

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635 (2010) 05-0301-05

病虫害防治

马铃薯环腐病菌 Real-time Taqman-PCR 检测体系的建立

魏 琪^{1,2,3}, 胡林双³, 董学志³, 闵凡祥³, 王晓丹³, 李凤兰^{1,2,4}, 郭 梅³, 芦 娜³, 李学湛^{3*}

(1. 黑龙江省农业科学院博士后工作站, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北林业大学博士后流动站, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 4. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 本研究根据环腐病菌 16 S rRNA 保守序列设计特异性引物及探针, 建立了马铃薯环腐病菌实时定量荧光 PCR 检测体系。研究表明, 该体系可以准确、稳定、定量的检测出样品中最低浓度为 $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (即 $3.21 \times 10^3 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 的目的基因, 检测极限可以达到几个拷贝。该检测体系可对马铃薯环腐病菌进行微量检测, 对于保证马铃薯各级种薯、商品薯及其相关产品的质量, 提高市场竞争力具有重要意义。

关键词: 马铃薯; 环腐病菌; Real-time Taqman-PCR

Establishment of Fluorescent Quantitation PCR Detection System (Taqman) for *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

WEI Qi^{1,2,3}, HU Linshuang³, DONG Xuezhi³, MIN Fanxiang³, WANG Xiaodan³, LI Fenglan^{1,2,4}, GUO Mei³, LU Na³, LI Xuezhao³

(1. Post-doctoral Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China; 2. Post-doctoral Research Station, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150086, China; 3. Virus-free Seedling Researcher Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China; 4. Life Science College, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: According to 16 S rRNA conserved sequence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, specific primers were designed, and fluorescent quantitation PCR detection system (Taqman) of potato ring rot was established. In the case of definite quantitative determination, the testing capability was $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ($3.21 \times 10^3 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) for real-time quantitative PCR (Taqman). It could detect several copies of genes by fluorescent quantitation PCR detection system (Taqman). The detection system can be established for trace detection of potato ring rot, ensuring the quality of seed potatoes, ware potatoes, and related potato products, thereby improving the market competitiveness.

Key Words: potato; *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*; Real-time Taqman-PCR

马铃薯环腐病是由密执安棒形杆菌环腐亚种 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, 简称 CM_S) 引起的一种危害输导系统的细菌性病害^[1], 以带病种薯为主要传播途径, 病害严重时可造成大幅度减产^[2], 病害较轻时也影响马铃薯品质。国际上已把该病害列为重要的进出口植物检疫对象, 要求种薯带病允许率为“0”^[3]。

马铃薯环腐病在种薯中存在肉眼无法观察的潜伏侵染, 这种侵染逐代累积、逐渐表现症状, 进而造成危害, 这是该病无法根除的根本原因。因此, 对马铃薯种薯中微量环腐病菌检测方法进行研究是十分必要的。

在我国, 目前实际应用的马铃薯环腐病鉴定检测技术有革兰氏染色、DAS-ELISA 等^[4], 然而这些

收稿日期: 2010-08-11

基金项目: 马铃薯产业创新体系 (NYCYTX-15); 黑龙江省科技厅重大攻关项目 (GA08B102), 农业部 948 项目 (2008-Z23); 黑龙江省博士后启动基金 (LBH-Z07023)。

作者简介: 魏琪 (1981-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为马铃薯细菌病害检测技术。

* 通信作者: 李学湛, 研究员, 研究方向为马铃薯栽培与病害综合防治, E-mail: tdm2004@126.com。

方法检测周期长、灵敏度低,尤其是对潜伏侵染病原菌的检出率不够理想,因此需要新方法来解决现有问题。因此,建立一套快速、准确、灵敏、可靠的马铃薯环腐病菌微量分子检测方法,对于保证各级种薯、商品薯及其相关产品的质量,提高市场竞争力具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究所使用的3种细菌菌株(马铃薯细菌病害的主要致病菌)均为本单位收集及保存(表1)。并从市场购买马铃薯薯块,共10个。以上供试材料中马铃薯环腐病菌用于目的基因的扩增,并与其它供试材料用于检测体系的应用。

