组织中的分布状况。此外,在该检测方法中省去了变性处理,但并未对检测效果产生影响,这可能反映出在杂交过程中,探针与PLMVd 的RNA 并不要求完全结合,部分核苷酸的结合即可得到好的检测效果。

影响核酸杂交特异性和灵敏度的因素主要有探针的特异性、封闭效果及变性条件[4]。封闭效果直接影响本底反应,在本试验中,考虑到预杂交试剂与杂交试剂中含有起封闭作用的Dehardent 试剂,因此省去了常规预杂交溶液与杂交溶液中常用的起封闭作用的鲑鱼精成分,也得到了理想的检测结果,降低了杂交成本。该试验所制备探针为RT-PCR 产物经回收后用生物素标记,避免了非特异性核酸和小片段产物的影响,使检测的特异性大大提高,为PLMVd 的检测提供了很好的诊断试剂。

参考文献

1 Flores R, Henandez C, et al. Studies on the detection, transmission and distribution of *peach latent mosaic viroid* in peach trees. Acta Horticulture, 1992, 309: 325~330

2 Faggioli F, Ragozzino E, Barba M. Simultaneous detection of stone or pome fruit viroids by single Tube-RT-PCR. Acta Horticulture, 2001, 242: 59~61

3 Zhang Yunping, Uyemoto J K, Kirkpatyick B C. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. Journal of virological methods, 1998, 71: 46~47

4 黄培堂等译. 分子克隆实验指南(第三版). 科学出版社, 2002, 549~550

柑橘黄龙病病原DNA 微量提取方法比较*

邹　敏[1,2]　宋　震[1]　唐科志[1]　董　鹏[2]　周常勇[1]

(1. 中国农业科学院柑桔研究所　重庆　400712　2. 西南农业大学植物保护学院)

Comparing of micro extraction methods of DNA from citrus huanglongbing pathogen. Zou Min[1,2], Song Zhen[1], Tang Kezhi[1], Dong Peng[2], Zhou Changyong[1] (1. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China; 2. College of Plant Protection, Southwest Agricultural University, Chongqing)

Abastract Three methods of micro extraction of DNA from citrus huanglongbing pathogen has been compared. Method 1 and method 2 are followed the methods conducted by Sandrine et al. and Hung et al., but the amount of the sample is reduced from 100mg and 250mg to 20mg and 10mg respectively. Method 3 is followed the method conducted by Zhou Changyong et al., the amount of the sample is 10mg. The result shows that the product of method 1 contains low concentration of DNA and much impurity, it is unfit for PCR detection of huanglongbing; product of method 2 contains high concentration of DNA and little impurity, it is fit for PCR detection of huanglongbing; product of method 3 contains high concentration of DNA and little impurity, it is also fit for PCR detection of huanglongbing. Since the progress for extraction in method 3 is quicker than that of method 2, method 3 is more fit for PCR detection of a lot of samples.

Key words citrus huanglongbing pathogen, micro extraction, DNA

* 收稿日期: 2005-01-31

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www

摘要　对比分析了 3 种黄龙病病原 DNA 微量提取方法, 方法 1 和方法 2 分别采用 Sandrine 等人和 Hung 等人的黄龙病病原 DNA 提取方法, 但取样量分别由 100mg 和 250mg 减少为 20mg 和 10mg; 方法 3 采用周常勇等人的微量核酸提取方法, 取样量为 10mg。实验结果表明: 方法 1 提取的病原 DNA 浓度低、杂质多, PCR 效果差; 方法 2 提取的病原 DNA 浓度较高、杂质少, PCR 效果好, 但提取周期较长, 不适合大批量样品的 PCR 快速检测; 方法 3 提取的病原 DNA 浓度较高、杂质少, PCR 效果好, 且提取速度快, 适宜大批量样品的 PCR 快速检测。

