

## 柑桔黄龙病的常规 PCR 及荧光定量 PCR 检测

胡浩<sup>1</sup>, 殷幼平<sup>1</sup>, 张利平<sup>1</sup>, 赵云<sup>1</sup>, 夏玉先<sup>1</sup>, 王中康<sup>1</sup>, 覃健<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>重庆大学生物工程学院, 基因工程研究中心, 重庆 400030; <sup>2</sup>柳州市鹧鸪江园艺场, 柳州 545002)

**摘要:** 【目的】为柑桔黄龙病的早期诊断和寄主体内病原菌的动态监测提供一种稳定、可靠的检验检疫技术。【方法】利用亚洲韧皮杆菌核糖体蛋白基因 *rplJ/rplL* 设计了 2 对 PCR 引物 CQULA03F/CQULA03R、CQULA04F/CQULA04R 和 1 条 TaqMan 探针 CQULAP1, 以此为基础建立了常规 PCR 和 TaqMan 探针法、SYBR Green I 荧光染料法两种荧光定量 PCR (共 3 种) 反应体系; 确定了 3 种体系各自的检测灵敏度、特异性和准确性, 据此对 3 种体系进行了比较; 从 2004 年 7 月到 2005 年 5 月还利用常规 PCR 和 TaqMan 探针荧光定量 PCR 体系完成了对柑桔黄龙病病原菌在寄主体内的周年变化的动态监测。【结果】两种荧光定量 PCR 方法的灵敏度比常规 PCR 高出至少 2~3 个数量级, 而 TaqMan 探针法由于使用了杂交探针, 其特异性尤其可靠, 另外两种定量 PCR 较小的产物片段使得它们具有更好的稳定性, 加上荧光定量 PCR 方法本身受污染可能性小、操作简便等固有优势, 使得前者更适用于柑桔黄龙病的检测。【结论】本研究建立的 2 种荧光定量 PCR 方法可以为柑桔黄龙病的病害早期诊断以及柑桔黄龙病病原菌近缘种的甄别提供准确、灵敏、快速的检验检疫技术。

**关键词:** *Candidatus Liberibacter asiaticus*; 黄龙病; SYBR Green I; TaqMan; 荧光定量 PCR

## Detection of Citrus Huanglongbing by Conventional and Two Fluorescence Quantitative PCR Assays

HU Hao<sup>1</sup>, YIN You-ping<sup>1</sup>, ZHANG Li-ping<sup>1</sup>, ZHAO Yun<sup>1</sup>, XIA Yu-xian<sup>1</sup>, WANG Zhong-kang<sup>1</sup>, QIN Jian<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Gene Function and Regulation at Chongqing, College of Bioengineering at Chongqing University, Chongqing 400030; <sup>2</sup>Zhegujiang Arboretum at Liuzhou City, Liuzhou 545002)

**Abstract:** 【Objective】The project aimed to develop an accurate, sensitive and fast technique for the early diagnosis of Huanglongbing and identification of *Ca. L. asiaticus*. 【Method】Conventional and two types of Fluorescence Quantitative Polymerase chain reaction (PCR) including SYBR Green I DNA-binding dye and TaqMan Probe approaches were established and optimized based on two pair of primers, CQULA03F/CQULA03R, CQULA04F/CQULA04R. TaqMan fluorescent probes were designed from the ribosomal protein gene sequence *rplJ/rplL* of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. The specificity and limitation of both SGI and TaqMan FQ-PCR methods were compared with conventional PCR. This was the PCR for suspension detection of *Ca. L. asiaticus* collection from citrus leaf midrib and recombinant plasmid DNA with a ribosomal protein gene target fragment. We also use the detection systems to monitor the dynamic change of the Huanglongbing pathogen in the host from July of 2004 to May of 2005 and obtained some useful information about the interaction between the host and the pathogen. 【Result】The three techniques (Conventional-PCR, SYBR Green I and TaqMan Q-PCR) stably detected target bacteria from symptomatic or asymptomatic citrus samples, and the sensitivity of FQ-PCR is higher than Conventional-PCR at 100-1000-fold (these are 439.0 fg· $\mu\text{l}^{-1}$ , 4.39 fg· $\mu\text{l}^{-1}$ , 0.44 fg· $\mu\text{l}^{-1}$  for conventional PCR, TaqMan and SGI PCR respectively); the TaqMan Q-PCR has robust specificity and higher accuracy but is more expensive compared with the SGI approach. 【Conclusion】This specific, accurate, sensitive and fast technique will play a key role for the early diagnosis of Huanglongbing and identification of *Ca. L. asiaticus*.