表1 供试菌株名称和来源

Table 1 Name and resource of experiment strains

名称 Name	拉丁名 Latin name	标号 Number	来源 Resource	采集时间 Year
环腐病菌 Ring rot pathogen	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	CMS1 CMS2 CMS3 CMS4 CMS5 CMS6 CMS7	CIP 黑龙江巴彦 黑龙江巴彦 黑龙江克山农场 黑龙江克山农场 黑龙江克山农场 黑龙江克山农场	2006 2007 2007 2006 2007 2007 2008
青枯病菌 Bacterial wilt pathogen	<i>R. solanacearum</i>	RS1 RS2 RS3	CIP 广西北海 广西惠州	2006 2007 2007
黑胫病菌 Black leg pathogen	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	EC1 EC2 EC3	黑龙江呼兰 甘肃 内蒙古	2007 2007 2007

1.2 主要仪器与设备

实时定量PCR仪为ABI 7500实时荧光PCR仪;引物由上海生工公司合成;ABI Taqman Gene Expression Master Mix反应试剂盒及ABI SYBR Green PCR Master Mix反应试剂盒购自欧比特仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 实时定量荧光PCR的引物及探针的设计

根据Genebank中的登录号为AM41069的*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*部分16S

rRNA基因序列,使用Primers 5.0软件设计马铃薯环腐病菌常规PCR的特异性扩增引物片段长度为541 bp。引物由上海生工生物公司合成,引物序列:

HF 5-1: 5'-CCGACTCTGGGATAACTG-3'

HF 3-1: 5'-ATTCCACCGCTACACCAG-3'

所得到的特异性扩增目的片段与克隆载体(pMD18-T)连接构建重组质粒,并转化大肠杆菌。测序后,以该目的片段为基础,设计实时荧光定量PCR的引物。

通过引物设计采用软件AlleleID 6.0,自动进行荧光引物的同源性检索和长度设定。设计马铃薯环腐病菌的实时定量荧光PCR引物QHF 5/QHF 3(拟扩增片段长142 bp)和探针HFP。

QHF5: 5'-CTGGGATAACTGCTAGAAATGG-3'

QHF3: 5'-CGTCGTAGGCTTGGTGAG-3'

HFP: 5' (FAM)-TTCGCTTGGGGATGGACTCGCGGCC (TAMRA)-3'

1.3.2 定量PCR标准样品的制备

以上述重组质粒作为阳性对照和标准阳性样品。制备的重组质粒DNA原液用紫外分光光度计测定其纯度和浓度后,将重组质粒DNA进行十倍质量浓度梯度稀释制成一系列的标准样品,通过公式转换成模板拷贝数浓度(Copy Number, CN):

$CN = (M \times N) / (L \times D)$, 其中M=质量浓度($g \cdot mL^{-1}$);

N=阿佛加德罗常数($6.022 \times 10^{23} \text{ copy} \cdot \text{mol}^{-1}$);

L=核酸分子长度(总长度=靶片段+载体,单位kb);

D=转换因子(对dsDNA为 $6.6 \times 10^5 g \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{kb}^{-1}$)。

1.3.3 马铃薯环腐病菌实时定量荧光检测的特异性分析

以标准阳性样品(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , $10^{-6} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)为模板,用设计合成的实时荧光PCR引物进行实时荧光PCR(SYBR Green I法)扩增,检测设计的荧光引物的特异性。

1.3.4 马铃薯环腐病菌实时定量荧光PCR检测

将所有样品放入7500实时定量荧光PCR仪反应板上,设置反应条件,进行实时定量荧光PCR检测,反应结束后,设置分析软件的基线和阈值,最后得到每个样品的CT值。反应体系如下:

ABI荧光试剂25.0 μL ,上游引物($10 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)5.0 μL ,下游引物($10 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)5.0 μL ,探针为

(25 mM) 5.0 μL , DNA 样品为 5.0 μL , 去离子水为 5.0 μL 。反应条件: 第 1 个循环为 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 第 2 个循环为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 后 50 个循环为 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。

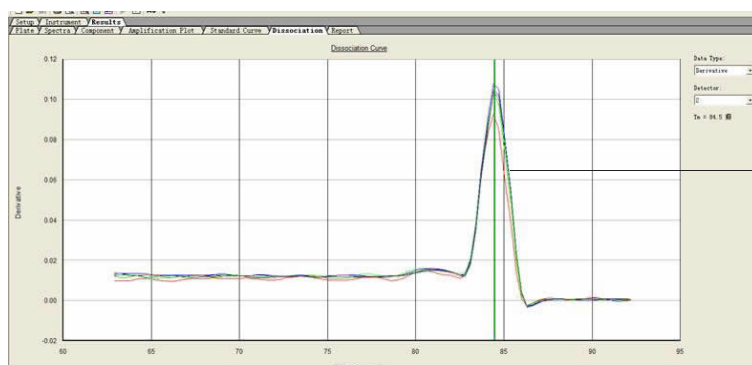
1.3.5 标准曲线建立和检测的灵敏度分析

依次按 10 倍稀释, 即由 10^{-1} 逐级至稀释 10^{-15} , 然后按照优化的荧光 PCR 反应条件进行标准曲线的绘制。其中灵敏度为梯度稀释的标准样品在多次重复的 PCR 扩增过程中能够给出稳定的阳性结果的最低浓度。

