



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116287354 A

(43) 申请公布日 2023.06.23

(21) 申请号 202310525899.8

C12R 1/01 (2006.01)

(22) 申请日 2023.05.11

(71) 申请人 三亚中国检科院生物安全中心
地址 572025 海南省三亚市崖州区科技城
标准厂房二期三楼C268区

(72) 发明人 赵文军 蔡璐璐 田茜 许沛冬
孟青青 陈迪 潘磊 马云龙
孙羽佳

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所
11410
专利代理师 王奕勋

(51) Int. Cl.

C12Q 1/689 (2018.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

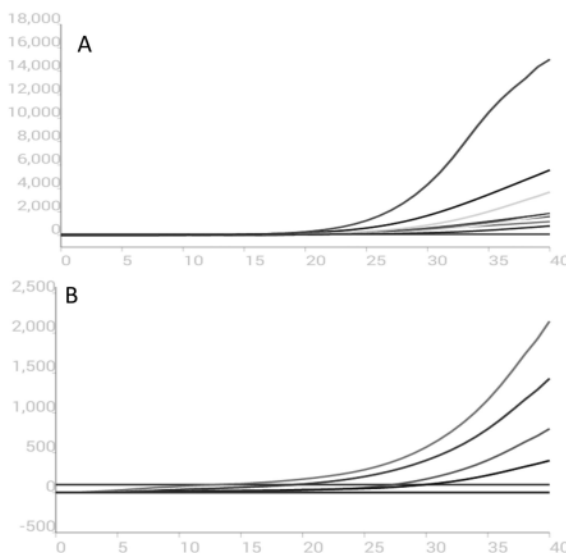
权利要求书1页 说明书13页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

检测玉米细菌性枯萎病菌的方法及试剂盒

(57) 摘要

本发明大体涉及分子生物学技术领域,具体而言,涉及一种检测玉米细菌性枯萎病菌的方法及试剂盒。本发明能够用于提高海关和基层实验室对玉米细菌性枯萎病菌的快速监测和检疫。通过实时荧光RPA反应,确定CLL001F/R引物的检测灵敏度为10 cfu/ μ L。模拟种子带菌和叶片针刺接种结果检测结果理想。与其他检测方法相比,RPA检测灵敏度高,检测时间短,易于操作,而且具有较高的灵敏性和特异性,适合玉米细菌性枯萎病菌的现场快速检疫。



1. 检测玉米细菌性枯萎病菌*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*亚种的方法,其基于重组酶聚合酶扩增技术,且用于排除*P. stewartii* subsp. *indologenes*亚种所造成的检测假阳性,所述方法包括采用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物对对待检测样品进行检测的步骤。

2. 根据权利要求1所述的方法,所述方法还采用如下所示的探针:

CATGGTGTTCGTATTTTAGGTAAATAAGTTGTTTAG[发光基团][脱碱基核苷酸类似物]GT[淬灭基团]TTTTTTCGCCATGCCG[阻断剂];

所述阻断剂用于阻断探针的聚合酶延伸。

3. 根据权利要求2所述的方法,所述脱碱基核苷酸类似物为四氢呋喃。

4. 根据权利要求2所述的方法,所述阻断剂为间臂。

5. 根据权利要求4所述的方法,所述间臂为C3间臂。

6. 根据权利要求2所述的方法,所述发光基团为FAM,所述淬灭基团是BHQ1。

7. 根据权利要求1~6任一项所述的方法,所述待检测样品包括玉米样本、土壤样本和水样本中的至少一种。

8. 权利要求1~7任一项所述的方法在区分玉米细菌性枯萎病菌*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*亚种和*P. stewartii* subsp. *indologenes*亚种中的应用。

9. 用于检测玉米细菌性枯萎病菌*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*亚种的试剂盒,其包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物以及权利要求2~6任一项中所定义的探针。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其还包含核酸提取试剂、等温核酸扩增所用试剂、阳性对照和阴性对照中的一种或多种。

检测玉米细菌性枯萎病菌的方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明大体涉及分子生物学技术领域,具体而言,涉及一种检测玉米细菌性枯萎病菌的方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 玉米细菌性枯萎病菌(*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, PSS)是进境植物检疫性病原物之一,主要通过种子进行远距离传播,其引起的玉米细菌性枯萎病是玉米上的病害。

[0003] 目前,PCR 广泛应用于进口玉米中PSS的快速检测,已经报道了多对特异引物或探针。由于PSS和*P. stewartii* subsp. *indologenes* (PSI)的基因序列非常相近,多对PSS特异引物均可扩增PSI,造成假阳性的检测结果,包括EPP0的PSS诊断标准采用的引物以及我国行业标准《SN/T 3756-2013 玉米细菌性枯萎病菌检疫鉴定方法PCR方法》中采用的引物。

发明内容

[0004] 本发明基于重组酶聚合酶扩增技术(RPA),通过收集的26株PSS及其相关菌株,对12对PSS特异引物/探针进行测试以评估引物/探针的特异性,最终建立了基于RPA的玉米细菌性枯萎病菌快速检测方法,满足(口岸)快速准确检测的需求。

[0005] 本发明一方面涉及检测玉米细菌性枯萎病菌*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*亚种的方法,其基于重组酶聚合酶扩增技术,且用于排除*P. stewartii* subsp. *indologenes*亚种所造成的检测假阳性,所述方法包括采用SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物对对待检测样品进行检测的步骤。

[0006] 本发明的再一方面涉及如上所述的方法在区分玉米细菌性枯萎病菌*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*亚种和*P. stewartii* subsp. *indologenes*亚种中的应用。