关键词　柑橘黄龙病病原　微量提取　DNA

柑橘黄龙病(huanglongbing) 是世界柑橘生产上的检疫性病害之一, 该病病原为细菌(*Liberobacter asiaticum*)[1], 通过嫁接传播, 自然传播介体为柑橘木虱。

目前对黄龙病的快速检测方法之一是 PCR 方法, 提取黄龙病病原 DNA 是运用 PCR 检测的第一步, 好的 DNA 抽提方法应该是 DNA 分子结构较为完整, 降解少, 蛋白质、多糖、多酚等杂质去除较为彻底, 同时又不会造成污染。

以前所采用的黄龙病病原 DNA 提取方法, 取样量多在 0.1~ 1g 之间[2~5], 研磨费时且容易在研磨时因粉末飞溅而造成污染。为减少取样量, 试采用 3 种方法提取黄龙病检测样品 DNA。方法 1 采用 Sandrine 等[2]的方法, 取样量由 100mg 减少为 20mg; 方法 2 采用 Hung 等[3]的方法, 取样量由 250mg 减少为 10mg; 方法 3, 采用周常勇等人[6]的微量核酸提取法。3 种方法比较的试验结果如下。

1　材料和方法

1.1　实验材料

黄龙病材料采自由广东杨村田间甜橙病树接穗嫁接后保存在中国农科院柑橘研究所脱毒中心温室的病苗, 用作负对照的无病材料来自脱毒中心防虫网室保存的甜橙苗。

1.2　样品 DNA 提取方法

比较了 3 种 DNA 提取方法, 这 3 种方法所提取的 DNA 均为总 DNA, 包括柑橘和黄龙病病原的 DNA, 具体步骤如下。

1.2.1　方法 1: 取 20mg 叶片中脉, 切碎放入 1.5mL 离心管, 液氮研磨; 加入 0.3M NaCl 溶液, 涡旋, 1000r/min 离心 5min; 取上清, 加入等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇(25∶24∶1); 充分混匀, 13000r/min 离心 5min; 弃上清, 加入 TE buffer 溶解沉淀。

1.2.2　方法 2: 取 10mg 叶片中脉, 切碎放入 1.5mL 离心管, 液氮研磨; 加入抽提缓冲液和十二烷基肌氨酸钠溶液, 充分混匀; 55℃水浴 1h, 6000r/min 离心 5min; 取上清液, 加入 NaCl 和 CTAB/Nacl 溶液, 65℃水浴 10min; 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24∶1), 充分混匀, 11000r/min 离心 5min; 取上清液, 加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇(24∶24∶1), 充分混匀, 11000r/min 离心 5min; 取上清, 加入 0.6 体积的异丙醇沉淀核酸, 12000r/min 离心 30min; 加入 70% 的乙醇清洗沉淀以除去残留的 CTAB; 快速干燥, 加入 TE buffer 溶解沉淀。

1.2.3　方法 3: 取 10mg 叶片中脉, 切碎放入 1.5mL 离心管, 液氮中研磨; 加入等体积的 TES 缓冲液和苯酚: 氯仿: 异戊醇(25∶24∶1), 充分混匀: 70℃水浴 5~ 10min; 取上清, 加到 Phamacial 公司的 Sephades G-50 微柱上, 5000r/min, 4℃离心 4min; 收集核酸溶液。

