中国油料作物学报
Chinese Journal of Oil Crop Sciences
2026,48(4):72-80
doi:10.19802/j.issn.1007-9084.2025172

基于RPA-CRISPR/Cas12a的亚麻褐斑病菌可视化检测方法的建立

高晓珂[1,2],蒋刚强[2],李鑫[3],古扎丽阿依·牙生[2],田沁怡[1,2],董经晗[1,2],王翀[2*],孙燕飞[4*],曹文泽[5],冉静[6],罗明[1]
(1.新疆农业大学农学院,新疆 乌鲁木齐,830052;
2.乌鲁木齐海关技术中心,新疆 乌鲁木齐,830013;
3.大连海关技术中心,辽宁 大连,116000;
4.石河子大学生命科学学院,新疆 石河子,832000;
5.广州海关技术中心,广东 广州,510000;
6.四川国际旅行卫生保健中心(成都海关口岸门诊部),四川 成都,610041)

摘要:亚麻褐斑病菌(*Mycosphaerella linicola* Naumov)是一种重要的检疫性病原菌,可危害亚麻整个生育期。我国每年从国外进口超10万吨亚麻籽,该病害传播扩散的风险激增,原有传统分离鉴定方法由于周期长、操作繁琐难以满足口岸快速通关需求。本研究基于RPA-CRISPR/Cas12a技术针对亚麻褐斑病菌*M. linicola*的β-微管蛋白基因Beta-Tubulin Gene(*TUB2*)序列设计RPA特异性引物和3条crRNA,筛选切割效率最佳的1条crRNA进行后续检测体系优化实验,优化实验结果表明:RPA反应适宜时间为20 min;适宜荧光报告分子浓度为50 nmol/L;适宜试纸条报告分子浓度为200 nmol/L。采用建立的检测方法对模拟带菌种子进行检测和验证,实验结果表明该体系可在种子带菌率为5%的样本中检测到100个*M. linicola*分生孢子。该方法可在80 min内完成检测,灵敏度达34 ag/μL,整个检测过程操作简便,灵敏度高,耗时短,为亚麻褐斑病菌的实时快速检测提供了技术支持。

关键词:亚麻褐斑病菌;CRISPR-Cas12a;快速检测
中图分类号:S41-31　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1007-9084(2026)04-0072-09

Establishment of a visual detection method for *Mycosphaerella linicola* based on RPA-CRISPR/Cas12a

GAO Xiao-ke[1,2], JIANG Gang-qiang[2], LI Xin[3], YASHENG Guzhaliayi[2], TIAN Qin-yi[1,2], DONG Jing-han[1,2], WANG Chong[2*], SUN Yan-fei[4*], CAO Wen-ze[5], RAN Jing[6], LUO Ming[1]
(1. *College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi* 830052, *China*;
2. *Urumqi Customs Technical Center, Urumqi* 830013, *China*;
3. *Dalian Customs Technology Center, Dalian* 116000, *China;*
4. *College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi* 832000, *China*;
5. *Guangzhou Customs Technology Center, Guangzhou* 510000,*China;*
6. *Sichuan International Travel Healthcare Center (Port Clinic of Chengdu Customs), Chengdu* 610041, *China*)

Abstract: *Mycosphaerella linicola* Naumov is an important quarantine pathogen that can damage the whole growth period of flax. China imports more than 100 000 tons of flax seeds from abroad every year.The risk of transmission and diffusion of this disease is increasing.The original traditional separation and identification methods are difficult to meet the needs of rapid customs clearance due to their long cycle and complicated operation.Based on RPA-CRISPR/Cas12a technology, this study designed specific primers and three crRNAs for the β-tubulin gene (*TUB2*) sequence of brown spot disease of flax, and selected the one with the best cutting efficiency for subsequent

收稿日期:2025-08-06
基金项目:海关总署科研项目(2023HK017);新疆维吾尔自治区自然科学基金(2023D01A67)
作者简介:高晓珂(2001-),女,硕士研究生,主要从事植物病原菌检测研究,E-mail: 3488804187@qq.com
* 通讯作者:王翀(1979-),女,正高级农艺师,主要从事植物病原菌检测研究,E-mail: wchgq@126.com; 孙燕飞(1976-),女,教授,主要从事微生物学研究,E-mail: 81711308@qq.com

detection system optimization experiments. The optimized experimental results showed that the suitable reaction time of RPA is 20 minutes.The appropriate concentration of fluorescence reporter molecules was 50 nmol/L, and the appropriate concentration of test strip report moleculars was 200 nmol/L.The established detection method was used to detect and verify the simulated fungal seed.The results showed that the system could detect 100 conidia in samples with 5% fungal seed band rate.This method can complete the detection in 80 minutes, and the sensitivity can reach 34 ag/μL. The whole detection process is simple to operate, highly sensitive and short in time, which provides technical support for the real-time rapid detection of *Mycosphaerella linicola*.

