

李矮缩病毒重组酶聚合酶扩增—侧流层析试纸条检测方法的建立

陈玲, 闫国华, 张晓明, 周宇, 王晶, 段续伟, 李彦林, 张开春*

(北京市林业果树科学研究院, 农业农村部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京市落叶果树工程技术研究中心, 北京 100093)

摘要: 根据李矮缩病毒 (prune dwarf virus, PDV) 外壳蛋白基因序列的保守区设计特异性引物和探针, 建立了 PDV 的重组酶聚合酶扩增—侧流层析试纸条 (recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick, RPA-LFD) 检测方法。该方法在恒温 39 °C 下反应 20 min, 具有标记的扩增子可达到检测水平。扩增子检测室 (amplicon detection chamber) 中的侧流层析试纸条在 20 min 内呈现可视化检测结果。该方法与侵染樱桃的另外 6 种病毒 (CGRMV、PNRSV、LchV-1、PBNSPaV、CVA 和 CNRMV) 无交叉反应。灵敏度试验表明, 用 RPA-LFD 方法检测 PDV 的灵敏度是 PCR 方法的 10 倍。用该方法检测 13 个田间样品, 其检测结果与 PCR 检测结果一致。RPA-LFD 法具有操作简单、快速、灵敏度高、特异性强等特点, 适合对 PDV 样品的快速检测与鉴定。

关键词: 李矮缩病毒; 樱桃; 重组酶聚合酶扩增—侧流层析试纸条; 检测

中图分类号: S 662.5; S 432.4^{†1} **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2021) 01-0183-10

Establishment of Recombinase Polymerase Amplification Combined with Lateral Flow Dipstick for Detection of Prune Dwarf Virus

CHEN Ling, YAN Guohua, ZHANG Xiaoming, ZHOU Yu, WANG Jing, DUAN Xuwei, LI Yanlin, and ZHANG Kaichun*

(Beijing Academy of Forestry and Pomology Sciences; Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Beijing Engineering Research Center for Deciduous Fruit Trees, Beijing 100093, China)

Abstract: Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick (RPA-LFD) method was developed to detect prune dwarf virus (PDV) in cherry, using the specific primers and probe based on the conserved coat protein gene sequences of PDV. The RPA method could be conducted under isothermal conditions optimized to be 39 °C for 20 min, and the terminally labeled amplicon can reach the detection level. The detection results could be visually inspected with lateral flow dipstick located in amplicon detection chamber within 20 min. The established method was specific and no cross-reactivity was detected with other six cherry-infecting viruses (CGRMV, PNRSV, LchV-1, PBNSPaV, CVA and CNRMV). The sensitivity test showed that the RPA was about 10-fold sensitive than that of PCR. This

收稿日期: 2020-05-15; 修回日期: 2020-08-12

基金项目: 北京市博士后工作经费资助项目 (2017ZZ090) 北京市农林科学院协同创新专项 (KJ CX201907-2, KJ CX201910)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: kaichunzhang@126.com)

method was verified effectively by testing 13 field-collected samples, and the results were consistent with those detected by PCR method. The RPA-LFD detection technique developed in this study is a simple, rapid, sensitive and specific method, which could be applicable for rapid and accurate detection and identification of PDV.

Keywords: prune dwarf virus; cherry; recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick (RPA-LFD); detection

李矮缩病毒 (prune dwarf virus, PDV) 是雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*) 等轴不稳定环斑病毒属 (*Ilarvirus*) 成员, 是危害核果类果树最主要的病毒之一, 在世界各地广泛分布, 导致果实产量和品质下降, 造成重大经济损失 (Fulton, 1959; Pallas et al., 2012)。该病毒基因组由 3 条正单链 RNA 组成, 5'端有帽子结构, 3'端结构复杂, 3 条 RNA 链分别被包裹在 3 个独立的病毒粒体中, 总长约 8 kb (Bujarski et al., 2019)。其中, RNA1 编码复制酶 (replicase), RNA2 编码依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase), RNA3 编码移动蛋白 (movement protein) 和外壳蛋白 (coat protein), 移动蛋白由 RNA3 直接产生, 而外壳蛋白由 RNA3 表达的亚基因组 RNA4 产生 (Kozieł et al., 2017)。

PDV 可侵染桃、李、甜樱桃、酸樱桃和扁桃等核果类果树, 但主要危害甜樱桃和酸樱桃 (Fulton, 1959; Pallas et al., 2012)。由于气候条件、病毒株系、寄主种类及其品种等不同, PDV 的危害症状差异较大。PDV 常引起樱桃黄花叶病、樱桃褪绿环斑病。感染 PDV 的樱桃植株有时呈潜隐感染不表现症状, 有时表现为矮化、树体发育不良, 有时表现为叶片畸形、褪绿环斑、坏死斑和黄化及花叶等症状 (Pallas et al., 2012)。PDV 侵染酸樱桃可造成 50% 减产, 可导致苗圃植株萌芽率下降 40% ~ 50%, 幼树长势减弱 (Nemeth et al., 1986; Çağlayan et al., 2011)。巴里地中海农业研究所在 1992 ~ 2007 年间与其他单位协作完成南欧、东欧、中东和北非共 14 个国家不同果树种质的带毒率调查, 用 ELISA 法检测了约 24 000 株核果类果树, PDV 侵染率为 9.6%, 其中樱桃达 35.4% (Myrta et al., 2003; Bouani et al., 2004; Gümüs et al., 2007; Matić et al., 2008; Rouag et al., 2008)。PDV 于 1996 年在中国首次被报道 (Zhou et al., 1996), 在南方地区危害桃、李、杏和油桃等核果类果树 (阙勇, 2008), 是甜樱桃主产区发生较普遍的樱桃病毒之一。北京、环渤海湾地区、河南、山东和新疆等樱桃产区均有 PDV 发生, 在疑似病毒病症状的甜樱桃样品中, PDV 侵染率达 60% (卢美光 等, 2015; 刘聪利 等, 2016; 周登攀, 2017; 曹欣然, 2019)。PDV 可通过无性繁殖材料、花粉和种子传播 (Mink, 1993), 因此, 采用无病毒繁殖材料是防控 PDV 最重要的措施, 而这依赖于快速高效的 PDV 检测方法。

