

副溶血弧菌的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法建立

张晓君, 陈 丽, 毕可然, 秦 蕾, 秦国民

(淮海工学院海洋学院, 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005)

摘 要: 基于副溶血弧菌 *gyrB* 基因保守序列设计 1 对特异性引物, 建立 SYBR Green I 实时定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测副溶血弧菌的方法。SYBR Green I 实时定量 PCR 的 T_m 为 90℃, 扩增产物的熔解曲线只出现 1 个单特异峰, 无引物二聚体, 表明该引物具有较好的特异性; 所制作的实时定量 PCR 扩增标准曲线在 $2.06 \times 10^8 \sim 2.06 \times 10^3$ 拷贝数之间有良好的线性关系, 相关系数为 0.992, 能对副溶血弧菌进行准确的定量分析。该方法检测时间从核酸抽提到结果分析仅需 4~5h, 且较传统方法敏感、操作简单, 可用于针对副溶血弧菌的进出口检验检疫、食品安全检测及该菌引起的水产动物疾病的诊断与分子流行病学调查。

关键词: 副溶血弧菌; *gyrB* 基因; SYBR Green I; 实时定量聚合酶链式反应

Development of SYBR Green-Based I Real-time Quantitative PCR for Detection of *Vibrio parahaemolyticus*

ZHANG Xiao-jun, CHEN Li, BI Ke-ran, QIN Lei, QIN Guo-min

(College of Ocean, Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: The *gyrB* gene, which encodes the B subunit protein of DNA gyrase, is a single copy gene and has conserved regions for PCR primers. A pair of specific primers target to the *gyrB* gene of *V. parahaemolyticus* was designed, and a SYBR green I-based real-time PCR for *V. parahaemolyticus* detection was established. The PCR primers could amplify 285-bp gene fragment from chromosomal DNA of *V. parahaemolyticus*, and no positive reaction was detected in 8 other pathogenic bacteria using conventional PCR. In addition, the results of melting curve analysis showed only a specific peak with a melting temperature (T_m) of 90 °C, and no primer-dimers peak was observed. These findings indicated that the PCR primers had high specificity. Both geometric growth and plateau phases were observed in PCR amplification curves. Analysis of standard curves revealed excellent correlation between the number of copies (in the range of 2.06×10^8 to 2.06×10^3) and PCR threshold cycle (C_t) with a correlation coefficient of 0.992 ($R^2 = 0.992$). It took only 4–5 h (from nucleic acid extraction to analysis of results) to detect samples by the method. Therefore, SYBR green-based I real-time PCR had the advantages of higher sensitivity and ease of operation over traditional methods and could be used for inspection and quarantine of import and export commodities, food safety detection, and diagnostic studies and molecular epidemic survey of aquatic animal diseases caused by *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; *gyrB* gene; SYBR green I; real-time PCR

中图分类号: S941

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)08-0203-04

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)早在 1950 年在日本大阪市发生的食物中毒病例中分离获得, 之后在世界许多国家如中国、澳大利亚、印度、美国、越南、泰国、多哥、马来西亚、新加坡、俄罗斯、巴拿马、新西兰、罗马尼亚、墨西哥等均陆续报告了副溶血弧菌食物中毒或肠炎。同时该菌广泛存在于世界各地近海岸的海水、海底沉积物及海产品中, 是一种重要的水

产养殖动物病原细菌, 可引起鱼、虾、蟹、贝等多种水产动物感染发病^[1-4], 严重危害水产养殖生产。因此选择合适的分子靶标, 研究开发操作简便、快速且特异性强的病原副溶血弧菌快速检测方法, 对食品中针对副溶血弧菌安全检测及该菌引起的水产动物疾病的快速诊断, 具有重要的实践意义。

gyrB 基因编码的是惟一能诱导 DNA 负超螺旋的拓

收稿日期: 2011-04-07

基金项目: 江苏省水产三项工程项目(PJ2010-58); 连云港市科技攻关项目(CG1134); 江苏省自然科学基金项目(BK2009163)

