

# 不同引物对检测柑桔黄龙病菌灵敏度比较

丁芳<sup>1,2</sup> 王国平<sup>1,2\*</sup> 易干军<sup>3\*</sup> 洪霓<sup>1,2</sup> 钟云<sup>3</sup>

(1. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; 2. 湖北省作物病害监测与安全控制重点实验室, 华中农业大学, 武汉 430070; 3. 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640)

**摘要:** 对目前常用的5对引物 (fOI1/rOI2c、fOI2/r23S1、fA2/rJ5、fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub>、fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub>) 检测柑桔黄龙病菌的灵敏度进行了比较。结果发现,不同引物对的检测灵敏度不同,5对引物检测灵敏度由高到低依次为:fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> > fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub> > fA2/rJ5 > fOI1/rOI2c > fOI2/r23S1;引物对 fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> 比广谱引物对 fOI2/r23S1 的灵敏度高近千倍。半巢式 PCR 及巢式 PCR 的检测灵敏度远高于常规 PCR,可检测出接近极限浓度 10<sup>-7</sup> ng/μL,二者没有明显的差别。因此,按照不同目的选择合适的检测引物非常重要,特别是当待测样品中的黄龙病菌浓度极低时,应选择高灵敏度的小片段特异性引物对。  
**关键词:** 柑桔黄龙病; 常规 PCR; 半巢式 PCR; 巢式 PCR; 灵敏度

## Comparison of detection sensitivity of different primer pairs for citrus huanglongbing pathogen

Ding Fang<sup>1,2</sup> Wang Guoping<sup>1,2\*</sup> Yi Ganjun<sup>3\*</sup> Hong Ni<sup>1,2</sup> Zhong Yun<sup>3</sup>

(1. Plant Science and Technology Academy Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China; 2. The Key Lab of Plant Pathology of Hubei Province, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China; 3. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

**Abstract:** A comparison of the detection sensitivity of five primer pairs (fOI1/rOI2c, fOI2/r23S1, fA2/rJ5, fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub>, fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub>) for citrus huanglongbing pathogen was carried out using simple PCR, semi-nested PCR and nested PCR. The result showed that different primer pairs had distinct detection sensitivity. The most sensitive primer pair fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> was nearly thousand times more sensitive than primer pair fOI2/r23S1, from the highest to the lowest were fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> > fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub> > fA2/rJ5 > fOI1/rOI2c > fOI2/r23S1. The sensitivity of semi-nested PCR and nested PCR were much higher than that of simple PCR, which can detect out the utmost concentration of 10<sup>-7</sup> ng/μL, and there's no obvious difference between each other. Therefore, it is important to choose sensitive primer pairs which amplify much smaller target fragment for the detection of citrus huanglongbing pathogen. Especially when citrus huanglongbing pathogen is extremely low in the samples, it is essential to choose much more sensitive primes in order to avoid false negative.

**Key words:** citrus huanglongbing; PCR; semi-nested PCR; nested PCR; detection sensitivity

基金项目:国家“863”课题资助项目(2001AA241142),湖北省攻关计划(2006AA203B05),广东省重大科技资助项目(2003B21601)

作者简介:丁芳,女,1978年生,讲师,主要从事柑桔病毒及类病毒分子生物学研究, email: dinfany@mail.hzau.edu.cn

\* 通讯作者(Author for correspondence), email: Gpwang@mail.hzau.edu.cn, Yiganjun@vip163.com

