

PMA-qPCR 方法检测陕西猕猴桃溃疡菌优势病原菌活菌的研究

PMA-qPCR for detecting live bacteria of Shaanxi
kiwifruit cancer dominant pathogen

肖妍¹ 刘芸宏¹ 高贵田^{1,2} 曹凡¹

XIAO Yan¹ LIU Yun-hong¹ GAO Gui-tian^{1,2} CAO Fan¹

马燕萍¹ 赵武奇¹ 雷玉山^{2,3}

MA Yan-ping¹ ZHAO Wu-qi¹ LEI Yu-shan^{2,3}

(1. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119; 2. 陕西省猕猴桃工程技术研究中心, 陕西 西安 710404; 3. 陕西省农村科技开发中心, 陕西 西安 710054)

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710119, China; 2. Shaanxi Kiwifruit Engineering Technology Research Center, Xi'an, Shaanxi 710404, China; 3. Shaanxi Rural Science and Technology Development Center, Xi'an, Shaanxi 710054, China)

摘要:将叠氮溴化丙啶(PMA)与实时荧光定量(qPCR)相结合定量检测陕西猕猴桃溃疡菌优势病原菌(Psa)活菌的数量。通过优化 PMA 最佳浓度、暗孵育时间、曝光时间,确定 PMA-qPCR 区别溃疡菌活、死菌的最佳条件。结果表明,Psa 经 98.3 °C 沸水浴处理 13 min 可完全致死,Psa 死菌浓度为 1×10^7 CFU/mL 时 PMA 与死菌共价交联的最佳浓度为 105 $\mu\text{g/mL}$,最佳暗育时间为 8 min,最佳曝光时间为 20 min,在此条件下死菌 DNA 无扩增,而对活菌 DNA 扩增无影响;Psa 质粒标准品建立的线性回归方程为 $Y = -3.2204x + 37.73$, $R^2 = 0.9955$,最低可检出 6.39×10^2 拷贝/ μL 的溃疡菌;建立的 PMA-qPCR 方法最低可检出 2.38×10^2 拷贝/ μL 的溃疡菌;采用人工染菌枝条样品的最低检出限为 6.30×10^4 CFU/mL,与菌落计数检测结果相符。

关键词: PMA; qPCR; 猕猴桃溃疡菌; 活菌检测

Abstract: Combining Propidium Monoazide Bromide (PMA) with

real-time quantitative (qPCR) to detect the number of the live bacteria of kiwifruit cancer dominant pathogen in Shaanxi province. The optimal condition for PMA-qPCR to distinguish between live and dead ulcer bacteria was determined by optimizing the optimum concentration of PMA, incubation time and light exposure time. The results showed that all Psa were killed when treated by boiling water bath at 98.3 °C for 13 min. When the concentration of dead Psa was 1×10^7 CFU/mL, the suitable concentration of covalent crosslinking between PMA and dead Psa was 105 $\mu\text{g/mL}$, the best incubation time was 8 min and the best light exposure time was 20 min. Under this condition, no DNA amplification of the dead bacteria, and no effect on the DNA amplification of live bacteria. The linear regression equation established based on the Psa plasmid standard was $Y = -3.2204x + 37.73$, for which $R^2 = 0.9955$. It can detect the Psa in the 6.39×10^2 copies/ μL at minimum. The established PMA-qPCR method can detect 2.38×10^2 copies/ μL Psa at minimum. By using the sample of artificially infected branches, the minimum detection limit was 6.30×10^4 CFU/mL, consistent with the detection results of colony counting method.

Keywords: PMA; qPCR; kiwifruit cancer; live bacteria detection

基金项目: 陕西省科技厅特色产业链项目(编号: 2018TSCXL-NY-01-05); 西安市农业科技创新计划项目[编号: 2017050NC/NY009(3)]

作者简介: 肖妍,女,陕西师范大学在读硕士研究生。

通信作者: 高贵田(1964—),男,陕西师范大学副教授,硕士,博士。E-mail: gaoguitian2006@snnu.edu.cn

雷玉山(1963—),男,陕西省猕猴桃工程技术研究中心研究员,硕士,博士。E-mail: leiyushan@163.com

收稿日期: 2018-11-28

猕猴桃溃疡病是由丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Psa)引起的细菌性病害^[1],严重影响猕猴桃产业的发展。目前,该病菌的检测主要采用 PCR 技术,但是常规的 PCR 技术不能区分

样品中病原菌的生活状态,在对活菌 DNA 进行扩增的同时,也会扩增自由状态的 DNA 或者死菌的 DNA^[2],检测产生假阳性,无法确定 Psa 的生活状态,无法对溃疡病的发生趋势作出科学预测,也无法对消毒、防治效果做出科学判断。

叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)是一种能和 DNA 共价交联的荧光染料。PMA 可以通过死菌损伤的细胞膜进入死菌细胞,并且光照可使 PMA 的光敏基团转化为氮宾自由基,与死菌 DNA 发生共价交联,从而抑制后续 DNA 扩增^[3-6];活菌细胞膜完整,PMA 不能进入细胞内;剩下的少量游离在溶液中的 PMA 则可与溶液中的水分子结合形成羟胺(—NH—OH),失去与 DNA 结合的活性;PMA-qPCR 技术就是利用这一特性,实现了只扩增活细胞的 DNA,而不扩增死细胞的 DNA^[4]。

近年来,PMA-qPCR 技术已被广泛应用于多种微生物活死菌的鉴别检测^[7],但该技术用于鉴别陕西猕猴桃溃疡菌优势病原菌仍鲜见报道。于小龙等^[8]建立的 PMA-qPCR 方法,能有效对包括 VBNC 状态在内的青枯菌活菌进行检测;温书香等^[9]通过优化 PMA 处理条件,实现了对结核杆菌活菌的快速检测;於颖等^[10]在 PMA 浓度 $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ 下,曝光 5 min ,可实现对金黄色葡萄球菌活菌筛选的作用。

世界 Psa 主要分为三大类群,中国流行的猕猴桃溃疡病的 Psa 与最近在意大利、新西兰、西班牙、法国、葡萄牙等国流行的 Psa 为同一类群^[11]。由于其同属的 *Pseudomonas syringae* pv. *theae* 和 *Pseudomonas avellanae* 与 Psa 的亲缘关系非常近,常规的分子标记技术很难将它们区分开^[12]。Gallelli 等^[13]根据猕猴桃溃疡菌的 *hrpW* 基因保守区,设计 P3F/P5R1 引物,不仅能区分 *Pseudomonas syringae* pv. *theae* 和 *Pseudomonas avellanae*,也可以准确区分出强致病力菌株(Psa-V)与弱致病力菌株,朱丹等^[14]克隆了陕西猕猴桃优势 Psa 的 *hrpW* 基因保守区,其序列与 Psa-V 同源率为 99% 。

因此本研究拟利用陕西猕猴桃优势 Psa 的 *hrpW* 的 P3F/P5R1 为引物,建立 PMA-qPCR 检测方法,研究 PMA 浓度、暗孵育时间及曝光时间等对 Psa 扩增的影响,并将死菌和活菌按一定的比例混合,对 PMA-qPCR 方法在实际检测中的可行性进行分析。为陕西猕猴桃溃疡病的快速检测、准确诊断及病情预测提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Psa):为陕西猕猴桃溃疡病优势病原菌^[15],西北农林科技大学植保学院黄丽丽教授惠赠;

PMA:美国 Biotium 公司;

Psa 质粒标准品:生工生物工程(上海)股份有限公司;

Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒、即用 PCR 扩增试剂盒:上海生工生物工程有限公司;

SYBR Green I 试剂盒:天根生化科技有限公司;

卤素灯:500 W,飞利浦灯具有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Psa 菌悬液的制备 挑取 Psa 单菌落于 King's B 液体培养基, $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 190 r/min 恒温震荡 12 h , 无菌水调节菌悬液浓度为 $1\times 10^7\text{ CFU/mL}$ 。

1.2.2 Psa 菌膜损伤时间的确定 吸取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 菌悬液于 1.5 mL 的离心管中,沸水浴($98.3\text{ }^{\circ}\text{C}$)分别处理 $10, 11, 12, 13, 14, 15\text{ min}$ 后立即在冰上冷却至室温,对照组未经沸水浴处理。吸取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 涂布于 King's B 固体培养基上, $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养, 3 d 后统计单菌落数,无菌落生长视为全部是死菌,该时间为膜损伤菌的处理时间。

1.2.3 DNA 提取 吸取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 菌液, $8\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 2 min 弃上清,按照 DNA Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒的说明书提取 DNA。

1.2.4 qPCR 检测 qPCR 引物根据 Gallelli 等^[13],修改如下,引物序列为:GGTTTCGACACCGCAGGTTC-TACCGAG 和 CTCCTGATCCCCGTTACCCATCGA-C,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应总体积为 $10\text{ }\mu\text{L}$,DNA 模板 $1.0\text{ }\mu\text{L}$,SYBR PCR premix $5.0\text{ }\mu\text{L}$,引物 P3F、P5R1 各 $0.6\text{ }\mu\text{L}$,ddH₂O 补足至反应总体积。反应程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s , 30 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s 。

1.2.5 PMA 处理的条件

(1) PMA 工作液的制备: 1 mg PMA 于 $8\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 2 min ,加入 20% 二甲基亚砜(DMSO)溶液 $200\text{ }\mu\text{L}$ 充分溶解,得到 $5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ PMA 储备液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

