

小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑粉菌 检测标准分子构建

李小焦¹ 王中康¹ 章桂明^{2,3*} 陈枝楠^{2,3} 殷幼平¹ 程颖慧^{2,3} 王颖^{2,3} 向才玉^{2,3} 缪建锟⁴

- (1. 重庆大学生物工程学院 重庆市功能基因及调控技术重点实验室 重庆 400030)
- (2. 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心 广东 深圳 518045)
- (3. 深圳市外来有害生物检测技术研发重点实验室 广东 深圳 518045)
- (4. 中国农业大学 北京 100094)

摘要: 以小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑粉菌为研究对象, 采用分子克隆技术, 分别构建了这两种真菌分子检测的标准分子。前者包括线粒体 2297 bp 的 DNA 序列以及 rDNA 710 bp 的 ITS 序列, 后者包括线粒体 2.3 kb 的 DNA 序列以及 rDNA 710 bp 的 ITS 序列。分别对该两个标准分子进行了性能评估试验, 测试结果显示所构建的标准分子具有良好的特异性、均匀性和稳定性, 能够满足小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑粉菌分子检测需求。

关键词: 克隆, 分子检测, 标准分子

Construction of Two Standard Molecules for Detection of *Tilletia indica* Mitra and *Tilletia walkeri* Castl.

LI Xiao-Jiao¹ WANG Zhong-Kang¹ ZHANG Gui-Ming^{2,3*} CHEN Zhi-Nan^{2,3}
YIN You-Ping¹ CHENG Ying-Hui^{2,3} WANG Ying^{2,3} XIANG Cai-Yu^{2,3}
MIU Jian-Kun⁴

- (1. Key Laboratory of Genetic Function and Regulation, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)
- (2. Technical center of APIQ, Shenzhen Entr-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)
- (3. Shenzhen Key Laboratory for Research & Development on Detection Technology of Exotic Pests, Shenzhen 518045, China)
- (4. China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Two standard molecules were constructed by molecular clone technology of *Tilletia indica* Mitra and *Tilletia walkeri* Castl.. The standard molecule for *Tilletia indica* Mitra contained two DNA fragments, one about 2297 bp DNA sequence from mitochondrial DNA, the other ITS sequence 710 bp. The standard molecule for *Tilletia walkeri* Castl. contained two DNA fragments, one about 2.3 kb DNA sequence from mitochondrial DNA, the other ITS sequence 710 bp. In this research, the two standard molecules were detected, the results show good specificity, homogeneity and stability which can satisfy

the need of molecular detection of *Tilletia indica* Mitra and *Tilletia walkeri* Castl..

Keywords: Clone, Molecular detection, Standard molecule

标准参考物质(Standard reference materials, SRM)是计量学中的一个分支,其作用在于对测量方法进行评价或对检测进行质量控制^[1-2]。标准分子是日本科学家 Kuribara 等提出的,用于分子检测的标准参考物质^[3]。自 PCR 技术建立以来,分子生物学检测作为一种快速、灵敏、简便的检测、鉴定方法得以迅速发展,已广泛应用于分子生物学研究的各个领域^[4]。到目前为止,越来越多的分子检测方法已被应用到所制定的检测标准之中^[5-7],但是,与此同时,用于这些分子检测标准相配套的检测结果判定和评价以及质量控制的标准分子,如阳性对照和阴性对照物质研究则明显滞后,这些物质的滞后研发制约了标准的广泛应用。欧洲标准委员会(The European Standards Committee)和国际标准化组织(International Standard Organization)建议,在做核酸扩增实验时务必要有严格的质量控制措施,包括使用阳性对照和阴性对照等质控标准分子。但是,在不同实验室或不同分子检测方法中,由于用作阳性对照的菌株或核酸片段其来源不同或不具有可溯源性,导致检测结果存在较大差异,从而制约了检测结果判定。因此,在分子检测中,标准分子的研制对检测质量控制以及检测结果的规范尤为重要。我国标准分子的研究文献报道主要集中于转基因植物和临床疾病等检测方法,关于植物病原真菌分子检测方法的标准分子研制则尚未见报道^[8-12]。

