

## 迟缓爱德华氏菌 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用

荣小军<sup>1,2</sup>, 廖梅杰<sup>2</sup>, 张 正<sup>2</sup>, 王印庚<sup>2\*</sup>, 刘智超<sup>1,2</sup>,  
李 彬<sup>2</sup>, 王 岚<sup>2</sup>, 陈贵平<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 根据克隆得到的迟缓爱德华氏菌 *gyrB* 基因序列设计并合成一对特异性引物, 通用性和特异性检测结果显示所设计的引物具有良好的种间特异性和种内通用性, 构建含 *gyrB* 基因的重组质粒作为标准品, 经过反应体系优化后建立了检测迟缓爱德华氏菌的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法。结果显示, 该方法线性关系良好, 在  $T_m$  为 63 °C 时, 扩增产物的溶解曲线仅有一个单特异峰, 扩增所得标准曲线为  $y = -3.32x + 39.38$ , 相关系数为 0.998, 扩增效率为 1.00, 最低能检测到 60 个拷贝。应用建立的方法对人工感染的大菱鲂病样进行了检测, 3 个被检样品均呈阳性反应, 证明该方法具有较好的适用性。研究表明, 所建立的实时荧光定量 PCR 方法具有特异、敏感、快速、定量的优点, 可用于迟缓爱德华氏菌病的快速检测。

**关键词:** 迟缓爱德华氏菌; *gyrB* 基因; 实时定量 PCR; SYBR Green I

**中图分类号:** Q 785; S 941.42

**文献标志码:** A

迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*), 又称迟钝爱德华氏菌或缓慢爱德华氏菌, 是属于肠杆菌科、爱德华氏菌属的一种革兰氏阴性菌, 是目前在水产养殖中危害极大的病原菌。该菌呈世界性分布, 危害较严重的地区主要有非洲、美洲和亚洲。迟缓爱德华氏菌有着广谱的宿主范围, 能够感染多种淡水和海水鱼类, 包括大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 和尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*) 等<sup>[1-5]</sup>, 其感染造成鱼类出血性败血症以及内脏组织的坏死等病症, 最终导致患鱼死亡, 统称为爱德华氏菌病, 给水产养殖造成巨大的损失。迟缓爱德华氏菌还可感染鸟类、哺乳动物及爬行动物等<sup>[6]</sup>。此外, 爱德华氏菌还是一种重要的人畜共患病的病原菌, 能够造成人类胃肠道感染, 还能引起败血症、菌血

症、浓度性关节炎和肌肉坏死等病症, 直接对人类健康造成威胁<sup>[7]</sup>。在水产养殖过程中, 爱德华氏菌病的前期往往只有少数鱼死亡, 一段时间后才会大规模发病<sup>[8]</sup>, 因此, 建立水产动物迟缓爱德华氏菌早期快速检测技术具有重要的实际意义。传统的迟缓爱德华氏菌检测方法需经富集培养、形态特征观察、革兰氏染色、生理生化反应、血清学鉴定等一系列过程, 耗时长且效率不高。随着生物学技术的发展, 现在常见的细菌快速检测方法主要有免疫诊断方法和分子生物学方法。目前已经建立的爱德华氏菌检测的免疫学技术主要有间接 ELISA 和竞争 ELISA 快速检测法、Dot-ELISA、胶体金试纸快速检测法<sup>[9-13]</sup>。随着分子生物学技术的发展, 依据迟缓爱德华氏菌的 *gyrB*、23S rDNA 或者其致病基因建立了其普通 PCR 检测方法、嵌套 PCR 检测方法、多重 PCR 检测方法、LAMP 检测方法和多基

收稿日期: 2013-07-03 修回日期: 2013-09-20

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A412-4); 科研院所技术开发研究专项项目 (2011EG34219); 国家科技支撑计划 (2012BAD17B03); 国家自然科学基金项目 (30901120, 31202016); 天津市农业科技成果转化与推广项目 (201104080)

通信作者: 王印庚, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

因序列分析 (MLSA) 检测方法<sup>[14-19]</sup>, 这些研究成果建立了迟缓爱德华氏菌的定性快速检测方法。然而, 细菌的密度感应 (quorum sensing) 机制认为病原菌的致病性与种群密度有关, 在大多数情况下, 密度感应都与独立因子的表达相关<sup>[20]</sup>。对于迟缓爱德华氏菌的密度感应初步研究检测到其密度感应信号分子, 表明其能产生多种复杂的密度感应信号分子, 用来应对各种各样的环境因素及选择压力<sup>[21]</sup>。因此, 在进行爱德华氏菌病的诊断过程中, 除了定性判别技术以外, 建立迟缓爱德华氏菌的定量检测方法对该菌所引发疾病的防控具有重要的现实意义。Xie 等<sup>[22-23]</sup>建立了迟缓爱德华氏菌的 TaqMan 探针实时定量检测方法。本实验在上述研究基础上, 以 *gyrB* 基因为靶基因, 建立了 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测迟缓爱德华氏菌的方法, 为建立特异性强、灵敏度高的定量检测技

术提供技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及其来源

实验用菌种包括哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、大菱鲆弧菌 (*Vibrio scophtalmi*)、费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等 9 种共 12 株。各菌株的编号和来源见表 1, 其中 VHBZ 0001, VABZ 0002, VABZ 0007, VSBZ 0003, VPBZ 0004, VABZ 0005, VFBZ 0006 为购自中国科学院微生物研究所的标准菌株, 其余菌株为本实验室分离保存的水产疾病病原株。

表 1 实验用菌株及其来源

Tab. 1 Bacterial strains used in this study with their resource

序号 no.	菌株 bacteria strain	拉丁名 scientific name	菌株编号 bacteria number	来源 source
1	哈维氏弧菌	<i>Vibrio harveyi</i>	VHBZ 0001	中国科学院微生物研究所
2	鳗弧菌	<i>Vibrio anguillarum</i>	VABZ 0002	中国科学院微生物研究所
3	鳗弧菌	<i>Vibrio anguillarum</i>	VABZ 0007	中国科学院微生物研究所
4	灿烂弧菌	<i>Vibrio splendidus</i>	VSBZ 0003	中国科学院微生物研究所
5	迟缓爱德华氏菌	<i>Edwardsiella tarda</i>	Sm05091301A	实验室分离
6	迟缓爱德华氏菌	<i>Edwardsiella tarda</i>	Sm07083001A	实验室分离
7	迟缓爱德华氏菌	<i>Edwardsiella tarda</i>	Aj05011101A	实验室分离
8	副溶血弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VPBZ 0004	中国科学院微生物研究所
9	溶藻弧菌	<i>Vibrio alginolyticus</i>	VABZ 0005	中国科学院微生物研究所
10	大菱鲆弧菌	<i>Vibrio scophtalmi</i>	Sm02112702A	实验室分离
11	费氏弧菌	<i>Vibrio fischeri</i>	VFBZ 0006	中国科学院微生物研究所
12	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	Trans1-T1	北京全式金生物技术有限公司