**Key words:** *Candidatus Liberibacter asiaticus*; Huanglongbing; SYBR Green I; TaqMan; FQ-PCR

收稿日期: 2005-09-28; 接受日期: 2006-09-25

基金项目: 教育部“春辉计划”项目(2003-589-18)资助, 科技部创新基金项目(03C26215101121)资助

作者简介: 胡浩(1983-), 男, 湖北黄石人, 硕士, 研究方向为分子微生物学。E-mail: cqquhao@126.com。通讯作者王中康(1956-), 男, 四川雅安人, 教授, 研究方向为分子微生物学。Tel: 023-66178808; E-mail: zkwang@cqu.edu.cn

## 0 引言

【本研究的重要意义】柑桔黄龙病 (huanglongbing, HLB) 是分布于中国南方部分柑桔产区 and 东南亚、非洲及美洲的严重的柑桔检疫性病害。该病由柑桔木虱 (*Diaphorina citri*) 取食新梢以及嫁接带菌接穗在田间传播, 随带病(虫) 种苗的调运而远距离传播。【前人研究进展】该病由难人工培养的韧皮杆菌所引起, 目前已报道 *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* 和 *Ca. L. americanus* 3 个暂订种<sup>[1,2]</sup>, 中国的黄龙病病原菌为亚洲种 (*Ca. L. asiaticus*)<sup>[3]</sup>。受全球性暖冬气候影响, 传病虫媒越冬北界逐年北移, 以及柑桔产业的发展, 带病(虫) 柑桔种苗的私调乱引增多而导致该病发生面积有逐年扩大的趋势<sup>[1,2,4]</sup>。由于黄龙病症状复杂, 传统的症状鉴定难免误判。电镜观察法因菌体分布不均很容易漏诊, 单克隆抗体法因病菌难培养特性导致的抗体制备过程繁琐, 而且专化性太强, 不能区别不同黄龙病菌的菌株, 至今未能推广应用<sup>[5]</sup>。20 世纪 90 年代中期法国 Dr. Bove 的研究小组利用 In2.6 特征片段设计的几对引物, 建立了柑桔黄龙病菌 PCR 扩增方法, 但因该法扩增片段过大、不能直接区别亚洲和非洲黄龙病菌, 必须通过 RFLP 法分析比较扩增产物的酶切图谱<sup>[6-9]</sup>。近年来国内亦有为数不多的几篇相关的柑桔黄龙病菌的 PCR 检测的研究报导<sup>[3,10,11]</sup>。【本研究的切入点】新兴的荧光定量 PCR 技术与常规 PCR 相比具有优越的灵敏度、特异性(以 TaqMan 探针法等杂交探针法为典型) 和稳定性<sup>[12-14]</sup>, 再加上它受污染的可能性小以及操作简便等特点使得这种技术成为更加适合于 HLB 检测的一种新的选择。【拟解决的关键问题】本文旨在优化柑桔黄龙病菌简易制样技术的基础上, 依据亚洲韧皮杆菌核糖体蛋白基因设计筛选的特异性引物对, 以柑桔黄龙病菌靶序列特征片段 (382 bp) 构建的重组质粒 DNA 为外参照系, 采用 iCycler™ (Bio-Rad, USA) 建立荧光定量 PCR 的检测平台, 为疑似柑桔黄龙病的早期诊断和寄主体内病原菌的动态监测提供一种稳定、可靠的检验检疫技术。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试柑桔样品和质粒

感病柑桔植株的斑驳叶片或疑似黄龙病样本采自广西、江西和浙江柑桔园, 阴性对照采自重庆忠县柑桔健康植株叶片。以“浸提—过滤法”提取样品

DNA<sup>[11]</sup>。其基本步骤如下: 撕取叶片中脉并尽量切碎, 将约 200 mg 中脉装入 1.5 ml 离心管后用 TES 缓冲液在 65℃ 下浸泡 30 min; 将浸泡液在 10 000×g 下离心 5 min, 取上清液转入 UNIQ-10 微滤柱 (Sangon, 上海) 10 000×g 离心 1 min; 用异丙醇清洗两次之后再空柱离心彻底甩干, 最后向柱中加入 50 μl ddH<sub>2</sub>O 10 000×g 离心 1 min 洗脱植物总 DNA, 所得即为 PCR 检测样品液。扩增的亚洲韧皮杆菌 DNA 片段与质粒 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 JM109 获得的靶片段的重组质粒 DNA (原液浓度为 1×10<sup>0</sup>=439 ng·μl<sup>-1</sup>) 的 10 倍梯度稀释液作为阳性对照、同时设置无模板反应混合液阴性对照、健康叶片 DNA 参比对照以及灭菌去离子水空白对照<sup>[12]</sup>。并以本中心收集保藏的 23 株 G<sup>+</sup> 或 G<sup>-</sup> 细菌包括柑桔叶面腐生菌以及其它植物病原细菌用于特异性测试。