Key words: *Mycosphaerella linicola*; CRISPR-Cas12a; rapid detection

亚麻(*Linum usitatissimum* L.)是亚麻科(Linaceae)亚麻属(*Linum* L.)的一年生或多年生草本植物[1],广泛分布于世界上五大洲(亚、非、欧、美、大洋洲)的40多个国家,其中以亚洲和欧洲栽培面积最大[2]。亚麻籽因其富含Ω-3脂肪酸,被定位为高端健康油,2022年国内亚麻籽年产量仅约40万吨,而消费需求超80万吨,自给率不足50%,造成严重供需缺口,国产原料无法满足[3]。每年我国都要从国外进口大量亚麻籽,据海关数据统计,2024年中国共进口69.3万吨亚麻籽。随着我国进口量的不断增长,外来检疫性病害传入我国风险极大。亚麻褐斑病是亚麻上的一种重要检疫性病害,可在亚麻全期及全株发生危害,发病植株易倒伏,叶片枯黄、早落,茎部出现褐色条斑,表皮破裂,蒴果发育不良,不仅降低种子及原茎的产量和质量,也影响其副产品纺织加工,给亚麻生产带来重大损失[4]。

亚麻褐斑病菌学名(*Mycosphaerella linicola* Naumov),异名亚麻派斯莫病菌(*Septoria linicola* Speg)有性态为*Mycosphaerella linorum* (Wr.)Gbncia -Raba(亚麻球腔菌),属子囊菌亚门真菌。其无性态为*Septoria linicola* Gar(亚麻生壳针孢),属半知菌亚门真菌[1]。亚麻褐斑病呈全球性分布,现有文献表明,该病害最早于1911年在阿根廷被记录,随后通过国际贸易传播至其他大陆。苏联于1930年因引进非洲油用亚麻种子而首次发现该病,并于1934年将其列为重点检疫性病害[5]。

目前国内外对于亚麻褐斑病菌的研究主要集中在病原菌形态鉴定[6,7]、抗病种质资源筛选[8]、防治药剂的筛选[9]和基于基因组的研究[10-12]等方面,而针对检测方法的研究十分有限,尚未建立成熟的分子检测技术。为适应口岸快速通关的实际需求,亟需建立一种快速、灵敏的检测方法。

重组酶聚合酶扩增技术(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)是一种基于酶促反应的恒温核酸扩增技术,其核心原理是通过三种关键蛋白的协同作用,在常温(37-42°C)下实现目标DNA序列的高效扩增[13,14]。

CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated enzyme systems)被称为成簇规律间隔短回文重复序列及CRISPR相关蛋白系统(Cas蛋白)[15]。当Cas12a-crRNA复合物识别并结合靶DNA后,其非特异性反式切割活性(trans-cleavage activity)被激活。CRISPR体系中加入预先设计的一端标记为FAM、另一端标记为Biotin的单链DNA探针,探针被Cas蛋白切割,释放标记物。标记物在层析作用下沿试纸条迁移,先后与检测线(T线)和质控线(C线)处包被的特异性抗体结合,形成肉眼可见的彩色条带。通过判读T线显色情况(出现/不出现),即可实现目标核酸的定性检测[16]。Cas12a的温度与RPA反应时间相近,将两种技术相结合,可进一步提升核酸扩增效率,对病原物进行快速检测。

目前,RPA/CRISPR-Cas12a技术已成为病原体检测领域的重要技术,并在多种动植物病原检测中得到广泛应用。卫艳珂等[17]基于*F. pseudograminearum*的*NPS15*基因,建立了重组酶聚合酶等温扩增技术(RPA)结合CRISPR/Cas12a的快速检测体系;董铮等[18]根据ToMV编码的外壳蛋白的基因保守序列,通过优化反应体系建立了番茄花叶病毒(tomato mosaic virus, ToMV)的快速可视化检测方法;王皓璐[19]利用RPA/CRISPR-Cas12a技术,建立了适用于海产品中异尖线虫等温、灵敏、快速的可视化核酸检测方法。RPA-CRISPR/Cas12a技术兼具快速、灵敏、特异、便携等优势,特别适用于现场检测、基层医疗和应急诊断,使之成为公认的新一代核酸快速检测技术。

本研究基于RPA-CRISPR/Cas12a系统,综合荧光PCR仪与可视化核酸试纸条,设计特异性RPA引物及crRNA,通过筛选crRNA、优化RPA反应时间及报告分子浓度,建立了亚麻褐斑病的快速可视化检

测方法,为口岸检验监管和病害田间早期监测预警提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 本实验所用菌株共10株,具体见表1。其中向日葵茎溃疡病菌ATCC62680购自于美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC),向日葵黑茎病菌CF-6和油菜茎基溃疡病菌781-1分别来自天津海关和上海海关,其他对照菌株均为本实验室自主采样分离菌株,且已完成形态学及分子生物学鉴定。

1.1.2 实验试剂与仪器 本实验所用主要试剂与仪器,具体见表2。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 将目标菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,25℃恒温培养15天。采用DNA提取试剂盒提取DNA后,使用分光光度计测定DNA浓度及纯度,确保后续实验的可靠性。测定DNA浓度为3.4 ng/μL。

1.2.2 特异性RPA引物及crRNA设计 从NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中下载*M. linicola*及其近似种的基因序列,用MEGA.11进行多序列比对,选择特异性大的β-微管蛋白基因Beta-Tubulin Gene (*TUB2*)基因序列(GenBank: MZ073925.1)设计RPA引物(YM-RPA-F/YM-RPA-R),再结合CRISPR-Cas识别位点PAM(TTTV,V=G,C or A),设计了三条YM-crRNA。具体序列见表3。

