

# 木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因质粒 标准样品的构建

伦才智<sup>1</sup>, 封立平<sup>2\*</sup>, 王曼霞<sup>2</sup>, 倪新<sup>1</sup>, 厉艳<sup>2</sup>, 王简<sup>2</sup>

(1. 临沂出入境检验检疫局综合技术服务中心, 临沂 276034; 2. 山东出入境检验检疫局, 青岛 266002)

**摘要:** **目的** 构建木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因质粒标准样品。**方法** 以木薯细菌性萎蔫病菌染色体复制起始因子 dnaA 特异基因序列为靶标设计引物, 通过 PCR 扩增目的片段, 连接至 pMD 18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 构建木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因片段的重组质粒。采用 PicoGreen DNA 分子荧光定量方法对该质粒分子进行定值, 对均匀性、稳定性及标准值进行研究, 制备木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因质粒标准样品。**结果** 结果表明, 木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品定值为 4.99  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 可在  $-18\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温条件下长时间保存, 在夏季高温期间一周内也可实现传输。**结论** 该标准样品的研制解决了木薯细菌性萎蔫病菌的溯源参照物问题, 为快速检测木薯细菌性萎蔫病菌奠定了基础。

**关键词:** 木薯细菌性萎蔫病菌; dnaA 基因; 重组质粒; 标准样品

## Construction of dnaA gene standard sample of *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*

LUN Cai-Zhi<sup>1</sup>, FENG Li-Ping<sup>2\*</sup>, WANG Man-Xia<sup>2</sup>, NI Xin<sup>1</sup>, LI Yan<sup>2</sup>, WANG Jian<sup>2</sup>

(1. Comprehensive Technology Center of Linyi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Linyi 276034, China;  
2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

**ABSTRACT: Objective** To construct dnaA gene standard sample of *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*. **Method** One pair of primers were designed with chromosome replication initiation factor dnaA gene sequence as the target to detect *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*. The target segment was amplified by PCR and cloned into pMD 18-T vector, then transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and constructed the recombinant plasmid. Then the value of recombinant plasmid was defined by PicoGreen DNA fluorescence quantitative method. Homogeneity and stability were studied, and the recombinant plasmid including dnaA gene standard sample of *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis* was prepared. **Results** The standard sample was determined for 4.99  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . It could be stored at  $-18\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for a long time, and also could be transmitted within 1 week at high temperature condition in summer. **Conclusion** Preparation of the standard sample provides a solution of tracing to the source of the reference, which provides a foundation for the rapid detection of *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*.

**KEY WORDS:** *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*; dnaA gene; recombinant plasmid; standard sample

基金项目: 国家质检总局科研项目“基于 SELEX 技术的进境种子中丁香假单胞菌分子检测平台的构建及应用”

Fund: Supported by AQSIQ Research Project “Construction and Applications with Molecular Detection Based on SELEX Technology of *Pseudomonas syringae* from Imported Seeds”

\*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: fengciq@163.com

\*Corresponding author: FENG Li-Ping, Senior Agronomist, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China. E-mail: fengciq@163.com

## 1 引言

木薯细菌性萎蔫病是木薯的严重病害,是影响木薯繁育的重要因素。该病具有高风险、分布广、可种传的特点,是由病原菌木薯细菌性萎蔫病菌引起的,木薯细菌性萎蔫病菌是国际上重要的植物检疫对象,被我国《中华人民共和国进境植物检疫危险性病、虫、杂草名录》被列为检疫性病害<sup>[1-3]</sup>。该病菌的快速检测方法主要以分子生物学鉴定为主,然而由于该病菌被列为出入境检疫对象,因此该病菌菌株在国内外都被禁止买卖和使用。目前国内外对此类植物病原菌检测时,多购买国际认可的菌种保藏中心(如美国菌种保藏中心 ATCC)的菌株作为阳性对照,其价格非常昂贵。因此开展该病菌分子检测标准样品的研制,具有很重要的现实意义。

