

宋晓兵,彭埃天,黄峰,等.柑橘黄龙病亚洲种 RPA 快速检测方法的建立[J].江苏农业科学,2021,49(22):137-140.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.22.024

柑橘黄龙病亚洲种 RPA 快速检测方法的建立

宋晓兵,彭埃天,黄峰,汤亚飞,崔一平,凌金锋

(广东省农业科学院植物保护研究所/广东省植物保护新技术重点实验室,广东广州 510640)

摘要:黄龙病是世界柑橘产业的毁灭性病害,引起柑橘黄龙病的病原分为亚洲种、非洲种和美洲种共 3 个种,目前我国柑橘黄龙病均由亚洲种引起,建立一套快速检测技术对我国柑橘黄龙病的防控具有重要意义。本研究根据柑橘黄龙病亚洲种 16S rDNA 基因序列设计引物,建立了基于重组酶聚合酶等温扩增(RPA)的检测方法,并评价了该方法的灵敏度和检测准确性。结果表明,本研究所建立的柑橘黄龙病亚洲种 RPA 快速检测方法特异性强、灵敏度高、操作过程简便,检测灵敏度比常规 PCR 提高 10 倍,为基层农技人员开展柑橘黄龙病的快速检测提供了一种新方法。

关键词:柑橘;柑橘黄龙病亚洲种;RPA;快速检测

中图分类号: S436.661.1⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)22-0137-04

柑橘黄龙病是一种影响全球的毁灭性病害,具有暴发性强、发展迅速、危害严重等特点,柑橘黄龙病正在全世界柑橘产区不断扩散蔓延,尤其在亚洲、非洲、美洲等地区泛滥成灾^[1-3]。华南柑橘产区是柑橘黄龙病的重度流行区,柑橘黄龙病发生流行持续时间长、发病范围广、发病率高,是造成柑橘寿命缩短、产量降低、生产成本提高、经济损失惨重的重要因素,严重制约了柑橘产业的健康发展^[4-5]。

目前,柑橘黄龙病普遍认为是由局限于韧皮部的候选韧皮部杆菌(*Candidatus Liberibacter* spp.) 侵染引起^[6],但至今未获得一致认可的纯培养^[7-8]。根据病原的热敏性、传播媒介、保守序列特征等可以将其分为 3 个种,包括亚洲种、非洲种和美洲种^[9-10]。基于柑橘黄龙病菌 16S rDNA 的同源性分析结果表明,侵染我国柑橘的黄龙病病菌均为亚洲种,通过序列测定与多重比对分析也表明在不同的地域病原菌没有较大的分子变异^[11-12]。

带病苗木、带菌接穗和田间病株是柑橘黄龙病的初侵染源,目前开发一种高效、精准、低成本、操

作简便的黄龙病病原检测技术,依然是基层科研单位、广大柑橘种植企业、柑橘育苗企业的迫切需求。重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术是一种等温核酸扩增技术,目前已应用于医学病原物的快速诊断、转基因作物检测、植物病害的病原检测等^[13-16]。本研究拟研发一种用于检测柑橘黄龙病亚洲种的 RPA 引物及其检测方法,以期对柑橘种苗的黄龙病早期检测、田间疑似黄龙病树的检测确诊、普及基层科研单位的检测能力提供技术支持,对早期预警柑橘产区黄龙病的扩散蔓延具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物:感染柑橘黄龙病的阳性植株由广东省植物保护新技术重点实验室提供,健康样品采自笔者所在实验室网室内种植的柑橘(砂糖橘),待测样品采自田间疑似感染黄龙病的柑橘(广东怀集砂糖橘 2 株、德庆贡柑 2 株)。

试验试剂: AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, TwistAmp Basic RPA 试剂盒购自英国 TwistDx 公司, Premix TaqTM 和 DNA 片段纯化试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 本研究中 RPA 引物设计原则见 www.twistdx.co.uk 网站 TwistAmp 反应试剂盒说明附录中的引物设计部分,通过在线软件 <https://>

