

# 基于16S rDNA与多拷贝基因 *hyvI/hyvII* 的柑橘黄龙病菌 PCR 检测体系比较

## Comparison of the PCR detection systems based on 16S rDNA and *hyvI/hyvII* multicopy gene sequences for *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the pathogen of citrus huanglongbing

陈岳文 李娜 李芳 肖翠 姚润贤 邓子牛\*

(湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128)

Chen Yuewen Li Na Li Fang Xiao Cui Yao Runxian Deng Ziniu\*

(College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan Province, China)

柑橘黄龙病是由  $\alpha$  变形菌纲细菌黄龙病菌耐热性亚洲种 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLAs) 引起的柑橘毁灭性病害, 世界柑橘产量居前三的中国、巴西、美国近年受灾严重。目前对 CLAs 的分子检测主要靶点基因序列有 16S rDNA、 $\beta$ -操纵子和外膜蛋白基因 (Bové, 2015), 但检出率及灵敏度相对较低, 而利用多拷贝基因序列检测黄龙病的研究较少。为进一步提高检出率和灵敏度, 本研究拟比较基于 CLAs 的 16S rDNA 序列和多拷贝基因 *hyvI/hyvII* 所设计引物的灵敏度, 建立柑橘黄龙病的高效检测体系, 以期在实际应用中快速、灵敏、可靠地检测柑橘黄龙病。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

供试 CLAs 及病样: CLAs 阳性重组质粒由华南农业大学邓晓玲教授提供。11 份田间症状为叶片黄化斑驳的疑似柑橘黄龙病叶由湖南省郴州市汝城县农业局提供, 液氮冷冻后于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

试剂及仪器: 常规 PCR 试剂、qPCR 试剂盒 (SuperMix) 及 DNA 提取试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司。Bio-Rad CFX96 qPCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 常规 PCR 仪, 美国 ABI 公司。

#### 1.2 方法

灵敏度评价: 根据 CLAs 的 16S rDNA 保守序列为靶标设计 4 对常规 PCR 特异引物 LB1/LB2、In1/In2、OL1/OL2 和 OI1/OI2 (Jagoueix et al., 1997) 及 3 对 qPCR 特异引物 Las-I-r/Las-I-f、Las-O-r/Las-O-f (姜兵海等, 2014) 和 HLBas/HLBr (Li et al., 2006), 选取 CLAs 的 *hyvI/hyvII* 序列为靶标设计 1 对 qPCR 特异引物 LJ900f/LJ900r (Morgan et al., 2012), 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以 10 倍梯度稀释 CLAs

阳性重组质粒 DNA 为 PCR 模板, 共设 8 个浓度:  $10^7$  (实际浓度为  $98 \text{ ng}/\mu\text{L}$ )、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。25  $\mu\text{L}$  常规 PCR 反应体系:  $10\times$  Easy Taq Buffer 2  $\mu\text{L}$ 、2.5 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  上下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ 、5 U/ $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ 、阳性 DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu\text{L}$ ; 反应程序:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min; 设清水空白对照。20  $\mu\text{L}$  qPCR 反应体系: SYBG Premix Taq 10  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  上下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ 、阳性 DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu\text{L}$ ; 反应程序:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;  $95^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,  $55^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 40 个循环; 扩增结束后进行熔解曲线分析, 以验证扩增的特异性。设清水空白对照。

特异性检测: 应用筛选出的引物建立常规 PCR 和 qPCR 体系并对 11 份疑似柑橘黄龙病样进行检测, 计算检出率, 比较检测结果, 设置 CLAs 阳性重组质粒 DNA 作阳性对照, 以清水作空白对照。

### 2 结果与分析

#### 2.1 常规 PCR 中不同引物的检测灵敏度

4 对特异性引物中, In1/In2 未扩增出目的条带, LB1/LB2、OL1/OL2 和 OI1/OI2 检测浓度为  $10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时结果呈阴性, 其中 LB1/LB2 和 OL1/OL2 检测浓度为  $10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时特异条带较弱, OI1/OI2 检测浓度为  $10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时特异条带清晰, 灵敏度最佳 (图 1-A)。表明基于 16S rDNA 序列设计的引物在常规 PCR 中对 CLAs 的检测下限为  $10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ , 对应浓度为  $98 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 。

#### 2.2 qPCR 中不同引物的检测灵敏度

4 组引物对阳性模板的扩增均出现明显的荧光累积而使荧光值达到阈值以上, 熔解曲线分析结果

也显示扩增产物具有单一性(图1-B)。其中Las-I-r/Las-I-f和LJ900r/LJ900f引物检测 $10^3$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 时呈阴性,表明对CLas的检测下限为 $10^4$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,对应

浓度为 $9.8\text{ pg}/\mu\text{L}$ ,在扩增循环数及特异性上,LJ900r/LJ900f引物的检测灵敏度最佳。表明qPCR检测灵敏度相比常规PCR高10倍。