### 1.2 柑桔黄龙病菌 PCR 检测体系

常规 PCR: 柑桔黄龙病菌供试引物对利用其核糖体蛋白基因 *rplJ/rplL* (GenBank 编号为 M94319) 按照 Primer premier 软件设计, 上海生物工程公司合成。通过预试筛选出最佳引物对为: CQULA03F: 5'-CAAGGAAAGAGCGTAGAA-3'; CQULA03R: 5'-CCTCAAGATCGGGTAAAG-3', 预期扩增片段 382 bp。PCR 反应体积为 25 μl, 含有终浓度为 1×PCR 缓冲液、0.25 μmol·L<sup>-1</sup> 靶序列引物对、0.3 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs、2.0 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、1U Taq 酶以及适量模板。PCR 反应程序: 预扩增 94℃ 2 min; 92℃ 20s, 56℃ 30s, 72℃ 45s, 共 30 个循环; 末次延伸 72℃, 7 min。

荧光定量 PCR: 采用 TaqMan 水解探针法和 SYBR Green I 荧光染色法进行, 利用亚洲韧皮杆菌核糖体蛋白基因 *rplJ/rplL* 的特异性靶序列按照 Primer Express 软件 (ABI, USA) 设计 CQULA04F/CQULA0R 引物对 (5'-TGGAGGTGTA AAAAGTTGCCAAA-3'/5'-CCAA CGAAAAGATCAGATATTCCTCTA-3') 与 TaqMan 水解探针 CQULAP (5'-ATCGTCTCGTCAAGATTGCT ATCCGTGATACTAG-3'), 由上海生物工程公司合成引物, TaqMan 荧光探针 5'端、3'端分别用 FAM 报导荧光染料和 TRAMA 淬灭荧光染料标记, 铝膜袋闭光保存于 -20℃ 备用。

TaqMan 水解探针法: 采用 25 μl 反应体系, 含有终浓度 1×PCR Buffer (Bio-Rad, Master Mix)、0.8 μmol·L<sup>-1</sup> 引物对 UCLAR04/UCLAF04、0.2 μmol·L<sup>-1</sup> TaqMan 探针以及适量模板。PCR 反应程序: 在 iCycle™ (Bio-Rad, USA) 荧光定量 PCR 仪上进行,

预扩增 95℃, 1 min; 然后 95℃, 15s, 59℃, 15s, 72℃, 45s, 45 个循环; 末次延伸 72℃, 7min; 在每个循环的延伸阶段 (72℃) 同步多次采集荧光。

SYBR Green I 荧光染料法: 25  $\mu\text{l}$  的反应体系, 含有终浓度为  $1\times\text{PCR}$  缓冲液 (Bio-Rad, SYBR Green Mater Mix)、 $0.8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的引物对 UCLAR04/UCLAF04 以及模板适量。PCR 反应程序、荧光采集阶段同上述水解探针法。PCR 扩增结束后立即进行熔解曲线分析, 以验证扩增的特异性。做熔解曲线的程序为: 95℃, 1 min; 55℃, 1 min; 从 55℃ 开始每升高 0.5℃ 保持 10s, 连续升高 80 次 (到 95℃ 为止)。

### 1.3 寄主体内柑桔黄龙病菌的周年监测

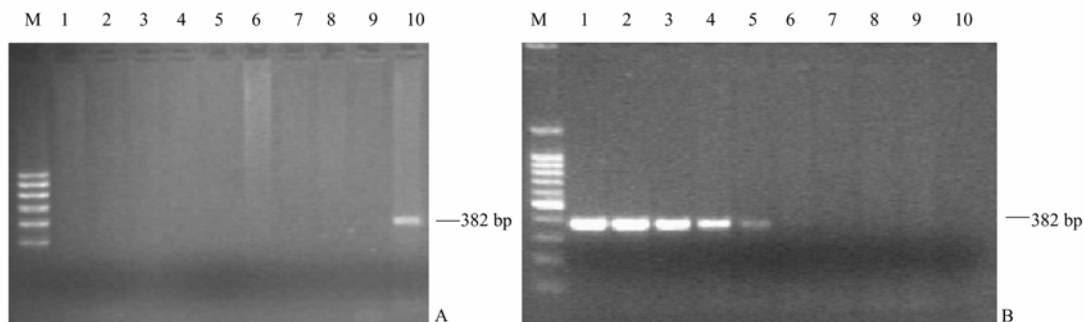
从 2004 年 7 月至 2005 年 5 月在广西柳州市鹧鸪湖柑桔园艺场, 选择感病寄主椪柑、沙田柚, 在柑桔春、夏、秋梢抽发期, 定点定株采集叶片样品, 利用常规 PCR 对采自感病柑桔植株的样品进行逐月连续检测。DNA 样品存放于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。再用荧光定量 PCR 标准曲线定量法, 对上述样品进行定量分析, 以便研究柑桔黄龙病菌在寄主体内病原细菌的周年数量变化动态。