小麦印度腥黑穗病菌[*Tilletia indica* Mitra, 异名 *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur, 简称TIM]是我国对外检疫性真菌病原,小麦印度腥黑穗病也是对世界小麦生产和贸易具有较大威胁的世界性检疫真菌病害之一。TIM的近似种黑麦草腥黑粉菌(*Tilletia walkeri* Castebury & Carris, 简称TW),寄主为黑麦草,其形态学特征与TIM十分相似,并且常混杂在小麦中,影响TIM的鉴定。美国就曾有一段时间将TW误诊为TIM^[13]。根据章桂明等的研究,该两种真菌形态学差异很小,需要通过大量孢子的综合分析才能得出准确鉴定结果^[14]。但是实际检疫工作中有时较难获得大量孢子或含有大量孢子的菌瘿,使应用形态学鉴定方法十分困难。有鉴于此,国内外学者分别建立了TIM和TW的分子学检测方法,如

Frederick等,根据Ferreira从TIM线粒体DNA中采用EcoR I 酶切获得的一段 2.3 kb片段,设计TIM和TW的特异性检测引物和探针,建立了两种菌的常规PCR和实时荧光PCR检测方法^[15-16]。随后章桂明、程颖慧^[17]、易建平^[18-19]等在此基础上也分别建立了TIM和TW的常规PCR、实时荧光PCR检测方法以及基因芯片检测方法^[14]。在以上研究的基础上,章桂明等制定了小麦印度腥黑穗病菌实时荧光PCR检测方法和黑麦草腥黑粉菌实时荧光PCR检测方法国家标准^[20-21]。鉴于TIM和TW实时荧光PCR检测的标准分子研究尚未见报道,为此本试验对该两种菌的分子检测方法中涉及的检测靶标序列进行了分析,并应用克隆技术构建TIM和TW的标准分子,为该标准以及该两菌其他分子检测方法标准的推广应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

小麦印度腥黑穗病菌来源于印度和巴西,黑麦草腥黑粉菌截获自美国小麦,上述供试菌株均由深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心保存(表1)。pMD19-T Vector、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 及 MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 购于宝生物工程(大连)有限公司; JM109 感受态购于天根生化科技(北京)有限公司; DNA 提取试剂盒购于 QIAGEN 公司; BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 测序试剂盒购于 Biosystems 公司。实验仪器设备由深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心提供。

本实验使用的引物及探针(表2)均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2 标准分子构建

1.2.1 引物设计合成:对线粒体 2.3 kb 序列和 ITS 序列进行酶切位点分析,选择适当的内切酶酶切位点,利用软件 Primer premier 5.0 设计带酶切位点的 PCR 扩增引物。同时,合成文献报道中的 TIM 和 TW 特异性检测引物探针用以对所构建的标准分子进行检测验证(表2)。

表 1 供试小麦印度腥黑穗病菌(TIM)和黑麦草腥黑粉菌(TW)菌株
Table 1 *Tilletia indica* (TIM) and *Tilletia walkeri* (TW) used in this study

编号 No.	原编号 Original No.	菌株名称 Strain names	种名 Species	来源 Sources	采集日期 Acquisition date
1	M8602	小麦印度腥黑穗病菌	<i>Tilletia indica</i>	巴西	1997
2	J1	小麦印度腥黑穗病菌	<i>Tilletia indica</i>	印度	2000
3	JY02	小麦印度腥黑穗病菌	<i>Tilletia indica</i>	印度	2001
4	EP91001*	小麦印度腥黑穗病菌	<i>Tilletia indica</i>	巴西	1997
5	CA01	黑麦草腥黑粉菌	<i>Tilletia walkeri</i>	美国	2000
6	TW01*	黑麦草腥黑粉菌	<i>Tilletia walkeri</i>	美国	2001

注: *: 本实验用于克隆的菌株。

Note: *: Used to clone in this study.

