

# 利用 PCR 和间接免疫荧光染色技术检测风信子黄腐病菌

胥婧<sup>1</sup>, 沈秀萍<sup>1</sup>, 邵秀玲<sup>2</sup>, 胡白石<sup>1\*</sup>, 许志刚<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学植物保护学院/农业部病虫害监测与治理重点开放实验室, 江苏 南京 210095;  
2. 山东出入境检验检疫局, 山东 青岛 266002)

**摘要:** 根据风信子黄腐病菌 (*Xanthomonas hyacinthi*, XHA) 的 *fimA* 基因, 合成了 1 对特异性引物 JAAN/JARA, 目的片段为 226 bp, 用来检测样本中有无目标细菌。用 XHA 全菌体免疫家兔, 获得抗血清, 建立了检测风信子黄腐病菌的间接免疫荧光染色检测技术。用上述两种方法对风信子黄腐病菌和人工接种发病样品进行检测。结果表明, 这两种方法可以准确、灵敏地检测风信子黄腐病菌及带菌样品, 方法简单、快速、实用, 可以在口岸检疫中推广使用, 以减少风信子黄腐病菌进入中国的风险。

**关键词:** 风信子黄腐病菌; PCR 检测; 间接免疫荧光染色技术

**中图分类号:** S41-30 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2030(2007)04-0058-04

## Detection of *Xanthomonas hyacinthi* by PCR assay and indirect immuno-fluorescent staining method

XU Jing<sup>1</sup>, SHEN Xiu-ping<sup>1</sup>, SHAO Xiu-ling<sup>2</sup>, HU Bai-shi<sup>1\*</sup>, XU Zhi-gang<sup>1</sup>

(1. College of Plant Protection/Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;  
2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

**Abstract:** PCR primer pair JAAN/JARA was synthesized based on the *fimA* gene, to detect *Xanthomonas hyacinthi* (XHA) in *Hyacinthus* plants. The primer pair was specific and could be used to distinguish XHA from other bacteria in samples. XHA were purified as an immunogen for immunization of rabbit. The antiserum against whole cell of XHA was obtained. Using this antiserum, indirect immuno-fluorescent staining (IIFS) was developed and applied for detection of XHA cultures and artificially inoculated plant samples. Target bacteria could be detected by IIFS from pure cultures and artificially inoculated samples. The PCR and IIFS procedures described in this study can be used to detect this disease in ports of China and reduce the risk of XHA entry to China.

**Key words:** *Xanthomonas hyacinthi*; PCR detection; indirect immuno-fluorescent staining (IIFS)

风信子黄腐病菌 (*Xanthomonas hyacinthi*) 是各国限制入境的有害生物之一, 也是我国禁止入境的病原细菌之一。风信子黄腐病菌的寄主范围较广, 主要危害风信子属 (*Hyacinthus*) 植物, 但也能侵害百合科其他相关属的观赏植物, 如蔓穗草 (*Scilla* sp.)、葡萄风信子 (*Muscari botryoides*)、条纹海葱 (*Puschkinia scilloides*) 等, 接种寄主有聚铃花 (*S. hispanica*)、亚美尼亚麝香兰 (*Muscari armeniacun*) 等<sup>[1]</sup>。据报道, 风信子黄腐病最早发生在荷兰, 其他发生地有日本、瑞典、丹麦、德国等, 但以荷兰发生比较严重<sup>[1]</sup>, 我国尚未发现。随着大量观赏植物的引进及种植, 该病害传入我国的风险日渐加大, 目前我国尚未有检测该病菌的报道。本研究目的是建立快速、灵敏的检测方法, 对风信子的球茎或叶片是否感染黄腐病菌进行检测及田间病害监测。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

参试菌株及样品见表 1。试验材料为新西兰大耳兔, 12 孔免疫荧光专用玻片, FITC 标记的羊抗兔

收稿日期: 2007-04-27

基金项目: 国家质检总局植物病原检测基金资助 (2005IK066)

