

基于环式等温扩增的烟草青枯病病原菌快速检测方法

贾蒙骜¹ 陈兴江¹ 林叶春^{1,2} 商胜华^{1*}

(1. 贵州省烟草科学研究院 烟草行业烟草分子遗传重点实验室, 贵阳 550081;
2. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘要 针对烟草青枯病的防控, 开发快速、高效的病原菌检测方法是必要的。环式等温扩增(LAMP)是一种在等温条件下快速完成靶标基因扩增的新方法。将青枯病菌贵州分离株 FQY4 基因组序列(NCBI 号:CP004013)与其他已发表菌株序列比对分析, 确定编码鞭毛蛋白的 *fliC* 基因的保守区域可被选作检测靶标。根据 LAMP 原理以及靶标序列的特点, 设计了一组由 6 条引物组成的环式等温扩增反应体系。结果表明:61 °C 条件下孵育 45 min, 可完成对青枯病病原菌单菌落和带菌烟草叶片的检测, 结果判定可以通过颜色变化被肉眼直接识别, 也可以通过琼脂糖凝胶电泳检测。通过这种新方法, 可以实现对青枯病菌菌落的快速鉴别, 还可以用于对田间疑似带病烟草植株的快速检测。

关键词 烟草; 茄科劳尔氏菌; *fliC* 基因; 环介导的等温扩增

中图分类号 S 435.72

文章编号 1007-4333(2014)01-0093-06

文献标志码 A

Rapid and sensitive detection method for *Ralstonia solanacearum* based on Loop-mediated isothermal amplification

JIA Meng-ao¹, CHEN Xing-jiang¹, LIN Ye-chun^{1,2}, SHANG Sheng-hua^{1*}

(1. Key Laboratory of Molecular Genetics, Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China;
2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Tobacco bacterial wilt disease, caused by *Ralstonia solanacearum*, is one of the most important biotic stresses for tobacco production in Guizhou province, southwest China. It is necessary to develop a rapid and sensitive pathogen detection method for wilt disease management. Here we reported a new detection strategy based on Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for *Ralstonia solanacearum* diagnosis. Referring to the genome of *Ralstonia solanacearum* FQY4 (NCBI accession No. CP004013), which is the dominant strain in Guizhou province, aligned with the published sequences of other strains, the *fliC* gene which encoded the flagellar protein, was chosen as the detection target. We designed a set of 6 LAMP primers based on the sequence of the conserved region of *fliC* gene, and optimized the reaction condition as 60 min at 60 °C. The amplification result, which reflected whether the pathogen existed or not, could be visual detected by colors identification, or could be presented as ladder-like bands pattern by the DNA product electrophoresis in agarose gel. Using this method, not only the *Ralstonia solanacearum* isolated colony but also the tobacco plant carrying pathogen could be identified rapidly and accurately.

Key words tobacco bacterial wilt disease; *Ralstonia solanacearum*; *fliC* gene; Loop-mediated isothermal amplification

在我国西南主要烟区, 青枯病是烟叶生产面临的主要风险。青枯病的病原为茄科劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*), 其寄主范围很广, 目前

已知可侵染的作物超过 200 种^[1]。目前, 已经有多个 *Ralstonia solanacearum* 菌株的基因组序列被陆续公布, 其中 GMI1000 菌株的测序结果公布最早,

收稿日期: 2013-07-23

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2013]2194 号); 中国烟草总公司贵州省公司科技计划项目(201022)

第一作者: 贾蒙骜, 助理研究员, 主要从事植物病理学研究, E-mail: jiamengao@cau.edu.cn

通讯作者: 商胜华, 副研究员, 主要从事烟草植保研究, E-mail: ssh6688@163.com

且注释信息最详细^[2]。贵州烟区青枯病病原菌主要是1号生理小种,FQY4菌株是典型代表,通过全基因组测序分析表明,FQY4与GMI1000菌株序列具有高度同源性^[3]。在*Ralstonia solanacearum*基因组编码的众多蛋白中,*flic*基因编码鞭毛亚基蛋白^[4],N-端和C-非常保守,但是中间区域变异明显,这个特点使得*flic*基因常被作为高特异性、高灵敏性检测方法的靶标^[5]。

