马铃薯青枯病菌日常快速检验方法的对比

尤 波*, 韩 宁, 张 箭, 郑 超, 吴永生, 王俊峰
(绥芬河出入境检验检疫局综合技术中心 157300)

摘 要: 目的 对马铃薯青枯病菌日常快速检验的方法的对比。**方法** 以日常监管抽检的出口马铃薯为材料, 采用双抗夹心酶联免疫吸附法(double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA)以及分子生物学方法的实时荧光 PCR(RT-PCR)法进行快速检测。**结果** 通过连续多批次马铃薯检测的结果进行统计分析, 试验结果显示, 应用上述两种方法对马铃薯青枯病菌携带情况具有较高的灵敏度, 特别是对处于潜伏期感染而没有表现出症状的马铃薯块茎的检测更为有效。**结论** DAS-ELISA 以及分子生物学方法的 RT-PCR 法对于马铃薯出口的快速检验快速通关具有重要的意义。

关键词: 马铃薯; 青枯病菌; 疫情防控; PCR; 双抗夹心酶联免疫吸附法

Comparison of routinequick tests for *solanacearum* in potato

YOU Bo*, HAN Ning, ZHANG Jian, ZHENG Chao, WU Yong-Sheng, WANG Jun-Feng
(*Integrated Technology Center*, *Suifenhe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau*, *Mudanjiang* 157300, *China*)

ABSTRACT: Objective To explore the epidemic prevention and control of *solanacearum* in potato. **Methods** With routine supervision sampling potato as the material, the serology agglutination double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS ELISA) and molecular biology method of real-time fluorescent PCR (RT-PCR) method were adopted for quick detection. **Results** Continuous multiple statistical analysis of the testing results of the batch of potato test showed that the application of the above two methods of potato *solanacearum* carrying case had a high sensitivity, especially for in latent infection without showing symptoms of potato tuber detection showing more effective. **Conlusion** Both kinds of methods were of great importance for potato *solanacearum* epidemic prevention and export detection.

KEY WORDS: potatoes; *solanacearum*; epidemic prevention and control; PCR; double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay

1 引 言

马铃薯青枯病(bacterial wilt)是由 *Ralstonia solanacearum* (RS)引起的细菌性病害, 也是我国马铃薯主要细菌性病害之一, 每年由青枯病菌造成的产量损失大约在 10%~15%, 发病严重的地块产量损失可达 80% 甚至可导致完全失收, 给马铃薯生产带来严重威胁[1]。青枯病为细菌性病害, 植株感病是系统性侵染, 由于青枯病较难控制, 既无免疫抗原, 又可经土壤传染, 一旦发生青枯病, 发病田将大幅度减产[2]。因此, 作为口岸检验检疫部门加强对出口马铃薯检疫及监管工作显得尤为迫切。

*通讯作者: 尤波, 助理工程师, 主要研究方向为粮食作物转基因检测、植物病害检疫。E-mail: 278783956@qq.com
***Corresponding author:** YOU BO, Assistant Engineer, Technical Center of Suifenhe Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.13, Yanhe Road, Suifenhe 157300, China. E-mail: 278783956@qq.com

本文采用双抗夹心酶联免疫吸附法(double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA)试剂盒及实时荧光 PCR 用于出口马铃薯青枯病菌的检测的对比, 充分利用两种方法灵敏、快速、特异、操作简便等优点, 逐步形成口岸检验检疫部门对马铃薯青枯病菌的快速诊断和预测, 以达到青枯病菌疫情防控的目的, 能够早发现、早处理, 从而保障果蔬进出口安全, 减少因感染青枯病菌带来的经济损失。

2　马铃薯青枯病菌检测方法

2.1　常规检测方法

马铃薯青枯病菌的常规检测方法为培养基分离方法, 包括非选择性培养基和半选择性培养基。传统的组织分离方法灵敏度较低, 最大的缺点是检测周期比较长, 一般在 7 d 左右, 因此, 常规的检测方法已经不能适应植物检疫和实验室快速鉴定的需要[3]。

