

# 基于烟草蚜传病毒病的黄瓜花叶病(CMV)和马铃薯Y病毒病(PVY) LAMP检测体系研究

匡传富<sup>1</sup>, 孙现超<sup>2</sup>, 陈德鑫<sup>3</sup>

<sup>1</sup>湖南省烟草公司郴州市公司, 湖南 郴州

<sup>2</sup>西南大学, 重庆

<sup>3</sup>中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛

Email: kcf601@163.com

收稿日期: 2020年11月7日; 录用日期: 2020年11月20日; 发布日期: 2020年11月27日

## 摘要

本文对基于烟草蚜传病毒病的黄瓜花叶病(CMV)和马铃薯Y病毒病(PVY), 在优化LAMP体系、LAMP反应的最佳体系、LAMP产物的检测、LAMP灵敏性检测、田间样品的检测等几个方面进行了研究。结果表明: LAMP体系Mg<sup>2+</sup>的最佳浓度为6 mM, dNTPs的最佳浓度为1.2 mM; LAMP的最佳反应条件为反应温度63℃、反应时间为40 min; CMV和PVY的阳性LAMP产物显示为绿色, 阴性LAMP产物显示为橘黄色; 检测方法的灵敏度在DNA水平上可达到10~3 ng/μL; 田间采集样品随机检测表明, 建立的LAMP检测体系准确可靠。

## 关键词

烟草, 蚜传病毒病, 黄瓜花叶病(CMV), 马铃薯Y病毒病(PVY), LAMP检测体系

# Studies on LAMP Detection System of Cucumber Mosaic Virus (CMV) and Potato Virus Y (PVY) Transmitted by Tobacco Aphids Virus

Chuanfu Kuang<sup>1</sup>, Xianchao Sun<sup>2</sup>, Dexin Chen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Hunan Tobacco Company, Chenzhou Company, Chenzhou Hunan

<sup>2</sup>Southwest University, Chongqing

<sup>3</sup>Tobacco Research Institute, China Academy of Agricultural Sciences, Qingdao Shandong

Email: kcf601@163.com

文章引用: 匡传富, 孙现超, 陈德鑫. 基于烟草蚜传病毒病的黄瓜花叶病(CMV)和马铃薯Y病毒病(PVY) LAMP检测体系研究[J]. 农业科学, 2020, 10(11): 947-958. DOI: 10.12677/hjas.2020.1011144

## Abstract

Based on cucumber mosaic virus (CMV) and potato virus (PVY) transmitted by tobacco aphid, the optimization of LAMP system, the optimum system of LAMP reaction, the detection of LAMP products, the sensitivity of LAMP and the detection of field samples were studied. The results showed that the optimum concentration of  $Mg^{2+}$  in LAMP system was 6 mM; the optimum concentration of dNTPs was 1.2 mM; the optimum reaction condition of LAMP system was 63°C; the reaction time was 40 min; the positive products of CMV and PVY were green; the negative products of LAMP were orange; the sensitivity of LAMP assay was 10 - 3 ng/L at DNA level. The results of random sampling in field showed that the LAMP assay was accurate and reliable.

## Keywords

Tobacco, Aphid-Transmitted Virus Disease, Cucumber Mosaic Disease (CMV), Potato Virus Y Disease (PVY), LAMP Detection System

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

目前针对于烟草蚜传病毒的检测方法主要有生物学检测、血清学检测、以 PCR 为基础的分子检测技术,包括普通 PCR、实时荧光定量 PCR、巢式 PCR 等。传统的生物学方法耗时长,血清学检测方法特异性差,容易受到外界因素的影响。而 PCR 的原理是建立在模板变性延伸的基础上,因而需要特殊的试验设备,难以得到普遍推广。LAMP 作为一种新的核酸扩增方法,不需要模板的预变性,具有速度快、时间短、操作简单等优点[1] [2]。LAMP 主要是针对于目的基因的 6 个区域而设计 2 条内引物和 2 条外引物,利用链置换的原理在 60°C~65°C 扩增 30~60 min,就可以获得大量的核酸产物。LAMP 技术主要用于检测香蕉条斑病毒(Banana streak virus, BSV)、水稻黑条矮缩病毒(Rise black-streaked dwarf virus, RBSDV)、草莓潜隐环斑病毒(Strawberry latent rings pot virus, SLRSV)、马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV)、李属坏死环斑病毒(Prunus necrotic ringspot virus, PNRSV)、菜豆荚斑驳病毒(Bean pod mottle virus, BPMV)、甘薯褪绿矮化病毒(Sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV)、柑橘衰退病毒(Citrus tristeza virus, CTV)、番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)等[3]。本试验以 SYBR Green I 为指示剂,建立 CMV 和 PVY 的等温环介导可视化快速检测体系,探讨快速检测 CMV 和 PVY 的 LAMP 检测体系可行性。

## 2. 材料与方

### 2.1. 试验样品

具有典型病毒病症状的田间样品采自湖南郴州桂阳试验基地,经 RT-PCR 验证的 CMV 的阳性样品来源于本试验室。黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)、马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY)质粒由试验室保存。

