

周莉质,宗 凯,李云飞,等. 稻粒黑粉病、稻曲病、恶苗病病原真菌的 MALDI-TOF-MS 鉴定规范化条件研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):93-99.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.025

# 稻粒黑粉病、稻曲病、恶苗病病原真菌的 MALDI-TOF-MS 鉴定规范化条件研究

周莉质<sup>1,2</sup>, 宗 凯<sup>1</sup>, 李云飞<sup>1</sup>, 姚 剑<sup>1</sup>, 檀根甲<sup>2</sup>

(1. 安徽出入境检验检疫局, 安徽合肥 230022; 2. 安徽农业大学植物保护学院, 安徽合肥 230036)

**摘要:**采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, 简称 MALDI-TOF-MS)技术对水稻作物的 3 种主要病原真菌进行分析,以获得稳定的指纹图谱。从菌物预处理方法、基质、点样方法等 3 个方面进行比较,对影响 MALDI-TOF-MS 分析结果的主要因素进行优化。结果表明,菌物预处理方法对检测结果的影响最大,热处理法在细胞壁较厚的真菌样品处理中可以获得较完整的生物信息;构建稻粒黑粉病菌(*Tilletia horrida*)、稻曲病菌(*Ustilaginoidea virens*)、恶苗病菌(*Fusarium moniliforme*)的 MALDI-TOF-MS 鉴定规范化方法,扩充 MALDI-TOF-MS 指纹图谱数据库,可简便、快速、准确地对细胞壁加厚的真菌样品进行鉴定。

**关键词:** MALDI-TOF-MS; 稻粒黑粉病; 稻曲病; 恶苗病; 鉴定; 指纹图谱

**中图分类号:** S435.111.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0093-07

水稻真菌病害大多是由病原菌的分生孢子、厚垣孢子以种子、土壤带菌或空气水流传播的方式流行<sup>[1]</sup>。近年来由于

收稿日期:2016-07-11

基金项目:国家质检总局公益性科研专项(编号:201410076)。

作者简介:周莉质(1990—),女,云南普洱人,硕士研究生,主要从事植物病理学研究。Tel:(0551)62856388;E-mail:zhoulizhi0112@163.com。

通信作者:姚 剑,博士,研究员,主要从事植物检疫及森林保护研究,E-mail:msyao@126.com;檀根甲,博士,教授,主要从事农作物病害流行与预测预报研究,E-mail:tgj63@163.com。

对西花蓟马的增效机制还有待深入研究。

## 参考文献:

- [1] Kirk W D J, Terry L I. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) [J]. Agricultural and Forest Entomology, 2003, 5(4): 301-310.
- [2] 张友军, 吴青君, 徐宝云, 等. 危险性外来入侵生物——西花蓟马在北京发生危害[J]. 植物保护, 2003, 29(4): 58-59.
- [3] 袁成明, 邹军锐, 李景柱, 等. 贵州省蔬菜蓟马的种类、分布及综合防治[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(12): 1442-1444.
- [4] 沈登荣, 何 超, 刘 佳, 等. 西花蓟马在云南的发生危害及形态变异[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 121-123.
- [5] 陈雪林, 杜予州, 王建军. 西花蓟马抗药性研究进展[J]. 植物保护, 2011, 37(5): 34-38.
- [6] 龚佑辉, 吴青君, 张友军, 等. 西花蓟马的抗药性及其治理策略[J]. 昆虫知识, 2010, 47(6): 1072-1080.
- [7] 王圣印, 刘永杰, 周仙红, 等. 西花蓟马对吡虫啉抗性机制的研究[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(3): 559-565.
- [8] 王圣印, 张安盛, 李丽莉, 等. 西花蓟马田间种群对常用杀虫剂的

新型超级稻的推广,稻粒黑粉病、稻曲病、恶苗病的真菌病害逐渐上升为水稻的主要病害。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, 简称 MALDI-TOF-MS)技术可借助基质对非挥发性和热不稳定性等生物大分子进行解吸电离,脉冲激发后离子云电离粒子真空向上通过飞行管探测器,产生 1 个频谱图被认为是该微生物的指纹图谱<sup>[2]</sup>。

植物病原真菌各生长阶段营养体差异较大,表达的蛋白种类和表达量有一定变化,与细菌相比,真菌孢子细胞壁含多糖和固醇类物质,在 MALDI-TOF-MS 鉴定中没有单一的方

- 抗性现状及防治对策[J]. 昆虫学报, 2014, 57(5): 621-630.
- [9] 万岩然, 何秉青, 苑广迪, 等. 北京和云南地区西花蓟马对多杀菌素类药剂产生抗药性[J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(2): 396-402.
- [10] 徐汉虹. 植物化学保护学[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2011: 247-254.
- [11] 陈雪林, 孙 蓉, 杜予州, 等. 阿维菌素与三种杀虫剂对西花蓟马的联合毒力[J]. 植物保护, 2011, 37(5): 206-209.
- [12] 陈 立, 徐汉虹, 李云宇, 等. 农药复配最佳增效配方筛选方法的探讨[J]. 植物保护学报, 2000, 27(4): 349-354.
- [13] 侯文杰, 李 飞, 吴青君, 等. 西花蓟马对多杀菌素的抗性生化机制研究[J]. 应用昆虫学报, 2013, 50(4): 1042-1048.
- [14] Bielza P, Quinto V, Contreras J, et al. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouses of south-eastern Spain [J]. Pest Management Science, 2007, 63(7): 682-687.
- [15] Zhang S Y, Kono S, Murai T, et al. Mechanisms of resistance to spinosad in the western flower thrip, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) [J]. Insect Science, 2008, 15(2): 125-132.