近年来, 随着对青枯病病原菌检测方法的不断深入研究, 一些快速灵敏的检测技术及方法已经被广泛建立及采用[4], 如血清学法和分子生物学法等。

2.2　血清学检测方法

血清学检测方法是利用抗原抗体特异性结合, 对植物样品中的青枯菌进行检测, 是目前较为灵敏、简便和实用的方法, 可以在 1 d 内完成快速筛选鉴定[5,6]。

本实验主要 DAS-ELISA, 由于 DAS-ELISA 具有快速、敏感、简便、易于标准化等优点, 使其得到迅速的发展和广泛应用。其基本原理是酶分子与抗体或抗抗体分子共价结合, 此种结合不会改变抗体的免疫学特性, 也不影响酶的生物学活性。

2.3　分子生物学法

应用分子生物学技术检测方法, 主要包括核酸分子杂交检测法和聚合酶链式反应 (PCR) 检测法以及在 PCR 技术的基础上扩展的 RAPD、RT- PCR、REP- PCR 和 AFLP 指纹识别技术等[7-10], 分子生物学方法具有灵敏、特异和高效等特点, 大大提高了植物青枯病原菌的检测效率, 已被广泛应用于青枯菌与寄主互作、病原流行学和病原检测中。这些方法可以直接从发病组织或者带菌土壤中进行病原菌的快速检测, 而不需要进行病菌的分离以及纯培养, 同时还能在短时间内检测到极微量的病菌。在简化检测步骤的同时, 不仅节约了成本, 也提高了检测限和精度[11]。

本实验采用实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-PCR)方法, 以其特异性强、灵敏度高、自动化和重复性好、定量准确、污染少等优点, 对马铃薯青枯病菌进行快速检测。

3　材料与方法

3.1　实验对象

本实验采用来自于山东马铃薯集散地的全国各地马铃薯作为监管对象, 随机抽取 20 批出口马铃薯进行检测。

3.2　仪器和试剂

ABI 7500 实时荧光仪(美国 ABI 公司)、冷冻离心机 Z36HK(德国 HERMEL 公司), Premix Ex *Taq*、ROX Reference Dye II (50x)*4 试剂以及检测引物和探针均购于宝生物工程(大连)有限公司, 天根植物基因组提取试剂盒

3.3　实验方法

采用 DAS-ELISA 法和 RT-PCR 法相结合的方法进行检测, 并进行对比分析。

3.3.1　DAS-ELISA 法

样品处理: 将待测马铃薯样品的芽眼部位用 75%就行擦拭, 挖取芽眼部位用少量无菌水研磨, 吸取 1 mL 研磨液离心, 弃去上清液, 沉淀部位加入 1 mL 提取液, 6000 r/min 离心 3 min, 取上清液。

点样: 分别吸取样品上清液、阳性对照、阴性对照各 100 μL 加入反应条, 每个孔重复两次。置于 4 ℃冰箱内孵育 2 h。

清洗微孔: 用清洗缓冲液清洗孵育的微孔条, 然后在干净的纸上拍干, 重复 3 次。

添加探针抗体: 在清洗好的微孔内每孔加入 100 μL 探针, 用封口膜包好置于恒温培养箱内 37 ℃孵育 1 h。

清洗微孔条: 用清洗缓冲液清洗孵育的微孔条, 然后在干净的纸上拍干, 重复 3 次。

添加显色液体底物: 在清洗好的微孔内每孔加入 100 μL 显色底物, 用封口膜包好避光室温孵育 1 h 后读取结果。

结果数据分析: 通过多批次的样品检测结果统计显示, 阳性样品颜色为浅黄色到黄色, 检测结果颜色深浅的变化取决于样品中青枯病菌的浓度, 一般肉眼可见的颜色反应为阳性样品, 无颜色反应的结果判断为阴性样品。

