

柑桔溃疡病菌实时荧光定量 PCR 检测与应用

殷幼平¹ 黄冠军¹ 赵 云¹ 刘 洪² 王中康^{1*}

(1. 重庆市基因功能及调控重点实验室, 重庆大学生物工程学院, 重庆 400030;
2. 重庆市农业技术推广总站植保植检站, 重庆 400020)

摘要: 根据地毯草黄单孢 Xac306 菌株 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac 306) 已知全基因组中独有蛋白基因序列设计的特异性引物对和探针, 建立并优化 SYBR Green I (SGI) 荧光染料和 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测体系, 用于柑桔溃疡病早期诊断鉴定。结果表明, 建立的两种定量 PCR 体系均能特异地检出 Xac 的细胞和其基因组 DNA, 而对其它测试的植物病原菌和柑桔表面的腐生黄单孢菌都不能检出。SGI 法和 TaqMan 探针法对 Xac 细菌悬浮液的检测灵敏度均可达到 1~5 个细菌/反应, 对 Xac 靶标片段 DNA 的检测灵敏度可达 1 fg/ μ L。两种定量 PCR 检测方法比常规 PCR 灵敏度高 2~3 个数量级。对田间采集的 328 个柑桔显症、疑似症状和无症带菌材料富集培养样品进行了实际检测, 结果表明, 实时荧光 PCR 适合柑桔无症带菌样品的早期检测。

关键词: 柑桔溃疡病菌; 定量 PCR; 荧光染料; TaqMan 探针; 检测

Establishment and application of real time fluorescent PCR approaches for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Yin Youping¹ Huang Guanjun¹ Zhao Yun¹ Liu Hong² Wang Zhongkang^{1*}

(1. Key Laboratory of Gene Function and Regulation at Chongqing, College of Bioengineering of Chongqing University, Chongqing 400030, China; 2. Plant Protection and Inspection Station of Agro-tech Extension General Station of Chongqing, Chongqing 400020, China)

Abstract: The primers and probes were designed based on the putative protein gene sequence in complete genome of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain 306 (Xac 306), and used separately to establish and optimize SYBR Green I dye (SGI) and TaqMan probe real time fluorescent quantitative PCR (RTi-PCR) approaches for citrus bacterial canker disease detection. The results showed that only the target pathogen Xac and its DNA can be detected, while other bacteria including saprophytic xanthomonads from citrus leaf surface and related plant pathogens cannot be detected. The sensitivity of real time fluorescent quantitative PCR is higher than that of conventional PCR by 100–1000 fold. The practice detections of suspicious symptomatic or asymptomatic samples collected in citrus orchards from citrus diseased area have been performed with fluorescent RTi-PCR method after pathogen enrichment. The results suggested that, as a sensitive and reliable diagnosis and identification method, RTi-PCR meets the requirement of pre-symptomatic detection of citrus pathogen.

Key words: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; RTi-PCR; SYBR Green I; TaqMan probe; detection

基金项目: 农业部重点项目(2003-589-18)和科技部创新基金项目(05C26215111399)

作者简介: 殷幼平, 女, 1955年生, 教授, 研究方向为分子微生物学, email: ypy128@sina.com, Tel: 023-65120489

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: zkwang646@sina.com

收稿日期: 2007-08-21

柑桔溃疡病 (citrus bacterial canker disease) 是影响全球柑桔种植业发展的重大检疫性病害,能侵染危害绝大多数柑桔栽培品种,其病原菌为地毯草黄单孢柑桔致病变种 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, 是国内外重大检疫性有害生物。该病通过显症或无症状带菌种苗、接穗、果实等柑桔材料远距离传播,在田间则主要通过风雨而扩散。目前我国正在实施柑桔非疫区建设,对柑桔溃疡病菌的准确鉴定及疫情的流行监测和早期诊断,都迫切需要建立适合于疑似症状或无症状带菌样品的灵敏可靠的分子检测技术。现有的常规 PCR 技术比起症状、形态鉴定和免疫检测方法是一个革命性的进步,但仍然存在检测灵敏度较低,假阳性和假阴性问题出现频率较高,不能对无症状带菌的柑桔样品进行准确稳定的检测的问题^[1-5]。实时荧光定量 PCR 具有更高的检测灵敏度和特异性,能对病原物进行定量检测,且不需要凝胶电泳分析,整个检测过程仅需要 1.5 h 就能获得检测结果,运用范围越来越广泛^[6]。