作者简介: 胥婧, 硕士研究生。\* 通讯作者: 胡白石, 副教授, 从事植物检疫学研究, E-mail: hbs@njau.edu.cn。

IgG (华美公司), 缓冲甘油<sup>[2]</sup>, Leica 荧光显微镜等。Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA 标准分子质量购自 TaKaRa 公司。

表1 供试菌株、样品及来源

Table 1 Isolates, samples and sources

病菌或样品 Isolates or samples	菌株代号 Code	来源 Source
风信子黄腐病菌 <i>Xanthomonas hyacinthi</i>	XHA ( LMG739 ), XHA1, XHA2	比利时国家菌种收藏中心 BCCM/LMG
水稻白叶枯病菌 <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Xoo	本研究室 This laboratory
水稻细菌性条斑病菌 <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	Xooc	本研究室 This laboratory
甘蓝黑腐病菌 <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Xcc	本研究室 This laboratory
柑橘溃疡病菌 <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	X. ci	本研究室 This laboratory
大豆斑疹病菌 <i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	Xag	本研究室 This laboratory
棉角斑病菌 <i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	X. mal	本研究室 This laboratory
麦类条斑病菌 <i>X. translucens</i> pv. <i>cerealis</i>	Xtc	本研究室 This laboratory
卡特莱兰褐斑病菌 <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	A. a. cat	R. Walcott Georgia University
西瓜果斑病菌 <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	ATCC29625	R. Walcott Georgia University
燕麦褐条病菌 <i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	FC371	N W, Schaad ISTA, USA
敏捷噬酸菌 <i>A. facilis</i>	A. f-019	N W, Schaad ISTA, USA
香石竹萎蔫病菌 <i>Burkholderia caryophylli</i>	BSC	本研究室 This laboratory
番茄溃疡病菌 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CMM	本研究室 This laboratory
苜蓿细菌性萎蔫病菌 <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	2621	本研究室 This laboratory
菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>	E. ch	本研究室 This laboratory
大白菜软腐病菌 <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	E. c. c	本研究室 This laboratory
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	E. coli	本研究室 This laboratory
豌豆细菌性疫病 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisii</i>	PSP	本研究室 This laboratory
桑疫病菌 <i>P. syringae</i> pv. <i>mori</i>	P. mori	本研究室 This laboratory
黄瓜角斑病菌 <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Ps18	中国农业科学院 CAAS
番茄细菌性叶斑病菌 <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	本研究室 This laboratory
萝卜细菌性黑斑病菌 <i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	PSM	本研究室 This laboratory
青枯劳尔氏病菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	R. so	本研究室 This laboratory
金黄葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	St. au	本研究室 This laboratory
风信子试验样本 Hyacinth plants		南京花神庙市场 Nanjing Huashenmiao Market
郁金香试验样本 Tulip plants		南京花神庙市场 Nanjing Huashenmiao Market

Note: BCCM/LMG; Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms; ISTA: International Seed Testing Association; CAAS: Chinese Academy of Agricultural Sciences

## 1.2 特异性引物的设计

特异性引物 JAAN 和 JARA 来源于风信子黄腐病菌 *fimA* 基因 (GenBank 登录号: AF281159), 所处位置分别为 468 ~ 490 bp 和 671 ~ 694 bp, 引物序列分别是 5'-ACAACGACTCAGGCCGATGTTGG-3' 和 5'-CAGGTGGCAGGACGCAATTTCTCC-3'<sup>[3-4]</sup>, 由 Invitrogen 公司合成。

