

柑桔溃疡病菌滚环扩增检测体系的建立

黄冠军¹, 殷幼平¹, 张仑¹, 李小焦¹, 葛建军², 陈洪俊², 王中康^{1*}

(¹重庆市功能基因与调控技术重点实验室, 重庆大学生物工程学院, 重庆 400030)

(²中国检验检疫科学院动植物检疫研究所, 北京 100029)

摘要: 根据柑桔溃疡病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac)独有的蛋白基因序列和锁式探针公共连接序列分别设计特异性的锁式探针及其扩增引物, 优化系列反应条件, 建立了特异性的柑桔溃疡病菌滚环扩增体系。初步检测结果表明该体系能够特异性地检出 Xac 的菌体细胞及其 DNA, 而检测不出供试的其它植物病原细菌和柑桔叶面常见的多种附生细菌; 对 Xac 靶片段克隆质粒 DNA 的检测灵敏度为 10^2 copy/ μ L, 对 Xac 菌悬液的检测灵敏度为 20 cfu/ μ L, 比常规 PCR 的检测灵敏度稍高。用滚环扩增技术和常规 PCR 技术对田间采集的实际样品进行了检测, 两种方法的检测结果没有显著差异($P>0.01$)。由于锁式探针的公共连接序列对扩增的条件要求一致, 本体系的建立可以为植物病原微生物多靶标检测和病害检疫检验提供新的技术支撑。

关键词: 柑桔溃疡病菌; 锁式探针; 滚环扩增; 多靶标检测

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0375-05

柑桔溃疡病(Citrus bacterial canker disease, CBCD)是影响全球柑桔种植业发展的重大检疫性病害, 能够侵染为害绝大多数柑桔栽培品种, 其病原菌为地毯草黄单胞柑桔致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac), 是国内外重大检疫性病害。因抗病特效药剂缺乏, 澳大利亚、巴西、中国等柑桔产区对柑桔溃疡病显症苗木依然只能沿用挖除病树集中烧毁的根除方法。目前我国正在实施柑桔非疫生产区建设以及疫区定界调查、果园疫情动态监控, 都迫切需要建立快速、特异、准确的诊断技术。基于靶标 DNA 扩增的 PCR 技术作为成熟的分子检测方法, 已用于该病原菌的检测鉴定^[1-3], 而基于锁式探针(Padlock probe)的滚环扩增检测技术(Rolling circle amplification, RCA)是近几年发展起来的新的分子检测方法, 锁式探针独特的设计不仅具备 PCR 的高特异性、高灵敏度的优点, 还能现实多靶标的平行检测, 已越来越多的用于分子生物学基础理论研究和核酸

实际检测^[4-7]。

锁式探针(Padlock probe)及其应用是 Nilsson 等^[8]首次报道的, 其原理是只有当锁式探针和相应的检测靶 DNA 同时存在于连接体系中且完全互补配对时, 线性锁式探针才能在连接酶的作用下被有效地连接成环型, 而在没有相应靶 DNA 存在时锁式探针不被连接酶连接, 仅以线性形式存在。在核酸外切酶的作用下, 线性形式存在的锁式探针被消化水解, 而连接成环状的锁式探针就可以在接下来的扩增反应中得到扩增^[7]。对扩增产物或扩增信号进行分析, 就可以判断连接体系中是否存在检测靶 DNA。本研究旨在依据柑桔溃疡病菌独有的蛋白基因序列, 设计特异的锁式探针及其扩增引物, 优化 RCA 条件, 建立特异、准确的柑桔溃疡病菌滚环扩增检测技术体系, 为我国的柑桔非疫区建设和维护, 柑桔溃疡病的疫情动态监测与控制提供又一新的分子检测技术。

基金项目: 国家“863计划”(2006AA10Z434); 农业部重点攻关项目(2006-37)

*通讯作者: Tel: +86-23-65120489; E-mail: zkwang646@sina.com

作者简介: 黄冠军(1982-), 男, 广西桂林人, 硕士研究生, 研究方向为分子微生物。E-mail: huangguanjun574@163.com

收稿日期: 2007-07-13; 修回日期: 2007-11-07

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 柑桔溃疡病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac) 菌株 Xac04 分离自罹病柑桔叶片的典型病斑, 采用 PSA 培养基划线分离纯化得到; 番茄溃疡病菌 (*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*)、蜡质芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescence*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 及柑桔叶片表面附生的黄单胞菌属的细菌均由重庆大学基因工程研究中心提供。