## 2.2. 试剂与仪器

### 2.2.1. 试验试剂

10× Bst DNA buffer	NEB
dNTPs	Takara
MgSO <sub>4</sub>	Sigma
琼脂糖	Amerisco
SYBR Green I	北京鼎国
Bst DNA 聚合酶	NEB

### 2.2.2. 试验仪器

高速常温台式离心机 5415D	Eppendorf
水平电泳仪 DYY-6C	北京六一
紫外分光光度计 UV-2201	Bio-RAD
高速冷冻台式离心机 5417R	Eppendorf
水浴锅	

## 2.3. 试验方法

### 2.3.1. 植物总 RNA 的提取

用新鲜叶样来提取 RNA，提取 RNA 的方法参照 RNA 试剂盒，用 Invitrogen Trizol 法来提取 RNA。

- 1) 在 1.5 mL 离心管中加入 RLT (500 μL)和 PLANTaid (50 μL)，把它们混合备用。
- 2) 预冷研钵，分别称取感病叶片和健康叶片 0.1~0.2 g 放入预冷的研钵中，液氮研磨样品至细粉。
- 3) 将研磨好的细粉转入离心管中，立即剧烈震荡 20 s，56℃水浴 3 min。
- 4) 涡旋或者用枪头抽打无解物 30 s，室温，13,000 rpm 离心 10 min。
- 5) 将上清液转到新管，加入 0.5 体积的无水乙醇(一般为 250 μL~225 μL)。
- 6) 将上一步混合的液体加入吸附柱，13, 000 rpm 离心 2 min，弃去废液。
- 7) 在离心管中加入 700 μL 的去蛋白液 RW1，室温放置 30 s 后，13,000 rpm 离心 30 s，弃去废液。
- 8) 在离心管中加入 500 μL 漂洗液 RW，12,000 rpm 离心 30 s，弃去废液。
- 9) 重复操作上一步，打开管盖，让漂洗液充分挥发，以免影响后续的试验。
- 10) 将吸附柱放入收集管中，13,000 rpm 离心 2 min，弃去废液。
- 11) 找一新管，将吸附柱放入，加入 30~50 μL RNase free water，室温放置 1 min。
- 12) 12,000 rpm 离心 1 min，弃去吸附柱，收集样品。
- 13) 样品收集后，取 3 μL 进行电泳，检测 RNA。

### 2.3.2. 反转录 cDNA 的合成

反转录 cDNA 的合成见表 1。

**Table 1.** Synthesis and dosage of reverse transcription cDNA**表 1.** 反转录 cDNA 的合成组分及用量

组分	用量
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	4.0 μL
5× Prime Script Buffer	2.0 μL
Oligo dT Primer	0.5 μL
Random primers	0.5 μL
Prime Script RT Enzyme Mix	0.5 μL
RNA 提取物	2.5 μL

反应程序为: 37°C 15 min, 85°C 20 s。

### 2.3.3. LAMP 引物的合成

LAMP 引物合成见表 2。

**Table 2.** LAMP primer sequence**表 2.** LAMP 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
CMV 引物	CMV-F3 TCTACCGTGTGGGTGACA
	CMV-B3 GAGCACGGCGTACTTTCG
	CMV-FIP CCGTCCGCGAACATAGCAGAG-GTCCGTAAGTTCCTGCCTC
	CMV-BIP GCTGCATCTGGAGTCCAAGCC-TGTCGCCAATATCAGCGC
PVY 引物	PVY-F3 CGCGCTATGCCTTTGACTT
	PVY-B3 TTGGAGAGACATCCTCGGT
	PVY-FIP CAATGCTGCGGCCTTCATTTGA-GGTCACATCACGAACACCAG
	PVY-BIP TCAGCCCAACCTCGACTTTTCG-GCCTCTCTGTGTTCTCCTCT

注: 表中退火温度为 62°C。

### 2.4. LAMP 体系的建立与优化

25 μL 的反应体系, 1.0 μL DNA, 1× ThermoPol buffer, 1.6 μM FIP, 1.6 μM BIP, 0.2 μM F3, 0.2 μM B3, 8U (Bst) DNA polymerase, MgSO<sub>4</sub> (2、4、6、8、10 mM), dNTPs (0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mM), 反应时间(30 min、40 min、50 min、60 min、70 min), 反应温度(60°C、61°C、62°C、63°C、64°C、65°C)。

### 2.5. LAMP 产物的检测

LAMP 产物的检测方法分别利用沉淀反应、显色反应、凝胶琼脂糖电泳进行。沉淀反应: LAMP 反应完成后, 进行快速离心, 观察 PCR 管底是否有白色沉淀。显色反应: LAMP 反应完成后, 加入 1 μL 的 SYBR Green I, 阴性结果应为橘黄色, 阳性结果应为绿色。凝胶琼脂糖电泳: 取 5 μL 的 LAMP 产物于 2% 凝胶琼脂糖电泳, 紫外灯下观察结果, 观察是否有梯状条带的产生。

