

养殖大黄鱼病原弧菌多重PCR检测技术的建立和应用

祝璟琳^{1,3}, 王国良^{1,2}, 金珊¹

(1. “应用海洋生物技术”教育部重点实验室, 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211; 3. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要: 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 和哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 是浙江省养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 弧菌病的主要致病菌。本研究选择针对溶藻弧菌和副溶血弧菌的胶原酶基因, 哈维氏弧菌的部分 *ToxR* 基因的特异性, 优化设计了3对特异性引物, 通过进行多重PCR反应体系优化, 多重PCR产物的测序鉴定与特异性和敏感性实验, 建立了一种检测致病性弧菌的多重PCR检测方法。经过琼脂糖凝胶电泳后的条带分析判断, 可以在一个PCR管中同时成功地检测这3种病原细菌, 含溶藻弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌3种致病弧菌核酸的阳性对照样品分别扩增出大小为737 bp、382 bp 和271 bp 的预期产物, 其灵敏度是 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL。将该方法应用于检测人工感染后的养殖大黄鱼病鱼肝脏和肾脏, 结果在6份组织样本中, 5份检出原始感染菌株, 与API 20E鉴定结果相符; 对弧菌病流行季节采集的未发病的16份养殖大黄鱼组织样本和16份水体样本进行抽检, 结果在1份大黄鱼组织样本中检出哈维氏弧菌, 7份水体样本中检出这3种弧菌中的1种或2种, 鉴定结果与API 20E鉴定结果符合率为93.75%。说明该方法不仅可以检测发病鱼, 还可以检测无病症带菌大黄鱼以及带菌水样, 且说明海洋水体中存在着大黄鱼弧菌病的致病菌。结果说明, 多重PCR检测方法具有较高的敏感性与特异性, 可以缩短检测时间, 降低检测成本, 该方法的建立对养殖大黄鱼弧菌病的快速诊断和分子流行病学的调查具有重要意义。[中国水产科学, 2009, 16(2): 156-164]

关键词: 大黄鱼; 胶原酶基因; *ToxR* 基因; 多重PCR

中图分类号: S941

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)02-0156-09

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 和副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 引起的弧菌病是养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 危害最严重的细菌性疾病, 症状表现为溃疡、烂尾、腹水、烂眼等。这是一种病程短、范围广、死亡率高的疾病, 流行时间为6-10月份, 7-8月份为高峰期, 一般死亡率为30%~40%, 最高可达80%以上。在典型的发病网箱内, 从出现少量病鱼到大部分发病死亡历时约7 d^[1-3]。弧菌病一旦暴发, 很难控制, 因此建立快速、简便、灵敏的早期检测技术, 是预防弧菌病暴发的重要手段。目前, 对于弧菌的检测方法报道很多, 各具优势和缺陷,

比如常规的生理生化方法费时费力(需要7 d左右), 且操作复杂, 敏感性较低; API 20E等快速细菌鉴定试剂盒比较快速, 但在鉴定菌谱内的海洋弧菌种类较少; 而免疫荧光技术^[4-6]和酶联免疫技术(ELISA)^[7-8]等免疫学技术不仅可以检测发病鱼, 还可以检测潜伏期的带菌个体, 但免疫荧光技术需要较昂贵的仪器设备, 而酶联免疫技术需要制备特异的抗血清。随着以核酸为基础的微生物分子检测的发展, 特别是PCR技术的应用, 使致病菌检测发展到一个新的水平。副溶血弧菌^[9-10]、哈维氏弧菌^[11-13]、溶藻弧菌^[14-15]等致病弧菌的PCR检测方法已经广泛建立起来, 但这些常规PCR反

收稿日期: 2008-08-05; 修订日期: 2008-11-22.

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划资助(IRT0734); 浙江省科技厅重点攻关项目(2005C23080); 浙江省新苗人才计划(2007G60G20700019).

作者简介: 祝璟琳(1983-), 男, 研究实习员, 从事水产动物病害研究. Tel: 0510-85559009; E-mail: zhujl@ffrc.cn

通讯作者: 王国良. Tel: 0574-87600922; E-mail: wanggl@nbip.net

应一次只能检测一种致病菌种,而导致弧菌病的可能致病菌较多,症状表现也多种多样,这就可能需要多次检测才能确定致病菌,使得检测时间延长,检测费用增加,延误弧菌病的防治。

针对这种情况,在常规PCR的基础上发展了多重PCR技术,目前已建立起针对两种或多种致病菌的多重PCR检测技术^[16-18]。香港城市大学的Kong等^[19]通过多重PCR实现了海水中气单胞菌(*Aeromonas* spp.)、志贺氏菌(*Shigella* spp.)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、沙门氏菌(*Salmonella* spp.)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) 6种病原菌的同时快速检测。多重PCR同时检测多种病原菌,更节省成本和时间,是快速检测水产动物多种致病菌的一个良好途径。

