

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17001

鲁氏耶尔森菌 qPCR 快速检测方法的建立和应用

张泉^{1,2}, 李绍戊¹, 王荻¹, 曹永生¹, 卢彤岩¹

1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081

摘要: 鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)是导致虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肠炎红嘴病的病原。本研究以鲁氏耶尔森菌毒力因子 *rupA* 基因为靶标设计 1 对特异性引物, 以含有 *rupA* 基因部分序列的重组质粒为标准品构建标准曲线, 优化建立检测鲁氏耶尔森菌的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法, 并对腹腔注射鲁氏耶尔森菌菌悬液的虹鳟肝、肾、脾、血液样品进行检测。结果显示, 设计的引物具有良好的种间特异性, 标准曲线线性方程为 $y = -3.3766x + 40.012 (R^2 = 0.9958)$; 最低检测限为 57 copy/μL, 较常规 PCR 的灵敏度高出约 100 倍。应用检测结果表明, 本方法可准确检测被鲁氏耶尔森菌感染的虹鳟样品。研究表明, 所建立的 qPCR 方法具有特异、灵敏、快速、定量的优点, 可用于快速诊断虹鳟肠炎红嘴病早期病症及定量检测鲁氏耶尔森菌。

关键词: 鲁氏耶尔森菌; *rupA* 基因; 实时荧光定量 PCR; 肠炎红嘴病; 鲑科; 虹鳟

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1254-07

鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)是革兰氏阴性肠杆菌, 最初分离自美国爱达荷州哈格曼山谷的患病虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[1], 目前在北美、南美洲、欧洲、澳大利亚、南非、中东和中国等地都有报道^[2-3]。鲁氏耶尔森菌可感染多种鱼类, 鲑科鱼类影响特别明显, 是造成鲑科鱼类肠炎红嘴病(enteric redmouth diseases, ERM)的主要病原菌^[1-2, 4]。被感染的鱼可以观察到异常的行为变化, 包括在水面附近游动、食欲不振和异常游动(如竖游、旋游、倒游等); 患病鱼还表现出其他体征如: 眼球突出、皮肤变黑、口腔和咽喉及其周围皮下出血、肛门红肿有异物流出等。鲁氏耶尔森菌感染初期出现患病典型症状的鱼较少, 感染后短时间内疾病大规模暴发^[2, 5-6], 死亡严重。

鲁氏耶尔森菌传统检测方法需经细菌分离纯化、革兰氏染色、形态学观察、生理生化指标测定和血清鉴定等一系列实验实验, 耗时长且效率低。随着分子生物学技术的发展, 新的细菌快速

检测方法已广泛应用到病原微生物的鉴定, 包括 RFLP^[7-8]、ELISA 快速检测法^[9-10]、16S rRNA 检测法^[7, 11]、LAMP 检测方法^[12]、RAPD 方法^[13]、TaqMan 探针法^[14-15]等。但上述方法均存在操作复杂、实验条件要求严苛、易出现假阳性等问题, 在实际应用中难以推广。对病原菌进行准确快速鉴定, 可以起到预防和及时发现病情的目的。因此, 建立快速的定性、定量检测方法对由鲁氏耶尔森菌感染引发肠炎红嘴病的防控和早期诊断具有重要的现实意义。本实验以鲁氏耶尔森菌毒力因子 *rupA* 基因^[16]为靶基因, 建立目标菌的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法, 为鲁氏耶尔森菌引起的虹鳟肠炎红嘴病的早期、快速诊断及定量检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

非免疫、健康供试虹鳟, 体重(12±1) g, 购自

收稿日期: 2017-01-09; 修订日期: 2017-03-03.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目(HSY201503); 新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(2016E02052).

