

柑橘黄龙病 PCR 检测技术研究

张伟

(信阳师范学院 生命科学学院, 河南 信阳 464000)

摘要: 以柑橘黄龙病病原亚洲菌系 β -操纵子的特异引物 fA2/rJ5 进行 PCR 扩增, 依据是否有目标 DNA 片段的产生来检测柑橘黄龙病菌的存在与否。该检测技术, 具有快速、简便、灵敏等特点, 可用于柑橘黄龙病的早期诊断, 对控制该病害的传播具有重要意义。

关键词: 柑橘黄龙病; β -operon; PCR

中图分类号: S436.6

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 02-0164-05

Study on PCR Detection of Citrus Huanglongbing Bacterium

ZHANG Wei

(College of Life Science, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

Abstract: Specific primer pairs fA2/rJ5 based on the β -operon of *Candidatus Liberobacter asiaticum* was used for PCR detection of citrus Huanglongbing bacterium, The result was depended on whether the target DNA fragment was existed. This PCR protocol is efficient, convenient and sensitive for early detection of citrus Huanglongbing bacterium, which was very important for the control of the spread of the disease.

Keywords: Citrus Huanglongbing; β -operon; polymerase chain reaction

柑橘黄龙病是柑橘上的一种侵染性病害, 引起柑橘产量、品质下降, 甚至导致整株橘树枯死, 橘园毁灭, 给世界柑橘的生产造成极大威胁。20 世纪初, 在我国的华南地区首先发现了黄龙病, 以后在福建、广西、江西、浙江、湖南、四川、云南、海南和台湾相继发现^[1]。目前柑橘黄龙病在亚洲、非洲和美洲地区都有发生, 存在三种菌系, 即亚洲菌系 (*Candidatus liberobacter asiaticus*); 非洲菌系 (*Candidatus liberobacter africanus*) 和美洲菌系 (*Candidatus liberobacter amercanus*)^[2]。柑橘黄龙病菌是一种韧皮部杆菌 (*Liberobacter*), 其病原菌难以得到分离和提纯, 主要是通过木虱、接穗和苗木等途径传播。柑橘黄龙病表现的典型症状有 3 种, 即黄化型、系统斑驳型和缺素型, 使叶片变黄, 影

响果实发育, 使柑橘产量降低, 品质下降, 病情严重时使根系腐烂, 影响地上植株的生长, 最终导致橘树死亡^[3]。近年来随着柑橘产业的发展, 柑橘苗木调用混乱导致该病发生面积有逐年扩大的趋势; 同时由于全球气候变暖影响, 传病虫媒越冬范围扩大, 也使得该病害的发病范围不断扩大。控制本病害的传播主要有三种措施: 一. 实行严格检疫, 防止带病接穗和苗木的传播。二. 建立无病苗木基地, 选种无病苗木。三. 铲除病株, 防治虫媒介体。这些防治方法的有效实施, 需要一套快速、灵敏、准确的检测技术相配合^[4]。而以往的一些检测方法, 灵敏度不高, 在一些未显症状的病株体内病原物极低, 不能检测出这样低的浓度, 只有寻找新的检测技术。通过 PCR 扩增技术, 可以将微量的目标 DNA 片段

收稿日期: 2012-04-25

基金项目: 河南省科技厅基础前沿项目 (092300410244)

作者简介: 张伟, 男, 河南项城人, 讲师, 硕士, 主要从事植物生物化学与综合利用。E-mail: chawenhua2009@163.com

进行特异性扩增、放大,既可以检测植株是否感染病原,又能获取大量的纯病原 DNA,有利于柑橘黄龙病原的分子生物学研究,这也为防治柑橘黄龙病提供了理论和事实依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

纽荷尔脐橙(*Citrus.sinensis*),表现为斑驳症状,经检测为阳性,在试验中作阳性对照,采自江西赣州;温州蜜柑(*C.nushiu. cv.*),为健康柑橘植株叶片,采自华中农业大学柑橘园,在试验中作阴性对照。待检样品均采集于广州萝岗农业技术推广中心柑橘园,品种分别为甜橙(*C. sinensis*)和椪柑(*C. reticulata*),叶片都变现为黄化、缺素症状,疑似感染黄龙病。以上实验材料,清理干净后分装于塑料带中,于-4℃冰箱中保存,备用。

