

环介导等温扩增(LAMP)技术在果树病毒病检测中的应用

罗丽婷¹, 蒋君梅², 李向阳², 谢鑫^{1*}

(1. 贵州大学农学院/农业微生物特色重点实验室, 贵州 贵阳 550025;
2. 贵州大学绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要:病害的早期诊断是防治及阻止病害进一步传播的有效途径。环介导等温扩增技术(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)因检测速度快、灵敏度高、特异性强、操作简便等优势,已成为病害诊断的主要手段之一。本文综述了LAMP检测技术在果树(苹果、番木瓜、樱桃、葡萄、西番莲)病毒病检测中的应用,总结目前LAMP技术的发展情况并展望其未来前景,以便促进该技术在植物病毒病检测中的应用。

关键词: LAMP技术; 病毒病; 快速检测

中图分类号: S432 **文献标识码:** A

文章编号: 1008-0457(2022)05-0043-10

国际 DOI 编码: 10.15958/j.cnki.sdnyswxb.2022.05.007

果树是指能提供可供食用的果实、种子的多年生植物及其砧木的总称^[1]。其果实不仅含有丰富的维生素营养,而且能够促进消化,因而深受人们的喜爱^[2]。自改革开放以来,我国果树产业发展迅速,现已成为世界果树产业第一大国,种植面积和产量都居世界首位^[3]。果树病害频发是目前制约果树产业发展的主要原因,病毒是其最常见的致病因子^[4],据报道,目前已发现900多种病毒可引起植物病害,造成的经济损失可高达600亿美元^[5-6]。早期诊断是减少病害损失,阻止病害进一步传播的有效方法^[3]。但由于病毒个体微小,结构简单,只含有一种核酸(DNA或RNA),无法用光学显微镜观察,使得病毒诊断存在较大的局限性^[7]。随着时间的推移与研究的不断深入,病害诊断领域发生了巨大的变革。从标本中分离和鉴定病原,到血清学鉴定的出现,再到酶联免疫吸附剂测定方法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)和聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)等检测方法的出现^[4,6,8]。检测效率和灵敏度虽都有不同程度的提高,但昂贵的仪器和繁琐的扩增后处理过程使其应用受到一定程度的影响。直至2003年环

介导等温扩增技术(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)被用于植物病毒病的检测^[9],才有效地解决了上述问题,该方法不仅操作简单,而且其灵敏度及效率也高于传统的ELISA及RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)检测技术。从2003年至今,LAMP技术已被用于检测47个属的100多种病毒^[10-11]。此外,逆转录环介导等温扩增(Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification, RT-LAMP)也已在2个科8个病毒属中进行检测^[11]。本文将从LAMP技术的原理出发,重点梳理LAMP技术在果树病毒病检测中的应用,讨论其优缺点,并对LAMP技术在植物病害防治中的应用进行了展望。

1 环介导等温扩增技术(LAMP)

LAMP是由Notomi和同事设计和开发的一种用于基因诊断和恒温核酸扩增的方法,最初用于检测乙型肝炎病毒的DNA^[3,9]。该方法所涉及的嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*, Bst) DNA聚合酶在60~65℃的等温条件下约有60min的自动循环可置换DNA合成^[12],因此需要由

收稿日期:2022-04-22;修回日期:2022-04-27

基金项目:贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2022]一般091);国家自然科学基金项目(32060614);大学生创新创业训练计划项目(贵大国创字[2021]007)

*通讯作者:谢鑫(1984—),男,博士,副教授,主要从事植物抗病基因功能研究,E-mail:xiexin2097757@163.com.

一组专门设计的特异性目标引物启动,用于识别目标 DNA 上的特定区域^[2]。LAMP 检测引物至少包括正向及反向外引物(F3 和 B3, 仅在非循环步骤中具有链位移活性)^[13]、正向及反向内引物 FIP 和 BIP,有助于环的形成,其中 FIP 由 F1c 和 F2 两部分组成;BIP 由 B1c 和 B2 两部分组成;F1c 和 F2c 与目标序列中的 F1 和 B1 区域互补^[14-15];有时还包括两种环引物(LF 和 LB)以加快 LAMP 反应效率^[16]。LAMP 引物是针对每个病原体的目标核酸序列(DNA 或 RNA)而设计的,通常使用 Primer Explorer (<https://primerexplorer.jp/e/>) 在线网站设计^[5,10]。