(2) 抑制死菌扩增的 PMA 最小浓度:分别吸取 6 份膜损伤的死菌悬液 $500\text{ }\mu\text{L}$ 于 1.5 mL 离心管,加入 PMA,使 PMA 的终浓度分别为 $0, 90, 95, 100, 105, 110\text{ }\mu\text{g/mL}$,颠倒混匀,暗孵育 8 min ,将样品置于冰上,离心管口朝上,置于距样品 20 cm 的 500 W 卤素灯下,曝光处理 20 min ,提取样品 DNA,用 qPCR 检测,从而确定能够完全抑制死菌扩增的 PMA 最小浓度。

(3) 不影响活菌扩增的 PMA 最大浓度:吸取 4 份活菌悬液 $500\text{ }\mu\text{L}$ 于 1.5 mL 离心管中,加入 PMA,使 PMA 的终浓度分别为 $0, 105, 110, 120\text{ }\mu\text{g/mL}$,颠倒混匀,暗孵育 8 min ,将样品置于冰上,离心管口朝上,置于距样品 20 cm 的 500 W 卤素灯下,曝光处理 20 min ,提取样品 DNA,用 qPCR 分别检测,研究不抑制活菌扩增的 PMA

最大浓度。

(4) 暗孵育时间的优化:分别吸取 5 份膜损伤的死菌悬液 500 μL 于 1.5 mL 离心管,加入确定的最佳 PMA 工作液浓度,分别暗孵育 5,6,7,8,9,10 min,将样品置于冰上,离心管口朝上,置于距样品 20 cm 的 500 W 卤素灯下,曝光处理 20 min,未加 PMA 的样品作为阳性对照,提取 DNA,用 qPCR 检测,研究完全抑制死菌扩增的最佳暗孵育时间。

(5) 曝光时间的优化:分别吸取 6 份膜损伤的死菌悬液 500 μL 于 1.5 mL 离心管,用确定的最佳 PMA 工作液浓度和最佳暗孵育时间进行处理,将样品置于冰上,离心管口朝上,置于距样品 20 cm 的 500 W 卤素灯下,分别曝光处理 5,10,15,20,25 min,未加 PMA 的样品作为阳性对照,确定能够完全抑制死菌扩增的最佳曝光时间。

(6) PMA 对不同比例活菌/死菌样品的检测效果:将培养至 10^7 CFU/mL 的活菌和死菌按照表 1 进行混合,经合适条件的 PMA 处理提取 DNA,进行 PMA-qPCR 反应,以未加 PMA 处理的样品作为对照。

表 1 不同比例的活死菌样品

Table 1 Proportion of different live and dead bacteria

菌液/%	活菌/ μL	死菌/ μL
0	0	500
25	125	375
50	250	250
75	375	125
100	500	0

1.2.6 标准曲线的建立 取已知浓度的 Psa 质粒标准品(由生工生物工程[上海]股份有限公司完成),根据式(1)换算成基因拷贝数。

$$A = \frac{C}{660M} \times N_A, \quad (1)$$

式中:

A——质粒 DNA 拷贝数,拷贝/ μL ;

C——DNA 浓度,ng/ μL ;

M——片段大小;

N_A ——阿伏伽德罗常数, 6.02×10^{23} 。

将 Psa 质粒标准品 10 倍梯度稀释至 10^1 ,进行荧光定量 PCR 反应,以拷贝数对数值和所得 Ct 值为横、纵坐标建立标准曲线。

1.2.7 PMA-qPCR 的灵敏度 菌液 10 倍梯度稀释至 10^1 ,经合适条件的 PMA 处理提取 DNA,进行 PMA-qPCR 的灵敏度分析。

1.2.8 猕猴桃枝条样品活菌检测

(1) 枝条样品的染菌:取无菌的猕猴桃枝条,切成

25 g 的小块,碾碎后放入无菌均质杯中,加入 225 mL 无菌水,8 000 r/min 均质 2 min,制成样品匀液。分别加入 $10^1 \sim 10^7$ CFU/mL 的溃疡菌活菌悬液,作为人工染菌的样品。

(2) 采用合适条件的 PMA 处理提取 DNA,进行 PMA-qPCR 检测,根据标准曲线得到基因拷贝数,与平板计数的结果进行比较。

1.2.9 数据分析 采用 DPS 7.05 对试验数据进行显著性差异检验, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 Psa 膜损伤时间的确定

本试验采用食品上较常使用的高温灭菌方式制备死菌悬液^[16]。菌悬液浓度为 1×10^7 CFU/mL,热处理不同时间,稀释一定浓度后涂布,24 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d,计数结果如表 2 所示,热处理时间越长,对活菌的灭活效率越高,当膜损伤时间为 13 min 时,无菌落生长,因此,以 13 min 的沸水浴处理作为活菌的全部致死时间。

