

文章编号:1000-0615(2012)04-0509-05

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27624

鲷鱼诺卡氏菌 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用

王国良*, 刘璐, 李思源

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 根据 GenBank 中鲷鱼诺卡氏菌 16S-23S rRNA 基因序列设计并合成一对特异性引物, 经反应体系优化后建立了检测鲷鱼诺卡氏菌的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法。结果显示, 该方法线性关系良好, 标准曲线的相关系数为 0.998; 溶解曲线分析显示产物为单一的特异峰; 检测灵敏度可达 10^{-6} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 DNA 含量, 与嗜水气单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、麦氏弧菌不发生交叉反应, 具有良好的特异性。应用建立的方法在鲷鱼诺卡氏菌病爆发时期, 对 16 份鱼体组织、养殖水体、饲料等样品进行了检测, 结果 7 份为阳性, 与细菌分离、培养检查结果 100% 相符。既能检测发病鱼, 又能检出未发病且已感染的病鱼, 对病害的早期防控体现应用价值。结果表明, 建立的实时荧光定量 PCR 方法具有特异、敏感、快速、定量等优点, 可用于鱼类致病鲷鱼诺卡氏菌的快速检测。

关键词: 鲷鱼诺卡氏菌; SYBR-Green I; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

诺卡氏菌(*Nocardia* sp.) 是一类革兰氏阳性丝状杆菌, 在海水中含量不高, 是一种机会致病菌, 当养殖鱼类体质虚弱、免疫力低下时, 通过口腔、鳃或创伤而感染^[1-2]。鲷鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriola*)是水产动物诺卡氏菌病的主要致病菌, 常引起五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)^[3-4]、海鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[5]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[6]、乌鳢(*Ophiocephalus argus*)^[7]的诺卡氏菌病。该病具有从发生至死亡的延续流行时间长且早期体表无明显症状等特点, 给预防和治疗带来困难, 研究早期快速检测技术就显得尤为重要和迫切。

国内对鲷鱼诺卡氏菌的检测主要依赖于传统的微生物分离、鉴定方法, 其操作过程复杂、耗时, 且结果不确定常延误病情的诊断。Kusuda 等^[8]用荧光抗体法检测五条鲷诺卡氏菌病, Gee 等^[9]用 PCR 技术检测大西洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)诺卡

氏菌病, Kono 等^[10]用 16S-23S rRNA 转录间隔序列 PCR 快速检测五条鲷诺卡氏菌病, 王国良等^[11]建立了鲷鱼诺卡氏菌的 LAMP 检测技术, 这些方法虽较灵敏但无法实现实时定量的监控检测, 难以掌握病情的发展和发生。

本研究应用 SYBR-Green I 荧光染料, 建立了一种针对鲷鱼诺卡氏菌的实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR)检测技术, 旨在为鱼类诺卡氏菌病的早期快速检测与防控提供有效的技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

鲷鱼诺卡氏菌由作者所在实验室分离、鉴定保存。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemo-*

收稿日期: 2011-07-11 修回日期: 2011-11-02

资助项目: 长江学者和创新团队发展计划(IRT0734); 农业部公益性行业科研专项(200903029); 浙江省自然科学基金(Y3080244)

通讯作者: 王国良, E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn

lyticus)、麦氏弧菌(*Vibrio metschnikovii*)均由作者所在实验室保存。鱼体组织、水体、饲料等待检样品分别取自浙江余杭乌鳢养殖场和宁波象山大黄鱼海水网箱养殖场。

1.2 主要试剂及仪器

SYBR Rremix *Ex Taq*TM II(perfect real time, 内含 TAKARA *Ex Taq*TM HS, dNTP Minture, Mg²⁺, SYBR Green I 等)试剂盒购置大连宝生物工程有限公司; Gene 3000 荧光定量 PCR 仪购自美国 Gene 公司。

