



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107893123 A

(43)申请公布日 2018.04.10

(21)申请号 201711281274.2

(22)申请日 2017.12.05

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483号

(72)发明人 刘吉平 杨宏宇

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限  
公司 44102

代理人 任重

(51) Int. Cl.

C12Q 1/689(2018.01)

C12Q 1/6844(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

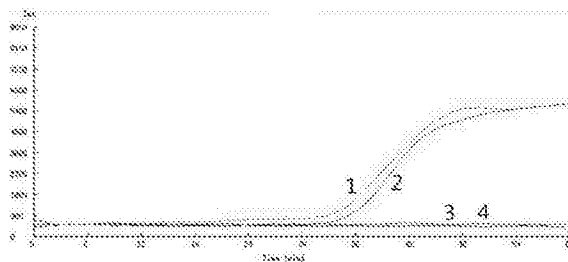
权利要求书1页 说明书8页  
序列表3页 附图6页

(54)发明名称

阴沟肠杆菌16SrDNA和引物组Yg2及其在阴沟肠杆菌分子检测方面的应用

(57)摘要

本发明公开了一种阴沟肠杆菌16SrDNA和引物组Yg2及其在阴沟肠杆菌分子检测方面的应用。设计的阴沟肠杆菌rDNA序列如SEQ ID NO.1所示,所述引物组包括引物Yg2-FIP(F1和F2)、Yg2-BIP(B1和B2)、Yg2-F3、Yg2-B3、Yg2-LoopF和Yg2-LoopB,所述引物的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.2~9所示。基于所述引物组的优异特异性,本发明设计了检测阴沟肠杆菌分子用的试剂盒,科学确定检测方法。应用本发明所述引物组以及检测方法,能够在病原菌侵染早期实现特异性检测,特异性强、灵敏度高、可视化,而且检测结果可靠准确、易于操作,在阴沟肠杆菌分子的实际检测以及制备检测阴沟肠杆菌分子相关产品中具有广泛的应用价值和重要意义。



1. 一种阴沟肠杆菌16SrDNA,其特征在于,其序列如SEQ ID NO.1所示。
2. 一种阴沟肠杆菌分子特异性检测用引物组Yg2,其特征在于,包括引物Yg2-FIP-F1、Yg2-FIP-F2、Yg2-BIP-B1、Yg2-BIP-B2、Yg2-F3、Yg2-B3、Yg2-LoopF和Yg2-LoopB,所述引物的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.2~9所示。
3. 一种权利要求2所述引物组Yg2的应用,其特征在于,应用于阴沟肠杆菌分子的检测或制备检测阴沟肠杆菌分子的检测产品。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述检测产品为试剂盒,其特征在于,包括LAMP反应液,所述LAMP反应液包括权利要求1所述引物组、2×反应缓冲液、Bst DNA聚合酶、密封液、无菌水和显示液。
5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述阴沟肠杆菌分子的检测的方法包括以下步骤:
  - S1. 提取待测样品的DNA;
  - S2. 利用权利要求1所述引物组对待测样品DNA进行恒温荧光扩增、显色反应、琼脂糖凝胶电泳三种方法即可判断样品中存在桑枯萎病病原阴沟肠杆菌;
  - S3. 步骤S2所述恒温荧光扩增反应结束后,加入显色液或采用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,根据恒温扩增检测仪是否出现S型曲线、显色反应颜色变化(橙红色变成绿色)、是否出现梯度扩增条带三种方法即可判断样品判断待测样品中是否存在阴沟肠杆菌分子。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,步骤S1所述的待测样品为桑树茎部、枝条和/或叶子。
7. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,步骤S2所述恒温荧光扩增反应的温度为63℃。
8. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,步骤S2所述恒温荧光扩增反应的时间为60~90min。
9. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,步骤S2所述恒温荧光扩增反应的体系为:

2×反应缓冲液	12.5 μL;
内引物(FIP/BIP)浓度 0.8μmol/L	
外引物(F3/B3)浓度 0.2μmol/L	引物混合物 1.0 μL;
环引物(LF/LB) 0.4μmol/L	
Bst DNA polymerase (8 U/μL)	1 μL;
Template DNA	2 μL;
ddH <sub>2</sub> O	补足至 25 μL;

其中,所述引物混合物为内引物、外引物、环引物按照体积比为1:1:1组成的混合物的量为1.0μL。

## 阴沟肠杆菌16SrDNA和引物组Yg2及其在阴沟肠杆菌分子检测方面的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地,涉及阴沟肠杆菌16SrDNA和引物组Yg2及其在阴沟肠杆菌分子检测方面的应用。

### 背景技术

[0002] 桑肠杆菌枯萎病又称桑枯萎病,是桑树的一种重要病害,近年来在华南蚕区桑园普遍发生,其发病速度快,蔓延迅速,对蚕桑业生产造成了严重的损失。继我国首次发现桑树细菌病的病原细菌为阴沟肠杆菌群(Enterobactercloacae complex)后,又陆续发现阿氏肠杆菌(E.cloacaeasburiae)、阴沟肠杆菌(E.cloacae)和1个未定名种(Enterobactersp.)等3个病原细菌。其中,阴沟肠杆菌

[0003] (Enterobactercloacae)是肠杆菌属中报道最多的一种植物病原菌,于1890年被JordanE0首次报道。而肠杆菌属是一种致病菌,寄主种类繁多、来源复杂,使桑枯萎病的检测和鉴别一直成为桑业研究的重点和难点。同时,桑枯萎病的后期病征与桑青枯病症状相似进一步增加了桑枯萎病检测和鉴别的难度。目前,桑枯萎病检测技术主要是采用传统的分离技术和PCR技术,耗时长,效率低,敏感度也较低。因此,开展对桑枯萎病的快速诊断技术研究,为系统预防和控制桑枯萎病提供重要技术依据,提高桑树检疫的质量,对桑枯萎病的防治具有重要的科学意义。

[0004] 环介导等温扩增法(loopmediatedisothermalamplification,LAMP)是日本学者Notomi等(2000)发明的一种新型的核酸体外等温扩增技术(NotomiT,etal.,2000.Loop-mediatedisothermalamplificationofDNA.NucleicAcidsResearch,28(12):e63)。随着LAMP技术的发展,已广泛应用于农、林、牧、渔、食品以及人类疾病的诊断研究中,并在检测病毒、细菌以及寄生虫等病原检测方面得到突破性进展。

[0005] LAMP法针对一个靶基因6个区段设计的引物,具有特异性强,快速、高效,灵敏度高,操作简便,检测方法简单等优点,肉眼即可判断结果,从而简化了检测过程,检测时间也大大缩短,但是该方法涉及多个引物,不仅要求单个引物具有特异性,其组合关系也是解决检测准确性和特异性的关键。目前尚未见应用LAMP技术用于检测桑枯萎病的相关技术报道,可以料见,基于相关引物以及检测关键条件的研究技术不足,LAMP技术尚未能应用于检测桑枯萎病方面的检测。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是克服现有桑枯萎病的检测技术不足,设计一种阴沟肠杆菌16S rDNA,基于所述阴沟肠杆菌16S rDNA,提供一种阴沟肠杆菌分子的检测引物组,而基于所述引物组可建立用于阴沟肠杆菌枯萎病的LAMP检测产品和方法,能够准确全面地判断样品是否含有阴沟肠杆菌分子,从而实现桑枯萎病的预测监控和防范。