2 结果与分析

2.1 马铃薯环腐病菌实时定量荧光检测的特异性分析

以标准阳性样品 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 为模板, 用设计合成的实时荧光 PCR 引物进行实时荧光 PCR (SYBR Green I 法) 扩增, 获得融合曲线 (图 1)。从图中可知, 整个溶解曲线只有一个尖锐的峰, 说明没有其它长度的扩增片段, 即所设计的荧光引物特异性良好。



模板为 $10^{-1}\sim 10^{-6}\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
的重组质粒 DNA

图 1 同一试验中对实时定量荧光 PCR (SYBR Green I) 产物进行的熔解曲线分析

Figure 1 The melting curve of the Real-time quantitative PCR product (SYBR Green I)

2.2 标准曲线建立和检测的灵敏度分析

用标准阳性样品来制作标准曲线。起始浓度为 10^{-1} $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 依次按 10 倍梯度稀释, 稀释至 $10^{-15}\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。其中, 以水做阴性对照的反应体系没有 Ct 值, 即没有扩增产物; $10^{-1}\sim 10^{-15}$ 的 Ct 值分别是 11.51、14.73、18.98、22.77、25.7、29.0、30.87、32.13、33.38、32.85、31.89、32.4、33.32、33.51、34.22。其中, 标准样品浓度在 $10^{-1}\sim 10^{-6}$ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时,

Ct 值曲线的相关系数达 0.995, 斜率是 -3.546946, 即曲线线性关系良好, 可作为实时荧光 PCR 定量检测的标准曲线 (图 2、3)。综合上述结果, 所建立的环境病菌荧光定量 PCR (Taqman 法) 可进行定量分析时检测下限为 1 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 即标样浓度 $10^{-6}\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 对应靶片段拷贝数 $3.21\times 10^3\text{copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

另外, 本研究中环腐病菌重组质粒 DNA 浓度梯度共有 15 个, 均进行了扩增。其中 $10^{-1}\sim 10^{-9}$ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的