为了实现对养殖大黄鱼弧菌病多种病原菌的快

速检测和监控,本实验探讨建立多重PCR技术,一次性检测溶藻弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌等养殖大黄鱼的致病弧菌,并对流行季节养殖大黄鱼弧菌病进行监测。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 溶藻弧菌(H050815-1)、副溶血弧菌(H040823-1)、哈维氏弧菌(H050704-1)均为本实验室历年分离收集保存,并已通过人工感染证实为养殖大黄鱼致病弧菌^[3]。

1.1.2 引物设计 结合国内外文献[9-15],利用Primer Premier 5.0软件评价比较,最终选择针对溶藻弧菌和副溶血弧菌的胶原酶基因,哈维氏弧菌的部分*ToxR*基因的特异性,优化设计了3对特异性引物(表1)。

表1 多重PCR扩增的寡核苷酸引物

Tab. 1 oligonucleotide primers for multiplex PCR amplification

| 细菌 Bacterium | 目标基因 Target gene | 引物序列 Sequence of primers | 产物/bp Product |
|----------------------------------|---------------------------------|--|------------------|
| 溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> | 胶原酶基因 Collagenase gene | VA-F: 5'-cga gta cag tca ctt gaa agc c-3' VA-R: 5'-cac aac aga act cgc gtt acc-3' | 737 |
| 副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> | 胶原酶基因 Collagenase gene | VP-F: 5'-gaa agt tga aca tca tca gca cga-3' VP-R: 5'-ggg cag aat caa acg ccg-3' | 271 |
| 哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> | <i>ToxR</i> 基因 <i>ToxR</i> gene | VH-F: 5'-gaa gca gca etc acc gat-3' VH-R: 5'-ggg gaa gac tca tca gca-3' | 382 |

1.2 实验方法

1.2.1 PCR模板的制备 酚/氯仿法提取细菌DNA参照《分子克隆实验指南》第3版^[16]。煮沸法从细菌培养液中,动物组织中提取细菌总DNA参照邓先余^[17]的方法。

1.2.2 多重PCR引物的特异性检验 提取溶藻弧菌,副溶血弧菌,哈维氏弧菌,创伤弧菌和嗜水气单胞菌的DNA作为模板,对3对多重PCR引物分别进行特异性检验。阴性对照不加任何模板。

1.2.3 多重PCR反应条件优化 首先对多重PCR影响较小的因素:10×PCR反应缓冲液、dNTP和*Taq*酶的量进行优化,摸索出最佳浓度后给予确定,再针对多重PCR影响较大的因素:Mg²⁺浓度、引物浓度和退火温度,进行L₉(3⁴)正交试验,经局部微调,确定

最佳的反应模式。阴性对照不加任何模板。

1.2.4 多重PCR灵敏度试验 将3种菌株分别培养至对数期,通过50%海水普通营养琼脂平板计数,将各菌样以10⁸ CFU/mL等体积混合后,用无菌生理盐水以十倍稀释法进行倍比稀释,8 000 r/min离心2 min,采用酚/氯仿法提取DNA模板,检测其灵敏度。

1.2.5 不同模板制备方法对多重PCR结果的影响以及多重PCR产物的鉴定 为了评价酚/氯仿法和直接煮沸法模板DNA提取方法对多重PCR扩增效果的影响,按1.2.1的2种方法提取细菌模板总DNA,进行3种弧菌的检测,重复3次。多重PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳确定特异条带后,经UNIQ-10柱式胶回收试剂盒纯化,送上海基康生物工程有限公司测序,并与GenBank中的基因序列进行Blast比对。

1.2.6 多重PCR的应用检测 为了评价PCR检测方法是否适用于养殖大黄鱼弧菌病的检测与诊断,分别用这3种弧菌感染健康大黄鱼,复制出相似的症状,取每组濒死的养殖大黄鱼,用无菌剪刀剪取适量(约0.1 g)肝脏和肾脏分别置入无菌离心管,立即放入液氮罐中。回实验室取出后用无菌剪刀剪碎,加PBS液研磨,煮沸法^[17]抽提总DNA, PCR扩增。同时,在2007年6-9月份采集宁波市象山县黄避岙和新桥养殖场的未发病大黄鱼的肝脏和肾脏,按同法^[17]提取总DNA,进行PCR扩增,检测是否含有上述3种弧菌。同步取黄避岙和新桥养殖场的未发病的大黄鱼样品用2216E和TCBS固体培养基做细菌培养,分离纯化,用自动微生物鉴定系统API 20E进行鉴定。

另外,为了评价养殖水体样品是否受3种弧菌污染,采集宁波市象山县黄避岙和新桥2个大黄鱼养殖场网箱内的海水水样作检测样品,滤膜法浓缩细菌,然后用煮沸法^[17]抽提DNA,多重PCR检测。同时,对样品进行培养、分离和纯化,用自动微生物鉴定系统API 20E进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 多重PCR引物的特异性检验

用实验室分离保存的5种水产养殖常见致病菌提取的DNA作为阳性对照模板检测3对引物的特异性,结果显示,除加入对应的阳性模板外没有别的泳道有任何阳性条带(图1-图3),3对引物特异性较好。阴性对照不加入任何模板,结果显示阴性。