## 1.3 PCR 检测方法

PCR 反应体系为: 10 × Buffer (10 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol · L<sup>-1</sup> KCl) 2.5 μL, 25 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL, 2.5 mol · L<sup>-1</sup> dNTP 1 μL, *rTaq* polymerase 0.5 U, 引物 JAAN、JARA (20 mmol · L<sup>-1</sup>) 各 0.5 μL, 菌悬液 1 μL, 双蒸水补足 25 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 循环; 72 °C 7 min。取 8 μL 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 120 V 30 min, 溴化乙锭 (EB) 染色, Bio-RAD 凝胶成像系统观察并进行图像采集和保存。PCR 的灵敏度测定: 将 XHA 菌悬液用灭菌水稀释至 2 × 10<sup>8</sup> ~ 2 × 10<sup>0</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>, 取 1 μL 作为模板进行扩增, PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳上检测。

## 1.4 抗血清的制备

取 XHA 在 NA 平板上划线, 挑取单菌落在 LB 液体培养基中扩大培养, 28 °C 培养 15 h, 离心去上清液, 用 0.008 g · mL<sup>-1</sup> NaCl 溶液洗涤, 重复 3 次, 最后用相同质量浓度 NaCl 溶液悬浮, 使菌悬液为 10<sup>9</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>。采用戊二醛法固定<sup>[5]</sup>。常规免疫家兔<sup>[6]</sup>, 最后一次免疫 10 d 后采血, 分离抗血清。

## 1.5 间接免疫荧光染色技术

1.5.1 间接免疫荧光染色程序 取 10 μL 用无菌水配制的约 10<sup>7</sup> CFU · mL<sup>-1</sup> 的菌悬液, 分别加到免疫荧光专用玻片的孔中 (直径为 5 mm), 热风吹干, 玻片通过火焰固定。抗血清用 PBS (0.01 mol · L<sup>-1</sup>, pH 7.4) 稀

释1 000倍,取10  $\mu\text{L}$  加到相应的孔中,37  $^{\circ}\text{C}$  保湿孵育30~60 min,蒸馏水轻轻淋洗(避免用水直接冲洗样品),风干。加FITC标记的羊抗兔IgG(用0.01 mol  $\cdot$  L $^{-1}$  PBS稀释至工作浓度),每孔10  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  保湿孵育30~60 min,淋洗,风干。加浮载液(缓冲甘油),盖玻片封片,荧光显微镜观察、记录并照相。

1.5.2 灵敏度检测 将XHA菌悬液用灭菌生理盐水(0.008 g  $\cdot$  mL $^{-1}$ )稀释到 $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^0$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$ ,荧光显微镜观察、记录并照相。

1.5.3 专化性检测 将所有参试菌株菌悬液稀释到约 $2 \times 10^6$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$ ,将XHA菌悬液与其他参试菌株菌悬液等体积混合,以不含XHA的其他参试菌株混合菌悬液作对照,荧光显微镜观察、记录并照相。

## 1.6 人工接种样品的检测

用无菌牙签蘸取XHA菌苔,在风信子和郁金香叶片背面针刺接种,以接种无菌水的叶片做阴性对照。保湿24 h,人工气候箱中(白天25  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度70%,12 h;晚上10  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度95%,12 h)培养14 d<sup>[3]</sup>。将接种发病样品叶片及健康叶片剪成1 cm $^2$ 小段,每份样品加1 mL无菌水,4  $^{\circ}\text{C}$ 浸泡1 h,吸取浸出液。取1  $\mu\text{L}$ 浸出液作为模板进行PCR检测。取10  $\mu\text{L}$ 浸出液进行免疫荧光检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 风信子黄腐病菌的PCR检测

将所有供试菌株配制成 $2 \times 10^8$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$ 的悬浮液,进行直接PCR反应。结果表明只有XHA菌株能扩增出226 bp的特异性片段,而其他参试菌株均无此片段。表明这对引物能特异地将XHA与其他细菌区分开。由于参试菌株较多,只给出部分参试菌株的结果(图1)。

由图2可见,大于 $2 \times 10^3$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$ 的菌悬液均可扩增出明显条带;而 $2 \times 10^2$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$ 的菌悬液只出现了微弱条带。表明该方法的灵敏度为 $2 \times 10^3$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$ 。以人工接种发病的风信子叶片的浸出液作为模板进行PCR检测,结果表明,除健康叶片外,发病部位的浸出液PCR检测结果均呈阳性。

