

侯雨萌, 赵振兴, 王思元, 等. 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(2): 268-275.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.02.007

基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法

侯雨萌^{1,2}, 赵振兴¹, 王思元¹, 董 铮¹, 胡中泽³, 周 涛², 张永江¹

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 2. 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193; 3. 江苏省农业科学院泰州农业科学研究所, 江苏 泰州 225300)

摘要: 玉米矮花叶病毒(Maize dwarf mosaic virus, MDMV)是一种重要的检疫性病毒,严重影响玉米的生产。为了有效防治玉米矮花叶病,本研究基于反转录重组酶介导等温核酸扩增(RT-RAA)技术和 CRISPR/Cas12a 系统构建了一种 MDMV 快速检测方法,将所有试剂集中在一个试管中进行反应,并通过侧向流动试纸条(LFD)检测反应结果。本研究筛选得到的最佳反应条件为,引物添加量 2.8 μL 、FB 报告分子浓度 100 nmol/L、RT-RAA 系统反应时间 20 min、CRISPR/Cas12a 系统反应时间 20 min。本研究构建的基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法特异性强、灵敏度高,且所用试验材料方便携带和运输,适用于现场检测。

关键词: 玉米矮花叶病毒; 反转录重组酶介导等温核酸扩增(RT-RAA)技术; CRISPR/Cas12a; 侧向流动试纸条

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2025)02-0268-08

A one-tube rapid detection method for maize dwarf mosaic virus based on RT-RAA and CRISPR/Cas12a

HOU Yumeng^{1,2}, ZHAO Zhenxing¹, WANG Siyuan¹, DONG Zheng¹, HU Zhongze³, ZHOU Tao², ZHANG Yongjiang¹

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2. College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. Taizhou Institute of Agricultural Sciences, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Taizhou 225300, China)

Abstract: Maize dwarf mosaic virus (MDMV) is an important quarantine virus that seriously affects maize production. To effectively prevent and control maize dwarf mosaic disease, this study constructed a rapid detection method for MDMV based on reverse transcription-recombinase aided amplification (RT-RAA) technology and the CRISPR/Cas12a system. All reagents were reacted in a single test tube, and the reaction results were detected by lateral flow dipstick (LFD). The optimal reaction conditions screened in this study were as follows: primer addition amount of 2.8 μL , FB reporter molecule concentration of 100 mol/L, RT-RAA system reaction time of 20 minutes, and CRISPR/Cas12a system reaction time of 20 minutes. The one-tube rapid detection method for maize dwarf mosaic virus based on RT-RAA and

CRISPR/Cas12a constructed in this study has strong specificity, high sensitivity, and the experimental materials used are convenient for carrying and transportation, making it suitable for on-site detection.

Key words: maize dwarf mosaic virus; reverse transcription-recombinase aided amplification (RT-RAA) technology; CRISPR/Cas12a; lateral flow dipstick

收稿日期: 2024-07-18

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD1400100、2021YFD1400103)

作者简介: 侯雨萌(2000-), 女, 天津人, 硕士研究生, 主要从事玉米矮花叶病毒的研究; (E-mail) 2192494895@qq.com。赵振兴为共同第一作者。

通讯作者: 张永江, (E-mail) zhangyjpv@yeah.net; 周 涛, (E-mail) taozhousig@163.com

玉米是全球重要粮食作物,种植面积广泛,被用于食品、医疗、化工等多个领域。美国是全球最大的玉米生产国,中国位居第 2^[1]。近年来,玉米产业在产量、质量和种植面积等方面均有显著提升。玉米常年遭受病毒的侵染,严重威胁其安全生产。玉米矮花叶病是玉米常见的病害之一,会导致玉米产量和质量下降,引起该病的主要病毒包括甘蔗花叶病毒(Sugarcane mosaic virus,SCMV)、玉米矮花叶病毒(Maize dwarf mosaic virus,MDMV),这两种病毒引起的症状相似,难以区分^[2]。目前有关检测 MDMV 的研究相对较少,因此,建立一种简捷、高效、快速的 MDMV 检测技术尤为重要。