表 2 供试引物及探针
Table 2 Tested probe and primer pairs for detection

编号 No.	序列 Sequence	来源 Sources
M13F/R	5'-CAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3'/5'-TCACACAGGAAACAGCTATGACC-3'	TaKaRa 商品目录
Ti-1/Ti-4	5'-TGGGCTGAGTCTGAGATGC-3'/5'-AGTAATACCTGCGTCTCATAGC-3'	Frederick RD. 2000 ^[15]
ITS4	5'-TAGgtaccTCCTCCGTTATTGATATGC-3'	White TJ. 1990 ^[22]
ITS5	5'-GTtctagaGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	酶切位点自行设计
P12F/R	5'-GTAATAGCCCTGTGCAGAAG-3'/5'-CGGCGAAGAAAGTCGGATTT-3'	章桂明, 章正. 2005 ^[14]
Tin3/Tin4	5'-CAATGTTGGCGTGGCGGCGC-3'/5'-CAACTCCAGTGATGGCTCCG-3'	Frederick RD. 2000 ^[15]
Tin11	5'-TAATGTTGGCGTGGCGGCAT-3'	Frederick RD. 2000 ^[15]
SZFP254-1/2	5'-AGCCATCACTGGAGTTGTCATG-3'/5'-CCCAGCAAGGTCACCTTTGA-3'	章桂明, 章正. 2005 ^[14]
SZFPb255	5'(VIC)-CCGACCGTATCGGTCT-MGB-3'	章桂明, 章正. 2005 ^[14]
MP3-1/2	5'-CTCGAGCCACTCCGTTGG-3'/5'-GACAACTCCAGTGATGGCTCC-3'	章桂明, 章正. 2005 ^[14]
MPb3	5'(FAM)-TACTCTTCATTGCCCTCA-MGB-3'	章桂明, 章正. 2005 ^[14]

1.2.2 PCR 扩增: (1) 线粒体片段扩增 采用表 2 中的引物 Ti-1/Ti-4 对 TIM 和 TW 进行线粒体 2.3 kb 片段扩增^[15]。反应体系体积为 25 μ L: 10 \times PCR buffer [Tris-HCl (pH 8.0) 10 mmol/L, Mg²⁺ 1.5 mmol/L 等] 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 2.5 mmol/L) 2 μ L, 10 mol/L 引物各 0.25 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.3 μ L, DNA 模板 1 μ L (约 10 ng), 灭菌去离子水 18.7 μ L。

反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 7 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 反应结束后切胶回收目的片段, -20 $^{\circ}$ C 保存备用, 切胶回收步骤参照 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒。

(2) ITS 区片段扩增 采用表 2 中的 ITS4 和 ITS5 引物进行 TIM 和 TW 的 ITS 片段扩增。扩增反应体系体积为 25 μ L: 10 \times PCR buffer [Tris-HCl (pH 8.0) 10 mmol/L, Mg²⁺ 1.5 mmol/L 等] 2.5 μ L,

10 mmol/L dNTPs (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 2.5 mmol/L) 2 μ L, 10 μ mol/L 引物各 1 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.3 μ L, DNA 模板 1 μ L (约 10 ng), 灭菌去离子水 17.2 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 7 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。

1.2.3 线粒体片段克隆: 分别将 TIM 和 TW 线粒体 PCR 切胶回收片段与质粒载体 pMD19-T 进行连接, 反应体积 10 μ L, 反应液组成: Ligation Mix 5 μ L, pMD19-T Vector 1 μ L, PCR 回收产物 3.5 μ L, 灭菌去离子水 0.5 μ L。16 $^{\circ}$ C 过夜处理。转化及筛选重组克隆过程见《分子克隆实验指南》^[23]。提取质粒 -20 $^{\circ}$ C 保存备用, 步骤参见 MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0。

1.2.4 标准分子的构建: (1) 酶切处理。分别对 TIM 和 TW 的 ITS 区 PCR 扩增产物、TIM 和 TW 的线粒体克隆质粒进行 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切处理。酶切

反应体系体积 20 μL : 10 \times M buffer 2 μL , 0.1% BSA 2 μL , 10 U/ μL *Kpn* I 和 *Xba* I 各 1 μL , 模板 10 μL , 灭菌去离子水 4 μL 。混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 3 h。酶切后, 切胶回收 TIM 和 TW 的 ITS 扩增片段以及 2 个重组质粒的大片段。