与需要2条引物的传统PCR检测方法^[6]不同,环介导的等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification,LAMP)需要一组可以靶向目标基因6个区域的6条特殊引物,在60~65℃恒温条件下,通过具有链置换活性的Bst(*Bacillus stearothermophilus*)DNA聚合酶催化,使靶基因高效扩增^[7]。该技术可以在15~60min内使模板DNA扩增 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍,扩增产物可以通过传统的琼脂糖凝胶电泳来检验,也可以将反应产物以SYBER Green染料染色后,直观的通过肉眼分辨^[8]。本研究通过选取*fliC*基因片段作为检测靶标,利用环介导等温扩增的技术手段简单、快速的实现青枯病的检测,旨在为青枯病早期诊断提供一种切实可行的方法,对于控制青枯病的发生蔓延以及重大损失的发生具有重要意义。

1 材料及方法

1.1 试验材料及设备

1.1.1 植物材料及菌株

青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)FQY4菌株由本实验室保存;疑似青枯病发病烟叶采自贵州省黔南州福泉市陆坪镇,烟草类型为烤烟(*Nicotina tabacum* L.),品种为贵烟2号;健康烟叶取自贵州省烟草科学研究院温室,烟草类型为烤烟,品种为贵烟2号。

1.1.2 生化试剂

植物基因组提取试剂盒购自北京天根生化;Taq DNA聚合酶和dNTP购自于Promega公司;甜菜碱和Bst DNA聚合酶购自NEB公司;其他化学试剂均为分析纯,购自国药集团。

1.1.3 设备

水浴锅,PCR仪(Bio-Rad C1000 thermal cycler)。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌培养基的配制

TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)固体培养基

(1L):蛋白胨(peptone)10g,葡萄糖10g,干酪素1g,加水800mL溶解后调pH至7.2后定容至1000mL,最后加入琼脂20g,121℃灭菌15min;使用前加入经过滤灭菌、浓度为5%的TTC1mL。

NA液体培养基(1L):牛肉浸膏10g,蛋白胨5g,加入水800mL,调pH至7.0后,定容至1000mL,然后分装灭菌。

1.2.2 菌落基因组模板快速制备

准备培养好的烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)、胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜亚种(*Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora*)和大肠杆菌工程菌的划线平板,用灭菌牙签分别在每个平板上挑取一个单菌落于100μL裂解缓冲液(20nmol/L Tri-Hcl,pH 8.0;2nmol/L EDTA,1.2% Triton-100)中悬起,沸水浴10min,冰上冷却,粗裂解液直接作为检测模板。

1.2.3 烟草叶片基因组提取

取0.1g烟草叶片,以液氮研磨至粉末,然后按照天根基因组DNA提取试剂盒说明书完成;基因组DNA浓度和质量检测使用Nano drop分析检测。

1.2.4 LAMP引物设计

选择*Ralstonia solanacearum*的*fliC*作为检测靶标。根据本实验室获得的FQY4菌株基因组数据,同时与NCBI上收录的*fliC*基因序列相比对,首先选出若干保守区域;之后根据靶标去序列设计引物,比较各组引物的GC含量、发夹结构形成倾向、自身配对倾向等指标选择最优化的组合。所设计引物热力学特征比较均是通过MFOLD软件完成。

1.2.5 LAMP反应体系^[9]

反应体系设定为25μL,体系中引物FIP和BIP浓度为1.6μmol/L,引物F3和B3浓度为0.2μmol/L,loop引物浓度0.4μmol/L,dNTP浓度400μmol/L,甜菜碱1.0mol/L,Tris-HCl(pH 8.8)浓度20mmol/L,KCl浓度10mmol/L,(NH₄)₂SO₄浓度10mmol/L,MgSO₄浓度6mmol/L,1% Triton X-100,另外加入模板DNA,然后加入8个单位的Bst DNA聚合酶大亚基,然后立即混匀,加入20μL矿物油,混匀后离心10s,最后整个反应体系61℃孵育45min。