玉米矮花叶病毒属于马铃薯 Y 病毒科(Potyviri-dae)马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*),是一种重要的检疫性病毒。MDMV 是一种正义单链 RNA 病毒^[3],仅寄生于禾本科植物,可侵染玉米、甘蔗等十余种农作物及草本植物,其中约翰逊草受害最严重^[4-5],石茅是 MDMV 田间的长期毒源^[6]。MDMV 传播方式多样,包括汁液传播和种子传播等。MDMV 主要通过蚜虫在田间进行非持久性传播^[7]。MDMV 传播速度快,侵染玉米后在植株内迅速移动,导致植株在短时间内出现矮化、叶片褪绿和生长受阻等症状,最终造成玉米减产 20%以上,甚至绝产^[8-10]。MDMV 主要分布在在美国、加拿大、匈牙利、西班牙、约旦、捷克和波兰等国家^[11-15],中国南方海关曾多次在阿根廷运输到中国的玉米中检测到 MDMV。该病毒最早于美国俄亥俄州被发现,2021 年 4 月 9 日被新增列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中^[16]。研究结果表明,MDMV 最初被分为 A、B 两个主要株系。在中国,玉米矮花叶病的主要致病病毒是 MDMV 的 B 株系,通过分子生物学分析发现,其特性与甘蔗花叶病毒(SCMV)的一个株系相似,因此将其归为 SCMV,并命名为 SCMV-MDB^[17]。

目前有关 MDMV 的检测方法包括反转录聚合酶链式反应(Reverse transcription-poly-merase chain reaction,RT-PCR)、实时荧光定量核酸扩增技术(Quantitative real-time PCR, qPCR)等,这些方法虽能准确检测到 MDMV,但耗时长、操作复杂,需要专业的技术人员和精密仪器,具有较多局限性。反转录重组酶介导等温核酸扩增技术(Reverse transcription-recombinase aided amplification,RT-RAA)是一种不需要热稳定酶和精密仪器的检测技术,在 36~44 ℃ 条件下反应

20~40 min 即可完成目的基因的指数扩增,具有反应速度快、操作简单、温度要求低、灵敏度高、特异性强等优点。这种检测技术可以满足现场快速检测的需求^[18],已被广泛应用于多个领域^[19-20]。在植物病毒的检测领域,RT-RAA 已被应用于樱桃病毒 A、菜豆荚斑病毒、番茄黄化曲叶病毒等 30 余种植物病毒的检测^[21-23]。CRISPR/Cas(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein)是一种基于 CRISPR RNA(crRNA)引导的靶向基因识别与切割技术。CRISPR/Cas12a 属于第 2 类 V 型系统,可在短时间内检测到低浓度的目的基因,目前已被广泛应用^[24]。本研究拟基于 RT-RAA 恒温扩增技术和 CRISPR/Cas12a 系统,将 MDMV 检测试剂集中在同一个试管中进行反应,并利用侧向免疫层析技术快速检测反应产物,以期在现场简便、高效、直观快速检测玉米矮花叶病毒提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

MDMV 阳性质粒^[6]、SCMV 阳性质粒、水稻黑条矮缩病毒(Rice black-streaked dwarf virus,RBSDV)、玉米褪绿斑驳病毒(Maize chlorotic mottle virus,MC-MV)、小麦线条花叶病毒(Wheat streak mosaic virus,WSMV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus,CMV)由本实验室保存;感染 MDMV 的玉米病株由广州海关和福州海关提供。

1.2 方法

1.2.1 RAA 引物、crRNA 及报告分子 FQ、FB 设计

参考 RAA 引物设计的相关文献,登录 NCBI 网站,获取已报道的 MDMV 外壳蛋白(Coat protein, CP)基因序列。

利用多重序列比对工具对这些序列进行比对,分析保守区域。在保守区域内,设计 2 对 RAA 引物。使用设计工具 CRISPR,根据 MDMV 外壳蛋白基因序列的保守区域设计特异性 crRNA 序列。MDMV-crRNA:5'-UAAUUUCUACUAGUGUAGAUAUAGGUGGUAUGAAGCAGUACAG-3';FQ 报告分子:6-羧基荧光素-CCGGAAAAAAAAAAAAACCGG-荧光猝灭剂;FB 报告分子:6-羧基荧光素-CCGGAAAAAAAAAAAAACCGG-生物素。引物具体信息如表 1 所示。crRNA 及 FQ、FB 报告分子序列由擎科有限公司(北京,中国)合成,引物由诺赛有限公司(北京,中国)合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
MDMV-RAA-1F	TCTAAAAAGATGCGTTTACCTCAGGCAAAAGG	228
MDMV-RAA-1R	CTCATGACAACCTGTCATTGTGTGTCATCAAG	
MDMV-RAA-2F	CCAAGCTCAAAGCCATGTCTAAAAAGATGCG	
MDMV-RAA-2R	TTCAATACACCAAACCATCAGTCCACTCATGAC	440
MDMV-194F	GTRCAGAAAGARTACGAAC	
MDMV-194R	TGCATRATYTGCTCTGAAAGTTG	194