### 1.2 *gyrB* 基因克隆及引物设计

将表 1 中的菌株活化, 利用北京 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌体的基因组 DNA, 分光光度计测定基因组 DNA 的浓度并定量至 100 ng/ $\mu$ L。根据 *gyrB* 基因通用引物<sup>[24]</sup>, 扩增哈维氏弧菌 (VHBZ 0001)、鳗弧菌 (VABZ 0002)、灿烂弧菌 (VSBZ 0003)、迟缓爱德华氏菌 (Sm05091301A)、副溶血弧菌 (VPBZ 0004)、溶藻弧菌 (VABZ 0005) *gyrB* 基因的部分序列。对扩增所得到的条带进行切胶回收、连接、转化等实验步骤构建重组质粒, 测序获得 6 种细菌的 *gyrB* 基因序列, 所得的基因序列组成提交 NCBI 数据库, 登录号分别为 JQ698506、JQ698507、JQ698508、JQ698509、JQ698510、JQ698511。利用软件

ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 进行同源性分析, 根据比对结果确定在迟缓爱德华氏菌特有的非同源性区段, 利用 Primer premier 5.0 软件设计特异性引物 Et-F 和 Et-R, 并由生工生物技术服务(上海)有限公司合成。

### 1.3 引物特异性检测

以 Et-F 和 Et-R 为引物, 分别以哈维氏弧菌 (VHBZ 0001)、鳗弧菌 (VABZ 0002)、鳗弧菌 (VABZ 0007)、灿烂弧菌 (VSBZ 0003)、迟缓爱德华氏菌 (Sm05091301A)、副溶血弧菌 (VPBZ 0004)、溶藻弧菌 (VABZ 0005)、大菱鲆弧菌 (Sm02112702A)、费氏弧菌 (VFBZ 0006)、大肠杆菌 (Trans1-T1) 的基因组 DNA 为模板进行常规 PCR 扩增, 验证本实验迟缓爱德华氏菌引物的特

异性。PCR 反应体系为超纯水 18.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  的引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , TaKaRa *rTaq* (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ ; PCR 反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 接着 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 59  $^{\circ}\text{C}$  复性 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s, 共 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。电泳检测所设计引物在不同菌种之间的特异性。

此外, 利用 Et-F 和 Et-R 为引物, 以上述 10 个菌株的 DNA 为模板, 以超纯水为阴性对照, 进行荧光定量 PCR 扩增, 收集荧光信号, 进一步验证所设计引物在不同菌种之间的特异性。

#### 1.4 引物通用性检测

以不同来源的 3 株迟缓爱德华氏菌 (Sm05091301A、Sm07083001A、Aj05011101) 基因组 DNA 为模板, 以所设计的 Et-F 和 Et-R 为引物进行常规 PCR 扩增, PCR 体系和程序与引物特异性检测时相同, 电泳检测所设计引物在迟缓爱德华氏菌不同株(系)之间的通用性。

#### 1.5 标准品的构建

选取“*gyrB* 基因克隆及引物设计”中所得到的迟缓爱德华氏菌阳性克隆进行质粒提取, 获得 pMD18-*gyrB* 重组质粒, 用核酸蛋白分析仪测定质粒浓度, 利用下述公式计算出每  $\mu\text{L}$  质粒中的 DNA 的拷贝数, 将该质粒作为标准品。

$$\text{质粒拷贝数(拷贝}/\mu\text{L}) = \frac{\text{浓度}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 6 \times 10^{14}}{M \times X}$$

式中,  $M$  表示每个碱基的平均分子质量,  $X$  表示重组质粒大小。

#### 1.6 迟缓爱德华氏菌 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立

荧光定量 PCR 扩增条件优化 设立引物终浓度梯度为 0.2 ~ 1.0  $\mu\text{mol/L}$ , 以确定反应的最佳引物浓度; 设立温度梯度为 59 ~ 65  $^{\circ}\text{C}$ , 根据 PCR 扩增结果, 选取最佳退火温度。

标准曲线的构建及其重复性 以构建好的 pMD18-*gyrB* 重组质粒作为迟缓爱德华氏菌定量标准品, 用 EASY Dilution 对定量标准品进行 10 倍梯度稀释, 共稀释 9 个梯度, 每个梯度做 3 个重复, 利用优化好的 PCR 反应条件, 进行荧光定量反应, 建立质粒起始浓度与  $C_t$  值对应关系的标准曲线。分析标准曲线的相关系数和扩增效率判断标准曲线的优劣。

标准曲线的重复性检测分为组内重复性实验和组间重复性实验两部分。选取构建好的 pMD18-*gyrB* 重组质粒稀释 5 个梯度, 组内重复性实验设 3 个重复管, 主要考察在同一次实验中, 3 个重复间的均一性, 用均值和方差来分析, 计算其组内变异系数; 组间重复性实验主要考察样品在不同批次的实验、不同的储存时间对标准品稳定性的影响。把标准品放于 -20  $^{\circ}\text{C}$ , 分别在 1、20 和 40 d 时取出做标准曲线, 用 Excel 对  $C_t$  值进行方差分析, 用 F 检验进行显著性检验。

#### 1.7 荧光定量 PCR 与普通 PCR 的敏感性比较实验

取不同浓度梯度迟缓爱德华氏菌的标准品 1  $\mu\text{L}$  作为普通 PCR 的模板, 用所设计的引物进行普通 PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖电泳, 观察并判读实验结果, 确定普通 PCR 的检测灵敏度, 比较荧光定量 PCR 与普通 PCR 的敏感性。

