

番茄溃疡病菌的环介导等温核酸扩增技术检测方法

封立平*, 尼秀媚, 魏晓棠, 邵秀玲, 吴兴海, 厉艳

(山东出入境检验检疫局, 青岛 266002)

摘要: **目的** 建立番茄溃疡病菌的环介导等温核酸扩增技术检测方法。**方法** 应用环介导等温核酸扩增技术(LAMP)对番茄溃疡病菌的16S rRNA特异性基因进行扩增,采用4对引物识别目的片段的6个特异性区域,62℃恒温1h完成扩增。**结果** 设计的引物与对照菌皱纹假单胞菌、茄假单胞菌、丁香假单胞菌番茄致病变种都没有扩增反应,表现了较好的特异性。这些对照菌在茄科蔬菜上易引起类似症状。**结论** LAMP检测程序便捷,所需设备简单,其结果可以通过肉眼观察来判断,比常规PCR灵敏且能更早得到反应结果,因此该技术具有更大的优势。

关键词: 番茄溃疡病菌;环介导等温核酸扩增技术;16SrRNA

Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* by loop-mediated isothermal amplification

FENG Li-Ping*, NI Xiu-Mei, WEI Xiao-Tang, SHAO Xiu-Ling, WU Xing-Hai, LI Yan

(Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* by loop-mediated isothermal amplification protocol (LAMP). **Methods** Detection of 16S rRNA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* by a loop-mediated isothermal amplification protocol (LAMP) was evaluated in laboratory assays. LAMP amplified target DNA rapidly (1 h), isothermally (62 °C) and with high-specificity based on four primers designed to recognize six independent sequences of target DNA. **Results** The LAMP primers did not react with suspensions of *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas solanacearum*, and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. The specificity of this LAMP assay was higher than PCR. **Conclusion** This method has convenient testing procedures, the required equipment is simple, and the results can be judged by the naked eye. It is sensitive than conventional PCR reaction and the results can be obtained earlier, so it has a greater advantage of the technology.

KEY WORDS: *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*; LAMP; 16SrRNA

番茄溃疡病是植物上一种毁灭性病害,严重发病的地块番茄减产可达25%~75%。番茄的幼苗、叶

片、茎秆、果实等均可发生此病。幼苗发病时造成植株矮化或枯死;叶片被害时,叶缘卷曲,表现皱缩,

基金项目:质检总局科研项目(2009IK254)

Fund: Supported by Science Foundation of State Administration for Quality Supervision and Inspection and Quarantine Bureau (2009IK254)

*通讯作者:封立平,高级农艺师,主要研究方向为植物病理学。E-mail: feng750613@yahoo.com.cn

*Corresponding author: FENG Li-Ping, Senior Agronomist, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: feng750613@yahoo.com.cn

干枯,凋萎;果实受害时,幼果表现皱缩、畸形,形成“鸟眼斑”。茎秆受害时,变空、下陷,最后植株枯死,茎中会溢出白色菌浓。该病害近几年来发病呈上升趋势,尤其是保护地环境条件适宜极易发生。该病害主要寄主是番茄,还侵染辣椒、龙葵、烟草等47种茄科植物^[1]。

引起番茄溃疡病的番茄溃疡病菌是《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》的检疫性植物病原细菌。该菌主要以带菌种子进行远距离传播,病菌在种子表面或种子内部至少可存活10个月,潜在传入危险性较大。在本实验中选取了皱纹假单胞菌、茄假单胞菌、丁香假单胞菌番茄致病变种作为对照菌,这些对照菌都可在番茄上造成严重的细菌病害,引起植株萎蔫、维管束变褐,症状极其相似。