3.3.2 实时荧光 PCR 法

DNA 提取: 将待测马铃薯样品的芽眼部位用 75%就行擦拭, 挖取芽眼部位用少量无菌水研磨, 吸取 1 mL 研磨液 12000 r/min 离心 3min, 弃去上清液, 沉淀部分用于下步试剂盒操作。

采用天根植物基因组提取试剂盒。具体步骤如下: 加入 400 μL LP1 震荡混匀,室温静置 10 min; 加入 130 LP2, 震荡混匀, 12000 r/min 离心 5min, 取上清加入新的离心管中, 加入 750 μL LP3, 震荡混匀, 将上述液体加入吸附柱中, 12000 r/min 离心 2min; 向吸附柱中加入 600 μL PW, 12000 r/min 离心 30 s, 清洗两次; 清洗后室温放置 10 min, 待吸附柱滤膜充分晾干; 向滤膜中央加入 60 μL PE, 12000 r/min 离心 2 min, 为确保 DNA 的回收率, 此步骤重复两次; 将离心所得的液体为 DNA 的模板, 进行 PCR 操作。

实时荧光 PCR 反应: 实时荧光 PCR 反应体系见表 1。PCR 反应引物序列见表 3。实时荧光 PCR 反应条件为: 预变性 95 ℃反应 30 s, 1 个循环体系为 95 ℃反应 5 s, 60 ℃反应 34 s 同时收集荧光, 共进行 40 个循环。

结果数据分析: 通过多次 PCR 反应数据分析可以发现, 在阳性菌对照、阴性样品对照、空白对照均正常的情况下, 阳性菌的引物 PCR 反应的 C_t 值一般为 23~32, 阴性样品的 C_t 值均大于 40, 结果准确率高, 易于判断。

表 1 实时荧光 PCR 反应体系参数

Table 1 System parameters of real-time fluorescence PCR reaction

组分	工作液浓度	加样量(μL)	反应体系终浓度
Premix Ex *Taq* TM	(2X)	12.5	1*
ROX Reference DyeII	(50X)*4	0.5	0.2 μmol/L*1
正向引物	10 μmol/L	0.5	0.2 μmol/L*1
反向引物	10 μmol/L	0.5	0.2 μmol/L*1
荧光探针	2.5 μmol/L	1.0	1*
DNA 模板		2.0	*3
去离子水		8.0	*5

表 2 青枯病菌引物序列

Table 2 Primer sequences of *solanacearum*

Primer 名称	序列(从左到右 5`至 3`)
B2-1	TGGCGCACTGCACTCAAC
B2-2	AATCACATGCAATTCGCCTACG
B2-P(VIC)	TTCAAGCCGAACACCTGCTGCAAG-(TAMRA)

4 方法对比与讨论

本实验通过对出口马铃薯样品采用 DAS-ELISA 和 RT-PCR 两种检测方法相结合的方式, 对连续多次实验数据结果进行分析归纳, 可以看出, 两种方法均可得到较好的检测结果, 其中 DAS-ELISA 方法操作简便, 结果通过颜色反应易于观察, 可以较快的得出检测结果; RT-PCR 方法检测结果较为灵敏, 通过 RT-PCR 反应可以直接判断样品是否携带病菌情况; 两种检测方法可同时应用在出口马铃薯的检验工作中, 对于出口马铃薯青枯病菌的疫情防控均起到重要的作用。在实际工作中, 可根据实际需要选择较为合适的检测方法, 但最终的确认实验还是 RT-PCR 方法为准。

参考文献

[1] 王艳, 常润磊, 周旭平. 青枯病快速检测研究概况[J]. 桉树科技, 2012, 6(2): 29–30.
Wang Y, Chang RL, Zhou XP. Rapid detection of bacterial wilt[J]. Eucalyptus, 2012, 6(2): 29–30

[2] 吴玉栋. 马铃薯青枯病 [J]. 植物保护, 2010, 3: 51–52.
Wu YD. Potato bacterial wilt [J]. Plant Protect, 2010, 3 :51–52.