#### 1.8 SYBR-Green I 实时定量 PCR 检测方法的初步应用

为评价采集迟缓爱德华氏菌 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法的有效性, 利用迟缓爱德华氏菌人工感染健康大菱鲆苗种后, 无菌操作取其溃烂肌肉组织进行研磨, 研磨上清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、 $C_t$  值及熔解曲线进行结果判断。同时, 将病样组织进行常规的细菌分离、培养、纯化和 16S rDNA 测序, 比较确定该方法的准确性。

## 2 结果

### 2.1 引物设计结果

将不同菌株的 *gyrB* 基因克隆测序的结果进行同源性分析(图 1), 选取迟缓爱德华氏菌特异性序列区域设计引物 Et-F 和 Et-R, 具体引物序列为上游引物 Et-F: 5'TGGCGACACCGAGCAGA 3' 下游引物 Et-R: 5' ACAAACGCCTTAATCC-CACC 3', 扩增片段大小为 207 bp。

### 2.2 引物特异性及通用性检测结果

以迟缓爱德华氏菌的 Et-F 和 Et-R 为引物, 对哈维氏弧菌(VHBZ 0001)、鳃弧菌(VABZ 0002)、鳃弧菌(VABZ 0007)、灿烂弧菌(VSBZ 0003)、迟缓爱德华氏菌(Sm05091301A)、副溶血弧菌(VPBZ 0004)、溶藻胶弧菌(VABZ 0005)、大菱鲆弧菌(Sm02112702A)、费氏弧菌(VFBZ 0006)、大肠杆菌(Trans1-T1)模板 DNA 进行常规 PCR 扩增, 由

电泳检测结果(图2)可知,仅迟缓爱德华氏菌扩增出大小约为 200 bp 的目的基因片段,而其它 9 株非

迟缓爱德华氏菌均没有扩增产物,为阴性结果,说明该实验所设计的引物具有很强的种间特异性。

<i>V.harveyi</i>	GCGCCACTAGCAGTAATTGGTGATACTGACCAAACCGGTACACAAATCCGTTTCTGGCCA	240
<i>V.alginolyticus</i>	GCGCCACTAGCCGTTGTGGGTGATACGGATAAAAACCGGTACACAAATTCGTTTCTGGCCA	240
<i>V.splendidus</i>	GCGCCACTAGCTGTGATTGGTGATACGGACCAAACCGGTACAGAAATCCGTTTCTGGCCA	240
<i>V.paraheamolyticus</i>	GCGCCTCTAGCGGTTGTGGGTGATACGGATAAAAACCGGTACACAAATTCGTTTCTGGCCA	240
<i>V.anguillarum</i>	GCACCGTTGGCTGTGGTGGGTGAAACCGATAAAAACCGGGACAACCCGCGTTTTTGGCCA	240
<i>E.tarda</i>	GCGCCGCTGAAAGTGGTTGGCAGACCGACCGGACTCGCGTCGCTTTCTGGCCG	240
	** *	
<i>V.harveyi</i>	AGTGCAGAAACATTCCTGAACAC---AGAATTTCACTACGACATCCTAGCGAAGCGTCTA	297
<i>V.alginolyticus</i>	AGTGCCGAGACGTTCTCTAACAC---TGAGTTCCACTATGACATTCGCGAAAACGCCTG	297
<i>V.splendidus</i>	AGTGAAGAGACATTCCTCAATGT---ACTTTCCACTACGATATTCTAGCTAAAACGTCTA	297
<i>V.paraheamolyticus</i>	AGTGCAGAAACTTTCTCTAACAC---TGAATTCATTACGACATCCTAGCAAAAACGTCTG	297
<i>V.anguillarum</i>	AGTGCCTGAAACCTTTACCAACAT---TGAATTCATTACGATATTAGTAAAGCGTCTG	297
<i>E.tarda</i>	AGCATGGAGACCTTCAGCAATGTGGTCAATTCCAGTATGACATTCTGGCTAAGCGCCTG	300
	** *	
<i>V.harveyi</i>	CGTGAACCTTTCTTTCTGAACTCTGGTGTTCAATCAAACCTGGTTGATGAGCGGAAGCA	357
<i>V.alginolyticus</i>	CGTGAACCTGTATTCTGAACTCTGGTGTCGATCAAATGGTTGATGAACGTGAAGCG	357
<i>V.splendidus</i>	CGTGAACCTGTCTTCTAAACTCAGGCGTTTCTATCAAGCTGATTGATGAGCGTAAGAA	357
<i>V.paraheamolyticus</i>	CGTGAACCTGCTTTCTTAAACTCAGGCGTTTCTATCAAGCTATTGATGAGCGGAAGCG	357
<i>V.anguillarum</i>	CGTGAACCTCTTCTTAAACTCTGGTGATCCATCAAACCTGGTTGATGAACGTGAAGAA	357
<i>E.tarda</i>	CGCGAACTCTTCTTAAACTCAGGCGTTTCTATCAAGCTGCGCGATAAACGCAACGAT	360
	** *	
<i>V.harveyi</i>	GACAAGAGCGACCATTTCATGTTGAAGGTGGTATCCAAGCGTTGTTGAGCACCTAAAC	417
<i>V.alginolyticus</i>	GACAACATGATCACCTTCATGTATGAAGGTGGTATTCAAGCGTTCGTTGATCACCTAAAC	417
<i>V.splendidus</i>	GATAAATCGGATCACCTTCATGTTGAAGGTGGTATTCAAGCGTTCGTTGATCACCTAAAC	417
<i>V.paraheamolyticus</i>	GACAAGCAAGACCATTTCATGTATGAAGGTGGTATTCAAGCGTTCGTTGATCACCTAAAC	417
<i>V.anguillarum</i>	GACAAAAAGACCATTTCAGATATGAAGGTGGTATTAAAGCGTTCGTTGGCCATTTAAAC	417
<i>E.tarda</i>	CGCGAA---GATCATTTCCACTATGAGGGTGGGATTAAAGCGTTCGAGTATCTGAAC	417
	* *	