收稿日期:2021-02-20

基金项目:国家重点研发计划(编号:2018YFD0201500、2017YFD0202000);广东省现代农业产业技术体系创新团队建设(编号:2020KJ108);广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设(编号:2020KJ134)。

作者简介:宋晓兵(1980—),男,山东胶南人,博士,副研究员,主要从事柑橘病害防控技术研究。E-mail: xbsong@126.com。

通信作者:彭埃天,研究员,主要从事果树病害防控技术研究。E-mail: pengait@163.com。

primer3. ut. ee/设计引物。基于柑橘黄龙病亚洲种 (GenBank 序列登录号: AY192576. 1) 的 16S rDNA 序列设计引物 HLBas - F/HLBas - R, 基于柑橘黄龙病亚洲种 (GenBank 序列登录号: AY842429. 1) 的

OMP 序列设计引物 OMP - F1/OMP - R1、OMP - F2/OMP - R2, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

表 1 设计的 RPA 引物

引物	序列(5'→3')	目的片段大小 (bp)
HLBas - F	CTTTAATACTGGTTGTCTAGAGTTTAGGAGAG	397
HLBas - R	GAAAAGAAAATACCATCTCTGATATCGTCCTATA	
OMP - F1	TTCCCAAAGTATCATCTATAATACACTAGATAACC	287
OMP - R1	CTATACCCCTTATATGCAAATCCCCTCAGATAATAA	
OMP - F2	GGTAAACAGATGTTTATAGTAAAGAACGAATGAG	200
OMP - R2	GTAGATTGAATAGAAATATTCCCCACTGTATAA	

1.2.2 总 DNA 提取 取适量的供试植物新鲜叶片,采用植物 DNA 提取试剂盒抽提其总 DNA。具体操作按照试剂盒厂商说明书的步骤进行。提取的植物总 DNA 沉淀溶解于 50 μL TE 缓冲液中,保存于 -20 ℃ 冰箱,备用。

1.2.3 RPA 反应 以柑橘黄龙病阳性植株总 DNA 为模板,利用设计的 RPA 引物 HLBas - F/HLBas - R、OMP - F1/OMP - R1、OMP - F2/OMP - R2 进行扩增。按照 TwistAmp Basic RPA 试剂盒的说明配制 RPA 反应体系(50 μL):向 0.2 mL 的 TwistAmp 反应管中加入 Rehy - dration Buffer 29.5 μL、10 μmol/L 上下游引物各 2 μL、模板 DNA 2 μL、280 mmol/L 醋酸镁 2.5 μL、不含 RNA 酶的水 12 μL。在 40 ℃ 温度下,分别反应 20、30、40、50、60 min;反应结束后,用纯化试剂盒对 RPA 产物进行纯化回收,取纯化后的 RPA 产物 10 μL 于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳中检测 20 min,通过凝胶成像系统观察电泳结果,确定最佳反应时间。

1.2.4 常规 PCR 以柑橘黄龙病阳性植株总 DNA 为模板,利用设计的引物 HLBas - F/HLBas - R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL):模板 DNA 2 μL、*rTaq*TM Premix 25 μL、10 μmol/L 上下游引物各 2 μL、灭菌水 19 μL。反应程序:预变性 94 ℃ 4 min;变性 94 ℃ 45 s,退火 54 ℃ 45 s,延伸 72 ℃ 45 s,35 个循环;延伸 72 ℃ 10 min。取 PCR 产物 10 μL 于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳中检测 20 min,通过凝胶成像系统观察电泳结果。