(2) 标准分子构建。将 TIM ITS 片段与 TIM 线粒体克隆质粒连接, TW ITS 片段与 TW 线粒体克隆质粒连接, 连接反应液总体积为 10 μL : Ligation Mix 5 μL , ITS 酶切回收产物 2.5 μL , 重组质粒酶切回收产物 2.5 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。转化及筛选重组克隆过程见《分子克隆实验指南》^[23]。提取质粒保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 标准分子测序验证

对标准分子进行 ITS 区以及线粒体片段测序分析。其中, ITS 区测序采用不带酶切位点的 ITS4 和 ITS5 引物进行。TIM 线粒体片段采用 P12、Tin3/Tin4 以及 Ti-1/Ti-4 3 对引物测序后进行拼接处理, 以获得 2297 bp 的序列; TW 线粒体片段采用 P14、Tin11/Tin4 以及 Ti-1/Ti-4 3 对引物测序后进行拼接处理, 以获得 2.3 kb 的序列。

1.3.1 测序反应体系及条件: 采用 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 测序试剂盒进行双向测序反应, 测序仪为 ABI3100。反应总体积 10 μL , 各成分为: BigDye 1.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游或下游引物 0.3 μL , DNA 模板 2 μL , 加灭菌去离子水 6.2 μL 。

测序反应条件为 98 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 96 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 40 个循环; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 测序 PCR 产物纯化及上机: 测序 PCR 反应结束后, 向测序 PCR 产物中加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 以及 2 倍体积预冷的无水乙醇, 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 min, 14000 r/min 离心 15 min; 弃上清, 加 100 μL 70%乙醇洗涤沉淀 2 次, 14000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 室温放置约 20 min 使残余乙醇挥发; 加 10 μL 甲酰胺, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 迅速转移至冰水混合物中冷却 5 min; 点样上机。

1.4 标准分子性能评价

1.4.1 特异性检测: (1) TIM 标准分子特异性检测: 以 4 个 TIM DNA 为阳性对照, 2 个 TW DNA 及其标准分子为阴性对照, 采用 SZFP254 引物对及 SZFP255 探针^[14]进行实时荧光 PCR 检测。(2) TW 标准分子特异性检测: 以 2 个 TW DNA 为阳性对照, 4

个 TIM DNA 及其标准分子为阴性对照, 采用 MP3 引物对及 MPb3 探针^[14]进行实时荧光 PCR 检测。

1.4.2 均匀性检测: 对 TIM 和 TW 的标准分子进行 10 倍梯度稀释。采用特异性检测使用的引物和探针分别对 TIM 和 TW 标准分子稀释液进行实时荧光 PCR 检测, 建立 TIM 和 TW 的两套标准曲线, 并进行 7 次重复实验, 根据样品扩增效率和相关系数对标准分子的均匀性进行分析。

1.4.3 稳定性检测: 分别对标准分子在室温条件下 (平均室温 25 $^{\circ}\text{C}$) 放置 24 h、48 h、72 h、1 周、2 周、1 个月和 2 个月 7 个时间段后进行实时荧光 PCR 检测, 对获得的 Ct 值进行统计分析, 以此判断标准分子的稳定性。

2 结果

2.1 标准分子测序

采用 DNAMAN 软件将测序结果与网上公布的序列进行比对分析。测序获得 ITS 区片段 710 bp, 其中 TIM 相似性大于 99%, 与多数序列仅有一个碱基差异; TW 与网上多数序列完全相同, 相似性 100%。TIM 测序拼接获得的 2297 bp 线粒体片段, 相似性大于 99%, 仅有 8 个碱基差异; TW 测定的 2.3 kb 片段相似性大于 99%, 有 3 个碱基差异。

2.2 标准分子特异性检测

应用 TIM 特异性检测引物和探针对 TIM DNA 及其标准分子检测, 均有扩增信号, 而对 TW 及其标准分子则无扩增信号; 应用 TW 特异性检测引物和探针对 TW DNA 及其标准分子检测均有扩增信号, 而对 TIM 则没有扩增信号(图 1)。可见, 本研究构建的标准分子具有良好的特异性, 可以替代基因组 DNA 作为阳性标准分子。