[0007] 本发明的又一方面涉及用于检测玉米细菌性枯萎病菌*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*亚种的试剂盒,其包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物以及探针。

[0008] 本发明能够用于提高海关和基层实验室对玉米细菌性枯萎病菌的快速监测和检疫。通过实时荧光RPA反应,确定CLL001F/R引物的检测灵敏度为10 cfu/ μ L。模拟种子带菌和叶片针刺接种结果检测结果理想。与其他检测方法相比,RPA检测灵敏度高,检测时间短,易于操作,而且具有较高的灵敏性和特异性,适合玉米细菌性枯萎病菌的现场快速检疫。

附图说明

[0009] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0010] 图1为引物特异性RPA检测;取26个玉米上的病原菌进行鉴定,确定引物和探针特

异性非常好,五个阳性菌株全部检测出来。

[0011] 图2为引物灵敏度RPA检测结果;其中菌液梯度稀释,最低检测浓度为10 cfu/ μ L。

[0012] 图3为模拟种子和叶片带菌RPA检测;

A. 模拟种子带菌实验,将过夜活化的菌洗涤后调整OD600为0.6(约 10^8 cfu/ml),然后进行梯度稀释后用菌液浸泡种子6h,烘干后,加入1ml的水浸泡种子4h,然后揉搓,取2 μ L进行RPA实验;

B. 玉米叶片带菌检测,针刺病斑处CT值19,稍远处的CT值29.9。

具体实施方式

[0013] 现将详细地提供本发明实施方式的参考,其一个或多个实例描述于下文。提供每一实例作为解释而非限制本发明。实际上,对本领域技术人员而言,显而易见的是,可以对本发明进行多种修改和变化而不背离本发明的范围或精神。例如,作为一个实施方式的部分而说明或描述的特征可以用于另一实施方式中,来产生更进一步的实施方式。

[0014] 除非另有说明,用于披露本发明的所有术语(包括技术和科学术语)的意义与本发明所属领域普通技术人员所通常理解的相同。通过进一步的指导,随后的定义用于更好地理解本发明的教导。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。

[0015] 本文所使用的术语“和/或”、“或/和”、“及/或”的选择范围包括两个或两个以上相关所列项目中任一个项目,也包括相关所列项目的任意的和所有的组合,所述任意的和所有的组合包括任意的两个相关所列项目、任意的更多个相关所列项目、或者全部相关所列项目的组合。需要说明的是,当用至少两个选自“和/或”、“或/和”、“及/或”的连词组合连接至少三个项目时,应当理解,在本申请中,该技术方案毫无疑问地包括均用“逻辑与”连接的技术方案,还毫无疑问地包括均用“逻辑或”连接的技术方案。比如,“A及/或B”包括A、B和A+B三种并列方案。又比如,“A,及/或,B,及/或,C,及/或,D”的技术方案,包括A、B、C、D中任一项(也即均用“逻辑或”连接的技术方案),也包括A、B、C、D的任意的和所有的组合,也即包括A、B、C、D中任两项或任三项的组合,还包括A、B、C、D的四项组合(也即均用“逻辑与”连接的技术方案)。

[0016] 本发明中所使用的术语“含有”、“包含”和“包括”是同义词,其是包容性或开放式的,不排除额外的、未被引述的成员、元素或方法步骤。

[0017] 本发明中用端点表示的数值范围包括该范围内所包含的所有数值及分数,以及所引述的端点。

[0018] 本发明中涉及浓度数值,其含义包括在一定范围内的波动。比如,可以在相应的精度范围内波动。比如2%,可以允许 $\pm 0.1\%$ 范围内波动。对于数值较大或无需过于精细控制的数值,还允许其含义包括更大波动。比如100mM,可以允许 $\pm 1\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 5\%$ 等范围内的波动。涉及分子量,允许其含义包括 $\pm 10\%$ 的波动。

[0019] 本发明中,涉及“多个”、“多种”等描述,如无特别限定,指在数量上指大于等于2。

[0020] 本发明中,以开放式描述的技术特征中,包括所列举特征组成的封闭式技术方案,也包括包含所列举特征的开放式技术方案。

[0021] 本发明中,“优选”、“更好”、“更佳”、“为宜”仅为描述效果更好的实施方式或实施

例,应当理解,并不构成对本发明保护范围的限制。本发明中,“可选地”、“可选的”、“可选”,指可有可无,也即指选自“有”或“无”两种并列方案中的任一种。如果一个技术方案中出现多处“可选”,如无特别说明,且无矛盾之处或相互制约关系,则每项“可选”各自独立。

[0022] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。除非和本申请的发明目的和/或技术方案相冲突,否则,本发明涉及的引用文献以全部内容、全部目的被引用。本发明中涉及引用文献时,相关技术特征、术语、名词、短语等在引用文献中的定义也一并被引用。本发明中涉及引用文献时,被引用的相关技术特征的举例、优选方式也可作为参考纳入本申请中,但以能够实施本发明为限。应当理解,当引用内容与本申请中的描述相冲突时,以本申请为准或者适应性地根据本申请的描述进行修正。

[0023] 本发明第一方面涉及检测玉米细菌性枯萎病菌 *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* 亚种的方法,其基于重组酶聚合酶扩增技术,且用于排除 *P. stewartii* subsp. *indologenes* 亚种所造成的检测假阳性,所述方法包括采用 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示的引物对对待检测样品进行检测的步骤。

[0024] 在一些实施方式中,所述方法还采用如下所示的探针:

CATGGTGTTCGTATTTTAGGTAATAAGTTGTTTAG[发光基团][脱碱基核苷酸类似物]GT[淬灭基团]TTTTTTCGCCATGCCG[阻断剂];