[0007] 本发明要解决的另一技术问题是提供所述引物组的应用。

[0008] 本发明目的是通过以下技术方案实现的：

[0009] 提供一种阴沟肠杆菌16S rDNA,其序列如SEQ ID NO.1所示。其在检测判断样品是否含有阴沟肠杆菌分子具有良好的应用。

[0010] 其应用之一,就是基于所述阴沟肠杆菌16S rDNA,本发明同时提供一种阴沟肠杆菌分子特异性检测用引物组Yg2,包括引物Yg2-FIP-F1、Yg2-FIP-F2、Yg2-BIP-B1、Yg2-BIP-B2、Yg2-F3、Yg2-B3、Yg2-LoopF和Yg2-LoopB,所述引物的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.2~9所示。

[0011] 所述引物分别组成内引物对FIP/BIP、外引物对F3/B3、环引物对LF/LB。其中Yg2-FIP-F1和Yg2-FIP-F2一起使用,为一对引物,设计位置不同;Yg2-BIP-B1和Yg2-BIP-B2一起使用,为一对引物,设计位置不同。

[0012] 本发明同时提供所述引物组在阴沟肠杆菌分子的检测或制备检测阴沟肠杆菌分子的检测产品方面的应用。重要的是,本发明的特异检测引物和试剂盒均能够在病原菌侵染早期就能够特异性的检测出来,为阴沟肠杆菌枯萎病病的早期检测提供了一种简单快速的方法,结果具有可通过肉眼直接观察、具有很好的实际推广应用前景。

[0013] 所述检测产品可以为试剂盒,试剂盒种包括LAMP反应液,所述LAMP反应液包括权利要求1所述引物组、2×反应缓冲液、Bst DNA聚合酶、密封液和无菌水、显色液。

[0014] 优选地,所述阴沟肠杆菌分子的检测的方法包括以下步骤:

[0015] S1.提取待测样品的DNA;

[0016] S2.利用所述引物组对待测样品DNA进行恒温荧光扩增;

[0017] S3.步骤S2所述恒温荧光扩增反应结束后加入显色液或采用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,根据恒温扩增检测仪是否出现S型曲线、显色反应颜色变化(橙红色变成绿色)、是否出现梯度扩增条带三种方法即可判断样品判断待测样品中是否存在阴沟肠杆菌分子。

[0018] 优选地,步骤S1所述的待测样品为桑树茎部、枝条和/或叶子。

[0019] 优选地,步骤S2所述恒温荧光扩增反应的温度为63℃。

[0020] 优选地,步骤S2所述恒温荧光扩增反应的时间为60~90min,进一步优选90min。

[0021] 优选地,步骤S2所述恒温荧光扩增反应的体系为:

2×反应缓冲液	12.5 μL;
内引物 (FIP/BIP) 浓度 0.8μmol/L	引物混合物为 1 μL;
外引物 (F3/B3) 浓度 0.2μmol/L	

[0022] 环引物 (LF/LB) 0.4μmol/L

Bst DNA polymerase (8 U/μL)	1 μL;
Template DNA	2 μL;
ddH <sub>2</sub> O	补足至 25 μL;

[0023] 其中,引物混合物为内引物、外引物、环引物按照体积比为1:1:1组成的混合物,量为1.0μL。

[0024] 进一步地,2×反应缓冲液的组分包括Taq DNA聚合酶,40mM Tris-HCl (pH8.8)、

20mM KCl、16mM MgSO<sub>4</sub>、20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2% Tween20、2.8mM dNTPs和1.6M甜菜碱。

[0025] 进一步地,所述试剂盒的反应体系含有:内引物FIP 0.8μmol、内引物BIP 0.8μmol、外引物F30.2μmol、外引物B30.2μmol、环引物LF 0.4μmol、环引物LB0.4μmol、2×LAMP反应缓冲液12.5μL、模板DNA 2μL、Bst DNA聚合酶1μL,用无菌水补齐反应体系总体积到25μL,反应体系混匀后,加入20μL甘油(高压灭菌)密封。所述试剂盒还可以集成包括DNA提取所需试剂或LAMP扩增反应所需其他试剂。

[0026] 所述试剂盒的使用方法为:以待测样本DNA为模板,利用Yg2引物组进行荧光恒温扩增反应,反应结束后凝胶电泳检测扩增产物,根据扩增DNA片段验证结果;所述判定结果的标准为:出现S型曲线、显色液由橙红色变成绿色且凝胶电泳扩增DNA片段呈现梯度扩增,证明存在有病原菌阴沟肠杆菌分子。

[0027] 本发明具有以下有益效果:

[0028] 本发明利用阴沟肠杆菌rDNA序列的特异区段,以全新的16S rDNA基因的全序列为靶基因,设计获得了6条特异性强、灵敏性好的阴沟肠杆菌特异性检测引物组,所述引物组可以将阴沟肠杆菌从桑树病原真菌如桑里白粉病病原菌(*Phyllactinia moricola*)、桑树细菌青枯病病原劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)、桑树病毒病花叶萎缩病病原菌、桑污叶病病原菌(*Pseudocercospora* sp.),以及假单胞菌属、芽孢杆菌、克雷伯氏菌、白僵菌、曲霉菌、青霉菌、枝孢霉菌等各种桑树病原物区分开来。并且检测结果可靠、易于操作(简单快速)、特异性强、灵敏度高、可视化,可用于阴沟肠杆菌的快速检测,尤其是快速区分其它桑树病害,在阴沟肠杆菌的实际检测应用中具有重要的技术支撑价值,可为桑叶的健康生产与资源利用提供保证。

[0029] 基于所述引物组,本发明引物及相关试剂可组装成试剂盒,使用方便。而且适用的LAMP扩增模板非常多样,适用范围广,可以是多种样品的DNA,桑茎部、枝条等提取的总DNA为模板,大大增加了检测对象的范围。

[0030] 本发明的桑阴沟肠杆菌特异性检测试剂盒,使用方便,而且适用的LAMP扩增模板非常多样,适用范围广,可以是多种样品的DNA,桑茎部、枝条等提取的DNA为模板,大大增加了检测对象的范围。

[0031] 本发明的特异检测引物和试剂盒均能够在病原菌侵染早期就能够特异性的检测出来,为阴沟肠杆菌枯萎病的早期检测提供了一种简单快速的方法,具有很好的实际推广应用前景。

[0032] 本发明的应用可以在桑枯萎病出现明显病症、病害大规模爆发前,检测病株中原菌的存在及其含量,进而对桑园发病病株等进行及时相应的处理,及时监控灾害的发生以备采取相应的方法措施。

## 附图说明

[0033] 图1:引物组yg2在LAMP检测恒温荧光检测仪结果示意图。其中,1.阴沟肠杆菌DNA;2.桑枯萎病病株枝条总DNA;3.健康桑树枝条总DNA(阴性对照)4.水。

