

双重 PCR 快速鉴别无乳链球菌和海豚链球菌

黎炯^{1,2}, 叶星^{1*}, 卢迈新¹, 邓国成¹, 田园园¹, 江小燕¹, 黎坚平³

(1.中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 2.上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 3.广东省水产技术推广站, 广东 广州 510380)

摘要: 根据无乳链球菌的 cfb 基因和海豚链球菌 16S rRNA基因序列, 设计、合成 2 对引物, 优化扩增条件, 建立了快速鉴别无乳链球菌和海豚链球菌的双重 PCR 方法。用该方法扩增无乳链球菌和海豚链球菌, 可分别获得 474、296 bp 的特异性片段, 扩增嗜水气单胞菌、铜绿假单胞菌等其他常见鱼病原菌无特异性片段。该方法可实现对无乳链球菌和海豚链球菌的快速鉴别, 具较高的灵敏度, 可检测到基因组含量分别为 3.2×10^{-3} ng/ μ L 的无乳链球菌和 3.0×10^{-2} ng/ μ L 的海豚链球菌。对采集自广东与海南两省养殖罗非鱼病鱼的 11 份病原样品进行检测, 均可获得 474 bp 片段, 测序与 BLAST 分析结果表明, 扩增到的序列均为无乳链球菌 cfb 基因序列, 可从分子水平上确定这些样品为无乳链球菌, 与生化鉴定结果一致。

关键词: 双重 PCR; 无乳链球菌; 海豚链球菌; cfb 基因; 16S rRNA

中图分类号: S941.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)04-0449-04

Rapid identification of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* with duplex PCR assay

LI Jiong^{1,2}, YE Xing^{1*}, LU Mai-xin¹, DENG Guo-cheng¹, TIAN Yuan-yuan¹, JIANG Xiao-yan¹, LI Jian-ping³

(1.Pearl River Fishery Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380, China; 2.College of Fisheries & Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3.Guangdong Fishery Technical Extension Station, Guangzhou 510380, China)

Abstract: *Streptococcus agalactiae* and *S. iniae* are two common pathogens of fish *Streptococcus* diseases. Symptoms of disease caused by both *Streptococcus* pathogens were quite similar, and it was difficult to distinguish the two pathogens from each other directly from the symptoms. Therefore it is necessary to develop a rapid identification method in order to control the disease effectively and rapidly. According to the cfb gene sequence of *S. agalactiae* and 16S rRNA gene sequence of *S. iniae*, two pairs of primers were designed and synthesized, and a rapid duplex PCR assay for identification of *S. agalactiae* and *S. iniae* was established by optimization of amplification conditions. A 474 bp fragment specific for *S. agalactiae* and a 296 bp fragment for *S. iniae* were produced, but no product was amplified from the other common pathogenic bacteria of fish such as *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa*. The method is quite sensitive, and can detect a template concentration as low as 3.2×10^{-3} ng/ μ L for *S. agalactiae* and 3.0×10^{-2} ng/ μ L for *S. iniae*, respectively. A total of eleven pathogen samples collected from pond-cultured tilapia in Guangdong and Hainan provinces were analyzed by duplex PCR. Sequencing and BLAST analysis revealed that all the sequences were cfb gene of *S. agalactiae*. Results of molecular identification were consistent with the previous results of biochemical assays. The double PCR method would provide a sensitive and accurate method for rapid identification of *S. agalactiae* and *S. iniae*.

Key words: duplex PCR; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus iniae*; cfb ; 16S rRNA

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)是水产养殖中常见的病

收稿日期: 2010-02-10

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD01A1201); 现代农业产业技术体系建设专项基金(Nycytx-48-4); 广东省农业重点项目(2009B020201003); 公益性行业(农业)科研专项(3-49); 广东省海洋渔业科技推广专项(A200899B02); 农业部“引进国际先进农业科学技术”项目(2010-C26); 广东省重大科技兴海(兴渔)项目(070103)

作者简介: 黎炯(1985—),男,湖南常德人,硕士研究生,主要从事水产养殖研究,glzlijiong@163.com; *通讯作者, gzyexing@163.com

