

番茄溃疡病菌 LAMP 可视化检测方法的建立

刘燕妮, 毛芙蓉*, 范惠冬, 郑士金

(吉林省蔬菜花卉科学研究所, 长春 130033)

摘要:以番茄细菌性溃疡病菌等 7 株病原细菌为检测材料, 以特异性基因 *tomA* 为检测靶标, 设计 LAMP 引物 *tomA*-107、*tomA*-8 和相应的环引物 *tomA*-107LF21、*tomA*-107LB21。针对靶标基因进行引物筛选及引物的特异性和灵敏度测试, 结果表明: *tomA*-107 能特异性检测出番茄细菌性溃疡病菌, 检测灵敏度达 5×10^2 copy/ μ L, 环引物的加成将反应进程缩短三分之一, 使整个检测过程控制在 50 min 内完成, 该方法非常适用于 Cmm 菌株的现场快速检测。

关键词:番茄溃疡病菌; 环介导等温扩增(LAMP); 检测

中图分类号: S436.412.1; S432.4*2

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)03-0134-04

Establishment of a LAMP Method for Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

LIU Yanni, MAO Furong*, FAN Huidong, ZHENG Shijin

(Jilin Academy of Vegetables and Flowers, Changchun 130033, China)

Abstract: In this study, eight bacterial strains, including *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*(Cmm), were used as test materials, with the specific gene *tomA* as the detection target. LAMP primers *tomA*-107 and *tomA*-8, as well as the corresponding loop primers *tomA*-107LF21 and *tomA*-107LB21, were designed. The primer specificity and sensitivity tests were conducted for the target gene, and the results showed that primer *tomA*-107 could specifically detect Cmm. The detection sensitivity of primer *tomA*-107 reached 5×10^2 copies/ μ L for Cmm. The addition of loop primers shortened the reaction process by one third, enabling the entire detection process to be completed within 50 minutes. This method is highly suitable for rapid on-site detection of Cmm bacterial strains.

Key words: Cmm; LAMP; Detection

番茄细菌性溃疡病(Bacterial canker of tomato)是由密执安棒状杆菌密执安亚种(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, 以下简称 Cmm)引起的系统性维管束病害^[1]。Cmm 可通过多种方式进行传播, 主要通过带菌种子和种苗进行远距离传播, 通过农事操作及雨水进行近距离传播。自然条件下, Cmm 在种子上可存活 8 个月以上, 在植物病残体上可在土壤、粪肥中存活 2~3 年^[2]。Cmm 在番茄的整个生育过程中均可侵染植株引发病害, 病害一旦发生便很难防治。相关研究表明: 番茄植株染病后不会马上表现症状, 只有当植物体内的 Cmm 浓度达到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ cfu/mL

时, 番茄才会表现出被害症状^[3]。因此进行番茄细菌性病原菌的早期检测, 能及早干预治疗以便有效控制番茄细菌性溃疡病的发生蔓延。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一项体外快速扩增 DNA 的技术^[4]。其特点为选取检测基因的 6 个特异性位点设计引物, 进行特异性扩增, 具有高特异性, 整个反应过程可在恒温水浴锅内完成, 操作简单; 检测结果可通过肉眼观察, 具有简便高效的特点。目前 LAMP 检测方法已广泛应用于医疗检测^[5-6]、养殖^[7]、水产^[8]、食品安全^[9]、农业^[10-11]等行业领域。本研究在传统 PCR 基础之上探索 LAMP 检测体系, 建立了一套针对番茄细菌性溃疡病菌的快速检测方法。该方法快速、高效, 受环境限制小, 操作简单, 更适用于推广应用。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

本研究以番茄细菌性溃疡病菌等 7 株病原细

收稿日期: 2020-01-13

基金项目: 吉林省重点科技攻关项目(20140204032NY)

