

# 基于 EMA-qPCR 的茄科青枯菌活体 检测技术的建立

熊书 殷幼平 王芳 王中康\*

(重庆大学 生命科学学院 重庆市杀虫真菌生物农药工程技术中心  
重庆市基因功能与调控重点实验室 重庆 400030)

**摘要:** 【目的】利用特异性核酸染料叠氮溴乙锭(Ethidium monoazide bromide, EMA)与实时荧光定量 PCR 技术相结合, 建立一种能有效区分青枯菌死活细胞的检测方法。【方法】样品 DNA 制备前经 EMA 渗透预处理, 再进行实时荧光定量 PCR 特异扩增菌体 DNA。【结果】终浓度为 2.0 mg/L 的 EMA 能有效排除  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL 灭活青枯菌细胞 DNA 的扩增, 对活细胞和不可培养状态(Viable but non-culturable, VBNC)活菌的 DNA 扩增均没有影响。当每个定量 PCR 反应体系中的活细胞在  $5.0 \times 10^0$ – $5.0 \times 10^4$  CFU 范围内时, 扩增  $C_t$  值与定量 PCR 反应体系中活细胞 CFU 对数值呈良好的负相关性( $R^2=0.9925$ )。比较 EMA-qPCR 法和平板计数法对经过不同温度短期保存的青枯菌检测结果发现, 待检样品可在 24 °C 与 4 °C 冷藏条件下短期保存。【结论】本研究建立的 EMA-qPCR 方法能有效检测青枯菌 VBNC 细胞和有效区分死活菌, 避免或减少青枯菌 PCR 检测的假阳性和假阴性。

**关键词:** 茄科青枯菌, 叠氮溴乙锭, 活的非可培养状态, 活体检测, 实时荧光定量 PCR

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30971875); 国家公益性行业(农业)科研专项项目(No. 201003067); 中央高校基本科研业务费资助项目(No. CDJXS112300)

\*通讯作者: Tel/Fax: 86-23-65120489; ✉: zkwang646@sina.com

收稿日期: 2012-11-07; 接受日期: 2013-01-25

# Establishment of a new method to detect viable cells of *Ralstonia solanacearum* by EMA-qPCR

XIONG Shu YIN You-Ping WANG Fang WANG Zhong-Kang\*

(College of Life Science, Chongqing University, Chongqing Engineering Research Center for Fungal Insecticide, Chongqing Key Laboratory of Genetic Function and Regulation, Chongqing 400030, China)

**Abstract: [Objective]** A novel method to differentiate viable/dead cells of *Ralstonia solanacearum* was established by using a DNA dye of ethidium monoazide bromide (EMA) in combination with the real-time polymerase chain reaction (EMA-qPCR). **[Methods]** Samples were pre-treated with EMA prior to DNA extraction. DNA from dead cells was bound by EMA, so that only DNA from viable *R. solanacearum* cells can be amplified by real-time PCR. **[Results]** A final concentration of 2.0 mg/L EMA was demonstrated to completely inhibit the PCR amplification from DNA derived from  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL dead cells, but no inhibition to viable and viable but non-culturable (VBNC) cells. A standard curve was generated relating the  $C_t$  values of the EMA-qPCR to the log number of genomic targets per PCR. A linear range of DNA amplification was observed from  $5.0 \times 10^0$  to  $5.0 \times 10^4$  genomic targets per PCR. EMA-qPCR method was used to evaluate the survival rate of *R. solanacearum* treated with different temperatures for a short time, compared with the method of plate count. The results indicate that samples can be stored for a short time under room temperature and 4 °C. **[Conclusion]** The EMA-qPCR method established in this work can effectively avoid false positive and false negative results of the *R. solanacearum* detection.

**Keywords:** *Ralstonia solanacearum*, Ethidium monoazide bromide (EMA), Viable but non-culturable (VBNC), Real-time PCR

细菌性青枯病是由茄科青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的土传病害,可引起 54 多个科,540 余种植物的病害,危害多种经济作物、木本植物和草本植物,造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。自 Xu 等<sup>[2]</sup>首次报道了细菌的“活的但不可培养的状态”(Viable but non-culturable, VBNC)以来,关于植物病原细菌的 VBNC 状态研究备受关注。有研究报道青枯菌能以 VBNC 的状态存在于土壤中<sup>[3-4]</sup>,并能在一定条件下从该状态恢复,且病原菌能在湿润土壤和水中存活数年<sup>[5-6]</sup>,处于

VBNC 状态的菌能逃过常规培养分离法的检测成为“隐性”传染源。由于青枯病防治难,一旦发病,就会带来巨大损失<sup>[1,7]</sup>。目前,PCR 技术已经广泛用于青枯菌病原检测中,而传统的 PCR 检测技术不仅能扩增活菌 DNA,死细胞 DNA 或自由状态的 DNA 也能被扩增<sup>[8]</sup>,导致检测假阳性增加;一些病害防治措施特别是检疫措施也需要对防治效果的快速检测。因此一种能特异、准确、快速检测青枯菌活菌和 VBNC 菌的方法成为迫切需要。