2.3 标准分子均匀性检测

由 ABI 7700 实时荧光 PCR 仪自动绘制标准曲线(图 2 和图 3), 计算出标准样品相关系数(r)以及样品扩增效率。检测结果显示, TIM 标准分子稀释液样品相关系数均大于 0.996, 重复实验扩增效率在 0.92–0.96 之间(表 3); TW 检测标准分子稀释液样品相关系数均大于 0.994, 重复实验扩增效率在 0.91–1.01 之间(表 3)。根据定量分析要求, 相关系数需要达到 0.985 以上^[2], 扩增效率在 0.90–1.05 之间, 可见, 构建的标准分子均匀性能满足定量分析要求。

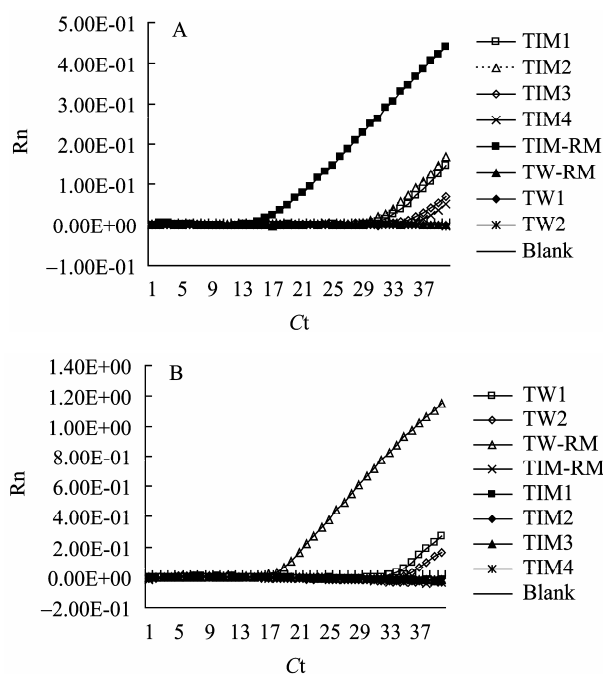


图1 TIM标准分子(A)和TW标准分子(B)特异性检测
Fig. 1 The specificity detection for TIM standard molecule (A) and TW standard molecule (B)

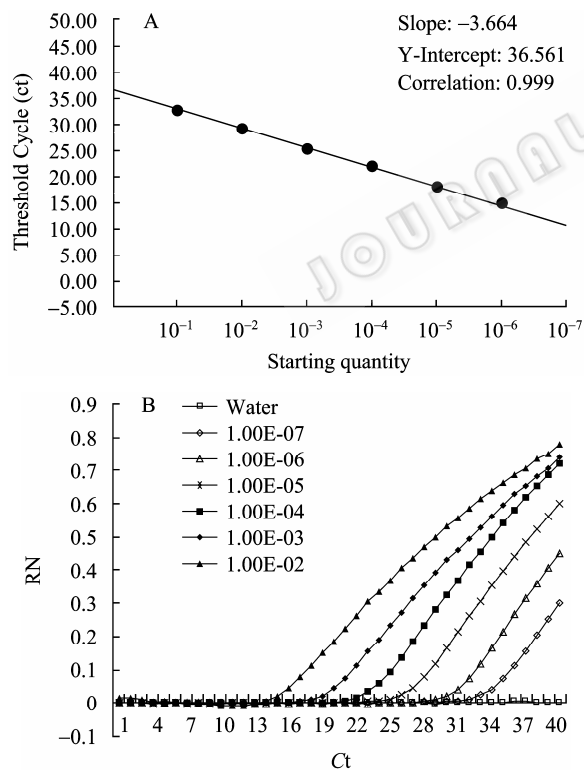


图2 TIM标准分子均匀性检测
Fig. 2 The homogeneity detection for TIM standard molecule

注: 图中所示6个梯度分别为 10^{-2} – 10^{-7} ; A: 标准曲线图; B: 相对应的扩增曲线图。

Note: Ten times continuous dilution of standard molecule from 10^{-2} to 10^{-7} ; A: Standard curve; B: Amplification curve.