1.1.2 主要试剂和仪器: Taq DNA ligase (Biolabs)、*Bst* DNA polymerase (Biolabs): Exonuclease I (TaKaRa): dNTPs (Promega)、100bp DNA ladder (Promega)。常规 PCR 扩增仪 (Mycycler, Bio-Rad, USA)、DU640 紫外分光光度计 (Beckman DU, USA)、凝胶成像系统 VersarDoc 1000 (Bio-Rad, USA)。

1.2 锁式探针及其扩增引物的设计

采用文献[1]报道的柑桔溃疡病菌 A 菌系独有区段的蛋白基因特异性引物 CQUJYF05/CQUJYR05 及 PCR 程序扩增 Xac, 并根据扩增产物 DNA(413bp) 的测序比对序列, 按照锁式探针的设计原则并采用软件 Oligo 6.0 及 Primer Express 设计锁式探针。设计的锁式探针其两端的检测序列分别与 CQUJYF05/CQUJYR05 引物对扩增片段序列毗邻互补, 而探针中间的一段连接序列对检测结果没有影响, 因此我们在小鼠的 *xist* 基因上任取一段序列作为锁式探针的连接序列, 并使用 MFold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>) 预测探针的二级结构, 确保探针的二级结构最小。锁式探针扩增引物根据其连接序列设计。再将所设计的探针序列和扩增引物在 NCBI 数据库进行同源性比对, 筛选出特异性强且性能稳定的探针及扩增引物。锁式探针、引物均由上海生物工程有限公司合成, 并对锁式探针的 5' 端进行磷酸化修饰(表 1)。

表 1 滚环扩增检测 Xac 所用到的锁式探针及其扩增引物
Table 1 Tested padlock probe and primer pairs for detection of Xac with RCA

Name	Sequences(5' - 3')	Length/bp
XacPP*	P-AGAAACGTCGCATGCTCTCCAGGTTCCCAATAGGTCCAGAATGTCAGCC- -GTTCTCTCACACCAGACTGCCCTGAGAAATAATCTAAGACTGGGAGTATGAGAGGT	105
OCPF1	AGCCGTTCTCTCACACCAGAC	20
OCPR1	GACATTCTGGACCTATTGGGA	21

*: XacPP means Padlock Probe designed for detection of Xac pathogen or DNA. XacPP sequence showed with capital letters is of sequence from *xist* gene (11637-11708).

1.3 Xac 的常规 PCR 检测

PCR 反应体系及程序参见文献[1]。

1.4 滚环扩增检测体系的建立与优化

1.4.1 连接反应及核酸外切酶 I 消化: 反应条件的优化包括磷酸化开环锁式探针 (Open circle probe, OCP) 终浓度、连接程序的选择、核酸外切酶 I 用量及反应时间。连接反应体积 10 μ L: 10 \times Taq DNA 连接酶缓冲液 1 μ L, 200pmol/L OCP 0.2 μ L, 40U/ μ L Taq DNA 连接酶 0.15 μ L, Sterilized ddH₂O 6.65 μ L, 检测模板 2 μ L。采用热循环连接法连接: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 65 $^{\circ}$ C 5min, 15 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15min 灭活 Taq DNA 连接酶。反应结束后立即将反应管冰浴 5min, 并向每一管中加入 10 μ L 核酸外切酶 I 混合液(10 \times 核酸外切酶 I 缓冲液 2 μ L; 5U/ μ L 核酸外切酶 I 2 μ L; Sterilized ddH₂O 6 μ L), 37 $^{\circ}$ C 保温 2.5 h 以彻底消化未环化的线型锁式探针, 再于 80 $^{\circ}$ C 反应 15 min 以灭活核酸外切酶 I。

1.4.2 滚环扩增: 滚环扩增的优化条件包括引物的用量、连接反应产物用量、反应温度及反应时间。滚环扩增反应体积 25 μ L: 10 \times *Bst* DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μ L, 10 μ mol/L OCPF1 1.25 μ L, 10 μ mol/L OCPR1 1.25 μ L, 10mmol/L dNTPs 0.75 μ L, 8U/ μ L *Bst* DNA 聚合酶 0.5 μ L, Sterilized ddH₂O 14.75 μ L, 连接反应产物 4 μ L。62.5 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 反应结束后取 7 μ L 于 2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳, 溴乙锭染色, 紫外凝胶成像系统照相分析。