作者简介: 张晓君(1969—), 女, 教授, 博士, 主要从事水产动物病害及病原微生物学研究。E-mail: zxj9307@163.com

拓扑异构酶——DNA 促旋酶的 B 亚单位蛋白, Yamamoto 等^[5]1995 年设计出通用引物可从许多革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌成功扩增出 *gyrB* 基因, 特别适合作为分子靶标进行细菌种间鉴别。*gyrB* 基因是副溶血弧菌 DNA 复制所必需的, 具有副溶血弧菌种特异性, 而且为单拷贝基因, 具有设计聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物的保守区域^[6]。SYBR Green I 是一种与双链 DNA 结合发光的荧光染料, 与双链 DNA 结合后, 其荧光大大增强, 且其荧光强度的增加与双链 DNA 的数量呈正比, 而不掺入链中的 SYBR Green I 染料分子不会发射任何荧光信号, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步, 因此可以根据荧光信号检测出反应体系中存在的双链 DNA 数量。本实验以编码 *gyrB* 基因为靶基因, 建立 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测副溶血弧菌的方法, 通过实验证实该方法特异性强、灵敏度高、检测耗时短, 是定量检测副溶血弧菌的有效且廉价的方法。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株来源及引物设计合成

供试副溶血弧菌分离自江苏连云港市赣榆县发病凡纳滨对虾幼虾及三疣梭子蟹; 阴性对照鳃弧菌(*V. anguillarum*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)、美人鱼弧菌(*V. damsela*)、鱼肠道弧菌(*V. ichthyenteri*)、河口弧菌(*V. aestuarianus*)、杀对虾弧菌(*V. penaeicida*)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)及爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)均分离自海水鱼, 由本实验室保存。

在 GenBank 上获得副溶血弧菌及其他细菌的 *gyrB* 基因的 DNA 序列, 采用 DNA Star 软件进行同源性分析, 确定在副溶血弧菌菌株内保守、其他菌株间特异的片段, 利用生物软件 Primer 5.0 对该保守片段设计副溶血弧菌的特异性检测引物: vp-*gyrB*-F: CGG CGT GGG TGT TTC GGT AGT; vp-*gyrB*-R: TCC GCT TCG CGC TCA TCA ATA, 由上海生物工程技术公司合成。

1.2 细菌模板 DNA 提取及 *gyrB* 标准质粒的构建

供试菌模板 DNA 按上海赛百盛基因技术有限公司生产的小量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒所述方法提取。

以 60 μ L 反应体系扩增副溶血弧菌 *gyrB* 基因, 反应体系中含有双蒸水 43.2 μ L、10 \times PCR 缓冲液 6 μ L、MgCl₂(25mmol/L)4.8 μ L、4 \times dNTP 混合物 1.2 μ L、vp-*gyrB*-F 和 vp-*gyrB*-R 引物各 0.6 μ L、Taq DNA 聚合酶(5U/ μ L)0.6 μ L、模板 DNA 3 μ L; PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20s、55 $^{\circ}$ C 复性 20s、72 $^{\circ}$ C 延伸 15s, 35 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 温育 5min; 琼脂糖凝胶电泳检测后用上海生物工程技术公司生产的 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒将阳性 PCR 产物进行胶回收、纯化, 将回收纯化的 *gyrB* 基因的 PCR 产物, 利用大连宝

生物公司生产的 PMD18T 载体进行连接, 连接 3h, 连接完毕后将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板进行蓝白斑筛选, 随机挑取 15 个白色克隆进行菌液 PCR 鉴定, 以确证为阳性克隆。取 2 个阳性克隆用上海生物工程技术公司生产的 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒提取质粒。用核酸蛋白分析仪测量质粒浓度, 根据阿佛加德罗常数换算出每毫升质粒中的 DNA 的拷贝数, 作为本研究的标准阳性样本。

1.3 副溶血弧菌 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 检测方法的建立

1.3.1 反应体系优化

设立引物浓度梯度为 0.1~0.5 μ L(10 μ mol/L)以确定反应的最佳引物浓度; 优化退火温度(55~62 $^{\circ}$ C), 利用 Bio-Rad iQ5 Optical System Software 软件进行数据分析, 以得到最小的 C_t 值并且在熔解曲线中不产生非特异性峰为指标。