### 2.6. LAMP 灵敏性检测

分别以 CMV CP 质粒和 PVY CP 为模板, 以 10 倍的梯度稀释质粒, 依次稀释 1~10<sup>8</sup> 倍, 以此为模板, 分别进行 PCR 和 LAMP 反应。

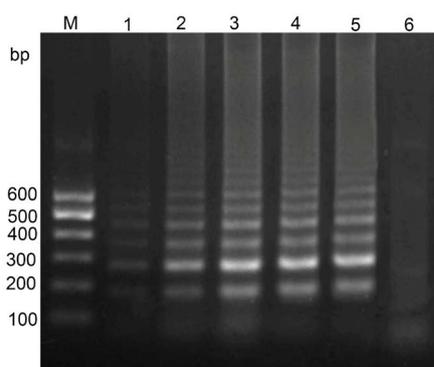
## 2.7. 田间样品的检测

利用建立起来的 LAMP 体系对田间样品进行检测。

## 3. 结果与分析

### 3.1. LAMP 体系的优化

CMV LAMP 体系的优化。CMV  $Mg^{2+}$ : 对于 CMV  $Mg^{2+}$  的浓度, 设置 5 个不同的梯度, 终浓度分别为 2 mM、4 mM、6 mM、8 mM、10 mM, 反应中的其他条件不变, 以健康的叶片作为阴性对照来进行 LAMP 反应。LAMP 反应完成之后, 进行 2% 的凝胶琼脂糖电泳, 120 V 电泳 30 min。  $Mg^{2+}$  的浓度从 2 mM 到 10 mM 逐渐增加, 反应条带也越来越清晰, 当  $Mg^{2+}$  的浓度达到 6 mM 时, 亮度最亮, 且再增加浓度, 条带的亮度没有很明显的变化, 因此确定 CMV LAMP  $Mg^{2+}$  的最佳浓度为 6 mM (图 1)。

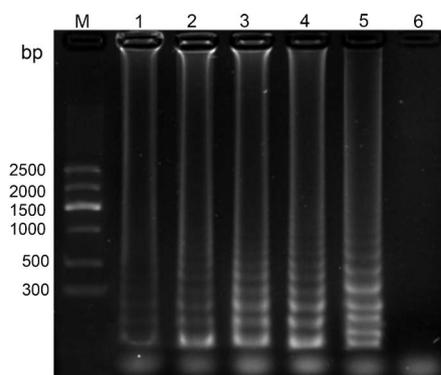


注: M: marker I; 1: 2 mM; 2: 4 mM; 3: 6 mM; 4: 8 mM; 5: 10 mM; 6: 阴性对照。

**Figure 1.** Influence of  $Mg^{2+}$  concentration on CMV LAMP reaction

**图 1.**  $Mg^{2+}$  浓度对于 CMV LAMP 反应的影响

CMV dNTPs: 对于 CMV dNTPs 的浓度, 设置 5 个不同的梯度, 终浓度分别为 0.4 mM、0.8 mM、1.2 mM、1.6 mM、2.0 mM, 反应中的其他条件不变, 以健康的叶片作为阴性对照来进行 LAMP 反应。LAMP 反应完成之后, 进行 2% 的凝胶琼脂糖电泳, 120 V 电泳 30 min。dNTPs 的浓度从 0.4 mM 到 2.0 mM 逐渐增加, 反应条带也越来越清晰, 当 dNTPs 的浓度达到 1.2 mM 时, 亮度最亮, 且再增加浓度, 条带的亮度没有很明显的变化, 因此确定 CMV LAMP dNTPs 的最佳浓度为 1.2 mM (图 2)。

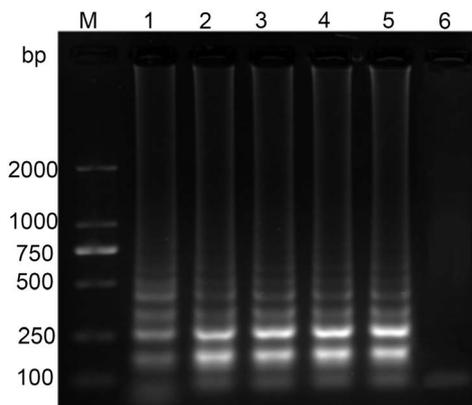


注: M: marker V; 1: 0.4 mM; 2: 0.8 mM; 3: 1.2 mM; 4: 1.6 mM; 5: 2.0 mM; 6: 阴性对照。

**Figure 2.** The effect of dNTPs concentration on the CMV LAMP reaction

**图 2.** dNTPs 浓度对于 CMV LAMP 反应的影响

**CMV 反应时间:** 为了确定 CMV LAMP 反应的最佳反应时间, 对于 LAMP 的反应时间设置 5 个不同的梯度, 分别为 30 min、40 min、50 min、60 min、70 min。从图中可以看出, 在所设置的 5 个时间梯度中, LAMP 都可以正常的进行, 在反应时间为 30 min 的时候就可以产生反应条带, 但是条带比较淡, 40min 的时候条带的亮度明显增强, 随着反应时间的延长, 条带亮度基本上没有变化, 因此确定 CMV LAMP 的最佳反应时间为 40 min (图 3)。

