

Taqman-探针荧光定量 PCR 鉴定溶藻弧菌方法的建立

陈昌国 侯兵兵 陈秋圆 郭建巍 赵强元

基金项目：国家自然科学基金青年基金项目(81401311)；军队后勤科研重点项目(BHJ14J005)；

首都临床特色应用研究(吴阶平专项：Z141107006614009)

作者单位：100048 北京，中国人民解放军海军总医院检验科

通讯作者：陈昌国，Email：1234_chen@sina.com

DOI：10.3969/j.issn.1674-7151.2017.01.001

【摘要】 目的 建立一种基于 DNA 回旋酶 B 亚单位基因(*gyrB*)基因的 Taqman-探针荧光定量聚合酶链式反应(PCR)鉴定溶藻弧菌的方法。**方法** 以溶藻弧菌标准株(ATCC)和溶藻弧菌野生株(WT)为研究对象,通过软件设计溶藻弧菌 *gyrB* 基因的特异性 PCR 引物及 Taqman-探针,采用荧光定量 PCR 仪进行检测,评价该检测方法的特异性和灵敏度。**结果** Taqman-探针荧光定量 PCR 检测方法对溶藻弧菌 *gyrB* 基因的检测灵敏度为 10^{-3} mg/L;在检测粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、腐生葡萄球菌、霍氏肠杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希氏菌 6 种其他常见致病菌时未出现阳性扩增,特异性均为 100%。**结论** 成功建立 Taqman-探针荧光定量 PCR 是一种特异性、灵敏度均较好的鉴定溶藻弧菌的方法,该方法适用于溶藻弧菌的快速检测,具有应用价值。

【关键词】 Taqman-探针; 荧光定量 PCR; 溶藻弧菌; *gyrB* 基因

Establishment of a method for the identification of *Vibrio alginolyticus* by Taqman-Probe fluorescence quantitative PCR analysis Chen Changguo, Hou Bingbing, Chen Qiuyuan, Guo Jianwei, Zhao Qiangyuan. Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital PLA, 100048 Beijing, China

【Abstract】 Objective To establish a method for the identification of *Vibrio alginolyticus* by Taqman-probe fluorescence quantitative PCR analysis based on *gyrB* gene. **Methods** The standard strain of *Vibrio alginolyticus* (ATCC) and wild strains (WT) were studied as the research object, using the bio-software to design specific PCR primers and Taqman probe of *Vibrio alginolyticus gyrB* gene and detected by fluorescence quantitative PCR instrument. **Results** The detection sensitivity of *gyrB* gene of *Vibrio alginolyticus* by Taqman fluorescence quantitative PCR was 10^{-3} mg/L. The detection method did not show positive amplification in detection of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Saprophytic staphylococcus*, *Enterobacter hormaechei*, *Pseudomonas aeruginos*, *Escherichia coli* 6 other common pathogenic bacteria. The specificity was 100%. **Conclusions** The fluorescence quantitative PCR method for the identification of *Vibrio alginolyticus* was successfully established. The method is specific and sensitive, it is suitable for rapid detection of *Vibrio alginolyticus* and has application value.

【Key words】 Taqman fluorescence probe; Fluorescence quantitative PCR; *Vibrio alginolyticus*; *gyrB* gene

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)由 Miyamoto 在 1961 年命名,属弧菌科弧菌属,是一种革兰阴性(G^{-})嗜盐性弧菌^[1],广泛存在于海洋、河水等水体环境中,是水生动物弧菌病的主要条件致病菌^[2-3]。对于人类,部分致病力较强的弧菌如创伤弧菌可以造成致命性感染^[4],溶藻弧菌主要导致食物中毒和