2.2 多重PCR的调试优化

2.2.1 多重PCR体系优化 引物浓度: 实验用等浓度的3对引物,分别采用0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和0.8 $\mu\text{mol/L}$,结果0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和0.8 $\mu\text{mol/L}$ 均能扩增预期目的条带,但溶藻弧菌,哈维氏弧菌的条带有时稍暗,经过优化最终确定的引物浓度为溶藻弧菌0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、哈维氏弧菌0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、副溶血弧菌0.16 $\mu\text{mol/L}$ 。Mg²⁺浓度: 分别采用1.5 mmol/L、2 mmol/L、3 mmol/L的MgCl₂浓度,结果显示2 mmol/L为最佳。10×PCR反应缓冲液2.5 μL ,热启动Ex Taq

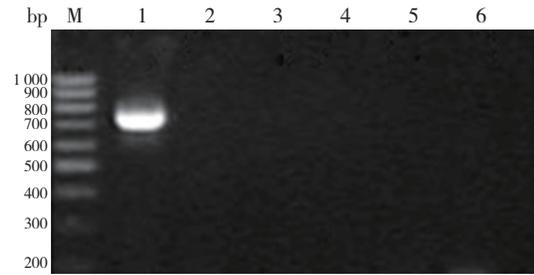


图1 溶藻弧菌引物特异性试验检测结果

M: DNA marker; 1: 溶藻弧菌; 2: 副溶血弧菌; 3: 哈维氏弧菌; 4: 创伤弧菌; 5: 嗜水性单胞菌; 6: 阴性对照。

Fig. 1 Specificilty assay of *Vibrio alginolyticus* primers

M: DNA marker; 1: *Vibrio alginolyticus*; 2: *Vibrio parahaemolyticus*; 3: *Vibrio harveyi*; 4: *Vibrio vulnificus*; 5: *Aeromonas hydrophila*; 6: negative control.

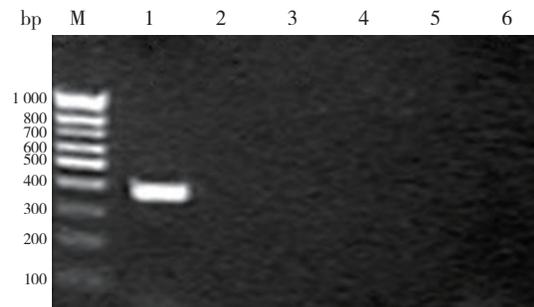


图2 哈维氏弧菌引物特异性试验检测结果

M: DNA marker; 1: 哈维氏弧菌; 2: 溶藻弧菌; 3: 副溶血弧菌; 4: 创伤弧菌; 5: 嗜水性单胞菌; 6: 阴性对照。

Fig. 2 Specificilty assay of *V. harveyi* primers

M: DNA marker; 1: *V. harveyi*; 2: *V. alginolyticus*; 3: *V. parahaemolyticus*; 4: *V. vulnificus*; 5: *A. hydrophila*; 6: negative control.

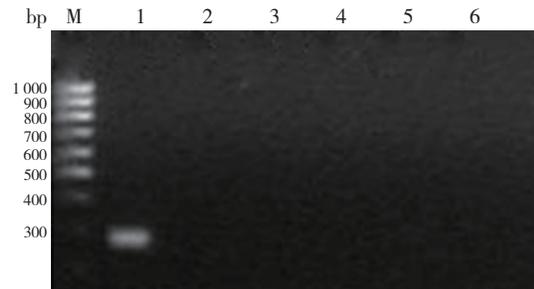


图3 副溶血弧菌引物特异性试验检测结果

M: DNA marker; 1: 副溶血弧菌; 2: 溶藻弧菌; 3: 哈维氏弧菌; 4: 创伤弧菌; 5: 嗜水性单胞菌; 6: 阴性对照。

Fig. 3 Specificilty assay of *V. parahaemolyticus* primers

M: DNA marker; 1: *V. parahaemolyticus*; 2: *V. alginolyticus*; 3: *V. harveyi*; 4: *V. vulnificus*; 5: *A. hydrophila*; 6: negative control.

酶1 U, dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP的混合物) 200 μmol/L, 模板1.0 μL, 反应体系为25 μL。

2.2.2 多重PCR条件的优化 退火温度: 当采用单一退火温度进行多重PCR时, 能得到预期的扩增产物, 但稳定性不够, 条带明亮暗度不一, 长目的片段有时未能扩增。改用在3种菌单一PCR条件的基础上, 采用降落PCR, 退火温度从57 °C到55 °C, 每降低1 °C

4个循环, 退火温度到54.8 °C时进行20个循环, 并采用热启动*Ex Taq*酶, 获得了预期特异性扩增产物, 且重复性较好(图4)。延伸时间: 延伸时间以1 min 20 s、1 min 40 s、2 min分别实验, 结果显示均能得到清晰条带, 最终选定1 min 20 s, 可得到均一、稳定的条带。延伸温度降至68 °C时能增加各扩增产物的量。