1.2 引物来源

根据柑橘黄龙病菌亚洲菌系 β -operon 基因序列设计特异引物 fA2/rJ5,同源引物 fA2 碱基序列为 5'-TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3',互补引物 rJ5 碱基序列 5'-ACAAAAGCAGAAATAGCAC GAA-3',扩增片段大小为 703bp。由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 总核酸的提取 总核酸的提取方法主要过程为:取 0.3 g 的柑橘叶片中脉(或完整叶片),剪碎后放入研钵中加液氮迅速研磨成粉末状,转入预冷的 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管中,加入 800 μ L 的 2%CTAB 抽提缓冲液(预热 65℃),轻轻振荡摇匀;放入水浴箱中 65℃水浴 60~90min,每隔 10min 轻摇 1 次。12 000 r/min 瞬时离心 2 min 取上清液,加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),充分

混匀 5 min。室温下,12000r/min 离心 10min,取上清液加等体积的氯仿/异戊醇(1:1),轻轻混匀。室温下,12 000 r/min 离心 5min,取上清液加入 1/10 体积的 3M/L NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇(预冷)。 -20°C 冰箱中放置 4 h,在 4℃下 16 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀用 95%和 75%的乙醇各清洗两次,晾干;视 DNA 量的多少加入适量的无菌 ddH₂O 溶解^[5]。

1.3.2 核酸的检测和凝胶电泳分析 取 1 μ L DNA 溶解液,加入 69 μ L ddH₂O 稀释 70 倍,用核酸蛋白质检测仪(Amersham sciences, ULTROSTES 2100 PRO)分析总核酸的浓度和纯度;1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

1.3.3 PCR 的扩增和凝胶电泳分析 PCR 反应体系包括:10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ L,同源引物和互补引物各 1 μ L,10 mM dNTPs 0.5 μ L,模板 DNA 1 μ L, TaqDNA 聚合酶 0.2 μ L (5U/ μ L),灭菌 ddH₂O 补足总体积 25 μ L,混合后置于 PCR 仪(Bio-Rad, PTC-200)上进行扩增反应。PCR 扩增反应程序:95℃预变性 3 min;95℃变性 30s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1min(最后一次 10 min),进行 35 次循环。反应完毕后,取 PCR 的扩增产物 5 μ L 和 10 \times LoadingBuffer 1 μ L 混匀,用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳,经溴化乙锭(EB)染色后,在凝胶成像系统(Bio-Rad, GelDoc2000)下观察结果、拍照。

2 结果与分析

2.1 不同材料抽提的总 DNA 的浓度、纯度和完整性

核酸蛋白质检测仪(Amersham sciences, ULTROSTES 2100 PRO)检测叶片中脉或叶片提取的总 DNA 的浓度、纯度结果如表 1。

表 1 不同材料提取的总 DNA 浓度、纯度比较

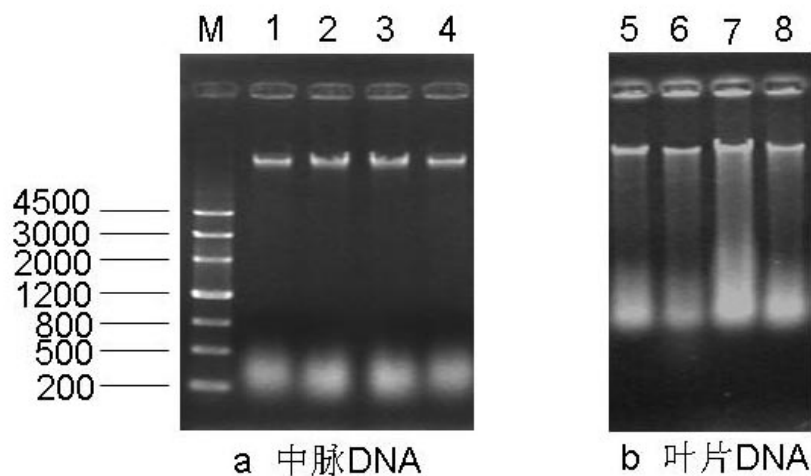
抽提样品	DNA 浓度 (ng/ μ L)	纯度	
		A260/A230	A260/A280
纽荷尔脐橙,中脉	1648	1.87	1.95
温州蜜柑,中脉	1042	1.76	1.86
甜橙,中脉	676	1.99	1.80
椪柑,中脉	935	2.06	1.83
纽荷尔脐橙,叶片	1325	1.78	1.85
温州蜜柑,叶片	862	1.83	1.96
甜橙,叶片	856	1.98	1.86
椪柑,叶片	1003	1.85	1.7

