只检测到  $1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$  的 RNA 模板量,而且扩增条带比较弱。可见,RT-LAMP 灵敏度约为 RT-PCR 的 10~100 倍。

另外对 RT-LAMP 检测 SMV 的特异性也进行了

测试,按照试剂盒提取携带 TMV、CMV 或 SMV 样品的 RNA,利用已优化好条件的反应体系 (表 2),进行特异性的检测。结果表明,RT-LAMP 只扩增出 SMV,不能检测到 TMV 及 CMV (图 3C),因此该体系做到了特异性的检测要求。

### 2.4 一步法 RT-LAMP 检测样品中的 SMV

为了达到快速检测的目的,采取粗提 RNA 方法与 RT-LAMP 方法结合,用粗提取携带 SMV 大豆叶片的 RNA 作为试验对象,进一步建立一步法 RT-LAMP 检测植物中的大豆花叶病毒。结果表明粗提取带病大豆的 RNA 能扩增出特异性条带,而从健康大豆上粗提取的 RNA 及空白对照均无条带 (图 4A)。



(A) 一步法 RT-LAMP 检测 SMV, 1: 阴性对照 (不加模板), 2: 健康大豆的粗提 RNA 样品, 3: 带病大豆的粗提 RNA 样品; (B) RT-LAMP 检测大豆田间样品; (C) 紫外灯下 RT-LAMP 的可视化检测, 阳性反应管加入 SYBR Green I 置于紫外灯下 PCR 扩增产物显绿色; (D) 白炽灯下 RT-LAMP 的可视化检测, 阳性反应管加入 SYBR Green I 置于白炽灯下 PCR 扩增产物显浅绿色, 1: 阴性对照 (不加模板), 2: 健康大豆叶片粗提 RNA 样品, 3: SMV CP 阳性质粒, 4: 已知带 SMV 植株粗提 RNA, 5~8: 田间疑似带 SMV 植株粗提 RNA 样品。

(A) One-step RT-LAMP. 1: Negative control without template, 2: Crude extract RNA from known healthy samples 3: Crude RNA extract from known positive samples; (B) RT-LAMP detection of field soybean samples; (C) In-tube visualization of RT-LAMP results under ultraviolet light. The addition of SYBR Green I turn the PCR amplification product to green; (D) In-tube visualization of RT-LAMP results under daylight irradiation. The addition of SYBR Green I turn the PCR amplification product light green. 1: Negative control without template, 2: Crude RNA extract from healthy soybean leaves, 3: Positive plasmids, 4: Crude extract RNA from SMV infected plants, 5-8: Field suspected with SMV plant hold RNA of samples.

图 4 一步法 RT-LAMP 检测田间样品及 RT-LAMP 扩增产物在反应管中的可视化检测  
Fig. 4 One-step RT-LAMP detection of field samples and in-tube visualization of RT-LAMP amplification products using fluorescent dyes

### 2.5 一步法 RT-LAMP 对田间大豆样品的检测

利用已建立的一步法 RT-LAMP 方法对田间样品进行了检测,共检测了 5 份来自不同地区的大豆叶片样品。为确保方法的可行性,试验设 2 个阴性

对照,一个为不加任何 RNA 的对照组,该对照可确保反应体系内无污染,另一对照为加入健康大豆叶片粗提取 RNA 的对照,该对照可确定该方法针对健康植株不会扩增出 LAMP 条带。田间样品检测结果

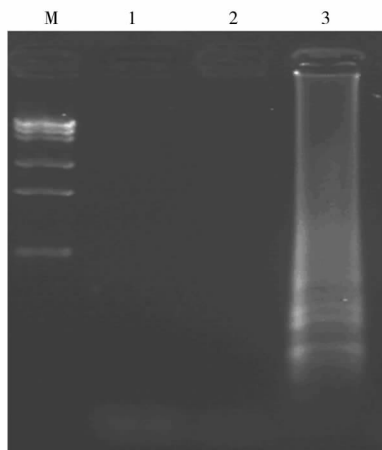
表明,该方法可灵敏地检测到样品中的 SMV (图 4B)。

## 2.6 RT-LAMP 检测 SMV 的可视化

将 SYBR Green I 荧光染料加入到反应完毕的 PCR 管中,并将反应管置于紫外光(图 4C)或日光灯下(图 4D)观察,结果表明,SYBR Green I 可直接在反应管中观察到阳性结果,并且显色结果与电泳结果相同,因此,加入 SYBR Green I 染料使 RT-LAMP 的检测结果更加直观。