## 2 结果与分析

### 2.1 常规定性 PCR 的检测性能

感病植株样品或柑桔黄龙病菌特异序列片段重组质粒 DNA 可以稳定地扩增出特异性靶带 (382 bp), 而柑桔溃疡病菌 DNA, 柑桔衰退病菌 cDNA 和其它一些柑桔叶片表面的腐生细菌 DNA 以及健康柑桔组织中提取的 DNA 都不能扩增同一靶带, 这说明引物对的检测特异性好 (图 1-A)。用重组质粒 DNA 的 10 倍梯度稀释的 8 个样品进行扩增试验, 浓度为  $10^3$  到  $10^6$  的 4 个样品都能扩增出明显的靶带, 到 5 号样品 ( $10^{-7}$ ) 时靶带微弱、模糊, 表明实际检测时常规 PCR 的灵敏度能达到  $0.439\ \text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  (图 1-B)。常规 PCR 检测方法的稳定性, 除了与引物特异性和扩增片段大小等因素有关外, 还与样品模板量有关; 通过 CTAB 法、硅胶膜过滤法、直接浸提法和浸提-过滤法等 4 种制样方法比较<sup>[12]</sup>, 证实浸提-过滤法能很好地把柑桔样品中的 PCR 抑制因子如植物色素和多糖物质等排除, 从而有效地避免假阴性, 提高检验的稳定性。

### 2.2 实时荧光定量 PCR 的检测性能



A. 常规 PCR 检测特异性。M. DNA 分子量标准 (300~800bp); 1. 从健康柑桔叶片中提取的 DNA; 2. 从柑桔衰退病毒 (CTV) 的 ssRNA 反转录得到的 cDNA; 3~8. 从柑桔叶片腐生细菌中提取的 DNA; 9. 大肠杆菌 DNA; 10. 从感染黄龙病的柑桔叶片中脉提取的 DNA。B. 常规 PCR 检测灵敏度。M. DNA 分子量标准 (100~1500bp); 1~8. 质粒标准品模板的 10 倍梯度稀释样品依次从  $439\ \text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  到  $0.04\ \text{fg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; 9. 阴性对照; 10. 空白对照

A. Specificity of conventional PCR assay. M. DNA ladder (300-800bp); 1. DNA extracted from healthy citrus leaves; 2. The cDNA revers transcribed from Citrus Tristeza ssRNA virus; 3-8. DNA extracted from saprophytic bacteria on the citrus leaves; 9. DNA extracts from *E.coli* untransformed; 10. DNA extracted from midrib of HLB-infected leaf sample. B. Sensitivity of conventional PCR assay. M. DNA ladder; 1-8. The amounts of plasmid DNA of target fragment:  $439\ \text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $43.9\ \text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $4.39\ \text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $0.44\ \text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $43.90\ \text{fg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $4.39\ \text{fg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $0.44\ \text{fg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ,  $0.04\ \text{fg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ; 9. Tested sample without template as negative control; 10. The only filtered ddH<sub>2</sub>O as blank control