[3] 王晓丹, 闵凡祥, 郭梅, 等. 马铃薯青枯病菌生化型研究及菌株接种方法的比较[J]. 中国马铃薯. 2010, 1(24): 38–39.
Wang XD, Min FX, Guo M, *et al*. Potato solanacearum comparison of biochemical research and strain inoculation method[J]. Chin Potato, 2010, 1(24): 38–39.

[4] 李广存, 金黎平, 谢开云, 等. 马铃薯青枯病研究进展[J]. 中国马铃薯, 2004, 6 (18) : 350–351.
Li GC, Jin LP, Xie KY, *et al* Potato bacterial wilt research progress [J]. Chin Potato, 2004, 6 (18) : 350–351.

[5] 陈永芳. 我国植物青枯菌的遗传多样性和马铃薯青枯菌的 PCR 检测技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2000,

Chen YF. The genetic diversity of China's green plants withered and potato blight fungus PCR detection technology research[D]. Beijing: The Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2000.

[6] 何云昆, 赵志坚, 李云海, 等. 云南省马铃薯青枯病菌生物型研究 [J]. 西南农业学报, 1999, 12 (4) : 78– 81.
He YK, Zhao ZJ, Li YH, *et al*. Yunnan province potato solanacearum type biological research[J]. J Southwest Agr, 1999, 12 (4): 78–81.

[7] 朱国庆, 罗晓玲, 王成华. 网室中脱毒小薯青枯病的发生和防治[J]. 马铃薯杂志, 1998, 12 (3) : 186–187
Zhu GQ, Luo XL, Wang CH. Net chamber detoxification occurrence and prevention and control of small potato bacterial wilt[J]. Potato J, 1998, 12 (3) : 186 –187

[8] 卢同. 我国农作物细菌性青枯病的研究进展[J]. 福建农学报, 1998, 13 (2) : 33–40.
Lu T. Our crops with bacterial bacterial wilt the research progress[J]. Fujian Agr, 1998, 13 (2) : 33–40

[9] 徐莉莉, 尹燕妮, 王勇明, 等. 发生于中国的青枯病菌生化变种研究[J]. 江苏农业科学, 2008, 5: 102–110.
Xu LL, Yin YN, Wang YM, *et al.* China's solanacearum biovar study[J]. J Jiangsu Agr Sci, 2008, 5: 102–110.

[10] 丁爱云, 郑继发, 时呈奎, 等. 山东省植物青枯菌生化型研究[J]. 山东农业大学学报, 2002, 33(1): 50–52.
Ding AY, Zheng JF, Shi CK, *et al.* Shandong plant green type dry bacteria biochemical research [J]. J Shandong Agr Univ, 2002, 33 (1) : 50–52.

[11] 曾宪铭, 董春. 广东农作物青枯病菌的生化型[J]. 华南农业大学学报, 1995, 16(1): 50–53.
Ceng XM, Dong C. Guangdong crop solanacearum biochemical model[J]. J South China Agr Univ, 1995, 16 (1): 50–53.

[12] 尤波, 吴永生, 周雅男, 等. 如何做好大豆粉转基因成分检测能力验证[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4 (5) : 1601–1604.
You B, Wu YS, Zhou YN, *et al.* How to do a good job in soybean meal detection capability validation[J]. J Food Saf Qual, 2013, 2013, 4 (5): 1601–1604.

[13] 种斌. 烟田土壤青枯菌的分子检测技术及应用[D]. 郑州: 河南农业大学, 2010
Zhong B. Vega the molecular detection technology and application of green dry soil bacteria[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2010

[14] 谢从华, 柳俊, 张克顺. 马铃薯块茎青枯病菌潜伏侵染的酶联免疫学检测[J]. 中国马铃薯, 2000,3(14) : 131–132.

[15] Xie CH, Liu J, Zhang KS. Potato tuber solanacearum enzyme-linked immunology test of latent infection[J]. China Potato, 2000, 3(14): 131–132.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介

尤波, 助理工程师, 主要研究方向为粮食作物转基因检测、植物病害检疫。
E-mail: 278783956@qq.com