[0034] 图2:引物组yg2在LAMP检测显色反应结果示意图:其中,1.阴沟肠杆菌DNA;2.桑枯萎病病株枝条总DNA;3.健康桑树枝条总DNA(阴性对照)4.水。

[0035] 图3:引物组yg2在LAMP检测电泳结果示意图。其中,M:TaKaRa DL2000Marker;游道

1-4分别为:1.阴沟肠杆菌DNA;2.桑枯萎病病株枝条总DNA;3.健康桑树枝条总DNA(阴性对照)4.水。

[0036] 图4:yg2引物组对桑树细菌性枯萎病病原LAMP特异性检测在恒温荧光检测仪结果示意图。注:图中1:*Ralstonia solanacearum*(青枯劳尔氏菌);2:桑花叶萎缩病;3:*Phyllactinia moricola*(桑里白粉病病原菌-桑球针壳);4:*N.bombycis*(桑蚕微粒子孢子);5:*Beauveria bassiana*(白僵菌);6:试剂盒阳性对照;7:阴性对照(水);8:*Pseudocercospora* sp.(桑污叶病-桑假尾孢菌);9:*E.cloacae*(阴沟肠杆菌);10:*Pseudomonas* sp.(恶臭假单胞菌);11:*Bacillus cohn*(芽孢杆菌);12:*Klebsiella* sp.(产酸克雷伯氏菌);13:*Aspergillus* sp.(曲霉);14:*Penicillium verruculosum*(疣孢青霉);15:*Cladosporium* sp.(枝孢霉)

[0037] 图5:yg2引物组对桑树细菌性枯萎病病原LAMP特异性显色法检测结果示意图。注:图中1:*Ralstonia solanacearum*(青枯劳尔氏菌);2:桑花叶萎缩病;3:*Phyllactinia moricola*(桑里白粉病病原菌-桑球针壳);4:Nb;5:*Beauveria bassiana*(白僵菌);6:试剂盒阳性对照;7:阴性对照(水);8:*Pseudocercospora* sp.(桑污叶病-桑假尾孢菌);9:*E.cloacae*(阴沟肠杆菌);10:*Pseudomonas*属(恶臭假单胞菌);11:*Bacillus cohn*(芽孢杆菌);12:*Klebsiella* sp.(产酸克雷伯氏菌);13:*Aspergillus* sp.(曲霉);14:*Penicillium verruculosum*(疣孢青霉);15:*Cladosporium* sp.(枝孢霉)

[0038] 图6:yg2引物组对桑树细菌性枯萎病病原LAMP特异性检测电泳结果示意图。其中,M:TaKaRa DL2000Marker;泳道1-15:1:*Ralstonia solanacearum*(青枯劳尔氏菌);2:桑花叶萎缩病;3:*Phyllactinia moricola*(桑里白粉病病原菌-桑球针壳);4:*N.bombycis*(桑蚕微粒子孢子);5:*Beauveria bassiana*(白僵菌);6:阴性对照(水);7:试剂盒阳性对照;8:*Pseudocercospora* sp.(桑污叶病-桑假尾孢菌);9:*E.cloacae*(阴沟肠杆菌);10:*Pseudomonas* sp.(恶臭假单胞菌);11:*Bacillus cohn*(芽孢杆菌);12:*Klebsiella* sp.(产酸克雷伯氏菌);13:*Aspergillus* sp.(曲霉);14:*Penicillium verruculosum*(疣孢青霉);15:*Cladosporium* sp.(枝孢霉)

[0039] 图7:引物组yg2灵敏度LAMP检测(DNA浓度)在恒温荧光检测仪结果示意图。其中,1:50.0ng/ $\mu$ L;2:5.0ng/ $\mu$ L;3:5.0 $\times$ 10<sup>-1</sup>ng/ $\mu$ L;4:5.0 $\times$ 10<sup>-2</sup>ng/ $\mu$ L;5:5.0 $\times$ 10<sup>-3</sup>ng/ $\mu$ L;6:5.0 $\times$ 10<sup>-4</sup>ng/ $\mu$ L;7:5.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>ng/ $\mu$ L;8:试剂阳性对照;;9:水(阴性对照)

[0040] 图8:引物组yg2灵敏度LAMP(DNA浓度)显色法检测结果示意图。注:图中1:50.0ng/ $\mu$ L;2:5.0ng/ $\mu$ L;3:5.0 $\times$ 10<sup>-1</sup>ng/ $\mu$ L;4:5.0 $\times$ 10<sup>-2</sup>ng/ $\mu$ L;5:5.0 $\times$ 10<sup>-3</sup>ng/ $\mu$ L;6:5.0 $\times$ 10<sup>-4</sup>ng/ $\mu$ L;7:5.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>ng/ $\mu$ L;8:试剂阳性对照;;9:水(阴性对照)

[0041] 图9:yg2引物组灵敏度LAMP检测(DNA浓度)电泳结果示意图。其中,M:TaKaRa DL2000Marker;泳道1:50.0ng/ $\mu$ L;2:5.0ng/ $\mu$ L;3:5.0 $\times$ 10<sup>-1</sup>ng/ $\mu$ L;4:5.0 $\times$ 10<sup>-2</sup>ng/ $\mu$ L;5:5.0 $\times$ 10<sup>-3</sup>ng/ $\mu$ L;6:5.0 $\times$ 10<sup>-4</sup>ng/ $\mu$ L;7:试剂阳性对照;8:5.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>ng/ $\mu$ L;9:水(空白对照)。

[0042] 图10:引物组yg2灵敏度LAMP(菌液浓度)在恒温荧光检测仪检测结果示意图。其中,1:1 $\times$ 10<sup>4</sup>CFU/m L;2:1 $\times$ 10<sup>3</sup>CFU/m L;3:1 $\times$ 10<sup>2</sup>CFU/m L;4:1 $\times$ 10<sup>1</sup>CFU/m L;5:1 $\times$ 10<sup>0</sup>CFU/m L;6:阴沟肠杆菌DNA(阳性对照);7:水(阴性对照);8:试剂阳性对照;

[0043] 图11:引物组yg2灵敏度LAMP(菌液浓度)显色法检测结果示意图。其中,1:1 $\times$ 10<sup>4</sup>CFU/m;2:1 $\times$ 10<sup>3</sup>CFU/m L;3:1 $\times$ 10<sup>2</sup>CFU/m L;4:1 $\times$ 10<sup>1</sup>CFU/m L;5:1 $\times$ 10<sup>0</sup>CFU/m L;6:阴沟

肠杆菌DNA (阳性对照);7:水 (阴性对照);8:试剂阳性对照。

[0044] 图12:yg2引物组灵敏度LAMP检测 (菌液浓度)电泳结果示意图。其中,M:TaKaRa DL2000Marker;泳道1: $1 \times 10^4$ CFU/m L;2: $1 \times 10^3$ CFU/m L;3: $1 \times 10^2$ CFU/m L;4: $1 \times 10^1$ CFU/m L;5: $1 \times 10^0$ CFU/m L;6:桑肠杆菌DNA (阳性对照),7:水 (阴性);8:试剂阳性对照。