环介导等温核酸扩增技术是一种体外恒温核酸扩增方法,它是一种灵敏的链置换技术,利用链置换DNA聚合酶在恒温(65℃左右)中1h,即可完成核酸扩增反应。具有操作简便、高特异性、快速高效、灵敏度高、结果易于判断等优点,而且LAMP技术的应用可以大幅度降低核酸试剂的成本,为普及核酸试剂的应用创造条件^[2-3]。本研究根据番茄溃疡病菌的16S rRNA基因设计LAMP引物,实现了对番茄溃疡病菌的特异性检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

本实验所用菌株及对照菌具体信息见表1。

1.1.2 试剂

Bst DNA polymerase large fragment(New England Biolabs); DNA marker(TaKaRa); dNTPs(上海生工); 甜菜碱(betaine)(美国Sigma公司); 琼脂糖(promega); 细菌DNA提取试剂盒(北京天根生物工

程公司); 营养肉汤(北京陆桥技术有限责任公司); SYBR Green I (Molecular Probes)。

1.1.3 仪器

水浴锅(上海森信实验仪器有限公司); 电泳仪(北京六一仪器厂); 凝胶成像系统(Vilber Lourmat)。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养及DNA提取

将目标菌株与对照菌株接于NA固体培养基上,25℃培养直至长出单菌落,挑取单菌落接种于NA液体培养基中,25℃,140 r/min进行震荡培养,36~48 h测定菌液的OD₆₀₀,菌液OD₆₀₀达到1后,吸取1 mL菌液,12000 r/min离心1 min,收集沉淀,根据细菌DNA提取试剂盒说明书进行目标菌与对照菌总DNA的提取(Tiagen 细菌总DNA提取试剂盒)。

1.2.2 LAMP反应引物设计及合成

根据番茄溃疡病菌16S rRNA特异性基因序列设计引物,利用LAMP引物的在线设计软件Primer Explorer Version 3设计LAMP反应的引物,再对产生的备选引物的二级结构进行分析、挑选,以得到特异性的引物序列。所得引物序列由南京金斯瑞生物有限公司合成。

1.2.3 LAMP结果的判断

方法一:凝胶电泳:将LAMP反应的产物,用含溴化乙锭(EB)的1.5%琼脂糖凝胶电泳。在紫外透射仪下观察核酸带。阳性扩增产物凝胶电泳后,可见从点样孔的拖尾现象以及很多不同扩增长度的条带,否则为阴性。

方法二:在扩增后的反应管里加入SYBR Green I后,混匀,肉眼可观察到阳性扩增产物(大量双链DNA)的颜色由无色转为翠绿色,阴性扩增产物转为橙色。

方法三:也可以通过观察扩增后的反应副产物焦磷酸镁白色沉淀的出现判断阳性扩增。

表1 供试菌株情况
Table 1 The tested strains

菌株名称	拉丁学名	来源
阳性菌株	番茄溃疡病菌	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i> (Smith) Davis et al.
对照菌株1	皱纹假单胞菌	<i>Pseudomonas corrugata</i>
对照菌株2	茄假单胞菌	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
对照菌株3	丁香假单胞菌番茄致病变种(番茄细菌叶斑病假单胞菌)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>

1.2.4 LAMP 反应体系

经过反复摸索, 最终确定反应体系为 50 μL , 其中包含: (1)模板预处理反应液 23 μL : 3.2 $\mu\text{mol/L}$ 引物 FIP, 3.2 $\mu\text{mol/L}$ 引物 BIP, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物 F3, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物 B3, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 1 \times Thermol Buffer 2.5 μL , 添加 ddH₂O 至 23 μL 。引物 FIP、BIP、F3 与 B3 的终浓度比为 8:8:1:1。

(2)溶液 I 25 μL : 1 \times Thermol Buffer (2.5 μL), 8 U/ μL *Bst* DNA Polymerase(2 μL), 和 ddH₂O (20.5 μL)。其中 1 \times Thermol Buffer 成分为: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8, 25 $^{\circ}\text{C}$), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 2 mmol/L MgSO₄, 0.01% Triton X-100。

