

MALDI-TOF-MS 鉴定 3 种水稻细菌的方法

王文彬, 匡 华, 徐丽广, 马 伟, 刘丽强, 胥传来*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 用哥伦比亚培养基培养了水稻细菌性谷枯病菌(NCPPB 2391, NCPPB 3591)、水稻细菌性条斑病菌(NCPPB 1585)、水稻细菌性褐斑病菌(NCPPB 2844), 菌落采用乙醇/甲酸处理法处理后用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析其蛋白质指纹图谱。除水稻细菌性条斑病菌无匹配结果外, 其它 2 种细菌均有正确的鉴定结果。用 Bruker 公司标准方法建立了水稻细菌性条斑病菌蛋白质指纹图谱库。采用水稻叶片作为空白样品添加了上述 3 种植物病菌, 回收实验结果表明 3 种植物病菌均可以用本方法检测。该研究为应用 MALDI-TOF-MS 方法检测水稻细菌奠定了基础。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 水稻病菌; 检测

中图分类号: S435.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)04—0370—05

Identification of Three Rice Pathogens by MALDI-TOF-MS

WANG Wenbin, KUANG Hua, XU Liguang, MA Wei, LIU Liqiang, XU Chuanlai*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: After *Burkholderia glumae* (NCPPB 2391, NCPPB 3591), *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* (NCPPB 1585) and *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (NCPPB2844) were cultured by Columbia agar medium and bacterial colonies were treated with an ethanol-formic acid extraction procedure, the protein fingerprints were obtained and analyzed by MALDI-TOF-MS. Three plant pathogens were accurately identified except that *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* did not exist in the Bio-Typer. With the standard method from Bruker, we established the protein fingerprint of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Bio-Typer. For the rice leaf spiked with these rice pathogens, they could be detected using this method. This study shed light on the detection of rice pathogens by MALDI-TOF-MS.

Keywords: MALDI-TOF-MS, rice pathogen, detection

水稻是全球仅次于小麦的第二大粮食作物,也是中国最重要的粮食作物之一,水稻产量直接关系到中国的粮食安全。真菌、病毒或细菌引起的水稻

病害轻者引起水稻减产,严重时可导致大片稻田颗粒无收^[1]。水稻细菌性褐斑病是由丁香假单胞菌丁香致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)引起

收稿日期: 2014-07-02

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAC01B07)。

作者简介: 王文彬(1990—),男,河南南阳人,食品科学博士研究生,主要从事食品安全检测研究。E-mail: wenbin66@yeah.net

* 通信作者: 胥传来(1965—),男,江苏盐城人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品安全检测研究。E-mail: xcl@jiangnan.edu.cn

的一种细菌性病害,病害在我国主要分布在东北水稻产区^[2]。水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*)是引起水稻条斑病的水稻细菌,最先发现于广东后来蔓延到湖南、江西、浙江、江苏等南方稻区^[3]。水稻细菌性谷枯病菌(*Burkholderia glumae*)是一种可引起苗期水稻秧苗腐烂、穗期水稻谷粒枯死的水稻细菌,主要分布于日本、越南,2007 年已列入我国进境植物检疫性有害生物名录^[4]。

目前水稻细菌性褐斑病还没有国标检测方法,检测方法也未见报道。水稻细菌性条斑病菌和水稻细菌性谷枯病菌目前均有国标检测方法,主要根据病株形态学特征,并采用分离培养、PCR(polymerase chain reaction)方法和 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)方法结合生理生化以及菌株致病性进行鉴定。廖晓兰等建立了快速检测水稻细菌性条斑病菌的实时荧光 PCR 方法,该方法可以区分水稻白叶枯菌与水稻细菌性条斑病菌^[5]。冯雯杰,张华分别建立了可以区分水稻白叶枯菌与水稻细菌性条斑病菌的水稻细菌性条斑病菌的常规 PCR 方法,成本相对较低,适合在种子检疫站进行推广^[6-7]。罗金燕等分别用常规 PCR 和免疫 PCR 检测水稻细菌性谷枯病菌,发现两种方法均可以特异性检测水稻细菌性谷枯病菌,但免疫 PCR 可以检测 10^3 cfu/mL 的菌悬液,灵敏度比常规 PCR 高两个数量级^[8]。莫瑾等设计了两对水稻细菌性谷枯病菌的特异性引物,建立了双重 PCR 检测方法,提高了 PCR 检测的特异性,准确性和检测灵敏度^[9]。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight massspectrometry, MALDI-TOF-MS)技术是一种软电离新型生物质谱,开始被用来鉴定蛋白和多肽的相对分子质量以及鉴定未知蛋白,后来在检测疾病标志物、微生物分类、临床微生物诊断等方面都得到成功的应用^[10-12]。目前 MALDI-TOF-MS 已被广泛报道用于检测鉴定病原微生物,具有快速、重复性好的特点。作者报道了一种用 MALDI-TOF-MS 检测水稻细菌性谷枯病菌、水稻细菌性条斑病菌、水稻细菌性条斑病菌的方法,为应用 MALDI-TOF-MS 检测其它水稻病菌奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 标准菌株:水稻细菌性谷枯病菌(*Burkholderia glumae*, NCPPB 2391),水稻细菌性谷枯病菌(*Burkholderia glumae*, NCPPB 3591),水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*, NCPPB 1585),丁香假单胞菌丁香致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, NCPPB2844),均购于英国 NCPPB 中心。