目前区分死活病原细菌的方法中, 基于能与 DNA 共价结合的叠氮溴乙锭 (Ethidium monoazide bromide, EMA) 的 PCR 分子检测技术备受关注。该方法以 EMA 选择渗透进入死细胞非正常的细胞膜内, 与死细胞内的 DNA 发生共价不可逆的结合从而抑制其 PCR 扩增, 使得只有活菌 DNA 可以作为扩增模板进行 PCR 扩增<sup>[9-11]</sup>。该方法仅以活的微生物的基因组 DNA 为检测靶标, 能有效降低传统 PCR 检测的假阳性, 使检测结果更加准确、可靠。为此, 本研究拟以 EMA-qPCR 方法检测不同状态下的青枯菌, 探讨 EMA-qPCR 方法在青枯菌纯培养条件下区分死细胞与活的可培养细胞以及 VBNC 状态细胞的可能性, 以为植物青枯病的检验检疫防控提供更科学、准确的技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株:** 茄科青枯菌 (*R. solanacearum*) 从番茄病株上分离, 由西南大学植物保护学院提供。菌株在常温下保存于灭菌蒸馏水中。

**1.1.2 培养基:** 采用 NA 培养基(g/L)<sup>[12]</sup>: 牛肉浸膏 3.0, 酵母浸膏 1.0, 蛋白胨 5.0, 葡萄糖 10.0, pH 7.0。

**1.1.3 试剂和耗材:** 叠氮溴乙锭 (Ethidium monoazide bromide, EMA, Invitrogen), 吡啶橙 (北京鼎国生物技术有限公司), 四甲基偶氮唑盐 (MTT, Sigma), Nuclepore™ 黑色聚碳酸酯滤膜 (Whatman), SYBR® Premix Ex Taq™ Mix (TaKaRa)。

### 1.2 方法

**1.2.1 青枯菌死活菌悬液的制备:** 从 NA 平板上挑取青枯菌单菌落, 接种于 20 mL NA 液体培养基中, 摇床培养 (28 °C、250 r/min) 至  $OD_{600}$  约为 3.0 (以 NA 培养基为对照), 得到活菌细胞悬液 (细

胞密度约为  $2.0 \times 10^9$  CFU/mL)。将部分活菌细胞悬液在 100 °C 水浴 5 min, 得到青枯菌死菌细胞悬液。将死菌在 NA 平板上划线, 于 28 °C 培养 24-72 h, 验证其致死效果后备用。

**1.2.2 EMA 处理条件的优化和青枯菌死、活细胞的处理:** (1) 死、活细胞的 EMA 渗透处理及 EMA 用量优化: 黑暗中, 3 种不同浓度 ( $10^8$ 、 $10^7$  和  $10^6$  CFU/mL) 的死细胞与活细胞纯菌悬液分别加入离心管中, 避光添加不同浓度的 EMA, 轻柔混匀, 黑暗中静置 5 min 使其渗入细胞内<sup>[10]</sup>, 将离心管取出, 开盖置于冰上, 距离灯管 15 cm, 650 W 卤钨灯持续均匀曝光 10 min<sup>[10,13]</sup>, 激活 EMA。

(2) 死、活细胞混合菌悬液的 EMA 渗透处理: 以固定数量的死细胞 ( $5.0 \times 10^6$  CFU) 分别与不同数量的活细胞 ( $2.5 \times 10^9$ 、 $1.25 \times 10^8$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $1.25 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $1.25 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^5$ 、 $1.25 \times 10^5$ 、 $2.5 \times 10^4$ 、 $1.25 \times 10^4$  和  $2.5 \times 10^3$  CFU) 混合形成不同死、活细胞比例的混悬液, 并用优化出的 EMA 检测浓度处理不同比例的混合菌悬液。轻柔混匀, 按 1.2.2(1) 做 EMA 静置渗透、激活处理。

**1.2.3 青枯菌 VBNC 状态的诱导:** 参考 Grey 等<sup>[3]</sup> 的报道, 以寡营养 (0.9% NaCl) 和重金属 ( $Cu^{2+}$ ) 条件诱导青枯菌进入不可培养状态, 将  $CuSO_4$  溶液加入到灭菌后的 0.9% NaCl 溶液中 ( $Cu^{2+}$  的终浓度为 0.05 mmol/L), 使  $Cu^{2+}$  的终浓度为 0.05 mmol/L, 随后加入浓度为  $10^7$  CFU/mL 新鲜青枯菌悬液 (需多次清洗彻底清除培养基, 再用无菌 0.9% NaCl 重悬), 混匀后分别在 0、10、20 和 30 d 进行下面的检测:

(1) 细菌总数的测定 (AODC 法): 参考文献 [14-15] 进行, 将待测菌液 1 mL 用甲醛固定 1-2 min (终浓度为 2%), 再用吡啶橙染色 7 min (终浓度为 0.01%), 过滤到 Nuclepore™ 黑色聚碳酸酯滤膜上 (孔径 0.2  $\mu$ m, 直径 25 mm), 荧光显

显微镜观察计算菌液原始浓度(cells/mL)。

(2) 活细菌数的测定(MTT法): 参照文献[16]进行。

(3) 可培养细菌数的测定(CFU): 选择  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  三个稀释度, 每 10 d 取各稀释度的菌悬液 50  $\mu$ L 涂 NA 平板, 28  $^{\circ}$ C 培养 2–3 d, 选择在 30–300 CFU 范围内稀释度平板计数菌落数, 根据下列公式计算原始菌液的浓度:

细菌浓度(CFU/mL)=(平均菌落数 CFU $\times$ 稀释倍数)/0.05 mL。

确定青枯菌进入 VBNC 状态后, 用 EMA-qPCR 方法检测菌量, 对照组为同浓度的青枯菌死菌和可培养的活菌。

**1.2.4 DNA 模板制备:** 参考 Wang 等<sup>[8]</sup>的报道, 将经过曝光处理的菌液经 8 000 r/min 离心 5 min, 弃尽上清, 菌体重悬在 0.5 mL 1.5%的氯化钠溶液中, 再将重悬液离心(8 000 r/min, 5 min), 弃上清, 用 0.5 mL 的 Milli-Q 水重悬。制备 TZ 裂解液(2.0% Triton X-100, 2.5 g/L 的叠氮化钠, 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0)<sup>[17–18]</sup>。在通风橱中, 将 0.5 mL 上述重悬菌液与等体积 TZ 裂解液混匀。混合液沸水浴 10 min, 使细菌细胞充分裂解。冷却, 离心(10 000 r/min, 5 min), 取 200  $\mu$ L 上清移入 2 mL DNA 纯化柱(DNA UNIQ-10 Column, 生工生物工程上海有限公司), 将 DNA 进行纯化备用。

**1.2.5 检测引物以及荧光定量 PCR 反应条件:** 参考 Chen 等<sup>[19]</sup>的报道, 根据青枯菌 *UDP-3-O-acyl-GlcNAc deacetylase* 基因设计特异引物 RSF (5'-GTGCCTGCCTCCAAAACGACT-3') 和 RSR (5'-GACGCCACCCGCATCCCTC-3'), 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。扩增目的片段长度为 159 bp。PCR 扩增在 CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad) 进行, SYBR Green I 荧光染料染色。反应采用 25  $\mu$ L 的反应体

系: 12.5  $\mu$ L SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq TM<sup>II</sup> mix (TaKaRa), 0.75  $\mu$ L 引物对 RSF/RSR (10  $\mu$ mol/L) 以及 2  $\mu$ L 模板, 加 Milli-Q 水补足 25  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 1 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 63  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环。PCR 扩增结束后立即进行熔解曲线分析, 验证扩增的特异性。

**1.2.6 不同温度短期处理活菌的 EMA-qPCR 检测方法**与平板计数法的比较: 取 0.5 mL 浓度为  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 的新鲜培养的青枯菌活菌悬液, 8 000 $\times$ g 离心 5 min 后, 将菌体重悬在 0.5 mL 的 Milli-Q 水中, 分别于 -20  $^{\circ}$ C 冷冻处理、4  $^{\circ}$ C 冷藏处理和 24  $^{\circ}$ C 处理 24、48 和 72 h 后, 取菌液, 避光添加 EMA, 使 EMA 终浓度为 2.0 mg/L, 按 1.2.2 (1) 做 EMA 静置渗透、激活处理, 提取 DNA, 进行 qPCR 扩增, 按 1.2.3 (2) 进行 MTT 法检测, 取同样处理的两管菌液涂布 NA 平板, 28  $^{\circ}$ C 培养 2–3 d 计算菌落数。

**1.2.7 EMA-qPCR 检测方法的假阳性验证:** 按 1.2.1 制备浓度为  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$  和  $10^4$  CFU/mL 的灭活青枯菌死细胞菌悬液, 比较 EMA-qPCR 方法和平板计数法对灭活死细胞的检测差别, 用以检验 EMA-qPCR 方法检测的假阳性几率。

**1.2.8 数据分析:** 应用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示具有显著性差异。一元线性回归方程用 Microsoft Excel 2007 制作。

## 2 结果与分析

### 2.1 抑制纯培养死细胞 DNA 扩增的最适 EMA 浓度

对 3 种不同浓度死菌细胞的实时荧光 PCR 检测结果显示, 添加 EMA 的实验组  $C_t$  值与活细胞对照组相比均有显著增加 ( $P < 0.05$ )。当死菌浓度  $\leq 10^7$  CFU/mL 和 EMA 浓度为 1.5 mg/L 时, 死细胞 DNA 的扩增即可完全被抑制。但当菌浓度为  $10^8$  CFU/mL 时, 即使 EMA 浓度高达

10 mg/L 时, 也不能完全抑制死细胞 DNA 的扩增(图 1A)。

低浓度的 EMA 对所测 3 种浓度的活细胞靶基因扩增没有显著的抑制作用( $P>0.05$ )。但高浓度 EMA 对活细胞的 PCR 扩增显示出一定抑制作用, 当活菌浓度 $\leq 10^7$  CFU/mL 和 EMA 浓度 $\geq 40$  mg/L 时, 对活细胞的靶基因扩增有显著的抑制作用( $P<0.05$ , 图 1B)。即影响活细胞 DNA 扩增的 EMA 浓度(40 mg/L)远远大于抑制死细胞 DNA 扩增的最小 EMA 浓度(1.5 mg/L), 采用 30 mg/L 以下浓度 EMA 都对活细胞扩增无影响。综合考虑成本等因素, 选择 EMA 浓度为 2.0 mg/L 为区分低于 $10^7$  CFU/mL 纯培养菌死活细胞的最佳浓度。