(3)模板 2 μL 。

1.2.5 LAMP 反应的流程

提取待检样品核酸, 其中 DNA OD_{260}/OD_{280} 在 1.6~2.0 范围内, 浓度在 10~100 ng/ μL 范围内。将装有 23 μL 模板预处理反应液的反应管加入 2 μL 待检模板 DNA 于 94 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 后迅速放入 59 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中 45 s; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 25 s 和 59 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 45 s, 过程反复进行 6 个循环。将上述模板预处理混合溶液 25 μL 加入 25 μL 溶液 I 中, 62 $^{\circ}\text{C}$ 加热 60 min, 反应结束后 80 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.6 LAMP 特异性试验

根据番茄溃疡病菌 16S rRNA 特异性基因序列建立的 LAMP 方法分别扩增番茄溃疡病菌和其对照菌株, 以检测引物的特异性。

1.2.7 LAMP 灵敏度检测

按照 1.2.1 进行番茄溃疡病菌的培养及 DNA 提取, 将得到的 DNA 利用核酸蛋白仪测定浓度 (Eppendorf), 浓度 100 mg/L。然后对获得的 DNA 进行 10 倍系列稀释, 用不同的稀释度做模板进行 LAMP 扩增, 以检测其灵敏度。

1.2.8 LAMP 与 PCR 灵敏度的比较

使用 1.2.7 中 10 倍系列稀释的模板, 同时进行 PCR, 将所建立的 PCR 方法与 LAMP 法进行比较, 比较他们与本试验建立的 LAMP 检测方法的最低检测极限差异与反应时间、所需仪器设备的差异。

PCR 引物序列: 16S UP 5'-GACGGCCTTCGGG TTGTA-3', 16S NP 5'-CGCTCGTTGCGGGACTTA-3', 引物由南京金斯瑞生物有限公司合成。25 μL 反应体系为: 5 U/ μL *Taq* 0.5 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL , 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , 50 mmol/L 上游引物 1 μL , 50 mmol/L 下游引物 1 μL , 模板 DNA 1 μL , ddH₂O 18 μL 。

PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后进入循环反应: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2 结果与分析

2.1 LAMP 反应引物设计结果

根据番茄溃疡病菌 16S rRNA 特异性基因序列设计一套 LAMP 引物, 结果见表 2。

2.2 LAMP 扩增结果的判断

采用设计的 FIP, BIP, F3, B3 引物进行 LAMP 反应, 扩增后肉眼可见浑浊, 加入 SYBR Green I 后, 阴性对照颜色为橙色, 阳性样品颜色为翠绿色, 见图 1。如果用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 阳性样品会出现梯形条带。

2.3 LAMP 特异性试验

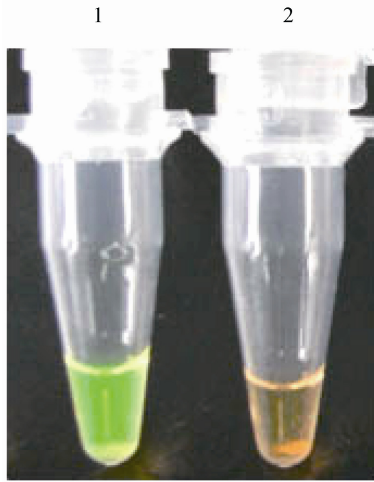
根据番茄溃疡病菌 16S rRNA 基因建立的 LAMP 方法分别扩增番茄溃疡病菌和其对照菌株, 结果表明, 番茄溃疡病菌菌株有扩增, 呈阳性反应, 而对照菌皱纹假单胞菌、茄假单胞菌、丁香假单胞菌番茄致病变种都没有扩增。见图 2。

表 2 番茄溃疡病菌 16S rRNA 基因 LAMP 的引物序列

Table 2 LAMP primer sequences of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* 16S rRNA gene