本研究旨在根据柑桔溃疡病菌独有的蛋白基因的特异序列,设计筛选特异的引物对及探针,通过优化定量 PCR 反应条件,建立 SYBR Green I 荧光染料和 TaqMan 荧光探针的两种特异、准确的定量 PCR 检测体系,并用于非疫区建设柑桔溃疡病疫情的动态监测与早期诊断。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和培养方法

供试 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac Gx01 菌株由重庆大学基因工程研究中心提供;供试阴性菌株包括分离自健康柑桔叶面的腐生黄单孢菌 *Xanthomonas* spp.、野油菜黄单孢菌 *X. campestris* pv. *campestris*、水稻细条病菌 *X. oryzae* pv. *oryzicola*、假单孢杆菌 *Pseudomonas* spp.、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*、草生欧氏杆菌 *Erwinia herbicola*。供试菌株除 Xac Gx01 在 PSA 培养基上培养外,其余菌株均采用 LB 培养基,28 °C 培养 48 h 后供试。细菌基因组 DNA 采用上海生物工程公司的试剂盒提取,紫外分光光度计测定其浓度后于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.2 主要仪器和试剂

实时荧光 PCR 仪, Icyler™ iQ, Bio-Rad, USA; 紫外分光光度计, Beckman DU-640; 凝胶成像系统, VersarDoc 1000, Bio-Rad, USA。Real time PCR Mas-

ter mix, 购自 ToYoBo 公司; Taq DNA 聚合酶、Hotstar Taq DNA 聚合酶、MgCl₂、PCR 反应缓冲液、dNTPs, 购自北京天为时代科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自上海生物工程公司; E. Z. N. A™ 质粒小抽试剂盒, 购自 Sigma 公司。

1.3 引物与探针的设计与筛选

按照王中康等^[4]根据柑桔溃疡病菌菌株独有的蛋白基因序列设计的特异性引物 CQUJYF05 和 CQUJYR05 扩增 Xac Gx01。将扩增产物 DNA 经克隆测序后根据荧光定量 PCR 引物和探针设计的基本原则(与 DNA 序列互补,长度适当(28 bp 左右),不能与引物碱基配对),使用引物设计软件 Primer Premier 5.0、Oligo 6.0、Primer Express 配合设计引物和探针。再将引物、探针序列在 NCBI 数据库进行同源性比对,筛选出特异性强且性能稳定的引物对及杂交探针,提交上海生工生物工程公司合成。TaqMan 探针的 5' 端用 6-羟基-荧光蛋白(FAM490)标记作为荧光报告染料,在 3' 末端用猝灭剂染料 6-羟基-四甲基-罗丹明荧光染料(TAMRA)标记并经过去羟基化处理,以避免在 Taq 酶作用下发生延伸。全部参试引物对及荧光探针详见表 1。

1.4 RTi-PCR 反应程序

SYBR Green I 和 TaqMan 定量 PCR 反应试剂分别使用了 ToYoBo 公司及基因中心自配的反应混合液。优化条件包括 Mg²⁺ 浓度、引物浓度、TaqMan 探针浓度。

SYBR Green I 反应体系一:采用市售 2 × SYBR Green I Real-time PCR Master mix 5 μL, 10 μmol/L 引物各 0.2 μL, 模板 2 μL, 加灭菌 ddH₂O 至 10 μL; SYBR Green I 反应体系二:基于自配 PCR 反应混合液掺加 1 U 热启动 Taq DNA 聚合酶和 1 μL 10 × SYBR Green I 荧光染料, 2 μL 模板, 加灭菌 ddH₂O 至 10 μL。