1.2.5 RPA 灵敏度 取柑橘黄龙病阳性样品的 DNA 模板进行梯度稀释,分别为 10⁰、10⁻¹、10⁻²、

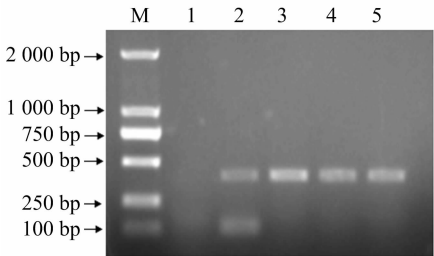
10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 6 个稀释梯度,分别进行 RPA 检测和普通 PCR 检测,分析比较两者的检测灵敏度。RPA 反应体系同“1.2.3”节,在 40 ℃ 条件下温浴 40 min,从而完成 RPA 的灵敏度测定试验;常规 PCR 反应体系和反应程序同“1.2.4”节。

1.2.6 样品检测 从广东省各地采集疑似感染黄龙病的柑橘样品 4 份,分别提取总 DNA,用本研究建立的 RPA 扩增技术进行检测,并用常规 PCR 扩增技术加以验证。

2 结果与分析

2.1 RPA 引物筛选

以柑橘黄龙病阳性植株总 DNA 为模板,40 ℃ 反应条件下,利用引物 HLBas - F/HLBas - R 进行 RPA 扩增。根据琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)可知,水浴 20 min 无特异性扩增,水浴 30 min 获得 397 bp 的目的条带,水浴 40 min 中获得的条带更亮、扩增条带单一,随着时间延长条带亮度无明显变化。根据琼脂糖凝胶电泳结果,确定反应 40 min 为最佳的反应时间。



M—2 000 bp Marker; 1—20 min; 2—30 min; 3—40 min; 4—50 min; 5—60 min

图1 引物 HLBas-F/HLBas-R的RPA 电泳结果

以柑橘黄龙病阳性植株总 DNA 为模板,利用引物 OMP-F1/OMP-R1、OMP-F2/OMP-R2 分别进行 RPA 扩增。根据凝胶电泳结果(图 2)可知,反应温度为 40 ℃,分别水浴 20~60 min,2 对引物水浴 20 min 时都可以获得相应的目的条带,反应 30 min 获得的目的条带较亮,但随着时间的延长目的条带的亮度明显模糊不清。引物 OMP-F1/OMP-R1 出现了非特异性扩增(图 2 左侧),引物 OMP-F2/OMP-R2 在 40、50、60 min 的扩增条带模糊不清(图 2 右侧)。鉴于 3 对 RPA 引物的电泳结果,最终选定引物 HLBas-F/HLBas-R 作为柑橘黄龙病 RPA 的检测引物。

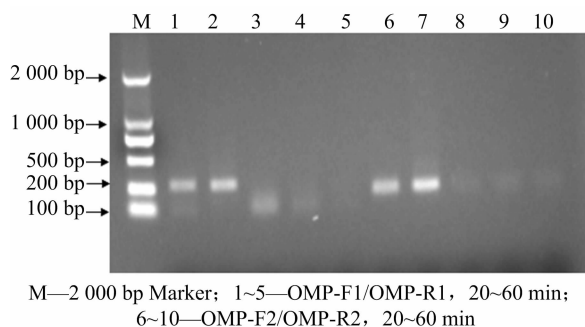


图2 引物 OMP-F1/OMP-R1 和 OMP-F2/OMP-R2 的 RPA电泳结果

2.2 RPA 检测方法的灵敏度

以柑橘黄龙病阳性植物总 DNA 为模板进行稀释,浓度梯度为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 6 个稀释度,分别进行 RPA 和普通 PCR 检测。琼脂糖凝胶电泳结果显示,RPA 在模板稀释倍数为 10^{-3} 时仍能扩增出目的条带(图 3),普通 PCR 在模板稀释倍数为 10^{-2} 时尚能扩增出目的条带(图 4),因此,本研究所建立的 RPA 检测方法比普通 PCR 检测方法灵敏度提高 10 倍。