原菌. 迄今为止, 已发现30余种淡水养殖鱼类、50余种广盐性鱼类和海水鱼类易感海豚链球菌或无乳链球菌^[1]. 该病每年给世界水产业造成的经济损失高达100亿美元^[2]. 罗非鱼病害中的主要致病菌为海豚链球菌和无乳链球菌^[3-8]. 该病病程发生较快, 仅从发病鱼的症状上很难判断病原菌到底是哪一种链球菌, 这影响对疾病的有效处理. 目前采用的生化反应、药敏试验和电镜观察等诊断方法耗时费力, 而且有些生理反应现象可能由于外部环境的不同而改变, 从而有可能导致误判^[9]. 采用分子方法进行链球菌的鉴定国内外已有相关报道^[6-7,10-11], 但这些研究大多采用传统的16S rRNA基因进行鉴定, 对于亲缘关系较近的细菌常因分辨率不够而较难区分^[12]. 无乳链球菌与海豚链球菌的16S rRNA基因的同源性较高(>96.6%~96.8%)^[8], 它们间的序列差异主要集中在4个区域里, 各有8~12个碱基, 其中5'端约200 bp内有2个小区域. 这些区域序列的差异可用于初步区分海豚链球菌与无乳链球菌. Zlotkin等^[13]设计的一对特异引物可特异性扩增海豚链球菌, 产生约300 bp的清晰特异性条带, 而无乳链球菌无扩增条带^[13]. *cfb*基因为无乳链球菌特有基因, 它编码的一种膜外蛋白(称CAMP因子)具溶血促进作用, 能与金黄色葡萄球菌分泌的 β 溶血毒素共同作用, 增加绵羊红细胞溶血程度以及胞膜成分的溶解, 即产生CAMP反应^[14-15]. 无乳链球菌CAMP因子已被作为临床诊断、鉴别无乳链球菌的一个重要指标. 笔者选用*cfb*基因和16S rRNA基因部分序列, 建立双重PCR检测方法, 旨在快速、准确地区分无乳链球菌和海豚链球菌, 为链球菌病的准确诊断、检疫提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

标准无乳链球菌购自中国兽医药品监察所. 海豚链球菌由中山大学李安兴教授惠赠. 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由珠江水产研究所水产疫苗中心提供. 病原菌于2009年夏季采自广东和海南两省不同罗非鱼主养区的发病罗非鱼, 经理化鉴定与人工感染试验, 确认致病菌为无乳链球菌. BHI

培养基及其他试剂购自广州环凯生物有限公司. 细菌基因组提取试剂盒购自广州铂尔生物科技有限公司. PCR仪为EDC-810(广州东胜创新生物科技有限公司). PCR反应体系产品、DNA分子标准为100 bp DNA ladder, 均购自Takara公司, 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

根据GenBank中无乳链球菌特异性基因*cfb*的序列, 设计引物P1(5'-AAGCGTGTATTCCAGATTT CCT-3')和P2(5'-CAGTAATCAAGCCCAGCAA-3'). 预期扩增目的片段大小为474 bp. 海豚链球菌16S rRNA的扩增引物参考文献^[13], P3(5'-CTAGAG TACACATGTACTTAAG-3'), P4(5'-GGATTTTC CACTCCCATTAC-3'), 预期扩增片段大小为296 bp. 引物由上海生工生物服务有限公司合成.

1.2.2 样品的处理与细菌基因组DNA的提取

无乳链球菌标准品为干粉, 在无菌条件下操作, 用灭菌ddH₂O溶解、混匀, 取数滴于BHI液体培养基中, 于28℃进行培养, 每隔20 h重新传代1次. 第3次传代细菌用于基因组DNA的提取. 提取方法参照提取试剂盒说明书进行, 最后用60 μ L提取液洗脱, 于-20℃保存备用. Biophotometer分光光度计(Eppendorf)测定无乳链球菌和海豚链球菌的基因组DNA含量分别为160、150 ng/ μ L.

1.2.3 双重PCR反应体系

20 μ L反应体系内含2 \times GC-rich Buffer I 10 μ L, 10 mmol dNTP 0.4 μ L, 20 μ mol两对引物各0.5 μ L, 灭菌ddH₂O 5.4 μ L, 模板DNA 2 μ L, 5 U/ μ L Ex *Taq* 酶0.2 μ L. PCR反应条件: 96℃预变性5 min, 94℃变性45 s, 51℃退火30 s, 72℃延伸35 s, 32个循环, 72℃延伸10 min. 反应结束, 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物.

1.2.4 双重PCR特异性试验

分别取无乳链球菌和海豚链球菌基因组DNA的混合物(每种模板各1 μ L)、无乳链球菌、海豚链球菌、嗜水气单胞菌和铜绿假单胞菌的基因组DNA共5个样品按照1.2.3的PCR反应条件与反应体系进行扩增, 电泳检测扩增产物.

1.2.5 双重PCR的灵敏性检测

将无乳链球菌基因组DNA分别稀释为 1.6、 3.2×10^{-1} 、 1.6×10^{-1} 、 3.2×10^{-2} 、 1.6×10^{-2} 、 1.6×10^{-3} ng/ μ L, 将海豚链球菌的基因组DNA分别稀释为 1.5、 3.0×10^{-1} 、 1.5×10^{-1} 、 3.0×10^{-2} 、 1.5×10^{-2} 、 1.5×10^{-3} ng/ μ L. 按 1.2.3 的PCR反应条件和反应体系进行扩增. 根据所能检测到的 2 种细菌的最大稀释度, 确定双重PCR的敏感性.