[0045] 图13:桑树枝条。其中,上部为有阴沟肠杆菌枯萎病发作的桑树枝条;下部为健康的桑树枝条;图中标尺为1cm。

[0046] 图14:桑树茎部。其中,上部为健康的桑树茎部;下部为有阴沟肠杆菌枯萎病发作的桑树茎部;图中标尺为1cm。

[0047] 图15:有阴沟肠杆菌枯萎病发作的桑树症状。

[0048] 图16:引物组Yg2荧光LAMP检测各材料在恒温荧光检测仪的结果示意图。其中,1:阴沟肠杆菌DNA;2:健康桑树木质部浸出液;3:患病桑树木质部浸出液4:-健康桑树枝条总DNA (阴性对照);5:患病桑树枝条总DNA;6:健康桑树叶总DNA;A7:试剂盒阳性对照;8:水;9:空白对照。

[0049] 图17:引物组Yg2荧光LAMP检测各材料在显色法的结果示意图。其中,1:阴沟肠杆菌DNA;2:健康桑树木质部浸出液;3:患病桑树木质部浸出液4:-健康桑树枝条总DNA (阴性对照);5:患病桑树枝条总DNA;6:健康桑树叶总DNA;A7:试剂盒阳性对照;8:水;

[0050] 图18:引物组Yg2荧光LAMP检测各材料电泳结果示意图。其中,M:TaKaRa DL2000Marker;1:阴沟肠杆菌DNA;2:健康桑树木质部浸出液;3:患病桑树木质部浸出液4:-健康桑树枝条总DNA (阴性对照);5:患病桑树枝条总DNA;6:健康桑树叶总DNA;A7:试剂盒阳性对照;8:水;

## 具体实施方式

[0051] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0052] 实施例1检测引物设计及LAMP扩增方法的建立

[0053] 1、引物设计

[0054] 本发明首先通过高通量测序方法,并用细菌通用引物27F/1492R (Jiang and Wu et al., 2011)成功获得全新的阴沟肠杆菌16SrDNA全基因序列SEQ ID NO.1所示,然后设计了大量的引物,经过分析和筛选,最终获得一组具有优异的特异性和灵敏性的引物组,命名为Yg2。该引物组序列如下:

[0055]

引物组	引物名	长(bp)	基因位点	序列 (5' -3')
Yg2引物	Yg2-FIP	38	F1:1041-1060	TCACAACACGAGCTGACGAC-
			F2:973-990	AGAGATGGATTGGTGCCT

[0056]

组	Yg2-BIP	37	B1:1063-1081	ACGAGCGCAACCCTTATCC-
			B2:1129-1146	ATCACTGGCAGTCTCCTT
	Yg2-F3	20	936-955	AGAACCTTACCTGGTCTTGA
	Yg2-B3	18	1170-1187	GGCCATGATGACTTGACG
	Yg2-LoopF	19	1014-1032	CAGCACCTGTCTCACAGTT
	Yg2-LoopB	18	1083-1100	TTGTTGCCAGCGGTTAGG

[0057] 2、LAMP扩增方法的建立

[0058] 以分离的肠杆菌属DNA为模板,以试剂盒(广州双螺旋公司)的阳性和阴性(水)作为对照,使用引物组Yg2参照以下反应体系,在63℃下进行LAMP扩增序列如SEQ ID NO.10所示。扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

[0059] 反应的体系为:

2×反应缓冲液 12.5 μL;  
 内引物(FIP/BIP)浓度 0.8 μmol/L 内引物、外引物、环引物按 1: 1:  
 外引物(F3/B3)浓度 0.2 μmol/L 1 体积比均匀混匀, 取为 1 μL;

[0060] 环引物(LF/LB) 0.4 μmol/L

Bst DNA polymerase (8 U/μL) 1 μL;  
 Template DNA 2 μL;  
 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μL。

[0061] 其中,内引物、外引物、环引物按照体积比为1:1:1组成的混合物的量为1.0 μL。

[0062] 3、结果判断

[0063] 引物Yg2引物组:LAMP反应结束后根据恒温荧光检测仪是否显示有S型曲线判定样品中是否含有阴沟肠杆菌,反应管出现S型曲线为阳性,无曲线为阴性;LAMP反应结束后与显色液(核酸荧光染料SYBR Green I)反应,阳性为绿色,阴性为橙红色;琼脂糖凝胶电泳出现梯度扩增为阳性,无扩增条带为阴性。通过S型曲线、显色反应、梯度扩增条带三种方法即可判断样品中存在桑枯萎病病原阴沟肠杆菌。

[0064] 4、桑枯萎病病原菌的检测

[0065] 恒温荧光检测仪结果如图1所示,Yg2引物组都能检测阴沟肠杆菌DNA和桑枯萎病株桑枝总DNA的反应管显示S型曲线;显色反应结果如图2所示,阴沟肠杆菌DNA和桑枯萎病株桑枝总DNA的反应管呈现绿色;电泳结果显示:阴沟肠杆菌DNA和桑枯萎病株桑枝总DNA的反应管琼脂糖凝胶电泳出现梯度扩增,因此Yg2引物组能够检测到阴沟肠杆菌的存在,可以用于桑枯萎病的病原检测。

[0066] 实施例2 Yg2引物组的特异性检测

[0067] 1、分别以多种从病株中的根、茎分离到的假单胞菌属DNA、芽孢杆菌DNA、克雷伯氏菌DNA等细菌,以及桑树病原真菌的桑里白粉病病原菌(*Phyllactinia moricola*)、桑树细



菌青枯病病原劳尔氏菌DNA、桑树病毒病花叶萎缩病病原菌DNA、桑污叶病病原菌DNA以及白僵菌DNA、曲霉 (*Aspergillus nomius*) DNA、青霉菌DNA、枝孢霉菌DNA等真菌作为对照组,利用Yg2引物组,以实施例1的方法进行荧光扩增,显色反应、琼脂糖凝胶电泳检测。

[0068] 2、引物的扩增结果分别如附图4、图5、图6所示。结果显示,只有桑枯萎病病原菌(阴沟肠杆菌)DNA在目标位置出现S型曲线,显示结果变绿色且琼脂糖凝胶电泳该目标位置出现梯度扩增。表明该引物组可以特异性地检测阴沟肠杆菌。

[0069] 实施例3 Yg2引物组的灵敏性检测

[0070] 1、提取阴沟肠杆菌的DNA,原始浓度为50ng/ $\mu$ L。

[0071] 将上述DNA用1 $\times$ TE进行稀释,分别稀释10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>倍。即得到浓度梯度为5.0、5.0 $\times$ 10<sup>-1</sup>、5.0 $\times$ 10<sup>-2</sup>、5.0 $\times$ 10<sup>-3</sup>、5.0 $\times$ 10<sup>-4</sup>、5.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>ng/ $\mu$ L。

[0072] 2、以上述各浓度的DNA为模板,以Yg2引物组,以实施例1的方法进行LAMP荧光扩增、显色反应、琼脂糖凝胶电泳检测。

[0073] 3、结果如图7、图8、图9所示,Yg2引物组能检测到病原菌DNA浓度为5.0 $\times$ 10<sup>-4</sup>,具有很好的检测灵敏性。

