

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2011)05-0309-04

马铃薯 PLRV 的 RT-LAMP 检测方法的构建

乔楠¹, 曹佳^{2*}

(1. 榆林学院生命科学院, 陕西 榆林 719000; 2. 北京真思维生物科技有限公司, 北京 100044)

摘要: 为了建立高效、便捷且成本较低的检测方法以应用于马铃薯卷叶病毒(Potato leaf roll virus, PLRV)检疫防控工作, 本研究构建了 PLRV 的逆转录环介导恒温扩增反应(Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)检测方法。结果表明: 本研究构建的马铃薯 PLRV 的 RT-LAMP 检测方法, 最低检测下限为 10 copies / mL, 与 PVX、PVM、PVV、PVS、CMV 等其他马铃薯病毒无交叉反应, 具有良好的特异性, 为马铃薯病毒检测技术应用奠定一定基础。

关键词: 马铃薯; 马铃薯卷叶病毒; 逆转录环介导恒温扩增反应

Development of a Rapid Detection Method for Potato Leaf Roll Virus by a Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay

QIAO Nan¹, CAO Jia^{2*}

(1. College of Life Science, Yulin University, Yulin, Shaanxi 719000, China;

2. Beijing Genesway Bio-tech Co. Ltd, Beijing 100044, China)

Abstract: In order to develop high-effective, convenient and low cost method for the detection of potato leaf roll virus (PLRV) for inspection and control of this disease, a PLRV reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay was carried out for detecting PLRV. The results showed that RT-LAMP method was effective, and the lowest detection limit was 10 copies / mL. No cross-reactivity was observed with other viruses (PVX, PVM, PVV, PVS, and CMV). Therefore, it had good specificity and laid a good foundation for detecting PLRV.

Key Words: potato; potato leaf roll virus; reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)是造成马铃薯病毒性退化、减产和绝产的病原之一。PLRV 通过蚜虫循环性传播, 具有广泛的空间性和持久的时间性。据报道, 在我国甘肃、宁夏、贵州等西北部地区主要的马铃薯产地时有马铃薯卷叶病毒病的发生, 严重时导致马铃薯种性退化, 产量损失最高达 90% 以上^[1-4]。构建和应用敏感性好、特异性强、易于操作的检测方法, 做到及时诊断, 迅速应对是防治马铃薯卷叶病毒病的有效措施。

该病毒可通过基于病原学、显微技术、免疫学、分子生物学等的检测手段进行检测。常用的方

法有指示植物法、电子显微镜观察、酶联免疫吸附法(ELISA)、斑点杂交法、RT-PCR 等, 这些方法都各自有优缺点。其中植物指示法操作简单, 应用方便, 但是该方法检测耗时长, 结果不稳定; 电子显微镜观察具备很高的准确性和直观性, 但是在设备上要求高端, 成本大, 并不适合一线基层检测应用; ELISA、斑点杂交和 RT-PCR 因具有剪特异性强、敏感度好的特点, 同时能对样品进行高通量检测而被广泛应用, 但是检测过程也需要一定的设备仪器。2000 年, Notomi 等^[5]建立了逆转录环介导恒温扩增反应(Reverse transcription loop-mediated

收稿日期: 2010-10-22

作者简介: 乔楠(1984-), 女, 助教, 主要从事植物资源开发利用及植物多样性研究。

* 通信作者(Corresponding author): 曹佳, 主要从事生物试剂研发, E-mail: neimenggucaojia@163.com。

isothermal amplification, RT-LAMP)检测方法, 可在 55~65℃间选择一个恒定的温度对样本进行指数扩增反应, 最终扩增效率达到 108~109 数量级。RT-LAMP 反应时, 产物两端形成了带有引物功能的环状结构, 这种多引物结合和可自产生引物的原理使其具有了灵敏度高、特异性强等特点, 同时 RT-LAMP 反应中生成大量焦磷酸镁的沉淀, 可以在反应管中加入 SYBGreen I 显色即可判定反应结果, 绿色为阳性反应, 橘红色为阴性反应^[6], 因此, RT-LAMP 方法构建成功后, 在基层检测使用时只需要水浴锅就可以完成整个检测工作, 适用于各种实验条件下检测工作的使用。

本研究拟构建 PLRV 的 RT-LAMP 检测体系, 为方便基层马铃薯检疫工作与脱毒育种工作的开展提供一种低成本高效率的 PLRV 检测方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验用病毒及样品来源