1.2.6 结果检测

LAMP反应产物的颜色反应判定是在反应结束后,在反应体系中加入1μL的SYBR Green染色

剂,然后颠倒混匀,观察颜色的变化,实验结果通过 Nikon P510 相机记录;LAMP 产物电泳分析是将 2 μ L 反应产物在 2% 的琼脂糖凝胶中以 85V 的恒压电泳 90 min,之后凝胶以 EB 染色,凝胶成像仪扫描拍照;PCR 产物电泳分析是将 2 μ L 反应产物在 1% 的琼脂糖凝胶中以 120V 恒压电泳 20 min,之后 EB 染色、成像。

2 结果与分析

2.1 检测靶标的选取及引物设计

对于环式等温扩增检测技术,引物设计是核心,

也是不同于 PCR 的最大区别^[7]。按照 1.2.4 的方法,将贵州烟区分离的菌株 FQY4 基因组测序数据^[3]与 NCBI 公布的基因组数据相比对,最终确定 *fliC* 基因的 380~720 bp 区域有多段核酸序列适合设计环式等温扩增的引物(图 1)。根据目标区的序列特点及引物设计原则,设计了一组(由 6 条引物组成)引物(表 1)。其中上游内引物(FIP)由 F1c(F1 序列的互补序列)和 F2 序列拼接而成,下游引物由 B1c(B1 序列的互补序列)和 B2 序列拼接而成,外引物 F3 和 B3 是扩增反应的出发点,环引物 Loop F 和 B 则是用于提高反应效率。

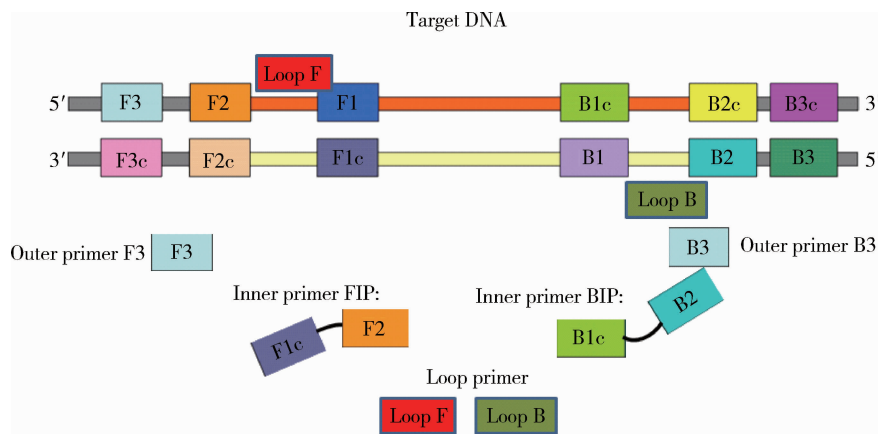


图 1 LAMP 引物设计原理

Fig. 1 Principle of designing LAMP primers

表 1 用于环式扩增 *fliC* 基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for Loop-mediated isothermal amplification the target gene *fliC*

引物 Primers	Sequence 引物序列
F3	CTGAGTACAACGCAGACC
B3	GTAGGCCCGAGAATCATC
FIP(F1c+F2)	CCGATGAAGTGTGCCCCGATTTCAAGTTGCAGGTCACG
BIP(B1c+B2)	GTCCTCAGCCTCAATACCAACGACTTTTGCAGAGCGGAC
LoopF	AATACTTGTTCGGCTAGGC
LoopB	ATCTCGTCCCTGCAAACG

2.2 青枯病环式等温扩增检测技术(LAMP)的建立

这项技术是或否可以用于青枯病的检测,首先要验证是否可以准确识别已知的 *Ralstonia solanacearum* 菌落。采用 1.2.1 所述方法,制备青枯菌单菌落 DNA 模板,同时以胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜亚种和大肠杆菌工程菌的单菌落 DNA 作