本文主要研究了木薯细菌性萎蔫病菌的质粒标准品构建和制备。目前基因质粒重组技术已在医学、动植物学、法学、毒素检测领域得到了广泛的研究和应用,是一种重要的分子研究手段。以病原特异性基因的重组质粒构建为基础的应用技术在研制无风险标准物质上具备良好的应用前景<sup>[4-7]</sup>。在细菌的基因质粒标准样品研制方面,也已经有相关的研究,如沙门氏菌、李斯特氏菌等细菌载体构建等<sup>[8,9]</sup>。这一技术的优势在于:质粒标准样品具有活性阳性菌株所有鉴定特征,不仅具有稳定性好、用量少、成本低、易保存、易获得、易繁殖等优势,而且没有阳性菌株作为标准样品的传播风险,可以为检验检疫提供可靠的技术保障。国内外迄今未见关于木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品方面内容的研究报道。

木薯细菌性萎蔫病菌染色体复制起始因子 *dnaA* 基因序列是该菌的特异性基因。*dnaA* 是 DNA 复制起始蛋白,它在细胞周期中担负着必需的功能。本研究选用高度保守的染色体复制起始因子 *dnaA* 基因序列设计引物,研制以 *dnaA* 基因重组质粒技术为基础的木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品,采用 PicoGreen DNA 分子荧光定量方法对标准样品的均稳性进行定值,可以解决木薯细菌性萎蔫病菌的溯源参照物问题,规范木薯细菌性萎蔫病菌的分子检测和鉴定工作,保证检疫工作质量和准确性,有效防范该外来检疫性高风险细菌的入侵。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 菌株

木薯细菌性萎蔫病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (ATCC 51302)购于美国标准菌种库(ATCC)。

#### 2.1.2 培养基

NA 固体培养基(g/L): 牛肉浸膏 3.0g, 蛋白胨 5.0g, 葡萄糖 2.5 g, 琼脂 18.0 g, 加水调整体积到 1 L, pH 值 7.0±0.1。

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 氯化钠 10.0 g, 加水调整体积到 1 L, pH 7.2~7.5, 121 °C, 灭菌 20 min。

LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基中加入 2.0 %琼脂粉, 高压灭菌, 倒入平板中, 冷却, 4 °C 保存。

#### 2.1.3 主要试剂

细菌 DNA 提取试剂盒, DNA marker, dNTPs, Taq 酶(质粒小量提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司); 凝胶回收试剂盒、pMD19-Tvector 连接试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司); 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 本实验室保存; 50 mg/mL 氨苄青霉素溶液(上海远慕生物科技有限公司); Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Reagent and Kits(包括: Quant-iT™、PicoGreen dsDNA Reagent、20×TE、Lambda DNA standard)(英杰生命科技有限公司)。

#### 2.1.4 主要仪器

BioPhotometer Plus 核酸蛋白测定仪, 梯度 PCR 仪(Eppendorf 中国有限公司); 水浴锅(上海森信实验仪器有限公司); DYCP-32C 型水平电泳仪(北京六一仪器厂); Vilber Lourmat 凝胶成像系统(法国 VILBER LOURMAT 公司); SpectraMax M5 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

## 2.2 方法

### 2.2.1 木薯细菌性萎蔫病菌质粒制备

#### 2.2.1.1 木薯细菌性萎蔫病菌 DNA 提取

将木薯细菌性萎蔫病菌菌株接于 NA 固体培养基 28 °C 进行单菌落培养, 然后根据细菌 DNA 提取试剂盒说明书进行木薯细菌性萎蔫病菌总 DNA 的提取。取 5  $\mu$ L DNA 溶液加 ddH<sub>2</sub>O 梯度稀释至 1 mL, 使用核酸蛋白分析仪检测 230、260 和 280 nm 处的光密度值。当 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.7~1.9 之间时, 适宜于 PCR 扩增。