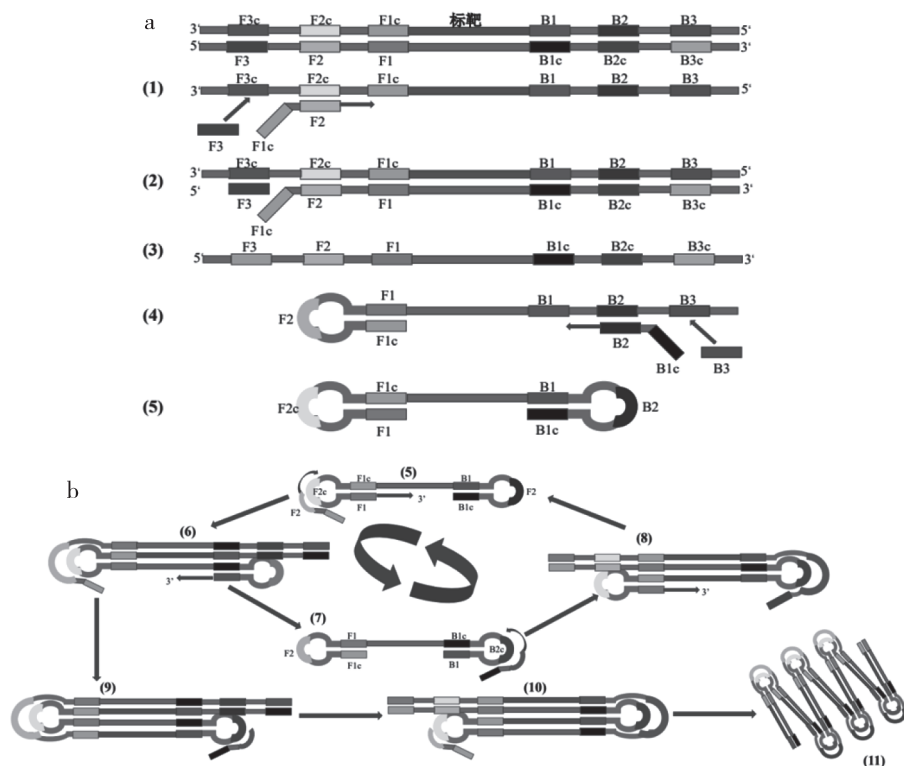
LAMP 反应过程(图 1)包括三个步骤:(1)初始步骤:FIP 针对特定的互补序列,开始 DNA 合成^[17]。在目标序列的另一端,BIP 的 DNA 扩增也以同样的方式进行(图 1-a,1-2)^[18];(2)环结构生成^[5]:F3 进入目标区域,在 Bst 酶的置换作用下,FIP 链被取代,形成一个扩增循环的模板^[19]。通过两个连续的扩增周期,即可合成含有目标序列的

DNA 片段,其末端为环状结构^[20],用于循环扩增步骤的模板(图 1-a,3-5);(3)循环放大:类似于初始和环结构产生步骤,但环结构作为单链模板^[7,21]。在每个循环中,对于每个单链 DNA 模板,都会有两个扩增产物,其中一个与模板相同,另一个是模板长度的两倍^[22]。最终得到花椰菜状混合产物,可通过多种方法检测,如:双链 DNA(dsDNA)结合染料、浊度测量、紫外光照射、实时荧光、凝胶电泳等方法检测(图 1-b,6-11)^[15,17,23]。

2 LAMP 技术在果树病毒病检测中的应用

2.1 苹果病毒病

苹果(*Malus pumila* Mill.)是全球最重要的果树作物之一,为落叶乔木^[24]。苹果病毒病是制约苹果可持续生产的一大威胁,如苹果褪绿叶斑病毒(*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV)和苹果茎沟病毒(*Apple stem grooving virus*, ASGV)是使苹果产业严重受损的主要病毒^[25-27]。ACLSV 和 ASGV 在



注:(1)靶标 DNA 从 FIP 开始合成到其特定的互补序列 B3c 为止;(2)F3 引物进入 B3c 序列并开始延伸;(3)在 Bst 酶作用下,从 FIP 开始合成的链被替换并成为下一个扩增周期的合成模板;(4)从 BIP 合成 DNA;(5)包含目标序列的 DNA 片段扩增完成;(6)-(7)FIP 引物在 F2c 位点与模板配对,扩增至与模板链相同长度;(8)模板链在 B1c 位点处合成至达到原来长度的两倍;(6)-(11)同上述步骤,在 Bst 酶的作用下每条模板链合成两条以上新 DNA 链。其中一条与模板长度相同,另一条长度为模板链的两倍。

图 1 LAMP 反应原理及流程

Fig. 1 LAMP reaction principle and amplification process

感病果树体内浓度很低^[26],且一般不产生明显症状,因而防治较为困难。目前主要通过使用高灵敏的检测方法对苗木进行病毒检测,从而及时对病害进行防治。传统的 ELISA 和 RT-PCR 技术都可快速识别和区分致病因子,防止病害进一步传播。然而,在某些情况下,ACLSV 和 ASGV 在感病苗木中含量甚至会低于 ELISA 和 RT-PCR 的最低检测限度,使得苹果褪绿叶斑病和苹果茎沟病一直未得到有效的防治^[28-29]。

为有效解决上述问题,Zhao 等^[30]、Kim 等^[31]于 2014 年建立了一种简单、灵敏的 RT-LAMP 检测方法,利用设计的外壳蛋白基因引物(表 1),快速检测 ASGV。结果显示,RT-LAMP 检测出 53 个被侵染的苹果叶片样品,而 RT-PCR 检测出 49 个被侵染的叶片样品。并通过与 ACLSV 和苹果茎痘病毒(*Apple stem pitting virus*, ASPV)的交叉反应,确定了 RT-LAMP 引物具有特异性。2017 年, Peng 等^[32]首次建立 ACLSV 的 RT-LAMP 体系。在多次试验后确定其最佳反应温度为 64 ℃,最佳反应时间为 75 min(表 1),并在现场采集的苹果样品上成功检测出病毒。不同于传统的检测技术,RT-LAMP 灵敏度高,简单易行,成本低廉,可在简单的现场条件下轻松进行,适用于野外条件下及在许多发展中国家进行感染样品的快速检测,目前已得到越来越广泛的应用^[22]。