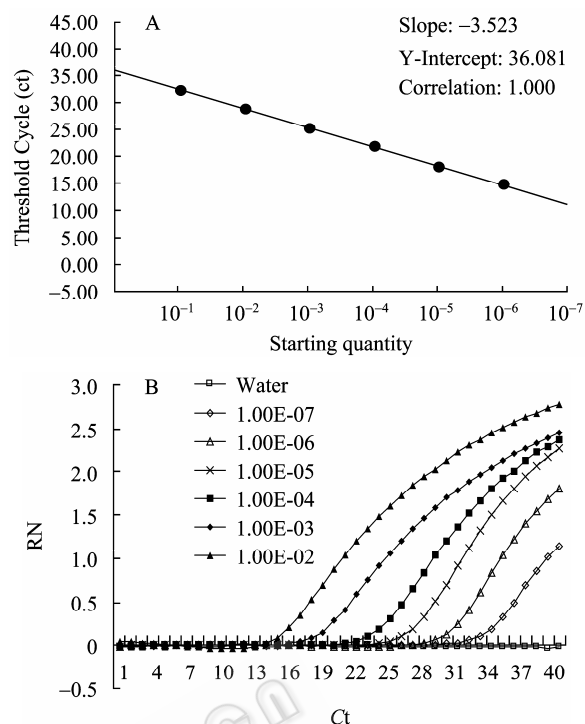


图3 TW标准分子均匀性检测
Fig. 3 The homogeneity detection for TW standard molecule

注: 图中所示6个梯度分别为 10^{-2} – 10^{-7} ; A: 标准曲线图; B: 相对应的扩增曲线图。

Note: Ten times continuous dilution of standard molecule from 10^{-2} to 10^{-7} ; A: Standard curve; B: Amplification curve.

表3 TIM和TW标准曲线相关参数 Table 3 Correlation parameter of standard curve for TIM and TW standard molecule				
检测时间 Detection time	TIM 扩增效率 TIM amplification efficiency	TIM-r	TW 扩增效率 TW amplification efficiency	TW-r
24 hours	0.96	0.996	0.950	0.998
48 hours	0.92	0.997	0.947	1.000
72 hours	0.92	0.999	0.910	0.996
1 week	0.93	1.000	0.910	0.998
2 weeks	0.93	0.999	1.000	0.995
1 month	0.96	0.996	0.920	0.994
2 months	0.94	0.999	1.010	0.999

2.4 标准分子稳定性检测

统计分析标准分子2个月内的实时荧光检测 Ct 值, TIM 检测值的相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)均小于2% (表4); TW 检测值的相对标准偏差均小于5% (表5)。借鉴 Hardegger H 等的文献报道, 相对标准偏差小于35%均可以接受^[24], 可见本试验研究的标准分子在室温下放置2个月其 Ct 值没有显著差异, 具有很好的稳定性。

表4 TIM标准分子不同时间段不同稀释倍数的实时荧光PCR检测Ct及相对标准偏差分析

Table 4 Ct value and RSD of real-time PCR for TIM reference material in different time and different deliquation

检测时间 Detection time	稀释 10 ⁻² 倍 10 ⁻² diluted	稀释 10 ⁻³ 倍 10 ⁻³ diluted	稀释 10 ⁻⁴ 倍 10 ⁻⁴ diluted	稀释 10 ⁻⁵ 倍 10 ⁻⁵ diluted	稀释 10 ⁻⁶ 倍 10 ⁻⁶ diluted	稀释 10 ⁻⁷ 倍 10 ⁻⁷ diluted
24 hours	15.491	18.276	22.032	25.334	28.987	32.441
48 hours	15.082	18.576	22.112	25.410	29.332	32.863
72 hours	15.038	18.661	22.245	25.633	29.231	32.647
1 week	15.534	19.384	22.795	26.360	29.824	32.995
2 weeks	15.492	18.570	22.196	25.631	29.534	32.778
1 month	15.366	18.824	21.494	25.362	29.179	32.398
2 monthes	15.611	18.768	22.363	25.606	29.590	32.738
RSD (%)	1.470	1.820	1.760	1.370	0.970	0.660