作者简介: 张泉(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物医学. E-mail: zhangxiao0904@163.com

通信作者: 卢彤岩, 研究员. E-mail: lutongyan@hotmail.com

辽宁省本溪市某养殖场。

供试菌 9 种(12 株), 其中 4 株为本实验室分离保存株, 其余均购自美国模式培养物集库(American Type Culture Collection, ATCC)及中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC), 菌株信息详见表 1。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒和血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒及质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; thunderbird SYBR® qPCR mix 试剂盒购自日本 TOYOBO 公司; PCR 相关试剂、DH5α 感受态细胞、pMD18T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司; 培养基、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)等常规微生物学试剂购自哈尔滨伊事达生物工程有限责任公司, 核酸测序及引物合成由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 上鲁氏耶尔森菌毒力因子基因 *rupA*(登录号: AY576529.1)序列, 经 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异性引物(YRI-F/R), 引物序列: YRI-F 5'-GGCGGTTGGTATTTGAC-3', YRI-R 5'-ACTGACCCAGCAGGATG-3'。

1.2.2 引物特异性检测 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取表 1 中 12 株细菌 DNA, 利用

1.2.1 设计好的引物 YRI-F/R, 以 12 株细菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 同时设立阴性对照。

PCR 反应体系: 2×PCR premix 10 μL, 10 μmol/L 的引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 超纯水补足至 20 μL; PCR 反应条件为 95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 53℃退火 20 s, 72℃延伸 5 s, 共 35 个循环; 72℃延伸 5 min。PCR 产物取 5 μL 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 经凝胶成像系统成像保存。

1.2.3 制备质粒标准品 以鲁氏耶尔森菌基因组 DNA 为模板, 利用 YRI-F/R 引物扩增 *rupA* 基因目的片段, 将扩增所得 PCR 产物切胶回收纯化后, 与 pMD18-T 载体于 16℃连接 3 h 后转化到 DH5α 感受态细胞中, 涂布在含 100 μg/mL 氨苄青霉素(Amp) LB 固体培养基上, 37℃培养 24 h; 挑取单菌落接种于 10 mL 含 100 μg/mL 氨苄青霉素(Amp) LB 液体培养基, 37℃震荡培养 10~12 h, 使用质粒提取试剂盒提取质粒。通过测序及 PCR 扩增鉴定阳性克隆, 获得重组质粒 pMD18T-*rupA*。用微量紫外可见分光光度计测定质粒浓度和纯度, 并根据摩尔定律计算出单位体积质粒所含的 DNA 拷贝数, 质粒拷贝数计算公式如下:

质粒拷贝数(copy/μL)=[质粒浓度(ng/mL)×质粒体积(μL)×(6.023×10²³)]/[质粒长度(bp)×660(g/mol)]

质粒长度(bp)=载体长度(bp)+片段长度(bp)

表 1 供试菌信息
Tab. 1 Bacterial strains used in this study

菌株名 bacterial strain	拉丁名 scientific name	编号 code	来源 source
鲁氏耶尔森菌	<i>Yersinia ruckeri</i>	BH1206 ^[3]	*
迟缓爱德华氏菌	<i>Edwardsiella tarda</i>	ATCC®15947	ATCC
嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC®7966	ATCC
豚鼠气单胞菌	<i>A. caviae</i>	CCTCC AB98034	CCTCC
温和气单胞菌	<i>A. sobria</i>	CCTCC AB98043	CCTCC
杀鲑气单胞菌无色亚种	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	ATCC®33659	ATCC
杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	ATCC®27013	ATCC
荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RT-PF-01	*
维氏气单胞菌①	<i>A. veronii</i>	ATCC®35624	ATCC
维氏气单胞菌②	<i>A. veronii</i>	VER204	*
柱状黄杆菌	<i>Flavobacterium columnare</i>	G3R19	*
嗜冷黄杆菌	<i>F. psychrophilum</i>	G3R20	*

注: “*”本实验室分离。
Note: “*”means the strain was produced by our laboratory.

1.2.4 荧光定量 PCR 扩增条件优化和引物特异性检测 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 $^{\circ}\text{C}$, 根据预实验结果, 选取最佳退火温度, 以获得最小的 C_t 值和较高的荧光强度增加值。

利用优化过的体系和条件对表 1 中 12 株细菌的 DNA 使用 SYBR Green I real-time PCR 方法进行检测。

1.2.5 标准曲线构建及重复性检测 以构建好的 pMD18T-rupA 重组质粒作为本实验的标准品, 进行 10 倍浓度梯度稀释, 共稀释 9 个梯度, 利用优化过的荧光定量 PCR 反应条件进行荧光定量反应, 建立以质粒拷贝数对数值为 x 轴和以 C_t 值为 y 轴的 qPCR 标准曲线。