法被作为常规处理方法使用,其结果常出现因培养条件不同而导致鉴定结果不准确的情况<sup>[3-5]</sup>。基于 DNA 序列的鉴定方法受 PCR 引物探针特异性、测序成本和时间等因素的制约。本研究对稻粒黑粉病病菌(*Tilletia horrida*)、稻曲病病毒(*Ustilaginoidea virens*)和恶苗病病菌(*Fusarium moniliforme*)的 MALDI-TOF-MS 鉴定从预处理方法、适用基质、点样方法等 3 个方面进行优化<sup>[1,6]</sup>,对病原真菌建立标准规范化的 MALDI-TOF-MS 鉴定方法并进行稳定性重复分析,为植物病原真菌的 MALDI-TOF-MS 鉴定方法提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用菌种分离自水稻带菌种子中,由安徽出入境检验检疫局植物检疫实验室保存。

PDA 培养基:200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、18 g 琼脂,加入 1 000 mL 蒸馏水中加热搅拌溶解,灭菌后待冷却至 55~60 ℃ 倒平板。

察氏培养基:3.00 g 硝酸钠、1.00 g 磷酸氢二钾、0.50 g 硫酸镁、0.50 g 氯化钾、0.01 g 硫酸亚铁、30.00 g 蔗糖、18.00 g 琼脂,加入 1 000 mL 蒸馏水中加热搅拌溶解,灭菌后待冷却至 55~60 ℃ 倒平板。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析系统,购自日本岛津公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 MALDI-TOF-MS 参数 线性操作模式,延迟提取,分析离子带正电荷,基质抑制偏转模式,加速电压为 20 kV,提取电压为 18.6 kV,脉冲离子提取时间为 3 500 ns,质荷比范围为 1 500~20 000,激光点击数为每张图谱 80~100 次,激光频率 60.0 Hz。使用大肠杆菌 ATCC 8739 作为外标校准物质。

1.2.2 病原真菌的培养 稻曲病病菌的培养:将纯化保存的菌株接种于 PDA 平板中,28 ℃ 活化培养 7 d。

恶苗病病菌的培养:将纯化保存的菌株接种于察氏培养基平板中,28 ℃ 活化培养 7 d。

稻粒黑粉病病菌厚垣孢子的获得:病粒在 75% 乙醇中浸泡 5 min 后夹出,在滤纸上晾干,再用无菌水漂洗病粒 2 次,夹出病粒用滤纸吸干水分,用刀切开病粒将厚垣孢子抖入装有无菌水的培养皿中,用擦镜纸过滤得到稻粒黑粉病菌的厚垣孢子。

1.2.3 样品的预处理方法选择 用接种针各挑取 20 mg(湿质量)稻曲病病菌、恶苗病病菌菌体和稻粒黑粉病病菌厚垣孢子,采用 75% 乙醇法、热处理法、液氮研磨法、载玻片挤压法、氧化锆珠匀浆法等 5 种方法分别对 3 种真菌进行破壁预处理。

75% 乙醇法:向 20 mg 菌体(厚垣孢子)中加入 300 μL 无菌水摇匀,再加入 900 μL 预冷的无水乙醇涡旋混匀,超声处理 3 min 后 12 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液,沉淀物于室温晾干 5 min<sup>[6]</sup>。

热处理法:向 20 mg 菌体(厚垣孢子)中加入 300 μL 无菌水摇匀,沸水水浴加热 30 min,取出冷却后加入 1 mL 无水乙醇,摇匀静置 3 min 后 12 000 r/min 离心 2 min。弃去上清液,沉淀物于室温晾干 5 min。

液氮研磨法:将菌体(厚垣孢子)用液氮研磨后,加入 300 μL 无菌水并移入 1.5 mL 离心管内,加入 900 μL 预冷的无水乙醇涡旋混匀,静置 3 min 后 12 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液,沉淀物于室温晾干 5 min。

载玻片挤压法:将菌体(厚垣孢子)用 2 片载玻片用力挤压,在显微镜下观察到孢子破裂即可。用 300 μL 无菌水将挤压的菌体洗入 1.5 mL 离心管中,加入 900 μL 预冷的无水乙醇涡旋混匀,静置 3 min 后 12 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液,沉淀物于室温晾干 5 min。

氧化锆珠匀浆法:向 20 mg 菌体(厚垣孢子)中加入 300 μL 无菌水摇匀,加入 100 mg 氧化锆珠(直径 0.5 mm),研磨棒匀浆 5 min,加入 900 μL 预冷的无水乙醇涡旋混匀,静置 3 min 后 12 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液,沉淀物于室温晾干 5 min<sup>[7]</sup>。

向 5 种方法提取的沉淀物中加入 30 μL 70% 甲酸,将沉淀打散混匀,再加入 30 μL 乙腈,8 000 r/min 离心 1 min,取上清液进行 MALDI-TOF-MS 分析。