PLRV、PVX、PVM、PVS、PVV, CMV (Cucumber mosaic virus) 等病毒感染马铃薯试管苗由北京真思维生物科技有限公司分子实验室提供。

1.1.2 主要试剂

RNaseout™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, SYBGreen I (Invitrogen); Reverse Transcriptase XL, TAKARA Taq HS DNA Polymerases, DNA marker DL-2000, dNTPs Mixture (TaKaRa); RNAsor Reagent, RNAsor Plant Kit, Gel Extraction Kit, pUC-T TA Kit, 50 × TAE Buffer (CWBI); RNA LAMP Kit (JWR)。

1.1.3 主要设备

Eppendorf 微量进样器; L7-65 超速离心机 (Beckman); Veriti™ 96 孔梯度 PCR 仪 (ABI); W0020-110C 可变温 6 L 迷你水浴锅 (Labnet); DYY-III 2 稳压稳流电泳仪 (北京六一厂)。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 公布的 PRLV ORF3 基因序列, 通过 [http:// primerexplorer.jp/e/](http://primerexplorer.jp/e/) 提供的在线软件 primerexplorerV4, 按照引物序列保守、引物 GC 含量于 40%~60% 间和序列中无聚嘌呤或聚嘧啶等 3 方面原则设计 RT-LAMP 引物 (表 1), 其中, F3、B3 为 RT-LAMP 反应外引物, FIP、BIP 为 RT-LAMP 反应内引物, 引物序列由 Invitrogen 公司合成。

表 1 马铃薯卷叶病毒 RT-LAMP 引物

Table 1 Primer sequences of used RT-LAMP for potato leaf roll virus

引物编号 Primer	序列(5'→3') Sequence
F3	CTTCAGTTCGTCAGCGAGG
B3	CGGCACTGATCCTCAGAAGA
FIP	TGACGTAGGACTGGAGGGATGATTCCACCTCCTCCGGTTC
BIP	TTCCAAATTACGAAGGGCGGCGTGCCATTCTACCCCGTTTA

1.3 试验方法

1.3.1 总 RNA 提取

按 RNAsor Plant Kit (CWBI) 说明书, 取 100 mg 带 PLRV 的试管苗样品, 提取总 RNA。利用微量分光光度计检测 RNA 提取的质量。

1.3.2 cDNA 第一链的合成

取总 RNA 8 μL; 加入下游引物 2 μL; 5 × buffer 4 μL; RNase Inhibitor (40 U / μL) 1 μL; TMV Reverse Transcriptase XL 1 μL; dNTPs (2.5 mM) 4 μL; 加入 RNase-Free H₂O 定容至 20 μL 后吹打混匀, 25℃ 10 min, 42℃ 60 min, 即得到 cDNA 第一链。

1.3.3 RT-LAMP 标准品制备

将获得的 PLRV cDNA 模板进行 PCR 扩增。反应体系: PCR grade H₂O 37 μL; 10 × PCR buffer 5 μL; B3 2 μL; F3 2 μL; dNTPs 1 μL; cDNA 模板 2 μL; TAKARA Taq HS DNA Polymerases 1 μL; 构成 50 μL 反应体系, 96℃ 预变性 5 min, 96℃ 变性 30 s, 55℃ + Δ0.1℃/循环退火 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 30 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。经 PCR 扩增后获得的产物按 Gel Extraction Kit 说明进行胶回收并将回收产物按 pUC-T TA Kit 说明链接 TA 克隆, PCR 验证后转化 pUC-T TA Kit 试剂盒中自

带的 Top10 感受态细胞并送 Invitrogen 公司测序。提取质粒后利用微量分光光度计测定浓度, 计算每微升质粒溶液中质粒的拷贝数。

1.3.4 RT-LAMP 的反应体系

将表 1 中引物配置成引物混合液 PM(Primer Mix), 其中各反应引物浓度: F3 为 5 pmol/μL; B3 为 5 pmol/μL; FIP: 40 pmol/μL; BIP: 40 pmol/μL。RT-LAMP 的反应体系为 20 μL; RM 反应缓冲混合液(RNA LAMP Kit 自带) 12.5 μL; 取 1 μL 反应引物混合液 PM, EM 反应酶类混合液(RNA LAMP Kit 自带) 1 μL; RNA 模板(1.3.1 中提取) 5.5 μL, 混匀。当水浴锅温度到达 65℃后将带有上述反应液的反应管中置于其中, 设置反应时间 1 h。结果采取 3 种方式进行判定: (1)反应产物测序; (2)反应产物加入 1 μL 20 倍稀释的 SYBGreen I 显色; (3)琼脂糖凝胶电泳观测。