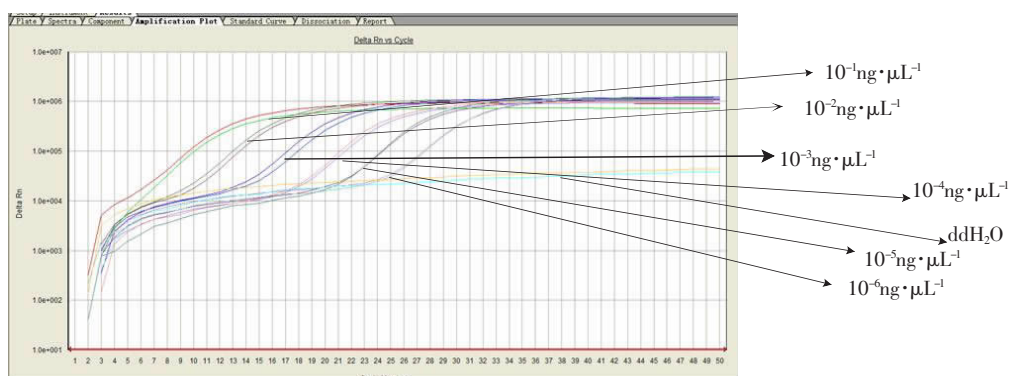


图 2 标准品的实时荧光 PCR 扩增

Figure 2 Standard sample amplification of fluorescent quantitation PCR detection

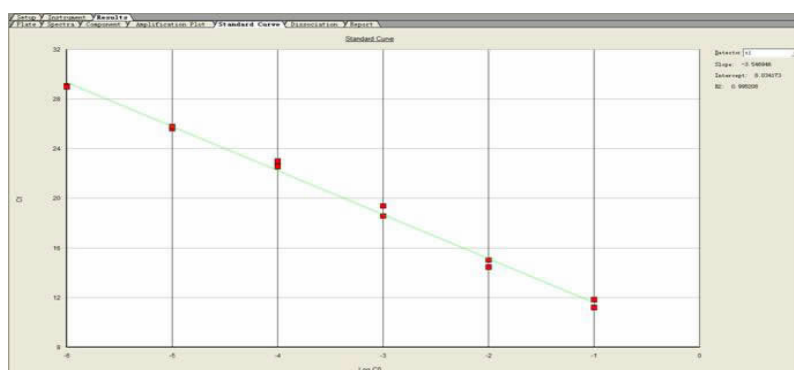


图 3 标准曲线

Figure 3 Standard curve of fluorescent quantitation PCR detection

扩增结果见图 4。从图中可看出, 当重组质粒浓度达到 $10^{-9} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时, 所建立的 Taqman 实时荧光定量 PCR 检测体系也可以有扩增曲线出现, 此时相对应的拷贝数是几个拷贝, 而此时的 CT 值已经不在标准曲线范围内, 所以不能进行准确的定量判断, 但可作为定性的判断参考。综上可知, Taqman 实时荧光定量 PCR 检测法的最低检测限度可达几个拷贝的目的基因, 其检测灵敏度高于实时荧光定量 PCR (染料

法) 检测法, 而且检测准确性也相对更高。

2.3 实时定量 PCR 检测体系的应用

采用马铃薯环腐病菌荧光定量 PCR (Taqman 法) 检测体系对市场上的马铃薯 10 个块茎、被检阳性菌株 (CMS1~7) 和阴性菌株 (RS1~3, EC1~3) 进行检测, 扩增结果如图 5 所示。从图中可知, 在检测中, 只有被检的阳性菌株有扩增曲线出现, 而其余被检样品均没有扩增曲线。

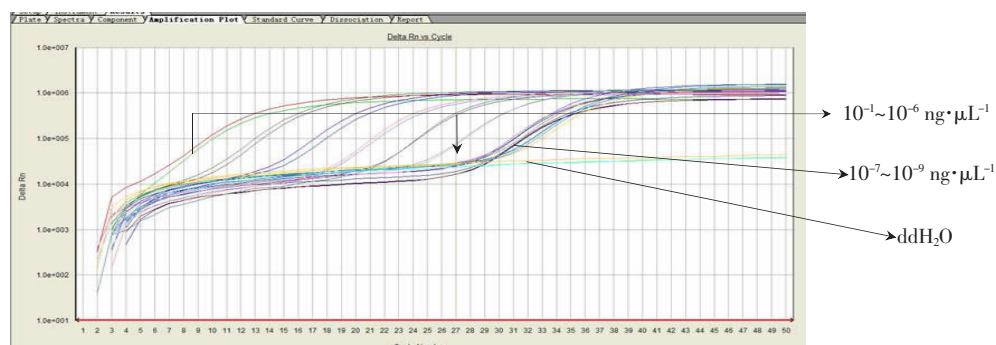
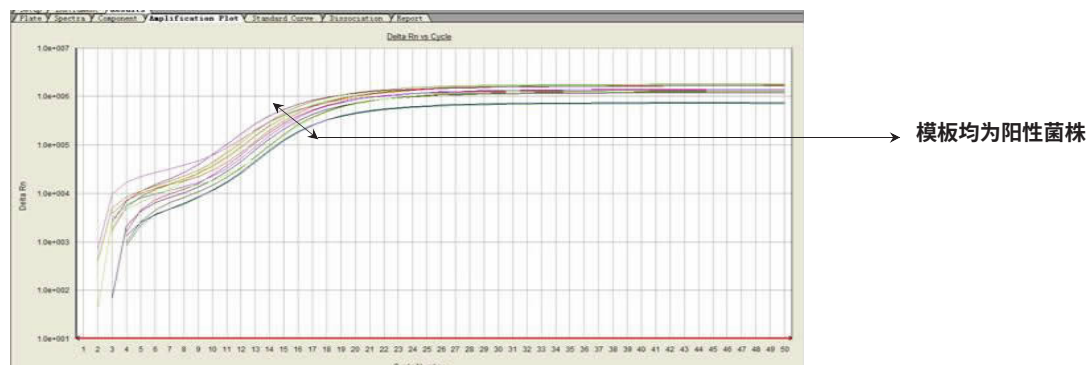
图 4 浓度为 $10^{-1} \sim 10^{-9} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 标准品的实时荧光 PCR 扩增Figure 4 Standard sample ($10^{-1} \sim 10^{-9} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) amplification of fluorescent quantitation PCR detection