收稿日期:2007-05-18

柑桔黄龙病 citrus huanglongbing, HLB 是柑桔生产上的毁灭性病害,也是生产上最难防治的一种病害。病原为韧皮部杆菌属细菌 *Candidatus Liberibacter*, 根据病原的热敏性、传播媒介等可将其分为亚洲型 *Ca. Liberibacter asiaticus*、非洲型 *Ca. Liberibacter africanus*<sup>[1]</sup> 和美洲型 *Ca. Liberibacter americanus*<sup>[2]</sup>。我国的柑桔黄龙病病原属于亚洲型<sup>[3-5]</sup>。由于该病原属于难培养细菌,迄今纯培养尚无公认的成功报道,但已有部分基因组 DNA 序列成功测序<sup>[6-8]</sup>,从而使得应用 PCR 技术检测该病害成为可能,国内外对于该病原检测已有一些成功的报道<sup>[9-13]</sup>。从理论上讲,灵敏的 PCR 技术应该可以检测到单拷贝的目的基因,但是由于试验条件的限制以及研究人员实际操作的误差而很难达到。目前国内外关于黄龙病菌的检测多采用不同的引物和不同的反应体系,尚无不同引物检测柑桔黄龙病菌灵敏度差异的报道。作者在前期研究中发现,用一对引

物检测为阳性的样品,用另外一对引物检测却为阴性。为明确不同引物的检测灵敏度,本研究分别运用常规 PCR、半巢式 PCR 及巢式 PCR 技术对其进行了比较分析,旨在为柑桔黄龙病菌快速、准确、灵敏的检测提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

以采自田间和嫁接于广东省农科院果树研究所防虫隔离网室内的柑桔黄龙病材料红江橙 (*Citrus sinensis* × *C. reticulata* hybrid)、椪柑 (*C. reticulata* Blanco)、江西宫川 (*C. nushiu* cv.) 为阳性材料,以健康的红江橙实生苗为阴性对照。待检材料为采自海南的北京柠檬 (*C. limon* (L.) Burm.)。

### 1.2 柑桔 HLB 引物设计

黄龙病菌检测引物如表 1 所示,均由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 柑桔黄龙病菌检测引物

Table 1 Primer sets used for the detection of HLB pathogen

引物 Primer	引物序列 Sequence of primer pair	扩增片段( bp ) Amplicon	位置 Position	基因组区间 Genomic region
f011/r012c	5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3' 5'-CCGTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'	1 160	39 ~ 61 1183 ~ 1204	16S rDNA <sup>[11]</sup>
f012/r23S1	5'-ATGGGTTGCGAAGTCGCGAGGC-3' 5'-CGCCCTTCTCTCGCGCTTGA-3'	912	1204 ~ 1183 869 ~ 892	16S/23S rDNA <sup>[9]</sup>
fA2/rJ5	5'-TATAAAGGTTGACCTTTTCGAGTTT-3' 5'-ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3'	703	1547 ~ 1571 36 ~ 61	$\beta$ -operon <sup>[12]</sup>
fP <sub>335</sub> /rP <sub>335</sub>	5'-TGAATTCCTTCGAGGTTGCTGAGC-3' <sup>a</sup> 5'-AGAATTCGACTTAATCCCCACCT-3' <sup>a</sup>	535	551 ~ 573 134 ~ 153	16S rDNA <sup>[10]</sup>
fP <sub>400</sub> /rP <sub>400</sub>	5'-GAGTTCATGTAGAAGTTCGTG-3' <sup>c</sup> 5'-CCTACAGGTGGCTGACTCAT-3' <sup>b</sup>	400	514 ~ 533	16S rDNA <sup>[14]</sup>

注: a: 巢式和半巢式 PCR 外侧引物; b: 巢式 PCR 内侧引物; c: 半巢式 PCR 内侧引物。Note: a: Outer primer for nested PCR and semi-nested PCR; b: inner primer for nested PCR; c: inner primer for semi-nested PCR.

### 1.3 总 DNA 的提取

以表现典型的斑驳和黄化症状的叶片为材料,总 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法<sup>[14]</sup>,称取 0.5 g 左右的叶片,加入液氮迅速研磨至粉末状,分装于 2.0 mL Eppendorf 管中。加入 65 °C 预热的 2% CTAB 抽提液,65 °C 水浴 1 h 左右,每隔 10 min 轻摇一次;苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提 1 次,取上清,加入 2 倍体积无水乙醇沉淀 30 min,12 000 r/min 离心 10 min;沉淀自然晾干,加入适量的灭菌 ddH<sub>2</sub>O 溶解。调整浓度为 100 ng/μL,置 -20 °C 备用。