## 2.7 RT-LAMP 检测大豆种子中的 SMV

大豆花叶病毒是重要的种传病毒,试验进一步尝试将种子上的病毒通过浸泡法洗脱后对其 RNA 进行粗提纯,然后再进行 RT-LAMP 检测,但是这一尝试却没能通过 RT-LAMP 检测到病毒 SMV,推测可能通过粗提法得到的 RNA 太少,因此尝试通过对大豆浸泡液用试剂盒纯化的方法进行 RNA 的抽提、浓缩与纯化,然后进行 RT-LAMP 检测,结果显示 RT-LAMP 可以检测到大豆种子中携带的 SMV,而健康种子浸泡的上清 RNA 提取液的 RT-LAMP 电泳图未出现条带(图 5)。



M 为 DL2000 Plus Marker;1:不加 RNA 模板的阴性对照;2:健康种子纯化的 RNA;3:携带 SMV 种子纯化的 RNA。

M:DL2000 Plus Marker;1:Negative control without RNA template;2. Purified RNA from healthy seeds;3. Purified RNA from SMV infected seeds.

图 5 RT-LAMP 检测大豆种子中的 SMV

Fig. 5 RT-LAMP detection of SMV in soybean seeds

## 3 讨论

作为一种新发展的检测方法,LAMP 具有快速、灵敏、特异等诸多优点,因此该方法逐渐被应用于病毒检测。在检测中,影响 LAMP 扩增的因素显得尤为重要,在 LAMP 体系中影响 LAMP 的因素,主要为 dNTP 浓度、Mg 离子浓度、甜菜碱浓度、内外引物浓度比、反应时间及反应温度。根据 Wei 等<sup>[13]</sup>用

RT-LAMP 检测菜豆荚斑驳病毒(*Bean pod mottle virus*, BPMV)的方法,本文选定 65℃ 及反应 1 h 为反应条件。优化反应条件时发现,dNTP 的浓度在 0.8 与 1.0 mmol·L<sup>-1</sup>可扩增出清晰条带。对于内外引物浓度比的选定,虽然随着内引物量的增加,条带的量也增加,但典型的 LAMP 条带变得不明显,最后选定内外引物浓度比为 2:1。对于 Mg 离子 5~8 mmol·L<sup>-1</sup>都可扩增出条带,并且考虑到 Mg 离子影响特异性,所以选定 5 mmol·L<sup>-1</sup>为检测时的使用浓度。对于甜菜碱浓度的选定采取最清晰条带浓度,即 0.8 mol·L<sup>-1</sup>,优化好的反应条件完全达到检测 SMV 的要求。

相比普通的 RT-PCR 检测方法,RT-LAMP 检测将反转录与核酸扩增同时进行,而且采用恒温扩增的方法,不仅省去了反转录的时间,更缩短了核酸扩增所用时间。本研究将 RNA 粗提取与 RT-LAMP 结合,又省去了核酸提取的时间,只需核酸扩增 1 h 左右,外加电泳 0.5 h,仅仅需要 1.5 h 左右。如无电泳设备,也可将 SYBR Green I 加入反应管中,直接观察结果。在选取 RT-LAMP 产物检测方法时,选定 SYBR Green I 是因为 Mori 等<sup>[14]</sup>设计的 LAMP 产物白色沉淀检测法需要通过浊度仪,虽然可以实现定量和实时监测,但没有 SYBR Green I 简便、快速,而且 SYBR Green I 与电泳结果完全一致,结果更可靠。

关于 RT-LAMP 的灵敏度研究,Zhang 等<sup>[15]</sup>用 RT-LAMP 方法检测小麦黄花叶病毒(*Wheat yellow mosaic virus*, WYMV)表明,RT-LAMP 方法的敏感度比 RT-PCR 高出 100 倍。而且在进行 30~45 min 反应后,琼脂糖凝胶分析中便可以检测到病毒。2012 年,Zhou 等<sup>[11]</sup>用 RT-LAMP 检测南方水稻黑条矮缩病毒(*Southern rice black-streaked dwarf virus*, SRBS-DV),总 RNA 提取物稀释后,比 RT-PCR 法灵敏 10 倍以上。本研究针对 RNA 的稀释液进行灵敏度研究表明,该研究方法的检测灵敏度比 RT-PCR 高 10~100 倍,检测下限为 0.1 ng,而且对其特异性进行的检测,使检测结果更加可靠的。

最后,试验对大豆种子中的 SMV 进行检测,试剂盒抽提 RNA 结合 RT-LAMP 可以检测到大豆中 SMV,而粗提取 RNA 方法结合 RT-LAMP 没有检测到大豆种子中 SMV,但可以检测到发病叶片中的 SMV。主要的原因可能为:首先,因为大豆带病叶片与大豆种子浸泡上清液不同,发病严重的大豆叶片中含有大量病毒及病毒 RNA,而大豆种子较大豆发病叶片病毒含量较少,再通过 1 h 的浸泡,少量的病毒 RNA 中还有部分 RNA 被降解掉;其次,粗提取