所述阻断剂用于阻断探针的聚合酶延伸。

[0025] 在一些实施方式中,所述脱碱基核苷酸类似物为四氢呋喃。其可作为核酸外切酶的识别位点。

[0026] 在一些实施方式中,所述阻断剂选自间臂、磷酸基团、生物素-TEG或胺(例如C6胺)。

[0027] 在一些实施方式中,所述间臂选自乙二醇、C9间臂(Spacer 9)、C18间臂(Spacer 18)、双脱氧间臂[1',2'-Dideoxyribose (dSpacer)]、C3间臂(C3 Spacer)中的任一种。

[0028] 在一些实施方式中,所述间臂选自C3间臂。

[0029] 间臂(Spacer)可为寡核苷酸标记提供必要的间隔以减少标记基团与寡核苷酸间的相互作用,主要应用于DNA发夹结构和双链结构研究。C3 spacer 主要用于模仿核糖的3'和5'羟基间的三碳间隔,或“替代”一个序列中未知的碱基。3'-Spacer C3用于引进一个3'间臂从而阻止3'端外切酶和3'端聚合酶发挥作用。

[0030] 在一些实施方式中,所述发光基团选AMCA、Pacific Blue、Atto 425、BODIPY FL、FAM、Alexa Fluor 488、TET、JOE、Yakima Yellow、VIC、HEX、Quasar 570、Cy3、NED、TAMRA、ROX、Aqua Phluor593、Texas Red、Atto 590、Cy5、Quasar 670、Cy5.5以及Cy5.5中的任一种。

[0031] 在一些实施方式中,所述淬灭基团选自BHQ1、BHQ2、BHQ3、Dabcyl、Eclipse以及MGB中的任一种。

[0032] 在一些实施方式中,所述发光基团为FAM,所述淬灭基团是BHQ1。

[0033] 需要说明的是,在一个方面,有用的引物和探针包括与上述所提供的特定序列的上游引物、下游引物或探针具有大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列。还考虑了这样的引物和探针修饰并且可根据

标准技术制备。

[0034] 术语“%同一性”在两个或更多个核苷酸序列或氨基酸序列的上下文中,指的是相同或具有特定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸的两个或多个序列或子序列,当比较和比对以用于最大对应时,如使用以下序列比较算法之一或通过目视检查来测量的。例如,%同一性是相对于要比较的序列的编码区域的整个长度。

[0035] 对于序列比较,通常一个序列用作参考序列,测试序列与该序列进行比较。当使用序列比较算法时,测试序列和参考序列被输入到计算机中,如果需要,指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法根据指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。可使用搜索算法例如BLAST和PSI-BLAST (Altschul et al., 1990, J Mol Biol 215:3, 403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res 25:17, 3389-402) 确定百分比同一性。

[0036] 引物和探针修饰可以采用公知的方法。这些引物和/或探针序列的修饰版本可包括,通过非限制性例子,将一个或多个核苷酸添加到5'端,将一个或多个核苷酸添加到3'端,将一个或多个核苷酸添加到5'端和3'端,添加尾部,缩短序列,延长序列,将序列上下游移动几个碱基,或其任何组合。除了上述已经提到的修饰方式,还可以在不显著负面影响引物/探针功能的前提下所施加的其他修饰,如3'P、5'P、5-硝基吡啶、2-氨基嘌呤、8-氨基-2'-脱氧腺苷、C-5丙炔基-脱氧胞苷、C-5丙炔基-脱氧尿苷、2-氨基-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸、2,6-二氨基嘌呤(2-氨基-dA)、反向dT、反向二脱氧-T、羟甲基dC、异-dC、5-甲基dC、氨基乙基-吩噻嗪-脱氧胞苷,和锁核酸(LNA's),并包括在碱基之一的至少一个错配碱基,或者替换其中至少一个碱基为RNA碱基,以实现例如增加突变体特异性引物3'端的核酸相互作用,以增加T_m。双链稳定碱基修饰的加入对PCR有积极的影响,从而使其能够在较高的温度下进行,在此范围内已知Taq聚合酶显示出最大的活性。修饰后的探针应当保留区分待检测突变位点和野生型位点的能力。

[0037] 本发明所采用的待检测样品可以是怀疑含玉米病原菌的任何样本。在一些实施方式中,所述待检测样品包括玉米样本、土壤样本和水样本(特别是玉米种植环境附近的水源和土壤)中的至少一种。

[0038] 本文所用的“玉米样品”是指固体,粘性或液体物质或制剂,典型的实例可包括水稻的插枝,根,叶,茎,花,花粉,胚,花药,种子,果实或其它部分。

[0039] 玉米样本可预先经过研磨、压实、降解、干燥、润湿等常规处理,只要该处理对病原菌的检测不产生显著干扰。

[0040] 在一些实施方案中,检测玉米细菌性枯萎病菌的方法还包括从怀疑含有该病原菌的成分中分离DNA(特别是基因组DNA)。如本文所用,术语“分离”指的是:(1)基本上或基本上不含通常伴随或与天然存在的环境中的材料相互作用的组分,(2)基本上或基本上不含伴随或相互作用加工形式的材料的组分,例如在饮料或食品中或从在分离过程中使用的物质中,或者(3)如果该材料在其自然环境中,则该材料已经通过故意的人为干预组合物而改变和/或放置在细胞中不同于该材料固有的位点的位点处。当使用术语“基本上纯化的”时,该命名将指其中蛋白质或肽形成组合物主要组分的组合物,例如占组合物的约50%,约60%,约70%,约80%,约90%,约95%或更多(即,例如,重量/重量和/或重量/体积)。如本文所用,术语“基本上纯化的”是指核酸分子(特别是DNA),其从它们的自然环境或植物中除去,分离或