表 2 时间对菌液灭活效率的影响

Table 2 Effect of heat-treatment time on sterilizing rate

热处理时间/min	平板计数/(CFU $\cdot$ mL ⁻¹)
0	1×10^7
10	5
11	2
12	1
13	0
14	0
15	0

2.2 PMA 处理条件的确定

2.2.1 PMA 浓度的优化

(1) 抑制死菌扩增的 PMA 最小浓度:由图 1 可知,随着 PMA 浓度的增大,Ct 值逐渐增大,PMA 的浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,Ct 值增大比较小,当 PMA 浓度为 105 $\mu\text{g/mL}$ 时,对死菌 DNA 扩增抑制达到最大,PMA 浓度为 110 $\mu\text{g/mL}$ 时,Ct 值几乎无变化,与 PMA 浓度为 105 $\mu\text{g/mL}$ 相比,无显著性差异($P > 0.05$),因此,确定抑制死菌 DNA 扩增最小 PMA 浓度为 105 $\mu\text{g/mL}$ 。

PMA 是一种能和死菌 DNA 共价交联的荧光染料,活菌的完整细胞膜可阻止 PMA 进入,从而达到检测活菌效果。但是,PMA 浓度过高可能对活菌的细胞产生影响,导致假阴性的检测结果^[17]。赵丽青等^[18]在 PMA 浓度 2 $\mu\text{g/mL}$ 下,500 W 卤素灯曝光 15 min 可达到检测金黄色葡萄球菌活菌的目的。曹梦琪等^[19]在 PMA 浓度 15 $\mu\text{g/mL}$ 下,650 W 卤钨灯曝光 5 min,可达到检测青枯菌活菌的目的。於颖等^[10]在 PMA 浓度 30 $\mu\text{g/mL}$ 下,

650 W 卤素灯曝光 5 min 可达到筛选金黄色葡萄球菌活菌的作用,并且试验中的菌悬液浓度均在 10^8 CFU/mL。本研究得到的 Psa 的最佳 PMA 浓度为 $105 \mu\text{g/mL}$,菌悬液浓度为 10^7 CFU/mL。细菌的细胞膜差异很大,革兰氏阴性菌比革兰氏阳性菌的细胞壁与细胞膜薄,对 PMA 的通透性好^[20],PMA 使用浓度应该较低,但本研究得到的 Psa 的最佳 PMA 浓度与已有文献相差较大,可能与陕西猕猴桃优势病原菌本身对外界环境的抵抗能力有关,其对 PMA 产生抵抗的详细机理还需更深层的探究。

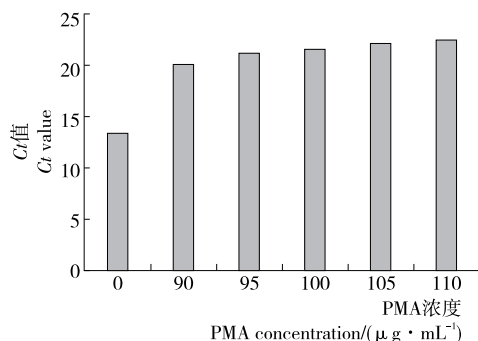


图1 PMA浓度对膜损伤菌的影响

Figure 1 Effect of PMA concentration on heat-treated bacteria

(2) 不影响活菌扩增的 PMA 最大浓度:由图 2 可知,活菌 DNA 的 Ct 值随 PMA 浓度的增大而增大,PMA 浓度为 $105 \mu\text{g/mL}$ 时,与未加 PMA 的 Ct 值无显著性差异($P>0.05$),说明此浓度不会对活菌 DNA 的扩增产生较大影响,但是当 PMA 使用浓度 $>105 \mu\text{g/mL}$ 时,与未加 PMA 的 Ct 值有显著性差异($P<0.05$),说明 PMA 浓度 $>105 \mu\text{g/mL}$ 对活菌有一定的影响,因此,选择 PMA 浓度为 $105 \mu\text{g/mL}$ 作为不影响活菌扩增的 PMA 最大浓度。

2.2.2 暗孵育时间的确定 由图 3 可知,随着暗孵育时间的延长,Ct 值逐渐增大,暗孵育时间为 7 min,Ct 值增大比较小,当暗孵育时间延长至 8 min,对死菌 DNA 扩增