1.2.3 RPA-CRISPR/Cas12a检测体系的建立 参考DNA恒温快速扩增试剂盒说明,反应体系共50 μL。将29.4 μL A buffer、2 μL YM-RPA-F(10 μmol/L)、2 μL YM-RPA-R(10 μmol/L)、5 μL DNA模板及9.1 μL RNase-free ddH_2O加入含冻干酶粉的反应管中,再加入2.5 μL B buffer。充分混匀后于水浴锅38℃水浴20 min。反应结束后,加入50 μL Tris饱和酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)DNA抽提液,漩涡混合器涡旋混匀30 S,离心机12000 r/min离心5 min后,取30 μL上清液作为RPA扩增产物。

CRISPR-Cas12a荧光检测体系:将RNase-free ddH_2O 12.5 μL, NE Buffer 2 μL, LbaCas12a 1 μL(5 μmol/L),0.5 μL RNAse Inhibitor(40 U/μL),荧光报告分子ssDNA-FQ 1 μL(1μmol/L),crRNA 1 μL(1 μmol/L),2 μL RPA扩增产物配置混合至总体积20 μL,放入荧光PCR仪,38℃,30 S收集一次荧光信号,共120个循环,测量荧光强度。

表1 供试菌株的病原名称、寄主和来源地

Table 1 The name of the tested strains of the pathogen, host and source

菌株编号 Strain code	病原菌 Pathogen	寄主 Host	来源 Source
PM1	亚麻褐斑病菌 *Mycosphaerella linicola*	亚麻 Linen	黑龙江省农科院经济作物所 Economic Crops Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Science
YMKW	亚麻枯萎病菌 *Fusarium linicola*	亚麻 Linen	新疆特克斯 Tekes, Xinjiang
M5	亚麻灰霉病菌 *Botrytis cinerea*	亚麻 Linen	新疆特克斯 Tekes, Xinjiang
M9	亚麻炭疽病菌 *Colletotrichum lini*	亚麻 Linen	新疆特克斯 Tekes, Xinjiang
M13	亚麻立枯病菌 *Rhizoctonia solani*	亚麻 Linen	新疆特克斯 Tekes, Xinjiang
M1	链格孢 *Alternaria conjuncta*	亚麻 Linen	新疆特克斯 Tekes, Xinjiang
X6	向日葵菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*	向日葵 Sunflower	新疆昭苏 Zhaosu, Xinjiang
CF-6	向日葵黑茎病菌 *Plenodomus lindquistii*	向日葵 Sunflower	天津海关 Tianjin Customs
ATCC62680	向日葵茎溃疡病菌 *Diaporthe helianthi*	向日葵 Sunflower	ATCC American Type Culture Collection
718-1	油菜茎基溃疡病菌 *Leptosphaeria maculans*	油菜 Rapeseed	上海海关 Shanghai Customs

表 2 实验试剂与仪器

Table 2 Experimental reagents and instruments

试剂/仪器 Reagents/Instruments	来源 Source
DNAsecure 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
DNAsecure New Plant Genome DNA Extraction Kit	Tiangen Biochemical Technology(Beijing) Co.,Ltd.
RNA 酶抑制剂	天根生化科技(北京)有限公司
RNAase Inhibitor	Tiangen Biochemical Technology(Beijing) Co.,Ltd.
DNA 恒温快速扩增试剂盒	安普未来(常州)生物科技有限公司
DNA Isothermal Rapid Amplification Kit	Ampu Future Biochemical (Shanghai) Co.,Ltd.
Tiosbio®Cas12/13 专用核酸检测试纸条	北京宝盈同汇生物科技有限公司
Tiosbio®Cas12/13 Special Nucleic Acid Test Strip	Beijing Baoying Tonghui Biochemical Technology Co.,Ltd.
Tiosbio ®Cas12a 核酸酶	北京宝盈同汇生物科技有限公司
Tiosbio ®Cas12a Nuclease	Beijing Baoying Tonghui Biochemical Technology Co.,Ltd.
去离子水	生工生物工程(上海)股份有限公司
RNase-free ddH2O	Sangon Biotech(Shanghai) Co.,Ltd.
QuantStudio TM 7 实时荧光 PCR 仪	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
QuantStudio TM 7 Felx Real-Time PCR	Thermo Fisher Scientific(China) Co.,Ltd.
NanoDrop ND-1000 分光光度计	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific(China) Co.,Ltd.
Fresco21 高速冷冻离心机	赛默飞世尔科技(苏州)仪器有限公司
Fresco21 High Speed Freezing Centrifuge	Thermo Fisher ScientificInstrument(Suzhou) Co.,Ltd.
XH-C 漩涡混合器	江苏金怡仪器科技有限公司
XH-C Vortex Mixer	Jiangsu Jinyi Instrument Technology Co., Ltd.
ThermoMixer 水浴恒温振荡器	艾本德生物科技国际贸易有限公司
Water Bath Thermostatic Shaker	Eppendorf Biochemical Technology International Trade Co., Ltd

表 3 RPA 引物、crRNA 及单链报告分子序列

Table 3 RPA primers, crRNA and probe sequences in this study

名称 Primer	序列 Sequences(5'-3')
YM-RPA-F	ATCACAGAAACGAGGTCGAGAGCGCGGAAA
YM-RPA-R	GTACCGCCCGAAAGCGCAACAGGCAGGTGC
YM-crRNA1	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGUUGCCCUUGGUUAUGUCAAUUU
YM-crRNA2	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUAGGACACUACUGACCUGGAGCAG
YM-crRNA3	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCGCGCUCUCGACCUCGUUUCUGU
ssDNA-FQ	FAM-/CCACCC/-BHQ1
ssDNA-FB	FAM-/TTTTTTTTTT/-Biotin