1.5 滚环扩增检测体系的性能测试

1.5.1 检测的特异性: 将所有的供试菌株活化后制成浓度约 1 \times 10⁸cfu/mL 的细菌悬浮液, 柑桔溃疡病菌作为标准菌株, 番茄溃疡病菌等其它细菌及柑桔叶片表面附生的黄单胞菌作为参比菌株, Sterilized ddH₂O 作为空白对照。分别取 2 μ L 菌悬液进行滚环扩增检测和常规 PCR 检测, 测试并比较滚环扩增检测

的特异性。

1.5.2 检测的灵敏度：将 PCR 产物(413bp)的克隆质粒 DNA^[1]和 Xac 菌液经 10 倍梯度稀释后作为模板，取 2 μ L 进行滚环扩增检测和常规 PCR 检测，以确定并比较滚环扩增检测体系的检测灵敏度。

1.5.3 实际样品的初步检测：将从疫区采集的显症及无症状样品浸泡后在 PSA 平板上划线分离得到 Xac 疑似菌落，制成菌悬液后进行检测。同时对这些样品进行常规 PCR 检测，以比较两种检测方法的检测结果。

2 结果和分析

2.1 滚环扩增检测体系的建立

滚环扩增检测体系由连接反应、核酸外切酶 I 消化反应及滚环扩增 3 个步骤组成。连接反应中分别优化了锁式探针的浓度和连接程序，核酸外切酶 I 消化反应中优化了外切酶的用量及作用时间，滚环扩增采用的是标准的体系^[9]，只是优化了引物的用量以及反应温度。结果表明，采用热循环连接法对终浓度为 4 μ mol/L 的锁式探针进行连接，并用 10U 的外切酶 I 作用 2.5 h，会明显提高连接反应的效率，消除线型锁式探针对接扩增产物的影响^[10]。得到的环化锁式探针用稍加改进的滚环扩增体系进行扩增，在 62.5 $^{\circ}$ C 下反应 1 h 后得到了特异的滚环扩增产物，在琼脂糖凝胶电泳图上呈现典型的阶梯状分布(图 1)。同时我们设置了一个不加锁式探针的对照以检验引物是否有非特异性扩增，一个不加连接酶的对照以检验合成的锁式探针是否有自我环化，从图 1 可以看出这两个处理均没有产物生成，说明合成的引物和探针均符合实验要求。

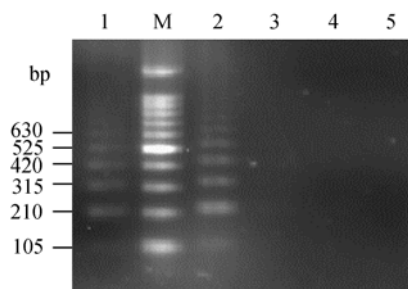


图 1 柑桔溃疡病菌滚环扩增的特异性产物

Fig. 1 Special products of RCA for Xac 1: Cloned plasmid of Xac as positive control; M: 100 bp DNA ladder; 2: Xac; 3: Sterilized ddH₂O as blank control; 4: No OCP control; 5: No ligase control.