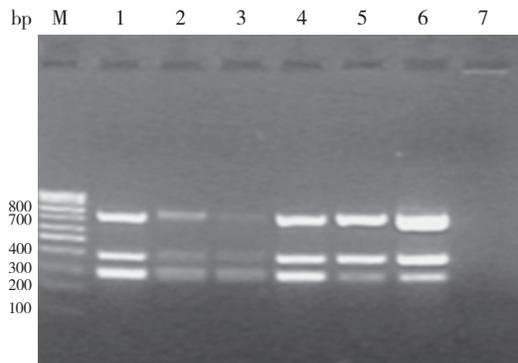


图4 多重PCR条件的优化

M: DNA marker; 1-3: 退火温度是54.5 °C时的多重PCR扩增结果; 4-6: 采用降落PCR后的扩增结果, 其中延伸时间分别为1 min 20 s, 1 min 40 s, 2 min; 7: 阴性对照。

Fig. 4 Optimization of multiplex PCR conditions

M: DNA marker; 1-3: The multiplex PCR amplification result when the annealing temperature is 54.5 °C; 4-6: the amplification result of touchdown PCR, while the extending time is 1 min 20 s, 1 min 40 s, 2 min, respectively; 7: negative control.

2.3 多重PCR灵敏度确定

3种致病弧菌检测灵敏度(图5)分别为: 溶藻弧

菌 10^3 CFU/mL、哈维氏弧菌 10^2 CFU/mL、副溶血弧菌 10^3 CFU/mL。

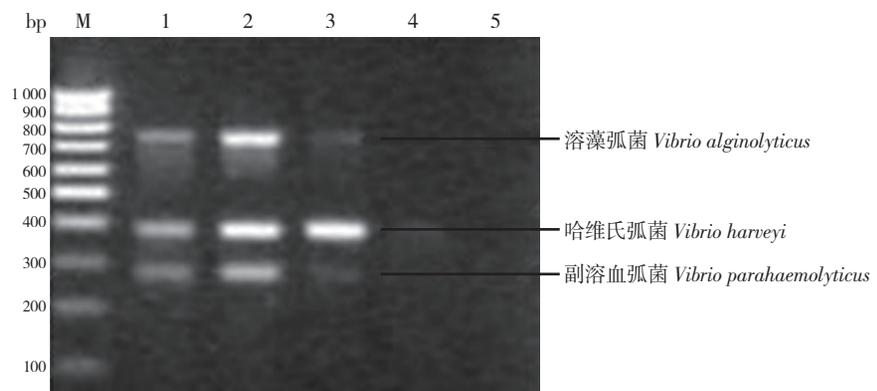


图5 DNA模板稀释法测定的多重PCR敏感性试验

M: DNA marker; 1-5: 溶藻弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌各菌液浓度梯度分别为 10^5 CFU/mL、 10^4 CFU/mL、 10^3 CFU/mL、 10^2 CFU/mL和 10^1 CFU/mL。

Fig. 5 Sensitivity assay of multiplex PCR of DNA templates dilution

M: DNA marker; 1-5: The gradient concentrations of DNA templates of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* one 10^5 CFU/mL, 10^4 CFU/mL, 10^3 CFU/mL, 10^2 CFU/mL and 10^1 CFU/mL, respectively.

2.4 不同模板制备方法对多重PCR结果的影响以及多重PCR产物的鉴定

从图6可以看出,用酚/氯仿法(泳道1、3、5)和煮沸法(泳道2、4、6)提取的细菌模板DNA,多重PCR扩增结果均为阳性,重复3次,结果也相同,表明2种提取模板DNA方法的PCR扩增效果几乎无差异,且结果稳定。因煮沸法既经济又简捷,可作为首选。

多重PCR扩增产物测序结果显示目的片段分别为溶藻弧菌737 bp、哈维氏弧菌382 bp、副溶血弧菌271 bp(图6),在GenBank中的登录存取号分别为EF645829、EF645830、EF645828。

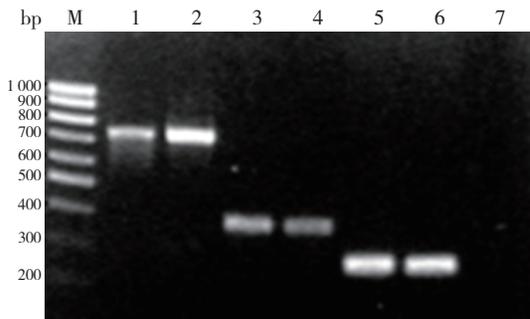


图6 多重PCR扩增结果的琼脂糖凝胶电泳图

M: DNA marker; 1,2: 溶藻弧菌; 3,4: 哈维氏弧菌;
5,6: 副溶血弧菌; 7: 阴性对照。

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis showing the results of multiplex PCR amplification

M: DNA marker; 1,2: *V. alginolyticus*; 3,4: *V. harveyi*;
5,6: *V. parahaemolyticus*; 7: negative control.