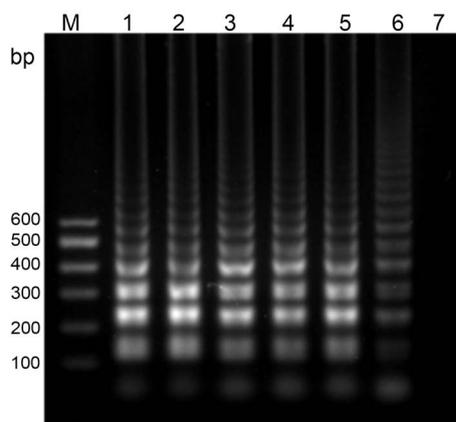


注: M: DL2000; 1: 30 min; 2: 40 min; 3: 50 min; 4: 60 min; 5: 70 min; 6: 阴性对照。

**Figure 3.** Effect of reaction time on CMV LAMP

**图 3.** 反应时间对于 CMV LAMP 的影响

**CMV 反应温度:** 为了确定 CMV LAMP 反应的最佳反应温度, 对于 LAMP 的反应温度设置 6 个不同的梯度, 分别为 60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃。反应中的其他条件不变, 以健康的叶片作为阴性对照来进行 LAMP 反应。LAMP 反应完成之后, 进行 2% 的凝胶琼脂糖电泳, 120 V 电泳 30 min。从图中可以看出, 当温度为 60℃ 时, LAMP 出现微弱的反应条带, 当温度为 61℃ 时, LAMP 条带亮度陡然增强, 温度继续增加, 条带亮度不变, 因此确定 CMV LAMP 的最佳反应温度为 61℃ (图 4)。



注: M: marker I; 1: 65℃; 2: 64℃; 3: 63℃; 4: 62℃; 5: 61℃; 6: 60℃; 7: 阴性对照。

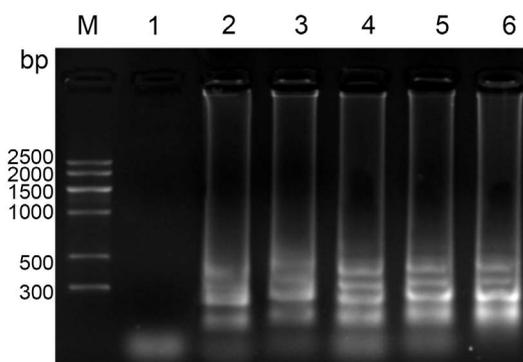
**Figure 4.** Effect of reaction temperature on CMV LAMP

**图 4.** 反应温度对于 CMV LAMP 的影响

### 3.2. PVY LAMP 体系的优化

**PVY Mg<sup>2+</sup>:** 对于 PVY Mg<sup>2+</sup> 的浓度, 设置 5 个不同的梯度, 终浓度分别为 2 mM、4 mM、6 mM、8 mM、

10 mM, 反应中的其他条件不变, 以健康的叶片作为阴性对照来进行 LAMP 反应。LAMP 反应完成之后, 进行 2% 的凝胶琼脂糖电泳, 120 V 电泳 30 min。Mg<sup>2+</sup> 的浓度从 2 mM 到 10 mM 逐渐增加, 反应条带也越来越清晰, 当 Mg<sup>2+</sup> 的浓度达到 6 mM 时, 亮度最亮, 且再增加浓度, 条带的亮度没有很明显的变化, 因此确定 PVY LAMP Mg<sup>2+</sup> 的最佳浓度为 6 mM (图 5)。

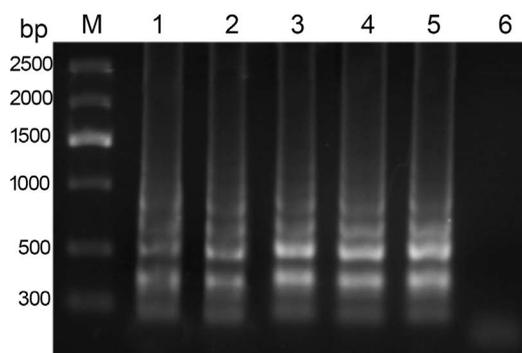


注: M: marker V; 1: 阴性对照; 2: 2 mM; 3: 4 mM; 4: 6 mM; 5: 8 mM; 6: 10 mM。

**Figure 5.** Influence of Mg<sup>2+</sup> concentration on PVY LAMP reaction

**图 5.** Mg<sup>2+</sup> 浓度对于 PVY LAMP 反应的影响

**PVY dNTPs:** 对于 PVY dNTPs 的浓度, 设置 5 个不同的梯度, 终浓度分别为 0.4 mM、0.8 mM、1.2 mM、1.6 mM、2.0 mM, 反应中的其他条件不变, 以健康的叶片作为阴性对照来进行 LAMP 反应。LAMP 反应完成之后, 进行 2% 的凝胶琼脂糖电泳, 120 V 电泳 30 min。dNTPs 的浓度从 0.4 mM 到 2.0 mM 逐渐增加, 反应条带也越来越清晰, 当 dNTPs 的浓度达到 1.2 mM 时, 亮度最亮, 且再增加浓度, 条带的亮度没有很明显的变化, 因此确定 PVY LAMP dNTPs 的最佳浓度为 1.2 mM (图 6)。