1.2.4 基质的选择 采用“1.2.3”节中选出的最佳样品预处理方法分别对病原真菌进行预处理,基质溶剂为水、乙醇、乙腈(体积比为 1:1:1)的混合溶液,分别以 α-氨基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、芥子酸(SA)为基质进行 MALDI-TOF-MS 分析。

1.2.5 点样方法的选择 采用“1.2.3”节中最佳的样品预处理方法对病原真菌进行预处理,选用“1.2.4”节中最佳的基质。试样的点样方法直接影响基质对生物信息物质的离子化程度,对有效基质的溶剂和点样包被方法进行筛选可有效提高 MALDI-TOF-MS 检测结果的有效性<sup>[6]</sup>。点样方法有以下 3 种。

覆盖干燥法:将 1 μL 真菌提取物点加到飞行质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization,简称 MALDI)靶板上,室温条件下晾干,再点加 1 μL 基质溶液覆盖于样品点上,室温条件下晾干用于 MALDI-TOF-MS 分析。

夹心点样法:将 1 μL 基质溶液点加在 MALDI 靶板上,室温晾干形成种子层,然后在种子层上覆盖 1 μL 样品,室温晾干,再点加 1 μL 基质溶液覆盖于样品点上,室温条件下晾干用于 MALDI-TOF-MS 分析。

混合干燥法:将样品上清液与基质溶液等体积混合,取 1 μL 混合液点加在 MALDI 靶板上,室温条件下晾干用于 MALDI-TOF-MS 分析。

1.2.6 重复性试验 为确定稻粒黑粉病、稻曲病、恶苗病病原真菌的 MALDI-TOF-MS 鉴定条件的稳定性,对这 3 种病原真菌的鉴定进行重复性试验。采用“1.2.3”节中最佳样品预处理方法对病原真菌进行预处理,选用“1.2.4”节中最佳基质和“1.2.5”节中最适的点样方法进行重复性试验。同一样品的重复性试验:每个样品重复点样 10 次,进行 MALDI-TOF-MS 分析。批间样品的重复性试验:对病原真菌进行 3 次重复培养、预处理提取、点样等工作。

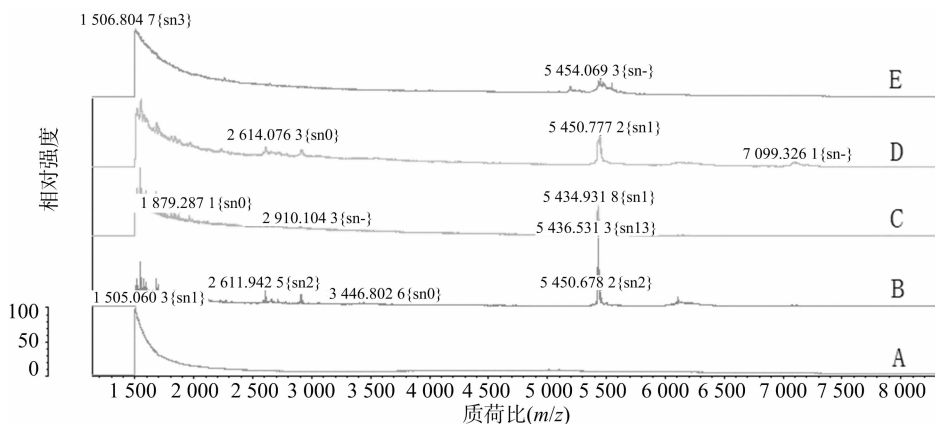
## 2 结果与分析

### 2.1 样品预处理方法的确定

稻粒黑粉病、稻曲病、恶苗病病原真菌的预处理提取物以

CHCA 为基质的 MALDI-TOF-MS 分析结果分别如图 1、图 2、图 3 所示。75% 乙醇法对真菌类细胞壁过厚的样品不适用, 稻粒黑粉病病菌和恶苗病病菌未得到特征峰谱图或强度过低, 稻曲病病菌在质荷比小于 4 000 的小分子肽段部分背景噪音过高; 液氮研磨法和氧化锆珠匀浆法对真菌细胞破碎

程度过高, 使蛋白特征峰过低; 载玻片挤压法造成细胞破碎不完全, 特征蛋白没有完全释放; 热处理法操作简便, 所得蛋白提取物的离子峰背景噪音最低, 特征峰数量最多, 离子激发强度适中且峰谱明显。因此, 选用热处理法作为样品预处理的最适方法。