1.3.5 RT-LAMP 敏感性试验

将通过 1.3.3 操作后分别获得的重组质粒 PLRV-pUC 浓度调整至 10^6 copies / 5.5 μL 后, 进行 10 倍比稀释, 获得 $10^0 \sim 10^6$ copies / 5.5 μL 7 个梯度浓度的重组质粒, 分别参考 1.3.4 方案进行 RT-LAMP 反应, 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

1.3.6 RT-LAMP 特异性试验

参考 1.3.4 方案分别对 PVX、PVM、PVV、PVS、CMV 等病毒进行 RT-LAMP, 并以 PLRV-pUC 为阳性对照, 无病害马铃薯组织 RNA 提取物为阴性对照, 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成结果

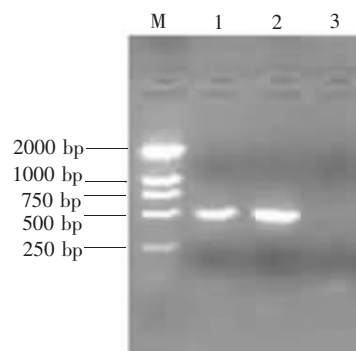
利用紫外分光光度计选择波长 260 nm 检测在 1.3.1 提取的总 RNA 与 1.3.2 中合成的第一链 cDNA 质量, 检测 260 nm / 280 nm 结果为 1.92, 合成的 cDNA 在同条件下紫外分光光度计检测 260 nm / 280 nm 结果为 1.87。证明总 RNA 提取及 cDNA 合成结果良好。

2.2 RT-LAMP 标准品制备结果

经 PCR(图 1)和测序验证 PLRV-pUC 中插入目的基因序列与预期吻合(487 bp), 经测算质粒浓度为 8.84×10^9 copies / 5.5 μL。

2.3 PLRV 的 RT-LAMP 反应结果

按 1.3.4 方案对 PLRV 的反应结果进行判定:

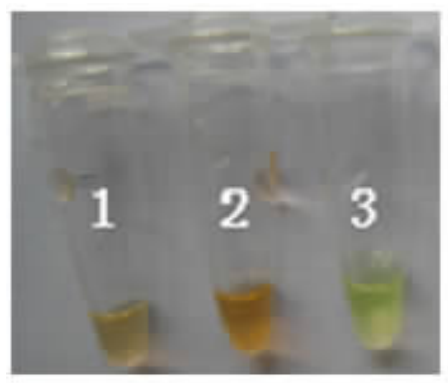


注: M-DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1, 2-PLRV-pUC; 3-H₂O
Note: M-Marker DL2000; 1, 2-PLRV-pUC; 3-H₂O

图 1 PLRV-pUC 重组质粒 PCR 扩增结果

Figure 1 Amplification result of PLRV-pUC by PCR

PLRV 的 RT-LAMP 反应产物送交 Invitrogen 公司测序, 结果表明测序结果与试验预期吻合; 在 PLRV 的 RT-LAMP 反应产物中加入 SYBGreen I 后, 显色为绿色, 阴性对照显色为橘红色(图 2); PLRV 的 RT-LAMP 产物在琼脂糖凝胶电泳中呈现出 RT-LAMP 反应的特征性梯形条带(Ladder)(图 3)。



注: 1 和 2 为阴性样品; 3 为阳性样品。
Note: 1, 2-Negative samples; 3-Positive sample.

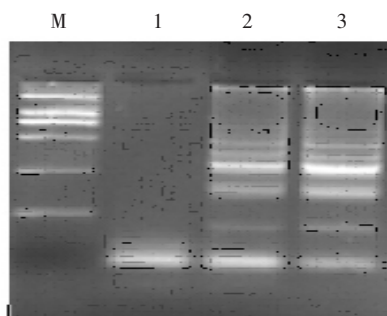
图 2 LAMP 反应产物加入 SYBR Green I 显色结果
Figure 2 Colouration of LAMP reaction products by SYBR Green I

2.4 RT-LAMP 敏感性试验结果

按 1.3.5 中方案进行验证, 结果表明所构建的 RT-LAMP 方法对 PLRV-pUC 检测下限为: 10 copies / 5.5 μL(图 4), 具有良好的敏感性。