作者简介: 刘燕妮(1988-), 女, 助理研究员, 硕士, 从事蔬菜病害综合防治研究。

通讯作者: 毛芙蓉, 女, 硕士, 副研究员, E-mail: 18504315123@163.com

菌为检测材料,分别为:由中国农业大学种子病理中心提供的番茄细菌性溃疡病菌(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)、广东省微生物保存中心提供的番茄青枯假单胞菌和茄青枯假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*);本实验室保存的马铃薯环腐病菌(*Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum*)和马铃薯疮痂病菌(*Streptomyces scabies*)、由吉林农业大学植物病理实验室提供的黄瓜角斑病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*)和西瓜果斑病菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*)。

1.2 LAMP反应体系的建立

1.2.1 细菌基因组DNA的提取

将供试菌活化培养后,转到液体培养基中恒温振荡培养至菌液浓度为 10^8 cfu/mL。将培养的菌株使用细菌基因组提取试剂盒提取菌体DNA,并用ND 1 000分光光度计检测提取的DNA质量和浓度, -20 °C保存备用。

1.2.2 LAMP引物设计

参照PCR的试验结果^[12],针对*tomA*基因设计LAMP反应内外引物及环引物(见表1)。引物由生工生物工程股份有限公司(上海)合成,利用设计合成的内外引物及环引物,使用通用型恒温实时荧光试剂盒(广州华峰生产)进行LAMP反应,使用时引物均稀释到100 μ M。

表1 LAMP反应所需引物

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>tomA</i> -107F3	CGCTGGCCCTTGACCGA
<i>tomA</i> -107B3	CCCACCGATCGATCCTTCC
<i>tomA</i> -107FIP	TACTCCGGATCGCAGCAGCGTAGAGCACGACA TGCGCG
<i>tomA</i> -107BIP	CGTGACCTCGATCACGGATGCGTAACGCTCCAT CACAGTGG
<i>tomA</i> -8F3	AAGGCCGGCGGAGTGGG
<i>tomA</i> -8B3	CCATGTCGTCTCTTCGG
<i>tomA</i> -8FIP	GCCATTGAACTGTTCCGGCAGG- GCCCGTCGAACTACCTGA
<i>tomA</i> -8BIP	AGATCGAAATGGGCCTTCACGCA- TCGGTCAAGCCCAGCG
<i>tomA</i> -107LF21	GGAGATCAGACCATGGCCCTTTA
<i>tomA</i> -107LB21	GCGGCGATGACGAGAGCA

1.2.3 LAMP反应体系

反应体系:2 \times LAMP reaction mixture 12.5 μ L, 荧光染料 0.25 μ L, Bst 酶 0.5 μ L, 引物 1.0 μ L(内、外引物终浓度分别为 1.6、0.2 μ M), 环引物(100

μ M) 0.2 μ L(终浓度为 0.8 μ M), DNA 模板 2.0 μ L, 水定容至 25 μ L, 反应程序:63 °C, 保持 70 min。

环引物加成后,使用广州华峰生产的冻干通用型恒温实时荧光试剂盒进行LAMP反应。反应体系:复溶液 15 μ L, 引物 1.0 μ L(内、外引物终浓度分别为 1.6、0.2 μ M), 环引物(100 μ M) 0.2 μ L(终浓度为 0.8 μ M), DNA 模板 2.5 μ L, 水定容至 25 μ L, 反应程序:63 °C, 保持 70 min。

1.2.4 LAMP方法引物筛选

将设计好的不同引物加到反应体系中进行等温扩增,采用实时荧光定量PCR仪进行LAMP反应并在每个循环结束时读取荧光信号值。

1.2.5 LAMP方法特异性检测

以供试菌株的DNA模板为检测对象,无菌水为空白对照,验证LAMP检测的特异性。检测结果通过三种不同方法进行判断,分别为:采用实时荧光定量PCR仪器进行LAMP反应,在每个循环结束时读取荧光信号值;对LAMP产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳检测;将LAMP扩增产物离心,使管盖上的显色物质进入产物,观察显色情况。

1.2.6 LAMP方法灵敏度检测

提取番茄溃疡病菌的DNA,并进行不同浓度的稀释使其终浓度分别为 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、50、5 copy/ μ L,作为各个梯度的DNA模板,以无菌水为空白对照进行LAMP反应的灵敏度检测。结果判断同1.2.5。