1.3 细菌 DNA 的提取

采用酚氯法提取鲮诺卡氏菌 DNA, 最后加入 30 μ L TE Buffer 溶解制备 DNA 原液, 贮存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

1.4 引物的设计与合成

根据 GenBank 上鲮鱼诺卡氏菌 16S-23S rRNA 基因(登陆号: AB060282)序列, 利用引物设计软件 Primer explorer 设计 1 对特异性引物, 上游引物为 5'-TGCTACAATGGCCGGTACAGAG-3'; 下游引物为 5'-TTCACGAGGTTCGAGTTGCAGAC-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。

1.5 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 扩增及标准曲线的建立

通过对反应体系中退火温度、最佳引物浓度进行摸索, 最终确定的反应体系为 SYBR Green I PreMix 聚合酶 10 μ L, 上、下游引物各 0.8 μ L, DNA 模板 1 μ L, 灭菌去离子水 7.4 μ L, 总体积为 20 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 40 个循环。对已知浓度 DNA 模板进行 10 倍梯度稀释, 取 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ 等 5 个稀释度为标准品模板进行荧光定量 PCR 扩增, 并利用 Rotor gene 6.0 软件进行分析, 得到动力学曲线及标准曲线。

1.6 灵敏性试验

将已知浓度 DNA 模板进行 10 倍梯度稀释 (10⁻¹~10⁻⁹ μ g/ μ L), 每个浓度取 1.0 μ L 作为模板, 进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测, 比较它们的敏感性, 以此计算出荧光定量 PCR 所能检出的最低起始模板浓度, 该浓度即为 real-time PCR 的灵敏度。

1.7 特异性试验

以鲮鱼诺卡氏菌作为阳性对照, 分别提取嗜

水气单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、麦氏弧菌的 DNA 作为模板, 对 real-time PCR 进行特异性检验。阴性对照不加任何模板。

1.8 SYBR-Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的应用

为了评价鲮鱼诺卡氏菌 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的有效性, 分别对养殖鱼类、水体及饲料进行检测应用。在发病时期, 从浙江余杭和宁波象山取病症明显的病鱼组织 4 份、无病症的乌鳢和大黄鱼组织 12 份, 不同乌鳢养殖塘和不同海水养殖网箱水样 4 份, 青钻鱼、小杂鱼等鲜鱼饲料样品 8 份。分别提取 DNA 后作 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测, 同步取样品鱼组织进行细菌分离、培养检查, 比较确定该方法的符合率。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 标准曲线及灵敏度

以预实验筛选的 10⁻¹~10⁻⁵ μ g/ μ L 5 个稀释度的模板标准品进行 SYBRGreen I real-time PCR 反应, 结果呈现良好的线性关系。扩增曲线(图 1)所对应的 DNA 含量分别为 10²、10、10⁰、10⁻¹、10⁻² ng, 所对应的 C_t 值分别为 14.42、17.25、21.23、24.54 和 28.19; 标准曲线(图 2)分析表明, 相关系数(*r*)为 0.998, 从而可以得出模板 DNA 浓度的 Log 值(*y*)与循环阈值(*x*)之间的线性关系曲线表达式: $y = -0.2865x + 6.0531$; 而待测样品的循环阈值(C_t)可以从仪器读取; 将待测样品的 C_t 值代入表达式即可计算出其浓度。

将标准样品 10 倍梯度稀释, 用所建立的实时荧光定量 PCR 进行检测, 结果鲮鱼诺卡氏菌 DNA 浓度的最低检测量为 10⁻⁶ μ g/ μ L。

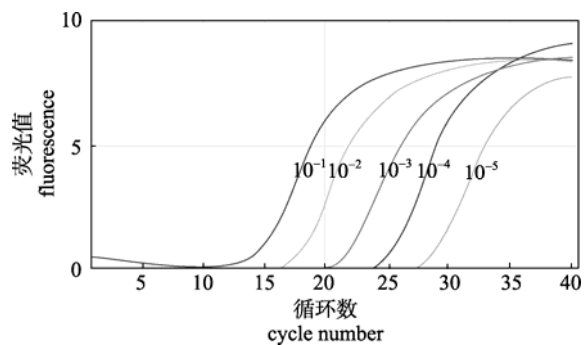


图 1 鲮鱼诺卡氏菌实时荧光定量 PCR 扩增动力学曲线
Fig. 1 Dynamic curve for real-time PCR of *N. seriolae*