#### 2.2.1.2 木薯细菌性萎蔫病菌 *dnaA* 基因片段的扩增

根据 Genbank 中木薯细菌性萎蔫病菌染色体复制起始因子 *dnaA* 基因序列(GenBank No: HM181678.1)设计引物, 利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6 设计、评价引物, 目的片段大小为 450 bp 左右, 引物由 TaKaRa 生物技术公司合成。引物序列如下:

Forward: 5'-GAATCCGAACGCACGGGTGATG-3',  
Reverse: 5'-ACGGGCAGCCAGCGTGTGA-3'。使用 25  $\mu$ L 反应体系进行 PCR 扩增: 2.5 mmol/L 的 dNTPs 1  $\mu$ L, 10×Buffer 2.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上游引物 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 下游引物 1  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L Taq 酶 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu$ L。扩增反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 30 循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。PCR 产物用 1.5%琼脂糖电泳检测。

#### 2.2.1.3 木薯细菌性萎蔫病菌 *dnaA* 基因的克隆

(1) *dnaA* 基因片段回收纯化: 将 PCR 所有产物加入琼脂糖凝胶上样孔中, 100 V, 30 min 后, 在紫外灯下切下目

标带,参照凝胶回收试剂盒回收纯化目标带。(2)连接:使用 pMD19-T vector 连接试剂盒进行。将 PCR 产物与含有 T 末端的 pMD19-T 载体连接,反应总体积 10  $\mu\text{L}$ : 3 U/ $\mu\text{L}$  T4 DNA 连接酶 5  $\mu\text{L}$ , 50 ng/ $\mu\text{L}$  pMD19-T 载体 1  $\mu\text{L}$ , 回收的 PCR 产物 4  $\mu\text{L}$ 。PCR 产物和载体加入同一离心管中,混匀,16  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接。(3)重组质粒的转化和复苏:全量 10  $\mu\text{L}$  连接产物加入至 100  $\mu\text{L}$  大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,冰浴 30 min,42  $^{\circ}\text{C}$  水浴 90 s,冰上放置 3 min。加入到 800  $\mu\text{L}$  预冷 LB 培养基的试管中,37  $^{\circ}\text{C}$  摇床中 150 r/min 振荡培养 1 h。(4)阳性克隆的筛选:根据  $\alpha$  互补现象,用 X-gal 对克隆进行初步筛选。将 200  $\mu\text{L}$  转化的菌液涂布于含 50 mg/mL 氨苄青霉素,表面涂有 40  $\mu\text{L}$  X-gal 和 4  $\mu\text{L}$  IPTG 的 LB 固体培养基上,37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。蓝色菌落为阴性菌落,白色菌落为阳性菌落。用无菌牙签随机挑取生长孤立的白色菌落分别置于 5 mL 含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  摇床中 180 rpm/min,振荡培养 8~12 h。(5)质粒提取及电泳检测:按照质粒小量提取试剂盒说明书操作进行质粒的提取和纯化。对提取的质粒进行 1.5% 琼脂糖电泳检测。(6)阳性质粒测序与序列分析:随机挑选 2 个重组质粒,送测序公司进行测序。同时对获得的序列在 GenBank 上与 NCBI 中的 dnaA 基因序列(GenBank No: HM181678.1)做序列比对,符合率达 100%,确定木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因目的片段接入载体中。

### 2.2.2 重组质粒标准品的制备和分装

对已获得的木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因的阳性克隆菌株培养后煮沸灭活,收集菌泥并冷冻干燥,分装于内置微量管的样品套管中,分装 500 管;每管木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品含量为 5  $\mu\text{g}$ 。分装后的样品加贴唯一性标识,放置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  中避光贮存。并进一步采用 PicoGreen DNA 分子荧光定量方法进行质粒标准样品的均匀性和稳定性定值等工作。

