

文章编号: 0412-0914(2002)04-0361-07

植原体 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测鉴定方法的建立

廖晓兰¹, 朱水芳^{2*}, 陈红运², 黄文胜²,
罗宽¹, 赵文军², 马荣群³, 朱建裕¹

(1. 湖南农业大学植保系, 长沙 410128; 2. 国家质检总局动植物检疫实验所, 北京 100029;
3. 西北农林科技大学, 杨凌 712100)

摘要: 本研究成功建立了植原体分类鉴定和检测的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法, 该方法根据植原体 16S rDNA 保守区设计了 1 个 TaqMan 广谱探针和 3 个植原体组间点突变特异性探针, 并对 9 种植原体和 5 种细菌以及 3 个植物样本进行实时荧光 PCR。结果表明, 用广谱探针可检测到所有植原体产生荧光信号, 而细菌不产生荧光信号。当用植原体组间特异性探针检测时, 仅能检测到该组植原体产生荧光信号, 检测的敏感性比常规的 PCR-电泳检测高约 100 倍、检测速度有较大提高。由于 PCR 产物是荧光探针检测, 本方法特异性强, 并且可以用组特异探针直接确定植原体种类。实验采用完全闭管检测, 降低了污染机会。本研究为其它原核生物、特别是不能培养菌、难培养菌的检测鉴定和分类提供了新方法。

关键词: TaqMan 探针; 实时荧光 PCR; 植原体; 检测; 鉴定

中图分类号: Q939.34; Q754 **文献标识码:** A

ESTABLISHMENT OF REAL-TIME FLUORESCENT PCR METHOD WITH TaqMan PROBE FOR PHYTOPLASMA DETECTION AND IDENTIFICATION

LIAO Xiao-lan¹, ZHU Shui-fang², CHEN Hong-yun², HUANG Wen-sheng²,
LUO Kuan¹, ZHAO Wen-jun², MA Rong-qun³, ZHU Jian-yu¹

(1. Dept. of Plant Protection, Hunan Agric. Univ., Changsha 410128;

2. Institute of Animal and Plant Quarantine, AQSIQ, Beijing 100029;

3. Northwest Sci-Tech University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: A real-time fluorescent PCR (RTF PCR) method was established to detect and identify phytoplasmas. One universal and three group-specific TaqMan probes were designed based on the conserved region of the 16S rDNA of phytoplasmas, and they were used to detect 9 strains of phytoplasmas and 5 species of bacteria and three samples by RTF PCR. The results showed that the universal probe could detect all the phytoplasmas used, while no signal was detected for bacteria. For three group-specific probes, each could detect its own group specifically. The method was 100 times more sensitive than normal PCR and more specific and

收稿日期: 2002-03-04; 修回日期: 2002-07-17

* 联系作者

作者简介: 廖晓兰(1962-), 女, 湖南人, 教授, 硕士, 在读博士, 从事植物病原的检测防治工作。

much faster due to fluorescent probe used. It could even identify the phytoplasma species while the group specific probes used. Few contamination would occur because whole detection process was finished in the contained tubes. RTF PCR could be a new technique for detecting other prokaryotes, especially the fastidious bacteria.

Key words: TaqMan probe; real-time fluorescent PCR; phytoplasma; detection; identification