标准曲线重复性检测: 选取构建好的 pMD18T-rupA 重组质粒稀释 6 个梯度, 每个梯度设 3 个重复, 比较在同一次实验中 3 个重复间的均一性, 再以相同标准的质粒为模板, 在不同时间段进行 3 次独立重复实验; 通过 C_t 值变异系数(标准偏差/重复值平均数)评价该方法的重复性。

1.2.6 灵敏性检测 各取 $10^1\sim10^8$ copy/ μL 鲁氏耶尔森菌的标准品 1 μL 作为 PCR 模板, 同时进行 qPCR 和常规 PCR 扩增, 常规 PCR 扩增产物使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测并凝胶成像, 计算 2 种方法所能检测出的最低模板浓度, 比较分析出 2 种方法的灵敏性。

1.2.7 qPCR 检测方法的应用 利用菌浓度为 2×10^7 cfu/mL 的鲁氏耶尔森菌悬液 100 μL /尾人工腹腔注射健康虹鳟, 分别于攻毒后 12 h、24 h 和 36 h 采集供试鱼血液、肾、肝和脾组织, 提取样品基因组 DNA, 进行 qPCR 检测。同时, 取感染鱼各组织进行常规细菌分离、培养和纯化, 并鉴定其理化特性和测定 16S rRNA 基因序列。

2 结果与分析

2.1 引物特异性及通用性检测

普通 PCR 检测结果表明, YRI-F/R 引物有很好的特异性, 可以特异性扩增鲁氏耶尔森菌 192 bp

的 rupA 基因目的片段, 而供试的其他 11 株病原菌均无阳性扩增(图 1)。

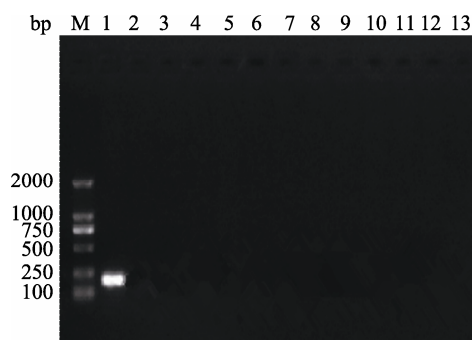


图 1 引物特异性检测结果

M: 分子量标准 DL2000; 1: 鲁氏耶尔森菌; 2: 迟缓爱德华氏菌; 3: 嗜水气单胞菌; 4: 豚鼠气单胞菌; 5: 温和气单胞菌; 6: 杀鲑气单胞菌无色亚种; 7: 杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种; 8: 荧光假单胞菌; 9: 维氏气单胞菌①; 10: 维氏气单胞菌②; 11: 柱状黄杆菌; 12: 嗜冷黄杆菌; 13: 阴性对照。

Fig. 1 Detection of primers specificity

Note: M: molecular weight marker DL2000; 1: *Y. ruckeri*; 2: *E. tarda*; 3: *A. hydrophila*; 4: *A. caviae*; 5: *A. sobria*; 6: *A. salmonicida* subsp. *Achromogenes*; 7: *A. salmonicida* subsp. *Masoucida*; 8: *P. fluorescens*; 9: *A. veronii*①; 10: *A. veronii*②; 11: *F. columnare*; 12: *F. psychrophilum*; 13: negative control.

2.2 标准品的制作

重组质粒 pMD18T-rupA 经紫外分光光度计测定, 浓度为 78.92 ng/ μL , 经质粒拷贝数计算公式换算为 5.7×10^{10} copy/ μL , 以此作为定量标准品。

2.3 qPCR 条件优化

经实验优化, 确定荧光定量 PCR 反应体系为 thunderbird SYBR qPCR mix 10 μL , 50 $\times$ ROX 0.5 μL , YRI-F/R(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 模板 1 μL , 补充超纯水至 20 μL 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 共 40 个循环。