A—75%乙醇法; B—热处理法; C—液氮研磨法; D—载玻片挤压法; E—氧化锆珠匀浆法。图2、图3同

图1 稻粒黑粉病病菌用5种预处理方法的 MALDI-TOF-MS 分析结果

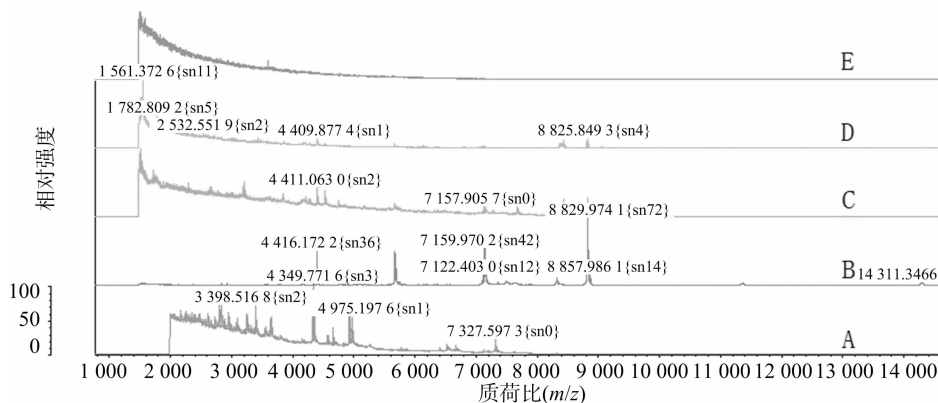


图2 稻曲病病菌用5种预处理方法的 MALDI-TOF-MS 分析结果

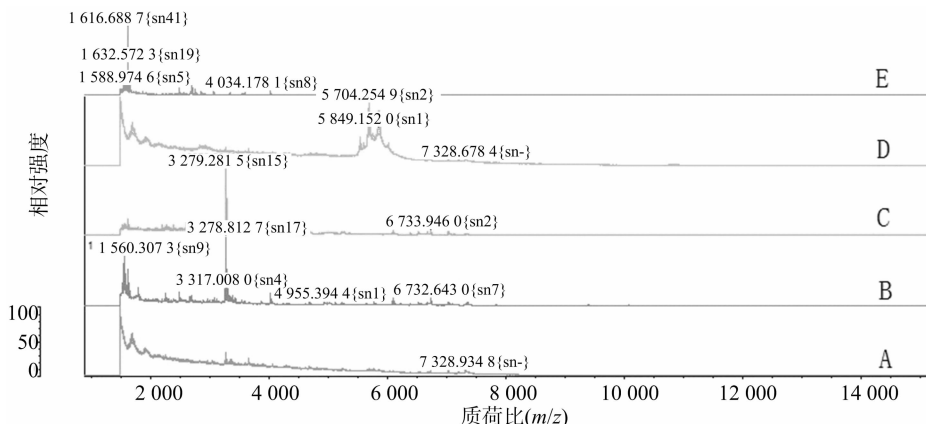


图3 恶苗病病菌用5种预处理方法的 MALDI-TOF-MS 分析结果

## 2.2 最适基质的确定

基质 CHCA 多用于多肽及小分子样品的分析, DHB 多用于糖类及小分子样品的分析, SA 多用于大于 10 000 u 的蛋白及大分子样品的分析。由图 4 至图 6 可知, 3 种植物病原真菌胞内提取物中 DHB 包被的糖类小分子成分无法激发出特征成分; SA 背景噪音较高, 并无特征峰谱。基质筛选试验表

明, 稻粒黑粉病病菌、稻曲病病菌、恶苗病病菌的细胞悬液提取物中特征成分主要为在质荷比小于 10 000 位置出现的多肽和小分子, 以 CHCA 为基质获得的图谱较稳定, 为最佳基质。