1.2.6 双重PCR对临床样品的检测

用 1.2.3 的 PCR 反应条件与反应体系对 11 份无乳链球菌样品进行检测.

2 结果与分析

2.1 双重PCR检测无乳链球菌和海豚链球菌的特异性

由图 1 可知, 双重PCR检测, 无乳链球菌基因组DNA样品可得到预期的 470 bp 条带; 海豚链球菌可见约 300 bp 特异条带; 以嗜水气单胞菌、铜绿假单胞菌提取的基因组为模板进行扩增, 均未出现任何条带.

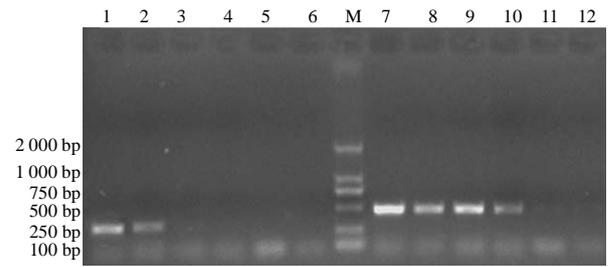


M 100 bp DNA 标记; 1 无乳链球菌和海豚链球菌基因组 DNA 混合样品; 2 无乳链球菌基因组 DNA; 3 海豚链球菌基因组 DNA; 4 嗜水气单胞菌基因组 DNA; 5 铜绿假单胞菌基因组 DNA.

图 1 无乳链球菌和海豚链球菌双重PCR特异性扩增结果
Fig.1 Duplex PCR analysis of specificity for *S. agalactiae* and *S. iniae*

2.2 双重PCR检测无乳链球菌和海豚链球菌的敏感性

用双重PCR方法扩增不同含量无乳链球菌和海豚链球菌基因组DNA的结果见图2. 双重PCR体系检测无乳链球菌和海豚链球菌的灵敏度均较高, 但此反应体系对无乳链球菌的检测更灵敏. 海豚链球菌基因组DNA稀释模板质量浓度 $\leq 3.0 \times 10^{-2}$ ng/ μ L 时有扩增条带, 但较模糊, 而无乳链球菌质量浓度



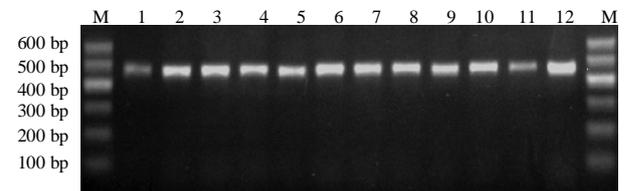
M DNA 标记; 1~6 分别为海豚链球菌模板DNA质量浓度 1.5、 3.0×10^{-1} 、 1.5×10^{-1} 、 3.0×10^{-2} 、 1.5×10^{-2} 、 1.5×10^{-3} ng/ μ L; 7~12 分别为无乳链球菌模板DNA质量浓度 1.6、 3.2×10^{-1} 、 1.6×10^{-1} 、 3.2×10^{-2} 、 1.6×10^{-2} 、 1.6×10^{-3} ng/ μ L.

图 2 无乳链球菌和海豚链球菌双重PCR敏感性扩增结果
Fig.2 Duplex PCR analysis of sensitivity for *S. agalactiae* and *S. iniae*

为 3.2×10^{-3} ng/ μ L时, 扩增条带仍较清晰, 因此, 无乳链球菌和海豚链球菌可检测的最低质量浓度分别为 3.2×10^{-3} 、 3.0×10^{-2} ng/ μ L.

2.3 临床样品的双重PCR检测结果

使用所建立的双重PCR方法检测分离保存的 11 个样品和无乳链球菌标准株, 均能获得约 470 bp 的特异性条带(图 3), 扩增序列经克隆、测序, 被证实均为 *cfb* 基因序列, 说明样品均为无乳链球菌阳性, 与试验前期的生理生化鉴定结果相符.



M 100 bp DNA 标记; 1 无乳链球菌标准株; 2~12 11 份无乳链球菌样品.

图 3 无乳链球菌标准株及病原样品的双重PCR检测结果
Fig.3 Duplex PCR analysis of the *S. agalactiae* reference strain and clinical samples

3 结论与讨论

以无乳链球菌的特异性基因 *cfb* 和海豚链球菌 16S rRNA 基因中有别于无乳链球菌的特异性区域为目标片段进行双重PCR扩增, 可在同一反应体系内经一次PCR反应检测、鉴别无乳链球菌和海豚链球菌. 此方法特异性好, 灵敏度高, 比传统生理生化鉴定简便、快捷, 可快速诊断、检疫、防控鱼类链球菌病.