分离,并且至少60%游离,优选75%游离,更优选90%不含它们天然相关的其它组分。

[0041] 从待检测样品中分离植物DNA片段可包括使用分离溶剂,如甲醇,乙醇,水,丙酮或其组合。在一些实施方案中,可以使用DNA分离试剂盒的试剂盒,包括例如使用Dneasy Mericon食品试剂盒(Qiagen,Germantown,MD,USA)或十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)DNA分离方案。其它分离技术包括裂解,加热,醇沉淀,盐沉淀,有机分离,固相分离,二氧化硅原膜分离,CSCL梯度纯化,或其任意组合。在一些具体的实施方式中,采用如上所述的纯化试剂提取并纯化待检测样品中的DNA。

[0042] 本发明的第二方面涉及如上所述的方法在区分玉米细菌性枯萎病菌*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*亚种和*P. stewartii* subsp. *indologenes*亚种中的应用。

[0043] 本发明的第三方面涉及用于检测玉米细菌性枯萎病菌*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*亚种的试剂盒,其包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物以及本发明第一方面中所定义的探针。

[0044] 术语“试剂盒”是指包括至少一个设备的任何制品(例如,包装或容器),试剂盒可进一步包括在本文中描述的方法或其步骤中使用的使用说明书、补充试剂和/或组分或组件。

[0045] 在一些实施方式中,所述的试剂盒还包含核酸提取试剂、等温核酸扩增所用试剂、阳性对照和阴性对照中的一种或多种。

[0046] 在一些实施方式中,所述等温核酸扩增所用试剂包括能结合单链核酸的重组酶、单链DNA结合蛋白、链置换DNA聚合酶、辅助蛋白、核酸外切酶III、反转录酶、ATP、ATP再生体系所用试剂、pH调节剂、dNTP、各种分子量分布的BSA和/或PEG、DTT以及水中的一种或多种;

其中所述辅助蛋白用于改变重组酶-引物复合体解离及重新结合的可逆反应过程,使反应向更有利于等温核酸扩增进行。

[0047] pH调节剂可以包含不显著影响反应进行的酸和碱,以及缓冲组分(例如Tris和醋酸盐等)。进一步地,Tris缓冲液为Tris-tricine,其工作浓度可以为约80mM~120mM。

[0048] 在一些实施方式中,所述重组酶选自uvsX和/或RecA;

在一些实施方式中,所述单链DNA结合蛋白为gp32;

在一些实施方式中,所述链置换DNA聚合酶选自BSu DNA聚合酶和/或Sau DNA聚合酶。重组酶介导的核酸恒温扩增技术中使用的DNA聚合酶是枯草芽孢杆菌DNA聚合酶I (*Bacillus subtilis* Pol I, *Bsu*)或金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Pol I, *Sau*),这两种DNA聚合酶均属于DNA聚合酶I家族。DNA聚合酶I家族是负责DNA复制过程中损伤修复的聚合酶,该家族中大部分DNA聚合酶的持续合成能力都不高,也就是说该家族的聚合酶与模板结合一次能催化的聚合反应数目较少。

[0049] 在一些实施方式中,所述辅助蛋白选自uvsY;

当重组酶用于链插入步骤的情况下,所述系统可能要求能量来源。这些酶的大多数利用ATP作为能量来源,但是因为ATP整理(*collate*)酶活性必需的镁离子,因此有利的提供另外的ATP再生系统而不是提高ATP的浓度。在一些实施方式中,所述ATP再生体系所用试剂选自镁离子、磷酸肌酸及其平衡离子、肌酸激酶、肌激酶、焦磷酸酶、蔗糖以及蔗糖磷酸化酶中的一种或多种。

[0050] 从上述组分可知,本发明所述试剂盒可以采用并优先采用重组酶聚合酶扩增(Recombinase Polymerase Amplification,RPA)方法,但亦可以采用在该技术之上的改进方法,例如重组酶依赖型扩增技术(Recombinase-dependent amplification,RDA)。

[0051] 在一些实施方式中,所述等温核酸扩增所用试剂为冻干粉试剂或混合的液体试剂。

[0052] 各组分优选以冻干形式,例如以一种或多种所谓的冻干珠的形式实现。冻干珠通常可以被理解为是指在制造后(在所述制造后物质通常作为粉末存在)被压制成球形的冻干物。因此,可以以冻干形式提供扩增反应所需的组分,特别是各种酶、核酸组分以及反应缓冲剂组分。以这种方式,可以通过添加待定量的样品以及任选其它所需组分对于用户非常友好的方式直接开始扩增过程。特别地,冻干形式的提供非常有利于自动化应用。

[0053] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,优先参考本发明中给出的指引,还可以按照本领域的实验手册或常规条件,还可以参考本领域已知的其它实验方法,或者按照制造厂商所建议的条件。

[0054] 下述的具体实施例中,涉及原料组分的量度参数,如无特别说明,可能存在称量精度范围内的细微偏差。涉及温度和时间参数,允许仪器测试精度或操作精度导致的可接受的偏差。

[0055] 实施例

1材料与方法

1.1材料

供试菌株:共收集菌株 26 株,包括 5 株 PSS、2 株 PSI、19 株其他菌株。其中 5 株 PSS、2 株 PSI及相关种采用16S 测序的方法进行了确认,菌株信息见表 1。