1.1.2 培养基 哥伦比亚琼脂培养基,购于杭州微生物试剂有限公司。

1.1.3 试剂 无水乙醇:色谱纯,购自百灵威科技有限公司;甲酸(formic acid, FA)、乙腈(acetonitrile, ACN):均为色谱纯,购于 Sigma 公司;基质 α -氰-4-羟基肉桂酸(α -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid, CHCA),校准蛋白干粉(protein calibration standard):购自德国布鲁克公司。水稻叶片、玉米叶片由湖南检验检疫局提供,白菜购于本地超市。

1.1.4 实验仪器 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(ultrafleXtreme MALDI-TOF),德国布鲁克公司。生物安全柜,Thermo scientific。

1.2 方法

1.2.1 植物病菌的培养条件 -80°C 冻存的菌液在哥伦比亚琼脂培养基平板上划线, 28°C 培养 2~3 d,传代 2~3 次。

1.2.2 样品处理与鉴定 参考陈秀金的方法进行 MALDI-TOF-MS 检测。

1.2.3 建立细菌 MALDI-TOF 指纹图谱数据库 按照布鲁克公司标准方法建立。

1.2.4 样品添加回收 水稻叶片用适量灭菌的蒸馏水冲洗 3 次,再用体积分数 70%乙醇浸泡 3 min,随后用适量灭菌的蒸馏水浸泡洗涤,重复 3 次。取适量叶片于一次性平皿中,用一次性接种针将植物病菌接种到平皿中的叶片上。样品处理按照 GB/T 28078—2011—水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌检疫鉴定方法中未显症的可疑组织的方法进行。划线后的平板按照 1.2.1 的方法培养,平板上可疑菌落采集后采用 1.2.2 的方法进行处理和鉴定。

2 结果与讨论

2.1 植物病菌培养条件

哥伦比亚培养基营养丰富,目前用于培养植物病菌的报道比较少。本研究中的几种植物病菌均采用哥伦比亚培养基培养效果不错,2~3 d 可以长出米粒大小的菌落。培养温度,水稻细菌性谷枯病菌最适生长温度是 30~35 ℃。水稻细菌性条斑病菌最适生长温度是 28~30 ℃。丁香假单胞菌丁香致病变种,又称水稻细菌性褐斑病,最适生长温度是 25~30 ℃。因此,作者采用了 28 ℃培养,在该温度下 3 种植物病菌均可较好的生长。

2.2 植物病菌蛋白质指纹图谱的建立

用 TFA 法对培养的 4 株植物病菌进行样品处理并用 MALDI-TOF-MS 分析,其蛋白质指纹图谱如图 1~3 所示。检索 Bio-Typer 数据库后 4 株菌的鉴定结果如表 1 所示。检索 Bio-Typer 数据库后,水稻细菌性谷枯病菌 NCPPB 2391、水稻细菌性谷枯病菌 NCPPB 3591 和水稻细菌性褐斑病菌 NCPPB

2844 均有正确的匹配结果。鉴定结果如表 1 所示。水稻细菌性条斑病菌 NCPPB 1585 在数据库中没有匹配结果,检索后发现数据库中没有该菌的质谱数据库。因此,按照布鲁克公司标准方法建立了水稻细菌性条斑病菌 NCPPB 1585 的数据库。

可信度得分在 2.300 到 3.000 之间的结果可鉴定到种;可信度得分在 2.000 到 2.299 之间的结果确定鉴定到属,很可能是鉴定到种;得分在 1.700 到 1.999 之间的结果很可能可鉴定到属。水稻细菌性谷枯病菌 NCPPB 2391 可信度得分低于水稻细菌性谷枯病菌 NCPPB 3591 但均有正确的匹配结果。Bio-Typer 数据库中没有水稻细菌性条斑病菌,因此作者采用布鲁克公司的标准方法建立了水稻细菌性条斑病菌的数据。水稻细菌性褐斑病菌 NCPPB 2844 又称丁香假单胞菌丁香致病变种鉴定结果为丁香假单胞菌,虽然没有鉴定到丁香致病变种,但在种的水平上是正确的。