2.5 RT-LAMP 特异性试验结果

按 1.3.6 中方案进行验证(图 5), 结果表明

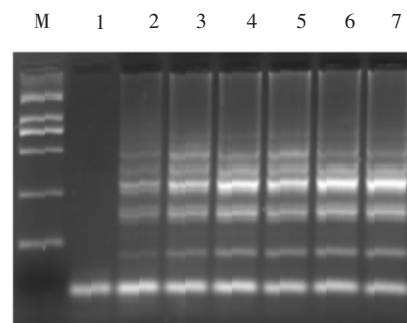


注: M-DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1-阴性样品; 2, 3-阳性样品

Note: M-Marker DL2000; 1-Negative sample; 2, 3-positive samples

图 3 PLRV LAMP 产物凝胶电泳分析

Figure 3 Gel electrophoresis assay of PLRV LAMP reaction products

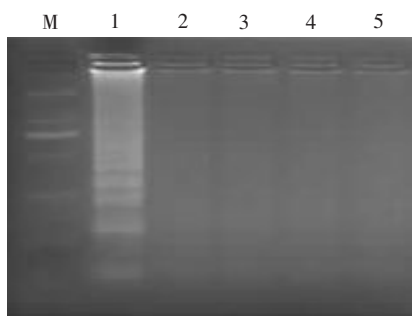


注: 1~7 质粒浓度分别为 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 /5.5 μ L

Note: The plasmid contents of 1-8(CH1-8) were 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 /5.5 μ L

图 4 ALV LAMP 法的敏感性试验 Real-time Turbidimeter 分析图及可视化图

Figure 4 Sensitivity test of ALV LAMP with Turbidimeter and color visualized



注(Note): M-DL2000 DNA 相对分子质量标准(Marker DL2000); 1-PVA-pUC; 2-PVM 3-PVV 4-PVS 5-CMV

图 5 PLRV RT-LAMP 法的特异性试验琼脂糖凝胶电泳鉴定

Figure 5 PLRV RT-LAMP specific test assay by gel electrophoresis

PVA-pUC 质粒出现扩增, 无病害马铃薯组织 RNA 提取物与 PVX、PVM、PVV、PVS、CMV 等病毒未出现非特异性反应。

3 讨 论

本研究利用 RT-LAMP 方法针对 PLRV 病毒进行检测, 方法构建后, 在实际应用中只需要简单的 RNA 提取和水浴锅进行反应即可, 大大的降低了检测成本^[7]。在 RT-LAMP 反应中, 通过琼脂糖凝胶电泳来分析结果, 阳性结果可以观察到明显的特征性梯形条带, 这种结果不同于产物为大小特定单一目的条带的普通 PCR, 不易于观察判定结果, 所以仅仅从凝胶电泳的方法来确定所建立的 LAMP 方法的准确性是不可靠的, 必须利用 RT-LAMP 产物测序来对建立的 RT-LAMP 方法进行验证。通过验证的 RT-LAMP 反应在实际应用的过程中, 只需要在反应样品中加入 SYBGreen I 显色判定结果^[8]。本研究构建的 PLRV 的 RT-LAMP 检测方法具有良好的敏感性和特异性, 操作简单方便, 需要试验条件和设备成本低, 在马铃薯脱毒育种和疫病检测工作中有一定的实用价值。

[参 考 文 献]

- [1] 段绍光, 金黎平, 谢开云, 等. 分子标记及其在马铃薯遗传育种中的应用[J]. 种子, 2003(5): 100-103.
- [2] 魏延安. 对推进陕西马铃薯产业发展的几点思考[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(1): 60-62.
- [3] 袁东征, 王帆. 早春马铃薯无公害栽培的几项关键技术[J]. 农业知识, 2008(1): 4-5.
- [4] 陆广欣, 毛碧增. 生物技术在马铃薯产业中的应用及其研究进展[J]. 浙江农业科学, 2011(2): 243-246, 249.
- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28: 63.
- [6] Fukuda S, Takao S, Kuwayama, M, et al. Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44: 1376-1381.
- [7] Nobuo M, Yoshie M, Yasushi S, et al. Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification [J]. J Clin Mic, 2006, 44(9): 3268-3273.
- [8] Hong T, Cam T, Mai Q L, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome corona virus [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 1956-1961.