[0056] 表1 菌株信息

菌株	编号
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	LX-2-8.19
	ATCC 8199
	ATCC 8200
	ATCC 29227
	ATCC 29228
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	ATCC 35396
	4270-6
<i>P. stewartii</i>	4270-4
	1082-3
<i>P. agglomerans</i>	1848-林
<i>P. ananatis</i>	DSM 30070
<i>P. cypripedii</i>	ICMP 1591
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	ATCC 19307
<i>Burkholderia andropogonis</i>	ATCC 23060
<i>Burkholderia cepacia</i>	LMG 1222
<i>Burkholderia gladioli</i>	NCPPB1888
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	NCPPB2578
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	ICMP10850
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	NCPPB549
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	2412-1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LX-2
<i>Pseudomonas fuscovaginas</i>	NCPPB3734
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>panici</i>	2357-1
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5083
<i>Xanthomonas albilineans</i>	ICMP196
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	ATCC13901

培养基:NA 培养基(蛋白胨 10 g、牛肉膏 3 g、氯化钠 5 g、琼脂粉 15 g、蒸馏水 1 L)。

[0057] 试剂:细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;DL2000 DNA marker、2×Taq PCR Master Mix、Premix Ex Taq (Probe qPCR)购自日本TaKaRa;其余试剂均为国产或进口分析纯。

[0058] 仪器:T100 PCR仪,美国Bio-rad公司;Quan Studio 5实时荧光PCR仪,美国ABI公司;GelDoc XR凝胶成像系统,美国 Bio-rad公司,安普未来RPA快速检测仪。

[0059] 1.2引物/探针

测试引物/探针包括文献报道的12对检测PSS的特异性引物/探针(表 2),引物/探针由华大基因有限公司合成。

[0060] 表2 引物/探针序列

编号	引物 / 探针	序列 (5'-3')	产物大小 /bp
A	ABinter F1	TGGATTTTATGCTGTGGTACTATGAAAACGGT	150
	ABinter R1	TTGAATAATAGGTAATCATTCTGTTTTGTCTGC	
B	ABinter F2	AAATGGATTTTATGCTGTGGTACTATGAAAAC	150
	ABinter R2	AATAATAGGTAATCATTCTGTTTTGTCTGCACT	
C	GaleE F1	GAATTCATTATCCGTGATTTTGCCAAAG	304
	GaleE R1	CTTTATAACCTTCAATTTTGTCCAGATGATC	
D	GaleE F2	GATGGTCGAATTCATTATCCGTGATTTTG	311
	GaleE R2	TATAACCTTCAATTTTGTCCAGATGATCCAG	
E	p-g F	GGGATTCACGCGTTTCATTTATTTGATCTTGC	165
	p-g R	TCATGCAAAATATCCTCAGTCAACTCGCCAAAA	
F	PssF1	TATTGATCGTATCCTCATTGTTGCTT	189
	PssR	GCGCTCTGGCTATATTGGGTTATTACGGCAC	
G	PssF2	GCTGCAGGTTATTGATCGTATCCTCATTG	195
	PssR	GCGCTCTGGCTATATTGGGTTATTACGGCAC	
H	EGaseUP	GGCGGCGGTGAAAGAGTT	453
	EGaseNP	GATGCACCGACGGAAACAA	
I	MDC283galE	CGACCTGTTTGCCTCTCACT	268
	DC283galEc	CATCAGCTTGGAGGTGCCA	
J	cpsAB2313F	AGAAAACGCTGATGCCAGAC	375
	cpsR	ACTATCCTGACTCAGGCACT	
K	DC283galE	CGACCTGTTTGCCTCTCACT	182
	DC283galEc	CATCAGCTTGGAGGTGCCA	
L	CLL001-F (SEQ ID NO: 1)	GGTAGAAAACGCTGATGCCAGACAGAACACCGTC	256
	CLL001-R (SEQ ID NO: 2)	AAGTAAACTATCCTGACTCAGGCACTGAACATG	
	CLL001P	CATGGTGTGCTATTTTAGGTAATAAGTTGTTTAG [FAM- δ T][THF]GT[BHQ1- δ T] TTTTTTCGCCATGCCG[C3Spacer]	

1.3 DNA 提取

供试菌株在NA培养基上纯化,取单菌落扩繁后用无菌水洗脱,菌悬液离心,沉淀用细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌基因组DNA, -20℃保存备用。

[0061] 1.4 引物测试

分别用12对引物测试供试的26株菌株DNA,反应程序参考其原始文献。PCR 扩增产物采用1.2%的琼脂糖凝胶电泳分析。

[0062] 1.5 灵敏度测试

测试筛选出2对特异性引物CLL001F/R和cpsAB2313F/cpsR,取菌株29277的基因组DNA进行10倍系列稀释,DNA浓度分别为50 ng/ μ L、5 ng/ μ L、0.5 ng/ μ L、0.05 ng/ μ L、0.005 ng/ μ L、0.5 pg/ μ L、0.05 pg/ μ L、0.005 pg/ μ L、0.0005 pg/ μ L,分别用上述2对引物进行PCR扩增,加入DNA模板2 μ L,反应程序按照原始文献。PCR扩增产物采用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析。

[0063] 1.6 模拟种子和叶片带菌检测

取PSS菌株29277制备 10^8 CFU/mL的菌悬液,梯度稀释后,取1mL菌悬液至含有6粒玉米种子中,混匀,自然晾干作为人工感菌样品,然后浸泡处理后提取DNA进行RPA实验。同时,将菌株 29277的 10^8 CFU/mL的菌悬液采用针刺的方法接种幼嫩的叶片,清水注射为阴性对照两周后观察发病情况,并进行RPA实验。引物cpsAB2313F/cpsR和cpsF/cpsR分别检测上述样品DNA,同时也采用引物CLL001F/R和探针进行RPA检测。