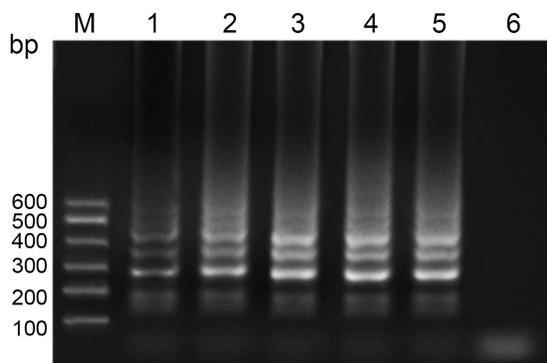


注: M: marker V; 1: 0.4 mM; 2: 0.8 mM; 3: 1.2 mM; 4: 1.6 mM; 5: 2.0 mM; 6: 阴性对照。

**Figure 6.** The effect of dNTPs concentration on PVY LAMP reaction

**图 6.** dNTPs 浓度对于 PVY LAMP 反应的影响

**PVY 反应时间:** 为了确定 PVY LAMP 反应的最佳反应时间, 对于 LAMP 的反应时间设置 5 个不同的梯度, 分别为 30 min、40 min、50 min、60 min、70 min。反应中的其他条件不变, 以健康的叶片作为阴性对照来进行 LAMP 反应。LAMP 反应完成之后, 进行 2% 的凝胶琼脂糖电泳, 120 V 电泳 30 min。从图中可以看出, 在所设置的 5 个时间梯度中, LAMP 都可以正常的进行, 在反应时间为 30 min 的时候可以产生反应条带, 但是条带比较淡, 40 min 的时候条带的亮度明显增强, 随着反应时间的延长, 条带亮度基本上没有变化, 因此确定 PVY LAMP 的最佳反应时间为 40 min (图 7)。

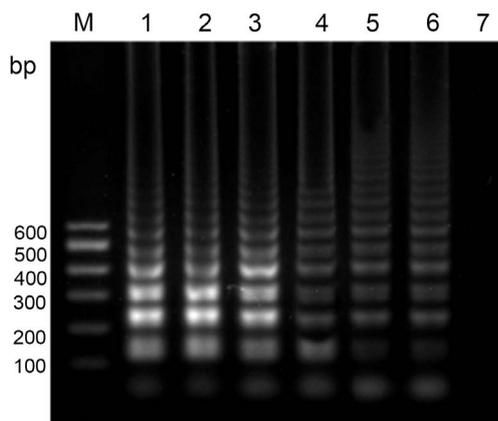


注: M: marker I; 1: 30 min; 2: 40 min; 3: 50 min; 4: 60 min; 5: 70 min; 6: 阴性对照。

**Figure 7.** Effect of reaction time on PVY LAMP

**图 7.** 反应时间对于 PVY LAMP 的影响

**PVY 反应温度:** 为了确定 PVY LAMP 反应的最佳反应温度, 对于 LAMP 的反应温度设置 6 个不同的梯度, 分别为 60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃。反应中的其他条件不变, 以健康的叶片作为阴性对照来进行 LAMP 反应。LAMP 反应完成之后, 进行 2% 的凝胶琼脂糖电泳, 120 V 电泳 30 min。从图中可以看出, 当温度在 60℃~62℃时, LAMP 出现微弱的反应条带, 当温度为 63℃时, LAMP 条带亮度陡然增强, 温度继续增加, 条带亮度不变, 因此确定 PVY LAMP 的最佳反应温度为 63℃ (图 8)。