CRISPR-Cas12a 试纸条检测体系:将 RNase-free ddH_2O 12.5 μL,NE Buffer 2 μL,LbaCas12a 1 μL(5 μmol/L),0.5 μL RNAse Inhibitor(40 U/μL),荧光报告分子 ssDNA-FB 1 μL(1 μmol/L),crRNA 1 μL(1 μmol/L),2 μL RPA 扩增产物配置混合至总体积 20 μL,于水浴锅中 38℃恒温反应 20 min。反应结束后,取 5 μL 反应液用去离子水稀释 10 倍后插入试纸条,观察试纸条检测线(T 线)是否出现红色条带对结果进行判读。

1.2.4 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系的优化 为优化 RPA 扩增时间,设置 10 min、20 min、30 min 及 40 min 四个时间梯度,同时设立无菌水为空白对照。将不同时间的 RPA 扩增产物通过 CRISPR/Cas12a 实时荧光检测与侧向流试纸条双重检测,评估不同反应时间下的检测效能,确定最优反应时间,试验设置 3 个重复。

在 CRISPR-Cas12a 反应中,将设计的 3 条 crRNA 进行 CRISPR-Cas12a 荧光法检测,观察 3 条 crRNA 在反应中的切割效率,选择最优的一条 crRNA 进行后续实验。

在 CRISPR-Cas12a 荧光反应体系与试纸条反应体系中,为确定最佳报告分子浓度,采用 2 倍梯度稀释,设置 5 个梯度水平(50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L、800 nmol/L),以无菌水为空白对照,将稀释后的不同浓度报告分子进行 CRISPR-Cas12a 荧光法和试纸条法反应,分别检测其荧

光强度与检测线的强度变化。

1.2.5 灵敏度检测 将原浓度3.4 ng/μL的亚麻褐斑病菌DNA进行10倍梯度稀释为340 pg/μL、34 pg/μL、3.4 pg/μL、340 fg/μL、34 fg/μL、3.4 fg/μL、340 ag/μL、34 ag/μL、3.4 ag/μL,每个样品设置3个重复,采用优化后的荧光法及试纸条检测体系进行RPA-CRISPR/Cas12a联合扩增与检测,以确定该方法的检测限度。

1.2.6 特异性验证 以表1供试菌株核酸为DNA模板,以无菌水为空白对照,采用优化后的RPA-CRISPR/Cas12a荧光法与试纸条法进行检测。每个样品设置3个重复,检测其是否具有特异性。

1.2.7 模拟样品检测 为评估RPA-CRISPR/Cas12a检测体系对染病种子的检测效能,制备*M. linicola*分生孢子悬浮液,用血球计数板计算孢子悬浮液浓度,计算10 μL体积下的孢子悬浮液中分生孢子的个数,将其稀释成相应浓度后滴在无菌亚麻籽上,确保每粒亚麻籽上附着10 000、1000、100、10、和1个*M. linicola*分生孢子。将分生孢子接种的种子在室温条件下干燥48 h后,取1粒带菌种子与19粒无菌种子混合研磨,提取混合样本总DNA作为检测模板。基于前期优化的反应条件,对样品进行检测,每个样品设置3个重复,同时设置无菌种子阴性对照,确保检测结果的可靠性。

2 结果与分析

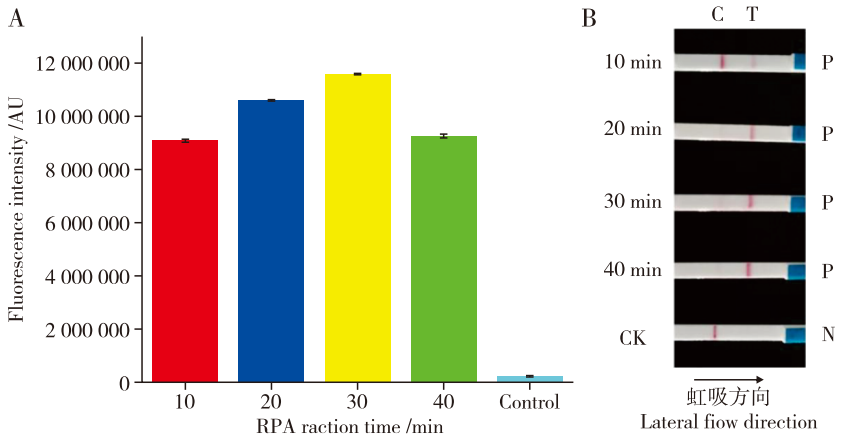
2.1 RPA-CRISPR/Cas12a检测体系的优化

2.1.1 RPA反应时间的优化 比较不同RPA反应时间条件下,CRISPR-Cas12a荧光检测与试纸条检测结果。图1结果表明,在RPA-CRISPR/Cas12a荧光检测体系中,荧光信号均明显高于对照,且四个反应时间荧光值相差不大;在RPA-CRISPR/Cas12a试纸条检测体系中,10 min时可见模糊红色条带,其他时间均可见清晰红色条带,为阳性结果。出于实验时间成本,故选择20 min为最佳RPA反应时间。