植原体(phytoplasma),原称类菌原体(mycoplasma-like organism, MLO)。能引起许多重要的粮食、蔬菜和果树以及观赏作物、林木的严重病害,并造成巨大损失。目前世界各地先后报道的植原体病害达 300 多种,我国也报道了 70 余种,且有不断增加的趋势。近 20 年来,血清学和以染色体 DNA 为基础的分子生物学技术已用来鉴定和区分植原体。植原体 16S rRNA 基因序列同源性分析是目前国际上植原体分类鉴定的最重要的方法。到目前为止,根据植原体 16S rRNA 限制性片段长度多态性分析(RFLP)和核糖体蛋白质基因(*rp*)序列分析构成了植原体分类的基本框架,并将植原体分为 14 个组。此外,研究者对植原体 23S rRNA,16S-23S rRNA 间隔区,与蛋白质合成有关的延伸因子 EF-Tu(*tuf*)等基因也进行了序列分析研究,以探索植原体检测和分类鉴定新途径^[1]。这些方法整个过程繁杂,操作步骤多,而且需要 PCR 后处理,如琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色,紫外光观察结果或通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测,如果要鉴定到种或组,还要进行限制性内切酶多态性分析(RFLP),或者进行核酸序列测定和同源性比较,不仅需要多种仪器,而且费时费力,所使用的染色剂溴化乙锭对人体又有害,这些繁杂的实验过程又给污染和假阳性提供了机会,严重影响对结果的正确判断。为此,我们开展了 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测和分类鉴定植原体的研究,以期获得一种简单、快速、灵敏、准确的新方法。

TaqMan 探针实时荧光 PCR 是在常规 PCR 反应体系中添加了一条标记了 2 个荧光基团的探针。荧光报告基团标记在探针的 5' 端,荧光淬灭基团标记在探针的 3' 端,两者可构成能量传递结构。在通常情况下荧光报告基团所发出的荧光可被荧光淬灭基团吸收。当二者距离变远时,抑制作用减弱,报告基团荧光信号增强。当在 PCR 扩增过程中,TaqMan 探针同 PCR 产物杂交,由于 TaqDNA 聚合酶具有 5' 端外切酶活性,在引物延伸阶段将杂交在模板上的荧光探针 5' 端荧光报告基团切下,而脱落在溶液中,加大了与淬灭基团的距离,从而引起报告基团发出荧光信号。随着 PCR 的进行,愈来愈多报告基团被切下,荧光信号也随着增强,它是模板被 PCR 扩增、TaqMan 探针与 PCR 产物杂交的直接标志。即只有在引物和探针都与模板杂交时,才能检测到荧光信号。如果探针不能与模板特异性的结合,即使在引物的作用下模板在 PCR 过程中得以扩增,但检测不到荧光信号。实时荧光 PCR 仪就是根据上述原理,在 PCR 过程中连续地检测反应体系中荧光信号的变化。由于循环次数(*Ct* 值)与 PCR 体系中起始模板量的对数值有严格的线性关系,因此可定性确定反应体系中是否有模板 DNA,而且可相对确定反应体系中 DNA 的量^[2]。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验所用 8 个植原体 16S rDNA 质粒,1 个植原体基因组 DNA 以及 5 个细菌菌株均由国家出入境检验检疫局动植物检疫实验所植物检疫实验室提供。泡桐健株脱毒组培苗及泡桐丛枝病病株组培苗、枣疯病田间病株标样由中国林科院田国忠博士提供。

1.2 仪器试剂

仪器:PTC200PCR 扩增仪(JM Research)、ABI PRISM7700 扩增仪(PE 公司)。

试剂:Faststart TaqDNA 聚合酶、尿嘧啶-DNA 糖苷酶(UNG 酶)、dATP、dUTP、dCTP、dGTP、PCR 缓冲液、 $MgCl_2$ 等购自 Roche 公司、pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细菌基因组 DNA 抽提 根据《精编分子生物学实验指南》提供的方法进行^[3]。

1.3.2 植原体 DNA 的提取 根据 I-M Lee 等人的方法进行^[4]。

1.3.3 植原体 16S rDNA 基因克隆和序列测定 以植原体基因组 DNA 为模板,用引物^[4] R16mR1: 5'-CTTAACCCCAATCATC-3', R16mF2: 5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3' 进行 PCR,得到 1.5 kb PCR 产物,克隆到 pMD18-T 载体上。提纯含 16S rDNA 质粒,一部分存于 -20℃ 冰箱备用,一部分送上海基康生物技术有限公司测序。