2.2 滚环扩增检测的特异性

对于所测试的八种细菌，滚环扩增检测体系能够特异性的检出 Xac，而其余 7 种菌均不能检出，这与

PCR 的特异性检测结果相同，表明本实验建立的滚环扩增体系是特异的，适合于柑桔溃疡病菌的检测(图 2)。

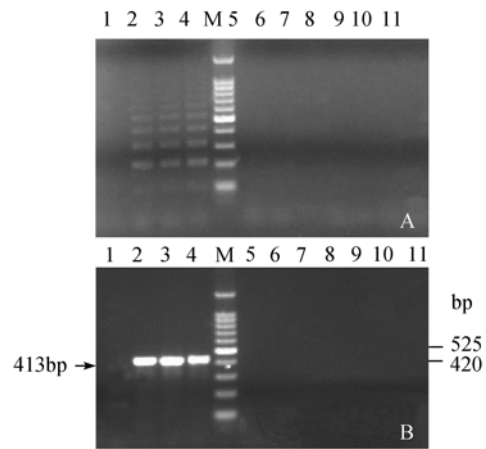


图 2 柑桔溃疡病菌滚环扩增体系的特异性

Fig. 2 The specificity of RCA for Xac A: Result of RCA. B: Result of conventional PCR. 1: Sterilized ddH₂O as blank control; 2 to 3: Cloned plasmid of Xac as positive control; 4: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; M: 100 bp DNA ladder; 5: *Escherichia coli*; 6: *Bacillus cereus*; 7: *Bacillus subtilis*; 8: *Xanthomonas* spp; 9: *Pseudomonas aeruginosa*; 10: *Staphylococcus aureus*; 11: *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*.

2.3 滚环扩增检测的灵敏度

将 Xac 菌悬液以及 Xac 阳性克隆质粒按照 10 倍梯度进行稀释，各取 2 μ L 分别进行滚环扩增检测和常规 PCR 检测。检测结果表明，滚环扩增的检测下限为 10⁴ cfu/mL 的 Xac 菌悬液(图 3-A)和 10² copy/ μ L 的克隆质粒(图 3-B)，而常规 PCR 的检测下限为 10⁴ cfu/mL 的 Xac 菌悬液(图 3-C)和 10³ copy/ μ L 的克隆质粒(图 3-D)，前者的检测灵敏度比后者的检测灵敏度稍高。实验结果还显示，滚环扩增检测体系对 Xac 阳性克隆质粒的检测灵敏度略高于对 Xac 菌悬液的检测灵敏度，其原因是 Xac 菌体残质会对低浓度下的扩增产生一定的影响，导致一定程度的检测假阴性^[11]。

2.4 实际样品的初步检测

运用滚环扩增检测方法以及常规 PCR 检测方法对重庆开县、奉节等地采集的柑桔叶片样品进行了实际检测，检测结果用阳性检出率(Positive percentage, 即检测呈阳性的样品在总样品中所占的比例)来表示，并使用 SPSS 统计软件分析两种方法检测结果的差异性(表 2)。数据分析显示，对于实际样品的检测，滚环扩增检测法与常规 PCR 法的检测结果没有统计学上的差异($p > 0.01$)，这表明建立的滚环扩增检测体系适合于柑桔溃疡病实际样品的检测。

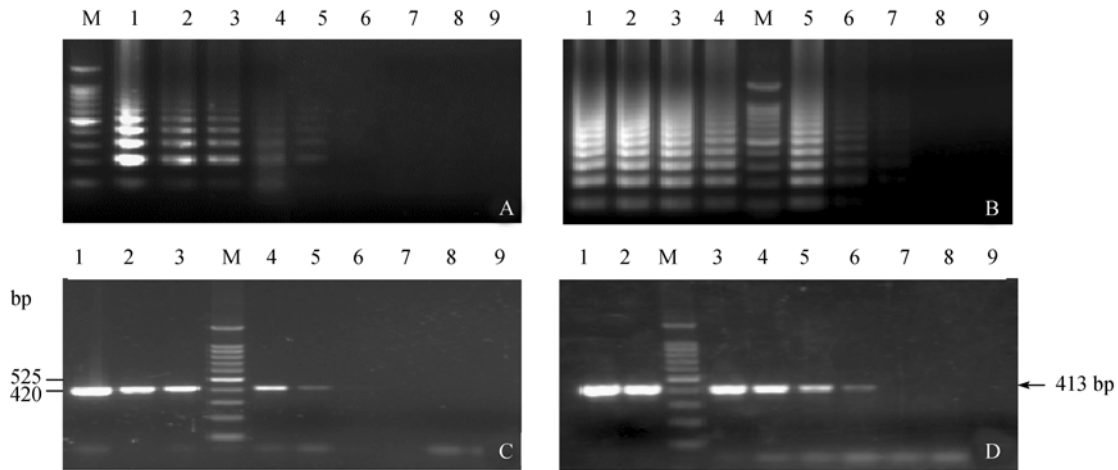


图 3 柑桔溃疡病菌滚环扩增检测的灵敏度

Fig. 3 The sensitivity of RCA for Xac A and C: 1-8: Ten times continuous dilution of pathogen from 10^8 cfu/mL to 10^1 cfu/mL, detected with RCA and PCR separately; 9: Sterilized ddH₂O as blank control; M: 100bp DNA ladder. B and D: 1-8: Cloned plasmid of Xac from 10^8 copy/ μ L to 10^1 copy/ μ L, detected with RCA and PCR separately; 9: Sterilized H₂O as blank control; M: 100 bp DNA ladder.