TaqMan 探针反应体系一:采用市售 2 × TaqMan probe Real-time PCR Master mix 5 μL, 10 μmol/L 引物各 0.5 μL, 模板 2 μL, 加灭菌 ddH₂O 至 10 μL; TaqMan 探针反应体系二:基于自配 PCR 反应混合液掺加 1 U Hotstar Taq DNA 聚合酶, 10 μmol/L 引物各 0.5 μL, 10 μmol/L CQUXacp 07 或 CQUXacp 08 0.5 μL, 模板 2 μL, 加灭菌 ddH₂O 至 10 μL。

采用三步法(95 °C 4 min; 94 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 30 s 并收集荧光, 40 个循环)和两步法(95 °C 4 min; 94 °C 15 s, 60 °C 30 s 并收集荧光, 40 个循环)进

表 1 实时荧光 PCR 检测 Xac Gxo1 所用的引物对和探针
Table 1 Tested primer pairs and TaqMan probes for detection of CBCD with FQ-PCR

引物对 Primer pair	引物与探针序列 Sequence of primers and probe	靶标片段 Target fragment (bp)	用途 Used for
CQUXacF01	5'-CGG CAG ATT GGA AGT CA-3'	137	SGI
CQUXacR01	5'-TCC AGC ACA TAC GGG TC-3'		
CQUXacF02	5'-GTT CGG CGT CAA CAA C-3'	107	SGI
CQUXacR02	5'-CGG TAG GCG ACT CAT TT-3'		
CQUXacF03	5'-GAG TCG CCT ACC GAG AAA TCC-3'	88	SGI
CQUXacR03	5'-ACC ACG GCA GGG TGA AGA C-3'		
CQUXacF04	5'-TCG CCT ACC GAG AAA TCC C-3'	253	SGI
CQUXacR04	5'-CCG AAC CCT TGA CCA GCA T-3'		
CQUXacF05	5'-TGA GTC GCC TAC CGA GAA A-3'	84	SGI
CQUXacR05	5'-GAC CAC GGC AGG GTG AAG A-3'		
CQUXacF06	5'-GTC GCC TAC CGA GAA ATC C-3'	81	SGI
CQUXacR06	5'-GAC CAC GGC AGG GTG AAG A-3'		
CQUXacF07	5'-GAG TCG CCT ACC GAG AAA TCC-3'	82	TaqMan
CQUXacR07	5'-GAC CAC GGC AGG GTG AAG A-3'		
CQUXacP07	5'-AGTGTCTCGGAAATTCGACCTCTCCGAAC-3'		
CQUXacF08	5'-CGT CAA CAA CCT GGA GAG CA-3'	100	TaqMan
CQUXacR08	5'-GGT AGG CGA CTC ATT TCC CA-3'		
CQUXacP08	5'-CGACGTTTCTACCTCTCATACTCCCAGCC-3'		

行定量 PCR 扩增。

1.5 定量 PCR 标准样品和检测样品制备及标准曲线的制作

无害化重组阳性对照按王中康等^[4]2004 年方法构建。使用时以 E. Z. N. A™ 质粒小抽试剂盒提取重组质粒 DNA, 制备的质粒 DNA 样品经紫外分光光度计测定其浓度后, 于 -20 °C 冰箱保存备用。按照下列公式计算提取的克隆载体 DNA 拷贝数:

$$CN = \frac{M \times N}{L \times D}$$

式中: M : 待测核酸的最低浓度 (g/mL); N : 阿佛加得罗常数 (6.022×10^{23} molecules/mole); L : 待测核酸的总长度 (kb); D : 1 kb 的核酸转换成道尔顿分子质量的转换系数, 对于双链 DNA, $D = 6.6 \times 10^5$ g/mole/kb。将克隆载体 DNA 作 10 倍梯度稀释作为 PCR 的标准模板, 在 RTi-PCR 检测时制作标准曲线。数据分析由 Icycler™ iQ optical system software version 3.0a 完成。

疑似症状柑桔材料制备按文献[7-8]修改而成。将疑似病斑切下放入微量离心管, 加入 200 μ L 浸泡液振荡后, 在室温下浸泡 20 min 后移出植物组织。浸泡液 8 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 留试管底部约 100 μ L 残存液作为待测模板。

