

# 甜瓜黄斑病毒 (MYSV) RT-LAMP 快速检测方法的建立

李战彪<sup>1</sup>, 谢慧婷<sup>1</sup>, 崔丽贤<sup>1</sup>, 苏 琴<sup>3</sup>, 秦碧霞<sup>1,\*</sup>, 杨世安<sup>1,2</sup>, 邓铁军<sup>1</sup>, 蔡健和<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>广西壮族自治区农业科学院植物保护研究所, 广西作物病虫害生物学重点实验室, 南宁 530007; <sup>2</sup>广西大学农学院, 南宁 530004; <sup>3</sup>广西壮族自治区农业科学院微生物研究所, 南宁 530007)

**摘 要:** 根据甜瓜黄斑病毒 (*Melon yellow spot virus*, MYSV) *N* 基因的保守序列设计 3 组特异引物对, 通过一系列优化, 筛选并获得 1 组特异引物, 建立了 MYSV 的 RT-LAMP 检测方法。该方法可在 62 ~ 64 °C, 45 min 内完成对样品的检测, 并且能够特异性扩增 MYSV, 灵敏度为 RT-PCR 的 100 倍, 特异性强, 灵敏度高, 适合对 MYSV 病样快速检测与鉴定。

**关键词:** 甜瓜黄斑病毒; RT-LAMP; 快速检测

**中图分类号:** S 652

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 05-1005-06

## Establishment of Reverse-transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Melon yellow spot virus*

LI Zhanbiao<sup>1</sup>, XIE Huiting<sup>1</sup>, CUI Lixian<sup>1</sup>, SU Qin<sup>3</sup>, QIN Bixia<sup>1,\*</sup>, YANG Shian<sup>1,2</sup>, DENG Tiejun<sup>1</sup>, and CAI Jianhe<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>Plant Protection Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests, Nanning 530007, China; <sup>2</sup>College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; <sup>3</sup>Microbiology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

**Abstract:** Melon yellow spot virus disease caused by (MYSV) *Melon yellow spot virus* was an newly reported viral disease harm greenhouse melon production in recent years. In this study, three sets of specific primers were designed based on the conserved region of the *N* gene of MYSV, The reaction system was screened, optimized, and one feasible set of primers was selected to suitable for the RT-LAMP reaction. MYSV RTLAMP optimal reaction parameters were obtained in this study. The established RT-LAMP method was specific in detecting MYSV and can be accomplished in 45 min with highly advantage in sensitivity, 100 times than RT-PCR. The method is suitable for rapid and accurate detection and identification of MYSV.

**Keywords:** *Melon yellow spot virus* (MYSV); RT-LAMP; rapid detection

**收稿日期:** 2017-02-13; **修回日期:** 2017-04-27

**基金项目:** 国家现代农业产业技术体系建设资金项目 (nycytxgxcxt-d-04-19-2); 广西自然科学基金项目 (2015GXNSFBA139075); 广西农业科学院科技发展基金项目 (2015JZ48); 河南省果树瓜类生物学重点实验室开放基金项目 (HNS-201508-10)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: caijianhe@gxaas.net, qinbx@126.com)

甜瓜黄斑病毒 (*Melon yellow spot virus*, MYSV) 属于布尼亚病毒科 (*Bunyairidae*) 番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*), 病毒粒为球状, 主要通过蓟马以持久增殖方式传播。该病毒的寄主主要是西瓜、黄瓜、甜瓜及苦瓜等葫芦科作物 (Kato et al., 1999, 2000)。

MYSV 首次发现于日本, Kato 等 (1999, 2000) 系统地研究了病毒的传播方式、寄主范围、超微结构和基因组特征后认定 MYSV 应为番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 的 1 个新种。目前, 该病毒在泰国 (Genbank NO. AM087021, FR714507)、印度、厄瓜多尔等地的不同葫芦科植物上均有报道, 且多地发生严重。