1.2.2 RT-RAA 恒温扩增 按照 RT-RAA 恒温扩增试剂盒(型号 WLRB8207KIT,安普未来生物科技有限公司产品)的说明书进行 RT-RAA 等温扩增,具体操作步骤如下:向每个冻干酶粉管中加入 29.4 μL A buffer、2.0 μL 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)和 2.0 μL 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$),12.1 μL ddH₂O,上下吸打混匀,使冻干酶粉充分溶解,随后加入 2.0 μL 模板(MDMV 阳性质粒)、2.5 μL B buffer,总体积共 50.0 μL 。充分混匀后,将反应管放入恒温反应器中,42 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温反应 30 min。扩增完成后,向扩增产物中加入 50.0 μL DNA 提取液,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液进行后续凝胶电泳检测。

1.2.3 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法 RT-RAA 体系包括 25.0 μL A buffer、2.4 μL 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)和 2.4 μL 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、4.0 μL FQ 报告分子(10 $\mu\text{mol/L}$)、6.0 μL ddH₂O,将混合溶液倒入冻干酶粉管中,充分溶解后加入 2.5 μL B buffer,上下吸打混合均匀后,从中抽取 9.0 μL RT-RAA 体系溶液至 PCR 管底部。CRISPR/Cas12a 体系包括 7.5 μL 10 \times NEBuffer 3.1、2.5 μL RNase inhibitor(40 U/ μL)、2.5 μL DTT(0.1 mmol/L)、2.5 μL LbCas12a(5 $\mu\text{mol/L}$)、5.0 μL MDMV-crRNA(10 $\mu\text{mol/L}$),充分振荡混匀后,从中抽取 4.0 μL CRISPR/Cas12a 体系溶液于管盖内。抽取 1 μL 待测病毒 RNA 至管底部,上下移液混合均匀,轻轻闭合 PCR 管盖,PCR 管置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温反应仪中反应 20 min。随后振荡并离心,使 4 μL CRISPR/Cas12a 体系溶液、9 μL RT-RAA 体系溶液及 1 μL 病毒 RNA 混合均匀。PCR 管内混合溶液总体积为 14 μL ,将 PCR 管放入实时荧光仪中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30 min,并实时监测荧光信号。

当使用 FB 报告分子结合侧向流动试纸条检测病毒 RNA 时,将 4 μL FQ 报告分子替换为 4 μL FB 报告分子,其他反应条件相同,反应结束后,加入 86 μL 去离子水,混合均匀后将试纸条插入 PCR 管中,静置 5 min,观察条带。

1.2.4 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法的特异性分析 按照 TIANGEN[®] RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒说明书,提取玉米上常见病毒 RBSDV、CMV、SCMV、MCMV、WSMV 的 RNA,验证方法 1.2.3 的基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法的特异性。

1.2.5 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法的灵敏度分析 使用 ddH₂O 将 MDMV 阳性质粒梯度稀释为每 1 μL 1 \times 10⁷拷贝、1 \times 10⁶拷贝、1 \times 10⁵拷贝、1 \times 10⁴拷贝、1 \times 10³拷贝、1 \times 10²拷贝、1 \times 10¹拷贝、1 \times 10⁰拷贝 8 个梯度,以健康玉米 RNA 为阴性对照,分别利用方法 1.2.3 的基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法、RT-RAA 结合凝胶电泳方法和 RT-PCR 结合凝胶电泳方法进行检测,分析不同方法的灵敏度。

2 结果与分析

2.1 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒检测方法的优化

2.1.1 RT-RAA 体系引物筛选 以 FQ 作为荧光信号分子,分别使用 2 对 RT-RAA 引物,通过基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法检测 MDMV 阳性质粒,同时以健康玉米 RNA 作为阴性对照。检测结果显示如图 1 所示,

2 对 RAA 引物均能扩增出目的片段,其中引物组合 MDMV-RAA-1F/MDMV-RAA-1R 的荧光信号值更稳定,因此引物选用 MDMV-RAA-1F/MDMV-RAA-1R。