图1 *gyrB* 基因比对结果及迟缓爱德华氏菌引物设计

Fig. 1 The result of *gyrB* gene sequences and the primers designed

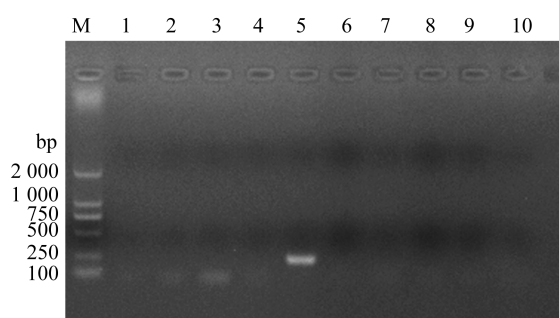


图2 引物的特异性检测结果

M. DL2 000; 1. 哈维氏弧菌; 2. 鳃弧菌; 3. 鳃弧菌; 4. 灿烂弧菌; 5. 迟缓爱德华氏菌; 6. 副溶血弧菌; 7. 溶藻胶弧菌; 8. 大菱鲆弧菌; 9. 费氏弧菌; 10. 大肠杆菌

Fig. 2 Specific detection of primers

M. DL2 000; 1. *V. harveyi*; 2. *V. anguillarum*; 3. *V. anguillarum*; 4. *V. splendidus*; 5. *E. tarda*; 6. *V. paraheamolyticus*; 7. *V. alginolyticus*; 8. *V. scopthalmi*; 9. *V. fischeri*; 10. *E. coli*

由荧光定量 PCR 方法检测所设计引物在不同细菌间扩增的结果(图3)可以看出,除了迟缓爱德华氏菌有扩增外,其余菌株及阴性对照均未检测到荧光信号。再次证明迟缓爱德华氏菌的引物 Et-F/Et-R 特异性强,没有非特异性扩增。

以迟缓爱德华氏菌的 Et-F 和 Et-R 为引物,对两株不同的分离自大菱鲆的迟缓爱德华氏菌和 1 株分离自海参的迟缓爱德华氏菌菌株 DNA 进行常规 PCR 扩增,由电泳检测结果(图4)可知,3 株迟缓爱德华氏菌均能扩增出大小约为 200 bp 的目的基因片段,说明该实验所设计的引物具有很强的种内通用性。

### 2.3 标准品的构建

含有迟缓爱德华氏菌 *gyrB* 基因的重组质粒 pMD18-*gyrB* 经分光光度计测定,其浓度为 260.6

ng/ $\mu\text{L}$ ,然后利用公式换算出拷贝数为  $6 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,将该重组质粒稀释成  $6 \times 10^9$  拷贝/ $\mu\text{L}$  后 作为定量标准品原液保存。

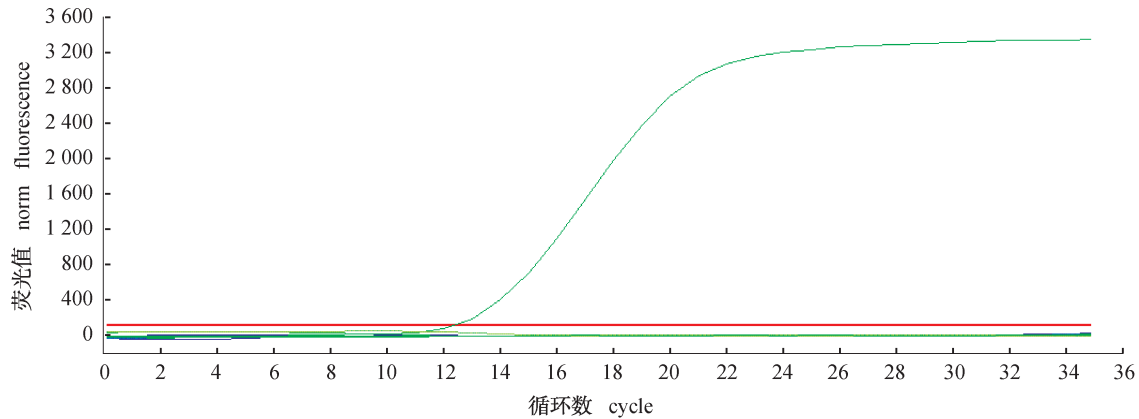


图3 迟缓爱德华氏菌引物特异性

Fig. 3 Amplification curve of specific detection of *E. tarda*

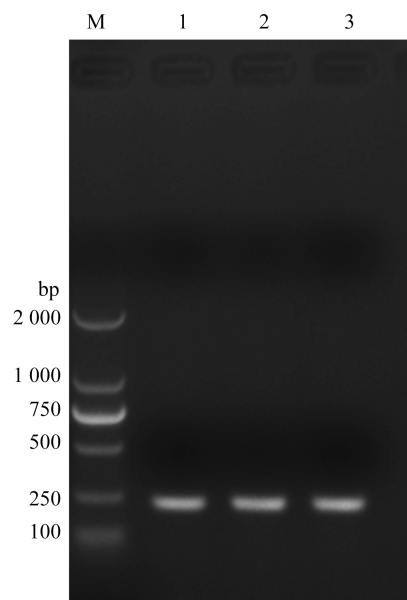


图4 引物的通用性检测

M. DL2 000; 1. 分离自大菱鲂的迟缓爱德华氏菌 (Sm05091301A); 2. 分离自大菱鲂的迟缓爱德华氏菌 (Sm07083001A); 3. 分离自海参的迟缓爱德华氏菌 (Aj05011101A)

Fig. 4 Universal detection of the primers designed

M. DL 2 000; 1. *E. tarda* separated from *S. maximus* (Sm05091301A); 2. *E. tarda* separated from *S. maximus* (Sm07083001A); 3. *E. tarda* separated from *A. japonicus* (Aj05011101A)

#### 2.4 荧光定量扩增条件优化

经过实验优化,确定进行实时定量 PCR 扩增体系中引物终浓度为  $0.25 \mu\text{mol/L}$ ,即  $20 \mu\text{L}$  的

荧光定量 PCR 反应体系:SYBR Premix Ex Taq II ( $2 \times$ )  $10 \mu\text{L}$ , Et-F ( $10 \mu\text{mol/L}$ )  $0.5 \mu\text{L}$ , Et-R ( $10 \mu\text{mol/L}$ )  $0.5 \mu\text{L}$ , DNA 模板  $1 \mu\text{L}$ , 补超纯水至  $20 \mu\text{L}$ 。