### 1.4 PCR、semi-nested PCR and nested PCR 检测

PCR 扩增体系(25 μL)中各成分依次为 10 × Buffer 2.5 μL, dNTPs 200 μmol/L, 同源引物 0.4 μmol/L, 互补引物 0.4 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.0 U, 模板 DNA 1.0 μL, 灭菌双蒸水补足总体积 25 μL。半巢式 PCR 及巢式 PCR 扩增运用以前所建立的体系<sup>[4]</sup>。

将阳性材料总 DNA 样品,起始浓度 10 ng/μL 进行 10 倍梯度稀释,用作各引物的检测模板。为使结果便于比较,除了 PCR 的退火温度不同外,其余

各条件完全相同:循环数均为35次,延伸时间90 s, 25  $\mu\text{L}$  反应体积,模板加入量为1  $\mu\text{L}$ 。进行半巢式 PCR、巢式 PCR 时取第1次 PCR 产物1.0  $\mu\text{L}$  作后续 PCR 的模板。反应完毕后取5.0  $\mu\text{L}$  PCR 产物于1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。Bio-Rad 凝胶成像系统观察,拍照。试验重复3次。PCR 试剂均购自北京鼎国生物技术有限责任公司,试验均在 MJ Research 公司 PTC-100 PCR 扩增仪上进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 5 对引物常规 PCR 检测结果

结果显示,对同样的2个阳性样品进行检测时,5对不同引物的检测灵敏度和检测的稳定性相差较

大。当总 DNA 样品浓度均为10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  时, fOI1/rOI2c、fOI2/r23S1、fA2/rJ5、fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub>、fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> 5对引物在大多数情况下都能够从阳性材料中检测到病原 DNA,但是扩增产物电泳条带的亮度有明显的差异;少数情况下 fOI1/rOI2c、fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> 出现了阳性条带, fA2/rJ5 只有微弱的目的带,而 fOI2/r23S1、fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub> 的结果为阴性(图1);在同样获得阳性目的条带的情况下,引物对 fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> 较 fOI1/rOI2c 的扩增产物多,目的条带亮度明显强。原因可能为尽管模板 DNA 的浓度一致,但是由于病原 DNA 的含量是未知的,并且引物在模板上的结合能力存在差异,因此有可能出现假阴性结果。

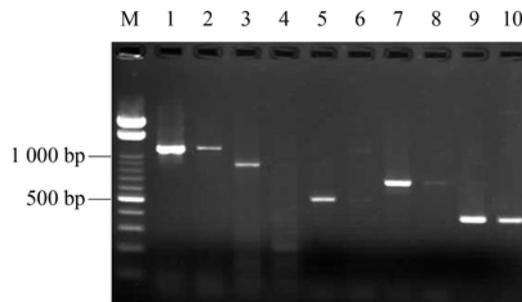


图1 引物 fOI1/rOI2c、fOI2/r23S1、fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub>、fA2/rJ5、fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> 对阳性材料红江橙和椪柑的检测结果

Fig. 1 Detection results of Hongjiang sweet orange and Ponkan with primer sets fOI1/rOI2c, fOI2/r23S1, fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub>, fA2/rJ5 and fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub>

注: M. 100 bp DNA ladder marker (ToYoBo); 1. 红江橙; 2. 椪柑; 3. 红江橙; 4. 椪柑; 5. 红江橙; 6. 椪柑; 7. 红江橙; 8. 椪柑; 9. 红江橙; 10. 椪柑。Note: M. 100 bp DNA ladder marker (ToYoBo); 1. Hongjiang sweet orange; 2. Ponkan; 3. Hongjiang sweet orange; 4. Ponkan; 5. Hongjiang sweet orange; 6. Ponkan; 7. Hongjiang sweet orange; 8. Ponkan; 9. Hongjiang sweet orange; 10. Ponkan.