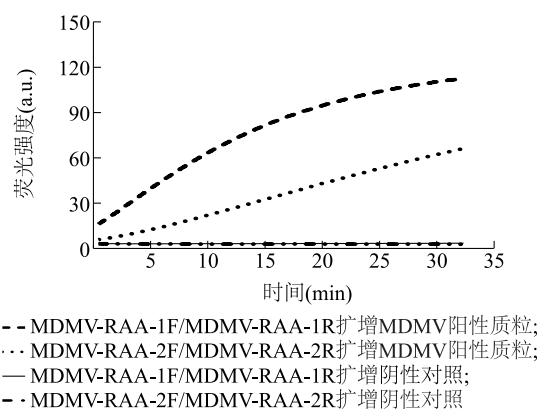


图1 RT-RAA 引物筛选

Fig.1 Screening of RT-RAA primers

2.1.2 RT-RAA 体系引物添加量筛选 将 RT-RAA 体系引物 MDMV-RAA-1F/MDMV-RAA-1R (10 $\mu\text{mol/L}$) 添加量分别设置 2.0 μL 、2.2 μL 、2.4 μL 、2.6 μL 、2.8 μL 、3.0 μL , 进行筛选。以 FQ 作为荧光信号分子,通过基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法检测 MDMV 阳性质粒,检测结果如图 2 所示,当引物添加量为 2.0~3.0 μL ,均可检测到荧光信号。当引物添加量达到 2.8 μL 时,荧光信号最强,当引物添加量为 3.0 μL 时,荧光信号减弱,因此确定引物 MDMV-RAA-1F/MDMV-RAA-1R (10 $\mu\text{mol/L}$) 最佳添加量为 2.8 μL 。

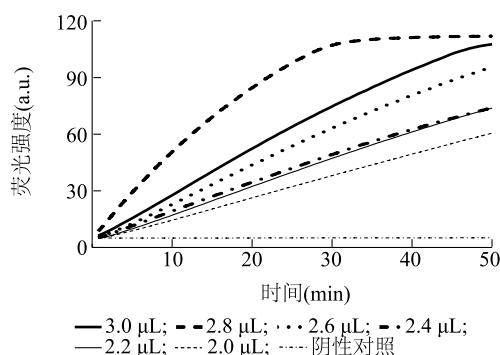
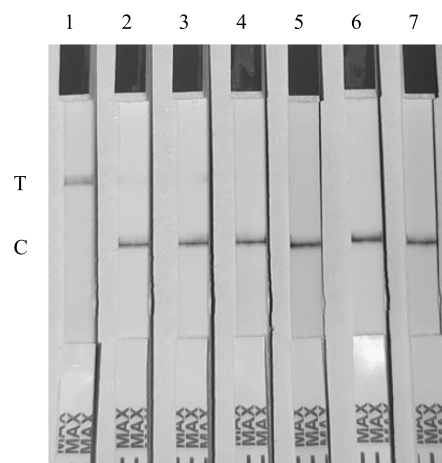


图2 RT-RAA 引物添加量筛选

Fig.2 Screening of RT-RAA primer addition amount

2.1.3 报告分子 FB 浓度筛选 在 CRISPR/Cas12a 系统中,报告分子的浓度对检测结果的准确性至关重要。报告分子浓度过低可能导致假阳性结果的出现。为了

避免假阳性现象,用试纸条分别检测 0 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L、500 nmol/L 和 1 000 nmol/L 浓度的 FB 报告分子。如图 3 所示,当 FB 浓度低于 100 nmol/L 时,检测线均会出现微弱的假阳性信号。因此选择 100 nmol/L 浓度的 FB 报告分子。



T: 检测线; C: 质量控制线。1: 0 nmol/L; 2: 25 nmol/L; 3: 50 nmol/L; 4: 100 nmol/L; 5: 200 nmol/L; 6: 500 nmol/L; 7: 1 000 nmol/L。

图3 FB 报告分子浓度筛选

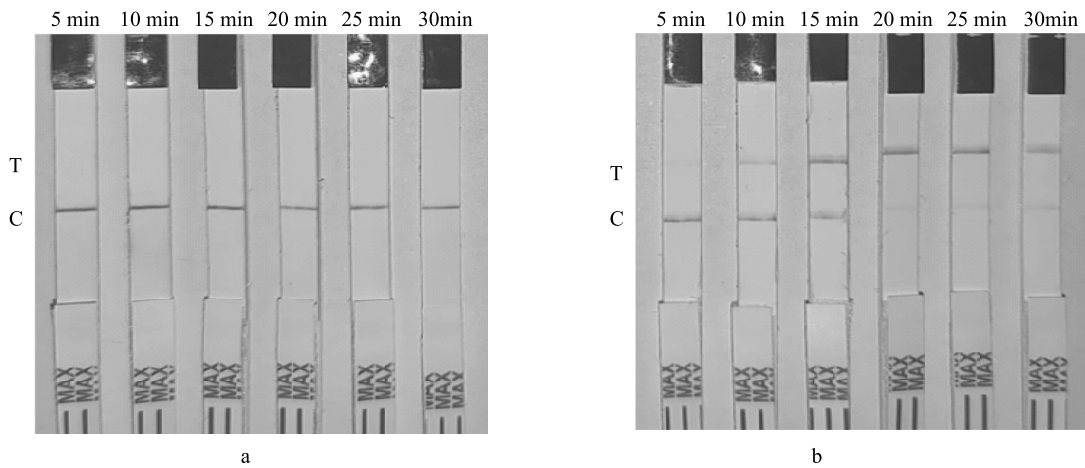
Fig.3 Screening of FB reporter molecule concentration