## 2.3 点样方法的确定

由图 7 至图 9 可知, 稻粒黑粉病病菌混合干燥法只得到质荷比 3 847、6 829、7 497 等 3 个特征峰且 2 次平行点样重

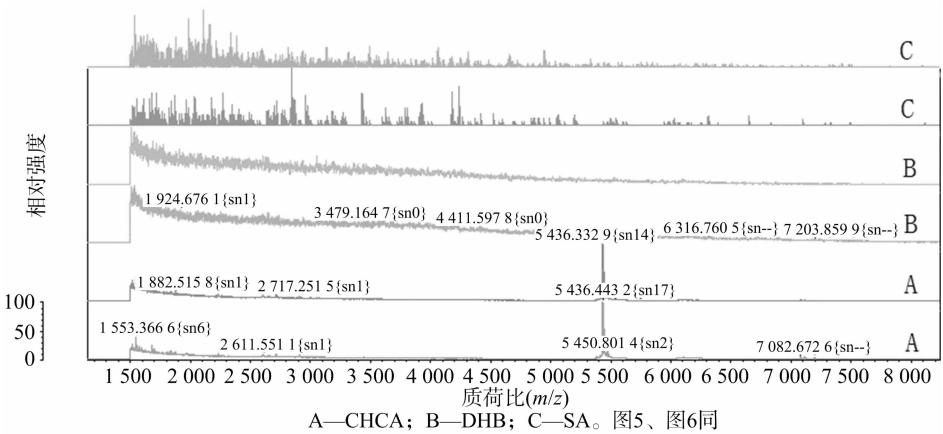


图4 稻粒黑粉病病菌在3种不同基质中 MALDI-TOF-MS 分析的结果

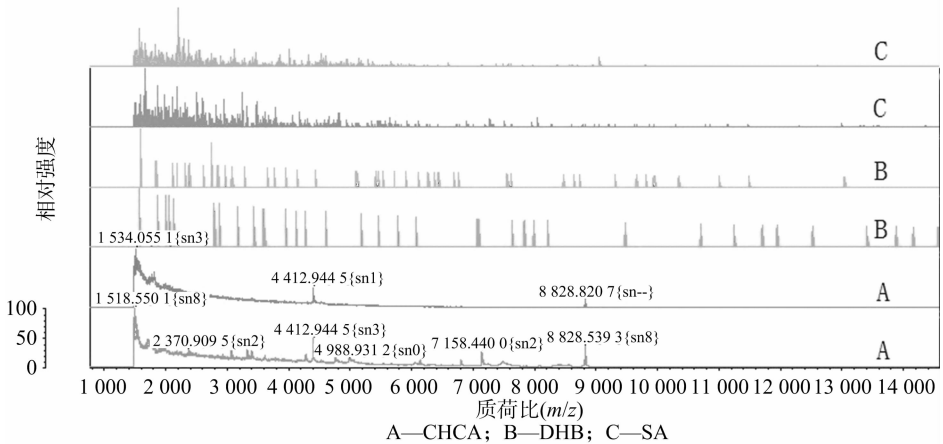


图5 稻曲病病菌在3种不同基质中 MALDI-TOF-MS 分析的结果

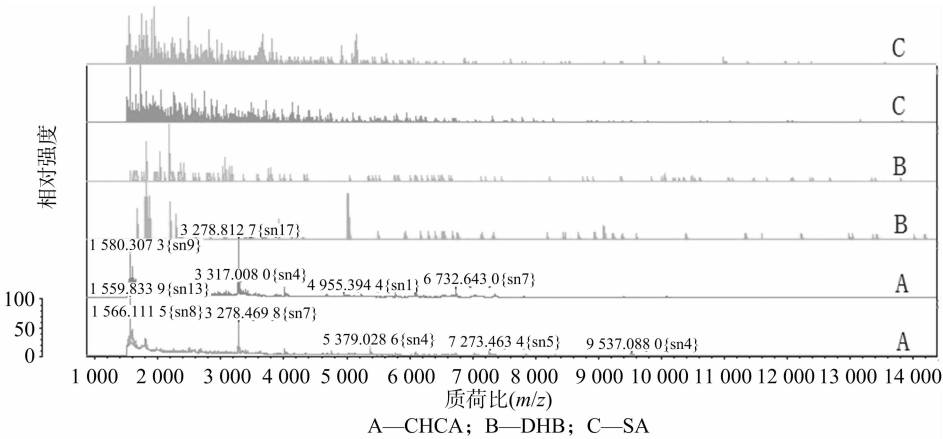


图6 恶苗病病菌在3种不同基质中 MALDI-TOF-MS 分析的结果

复性较差,夹心点样法在质荷比 2 615、3 814 位置出现非特异性峰且背景噪音较高;稻曲病病菌混合干燥法在质荷比 4 000 之前背景噪音过高无法辨识特征峰,夹心点样法只能激发到质荷比 4 414、8 823 等 2 个最强的峰值,其他强度不高的小峰不明显;恶苗病病菌混合干燥法出峰凌乱无规律,夹心点样法几乎未检测到特征物质且背景噪音较高。点样方法试验结果表明,覆盖干燥法中基质对特征蛋白的离子化程度较高,特征蛋白峰谱较清晰,并能有效降低 MALDI-TOF-MS 背景的干扰。

2.4 标准试验方法重复性试验

由图 10 至图 12 可知,同一样品重复 10 次所得的特征峰谱一致,说明本试验所选的样品预处理方法、基质、点样方法稳定可行。3 种病原真菌分别进行 3 次重复培养和预处理提取、点样等工作的 MALDI-TOF-MS 分析结果分别如图 13 至图 15 所示,该方法从病原真菌的纯培养条件到 MALDI-TOF-MS 鉴定的各个步骤所得的特征蛋白的指纹图谱一致、特征峰谱一致,说明病原真菌的鉴定结果可靠,重复性较好,特征峰谱数量多且丰度高。采用 MALDI-TOF-MS 自带专业分析软件 Biotyper 分别对稻粒黑粉病、稻曲病、