表5 TW标准分子不同时间段不同稀释倍数的实时荧光PCR检测Ct及相对标准偏差分析

Table 5 Ct value and RSD of real-time PCR for TW reference material in different time and different deliquation

检测时间 Detection time	稀释 10 ⁻² 倍 10 ⁻² diluted	稀释 10 ⁻³ 倍 10 ⁻³ diluted	稀释 10 ⁻⁴ 倍 10 ⁻⁴ diluted	稀释 10 ⁻⁵ 倍 10 ⁻⁵ diluted	稀释 10 ⁻⁶ 倍 10 ⁻⁶ diluted	稀释 10 ⁻⁷ 倍 10 ⁻⁷ diluted
24 hours	14.835	17.442	21.206	24.521	28.567	31.551
48 hours	15.191	18.264	22.442	25.628	29.030	32.441
72 hours	15.370	18.872	22.850	26.144	29.369	33.373
1 week	15.082	17.831	21.116	24.458	28.499	32.889
2 weeks	14.905	17.333	20.532	23.964	27.782	31.235
1 month	14.680	17.106	20.458	23.997	27.943	32.115
2 monthes	15.302	17.650	20.339	23.504	27.608	31.706
RSD (%)	1.570	3.160	4.340	3.580	2.140	2.200

3 讨论

3.1 克隆技术在标准分子研究中的应用

2002年,日本科学家Kuribara等首先提出标准分子的概念,其定义为含有外源基因片段的重组质粒分子^[3],应用于分子生物学检测的标准物质研究和制备。我国杨立桃等利用重组克隆构建了包括转基因玉米等6种转基因植物的22个转基因分子检测标准分子^[8-9]。随后敖金霞等采用相同的技术将转基因大豆、玉米和水稻的6个检测基因共4.7 kb的外源基因片段克隆到一个载体中^[10],从而构建了3个转基因植物的通用分子质粒标准分子。由于重组质粒克隆纯度高、易操作、稳定性好,且可以通过微生物进行大量培养获得,甚至被一些学者称为“金标准物质”^[2],因此本研究采用克隆技术构建了TIM和TW的分子检测标准分子。

3.2 测序结果比对分析

在比对分析NCBI上公布的13个TIM ITS序列时,发现其ITS并非完全相同,其中AF399890、AF135434、AY560652、AF399889、AF310178、

AF310174和AF310175等7个序列与其它序列在不同位点均有1个碱基差异,而AF399888和AY390350与其它序列有2个碱基差异,可见本研究测定的TIM ITS序列和网上公布的13个ITS序列存在一个碱基位点的差异是可以接受的。本研究测定的线粒体2.3 kb序列与网上公布的序列相比,TIM有8个碱基差异,TW有3个碱基差异。根据周业琴、易建平等^[25]的研究以及Taylor等^[26]对线粒体的报道认为,线粒体进化速度较快,同种菌株在不同地理环境表现出一定的差异,因此可以解释本研究测序结果与NCBI公布的序列间的差异。尽管如此,区分TIM和TW的60多个特异位点与网上公布的序列却是相同的,即本研究测定序列的差异不会影响TIM或TW的特异性检测,这与本研究进行的标准分子特异性检测实验结果相符。

3.3 标准分子

本研究首次对TIM和TW核酸检测分子标准分子进行研究,对实际检验检疫工作具有一定的价值。根据ISO Guide-30^[3]要求,标准分子或标准样品要具有相关证书并获得标准化管理机构批准。为