对退火温度进行优化结果表明,  $63 \text{ }^\circ\text{C}$  为最适退火温度,此时扩增效率和引物特异性最佳,荧光定量 PCR 反应条件为  $95 \text{ }^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ ;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$   $10 \text{ s}$ ,  $63 \text{ }^\circ\text{C}$   $20 \text{ s}$ ,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$   $20 \text{ s}$ , 40 个循环; 熔解曲线分析 (Effendorf 默认程序):  $95 \text{ }^\circ\text{C}$   $15 \text{ s}$ ,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$   $15 \text{ s}$ ,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$   $15 \text{ s}$ , 温度由  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  上升到  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 此过程不断收集荧光信号,形成熔解曲线。

#### 2.5 标准曲线的构建及其重复性

利用优化好的迟缓爱德华氏菌实时定量 PCR 反应体系,对 10 个 10 倍梯度稀释的定量标准品 ( $6 \times 10^9 \sim 6 \times 10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 进行检测,建立质粒拷贝浓度的对数值与  $C_t$  值对应关系的定量标准曲线。由扩增曲线 (图 5) 可以看出, pMD18-*gyrB* 重组质粒在  $6 \times 10^9 \sim 6 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$  范围内的定量 PCR,其扩增曲线反映了 PCR 的指数增长阶段和平台阶段。由熔解曲线 (图 6) 可知,9 个浓度梯度的扩增熔解曲线均只有 1 个熔解峰,  $T_m$  值为  $88.5 \sim 89.2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,表明反应过程中未出现非特异性扩增和引物二聚体。由标准曲线可以看出 (图 7),所制作的标准曲线在  $6 \times 10^9 \sim 6 \times 10^1$  拷贝数之间的  $C_t$  相差比较均匀,符合定量 PCR 的  $C_t$  值与其拷贝数之间的线性关系。本实验所得到的标准曲线方程为  $y = -3.32x + 39.38$ , 相关系数  $r^2 = 0.998$ ,扩增效率为 1.00。

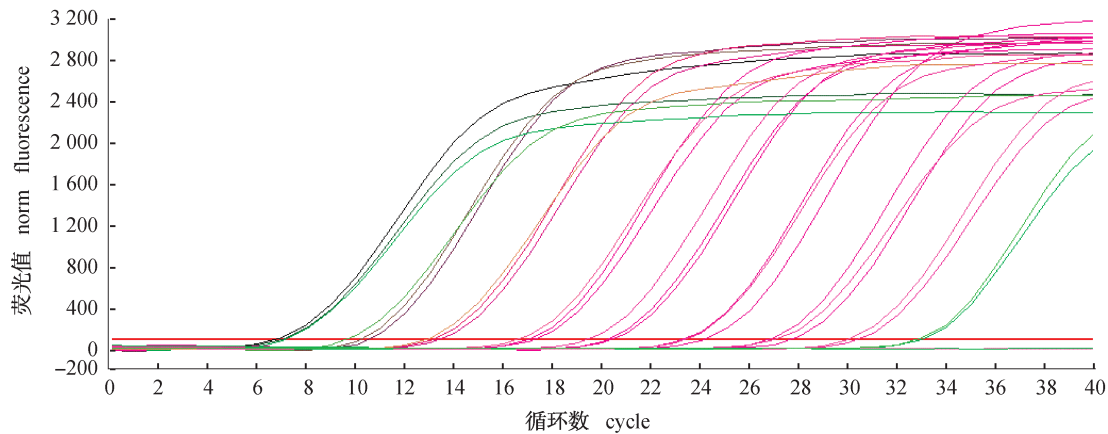


图5 迟缓爱德华氏菌标准品的 SYBR Green I 实时定量 PCR 扩增曲线图

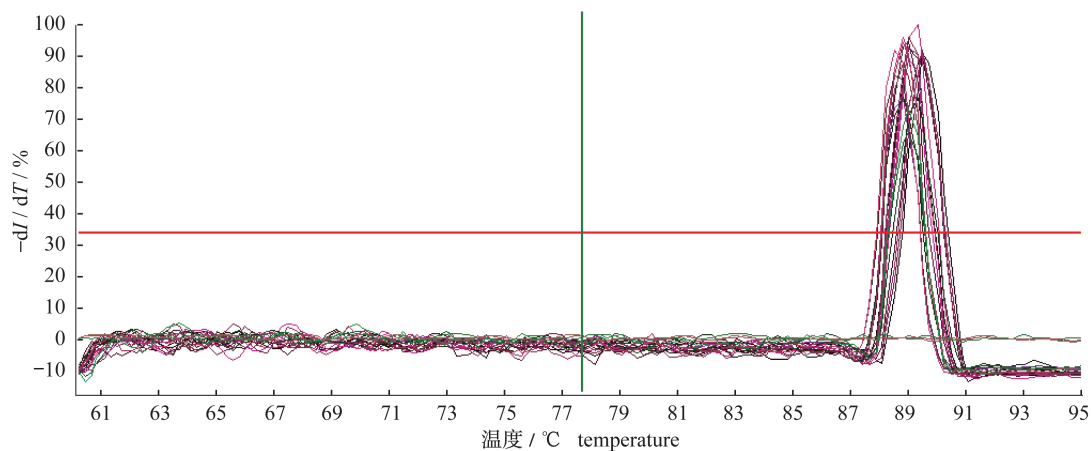
Fig.5 Amplification curve of SYBR Green I real-time PCR for strand plasmid of *E. tarda*

图6 迟缓爱德华氏菌标准品的 SYBR Green I 实时定量 PCR 扩增的熔解曲线

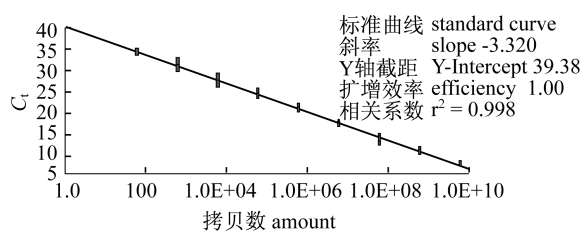
Fig.6 Melting curve of SYBR Green I real-time PCR for strand plasmid of *E. tarda*