胃肠炎,严重时可引起脓毒症^[5-6]。溶藻弧菌作为一种致腹泻菌和影响食品安全的病原菌日益受到重视^[7-8]。

溶藻弧菌常规检测方法大多要经过分离培养与生化鉴定,不仅用时较长且不能快速鉴别病原菌。随着分子生物学技术的快速发展,荧光定量聚合酶

链式反应(PCR)技术被广泛应用于病原菌的鉴定和检测^[9-10]。我们针对溶藻弧菌 DNA 回旋酶 B 亚单位基因(*gyrB*)高度保守区设计荧光定量引物和 Taqman-探针,建立 Taqman-探针荧光定量 PCR 检测溶藻弧菌的方法。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 本实验使用的菌株包括:溶藻弧菌 ATCC-17749(由李艳君博士提供);溶藻弧菌野生株-WT(由本实验室采集并保存);粪肠球菌 ATCC-29212、金黄色葡萄球菌(金葡菌) ATCC-25293、腐生葡萄球菌 ATCC-BAA750、铜绿假单胞菌 ATCC-27853、霍氏肠杆菌 ATCC-700323、大肠埃希氏菌 ATCC-25922 菌株 6 种其他菌株均为本科室保存。

1.2 仪器与试剂 SYBR[®]Green QPCR Master Mix 购自天根生物科技(北京)有限公司;荧光定量 PCR 仪为上海宏石公司 SLAN-96P Real Time PCR System 生产,引物及 Taqman-探针由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,按照引物合成单要求进行后期处理。

1.3 细菌核酸粗提物制备 菌种存放在 -80 ℃ 的冰箱里,取出后置于 37 ℃ 水浴快速复温,复温后的菌种冻存液接种在硫代硫酸盐柠檬酸盐蔗糖琼脂培养基(TCBS)和哥伦比亚血平板上,在 37 ℃ 孵箱中培养 12 h。用无菌接种环取适量细菌至 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL 核酸裂解液后室温裂解 15 min, 100 ℃ 恒温金属浴加热 10 min,室温 13 000 r/min 离心 5 min(离心半径=9.5 cm),取上清作为模板。

1.4 引物及 Taqman-荧光探针设计 在 NCBI 网站输入基因名称获取相应基因序列,运用生物软件 Beacon Designer 7 和 Primer Premier 5.0 进行荧光定量 PCR 引物及 Taqman-荧光探针设计,探针 5' 端标记 FAM, 3' 端标记 BHQ1。上游引物:5'-GCT AACACGTACATTGA-3', 下游引物:5'-GCTTGAG AACTTAGGATCA-3', 荧光探针:FAM-CCGCAGTT AGACCTTCACGC-BHQ1。

1.5 PCR 反应体系及扩增条件 取 1 μL 提取液上清为模板,以 *gyrB* 特异性引物及 Taqman-探针进行荧光定量 PCR 检测。PCR 反应体系为:2× Mix 10 μL、引物对 1 μL、模板 1 μL、ddH₂O 7 μL。PCR 反应条件为:95 ℃ 5 min(94 ℃ 30 s ~ 58 ℃ 40 s 收集荧光), 35 个循环, 25 ℃ 10 s。

1.6 引物浓度的优化 上下游引物浓度分别配置

成 20 nmol/L、15 nmol/L、10 nmol/L 工作液进行荧光定量 PCR 检测,扩增条件同前。

1.7 探针浓度的优化 合成的荧光探针按照合成单加入 ddH₂O 配成母液,然后取 5 μL 探针母液至 95 μL ddH₂O 中作为工作液。在 20 μL PCR 反应体系中分别加入 1 μL、0.5 μL 荧光探针,扩增条件同前。

1.8 特异性评价 以优化后的反应体系检测溶藻弧菌标准菌株及其他 6 种细菌的标准株。

1.9 灵敏度评价 以标准菌株系列浓度梯度为模板(10² mg/L ~ 10⁻⁵ mg/L),每个浓度梯度取 1 μL 核酸为模板,以优化后的反应体系和反应条件进行荧光定量 PCR。以出现典型扩增曲线并在循环数内出现 Ct 值为阳性。

2 结果

2.1 实验参数的优化

2.1.1 引物浓度的优化 经过多次实验引物最佳浓度约为 10 nmol/L,经 2% 凝胶电泳显示引物二聚体较少且扩增效率能够满足实验要求。见图 1。

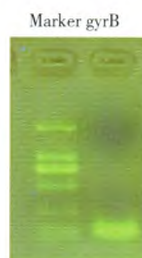


图 1 PCR 产物 2% 凝胶电泳图

2.1.2 探针浓度的优化 实验结果显示,20 μL PCR 反应体系中加入 0.5 μL 荧光探针,其反应曲线较加入 1 μL 荧光探针的效果更好,见图 2。优化后的溶藻弧菌 Taqman-探针荧光定量 PCR 反应条件为:20 μL 体系(ddH₂O 7.5 μL、2× Mix 10 μL、模板 1 μL、引物对 1 μL、探针 0.5 μL), 95 ℃ 5 min(94 ℃ 30 s ~ 58 ℃ 40 s 收集荧光), 35 个循环, 25 ℃ 10 s。