对照,采用 1.2.4 的体系进行 LAMP 检测。反应结束后,在反应产物中加入 SYBR Green 显色液,并混合均匀,这时候阴性反应产物(以欧文氏和大肠杆菌工程菌为模板)呈现出显色液原有的橙色,而阳性反应产物(以青枯菌为模板)则会使显色液变为绿色(图 2(a))图中作相应修改。同时,将已呈现不同颜

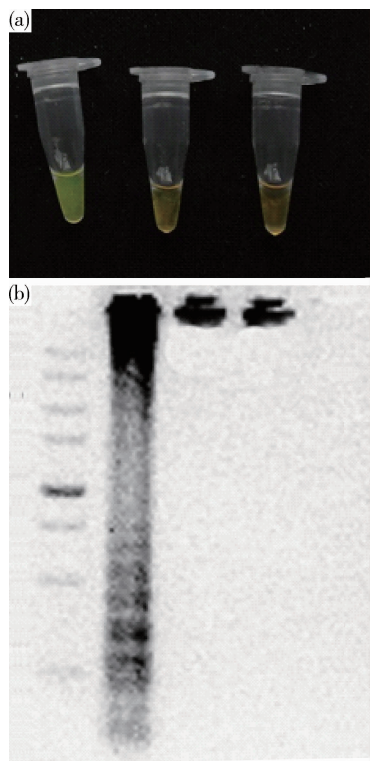


图2 LAMP用于青枯菌单菌落检测

Fig. 2 Detection of *R. solanacearum* colony by loop-mediated isothermal amplification reaction

色的反应产物按照 1.2.6 的方法进行琼脂糖电泳检测,与颜色反应结果一致,只有以青枯菌单菌落 DNA 为模板的反应产物检测到呈现梯状分布的电泳条带(图 2(b))。以上结果说明,环式等温扩增的方法以及设计的引物可以成功、特异的检测 *Ralstonia solanacearum*。

2.3 利用 LAMP 技术进行菌落快速筛选

经典的青枯病病原菌的筛选分离是以细菌对不同的培养基的选择性,以及在不同培养基上菌落的形态差异为基础,然后结合 PCR 检测来判定(有时还需结合 PCR 产物测序结果)^[6],整个检测过程耗时短则几个小时,长则会达到几天。为了对比 LAMP 检测法与传统 PCR 筛选方法在快捷性和方便性的差异,在细菌平板培养基上挑取了 7 个单菌落,采用 1.2.5 的方法体系制备模板,分别采用 LAMP(见 1.2.5, 1.2.6)和普通 PCR 的方法^[10-11]进行菌落筛选鉴定。通过比较试验结果可以发现(表 2),2 种方法结果准确性相当,但是 LAMP 与常规 PCR 检测相比,反应时间节约至少为 50%(如果计算电泳检测时间,节约比例更大)。同时,由于 LAMP 检测只需一台水浴锅,因此对仪器设备依赖性极小。

表 2 LAMP 与传统 PCR 在菌落筛选中的比较

Table 2 Difference between LAMP and traditional PCR in colony screening

菌落 Colony	LAMP 筛选 Screening by LAMP				PCR 筛选 Screening by PCR			
	结果 Result	使用仪器 Apparatus	是否电泳 Electro. or not	时间/min Time	结果 Result	使用仪器 Apparatus	是否电泳 Electro. Or Not	时间/min Time
1 #	+				+			
2 #	+				+			
3 #	-				-			
4 #	-	水浴锅	否	45	-	PCR 仪	是	90
5 #	+				+			
6 #	-				-			
7 #	+				+			

2.4 应用 LAMP 技术对疑似发病烟叶的带菌检测

除了对菌落的鉴定,能否用于田间潜在带病植株的检测也是对一种成熟检测技术的基本要求。本研究在已开始发生青枯病的烟田中,选取相邻的、处于团棵期的 2 棵烟株作为检测对象。其中一株烟叶呈现半侧萎蔫、茎基部已出现黑色点条斑的发病典

型特征;另一株暂时无症状,但是由于 2 株烟株紧挨,因此带菌风险性很大。2 株烟株均采集靠近茎基部片叶作为检测对象,按照 1.2.2 的方法提取烟草叶片基因组 DNA,同时,提取健康烟叶基因组 DNA 作为阴性对照。测定浓度后,各取 50 ng 的基因组 DNA 作为模板,按照 1.2.4 的反应体系进行