图7 迟缓爱德华氏菌标准曲线

Fig.7 The standard curve of *E. tarda*

## 2.6 荧光定量 PCR 的重复性分析

组内重复性分析选取  $6 \times 10^8 \sim 6 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的 5 个浓度梯度, 每个梯度选取 3 个重复管进行组内荧光 RT-PCR 重复性分析, 计算其  $C_t$  均值、方差和变异系数(表 2)。由表 2 的数据得出, 标准品浓度在  $6 \times 10^8 \sim 6 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  之间的 3 个重复的  $C_t$  值基本一致, 标准差在 0.043 4 ~ 0.617 2 之间, 变异系数在 0.26% ~ 4.73% 之间。

组间重复性实验中(表 3), 选取的 5 个标准品的  $F$  均小于  $F_{\text{crit}}$ , 且  $P > 0.05$ , 说明储存的迟缓爱德华氏菌标准品储存在  $-20^\circ\text{C}$  的标准品在 1 ~ 40 d 间, 做标准曲线时没有显著差异, 均一性良好较稳定, 结果表明该实时定量 PCR 有良好的重复性。

## 2.7 荧光定量 PCR 与普通 PCR 的灵敏度比较

由 10 个  $10 \times$  梯度稀释的定量标准品重组质粒的扩增曲线可以看出,  $6 \times 10^9 \sim 6 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$  均有较强的荧光信号, 且其扩增曲线有指数增长阶段和平台阶段, 而在 6 个拷贝没有检测到扩增的荧光信号, 因此可以确定该检测方法可以至少能检测到 60 个 DNA 拷贝数, 具有较高的灵敏度。为了比较荧光定量 PCR 与普通 PCR 的灵敏度差异, 取标准品 ( $6 \times 10^9 \sim 6 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 作为普通 PCR 的模板, 由电泳结果(图 8)可知, Et-F/Et-R 作为迟缓爱德华氏菌的特异性引物, 普通 PCR

能检测到  $6 \times 10^5$  拷贝,在拷贝数为  $6 \times 10^4$  时的条带很弱,较模糊,由此可以看出荧光定量 PCR 的灵敏度比常规 PCR 高 10 000 倍。

## 2.8 实时荧光定量 PCR 检测方法应用结果

利用本实验建立的迟缓爱德华氏菌 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法,对人工感染的大菱鲆溃烂组织进行检测,PCR 的  $C_t$  值与 DNA 拷贝数之间的定量曲线见图 9。结果显示,3 个检测样品均呈阳性反应,3 个样品的  $C_t$  值分别为 16.53、15.39 和 15.55,对应 *gyrB* 基因的拷贝数为  $8.38 \times 10^6$ 、 $1.80 \times 10^7$ 、 $1.63 \times 10^7$ 。利用常规的细菌分离、培养、纯化和 16S rDNA 测序,对测序结果进行 Blast 分析结果显示,所分离的细菌为迟缓爱德华氏菌,进一步证明了该荧光定量 PCR 的准确性。

表 2 迟缓爱德华氏菌荧光定量 PCR 检测——组内重复性实验

Tab. 2 Intra-assay variability of real-time PCR of *E. tarda*

标准品/拷贝 standard	组别 group	组内重复均值 mean	标准差 S. D.	变异系数 C. V.
$6 \times 10^8$	1	10.62	0.126 2	1.19%
	2	10.20	0.208 0	2.04%
	3	10.10	0.110 8	1.10%
$6 \times 10^7$	1	13.52	0.366 9	2.71%
	2	13.21	0.081 9	0.62%
	3	13.05	0.617 2	4.73%
$6 \times 10^6$	1	17.54	0.107 2	0.61%
	2	17.01	0.121 4	0.71%
	3	16.89	0.043 4	0.26%
$6 \times 10^5$	1	20.39	0.241 6	1.18%
	2	20.10	0.298 4	1.48%
	3	20.59	0.130 0	0.63%
$6 \times 10^4$	1	24.21	0.094 0	0.39%
	2	23.68	0.188 4	0.80%
	3	24.00	0.230 4	0.96%

表 3 迟缓爱德华氏菌荧光定量 PCR 检测——组间重复性实验

Tab. 3 Inter-assay variability of real-time PCR of *E. tarda*

标准品/拷贝 standard	F 值 F-value	P 值 P-value	F 临界值 $F_{crit}$
$6 \times 10^8$	1.511 459	0.294 044	5.143 253
$6 \times 10^7$	0.489 416	0.635 486	5.143 253
$6 \times 10^6$	3.870 758	0.083 243	5.143 253
$6 \times 10^5$	0.827 024	0.481 704	5.143 253
$6 \times 10^4$	1.266 671	0.347 613	5.143 253

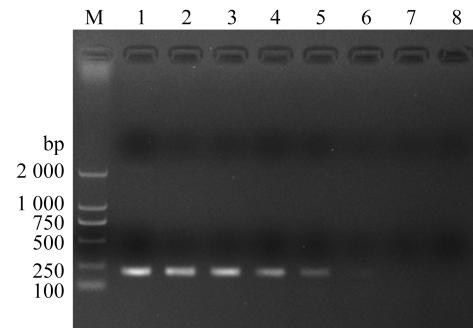


图 8 普通 PCR 检测迟缓爱德华氏菌的灵敏度

M. DL2 000; 1.  $6 \times 10^9$  拷贝; 2.  $6 \times 10^8$  拷贝; 3.  $6 \times 10^7$  拷贝; 4.  $6 \times 10^6$  拷贝; 5.  $6 \times 10^5$  拷贝; 6.  $6 \times 10^4$  拷贝; 7.  $6 \times 10^3$  拷贝; 8.  $6 \times 10^2$  拷贝

Fig. 8 Sensitivity detection of *E. tarda* using normal PCR

M. DL2 000; 1.  $6 \times 10^9$  copies; 2.  $6 \times 10^8$  copies; 3.  $6 \times 10^7$  copies; 4.  $6 \times 10^6$  copies; 5.  $6 \times 10^5$  copies; 6.  $6 \times 10^4$  copies; 7.  $6 \times 10^3$  copies; 8.  $6 \times 10^2$  copies