1.3.2 定量标准曲线的建立

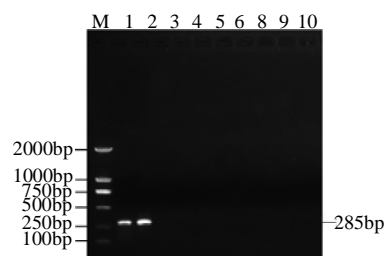
利用构建好的 PMD18-*gyrB* 重组质粒作为副溶血弧菌定量标准品, 对定量标准品进行 10 倍梯度稀释, 共稀释 6 个梯度, 利用优化好的荧光 PCR 反应条件检测各梯度标准品的 C_t 值。以质粒拷贝数为横坐标、C_t 值为纵坐标, 建立质粒拷贝浓度与 C_t 值对应关系的定量标准曲线。

1.4 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 检测副溶血弧菌方法的初步应用

采取扇贝、脊尾白虾、中国对虾、杂色蛤等海产品, 无菌操作取其肌肉组织用生理盐水反复冲洗干净, 人工染副溶血弧菌后进行研磨, 研磨液用水煮法提取细菌模板 DNA, 按上述方法进行荧光 PCR 检测; 通过样品的扩增曲线及 C_t 值及熔解曲线进行结果判断。

2 结果与分析

2.1 引物特异性检测



M. DL2000; 1、2. 副溶血弧菌; 3~10. 阴性对照(分别为鳃弧菌、哈氏弧菌、美人鱼弧菌、鱼肠道弧菌、河口弧菌、杀对虾弧菌、杀鲑气单胞菌、爱德华氏菌)。

图1 引物特异性检测结果
Fig.1 Specificity of primers

以 *vp-gyrB-F* 和 *vp-gyrB-R* 为引物, 对副溶血弧菌 (2 株)、鳗弧菌、哈氏弧菌、美人鱼弧菌、鱼肠道弧菌、河口弧菌、杀对虾弧菌、杀鲑气单胞菌及爱德华氏菌模板 DNA 进行常规 PCR 扩增, 结果仅 2 株副溶血弧菌扩增出大小为 285bp 的目的基因片段, 其他 8 种细菌均为阴性结果, 结果表明该实验所使用的引物具有较强的特异性 (图 1)。

2.2 定量标准品的制备

PMD18-*gyrB* 基因重组质粒经分光光度计测定, 其质量浓度为 66ng/μL, 根据阿弗加德罗常数换算出每毫升重组质粒的拷贝数为 2.06×10^{10} , 该重组质粒稀释成 2.06×10^8 作为定量标准品原液保存。

2.3 反应优化条件

20μL 反应体系包括双蒸水 8.6μL、SYBR Green I Hotstar Fluo-PCR mix (上海生物工程技术公司生产) 10μL、正反向引物各 0.2μL、1μL 标准阳性质粒; 定量 PCR 反应条件: 94℃、4min, 94℃、30s, 60℃、30s, 72℃、30s, 进行 45 个循环。PMD18-*gyrB* 基因重组质粒在 $2.06 \times 10^8 \sim 2.06 \times 10^3$ 拷贝数范围的定量 PCR, 其扩增曲线反映了 PCR 的指数增长阶段和平台阶段 (图 2)。

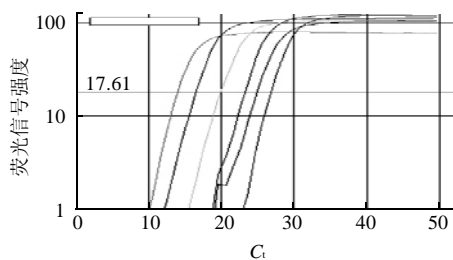


图2 SYBR Green I 实时定量PCR扩增曲线

Fig.2 Amplification curves of SYBR green I-based real-time PCR

2.4 标准曲线方程

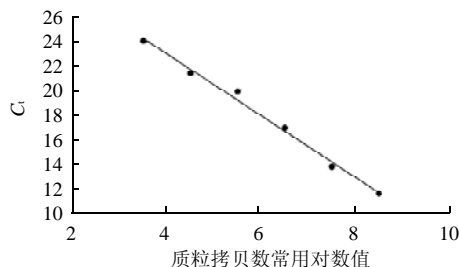


图3 SYBR Green I 实时定量PCR的标准曲线

Fig.3 Standard curves of SYBR green I-based real-time PCR

利用优化好的副溶血弧菌 RT-PCR 反应体系对 7 个 10 倍梯度稀释的定量标准品进行检测, 建立质粒拷贝质量浓度的对数值与 C_t 值对应关系的定量标准曲线 (图 3)。结果显示, 所制作的标准曲线在 $2.0 \times 10^8 \sim 2.0 \times 10^3$ 拷贝