检测。反应结束后在反应产物中加入 SYBR Green I 染料,混匀后结果显示,健康叶片对应的反应产物为橙色,表示阴性;而取自发病烟田的 2 株对应的反应产物均为绿色(图 3(a))表示阳性;另外,反应产物电泳检测结果与颜色反应的结果一致(图 3(b))。由此说明,应用 LAMP 技术可以对疑似发病烟叶的情况进行检测,特别是对尚未出现症状的烟株进行早期带菌检测。

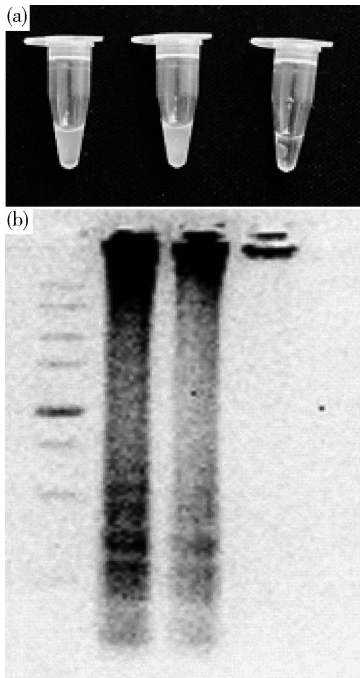


图 3 LAMP 法检测烟草叶片中病原菌的检测

Fig. 3 *R. solanacearum* detection in plant leaves by loop-mediated isothermal amplification reaction

2.5 LAMP 检测技术与普通 PCR 检测的灵敏度比较

为了对比 LAMP 检测法和普通 PCR 检测法灵敏度的差异,以 1.0×10^8 cfu/mL 菌液为母液,通过加入无菌水,分别制备 1.0×10^6 、 1.0×10^4 和 1.0×10^2 cfu/mL 浓度菌液,以 1.2.2 的方式制备检测反应模板,然后分别采用 LAMP 法(见 1.2.5, 1.2.6)和 PCR 检测法(参见文献[10-11])进行检测。通过比较检测结果可以看出(表 3),PCR 检测灵敏性可以达到 10^4 cfu/mL;而是用 LAMP 检测时,当病原菌浓度为 10^2 cfu/mL 时,通过 SYBR Green I 染色法仍然可以检测到阳性,电泳检测也可以看到扩增的条带。以上数据说明,采用 SYBR Green I 染色的 LAMP 检测,灵敏度至少要比 PCR 高 1~2 个数量级。

表 3 LAMP 与 PCR 对青枯菌检测灵敏的比较

Table 3 Comparison between LAMP and traditional PCR in sensitivity for *R. solanacearum* detection

菌液浓度/ (cfu/mL) Concentration of beeterium	LAMP(染色法) LAMP by color identification	LAMP(电泳法) LAMP by electrophoresis detection	PCR 检测 PCR test
10^8	+	+	+
10^7	+	+	+
10^6	+	+	+
10^5	+	+	+
10^4	+	+	+
10^3	+	+	-
10^2	+	+	-
10	-	-	-

3 讨论

3.1 烟草青枯病病原菌快速检测方法的建立

成熟的烟草青枯病病原菌的鉴定检测方法有很多,但是无论是最经典的平板培养基分离纯化法,还是基于 PCR 的分子生物学法^[5-6,12],都无法解决操作复杂,设备要求较高的缺点。基于环式等温扩增技术(LAMP)的检测方法则可以大大简化检测操作,明显缩短检测时间。通过在已有文献报道基础^[9]上优化设计的青枯病病原菌专用引物,只需将整个反应体系放入一个 61°C 的水浴锅 45 min,立即可以做出结果判断,这样既免去了 PCR 仪的昂贵设备的使用,而且检测时间大大缩短。同时,由于环式等温扩增技术(LAMP)能够使模板 DNA 实现 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍的扩增,如果配合合适的环引物(Loop primer),检测下限有可能进一步提高^[13],因此,采用着这项检测技术使得对土壤、灌溉水等低带菌量样品的快速检测成为可能,在生产一线的应用前景广阔。