2.1.2 crRNA的筛选 比较三条crRNA在荧光检测体系中的切割效率,选取荧光信号强且切割效率高的一条crRNA进行后续实验。图2结果表明,三条crRNA均在体系中进行反应,荧光信号高于对照组,其中crRNA2荧光强度最高。故选择crRNA2进行后续实验。

2.1.3 荧光报告分子浓度的优化 CRISPR-Cas12a荧光检测体系中,设置不同荧光报告分子浓度进行优化。图3结果表明,随着荧光报告分子浓度增长,其荧光强度也随之加强。五个报告分子浓度荧光信号值明显高于空白对照。出于经济成本考量,选择50 nmol/L作为最终工作浓度。

2.1.4 试纸条报告分子浓度的优化 CRISPR-Cas12 a试纸条检测体系中,对试纸条报告分子浓度进行优化。图4A结果表明,当试纸条报告分子浓度为50 nmol/L时,检测线为模糊红色条带,其他4个报告分子浓度都可见检测线为清晰红色条带。B图中,当报告分子浓度为50 nmol/L和100 nmol/L,对照检测线可见模糊红色条带,呈阳性结果,其他3个报告分子浓度对照呈现阴性结果,表明试纸条报告分子浓度过低会出现假阳性,故选择200 nmol/L为最佳试纸条报告分子浓度。



注:A:荧光法RPA反应时间优化检测结果;B:试纸条法RPA反应时间优化检测结果;P:阳性结果;N:阴性结果;T:检测线;C:质控线;下同

Note: A: Optimization results of RPA reaction time by fluorescence method; B: The test results of RPA reaction time optimization by test strip method; P: Positive result; N: Negative result; T: Detection line; C: Quality control line. the below is same

图1 RPA反应时间的优化

Fig. 1 Optimization of RPA response time

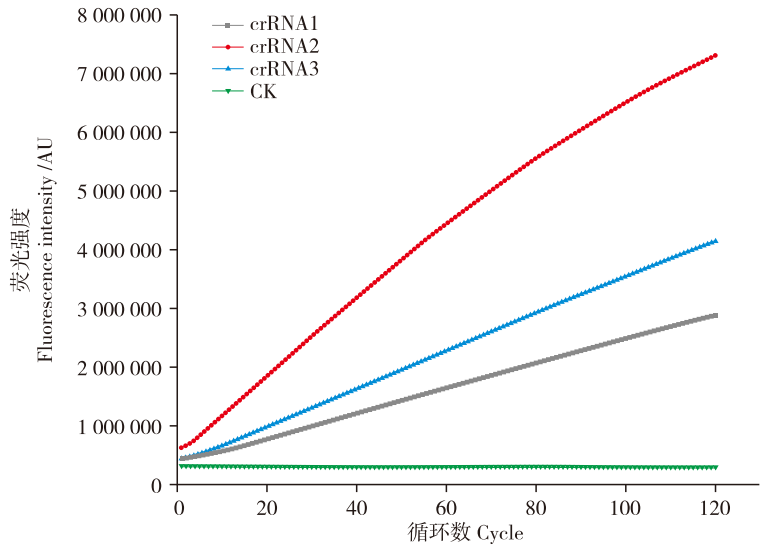


图2 不同crRNA在CRISPR体系中反应效果比较

Fig. 2 Comparison of the reaction effects of different crRNAs in CRISPR system

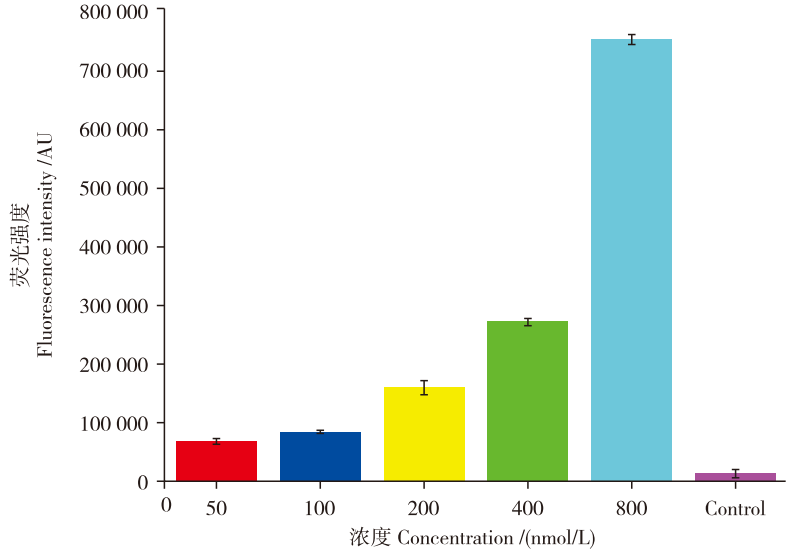
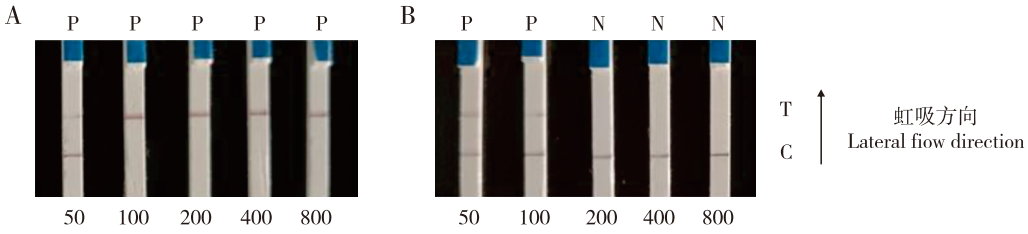