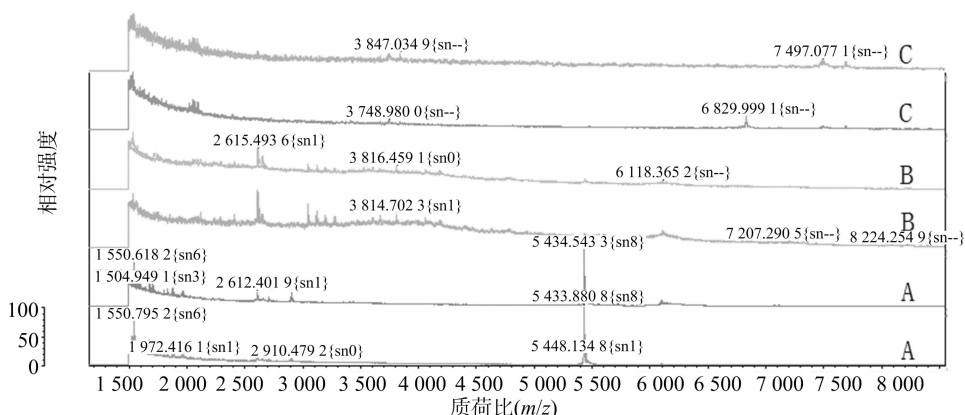


图7 稻粒黑粉病菌3种点样方法的 MALDI-TOF-MS 分析结果

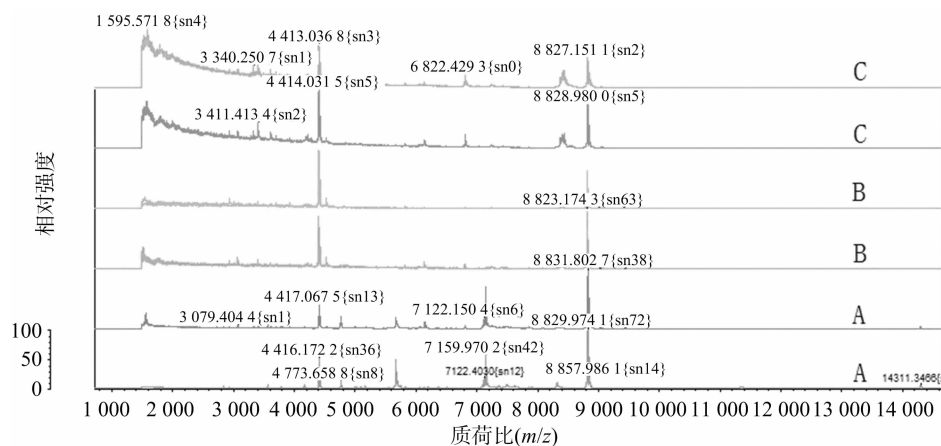


图8 稻曲病菌3种点样方法的 MALDI-TOF-MS 分析结果

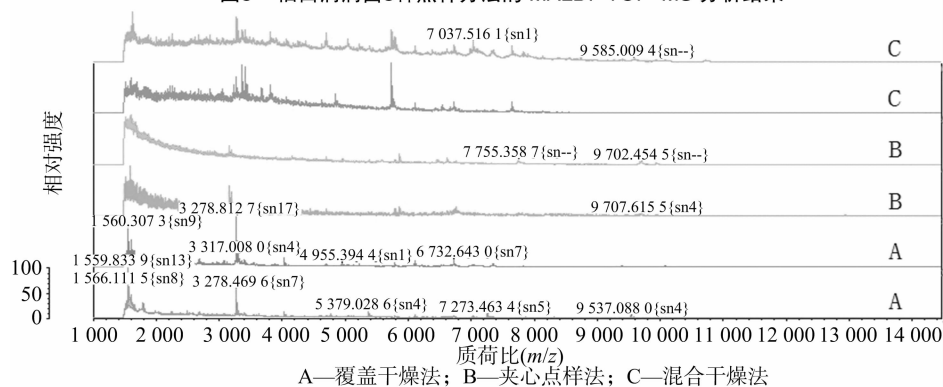


图9 恶苗病菌3种点样方法的 MALDI-TOF-MS 分析结果

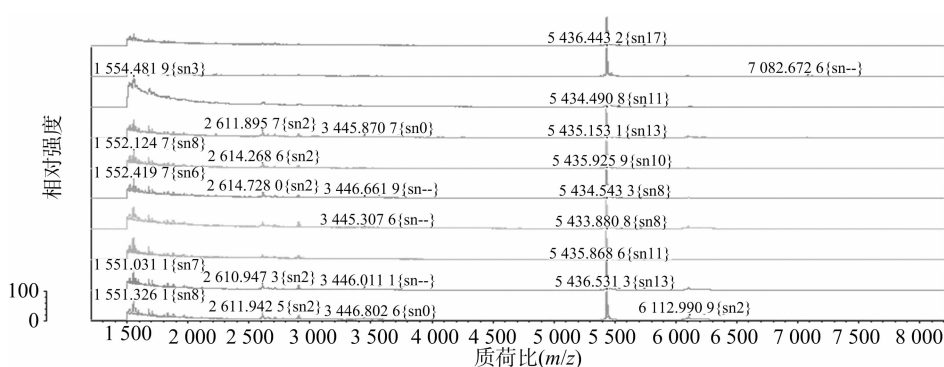


图10 稻粒黑粉病菌同一样品重复 10 次的 MALDI-TOF-MS 分析结果

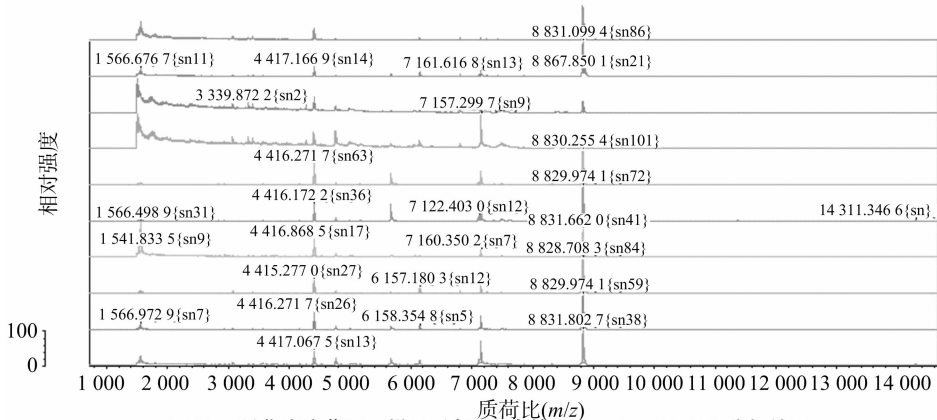


图11 稻曲病病菌同一样品重复 10 次的 MALDI-TOF-MS 分析结果