中脉或叶片不同材料提取的 DNA 进行比较分

析,两者浓度值接近,A260/A230 和 A260/A280 均

在 1.85 左右,说明纯度很高,符合 PCR 的扩增的要求。但相比而言,从中脉中提取的 DNA 比叶片高。电泳结果分析:图 1.a 显示表明,从叶脉中提取的总 DNA 电泳带明显、清晰,不含有杂质,没有发生降解现象,DNA 结构完整;图 1.b 中显示表明,从叶片中提取的总 DNA 电泳带也比较明显,但含有少量的杂质,DNA 有轻微的降解现象。这与叶片中富含酚类、多糖和盐离子有关,对提取的

DNA 造成了一定的污染。其中甜橙叶片中提取的 DNA (泳道 7) 电泳后出现拖带,含有较多的杂质,DNA 也呈现降解;而从甜橙中脉中提取的 DNA (泳道 3) 电泳后没有出现这种结果。经分析,这与叶片老化有关,叶肉组织中色素沉积,累积大量的杂质,核酸结构也不稳定,影响提取的 DNA 质量。因此,在实验中宜选择中脉作试验材料,且样品不要出现老化现象。



M.DNA LadderMarker III 1、纽荷尔脐橙; 2、温州蜜柑; 3、甜橙; 4、椪柑;
5、纽荷尔脐橙; 6、温州蜜柑; 7、甜橙; 8、椪柑

图 1 不同材料提取的总 DNA 电泳检测结果

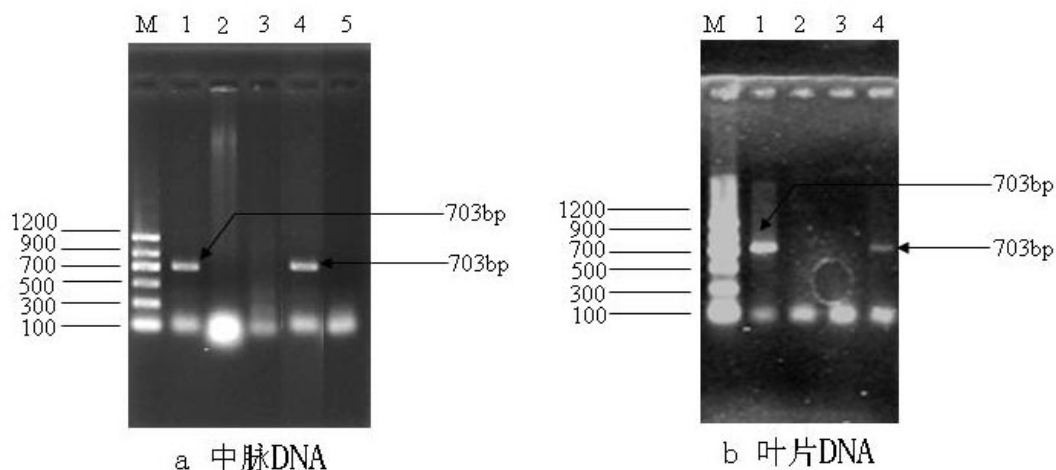
2.2 PCR 扩增产物的电泳分析

以纽荷尔脐橙作阳性对照,温州蜜柑为阴性对照,分别甜橙和椪柑进行了 PCR 检测。在 1%的琼脂糖凝胶中进行电泳分检测,结果如图 2,其中图 2.a 中泳道 1 为阳性对照,扩增片段大小为 703bp。泳道 2 和泳道 5 分别为阴性对照和空白清水对照,无扩增条带形成。泳道 3 没有特异条带产生,表明甜橙为阴性,没有感染柑橘黄龙病。泳道 4 中有特异条带形成,与阳性对照的电泳带一致,表明该片段为目标片段,椪柑检测为阳性,感染了柑橘黄龙病菌。图 2.b 中,泳道 1 和泳道 4 均有特异条带形成,泳道 2 和泳道 3 都没有产生特异条带,结果与图 2.a 相同,说明甜橙样品为阴性,椪柑为阳性。图 2 中两组不同材料的总 DNA 进行 PCR 扩增后,中脉提取的 DNA 扩增后电泳带较叶片清晰,而叶片提取的 DNA 扩增后仍有少量杂质,形成模糊的阴影,说明中脉中提取物纯度高,PCR 扩增质量比