### 2.2.3 均匀性检验

#### 2.2.3.1 均匀性检验方法

抽取数按  $2 \times \sqrt[3]{N}$  个( $N$  为总单元数)计算,随机抽取 15 瓶标准样品。采用 PicoGreen DNA 分子荧光定量方法对木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因质粒标准样品的浓度进行定值。每个样品分别测定 2 个结果,按照随机次序在重复性条件下测试,即在同一实验室中由相同的人员使用相同的测试方法和仪器在较短时间内测试。检测结果采用  $F$  检验法检验其均匀性。结果数据用单因子方差分析(one way ANOVA)进行统计处理。若  $F <$  自由度为( $\nu_1$ 、 $\nu_2$ )及给定显著性水平  $\alpha$  (通常  $\alpha = 0.05$ ) 的临界值  $F_{\alpha}(\nu_1, \nu_2)$ , 则表明样品内和样品间无显著性差异,因而样品是均匀的。

#### 2.2.3.2 PicoGreen DNA 分子荧光定量方法

(1) 制备 DNA 标准曲线: 将 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Lambda ( $\lambda$ )DNA 标准品用 TE 稀释成 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNA 标准品贮存液; 酶联板每个反应孔分别加入 1000、100、10、1  $\mu\text{L}$  的 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$

的  $\lambda$ DNA 标准品贮存液,再加入 1 mL Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Reagent 进行稀释,混匀,在室温避光孵育 2~5 min; 利用多功能酶标仪进行读数检测。多功能酶标仪检测反应参数: 激发光 485 nm, 发射光 535 nm。

(2) 待测样品检测: 用 50  $\mu\text{L}$  的 1 $\times$ TE Buffer 溶解待测样品; 取溶解后的待测样品溶液 5  $\mu\text{L}$ , 用 1 $\times$ TE Buffer 稀释至 1 mL 加入反应孔中; 每个反应孔再加入 1 mL Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Reagent, 混匀, 在室温避光孵育 2~5 min; 利用多功能酶标仪进行读数检测。多功能酶标仪检测反应参数: 激发光 485 nm, 发射光 535 nm。

(3) 结果计算: 以 Lambda ( $\lambda$ )DNA 标准品的荧光值为纵坐标轴, Lambda ( $\lambda$ )DNA 标准品的 DNA 浓度为横坐标轴, 制作标准曲线。根据木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品的荧光吸收值, 从 DNA 标准曲线上, 得出待测木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品的浓度。

### 2.2.4 稳定性检验

#### 2.2.4.1 稳定性检验方法

采用 GB/T 15000.3-2008/ISO Guide35:2006 检验法<sup>[10]</sup>评价该木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品的长期稳定性和热稳定性。

采用直线作为经验模型。斜率可用下式计算:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

$b_1$ —斜率;  $X$ —时间;  $Y$ —稳定性的标准不确定度。

截距由下式计算:

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}$$

$b_0$ —截距。

直线上的点的标准偏差由下式计算:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2}$$

与斜率相关的不确定度用下式计算:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$$

通过比较  $|b_1|$  和  $t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1)$  大小来判断标准样品特性值在稳定性检验期间的稳定情况。

#### 2.2.4.2 长期稳定性检测

所选取的用于长期稳定性测试的包装好的样品在 -18~-20  $^{\circ}\text{C}$  低温条件下历经了长时间保存。随机选取样品进行稳定性试验。每 2 个月进行含量测试, 每次测定按 2.2.3.2 进行样品的溶解, 采用 PicoGreen DNA 分子荧光定量法定值。在全部稳定性测试中, 所用人员、仪器、测试方法和实验室均与均匀性测试相同, 验证标准样品在

-18~20℃保存条件下的可用性和完整性。

#### 2.2.4.3 热稳定性检测

为了对木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品的热稳定性进行考察,我们对质粒标准样品进行了热稳定性检测。在37℃保存的样品测定间隔时间为1d。每次测定按2.2.3.2进行样品的溶解,采用PicoGreen DNA分子荧光定量法定值。在全部稳定性测试中,所用人员、仪器、测试方法和实验室均与均匀性测试相同,验证标准样品在37℃保存条件下的可用性和完整性。