数之间的 C_t 值相差比较均匀, 符合定量 PCR 的 C_t 值与起始拷贝数之间的线性关系。相关系数为 0.992, 斜率约为 -2.597, 截距为 33.199, 得出细菌拷贝数与 C_t 值的线性方程为 $C_t = -2.597X + 33.199$ 。在对样品进行检测时, 根据其 C_t 值和线性方程可以获得该样品 DNA 拷贝数。

2.5 荧光定量PCR的溶解曲线

利用优化好的副溶血弧菌 RT-PCR 反应体系对 6 个 10 倍梯度稀释的 PMD18-*gyrB* 基因重组质粒进行检测, 结果显示溶解曲线均只有 1 个溶解峰, T_m 值为 90℃, 表明反应过程中未出现非特异性扩增和引物二聚体 (图 4)。

2.6 水产品人工染菌样品的检测

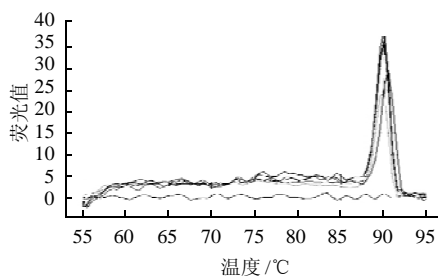


图4 SYBR Green I 实时定量PCR溶解曲线

Fig.4 Melting curves of SYBR green I-based real-time PCR

利用本研究建立的副溶血弧菌 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法, 对扇贝、脊尾白虾、中国对虾、杂色蛤等人工染菌的 4 种海产品进行检测, PCR 的 C_t 值与 DNA 拷贝数之间的定量曲线见图 5。结果显示, 扇贝样品 C_t 值为 24.73, 其 DNA 拷贝数为 1.832×10^3 , 脊尾白虾 C_t 值在 24.87, 其 DNA 拷贝数为 1.61×10^3 , 中国对虾 C_t 值在 23.38, 其 DNA 拷贝数为 6.02×10^3 , 杂色蛤 C_t 值在 25.16, 其 DNA 拷贝数为 1.25×10^3 , 4 个人工染菌样品均成阳性反应, 结果表明, 该荧光 PCR 方法具有较好的适用性。

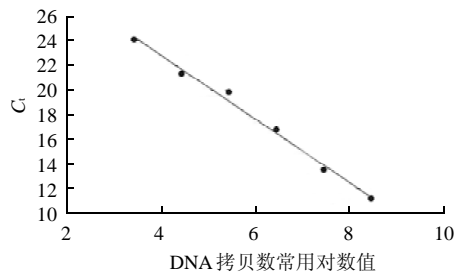


图5 SYBR Green I 实时定量PCR样品检测曲线

Fig.5 Detection curves of SYBR green I-based real-time quantitative PCR for samples

3 讨论

随着分子生物学技术的发展, 用于副溶血性弧菌检

测的分子生物学方法已越来越多,如随机引物PCR(arbitrarily primed PCR, APPCR)^[7]、脉冲场电泳(pulsed field gelelectrophoresis, PFGE)^[8]、基因芯片^[9]等。PCR技术以其敏感、特异、简便和快速等优点广泛地应用于副溶血弧菌的检测,其PCR检测的靶基因主要有*tlh*、*tdh*、*trh*、*gyrB*和*toxR*等^[10],Bej等^[11]开发了以*tlh*、*tdh*及*trh*为靶基因的多重PCR用来检测贝类产品中的副溶血性弧菌,黄晓蓉等^[12]亦以*tlh*、*tdh*及*trh*为靶基因建立了食品中副溶血性弧菌的多重PCR检测。然而,强致病性的*tdh*和*trh*基因很少在副溶血性弧菌环境分离株中出现,并且*tdh*和*trh*基因都不是单一基因,而*gyrB*基因具有副溶血弧菌种特异性,而且为单拷贝基因。因此,本研究选择*gyrB*基因作为扩增的靶基因检测副溶血弧菌,普通PCR的特异性实验结果表明,引物(vp-*gyrB*-F和vp-*gyrB*-R)仅对所检测的副溶血弧菌可扩增出大小为285bp的基因片断,对水产动物其他病原细菌(鳃弧菌、哈氏弧菌、美人鱼弧菌、鱼肠道弧菌、河口弧菌、杀对虾弧菌、杀鲑气单胞菌及爱德华氏菌)的检测均呈阴性反应,说明该引物对副溶血弧菌具有良好的特异性,可用于针对副溶血弧菌的进出口检验检疫、食品安全检测及该菌引起的水产动物疾病的诊断与分子流行病学调查。