[0064] 2结果与分析

2.1引物特异性测试

采用12对特异性引物/探针对26株菌株的基因组DNA进行PCR或qPCR检测,测试结果显示,引物 CLL001F/R和 cpsAB2313F/cpsR对供试的PSS均为阳性扩增,其他供试菌株均为阴性,2对引物的特异性优于其他供试引物/探针(表3)。引物cpsAB2313F/cpsR在扩增部分菌株时出现微弱的非特异性扩增,但非特异性条带大小与目标条带相差较远,不影响结果的判断。

[0065] 表3引物/探针检测结果

菌株	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>												
LX-2-8.19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC 8199	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC 8200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC 29227	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC 29228	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>												
ATCC 35396	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4270-6	+	(+)	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>P. stewartii</i>												
4270-4	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
1082-2	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>P. agglomerans</i>												
1848-林	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. ananatis</i>												
DSM 30070	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. cypripedii</i>												
ICMP 1591	+	(+)	(+)	+	+	-	-	-	-	-	(+)	-
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>												
ATCC 19307	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia andropogonis</i>												
ATCC 23060	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i>												
LMG122	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia gladioli</i>												
NCPPB1888	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	(+)	-
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>												
NCPPB2578	+	+	+	+	+	-	-*	-	-	-	-	-
<i>Dickeya chrysanthemi</i>												
ICMP10850	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>												
NCPPB549	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>												
2412-1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>												
LX-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>												
NCPPB3734	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>panici</i>												
2357-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>												
LMG 5083	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas albilineans</i>												
ICMP196	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>												
ATCC 13901	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

注：“+”为阳性；“-”为阴性；

“-*”表示结果为阴性，但存在非特异性扩增，不影响对结果的判断。

[0066] 实验结果表明，10对供试引物均存在不同程度的假阳性或弱假阳性扩增，容易引起假阳性或弱假阳性扩增的菌株主要包括 PSI、*P. stewartii*、*P. allii*等(表 3)。引物 cpsF/cpsR可扩增4株PSI和3株*P. stewartii*，得到193 bp的非预期条带，而扩增 PSS 时条带大小为 375 bp。扩增产物测序结果显示(数据未显示)，这是由于 PSI 和*P. stewartii* 扩增区域缺失了182个碱基，造成了产物大小相差182bp。此外，该引物还可非特异性扩增*P.*

allii, 扩增条带与目标条带非常接近(仅片段稍大于目标条带), 容易影响结果判断。

[0067] 2.2 样品特异性和灵敏度RPA检测

利用筛选出的引物CLL001F/R和探针对26个菌株进行RPA特异性检测, 实验结果表明该引物和探针特异性很强, 见图1, 其A、B、C对应的数据参见表4、表5、表6, 能成功区分PSS和其他菌株。利用菌株29277的基因组DNA系列梯度浓度为50 ng/ μ L、5 ng/ μ L、0.5 ng/ μ L、0.05 ng/ μ L、0.005 ng/ μ L、0.5 pg/ μ L、0.05 pg/ μ L、0.005 pg/ μ L、0.0005 pg/ μ L进行引物CLL001F/R和探针的灵敏度测试。RPA实验结果表明, RPA方法对于DNA最低检测浓度为0.0005pg/ μ L(图2, 其对应的数据参见表7)。

[0068] 表4

孔位	样本名称	检测项目	T T(F)
A1	ATCC 8199	PSS	16.0
A2	ATCC 8200	PSS	10.8
A3	ATCC 29227	PSS	13.4
A4	ATCC 29228	PSS	10.5
A5	ATCC 35396	PSI	
A6	4270-6	PSI	
A7	4270-4	<i>P.stewartii</i>	
A8	1082-3	<i>P.stewartii</i>	

表5

孔位	样本名称	检测项目	T T(F)
A1	LX-2	PSS	17.4
A2	1848-林	<i>Pantoea agglomerans</i>	
A3	DSM 30070	<i>Pantoea ananatis</i>	
A4	ICMP 1591	<i>Pantoea cyripedii</i>	
A5	ATCC 19307	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	
A6	ATCC 23060	<i>Burkholderia andropogonis</i>	
A7	LMG 1222	<i>Burkholderia cepacia</i>	
A8	NCPPB1888	<i>Burkholderia gladioli</i>	

表6

孔位	样本名称	检测项目	T T(F)
A1	LX-2	PSS	13.5
A2	NCPPB 2578	Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis	
A3	ICMP 10850	Dickeya chrysanthemi	
A4	LMG 5083	Pseudomonas syringae pv. panici	
A5	ICMP 196	Xanthomonas albilineans	
A6	ATCC 13091	Xanthomonas axonopodis pv. vasculorum	

表7

孔位	样本名称	检测项目	T T(F)
A1	10 ⁸	PSS	3.2
A2	10 ⁷	PSS	6.2
A3	10 ⁶	PSS	10.2
A4	10 ⁵	PSS	15.0
A5	10 ⁴	PSS	25.8
A6		positive	3.5
A7		negative	

2.3模拟带菌种子样品检测

本发明制备了6份不同带菌量的玉米种子(接种量 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$ CFU/ml),使用CLL001F/R和探针进行RPA实验,结果表明种子样品检测极限为 1×10^2 CFU/ml,即在单个反应体系中可检测到2 cells(图3中A,其对应的数据参见表8)。对幼嫩的玉米叶片进行针刺接种后,确认发病后进行采样,提取DNA进行RPA检测,RPA检测发现接种处样品的CT值为19.3,同一片稍远处为27左右,显示样品为阳性,对照样品为RPA结果为阴性(图3中B,其对应的数据参见表9)。