MYSV 于 2008 年传入中国台湾, Chen 等 (2008) 从西瓜上发现并鉴定, 随后在黄瓜、甜瓜等作物上也检出该病毒的侵染 (Chao et al., 2010; Peng et al., 2011); 2009 年, Gu 等在中国海南省三亚市甜瓜保护地也发现了一种新发生的病毒病, 发病率高达 30% ~ 100%, 经鉴定为 MYSV 侵染, 分析其基因组序列后发现该病毒分离物与中国台湾分离物核苷酸相似性高达 99% 以上, 预示着该病已经传入中国大陆地区 (Gu et al., 2012)。目前 MYSV 在中国广西 (陈红运 等, 2012)、广东 (刘勇 等, 2011)、海南 (陈红运 等, 2012; Gu et al., 2012)、山东 (乔宁 等, 2015) 等地均有报道, 且有进一步扩展的趋势。

目前 MYSV 的检测主要通过 RT-PCR 和 ELISA 等方法 (Okuda & Hanada, 2001; Wiboonchotikorn et al., 2012)。但是 ELISA 操作较为繁琐, 比较费时。RT-PCR 则需要昂贵的检测仪器, 且灵敏度仍待进一步提高。

环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是在 2000 年由日本的学者 Notomi 等 (2000) 建立的一种新型的分子检测技术, 已广泛应用于动物病毒和植物病毒等检测 (Le et al., 2010; Minenko et al., 2014; Okuda et al., 2015; Rudolph et al., 2015; Liu et al., 2016)。本研究旨在建立一种对 MYSV 特异、快速的检测方法, 为今后的田间检测鉴定奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从广西壮族自治区南宁市和北海市等地采集具有典型症状的甜瓜样品, 经 RT-PCR 检测确定感染 MYSV 后作为阳性样品; 同时采集健康甜瓜叶片作为阴性对照, 提取叶片总 RNA, 保存于 -80 °C 备用。感染烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜绿斑驳花叶病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)、甜瓜坏死斑点病毒 (*Melon necrotic spot virus*, MNSV)、瓜类褪绿黄化病毒 (*Cucurbit chlorotic yellows virus*, CCYV) 等植物样品均采集自广西壮族自治区, 经 ELISA 及 RT-PCR 鉴定确定为单一病毒侵染样品后, 保存于 -80 °C 备用。

试验于 2015 年 10 月—2016 年 8 月在广西壮族自治区农业科学院植物保护研究所完成。

### 1.2 样品总 RNA 提取与引物设计

称取甜瓜病叶、健康叶片各 100 mg, 参照 TRNzol 总 RNA 提取试剂说明提取叶片组织总 RNA。

根据 NCBI 上已报道的甜瓜黄斑病毒基因序列 (KX118633, GQ397254), 结合本研究室对甜瓜黄斑病毒的测序结果, 利用 VECTOR NTI alignX 进行比对分析, 选取基因序列保守区域 2 366 nt ~ 3 136 nt (引物序列在基因组全长的位置), 利用在线引物设计软件 Primer Explorer V4 设计引物。

1.3 MYSV RT-LAMP 检测体系优化

根据文献报道, 对 RT-LAMP 温度、反应时间进行优化。其中温度设置 60、61、62、63、64 和 65 ℃; 时间梯度为 30、35、40、45、60、75、90 和 120 min。

1.4 MYSV RT-LAMP 与 RT-PCR 灵敏性比较

所提取甜瓜黄斑病毒病样总 RNA 经 Nandrop 1000 进行浓度检测, 然后将 RNA 模板进行倍比稀释, 稀释至  $10^{-8}$ , 分别进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测, 确定二者最低的模板检出量。

1.5 RT-PCR 反应体系

以感染 MYSV 的甜瓜样品总 RNA 进行一步法 RT-PCR 检测。检测引物采用 RT-LAMP 外侧引物 B3-3/F3-3。反应体系为: 模板 RNA 2  $\mu\text{L}$ , PrimeScript 1 step Enzyme Mix 1  $\mu\text{L}$ , 2\* one step buffer 12.5  $\mu\text{L}$ , 正、反向引物各 0.5  $\mu\text{L}$  (使用浓度  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), RNase-free water 8.5  $\mu\text{L}$ , 共 25  $\mu\text{L}$ 。一步法 RT-PCR 扩增, 50 ℃ 30 min, 94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 延伸 30 s (30 个循环); 72 ℃ 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 甜瓜黄斑病毒 RT-LAMP 检测引物组筛选

根据在线引物设计软件设计了 3 组引物 (表 1), 参考 Bst DNA Polymerase 酶给出的引物配比等试验条件: Bst DNA polymerase 8 U, 10 $\times$  Bst Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgSO}_4$  1.5  $\mu\text{L}$  (终浓度  $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), F3/B3 各 0.5  $\mu\text{L}$  (使用浓度  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 终浓度均为  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , BIP/FIP 各 4  $\mu\text{L}$  (使用浓度  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 终浓度均为  $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTP MIX ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  each) 3.5  $\mu\text{L}$ , 加入逆转录酶 M-MLV 和 RNase Inhibitor 等, 63 ℃ 扩增 90 min, 最终筛选出 MYB3-2/MYF3-2、MYFIP-2 (F1c-2+F2-2) / MYBIP-2 (B1c-2+B2-2) 为最优引物组。

表 1 甜瓜黄斑病毒 RT-LAMP 检测用引物序列  
Table 1 Primers for the RT-LAMP detection of MYSV

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Sequence	引物位置/nt Location
MYF3-1	TCCATCAACTACAAGAGAAGA	2 414 ~ 2 434
MYB3-1	TCTGCAAAATTGCTCGTG	2 607 ~ 2 590
MYBIP-1 (B1c-1+B2-1)	TGACTGCAAACCAGGAACAAC-TGAAAGCCTGTTCCATGAA	2 516 ~ 2 496, 2 437 ~ 2 455
MYFIP-1 (F1c-1+F2-1)	GCCAAGATTTTCACACAACCTTTTGA-TTATGTCTGCTAGCAATATGACC	2 517 ~ 2 541, 2 589 ~ 2 567
MYF3-2	TGCTAGCAGACATAACACG	2 575 ~ 2 593
MYB3-2	GTATGGTTTAACTGTGCCTG	2 792 ~ 2 773
MYBIP-2 (B1c-2+B2-2)	ACTAGCAAGCAAAGACAGAGGTC-GTTTGACATGACAGCTTTGAG	2 705 ~ 2 727, 2 768 ~ 2 748
MYFIP-2 (F1c-2+F2-2)	CTGCCTTTGGCCTATTTTCAGAAT-AAITTTGCAGATCTGCTCAT	2 680 ~ 2 657, 2 597 ~ 2 616
MYB3-3	AGCAGACATAACACGAGC	2 579 ~ 2 596
MYF3-3	GTTTGACATGACAGCTTTGA	2 768 ~ 2 749
MYBIP-3 (B1c-3+B2-3)	CTGCCTTTGGCCTATTTTCAGAAT-AAITTTGCAGATCTGCTCAT	2 680 ~ 2 657, 2 597 ~ 2 616
MYFIP-3 (F1c-3+F2-3)	AGGGCAGAGTGAGTGAAGACTAG-ATTAATGCTATGCATTGGAGG	2 687 ~ 2 709, 2 747 ~ 2 727

nt: 核苷酸缩写。nt: Acronym for nucleotide.

2.2 MYSV RT-LAMP 最佳反应温度、时间的确定

参照 Bst DNA Polymerase 酶给出的反应体系, 分别对 RT-LAMP 反应温度及时间进行优化。通过设置温度梯度进行扩增后发现, 甜瓜黄斑病毒 RT-LAMP 在 60 ~ 64 ℃ 均有扩增, 但在 62 ~ 64 ℃

时未显出差异, 因此该反应在 62 ~ 64 ℃任一温度皆可达到最优 (图 1)。设置时间梯度, 扩增后发现, 在 30 min 即有产物产出, 45 min 后扩增产物的产出量未见明显增加, 因此该反应可在 45 min 达到较为满意的结果 (图 2)。

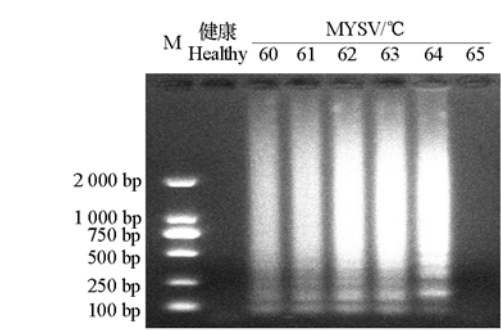


图 1 MYSV RT-LAMP 最佳反应温度筛选  
Fig. 1 Screening of the optimal temperature for RT-LAMP