2.2 番木瓜病毒病

番木瓜(*Carica papaya* Linn.)又名木瓜,是最具经济价值的番木瓜科水果,营养价值与药用价值都极为丰富,广受人们的喜爱,在我国南方多地均有种植^[33]。但近年来,番木瓜病毒病频繁发生,严重阻碍了番木瓜的高产与优产。番木瓜环斑病毒(*Papaya ringspot virus*, PRSV),于 1949 年在美国被首次报道,属于马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*),有 PRSV-P 和 PRSV-W 两种类型^[34]。该病毒在自然界中极易传播,已成为全球性的制约番木瓜生产的重大病害,曾在中国华南地区大规模流行,一度被认为是危害中国木瓜生产最广泛和最具破坏性的病害^[35]。此外,与 PRSV 同属的番木瓜变形花叶病毒(*Papaya leaf-distortion mosaic virus*, PLDMV)因引起的病害症状与 PRSV 相似,最初被认为是 PRSV^[36]。病毒基因通过同源性依赖的转录后基因沉默(Post-transcriptional Gene Silencing, PTGS)获得的转基因抗性是迄今为止保护植物免受包括 PRSV 在内的病毒感染的最有效途径^[26]。而 PLD-

MV 却可侵染中国台湾和海南岛的抗 PRSV 转基因番木瓜,对中国番木瓜商业化生产构成了严重威胁^[33-34]。在经过病毒的血清学诊断和全基因组测序后发现,PLDMV 为 *Potyvirus* 一个独立的种。为了区分 PLDMV 和 PRSV,已建立 ELISA、Western blotting 和基于 PLDMV CP 基因的 RT-PCR 等鉴别方式,但效果均不太理想。因此,有必要开发一种快速、灵敏、经济的检测 PLDMV 的方法。2013 年 Shen 等^[36]基于 PLDMV CP 的保守序列设计了 4 条 RT-LAMP 引物(表 1),建立 PLDMV 的 RT-LAMP 检测方法,通过 RT-LAMP 检测试验,仅在 PLDMV 感染样本的 RNA 提取物中获得阳性结果^[35-37],因此较好地区分了这两种病毒。

对于 PRSV CP 基因,过去常用 RT-PCR 进行检测,但近年来由于 PRSV 转基因抗病品种培育的增多,以往的检测方法已难以完全区分各转基因品种与感 PRSV 的番木瓜^[35]。研究人员在之前的研究的基础上,对 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中保存的 22 个 PRSV-P 和 PRSV-W 菌株的基因组序列进行序列比对,发现 P3 基因包含一个高度保守的区域(3552-3736 bp),还尚未用于转基因番木瓜抗 PRSV 基因的开发。以此区域设计 LAMP 引物靶点,成功设计出了对感 PRSV 植株病毒 RNA 有特异性和敏感性的引物(表 1),且对 PLDMV 的检测不具有特异性和敏感性。通过检测 PRSV 即可区分转基因番木瓜、感 PRSV 番木瓜和感 PLDMV 番木瓜^[36,38]。该方法结合早期开发的 PLDMV RT-LAMP 检测方法,为区分木瓜病毒感染提供一个快速、可靠、敏感和经济的诊断工具。

2.3 樱桃病毒病

樱桃(*Cerasus* spp.)为蔷薇科、樱属植物的统称,营养丰富,含丰富的蛋白质、糖类、维生素及钙、铁等多种元素,享有“早春第一果”的美誉^[39]。世界上作为栽培的樱桃仅有樱桃(*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don)、欧洲甜樱桃(*Cerasus avium* (L.) Moench.)、欧洲酸樱桃(*Cerasus vulgaris* Mill.)和毛樱桃(*Cerasus tomentosa* (Thunb.) Wall.)4 个种类^[40]。甜樱桃是近几年来在我国发展较快的果树之一,其种植面积逐年扩大,但由于栽培过程中的操作不当,尤其对病毒病的重视及预防力度不够,严重影响了樱桃果品的产量与品质^[41]。

目前,国内报道的甜樱桃病毒病已有 14 种,主要为樱桃小果病毒 1(*Little cherry virus 1*, LChV-1)、

樱桃小果病毒 2 (*Little cherry virus 2*, LChV-2) 和 ACLSV 等^[40]。LChV-1 与 LChV-2 致病力极强,在大多数樱桃种植区均有发现,被认为是造成樱桃经济损失的主要原因,目前尚未找到较好的防治方法,只有通过清除感病的苗木才能控制,需要高效、灵敏、准确的检测方法为其提供保障^[39,41]。传统的检测技术,如:RT-PCR、ELISA 等大都存在灵敏度低,操作复杂的问题^[42-43]。因而,研究人员选择建立 LChV-1 与 LChV-2 的 RT-LAMP 体系。研究发现,RT-LAMP 技术在 10 min 内就能检测出 LChV-1,在 67 °C 下进行时效果最佳(表 1)。现场检测病叶结果显示 RT-LAMP 检测速度较 RT-PCR 显著提高,灵敏度至少提高了 100 倍。在对从甜樱桃中分离出的 LChV-2 进行广谱检测,还发现了其潜在的昆虫媒介^[43-44]。该研究成果为 LChV-1 与 LChV-2 在现场快速诊断应用奠定了基础,为樱桃的商业化发展提供了技术支持。

2.4 葡萄病毒病

葡萄(*Vitis vinifera* L.)是世界上产量第二大的水果,是世界最古老的果树树种之一^[45]。近年来,葡萄栽种面积的持续扩大的同时,也造成了葡萄病毒病的快速传播。到目前为止,已有超过 60 种病毒在葡萄中发现,严重制约了葡萄产业的发展^[16]。据血清学调查显示,多种葡萄病毒病都是由一种单一病毒所引起——葡萄扇叶病毒(*Grapevine fanleaf virus*, GFLV)^[46]。GFLV 是已知最早的葡萄病毒,葡萄受侵染后其叶片会退化,导致高达 80% 的产量损失。预防一直以来都是控制病毒病最重要的方法,但因 GFLV 在世界范围内的广泛分布^[47],导致预防效果一直欠佳,这对病毒检测技术提出了更高的要求。研究人员通过对双抗体夹心酶联免疫吸附法(DAS-ELISA)、RT-PCR、免疫捕捉反转录聚合酶链式反应(IC-RT-PCR)、RT-LAMP、免疫捕捉反转录环介导等温扩增方法(IC-RT-LAMP)等几种检测方法的评估发现,IC-RT-LAMP 为目前检测 GFLV CP 基因的最佳方法(表 1)^[45,48]。该检测方法所需时间最短,且操作简便,避免了毒性染色材料的使用,可直接用肉眼进行视觉检测,提高了安全性的同时也降低了成本。