#### 2.2.5 定值

本实验室采用8家单位使用PicoGreen DNA分子荧光定量法进行了联合定值。按照GB/T 15000.3-2008的要求对数据进行统计,计算木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品的标准值。

### 3 结果与分析

#### 3.1 木薯细菌性萎蔫病菌 DNA 检测结果

核酸蛋白分析仪测试结果为 $OD_{230}/OD_{260}$ 值小于0.7, $OD_{260}/OD_{280}$ 值为1.9,结果表明所提取的核酸标准样品DNA质量很好。

按照2.2.1.2方法进行PCR反应,PCR产物用1.5%琼脂糖电泳检测,结果如图1。从电泳结果中可以看出,PCR产物为400bp以上,且产物条带单一,大小与预测大小基本一致,因此可以初步判断得到木薯细菌性萎蔫病菌染色体复制起始因子部分序列。

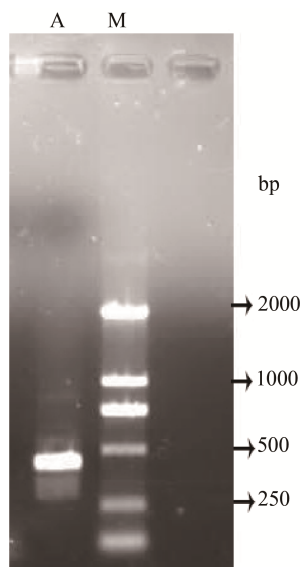


图1 木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因序列 PCR 扩增电泳结果

Fig. 1 The PCR and electrophoresis result of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* dnaA gene sequence

(M: DL 2000 DNA Marker; A: 木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因序列 PCR 扩增产物)

(M: DL 2000 DNA Marker; A: PCR products of dnaA)

#### 3.2 木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因序列阳性克隆质粒电泳结果

按照2.2.1.3将PCR产物纯化并与质粒pMD19-T进行连接、转化入大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞、进行阳性克隆的筛选及质粒提取。对提取的质粒进行1.5%琼脂糖电泳检测,结果如图2。随机挑选2个提取的阳性质粒,送测序公司进行测序。同时对获得的序列在GenBank上比对。根据比对结果发现,获得的阳性克隆就是木薯细菌性萎蔫病菌dnaA基因序列的阳性克隆。

核酸蛋白分析仪测试结果为 $OD_{230}/OD_{260}$ 值小于0.7, $OD_{260}/OD_{280}$ 值为1.9,结果表明所提取的核酸标准样品DNA质量很好。

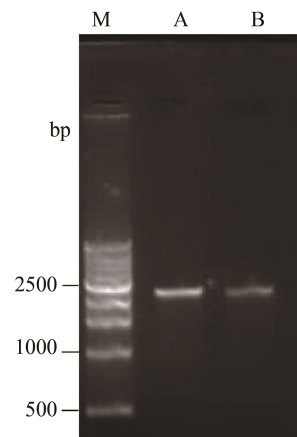


图2 木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因序列阳性克隆质粒电泳结果

Fig. 2 The electrophoresis results of dnaA gene positive clones of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

(M: DL 12000 DNA Marker; A, B: 带有 dnaA 基因序列的阳性克隆质粒)

(M: DL 12000 DNA Marker; A, B: Positive cloned plasmid with dnaA)

#### 3.3 重组质粒的均匀性检验结果

木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品的均匀性检验结果见表1。

结果可看出, $F$ 临界值 $F_{0.05}(14,15)=2.42$ ,计算的 $F$ 值为0.98,该值 $<F$ 临界值,表明在 $\alpha=0.05$ 显著性水平时,样品中木薯细菌性萎蔫病菌质粒含量是均匀的。

#### 3.4 重组质粒的稳定性检验结果

##### 3.4.1 重组质粒的长期稳定性检测结果

木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品的长期稳定性研究数据及评价见表2。

自由度为 $n-2=5$ 和 $P=0.95$ (95%置信水平)的 $t$ 分布临界值等于2.57。由于 $|b_1| < t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$ ,斜率不显著,表示标准样品的特性量值随时间变化而无明显变化,因此该标准样品长期稳定性良好。

3.4.2 重组质粒的热稳定性检测结果

木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品的热稳定性研究数据及评价见表 3。

自由度为  $n-2=5$  和  $P=0.95$ (95%置信水平)的  $t$  分布临界值等于 2.57。由于  $|b_1| < t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$  斜率不显著, 表示标准样品的特性量值随时间变化而无明显变化, 因此该标准样品热稳定性良好。

3.5 重组质粒的标准值

木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品定值结果见表 4。

表 1 木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品均匀性检验结果( $\mu\text{g}$ )  
Table 1 The homogeneity test results of plasmid standard samples of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* ( $\mu\text{g}$ )

样品序号	第 1 次结果	第 2 次结果
1	4.991	4.996
2	5.007	5.001
3	4.985	4.983
4	4.897	4.992
5	5.001	4.996
6	5.003	5.007
7	5.007	5.006
8	4.996	5.002
9	4.99	4.992
10	5.001	4.998
11	4.996	4.993
12	5.003	5.001
13	4.993	4.998
14	5.002	5.007
15	4.997	5.002
$\bar{x}$	4.991	
$SS_{among}$	0.006421	
$SS_{within}$	0.004634	
$MS_{among}$	0.000459	
$MS_{within}$	0.000309	
$F$	1.48	
$F_{0.05}(14,15)$	2.42	

表 2 木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品的长期稳定性检验结果  
Table 2 The long-time stability test results of plasmid standard samples of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

测试时间间隔, 月	平均值( $\mu\text{g}$ )
0	5.002
2	5.005
4	4.996
6	5.001
8	4.997
10	5.003
12	4.995
$b_1$	-0.000429
$b_{e0}$	5.002
$S(b_1)$	0.00035
$t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$	0.00090

表 3 木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品的热稳定性检验结果  
Table 3 The thermal stability test results of plasmid standard samples of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

测试时间间隔 (d)	平均值( $\mu\text{g}$ )
0	5.002
1	4.999
2	4.995
3	5.003
4	5.005
5	4.996
6	5.001
$b_1$	0.000036
$b_0$	5.000
$S(b_1)$	0.00076
$t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$	0.0019

表 4 木薯细菌性萎蔫病菌质粒标准样品定值结果统计分析表

Table 4 The results analysis of plasmid standard samples of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

序号	1	2	3	4	5	6	7	8
平均值( $\bar{X}$ , $\mu\text{g}$ )	4.992	5.000	5.007	4.985	4.930	5.013	4.965	5.022
总平均值( $\bar{Y} = \frac{1}{P} \sum_{i=1}^P Y_i$ , $\mu\text{g}$ )					4.99			
平均值标准偏差( $S$ , $\mu\text{g}$ )					0.03			

## 4 结 论

目前, 分子生物学方法例如普通 PCR、巢式 PCR、荧光定量 PCR、环介导恒温扩增技术(LAMP)、杂交探针检测方法、指纹图谱技术等快速检测手段已成为木薯细菌性萎蔫病菌检测的主要方法<sup>[11-17]</sup>, 因此对于该检疫性细菌的阳性标准样品的需求量越来越大。木薯细菌性萎蔫病菌特异性基因的质粒标准样品的研制, 有效解决了目前该检疫性细菌检测用标准物质严重缺乏的难题。