图 1 常规 PCR 检测性能表现

Fig. 1 Specificity of Conventional PCR assay

### 2.2.1 TaqMan 水解探针法

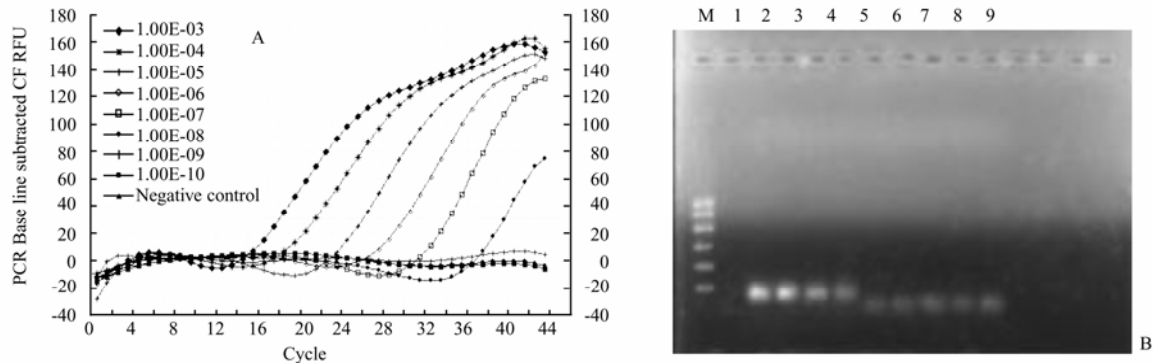
检测特异性: 供试的 23 种柑桔叶面附生细菌和已知植物病原细菌与柑桔黄龙病菌在同样条件下进行扩增, 最终只有柑桔黄龙病菌样品出现阳性反应, 采集

到荧光增长曲线, 而其它所有的供试细菌菌株均没有获得荧光累积。这证明了探针和引物的特异性很好, 同时也说明该方法中 TaqMan 探针的加入确保了检测的特异性。

检测灵敏度：将纯化的浓度为  $439 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  (Beckman 紫外分光光度计) 的重组质粒 DNA 以 10 倍梯度稀释 10 个梯度，在上述 FQ-PCR 反应条件下，经过 45 个循环后，测试结果表明，模板浓度为  $10^{-3}$  到  $10^{-8}$  的 6 个样品均能出现明显的荧光累积而使荧光值达到荧光阈值 (Threshold) 以上，而稀释度  $10^{-9}$  和  $10^{-10}$  的 2 个样品在经历 45 个循环后 仍然没有出现显著的荧光增长，并且其中  $10^{-8}$  样品达到阈值的时间比

预期的稍晚 (图 2-A 中表现为 Ct 值偏大)，这可以归因于样品稀释度过大、靶标 DNA 模板量太少而导致上样误差 (图 2-A)。综合重复验证结果，确定 TaqMan 探针法对柑桔韧皮杆菌的检测下限为  $10^{-8}$ ，即  $4.39 \text{ fg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  (相当于靶标基因拷贝数  $1\ 290 \text{ 拷贝}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ，每管含有约 2 580 个拷贝)，这比常规 PCR 的检测灵敏度高 2 个数量级 (图 2-B)。

检测准确性：TaqMan 探针法与常规 PCR 的检测



A. TaqMan 探针法的检测灵敏度。是用 TaqMan 探针法以 10 倍梯度稀释的质粒标准品做模板做出的扩增曲线以确定该方法的检测灵敏度。之后用琼脂糖凝胶电泳对做出上述曲线的产物进行分析得到图 2B。B. TaqMan 探针法的产物用凝胶电泳分析。M: DNA 分子量标准 (100-600bp); 1-8. 代表模板的浓度从  $10^{-3}$  到  $10^{-10}$ ; 9. 阴性对照。通过比较两张图可以看出同样的模板在 TaqMan 探针法中前 6 个给出了阳性反应，而在凝胶图 (代表常规 PCR) 上只能看到前 4 个样品的靶带，从而得出前者比后者灵敏 100 倍的结论。

A. Detection sensitivity of TaqMan FQ-PCR. Shows the detection sensitivity using 10-fold serial dilution of recombinant plasmid DNA by TaqMan FQ-PCR. B. The TaqMan products analyzed by agarose gel electrophoresis. M: DNA marker (100-600bp); 1-8. 10-fold serial dilution of recombinant plasmid of *Ca. L. asiaticus* from  $10^{-3}$  to  $10^{-10}$ ; 9. Negative control. In FQ-PCR there are 6 samples with dilution of DNA from  $10^{-3}$ - $10^{-8}$  exceed the threshold, while in the conventional PCR, only the first 4 dilution samples can be amplified and observed in agarose gel, the other 4 samples and the negative control only give the weak bands of primer-dimer. This verified that the Q-PCR is more sensitive than conventional PCR at  $100\times$  fold

图 2 TaqMan 探针法与常规 PCR 的检测灵敏度对比

Fig. 2 The contrast between TaqMan FQ-PCR and conventional PCR

灵敏度比较测评结果表明，选取其中阳性检出率较高的 3 批常规 PCR 已测样品，再用 TaqMan 探针法重新检测，检测特异性基本相同，但常规 PCR 检测的部分阴性样品经荧光定量 PCR 检测结果为阳性，这证明荧光定量 PCR 的灵敏度较常规 PCR 更高，能够检出样品中痕量的病原菌。