### 2.2 不同引物对检测 HLB 病菌灵敏度比较

为了进一步明确它们之间的差异,对以上5对引物检测灵敏度进行了比较。模板总 DNA 样品起始浓度为10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ,经10倍梯度稀释至 $10^{-5}$   $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。检测结果显示,5对引物的检测灵敏度由高到低依次为: fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> > fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub> > fA2/rJ5 > fOI1/rOI2c > fOI2/r23S1 (图2),其中 fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub>、fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub> 的检测灵敏度接近, fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> 的灵敏度略高,但均比 fOI1/rOI2c 和 fOI2/r23S1 高出近千倍。

在5对引物中 fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub>、fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub>、fA2/rJ5、fOI1/rOI2c 的特异性相当,因为该4对引物均基于黄龙病菌基因组保守区16S rDNA 序列设计;而 fOI2/r23S1 在扩增时常出现非特异性带,有时非特异性带完全取代了目的带,因此检测特异性最差,稳定性也最差;经测序后发现该伴随性非特异带来自 *E. coli* 菌株(结果未列出)。

### 2.3 常规 PCR、半巢式 PCR 及巢式 PCR 检测灵敏度比较

总 DNA 浓度从10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  经10倍梯度稀释后,分别作为常规 PCR (选用检测灵敏度最高引物 fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub>)、半巢式 PCR 及巢式 PCR 的扩增模板,检测结果显示:半巢式 PCR 及巢式 PCR 二者之间无明显的差别,均可检测到 $10^{-8}$  倍稀释( $10^{-7}$   $\text{ng}/\mu\text{L}$ ),低于 fg 数量级(图3A, B);而最灵敏引物的常规 PCR 只能检测到 $10^{-4}$  倍稀释(图2A,泳道5),相当于 pg 数量级;模板为 $10^{-5}$  倍稀释时带非常模糊(图2A,泳道6)。

## 3 讨论

柑桔黄龙病是世界范围内极具破坏性的危险性病害,探索快速、准确、高灵敏度、高特异性的检测技术对防止该病害的传播蔓延具有极其重要的意义。

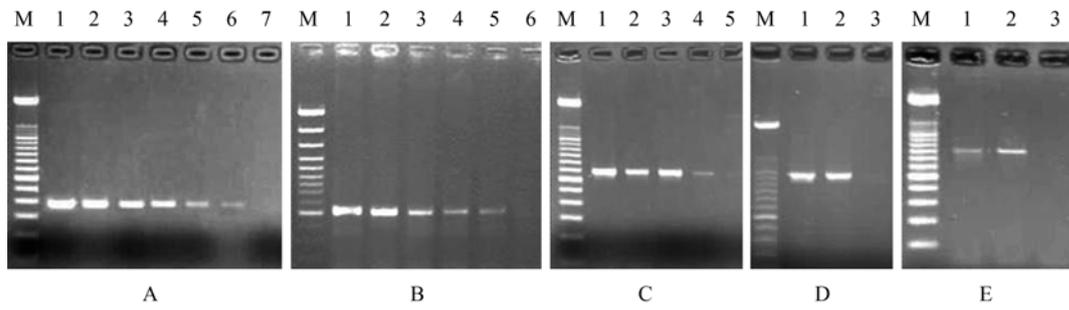


图 2 引物检测灵敏度比较

Fig. 2 Sensitivity comparison of 5 different primer sets fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> (A), fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub> (B), fA2/rJ5 (C), fOI1/rOI2c (D), fOI2/r23S1 (E)

注: A. fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub>; B. fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub>; C. fA2/rJ5; D. fOI1/rOI2c; E. fOI2/r23S1。M. 100 bp DNA ladder marker VII (A, C, D, E, D015-2, 鼎国; B, 100 bp DNA ladder IV, 生工); 1: 10 ng/μL; 2: 1.0 ng/μL; 3: 10<sup>-1</sup> ng/μL; 4: 10<sup>-2</sup> ng/μL; 5: 10<sup>-3</sup> ng/μL; 6: 10<sup>-4</sup> ng/μL; 7: 10<sup>-5</sup> ng/μL。Note: A. fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub>; B. fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub>; C. fA2/rJ5; D. fOI1/rOI2c; E. fOI2/r23S1。M. 100 bp DNA ladder marker VII (A, C, D, E, D015-2, Dingguo; B, 100 bp DNA ladder IV, Shengggong); 1: 10 ng/μL; 2: 1.0 ng/μL; 3: 10<sup>-1</sup> ng/μL; 4: 10<sup>-2</sup> ng/μL; 5: 10<sup>-3</sup> ng/μL; 6: 10<sup>-4</sup> ng/μL; 7: 10<sup>-5</sup> ng/μL。