[0074] 4、将培养至1 $\times$ 10<sup>8</sup>CFU/m L的菌液梯度稀释为1 $\times$ 10<sup>7</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>6</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>5</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>4</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>3</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>2</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>1</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>0</sup>CFU/m L)。

[0075] 5、以1 $\times$ 10<sup>4</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>3</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>2</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>1</sup>CFU/m L,1 $\times$ 10<sup>0</sup>CFU/m L的浓度为模板,以Yg2引物组,以实施例1的方法进行LAMP荧光扩增、显色反应、琼脂糖凝胶电泳检测。

[0076] 6.结果如图10、图11、图12所示,Yg2引物组能检测到菌液浓度为1 $\times$ 10<sup>2</sup>CFU/m L,具有很好的检测灵敏性。

[0077] 特异性和灵敏性的实验结果,充分证明引物Yg2引物组既能够特异性的检测阴沟肠杆菌,又具有很好的检测灵敏性。

[0078] 实施例4感染阴沟肠杆菌枯萎病的桑枝和桑茎部的病原菌检测

[0079] 1、材料的选定

[0080] 随机选取实验材料,包括患病桑园的桑树茎部和枝条,与无病的桑树茎部、枝条及新鲜的叶子等材料,如附图13~15所示。

[0081] 按照以下步骤操作:

[0082] S1.包含桑树成分的材料总DNA提取

[0083] 使用鼎国植物基因组DNA提取试剂盒(LOT:69700110)进行DNA的提取,步骤如下:

[0084] 选取含植物组织材料,使用液氮充分研磨至粉末;1.5mL离心管中加入800 $\mu$ L的Lysis Buffer,并添加 $\beta$ -巯基乙醇至终浓度0.1%;加入液氮研磨后的粉末样品,65 $^{\circ}$ C恒温金属浴30分钟至2小时;先使用500 $\mu$ L酚/氯仿/异戊醇振荡混匀5分钟,后12000r/min离心10分钟,取上清;加入500 $\mu$ L氯仿,振荡混匀5分钟,后12000r/min离心10分钟,取上清;加入700 $\mu$ L的Binding Buffer,混匀;吸取混合液于离心柱中,12000r/min离心1分钟,弃滤液;加入700 $\mu$ L的Washing BufferA,12000r/min离心1分钟,弃滤液;加入700 $\mu$ L的Washing Buffer B,12000r/min离心1分钟,弃滤液;加入500 $\mu$ L的Washing Buffer B,12000r/min,离心1分钟,弃滤液;再次12000r/min离心2分钟,弃滤液弃收集管;将离心柱装入1.5mL离心管中,加

入50 $\mu$ L TE Buffer, 室温放置3分钟, 12000r/min离心2分钟; 重复上一步骤, 即获得纯度较高的总DNA。

[0085] S2. 以Yg2引物组作为引物进行恒温荧光扩增。以步骤S1得到的各材料提取DNA为模板, 用特异性Yg2引物组进行荧光LAMP反应, 反应条件: 时间60min; 温度63 $^{\circ}$ C。反应体系如实施例1所述。

[0086] S3. 步骤S2所述LAMP荧光扩增、显色反应、琼脂糖凝胶电泳检测。判断待测样品中是否存在阴沟肠杆菌分子。

[0087] 反应结果如附图16所示, 桑肠杆菌枯萎病病发作的桑园的桑枝条均出现S型曲线, 可检测出病原菌DNA的存在。

[0088] 如附图17所示, 显示反应结果显示, 桑肠杆菌枯萎病病发作的桑园的桑枝条的反应管均变成绿色, 可检测出病原菌DNA的存在

[0089] 如图18所示, 发作过阴沟肠杆菌枯萎病桑树枝条上检测到病原菌DNA存在(泳道3、泳道5), 而用作对照的新鲜桑枝条则未检测出病原存在(泳道2、泳道4、泳道6), 证明有阴沟肠杆菌枯萎病发作过的桑园, 其桑树枝条上存在有病原菌。说明该引物可用于阴沟肠杆菌枯萎病病害诊断。由图16、图17、图18结果可知, 本发明所述引物组可以将阴沟肠杆菌菌从桑树病原真菌如桑里白粉病病原菌(*Phyllactinia moricola*)、桑树细菌青枯病病原劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)、桑树病毒病花叶萎缩病病原菌、桑污叶病病原菌(*Pseudocercospora* sp.), 以及假单胞菌属、芽孢杆菌、克雷伯氏菌、白僵菌、曲霉菌、青霉菌、枝孢霉菌等各种桑树病原物区分开来。并且检测结果可靠、易于操作(简单快速)、特异性强、灵敏度高, 可用于阴沟肠杆菌的快速检测, 尤其是快速区分其它桑树病害, 在阴沟肠杆菌的实际检测应用中具有重要的技术支撑价值, 可为桑叶的健康生产与资源利用提供保证。在桑树病害防控时, 应考虑桑树枝条在病原菌传播循环中的作用, 在桑园管理时, 应做好桑枝条的处理工作。

## 序列表

<110>	华南农业大学	
<120>	阴沟肠杆菌16SrDNA和引物组Yg2及其在阴沟肠杆菌分子检测方面的应用	
<160>	10	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	1554	
<212>	DNA	
<213>	阴沟肠杆菌 ( <i>Enterobacter cloacae</i> )	
<400>	1	
	acttaaattg aagagtttga tcatggetca gattgaacgc tggcggcagg cctaacacat	60
	gcaagtcgaa cggtagcaca gagagettgc tetcgggtga cgagtggcgg acgggtgagt	120
	aatgtctggg aaactgcctg atggaggggg ataactactg gaaacggtag ctaataccgc	180
	ataacgtcgc aagaccaaag agggggacct tcgggectet tgccatcaga tgtgccaga	240
	tgggattagc tagtaggtgg ggtaacgget cacctaggcg acgateccta gctggtctga	300
	gaggatgacc agccacactg gaactgagac acggtccaga ctctacggg aggcagcagt	360
	ggggaatatt gcacaatggg cgcaagcctg atgcagccat gccgcgtgta tgaagaaggc	420
	cttcgggttg taaagtactt tcagcgggga ggaaggcgt aaggttaata accttgtcga	480
	ttgacgttac ccgcagaaga agcaccggct aactccgtgc cagcagccgc ggtaatacgg	540
	agggtgcaag cgttaatcgg aattactggg cgtaaagcgc acgcaggcgg tctgtcaagt	600
	cggatgtgaa atccccgggc tcaacctggg aactgcattc gaaactggca ggctagagtc	660
	ttgtagaggg gggtagaatt ccaggtgtag cggtgaaatg cgtagagatc tggaggaata	720
	ccgggtggcga aggcggcccc ctggacaaag actgacgctc aggtgcgaaa gcgtggggag	780
	caaacaggat tagataccct gtagtccac gccgtaaacg atgtcgactt ggaggttgtg	840
	cccttgaggc gtggcttccg gagctaacgc gttaagtcca ccgcctgggg agtacggccc	900
	caaggttaaa actcaaatga attgacgggg gccgcacaa gcggtggagc atgtggttta	960
	attcgatgca acgcgaagaa cttacctac tcttgacatc cagagaactt agcagagatg	1020
	ctttggtgcc ttcgggaact ctgagacagg tgctgcatgg ctgtcgtcag ctctgtttgt	1080
	gaaatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccttat ctttgttgc cagcggttag	1140
	gccgggaact caaaggagac tgccagtgat aaactggagg aaggtgggga tgacgtcaag	1200
	tcatcatggc cttacgagt agggctacac acgtgctaca atggcgcata caaagagaag	1260
	cgacctcgcg agagcaagcg gacctataa agtgcgtcgt agtccggatt ggagtctgca	1320
	actcgactcc atgaagtcgg aatcgetagt aatcgtggat cagaatgcca cggatgaatac	1380
	gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtgggttgca aaagaagtag	1440
	gtagcttaac cttcgggagg gcgettacca ctttgtgatt catgactggg gtgaagtcgt	1500
	aacaaggtaa ccgtagggga acctgcggtt ggatacctc cttaccttaa agaa	1554
<210>	2	
<211>	20	