图3 荧光报告分子浓度的优化

Fig. 3 Optimisation of reporter molecule concentration in fluorescence assay



注:A:不同试纸条报告分子浓度对CRISPR/Cas12a试纸条检测的影响;B:不同试纸条报告分子浓度的空白对照

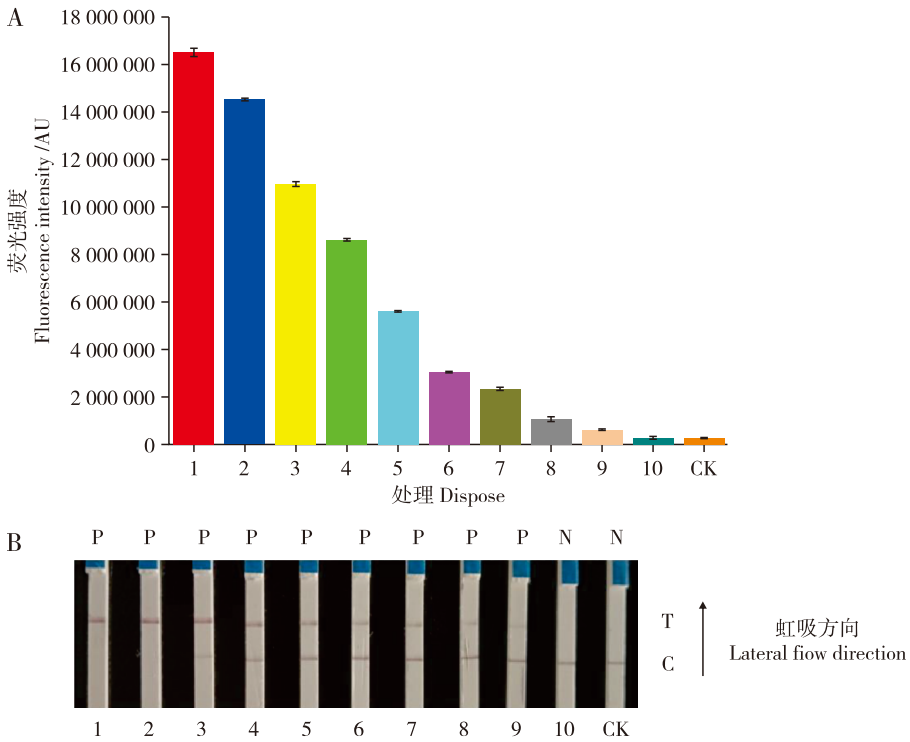
Note: A: Effect of different test strip reporter molecular concentrations on CRISPR/Cas12a strip detection; B: Negative control for different test strips reporting molecular concentrations

图4 试纸条报告分子浓度的优化

Fig. 4 The test strips report the optimization of molecular concentrations

2.2 RPA-CRISPR/Cas检测体系的灵敏度检测

将*M. linicola* DNA进行10倍梯度稀释,基于优化后的反应体系进行RPA-CRISPR/Cas扩增和检测。图5结果表明,原浓度3.4 ng/μL到34 ag/μL试纸条检测结果为阳性,当DNA浓度为3.4 ag/μL时,试纸条检测线未有红色条带,呈阴性结果,表明该



注:A:荧光法灵敏度结果;B:试纸条法灵敏度结果;处理1~10分别为原浓度3.4 ng/μL、340 pg/μL、34 pg/μL、3.4 pg/μL、340 fg/μL、34 fg/μL、3.4 fg/μL、340 ag/μL、34 ag/μL、3.4 ag/μL;CK:阴性对照

Note: A: Fluorescence method sensitivity results; B: Sensitivity results of test strip method; Treatments 1-10 were 3.4 ng/μL, 340 pg/μL, 34 pg/μL, 3.4 pg/μL, 340 fg/μL, 34 fg/μL, 3.4 fg/μL, 340 ag/μL, 34 ag/μL, and 3.4 ag/μL, respectively. CK: Negative control