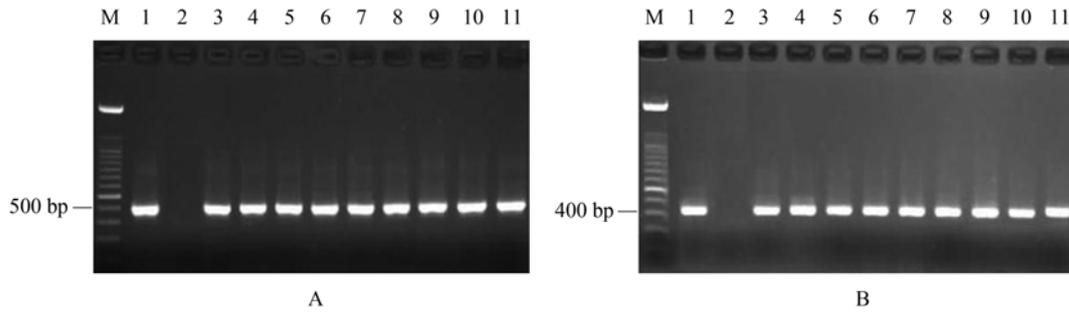


图 3 半巢式(A)和巢式(B)PCR 检测灵敏度

Fig. 3 Sensitivity of semi-nested PCR (A) and nested PCR (B)

注: M. 100 bp DNA ladder marker VII (D015-2, 鼎国); 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~11: 模板依次为 10 ~ 10<sup>-7</sup> ng/μL。Note: M. 100 bp DNA ladder marker VII (D015-2, Dingguo); 1. Positive control; 2. Negative control; 3~11: Template DNA diluted from 10 ng/μL to 10<sup>-7</sup> ng/μL。

柑桔黄龙病传统诊断方法有指示植物鉴定法、电子显微镜观察、血清学及分子生物学方法等。其中分子生物学方法中最为常用的就是 PCR 检测技术,具有快速、灵敏、特异性强等优点;然而 PCR 技术受很多因素的影响,如 DNA 模板,PCR 缓冲液成分、dNTPs 的用量、引物的特异性及用量、反应的循环参数(包括退火温度、退火及延伸时间等)、Taq DNA 聚合酶的质量及用量等均可直接影响 PCR 的扩增效率及特异性,进而影响 PCR 的检测灵敏度。其中最为关键的就是引物的特异性和敏感性,只有特异性和敏感性较强的引物才能进行有效的快速检测<sup>[15]</sup>。本研究为了保证反应充分同时兼顾反应的特异性,尽量控制 PCR 各反应参量在适宜的浓度条件下,如 dNTPs 的浓度控制在 200 μmol/L,引物的用量为 0.4 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.0 U (25 μL 体系),既能确保整个反应的充分扩增和尽量降低由

各参量带来的非特异性反应,又可保证在相对一致的前提条件下对各引物的敏感性和特异性进行比较。

据葛泉卿<sup>[16]</sup>研究报道,在同样条件下,PCR 扩增较短片段的引物比扩增较长片段的引物检测灵敏度高。本试验结果与其基本一致,除了 fOI2/r23S1 引物外,其余 4 对引物的检测灵敏度由高到低与扩增片段大小成负相关。5 对引物中 fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub>、fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub>、fA2/rJ5、fOI1/rOI2c 均基于黄龙病菌基因组保守区 16S rDNA 设计,检测的特异性相当,在扩增中基本无非特异性带出现;而 fOI2/r23S1 在扩增时的特异性及稳定性均最差。这与前人 16S rDNA 引物比非 16S rDNA 引物检测灵敏度高很多的研究结论相一致<sup>[16]</sup>。