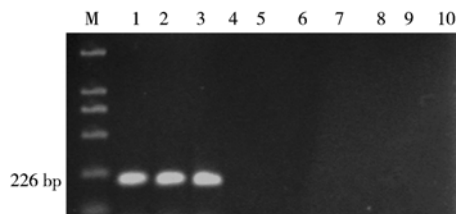


图1 引物特异性测定

Fig. 1 Primer specificity test

1. XHA; 2. XHA1; 3. XHA2; 4. Xooc; 5. Xcc; 6. X. ci; 7. Xag; 8. X. mal; 9. ATCC29625; 10. Xtc; M. Marker

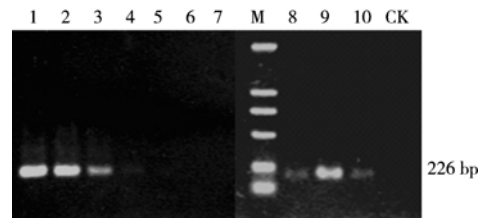


图2 PCR检测灵敏度与人工接种样品的PCR检测

Fig. 2 Sensitivity test and detection of artificially inoculated *X. hyacinthi* (XAH)

1-6.  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^0$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$  of XHA respectively; 7. H $_2$ O; M. Marker; 8, 10. Inoculated samples; 9. XHA; CK. Negative control

### 2.2 风信子黄腐病菌的间接免疫荧光检测

专化性和灵敏度测定:含XHA的菌株菌悬液呈阳性反应,不含XHA的其他菌株混合液未发现阳性细胞(图3)。经间接免疫荧光染色方法检测与其他属细菌无明显交叉反应。间接免疫荧光染色方法的灵敏度可达到 $2 \times 10^3$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$ (图4)。

人工接种样品的检测:利用制备的抗血清,对人工接种XHA发病叶片和健康叶片样品进行检测。结果表明,所有接种样品均呈阳性反应(图5-A, B, C),健康叶片则未见有发荧光的细菌(图5-D)。

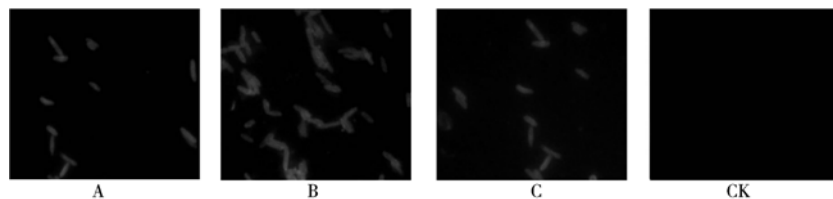


图3 间接免疫荧光染色检测专化性结果

Fig. 3 Specificity of indirect immuno-fluorescent staining detection

A. XHA + PSP; B. XHA + Xcc; C. XHA + St. au; CK. Suspension of mixed bacteria without of XHA

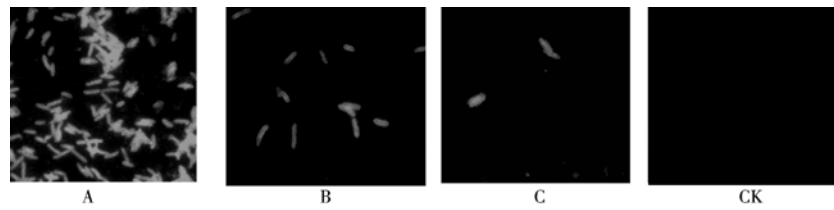


图4 间接免疫荧光染色检测灵敏度结果

Fig. 4 Sensitivity of indirect immuno-fluorescent staining detection

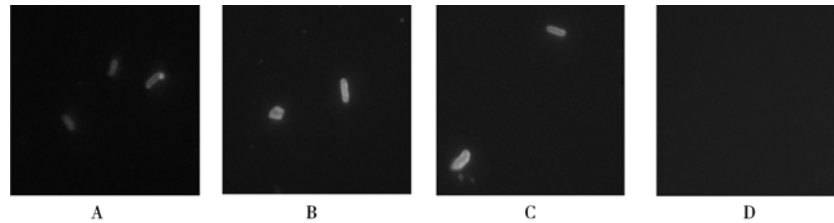
A.  $2 \times 10^5$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$ ; B.  $2 \times 10^4$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$ ; C.  $2 \times 10^3$  CFU  $\cdot$  mL $^{-1}$ ; CK. H $_2$ O

图5 风信子黄腐病菌人工接种样品的间接免疫荧光染色检测结果

Fig. 5 Indirect immuno-fluorescent staining detection results of artificially inoculated samples

A, B and C. 人工接种样品 Artificially inoculated samples; D. 健康样品 Health sample

### 3 讨论

风信子黄腐病菌是风信子上危害最重的种传病害。我国每年都从国外引进数量巨大的风信子和郁金香等花卉球茎，病菌随之传入我国的风险很大，迫切需要建立一种快速、灵敏、专一性好的检测技术来阻止风信子黄腐病菌传入我国。

已有一些分子生物学方法应用到病原物的检测中，通常都是将 ITS 以及 rDNA 序列作为检测靶标<sup>[7-8]</sup>。本研究首次在我国建立了风信子黄腐病菌的分子生物学和间接免疫荧光染色检测技术。同时我们也发现致病性相关基因也可作为分子检测靶标，这为病原物的检测提供了新的思路。本试验以 *fimA* 基因作为分子检测靶标，利用特异性引物，能特异地检测到风信子黄腐病菌。该方法具有专化性好、灵敏度高的特点，全部检测程序可在 4 h 内完成。

本研究表明，利用风信子黄腐病菌菌体制备的抗血清所建立的间接免疫荧光染色方法检测风信子黄腐病菌，耗时短，专化性较好，全部程序可在 3 h 内完成，适合口岸对该病菌的检测。间接免疫荧光染色方法灵敏度与 PCR 技术相当，该技术操作简单，不需要复杂设备，一般实验室均可随时进行检测，是一种准确而简便的检测方法。该方法与其他血清学方法相比，具有更直观的效果（能够观察到菌体形态）。

本研究建立的检测风信子黄腐病菌的间接免疫荧光染色技术和 PCR 技术，可在我国口岸检疫部门推广，以提高对风信子黄腐病菌的检测水平，减少风信子黄腐病菌进入的风险。

#### 参考文献：

- [1] 李怀方, 刘凤权, 郭小密. 园艺植物病理学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001
- [2] Hampton R, Ball E, de Boer S. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens [M]. St. Paul, MN: APS Press, 1990: 389
- [3] van Doorn J, Ojanen-Reuhs T, Hollinger T C, et al. Development and application of pathovar-specific monoclonal antibodies that recognize the lipopolysaccharide O antigen and the type IV fimbriae of *Xanthomonas hyacinthi* [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(9): 4171-4180
- [4] van Doorn J, Hollinger T C, Oudega B. Analysis of the type IV fimbrial-subunit gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: application in PCR-mediated detection of yellow disease in hyacinthis [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2): 598-607
- [5] 胡白石, 卢玲, 刘凤权, 等. 利用间接免疫荧光染色和协同凝集技术检测梨火疫病病菌 [J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(4): 41-45
- [6] 卢玲. 梨火疫病病菌的分子检测技术研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2004
- [7] 廖晓兰, 朱水芳, 赵文军, 等. 柑桔黄龙病病原 16S rDNA 克隆、测序及实时荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 80-85
- [8] 葛芸英, 郭坚华. 小麦苗枯病菌的 ITS 分析及 PCR 检测 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(3): 198-202

责任编辑：夏爱红