目前针对 PDV 的检测方法有 ELISA、斑点杂交、RT-PCR、多重 RT-PCR、巢氏 RT-PCR 以及实时荧光定量 PCR (Mekuria et al., 2003; Jarošová & Kundu, 2009; Peiró et al., 2012; Beaver-Kanuya & Harper, 2019)。因等轴不稳定环斑病毒属病毒的免疫原性较弱 (Pallas et al., 2012), 故不易制备高质量抗体, 外加果树中病毒含量偏低, 且具有时空变化的特点, 使得 ELISA 检测灵敏度偏低。斑点杂交操作步骤繁琐、费时。RT-PCR、多重 RT-PCR、巢氏 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 需要配备较昂贵的检测设备, 且相对费时。

重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是依赖重组酶、单链 DNA 结合蛋白和链置换 DNA 聚合酶的一种快速灵敏的核酸恒温扩增技术, 与利用胶体金免疫层析原理检测的侧流层析试纸条 (lateral flow dipstick, LFD) 结合应用, 实现可视化检测。其原理为: 利用上

游引物和带有生物素标记的下游引物分别与重组酶结合形成蛋白—DNA 复合物, 寻找并结合模板中的同源双链 DNA, 随之发生链置换反应, DNA 聚合酶启动 DNA 合成, 对目标片段进行指数式扩增; 同时 5'端具有荧光标记的探针靶向上下游引物扩增的产物, 探针内部具有核苷酸类似物 (tetrahydrofuran, THF), THF 被大肠杆菌核酸内切酶 IV (nfo) 识别并切割, 形成新的聚合酶延伸底物, 最终获得 5'端具有探针 5'端的荧光标记, 3'端具有下游引物 5'端的生物素标记的扩增产物。待检测样品通过毛细管作用在包被有抗荧光标记的金颗粒试纸条上扩散, 待扩散至试纸条测试区时, 金颗粒被生物素配体捕获, 大量聚集, 呈现红色条带, 当待测样品扩散至对照区时, 抗荧光标记的金颗粒被相应抗体捕获, 呈现红色条带 (Li et al., 2019)。

本研究中根据 PDV 外壳蛋白基因序列的保守区设计了 PDV RPA 检测引物和探针, 建立了检测 PDV 的 RPA-LFD 方法, 为 PDV 的快速检测及防控提供了技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料采集、总 RNA 提取与 cDNA 合成

2019 年 11 月在北京市通州区樱桃基地随机采集 3 个甜樱桃品种 ‘Canada Giant’、‘Kordia’ 和 ‘京樱 1 号’ 共 13 株 1 年生嫁接苗休眠枝条; 采集甜樱桃 ‘彩虹’ 休眠枝条。2020 年 1 月在北京林业果树科学研究院樱桃资源圃采集甜樱桃 ‘龙冠’ 和 ‘优系 1’ 休眠枝条。无病毒苗为本课题组培育的甜樱桃砧木 ‘京春’ 系。

从各个休眠枝条上分别取 3 个休眠芽, 剥去最外层的褐色鳞片, 置于含有直径 5 mm 钢珠的 1.5 mL 离心管中, 用研磨仪研磨。使用博迈德生物 (Biomed) EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒, 获得去除基因组的总 RNA, 进行反转录或者 -80 °C 冰箱保存备用。反转录用 20 μ L 反应体系。将 4 μ L 总 RNA、0.5 μ L 随机引物 Random Primer (6 单体/mer)、0.5 μ L Oligo (dT)₁₈、9 μ L 无 RNA 酶的水加入 200 μ L 无 RNA 酶的反应管中, 70 °C 反应 10 min, 冰上放置至少 5 min; 之后加入 4 μ L 5 \times 反转录 buffer、1 μ L dNTPs (10 mmol \cdot L⁻¹)、0.5 μ L RNA 酶抑制剂 (Recombinant RNase Inhibitor, 40 U \cdot μ L⁻¹)、0.5 μ L M-MLV 反转录酶 (200 U \cdot μ L⁻¹) 至总体积 20 μ L。30 °C 10 min, 42 °C 1 h, 70 °C 15 min 后于冰上冷却, 获得的 cDNA 置于 -20 °C 保存。Random Primer (6 单体/mer)、Oligo (dT)₁₈、dNTPs、RNA 酶抑制剂、M-MLV 反转录酶购自 TaKaRa。