## 2.2 死、活细胞混合体系中 EMA-qPCR 对活细胞的选择性扩增

当固定数量的死细胞( $5.0 \times 10^6$  CFU)与不同数量的活细胞混合后, 添加 EMA, 使 EMA 终浓度为 2.0 mg/L。死细胞 DNA 的扩增完全被抑制, 随着活菌 CFU 数的减少, 其  $C_t$  值呈现上升趋势, 检测

下限能达到  $5.0 \times 10^0$  ( $C_t$  为 35.31) 个活细胞(图 2A)。在反应体系中活细胞数为  $5.0 \times 10^0 - 5.0 \times 10^4$  CFU 的范围内, qPCR 的  $C_t$  值与反应体系中活菌 CFU 数目的对数值有良好的线性关系, 相关系数为  $R^2=0.9925$  (图 2B)。因此在此范围内可以通过  $C_t$  值对 qPCR 体系中活菌数目进行定量。

## 2.3 处于 VBNC 状态的青枯菌的 EMA-qPCR 方法检测

在 0.9% NaCl 和  $\text{Cu}^{2+}$  的终浓度为 0.05 mmol/L 诱导培养 20 d, 按常规方法进行涂板培养无菌落长出, 平板计数为 0, 表明青枯病菌进入了不可培养状态(图 3); 对该菌 DNA 进行 EMA-qPCR 结果显示, 扩增的  $C_t$  值在添加和不添加 EMA 组中无显著变化( $P>0.05$ ), 表明青枯菌进入活的不可培养状态, 即 VBNC 状态, 而灭活死菌在添加 EMA 后, 没有扩增(图 4)。上述结果表明, EMA-qPCR 能作为检测处于 VBNC 状态的青枯病菌的有效手段, 可避免使用平板计数法检测出现的假阴性结果。

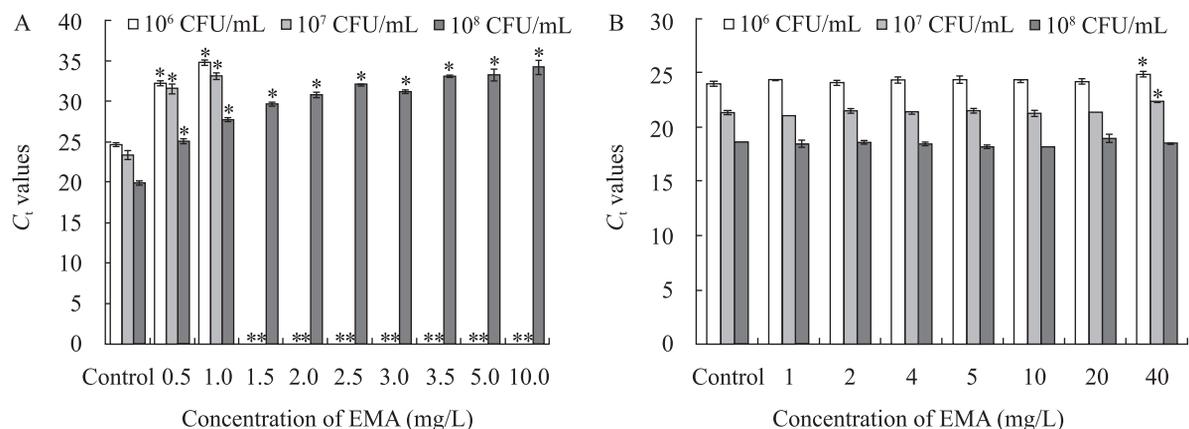


图 1 青枯病菌 EMA-qPCR 检测体系中 EMA 用量的优化

Fig. 1 Optimization of the EMA concentration in EMA-qPCR

注: A: 抑制死细胞 DNA 扩增的 EMA 浓度优化; B: EMA 浓度对活细胞 DNA 扩增的影响。Control: 不添加 EMA; \*: 与对照组相比有显著性差异。

Note: A: Optimization of the minimum amount of EMA to inhibit amplification of DNA from dead *R. solanacearum* cells as reflected by  $C_t$  values in qPCR; B: Influence of EMA on DNA amplification from viable *R. solanacearum* cells. Control: PCR amplified without EMA; \*: The difference was significant ( $P<0.05$ ) compared with the controls.