2 结果与分析

2.1 LAMP引物筛选

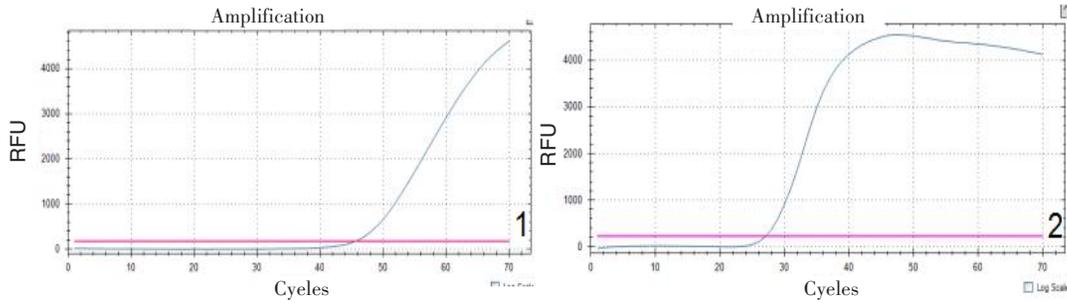
使用设计引物*tomA*-8和*tomA*-107对Cmm进行特异性扩增,图1结果显示:引物*tomA*-8扩增效果不理想,不能特异性扩增目标片段,引物*tomA*-107能较好地扩增出目的片段,可进行后续试验。

2.2 LAMP检测加环试验

对筛选出的*tomA*-107引物组进行环引物加成处理,将处理后的引物组重进进行LAMP反应,通过试验结果(图2)可看出加环后反应时间从35.17 min 缩减为 20.56 min;反应时间缩短接近三分之一,扩增速度明显加快。

2.3 *tomA*基因LAMP特异性检测

利用供试菌株对筛选优化的*tomA*-107引物组进行特异性检测,图3结果显示,三种检测方法均证明*tomA*-107基因只能从Cmm样品中获得预期的PCR扩增产物,而在番茄青枯假单胞菌、马



注:1为 *tomA*-8引物,2为 *tomA*-107引物

图1 LAMP引物筛选扩增结果

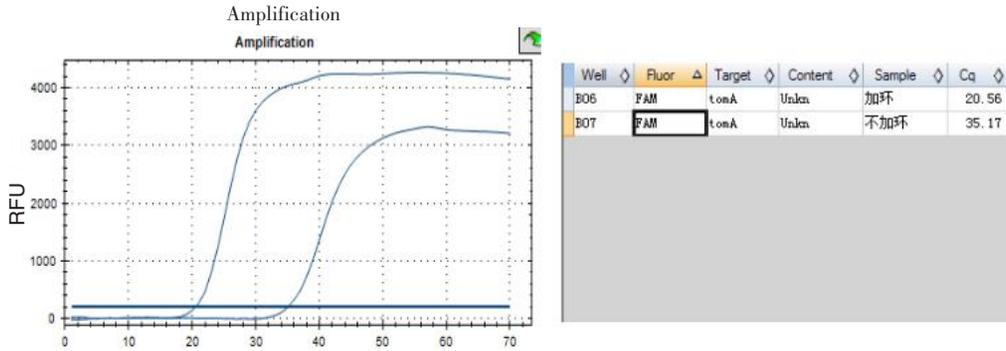
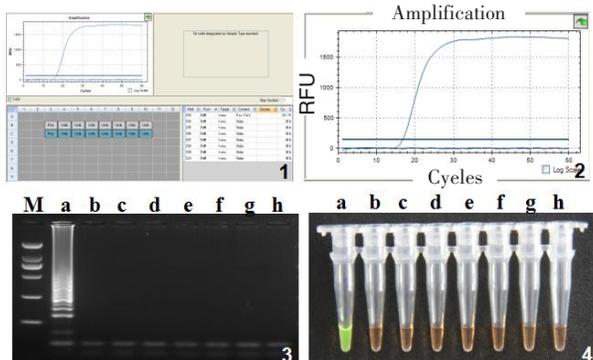
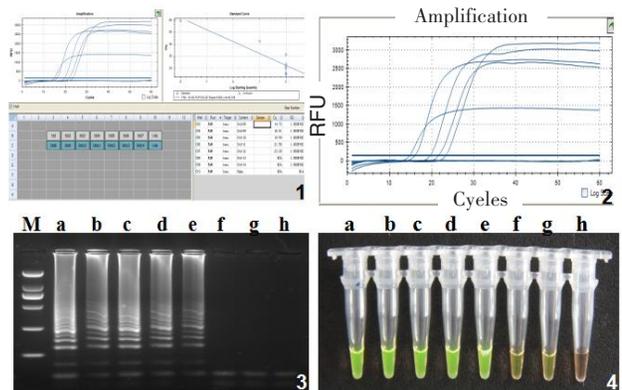