1.2 引物设计

用 DNAMAN 比对 NCBI 上已报道的 30 个来源于不同地区和不同寄主植物的 PDV 外壳蛋白基因全序列。在外壳蛋白基因序列的保守区用 Primer Premier 6 设计引物。本研究中 RPA 引物和探针设计的注意事项参照 <http://www.agdia.com> 网站 Amplify Discovery Kits 分析设计指南中的引物设计部分。本研究所用的全部引物序列见表 1, 引物由生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.3 常规 RT-PCR 检测

常规 PCR 反应使用 10 μ L 反应体系, 包括 1 μ L cDNA 模板、5.0 μ L 2 \times Es Taq MasterMix (含染料, 购自康为世纪)、0.5 μ L 正向引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹)、0.5 μ L 反向引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹)、3.0 μ L ddH₂O。35 个循环。反应结束后取 8 μ L PCR 产物用含有 GoldView 染料 (Biotopped) 的 1.5% ~ 2.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 之后用 Gel K 8160 凝胶成像仪拍照。

表 1 所用引物和探针序列
Table 1 The sequences of primers and probe used

引物来源 Primer source	参考基因组 Reference genome	产物/bp Product	引物位置/nt Location	引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
本实验室设计 Design by our Lab	NC_008038	130	1 526 ~ 1 558	RPA-PDV-F	CGTTACTGCCTTGATGTTTCTAATGGTGTCTAC
			1 680 ~ 1 651	RPA-PDV-R	Biotin-CCAACGGTCATACCAGTAGGAGCAAGA ATT
			1 551 ~ 1 597	RPA-PDV- Probe	FAM-GTGTCTACGGACTCATTAAAGGTTTCGA TGTG(THF)AATGCGCCTGTGGCG -PO ₄
宗晓娟 等, 2012	NC_008038	304	1 341 ~ 1 360	PDV-F	CGAAGTCTATTTCCGAGTGG
Bajet et al., 2008	Y10237.1	300	1 644 ~ 1 625	PDV-R	CCACTGGCTTGTTTCGCTGT
			7 090 ~ 7 109	LChV-1-F	GGTTGTCCTCGGTTGATTAC
侯义龙 等, 2005	NC_004364	455	7 389 ~ 7 370	LChV-1-R	GGCTTGGTTCCATACATCTC
			1 185 ~ 1 209	PNRSV-F	ACGCGCAAAAGTGTCGAAATCTAAA
Villamor & Eastwell, 2013	KY178277	685	1 639 ~ 1 615	PNRSV-R	TGGTCCCCTCAGAGCTCAACAAAAG
			7 468 ~ 7 486	CGRMV-F	CTAAGTCTCCAACCCCTCA
Villamor & Eastwell, 2013	KR820549	658	8 152 ~ 8 133	NGRRM-TL	ATNGGTTGAATTTGGCCAGT
			7 559 ~ 7 579	CNRMV-F	CTTCAAGAARGAGYGATATTG
陈玲 等, 2020	EF546442	804	8 216 ~ 8 197	NGRRM-TL	ATNGGTTGAATTTGGCCAGT
			2 828 ~ 2 847	PBNSPaV-F	GAGACTCGCGATGGACAGAG
	KT285841	567	3 631 ~ 3 612	PBNSPaV-R	GGCAATTTCCACAACAGCGT
			6 170 ~ 6 190	CVA-F	AGCCAGAAGGTATCATGCCAG
	XM_0219496 34	361	6 718 ~ 6 736	CVA-R	ATGACATGCCTGCTGGGAG
958 ~ 977			Internal Control-F	TGCGGTCAAAGCTTCTCAGT	
			1 318 ~ 1 299	Internal Control-R	AACATTTGCGACGACGACCC

注: CGRMV 与 CNRMV 的反向检测引物序列相同, 位于各自基因组的不同位置。

Note: The reverse primer sequences of CGRMV and CNRMV are the same, and located in different regions of their respective genomes.

1.4 RPA 反应条件

使用 AmplifyRP Acceler8-Discovery Rapid DNA/RNA Amplification Test Kit (Product No. ACS 98800/0048, agdia, USA) 进行 RPA 扩增反应。反应体系中依次加入 5.9 μL Rehydration Buffer、0.42 μL RPA-PDV-F (10 μmol · L⁻¹)、0.42 μL RPA-PDV-R (10 μmol · L⁻¹)、0.12 μL RPA-PDV-Probe (10 μmol · L⁻¹)、1 μL cDNA 模板、1.64 μL ddH₂O, 共计 9.5 μL。将以上混合物加入到 RPA 反应管中, 反应管中含有经真空冷冻干燥处理的固体反应物, 用移液器吸打混匀, 使冻干状态的固体反应物复水, 然后在反应管盖上滴加 0.5 μL 280 mmol · L⁻¹ MgAc, 离心, 当 MgAc 接触反应混合物时, 反应开始。设定 RPA 反应温度为 39 °C, 时间为 20 min。

1.5 LFD 检测 RPA 反应产物

反应结束后, 将未开盖的反应管放置到反应装置中, 关闭反应装置, 使反应管固定。按 AmplifyRP Acceler8-Discovery Rapid DNA/RNA Amplification Test Kit 说明书将反应装置装到扩增子检测室 (Item No. ADC 98800/0001, agdia, USA) 壳体中, 反应管朝向检测壳体中的试纸条, 向下推检测壳体手柄, 直至啪一声关上。检测室放置 20 min, 一般阳性结果在 10 min 内就能看到, 20 min 能使低量扩增子的样品产生阳性测试线。结果判定: 当对照线 (Control line) 显示清晰时, 表明试纸条结果