引物名称	引物序列
FIP	5'-TACCCACTGCAGACCCGAGG-AGCTCGTAGGCGGTTTGT-3'
BIP	5'-GACTAGAGTGCGGTAGGGGAGA-CCATCGGTGTTCTCCTGA-3'
F3	5'-GTCCGGAATTATTGGGCGT-3'
B3	5'-CTCAGCGTCAGTTACGGC-3'

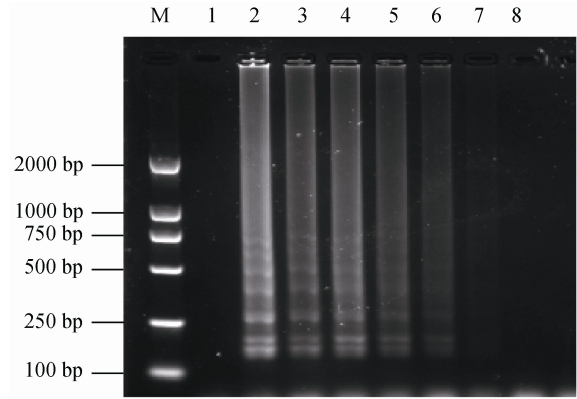
注: FIP: 正向内侧引物; BIP: 反向内侧引物; F3: 正向外侧引物; B3: 反向外侧引物



注: 1: 16SrRNA 基因序列 LAMP 扩增结果;
2: 阴性对照的 LAMP 扩增结果
图 1 SYBR Green 染色后结果
Fig. 1 SYBR Green I staining results

2.5 LAMP 与 PCR 最低检测极限的比较

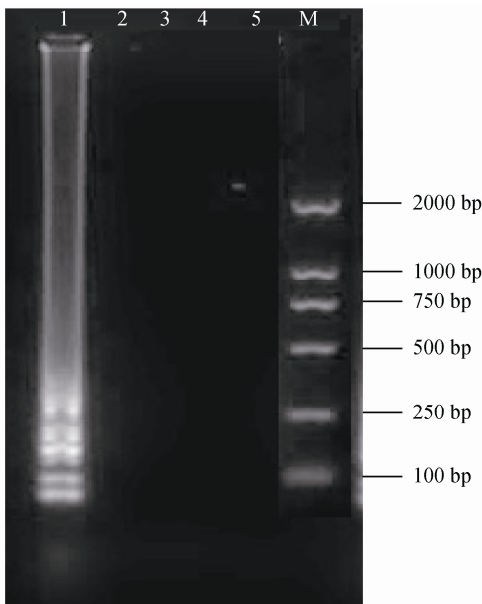
用普通 PCR 方法扩增不同稀释浓度的模板, 结果表明, 当稀释度为 10^{-4} 时没有扩增产物, 见图 4。通过比较可以看出, LAMP 方法的灵敏度是普通 PCR 的 10 倍。



注: M: DNA marker DL2000; 1: 空白对照; 2~8 的 *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* 浓度分别为: 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} (mg/L)

图 3 番茄溃疡病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* LAMP 灵敏度实验结果

Fig. 3 LAMP sensitivity results of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*

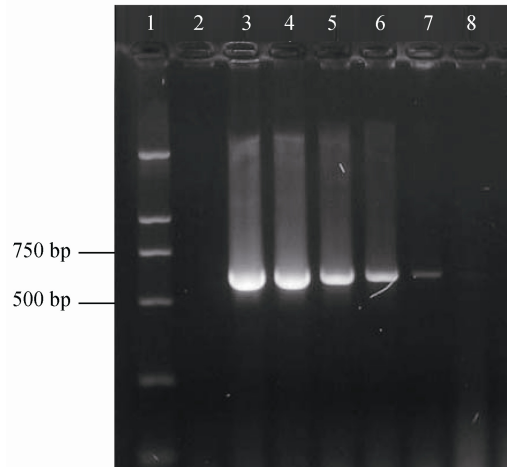


注: M: DL2000 Marker; 1: 番茄溃疡病菌; 2: 皱纹假单胞菌;
3: 茄假单胞菌; 4: 丁香假单胞菌番茄致病变种; 5: 空白对照

图 2 番茄溃疡病菌 LAMP 反应体系特异性试验结果
Fig. 2 LAMP reaction specificity test results of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*