有关副溶血弧菌的荧光定量PCR技术,国内外学者也多有报道。Blackstone等^[13]建立了1种基于*Taq Man*探针的快速定量检测含*tdh*的副溶血弧菌的实时PCR方法;蔡潭溪等^[14]根据*gyrB*基因序列设计和合成1对引物和1个*Taq Man*探针建立了一种定量检测副溶血弧菌的方法。本实验建立的副溶血弧菌的SYBR Green I实时定量PCR检测方法与*Taq Man*探针法相比,操作简单,不需要设计合成昂贵的探针,只需在SYBR Green I反应混合液中加入引物和待测样品的DNA;与普通PCR相比,SYBR Green I PCR扩增完成后,可以直接对检测结果进行分析,方便且省时,从核酸的提取到定量PCR反应完成只需要4~5h,使用i cycler iQ5多通道荧光定量PCR仪1次可以进行96个样品的高通量检测,模板质量浓度范围宽、灵敏度高,且重复性好。

由于SYBR Green I与所有的双链DNA相结合,因此由引物二聚体、单链二级结构以及非特异的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性。荧光染料法实时定量PCR检测的结果分析软件,其熔解曲线功能可以帮助

确定PCR生成几种产物、有无二聚体,从而得到定量结果。本研究的PMD18-*gyrB*基因重组质粒及检测样品熔解曲线均只有1个熔解峰, T_m 值为90℃,表明反应过程中未出现非特异性扩增和引物二聚体。

参考文献:

- [1] 张晓君,陈翠珍,阎斌伦,等. 凡纳滨对虾病原副溶血弧菌的表型及分子特征[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 654-661.
- [2] 阎斌伦,秦国民,暴增海,等. 三疣梭子蟹病原副溶血弧菌的分离与鉴定[J]. 海洋通报, 2010, 29(5): 560-566.
- [3] 林星,肖懿哲. 大黄鱼弧菌病的诊治[J]. 水产学报, 1998, 22(4): 29-30.
- [4] 张朝霞,王军,张蕉南,等. 东山九孔鲍细菌性疾病研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(2): 193-199.
- [5] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [6] VENKATESWARAN K, DOHMOTO N, HARAYAMA S. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(2): 681-687.
- [7] MARSHALL S, CLARK C, WANG G, et al. Comparison of molecular methods of typing *Vibrio parahaemolyticus*[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(8): 2473-2478.
- [8] MATSUMOTO C, OKUDA J, ISHIBASHI M, et al. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 578-585.
- [9] PEACOCK S J, SILVA G D I, JUSTICE A, et al. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing staphylococcus aureus isolates in a microepidemiological setting[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3764-3770.
- [10] GOOCH J A, DEPAOLAR A, KAYSIMER C A, et al. Evaluation of two direct plating methods using nonradio active probes for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters [J]. Appl and Environ Microbiol, 2001, 67(2): 721-724.
- [11] BEJ A K, PATTERSON D P, BRASHER C W. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*[J]. J Microbiol Methods, 1999, 36(3): 215-225.
- [12] 黄晓蓉,吕海沧,郑晶,等. 副溶血弧菌的多重PCR检测[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 445-446.
- [13] BLACKSTONE G M, NOALSMXN J L, VIEKERY M C, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR[J]. J Microbiol Methods, 2003, 53(2): 149-155.
- [14] 蔡潭溪,蒋鲁岩,黄克和. 用基于*Taq Man*探针的Real-time PCR技术定量检测副溶血弧菌[J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 638-642.