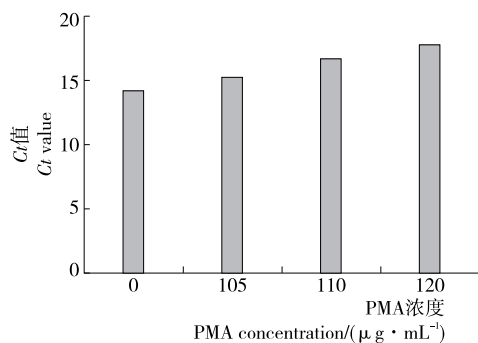


图2 PMA浓度对活菌的影响

Figure 2 Effect of PMA concentration on live bacteria

抑制达到最大,暗孵育时间 >8 min,Ct 值几乎无变化,与暗孵育时间 8 min 相比,无显著性差异($P>0.05$),8 min 的暗孵育时间可完全抑制死菌 DNA 扩增,因此确定最佳的暗孵育时间为 8 min。

抑制膜损伤菌 DNA 扩增除 PMA 浓度外,最佳的暗孵育时间也至关重要。PMA 在光照条件下,与水分子结合生成羟胺,羟胺不能和 DNA 分子结合,从而无法抑制死菌的 DNA,因此,在样品中加入 PMA 要避开处理合适的时间,而暗孵育时间的长短受样品菌浓度、PMA 浓度、细胞膜结构等因素影响。结果表明,8 min 的暗孵育时间可充分使 PMA 与 DNA 结合,曝光处理后与 DNA 结合形成不可逆的共价交联结构,抑制死菌 DNA 扩增。未与 DNA 结合的 PMA 曝光时可与水分子反应生成羟胺而失去活性^[21-22]。

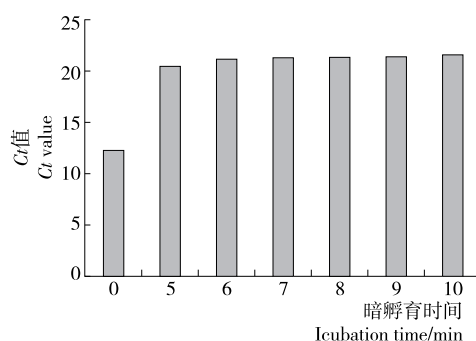


图3 暗孵育时间对膜损伤菌的影响

Figure 3 Effect of incubation time on heat-treated bacteria

2.2.3 曝光时间的确定 由图 4 可知,随着曝光时间的延长,Ct 值逐渐增大,曝光时间为 15 min,Ct 值增大比较小,当曝光时间延长至 20 min,对死菌 DNA 扩增抑制达到最大,曝光时间为 25 min,Ct 值几乎无变化,与曝光时间 20 min 相比,无显著性差异($P>0.05$)。因此,20 min 的曝光时间可完全抑制死菌 DNA 扩增,确定最佳的曝光时间为 20 min。

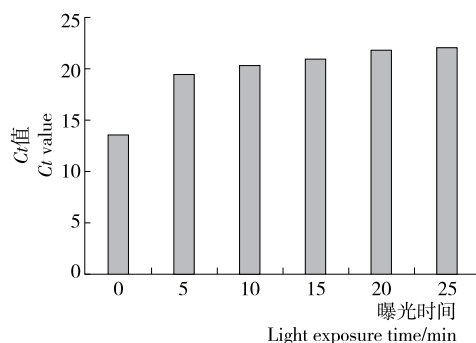


图4 曝光时间对膜损伤菌的影响

Figure 4 Effect of light exposure time on heat-treated bacteria

曝光时间是影响活菌检测的另一个重要因素,光照时间不充分,PMA 不能完全被钝化,部分残留在菌悬液中,提取 DNA 时,活细胞的细胞膜被破坏,暴露出的 DNA 被 PMA 分子结合,使检测结果出现假阴性。卤钨灯的选择也会影响到曝光的时间,650 W 卤钨灯虽然能降低耗时,但同时会产生大量的热量,有可能造成管口附近菌体的死亡。所以本研究选用 500 W 的卤钨灯距离 20 cm,曝光 20 min,一方面使与 DNA 结合的 PMA 与 DNA 分子进一步充分交联,同时使游离的 PMA 完全被钝化。

2.2.4 PMA 对不同比例活菌和膜损伤菌影响 PMA 对不同比例活菌和死菌的影响如表 3 所示,当样品全部为死菌时(活菌比例 0%),未加 PMA 处理的 C_t 值为 16.21,加 PMA 处理后 C_t 值为 23.28,差异极显著($P<0.01$),活菌的比例为 25%,50%,75%,未加 PMA 处理的样品 C_t 值明显低于加入 PMA 样品的 C_t 值,说明 PMA 有抑制死菌 DNA 扩增的作用。当样品中活菌比例达到 100% 时,未加 PMA 样品的 C_t 值与加入 PMA 处理样品的 C_t 值无显著性差异($P>0.05$),说明加入的 PMA 对活菌的扩增几乎无影响。同时,活菌比例的增大导致 C_t 值相应的减少,说明经 PMA 处理后死菌 DNA 被 PMA 抑制不能扩增,可以消除死菌对 PCR 的扩增,降低假阳性结果出现的可能性。