溶藻弧菌胶原酶基因测序结果与GenBank中提交的溶藻弧菌X62635.1、DQ097161.1的胶原酶基因序列的同源性分别为98%和97%,说明为溶藻弧菌胶原酶基因的特异性条带;副溶血弧菌胶原酶基因测序结果与GenBank中提交的副溶血弧菌DQ479431.1、AF326572.1的胶原酶基因序列的同源性分别为99%和98%,说明为副溶血弧菌胶原酶基因的特异性条带;哈维氏弧菌*ToxR*基因测序结果与GenBank中提交的哈维氏弧菌AY247418.1、DQ517446.1、DQ503438.1的部分*ToxR*基因序列的同源性在97%~99%之间,说明为哈维氏弧菌*ToxR*基因的特异性条带。

2.5 多重PCR的应用检测

通过对2007年6-9月采集的16份养殖大黄鱼组织样本进行多重PCR检测,结果只在9号样本(大黄鱼肝脏,2007年7月11日采自象山黄避岙)中检出副溶血弧菌(表2和图7的1、2泳道),API 20E鉴定系统未能检出副溶血弧菌。而对人工感染后濒死养殖大黄鱼的不同组织进行多重PCR检测,结果在1号鱼的肝脏和肾脏、2号鱼的肾脏以及3号鱼的肝脏和肾脏中都检出原始感染菌株(图7的3-9泳道),与API 20E鉴定结果相符。

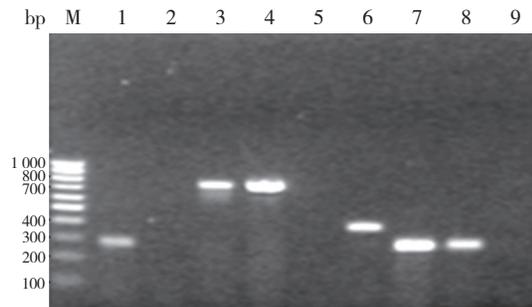


图7 大黄鱼各组织样本的多重PCR检测

M: DNA marker; 1: 养殖场采集的9号组织样本检测结果; 2: 阴性对照; 3: 人工感染后的1号鱼肝脏; 4: 人工感染后的1号鱼肾脏; 5: 人工感染后的2号鱼肝脏; 6: 人工感染后的2号鱼肾脏; 7: 人工感染后的3号鱼肝脏; 8: 人工感染后的3号鱼肾脏; 9: 阴性对照。

Fig. 7 Multiplex PCR amplification of different tissue samples of *P. crocea*

M: DNA marker; 1: result of multiplex PCR detection of No.9 tissue sample collected from fishery farm; 2: negative control; 3: result of multiplex PCR detection of liver of No.1 fish artificially infected; 4: result of multiplex PCR detection of kidney of No.1 fish artificially infected; 5: result of multiplex PCR detection of liver of No.2 fish artificially infected; 6: result of multiplex PCR detection of kidney of No.2 fish artificially infected; 7: result of multiplex PCR detection of liver of No.3 fish artificially infected; 8: result of multiplex PCR detection of kidney of fish No.3 artificially infected; 9: negative control.

通过对2007年6-9月采集的16份水体样本进行多重PCR检测,结果在7份水体样本中检出弧菌,1、10、11号水体中检出副溶血弧菌,2号水体中检出溶藻弧菌和副溶血弧菌,6、7、8号水体检出哈维氏弧菌(表2和图8的1~16泳道)。除2号水体API 20E鉴定系统未能检出外,其余鉴定结果与API 20E鉴定结果相符,结果符合率93.75%。

表2 大黄鱼养殖场采集的组织样本和水体样本的检测结果
Tab. 2 Multiplex PCR results of tissue samples and water samples collected from large yellow croaker farms