注: M: marker I; 1: 65℃; 2: 64℃; 3: 63℃; 4: 62℃; 5: 61℃; 6: 60℃; 7: 阴性对照。

**Figure 8.** Effect of reaction temperature on PVY LAMP

**图 8.** 反应温度对于 PVY LAMP 的影响

### 3.3. LAMP 反应的最佳体系

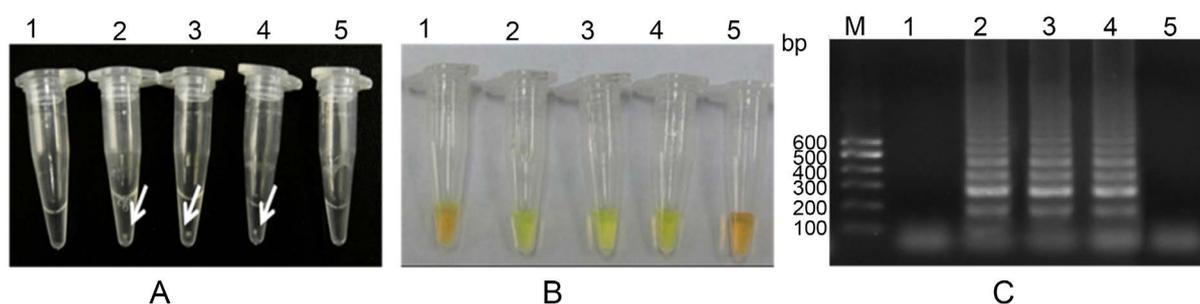
在体系中无论是否添加甜菜碱, 都能产生梯状条带, 所以, 本试验最终确定在 LAMP 反应体系中, 不添加甜菜碱。为了综合考虑 CMV 和 PVY 的反应体系以及反应条件, 最终确定了 LAMP 的最佳反应体系(表 3), 最佳反应条件为 63℃反应 40 min, 80℃终止 2 min。

### 3.4. LAMP 产物的检测

LAMP 反应完成后, 进行快速离心, 发现阳性反应管底有白色沉淀的产生, 在加入 1 μL 的 SYBR Green I 后显示为绿色, 凝胶琼脂糖电泳结果显示有梯状条带的产生。而阴性反应管和阴性对照没有白色沉淀, 染色结果为橘黄色, 也无梯状条带的产生(图 9)。

**Table 3.** The optimum reaction system of 3-LAMP reaction**表 3.** LAMP 反应的最佳反应体系

成分	体积	终浓度
FIP/BIP (10 $\mu$ M)	4 $\mu$ L	1.6 $\mu$ M
F3/B3 (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
MgSO <sub>4</sub> (100 mM)	1.5 $\mu$ L	6 mM
dNTPs (10 mM)	3 $\mu$ L	1.2 mM
10 $\times$ ThermoPol buffer	2.5 $\mu$ L	1 $\times$
(Bst) DNA polymerase (8 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	8 U
DNA	1 $\mu$ L	



(A) 沉淀观察; (B) LAMP 产物的染色结果; (C) LAMP 产物的电泳结果; M: marker I; 1: LAMP 阴性结果; 2~4: LAMP 阳性结果; 5: 阴性对照。

**Figure 9.** Detection of LAMP products**图 9.** LAMP 产物的检测

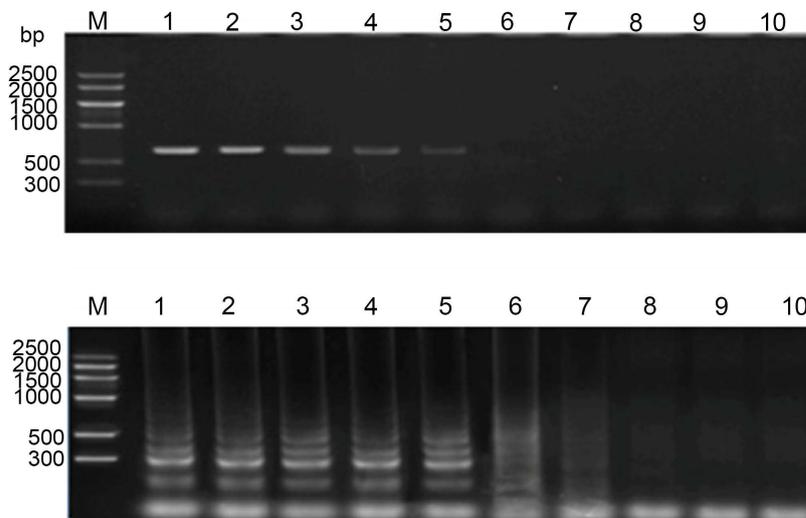
### 3.5. LAMP 灵敏性检测分析

#### 3.5.1. CMV LAMP 体系的灵敏性分析

CMV 的菌液提取质粒, 测得质粒的浓度为  $1.987 \times 10^3$  ng/ $\mu$ L, 以 10 倍的梯度稀释质粒, 依次稀释  $10^1 \sim 10^8$  倍, 以此为模板, 分别进行 PCR 反应和 LAMP 反应。电泳的结果显示(图 10), PCR 检测的最高限度为  $1.987 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L, 继续稀释, 没有反应条带的产生, 此时, 质粒的稀释倍数达到  $10^4$ , 在  $10^1 \sim 10^4$  稀释过程中, 反应条带的亮度会随着稀释倍数的增加而减弱。而 LAMP 检测的最高限度是在质粒浓度稀释到  $1.987 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L 时, 继续稀释, 没有产生反应条带。此时, 质粒的稀释倍数为  $10^6$ 。在  $10^1 \sim 10^6$  稀释过程中, 反应条带的亮度会随着稀释倍数的增加而减弱, 到了  $10^5$  和  $10^6$ , 反应条带已经很模糊, 但是还是可以隐约看到有条带。综上所述, CMV LAMP 的灵敏度高于常规的 PCR, 大概为 100 倍。