2.4 LAMP 灵敏度试验

用建立的 LAMP 方法扩增不同稀释度的模板, 结果表明, 随着模板浓度的降低, 条带逐渐变淡, 至稀释度 10^{-5} 时没有扩增产物, 见图 3。根据 DNA 的浓度计算得出, 本 LAMP 方法的检测限为 2 pg DNA。



注: 1: DNA marker DL2000; 2: 空白对照; 3~8 的 *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* 浓度分别为: 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} (mg/L)

图 4 番茄溃疡病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* PCR 灵敏度实验结果

Fig. 4 PCR sensitivity results of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*

3 讨 论

LAMP 方法对于引物的要求比较高, 它的引物共有 4 条, 包括两条外引物和两条内引物, 外引物限定了扩增片段的大小范围, 也为内引物提供了模板, 内引物引导合成靶基因 DNA 片段。在本实验中, 利用番茄溃疡病菌 16S rRNA 基因设计特异性的引物。rRNA 是细菌系统分类学研究中最有用最常见的分子钟, 其种类少, 含量大, 约占细菌 RNA 含量的 80%。rRNA 分子因其在结构与功能上具有高度的保守性, 素有“细菌化石”之称。在原核生物中, rRNA 基因位点包括 5S, 16S 和 23S 三个基因, 其中 16S rRNA 基因大小适中, 约 1.5 kb 左右, 在细菌各种属之间既有高度保守的序列又有相互之间有差异的碱基, 已成为理想的基因鉴定靶序列。通过对其序列的分析, 可以判定不同菌属、菌种间遗传关系的远近。因此被广泛用作细菌之间种属鉴定的依据。在本试验中, 番茄溃疡病菌与对照菌皱纹假单胞菌、茄假单胞菌、番茄细菌叶斑病假单胞菌属于不同属的细菌, 因此用 16S rRNA 基因设计特异性的引物较合适^[4-15]。此外, 在引物设计时, 应该注意引物之间的距离、 T_m 值、引物末端的稳定性、GC 含量、二级结构等问题, 综合各种因素, 设计出特异性高的引物。

LAMP 检测方法比 PCR 方法具有更好的特异性和灵敏度, 在本实验中 LAMP 比普通 PCR 灵敏度高 10 倍。其次, LAMP 扩增反应在恒温条件下进行, 仅一台水浴锅就能进行检测, 缩短了检测周期, 比常规 PCR 和实时荧光 PCR 能更早得到反应结果。另外, LAMP 检测结果可以通过肉眼观察颜色变化来判断结果, 而不必用凝胶电泳, 这使得 LAMP 方法可以很容易的在口岸进行实验室检测。

由番茄溃疡病菌引起的番茄溃疡病是茄科蔬菜作物上的一种重要的细菌病害, 该病害主要依靠种子进行远距离传播, 目前还没有快速有效的防治办法。番茄溃疡病菌是我国《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中的检疫性植物病原细菌。本文建立的番茄溃疡病菌的 LAMP 检测方法特异、灵敏、便捷, 如果进行进一步优化、研制检测试剂盒, 将会在茄科作物番茄溃疡病的早期诊断及预防传入方面发挥重要作用。