2.2 Taqman-探针荧光定量 PCR 反应体系评价

2.2.1 特异性评价 用优化后的反应体系检测溶藻弧菌标准菌株与野生株以及其他 6 种细菌的标准菌株,以溶藻弧菌的标准菌株为阳性对照。结果除溶藻弧菌标准株及野生株出现阳性扩增外,其他 6 种细菌标准株均无阳性扩增。因此,该方法的特异性为 100%。见图 3~4。

2.2.2 灵敏度评价 以溶藻弧菌标准株核酸系列稀释样本为模板进行荧光定量 PCR,当模板浓度为 10² ~ 10⁻³ mg/L 时,每个浓度均有典型扩增曲线,当

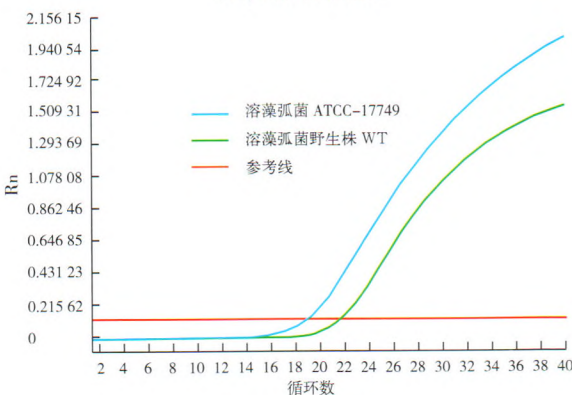
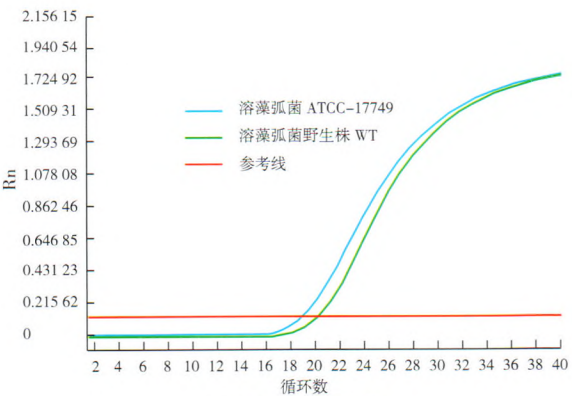


图 2 不同浓度的探针 PCR 扩增曲线

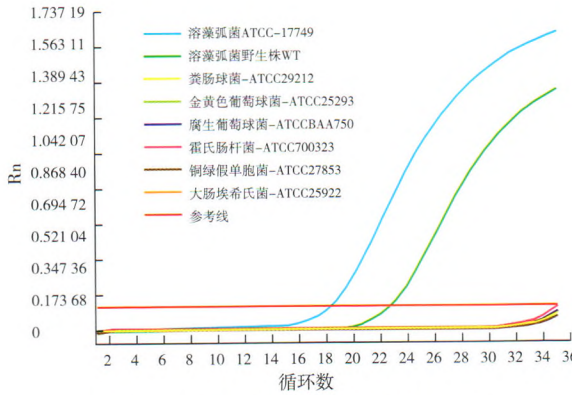
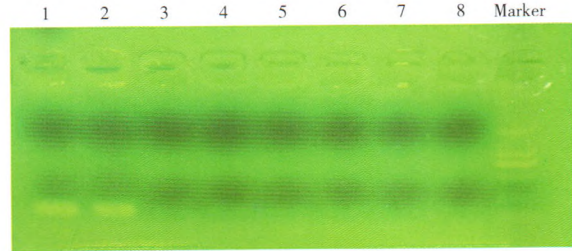