疫区柑桔无症状带菌样品富集法制备: 取取自疫区病树周围无症状树的叶片 10 片放入自封式塑料袋中, 加入 0.1% 蔗糖水溶液 10 mL, 28 °C 振荡富集培养 1 h 后, 吸取 2 mL 富集培养液, 取 100 μ L 接种于 PSA 培养基, 涂抹均匀后于 28 °C 培养 72 h, 计数淡黄色 Xac 单一微小菌落, 计算菌液浓度 (cfu/mL), 重复 3 次。挑取 Xac 疑似单菌落并用常规 PCR^[4]验证。剩余培养液 8 000 r/min 离心 5 min, 倒去上清液, 留约 100 μ L 残存液供定量 PCR 验证检测。

柑桔无症状带菌标准样品制备 (定量掺加法): 把 Xac Gxo1 菌悬浮液用分光光度计 (600 nm) 调节光密度 OD 值 0.3, 菌液浓度约为 10^8 cfu/mL, 再经 10 倍系列稀释为 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 cfu/mL, 喷洒在检疫温室栽种的的健康柑桔植株叶片两面, 风干后用直径 6 mm 打孔器打取各浓度带菌叶片小圆片 50 片, 加入无菌水 1 mL 室温下振荡洗涤, 洗涤液 8 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 留离心管底的残余液约 200 μ L, 分别用于分子检测和涂抹 PSA 平板分离柑桔溃疡病菌。

PCR 检测的阳性对照可以分别采用病原细菌 Xac Gxo1 的细胞悬浮液或经大肠杆菌 JM109 转化靶片段 pMD18-T 质粒 DNA^[4]。DNA 用紫外分光光度计 260 nm 测定后, 用无菌蒸馏水 10 倍梯度稀释。阴性对照采用从健康柑桔植株中提取的基因组

DNA 或健康叶片浸泡液代替模板。

1.6 检测的灵敏度和特异性测定

将克隆质粒 DNA 和 *Xac* Gxo1 菌液经 10 倍梯度稀释后作为模板,分别进行 SYBR Green I 及 TaqMan 探针两种荧光 PCR 扩增,以确定两种定量 PCR 方法的检测下限。

将 *Xac* Gxo1 基因组 DNA 10 倍系列稀释液作为阳性对照;健康柑桔组织用制样液浸泡 30 min,浸提液用作阴性对照。上述不同供试细菌菌株配成浓度为 1×10^5 cfu/mL 菌悬液进行两种荧光 PCR 测定。

2 结果与分析

2.1 RTi-PCR 的优化反应体系

RTi-PCR 反应采用 10 μ L 体系,其中模板 2 μ L,供试 PCR 反应混合液均能形成扩增曲线,其中自配反应试剂对两种实时荧光 PCR 检测均适用,且 PCR 扩增效率高、检测成本低。在对自配反应试剂进行优化时,使用了热启动 *Taq* DNA 聚合酶,能有效地减小荧光本底值,基线值(threshold position)更低。热启动 *Taq* DNA 聚合酶需要 94 ~ 95 $^{\circ}$ C 高温处理一定时间才能使酶活性完全恢复,此步骤还可同时进行菌体的裂解、DNA 释放并变性。

通过比较发现在扩增片段较小的情况下,对于两种定量 PCR,两步法扩增比三步法扩增具有更高

的 PCR 效率。经退火温度梯度比较,确定理想的退火温度为 60 $^{\circ}$ C,优化后的 PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 4 min;随后的 40 个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s;60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s 并采集荧光信号。SYBR Green I 和 TaqMan 的优化反应程序相同。