2.1.4 RT-RAA 体系反应时间优化 分别设置 RT-RAA 体系反应时间为 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min,以 FB 作为信号分子,通过基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法检测 MDMV 阳性质粒。检测结果如图 4 所示,RT-RAA 反应 5 min 即可在检测线(T 线)上产生条带,随着 RT-RAA 体系反应时间的增加,检测线上的条带颜色逐渐加深。当反应时间超过 20 min,检测线上的条带深度不再随着时间增加而变化,因此选择 20 min 作为 RT-RAA 体系最佳反应时间。

2.1.5 CRISPR/Cas12a 体系反应时间优化 分别设置 CRISPR/Cas12a 体系反应时间为 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min,以 FB 作为信号分子,通过基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法检测 MDMV 阳性质粒。结果如图 5 所示,反应 10 min,试纸条检测线上产生条带,随着反应时间的增加,检测线上的条带

颜色逐渐加深。当反应时间超过 20 min, 检测线上的条带深度不再随着时间增加而变化, 因此选择 20

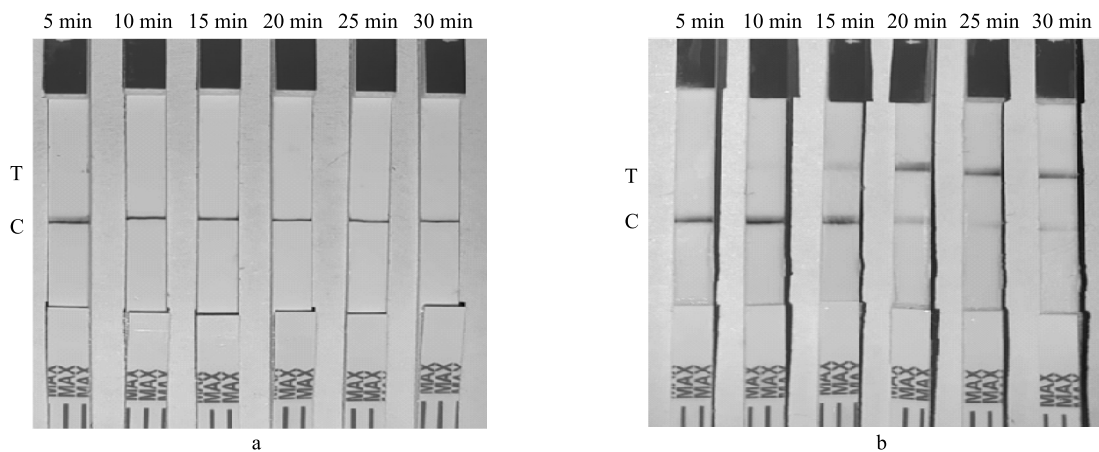
min 作为 CRISPR/Cas12a 体系最佳反应时间。



a: 阴性对照; b: 玉米矮花叶病毒 (MDMV)。T: 检测线; C: 质量控制线。

图 4 RT-RAA 体系反应时间筛选

Fig.4 Screening of RT-RAA system reaction time



a: 阴性对照; b: 玉米矮花叶病毒 (MDMV)。T: 检测线; C: 质量控制线。

图 5 CRISPR/Cas12a 体系反应时间筛选

Fig.5 Screening of CRISPR/Cas12a system reaction time

2.2 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法的特异性

为评估基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法的特异性, 使用试纸条对多种病毒进行了检测, 包括玉米矮花叶病毒 (MDMV)、水稻黑条矮缩病毒 (RBSDV)、黄瓜花叶病毒 (CMV)、甘蔗花叶病毒 (SCMV)、玉米褪绿斑驳病毒 (MCMV) 和小麦条纹花叶病毒 (WSMV), 并以健康玉米 RNA 作为阴性对照。如图 6 所示, 只有检测 MDMV 的试纸条检测线 (T 线) 上出现红色条

带, 检测其他病毒和阴性对照的试纸条只在质量控制线 (C 线) 上出现条带, 未出现非特异性扩增条带。本研究的 RT-RAA/Cas12a 一管法在检测 MDMV 时表现出高特异性, 未与其他常见病毒发生交叉反应。