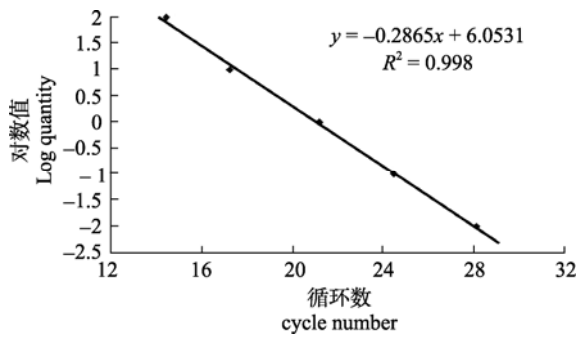


图 2 标准曲线
Fig. 2 Standard curve

2.2 扩增产物的溶解曲线分析

如图 3 可以看出, 标准品 DNA 各个稀释度的溶解温度均在 88 °C, 波峰的高度与 DNA 的浓度呈正相关。5 个浓度的标准品的溶解温度均为 87.5~88.5 °C, 有约 1 °C 的波动, 属于正常范围, 且扩增的目的片段只产生特异性单峰, 没有引物二聚体和非特异性扩增。

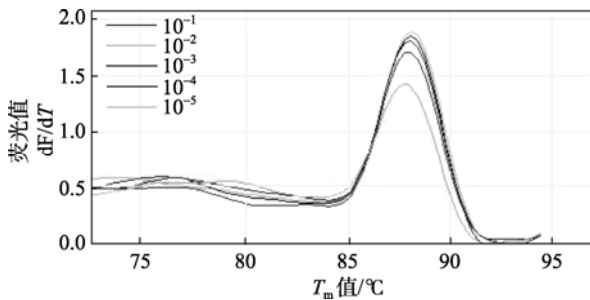


图 3 鲮鱼诺卡氏菌 PCR 扩增产物溶解曲线
Fig. 3 Melt curve of *N. seriolae* PCR amplification product

2.3 特异性

采用 SYBR Green I real-time PCR 检测嗜水气单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、麦氏弧菌, 结果只有鲮鱼诺卡氏菌为阳性, 其余均呈阴性反应(图 4)。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测方法应用结果

应用 SYBR Green I real-time PCR 对采自浙江余杭乌鳢养殖池塘和浙江象山大黄鱼海水网箱养殖场的具明显症状的病鱼组织和无病症的鱼体组织 16 份样品、水体样品 4 份以及 8 份饲料样品进行检测。结果显示, 在 16 份待检组织样品中, 7 份显示阳性(其中 3 份为无病症的样品鱼组织), 与同步取样品鱼组织的细菌分离、培养检查结果相一致(图 5), 检测的 C_t 值依次为 14.46、13.84、15.05、16.58、13.88、14.61、17.82。根据已建立的标准曲线计算,