[0069] 表8

孔位	样本名称	检测项目	T T(F)
A1	Postive	PSS	18.3
A2	10 ⁸	PSS	15.7
A3	10 ⁷	PSS	15.6
A4	10 ⁶	PSS	16.5
A5	10 ⁵	PSS	21.6
A6	10 ⁴	PSS	22.3
A7	10 ³	PSS	25.6
A8	10 ²	PSS	26.1

表9

孔位	样本名称	检测项目	T T(F)
A1	Postive	PSS	13.1
A2	Corn leaf 1	PSS	19.3
A3	Corn leaf 2	PSS	27.3
A4	Corn leaf 3	PSS	29.9
A5	Negative	PSS	

讨论

目前 *P. stewartii* 种下有个 2 亚种,即 PSI和PSS,亚种间遗传关系相近,但PSI对玉米不致病,能够引起谷子 (*Setaria italica*) 和 *pennisetum americanum* 的叶斑、菠萝 (*Ananas comosus*) 的腐烂。基于此有学者认为 *P. stewartii* 的这2个亚种可以独立成2个不同的种。由于这 2个亚种的序列相似性高,因此许多 PSS 特异引物可扩增 PSI,从而造成假阳性扩增,影响了检测结果的准确性。王赢等^[1]利用39株菌验证了5对已报道的 PSS 特异性引物,发现其中3对引物能扩增 PSI;Block 等^[2]验证了9对报道的引物,发现均存在不同程度上的假阳性扩增现象;Pal 等^[3]验证了 8 对已报道的引物,发现这8对引物均能扩增 PSI。本发明在前人研究的基础上,收集了26株菌株,包括从玉米种子样品中分离的近似菌菌株,对目前已经报道的 18 对引物进行特异性评价,测试结果和前人研究相符,大部分供试引物存在假阳性扩增,仅DC283galE/DC283galEc 和 cpsAB2313F/cpsR 引物特异性好。

[0070] [1] 王赢,周国梁,印丽萍,等. 玉米细菌性枯萎病菌 PCR 检测. 植物病理学报, 2009,39(4):368-376.

[2] Block C C,Shepherd L M,Munkvold G. Comparison of nine PCR primer sets designed to detect *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* in maize[EB/OL]. (2021-06-06)[2021-06-07].<https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=266266>.

[3] Pal N,Block C C,Gardner C A G. A real-time PCR differentiation *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* from *P.stewartii* subsp. *indologenes* in corn seed. *Plant Disease*,2019,103(7):1474-1486.