质粒是指含有该生物特异性基因片段的重组质粒分子。本研究通过分析木薯细菌性萎蔫病菌的分子特征, 选取木薯细菌性萎蔫病菌染色体复制起始因子 dnaA 基因序列作为靶标序列, 设计引物进行木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因片段的扩增, 并将 PCR 产物与含有 T 末端的 pMD19-T 载体上, 构建包含木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因片段的质粒, 并经 PCR 鉴定、测序等方式验证标准样品构建的正确性, 采用 PicoGreen DNA 分子荧光定量方法对标准样品的重复性、均匀性、稳定性及定值方法进行了系统研究, 成功构建了木薯细菌性萎蔫病菌 dnaA 基因质粒定性标准样品。

在该标准品研制中采取了冷冻干燥的方法, 标准样品以固体形式运输, 有效避免了冷链运输对稳定性造成的影响。研究结果表明, 构建的木薯细菌性萎蔫病菌质粒定性标准样品的标准值为 4.99 μg, 长期稳定性和热稳定性均良好, 可在-18 ℃~-20 ℃低温条件下长时间保存, 在夏季高温期间一周内也可实现传输。

本研究所构建的标准物质可用于致病性木薯细菌性萎蔫病菌的分子生物学检测; 本研究的质粒构建和制备方法可为其它检疫性细菌质粒定性标准样品的研制提供参照; 均匀性、稳定性及定值方法等的分析结果可为检疫性植物病原细菌质粒定性标准样品的质量分析、定值和适用性、保存环境等的相关研究或申报国家标准物质提供实验依据。

### 参考文献

- [1] 方佳, 濮文辉, 张慧坚. 国内外木薯产业发展近况[J]. 中国农学通报, 2010, 26(16): 353-361.  
Fang J, Pu WH, Zhang HJ. The development status of cassava industry at home and abroad [J]. Chin Agric Sci Bull, 2010, 26(16): 353-361
- [2] 李开绵, 林雄, 黄洁. 国内外木薯科研发展概况[J]. 热带农业科学, 2001, 89(1): 56-60.  
Li KM, Lin X, Huang J. The development of cassava research at home and abroad [J]. Chin J Trop Agric, 2001, 89(1): 56-60
- [3] 封立平, 王英超, 庞国兴, 等. 木薯细菌性萎蔫病菌的检疫方法研究[J]. 植物检疫, 2007, 21(5): 261-264.  
Feng LP, Wang YC, Pang GX, et al. Method for inspection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* [J]. Plant Quarant, 2007, 21(5): 261-264.
- [4] 金荣愉. 含多个基因元件的质粒标准分子的构建与分析[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(10): 1249-1260.  
Jin RY. Construction and analysis of reference molecule contained six target elements [J]. J Agric Biotechnol, 2013, 21(10): 1249-1260.
- [5] 冯燕艳, 吴卫东, 普雄明. ERAP1 基因标准品质粒的构建[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(3): 110-112.  
Feng YY, Wu WD, Pu XM. Standard plasmid construction of endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 Gene [J]. J Med Res, 2014, 43(3): 110-112.
- [6] 王从阳. IL2813 基因多态性检测的质粒标准品的构建[J]. 生物学杂志, 2014, 31(4): 42-54.  
Wang CY. Standard plasmid construction of gene IL28 B polymorphism detection [J]. J Biol, 2014, 31(4): 42-54.
- [7] 郑秋月. 转基因玉米质粒分子国家标准样品的构建[J]. 标准科学, 2012, 12: 48-51.  
Zheng QY. Research on molecular DNA reference material for GM maize [J]. Stand Sci, 2012, 12: 48-51.
- [8] 李正义. 沙门氏菌 invA 基因组质粒标准的构建[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(7): 2119-2124.  
Li ZY. Construction of recombinant plasmid of invA gene of *Salmonella* [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(7): 2119-2124.
- [9] 刘海瑞, 付世新, 罗春海. 单核细胞增生性李斯特氏菌 hly 基因的克隆表达[J]. 中国奶牛, 2008, 11: 2-4.  
Liu HR, Fu SX, Luo CH. Cloning and expression of hly gene from *Listeria Monocytogenes* [J]. China Dairy Cattle, 2008, 11: 2-4.
- [10] GB/T 15000.3-2008/ISO Guide35:2006 《标准样品工作导则(3) 标准样品 定值的一般原则和统计方法》[S].  
GB/T 15000.3-2008/ISO Guide35:2006 Directive for the work of reference materials(3)-Reference materials-General and statistical principles for certification [S]
- [11] Verdier V, Mosquera G, Assigbetse K. Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction [J]. Plant Dis, 1998, 82(1): 79-83
- [12] Ojeda S, Verdier V. Detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava true seeds by nested polymerase chain reaction assay [J]. Canadian J Plant Pathol, 2000, 22(3): 241-247.
- [13] Verdier V, Mosquera G. Specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* with a DNA hybridization probe [J]. J Phytopathol, 1999, 147(7): 417-423.
- [14] Silvia R, Myriam D, Joe T, et al. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* [J]. Microbiology, 1999, 145(1): 107-114.
- [15] Ogunjobi AA, Fagade OE. Comparative analysis of genetic variation among *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* isolated from the western states of Nigeria using RAPD and AFLP [J]. Indian J Microbiol, 2010,