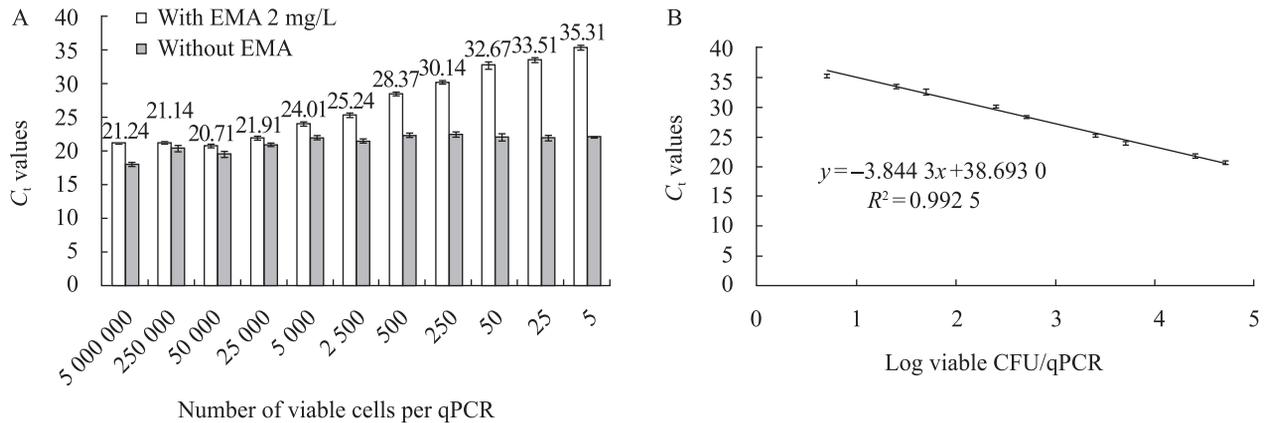


图 2 死、活细胞混合体系的 EMA-qPCR 扩增

Fig. 2 The amplification of mixed bacteria by EMA-qPCR

注: A: 在添加 EMA 和不添加 EMA 条件下, 定量 PCR 反应体系中不同的菌量与扩增  $C_t$  值的关系; B: 在添加 EMA 条件下, 扩增  $C_t$  值与定量 PCR 反应体系中活细胞 CFU 对数值的线性关系, 混合 PCR 扩增体系中死菌数目固定为  $5.0 \times 10^6$  CFU, 活细胞数分别为  $5.0 \times 10^0$ 、 $2.5 \times 10^1$ 、 $5.0 \times 10^1$ 、 $2.5 \times 10^2$ 、 $5.0 \times 10^2$ 、 $2.5 \times 10^3$ 、 $5.0 \times 10^3$ 、 $2.5 \times 10^4$  和  $5.0 \times 10^4$  CFU。

Note: A: Relationship between the  $C_t$  values from EMA-qPCR and the varying number of genomic targets per PCR; B: A standard curve relating the  $C_t$  values from the EMA-qPCR to the log number of genomic targets per PCR. The number of dead cells in the mixture was kept constant at  $5.0 \times 10^6$  CFU. Point 1-9:  $5.0 \times 10^0$ ,  $2.5 \times 10^1$ ,  $5.0 \times 10^1$ ,  $2.5 \times 10^2$ ,  $5.0 \times 10^2$ ,  $2.5 \times 10^3$ ,  $5.0 \times 10^3$ ,  $2.5 \times 10^4$ , and  $5.0 \times 10^4$  viable CFU/qPCR, respectively.

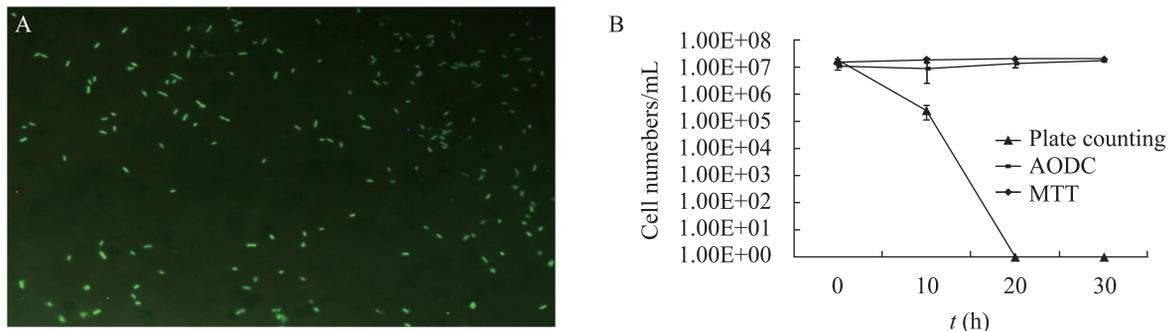


图 3 青枯菌进入 VBNC 状态的检测

Fig. 3 Detection of *R. solanacearum* transforming into a VBNC state by three different methods

注: A: 青枯菌 AODC 法荧光检测; B: 用平板计数法、AODC 法、MTT 法检测。

Note: A: Detection of *R. solanacearum* by AODC methods; B: Entry of *R. solanacearum* into the VBNC state in liquid microcosms, as determined by AODC, MTT and plate counting methods.

## 2.4 不同温度短期处理后青枯菌的存活情况的 EMA-qPCR 检测

在实际样品检测中, 可能会出现待检样品短期积压情况, 需要进行暂时保存。那么, 样品的保存温度对最终检测结果有没有影响? 因此, 我们设计了  $24^\circ\text{C}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、 $-20^\circ\text{C}$  3 个温度梯度保存 72 h 后, 以 EMA-qPCR 检测样品青枯菌存活情况

并与平板培养计数法和 MTT 法进行比较。结果显示, 当浓度为  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL 活菌经过  $-20^\circ\text{C}$  冷冻处理 72 h 后, EMA-qPCR 的检测结果显示活菌为  $3.3 \times 10^5$  CFU, 平板计数法结果显示活菌数为  $3.8 \times 10^3$  CFU, 两种方法得到的结果有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 而 MTT 法得到的检测结果与平板计数法无显著差异 ( $P > 0.05$ , 图 5A), 表明极端的低