可信, 如观察到测试线 (Test line) 则为阳性, 未观察到测试线则为阴性, 未见对照线则检测结果无效。

1.6 RPA-LFD 检测特异性分析

选择感染樱桃绿环斑驳病毒 (cherry green ring mottle virus, CGRMV)、李属坏死环斑病毒 (prunus necrotic ringspot virus, PNRSV)、樱桃小果病毒-1 (little cherry virus-1, LChV-1)、PDV、李树皮坏死茎痘伴随病毒 (plum bark necrosis stem pitting-associated virus, PBNSPaV) 和樱桃病毒 A (cherry virus A, CVA), 共 6 种病毒的甜樱桃 ‘龙冠’ 休眠芽, 感染 CGRMV、PNRSV、LChV-1、PBNSPaV 以及 CVA, 共 5 种病毒的甜樱桃 ‘彩虹’ 休眠芽, 感染樱桃坏死锈状斑驳病毒 (cherry necrotic rusty mottle virus, CNRMV) 和 PNRSV 的甜樱桃 ‘优系 1’ 的休眠芽进行 RPA-LFD 检测, 阴性对照为无病毒甜樱桃砧木 ‘京春’ 系幼苗叶片。以上各个病毒均经 RT-PCR 检测, 检测引物如表 1 所示。

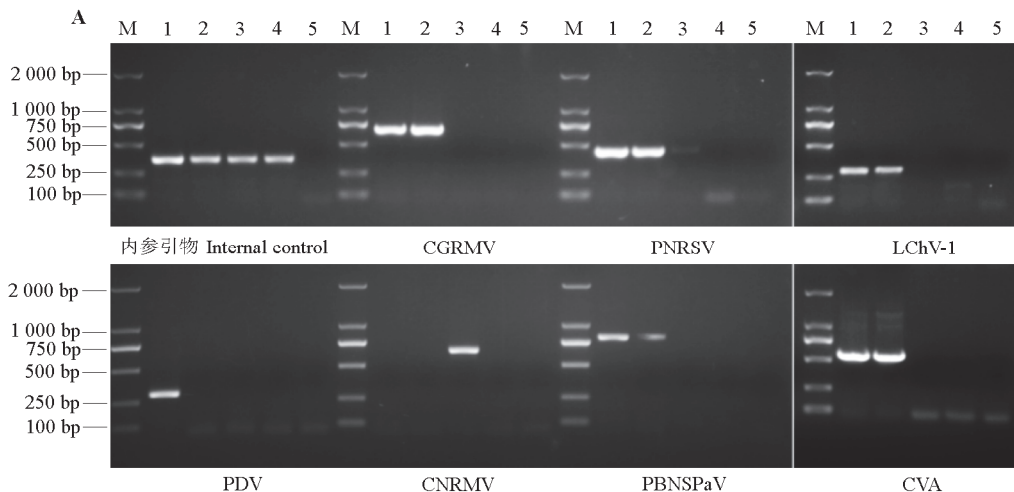
1.7 RPA-LFD 检测灵敏性分析

提取 PDV 检测阳性的甜樱桃 ‘龙冠’ 休眠芽的总 RNA, 将 1.7 μg 总 RNA 反转录获得 cDNA, 以 10 倍梯度稀释 ($10^{-1} \sim 10^{-8}$) 的 cDNA 为模板分别进行 RPA 和 PCR 扩增, 比较 RPA 和 RT-PCR 的检测灵敏性。

2 结果与分析

2.1 RPA-LFD 检测特异性分析

以 ‘龙冠’、‘彩虹’ 和 ‘优系 1’ 甜樱桃的休眠芽为待检材料, 以无病毒甜樱桃砧木 ‘京春’ 系幼苗叶片为阴性对照, ddH₂O 为空白对照, 进行 RT-PCR 检测。首先用内参引物 (表 1, Internal Control) 扩增樱桃 RNA 聚合酶 II, 电泳结果显示获得较亮的目的条带 (图 1, A, Internal Control), 表明待检样品 cDNA 质量合格。然后用 CGRMV、PNRSV、LChV-1、PDV、CNRMV、PBNSPaV 和 CVA 等 7 种病毒检测引物分别进行 PCR 检测, 结果表明 ‘龙冠’ 携带 CGRMV、PNRSV、LChV-1、PDV、PBNSPaV 和 CVA, ‘彩虹’ 携带 CGRMV、PNRSV、LChV-1、PBNSPaV 和 CVA, ‘优系 1’ 携带 CNRMV 和 PNRSV (图 1, A)。



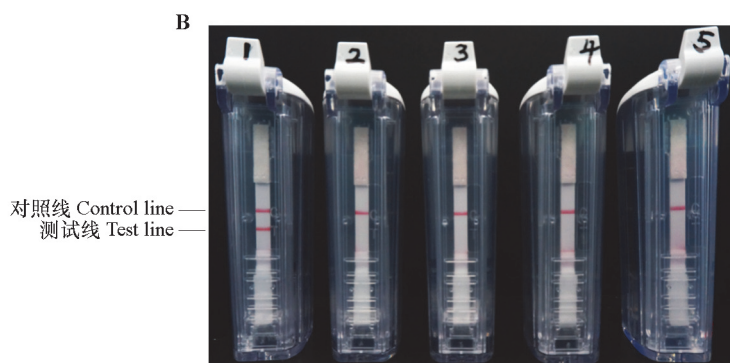


图 1 RPA-LFD 检测 PDV 的特异性分析

A: RT-PCR; B: RPA-LFD. 1: ‘龙冠’; 2: ‘彩虹’; 3: 优系 1; 4: 无病毒甜樱桃砧木幼苗 (‘京春’); 5: ddH₂O.