50(2): 132–138.

- [16] Verdier V, Bother B. Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing disease of cassava [J]. Source Appl Environ Microbiol, 1994, 60(12): 4478–4486
- [17] Verdier V, Restrepo S, Mosquera G, *et al.* Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-cassava interaction [J]. Plant Molecular Biol, 2004, 56(4): 573–584.

(责任编辑: 金延秋)

## 作者简介



伦才智, 硕士, 农艺师, 主要研究方向为植物检疫有害生物。

E-mail: allen0522@163.com



封立平, 高级农艺师, 主要研究方向为植物病理学。

E-mail: fengciq@163.com

## “食药菌”专题征稿函

我国发现和利用食用菌已有数千年的历史, 其中大型真菌作为药物使用也至少有 2500 年的历史。食用菌营养丰富, 优质蛋白质含量较高, 含有人体所需的 8 种必需氨基酸, 其中赖氨酸和亮氨酸的含量尤为丰富。另外, 食用菌还含有多种活性多糖、微量元素等功能性物质, 具有特殊的保健功能。药用菌也具有良好的药理活性, 具有调节免疫力, 增强记忆力, 延缓衰老, 减少心脑血管疾病发生等功效, 应用十分广泛。随着人们对食药菌营养价值的认可, 对食药菌产品的消费需求也不断增加, 因此食药菌食品具有很高的开发价值。

我国食药菌年产量占世界总产量的 75% 以上, 其总产值在我国种植业中排名第六位, 主要栽培种类有 70~80 种, 形成商品的有 50 种, 具有一定生产规模的有 20 种以上。总产量年均复合增长率约为 12.40%, 总产值年复合增长率约为 17.01%。鉴于此, 本刊特别策划了“食药菌”专题, 由中国工程院院士、中国吉林农业大学食药菌专家李玉教授担任专题主编, 李教授为原中国菌物学会理事长, 中国食用菌协会副会长, 国际药用菌学会理事长, 食药菌教育部工程研究中心首席科学家, 国家食用菌产业技术体系岗位科学家兼资源收集与繁殖利用功能实验室主任。围绕“食药菌的化学组成、理化性质、保鲜贮藏、食药菌中有害物质检测、食药菌的深加工、食药菌营养特性的研究、食药菌功能特性的研究、食药菌标准与体系等或您认为本领域有意义的问题展开讨论, 计划在 2016 年 6 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及李玉教授特邀请您为本专题撰写稿件, 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, 请通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

E-mail: [jfoodsq@126.com](mailto:jfoodsq@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部