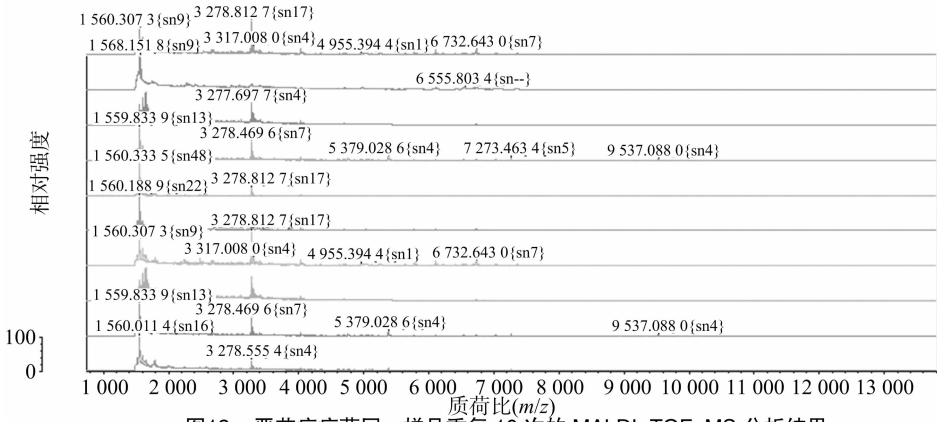


图12 恶苗病病菌同一样品重复 10 次的 MALDI-TOF-MS 分析结果

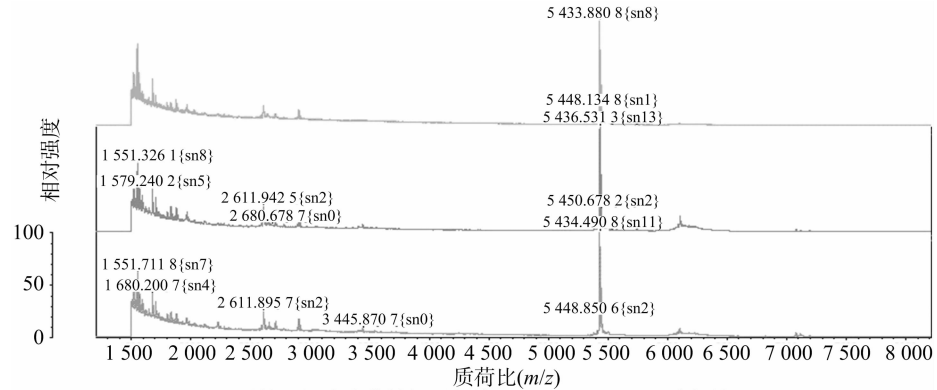


图13 稻粒黑粉病病菌批间重复的 MALDI-TOF-MS 分析结果

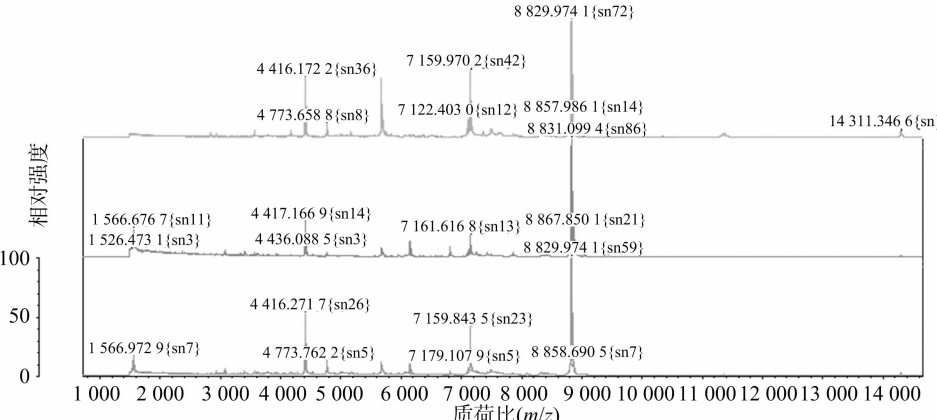


图14 稻曲病病菌批间重复的 MALDI-TOF-MS 分析结果

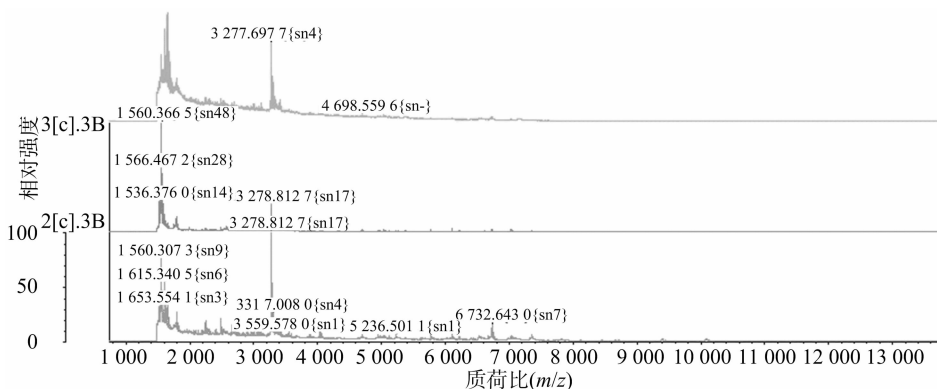


图15 恶苗病菌批间重复的 MALDI-TOF-MS 分析结果

恶苗病病原真菌图谱进行分析,得到病原真菌标准指纹图谱的特征峰信息如表 1 所示,在 MALDI - TOF - MS 鉴定方法相同并选用同种电离基质时,3 种病原真菌在质荷比对应的位置应有的特征峰均出现。