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准,说明书及附图可以用于解释权利要求的内容。

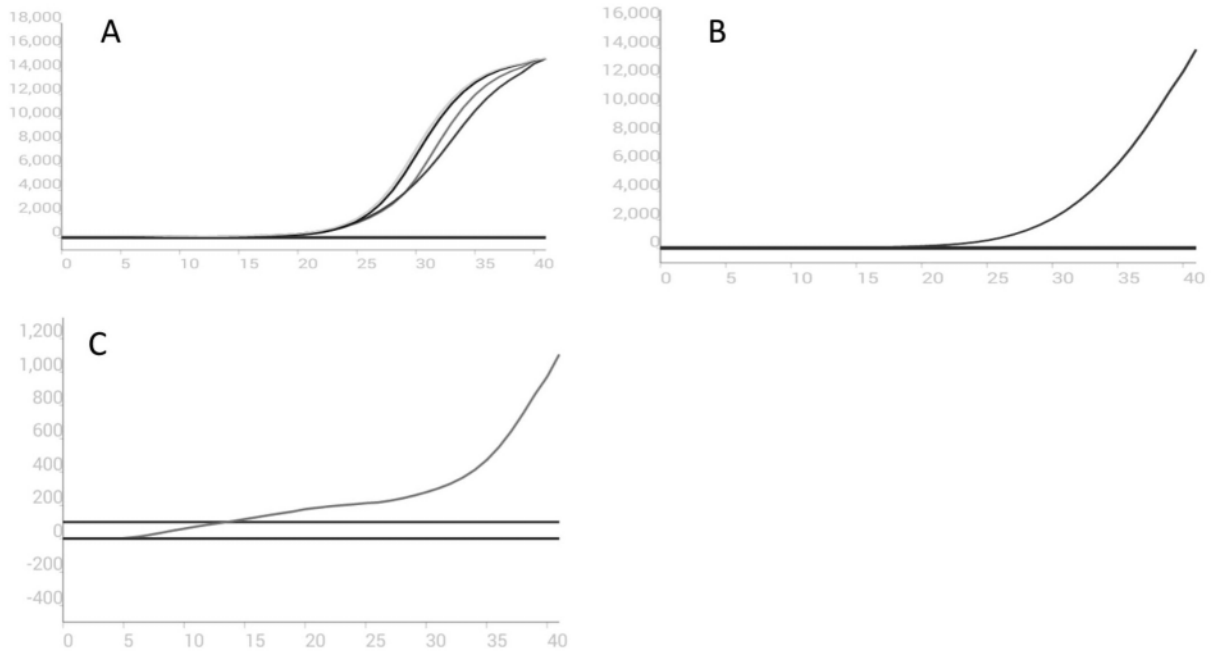


图1

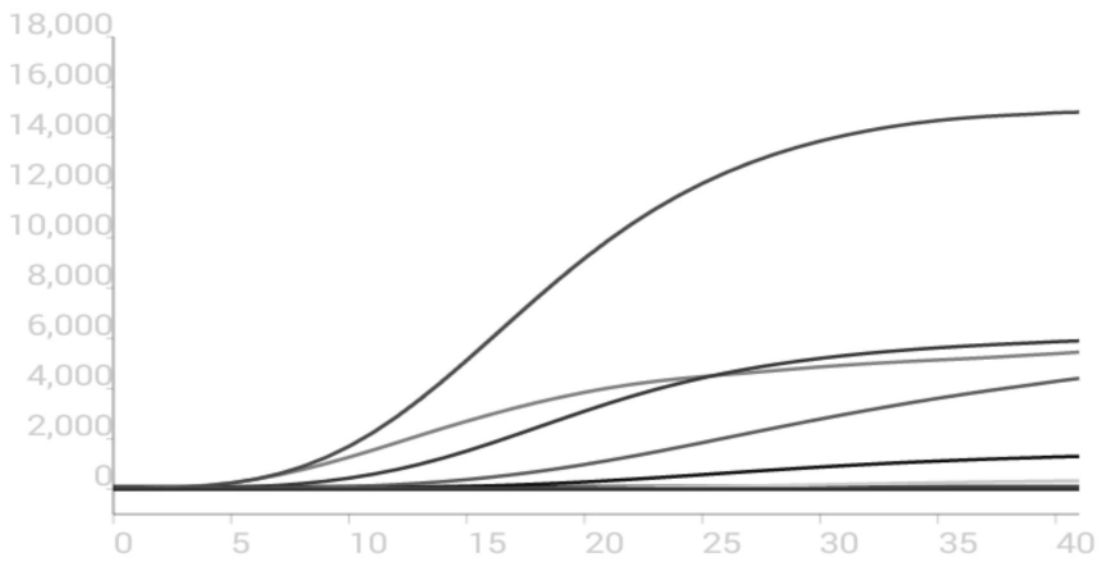


图2

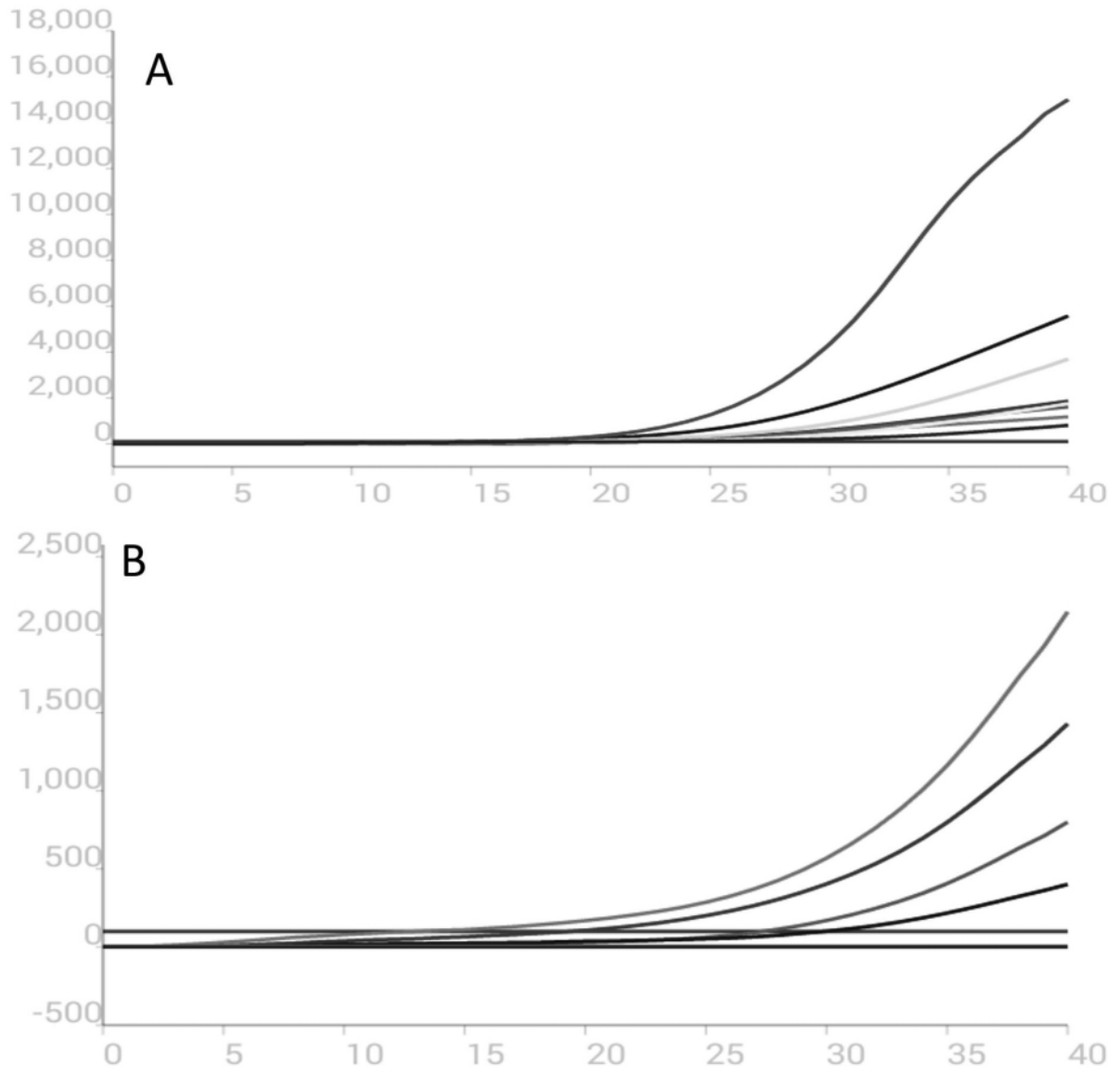


图3