2.4 标准曲线的构建及重复性

利用优化的反应体系, 对 9 个 10 倍梯度稀释的定量标准品($5.7\times10^0\sim5.7\times10^8$ copy/ μL)进行检测, 建立质粒拷贝数对数值与 C_t 值对应关系的定量标准曲线。由图 2 标准曲线可知, 所得标准曲线在 $5.7\times10^1\sim5.7\times10^8$ 拷贝数对数之间 C_t 值线性良好。本实验所得标准曲线方程为 $y=-3.3766x+40.012$, $R^2=0.9958$ 。

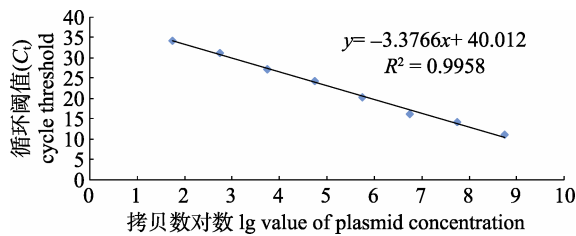


图 2 用 pMD18T-rupA 构建的 qPCR 标准曲线
Fig. 2 Standard curve of qPCR developed by using the plasmid of pMD18T-rupA

2.5 qPCR 稳定性分析

选取 $5.7 \times 10^2 \sim 5.7 \times 10^7$ copy/ μL 的 7 个浓度梯度进行组内重复性分析, 每个浓度梯度设 3 个重复; 计算 C_t 平均值、方差与变异系数(表 2)。结果表明标准品 3 个重复的 C_t 基本一致, 标准差(SD)在 0.058~0.883, 变异系数(CV)在 0.410%~3.364%。实验结果显示, 所建立的 qPCR 检测方法重复性好, 可进行稳定、可靠的检测。

表 2 以 pMD18T-rupA 重组质粒为标准模板的 qPCR 重复实验

Tab. 2 Reproducibility of pMD18T-rupA standard template in qPCR assay

标准品 (/copy· μL^{-1}) standard	标准品 C_t C_t for the following number of standard			标准差 SD	变异系数/% CV
5.7×10^8	11.03	11.12	10.99	0.068	0.620
5.7×10^7	14.22	14.12	14.13	0.058	0.410
5.7×10^6	16.30	16.30	15.95	0.174	1.079
5.7×10^5	20.94	20.14	19.84	0.457	2.260
5.7×10^4	24.95	24.54	23.25	0.883	3.364
5.7×10^3	26.99	27.74	26.67	0.550	2.026
5.7×10^2	31.79	31.00	30.60	0.605	1.942

2.6 荧光定量 PCR 灵敏度检测

由 5.7×10^8 copy/ μL 浓度起始的 9 个 10 倍梯度系数的定量标准重组质粒 pMD18T-rupA 扩增曲线可以看出(图 3), 本方法对重组质粒的最低检测限为 57 copy/ μL 。

由常规 PCR 检测结果可知(图 4), 模板浓度为 5.7×10^3 copy/ μL 以上时可见模糊目的条带, 模板浓度为 5.7×10^2 copy/ μL 时不可见。

2.7 qPCR 检测方法应用结果

攻毒 14 h 后供试虹鳟开始出现鳍条充血及肛门红肿症状, 24 h 开始出现死亡。对感染虹鳟肝、

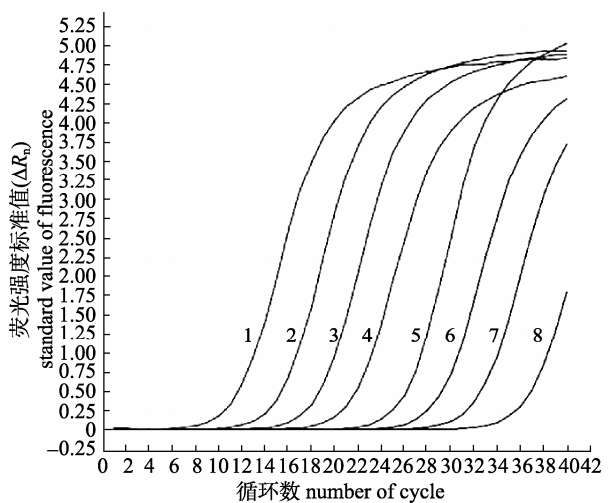


图 3 SYBR Green I qPCR 灵敏度检测结果
1~8: 质粒稀释为: 10^8 copy/ μL 、 10^7 copy/ μL 、 10^6 copy/ μL 、 10^5 copy/ μL 、 10^4 copy/ μL 、 10^3 copy/ μL 、 10^2 copy/ μL 、 10^1 copy/ μL 。
Fig. 3 Sensitivity of SYBR Green I qPCR for detection of *Yersinia ruckeri*