1.3.4 TaqMan 探针与引物的设计和合成 从 GenBank 调出所有已知植原体的 16S rRNA 序列;用 Omega 软件找出所有植原体 16S rRNA 序列的保守区;使用引物和探针设计软件 Primer 5.0 设计植原体通用引物对 PPF: 5'-TTATTGGGCGTAAAGGGTG-3', PPR: 5'-AAACAACAACAT GATCCACCGCTTG-3'。同理,在通用引物对扩增片段区间找出所有植原体基因序列的保守区和植原体组内保守而组间基因序列具稳定性点突变区,分别设计出植原体通用探针 PProbe 和小组特异性探针(探针已申请专利,故不列出序列)PCLYProbe、PEYProbe、PAPProbe。引物和探针在上海申友生物技术有限责任公司合成,探针 5' 端标记报告荧光染料为 6-Carboxyfluorescein (FAM),3' 端标记淬灭荧光染料为 Tetramethylcarbo xyrhodamine(TAMRA)。

1.3.5 实时荧光 PCR 检测 反应体系:10×PCR 缓冲液 2.5 μ l,25 mmol/L $MgCl_2$ 5 μ l,10 mmol/L dATP、dUTP、dGTP、dCTP 各 0.5 μ l,20 μ mol/L 引物各 0.5 μ l,20 μ mol/L 探针 1 μ l,1 U/ μ l UNG 酶 0.15 μ l,5 U/ μ l Faststart Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l,模板 DNA 1 μ l,加灭菌双蒸水使总体积为 25 μ l。

样品检测:将样品放入 ABIPRISM7700 96 孔反应板上打开 Sequence Detection 1.71,设置 PCR 反应条件,第一个循环为 50℃,2 min,95℃,10 min;后 40 个循环为 94℃,15 s,60℃,1 min。点击运行,进行 PCR 反应,1 h 56 min 反应结束,保存文件,打开分析软件,仪器自动分析实验结果。给出 ΔR_n (第 n 循环时的荧光信号增加值)与循环数图象。

1.3.6 本次实验所用植原体及细菌 表中列出了本次实验所用植原体及细菌的名单。

2 结果与分析

2.1 PProbe 广谱探针对植原体的检测

用广谱探针 PProbe 对 9 种植原体和 5 种细菌对照株进行实时荧光 PCR 检测,9 种植原体都表现为阳性扩增,而 5 种细菌对照株及水对照未有荧光增加信号,表现为阴性。由于 9 种植原体的 DNA 模板在反应体系中的浓度不同,所以实时荧光 PCR 扩增曲线表现差异(图 1),模板浓度越高,可检测到荧光增加信号所进行的 PCR 循环数越少,当模板浓度为零时,即使 PCR 循环数达到最大(40 个循环),也检测不到荧光增加信号,说明探针 PProbe 对植原体特异性强,它可将植原体和细菌区分开来,这对于今后快速诊断病害有实用价值。根据所设计的植原体广谱性引物 PPF/PPR,扩增片段应为 392 bp,将扩增产物作电泳观察(图 2),可见所有植原体在 392 bp 位置存在扩增带。其中 3 种细菌对照株亦存在扩增带,2 种细菌对照株有非特异性扩增带,水对照无扩增带出现。这表明 TaqMan 探针具有很强的特异性,尽管引物可把非特异性模板扩增出来,但如果 TaqMan 探针不能与模板特异性的结合,在实时荧光 PCR 仪上就不能观察到荧光增加信号。

表 植原体及细菌名单

Table The name of phytoplasma and bacteria

缩写 Abbreviation	病原 Pathogen	分类地位 Classification
BB	马铃薯巨芽病原(Tomato big bud phytoplasma)	植原体翠菊黄化组(Phytoplasma aster yellows group)
Cph	三叶草变叶病原(Clover phyllody phytoplasma)	植原体翠菊黄化组(Phytoplasma aster yellows group)
AY	翠菊黄化病原(Aster yellows phytoplasma)	植原体翠菊黄化组(Phytoplasma aster yellows group)
CYE	三叶草边缘黄化病原(Clover yellow edge phytoplasma)	植原体 X-病组(Phytoplasma X-disease group)
CX	加拿大桃 X-病原(Canadian peach X-disease phytoplasma)	植原体 X-病组(Phytoplasma X-disease group)
CY	椰子致死黄化病原(Coconut lethal yellow phytoplasma)	植原体椰子致死黄化组(Phytoplasma coconut lethal yellows group)
CLYMLO	樱桃致死黄化病原(Cherry lethal yellows phytoplasma)	植原体榆树黄化组(Phytoplasma ash yellows group)
CMLO	樱桃致死黄化病原(Cherry lethal yellows phytoplasma)	植原体榆树黄化组(Phytoplasma ash yellows group)
PD	梨衰退病原(Pear decline phytoplasma)	植原体苹果丛簇组(Phytoplasma apple proliferation group)
XC	甘兰黑腐病原(<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>)	细菌黄单胞菌属(<i>Xanthomonas</i>)
PS	丁香假单胞菌(<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>)	细菌假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)
EC	胡萝卜软腐病菌(<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>)	细菌欧氏杆菌属(<i>Erwinia</i>)
AT	根癌土壤杆菌(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	细菌土壤杆菌属(<i>Agrobacterium</i>)
CM	马铃薯环腐病菌(<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>)	细菌棒形菌属(<i>Clavibacter</i>)

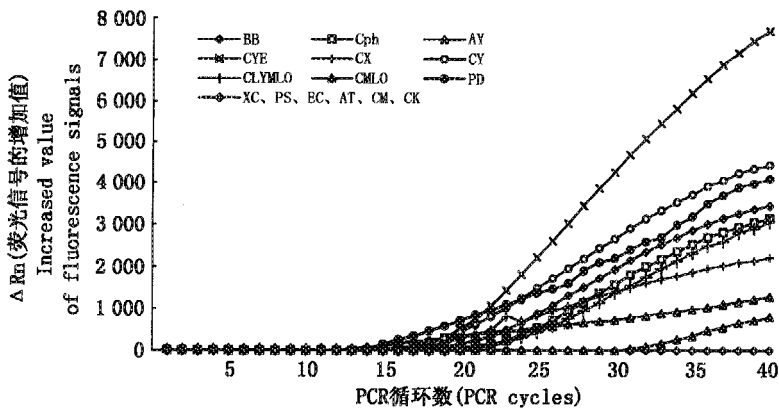


图 1 PProbe 广谱探针实时荧光 PCR 结果图

Fig. 1 Results of RTF PCR generated by PProbe universal probe

2. 2 植原体组间 PCLYProbe、PEYProbe、PAPProbe 探针对植原体扩增的特异性

PCLYProbe 是针对植原体椰子致死黄化组, PEYProbe 是针对植原体榆树黄化组, PAPProbe 是针对植原体苹果丛簇组而设计的特异性探针。用 PCLYProbe 在退火温度 67℃, PEYProbe 在退火温度 63℃, PAPProbe 退火温度 60℃下对 9 种植原体和 5 种细菌对照菌进行实时荧光 PCR 检测, 结果 PCLYProbe 只检测到椰子致死黄化(CY)植原体, 而其它供试菌及水对照均为阴性(图 3)。PEYProbe 检测到 2 种樱桃致死黄化菌(CMLO、CLYMLO), 而樱桃致死黄化菌归属于榆树黄化组(图 4)。PAPProbe 检测到梨衰退植原体(PD), 而 PD 归属于植原体苹果丛簇组, 其它非同组供试菌及细菌对照菌均为阴性(图 5)。表明设计的这 3 个植原体组间特异性探针的特异性非常强, 它不但能把植原体与细菌区分开来, 而且可把不同组的植原体区分开来。这为以后快速检测、鉴定植原体并确定其分类地位提供了依据。

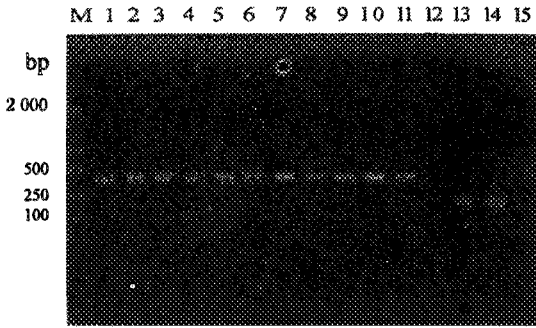


图 2 实时荧光 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoretic detected of RTF PCR products

1:BB, 2:Cph, 3:AY, 4:CYE, 5:CX, 6:CY, 7:CLYMLO, 8:CMLO, 9:PD, 10:XC, 11:PS, 12:EC, 13:AT, 14:CM, M:Marker.