2.2 实时荧光 PCR 的检测性能

2.2.1 两种实时荧光 PCR 的灵敏度以及与常规 PCR 灵敏度的比较

为确定 *Xac* 的实时荧光 RTi-PCR 的检测下限,测试了从 *Xac* Gxo1 菌株提取的基因组 DNA 的 10 倍连续稀释液,在 SGI 法实时荧光分析中,1.08 fg/ μ L 的靶病原菌 DNA 即产生可以检测的荧光强度。实时荧光 PCR 扩增曲线如图 1 所示,低于 1.08 fg/ μ L 模板 DNA 在 40 个循环内不能积累有效的荧光信号,无法检出。因此确定检测下限为 1.08 fg/ μ L 模板 DNA,对应的靶标菌的基因拷贝数为 6.4×10^2 copy/ μ L。SGI 实时荧光 PCR 中的 Ct 值比 TaqMan 探针荧光 PCR 中相应浓度的病原菌及其 DNA 的 Ct 值略低,表明前者的检测灵敏度较探针法稍高(图 2)。对 *Xac* Gxo1 菌株基因组 DNA 的 10 倍连续稀释液进行常规 PCR 检测^[4],结果其检测下限仅为 108 fg/ μ L,检测灵敏度比两种定量 PCR 的灵敏度低 2 ~ 3 个数量级。

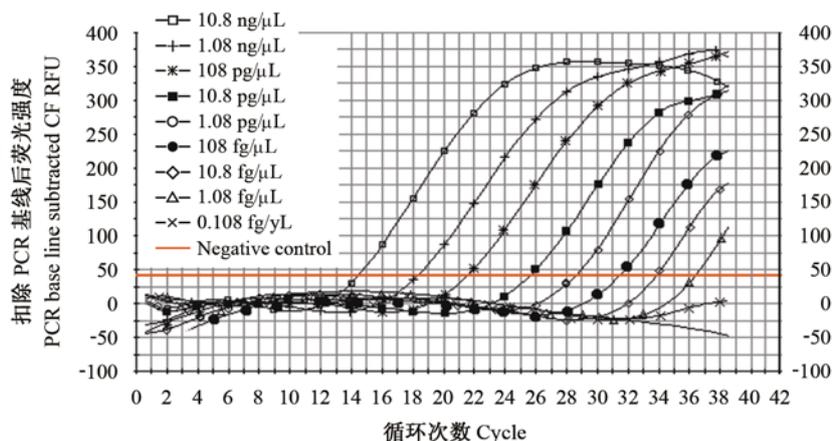


图 1 TaqMan 探针实时荧光 RTi-PCR 对 *Xac* DNA 检测灵敏度

Fig. 1 Sensitivity of detecting TaqMan probe RTi-PCR for *Xac*

注: TaqMan 探针法扩增 10 倍梯度稀释的 DNA 模板。Note: The amplifying efficacy of the same concentration of 10-fold diluted DNA template in TaqMan probe RTi-PCR.

2.2.2 检测的特异性

供试的 7 种柑桔叶片表面非致病菌和 *Xac* Gxo1 阳性对照在相同条件下进行 PCR 检测。TaqMan 探

针法中柑桔溃疡病菌阳性对照有扩增曲线生成,阴性对照均无荧光信号积累,说明 TaqMan 探针及引物具有很好的特异性(图 3)。

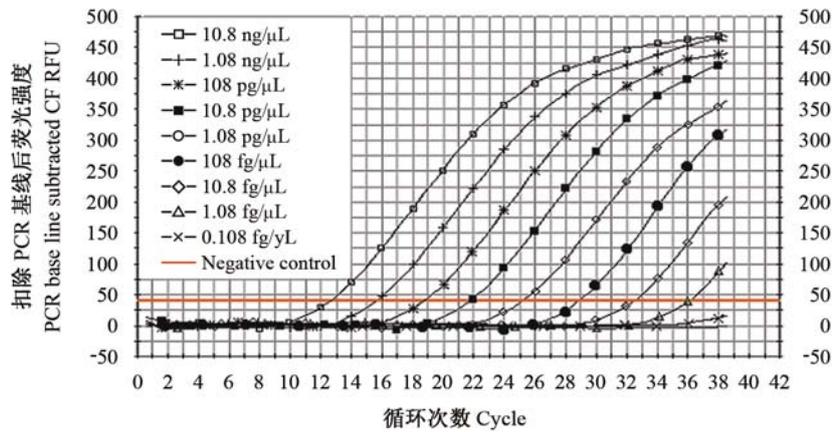


图2 SGI 实时荧光 RTi-PCR 对 Xac DNA 检测灵敏度

Fig. 2 Sensitivity of detecting Xac template with TaqMan probe and SGI RTi-PCR

注: SGI 法扩增 10 倍梯度稀释的 Xac DNA 模板。Note: The amplifying efficacy of 10-fold diluted Xac DNA template with SYBR Green I RTi-PCR.