1~8: Plasmid diluted to 10^8 copy/ μL , 10^7 copy/ μL , 10^6 copy/ μL , 10^5 copy/ μL , 10^4 copy/ μL , 10^3 copy/ μL , 10^2 copy/ μL , 10^1 copy/ μL .

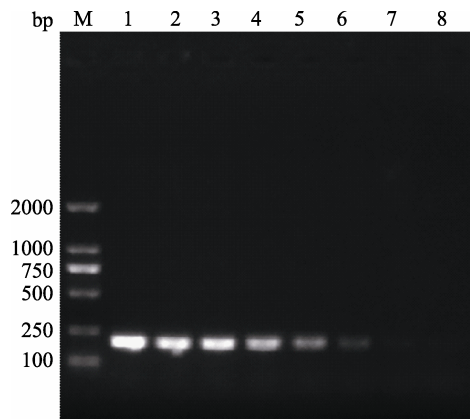


图 4 常规 PCR 灵敏度检测结果
M: 分子量标准 DL2000; 1~8: 质粒稀释为 10^8 copy/ μL 、 10^7 copy/ μL 、 10^6 copy/ μL 、 10^5 copy/ μL 、 10^4 copy/ μL 、 10^3 copy/ μL 、 10^2 copy/ μL 、 10^1 copy/ μL 。
Fig. 4 Sensitivity of conventional PCR
M: molecular weight marker DL2000; 1~8: plasmid diluted to 10^8 copy/ μL , 10^7 copy/ μL , 10^6 copy/ μL , 10^5 copy/ μL , 10^4 copy/ μL , 10^3 copy/ μL , 10^2 copy/ μL , 10^1 copy/ μL .

脾及肾中的致病菌进行分离、培养、纯化, 形态学观察、特异性引物 PCR 结果均表明供试虹鳟感染的致病菌为鲁氏耶尔森菌。为了验证本实验建立方法的实用性, 确定不同时间段死亡虹鳟各组组织中的病原菌浓度, 对人工感染后 12 h、24 h 和

36 h 的虹鳟肝、脾、肾及血液进行 qPCR 检测。结果显示, 3 种组织分离出细菌纯培养后检测结果均呈阳性(图 5)。

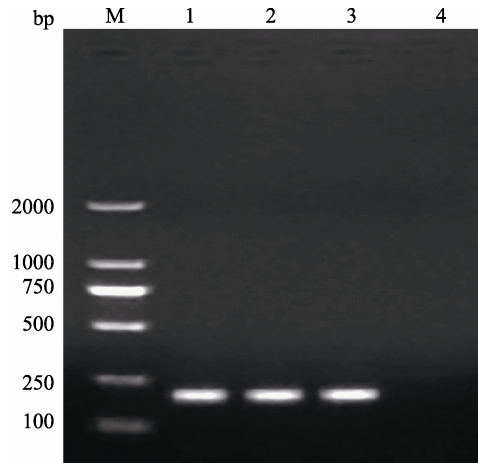


图 5 虹鳟攻毒后 3 个组织分离鲁氏耶尔森菌株的 PCR 检测

M: 分子量标准 DL2000; 1: 肝组织分离细菌; 2: 脾组织分离细菌; 3: 肾组织分离细菌; 4: 阴性对照。

Fig. 5 Detection of *Yersinia ruckeri* challenge strains

M: DNA Marker DL2000; 1: strain isolated of liver; 2: strain isolated of spleen; 3: strain isolated of kidney; 4: negative control.