表 3 不同比例活菌样品 PMA-qPCR 结果[†]

Table 3 PMA-qPCR Results of different live bacteria proportion

组别	对照组	PMA 处理组	ΔC_t	P 值
0%	16.21±0.10	23.28±0.18	7.07	0.00
25%	15.23±0.08	19.70±0.58	4.47	0.00
50%	15.38±0.26	18.31±0.19	2.93	0.00
75%	16.02±0.10	18.26±0.16	2.24	0.00
100%	16.18±0.18	17.37±0.41	1.19	0.06

[†] ΔC_t =PMA 处理组-对照组。

2.3 质粒标准品的制备及标准曲线的建立

质粒标准品初始拷贝数为 6.39×10^8 拷贝/ μL 。将其进行 10 倍梯度稀释,使浓度范围在 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝/ μL 。以拷贝数对数值和所得 C_t 值为横、纵坐标建立标准曲线,见图 5。可以看出两者存在对应线性关系, $r^2=0.9955$,斜率为-3.220 4,该方法最低能够检出 6.39×10^2 拷贝/ μL 的溃疡菌。

2.4 PMA-qPCR 的灵敏度

菌液 10 倍梯度稀释至 $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$,经合适条件的 PMA 处理提取 DNA,进行 PMA-qPCR 反应。根据标准曲线得到定量结果见表 4,PMA-

qPCR 方法最低可检出 2.38×10^2 拷贝/ μL 的溃疡菌见图 6。

2.5 猕猴桃枝条样品活菌检测

染菌样品经 PMA 处理提取 DNA,进行 PMA-qPCR 检测,根据标准曲线得到基因拷贝数,与平板计数的结果进行比较,显示两者无显著性差异($P>0.05$)(表 5)。

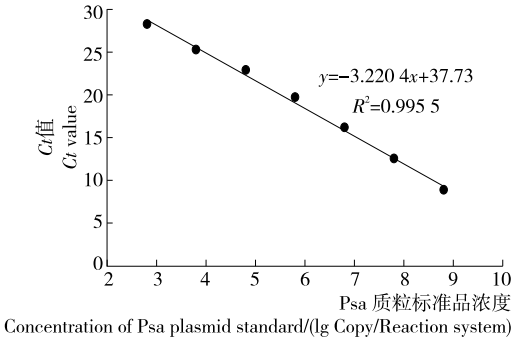


图 5 Psa 质粒标准曲线

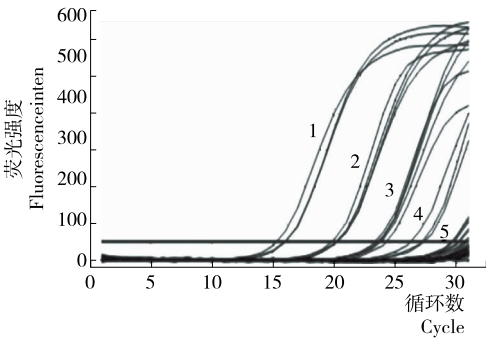
Figure 5 Plasmid standard curve

表 4 不同稀释梯度菌液的 PMA-qPCR 结果[†]

Table 4 PMA-qPCR results of different dilution bacteria

菌液	C_t 值	拷贝数
10^1	UD	—
10^2	UD	—
10^3	30.07 ± 0.24	2.38×10^2
10^4	28.01 ± 0.03	1.32×10^3
10^5	23.59 ± 0.12	2.45×10^4
10^6	20.15 ± 0.02	2.88×10^5
10^7	15.95 ± 0.04	5.75×10^6

[†] UD 表示未测得。



1~5 分别为稀释至 $10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3$ 的菌悬液扩增曲线,最低可检出 2.38×10^2 拷贝/ μL 的溃疡菌

图 6 PMA-qPCR 灵敏度分析

Figure 6 PMA-qPCR sensitivity analysis

表 5 染菌样品 PMA-qPCR 结果与平板计数结果比较[†]
Table 5 Compare results of PMA-qPCR with plate count

菌液浓度/ (CFU · mL ⁻¹)	qPCR 结果/ (Copy · mL ⁻¹)	qPCR 结果 取对数	平板计数结果/ (CFU · mL ⁻¹)	平板计数结 果取对数
10 ¹	UD	—	1.25×10 ¹	1.10
10 ²	UD	—	1.50×10 ²	2.18
10 ³	UD	—	1.35×10 ³	3.13
10 ⁴	6.30×10 ⁴	4.80	5.10×10 ⁴	4.71
10 ⁵	1.12×10 ⁵	5.05	1.00×10 ⁵	5.00
10 ⁶	1.34×10 ⁶	6.13	1.45×10 ⁶	6.16
10 ⁷	2.60×10 ⁷	7.41	2.90×10 ⁷	7.46