**2.2.2 SYBR Green I 荧光染料法** SYBR Green I 荧光染料法与上述 TaqMan 探针法的扩增程序基本相同，但应测定溶解曲线以验证扩增产物的特异性。试验数据显示：(1) 该法特异性较 TaqMan 探针法稍差，不含有靶序列的多个样品在反应后期 (约 35 个循环之后) 都出现了明显的荧光增长，不过溶解曲线分析可以看出这些荧光来自引物二聚体 (表现为非 HLB 病菌样品与阴性对照出现了一致的，但与阳性对照溶解温度不同的 1 个侧峰，参见图 3)，可见本试验采用的

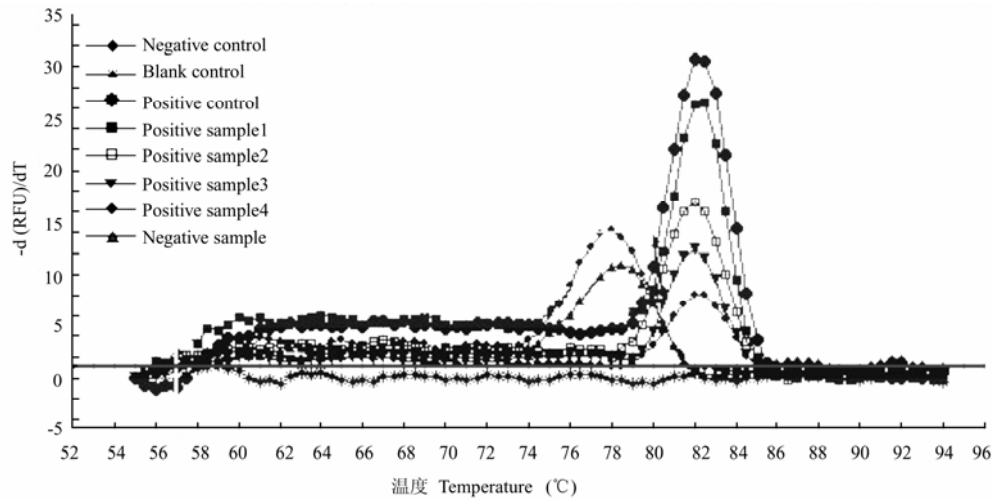
引物 UCLA04F/ UCLA04R 对靶标病原菌的特异性强；

(2) SYBR Green I 荧光染料法的灵敏度试验显示该方法比 TaqMan 探针法灵敏度更高，在同样试验条件下，稀释度为  $10^{-9}$ ，即  $0.439 \text{ fg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  的样品也达到了荧光阈值，而  $10^{-10}$  样品也有明显的荧光增长；(3) 准确性试验与 TaqMan 探针法的结果完全一致。

### 2.3 周年监测结果

表 1 中给出了利用常规 PCR (引物对为 CQULA 03F/CQULA03R) 对广西柳州柑桔黄龙病染病样品周年检测的结果，可以看出 9 到 12 月份的阳性检出率是最高的，而 3 到 5 月份则是检出率最低的阶段，这种检出率的变化主要是由常规 PCR 方法本身的灵敏度所引起的，即当样品中病原菌含量太少时就会产生假阴性的结果，这一点用 TaqMan 荧光 PCR 方法的定量检测结果可以给出一定的解释 (同样的样品再用此方

法检测都获得了阳性结果,并且数据显示 9 到 12 月份 病菌含量最高,比含量最低的 3 到 5 月份高出约 100 倍,此定量结果已另文发表)。



溶解曲线主要可以告知产物中有几个溶解峰型(根据峰值温度来分)。图中有两组峰,右边的一组(峰值温度在 82°C)为目标产物的峰型,左边的(峰值温度在 78°C)为引物二聚体形成的峰。使用 SYBR Green I 染料法时出现的扩增曲线可能是由引物二聚体引起的,而并非目标产物的扩增,用溶解曲线可以区分这种情况

The most important information the melt curve can deliver to the readers is the peak types which are divided according to the temperature of peaks. In Fig.3, there are two types peaks: the right group(peak temperature at 82°C) shows the specific amplicons amplified; while the left group (peak temperature at 78°C) shows the primer-dimers. Sometimes the increase of fluorescence dose not represent the specific amplification due to primer-dimmers' formation when using SYBR Green I assay, we can discriminate this case after making this kind of melting curve

图 3 SYBR Green I 染料法的溶解曲线

Fig. 3 The melt curve of SYBR green I assay

表 用常规 PCR 检测广西柳州样品结果

Table Detection of HLB pathogen by routine PCR for tested samples from Liuzhou, Guangxi