Fig. 1 Specificity analysis of RPA assays for CVA detection

A: RT-PCR; B: RPA-LFD. 1: ‘Longguan’; 2: ‘Caihong’; 3: Youxi-1; 4: Virus-free sweet cherry scion seedling (‘Jingchun’); 5: ddH₂O.

用上述材料进行 RPA 反应, LFD 检测结果显示, 仅 ‘龙冠’ 样品呈现出明显的测试线, 不含 PDV 的 ‘彩虹’、‘优系 1’、阴性对照以及空白对照样品中均未见测试线 (图 1, B), 表明建立的 RPA-LFD 方法能特异地检测 PDV, 与侵染樱桃的其他 6 种病毒无交叉反应。

2.2 RPA-LFD 检测灵敏性分析

以 PDV 检测阳性的甜樱桃 ‘龙冠’ 休眠芽总 RNA 为模板, 反转录获得 cDNA, 以 10 倍梯度稀释的 cDNA 为模板进行 RPA 和 PCR 检测灵敏性比较 (图 2)。

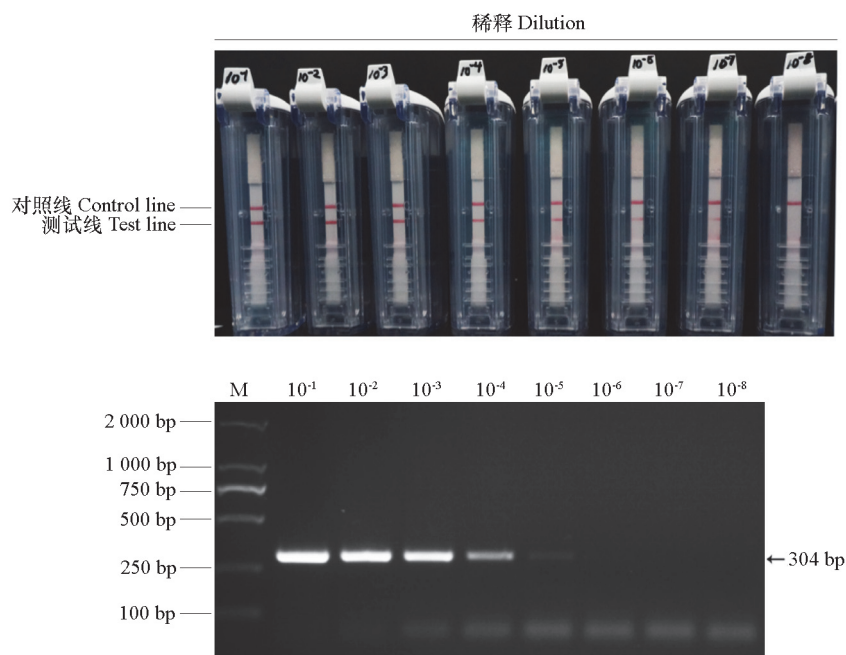


图 2 RPA-LFD (A) 和 RT-PCR (B) 检测 PDV 的灵敏性比较

Fig. 2 Comparison of the relative sensitivity of RPA-LFD (A) and RT-PCR (B) for PDV detection

LFD 结果表明 RPA-LFD 10 min 内可以检测到总 RNA 稀释至 $1.7 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ 的样品, 20 min 能检测到 $1.7 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ 的样品, 而琼脂糖凝胶电泳结果表明 RT-PCR 仅能检测到总 RNA 稀释至 $1.7 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ 的样品 (图 2)。以上结果表明建立的 RPA 检测方法比 RT-PCR 至少灵敏 10 倍。

2.3 RPA-LFD 检测田间样品

为了验证建立的 PDV RPA-LFD 方法的田间实用性, 从田间随机采集了 13 株甜樱桃嫁接苗的休眠芽样品, 包括 5 株 ‘Canada Giant’、4 株 ‘Kordia’ 和 4 株 ‘京樱 1 号’, 分别用 RPA-LFD 和 RT-PCR 进行检测。其中, 10 个样品 PDV 检测阳性, 3 个样品 PDV 检测阴性, RPA-LFD 检测结果与 PCR 检测结果一致 (图 3), 表明建立的 RPA-LFD 检测方法可用于田间樱桃样品的 PDV 检测。