时,大豆叶片与 NaOH 有倍比关系,大豆浸泡上清液的倍比关系并不清楚,由于加入量的不清楚,再加上需要加入 Tris-Cl 中和 pH,病毒 RNA 的浓度又被稀释了 50 倍,导致终溶液中的病毒 RNA 可能无法达到 RT-LAMP 的检测下限;再次,粗提取 RNA 虽较试剂盒提取 RNA 节省了时间,但在一定程度上没有试剂盒提取的效果好,可能是粗提物中含有杂质成分干扰 RT-LAMP 的有效反应。

## 4 结 论

本研究建立了一步法 RT-LAMP 检测大豆花叶病毒的方法,利用 RNA 粗提法与 RT-LAMP 的结合既减少了检测的反应时间又可以灵敏、特异地检测到大豆叶片中 SMV。而且,结合试剂盒提取大豆种子浸泡液中的 RNA,该方法又可检测大豆种子是否带有 SMV。最后,增加 SYBR Green I 染料,将反应结果进行可视化,无需电泳,更适用于大量样品的检测。本研究首次将 RT-LAMP 检测应用于大豆叶片和种子中的 SMV 检测,所建立的方法具有灵敏高、快速和特异性强的优点,可应用于实验室和田间大豆样品的 SMV 的快速检测。

## 参考文献

- [1] 葛箐,张明厚.大豆叶片及种子内大豆花叶病毒(SMV)的生物与免疫测定方法的比较[J].东北农学院学报,1985(1):5. (Ge Z, Zhang M H. A comparison between bioassay and immune assay for detection of soybean mosaic virus(SMV) in soybean leaves and seeds[J]. Northeast Agricultural College, 1985(1):5.)
- [2] 赵玖华,尚佑芬,杨崇良,等. RT-PCR 技术检测大豆花叶病毒的研究[J].山东农业科学,2000(4):34-35. (Zhao J H, Shang Y F, Yang C L, et al. RT-PCR detection of soybean mosaic virus[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2000(4):34-35.)
- [3] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12):63.
- [4] 李健,熊炜,方雪恩,等.猪瘟病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2010,40(10):1033-1038. (Li J, Xiong W, Fang X E, et al. Establishment of RT-LAMP system for rapid detection of classical swine fever virus[J]. Chinese Veterinary Science, 2010, 40(10):1033-1038.)
- [5] 黄元,向华,陈晶,等.狂犬病病毒核酸 RT-LAMP 检测方法的建立[J].中国人兽共患病学报,2011,27(2):108-111. (Huang Y, Xiang H, Chen J, et al. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of rabies virus[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27(2):108-111.)
- [6] 宋克云,张如胜,欧新华,等. RT-LAMP 快速检测 Norwalk 病毒 GII 型[J].病毒学报,2009,25(4):291-295. (Song K Y, Zhang R S, Ou X H, et al. Rapid detection of Norwalk GII with reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Chinese Journal of Virology, 2009, 25(004):291-295.)
- [7] 李启明,马学军,周蕊,等.环介导逆转录等温扩增技术(RT-LAMP)在丙型肝炎病毒基因检测中的应用[J].病毒学报,2006,22(5):334-338. (Li Q M, Ma X J, Zhou R, et al. Detection of HCV gene by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method[J]. Chinese Journal of Virology, 2006, 22(5):334-338.)
- [8] 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. (Wang Y J, Zhou Y, Li Z A, et al. A RT-LAMP assay for detection of Citrus Tristeza Virus[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(3):517-524.)
- [9] 范旭东,董雅凤,张尊平,等.沙地葡萄茎痘相关病毒的 RT-LAMP 检测方法[J].植物病理学报,2013,43(3):286-293. (Fang X D, Dong Y F, Zhang Z P, et al. RT-LAMP assay for detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2013, 43(3):286-293.)
- [10] 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. (Zhou T, Du L L, Fan Y J, et al. Development of a RT-LAMP assay for rapid detection of rice black-streaked dwarf virus[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(7):1285-1292.)
- [11] Zhou T, Du L L, Fan Y J, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of RNA for sensitive and rapid detection of southern rice black-streaked dwarf virus[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 180(1-2):91-95.
- [12] Le D T, 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(1-2):90-93.
- [13] 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(1):187.
- [14] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 289(1):150-154.
- [15] Zhang Z Y, Liu X J, Li D W, et al. Rapid detection of wheat yellow mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Virology Journal, 2011, 8(1):550.