表 2 柑桔溃疡病实际样品的检测结果

Table 2 Detection result for Xac samples collected from field with RCA and PCR

Sample sources	Number of samples	Number of positive results		Positive percentage /%	
		RCA	PCR	RCA*	PCR
Kaixian (开县)	45	9	13	20	29
Fengjie (奉节)	19	12	11	63	58
Wanzhou (万州)	7	7	7	100	100
Total	71	28	31	39	44

*: $P > 0.01$: Positive percentage of RCA versus Positive percentage of PCR.

3 讨论

柑桔溃疡病是柑桔上一种危害严重的细菌性病害,快速准确的检测方法是非疫区病害预警监测与及时控制的技术保证。现行的血清学检测和胶体金免疫检测等常规诊断方法操作繁复、检测周期长、检测灵敏度低;而定性 PCR 检测技术和定量 PCR 检测技术都是对检测靶标的扩增,增加了交叉污染的风险^[6]。与之相反,RCA 技术只特异性的扩增锁式探针,避免检测模板的富集,最大限度地减少污染风险,更适合于高通量多靶标同步检测。

与常规 PCR 等其它检测技术相比,滚环扩增技术具有下述的优势: 锁式探针只有在它的两个末端均与靶标模板杂交形成 Watson-Crick 碱基对时才能够被连接成环型,从而能够极大地避免非特异性检测; 锁式探针中间有一段与靶标检测关系不大的连接序列,利用这段序列可以设计通用的扩增引物,现实多靶标同时检测; 锁式探针能与 RNA 模板杂交,避免了检测 RNA 模板时的反转录过

程; 滚环扩增使用的聚合酶具有链替代性,在恒温条件下就可以对环化的锁式探针进行超分支滚环扩增,得到极大量的产物,因此不需要热循环仪。

根据上述特点我们设计了锁式探针两个末端上的检测序列,使之与柑桔溃疡病菌独有的蛋白基因序列完全互补,毗邻配对,而与其他细菌的 DNA 序列不互补,或在锁式探针的 3' 末端存在碱基错配^[12],从而确保锁式探针只能与柑桔溃疡病菌独有的 DNA 序列杂交。此外,根据 Marianna 等^[7]以及 Judith 等^[12]的报道,采用不对称方法设计锁式探针会明显提高检测的特异性和连接效率,因此我们设计的锁式探针其 5' 端检测序列的碱基数为 24bp, T_m 值为 74°C ,比连接温度 (65°C) 高 9°C ,而 3' 端检测序列的碱基数为 17bp, T_m 值为 52°C ,比连接温度低 13°C ,再结合热循环连接法^[7,13,14]进行连接,结果取得了很好的检测特异性和灵敏度。

我们用滚环扩增检测法和常规 PCR 法对田间样品进行了实际的检测,结果表明两种检测方法得到的结果基本一致,所建立的滚环扩增体系适合于实际样品的检测。由于滚环扩增能同时进行多靶标检测,因此只要严格设计锁式探针,并使用探针的通用扩增引物就能实现多种植物病原微生物的同时检测^[7]。目前我们正在进行相关的研究,并且已取得了初步的成效。

在柑桔溃疡病田间样品的 PCR 检测中,由浸泡法制得的样品浸泡液里混有或多或少的杂质和色素。直接对浸泡液进行 PCR 检测,这些杂质及色素会极大地影响 *Taq* DNA polymerase 的扩增活性,从而影响和抑制 PCR 扩增的正常进行^[1]。我们在用本实验建立的滚环扩增体系进行初步的样品检测时也遇到了同样的问题,因此我们先将样品浸泡液在平板上划线,再

对得到的疑似菌落进行 RCA 检测, 从而消除了杂质与色素对 *Bst* DNA polymerase 的扩增活性及检测结果的影响。赵春燕等^[5]以及 Bin Wang 等^[6]采用固相 RCA 技术, 先分离出病原物的基因组 DNA(或 mRNA), 再进行滚环扩增检测, 也提高了检测的准确性和灵敏度。