双重或多重PCR技术虽然在操作上与单独使用一对引物的PCR操作相似, 只是在同一反应体系中同时加入多对引物, 但双重PCR或多重PCR反应中

引物的设计要考虑较多的因素^[16],比如引物间有相近的退火温度,避免引物间形成二聚体、交叉配对等。同时扩增片段的大小有一定的差别,以便在凝胶电泳中易于区分^[17]。本研究中所设计的2对引物能扩增出无乳链球菌和海豚链球菌各自的特异基因片断,而无其他任何杂带,说明引物间没有形成二聚体或交叉配对。本研究中用于扩增海豚链球菌的引物为296 bp,参照此对引物的主要参数,设计扩增无乳链球菌*cfb*基因的引物,使扩增产物的大小为474 bp,以便于和海豚链球菌的扩增产物分开。为了有效减少反应体系内可能出现的复杂结构的影响,使用了既可以进行一般PCR扩增,也可以对具有复杂结构DNA片段进行有效扩增的2×GC-rich Buffer I。此外,优化PCR反应条件也很重要^[18],如选择合适引物的退火温度等。本研究中,49~52℃的退火温度都可以扩增出目的带,但选择51℃为退火温度可提高目的条带的产量,减少二聚体的产生,并避免非特异性条带的出现。循环次数的选择主要取决于模板浓度,一般为30~40次^[19-20]。

参考文献:

- [1] 张生,曾中良,王凡,等. 暖水鱼类链球菌病研究概况[J]. 水产科技, 2007(2): 1-6.
- [2] Shoemaker C A, Klesius P H, Evans J J, et al. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States[J]. AJVR, 2001, 62: 174-177.
- [3] Colorni A, Diamant A, Eldar A, et al. *Streptococcus iniae* infection in Red Sea cage-cultured and wild fishes [J]. Disease of Aquatic Organisms, 2002, 49: 165-170.
- [4] Evans J J, Pasnik D J, Klesius P H, et al. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*[J]. Journal of Wildlife Diseases, 2006, 42: 561-569.
- [5] 甘西,陈明,余晓丽,等. 罗非鱼海豚链球菌16S rRNA基因的序列测定和系统分析[J]. 广西水产科技, 2006(4): 8-14.
- [6] 张新燕. 罗非鱼无乳链球菌的分子鉴定[J]. 福建水产, 2007, 4(4): 5-8.
- [7] 柴家前,丁巧玲,王振龙,等. 罗非鱼链球菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(1): 18-20.
- [8] 卢迈新,黎炯,叶星,等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766-774.
- [9] 李为,余龙江,余俊峰,等. 岩溶环境因子对细菌胞外碳酸酐酶表达及活性的影响[J]. 微生物学通报, 2005, 32(5): 35-39.
- [10] Klesius P H, Evans J J, Shoemaker C A, et al. Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique[J]. Aquaculture, 2006, 258: 180-186.
- [11] Berridge B R, Bercovier, Frelie P F. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rRNA genetic homogeneity and species-specific PCR [J]. Veterinary Microbiology, 2001, 78: 165-173.
- [12] Stackbrandt E, Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics[M]. New York: A Wiley-Interscience Publication, 1991: 115-175.
- [13] Zlotkin A, Hershko H, Eldar A. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild to cultured marine fish[J]. Appl Env Microbiol, 1998, 64: 4065-4067.
- [14] Jurgens D, Sterzik B, Fehrenbeeh F J. Unspecific binding of group B streptococcal cocytodysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible in pathogenicity[J]. J Exp Med, 1987, 165(3): 720-732.
- [15] Mary E H, Darin Q, Chia-Jun H, et al. CAMP factor is not essential for systemic virulence of group B streptococcus[J]. Microbial Pathogenesis, 2008, 44(1): 84-88.
- [16] 刘建柱,崔玉东,李鹏,等. 多重PCR检测猪瘟病毒,猪细小病毒,猪伪狂犬病毒[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(6): 535-537.
- [17] 颜新敏,张强,吴国华,等. 双重PCR快速鉴别羊痘病毒和羊口疮病毒[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10): 945-948.
- [18] Kent L, McHugh T D, Billington O, et al. Demonstration of homology between IS6110 of mycobacterium tuberculosis and DNA of other mycobacterium spp [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(9): 2290-2293.
- [19] 李敏,吕淑陶,赵源,等. 应用双重PCR技术快速鉴定结核与非结核分枝杆菌[J]. 内蒙古农业大学学报, 2008, 29(1): 85-87.
- [20] Magdalena J, Vachee A, Supply P, et al. Identification of a new DNA region specific for members of mycobacterium tuberculosis complex[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36: 937-943.

责任编辑:王赛群

英文编辑:罗文翠