1.3　抽提样品 DNA 浓度、纯度和完整性检测

使用 BIO-RAD 公司的 SmartSpec3000 核酸浓度测定仪测定样品 DNA 浓度和纯度, 并经电泳分析所提取的 DNA 的浓度、纯度和完整性。

1.4　PCR 扩增

使用柑橘黄龙病特异性引物 CN265、

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www

CN266[7] 分别扩增 3 种方法所提取的黄龙病样品 DNA。PCR 反应在 Biometra 公司 T1PCR 仪上进行, 反应体系为 25μL, 成分为: 模板 1μL, 12.5pmol/μL 引物各 1μL, 2mmol/L dNTPs 2.5μL, 50mmol/L $MgSO_4$ 1 μL, 5U/μL Taq 酶 0.3μL, 10×PCR buffer 2.5μL, 超纯水 14.7μL。PCR 扩增程序为: 94℃5min; 94℃30s, 60℃30s, 72℃45s, 35 个循环; 72℃, 10min。PCR 反应产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上使用 BIO-RAD 公司 PowerPac 3000 电泳仪电泳, EB 染色, 在 BIO-RAD 公司 Gel. Doc2000 凝胶成像系统上观察结果。引物为上海生工合成, 碱基序列为: CN265: 5'TGGGTGGTTTACCATTCAGT3', CN266: 5'CGCGACTTCGCAACCCCAT3', 其它 PCR 试剂均购自 Promega 公司。

2　结果与分析

2.1　抽提样品 DNA 浓度、纯度和完整性

浓度测定仪检测的不同提取方法提取的总 DNA 浓度、纯度结果如表 1(方法 1、2、3 分别代号为 A、B、C)。

方法 1 提取的总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.1 到 1.5 之间, 说明其中蛋白质较多, DNA 浓度低: 方法 2 提取的总 DNA 平均浓度约为 158.29ng/μL, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 左右, 说明纯度较高; 方法 3 提取的总 DNA 平均浓度约为 295.43ng/μL, A_{260}/A_{280} 比值大多在 1.8 左右, 说明纯度较高。

电泳结果(图 1) 说明, 方法 1 提取总 DNA 浓度很低: 方法 2 和方法 3 提取的总 DNA 浓度较高且无明显差异, 同时所有方法提取的总 DNA 多为小片段的 DNA, 这可能是在涡旋时 DNA 有所断裂; 方法 2 和方法 3 的产物中还含有少量的 RNA, 方法 3 中所含有的 RNA 量要多于方法 2, 这是因为方法 2 反复提取上清, 而方法 3 只是一次过柱, RNA 去除不如方法 2 彻底。

表 1　不同提取方法的 DNA 浓度、纯度

抽提代号	DNA 浓度(ng/μL)	A_{260}/A_{280}
A1	*	1.4033
A2	*	1.4446
A3	*	1.1533
A4	*	1.5584
A5	*	1.3773
B1	71.6	1.8210
B2	97.61	1.8717
B3	80.53	1.7530
B4	130.84	1.7468
B5	10.87	2.2044
C1	48.28	1.7048
C2	302.82	1.5993
C3	197.96	5.7927
C4	246.29	1.9611
C5	281.82	2.5668

表中" * " 表示检测结果中杂质过多

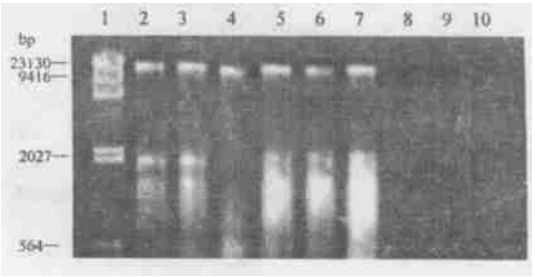

图 1　不同方法提取的总 DNA 电泳结果

1: λ DNA/HidIII; 2~4: 方法 2; 5~7: 方法 3; 8~10: 方法 1

2.2　黄龙病样品 DNA 的 PCR 扩增

图 2　不同方法提取的黄龙病病原 DNA 的 PCR 检测结果

1: 水; 2~6: 方法 2; M: 100bp DNA 分子量标准; 7~11: 方法 3; 12~16: 方法 1; 17: 阳性 CK; 18 阳性 CK

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www

PCR 结果(图 2) 显示, 方法 1 提取的黄龙病样品 DNA 的 PCR 条带模糊, 方法 2 和方法 3 提取的黄龙病 DNA 的 PCR 条带清晰, 说明方法 1 提取的 DNA 浓度很低, 方法 2 和方法 3 提取的黄龙病 DNA 浓度较高且检测结果相似, 这个结果与浓度测定仪和电泳结果显示的样品 DNA 浓度高低一致。