肝、脾、肾及血液进行荧光定量 PCR 反应得出的基因拷贝数见表 3。

3 讨论

近年来, 欧美等鲑鳟养殖大国不断筛选研发鲁氏耶尔森菌的检测方法。2008 年, Saleh 等^[12]基于鲁氏耶尔森菌的 *yrul/yrur* 基因使用 LAMP 方法检测虹鳟肠炎红嘴病病原菌。2012 年, Bastardo 等^[14]采用 TapMan 方法对虹鳟血液、肝、脾、肾等组织中的鲁氏耶尔森菌进行了快速检测; 同

年, Keeling 等^[15]依据鲁氏耶尔森菌 *glnA* 基因建立了该菌在虹鳟肾组织样品的 TaqMan 探针法 qPCR 检测方法。然而中国对鲁氏耶尔森菌的研究起步较晚, 仅见范方玲等^[17]、李绍戊等^[3]和杨移斌等^[18]在分离鉴定及生物学特性分析等方面的一些相关研究报道。qPCR 具有操作简便、快速高效、高通量、高敏感性、高重复性、高特异性和易定量等优点^[19-21], 常用的方法主要有 TaqMan 探针法和 SYBR Green I 荧光染料法。与 TaqMan 法相比, SYBR Green I 法操作简单, 不需要设计合成昂贵的探针, 可用于相同引物不同基因的检测^[19], 因此本实验基于此建立了鲁氏耶尔森菌 SYBR Green I 法实时荧光检测方法。

本实验参考 GenBank 中已发表的鲁氏耶尔森菌基因序列, 选取保守区 *rupA* 基因^[16]一段序列并对此序列在网上进行 BLAST 未出现与该序列匹配的片段, 表明该基因只存在于鲁氏耶尔森菌种, 具有高特异性。以此为靶基因设计一对引物 YRI-F/R, 并对多种水产生物病原菌的标准株以及多个不同来源的菌株进行常规 PCR 和 qPCR 检测, 结果表明仅有鲁氏耶尔森菌呈现阳性, 且仅鲁氏耶尔森菌在 qPCR 反应有单一的产物吸收峰出现, 对鲁氏耶尔森菌检测结果与常规 PCR 相比皆呈现较好的一致性, 因此该引物适用于鲁氏耶尔森菌检测。实验所建立 *rupA* 基因重组质粒拷贝数对数与 C_t 值所建立的标准曲线, 曲线斜率为 -3.3766 , 相关系数 $R^2=0.9958$, 表示质粒拷贝数对数与 C_t 值之间相关性较高; 对标准品重复实验结果, 标准差(SD)为 $0.058\sim0.883$, 变异系数(CV)小于 3.364% , 进一步验证所建立的检测方

表 3 待检虹鳟样品目的基因拷贝数
Tab. 3 Target gene copies detected in rainbow trout samples

									copy/ μ L
待检样品 sample	人工感染后时间/h				time after artificial infection				
	12				24				36
肝 liver	5.0 $\times$ 10 ³	5.7 $\times$ 10 ²	8.4 $\times$ 10 ³	3.6 $\times$ 10 ⁶	5.1 $\times$ 10 ⁵	2.3 $\times$ 10 ⁸	9.4 $\times$ 10 ⁷	4.4 $\times$ 10 ⁷	1.3 $\times$ 10 ⁸
脾 spleen	4.1 $\times$ 10 ⁵	6.8 $\times$ 10 ³	4.4 $\times$ 10 ⁴	7.9 $\times$ 10 ⁶	1.1 $\times$ 10 ⁷	1.5 $\times$ 10 ⁸	9.2 $\times$ 10 ⁷	1.2 $\times$ 10 ⁸	2.5 $\times$ 10 ⁹
肾 kidney	1.4 $\times$ 10 ⁵	3.6 $\times$ 10 ⁶	1.2 $\times$ 10 ⁶	6.7 $\times$ 10 ⁶	2.3 $\times$ 10 ⁶	1.6 $\times$ 10 ⁸	5.3 $\times$ 10 ⁷	1.6 $\times$ 10 ⁸	2.3 $\times$ 10 ⁸
血液 blood	3.5 $\times$ 10 ⁶	8.7 $\times$ 10 ⁵	6.3 $\times$ 10 ⁵	9.1 $\times$ 10 ⁶	2.5 $\times$ 10 ⁷	N	5.2 $\times$ 10 ⁷	9.8 $\times$ 10 ⁶	N

注: N 表示鱼在取样前已经死亡。
Note: N indicates that the fish was dead before sampling.