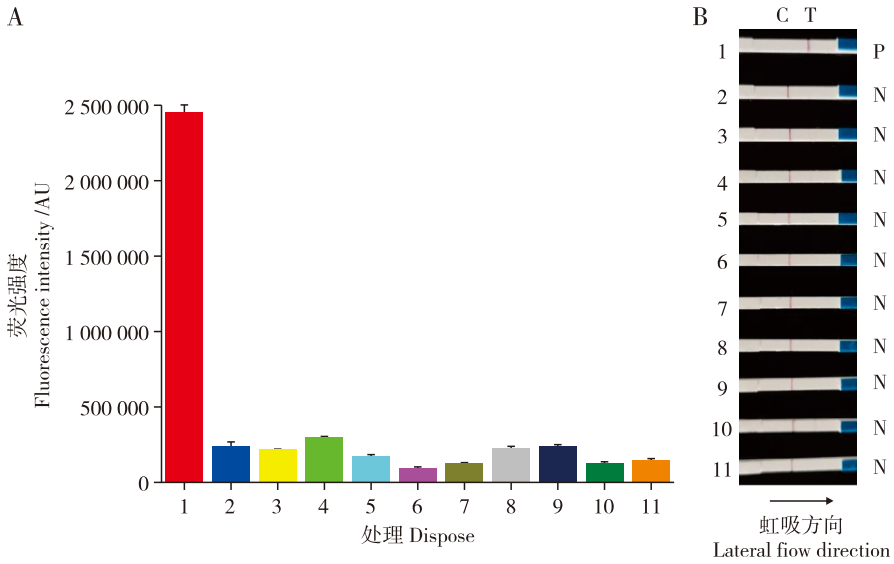
图5 灵敏度检测

Fig. 5 Sensitivity detection

体系灵敏度为34 ag/μL,具备较高的灵敏度。

2.3 RPA-CRISPR/Cas检测体系的特异性验证

使用优化后的RPA-CRISPR/Cas12a检测体系,对供试菌株基因组DNA进行特异性检测分析。图6

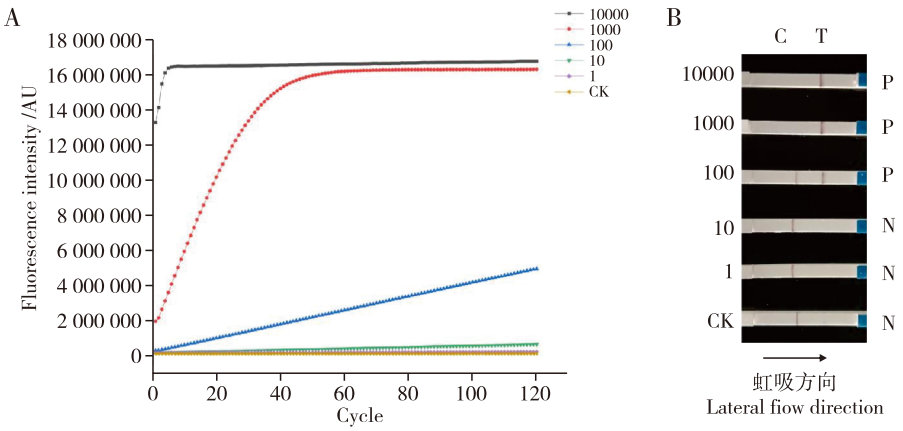


注:A:荧光检测体系特异性结果;B:试纸条检测体系特异性结果;处理1~10分别为PM1、YMKW、M5、M9、M13、M1、X6、CF-6、ATCC62680、781-1,11为空白对照

Note: A: System-specific results for fluorescence detection; B: Test strip detection system-specific results; Treatments 1-10 were PM1, YMKW, M5, M9, M13, M1, X6, CF-6, ATCC62680, and 781-1, respectively, and 11 is negative control

图6 RPA/CRISPR-Cas12a检测特异性验证

Fig. 6 Validation of RPA/CRISPR-Cas12a assay specificity



注:A:荧光检测体系模拟样品结果;B:试纸条检测体系模拟样品结果;CK:阴性对照

Note: A: Fluorescence detection system simulated sample results; B: Test strip detection system simulated sample results; CK: Negative control

图7 模拟样品检测结果

Fig. 7 Simulated sample test results

结果表明,在荧光检测中,编号PM1的*M. linicola*菌株荧光信号明显高于阴性对照,而其他供试菌株荧光信号与阴性对照差异不大;在试纸条检测中,编号PM1的*M. linicola*菌株检测结果为阳性,其他供试菌株均为阴性,表明该体系对*M. linicola*具有特异性。

2.4 模拟样品检测

将每粒附着10 000、1000、100、10和1个*M. linicola*分生孢子的亚麻籽室温干燥2 d之后,取1粒含有分生孢子的亚麻籽与19粒无菌亚麻籽混合提取DNA进行RPA/CRISPR-Cas12a体系检测。图7结果表明:RPA/CRISPR-Cas12a荧光检测法和试纸条检测法结果一致,种子带菌率为5%的样本中检测到100个*M. linicola*分生孢子。

3 结论与讨论

本研究将RPA扩增技术及CRISPR-Cas检测技术相结合,建立了亚麻褐斑病菌的检测体系。该体系可在80 min内得到结果,灵敏度可达34 ag/μL,操作简单,用时短,灵敏性高,实现了亚麻褐斑病菌的快速、灵敏的分子检测,为口岸检疫以及田间早期诊断提供新技术。

本研究采用的供试菌株,为了保证crRNA的特异性和可靠性,对NCBI上发布的*TUB2*序列进行对比,同种相似度达到100%,同属不同种相似度达27%。首先从理论上确保其可靠的特异性,通过对现有的一株目标菌株和参考菌株进行特异性验证,实验结果与理论上是一致的。亚麻褐斑病菌为检疫性病菌,国内鲜有发生,经查询国内菌种保藏中心无该病菌,目前亚麻褐斑病尚无充足菌株进行方法验证,后期获得不同来源菌株可对方法进一步验证。