图2 LAMP检测加环试验结果



注:1、2为定量PCR仪读取数据;3为电泳图;4为显色反应图;M为Marker;a为Cmm;b为番茄青枯假单胞菌;c为茄青枯假单胞菌;d为马铃薯环腐病菌;e为黄瓜角斑病菌;f为西瓜果斑病菌;g为马铃薯疮痂病菌;h为空白对照,下同

图3 *tomA*-107基因LAMP特异性检测结果



注:a为 5×10^6 copy/ μ L;b为 5×10^5 copy/ μ L;c为 5×10^4 copy/ μ L;d为 5×10^3 copy/ μ L;e为 5×10^2 copy/ μ L;f为50 copy/ μ L;g为5 copy/ μ L;h为空白对照

图4 *tomA*-107基因LAMP灵敏度检测结果

铃薯环腐病菌等病原细菌中均不能获得目标片段,表明 *tomA*-107 基因能通过 LAMP 检测的方法特异性检测出 Cmm。

2.4 *tomA*-107 基因 LAMP 灵敏度检测

对筛选出的 *tomA*-107 引物组进行灵敏度检测,图4结果显示:三种检测方法均证明,当病菌浓度达到 5×10^2 copy/ μ L 时, *tomA*-107 基因能很好地扩增出目的片段可用于检测 Cmm。

3 讨论与结论

本研究建立的以 *tomA* 基因为检测靶标的 LAMP 检测方法,检测灵敏度为 5×10^2 copy/ μ L, 检

测时间 20.56 min。反应时间短,检测灵敏度高,技术设备要求低,可在植物体发病前^[3]快速检测出植物体是否被感染,可以作为早期检测手段,及早预防番茄细菌性溃疡病的发生蔓延。

目前检测番茄细菌性溃疡病的方法主要是 PCR,为提高检测的灵敏度出现了免疫捕捉 PCR,超分支滚环扩增技术,基于锁式探针的实时荧光 PCR^[13-14];为缩短检测时间建立了 Direct-PCR 和 Nested-PCR 及检测活菌避免假阳性的 EMA-qPCR^[15-17],但这些技术普遍存在反应时间较长,操作复杂的特点,不适于大面积推广应用。也有学者使用 LAMP 检测方法进行番茄细菌性溃疡病菌

的检测,但是选择的是具有高保守性的16S rRNA序列及高变异性的ITS序列^[18-19],而非功能基因,本研究选择了与致病性相关的*tomA*基因更能避免假阳性的出现。

本研究建立的番茄溃疡病菌LAMP可视化检测方法特异性强,灵敏度高,且操作简单,仅一台水浴锅就能进行检测。LAMP检测结果可通过肉眼观察颜色变化来判断,而不必用凝胶电泳,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。虽然PCR检测的灵敏度^[12]要高于LAMP快速检测,但PCR检测条件要求比较高,LAMP检测更快速、便捷,只需一个恒等温的环境即可,更适用于生产应用。

参考文献:

- [1] 徐 佳,王春燕,张庆萍.番茄溃疡病原细菌对5种药物敏感程度的研究[J].东北农业科学,2016,41(4):86-89.
- [2] 吴 俐.番茄溃疡病的发生规律及防治技术[J].安徽农学通报(下半月刊),2012(22):36.
- [3] Gitaitis R D, Beaver R W, Voloudakis A E. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants[J]. Plant Disease,1991,75:834-838.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research,2000,28(12): 63.
- [5] 冯 洁,张 泉,钱 森,等.肝螺杆菌LAMP快速检测方法的建立及初步应用[J].中国动物传染病学报,2019,27(4):50-55.
- [6] 陈 钰,罗力涵,李 莎,等.结核分枝杆菌LAMP检测方法的建立及应用[J].中国国境卫生检疫杂志,2017,40(4):242-247.