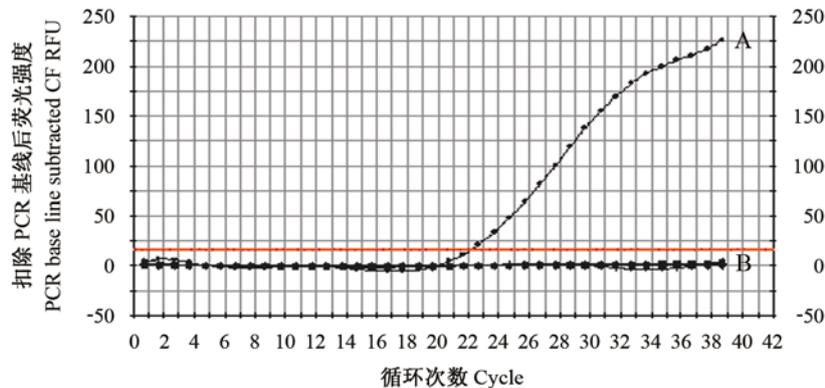


图3 TaqMan 探针定量 PCR 检测的特异性

Fig. 3 Specificity of TaqMan probe RTi-PCR

注: A: 柑桔溃疡病菌; B: 阴性对照以及黄单孢杆菌、野油菜黄单孢菌、水稻细条病菌、假单孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌、草生欧氏杆菌。下同。Note: A: Xac; B: Negative control and *Xanthomonas* spp., *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Erwinia herbicola*. The same as below.

SYBR Green I 法中柑桔溃疡病菌阳性对照亦有扩增曲线, 阴性对照在 36 个循环后有少量荧光信号积累(图 4)。随后进行的熔解曲线分析中可知, 阳性对照 PCR 产物的 TM 值与靶标 DNA 片段的 TM 值相符(87.8 °C), 无非特异性波峰; 而有荧光信号积累的阴性对照产生的双链 DNA 片段 TM 值与靶标 DNA 片段不符, 为非特异性扩增片段或引物二聚体。

2.3 检测体系适用性测试

采用实时荧光 PCR 对来自我国各柑桔主产区的 328 个柑桔溃疡病田间样品及人工接种的无症状带菌柑桔样品进行了实际检测, 部分结果见表 2。表中显示出所有显症样品均能被特异性引物稳定地检

出; 部分无症状带菌样品能被定量 PCR 检出, 其中 SGI 实时荧光 PCR 的无症状带菌样品的阳性检出率更高。而对柑桔无症状带菌样品进行浸泡富集后, 采用半选择 PSA 培养基分离培养, 其结果与实时荧光 PCR 的检测结果比较, 可以看出培养物检出与定量 PCR 检出符合度基本一致, 显示出所设计的引物特异性强, 检测灵敏度高, 能够满足检测和病害监测的需要。

3 讨论

柑桔溃疡病是国内外柑桔生产上的一种危害严重的细菌性病害, 快速准确的检测方法是疫区病害预警监测与有效防控的技术保证。现行的常规 PCR 方法特异性尚可, 但检测灵敏度不足以稳定地