| 组织样本 Sample no. | 采集时间 Sampling date | 采集地点 Sampling location | 采集部位 Target site | 检测结果 Result | 水体样本 Water sample | 采集时间 Sampling date | 采集地点 Sampling location | 检测结果 Result |
|--------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|----------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|----------------|
| 1 | 2007-06-27 | HBA | 肝脏 Liver | - | 1 | 2007-06-27 | HBA | VP |
| 2 | 2007-06-27 | HBA | 肾脏 Kidney | - | 2 | 2007-06-27 | HBA | VA, VP |
| 3 | 2007-06-27 | HBA | 肝脏 Liver | - | 3 | 2007-06-27 | HBA | - |
| 4 | 2007-06-27 | HBA | 肾脏 Kidney | - | 4 | 2007-06-27 | HBA | - |
| 5 | 2007-06-27 | HBA | 肝脏 Liver | - | 5 | 2007-06-27 | HBA | - |
| 6 | 2007-07-11 | HBA | 肾脏 Kidney | - | 6 | 2007-07-11 | HBA | VH |
| 7 | 2007-07-11 | HBA | 肝脏 Liver | - | 7 | 2007-07-11 | HBA | VH |
| 8 | 2007-07-11 | HBA | 肾脏 Kidney | - | 8 | 2007-07-11 | HBA | VH |
| 9 | 2007-07-11 | HBA | 肝脏 Liver | VP | 9 | 2007-07-11 | HBA | - |
| 10 | 2007-07-11 | HBA | 肾脏 Kidney | - | 10 | 2007-07-11 | HBA | VP |
| 11 | 2007-07-30 | XQ | 肝脏 Liver | - | 11 | 2007-07-30 | XQ | VP |
| 12 | 2007-07-30 | XQ | 肾脏 Kidney | - | 12 | 2007-07-30 | XQ | - |
| 13 | 2007-07-30 | XQ | 肝脏 Liver | - | 13 | 2007-07-30 | XQ | - |
| 14 | 2007-07-30 | XQ | 肾脏 Kidney | - | 14 | 2007-07-30 | XQ | - |
| 15 | 2007-07-30 | XQ | 肝脏 Liver | - | 15 | 2007-07-30 | XQ | - |
| 16 | 2007-07-30 | XQ | 肾脏 Kidney | - | 16 | 2007-07-30 | XQ | - |

注:“-”代表检测结果阴性,“VA”代表溶藻弧菌,“VP”代表副溶血弧菌,“VH”代表哈维氏弧菌. HBA-黄避岙; XQ-新桥.

Note:“-” represents negative result of the multiplex PCR detection, “VA” represents *Vibrio alginolyticus*, “VP” represents *V. parahaemolyticus*, “VH” represents *Vibrio harveyi*. HBA-Huang Bi-ao; XQ-Xinqiao.

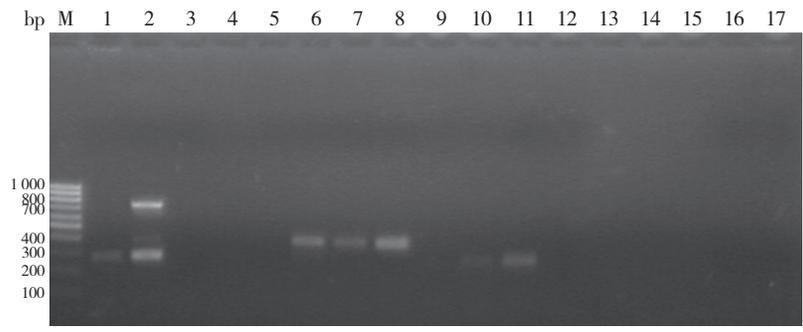


图8 大黄鱼养殖场水体样本的多重PCR检测

M: DNA marker; 1-16: 养殖场采集的1-16号水体样本的多重PCR检测结果; 17: 阴性对照.

Fig. 8 Multiplex PCR amplification of water samples from *P. crocea* farms

M: DNA marker; 1-16: result of the multiplex PCR detection of water samples Nos.1-16 collected from fishery farm; 17: negative control.

3 讨论

3.1 多重PCR的影响因素

多重PCR要求不同引物能在同一反应体系中进行特异性扩增,影响其扩增效果的因素较多,不同引物对之间的相对浓度、循环温度、延伸时间, MgCl₂和 dNTP 浓度间的平衡等^[18]。多重PCR反应中引物

浓度在一定范围内波动,多重扩增都可以出现,然而如果超出这一范围,浓度过高或过低都不利于多重扩增反应。本实验中溶藻弧菌引物浓度在0.4~0.8 μmol/L之间、哈维氏弧菌引物浓度在0.4~0.8 μmol/L之间、副溶血弧菌引物浓度在0.16~0.8 μmol/L之间,三重扩增都可以出现。但以最低引物量产生所需要

的结果为好,引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增,且可增加引物之间形成二聚体的机会。因此确定最优化的引物浓度为溶藻弧菌 $0.4\ \mu\text{mol/L}$ 、哈维氏弧菌 $0.4\ \mu\text{mol/L}$ 、副溶血弧菌 $0.16\ \mu\text{mol/L}$ 。当采用单一退火温度 $54.5\ ^\circ\text{C}$ 进行多重PCR时,能得到预期的扩增产物,但稳定性不够,条带明亮暗度不一,结合降落PCR和热启动PCR后,可以得到均一、稳定的条带,获得很好的扩增效果,同时也减少了样品间交叉污染的机率。延伸温度和延伸时间也是影响多重PCR结果的重要因素,高的延伸温度减少了某些基因的扩增,用较长的退火时间和延伸时间并不能完全消除这种影响,而将延伸温度降至 $68\ ^\circ\text{C}$ 后,能增加所有基因的PCR产物量。