长期以来,尽管人们已对葡萄的主要病毒病有了一定了解,如由 GFLV 引起的病害,但影响葡萄健康和产业发展的新病毒仍在不断出现。包括葡萄红斑点病毒(*Grapevine red blotch virus*, GRBV),

于 2008 年首次在美国加州出现,2012 年首次从患病葡萄中提取出该病毒^[49]。由其引起的葡萄红斑病,广泛分布于北美葡萄种植区,可导致葡萄产量严重降低、成熟期大幅缩短。此前,果农一直都通过定期检测和清除病株的方式来管理葡萄园,往往不能及时发现病害,而导致损失严重^[46]。直到 2019 年研究人员建立了一种不需要提取核酸,使用无菌移液管尖端穿刺植物体,即可在无菌蒸馏水中孵育 LAMP 反应所需模板的技术。试验结果显示,“针刺”LAMP 检测方法具有 100% 的敏感性和 96.3% 的特异性,进一步使用葡萄红斑伴随病毒等温扩增检测试纸条(AmplifyRP® Acceler8® for GRBaV Rapid DNA Test)对 GRBaV 进行检测。结果与“针刺”LAMP 检测一致,表明“针刺”LAMP 检测法具有实用性与广谱性^[50]。

2.5 西番莲病毒病

西番莲(*Passiflora caerulea* L.)别名百香果,因其香气浓郁,营养、药用价值高,而深受消费者的喜爱,有“果汁之王”的美誉^[51]。又因其适应性强,种植还具有“短、平、快”的特点,近年来全国种植面积持续增加。目前,西番莲多为引种栽培,在栽培生产过程中,常常会受到病虫害的威胁^[52]。其中,病毒病对西番莲产业的发展危害最大,据报道,现已有超过 25 种病毒可侵染西番莲。夜来香花叶病毒(*Telosma mosaic virus*, TeMV)为 potyvirus 病毒,该病毒首先在越南发现可侵染夜来香属植物(*Telosma* Cov.),2014 年通过检测在西番莲中发现了该病毒^[53]。西番莲受 TeMV 侵染后,其果实和叶片会出现变形及皱缩等症状,使其产量和品质受到严重影响^[54]。现在,大都选择通过筛选无毒果苗来防治病毒危害,但由于早期植株受病毒侵染后不表现出明显的症状,从而采用 ELISA、PCR 及 LAMP 等方法来检测植物病原物^[55]。

不同于传统的检测方法,如 ELISA、PCR 等,LAMP 因其具有检测速度快、灵敏度高和无需专业仪器等优点,而被广泛用于各种病原体的检测^[11]。为了减少西番莲产业的损失,加快无毒苗的筛选,Fu 等^[54]于 2021 年首次将 LAMP 技术应用于西番莲 TeMV 的检测,并成功建立西番莲 LAMP 快速检测体系(表 1)。研究发现 RT-LAMP 检测技术与 RT-PCR 相比具有显著优势,其灵敏度与效率高,特异性强,此外还可直接在田间使用。为西番莲的有效防治提供了极其有力的保障^[55]。