2.3 样品添加回收

为研究基质影响和探索基于蛋白质指纹图谱

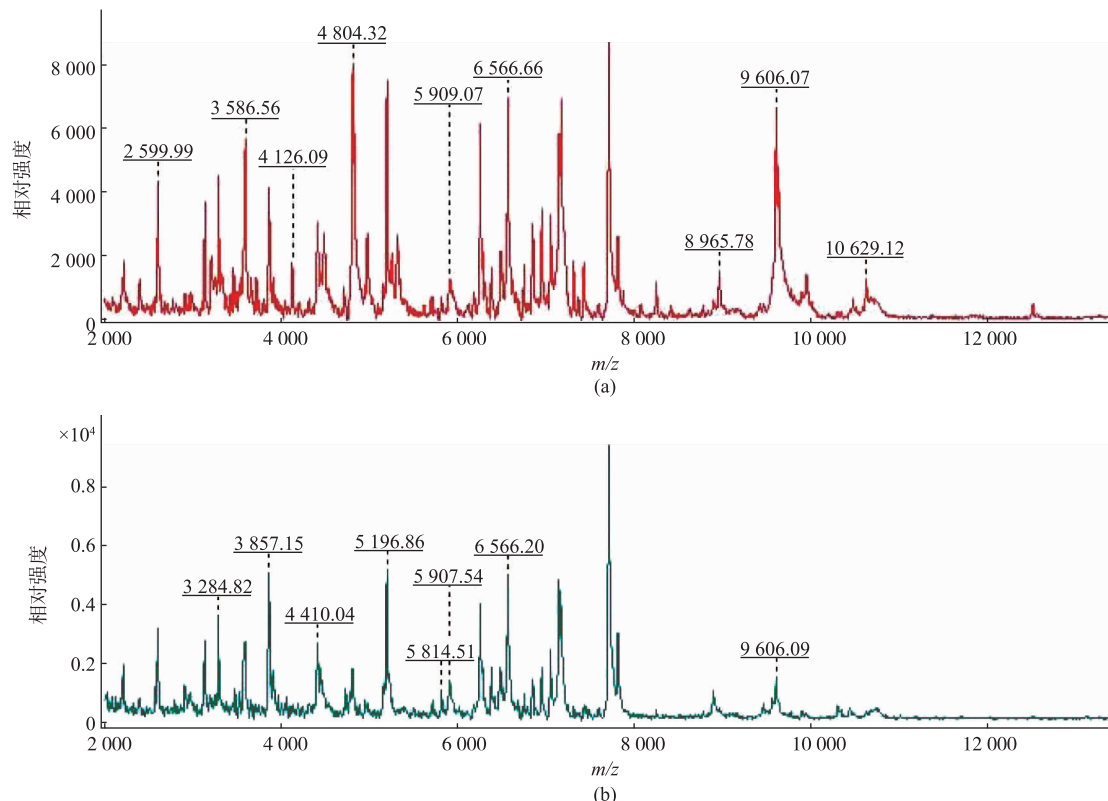


图 1 水稻细菌性谷枯病菌 NCPPB 2391(上),NCPPB 3591(下)的蛋白质指纹图谱

Fig. 1 Protein mass spectrometric profiles of *Burkholderia glumae* NCPPB 2391 (up) and *Burkholderia glumae* NCPPB 3591(down)