法重复性好并且结果可靠稳定。本实验对重组质粒检测灵敏度达 57 copy/ μ L, 较 Saleh 等^[12]使用 LAMP 方法检测研究结果高出约 1 个数量级, 与 Bastardo 等^[14]设计的 TapMan 探针法检测鲁氏耶尔森菌灵敏度相当, 均可在较低浓度下检测出鲁氏耶尔森菌; 与常规 PCR 灵敏度对比, qPCR 检测灵敏度是常规 PCR 的 100 倍。对人工感染的虹鳟组织样品进行检测, 实际应用结果显示该方法可以在生产中具有较好的适用性。相关研究表明鲁氏耶尔森菌存在群体感应系统, 其致病性不但与菌株特性有关外, 还与种群密度相关^[1, 22-23]。因此, 建立鲁氏耶尔森菌快速定量检测技术对于监测和早期诊断鲁氏耶尔森菌引起的虹鳟肠炎红嘴病显得尤为重要。本研究得出荧光定量 C_t 值可换算成核酸拷贝数, 借以监测被感染鱼体内的鲁氏耶尔森菌种群密度, 从而实现了对 ERM 的防控。

本研究建立鲁氏耶尔森菌 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法, 可直接用于肝、肾、脾、血液样品 DNA 测定, 而无需在分子水平确认之前对细菌进行富集培养。实际应用效果显示, 该方法从 DNA 的提取到 qPCR 反应完成约 4 h, 并且可以进行活鱼取血检测, 因此在实际生产中具有较好的适用性。综上, 本检测方法对水产养殖过程中虹鳟肠炎红嘴病的调查和监测具有重要的生产意义。

参考文献:

- [1] Tobback E, Decostere A, Hermans K, et al. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish[J]. J Fish Dis, 2007, 30(5): 257-268.
- [2] Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish[J]. Vet Res, 2015, 46: 103.
- [3] Li S, Wang D, Liu H, et al. Isolation of *Yersinia ruckeri* strain H01 from farm-raised Amur sturgeon *Acipenser schrencki* in China[J]. J Aquat Anim Health, 2013, 25(1): 9-14.
- [4] Romalde J L, Toranzo A E. Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium[J]. FEMS Microbiol Lett, 1993, 112(3): 291-299.
- [5] Ross A J, Rucker R R, Ewing W H. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. Can J Microbiol, 1966, 12(4): 763-770.
- [6] Hunter V A, Knittel M D, Fryer J L. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson[J]. J Fish Dis, 1980, 3(6): 467-472.
- [7] Gibello A, Blanco M M, Moreno M A, et al. Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout[J]. Appl Environ Microb, 1999, 65(1): 346-350.
- [8] Olesen N J. Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterins by ELISA and passive immunization[J]. J Appl Ichthyol, 1991, 7(1): 36-43.
- [9] LeJeune J T, Rurangirwa F R. Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*[J]. J Vet Diagn Invest, 2000, 12(6): 558-561.
- [10] Kubilay A, Timur G. Determination of antibody production by IFAT and ELISA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunized by *Yersinia ruckeri* bacterin[J]. Turk J Vet Anim Sci, 2001, 25(4): 437-445.
- [11] Altinok I, Grizzle J M, Liu Z. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction[J]. Dis Aquat Organ, 2001, 44(1): 29-34.
- [12] Saleh M, Soliman H, El-Matbouli M. Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish[J]. BMC Vet Res, 2008, 4: 31.
- [13] Rossetti L, Giraffa G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases[J]. J Microbiol Methods, 2005, 63(2): 135-144.
- [14] Bastardo A, Ravelo C, Romalde J L. Highly sensitive detection and quantification of the pathogen *Yersinia ruckeri*, in fish tissues by using real-time PCR[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96(2): 511-520.
- [15] Keeling S E, Johnston C, Wallis R, et al. Development and validation of real-time PCR for the detection of *Yersinia ruckeri*[J]. J Fish Dis, 2012, 35(2): 119-125.
- [16] Fernández L, Márquez I, Guijarro J A. Identification of specific in vivo-induced (ivi) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(9): 5199-5207.
- [17] Fan F L, Wang K Y, Geng Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Yersinia ruckeri* in channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2010, 41(6): 862-868. [范方玲, 汪开毓, 耿毅, 等. 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(6): 862-868.]
- [18] Yang Y B, Xia Y T, Zhang W D, et al. Isolation and identification of *Yersinia ruckeri* from *Acipenser baerii* and its an-