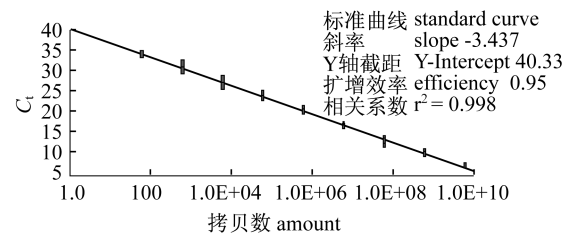


图 9 SYBR Green I real-time PCR 样品检测曲线

Fig. 9 Detection curves of samples by SYBR Green I real-time PCR

## 3 讨论

荧光定量 PCR 具有敏感度高、重复性好、线性范围宽、易于标准化和高通量等优点,常用的方法主要包括 TaqMan 探针法和 SYBR Green I 荧光染料法。与 TaqMan 荧光探针法相比,SYBR Green I 荧光染料检测具有成本低、简便易行的优点,可用于不同核酸的检测。黄世旺等<sup>[25]</sup>利用荧光定量探针法定量检测霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*),最低能检测到 10 CFU/mL;覃倚莹等<sup>[26]</sup>同样利用荧光定量探针法快速检测副溶血弧菌,检测灵敏度可到 25 个拷贝;Zhou 等<sup>[27]</sup>利用荧光定量染料法快速检测溶藻弧菌;荧光定量 PCR 还可以与多重 PCR 结合实用,达到定量检测多种细菌,或者同一菌种中不同菌株的目的<sup>[28]</sup>。虽然荧光定量 PCR 在病原菌快速检测中应用越

来越多,但是鲜有对迟缓爱德华氏菌的荧光定量检测的报道,所以本实验基于此建立了迟缓爱德华氏菌的荧光定量检测技术。

迟缓爱德华氏菌是一种常见的条件致病菌,有关迟缓爱德华氏菌的特异性检测技术已陆续见到报道。免疫方法具有检测时间短、特异性强、准确性高等优点,Swain等<sup>[11]</sup>应用斑点ELISA对感染了*E. tarda*的鱼体进行了检测,能够在鱼体死后的48~72h内特异地检测到*E. tarda*的抗原。在此基础上,Swain等<sup>[12]</sup>还评估了间接ELISA、间接阻断ELISA、竞争ELISA和血清凝集实验4种方法对鱼体中的检测敏感性,发现间接ELISA方法的阳性检出率最高。在我国,白方方等<sup>[10]</sup>利用制备具有高敏感性和特异性的*E. tarda*多克隆抗体建立的间接ELISA检测方法具有检测时间短、特异性强、准确度高优点。此外,秦璞等<sup>[13]</sup>建立的鱼类致病性迟缓爱德华氏菌胶体金快速检测法可在5~10min内检测出迟缓爱德华氏菌。然而,免疫方法检测的灵敏度在 $10^5$ CFU/mL,检测的灵敏度不高。随着分子生物学的发展和对迟缓爱德华氏菌致病基因的研究,依据其特异基因建立了迟缓爱德华氏菌的分子生物学方法。邓显文等<sup>[15]</sup>根据迟缓爱德华氏菌株23S rDNA基因,建立了二温式聚合酶链反应鉴别诊断迟缓爱德华氏菌株的技术,检测灵敏度可达到10pg DNA;薛淑霞等<sup>[16]</sup>依据迟缓爱德华氏菌溶血素基因建立的嵌套PCR检测方法,检测灵敏度达到10fg;Li等<sup>[17]</sup>利用PCR方法研究了国内分离株中毒力基因分布情况,筛选出可用于检测致病性*E. tarda*的毒力基因;Xie等<sup>[18]</sup>依据*EsrB*基因建立了LAMP检测方法,检测限可达到10拷贝。这些方法为建立具有高敏感性、特异性强的早期迟缓爱德华氏菌检测方法提供了科学依据。然而,对迟缓爱德华氏菌的密度感应系统机制研究表明,该细菌存在密度感应系统<sup>[21]</sup>,由此可以推断,该细菌致病性除了与其株系有关外,还与其种群密度密切相关,因此,建立迟缓爱德华氏菌的快速定量检测技术对于监测和预防迟缓爱德华氏菌引起的病害显得尤为重要。Xie等<sup>[22-23]</sup>分别依据迟缓爱德华氏菌的16S rDNA和*HlyB*基因建立了该菌的TaqMan探针实时定量检测方法,检测限分别可达到5拷贝和40fg。本实验依据迟缓爱德华氏菌的*gyrB*基因序列,设计了其实时定量PCR

检测引物,利用这对引物对多种弧菌或细菌的标准菌株及多个不同来源的迟缓爱德华氏菌菌株进行PCR检测,发现所有迟缓爱德华氏菌菌株都能出现阳性结果,而其它弧菌或细菌菌株均出现阴性结果,表明这对引物能特异性检测到迟缓爱德华氏菌。以这对引物为基础,构建了含有迟缓爱德华氏菌*gyrB*基因的标准品,并进行了实时定量PCR条件优化,构建了标准曲线,建立了迟缓爱德华氏菌的SYBR Green I实时定量PCR检测方法。标准曲线线性关系和扩增效率都接近1,标准品性质稳定,标准曲线重复性较好,是理想的标准曲线。其灵敏度检测结果表明,建立的迟缓爱德华氏菌的荧光定量PCR技术的最低可检测到60个拷贝*gyrB*基因,其检测灵敏度是普通PCR的10000倍。

本实验建立的迟缓爱德华氏菌的SYBR Green I实时定量PCR检测方法与普通PCR方法相比,具有灵敏度高且可以达到定量检测的目的,与TaqMan探针方法相比,操作简单,不需要设计合成昂贵的探针,只需要在SYBR Green I反应混合液中加入引物和待测样品的DNA。且其重复性检测结果表明,该方法可重复性好。实际应用效果显示,该方法可以在实际生产中具有较好的适用性,因此,本检测方法对水产养殖过程中的病原性迟缓爱德华氏菌的检测和预防具有重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] 秦蕾,王印庚,张晓君. 迟钝爱德华氏菌感染大菱鲆的病理学研究[J]. 中国水产科学,2009,16(3): 411-419.
- [2] 陈翠珍,房海,张晓君,等. 牙鲆与大菱鲆病原迟钝爱德华氏菌生物学特性及系统发育学分析[J]. 高技术通讯,2005,15(10):82-88.
- [3] Joh S J, Kim M J, Kwon H M, et al. Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from farm-cultured eels, *Anguilla japonica*, in the Republic of Korea [J]. The Journal of Veterinary Medical Science/The Japanese Society of Veterinary Science, 2011, 73(1):7-11.
- [4] 邓先余,罗文,谭树华,等. 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)“红头病”病原菌迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的分离及鉴定[J]. 海洋与湖沼,2008,39(5):511-516.
- [5] 邓显文,谢芝勋,刘加波,等. 罗非鱼迟缓爱德华氏