传统分离鉴定耗时长、操作步骤多且需要全套微生物实验室设备;常用分子检测技术如普通PCR、荧光定量PCR、LAMP等技术操作复杂,对专业人员及仪器设备要求高;新一代常温扩增技术RPA操作简单且仅需要简单的恒温装置,但存在极高的非特异性扩增风险。本研究所建立的方法包含了RPA技术的优点,同时依赖CRISPR系统的双重识别,特异性极高,结果判定所需设备要求极低,可直接配合便携式荧光仪或裸眼观察。但该体系在实际应用方面具有巨大潜力和持续改进的空间。例如,本研究在方法建立过程中发现,重复实验所获得的荧光信号值较首次实验有所减弱,推测主要原因可能是crRNA发生了部分降解。针对这一问题,开发可在常温下稳定保存的冻干试剂盒,有望有效改善试剂的储存与运输条件,从而提升检测稳定性。此外,对于低浓度样本的检测,可通过引入内标[20]来提高扩增效率,进而增强检测体系的灵敏度。在实际植株病害诊断中,病原菌常为多种混合侵染,未来若能开发多重检测方法[21,22],将有望实现同时检测多种病原,从而进一步提升亚麻褐斑病的综合诊断能力。

参考文献:

[1] 邵忠. 亚麻派斯莫病及其综合防治技术[J]. 农业科技通讯, 2016(6): 240-242.

[2] 刘玮琦, 董奇彪, 张贵, 等. 俄罗斯输华油用亚麻籽有害生物风险分析[J]. 中国农业信息, 2014,26(1): 233-234.

[3] 王瑞元, 中国粮油学会, 北京, 等. 2022年我国粮油产销和进出口情况[J]. 中国油脂, 2023, 48(6): 1-7. DOI:10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.230101.

[4] 杨学. 亚麻派斯莫病发生特点及防治技术研究[J]. 中国麻业, 2004,26(4):170-172.

[5] 王孑民, 赵子俊, 张世管, 等. 胡麻(亚麻)派斯莫病[J]. 山西农业科学, 1984,12(S1): 61.

[6] 陈思, 杨学, 杨秀坤, 等. 亚麻抗派斯莫病种质资源筛选[J]. 作物杂志, 2019(1): 63-67. DOI:10.16035/j.issn.1001-7283.2019.01.010.

[7] 李倩, 何鹏亮, 姜晚霞, 等. 适宜南方镉污染土壤种植的亚麻品种筛选[J]. 现代农业科技,2023,(23): 30-33. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5739.2023.23.008.

[8] 王振华, 杨武, 赵晖, 等. 加拿大进境油菜籽茎基溃疡病菌的检测与鉴定[J]. 华中农业大学学报,2011,30(1): 66-69. DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2011.01.005.

[9] Halley S, Bradiey C A, Lukach J R, et al. Distribution and severity of pasmo on flax in north Dakota and evaluation of fungicides and cultivars for management [J].Plant Dis, 2004, 88 (10): 1123-1126. DOI: 10.1094/PDIS.2004.88.10.1123.

[10] 何立强. 麦类赤霉病和亚麻派斯莫病抗性基因发掘[D]. 南京: 南京农业大学, 2019. DOI: 10.27244/d.cnki.gnjnu.2019.002400.

[11] Liqiang He, Yao Sui, Yanru Che, et al.Genome-wide association studies using multi-models and multi-SNP datasets provide new insights into pasmo resistance in flax. Technical Advances in Plant Science,2023,12:14.

[12] Lapalu N, Simon A, Demen B, et al. Complete genome sequences of *Septoria linicola*: a resource for studying a damaging flax pathogen[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2023, 36 (1): 59-63. DOI: 10.1049/MPMI-09-22-0185-A.

[13] 廖川, 韦贵将. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展与应用[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(22): 3145-3149.

[14] 楚馨, 冯梓钊, 姜有声, 等. 重组酶聚合酶扩增技术结合侧向流动试纸条快速检测锦鲤疱疹病毒[J]. 水生生物学报, 2023, 47(6): 866-873. DOI: 10.7541/2023.2022.0226.

[15] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012,337(6096): 816-821. DOI:10.1126/science.1225829.

[16] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.DOI:10.1126/science.1231143.

[17] 卫艳珂, 王强, 徐向明, 等. 假禾谷镰孢RPA-CRISPR/Cas12a快速检测体系的建立与应用[J]. 菌物学报, 2024, 43(8): 171-179. DOI: 10.13346/j.mycosystema.240061.

[18] 董铮, 赵振兴, 范奇璇, 等. 基于RPA-CRISPR/Cas12a的番茄花叶病毒可视化检测方法的建立[J]. 植物保护, 2024, 50(4): 235-241. DOI: 10.16688/j.zwbh.2023381.

[19] 王皓璐. 基于RPA-CRISPR/Cas12a的异尖线虫快速等温检测方法的建立[D]. 长春: 吉林大学, 2024. DOI:10.27162/d.cnki.gjlin.2024.002561.

[20] 于璇. 进口油菜籽中两种检疫性病菌检测技术研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2020. DOI: 10.27152/d.cnki.ghanu.2020.000414.

[21] 刘岩. 一种基于多重RPA结合CRISPR/Cas12a系统的HR-HPV分型检测POCT技术研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2024. DOI:10.27351/d.cnki.gszhu.2024.001183.

[22] 蒋童. 基于CRISPR-Cas12a/Cas13a双系统联合多重等温扩增技术的病原体多重检测平台的建立和初步性能评价[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2024. DOI: 10.26921/d.cnki.ganyu.2024.000214.

(责任编辑:胡志勇)