取样日期 Sampling date	检测结果 Results of detection								阳性率 Positive(%)
	1 <sup>#</sup>	2 <sup>#</sup>	3 <sup>#</sup>	4 <sup>#</sup>	5 <sup>#</sup>	6 <sup>#</sup>	7 <sup>#</sup>	8 <sup>#</sup>	
2004/07	+	+	+	+	+	+	+	-	87.5
2004/08	+	+	+	+	-	+	+	+	87.5
2004/09	+	+	+	+	+	+	-	+	87.5
2004/10	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
2004/11	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
2004/12	+	+	+	+	+	-	+	+	87.5
2005/01	+	+	+	+	+	+	+	-	87.5
2005/02	+	+	+	-	+	+	+	+	87.5
2005/03	+	+	-	+	+	+	-	+	75.0
2005/04	-	-	+	-	+	-	-	+	37.5
2005/05	+	-	-	+	+	+	-	+	62.5

从染病但没有显症的沙田柚和椪柑上取样,从树冠的各个方向各取 40 片新成熟的叶片。+代表检测阳性, -代表检测阴性。

Tested samples collected from infected Shatian pumello and mandarin, each with 40 pieces newly mature leaf from surrounding canopy, without typical symptom from Liuzhou, Guangxi Province; “+”stands for sample with HLB pathogens, “-”stands for tested samples without pathogens

### 3 讨论

3.1 基于差异基因设计的种特异性引物对于植物病害诊断和病原菌近缘种的鉴定是至关重要的<sup>[15]</sup>。只要

特异性引物设计合理,扩增片段适中,以重组质粒作为模板时常规 PCR 的灵敏度可以达到  $10^2\text{fg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  的数量级(图 1),但是,对于柑桔黄龙病这种难培养细菌,植物组织中如叶脉中病原菌分布不均匀,数量不

高,加上制样比较繁琐,所以用常规 PCR 难免出现假阴性的情况;另外,常规 PCR 检测是用电泳来判定结果,这种在凝胶上寻找靶标 DNA 条带具有不可靠性(模糊的条带在不同人看来会得出不同的结果),而且因使用致癌物质而影响安全。

继常规 PCR 检测技术之后,新兴的实时荧光定量 PCR 技术凭借其初始模板量准确定量、灵敏度高(这一点对于柑桔黄龙病检测尤其重要)、特异性强、闭管操作、简便迅速等优点,已经成为国内外分子生物学研究中的主流技术<sup>[13]</sup>并在植物检疫中崭露头角<sup>[14]</sup>。实时定量荧光 PCR 是利用荧光信号伴随着 PCR 产物的增加而增强的原理,在 PCR 扩增过程中,连续不断地检测反应体系中荧光信号的变化。根据荧光信号基线的平均值和平均标准差,在 99.7%置信度时计算出大于平均值的荧光值即阈值,然后收集荧光信号增强到预定阈值时的 PCR 循环次数(即 Ct 值)。该循环参数和 PCR 反应体系中起始 DNA 模板量的对数值之间有严格的线性关系。利用阳性梯度稀释标准品的 Ct 值绘制成标准曲线,再根据检测样品的 Ct 值就可以准确地测定靶标病原菌的起始模板的拷贝数<sup>[13,16]</sup>。本研究基于 iCycler™ 荧光定量扩增仪建立的 TaqMan 探针 FQ-PCR 技术体系的检测灵敏度至少可以达到 4.39 fg·μl<sup>-1</sup>。其中 TaqMan 探针法使用 1 对引物和 1 条两端用不同的荧光染料标记的 TaqMan 水解探针,检测特异性足以令人信服。而与双链 DNA 非特异性结合的 SYBR Green I 荧光染料法,由于每一双链 DNA 分子能和多个 SYBR Green I 染料分子非特异性结合,荧光信号比前者更强,因此灵敏度也就更高,但同时引物自身的特异性要求较高,且要避免形成引物二聚体,造成检测的假阳性(可以用溶解曲线帮助判断,图 3)。因此在基因表达研究中可以采用 SYBR Green I FQ-PCR 法,而在病原菌检测时推荐使用 TaqMan 探针法<sup>[15]</sup>。

**3.2 对如何实现对 PCR 起始模板的定量方面,** FQ-PCR 技术有效地解决了传统的半定量只能终点检测的局限,实现了每一轮循环均可动态检测并自动记录荧光信号强度,并通过计算每个样品的重现性极好且与起始模板具有线性关系的 Ct 值<sup>[13,15]</sup>,根据标准曲线获得定量结果。FQ-PCR 不需要内标,避免了两种模板之间的干扰和竞争,是一种准确、可靠的科学定量方法<sup>[17]</sup>。标准曲线法需要有较高的 PCR 扩增效率<sup>[13]</sup>。