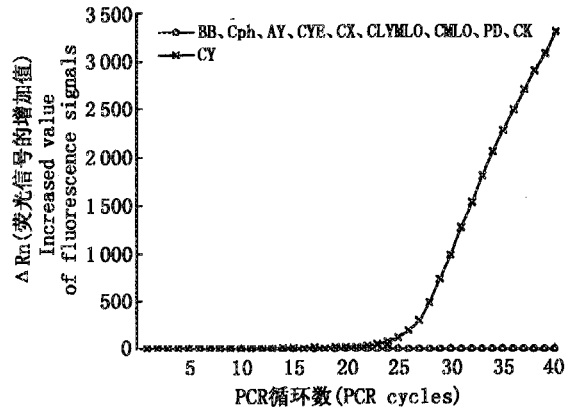


图 3 PCLYProbe 组特异性探针实时荧光 PCR 图
Fig. 3 Result of RTF PCR generated by PCLYProbe group-specific probe

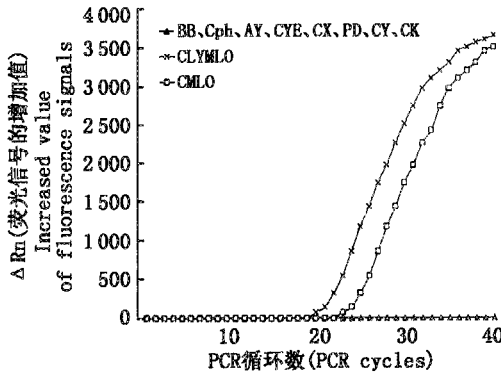


图 4 PEYProbe 组特异性探针实时荧光 PCR 图
Fig. 4 Results of RTF PCR generated by PEYProbe group-specific probe

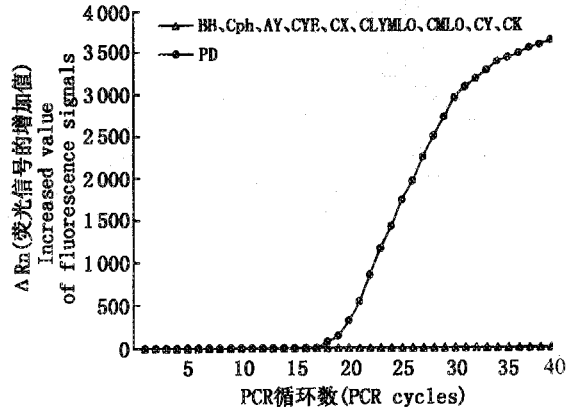


图 5 PAPProbe 组特异性探针实时荧光 PCR 图
Fig. 5 Result of RTF PCR generated by PAPProbe group-specific probe

2.3 实时荧光 PCR 检测的灵敏度

将纯化的梨衰退植原体质粒 DNA 稀释成 300、30、3 ng/μl, 300、30、3 pg/μl, 300、30、3 fg/μl, 分别加入到含有引物 PPF/PPR, PAPProbe 探针的反应体系中, 在退火温度 60℃ 下扩增。其检测到的稀释限点为 30 fg/μl (图 6)。从图中还可观察到并不是模板浓度越高, 扩增效率就越高, 太高浓度的模板对 PCR 反应可产生干扰作用, 使扩增效率降低。将扩增产物作琼脂糖凝胶电泳观察 (图 7), 可观察到明显的浓度梯度谱带, 其可观察到的稀释限点为 3 pg/μl。表明实时荧光 PCR 直接观察的灵敏度较普通 PCR 通过琼脂糖凝胶电泳观察高 100 倍。

2.4 DNA 测序结果

以梨衰退植原体为代表测序结果显示, 所克隆的 16S rDNA 序列长为 1419 bp, 与 GenBank 中梨衰退植原体序列仅有 8 个核苷酸位点的差异, 具有 99.47% 同源性, 从而证明实验结果的准确性。

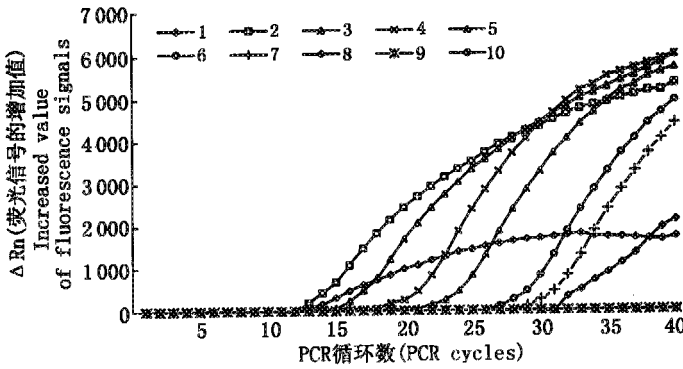


图 6 实时荧光 PCR 检测的灵敏度

Fig. 6 Sensitivity of real-time fluorescent PCR method

1:300 ng/μl, 2:30 ng/μl, 3:3 ng/μl,
 4:300 pg/μl, 5:30 pg/μl, 6:3 pg/μl,
 7:300 fg/μl, 8:30 fg/μl, 9:3 fg/μl, 10:CK

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

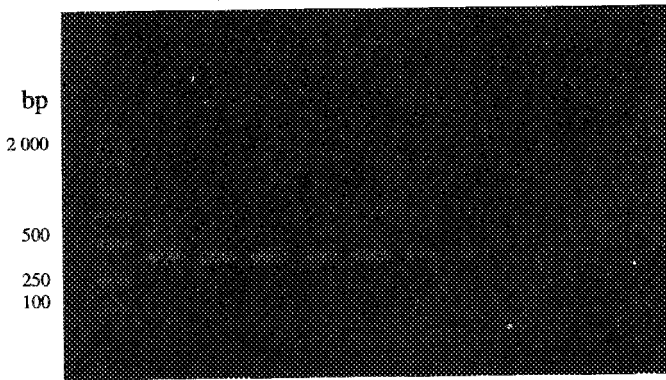


图 7 实时荧光 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测的灵敏度

Fig. 7 Sensitivity of agarose gel electrophoretic detected for RTF PCR products

M:marker, 1:300 ng/μl, 2:30 ng/μl, 3:3 ng/μl,
 4:300 pg/μl, 5:30 pg/μl, 6:3 pg/μl,
 7:300 fg/μl, 8:30 fg/μl, 9:3 fg/μl, 10:CK

2.5 TaqMan 探针实时荧光 PCR 对植物标样的检测

用探针 PProbe、PCLYProbe、PEYProbe、PAPPProbe 探针分别与泡桐健株、泡桐丛枝病病株及枣疯病病株的 DNA 进行实时荧光 PCR。结果 PProbe 探针可观察到泡桐丛枝病株与枣疯病株产生荧光增长信号,用 PEYProbe 探针仅有枣疯病病株产生荧光信号,其它探针及泡桐健株和水对照均无荧光信号。进一步证实我们所设计的植原体探针的广谱性和特异性。因为泡桐丛枝与枣疯病原均为植原体,因此,它们可通过植原体广谱探针 PProbe 检测出来。而枣疯病病原属于植原体榆树黄化组成员,因此

它只与榆树黄化组特异性探针 PEYProbe 杂交,产生荧光信号。由于泡桐丛枝病原属于植原体翠菊黄化组成员,故本实验所设计的椰子致死黄化组特异性探针 PCLYProbe、榆树黄化组特异性探针 PEYProbe、苹果丛簇组特异性探针 PAPPProbe 均不能检测到泡桐丛枝病原。