- tibiotic sensitivity[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 393–398. [杨移斌, 夏永涛, 郑卫东, 等. 鲟源鲁氏耶尔森氏菌的分离鉴定及药敏特性研究[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(2): 393–398.]
- [19] Liao M J, Zhang Z, Rong X J, et al. Development of a SYBR Green I real-time PCR for detection of *Vibrio harveyi* based on the *vhhP2* gene[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 611–620. [廖梅杰, 张正, 荣小军, 等. 基于 *vhhP2* 基因的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测哈维氏弧菌方法的建立[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(3): 611–620.]
- [20] Purcell M K, Getchell R G, McClure C A, et al. Quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of aquatic animal pathogens in a diagnostic laboratory setting[J]. *J Aquat Anim Health*, 2011, 23(3): 148–161.
- [21] Ren W C, Wang C M, Sun S C, et al. Development and application of a FQ-PCR assay for detection of *Chlamys farreri* acute viral necrobiosis virus[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(4): 564–571. [任伟成, 王崇明, 孙世春, 等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(4): 564–571.]
- [22] Miller M B, Bassler B L. Quorum sensing in bacteria[J]. *Microbiology*, 2001, 55(55): 165–199.
- [23] Coquet L, Cosette P, Junter G A, et al. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties[J]. *Colloid Surface B*, 2002, 26(4): 373–378.

Development and application of a rapid qPCR assay for detecting *Yersinia ruckeri*

ZHANG Xiao^{1,2}, LI Shaowu¹, WANG Di¹, CAO Yongsheng¹, LU Tongyan¹

1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: Enteric redmouth disease (ERM) is an emerging problem in aquaculture all over the world. ERM is caused by the gram-negative bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*, which can infect salmonids and several other fish taxa and cause clinical signs of hemorrhaging on the body surface and in the intestine. Fish suffering from ERM exhibit exophthalmos, darkening skin, subcutaneous hemorrhage of the mouth and throat, perianal swelling with yellow fluid, and other deleterious outcomes up to and including death. When ERM appears in an aquaculture facility, a large number of fish may be affected over a short period of time. Various antibiotics are available for the treatment of ERM and vaccines can also be used in the treatment and prevention of this disease. Several methods such as ultrastructural examination and LAMP have been developed for ERM detection. However, these assays are generally laborious and time-consuming, and are not sufficiently sensitive. To establish a rapid and quantitative method for the detection of *Y. ruckeri*, a pair of specific primers was designed and synthesized based on the virulent gene *rupA*. A recombinant plasmid containing part of the *rupA* gene was used as a standard to construct a standard curve. SYBR Green I real-time quantitative PCR assay was established for the detection of *Y. ruckeri* by optimizing experimental conditions. The established qPCR method was also applied to the detection of *Y. ruckeri* in tissues of artificially-infected rainbow trout. Our results showed that the designed primers had good interspecific specificity. The quantitative linear equation was $y = -3.3766x + 40.012$ ($R^2 = 0.9958$). The detection limit of qPCR method was 57 copies/ μL , which is approximately 100-fold greater than conventional PCR. This qPCR method can accurately detect *Y. ruckeri* in rainbow trout. These results suggest that our qPCR method has the advantages of specificity, sensitivity, rapidity, and quantification, and can be used for rapid diagnosis of early-stage disease and quantitative detection of *Y. ruckeri*.

Key words: *Yersinia ruckeri*; *rupA* gene; real-time quantitative PCR; enteric redmouth diseases; Salmonidae; *Oncorhynchus mykiss*

Corresponding author: LU Tongyan. E-mail: lutongyan@hotmail.com