3　讨论

3.1　观察 **3** 种方法所提取的 DNA 溶液, 方法 1 的溶液黏稠且呈淡绿色, 说明其中含有多糖和少量的叶绿素等杂质, 浓度测定仪检测和 DNA 电泳说明其中 DNA 含量低且含有较多的蛋白质。方法 2 和方法 3 所提取的溶液呈透明状, 浓度测定仪和 DNA 电泳说明其中 DNA 浓度较高、杂质少。

3.2　方法 **2** 水浴时间为 **1**h, 且需反复的提取上清, 步骤较多, 提取 1 次, 周期约为 3h; 但所用试剂均为常规试剂, 成本相对较低。方法 3 水浴时间为 5~ 10min, 不需反复提取上清, 提取 1 次周期约为 30min; 但用到 Sephedex 等昂贵的耗材, 成本相对较高。

3.3　方法 **1** 提取的黄龙病病原 DNA 不适合黄龙病 PCR 检测的需要。方法 2 提取的黄龙病样品 DNA 浓度较高、杂质少, 且成本相对较低, 能满足实验室少量样品的 PCR 检测和研究要求, 但其步骤较多, 周期相对较长, 不能满足大批量样品快速检测的要求。方法 3 所提取的黄龙病样品 DNA 浓度较高、杂质少, 尽管成本相对较高, 但提取周期短, 能够同时运用 PCR 快速检测大批量样品, 是一种微量、快速、准确的黄龙病病原 DNA 提取方法。

参考文献

1　Villechanoux S, et al. The genome of the Non-cultured, bacteria-like organism of citrus associated with citrus greening disease contains the musG-rplKAJL-rpoBC gene cluster and gene for a bacteriophage type DNA polymerase. Curr Microbiol, 1993, 26: 161~ 166

2　Sandrine Jagoueix, Joseph Marie Bove, Monique Garnier. PCR detection of two ' Candidatus' liberobacter species associated with greening disease of citrus. Molecular and Cellular Probes, 1996, 10: 43~ 50

3　Ting-Hsuan Hung, Meng-Ling Wu, Houg-Ji Su. Identification of the Chinese box orange (Sverinia buxifolia) as an alternative host of the bacterium causing citrus Huanglongbing. European Journal of Plant Pathology, 2001, 107: 183~ 196

4　邓晓铃, 梁志慧, 唐伟文. 快速检测柑橘黄龙病病原的研究. 华南农业大学学报, 1999, 20(1): 1~ 4

5　孔维文, 邓晓铃, 梁志慧等. 柑橘黄龙病病原 DNA 片段的克隆和序列分析. 植物病理学报, 2000, 30(1): 71~ 75.

6　周常勇. 一种微量快速抽提柑橘衰退病毒(CTV) 核酸应用于 RT-PCR 扩增的方法. 福建农业大学学报, 2001, 30(增刊): 200

7　Harakava R, Marais L J, Ochasan J, et al. Improved Sensitivity in the Detection and Differentiation of Citrus Huanglongbing Bacteria form South Africa and the Philippines. Proc 14th Conf IOCV. Riverside: IOCV, 2000, 195~ 199

肇庆局从挪威进境木质包装中截获沟胸断眼天牛

2005 年 3 月 5 日, 肇庆局在对挪威进口的花岗石材木质包装检查时, 发现新鲜的虫粪和虫蛀道, 并当场截获多头活的天牛幼虫, 经实验室鉴定, 为沟胸断眼天牛 *Tetropium orienum* Gahan, 属我国分布未广危险性害虫。根据我国的有关法规, 已对该批木质包装实施熏蒸灭虫处理。

肇庆出入境检验检疫局　严国明

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www