图 3 溶藻弧菌标准菌株与野生株以及其他 6 种细菌 PCR 扩增曲线



注：1 为溶藻弧菌 ATCC-17749；2 为溶藻弧菌野生株 WT；3 为粪肠球菌 ATCC-29212；4 为金黄色葡萄球菌 ATCC-25293；5 为腐生葡萄球菌 ATCC-BAA750；6 为霍氏肠杆菌 ATCC-700323；7 为铜绿假单胞菌 ATCC-27853；8 为大肠埃希氏菌 ATCC-25922

图 4 溶藻弧菌 Taqman- 探针荧光定量 PCR 特异度检测

模板浓度为 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ mg/L 时,每个浓度未出现典型扩增曲线。所以,本研究建立的方法对溶藻弧菌 *gyrB* 基因的检测灵敏度为 10^{-3} mg/L,有较好的检测灵敏度。见图 5~6。

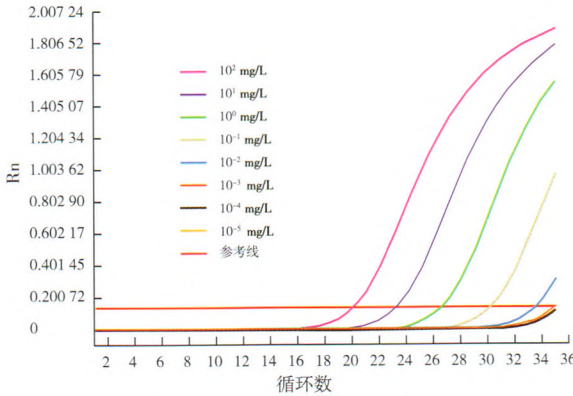


图 5 溶藻弧菌 (ATCC) Taqman- 探针荧光定量 PCR 灵敏度检测

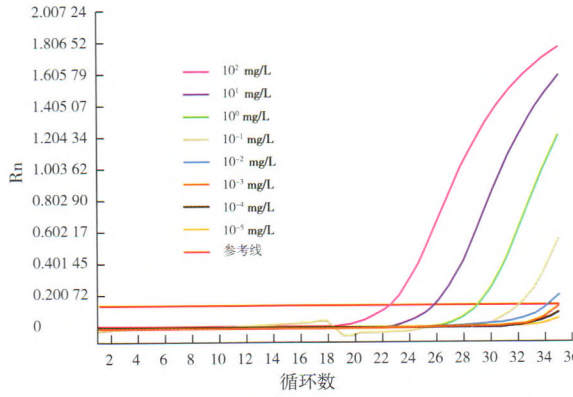


图 6 溶藻弧菌 (WT) Taqman- 探针荧光定量 PCR 灵敏度检测

3 讨论

溶藻弧菌传统的检测方法检测时间长且特异性和灵敏度均受到不同程度的限制。因此,建立快速、准确、实用的检测和鉴定方法是必要的。

随着分子生物学技术快速发展,目前已经有好多技术如 PCR、SYBRGreen 荧光定量 PCR、随机引物 PCR、酶联反应吸附试验 (ELISA)、斑点杂交以及多重荧光 PCR 等用于弧菌的检测^[10]。而分子分型技术以分辨率高、特异性强、重复率好的特点在弧菌感染的溯源及防控方面发挥了十分重要的作用^[11-12]。Taqman- 探针荧光定量 PCR 技术近年来被广泛应用于病原菌检测,该技术在普通 PCR 基础上加入一条特异的荧光探针,因而较其他 PCR 方法具有更高的特异性^[13]。本研究针对溶藻弧菌 *gyrB* 基因高度保守区设计荧光定量 PCR 引物和荧光探针,

建立了 Taqman- 探针荧光定量 PCR 鉴定溶藻弧菌的体系,并对反应体系进行了优化。

16S rRNA 基因、colH 基因、dnaJ40 基因以及 hsp60 基因等都被应用于溶藻弧菌的检测^[5]。其中, 16S rRNA 基因测序虽然是细菌分子系统鉴定的“金标准”,但对于一些种属关系比较密切的细菌(如弧菌属、气单胞菌属、芽孢杆菌属和分枝杆菌属)缺乏足够的鉴别能力^[14]。然而, gyrB 基因在弧菌中具有较高的同源性,不同弧菌之间具有明显遗传距离,对于弧菌来说是一个很好的系统发育标记。因此,基于 gyrB 基因的研究方法比 16S rRNA 基因测序方法更适用于弧菌种的鉴定,该方法具有特异性^[15]。

目前,在国内研究中对溶藻弧菌进行 Taqman- 探针荧光定量 PCR 鉴定的报道较少。我们建立的基于 gyrB 基因的 Taqman- 探针荧光定量 PCR 鉴定溶藻弧菌的方法,通过对标准株进行灵敏度检测发现该体系检测的灵敏度为 10^{-3} mg/L,具有很好的检测灵敏度。该体系在特异性检测中标准株全阳性,其他 6 种病原菌全阴性,在区分溶藻弧菌与其他 6 种病原菌中具有较好的特异性,为临床检测溶藻弧菌提供了可靠的技术依据。

综上所述,本研究建立的 Taqman- 探针荧光定量 PCR 技术在 2 h 内可完成对溶藻弧菌的检测工作。与传统分离培养、生化鉴定的方法相比,其检测速度快、特异性和灵敏度高,适用于溶藻弧菌的快速检测,具有应用价值。但是本研究中特异性验证中其他菌株数较少,仍需进一步试验和验证。

参考文献

- 1 Ramesh KP, Kalidas C, Tamilmani G, et al. Microbiological and histopathological investigations of *Vibrio alginolyticus* infection in cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) cultured in sea cage [J]. Indian J Fish, 2014, 61(1): 124-127.
- 2 Sadok K, Mejdi S, Nourhen S, et al. Phenotypic characterization and RAPD fingerprinting of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolated during Tunisian fish farm outbreaks [J]. Folia Microbiol (Praha), 2013, 58(1): 17-26.
- 3 Balcázar JL, Gallo-Bueno A, Planas M, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive-bred seahorses with disease symptoms [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2010, 97(2): 207-210.
- 4 卢中秋, 卢才教, 邱俏檬, 等. 创伤弧菌脓毒症诊疗方案(草案) [J]. 中华危重病急救医学, 2008, 20(1): 4-6.
- 5 Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, et al. Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 132(1): 47-53.
- 6 苏婷, 罗鹏, 陈偿, 等. 溶藻弧菌溶血活性检测及溶血素基因、启动子区功能 [J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1138-1144.
- 7 王海波, 张京云, 王多春, 等. 溶藻弧菌 TaqMan 实时 PCR 快速检测体系的建立 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(5): 1150-1152.
- 8 Li XC, Xiang ZY, Xu XM, et al. Endophthalmitis caused by *Vibrio alginolyticus* [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(10): 3379-3381.
- 9 Wei S, Zhao H, Xian Y, et al. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 79(2): 115-118.
- 10 李宏, 杨大伟, 刘云国, 等. 多重荧光定量 PCR 同时检测霍乱弧菌、副溶血性弧菌和创伤弧菌的方法研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(5): 1180-1182.
- 11 曲业敏, 马淑青, 孙梅, 等. 副溶血性弧菌分子分型的研究进展 [J]. 实用检验医师杂志, 2016, 8(3): 181-183.
- 12 张金金, 李迎慧, 石晓路, 等. 副溶血弧菌的多位点可变数目串联重复序列分型方法的研究 [J]. 实用检验医师杂志, 2012, 4(4): 211-215.
- 13 金东, 王艺婷, 白雪梅, 等. 弗氏枸橼酸杆菌 TaqMan 实时荧光定量-聚合酶链反应检测方法的建立 [J]. 疾病监测, 2013, 28(6): 451-455.
- 14 Teh CS, Chua KH, Thong KL. Simultaneous differential detection of human pathogenic and nonpathogenic *Vibrio* species using a multiplex PCR based on gyrB and pntA genes [J]. J Appl Microbiol, 2010, 108(6): 1940-1945.
- 15 Luo P, Hu C. *Vibrio alginolyticus* gyrB sequence analysis and gyrB-targeted PCR identification in environmental isolates [J]. Dis Aquat Organ, 2008, 82(3): 209-216.

(收稿日期: 2017-01-18)

(本文编辑: 李银平)