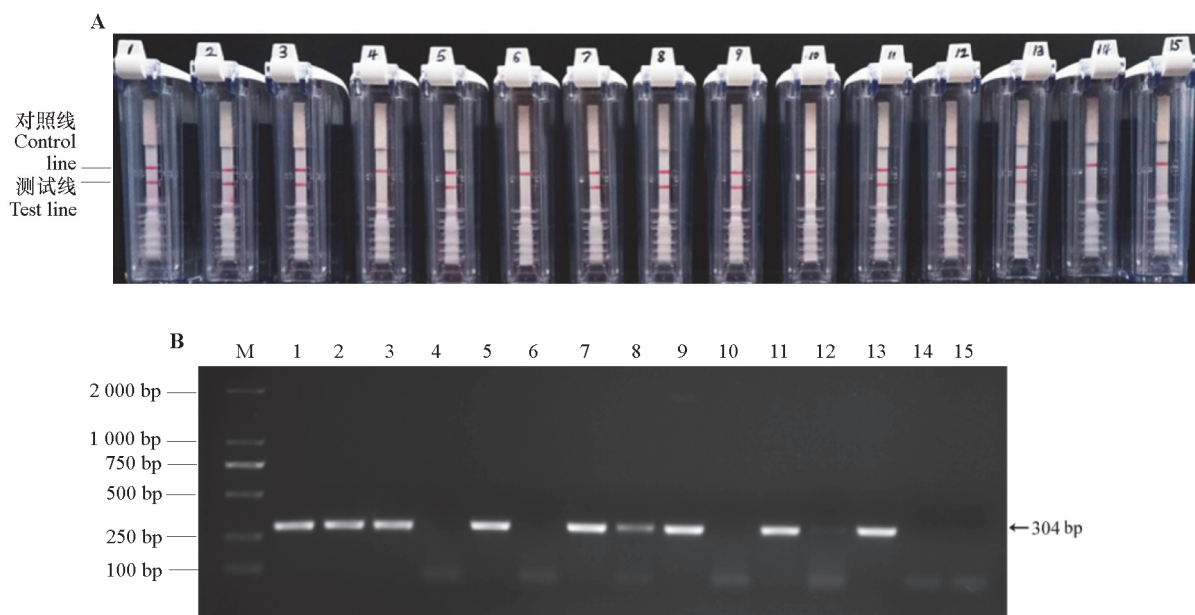


图 3 RPA-LFD (A) 和 RT-PCR (B) 检测田间樱桃样品的 PDV 感染情况

1 ~ 13: 随机采集的田间甜樱桃样品; 14: 无病毒甜樱桃砧木幼苗; 15: ddH₂O。

Fig. 3 Detection of natural PDV infection in selected field-grown cherry samples with RPA-LFD (A) and RT-PCR (B)

1 - 13: Random field sweet cherry samples; 14: Virus-free sweet cherry scion seedling; 15: ddH₂O.

3 讨论

本研究中建立的 RPA-LFD 方法适用于樱桃样品中 PDV 的快速检测。与 RT-PCR 等检测方法相比, RPA-LFD 检测体系操作简单、反应快速、灵敏度高、特异性强, 不依赖多种实验设备, 可应用于现场诊断, LFD 检测结果可通过肉眼直接观察。与环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 检测方法 (李敏 等, 2019; 黄爱军 等, 2020; Shi et al., 2020) 相比, RPA 检测方法的引物设计更加简单。

RPA 引物一般长约 30 ~ 35 nt, 5'端避免 3 ~ 5 个 G (鸟嘌呤) 或者 C (胞嘧啶), 更有助于重组酶的结合, 3'端含有 3 个 G (鸟嘌呤) 或者 C (胞嘧啶) 更有助于聚合酶的结合。引物序列中避免

短的重复序列或者长的单一序列及回文结构,避免形成发夹结构和引物二聚体。引物中的 GC 含量大于 30%,小于 60%。扩增片段长约 100~200 bp,最好不超过 500 bp。探针长约 46~52 nt, THF 左边至少 30 nt, 3'端至少 15 nt, 探针 5'端可以和正向引物重叠,但重叠区域不能超过 30 nt,不能越过 THF, 探针与反向引物不能重叠。

已有研究表明 RPA 与 RT-PCR 检测灵敏度相当,有的甚至是 RT-PCR 检测灵敏度的 10 倍或 1 000 倍 (Kim et al., 2019; Jiao et al., 2020; Kapoor et al., 2020)。本研究中发现 RPA-LFD 10 min 内可以检测到总 RNA 稀释至 1.7×10^{-6} μg 的样品, 20 min 能检测到 1.7×10^{-7} μg 的样品。虽然 Agdia 的试纸条使用说明指出 LFD 检测 20 min 能使低量扩增子的样品产生阳性测试线,但因 RPA 引物探针本身存在着“噪音”现象,即随着时间推移,阴性对照可能会在试纸条上慢慢出现轻微的检测线 (樊晓旭等, 2018),为此,为了提高判定结果的客观性,尽可能排除装配扩增检测室和拍照过程等的影响,读取测试结果的时间限定在 20 min 以内,因此本研究建立的 PDV RPA-LFD 检测方法至少是常规 RT-PCR 检测方法的 10 倍,适用于检测 PDV 复制积累量较低的樱桃样品。此外,该 RPA-LFD 方法可用于资源受限的实验室或现场诊断,为远距离、不易携带样品的检测,以及从资源受限地区调运苗木过程中的病毒检测提供了便利方法。

RPA-LFD 技术已经应用于病毒、细菌和食品微生物的检测及鉴定。多种植物病毒的 RPA 检测试剂盒已经商业化,有的甚至可以用样品粗提液直接检测,包括樱桃小果病毒-2 (little cherry virus-2, LChV-2) 和严重为害李属果树的李痘病毒 (plum pox virus, PPV)。RPA-LFD 方法简化了检测程序,缩短了检测时间,扩增子检测室的应用降低了污染风险,可用于大量样品的快速检测。但现阶段与 RT-PCR 等检测方法相比,RPA-LFD 检测成本较高,相关企业后续应加快类似 RPA-LFD 这种现场快速检测产品的研发,高质量的检测试剂才能满足 RPA-LFD 检测的稳定性和灵敏性,在保证试剂质量稳定的基础上逐步降低检测成本。