叶片提取物好。其中椪柑提取的总 DNA 经 PCR 扩增后,经电泳得到的特异条带,中脉 DNA 的条带清晰,叶片 DNA 的条带弱,比较模糊,同时也证明柑橘黄龙病病原 DNA 适宜在叶片中脉中提取,PCR 扩增的效果很好。在四种实验材料中,纽荷尔脐橙和椪柑有特异条带产生,而温州蜜柑和甜橙没有电泳带出现,说明 PCR 检测技术具有特异性。2 种待检柑橘叶片中脉抽提的总 DNA 的浓度和纯度如表 2 所示,浓度值均在 2800 ng/uL 左右,纯度很好,由于 DNA 浓度太高,对 DNA 溶解液进行简单的倍数稀释,分别稀释 10 倍,总计 4 份。在相同 PCR 反应体系中进行扩增,结果如图 3;椪柑样品总 DNA 经 10 倍稀释后有目标片段(泳道 3)产生,扩增条带清晰,扩增片段大小为 703bp,检测为阳性;而同样材料的椪柑总 DNA (泳道 1)却没有扩增产物形成。甜橙样品提取的总 DNA 和稀释 10 倍后的 DNA (泳道 2 和泳道 4)为模板进行扩增后,

均无目标片段产生, 结果显示为阴性。经分析, 由于 DNA 浓度过高, 抑制 PCR 扩增反应过程的进行, 最终导致没有目标产物形成, 而浓度偏低的 DNA 溶液却有目标产物生成。因此, 在柑橘黄龙病检测

中, 注意试验设计要严谨, 模板 DNA 的浓度要适中, 避免浓度过高导致假阴性现象的发生, 防止漏检误检。

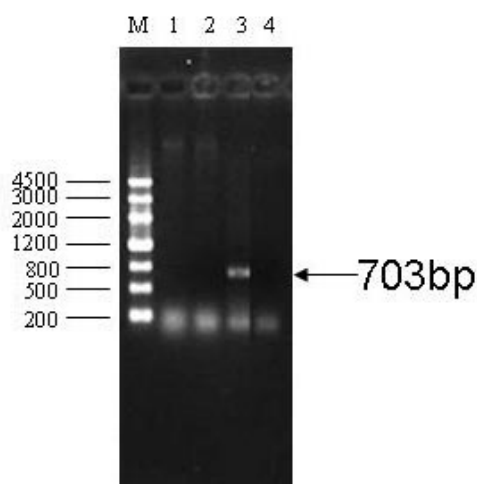


(M. DNA Ladder Marker II 1、纽荷尔脐橙; 2、温州蜜柑; 3、甜橙; 4、椪柑; 5、灭菌水 (CK))

图2 不同材料 DNA PCR 扩增产物的电泳结果

表2 两种材料中脉提取的总 DNA 浓度和纯度

样品材料	DNA 浓度 (ng/ μ L)	纯度	
		A260/A230	A260/A280
椪柑	3013	1.9	2
甜橙	2537	1.87	1.94



M. DNA Ladder Marker III 1、椪柑 (3013ng/ μ L); 2、甜橙 (2537ng/ μ L);
3、椪柑样品 DNA 10 倍稀释 (300ng/ μ L); 4、甜橙样品 DNA 10 倍稀释 (250ng/ μ L)