表1 LAMP在果树病毒检测中的应用
Tab.1 Application of LAMP in fruit tree virus detection

靶标及特异性引物(5'-3')	反应体系(25 μ L)	反应条件
1. 苹果(<i>Malus pumila</i> Mill.) 1.1 苹果褪绿叶斑病毒(<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> , ACLSV) 靶标:ACLSV CP 基因 F3:AAGTCAATGGAGGATCAGAA B3:GGTAGTAAAGAGATTAGTGAAGAAC FIP:GTTTCGGATCCGAAGAGGTAGTCTCTACAA-TTTGAAGGGGT BIP:TCAGCAGCATGACTTTCCGCATATTTCACT-TTAACCAACCCG	1. RNA (40 ng/ μ L) 1.4 μ L; 2. F3 和 B3 (0.2 μ M) 各 0.5 μ L; 3. FIP 和 BIP (1.6 μ M) 各 4 μ L; 4. MgSO ₄ (8 mM) 0.2 μ L; 5. betaine (0.8 mM) 4 μ L; 6. dNTPs (10 mM) 3.5 μ L; 7. Bst DNA polymerase (0.32 U/ μ L) 1 μ L; 8. M-MLV reverse transcriptase (4 U/L) 0.5 μ L; 9. RNasin Inhibitor (0.8 U/L) 0.5 μ L; 10. 10x Bst DNA polymerase buffer 2.5 μ L; 11. DEPC-treated 水定容至 25 μ L	64 $^{\circ}$ C 水浴加热 75 min
1.2 苹果茎沟病毒(<i>Apple stem grooving virus</i> , ASGV) 靶标:ASGV CP 基因 F3:GCTTTGTGAGCCATTTGC B3:TTTTGCTCATCCTATCAATCAC FIP:CGAAAGCTTTGGGCCATTTCTTTTCATGAAA-GGTGGTCAAGA BIP:CCGTGGGTGGCATTTGACTTTTCATCAGGTG-TTAGACGATT	1. FIP 和 BIP 各 1.6 μ M; 2. F3 和 B3 各 0.4 μ M; 3. MgSO ₄ 5 mM; 4. betaine 1.0 mM; 5. dNTP mix 1.0 mM; 6. 1 $\times$ ThermoPol buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 2 mM MgSO ₄ , 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% Triton X-100); 7. RNasin 4 U; 8. Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, Promega, USA) 10 U; 9. Bst DNA polymerase 10 U; 10. cDNA 1 μ L	60 $^{\circ}$ C 反应 60 min; 80 $^{\circ}$ C 反应 5 min
2. 番木瓜(<i>Carica papaya</i> Linn.) 2.1 番木瓜环斑病毒(<i>Papaya ringspot virus</i> , PRSV) 靶标:PRSV P3 基因 F3:GTTGAAAAACCTACGCCG B3:GACCTCGTGACACAGTAC FIB:GCAAAGTACCTTAAGTGCAACTTTCTCTCTTG-CAGGAAGACTG BIP:TCAAATCACAACCATCTTTTCCGGGTGAGAA-GTCGTACACAAT	1. F3 和 B3 各 0.2 μ M; 2. FIP 和 BIP 各 1.6 μ M; 3. dNTP 混合物 1.4 mM; 4. betaine 0.8 mM; 5. MgSO ₄ 6 mM; 6. 10x ThermoPol II (Mg-free) Reaction Buffer [20mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% Triton X-100] 2.5 μ L; 7. Bst DNA polymerase 8 U 8. AMV reverse transcriptase XL 5 U; 9. cDNA 0.5 μ L 10. nuclease-free dH ₂ O 定容至 25 μ L	65 $^{\circ}$ C 水浴加热 60 min, 然后在 80 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min
2.2 番木瓜变形花叶病毒 (<i>Papaya leaf-distortion mosaic virus</i> , PLDMV) 靶标:PLDMV CP 基因 F3:GCCATATATGCCGAGGTACG B3:CGCTCCGTGTCTCTACTC FIP:CCGAGATGGCGTCTTGATGTCTATTCAACGG-AACCTCACCG BIP:CGGGAAGCCCCACATCCAGATGCGACTTTTCCA-TCCAGTCCA	1. F3 和 B3 各 0.2 μ M; 2. FIP 和 BIP 各 1.6 μ M; 3. dNTP 混合物 1.4 mM; 4. betaine 0.8 M; 5. MgSO ₄ 6 mM; 6. 10 $\times$ ThermoPol II (Mg-free) reaction buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% Triton X-100) 2.5 μ L; 7. Bst DNA polymerase 8 U; 8. M-MLV reverse transcriptase 5 U; 9. cDNA 0.5 μ L; 10. DNase/RNase-free dH ₂ O 定容至 25 μ L	65 $^{\circ}$ C 水浴加热 60 min, 80 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min

续表 1

靶标及特异性引物(5'-3')	反应体系(25 μL)	反应条件
3. 樱桃(<i>Cerasus</i> spp.) 樱桃小果病毒 1(<i>Little cherry virus 1</i>, LChV-1) 靶标:LChV-1 <i>ORF1b</i> 基因 F3:CGAGTTACCTTGCTTGGA B3:TAGACGAACTGCTAACAGG FIP:TCCTTATAGGTAAAGGTGAACGCTTTTGATCT-GCTTTTAACCCGA BIP:GCAGACCAGATACTTGGAACAAGTTTATAG-CTCAATGAAGATCTTTCC LF:AGGTATCTTACAATTAACGGCCTGA LB:ATCTAAACGTAACTTTGCTGCACC	1. FIP 和 BIP 各 0.8 μM; 2. F3 和 B3 各 0.1 μM; 3. LF 和 LB 各 0.3 μM; 4. Cdna 0.8 μL; 5. Isothermal Mastermix ISO-004 15.8 μL; 6. 10x diluted target template 3 μL; 7. nuclease-free Milli-Q water 3 μL	45 ℃加热 3 min;67 ℃ 加热 40 min,最后以 0.05 ℃/s 的变温速度 使温度从 98 ℃降低到 70 ℃
4. 葡萄(<i>Vitis vinifera</i> L.) 葡萄扇叶病毒(<i>Grapevine fanleaf virus</i>, GFLV) 靶标:GFLV <i>CP</i> 基因 F3:ACTGGATTGACATGGGTG B3:CTAACTCTTTGTGTGCCCCGT FIB:GATAAGCCAATGTGGGACTGATTTTATGCTTA-TAACCGATAACT BIP:ACGTTTCATGTGAGATAGATTTTATGCAACCT-TGGAGATTCAAAT LF:ATACAGGATCCGCACTAGCAGT LB:TGTGTGTCATGCTATGTGGTT	1. pH = 8.8 Tris-HCl 20 mM; 2. KCl 10 mM; 3. (NH₄)₂SO₄ 10 mM; 4. Triton X-100 0.1% ; 5. Betaine 2 mM; 6. MgSO₄ 1 mM; 7. dNTP 10 mM; 8. F3 和 B3 各 0.2 μM; 9. FIP 和 BIP 各 0.8 μM; 10. LF 和 LB 各 0.6 μM; 11. Bst DNA polymerase 8 U; 12. cDNA 2 μL; 13. nuclease-free ddH₂O 定容至 25 μL	60 ℃水浴 30 min
5. 西番莲(<i>Passiflora caerulea</i> L.) 夜来香花叶病毒(<i>Telosma mosaic virus</i>, TeMV) 靶标:TeMV <i>CP</i> 基因 F3:AAAAAGGATGAATTTAAGGAGCT B3:GATAAGGATGCCCGATGGATTG FIP:ATTCTCCACAACCTTCTG BIP:CTTGTGTTACTCCAAAAGG	1. 10X Isothermal Amplification Buffer 2.5 μL; 2. MgSO₄ (100 mM) 1.5 μL; 3. dNTP Mix (10 mM) 3.5 μL; 4. FIP/BIP Primers(10 μM) 4 μL; 5. F3/B3 Primers (10 μM) 0.5 μL; 6. Bst 2.0 Warmstart DNA Polymerase (8000 U/mL) 1 μL; 7. cDNA 1 μL; 8. 加 ddH₂O 至 25 μL	65 ℃反应 60 min

3 总结与展望

自 2000 年 LAMP 技术被首次报道以来,已被广泛应用于动物、植物和人类样本的病原体检测的多个方面^[56]。与其他技术相比,LAMP 具有一些显著的优势,使其在诊断方面具有竞争力。首先,LAMP 检测速度快、灵敏度高、特异性强^[57]。LAMP 反应在等温条件下很容易进行,一般在 45 ~ 60 min 内即可完成大量样品的检测,若增加一对环引物,检测时间可缩短到 30 ~ 60 min,其反应灵敏度可达到 PCR 的 10 ~ 100 倍^[38];其次,LAMP 检测

方法操作简单、无需昂贵的设备、可使用范围广^[58]。LAMP 反应不需要昂贵的仪器,只要简单的水浴或加热即可^[8]。结果不需要放大处理,根据反应过程产生沉淀物的浊度,或利用钙黄绿素(Calcein)、羟基萘酚蓝(Hydroxy naphthol blue, HNB)、SYBR Green I 等进行荧光检测,即可肉眼对结果进行直接观察^[59,60]。这使得 LAMP 检测可在实验室、室外现场检测,甚至是世界上资源有限的地区都能使用^[46]。

LAMP 检测技术已成为目前病害诊断的主要方法之一,但在广泛使用的同时也应注意其不足:

(1) LAMP检测时每个标靶都需要4~6个长度不等的引物,引物较多增加了正确设计难度的同时,使其相互之间作用的机会也更多,影响检测的准确性^[29]; (2) LAMP检测方法特异性强,使其无法用于研究已知信息较少的新基因或结构未知的目标基因^[41]; (3) 不能用于扩增大于30 bp的序列,目的基因片段通常较短,反应产物是一系列大小不一的DNA片段,不能作为其他检测的材料^[33],如PCR; (4) LAMP检测技术灵敏度高,样品制备、扩增和扩增后处理(如需要)必须在单独的空间进行,否则其极易被污染^[57]; (5) 指示剂(钙黄绿素、HNB等)或其他反应组分(锰离子或反应辅助因子)浓度过高可能会抑制聚合酶反应,使产物分解或改变指示剂颜色,从而影响检测结果^[12]。

虽然LAMP技术目前仍存在一些缺陷,但其已成为目前诊断病害的重要方法之一,在农业、医学等领域得到了广泛的应用,同时LAMP技术也在不断的完善。许多新试剂的开发,如:Bst 2.0和Bst 2.0 WarmStart DNA聚合酶(New England Biolabs, Ipswich, MA)、GspSSD和Tin DNA聚合酶和等温混合物(OptiGene Ltd, West Sussex, United Kingdom)等^[61]极大地提高了检测的热稳定性和扩增效率; LAMP-LFD(LAMP与横向流动试纸条(lateral flow

dipstick, LFD)结合,使结果可用肉眼直接观察)、IC-LAMP(免疫捕获与LAMP结合,省去了制备病原体DNA或RNA的步骤)等技术的开发^[62],即保持了检测的有效性、灵敏度和特异性,同时减少了反应所需时间、更好的避免污染、对操作人员也更加安全^[63]; LAMP技术与带有特定光学标记特征的条形码结合,并对用于条码扫描的光学传感器进行计算机集成,或使用在与目标序列结合后可改变电或磁特性的纳米材料,实现了快速读取检测结果及检测结果的数字化管理^[64]。此外,为了使该技术可以应对大规模的筛查和对抗病毒病的大流行。研究人员提出了一种基于新型冠状病毒肺炎诊断的LAMP试纸条化检测方法,可供任何居家隔离或就诊困难的人群使用^[65]。再结合“improva”系统——集成了控制整个系统的中央单元、分离和纯化样品核酸的预处理单元、核酸序列检测和扩增的LAMP组件为一体,即可连接智能手机等电子设备,实现对检测结果和疾病发展情况的实时了解^[66]。虽然目前想要实现在日常生活的环境中进行恒温检测还较为困难,但随着越来越多的研究人员和实验室的加入,LAMP技术的完善性将不断提高,在未来得到更广泛的应用。

(责任编辑:胡吉凤)

参 考 文 献:

- [1] 刘凤之,王海波,胡成志. 我国主要果树产业现状及“四五”发展对策[J]. 中国果树,2021,1:1-5.
- [2] Wang H, Turechek W W. A loop-mediated isothermal amplification assay and sample preparation procedure for sensitive detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry[J]. PLoS One, 2016, 11(1):1-21.
- [3] Tomlinson J A, Ostojic-Starzewska S, Webb K, et al. A loop-mediated isothermal amplification-based method for confirmation of *Guignardia citricarpa* in citrus black spot lesions[J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 136(2):217-224.
- [4] Singh J, Cobb-Smith D, Higgins E, et al. Comparative evaluation of lateral flow immunoassays, LAMP, and quantitative PCR for diagnosis of fire blight in apple orchards[J]. Journal of Plant Pathology, 2021, 103(Suppl 1):S131-S142.
- [5] 罗丽婷,蒋君梅,李向阳,等. CRISPR技术在改良植物抗病性中的应用[J]. 山地农业生物学报, 2021, 40(4):46-57.
- [6] Zhang X, Harrington T C, Batzer J C. Detection of *Colletotrichum acutatum* Ssensu lato on strawberry by loop-mediated isothermal amplification[J]. Plant Disease, 2016, 100(9):1804-1812.
- [7] 郑家瑞,李云洲. 植物诱导抗性研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2022, 41(2):51-58.
- [8] 方远鹏,李云洲,岳宁波,等. 植物RNA干扰抗病毒机制研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2020, 39(5):50-56.
- [9] Kong G H, Li T L, Huang W X, et al. Detection of *Peronophythora litchii* on lychee by loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Crop Protection, 2021, 139:1-6.
- [10] Roumani F, Gómez S, Rodrigues C, et al. Development and evaluation of a real-time fluorescence, and naked-eye colorimetric, loop-mediated isothermal amplification-based method for the rapid detection of spoilage fungi in fruit preparations[J]. Food Control, 2022, 135:1-9.

- [11] Frisch L M, Mann M A, Marek D N, et al. Development and optimization of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the species-specific detection of *Penicillium expansum*[J]. Food Microbiology, 2021, 95:1-9.
- [12] Leonardo S, Toldrà A, Campàs M. Biosensors based on isothermal DNA amplification for bacterial detection in food safety and environmental Monitoring[J]. Sensors, 2021, 21(2):1-24.
- [13] Ahuja A, Somvanshi V S. Diagnosis of plant-parasitic nematodes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a review[J]. Crop Protection, 2021, 147:1-10.
- [14] Panno S, Mati S, Tiberini A, et al. Loop mediated isothermal amplification: principles and applications in plant virology[J]. Plants, 2020, 9(4):1-28.
- [15] Biswas G, Sakai M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection and identification of aquaculture pathogens: current state and perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(7):2881-2895.
- [16] Akram A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of various organisms: a review[J]. Bangladesh Journal of Medical Microbiology, 2017, 11(2):20-27.
- [17] Da Silva S J R, Pardee K, Pena L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of Zika virus: a review[J]. Viruses, 2020, 12(1):1-20.
- [18] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR? [J]. Cells, 2021, 10(8):1-20.
- [19] Yang Q R, Domesle K J, Ge B L. Loop-mediated isothermal amplification for *salmonella* detection in food and feed: current applications and future directions[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(6):309-331.
- [20] Huang T Z, Li L Z, Liu X, et al. Loop-mediated isothermal amplification technique: principle, development and wide application in food safety[J]. Analytical Methods, 2020, 12(46):5551-5561.
- [21] Gong P, Zhang T T, Chen F X, et al. Advances in loop-mediated isothermal amplification: integrated with several point-of-care diagnostic methods[J]. Analytical Methods, 2014, 6(19):7585-7589.
- [22] Le D T, Vu N T. Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases[J]. Applied Biological Chemistry, 2017, 60(2):169-180.
- [23] Zhou Y, Fan F, Wang L, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Venturia carpophila* on peach[J]. Pest Management Science, 2021, 77(3):1383-1391.
- [24] 王亚南, 胡同乐, 刘淑香, 等. 我国苹果病毒病的研究现状[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(15):7933-7936.
- [25] 张双纳, 李正男, 范旭东, 等. 苹果褪绿叶斑病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2018, 51(9):1706-1716.
- [26] 郭立新, 向本春, 朱水芳, 等. 苹果茎沟病毒研究进展[J]. 果树学报, 2008, 25(5):714-720.
- [27] Shin D S, Heo G-II, Son S H, et al. Development of an improved loop-mediated isothermal amplification assay for on-site diagnosis of fire blight in apple and pear[J]. Plant Pathology Journal, 2018, 34(3):191-198.
- [28] Wan J J, Guo J P, Lu Z X, et al. Development of a test kit for visual loop-mediated isothermal amplification of *Salmonella* in spiked ready-to-eat fruits and vegetables[J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 169:1-10.
- [29] Bühlmann A, Pothier J F, Rezzonico F, et al. *Erwinia amylovora* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 92(3):332-339.
- [30] Zhao L, Feng C H, Li B Q, et al. Rapid detection of apple stem grooving virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Plant Pathology, 2014, 96(2):407-409.
- [31] Peng D D, Xie J P, Qiang W, et al. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *apple chlorotic leaf spot virus*[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 248:154-158.
- [32] Kim N Y, Oh J, Lee S H, et al. Rapid and specific detection of apple stem grooving virus by reverse transcription-recombinase polymerase amplification[J]. Plant Pathology Journal, 2018, 34(6):575-579.
- [33] 郑逸蓝, 林映好, 张倩玮, 等. 番木瓜加工副产物综合利用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(13):5162-5169.