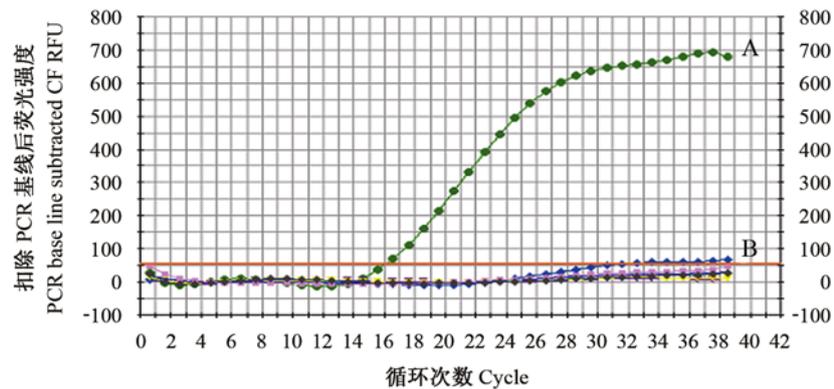


图 4 SYBR Green I 定量 PCR 检测的特异性

Fig. 4 Specificity of SYBR Green I RTi-PCR

表 2 柑桔溃疡病显症及不显症样品的 PCR 检测

Table 2 Detection of symptomatic and asymptomatic samples of CBCD by classical PCR and RTi-PCR

检测编号 Detection number	柑桔品种 Citrus variety	样品名称 Name of sample	检测结果 Results of detection		
			常规 PCR Routine PCR	定量 PCR RTi-PCR	PSA 培养物 Pure culture
WZ0704	脐橙 Navel orange	无症叶片 Leaf without lesion	-	N/A	-
WZ0705	脐橙 Navel orange	无症叶片 Leaf without lesion	+	1.54E+03	+
WZ0603	甜橙 Sweet orange	显症叶片 Leaf with lesion	+	6.37E+03	+
WZ0604	甜橙 Sweet orange	春梢 Spring flushes	-	N/A	-
WZ0605	柠檬 Limon	显症叶片 Leaf with lesion	+	2.02E+03	+
WZ0606	柠檬 Limon	无症叶片 Leaf without lesion	-	N/A	-
WS0607	脐橙 Navel orange	无症叶片 Leaf without lesion	-	N/A	-
Bb0606	温州蜜桔 Satsuma	显症根 Root with lesion	-	N/A	-
Bb0607	温州蜜桔 Satsuma	无症根 Root without lesion	-	8.42E+02	+
Bb0608	桔 Mandarin orange	显症叶片 Leaf with lesion	+	1.35E+04	+
Bb0609	桔 Mandarin orange	显症叶片 Leaf with lesion	+	4.04E+03	+
Bb0610	桔 Mandarin orange	无症叶片 Leaf without lesion	-	5.76E+02	-
Sc0601	甜橙 Sweet orange	Xac 接菌叶片(48 h) Leaf spiked with Xac(48 h)	-	N/A	/
Sc0602	甜橙 Sweet orange	Xac 接菌叶片(48 h) Leaf spiked with Xac(48 h)	-	7.94E+02	/
Sc0603	甜橙 Sweet orange	Xac 接菌叶片(48 h) Leaf spiked with Xac(48 h)	+	9.22E+04	/
Sc0604	甜橙 Sweet orange	Xac 接菌叶片(48 h) Leaf spiked with Xac(48 h)	-	N/A	/
Sc0605	甜橙 Sweet orange	Xac 接菌叶片(72 h) Leaf spiked with Xac(72 h)	-	N/A	/
Sc0606	甜橙 Sweet orange	Xac 接菌叶片(72 h) Leaf spiked with Xac(72 h)	-	N/A	/
Sc0607	甜橙 Sweet orange	Xac 接菌叶片(72 h) Leaf spiked with Xac(72 h)	-	7.57E+02	/
Sc0608	甜橙 Sweet orange	Xac 接菌叶片(72 h) Leaf spiked with Xac(72 h)	+	2.39E+05	/
Sc0609	甜橙 Sweet orange	Xac 接菌叶片(96 h) Leaf spiked with Xac(96 h)	+	9.79E+03	/
Sc06010	甜橙 Sweet orange	Xac 接菌叶片(96 h) Leaf spiked with Xac(96 h)	-	N/A	/
Sc06011	甜橙 Sweet orange	接有 Xac 菌的叶片(96 h) Leaf spiked with Xac(96 h)	-	1.20E+02	/
Sc06012	甜橙 Sweet orange	接有 Xac 菌的叶片(96 h) Leaf spiked with Xac(96 h)	+	3.49E+04	/