References

- Bajet N B, Unruh T R, Druffel K L, Eastwell K C. 2008. Occurrence of two little cherry viruses in sweet cherry in Washington State. *Plant Disease*, 92 (2): 234 - 238.
- Beaver-Kanuya E, Harper S J. 2019. Detection and quantification of four viruses in *Prunus* pollen: implications for biosecurity. *Journal of Virological Methods*, 271: 113673.
- Bouani A, Rwanhni M A, Ghanem-Sabanadzovic N A, Alami I, Zemzami M, Myrta A, Savino V. 2004. A preliminary account of the sanitary status of stone fruit trees in Morocco. *EPPO Bulletin*, 34: 399 - 402.
- Bujarski J, Gallitelli D, Garcia-Arenal F, Pallas V, Palukaitis P, Reddy M K, Wang A M, Consortium I R. 2019. ICTV virus taxonomy profile: *Bromoviridae*. *Journal of General Virology*, 100 (8): 1206 - 1207.
- Çağlayan K, Ulubas-Serce C, Gazel M, Varveri C. 2011. Prune dwarf virus/Hadidi A, Barba M, Candresse T, Jelkmann W. In virus and virus-like disease of pome and stone fruits. St. Paul, MN: American Phytopathological Society: 199 - 205.
- Cao Xin-ran. 2019. Analysis of cherry viral diseases in Shandong Province and new strategy using satellite RNA to control viral diseases [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 曹欣然. 2019. 山东省樱桃病毒病种类分析及卫星 RNA 控制植物病毒病新策略 [博士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Chen Ling, Duan Xu-wei, Zhang Kai-chun, Zhang Xiao-ming, Wang Jing, Yan Guohua, Zhou Yu. 2020. A method for the detection of cherry virus A (CVA) based on recombinase polymerase amplification (RPA) technique. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (2): 390 - 398. (in Chinese)
- 陈玲, 段续伟, 张开春, 张晓明, 王晶, 闫国华, 周宇. 2020. 基于重组酶聚合酶扩增 (RPA) 技术的樱桃病毒 A (CVA) 的检测方法. *园艺学报*, 47 (2): 390 - 398.
- Fan Xiao-xu, Song Zhu-yuan, Zhao Yong-gang, Zhao Ming, Dong Ya-qin, Zhang Yong-qiang, Li Yuan-li, Chi Tian-ying, Liu Chun-ju, Ge