- [34] Hamim I, Borth W, Melzer M J, et al. Ultra-sensitive detection of *papaya ringspot virus* using single-tube nested PCR[J]. Acta Virologica, 2018, 62: 379-385.
- [35] 黄显德, 王玉, 闫志勇, 等. 番木瓜环斑病毒西瓜株系弱毒突变体的筛选与应用[J]. 植物保护学报, 2019, 46(4): 738-744.
- [36] Shen W T, Tuo D C, Yan P, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *papaya ringspot virus*[J]. Journal of Virological Methods, 2014, 204: 93-100.
- [37] 夏玥琳, 吕金慧, 李泽栋, 等. 番木瓜病毒病的研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(11): 3690-3694.
- [38] Shen W T, Tuo D C, Yan P, et al. Detection of *papaya leaf distortion mosaic virus* by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Virological Methods, 2014, 195: 174-179.
- [39] 赵玲玲, 宋来庆, 张硕, 等. 甜樱桃病毒病发生及防治技术[J]. 烟台果树, 2020, 3: 39-40.
- [40] 刘馨娜, 贾丽娜, 苑宁, 等. 樱桃的研究进展[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(4): 17-19.
- [41] Wang D Y, Li Z L, Yang W K, et al. Optimization and application of loop-mediated isothermal amplification detection method on *little cherry virus 1*[J]. Research Square, 2021: 1-7.
- [42] Tahzima R, Foucart Y, Peusens G, et al. New sensitive and fast detection of *little cherry virus 1* using loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. Journal of Virological Methods, 2019, 265: 91-98.
- [43] Tahzima R, Foucart Y, Peusens G, et al. An advanced one-step RT-LAMP for rapid detection of *little cherry virus 2* combined with high-throughput sequence-based phylogenomics reveal divergent flowering cherry isolates[J]. Plant Disease, 2022, 106(3): 835-845.
- [44] Zong X J, Wang W W, Wei H R, et al. Rapid detection of *prunus necrotic ringspot virus* using magnetic nanoparticle-assisted reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Virological Methods, 2014, 208: 85-89.
- [45] 王建辉, 刘建军, 陈克玲, 等. 葡萄病毒研究进展[J]. 北方园艺, 2017(9): 179-183.
- [46] 任芳, 董雅凤, 张尊平, 等. 葡萄病毒研究最新进展[J]. 园艺学报, 2014, 41(9): 1777-1792.
- [47] Van Regenmortel M H V. Purification of south african isolates of *grapevine fanleaf virus* by zone electrophoresis[J]. Phytopathology, 1965, 46: 60-69.
- [48] Almasi M. Establishment and application of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *grapevine fanleaf virus*[J]. Molecular biology, 2015, 4(5): 1-10.
- [49] Zhang J X, Borth W, Lin B R, et al. Multiplex detection of three banana viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. Tropical Plant Pathology, 2018, 43(6): 543-551.
- [50] Yepes L M, Cieniewicz E, Krenz B, et al. Causative role of *grapevine red blotch virus* in red blotch disease[J]. Phytopathology, 2018, 108(7): 902-909.
- [51] 王泳植, 刘宇, 窦润秋, 等. 三种侵染百香果的马铃薯 Y 病毒属病毒外壳蛋白的对比及其序列分析[J]. 植物病理学报, 2022: 1-11.
- [52] 蔡昭艳, 董龙, 王小媚, 等. 西番莲新品种桂百一号的选育[J]. 果树学报, 2022, 39(6): 1133-1136.
- [53] 王叶, 滕尧, 张建利, 等. 西番莲在山地环境的果实发育及品质表现[J]. 农业与技术, 2021, 41(24): 114-118.
- [54] Fu X D, Jiang J M, Luo L T, et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and visual detection of *telosma mosaic virus* (TeMV) in passion fruit[J]. Crop Protection, 2021, 150(6): 1-11.
- [55] Chen S S, Yu N N, Yang S H, et al. Identification of *telosma mosaic virus* infection in *passiflora edulis* and its impact on phytochemical contents[J]. Virology Journal, 2018, 15(1): 1-8.
- [56] 袁启凤, 陈楠, 史斌斌, 等. 贵州不同产区百香果紫香 1 号果实品质分析与评价[J]. 西南农业学报, 2021, 34(12): 2729-2736.
- [57] Nair S, Manimekalai R, Ganga Raj P, et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of coconut root wilt disease and arecanut yellow leaf disease phytoplasma[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(7): 1-7.
- [58] Panek J, Frac M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) approach for detection of heat-resistant *talaromyces flavus* species[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-8.

- [59] Aglietti C, Luchi N, Pepori A L, et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification; an early-warning tool for quarantine plant pathogen detection[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 1-14.
- [60] Niessen L, Luo J, Denschlag C, et al. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants[J]. Food Microbiology, 2013, 36(2): 191-206.
- [61] Zhang X, Lowe S B, Gooding J J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 61: 491-499.
- [62] Kumar Y, Bansal S, Jaiswal P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid and sensitive tool for quality assessment of meat products[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017, 16(6): 1359-1378.
- [63] Yuan H, Chao Y, Shum H C. Droplet and microchamber-based digital loop-mediated isothermal amplification (dLAMP)[J]. Small, 2020, 16(9): 1-12.
- [64] Deng M H, Zhong L Y, Kamolnetr O, et al. Detection of helminths by loop-mediated isothermal amplification assay; a review of updated technology and future outlook[J]. Infectious Diseases of Poverty, 2019, 8(1): 1-22.
- [65] Augustine R, Hasan A, Das S, et al. Loop-mediated isothermal amplification (Lamp): a rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic[J]. Biology, 2020, 9(8): 1-17.
- [66] Thompson D, Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection[J]. Sensors and Actuators Reports, 2020, 2(1): 1-10.

Application of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) in Virus Disease Detection of Fruit Trees

Luo Liting¹, Jiang Junmei², Li Xiangyang², Xie Xin^{1*}

(1. Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: Early diagnosis is an effective way to control plant disease and prevent further spread of disease. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) has become one of the key methods for disease diagnosis with the advantages of rapid detection, high sensitivity, strong specificity, and easy operation. This paper reviewed the application of LAMP detection technology in fruits (apple, papaya, cherry, grape, and passion fruit) virus disease detection, and summarized the current development of LAMP technology as well as its development in the future, which will promote the application of LAMP in plant virus disease detection.

Keywords: LAMP technology; virus disease; rapid detection