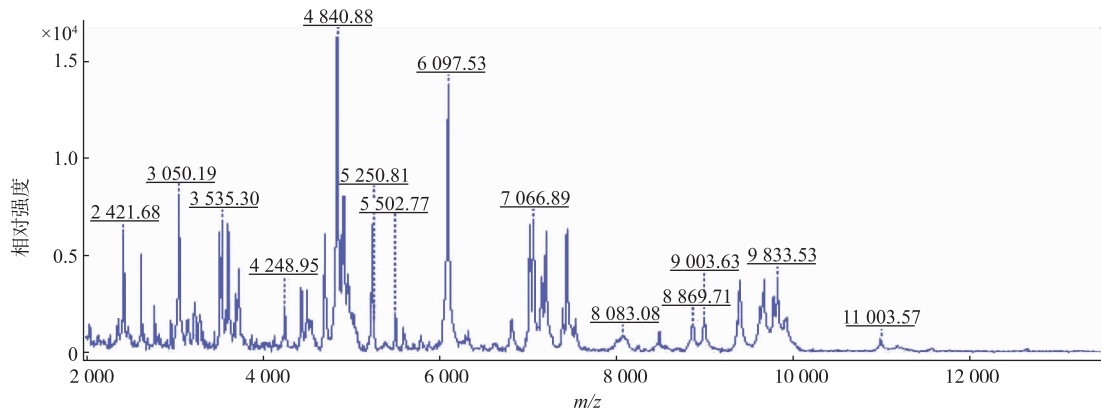


图 2 水稻细菌性条斑病菌 NCPPB 1585 的蛋白质指纹图谱

Fig. 2 Protein mass spectrometric profile of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* NCPPB 1585

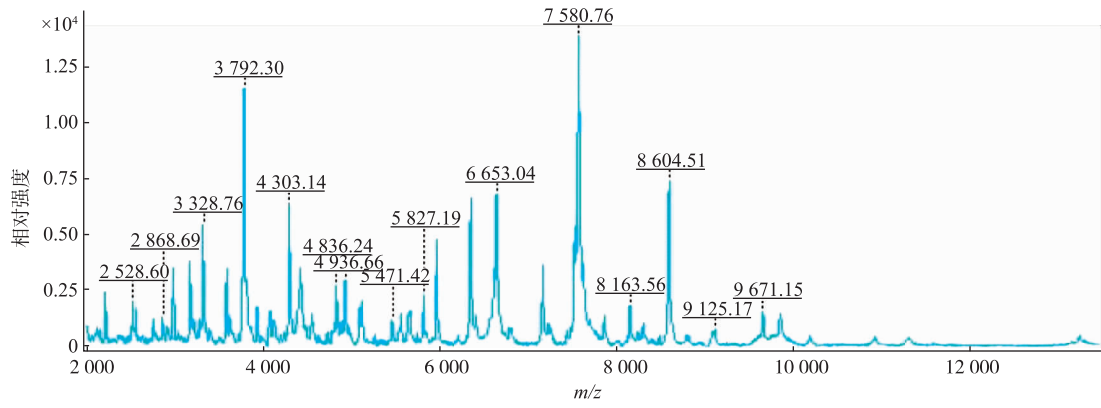


图 3 丁香假单胞菌丁香致病变种 NCPPB2844 的蛋白质指纹图谱

Fig. 3 Protein mass spectrometric profile of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB2844

表 1 纯培养菌株的 MALDI-TOF-MS 指纹图谱在 Bio-Typer 数据库中的匹配结果

Table 1 Matching results of pure cultures by MALDI-TOF-MS in Bio-Typer

样品名称	匹配结果	可信度分数
水稻细菌性谷枯病菌 NCPPB 2391	<i>Burkholderia glumae</i>	1.922
水稻细菌性谷枯病菌 NCPPB 3591	<i>Burkholderia glumae</i>	2.252
水稻细菌性条斑病菌 NCPPB 1585	<i>Xanthomonas oryzae</i>	—
水稻细菌性褐斑病菌 NCPPB 2844	<i>Pseudomonas syringae</i>	1.952

的水稻病菌检测方法,选择用水稻叶片进行了样品添加实验。表 2 是各样品的鉴定结果,由表可知 4 株植物病菌的添加样品均可用该方法正确鉴定。

3 结 语

近年来 MALDI-TOF-MS 技术已经越来越多地

表 2 添加样品中分离株的 MALDI-TOF-MS 指纹图谱在 Bio-Typer 数据库中的匹配结果

Table 2 Matching results of isolated colonies from spiked samples by MALDI-TOF-MS in Bio-Typer

样品名称	匹配结果	可信度分数
水稻细菌性谷枯病菌 NCPPB 2391	<i>Burkholderia glumae</i>	2.378
水稻细菌性谷枯病菌 NCPPB 3591	<i>Burkholderia glumae</i>	2.202
水稻细菌性条斑病菌 NCPPB 1585	<i>Xanthomonas oryzae</i>	2.506
水稻细菌性褐斑病菌 NCPPB 2844	<i>Pseudomonas syringae</i>	1.799

用来检测病原微生物,然而主要集中在沙门氏菌、单增李斯特菌等常见的食源性致病菌或者临床上重要的致病菌,而应用于检测水稻细菌的报道还比较少见。目前检测水稻细菌性条斑病菌、水稻细菌性谷枯病菌主要采用 PCR 扩增细菌特异性片段进行检测,检测灵敏度高、特异性好,但也存在着对操

作人员技术要求高的特点。MALDI-TOF-MS 检测方法基于细菌全细胞蛋白质的指纹图谱,具有操作简单、检测速度快、检测结果稳定的优点,因此相信随着研究的深入,MALDI-TOF-MS 将成为检测水稻实际样品中病原菌的有力工具。

参考文献:

- [1] 刘姮,李雪琴. 水稻细菌性条斑病的研究概述[J]. 湖北植保,2011,5:51-54.
LIU Heng, LI Xueqin. Summary of the research in *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* [J]. **Hubei Plant Protection**, 2011, 5: 51-54. (in Chinese)
- [2] 李俊,代玉梅,纪关正,等. 水稻细菌性褐斑病与叶鞘腐败病对产量的影响[J]. 现代化农业,1998,12:5-6.
LI Jun, DAI Yumei, JI Guanzheng, et al. *Pseudomonas oryzae* Klement and *Acrocyndrium oryzae* Sawada and its influence on the crop yield[J]. **Modernizing Agriculture**, 1998, 12: 5-6. (in Chinese)
- [3] 徐美明,曾刘光,林璧润,等. 广东水稻细菌性条斑病菌致病力分化研究初报[J]. 广东农业科学,1992,6:31-32.
XU Xianming, ZENG Liuguang, LIN Birun, et al. Study on the pathogenicity differentiation of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* in Guang Dong province[J]. **Guangdong Agricultural Sciences**, 1992, 6: 31-32. (in Chinese)
- [4] 罗金燕,徐福寿,王平,等. 水稻细菌性谷枯病原菌的分离鉴定[J]. 中国水稻科学,2008,22(1):82-86.
LUO Jinyan, XU Fushou, WANG Ping, et al. Isolation and identification of the causal organism of bacterial grain rot from rice[J]. **Chinese Journal of Rice Science**, 2008, 22(1): 82-86. (in Chinese)
- [5] 廖晓兰,朱水芳,赵文军,等. 水稻白叶枯病菌和水稻细菌性条斑病菌的实时荧光 PCR 快速检测鉴定 [J]. 微生物学报,2003,43(5):626-634.
LIAO Xiaolan, ZHU Shuifang, ZHAO Wenjun, et al. Detection and identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by real-time fluorescent PCR [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2003, 43 (5): 626-634. (in Chinese)
- [6] 张华,姜英华,胡白石,等. 利用 PCR 技术专化性检测水稻细菌性条斑病菌[J]. 植物病理学报,2008,38(1):1-5.
ZHANG Hua, JIANG Yinghua, HU Baishi, et al. Specific detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by PCR techniques[J]. **Acta Phytopathologica Sinica**, 2008, 38(1): 1-5. (in Chinese)
- [7] 冯雯杰,常清乐,杨龙,等. 水稻白叶枯病菌和细菌性条斑病菌的分子标记筛选及检测 [J]. 植物病理学报,2013,43(6):581-589.
FENG Wenjie, CHANG Qingle, YANG Long, et al. Screening and detection of diagnostic molecular markers to distinguish *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* [J]. **Acta Phytopathologica Sinica**, 2013, 43 (6): 581-589. (in Chinese)
- [8] 罗金燕,陈磊,秦萌,等. 免疫捕捉 PCR 和经典 PCR 方法检测水稻细菌性谷枯病菌灵敏性比较[J]. 浙江农业学报,2014,26(2):371-377.
LUO Jinyan, CHEN Lei, QIN Meng, et al. Sensitivity comparison of the ISE method and classical PCR to detect *Burkholderia glumae*[J]. **Acta Agriculturae Zhejiangensis**, 2014, 26(2): 371-377. (in Chinese)
- [9] 莫瑾,朱金国,彭梓,等. 利用双重 PCR 技术快速检测水稻细菌性谷枯病菌[J]. 植物保护学报,2010,37(3):222-226.
MO Jin, ZHU Jinguo, PENG Zi, et al. A duplex PCR method for rapid detection of *Burkholderia glumae*[J]. **Acta Phytophylacica Sinica**, 2010, 37(3): 222-226. (in Chinese)
- [10] Jackson O. Lay, Jr. MALDI-TOF mass spectrometry of bacterial[J]. **Mass Spectrometry Reviews**, 2001, 20, 172-194.
- [11] Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory[J]. **Clinical Biochemistry**, 2011, 44(1): 104-109.
- [12] Welker M, Moore E R. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology[J]. **Systematic and Applied Microbiology**, 2011, 34(1): 2-11.