- [7] 许宗丽,黄溢泓,李志源,等.猪伪狂犬病病毒LAMP可视化检测方法的建立[J].中国动物检疫,2017,34(10):79-82.
- [8] 余艳玲,彭 昊,冯世文,等.罗非鱼无乳链球菌环介导等温扩增(LAMP)检测技术的建立及应用[J].江苏农业科学,2019,47(13):200-203.
- [9] 李晓霞,贾 森,金君华,等.原料乳中金黄色葡萄球菌环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用[J].江苏农业学报,2017,33(5):1171-1175.
- [10] 王芝涵,王春伟,高海馨,等.引起玉米穗腐病的禾谷镰刀菌LAMP快速检测方法的建立[J].江苏农业学报,2019,35(3):581-585.
- [11] 黄 雯,徐 进,张 昊,等.植物青枯菌LAMP检测方法的建立[J].中国农业科学,2016,49(11):2093-2102.
- [12] 毛芙蓉,李飞武,刘燕妮,等.番茄细菌性溃疡病菌的定性PCR检测方法[J].北方园艺,2015(5):128-131.
- [13] 闵现华,韩跃武,刘 箐,等.种传番茄溃疡病菌直接PCR和免疫捕捉PCR检测方法之比较[J].植物检疫,2010,24(4):12-16.
- [14] 王念武,王 婷,沈建国,等.基于锁式探针的番茄溃疡病菌实时荧光PCR快速检测[J].中国农业科学,2014,47(5):903-911.
- [15] 王 欢,刘 箐,刘 芳,等.番茄溃疡病一步法快速超灵敏检测技术研究[J].检验检疫科学,2006(S1):35-37.
- [16] 闵现华,刘 箐,韩跃武,等. Nested-PCR检测种传番茄细菌性溃疡病菌[J].西北农业学报,2011,20(7):28-31.
- [17] 周大祥,熊 书. EMA-qPCR方法快速检测番茄溃疡病菌活菌研究[J].西南农业学报,2017,30(1):99-104.
- [18] 封立平,尼秀媚,魏晓棠,等.番茄溃疡病菌的环介导等温核酸扩增技术检测方法[J].食品安全质量检测学报,2013,4(4):1207-1212.
- [19] 赵 赛,李建娜,周 颖,等.番茄溃疡病菌LAMP快速检测方法的建立[J].河北农业大学学报,2015,38(3):19-23.

(责任编辑:王 昱)

(上接第21页)用壳钙镁+仙U素复合处理的小豆产量最高,是7种氨基酸水溶肥与植物生长素组配中对辽红小豆2号增产效果最好的组合模式,为氨基酸水溶肥与植物生长素复合药剂组配在辽宁省小豆农业生产上的应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 王学君,董晓霞,董 亮,等.含氨基酸水溶肥对盐碱地小麦产量和经济效益的影响[J].山东农业科学,2016,48(6):

78-80.

- [2] 冯先明,王保明,彭 全,等.我国水溶肥的发展概况与建议[J].现代化工,2018,38(1):6-11.
- [3] 张亚平.套种大豆喷施含氨基酸水溶肥料肥效研究[J].现代农业科技,2008(9):120,122.
- [4] 李博赓,吕烈武,黄顺坚,等.氨基酸水溶肥在春植豇豆上的田间试验[J].农业研究与应用,2013(5):14-16.
- [5] 申海林,邹利人,陈 蕾,等.叶面肥对设施内葡萄生长发育的影响[J].东北农业科学,2015,40(3):89-91.

(责任编辑:刘洪霞)