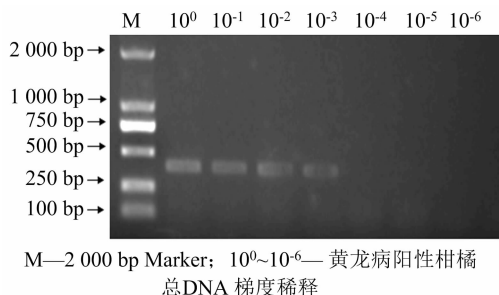


图3 RPA 法的灵敏度检测结果

2.3 田间样品的检测

从广东省各地采集疑似柑橘黄龙病样品 4 份,用本研究建立的 RPA 检测方法进行检测,琼脂糖凝胶电泳结果(图 5)显示,4 份疑似病样品中 3 份检

测均为阳性,同时采用普通 PCR 方法加以验证,其检测结果(图 6)与 RPA 检测结果一致,两者的符合率为 100%。试验结果表明,本研究建立的 RPA 检测方法能够实现柑橘黄龙病田间疑似样品的快速、准确检测与诊断。

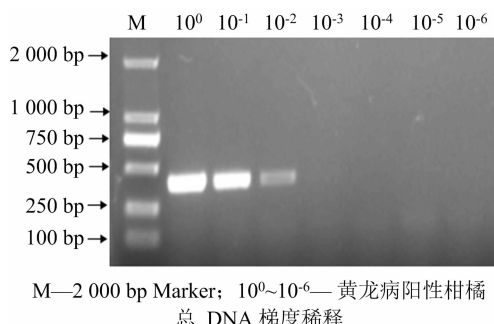


图4 PCR 法的灵敏度检测结果

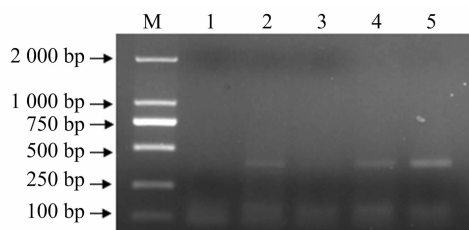


图5 田间样品的 RPA 检测结果

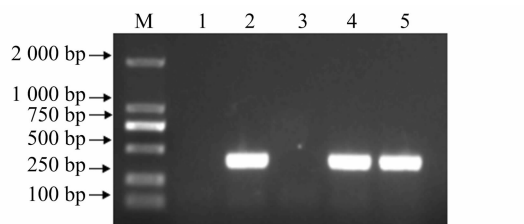


图6 田间样品的常规 PCR 检测结果

3 讨论

RPA 检测方法特异性强,对引物要求比常规 PCR 严格,RPA 引物一般由 30~38 个核苷酸组成,而常规 PCR 引物长度通常为 15~25 个核苷酸^[17-18]。与普通 PCR 检测方法相比,RPA 扩增过程中不需要热循环,可在恒温水浴锅或金属浴中进行,检测耗时较短,经济适用,无需 PCR 仪、荧光定量 PCR 仪等昂贵仪器设备^[19-20]。目前已建立的 PCR、巢式 PCR、荧光定量 PCR 等柑橘黄龙病病原检测技术^[21-23],虽然不断提高了检测的灵敏度和准确率,但是检测时间依然比较费时,荧光定量 PCR 由于需要昂贵的试验设备和试剂耗材,检测费用

偏高。

本研究建立的柑橘黄龙病亚洲种 RPA 检测方法简便、快速、灵敏性好,扩增反应快速,在 40 ℃ 温度条件下最短 30 min 就可以完成扩增反应,检测灵敏度比普通 PCR 高 10 倍,是一种新型的柑橘黄龙病检测方法,笔者所在研究团队已经申请了国家发明专利(专利申请号 202011285512.9)。尽管目前 RPA 检测方法的灵敏度与巢式 PCR、荧光定量 PCR 相比仍存在较大差距^[24],柑橘黄龙病亚洲种 RPA 检测方法的优势在于简单易学、省时省力,适用于田间疑似黄龙病树的快速诊断,为基层科研单位的黄龙病检测提供技术支持,未来应用前景广泛。

参考文献:

- [1] Bové J M. Huanglongbing: a destructive, newly – emerging, century – old disease of citrus[J]. Journal of Plant Pathology, 2006, 88(1): 7 – 37.
- [2] 宋晓兵, 彭埃天, 陈霞, 等. 柑橘黄龙病病原培养及分子检测技术研究进展[J]. 广东农业科学, 2013, 40(23): 65 – 69.
- [3] 许美容, 戴泽翰, 孔维文, 等. 基于分子技术的柑橘黄龙病研究进展[J]. 果树学报, 2015, 32(2): 322 – 334.
- [4] 柏自琴, 周常勇. 柑橘黄龙病病原分化及发生规律研究进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(1): 133 – 137.
- [5] 邓晓玲, 郑永钦, 郑正, 等. 柑橘黄龙病菌基因组学的研究进展[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 137 – 148.
- [6] 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[J]. Molecular and Cellular Probes, 1999, 13(5): 373 – 379.
- [7] Davis M J, Mondal S N, Chen H, et al. Co – cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ with Actinobacteria from Citrus with Huanglongbing[J]. Plant Disease, 2008, 92(11): 1547 – 1550.
- [8] Sechler A, Schuenzel E L, Cooke P, et al. Cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’, and ‘*Ca. L. americanus*’ associated with Huanglongbing[J]. Phytopathology, 2009, 99(5): 480 – 486.
- [9] Garnier M, Jagoueix – Eveillard S, Cronje P R, et al. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of ‘*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*’[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(6): 2119 – 2125.
- [10] Texeira D C, Ayres J, Kitajima E W, et al. First report of a Huanglongbing – like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new liberibacter species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the disease[J]. Plant Disease, 2005, 89(1): 107.
- [11] 丁芳, 洪霓, 钟云, 等. 中国柑橘黄龙病病原 16SrDNA 序列研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(5): 649 – 654.
- [12] 姜兵海. 柑橘黄龙病菌亚洲种全基因组测序及遗传多样性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [13] 哈登楚日亚, 樊晓旭, 赵永刚, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(11): 3270 – 3277.
- [14] 李凯, 金芄军, 李亮, 等. 转基因玉米 Bt11 品系特异性荧光 RPA 检测[J]. 分子植物育种, 2017, 15(11): 4741 – 4745.
- [15] 宋建, 薛俊, 孙海波, 等. 一种基于 RPA 的番茄褪绿病毒检测方法[J]. 植物保护, 2020, 46(4): 168 – 170, 184.
- [16] 凌莉, 席静, 王莹, 等. 重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测创伤弧菌[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(4): 73 – 76.
- [17] 李华伟, 林志坚, 张鸿, 等. 甘薯薯瘟病菌 RPA 检测方法的建立及应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2020, 49(5): 583 – 588.
- [18] 龙海, 李一农, 李芳荣. 不同 PCR 引物对柑橘黄龙病菌的特异性检测[J]. 植物检疫, 2012, 26(4): 38 – 41.
- [19] Chen L, Jiao Z Y, Liu D M, et al. One – step reverse transcription loop – mediated isothermal amplification for the detection of maize chlorotic mottle virus in maize[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 240: 49 – 53.
- [20] 冯黎霞, 魏霜, 余辛, 等. 重组酶聚合酶扩增技术(RPA)快速检测玉米褪绿斑驳病毒[J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 217 – 218.
- [21] Jagoueix S, Bové J M, Garnier M. PCR detection of the two ‘*Candidatus Liberobacter*’ species associated with greening disease of citrus[J]. Molecular and Cellular Probes, 1996, 10(1): 43 – 50.
- [22] 李韬, 柯冲. 应用 Nested PCR 技术检测柑橘木虱及其寄主九里香的柑桔黄龙病带菌率[J]. 植物保护学报, 2002, 29(1): 31 – 35.
- [23] Li W, Hartung J S, Levy L. Quantitative real – time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(1): 104 – 115.
- [24] 程保平, 彭埃天, 宋晓兵, 等. 三种 PCR 方法检测柑橘黄龙病菌的效果比较[J]. 植物保护, 2014, 40(5): 106 – 110.