<212> DNA	
<213> 引物Yg2-FIP-F1序列 (primer)	
<400> 2	
tcacaacacg agctgacgac	20
<210> 3	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 引物Yg2-FIP-F2序列 (primer)	
<400> 3	
agagatggat tggcgcct	18
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 引物Yg2-BIP-B1序列 (primer)	
<400> 4	
acgagcgcaa cccttatcc	19
<210> 5	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 引物Yg2-BIP-B2序列 (primer)	
<400> 5	
atcactggca gtctcctt	18
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 引物Yg2-F3序列 (primer)	
<400> 6	
agaaccttac ctggtccttga	20
<210> 7	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 引物Yg2-B3序列 (primer)	
<400> 7	
ggccatgatg acttgacg	18
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 引物Yg2-LoopF序列 (primer)	
<400> 8	

cagcacctgt ctcacagtt	19
<210> 9	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 引物Yg2-LoopB序列 (primer)	
<400> 9	
ttgttgccag cggtagg	18
<210> 10	
<211> 157	
<212> DNA	
<213> 实施例1LAMP扩增产物序列 (An example of implementation)	
<400> 10	
agagatggat tggccttc gggaaactgtg agacaggtgc tgcattgctg tcgtcagctc	60
gtgttgtaa atgttgggtt aagtccegcgca acgagcgcaa cccttatect ttgttgccag	120
cggtaggcc gggaaactcaa aggagactgc cagtgat	157