#### 3.5.2. PVY LAMP 体系的灵敏性分析

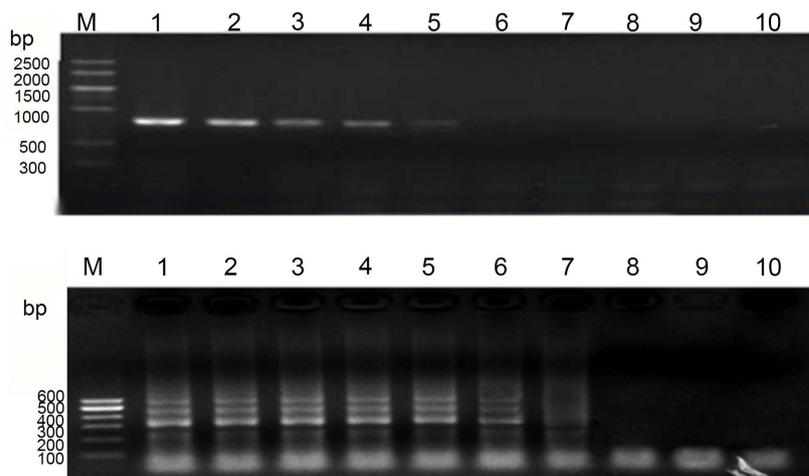
PVY 的菌液提取质粒, 测得质粒的浓度为  $2.045 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L, 以 10 倍的梯度稀释质粒, 依次稀释  $10^1 \sim 10^8$  倍, 以此为模板, 分别进行 PCR 反应和 LAMP 反应。电泳的结果显示(图 11), PCR 检测的最高限度为  $2.045 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L, 继续稀释, 没有反应条带的产生, 此时, 质粒的稀释倍数达到  $10^4$ , 在  $10^1 \sim 10^4$  稀释过程中, 反应条带的亮度会随着稀释倍数的增加而减弱。而 LAMP 检测的最高限度是在质粒浓度稀释到  $2.045 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L 时, 继续稀释, 没有产生反应条带。此时, 质粒的稀释倍数为  $10^6$ 。在  $10^1 \sim 10^6$  稀释过程中, 反应条带的亮度会随着稀释倍数的增加而减弱, 到了  $10^5$  和  $10^6$ , 反应条带已经很模糊, 但是还是可以隐约看到有条带。综上所述, PVY LAMP 的灵敏度高于常规的 PCR, 大概为 100 倍。



注: M: marker V; 1:  $1.987 \times 10^3$  ng/ $\mu$ L; 2:  $1.987 \times 10^2$  ng/ $\mu$ L; 3:  $1.987 \times 10$  ng/ $\mu$ L; 4: 1.987 ng/ $\mu$ L; 5:  $1.987 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L; 6:  $1.987 \times 10^{-2}$  ng/ $\mu$ L; 7:  $1.987 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L; 8:  $1.987 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L; 9:  $1.987 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L; 10: 阴性对照。

**Figure 10.** Comparison of PCR and LAMP CMV sensitivities

**图 10.** CMV PCR 和 CMV LAMP 灵敏度的比较测定



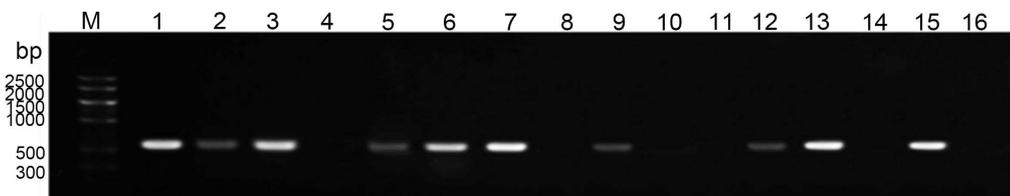
注: M: marker V; 1:  $2.045 \times 10^3$  ng/ $\mu$ L; 2:  $2.045 \times 10^2$  ng/ $\mu$ L; 3:  $2.045 \times 10$  ng/ $\mu$ L; 4: 2.045 ng/ $\mu$ L; 5:  $2.045 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L; 6:  $2.045 \times 10^{-2}$  ng/ $\mu$ L; 7:  $2.045 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L; 8:  $2.045 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L; 9:  $2.045 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L; 10: 阴性对照 control。

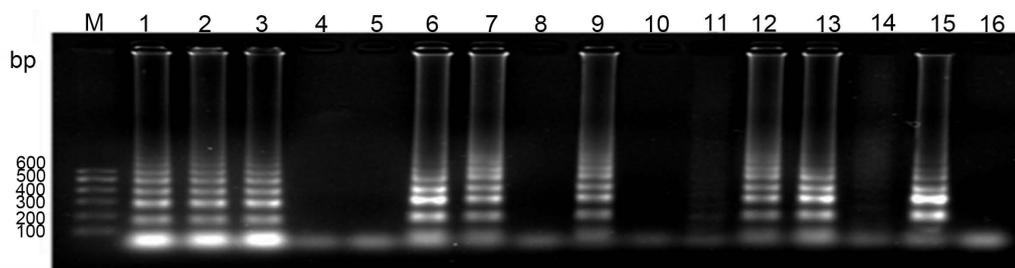
**Figure 11.** Comparison of PVY PCR and PVY LAMP sensitivity