- 菌的分离与鉴定[J]. 水生态学杂志,2009,2(1): 114-117.
- [6] 王波,莫照兰. 迟缓爱德华氏菌及其致病机理[J]. 海洋科学集刊,2007,48:133-139.
- [7] 马勋,欧阳志明,陈怀青. 迟缓爱德华氏菌对 HEp-2 细胞的侵袭特性[J]. 微生物学报,1998,38(5): 336-340.
- [8] Ullah M A, Arai T. Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda*[J]. Fish Pathology,1983,18(2):65-70.
- [9] 王斌,范薇,李艳,等. 用两种 ELISA 方法快速检测大菱鲆细菌性出血性败血症的病原菌[J]. 大连水产学院学报,2008,23(4):252-257.
- [10] 白方方,兰建新,王燕,等. 迟缓爱德华氏菌间接 ELISA 快速检测法[J]. 中国水产科学,2009,16(4):619-625.
- [11] Swain P, Mukherjee S C, Sahoo P K, et al. Dot-Enzyme-Linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for the diagnosis of *Edwardsiella tarda* infection in fish[J]. Asian Fisheries Science, 2001, 14(1): 89-94.
- [12] Swain P, Nayak S K. Comparative sensitivity of different serological tests for seromonitoring and surveillance of *Edwardsiella tarda* infection of Indian major carps[J]. Fish & Shellfish Immunology,2003, 15(4):333-340.
- [13] 秦璞,胡晓,张在阳,等. 鱼类致病性迟钝爱德华氏菌胶体金快速检测试纸的研制[J]. 华东理工大学学报:自然科学版,2011,37(3):330-334.
- [14] Horenstein S, Smolowitz R, Uhlinger K, et al. Diagnosis of *Edwardsiella tarda* infection in oyster toadfish (*Opsanus tau*) held at the Marine Resources Center[J]. The Biological Bulletin,2004,207(2): 171-171.
- [15] 邓显文,谢芝勋,谢丽基,等. 二温式聚合酶链反应鉴别诊断迟缓爱德华氏菌病[J]. 水生态学杂志, 2009,2(2):158-160.
- [16] 薛淑霞,孙金生. 检测鲆鱼腹水病病原菌迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌的嵌套 PCR 方法[J]. 水生生物学报,2008,32(6):856-859.
- [17] Li G Y, Mo Z L, Li J, et al. Development of a multiplex PCR for the identification of pathogenic *Edwardsiella tarda* and application to edwardsiellosis diagnostics[J]. Journal of Fish Diseases, 2013, 36(2):151-157.
- [18] Xie G S, Zhang Q L, Han N N, et al. An improved method for detection of *Edwardsiella tarda* by loop-mediated isothermal amplification by targeting the *EsrB* gene[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology,2012,30(4):595-603.
- [19] Abayneh T, Colquhoun D J, Sørum H. Multi-locus Sequence Analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish[J]. Veterinary Microbiology, 2012,158(3-4):367-375.
- [20] Miller M B, Bassler B L. Quorum sensing in bacteria[J]. Annual Reviews in Microbiology,2001,55(1): 165-199.
- [21] 张敏. 迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) LuxS/AI-2 群体感应系统研究[D]. 青岛:中国科学院研究生院,2009.
- [22] Xie G S, Huang J, Zhang Q L, et al. Development and validation of a TaqMan<sup>TM</sup> fluorescent quantitative real-time PCR assay for the rapid detection of *Edwardsiella tarda*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2012,31(4):140-148.
- [23] Xie G S, Huang J, Zhang Q L, et al. A real-time PCR targeted to the upstream regions of HlyB for specific detection of *Edwardsiella tarda*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology,2012,30(5): 731-737.
- [24] 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]. Applied and Environmental Microbiology, 1995,61(3):1104-1109.
- [25] 黄世旺,卢亦愚,徐丹戈,等. TaqMan 荧光定量 PCR 技术快速检测霍乱弧菌方法的建立[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(8):923-924.
- [26] 覃倚莹,吴晖,肖性龙,等. *toxR* 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测副溶血弧菌[J]. 生物工程学报,2008,24(10):1837-1842.
- [27] Zhou S, Hou Z, Li N, et al. Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5): 1897-1906.
- [28] Nordstrom J L, Vickery M C L, Blackstone G M, et al. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(18): 5840-5847.

## Development of an SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Edwardsiella tarda* and its application

RONG Xiaojun<sup>1,2</sup>, LIAO Meijie<sup>2</sup>, ZHANG Zheng<sup>2</sup>, WANG Yingeng<sup>2\*</sup>,  
LIU Zhichao<sup>1,2</sup>, LI Bin<sup>2</sup>, WANG Lan<sup>2</sup>, CHEN Guiping<sup>2</sup>

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** According to the sequenced *gyrB* gene sequence of *Edwardsiella tarda*, a pair of primers was designed for establishing an SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR method. A 207 bp gene fragment was amplified from chromosomal DNA of *E. tarda* from different sources, and no positive reaction was detected in 9 other bacteria species using conventional PCR, which indicated that the primer pair has good inter-species specificity and intra-species commonality. Recombinant plasmid containing *gyrB* gene of *E. tarda* was constructed and used to construct the standard curve. The standard curves was  $y = -3.32x + 39.38$ , the correlation coefficient was 0.998 and the amplification efficiency was 1.00, which indicated that it had a good linear relationship between initial templates and  $C_t$  values. The melting curve has only one specific peak when annealing temperature was 63 °C. The detection limit of the assay was 60 copies per reaction. Turbot samples infected by *E. tarda* artificially were detected using the real-time PCR assay. All the three samples were positive, which had good agreement with bacteriological analysis by isolation and culture. The results showed that the developed SYBR Green I real-time PCR assay had the advantages of specificity, sensitivity, rapidity and quantification, and would be helpful for *E. tarda* diagnosis and epidemiology investigation.

**Key words:** *gyrB* gene; *Edwardsiella tarda*; real-time PCR; SYBR Green I

**Corresponding author:** WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn