

# 柑橘褪绿矮化相关病毒 LAMP 检测体系的建立

刘科宏, 陈洪明, 周彦, 宋震, 李中安\*

(西南大学柑桔研究所, 重庆 400712)

**摘要:** 根据 GenBank 登录的柑橘褪绿矮化相关病毒 (Citrus chlorotic dwarf-associated virus, CCDaV) 的移动蛋白 (MP) 基因序列设计了一组特异性引物, 经体系优化, 建立了 CCDaV 的环介导等温核酸扩增 (LAMP) 检测方法。结果显示该方法能特异扩增 CCDaV, 与其他 5 种柑橘病原体 (柑橘衰退病毒、柑橘碎叶病毒、柑橘裂皮病类病毒、温州蜜柑萎缩病毒和柑橘黄龙病菌) 不发生反应; 灵敏度为 PCR 的 100 倍, 与实时荧光 PCR 的灵敏度相同。用 LAMP 方法对 50 个田间样品进行检测, 与 PCR 和实时荧光 PCR 的检测结果一致, 证明该方法可用于田间样品的检测。该 LAMP 检测方法可特异、灵敏、快速地对 CCDaV 样品进行检测。

**关键词:** 柑橘; 柑橘褪绿矮化相关病毒; LAMP; 检测

**中图分类号:** S 666

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 05-0999-06

## Establishment of LAMP Assay for Detection of Citrus chlorotic dwarf-associated virus (CCDaV)

LIU Kehong, CHEN Hongming, ZHOU Yan, SONG Zhen, and LI Zhongan\*

(Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China)

**Abstract:** The specific primers of Citrus chlorotic dwarf-associated virus (CCDaV) were designed from the conserved region of movement protein(MP) gene sequence which available in GenBank, and the reaction condition was optimized. A loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay was established for detection of CCDaV. CCDaV was detected while *Citrus tristeza virus* (CTV), Citrus tatter leaf virus (CTLV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Satsuma dwarf virus* (SDV) and Huanglongbing (HLB) were not detected by the LAMP assay. Sensitivity of the LAMP assay was 100-fold higher than conventional PCR and same as real-time PCR. The positive rate of 50 samples from Yunnan, Sichuan and Chongqing by using the LAMP was 6%, same as conventional PCR and real-time PCR, suggesting the LAMP assay could detect CCDaV from field samples. The LAMP assay is a specific, sensitive and rapid method for detecting CCDaV.

**Keywords:** Citrus; Citrus chlorotic dwarf-associated virus; LAMP; detection

柑橘褪绿矮化相关病毒 (Citrus chlorotic dwarf-associated virus, CCDaV) 引起的柑橘褪绿矮化

**收稿日期:** 2016-10-19; **修回日期:** 2017-03-21

**基金项目:** 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201203076-01); 重庆市基础与前沿研究计划项目 (cstc2015jcyjBX0043); 中央高校基本科研业务费项目 (XDJK2015C093)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lizhongan@cric.cn)

病是柑橘新发生的一种重要病害, 主要分布于土耳其 (Çinar et al., 1993; Kersting et al., 1996), 近年在中国云南地区也有发现 (周常勇 等, 2013; Guo et al., 2015)。CCDaV 为单链环状 DNA 病毒, 属于菜豆金黄花叶病毒属 (*Begomovirus*), 可嫁接传播, 也可通过杨梅粉虱 (*Parabemisia myricae* Kuwana) 传播 (Korkmaz et al., 1995; Loconsole et al., 2012)。CCDaV 可侵染多种柑橘寄主, 引起植株叶片变形、扭曲、花叶等症状, 造成果实变小, 产量降低, 已给土耳其柑橘产业造成了严重的损失 (Loconsole et al., 2012)。2008 年仅在中国云南瑞丽一个果园中发现该病感染率为 10%, 而到 2015 年这一地区尤力克柠檬感染率已上升到 30% (Guo et al., 2015)。目前尚无防治柑橘褪绿矮化病的有效药剂。准确、灵敏、快速的检测方法是柑橘安全生产和建立无病毒苗木繁殖体系的前提和保障。

本研究根据 CCDaV 的移动蛋白 (MP) 基因序列设计了环介导等温核酸扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 引物并建立了检测方法, 可对该病毒实施准确、灵敏、快速的检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试毒源及植株: 感染了 CCDaV、柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV)、柑橘碎叶病毒 (*Citrus tatter leaf virus*, CTLV)、柑橘裂皮病类病毒 (*Citrus exocortis viroid*, CEVd)、温州蜜柑萎缩病毒 (*Satsuma dwarf virus*, SDV) 和柑橘黄龙病菌 (*Citrus Huanglongbing*, HLB) 及健康的代代酸橙 (*Citrus aurantium* 'Daidai') 实生苗均由西南大学柑桔研究所国家柑橘苗木脱毒中心提供。从云南、四川、重庆采集 50 份疑似样品包括尤力克柠檬、温州蜜柑、冰糖橙、纽荷尔脐橙和沙田柚。

试剂: *Bst* 聚合酶、限制性内切酶 *Mbo* II 购于美国 NEB 公司; SYBR Green I 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; Gel Extraction Kit 购自美国 Omega 公司; Betaine 购自美国 Promega 公司; DH5a 购自中国 BioMed 公司; 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 其余试剂均为国产分析纯。

仪器: Varioskan@ Flash 核酸读数系统 (美国 Thermo Scientific 公司); TGRADIENT 型 PCR 仪 (美国 WhatMan 公司); Power300 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 引物合成

根据 GenBank 登录的 CCDaV (KF561253) 基因组序列, 选择 MP 基因序列为靶标, 使用专门的 LAMP 引物设计软件 primer explorer 4.0 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) 设计引物, 得到针对 6 个区域的 4 条特异性引物, 按照 Loconsole 等 (2012) 的方法合成 PCR 和实时荧光 PCR 的引物 (表 1)。

### 1.3 LAMP 检测体系

取 50 mg 待测样品的叶片, 按照 Trizol 试剂说明书提取样品的总核酸, 保存于 -20 °C 备用。

反应体系为: 总核酸 2 μL, 10× *Bst* 缓冲液 2.5 μL, 25 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 3 μL, 4 mmol · L<sup>-1</sup> Betaine 2 μL, 10 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs 2 μL, 8 U · μL<sup>-1</sup> *Bst* 聚合酶 1 μL, 20 μmol · L<sup>-1</sup> FIP 和 BIP 各 2 μL, 10 μmol · L<sup>-1</sup> F3 和 B3 各 0.5 μL, 无菌水补足至 25 μL。反应条件为: 64 °C 60 min, 80 °C 5 min。取

3  $\mu\text{L}$  产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析; 同时在产物中加入 1  $\mu\text{L}$  100 倍稀释的 SYBR Green I, 振荡混匀, 目视观察结果。

表 1 试验引物

Table 1 The primers in this study

体系 System	引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') Sequence	扩增片段长度/bp Product size	参考文献 Reference
LAMP	F3	ACCAGGAGTGGAGGACAAT		
	B3	CCTTACACCCCGGAGGAA		
	FIP	ACCTGGGCCTCCTTCTTCTTGGGACAAGCCGTGTAACG		
	BIP	AGAAGCCCAAGATTGCTGGGGACCTTGCTCGACTTCTCC		
PCR	3202fw	GTCTGTGTTCGACCCGTT	444	Loconsole et al., 2012
	6rev	GGGATTTCGCATGGATAGTCATCCAA		
实时荧光 PCR Real-time PCR	1583fw	GTGTTGAAGGGTTCTCATTTTTGTC	68	Loconsole et al., 2012
	1650rev	CTACTTGATTAGCCGCGCTTAG		

## 1.4 产物鉴定

将 LAMP 产物经琼脂糖电泳分离后, 切取大小 200 bp 左右的条带, 用胶回收试剂盒回收目标片段连接于 pMD-19T 载体, 连接产物转入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 选取阳性克隆送到上海英潍捷基贸易有限公司测序。测序结果在 GenBank 中进行序列比对。

利用 BioEdit 软件分析 LAMP 产物序列, 选择限制性内切酶 *Mbo* II 进行酶切鉴定, 预期酶切片段为 81、108 和 127 bp。按试剂盒说明书进行酶切, 取 15  $\mu\text{L}$  酶切产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

## 1.5 特异性验证

分别提取感染了 CCDaV、CTV、CTLV、CEVd、SDV 和 HLB 样品的总核酸, 用建立的 LAMP 方法进行检测。

## 1.6 灵敏度比较

测定感染 CCDaV 样品的总核酸浓度, 并将其 10 倍稀释后作为模板, 分别用 LAMP、PCR 和实时荧光 PCR (Loconsole et al., 2012) 方法进行检测。

## 1.7 LAMP 方法的应用

提取 50 份疑似样品的总核酸, 每份样品提取 3 个重复, 用建立的 LAMP 方法进行检测, 同时参照 Loconsole 等 (2012) 建立的 PCR 和实时荧光 PCR 方法对样品进行检测, 对 LAMP 结果进行验证。对阳性样品进行序列分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 LAMP 检测

用 LAMP 体系扩增感染 CCDaV 样品的总核酸, 电泳可检测到 LAMP 产物特殊的阶梯状条带, 而水和健康对照无条带 (图 1)。在产物中加入 SYBR Green I 后, CCDaV 阳性产物变为黄绿色; 健康对照和清水对照产物为 SYBR Green I 的红棕色, 为阴性 (图 2)。

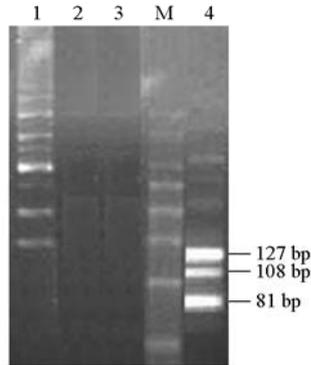


图1 LAMP产物琼脂糖电泳检测

M: 标准分子量; 1: CCDaV 样品; 2: 健康对照;  
3: 水; 4: *Mbo* II 酶切产物。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis inspection of LAMP products

M: DNA Marker; 1: CCDaV sample; 2: Healthy control;  
3: Water; 4: LAMP product digested with *Mbo* II.

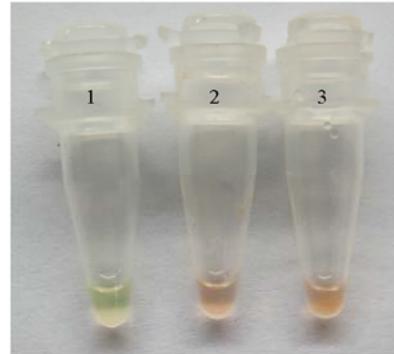


图2 LAMP产物可视化检测

1: CCDaV 样品; 2: 健康对照; 3: 水。

Fig. 2 Visual inspection of LAMP products

1: CCDaV sample;  
2: Healthy control; 3: Water.

## 2.2 产物鉴定

将上述感染 CCDaV 样品的 LAMP 产物电泳分离后, 切取 200 bp 左右条带进行克隆, 测序结果表明所克隆片段大小为 193 bp, 在 GenBank 中进行序列比对, 其与 GenBank 中的 CCDaV (登录号: JQ920490.1) 核苷酸序列同源率为 96%, 说明获得的序列为 CCDaV 的基因序列。

CCDaV 产物经 *Mbo* II 酶切后产生 81、108 和 127 bp 的条带, 与理论值相符, 证明该体系扩增产物确为设计的 CCDaV 靶基因序列 (图 1)。

## 2.3 特异性验证

用建立的 LAMP 方法检测感染了 CCDaV、CTV、CTLV、CEVd、SDV 和 HLB 的样品, 只有 CCDaV 检测结果为阳性 (图 3, 图 4), 表明该体系可特异性检测 CCDaV。

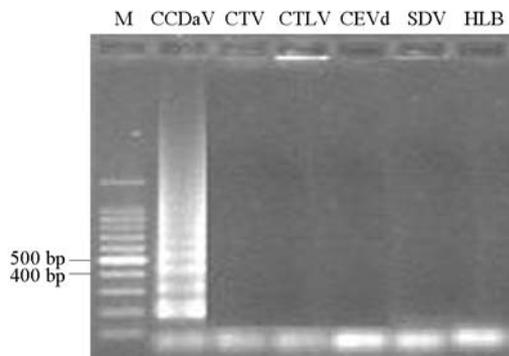


图3 LAMP体系特异性检测琼脂糖电泳分析

Fig. 3 Specificity of the LAMP assay by agarose gel electrophoresis inspection

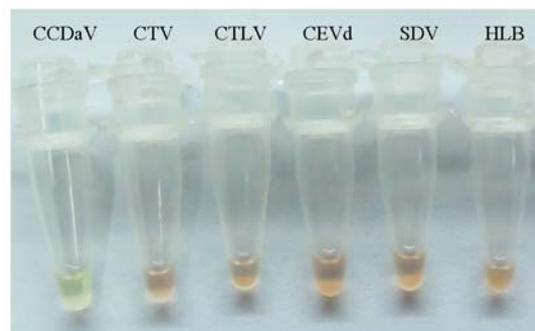


图4 LAMP体系特异性检测可视化分析

Fig. 4 Specificity of the LAMP assay by visual inspection

## 2.4 灵敏度比较

经测定, 感染 CCDaV 样品的总核酸浓度为  $5.2 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 经 10 倍梯度稀释后的检测结果显示, PCR 可检测的最小总核酸浓度为  $5.2 \times 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 实时荧光 PCR 和 LAMP 可检测的最小总核酸浓度为  $5.2 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (图 5, 图 6, 图 7)。

LAMP 的灵敏度是 PCR 的 100 倍, 与实时荧光 PCR 的灵敏度相同。

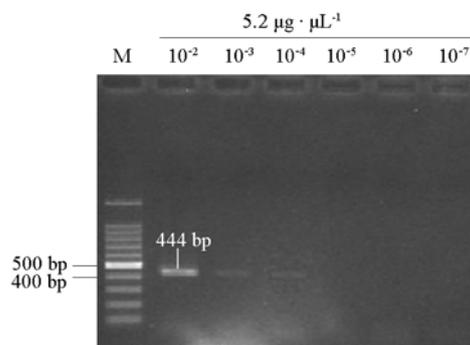


图 5 PCR 检测灵敏度  
Fig. 5 Sensitivity of PCR

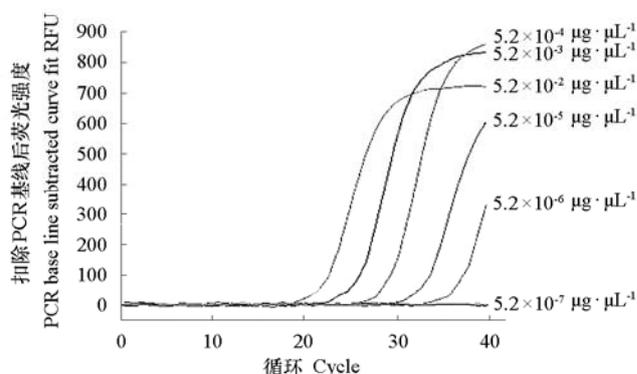


图 6 实时荧光 PCR 检测灵敏度  
Fig. 6 Sensitivity of real-time PCR

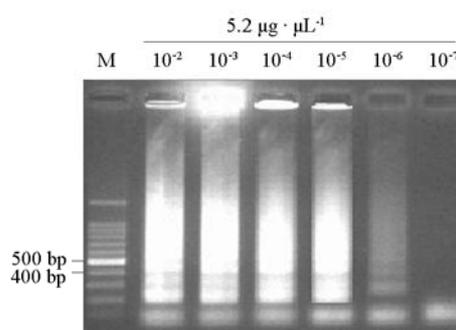


图 7 LAMP 检测灵敏度  
Fig. 7 Sensitivity of LAMP

## 2.5 LAMP 方法的应用

用 LAMP 方法从采自云南、四川和重庆的 50 个疑似样品中检测出 3 个样品感染了 CCDaV, 检出率为 6%, 3 个感病样品均为采自云南的尤力克柠檬。用 PCR 和实时荧光 PCR 两种方法对 50 个疑似样品进行检测, 结果与 LAMP 的检测结果一致 (表 2); 每个样品重复的 3 个分样检测结果也一致, 证明本研究建立的 LAMP 检测方法可用于 CCDaV 田间样品的检测。

3 个阳性样品所得克隆片段大小为 193 bp, 其核苷酸序列同源率为 100%。

表 2 田间样品检测结果  
Table 2 Detection results of field samples

地区 Region	品种 Variety	样品株数 Number of samples	阳性株数 Positive number		
			LAMP	实时荧光 PCR Real-time PCR	PCR
云南 Yunnan	尤力克柠檬 Eureka Lemon	7	3	3	3
	冰糖橙 Bingtangcheng	5	0	0	0
四川 Sichuan	尤力克柠檬 Eureka Lemon	7	0	0	0
	温州蜜柑 Satsuma orange	5	0	0	0
	纽荷尔脐橙 Newhall navel orange	4	0	0	0
重庆 Chongqing	尤力克柠檬 Eureka Lemon	7	0	0	0
	沙田柚 Shatianyou	6	0	0	0
	温州蜜柑 Satsuma orange	5	0	0	0
	纽荷尔脐橙 Newhall navel orange	4	0	0	0

### 3 讨论

本研究以 CCDaV 的 MP 基因序列为靶标, 设计了针对 6 个区域的 4 条特异性引物, 建立了 CCDaV 的 LAMP 检测方法。该方法可特异检测 CCDaV, 而不与 CTV、CTLV、CEVd、SDV 和 HLB 这 5 种柑橘病原物发生反应, 说明该方法的特异性强。Loconsole 等 (2012) 建立了 CCDaV 的 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法, LAMP 和实时荧光 PCR 的灵敏度是 PCR 检测方法的 100 倍, 说明 LAMP 与实时荧光 PCR 方法均可对低含量的 CCDaV 样品进行精确的检测。应用本研究建立的 LAMP 方法对田间的 50 个样品进行了检测, 其结果与 PCR 和实时荧光 PCR 方法的检测结果一致, 说明该方法可用于检测田间样品。对脱毒苗木、良繁体系母树、引进品种等重要材料进行检测时, 建议使用灵敏度较高的 LAMP 或实时荧光 PCR 检测方法。

LAMP 方法的灵敏度高于 PCR, 与实时荧光 PCR 相同, 因此 LAMP 相对于 PCR 能更准确地对 CCDaV 进行检测。PCR 和实时荧光 PCR 需相应的特殊仪器, 样品只能带回实验室检测; 而 LAMP 可在水浴锅或烘箱中进行反应, 容易配备, 可直接在田间对样品进行检测, 既省去了样品的运输环节, 还可更快得到检测结果, 也避免了运输途中由于保存不当或时间过长而造成的样品缺失、干枯、腐烂等问题。因此 LAMP 比 PCR 和实时荧光 PCR 更适合在田间及基层单位使用。

LAMP 方法由于灵敏度高, 能检测到空气中的阳性气溶胶微粒, 容易出现假阳性 (王永江 等, 2013)。因此操作必须规范、细心, 加样区和琼脂糖电泳区必须隔离, 不在加样区对 LAMP 产物进行任何操作, 保持加样区空气清洁, 避免假阳性的发生。

田间样品中的 3 个阳性样品均来自云南的同一果园, 且 MP 基因的核苷酸序列同源性为 100%, 可能是不正确的农事操作造成的 CCDaV 在果园内部的传播。有效防止嫁接造成传染性病害的传播, 首先要种植无病毒苗木; 其次在田间进行农事操作时, 应对嫁接刀、枝剪等工具消毒, 抹芽时手不接触植株伤口; 可通过昆虫传播的病害还要加强对媒介昆虫的防治。

### References

- Çinar A, Kersting U, Önelge N, Korkmaz S, Şaş G. 1993. Citrus virus and virus-like disease in the eastern Mediterranean region of Turkey//Moreno P, Graça J V, Yokomi R K. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside: IOCV: 397 - 400.
- Guo J, Lai X P, Li J X, Yue J Q, Zhang S Y, Li Y Y, Gao J Y, Wang Z R, Duan H F, Yang J D. 2015. First report on Citrus chlorotic dwarf associated virus on lemon in Dehong prefecture, Yunnan, China. *Plant Disease*, 99 (9): 1287.
- Kersting U, Korkmaz S, Çinar A, Ertugrul B, Önelge N, Garnsey S M. 1996. Citrus chlorotic dwarf: a new whitefly-transmitted disease in the east Mediterranean region of Turkey//Graça J V, Moreno P, Yokomi R K. Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside: IOCV: 220 - 225.
- Korkmaz S, Çinar A, Kersting U, Garnsey S M. 1995. Citrus chlorotic dwarf: a new whitefly-transmitted virus-like disease of citrus in Turkey. *Plant Disease*, 79: 1074.
- Loconsole G, Saldarelli P, Doddapaneni H, Savino V, Martelli G P, Saponar M. 2012. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family *Geminiviridae*. *Virology*, 432: 162 - 172.
- Wang Yong-jiang, Zhou Yan, Li Zhong-an, Su Hua-nan, Huang Ai-jun, Tang Ke-zhi, Zhou Chang-yong. 2013. A RT-LAMP assay for detection of *Citrus tristeza virus*. *Scientia Agriculture Sinica*, 46 (3): 517 - 524. (in Chinese)
- 王永江, 周彦, 李中安, 苏华楠, 黄爱军, 唐科志, 周常勇. 2013. 柑橘衰退病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立. *中国农业科学*, 46 (3): 517 - 524.
- Zhou Chang-yong, Wang Xue-feng, Zhou Yan, Liu Jin-xiang. 2013. Occurrence and control citrus viral diseases in China. *China Fruit News*, 30 (10): 70 - 72. (in Chinese)
- 周常勇, 王雪峰, 周彦, 刘金香. 2013. 我国柑橘病毒病发生和防控进展. *中国果业信息*, 30 (10): 70 - 72.