3 结论与讨论

植原体危害大、传播快、寄主范围广泛,引起数百种重要的植物病害。由于不能离体培养,以前对这类病原的检测、鉴定和防治都很困难。许多国家把一些有重要经济价值的作物(如苹果、梨、桃、葡萄等)上的植原体列为检疫对象,仅欧盟就有 12 种植原体被列为进境检疫对象。随着我国加入 WTO,对外交流将不断增加,一些危险性植原体随农产品的进口传入我国的风险不断加大。建立快速、准确、灵敏的植原体检测方法具有重要意义。

根据 16S rDNA 设计广谱引物和特异性引物对植原体进行检测,国内外有许多报道^[5~8]。这和以前的生物学实验和电镜观察比,已有很大的进步,特别是 PCR 和 RFLP 及核酸序列分析技

术结合,已可以进行植原体的分类鉴定,在植原体的研究中有了历史性的进步。但这些植原体检测鉴定方法均需 PCR 后处理,需要时间通常是一至几天才能完成,另一个问题是 PCR 后处理常常出现污染而影响实验的准确性和可靠性,不能适应进出口检验检疫要求。

本实验利用植原体已建立的组特异性 PCR 引物原理,在国际上首次设计并合成了植原体广谱荧光探针和椰子致死黄化、苹果丛生和榆树黄化 3 组植原体特异性荧光探针,成功地利用了实时荧光 PCR 法对植原体进行了分类鉴定。广谱探针可以用来检测确定植原体,而 3 种组特异探针可以直接鉴定植原体的种类,而无需 PCR 后处理和分析,大大地简化了检测鉴定步骤,提高了检测速度,用 PE7700 扩增仪整个检测过程约需 2 h,用罗氏 Light cycler 只需 30 min。实验表明由于灵敏度比常规 PCR 检测高出 100 倍以上,并且杂交探针的引入使检测特异性也大大提高。该方法只需在加样时打开一次盖子,其后的过程完全是闭管操作,也降低了污染的机会,由于本方法还引入了 UNG 酶和 dUTP,进一步降低了污染的风险。因此本研究建立的植原体检测、鉴定及分类的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法具有简单、快速、灵敏、准确的特点,在检验检疫工作中具有广阔的应用前景。

本方法对其它原核生物,特别是对不能培养和难培养菌的检测、鉴定和分类具有借鉴作用。目前较权威的分类是将植原体分为 14 个组,由于标本来源的限制,本研究仅设计了 3 个组的组特异性探针,且供试的 9 个植原体只涉及到植原体的 5 个组,因此,须进一步收集菌株,扩大应用范围。

参 考 文 献

- [1] LEE I-M, DAVIS R E, GUNDERSEN-RINDAL D E. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes [J]. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, 54: 221-55.
- [2] HEID C A, STENRNS J, LIVAK K J, *et al.* Real time quantitative PCR [J]. *Genome Research*, 1996, 6: 986-994.
- [3] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等, (颜子颖, 王海林译). 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 78-79.
- [4] LEE I-M, HAMMOND R W, DAVIS R E, *et al.* Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms [J]. *Phytopathology*, 1993, 83(8): 834-842.
- [5] WANG K, HIRUKI C. Heteroduplex mobility assay detects DNA mutations for differentiation of closely related phytoplasma strains [J]. *J. Micro. Methods*, 2000, 41: 59-68.
- [6] MARCONE C, LEE I-M, DAVIS R E, *et al.* Classification of aster yellows-group phytoplasma based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences [J]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, 50: 1703-1713.
- [7] LEE I-M, GUNDERSEN D E, HAMMOND R W, *et al.* Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant [J]. *Phytopathology*, 1994, 84(6): 559-566.
- [8] DAVIS R E, LEE I-M. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms [J]. *Phytopathology*, 1993, 83: 1008-1011.