目前,选择的检测靶标,是以实现青枯病病原高效检出为目的,还无法实现青枯病病理小种的区分。进一步选取既能保证检出灵敏度,又能实现病理小种区分的检测靶标,是完善 LAMP 法检测青枯病的进一步要求。

3.2 LAMP 技术用于病原检测的未来发展趋势

环式等温扩增技术凭借其操作简单、快捷,结果

判别方便的特点,特别适合于简易实验条件下开展分子检测。随着技术的进步,LAMP发展成实时检测技术的结合,成为可能^[14]。根据LAMP反应的副产物焦磷酸根可以夺取与钙黄绿素结合的锰离子,从而使钙黄绿素释放荧光的原理,可以开发出准确的荧光实时定量监测系统^[15];根据LAMP产生的焦磷酸根还可以与反应体系中的 Mg^{2+} 结合,出现大量沉淀,可以开发出浊度实时监测系统^[16]。基于这些特性,LAMP的实时荧光检测法和实时浊度检测法已有报道^[16-18]。采用这2种检测方法这不仅可以大大提高发硬的准确性,还会进一步降低LAMP法可能存在的假阳性问题。

致谢 衷心感谢中国农业大学植物病理系张立群教授赠予胡萝卜软腐欧文氏菌菌株及其提供的帮助。

参 考 文 献

- [1] 霍沁建,张深,王若焱.烟草青枯病研究进展[J].中国农学通报,2007,23(8):364-368
- [2] Salanoubat M,Genin S,Artiguenave F,et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* [J]. Nature, 2002,415:497-502
- [3] Cao Y,Tian B,Liu Y,et al. Genome sequencing of *Ralstonia solanacearum* FQY_4, Isolated from a bacterial wilt nursery used for breeding crop resistance[J]. Genome Announc, 2013, 1:E00125-13
- [4] Trans-Kersten J, Huang H, Allen C, et al. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive on tomato [J]. J Bacteriol,2001,183:3597-3605
- [5] Schonfeld J, Heuer H, Van Elsas J D. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments[J]. Appl Environ Microbiol, 2003,23:479-486
- [6] Jensen M, Webster J, Straus N, et al. Rapid identification of bacteria on the basis of PCR ribosomal DNA spacer polymorphisms[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:945-952
- [7] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res,2000, 28:E63
- [8] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. Biochem Biophys Res Commun,2001,289:150-154
- [9] Kubota R, Vine B G, Alveraz A M, et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification [J]. Phytopathology,2008,98:1045-1051
- [10] Chen Y,Zhang W Z,Liu X,et al. A real-time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacearum* in horticulture soil and plant tissue[J]. J Microbiol Biotechnol, 2010,20:193-201
- [11] 贾春燕.烟草青枯病菌的分子检测与烟草品种抗病性研究[D].泰安:山东农业大学,2011
- [12] Weller S,Elphinstone J,Smith N,et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (Taqman) assay[J]. Appl Environ Microbiol, 2000,66:2853-2858
- [13] Nagamine K,Hase T,Notomi,T. Accelerate reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cell Probe,2002,16:3-229
- [14] Thai H,Le M,Vuong C,et al. Development and evaluation of a novel loop-mediate isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. J Clin Microbiol,2004,42:956-1961
- [15] Norihiro T, Yasuyoshi M, Hidetoshi, K, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. Nature Protocols,2008, 3:877-882
- [16] Mori Y,Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for qualifying template DNA[J]. J Biochem Biophys Method,2004,9:45-157
- [17] Bühlman A, Pothier J, Rezzonico F, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight[J]. J Microbiol Method,2013,92(3):332-339
- [18] Mahony J, Chong S, Bulir D, et al. Development of sensitive Loop-mediated isothermal amplification assay that provides specimen-to-diagnosis of respiratory syncytial virus infection in 30 minutes[J]. Clin Microbiol,2013,51(8):2696-2701

责任编辑:王燕华