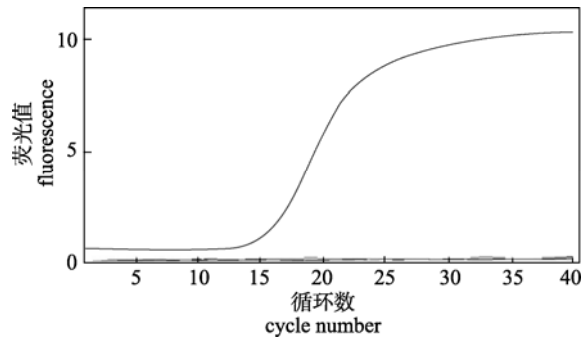


图 4 特异性检测
Fig. 4 Specificity detection of SYBR Green I real-time PCR

每管含有的 DNA 量分别为 0.813×10^{-2} 、 1.224×10^{-2} 、 0.551×10^{-2} 、 0.201×10^{-2} 、 1.19×10^{-2} 、 0.737×10^{-2} 、 $0.886 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 表明实验建立的鲮鱼诺卡氏菌实时荧光定量 PCR 扩增效果良好, 既能检测发病鱼, 又能检出未发病且已感染的病鱼, 还能根据检测结果判断 DNA 含量, 为实时监控和早期预防提供依据。4 份水样及 8 份饲料样品均为阴性。

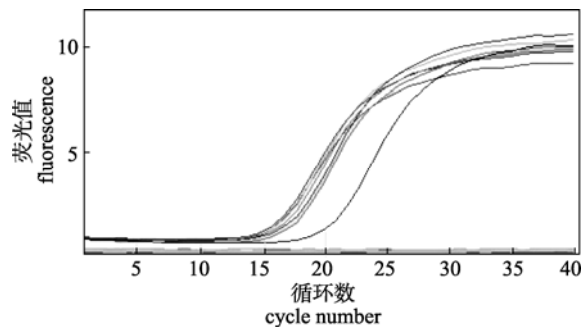


图 5 组织样品的实时荧光定量 PCR 检测
Fig. 5 Amplification plots of different tissue samples by real-time PCR

3 讨论

实时荧光定量 PCR 检测技术的常用方法主要包括 TaqMan 探针法和 SYBR Green I 染料法^[12]。SYBR Green I real-time PCR 检测与 TaqMan 探针法相比更简便, 成本相对低廉, 可用于不同核酸的检测。与常规 PCR 相比, 该方法不但可以定性、定量检测, 还可以检测常规 PCR 无法检测的样品, 且其扩增和检测在同一管内完成, 无需开盖, 不需要电泳检测 PCR 产物, 解决了污染问题^[13], 具有敏感性高、重复性好、线性范围宽、易于标准化和高通量等优点^[14]。