表 1 MALDI - TOF - MS 分析特征峰信息

| 病原菌    | 特征峰的质荷比( <i>m/z</i> )  |
|--------|--|
| 稻粒黑粉病菌 | 1 523.76、1 552.12、1 597.46、1 652.75、1 680.45、1 708.80、1 837.28、2 614.27、2 911.92、5 435.15、6 122.47、7 074.63                              |
| 稻曲病菌   | 2 837.41、3 562.03、3 793.19、4 170.22、4 416.17、4 773.66、5 173.87、5 674.10、6 181.47、7 159.97、7 492.28、8 336.62、8 829.97、11 372.24、14 311.35 |
| 恶苗病菌   | 1 536.02、1 559.83、1 615.10、1 653.25、1 803.74、3 278.47、4 029.79、4 765.85、5 379.03、5 788.77、6 107.72、6 731.66、7 033.25、7 273.46、9 537.09   |

3 结论与讨论

在没有提取、分离和扩增的情况下,蛋白质作为最具特征性的物质可用于微生物的鉴定,而植物病原真菌的 MALDI - TOF - MS 鉴定准确性主要影响因素为预处理方法的差异<sup>[8-9]</sup>。预处理使用的 75% 乙醇法常用于破裂细菌细胞膜<sup>[10]</sup>,但该方法对真菌的厚垣孢子类细胞壁加厚的样品并不能达到破裂效果。Adams 等将病原菌经过 75% 乙醇破裂后再进行匀浆和超声处理<sup>[3]</sup>,该方法在本试验中并未得到相似的结果,超声处理后细胞内蛋白小分子结构松散,不利于与基质结合。MALDI - TOF - MS 技术在植物病原菌的鉴定和研究应用中要依靠病原菌指纹图谱数据库,建立足够种类的已知病原菌指纹图谱库才能实现最有效、最真实的鉴定结果<sup>[8]</sup>,且应对病原菌进行归类,建立不同的预处理方法和标准基质以得到最稳定的结果,提高指纹图谱数据库比对的准确性。

本试验对 3 种水稻病原真菌进行细胞内含物粗提取,沸水水浴 30 min 细胞壁破裂较完全,所得细胞内含物主要为胞内小分子粗蛋白,蛋白与基质 CHCA 所得 MALDI - TOF - MS 图谱背景较低,特征峰数量多且丰度高,经过多次重复试验,培养条件相同的情况下所得的蛋白指纹图谱重复性良好,该方法可用于细胞壁加厚类真菌样品的蛋白提取和 MALDI - TOF - MS 分析。

参考文献:

[1] Anne - Cécile N, Carole C, Stéphane R, et al. Assessment of various parameters to improve MALDI - TOF MS reference spectra libraries

constructed for the routine identification of filamentous fungi [ J ]. BMC Microbiology, 2013, 13( 1 ): 76.

[2] Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI - TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology [ J ]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36( 2 ): 380 - 407.

[3] Adams L L, Salee P, Dionne K, et al. A novel protein extraction method for identification of mycobacteria using MALDI - TOF MS [ J ]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 119: 1 - 3.

[4] Horká M, Kubesová A, Salplachta J, et al. Capillary and gel electromigration techniques and MALDI - TOF MS—suitable tools for identification of filamentous fungi [ J ]. Analytica Chimica Acta, 2012, 716( 4 ): 155 - 162.

[5] Chalupová J, Raus M, Sedlářová M, et al. Identification of fungal microorganisms by MALDI - TOF mass spectrometry [ J ]. Biotechnology Advances, 2014, 32( 1 ): 230 - 241.

[6] 李凤琴, 吴多加, 武淑真, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测与鉴定食品真菌的研究 [ J ]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19( 5 ): 385 - 393.

[7] Brun S, Madrid H, van den Ende B G, et al. Multilocus phylogeny and MALDI - TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives [ J ]. Fungal Biology, 2013, 117( 1 ): 32 - 40.

[8] 冯建军, 龙海, 刘新娇, 等. MALDI - TOF 质谱技术鉴定植物病原体研究进展 [ J ]. 植物检疫, 2014( 6 ): 13 - 18.

[9] Bader O. MALDI - TOF - MS - based species identification and typing approaches in medical mycology [ J ]. Proteomics, 2013, 13( 5 ): 788 - 799.

[10] Branquinho R, Sousa C, Lopes J, et al. Differentiation of *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis* using MALDI - TOF - MS [ J ]. PLoS One, 2014, 9( 10 ): e110127.