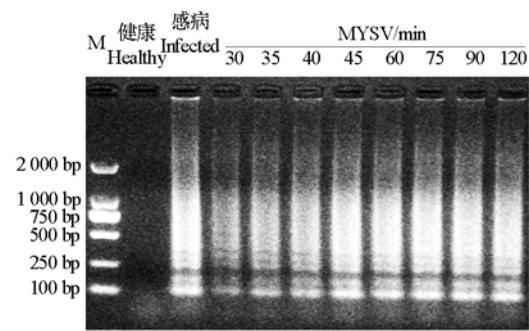


图 2 RT-LAMP 最佳反应时间筛选  
Fig. 2 Screening of the optimal time of RT-LAMP

2.3 MYSV RT-LAMP 最佳反应体系

通过对反应体系中各组分的浓度进行优化, 从而得到的最佳的反应体系为: Bst DNA polymerase 8 U, 10× Bst Buffer 2.5 μL, MgSO<sub>4</sub> 1.5 μL (终浓度达 8 mmol · L<sup>-1</sup>), M-MLV 5 U, Inhibitor 40 U, F3/B3 各 0.5 μL (使用浓度 10 μmol · L<sup>-1</sup>), 终浓度均为 0.2 μmol · L<sup>-1</sup>, BIP/FIP 各 4 μL (使用浓度 10 μmol · L<sup>-1</sup>), 终浓度均为 1.6 μmol · L<sup>-1</sup>, dNTP MIX (10 μmol · L<sup>-1</sup> each) 3.5 uL, 模板 RNA 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μL。63 ℃反应 45 min, 85 ℃灭活 5 min。

2.4 MYSV RT-LAMP 与 RT-PCR 灵敏度比较

利用 NanoDrop 1000 对甜瓜黄斑病毒病样总 RNA 进行浓度检测, RNA 浓度为 408.6 ng · μL<sup>-1</sup>。倍比稀释甜瓜黄斑病毒病样总 RNA, 分别进行 RT-PCR 和 RT-LAMP 扩增, 各反应体系模板均设置为 2 μL, 产物经 1%琼脂糖凝胶分析, 结果显示, RT-PCR 检测灵敏度达到 10<sup>-3</sup>, 而 RT-LAMP 在 10<sup>-5</sup> 仍有扩增, RT-PCR 检测灵敏度比 RT-LAMP 低 100 倍 (图 3, A, B)。

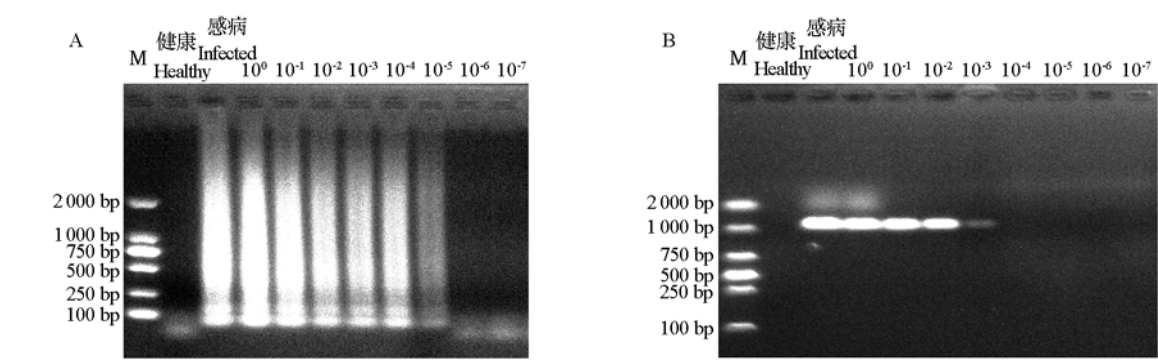


图 3 MYSV RT-LAMP (A) 与 RT-PCR (B) 灵敏度对比  
Fig. 3 Comparative analysis of the specificity between RT-LAMP and RT-PCR for MYSV and visualize detection