温处理青枯菌会出现部分死亡。24 °C 处理和 4 °C 处理 72 h 后, 3 种检测方法的活菌检测结果均无显著差异( $P>0.05$ , 图 5B、C), 与 0 h 的对照组相比活菌数均无显著变化( $P>0.05$ ), 初步表明待检测样品可在此条件下短期保存。

## 2.5 EMA-qPCR 检测方法的假阳性验证

为了验证 EMA-qPCR 方法对灭活的青枯菌的检测是否会出现假阳性结果, 设计了平板培养计数法, EMA-qPCR 方法和常规 qPCR 方法对灭活的青枯菌死细胞进行了检测。结果显示, 在所设置的 4 组灭活死细胞浓度中, 除了常规 qPCR 方法检测到青枯菌的存在以外, EMA-qPCR 方法和平板培养计数法的检测结果均为阴性(表 1),

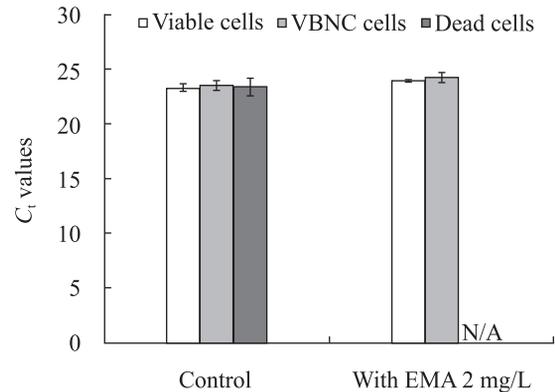


图 4 3 种不同状态的青枯菌的 EMA-qPCR 检测结果  
Fig. 4 The result of detecting *R. solanacearum* by EMA-qPCR

Note: The  $C_1$  values derived from DNA extracted from cells without EMA treatment were set as control.

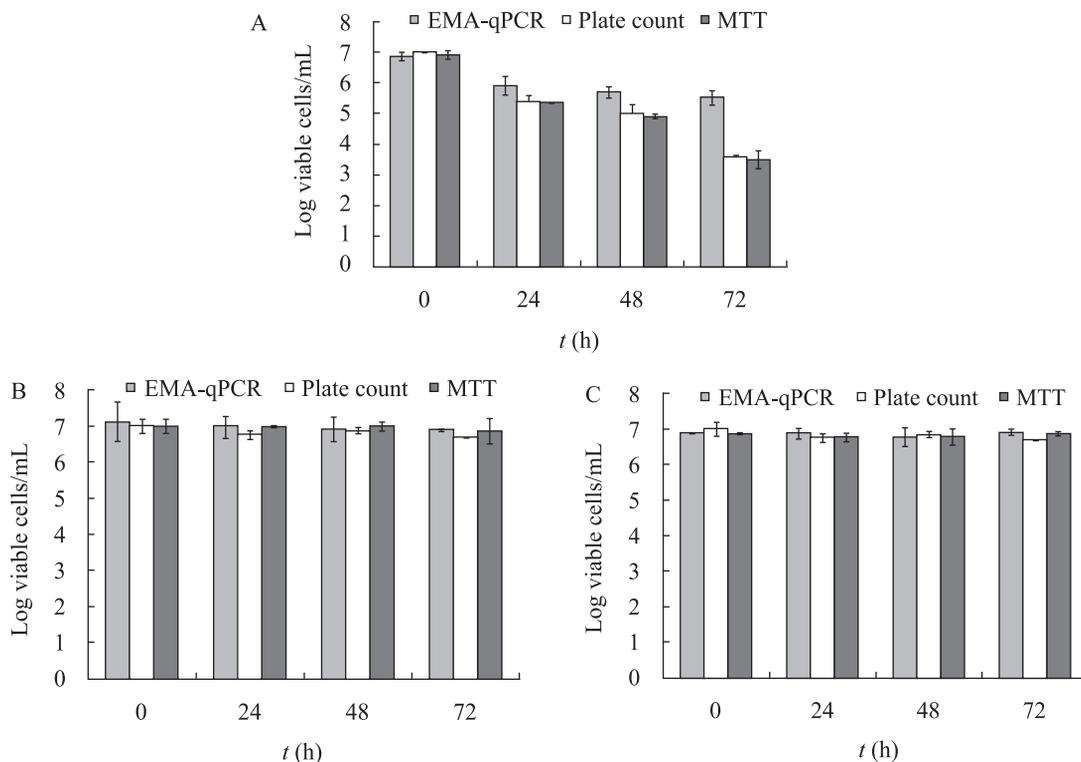


图 5 EMA-qPCR 方法、平板计数法与 MTT 法检测经不同温度处理的活菌

Fig. 5 Use of EMA-qPCR method to detect *R. solanacearum* compared with the method of plate counting and MTT  
注: A: -20 °C 处理 24、48 和 72 h; B: 24 °C 处理 24、48 和 72 h; C: 4 °C 处理 24、48 和 72 h.

Note: A: *R. solanacearum* suspension ( $1.0 \times 10^7$  CFU/mL) in sterile water at -20 °C for 24, 48, and 72 h; B: *R. solanacearum* suspension ( $1.0 \times 10^7$  CFU/mL) in sterile water at 24 °C for 24, 48, and 72 h; C: *R. solanacearum* suspension ( $1.0 \times 10^7$  CFU/mL) in sterile water at 4 °C for 24, 48, and 72 h.