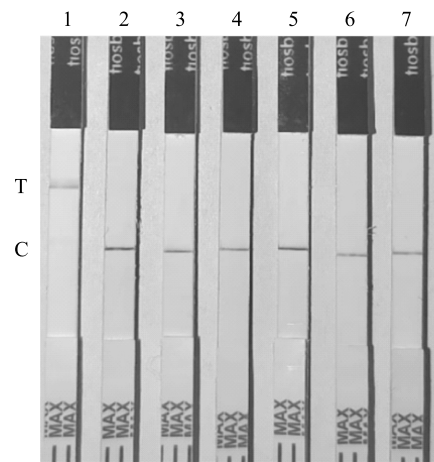
2.3 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法的灵敏度

为评估不同检测方法的灵敏度, 分别用基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法、RT-PCR 结合凝胶电泳方法、RT-

RAA 结合凝胶电泳方法检测 MDMV 阳性质粒。如图 7 所示,RT-PCR 结合凝胶电泳方法能检测到的病毒最低含量为每 $1\ \mu\text{L}$ 1×10^5 拷贝(图 7a),RT-RAA 结合凝胶电泳方法能检测到的病毒最低含量为每 $1\ \mu\text{L}$ 1×10^4 拷贝,基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法能检测到的病毒最低含量为每 $1\ \mu\text{L}$ 1×10^2 拷贝(图 7c)。可见,基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法灵敏度是 RT-RAA 结合凝胶电泳方法的 100 倍,是 RT-PCR 结合凝胶电泳方法的 1 000 倍。

2.4 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法实际场景应用

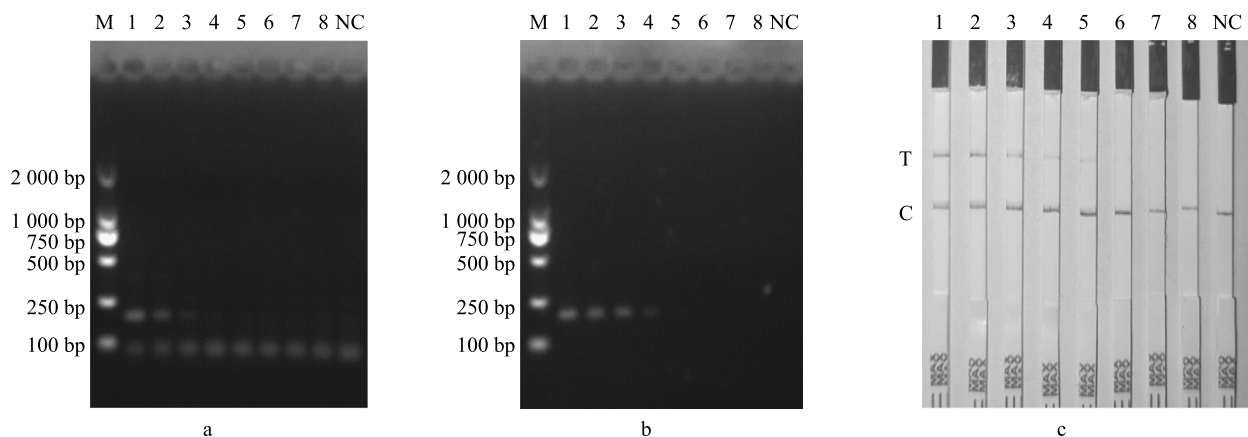
为验证基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法的稳定性和可靠性,对广州海关和福州海关提供的 4 份感染玉米矮花叶病毒的玉米植株进行检测,同时以健康玉米 RNA 作为阴性对照。如图 8 所示,检测供试 4 份感染玉米矮花叶病毒玉米植株的试纸条检测线上均出现明显条带,表明本研究的方法稳定可靠。



T:检测线;C:质量控制线;1:玉米矮花叶病毒;2:水稻黑条矮缩病毒;3:黄瓜花叶病毒;4:甘蔗花叶病毒;5:玉米褪绿斑驳病毒;6:小麦线条花叶病毒;7:阴性对照。

图 6 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法特异性分析

Fig.6 Specificity analysis of a one-tube rapid detection method for maize dwarf mosaic virus based on RT-RAA and CRISPR/Cas12a



a:RT-PCR 结合凝胶电泳方法灵敏度检测;b:RT-RAA 结合凝胶电泳方法灵敏度检测;c:RT-RAA 结合 CRISPR/Cas12a 一管式玉米矮花叶病毒快速检测试纸条灵敏度检测。M:2 000 bp marker; T:检测线;C:质量控制线;1~8:分别为每 $1\ \mu\text{L}$ 1×10^7 拷贝、 1×10^6 拷贝、 1×10^5 拷贝、 1×10^4 拷贝、 1×10^3 拷贝、 1×10^2 拷贝、 1×10^1 拷贝、 1×10^0 拷贝;NC:阴性对照。