滚环扩增检测法是近几年新兴的一种病原菌检测技术, 检测的高特异性和多靶标性是其它检测技术不完全具备的。本研究首次成功地建立了特异、灵敏的柑桔溃疡病菌的滚环扩增检测体系, 为膜片杂交以及实现柑桔重要检疫性有害生物的多靶标平行检测奠定了坚实的试验基础。

参 考 文 献

- [1] 王中康, 孙宪昉, 殷幼平, 等. 柑桔溃疡病 PCR 快速检验检疫技术研究. 植物病理学报(Acta Phytopathologica Sinica), 2004, **34**(1): 14–20.
- [2] Park DS, Hyun JW, Park YJ, *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, **16**(2): 1145–1149.
- [3] Cubero J, Graham JH, Gottwald TR. Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(6): 2849–2852.
- [4] 陶震, 蔡兴锋, 颜志强, 等. HRCA 技术在转基因植物检测中的应用. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2003, **19**(3): 294–300.
- [5] 赵春燕, 易世红, 李凡. 网状分枝扩增技术快速检测大肠埃希菌 0157: H7 及其他产志贺毒素大肠埃希菌. 吉林大学学报(医学版)(*Journal of Jilin University (Medicine Edition)*), 2006, **32**(1): 18–22.
- [6] Wang B, Potter SJ, Lin YG, *et al.* Rapid and Sensitive Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus by Rolling Circle Amplification. *Journal of clinical microbiology*, 2005, **43**(5): 2339–2344.
- [7] Szemes M, Bonants P, Weerd MD, *et al.* Diagnostic application of padlock probes-multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**(8): e70–e70.
- [8] Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, *et al.* Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science*, 1994, **265**(5181): 2085–2088.
- [9] Yi JZ, Zhang WD, Zhang DY. Molecular Zipper: a fluorescent probe for real-time isothermal DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 2006, **34**(11): e81–e81.
- [10] Hafner GJ, Yang IC, Wolter LC, *et al.* Isothermal Amplification and Multimerization of DNA by *Bst* DNA Polymerase. *BioTechniques*, 2001, **30**(4): 852–867.
- [11] Hsuih TC, Park YN, Zaretsky C, *et al.* Novel, Ligation-Dependent PCR Assay for Detection of Hepatitis C Virus in Serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, **34**(3): 501–507.
- [12] Pickering J, Bamford A, Godbole V, *et al.* Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, end-point detection of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**(12): e60–e60.
- [13] Banêr J, Isaksson A, Waldenstroëm E, *et al.* Parallel gene analysis with allele-specific padlock probes and tag microarrays. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**(17): e103–e103.
- [14] Qi XQ, Bakht S, Devos KM, *et al.* L-RCA (ligation-rolling circle amplification): a general method for genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**(22): e116–e116.

Detection system for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Rolling Circle Amplification

Guanjun Huang¹, Youping Yin¹, Lun Zhang¹, Xiaojiao Li¹, Jianjun Ge², Hongjun Chen², Zhongkang Wang^{1*}

¹ Key Laboratory of Gene Function and Regulation in Chongqing, College of Bioengineering at Chongqing University, Chongqing 400030, China

² Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China

Abstract: Padlock probe was designed based on the sequence of the unique hypothetical protein gene in complete genome of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), and amplification primers were designed according to the universal linking sequence of padlock probe. Detection system of rolling circle amplification (RCA) was established and optimized. Results show that the system could detect Xac and its DNA specifically, while other plant pathogens and bacteria attached on the surface of citrus leaves could not be detected. This indicates that the detection system had its specificity. The detection sensitivity of RCA was 20 cfu/μL for Xac cells and 10² copy/μL for cloned DNA fragment, which was slightly higher than the sensitivity of conventional PCR. Leaf samples collected from orange orchards were detected with both RCA and conventional PCR. The result shows that the Xac positive percentage had no remarkable difference between the two methods ($P>0.01$). Because the universal linking sequence in padlock probe can use same amplification condition, the new technology and detection system can be used to detect diverse plant pathogens simultaneously in plant quarantine and disease pre-symptom diagnosis.

Keywords: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; padlock probe; Rolling circle amplification; multiplex detection

Supported by the Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2006AA10Z434), the Key Technology Research and Development Program of Agriculture Ministry (2006-37)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-65120489; Email: zkwang646@sina.com

Received: 13 July 2007/ Revised: 7 November 2007