表1 平板培养计数法、常规 qPCR 法、EMA-qPCR 测定灭活青枯菌数的比较  
Table 1 Comparison of bacterial counts determined by qPCR, EMA-qPCR and plate counting methods

青枯菌细胞数 <i>Ralstonia solanacearum</i> counts (CFU)	检测值 Detect values		
	EMA-qPCR 方法 average $C_t$ value $\pm$ STDEV <sup>a</sup>	qPCR average $C_t$ value $\pm$ STDEV <sup>a</sup>	平板培养计数 Plate counting (CFU)
10 <sup>7</sup>	NA	23.08 $\pm$ 0.1305	0
10 <sup>6</sup>	NA	25.96 $\pm$ 0.2899	0
10 <sup>5</sup>	NA	28.02 $\pm$ 0.1085	0
10 <sup>4</sup>	NA	30.78 $\pm$ 0.2458	0

Note: STDEV<sup>a</sup>: Standard deviation.

这表明在对青枯菌死细胞的检测中, 常规 qPCR 方法不能区分死活菌, 死菌 DNA 也可做为模板被扩增, 而本研究所建立的 EMA-qPCR 仅以活菌为检测靶标, 对死菌不会扩增, 未出现假阳性检测结果, 平板计数方法进一步验证了 EMA-qPCR 的可靠性。

### 3 讨论

EMA 能进入细胞壁(膜)损坏的死细胞内, 同细胞 DNA 结合而阻止 DNA 的扩增, 而活细胞完整的壁(膜)结构可以阻止 EMA 的进入, 从而实现了 EMA 作用的选择性<sup>[8-9]</sup>, 将 EMA 作用的选择性与实时荧光定量 PCR 技术相结合, 能使活菌基因组 DNA 为检测靶标得到扩增, 从而能准确、快速地完成样品中死活菌的区分。目前该方法已经广泛地用于国内外临床医学和食源致病微生物的检测中<sup>[8,10-11,13]</sup>, 但对农业植物病原菌的检测国内外仅有 3 篇文献报道<sup>[20-22]</sup>。

本研究结果显示, 当 EMA 的作用终浓度达到 1.5 mg/L 时, EMA-qPCR 方法能完全抑制 10<sup>7</sup> CFU/mL 浓度的青枯菌死菌的扩增; 在死、活菌混合体系中, EMA-qPCR 对活菌的检测下限能够达到 5.0 $\times$ 10<sup>0</sup> 个菌/反应, 且当反应体系中活菌数在 5.0 $\times$ 10<sup>0</sup>–5 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU 范围内时, 扩增  $C_t$  值与活菌数为线性相关。因此可以利用所建立的标准曲线对混合体系中的活菌进行快速定量检测。

VBNC 状态是细菌的一种特殊存活机制, 是一种对不良环境的适应性反应。处于 VBNC 状态的细菌在常规培养条件下表现为不可培养, 因此在常规的平板计数方法中不能被检出。目前用于 VBNC 细菌的检测技术主要有光学方法[主要有活菌直接计数法(DVC)、呼吸检测法、死/活细菌检测试剂盒]、免疫学法、分子生物学法等, 其中分子生物学检测成为一种趋势, mRNA 体外扩增法(RT-qPCR)是目前区分死活细胞的常用分子检测方法, 但有一定的局限性<sup>[10]</sup>。本研究中所建立的 EMA-qPCR 方法能够有效区分青枯菌的死细胞和 VBNC 状态的方法, 并且方法简单可靠, 可以用于实际应用。

实际检测中, 待检样品可能会出现积压情况, 需要短期保存。我们初步研究了在不同温度下短期保存后菌体细胞死活状态的变化, 结果显示, 菌体在 4 °C 和 24 °C 保存 72 h, EMA-qPCR 与平板计数法结果一致, 活体数与对照组无显著差异, 但是 EMA-qPCR 检测方法与平板计数法相比, 只需在几小时就可以完成, 大大缩短了检测时间。而在 -20 °C 保存 72 h 后, 检测结果显示 EMA-qPCR 比平板计数法检出的活菌数要高。根据 Van 等<sup>[5]</sup>报道, 青枯菌在无菌水中 4 °C 冷藏 3 个月菌体会进入 VBNC 状态。本研究中 -20 °C 保存 72 h 后, MTT 法检测显示菌体出现了部分死亡(图 5A)。结合 Kell 等<sup>[23]</sup>和 Novak 等<sup>[24]</sup>的报道, 极

端低温处理后的菌体可能会因酶的活性被破坏而死亡, 而细胞壁(膜)仍能保持部分完整, 使 EMA 染料无法渗透进入, 从而出现了 EMA-qPCR 法比平板计数法检出的活菌数要高。由此充分表明, 待检样品能在 4 °C 和 24 °C 条件下做短期保存而对检测结果无影响, 不能够在 -20 °C 低温条件做短期保存。