此本研究下一步拟做该方面工作。

参 考 文 献

- [1] 侯传喜. 标准参考物质. 自然杂志, 1980, **3**(1): 42-45.
- [2] 张海波. 适合转基因大豆 GTS 40-3-2 复合 PCR 检测标准分子研制及番茄内标准基因国际协同验证. 上海交通大学硕士学位论文, 2008.
- [3] Matsuoka T, Kuribara H, Takubo K, *et al.* Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002(50): 2100-2109.
- [4] 苗玉发, 潘东升, 刘芳, 等. 实时定量 PCR 的应用进展及常见问题对策. 医学研究杂志, 2009, **40**(8): 91-94.
- [5] 叶子弘, 赵煦泓, 邹克琴, 等. 生物标准物质研究简析. 中国计量, 2009, **39**(4): 68-70.
- [6] 汪斌, 卢晓华, 孟凡敏. 2001 年以来我国标准物质发展状况概述. 江苏现代计量, 2009, **21**(5): 36-38.
- [7] 丁丽霞, 周海钧. 生物标准物质的研究和技术要求(上). 中国药师, **14**(3): 33-36.
- [8] Yang LT, Pan AH, Zhang HB, *et al.* Event specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction analysis for genetically modified canola T45. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2006(54): 9735-9740.
- [9] Yang LT, Guo JC, Pan AH, *et al.* Event-specific quantitative detection of nine genetically modified mazes using one novel standard reference molecule. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2007(55): 15-24.
- [10] 敖金霞, 高学军, 曲波, 等. 转基因大豆、玉米和水稻外源基因检测通用标准分子的构建. 中国农业大学学报, 2008, **13**(6): 19-24.
- [11] 周净, 王云龙, 李智涛, 等. JEV-DNA 实时荧光定量标准品的构建. 生物技术通报, 2007, **10**(4): 604-605.
- [12] 陈雯, 张芹, 黄一红, 等. B 细胞激活因子受体-BCMA 基因表达水平定量标准品的构建. 医学检验与临床, 2007, **18**(2): 10-12.
- [13] 田利华, 易建平, 周国梁, 等. 进境美国小麦中黑麦草腥黑穗病菌的检测和鉴定. 植物检疫, 2006, **20**(ZK): 27-30.
- [14] 章桂明, 章正. 植物病原真菌检测平台方法的建立——小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑粉菌检测方法体系的研究. 北京: 中国农业出版社, 2005: 60-102.
- [15] Frederick RD, Snyder KE, Tooley PW, *et al.* Identification and differentiation of *Tilletia indica* and *T. walkeri* using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 2000(90): 951-960.
- [16] Ferreira MASV, Tooley PW, Hatziloukas E, *et al.* Isolation of species-specific mitochondrial DNA sequences for identification of *Tilletia indica*, the karnal bunt of wheat fungus. *Appl Environ Microbiol*, 1996(62): 87-93.
- [17] 章桂明, 程颖慧, 王颖, 等. 应用 TaqMan MGB 探针检测小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑穗病菌. 植物病理学报, 2006, **36**(2): 142-151.
- [18] 易建平, 陶庭典, 印丽萍, 等. 小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑穗病菌的单孢检测. 南京农业大学学报, 2003, **26**(2): 42-46.
- [19] 易建平, 沈禹飞. PCR 技术在印度腥黑穗病菌检测和鉴定中的应用. 上海农业学报, 2002, **18**(2): 57-61.
- [20] 章桂明, 程颖慧, 王颖, 等. 小麦印度腥黑穗病菌检疫鉴定方法. 国家标准, 20071035-T-469, 2008.
- [21] 章桂明, 程颖慧, 王颖, 等. 黑麦草腥黑粉菌检疫鉴定方法. 国家标准, 20071014-T-469, 2008.
- [22] White TJ, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics//Innis MA, Gelfand DH, Sninski JJ, *et al.* eds. PCR protocols. Inc San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [23] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 96-99.
- [24] Hardegger M, Brodmann P, Herrmann A. Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *Eur Food Res Technol*, 1999(209): 83-87.
- [25] 周亚琴, 易建平, 周国梁, 等. 小麦印度腥黑粉菌线粒体 DNA 提取及其 ATP6 基因在真菌遗传发育分析中的应用. 微生物学报, 2007, **45**(5): 817-822.
- [26] Taylor JW, Smolich BD, May G. Evolution and mitochondrial DNA in *Neurospora Crassa*. *Evolution*, 1986, **40**(4): 716-739.