$10\times$ PCR反应缓冲液、dNTP、*Taq*酶的量等多重扩增的影响不是很大,是变化较小的因素。但热启动*Ex Taq*酶比普通*Taq*酶更能增强各目的片段的扩增量。而当dNTP浓度为每种 $200\ \mu\text{mol/L}$ 时结果最好,浓度继续增加时扩增被抑制。降低dNTP浓度不抑制扩增,但扩增产物的量会减少。dNTP母液对于反复冻融十分敏感,反复冻融 $3\sim 5$ 次后,多重PCR扩增产物几乎完全不可见。为了避免这一问题,应分装小份的dNTP,冻存于 $-20\ ^\circ\text{C}$,使用前离心。dNTP的这种低稳定性在单PCR扩增中并不明显。

3.2 多重PCR检测养殖大黄鱼弧菌病原菌的意义

养殖大黄鱼的弧菌病研究仅限于中国,大多研究集中在疾病描述、流行病学、病原鉴定、致病机理、防治方法等方面。弧菌是一种条件致病菌,其致病性受宿主的生理状态及水质环境条件等综合因素的影响较大,当大黄鱼免疫机能低下或表皮擦伤磨损时,海水养殖环境中的致病弧菌就易引起感染,症状表现多种多样,病原菌可能有溶藻弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌^[1-3]。关于大黄鱼弧菌病的早期检测技术研究较少,且集中在免疫学方法上。免疫学方法不仅可以检测发病鱼,还可以检测潜伏期的带菌个体,但只能检测一种细菌,难以用抗血清分辨相关菌群且敏感性较低^[4-8]。随着分子生物学技术的发展,快速检测弧菌的PCR方法已经广泛建立^[9-15]。但常

规的PCR检测法为单对引物扩增一种病原体DNA,一次只能检测一种病原体,混合感染的检测显得操作烦琐,费时且成本高,而且容易产生漏诊。养殖大黄鱼致病性弧菌种类多,难以用一种方法进行确诊,而多重PCR能有效地解决上述问题^[19-22]。

胶原酶基因是一种新的金属蛋白酶基因,这种金属蛋白酶基因是弧菌侵染宿主时的一种毒力因子^[23]。*ToxR*基因是一种毒素蛋白表达调控基因,可作为弧菌间鉴别和检测基因^[11]。因此,本研究针对溶藻弧菌和副溶血弧菌的胶原酶基因,以及哈维氏弧菌中的部分*ToxR*基因的特异性设计并优化建立了多重PCR检测方法,检测灵敏度是 $10^2\sim 10^3\ \text{CFU/mL}$,并把它应用到流行季节养殖大黄鱼弧菌病的监测中。

通过对2007年6月至9月间采集的16份养殖大黄鱼组织样本进行多重PCR检测,结果只在1份样本中检出副溶血弧菌,这也与2007年浙江省这2个大黄鱼养殖场没有暴发弧菌病的情况相吻合,并且表明多重PCR不仅可以检测发病鱼,还可以检测潜伏期的带菌个体。另16份水体样本进行多重PCR检测,结果显示7份水体样本中含有这3种弧菌中的1种或2种,说明海洋水体中存在有大黄鱼弧菌病的致病菌。

用多重PCR方法检测养殖大黄鱼组织或水体样本中的3种弧菌的优越性主要表现在:(1)操作简便,检测周期短。每一批次从样品准备到检出只需 $3\sim 4\ \text{h}$,可在1个工作日内完成;(2)灵敏度高,结果准确。多重PCR方法的灵敏度达到 $10^2\sim 10^3\ \text{CFU/mL}$,小于、等于致病菌的致病感染剂量($10^3\ \text{CFU/mL}$)^[24],对致病弧菌的检测和监测具有实际应用价值;(3)工作量小,检测成本低,一种方法能同时检测3种可能致病弧菌;(4)可为其他海水养殖动物病原菌早期检测提供借鉴模式,具有广泛的适用性。

由于流行季节的时间等条件所限,在本实验中用多重PCR方法仅对一定量的组织样本和水样中的3种弧菌进行了检测。若对不同来源的更多样品采取相应的总DNA抽提技术,此法可更广泛地应用于海水养殖动物弧菌病的检测和预防。

参考文献:

- [1] 毛芝娟, 刘国勇, 陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 178-181.
- [2] 金珊, 王国良. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的流行病学研究[J]. 水产科学, 2005, 24(1): 17-19.
- [3] 王国良, 祝璟琳, 金珊. 养殖大黄鱼3种致病弧菌的分子鉴定及其系统发育学分析[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(2): 162-167.
- [4] 余俊红, 姚斐, 俞勇, 等. 应用间接荧光抗体技术快速检测花鲈病原菌—鳃弧菌[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 38-43.
- [5] 王军, 鄢庆枇, 苏永全, 等. 溶藻弧菌的间接荧光抗体快速检测[J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 1-4.
- [6] 鄢庆枇, 苏永全, 王军, 等. 大黄鱼弧菌病的荧光抗体快速诊断研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2001, 6(4): 291-295.
- [7] 王军, 鄢庆枇, 苏永全, 等. 养殖大黄鱼副溶血弧菌的酶联免疫吸附法研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(3): 346-350.
- [8] 鄢庆枇, 方恩华, 苏永全, 等. 大黄鱼溶藻弧菌LPS的间接ELISA检测[J]. 台湾海峡, 2004, 23(1): 56-61.
- [9] Lee C Y, Pan S F, Chen C H. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(4): 1311-1317.
- [10] Kim Y B, Okuda J, Matsumoto C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene [J]. J Clinical Microbiol, 1999, 37(4): 1173-1177.
- [11] Conejero M J U, Hedrvda C T. Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection [J]. J Applied Microbiol, 2003, 95(3): 602-611.
- [12] Conejero M J U, Hedrvda C T. PCR detection of hemolysin (*vhh*) gene in *Vibrio harveyi* [J]. J Gener Appl Microbiol, 2004, 50(3): 137-142.
- [13] Pang L, Zhang X H, Zhong Y, et al. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene [J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(3): 249-255.
- [14] Lee K K, Yu S R, Yang T I, et al. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. Letters in Applied Microbiol, 1996, 22(2): 111-114.
- [15] Liu P C, Lin J Y, Hsiao P T, et al. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum* [J]. J Basic Microbiol, 2004, 44: 23-28.
- [16] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南: 第3版[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 27-36.
- [17] 邓先余. 6种水产病原菌16S-23S rDNA 间区序列分析及检测技术[D]. 广州: 中山大学, 2003: 1-168.
- [18] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. BioTechniques, 1997, 23(3): 504-511.
- [19] Kong R Y C, Lee S K Y, Law T W F, et al. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR [J]. Water Res, 2002, 36(11): 2802-2812.
- [20] Brasher C W, DePaola A, Jones D D, et al. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR [J]. Curr Microbiol, 1998, 37(1): 101-107.
- [21] Del Cerro A, Marquez I, Guijarro J A. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR [J]. Applied Environm Microbiol, 2002, 68(10): 5177-5180.
- [22] Angela D, Giuseppina C, Maria F. Detection of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish samples using collagenase-targeted multiplex-PCR [J]. J Food Saf, 2006, 26: 150-159.
- [23] Kim S K, Yang J Y, Cha J. Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04 [J]. Gene, 2002, 283: 277-286.
- [24] US EPA. Guidelines for water reuse [M]. Washington: United States Environmental Protection Agency, 1992.

Development and application of multiplex PCR of vibrios pathogenic to cultured large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson)

ZHU Jing-lin^{1,3}, WANG Guo-liang^{1,2}, JIN Shan¹

(1. Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology, Ministry of Education, Faculty of Life-Science and Bio-Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. The Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 3. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: In recent years, Vibriosis was the most severe disease of cultured large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) in Zhejiang province, China, resulting in great economic losses. The clinical symptoms included anorexia, floating upward and swimming alone, pterygiophore hyperaemia, ulceration, ascites and lippitude. It was epidemic from June to October, with peak on July to August. The mortality rate varied from 30 % to 40 % , even up to 80% sometimes. It costed only one week from some fish infected to almost all dead. Three bacterial pathogens accounted for the majority of large yellow croaker vibriosis in Zhejiang province, China. They were *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*. In this study, three special oligonucleotide primers for multiplex PCR amplification was designed, based on the diversity of the collagenase gene sequences between *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*, and the partial *ToxR* gene specific detection of *Vibrio harveyi*. The reaction conditions of the multiplex PCR were optimized and PCR products were sequenced. Specificity and sensitivity of multiplex PCR were studied. Finally, the multiplex PCR is well developed successfully allowing the detection of the three bacterial pathogens in one PCR tube with relatively equal intensities DNA bands when analyzed in an agarose gel. Positive control samples which contained DNA of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* yielded evident amplification products showing the expected DNA fragments of 737 bp, 382 bp and 271 bp respectively. The sensitivity of multiplex PCR was 10^2 – 10^3 CFU/mL. When it was applied to detect the vibrios in livers and kidneys of fish which were artificially infected, the vibrio was detected in five of six samples, which was as same as the vibrio formerly injected. The result was coherence with that of API 20E method; when it was applied to detect the vibrios in different tissue samples of large yellow croaker and water samples collected from fishery in epidemic season, one of 16 tissue samples produced positive bands of *Vibrio harveyi*, and seven of 16 water samples produced positive bands of one or two vibrio species. The coherence tested by multiplex PCR and API 20E methods was 93.75%. The results showed that the multiplex PCR could be used not only to diagnose the clinically diseased large yellow croaker, but also to recognize the carrier. What is more, there are vibrios pathogenic to cultured large yellow croaker in the aquatic environment. It can be concluded that the multiplex PCR is specific and sensitive. It is a reliable tool for identification of the major Vibrios pathogenic with less time and cost, and it can be used in quick diagnose and epidemiology investigation of vibriosis of cultured large yellow croaker. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (2): 156–164]

Key words: large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*); collagenase gene; *ToxR* gene; multiplex PCR

Corresponding author: WANG Guo-liang. Tel: 0574-87600922; E-mail: wanggl@nbip.net