**图 11.** PVY PCR 和 PVY LAMP 灵敏度的比较测定

### 3.6. 田间样品的检测分析

在郴州各地采集的 14 份田间样品的 CMV 检测中, PCR 检测到 9 份阳性样品, LAMP 检测到 10 份阳性样品, 两种检测方法的结果基本一致(图 12)。



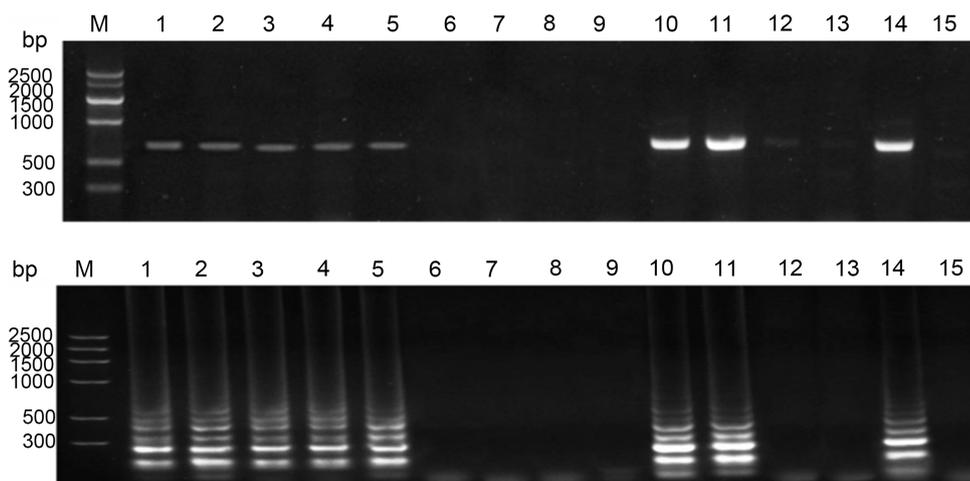


M: marker V; marker I; 1-14: 田间样品 A1~A14; 15: 阳性对照; 16: 阴性对照。

**Figure 12.** PCR and LAMP results of CMV from a field sample

**图 12.** 田间样品 CMV 的 PCR 和 LAMP 结果

在郴州烟区采集的 13 份田间样品的 PVY 检测中, PCR 检测到 7 份阳性样品, LAMP 检测到 7 份阳性样品, 两种检测方法的结果一致(图 13)。



M: marker V; 1~13: 田间样品 B1~B14; 14: 阳性对照; 15: 阴性对照。

**Figure 13.** PCR and LAMP results of PVY field samples

**图 13.** 田间样品 PVY 的 PCR 和 LAMP 结果

#### 4. 讨论与结论

1) 田间样品 CMV 的检测中, A5 号样品 PCR 为阳性, 而 LAMP 为阴性, 具体原因有待进一步分析。样品 A11 和样品 A14 的 PCR 显示为阴性, LAMP 却有微弱的条带产生, 推测原因是 LAMP 的灵敏度高于 PCR, 所以可以检测到微量的病毒。样品 A2、A5、A9、A12 的 PCR 条带很暗, 但相对应的 LAMP 却是清晰可见, 同样可以说明 LAMP 的灵敏度比普通的 PCR 高。在田间样品 PVY 的检测中, 样品 B1、B2、B3、B4、B5 的 PCR 条带微暗, 但 LAMP 的条带很清晰。PCR 和 LAMP 两种检测方法的结果一致。

2) 作为一种新的核酸扩增手段, LAMP 也有自身的缺陷。引物设计原理比较复杂, 如果引物设计不成功, 往往导致高频率假阳性的扩增。LAMP 的 4 条引物只有和目的基因完全匹配的情况下, 扩增才能顺利进行, 因此在很大程度上, 扩增的特异性会很高, 但是若目的基因发生突变, 则 LAMP 扩增无法进行。

#### 基金项目

湖南省烟草公司重点科研项目(项目编号: 14-16ZDAa02)。

### 参考文献

- [1] 刘亚东, 冷雪, 时坤, 等. 环介导等温扩增技术检测方法的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2018(5): 76-81.
- [2] 杨粤, 付博宇, 张蕴哲, 等. 环介导等温扩增检测技术的应用与方法改进[J]. 食品安全质量检测学报, 2016(4): 174-178.
- [3] 黄海龙, 朱鹏, 杨浩. LAMP-LFD 技术及其在生物快检方面应用[J]. 中国生物工程杂志, 2015(12): 95-101.