本试验发现 5 对柑桔黄龙病菌常用检测引物的灵敏度由高到低依次为: fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub> > fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub> >

fA2/rJ5 > fOI1/rOI2c > fOI2/r23S1, 建议在进行黄龙病菌检测时选取检测灵敏度及特异性均较高的 fP<sub>400</sub>/rP<sub>400</sub>、fP<sub>535</sub>/rP<sub>535</sub>、fA2/rJ5; 尽量避开选择 fOI2/r23S1, 必要时可同时选用 2 对或 2 对以上的引物相互印证, 以防止漏检。另外, 本研究中发现半巢式 PCR 与巢式 PCR 的检测灵敏度远高于常规 PCR, 为常规 PCR 的近 10<sup>4</sup> 倍, 且二者检测灵敏度相当, 无明显的差别, 均可检测到 10<sup>-7</sup> ng/μL, 相当于极限水平, 这对于黄龙病菌在含量极微情况下的诊断具有非常重要的应用价值。

### 参考文献(References)

- Jagoueix S, Bové J M, Garnier M. 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*, 1997, 47(1): 224 - 227
- Teixeira D C, Saillard C, Eveillard S, et al. "*Candidatus Liberobacter americanus*" associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55 (5): 1857 - 1862
- 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(3): 243 - 250
- 丁芳, 易干军, 王国平. 应用 PCR 及 Nested - PCR 技术检测柑桔黄龙病病原研究. *园艺学报*, 2004, 31(6): 803 - 806
- Ding F, Wang G, Yi G, et al. Infection of wampee and lemon by the citrus huanglongbing pathogen (*Candidatus Liberobacter asiaticus*) in China. *Journal of Plant Pathology*, 2005, 87(3): 207 - 212
- Hocquellet A, Bové J M, Garnier M, et al. Isolation of DNA from the uncultured "*Candidatus Liberobacter*" species associated with citrus huanglongbing by RAPD. *Current Microbiology*, 1999, 38 (3): 176 - 182
- Villechanoux S, Garnier M, Laigret F, et al. The genome of the non-cultured bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the *nusG-rpIKAJL-rpoBC* gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase. *Current Microbiology*, 1993, 26 (3): 161 - 166
- Planet P, Jagoueix S, Bové J M, et al. Detection and characterization of the African citrus greening *Liberobacter* by amplification, cloning, and sequencing of the *rpIKAJL-rpoBC* operon. *Current Microbiology*, 1995, 30 (3): 137 - 141
- Subandiyah S, Iwanmi T, Tsuyumu S, et al. Comparison of the 16S/23S intergenic region among citrus greening organisms in Asia. *Plant Disease*, 2000, 84 (1): 15 - 18
- 孔维文, 邓晓玲, 梁志慧, 等. 柑桔黄龙病病原 DNA 片段的克隆及序列分析. *植物病理学报*, 2000, 30(1): 71 - 75
- Hocquellet A, Toorawa P, Bové J M, et al. 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(5): 373 - 379
- 李韬, 柯冲. 应用 Nested PCR 技术检测柑桔木虱及其寄主九里香的柑桔黄龙病带菌率. *植物保护学报*, 2002, 29 (1): 31 - 35
- 胡浩, 殷幼平, 张利平, 等. 柑桔黄龙病的常规 PCR 及荧光定量 PCR 检测. *中国农业科学*, 2006, 39(12): 2491 - 2497
- 易干军, 霍合强, 蔡长河, 等. 适用 AFLP 分析用的荔枝 DNA 提取方法. *华南农业大学学报*, 1999, 20(3): 123 - 124
- 詹群珊, 吴旗, 曾真. 不同引物检测肺炎支原体的研究. *河北医学*, 2002, 8(8): 673 - 675
- 葛泉卿. 不同引物对植原体的检测灵敏度比较研究. *植物检疫*, 2003, 17 (3): 133 - 136