## 2.5 MYSV RT-LAMP 检测特异性

为了确定 RT-LAMP 检测 MYSV 的特异性, 采集广西壮族自治区内感染 TMV、MNSV、CCYV、CGMMV 等病毒的甜瓜样品, 采用最优反应体系, 63 °C 恒温扩增 45 min, 电泳结果显示, 仅含有 MYSV 的 RNA 样品可扩增出 RT-LAMP 典型的梯状条带 (图 4)。

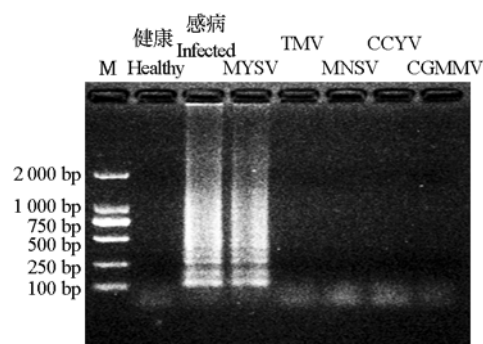


图 4 MYSV RT-LAMP 检测特异性

Fig. 4 Specificity analysis of MYSV RT-LAMP assay

## 3 讨论

番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*) 病毒是一类世界性分布, 寄主范围广泛, 对园艺作物和农作物生产造成严重为害的植物病毒, 每年在世界范围内造成数亿美元的经济损失 (German et al., 1992; Momol et al., 2001)。MYSV 是一种新发现的 *Tospovirus* 病毒, 该病毒能够侵染 11 科 30 多种植物, 对作物的潜在威胁比较严重。

LAMP 是一种高效、快捷的检测技术, 广泛用于检测植物病原物的检测。本研究中通过对 MYSV 序列的分析, 在 MYSV *N* 基因的保守区域设计多组用于 RT-LAMP 扩增的引物, 经过引物的筛选, 反应体系的优化, 建立一种特异的用于检测 MYSV 的 RT-LAMP 方法, 该方法仅需一台水浴锅在 45 min 即可获得检测结果, 省时快捷。通过比较 RT-LAMP 和一步法 RT-PCR 灵敏度发现, 该方法比传统的 RT-PCR 检测灵敏度高 100 倍; 通过扩增感染 TMV、MNSV、CCYV、CGMMV 等病毒的甜瓜样品发现, 该方法仅可扩增 MYSV, 特异性较强。RT-LAMP 反应效率很高, 不严格的操作很容易造成污染, 一旦污染, 检测结果将不可靠, 因此, 试验时应严格操作, 条件允许的情况下尽可能分区进行加样, 以减少污染发生的可能。

引物在 RT-LAMP 反应中起重要作用, 引物退火温度及引物序列间碱基的不同, 直接影响茎环结构的形成 (Notomi et al., 2000)。本研究中设计 3 对引物, 一对引物 [MYB3-1/MYF3-1、MYFIP-1 (F1c-1+F2-1)/MYBIP-1 (B1c-1+B2-1)] 并未对目的病原有扩增, 而另外一对 [MYB3-3/MYF3-3、MYFIP-3 (F1c-3+F2-3)/MYBIP-3 (B1c-3+B2-3)] 的扩增灵敏度仅比 RT-PCR 高 10 倍, 本研究中报道的引物扩增灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍, 因此, 选择合适的引物位置对 RT-LAMP 方法建立的成功与否, 及扩增效率的优劣有着至关重要的作用。

## References

- Chao C H, Chen C T, Kang C Y, Li J T, Huang L H, Yeh S D. 2010. Characterization of *Melon yellow spot virus* infecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 19: 41 - 52.
- Chen Hongyun, Chen Qing, Yang Yinghua, Wu Huijie, Lin Shiming, Gu Qingsheng. 2012. Molecular characterization of S RNA of a *Melon yellow spot virus* isolate in Sanya. *ACTA Phytopathol ICA Sin.* 42: 536 - 540. (in Chinese)
- 陈红运, 陈 青, 杨英华, 吴会杰, 林石明, 古勤生. 2012. 甜瓜黄斑病毒三亚分离物 S RNA 的分子特征. *植物病理学报*, 42 (5): 536 - 540.
- Chen T C, Lu Y Y, Cheng Y H, Chang C A, Yeh S D. 2008. *Melon yellow spot virus* in watermelon: a first record from Taiwan. *Plant Pathol.* 57: 765.
- German T L, Ullman D E, Moyer J W. 1992. *Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships*. *Annual Review of*