图 5 样品的实时荧光 PCR 扩增

Figure 5 Sample amplification of fluorescent quantitation PCR detection

3 讨 论

随着分子生物学实验技术的发展, 将稳定、准确、灵敏的实时定量荧光PCR (Real-time PCR) 技术应用于病原菌的鉴定检测成为可能。实时荧光定量 PCR 技术自1996 年诞生以来, 由于它显著的优越性, 已经应用到病原微生物和细胞因子基因表达定量检测、基因突变分析等多个领域^[5-7]。该技术检测病原 DNA 不仅可以定性, 还可以定量^[8-12]。

荷兰、加拿大、英国等马铃薯的重要生产国都已建立了完善的马铃薯环腐病 Real-time Taqman-PCR 检测体系, 对种薯进行严格的检测^[13]。然而, 在我国只是有极少数科研人员进行了这方面的科学研究^[14], 而完善的检测体系尚有待于进一步开发和应用。

本研究小组构建了稳定的马铃薯环腐病 Real-time Taqman-PCR 检测体系, 该检测体系可以准确、稳定的检测出样品中最低浓度为 $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (即 $3.21 \times 10^3 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 的目的基因, 与 Schaad^[13]的报道的一致。研究表明, 该检测体系的检测下限甚至可以达到几个拷贝, 但是在这种病原菌处于痕量的情况下, 荧光信号量与样品中目的基因含量不成线性关系, 不能进行病原菌定量分析, 因此在这种情况下该检测体系给出的检测结果仅能用于参考, 在结合了实际情况后方可进行判断。此外, 本研究中只采用了数量较小的马铃薯块茎进行检测体系应用的实验, 其中并未检出阳性结果。因此, 本研究将扩大检测范围, 应用所建立的马铃薯环腐病 Real-time Taqman-PCR 检测体系进行大量的块茎检测并开展植株检测, 为该检测体系的实际应用奠定更为全面的实验基础。

马铃薯环腐病 Real-time Taqman-PCR 检测体系的建立, 不仅可以提高黑龙江省乃至全国在马铃薯环腐病上的检测水平, 同时也为马铃薯种薯及商品薯生产中控制马铃薯环腐病的大范围发生及扩散提供良好的技术支持, 为保证马铃薯种薯进口安全性及我国种薯出口提供重要的质量检测保证。目前, 国内对该病害的检测多集中于血清学原理的检测方法, 而国外在分子水平检测方法已经相对成熟。因此, 本研究可填补我国在这一领域的空白。该检测体系的建立同时也为马铃薯其它病原菌检测技术的研究提供重要的参考。

[参 考 文 献]

- [1] 任欣正. 植物病原细菌的分类与鉴定[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 200.
- [2] 程天庆. 马铃薯栽培技术[M]. 北京: 金盾出版社, 1991: 117-121.
- [3] De Boer S H, Slack S A. Current status and prospects for detecting and controlling bacterial ring rot of potatoes in North America [J]. Plant Disease, 1984, 10: 841-844.
- [4] 何云霞, 张濡喜, 白艳菊, 等. 马铃薯环腐病菌鉴定检测技术研究进展[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(3): 159-162.
- [5] Takahashi T, Tamura M, Asami Y, et al. Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA: Clinical application for diagnosis of tuberculous meningitis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(5): 1698-1707.
- [6] Yoder K E, Fishel R. Real-time quantitative PCR and fast QPCR have similar sensitivity and accuracy with HIV cDNA late reverse transcripts and 2-LTR circles[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 153(2): 253-256.
- [7] Peiris J S, Poon L L. Detection of SARS coronavirus in humans and animals by conventional and quantitative (real time) reverse transcription polymerase chain reactions[J]. Methods Mol Biol, 2008, 454: 61-72.
- [8] Schnerr H, Niessen L, Rudi F, et al. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by Light Cycler TM PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71: 56-61
- [9] Schweigkofler W O, Donnell K, Garbellottom, et al. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 3512-3520.
- [10] Gachon C, Saindrenan P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42: 367-371.
- [11] Brouwer M, Lievens B, Van Hemeleirjck W, et al. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 228: 241-248.
- [12] Ros B, Mohler V, Wenzel G, et al. *Phytophthora infestans* - triggered response of growth- and defense-related genes in potato cultivars with different levels of resistance under the influence of nitrogen availability[J]. Physiol Plant, 2008, 133(2): 386-396.
- [13] Schaad W. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tuber by Bio-PCR and an automated real time fluorescence detection system [J]. Plant Disease, 1999, 83: 1095-1110.
- [14] 赵文军, 朱水芳, 夏明星, 等. 利用 Real-Time PCR 从无症种薯上快速检测马铃薯环腐病菌[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(增刊): 9.