[†] UD 表示未测得。

3 结论

本试验以猕猴桃溃疡菌为研究对象,通过优化 PMA 处理条件,实现检测陕西猕猴桃溃疡病优势病原菌活菌的目的。结果表明,PMA 与死菌共价交联的最佳浓度为 105 μg/mL,最佳暗孵育时间为 8 min,最佳曝光时间为 20 min,在此条件下,Psa 死菌扩增被抑制,而活菌的扩增未受影响。同时,虽然优化后的 PMA 浓度对活菌的扩增未产生影响,但是该浓度相对此类文献而言还是偏高,所以对于陕西猕猴桃溃疡病优势病原菌是否对 PMA 具有更强的抵抗力,还需要进一步研究。

参考文献

[1] 李瑶, 承河元, 方书苗, 等. 猕猴桃细菌性溃疡病流行预测初探[J]. 应用生态学报, 2001, 12(3): 359-362.

[2] WANG Shi-shan, LEVIN R E. Discrimination of viable vibrio vulnificus cells from dead cells in real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64(1): 1-8.

[3] NOCKER A, SOSSA-FERNANDEZ P, BURR M D, et al. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5 111-5 117.

[4] CAWTHORN D M, WITTHUHN R C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(4): 1 178-1 185.

[5] NOCKER A, CHEUNG C Y, CAMPER A K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(2): 310-320.

[6] FORGHANI F, LANGAEE T, ESKANDARI M, et al. Rapid detection of viable *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR) [J]. Food Control,

2015, 55: 151-157.

[7] 盖冬雪, 任洪林, 卢士英, 等. 乳品中大肠杆菌 PMA-qPCR 活菌检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(2): 439-498.

[8] 于小龙, 徐进, 张昊, 等. PMA-PCR 方法快速检测 VBNC 状态青枯菌[J]. 植物保护, 2016, 42(1): 144-149.

[9] 温书香, 王慧勤, 曹旭东, 等. PMA-qPCR 快速检测结核活菌方法的建立[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2014(2): 143-147.

[10] 於颖, 王文静, 陆晔, 等. PMA-实时荧光 PCR 快速检测蔬果中金黄色葡萄球菌活菌[J]. 现代预防医学, 2016, 43(20): 3 757-3 763.

[11] BUTLER M I, STOCKWELL P A, BLACK M A, et al. *Pseudomonas syringae* P_{vs}. *actinidiae* from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China[J]. PLOS One, 2013, 8(2): e57464.

[12] 周大祥, 殷幼平, 王中康, 等. 利用 EMA-qPCR 建立快速检测猕猴桃溃疡病菌活菌的方法[J]. 植物保护, 2017, 43(3): 143-148.

[13] GALLELLI A, TALOCCI S, PILOTTI M, et al. Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* p_{vs}. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker [J]. Plant Pathology, 2013, 63(2): 264-276.

[14] 朱丹, 曹凡, 高贵田, 等. 贮藏期猕猴桃果实表面溃疡病病原菌的快速检测方法研究[J]. 核农学报, 2017, 31(3): 493-499.

[15] ZHAO Zhi-bo, GAO Xiao-ning, HUANG Qi-ling, et al. Identification and characterization of the causal agent of bacterial cancer of kiwifruit in the Shaanxi province of China[J]. Journal of Plant Pathology, 2013, 95(1): 153-160.

[16] YANG X, BADONI M, GILL C O. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E.coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments[J]. Food Microbiology, 2011, 28(8): 1 478-1 482.

(下转第 59 页)

3 结论

(1) 本试验分别建立高效液相色谱法与高效薄层扫描法测定滁菊中木犀草素、芹菜素、金合欢素的含量,并对滁菊不同批次产品采用 2 种方法测定结果进行比较分析,组间比较无差异性 ($P < 0.05$),且 $RE < 3\%$,表明 HTLCS 法可以代替 HPLC 法对滁菊中 3 种成分进行分析,且分析误差较小。

(2) 本试验采用 HTLCS 法和 HPLC 法同时对滁菊中 3 种成分分析,并对测定方法建立了相关分析方法,测定方法的线性关系及相关方法学考察符合要求,本试验对滁菊中多成分分析方面更能体现滁菊质量差异性,测定方法较唐婧等^[23]采用 HPLC 法对滁菊中单一成分木犀草素评价更具有科学性。

(3) 滁菊为药用植物,含有效成分较多,仅对其中几个进行分析对其质量评价存在局限性,采用分析方法对滁菊中更多有效成分进行分析有待下一步研究。

参考文献

- [1] 叶桔泉. 现代实用中药[M]. 北京: 人民出版社, 1956: 172.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 第一部[S]. 2015 版. 北京: 化学工业出版社, 2015: 310.
- [3] 中国医学科学院药物研究所. 中药志: 第三册[M]. 北京: 人民出版社, 1960: 1 383.
- [4] 俞浩, 肖新, 刘汉珍, 等. 滁菊总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 283-286.
- [5] 俞浩, 张孝林, 熊友谊, 等. 滁菊总黄酮和白背三七总黄酮配伍对糖尿病血瘀证大鼠血糖及血液流变学的影响[J]. 中成药, 2014, 36(4): 830-834.
- [6] 俞浩, 张成孜, 毛斌斌. 滁菊多糖抗疲劳耐缺氧作用效果观察[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 365-367, 372.
- [7] 缪成贵, 陈庆榆, 何华奇. 滁菊总黄酮抗氧化作用研究[J]. 生物学杂志, 2012, 29(3): 42-44, 87.
- [8] 陈庆榆, 何华奇. 采用 DPPH 法测定四大药用名菊抗氧化活性[J]. 安徽科技学院学报, 2012, 26(4): 39-42.
- [9] 肖新, 朱伟, 杜超, 等. 轮作与施肥对滁菊品质、产量及土壤酶活性的影响[J]. 中药材, 2015, 38(5): 889-893.
- [10] 陈世勇, 李英峰, 史亚东, 等. 滁菊低产原因分析及对策[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 5 784-5 785.
- [11] 刘汉珍, 史亚东, 俞浩, 等. 不同品种菊花中 4 种黄酮类化合物的含量测定比较研究[J]. 中药材, 2016, 39(9): 2 046-2 048.
- [12] 杨毕超, 时维静, 章庆华, 等. 安徽省药用菊花多类成分含量比较[J]. 安徽科技学院学报, 2013, 27(5): 50-54.
- [13] 周国梁, 蔡玉茹, 俞浩, 等. “一测多评”法测定凤尾草中 4 种成分的含量[J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(12): 1 791-1 795.
- [14] 郑天驰, 王钢力, 曹进, 等. 食品快速检测方法现状及建议[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 853-859.
- [15] 袁铭铭, 周雷罡, 钟端建, 等. 广东紫珠中抗凝血活性成分的薄层色谱鉴别及含量测定[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(5): 811-815.
- [16] LIU Li, OUYANG Li-fang, CHENG Deng-fang, et al. Detection of Berberine Hydrochloride in Jin Weng Zhili Particle Using TLC and HPLC[J]. Medicinal Plant, 2017, 8(1): 12-16.
- [17] 高美华, 刘磐, 梁士亮, 等. 隔山香药材中异莜蓆脑乙二醇的薄层鉴别及含量测定[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(6): 860-863.
- [18] 车晓彦, 伍丕娥, 周娟, 等. 麦冬药材 TLC 及 HPLC 特征图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(12): 2 262-2 266.
- [19] 马俊, 邱富娜, 刘金娥, 等. ELISA 和 TLC 检测饲料中 AFB₁ 含量的比较研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2013, 34(2): 19-24.
- [20] 郑夏生, 黄颖, 徐晖, 等. 地榆药材的 TLC 鉴别和 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2014, 25(27): 2 547-2 550.
- [21] 冯雅斌, 杜靓, 温静. 薄层色谱法在药物分析中的应用及研究进展[J]. 疾病监测与控制, 2011, 5(1): 60-63.
- [22] 姚令文, 刘燕, 郑笑为, 等. 牛黄镇惊丸薄层色谱质控方法的系统研究和应用[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(9): 1 065-1 069.
- [23] 唐婧, 郑胜彪, 张雪梅, 等. 超声提取-高效液相色谱测定滁菊中的木犀草素[J]. 安徽科技学院学报, 2010, 24(6): 48-51.
- (上接第 53 页)
- [17] NOCKER A, RICHTER-HEITMANN T, MONTIJN R, et al. Discrimination between live and dead cells in bacterial communities from environmental water samples analyzed by 454 pyrosequencing[J]. International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology, 2010, 13(2): 59-65.
- [18] 赵丽青, 王静, 秦燕, 等. PMA 结合 ddPCR 检测食品中金黄色葡萄球菌的研究[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(1): 105-109.
- [19] 曹梦琪, 王旭东, 王俊, 等. 基于 PMA-qPCR 检测青枯菌 5 号生理小种活菌的方法[J]. 蚕业科学, 2015, 41(6): 1 004-1 010.
- [20] 刘艳艳, 柳增善, 卢士英, 等. 灭菌乳中活阪崎肠杆菌 PMA-qPCR 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(2): 61-69.
- [21] ALIFANO P, RIVELLINI F, PISCITELLI C, et al. Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of a polycistronic mRNA[J]. Genes & Development, 1994, 8(24): 3 021-30 31.
- [22] NOCKER A, CHEUNG C Y, CAMPER A K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. Dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells[J]. J Microbiol Methods, 2006, 67(2): 310-320.