- Phytopathology, 30: 315 – 348.
- Gu Q S, Wu H J, Chen H Y, Zhang X J, Wu M Z, Wang D M, Peng B, Kong X Y, Liu T J. 2012. Melon yellow spot virus identified in China for the first time. New Dis Reports, 25: 7.
- Kato K, Hanada K, Kameya-Iwaki M. 1999. Transmissions mode, host range and electron microscopy of a pathogen causing a new disease of melon. Ann Phytopathol Soc Jpn, 65 (6): 624 – 627.
- Kato K, Handa K, Kameya-Iwaki M. 2000. *Melon yellow spot virus*: a distinct species of the genus *tospovirus* isolated from melon. Phytopathology, 90: 422 – 426.
- Le D T, Netsu O, Uehara-Ichiki T, Shimizu T, Choi IR, Omura T, Sasaya T. 2010. Molecular detection of nine rice viruses by a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. J Virol Methods, 170: 90 – 93.
- Liu Yong, Wu Zhu-yan, Li Yuan, Rao Xue-qin. 2011. Detection of *Melon yellow spot virus* on watermelon in Guangdong. Plant Quar, 25: 37 – 39. (in Chinese)
- 刘 勇, 吴竹妍, 黎 园, 饶雪琴. 2011. 广东西瓜上检测出甜瓜黄斑病毒. 植物检疫, 25 (6): 37 – 39.
- Liu Z, Xia X, Yang C, Huang J. 2016. Colorimetric detection of *Maize chlorotic mottle virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) with hydroxynaphthol blue dye. RSC Adv, 6: 73 – 78.
- Momol M T, Funderburk JE, Olson S, Stavisky J. 2001. Management of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) on tomatoes with UV-reflective mulch and acibenzolar-S-methyl // Thrips and Tospoviruses: Proceeding of the 7th International Symposium on Thysanoptera. Italy: CSIRO Publisher, 111 – 116.
- Minenko E, Vogel RF, Niessen L. 2014. Application of one-step reverse transcription loop mediated isothermal amplification (reverse transcription LAMP) for rapid detection of fungal gene expression in pure culture mycelia and in planta. Mycoscience, 55: 425 – 430.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res, 28: E63.
- Okuda M, Hanada K. 2001. RT-PCR for detecting five distinct tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. Journal of Virological Methods, 96: 149 – 156.
- Okuda M, Okuda S, Iwai H. 2015. Detection of cucurbit chlorotic yellows virus from *bemisia tabaci* captured on sticky traps using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and simple template preparation. J Virol Methods, 221: 9 – 14.
- Peng J C, Yeh S D, Huang L, Li J T, Cheng Y F, Chen T C. 2011. Emerging threat of thrips-borne Melon yellow spot virus on melon and watermelon in Taiwan. Pathol Eur J Plant, 130.
- Qiao Ning, Wang Xing-cui, Tian Su-bo, Liu Yong-guang, Jiang Hui-xia, Li Mei-qin, Zhu Xiao-ping. 2015. Initial identification and sequence analysis of *Melon yellow spot virus* on cucumber in Shouguang isolates. China Vegetable, 7: 25 – 28. (in Chinese)
- 乔 宁, 王兴翠, 田素波, 刘永光, 姜会霞, 李美琴, 竺晓平. 2015. 黄瓜上甜瓜黄斑病毒寿光分离物的初步鉴定及序列分析. 中国蔬菜, (7): 25 – 28.
- Rudolph D L, Sullivan V, Owen S M, Curtis K A. 2015. Detection of acute HIV-1 infection by RT-LAMP. PLoS One, 10.
- Wiboonchotikorn N, Chiemsombat P, Hongprayoon R. 2012. *In vitro* expression of NSs protein of *Melon yellow spot virus* infecting melon in Thailand and serological activity of NSs antibody in virus diagnosis. Australasian Plant Pathology, 41: 475 – 482.