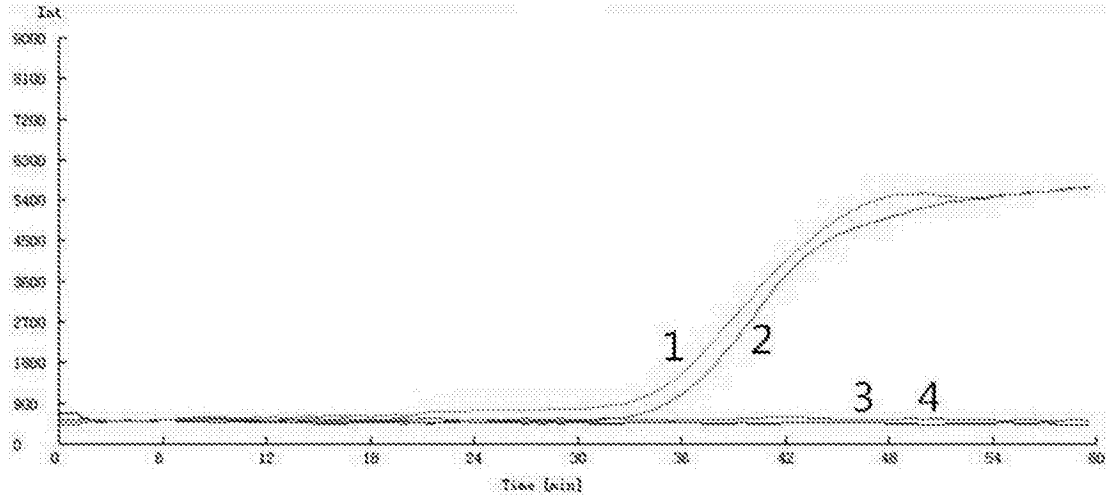


图1

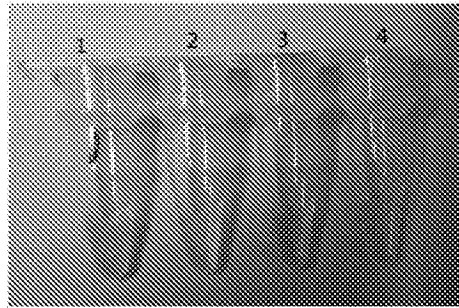


图2

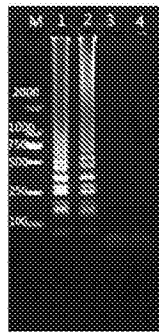


图3

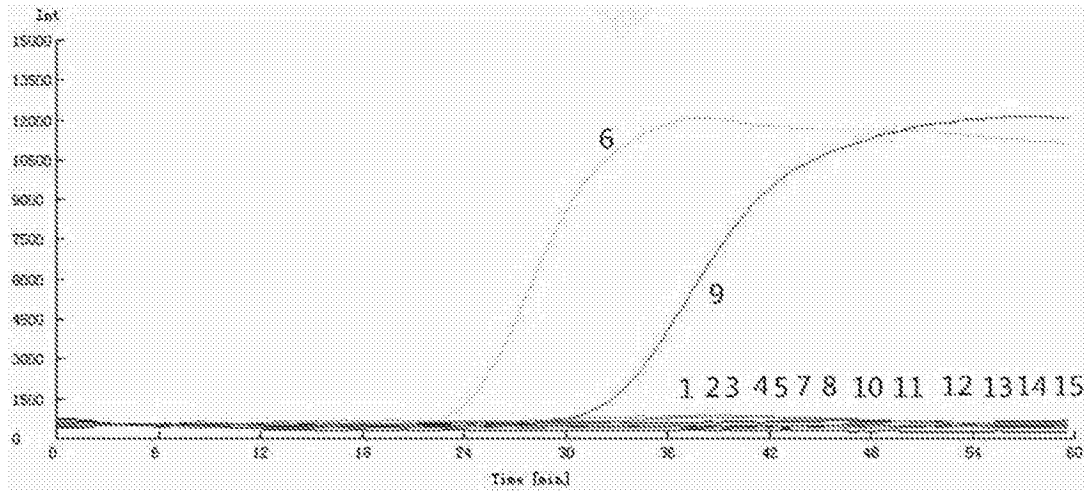


图4

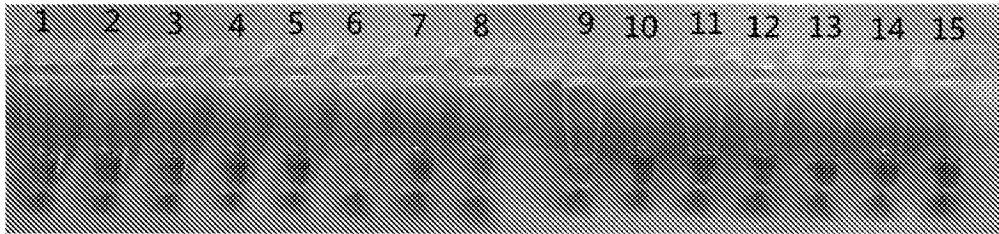


图5

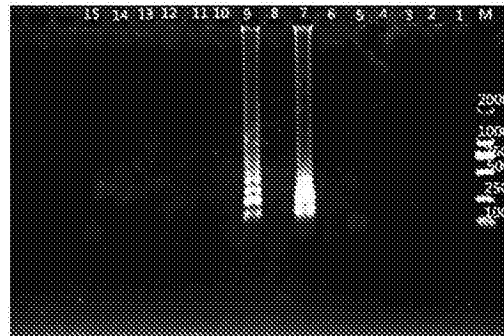


图6

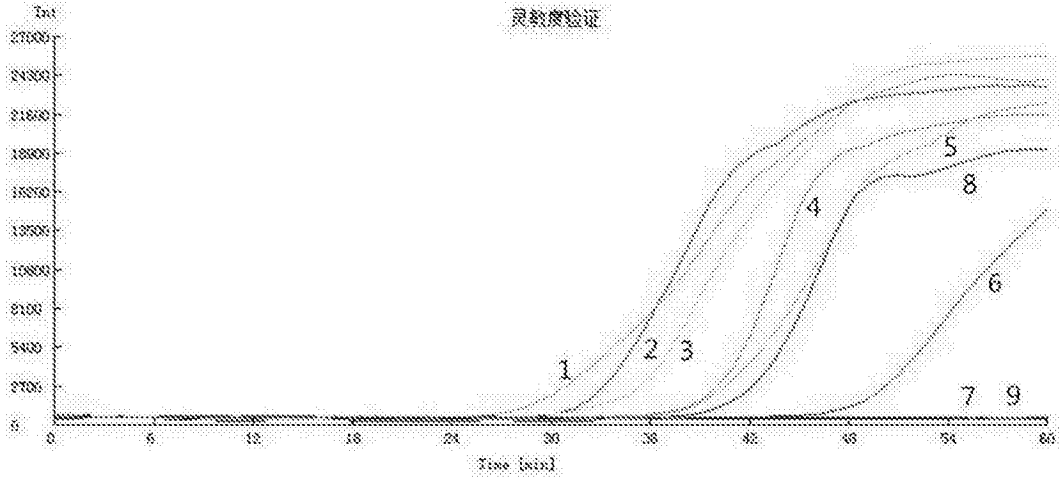


图7

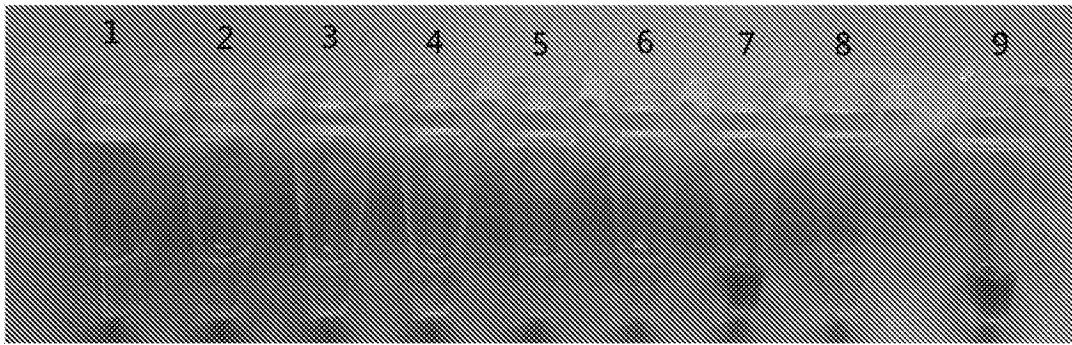


图8

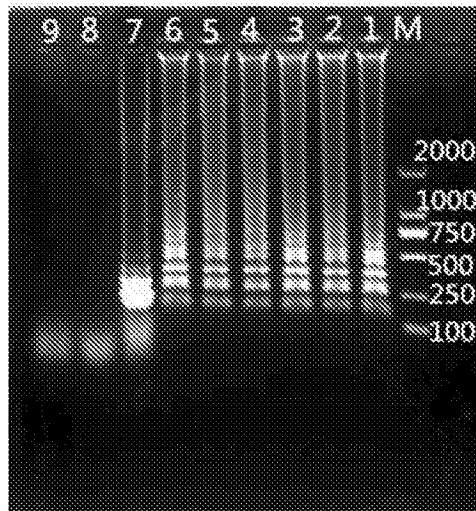


图9