图3 两种材料抽提的 DNA 浓度稀释 PCR 分析

3 讨论

试验中, 引物 fA2/rJ5 是针对柑橘黄龙病菌 β -operon 设计的一对特异性引物, 可对目标 DNA

片段进行特异性 PCR 扩增,依据是否有扩增产物生成来检测柑橘黄龙病菌存在与否^[6]。若有目的扩增产物生成,则在凝胶电泳分析时有反应带形成,即可以判定该样品为阳性;如果没有反应带形成,则这个样品为阴性。这样,可以快速、准确地检测植株是否感染柑橘黄龙病菌。

柑橘黄龙病菌是一种韧皮部杆菌,在感病植物体内分布不均匀,主要分布于韧皮部筛管中,在中脉中提取的总 DNA 浓度含量高;叶片组织中富含盐离子、酚类、蛋白质和多糖,容易造成 DNA 污染,因此,从中脉中抽提的 DNA 进行 PCR 扩增后特异条带较其他部位更为明显,检测准确率也更高^[7]。如图 1 中,中脉 DNA 的电泳条带比叶片 DNA 的要清楚,含有的杂质低,纯度高, DNA 的质量好。同时在叶片 DNA 的电泳图中,泳道 7 (图 1.b) 的 DNA 污染严重,含有的杂质高,且出现 DNA 降解,主要是因为叶片老化有关,叶肉组织中沉积大量色素, DNA 也不稳定,容易降解,含有的杂质多。因而,在样品的采集上,应选择新鲜的叶片,同时应该从中脉中抽提总 DNA,这样能使 DNA 的质量提高,有利于更准确的得出实验结果。图 2 中,虽然两组实验检测结果一致,但是,从叶片中提取的 DNA 扩增后电泳产生的特异条带模糊,结果不明显。从 DNA 扩增电泳结果比较分析来看,以叶片为材料提取的 DNA 含有少量杂质,这与叶片富含酚类、多糖、蛋白质等物质有关,研磨后在进行水浴过程中易释放污染 DNA,经有机溶剂抽提不容易完全剔除,进行 PCR 扩增时特异条带模糊甚至产生假阴性,可导致 PCR 检测结果不稳定。

图 3 中,从两种不同的实验样品椪柑和甜橙中脉里,抽提的总 DNA 浓度达到 2500ng/μL 以上,纯度很好,含有的杂质低,适宜作 PCR 扩增。经 PCR 扩增后电泳分析,甜橙样品(泳道 2 和泳道 4)检测为阴性;而椪柑总 DNA 直接为模板进行 PCR 扩增后,没有产生特异条带(泳道 1),稀释 10 倍

后却产生了特异条带(泳道 3)。经分析,两者虽然为同一材料来源的 DNA,且在相同的 PCR 反应体系,只存在浓度上的差异,显然由于浓度太高,导致 PCR 过程中没有扩增产物生成。因此在 PCR 反应体系中,模板 DNA 的浓度不宜太高,否则进行 PCR 检测过程中会造成目标 DNA 片段无法正常扩增。

为了提高检测灵敏度和检测检测准确性,不仅要求试验材料要新鲜,保存方式要恰当,同时对整个反应体系要进行更合理的优化,科学的设计各个试验步骤,缩短试验过程的周期,这样更有利于有利于黄龙病的早期快速诊断,为柑橘黄龙病的预防提供重要的预警信号。

参考文献:

- [1] 丁芳,易干军,王国平.应用 PCR 及 Nested-PCR 技术检测柑橘黄龙病病原研究[J].园艺学报,2004,31(6): 803-806.
- [2] 邓秀新.世界柑橘品种改良进展[J].园艺学报,2005,32(6): 1140-1146.
- [3] 李德望,唐伟文,范怀忠.柑橘黄龙病的血清学诊断方法的初步研究[J].华南农业大学学报,1992,13(2): 16-22.
- [4] 邹敏,周常勇.柑橘黄龙病病原和检测方法研究进展[J].植物保护,2005,31(3): 10-14.
- [5] 肖远辉,丁芳,曾继吾,等.柑橘黄龙病和衰退病的同步 PCR 和 RT-PCR 检测[J].果树学报,2006,23(4): 642-645.
- [6] 孟祥春,钟云,刘岩,等.柑橘黄龙病 PCR 快速检测技术的建立与应用[J].西北植物学报,2007,27(7): 1461-1463.
- [7] Jagoueix S, Bove J M, Garnier M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of proteobacteria[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44: 397.