检测柑桔无症带菌样品^[3-4]。

本研究根据柑桔溃疡病菌的专有蛋白基因序列,设计筛选出特异性和稳定性好的实时荧光 PCR 引物和水解探针。经以梯度稀释标准样品和田间异地多点采集样品重复检测,结果表明 SGI RTi-PCR

和 TaqMan 杂交探针 RTi-PCR 检测灵敏度均比常规 PCR 高出 2~3 个数量级,并且可以对起始菌量定量;整个检测过程闭管操作,无需 PCR 产物的电泳分析,检测在 1~2 h 内完成,因此可以减少污染,提高检测效率。两种方法中 SGI 的检测成本相对较

低,只需在反应体系加入能与双链核酸结合而受激发产生荧光的 DNA 荧光染料,检测的特异性取决于引物的特异性,适宜大规模快速检测。对于有疑问检测结果还可进行熔解曲线分析,观察检测样品和参照样品的熔解曲线的吻合程度,来验证扩增曲线中荧光信号的增长是否由靶标序列的扩增引起,从而排除检测的假阳性,提高检测的准确率。

国外现有的实时荧光 PCR 检测结果表明,当检测样品的实际带菌量低于 10^4 cfu/mL 时,检测结果不稳定^[9-10]。而这种不稳定往往与制备的样品和检测程序密切相关。本研究对制样技术和检测程序进行了优化,大大提高了方法的灵敏度,降低了检测的假阴性。为了提高无症柑桔样品的带菌数量并检测病菌存活状况,本研究设计了振荡富集培养法,对柑桔无症带菌样品中溃疡病菌富集后,采用实时荧光 PCR 检测的方法,该方法可以提高阳性检出率。而且采用半选择 PSA 培养基分离培养结果还可以与实时荧光 PCR 的检测结果相互验证,显示出本研究所设计的检测引物和探针具有特异性强、检测灵敏度高的优点。

实时荧光 PCR 分析在医学领域已经广泛应用,但在植物病害检测中应用较少。本研究所建立的柑桔溃疡病实时荧光定量 PCR 检测体系可以灵敏、准确地鉴别柑桔组织表面的 Xac 靶标细菌,尤其适合于柑桔溃疡病疑似或初期症状的早期快速诊断,为柑桔溃疡病早期预警监测、柑桔苗木果品出入境检验检疫、柑桔溃疡病疫区的确定及病害流行病学动态研究提供了准确、灵敏而实用的分子检测新技术。

参 考 文 献 (References)

1 Cubero J, Graham J H. Genetic relationship among worldwide

strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1257 - 1264

2 Silva A C R, Ferro J A, Reinach F C, et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 2002, 417(6887): 459 - 463

3 Park D S, Hyun J W, Park Y J, et al. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on hrpW gene sequences. *Microbiological Research*, 2006, 161 (2): 145 - 149

4 王中康, 孙宪昀, 夏玉先, 等. 柑桔溃疡病 PCR 快速检验检疫技术研究. *植物病理学报*, 2004, 34 (1): 14 - 20

5 Cubero J, Graham J H, Gottwald T R. Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Applied Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2849 - 2852

6 Ginzinger D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 2002, 30(6): 503 - 512

7 Mavrodieva V, Levy L, Gabriel D W. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Bacteriology*, 2004, 94 (1): 61 - 68

8 孙宪昀, 王中康, 周常勇, 等. PCR 法快速检测柑桔溃疡病菌的简易制样技术. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2004, 26 (2): 148 - 150, 154

9 Bock C, Parker P, Cook A, et al. Using PCR for detection and quantification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in wind driven splash. *Proceeding of the 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Workshop*, Orlando, FL, November, 7 - 11, 2005

10 Sun X, Stall R E, Jones J B, et al. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Disease*, 2004, 88 (11): 1179 - 1188