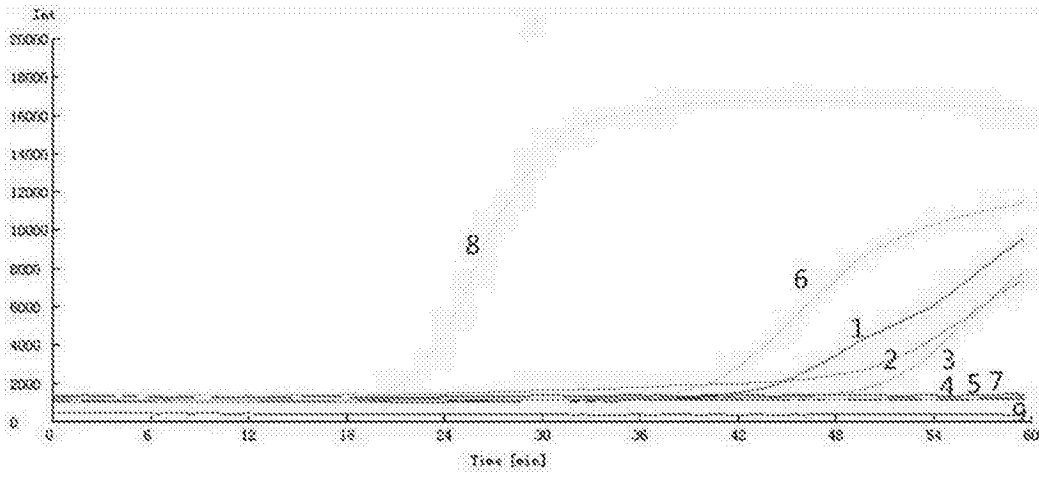


图10

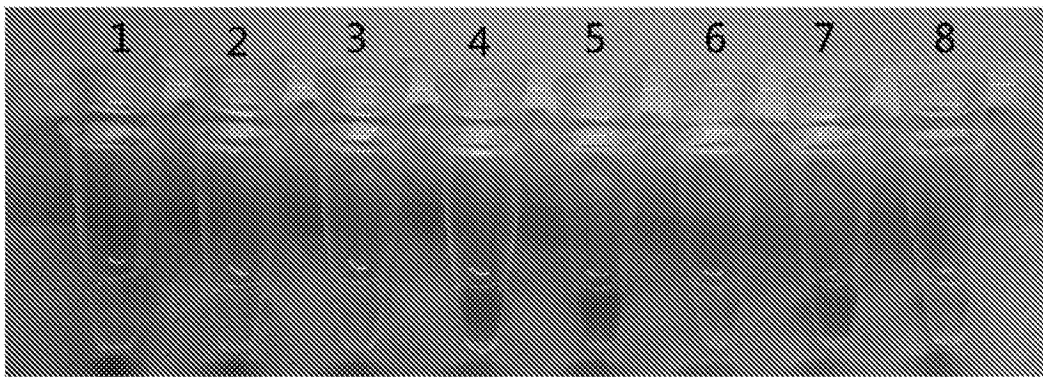


图11

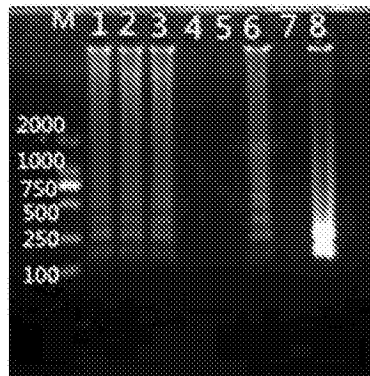


图12

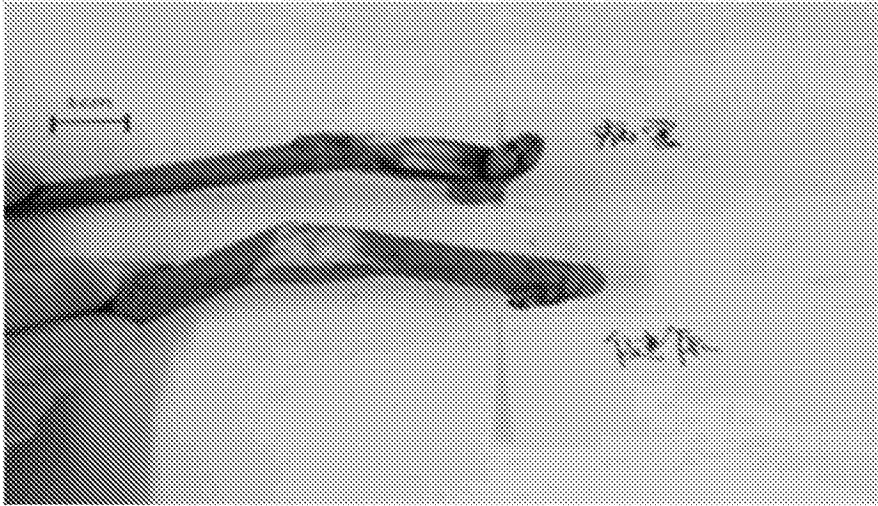


图13

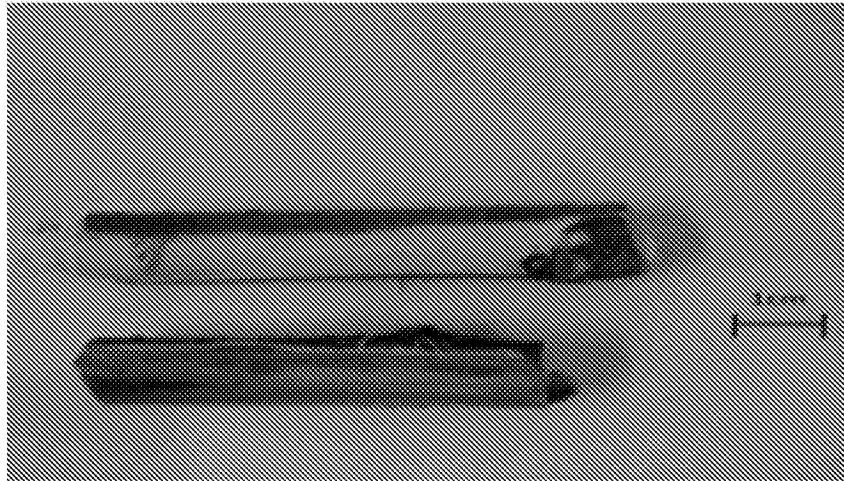


图14

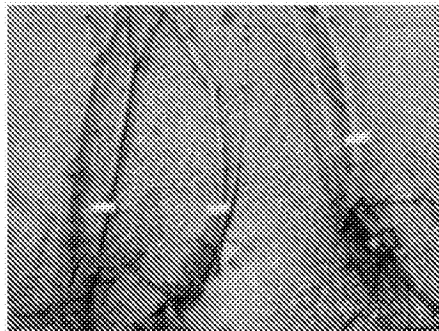


图15

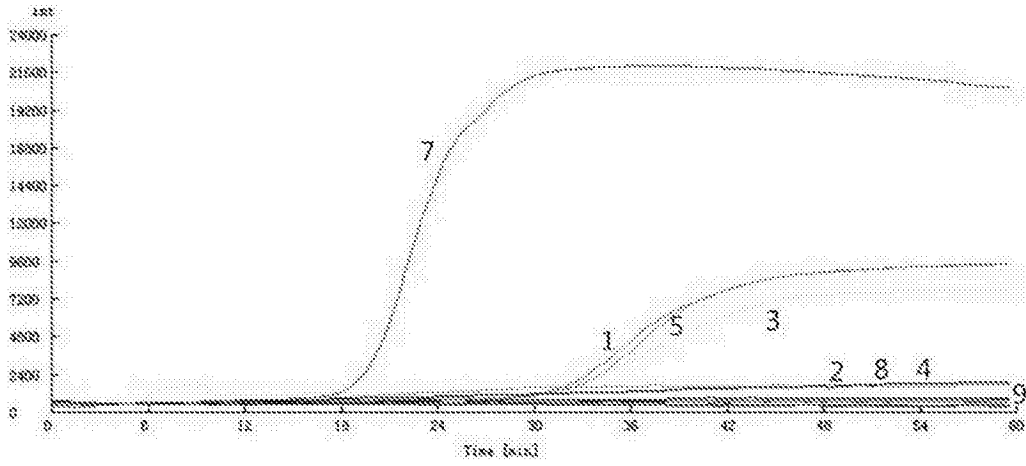


图16

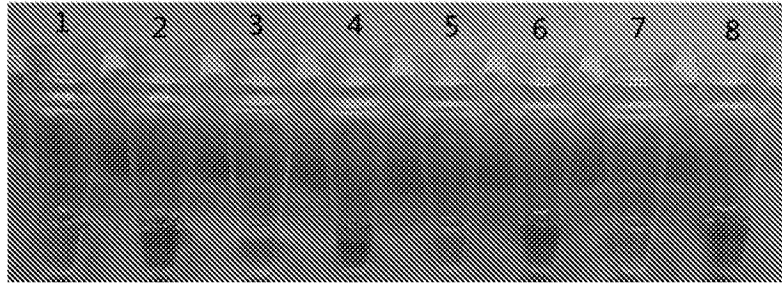


图17

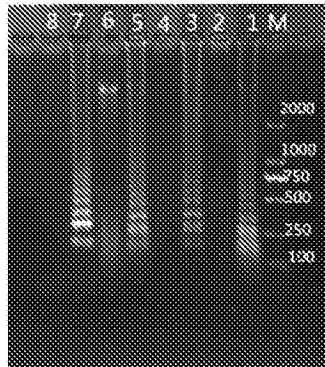


图18