**3.3 经病区定点连续取样对感病柑桔植株体内菌量**

动态变化的为期近一年的监测结果表明,柑桔黄龙病菌在寄主植物体内的带菌量随季节呈现明显的变化,可能与寄主植物韧皮部组织内营养状况和环境条件如气温变化、木虱数量有一定关系(定量结果已另文发表)。本研究建立的荧光定量 PCR 检测方法将为柑桔黄龙病的病害早期诊断、柑桔黄龙病病原菌近缘种的鉴定提供一种特异准确、灵敏快速的检测技术。

## 4 结论

本研究建立了用于柑桔黄龙病检测的荧光定量 PCR 方法体系,为柑桔黄龙病早期诊断以及病原菌鉴定提供了新的准确可靠、灵敏快速的检疫技术。

## References

- [1] Teixeira D A, Danet J L. Citrus Huanglongbing in San Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes*, 2005, 19:173-179.
- [2] Teixeira D A, Saillard C, Eveillard S, Danet J L, da Costa P I, Ayres A J, Bove J. 'Candidatus Liberibacter americanus' associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 1857-1862.
- [3] 廖晓兰, 朱水芳, 赵文军. 柑桔黄龙病病原 16SrDNA 克隆、测序及实时荧光 PCR 检测方法的建立. *农业生物技术学报*, 2004, 12(1): 80-85.  
Liao X L, Zhu S F, Zhao W J. Cloning, Sequencing of 16S rDNA of HLB and establishment of real time PCR method. *The Journal of Agri-Biotechnology*, 2004, 12(1): 80-85. (in Chinese)
- [4] Knighten C, Redding J, Feiber D, Compton E, 2005. Department press release. U.S. Department of Agriculture and Florida Department of Agriculture confirm detection of citrus greening. [[http://www.doacs.state.fl.us/press/2005/09022005\\_2.html](http://www.doacs.state.fl.us/press/2005/09022005_2.html)]
- [5] Da Graca J. V. Citrus greening disease. *Annul Review of Phytopathology*, 1991, 29: 109-136.
- [6] Jagoueix S, Bove J M, Garnier M. PCR detection of the two "Candidatus" Liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes*, 2000, 14: 43-50.
- [7] Bove J M, Chau N M, Trung H M, Bourdeaut J, Garnier M. Huanglongbing (greening) in Vietnam: detection of Liberobacter asiaticum by DNA-hybridization with probe In2.6 and PCR-amplification of 16S ribosomal DNA. In: Da Graca J, Moreno P, Yokomi R K, eds. *Proceedings of the 13<sup>th</sup> Conference of the*

- International Organization of Citrus Virologists*, 1996: 258-266.
- [8] Hocquellet A, Toorawa P, Bove J M, Garnier M. Detection and identification of the two Candidatus Liberobacter species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the  $\beta$ -operon. *Molecular and Cellular Probes*, 1999, 13: 373-379.
- [9] Planet P, Jagouxie S, Bove J M, Garnier M. Detection and characterization of the African citrus greening liberobacter by amplification, cloning and sequencing of the *rplKAJL-ropBC* operon. *Current Microbiology*, 1995, 30: 137-141.
- [10] 田亚南, 柯 穗, 柯 冲. 应用多聚酶链式反应 (PCR) 技术检测和定量分析柑桔黄龙病病原. 植物病理学报, 1996, 26: 243-250.  
Tian Y N, Ke H, Ke C. Detection and quantitation of citrus Huanglongbing pathogen by polymerase chain reaction. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1996, 26: 243-250. (in Chinese)
- [11] Wang Z K, Gast T C, Molin J M. Rapid detection of liberibacter asiaticus in citrus by PCR amplification of 16s rDNA and ribosomal protein. *Proceedings of The First Asian Conference on Plant Pathology*, 2000, 8: 180.
- [12] Archie L. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2002, 82: 279-300.
- [13] Ginzinger D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 2002, 30:503-512.
- [14] Schaad N W, Frederick R D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canada Journal of Plant Pathology* 2002, 24: 250-258.
- [15] Dieffenbach C W. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 187-197.
- [16] Filion M, St-Arnaud M, Jabaji-Hare S H. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *Journal Microbiology, Methods*, 2003, 53: 67-76.
- [17] Ke L D, Chen Z, Yung W K. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Molecular and Cellular Probes*, 2000, 14(2): 127-135.

(责任编辑 王红艳)