参考文献

- [1] 罗来鑫, 赵廷昌, 李健强, 等. 番茄细菌性溃疡病研究进展[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1140-1150.
Luo LX, Zhao TC, Li JQ, et al. Progress in Research on Bacterial Canker of Tomato Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* [J]. Sci Agr Sinica, 2004, 37(8): 1140-1150.
- [2] Annaka T. Rapid and simple detection of *Legionella species* by LAMP, a new DNA amplification method [J]. J Assoc Rapid Method Automat Microbiol, 2003, 14: 25-30.
- [3] 施伟, 赵凯, 唐雪明, 等. 环介导等温扩增方法在生物检测方面的研究进展 [J]. 江西农业学报, 2011, 23(12): 150-154.
Shi W, Zhao K, Tang XM, et al. Research Progress in Application of Loop-mediated Isothermal Amplification Method in Biological Survey [J]. Acta Agr Jiangxi, 2011, 23(12): 150-154.
- [4] 赵文军, 夏明星, 陈红运, 等. 番茄溃疡病菌 PCR 快速检测技术[J]. 植物检疫, 2007, 21(2): 75-77.
Zhao WJ, Xia MX, Chen HY, et al. Rapid detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using PCR [J]. Plant Quarantine, 2007, 21(2): 75-77.
- [5] 吴兴海, 邵秀玲, 厉艳, 等. 应用分子生物学方法快速检测番茄溃疡病菌的研究[J]. 江西农业学报, 2006, 18(2): 5-7.
Wu XH, Shao XL, Li Y, et al. Study on Papid Identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by Molecular Biological Method [J]. Acta Agr Jiangxi, 2006, 18(2): 5-7.
- [6] 付鹏, 郭亚辉, 张晓梅, 等. 番茄溃疡病菌分子检测技术[J]. 江苏农业学报, 2005, 21(2): 118-122.
Fu P, Guo YH, Zhang XM, et al. Development of a PCR Assay for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [J]. Jiangsu J Agr Sci, 2005, 21(2): 118-122.
- [7] Kaneshiro WS, Mizumoto CY, Alvarez AM. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing [J]. Eur J Plant Pathol, 2006, (1): 45-56.
- [8] de Leon L, Rodriguez A, Liop P, et al. Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from the Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP [J]. Plant Pathol, 2009, (58): 862-871.
- [9] Beran IM, Kokoskova PB. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seeds using ELISA, IF and PCR with commercial and own primers [J]. Acta Hort, 2011, (914): 57-60.
- [10] Olivier V, Baloché A, Drouin A, et al. Internal methods comparison study and inter-laboratory study on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds [J]. EPPO Bulletin, 2010, 40(2): 248-256.

- [11] Quesada-Ocampu LM, Landers NA, Lebeis AC, *et al.* Genetic structure of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in michigan commercial tomato fields [J]. *Plant Dis*, 2012, 96(6): 788–796.
- [12] Lara-Ávila JP, Isordia-Jasso MI, Castillo-Collazo R, *et al.* Gene expression analysis during interaction of tomato and related wild species with *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 30(2): 498–511.
- [13] Sousa SM, Cruz L, Norskov P, *et al.* A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction [J]. *Seed Sci Technol*, 1997, 25(3): 581–584.
- [14] Gartemann KH, Abt B, Bekel T, *et al.* The Genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(6): 2138–2149.
- [15] Louws FJ, Bell J, Medina-Mora CM, *et al.* rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis* [J]. *Phytopathology*, 1998, 88(8): 862–868.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



封立平, 大学本科, 高级农艺师, 主要研究方向为植物病理学。
E-mail: feng750613@yahoo.com.cn

“食品安全快速检测技术”专题征稿

近年来, 随着经济的高速发展, 食品安全问题也越来越严重, 受到了世界各国的广泛关注。如何快速地检测食品的安全问题具有重要的意义。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品安全快速检测技术”专题, 由军事医学科学院卫生学环境医学研究所的高志贤教授担任专题主编, 围绕化学比色分析方法、酶联免疫法(ELISA)、免疫胶体金试纸检测方法、生物芯片、生物传感器、便携式色谱质谱联用仪、生物化学发光检测仪等食品安全快速检测技术或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2014 年 2 月份出版。

本刊编辑部及高教授诚邀各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2013 年 11 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部