综上所述, 本研究建立的 EMA-qPCR 检测方法能从混合状态下的纯培养菌中特异性检测出青枯菌活菌, 并能够有效区分死细胞和处于 VBNC 状态的细胞, 提供了更为准确、科学的检测方法, 具有一定的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, et al. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6790–6801.
- [2] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and Marine environment[J]. Microbial Ecology, 1982, 8(4): 313–323.
- [3] Grey BE, Steck TR. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 3866–3872.
- [4] Van Elsas JD, Kastelein P, van Bekkum P, et al. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates[J]. Phytopathology, 2000, 90(12): 1358–1366.
- [5] Van Overbeek LS, Bergervoet JH, Jacobs FH, et al. The Low-Temperature-Induced Viable-But-Nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2[J]. Phytopathology, 2004, 94(5): 463–469.
- [6] Alvarez B, López MM, Biosca EG. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms[J]. Microbiology (Reading, England), 2008, 154(11): 3590–3598.
- [7] Swanson JK, Yao J, Tans-Kersten J, et al. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium[J]. Phytopathology, 2005, 95(2): 136–143.
- [8] Wang S, Levin RE. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64(1): 1–8.
- [9] Bolton PH, Kearns DR. Spectroscopic properties of ethidium monoazide: a fluorescent photoaffinity label for nucleic acids[J]. Nucleic Acids Research, 1978, 5(12): 4891–4903.
- [10] Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H, et al. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR[J]. BioTechniques, 2003, 34(4): 804–808.
- [11] 伦镜盛, 夏常艳, 罗鹏, 等. 副溶血弧菌 EMA-PCR 检测技术的建立[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 952–956.
- [12] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [13] Rudi K, Moen B, Drømtorp SM, et al. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 1018–1024.
- [14] Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 33(5): 1225–1228.
- [15] Du M, Chen J, Zhang X, et al. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(4): 1349–1354.
- [16] Wang H, Cheng H, Wang F, et al. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 82(3): 330–333.

- [17] Abolmaaty A, Vu C, Oliver J, et al. Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction[J]. *Microbios*, 2000, 101(400): 181–189.
- [18] Lee JL, Levin RE. Quantification of total viable bacteria on fish fillets by using ethidium bromide monoazide real-time polymerase chain reaction[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 118(3): 312–317.
- [19] Chen Y, Zhang WZ, Liu X, et al. A real-time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacearum* in the horticultural soil and plant tissues[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(1): 193–201.
- [20] Luo LX, Wllters C, Bolkan H, et al. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real time PCR assay[J]. *Plant Pathology*, 2008, 57(2): 332–337.
- [21] Trivedi P, Sagaram US, Kim JS, et al. Quantification of viable *Candidatus Liberibacter asiaticus* in hosts using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide(EMA)[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2009(124): 553–563.
- [22] 冯建军, 金志娟, 刘西莉, 等. 一种 DNA 染料结合聚合酶链反应检测鉴别植物病原细菌死活细胞[J]. *高等学校化学学报*, 2008, 29(5): 944–948.
- [23] Kell DB, Kaprelyants AS, Weichert DH, et al. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73(2): 169–187.
- [24] Novak JS, Juneja VK. Detection of heat injury in *Listeria monocytogenes* Scott A[J]. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(11): 1739–1743.

## 科技信息摘录

### 科学家在 DNA 折纸单分子反应中发现“穿越”

中国科学院上海应用物理研究所胡钧课题组与上海交通大学生物医学工程院合作,在 DNA 折纸单分子反应的研究中发现了“分子穿越”现象。相关成果日前在线发表于《美国化学会志》。

DNA 折纸技术结合了生物 DNA 分子本身严格的互补配对原则和计算机编程技术,成为制造人为可控纳米结构的有效途径。目前,基于 DNA 折纸技术研究单分子反应和进行相关生物检测,已成为学术界关注的前沿领域。然而, DNA 折纸在界面上的吸附取向原因不明、无法控制,因此当功能化修饰的一面朝向吸附界面时,其功能性分子朝向吸附的界面表面,修饰面难以顺利完成既定功能,这将限制 DNA 纳米机器人和器件的实际应用。

在研究员胡钧的指导下,博士生吴娜等在研究 DNA 折纸上生物素与亲和素的单分子识别反应动力学过程时发现,单链 DNA 分子可以“穿越”DNA 折纸,与折纸另一端的分子发生反应。研究人员猜测:两维 DNA 折纸呈现纳米网格结构,网格的孔洞呈现规则而有序的排列。分子模拟与原子力显微镜检测结果显示,这些“纳米孔”的孔径约在 1–3 nm 间,尺度合适的单链 DNA 分子可穿过“纳米孔”。通过巧妙的图案化设计和单分子识别反应的实时原位检测,研究人员发现一定长度的单链 DNA 的确可通过“纳米孔”穿梭到折纸的另外一面,且在一定范围内,其长度对分子识别反应具有显著的调控作用,长度越长反应越快。

专家认为,“分子穿越”现象的发现具有重要意义,如果功能性分子能够通过此“纳米孔”,从折纸的一面穿梭到另外一面,就可改善由于 DNA 折纸吸附取向所造成的问题。这将为 DNA 折纸纳米结构构建提供新视角,并为有关实验现象提供新的诠释依据。

——摘自《科学网》2013/8/27

<http://news.sciencenet.cn/htmlnews/2013/8/281722.shtm>