图 7 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法灵敏度分析

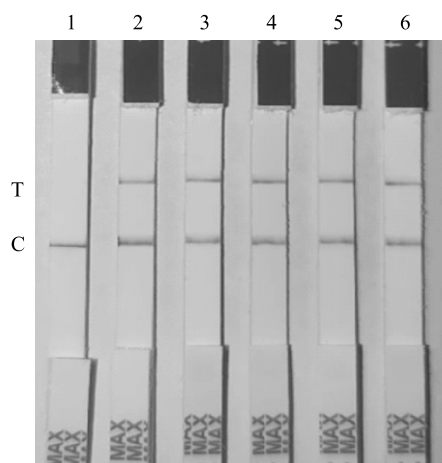
Fig.7 Sensitivity analysis of a one-tube rapid detection method for maize dwarf mosaic virus based on RT-RAA and CRISPR/Cas12a

3 讨论

玉米是中国重要的作物之一,长期受到作物学研究者的关注^[25]。被 MDMV 侵染的玉米常出现坏死现象,MDMV 在全球范围内造成严重的经济损失。因此,加强对进口玉米、高粱等作物的病毒检疫

尤为重要,需要建立快速有效的 MDMV 检测方法,以降低病毒传入和流行的风险。

RT-RAA 方法通过 DNA 聚合酶、重组酶的多种酶的协同作用完成链置换,实现目的基因的快速扩增^[26]。与传统 PCR 和荧光定量 PCR 相比,该方法无需电泳仪和荧光定量 PCR 仪,仅需恒温金属浴即



T:检测线;C:质量控制线;1:阴性对照;2、3:福州海关提供的感染玉米矮花叶病毒玉米植株样品;4、5:广州海关提供的感染玉米矮花叶病毒玉米植株样品;6:阳性对照。

图8 基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法的实际病株检测结果

Fig.8 The actual detection results of diseased maize plants using the one-tube rapid detection method for maize dwarf mosaic virus based on RT-RAA and CRISPR/Cas12a

可完成检测,大幅缩短操作时间,真正实现了现场化检测^[27]。此外,等温扩增技术具有反应条件简便、特异性强、灵敏度高的优势,能够在恒温下完成扩增反应。该技术还可结合实时荧光检测、蓝光可视化及侧向层析试纸条等方法,使检测结果更加直观。

玉米矮花叶病是玉米上最严重的病害之一。据报道,已有 6 种病毒可引起玉米矮花叶病,它们均可导致玉米花叶、矮缩等症状,相似的发病症状给病原的准确识别带来挑战^[28]。MDMV 是玉米矮花叶病的主要病原之一。本研究基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 构建一种检测 MDMV 的方法,将所有检测试剂集中于一个试管中进行反应,并对反应条件进行优化。试验结果表明,引物 MDMA-RAA-1F/MDMA-RAA-1R 稳定性强;最佳试验条件为,引物添加量 2.8 μ L、FB 报告分子浓度 100 nmol/L、RT-RAA 系统反应时间 20 min、CRISPR/Cas12a 系统反应时间 20 min。本研究构建的基于 RT-RAA 和 CRISPR/Cas12a 的一管式玉米矮花叶病毒快速检测方法特异性强,灵敏度是 RT-RAA 结合凝胶电泳方法的 100 倍,是 RT-PCR 结合凝胶电泳方法的 1 000 倍。该方法所用试剂可进行冻干处理,便于储存和运输,

同时结合侧向层析试纸条,使该检测方法更加适用于田间检测^[29]和植物病毒病的现场诊断^[30],具有广泛应用前景。

参考文献:

- [1] 马 丽. 玉米矮花叶病毒基因遗传转化研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [2] BEVERS N, OHLSON E W, KC K, et al. Sugarcane mosaic virus detection in maize using UAS multispectral imagery [J]. Remote Sensing, 2024, 16(17): 3296-3296.
- [3] DULANJANI W, AKHTAR A. Complete Genome characterization and coat protein genealogy of isolates of maize dwarf mosaic virus from johnsongrass and maize in Oklahoma and Missouri [J]. Plant Disease, 2020, 104(4): 1214-1223.
- [4] KUSIA E S, SUBRAMANIAN S, NYASANI J O, et al. First report of lethal necrosis disease associated with co-infection of finger millet with maize chlorotic mottle virus and sugarcane mosaic virus in Kenya [J]. Plant Disease, 2015, 99(6): 899.
- [5] 田逸英, 元芳芳, 焦志远, 等. 四种中国检疫性玉米病毒的研究进展 [J]. 植物保护学报, 2022, 49(5): 1299-1312.
- [6] ACHON M A, ALONSO-DUENAS N, SERRANO L. Maize dwarf mosaic virus diversity in the Johnsongrass native reservoir and in maize: evidence of geographical, host and temporal differentiation [J]. Plant Pathology, 2011, 60(2): 369-377.
- [7] 陈红运, 陈 青, 方志鹏, 等. 进口甜玉米种子中玉米矮花叶病毒的检测 [J]. 植物检疫, 2023, 37(4): 62-65.
- [8] 赵振兴, 范奇璇, 冯黎霞, 等. 基于重组酶聚合酶扩增技术的玉米矮花叶病毒快速检测方法的建立 [J]. 植物保护, 2022, 48(6): 83-89.
- [9] 王海光. 玉米矮花叶病流行原因分析及预测方法 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [10] 周伦理. 玉米矮花叶病研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(2): 396-401.
- [11] DULANJANI W, AKHTAR A. Evolutionary study of maize dwarf mosaic virus using nearly complete genome sequences acquired by next-generation sequencing [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 18786.
- [12] LUO L L, CHANG Q R, WANG Q, et al. Identification and severity monitoring of maize dwarf mosaic virus infection based on hyperspectral measurements [J]. Remote Sensing, 2021, 13(22): 4560.
- [13] ZHANG Z Y, WANG Y G, SHEN X J, et al. RNA interference-mediated resistance to maize dwarf mosaic virus [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2013, 113(3): 571-578.
- [14] TRZMIEL K, JEZEWSKA M. Identification of maize dwarf mosaic virus in maize in Poland [J]. Plant Disease, 2008, 92(6): 981.
- [15] 刘静远, 于 翠, 黄昱萌, 等. 基于 MaxEnt 模型预测玉米矮花叶病毒的潜在适生区 [J]. 植物保护学报, 2022, 49(5): 1383-1391.

- [16] 朱崧琪,梁柱伟,汪绍文.《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》更新项目简介[J]. 中国海关,2021(7):54.
- [17] FAN Z F, CHEN H Y, LIANG X M, et al. Complete sequence of the genomic RNA of the prevalent strain of a potyvirus infecting maize in China[J]. Archives of Virology,2003,148(4):773-782.
- [18] LU X Y, XU H, SONG W, et al. Rapid and simple detection of *Phytophthora cactorum* in strawberry using a coupled recombinase polymerase amplification-lateral flow strip assay[J]. Phytopathology Research,2021,3(1):12.
- [19] DU X J, ZANG Y, LIU H, et al. Rapid detection of staphylococcus aureus via recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip[J]. Food Analytical Methods,2018,11(8):2296-2306.
- [20] 凌莉,席静,王莹,等.重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测创伤弧菌[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):73-76.
- [21] 陈海云,滕丽琼,邱英华,等.柑橘黄龙病 RAA-LFD 检测方法的建立[J]. 现代农业科技,2023(1):61-66.
- [22] 张永江,魏霜,袁俊杰,等.一步法逆转录重组酶聚合酶常温扩增(RT-RPA)技术检测菜豆荚斑驳病毒[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):96-98.
- [23] 单长林,周圆,任琰,等.玉米内州萎蔫病菌荧光重组酶介导等温扩增检测方法的建立[J]. 浙江农业学报,2021,33(9):1676-1685.
- [24] PAUL B, MONTTOYA G. CRISPR-Cas12a: functional overview and applications[J]. Biomedical Journal,2020,43(1):8-17.
- [25] 路子显.近六十年我国玉米产业发展、贸易变化与未来展望[J]. 黑龙江粮食,2021(9):9-14.
- [26] LI Y D, WANG X F, XU R, et al. Establishment of RT-RPA-Cas12a assay for rapid and sensitive detection of human rhinovirus B[J]. BMC Microbiology,2023,23(1):333.
- [27] 朱裕敏,吴江,廖立珊,等.鲤春病毒血症病毒 RT-RAA-LFD 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2023,45(9):916-921.
- [28] 蒋军喜.玉米矮花叶病原鉴定、检测及外壳蛋白基因变异研究[D]. 杭州:浙江大学,2002.
- [29] DA N T, SU L H, THANH H T, et al. Design an RPA model for the fulfillment process in an SAP ERP system[J]. Journal of the Chinese Institute of Engineers,2023,46(6):683-691.
- [30] WIJAYASEKARA D, ALI A. First report of maize dwarf mosaic virus in johnsongrass in Oklahoma[J]. Plant Disease,2017,101(5):850.

(责任编辑:成纾寒)