- Sheng-qiang, Zhang Zhi-cheng, Wu Xiao-dong, Wang Shu-shuang, Wang Zhi-liang. 2018. Establishment of recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick for the detection of Seneca valley virus. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 40 (5): 406 - 410. (in Chinese)
- 樊晓旭, 宋翥远, 赵永刚, 赵明, 董雅琴, 张永强, 李园丽, 迟田英, 刘春菊, 戈胜强, 张志诚, 吴晓东, 王树双, 王志亮. 2018. 塞尼卡谷病毒重组酶聚合酶扩增—侧流层析试纸条检测方法的建立. *中国预防兽医学报*, 40 (5): 406 - 410.
- Fulton R W. 1959. Purification of sour cherry necrotic ringspot and prune dwarf viruses. *Virology*, 9 (4): 522 - 535.
- Gümüş M, Paylan I C, Matic S, Myrta A, Sipahioglu H M, Erkan S. 2007. Occurrence and distribution of stone fruit viruses and viroids in commercial plantings of *Prunus* species in Western Anatolia, Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 89: 265 - 268.
- Hou Yi-long, Zhang Kai-chun, Yang Jun-ling. 2005. Detection of PNRSV and PDV in peach and cherry by RT-PCR. *Journal of Fruit Science*, 22 (3): 292 - 293. (in Chinese)
- 侯义龙, 张开春, 杨俊玲. 2005. 应用 RT-PCR 方法检测桃和樱桃及其组培苗上的 PNRSV 和 PDV. *果树学报*, 22 (3): 292 - 293.
- Huang Aijun, Ding Min, Wang Ying, Su Huanan, Yi Long. 2020. Establishment of RT-LAMP assay for detection of citrus leaf blotch virus. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (11): 2215 - 2222. (in Chinese)
- 黄爱军, 丁敏, 王莹, 苏华楠, 易龙. 2020. 柑橘叶斑驳病毒的 RT-LAMP 检测. *园艺学报*, 47 (11): 2215 - 2222.
- Jarošová J, Kundu J K. 2009. Detection of Prune dwarf virus by one-step RT-PCR and its quantitation by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 164: 139 - 144.
- Jiao Y, Xu C, Li J, Gu Y, Xia C, Xie Q, Xie Y, An M, Xia Z, Wu Y. 2020. Characterization and a RT-RPA assay for rapid detection of Chilli Veinal mottle virus (ChiVMV) in tobacco. *Virology Journal*, 17 (1): 33.
- Kapoor R, Srivastava N, Kumar R, Sharma S K, Rai R, Kumar S, Baranwal V K. 2020. Detection of episomal banana streak Mysore virus by reverse transcription-recombinase polymerase amplification assay. *Journal of Plant Pathology*, 102: 499 - 503.
- Kim N Y, Lee H J, Jeong R D. 2019. A portable detection assay for *Apple stem pitting virus* using reverse transcription-recombinase polymerase amplification. *Journal of Virological Methods*, 274: 113747.
- Kozieł E, Otulak K, Lockhart B E L, Garbaczewska G. 2017. Subcellular localization of proteins associated with *Prune dwarf virus* replication. *European Journal of Plant Pathology*, 149 (3): 653 - 668.
- Li J, Macdonald J, Stetten F. 2019. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *Analyst*, 144: 31 - 67.
- Li Min, Zhou Tianyu, Wu Jiaying, Zhou Yan, Cao Mengji, Li Zhongan. 2019. Establishment and application of loop-mediated isothermal amplification on *Citrus psorosis virus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (11): 2215 - 2222. (in Chinese)
- 李敏, 周天宇, 吴佳星, 周彦, 曹孟籍, 李中安. 2019. 柑橘鳞皮病毒 RT-LAMP 检测方法的建立与应用. *园艺学报*, 47 (11): 2215 - 2222.
- Liu Cong-li, Li Ming, Zhao Gai-rong, Li Yu-hong. 2016. Investigation and pathogen detection of sweet cherry virus disease in Henan. *Plant Protection*, 42 (4): 200 - 204. (in Chinese)
- 刘聪利, 李明, 赵改荣, 李玉红. 2016. 河南甜樱桃病毒病害调查及病原检测. *植物保护*, 42 (4): 200 - 204.
- Lu Mei-guang, Wu Bing, Gao Rui, Zhang Zhi-xiang, Xiao Hong, Chen Ran-ran, Li Shi-fang. 2015. Preliminary investigation on cherry virus diseases and detection of the pathogens in some regions of China. *Plant Protection*, 41 (1): 98 - 103. (in Chinese)
- 卢美光, 吴冰, 高蕊, 张志想, 肖红, 陈冉冉, 李世访. 2015. 我国部分地区樱桃病毒病害初步调查和病原检测. *植物保护*, 41 (1): 98 - 103.
- Matić S, Rwahnih M A, Myrta A. 2008. Viruses of stone fruits in Bosnia and Herzegovina. *Acta Horticulturae*, 781: 71 - 74.
- Mekuria G, Ramesh S A, Alberts E, Bertozzi T, Wirthensohn M, Collins G, Sedgley M. 2003. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus* necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods*, 114 (1): 65 - 69.
- Mink G I. 1993. Pollen-and seed-transmitted viruses and viroids. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 375 - 402.
- Myrta A, Di Terlizzi B, Savino V, Martelli G P. 2003. Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. *Options Méditerranéennes, Série B (Etudes et Recherches; n. 45)*. 15 - 23.

- Nemeth M, Szalay-Marzsó L, Posnette A. 1986. Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Akademiai Kiado: Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers.
- Pallas V, Aparicio F, Herranz M C, Amari K, Sanchez-Pina M A, Myrta A, Sanchez-Navarro J A. 2012. Ilarviruses of *Prunus* spp.: a continued concern for fruit trees. *Phytopathology*, 102 (12): 1108 - 1120.
- Peiró A, Pallás V, Sánchez-Navarro J A. 2012. Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 469 - 475.
- Que Yong. 2008. The detection of prunus necrotic ringspot virus and prune dwarf virus on the stone fruit trees by serology and RT-PCR. [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
阙 勇. 2008. 核果类果树上李坏死环斑病毒和李矮缩病毒的血清学及 RT-PCR 检测[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Rouag N, Guechi A, Matic S, Myrta A. 2008. Virus and viroids of stone fruits in Algeria. *Journal of Plant Pathology*, 90 (2): 393 - 395.
- Shi Y X, Jin Z W, Meng X L, Wang L X, Xie X W, Chai A L, Li B J. 2020. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection and identification of *Pectobacterium carotovorum* on celery in the field. *Horticultural Plant Journal*, 6 (5): 313 - 320.
- Villamor D E V, Eastwell K C. 2013. Viruses associated with rusty mottle and twisted leaf diseases of sweet cherry are distinct species. *Virology*, 103: 1287 - 1295.
- Zhou Deng-pan. 2017. Investigation and detection of cherry virus diseases and identification of the pathogen viruses in facilitated cultivation in Shihezi of Xinjiang [Ph. D. Dissertation]. Shihezi: Shihezi University. (in Chinese)
周登攀. 2017. 石河子地区设施樱桃病毒病害调查及病原病毒种类鉴定与检测[博士论文]. 石河子: 石河子大学.
- Zhou Y Y, Ruan X F, Wu C L. 1996. First report of sweet cherry viruses in China. *Plant Disease*, 80 (12): 1429 - 1429.
- Zong Xiao-juan, Wang Wen-wen, Wang Jia-wei, Wei Hai-rong, Yan Xue-rui, Liu Qing-zhong. 2012. The application of SYBR Green I real-time quantitative analysis of sweet cherry viruses in different tissues. *Acta Phytopythologica Sinica*, 39: 497 - 502. (in Chinese)
宗晓娟, 王文文, 王甲威, 魏海蓉, 严雪瑞, 刘庆忠. 2012. SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 技术在甜樱桃病毒定量分析中的应用. *植物保护学报*, 39: 497 - 502.