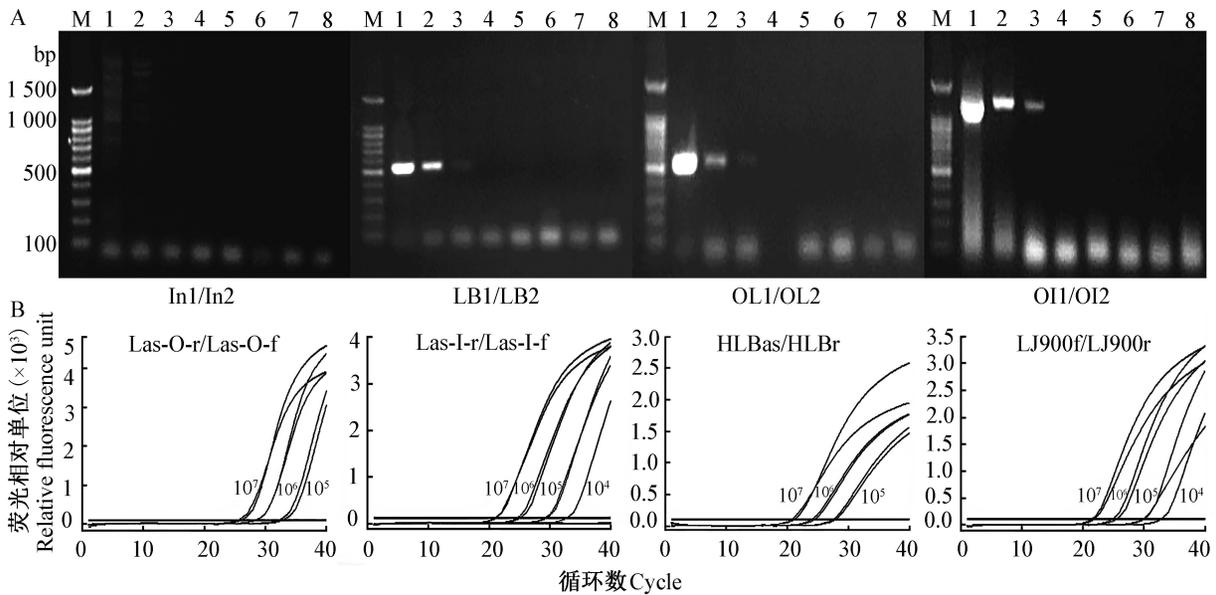


图1 常规PCR体系和qPCR体系中不同引物检测CLAs的灵敏度

Fig. 1 The sensitivity of different primer pairs for detection of CLAs by conventional PCR and qPCR

M: 100 bp DNA ladder; 1~8: 模板浓度分别为 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。M: 100 bp DNA ladder; 1~8: Concentrations were  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$  copies/ $\mu\text{L}$  of positive sample, respectively.

### 2.3 田间疑似样品的检测结果

常规PCR(OI1/OI2引物)和qPCR(LJ900引物)对田间疑似样品的阳性检出率分别为45.4%和72.7%;其中有3个样品在常规PCR检测中呈阴性,但在qPCR检测中呈阳性。表明常规PCR检测中出现了假阴性,qPCR检测体系对于黄龙病的早期检测效果更好。

### 3 讨论

由于黄龙病菌在树体上分布不均匀且具有较长的潜伏期,对其准确检测较难(Li et al., 2009)。较之样品所含背景DNA浓度,病原DNA浓度较低,在检测CLAs浓度较低的样品时易出现不可靠结果。目前基于CLAs的16S rDNA序列设计引物(Bové, 2015),检出率及灵敏度较低,易出现假阴性结果,而利用多拷贝串联序列 $hyvI/hyvII$ 设计引物可为CLAs检测提供更佳的检测位点(Morgan et al., 2012),因此建立高灵敏度的CLAs检测体系对于黄龙病的检疫检验具有重要意义。本研究中基于 $hyvI/hyvII$ 序列的qPCR检测方法拥有更高的灵敏度和检出率,有效减少了检测中的假阴性结果,可用于柑橘黄龙病的早期检测。

### 参考文献 (References)

Bové JM. 2015. Half a century on huanglongbing: learning about the

disease, trying to control it. *Journal of Citrus Pathology*, 2(1): 307-87

Jagoueix S, Bove JM, Garnier M. 1997. Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic regions of "*Candidatus Liberobacter asiaticum*" and "*Candidatus Liberobacter africanum*", the two species associated with citrus huanglongbing (greening) disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(1): 224-227

Li WB, Hartung JS, Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiology Methods*, 66(1): 104-115

Li WB, Levy L, Hartung JS. 2009. Quantitative distribution of *Candidatus Liberobacter asiaticus* in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology*, 99(2): 139-144

Morgan JK, Zhou LJ, Li WB, Shatters RG, Keremane M, Duan YP. 2012. Improved real-time PCR detection of '*Candidatus Liberobacter asiaticus*' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. *Molecular and Cellular Probes*, 26(2): 90-98

Lou BH, Song YQ, Zhao XL, Bai XJ, Deng CL. 2014. Quantitative distribution of *Candidatus Liberobacter asiaticus* in flowers and seeds of Shatian pummelo and its applications. *Journal of Plant Protection*, 41(4): 447-452 (in Chinese) [娄兵海, 宋雅琴, 赵小龙, 白先进, 邓崇岭. 2014. 柑橘花器和种子中黄龙病菌的定量分布及应用. *植物保护学报*, 41(4): 447-452]

(责任编辑:李美娟)