现阶段我国关于鱼类鲮鱼诺卡氏菌病的研究较少, 主要集中在病原菌的分离与鉴定^[15], 由于感染鲮鱼诺卡氏菌从发病至死亡的延续流行时间

长且早期体表无明显症状,因此常规的生理生化测定、组织切片观察和超薄切片电镜观察等方法均无法准确达到定量,且不能作出早期快速诊断,给该病害防治技术的研究和应用带来了困难。本试验所建立的用于检测鱼类致病鳊鱼诺卡氏菌的 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法呈现出良好的 S 型扩增曲线,只出现扩增产物特异的单个峰,产物的 T_m 值均一,说明没有引物二聚体及非特异性扩增产物出现;在特异性试验中,只出现一特异性条带,与嗜水气单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、麦氏弧菌均无交叉反应;检测灵敏度可达 10^{-6} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 DNA 浓度,由标准曲线可以看出,该方法起始模板浓度与 C_t 值之间呈很好的线性关系,直线回归方程的相关系数可达 0.998,说明此反应体系具有很高的精确度和良好的稳定性。同时,本方法可以同时检测 96 个样品,且可以直接对检测结果进行分析。经对 16 份鱼体组织、4 份水体和 8 份饲料待测样品进行的检测应用结果表明,既能检测发病鱼,又能检出未发病且已感染的病鱼,从检测阳性样品的 DNA 量反映,在 10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时病鱼不显现临床症状,而在 10^{-2} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以上病鱼开始出现临床征象,显示该技术方法的准确性和敏感性。该技术尤其对养殖鱼类早期少量感染鳊鱼诺卡氏菌的检测具有重要作用,人们可以在病害流行之前发现养殖鱼类携带病原菌的情况,并及时采取有效防控措施。由于在 4 份水体和 8 份饲料样品中均未检出鳊鱼诺卡氏菌,故有关鳊鱼诺卡氏菌的自然感染途径问题有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Isik K, Chun J, Hah Y C, et al. *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen[J]. International Journal Systematic Bacteriology, 1999, 2: 833-837.
- [2] Bransden M P, Carson J, Munday B L, et al. Nocardiosis in tank-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* (L.) [J]. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(1): 83-85.
- [3] Kumamoto H, Horita Y, Kubota S, et al. Studies on fish nocardiosis. I. Comparison in the histopathology of both yellowtails, *Seriola quinqueradiat*, experimentally inoculated and those naturally infected with *Nocardia kampachi*[J]. Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College, 1985, 34: 100-118.
- [4] Kudo T, Hatal K, Seino A. *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish[J]. International Journal Systematic Bacteriology, 1988, 38: 173-178.
- [5] Chen S C, Lee J L, Lai C C, et al. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan[J]. Journal of Fish Diseases, 2000, 23: 299-307.
- [6] Wang G L, Yuan S P, Jin S. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson)[J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28: 339-345.
- [7] Wang G L, Xu Y J, Jin S, et al. Nocardiosis in snakehead, *Ophiocephalus argus* Cantor[J]. Aquaculture, 2007, 271: 54-60.
- [8] Kusuda R, Kawahara E. Direct and indirect fluorescent antibody identification of yellowtail pathogens[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1987, 53(3): 389-394.
- [9] Gee A, Elston R A. PCR detection of the bacterial pathogen in oyster nocardiosis[J]. Journal of Shellfish Research, 1997, 16(1): 264.
- [10] Kono T, Ooyama T, Chen S C, et al. Sequencing of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and its application in the identification of *Nocardia seriolae* by polymerase chain reaction[J]. Aquaculture Research, 2002, 33(14): 1195-1197.
- [11] 王国良, 刘璐, 徐益军. 鱼类致病鳊鱼诺卡氏菌 (*Nocardia seriolae*) 的 LAMP 检测技术建立与应用[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(1): 27-31.
- [12] Gardner S N, Kuzmarski T A, Vitalis E A, et al. Limitations of TaqMan PCR for detecting divergent viral - pathogens illustrated by hepatitis A, B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus[J]. Journal Clinical Microbiology, 2003, 41(6): 2417-2427.
- [13] Buchheidt D M, Hummel D, Schleiermacher B. Prospective clinical evaluation of a light cycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients[J]. British Journal of Haematology, 2004, 125(2): 196-202.
- [14] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using Realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays[J]. Journal Molecular Endocrinology, 2000, 25(2): 169-173.
- [15] 王国良, 徐益军, 金珊, 等. 养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 277-283.

Development of a SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Nocardia seriolae* and its application

WANG Guo-liang*, LIU Lu, LI Si-yuan

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: According to the 16S-23S rRNA gene sequences of *Nocardia seriolae* available in GenBank, a pair of primers was designed for establishing a SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR method. It had a good linear relationship between initial templates and Ct values, and the correlation coefficient of the standard curve was 0.998. The sensitivity analysis showed that the developed SYBR Green I real-time PCR could detect 10^{-6} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DNA. The specificity assay showed that negative control and the other bacteria such as *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, could not be detected by this PCR. Through the epidemic seasons, 16 fish tissue sample, 4 water samples and 8 fish bait tissue samples were detected by the real-time PCR assay. Results showed that 7 out of those samples were positive, which had good agreement (100%) with bacteriological analysis by isolation and culture. It was able to diagnose the clinically diseased fishes, and to recognize the carrier of *N. seriolae* as well. It reflected application value on early prevention and control of disease. The results showed that the developed SYBR Green I real-time PCR assay had the advantages of specificity, sensitivity, rapidity and quantitativity, and was able to be applied to the clinical diagnosis of *N. seriolae* in fish.

Key words: *Nocardia seriolae*; SYBR Green I ; real-time quantitative PCR

Corresponding author: Wang Guo-liang. E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn