

文章编号: 1000-0615(2000)04-0345-04

采用通用引物 PCR 配合 SSCP 和 RFLP 技术 检测鱼病病原菌

彭宣宪, 高 华, 王三英, 郑文竹
(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用通用引物 PCR(UPPCR)、PCR-RFLP、PCR-SSCP 技术, 研究快速鉴别鱼病病原菌的分子生物学诊断技术。结果发现, 采用细菌 16S rRNA 基因保守区特异性引物, 以嗜水气单胞菌、鲁克氏耶尔森菌、鳃弧菌、柱状曲挠杆菌、乙型链球菌、荧光假单胞菌等部分常见鱼病病原菌为对象, 可以建立一种 UPPCR 技术。该技术能在保证实验条件不变的基础上, 检出上述所有细菌, 并还可检出大肠杆菌和双歧杆菌等非鱼病病原菌。并且认为, 该法与 SSCP 配合即采用 UPPCR-SSCP 技术能较好地鉴别被检菌而用于鱼病病原菌的快速诊断。

关键词: 鱼病病原菌; 通用引物; 多聚酶联反应; 多聚酶联反应—限制性片段长度多态性分析; 多聚酶联反应—单链构象多态性分析

中图分类号: S94 文献标识码: A

Universal primer PCR with SSCP and RFLP for identification of fish disease pathogens

PENG Xuan-xian, GAO Hua, WANG San-ying, ZHENG Wen-zhu
(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A universal primer PCR(UPPCR), PCR-RFLP and PCR-SSCP had been screened for a molecular biological method that permitted the rapid identification of fish pathogens among them. The results showed that a universal primer PCR technology was available with specific primers from conserved regions of bacterial 16S ribosomal RNA genes. The bacteria tested included some common causative agents of fish diseases such as *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum*, *Flexibacter columnaris*, *beta-Streptococcus*, *Pseudomonas fluorescens*. The approach allowed the bacteria above and *Escherichia coli* and *Bifidobacterium catenulatum* detectable without any alterations of the experiment conditions. However, this study also found that the identification of species of bacteria tested depended on the combination of UPPCR and SSCP (PPCR-SSCP), which was better than that of UPPCR and RFLP(UPPCR-RFLP) and made rapid diagnosis of fish disease pathogens possible.

Key words: fish disease pathogen; universal primer; PCR; PCR-RFLP; PCR-SSCP

鱼病病原菌是严重危害渔业生产的一类主要病原微生物, 必须及时诊断以采取恰当的防治措施, 来控制其引起的相应流行病。随着现代生物学技术的迅速发展, 微生物性鱼病的诊断方法不断更新, 目前已有采用 PCR 技术快速诊断细菌和病毒性鱼病的报道^[1-3]。这些研究都是采用通常的一种病原菌—

收稿日期: 1999-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770585)和 IFS 基金(Immune complexes in fresh fish infected *Flexibacter columnaris*)资助项目(A/2338-2)

作者简介: 彭宣宪(1954—), 男, 江西省安福人, 教授, 博士生导师, 主要从事免疫生物学和分子生物学研究。Tel: 0592-2186392, E-mail: wangpeng@jingxian.xmu.edu.cn

种特异性引物的特定病原体检查的引物特异性 PCR 技术。这种方法虽然可以达到对单一菌的快速、准确和方便的诊断目的,但在病原菌未明时,需要多种不同引物进行实验,这对于鱼病病原菌的复杂性和 PCR 程序的多样性来说显然不够理想。本文研究通用引物 PCR (Universal primer polymerize chain reaction, UPPCR)配合单链构象多态性(SSCP)分析即 UPPCR-SSCP 技术和配合限制性片段长度多态性分析(RFLP)即 UPPCR-RFLP 技术鉴别鱼病病原菌。

1 材料和方法

1.1 菌种

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、鲁克氏耶尔森菌(*Yersinia ruckri*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、柱状曲挠杆菌(*Flexibacter columnaris*)、乳酸双歧杆菌(*Bifidobacterium catenulatum*)、乙型链球菌(*Streptococcus β*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。除大肠杆菌、双歧杆菌和乙型链球菌为本系保存菌种外,其余购自中国科学院武汉水生生物研究所菌种保存站。

1.2 引物

引物设计参考文献[4]进行,由上海 Sangon 公司合成,经鉴定为电泳纯。引物序列:5' - AAACCTCAAAGGAATTGACGG; 5' - GACGGGCGGTGTGTACAA。

1.3 细菌培养和模板制备

细菌培养均采用普通肉汤培养基。培养基成分为 1%蛋白胨、0.2%KH₂PO₄、0.5%NaCl、0.5%牛肉膏, pH 7.2~7.4;置于培养皿中, 121 °C 灭菌 20min。接种后,嗜水气单胞菌、鲁克氏耶尔森菌、鳃弧菌、柱状曲挠杆菌、荧光假单胞菌于 25 °C 摇床培养 18~24h,大肠杆菌、乳酸双歧杆菌、乙型链球菌于 37 °C 静置培养 18~24h。然后分别取 0.5mL 菌液, 3 500 r·min⁻¹ 离心 20min;弃上清,沉淀用蒸馏水洗一遍,加无菌蒸馏水 0.8mL,混匀, 100 °C 水浴 10min;冰浴冷却, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10min,取上清作为模板进行 PCR 检测。

1.4 PCR 扩增

采用 25 μ L 反应体系进行:分别加入 10 倍缓冲液 2.5 μ L、混合 dNTP(各 10mmol·L⁻¹) 0.5 μ L、MgCl₂(25 mmol·L⁻¹)3 μ L、引物(74 μ mol)各 0.085 μ L、0.125 μ L Taq 酶(4u· μ L⁻¹, MBI 产品)、模板 10 μ L,最后以双蒸水补足。PCR 反应程序:94 °C 变性 1min, 51 °C 复性 1min, 70 °C 延伸 2.5min,共循环 40 次。

1.5 RFLP 分析

取限制性内切酶 Hae III 和 Hinc II (Ferments 产品)进行实验。于灭菌 Eppendorf 管中,依次加入 12 μ L 双蒸水、10 倍缓冲液 2 μ L、内切酶 1 μ L、PCR 反应产物 5 μ L,稍离心混合后于 37 °C 水浴 3h,最后进行电泳鉴定。

1.6 SSCP 分析

取 20 μ L PCR 产物,与等量变性缓冲液(95%甲酰胺, 20mmol·L⁻¹ EDTA, 0.05%溴酚兰, 0.05%二甲苯腈 EF)混合; 95 °C 热变性 10min 后,迅速置于冰水浴中,加样于预电泳 1h 的 10%非变性聚丙烯酰胺凝胶(ARC·BIS=29:1)中电泳;电泳条件:1×TBE, 4 °C,电流依次为 3mA 1h、8mA 3.5h。电泳后取下凝胶,将其依次置于 50%甲醇和 10%乙酸、50%甲醇和 7%乙酸、10%戊二醛、0.1%硝酸银各 30min;然后在 3%碳酸钠(含 0.05%甲醛)中显影获得满意效果后,在 2.3mol·L⁻¹柠檬酸液中搅动 10min 以终止反应;最后制成干胶保存^[5,9]。

2 结果

2.1 UPPCR 的扩增结果

以细菌 16S rRNA 区特异性引物, 对 8 种实验菌进行检测。结果表明, 同样的标本处理方法和 PCR 操作程序可同时扩增出不同类型目的菌的目的基因片段。图 1 示扩增产物的 2.5% 琼脂糖电泳结果。

2.2 PCR 产物的 RFLP 分析

取上述 PCR 产物进行酶切分析。结果发现, 内切酶 Hae II 和 Hinf II 均可切开 8 种实验菌的 PCR 产物, 并呈现限制性片段的多态性现象。经计算, 不同菌的片段数目和片段大小均与理论数相符, 但有些细菌的限制性内切酶图谱相同或相似, 相互间不能区分。图 2 示 Hae II 的酶切结果 (Hinf II 的酶切结果照片未提供)。从图 2 可见, 鳃弧菌与荧光假单胞菌, 鲁克氏耶尔森菌与柱状曲挠杆菌分别相同, 后二者还与乳酸双歧杆菌极相似。

2.3 PCR 产物的 SSCP 分析

图 3 示 8 种细菌的 PCR-SSCP 分析结果。从图 3 可见, 不同细菌的 SSCP 图谱明显不同, 极易区别。

3 讨论

迄今为止, PCR 被认为是最敏感、特异和快速的分子生物学诊断技术, 应用广泛, 种类多样^[7]。近年来, 有关学者将其引入水产养殖领域, 对及时诊断和尽早控制微生物性疾 病起到重要作用^[1-3]。通常的 PCR 技术是一种引物特异地针对一种目的核酸片段, 可称为特异性引物 PCR。由于引物是决定 PCR 反应程序的关键因素, 所以不同特异性引物 PCR 很难在同一反应条件下进行。再将病原菌的多样性一并考虑, 则从待检标本中寻找未知病原菌需要预备众多引物、摸索不同条件, 并进行多次 PCR 反应。这使 PCR 技术在检测病原菌的实际应用中受到限制。然而, 从保守区中选择引物, 建立 UPPCR 技术, 可以统一实验条件, 一次多管的 PCR 扩增便可迅速检出有关

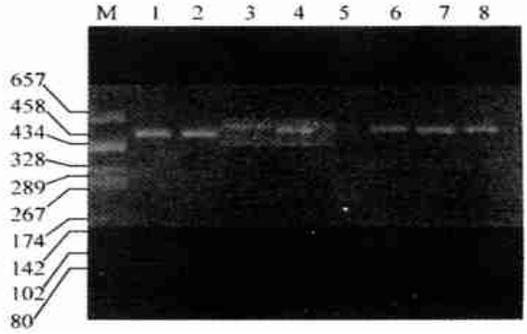


图 1 UPPCR 扩增产物的 2.5% 琼脂糖电泳结果
Fig. 1 Results of PCR amplification with universal primer from bacterial 16s rRNA gene in 3.5% agarose
M: pGEM-7Zf(+)/Hae III markers

- 1. 嗜水性气单胞菌, 2. 大肠杆菌,
- 3. 鲁克氏耶尔森菌, 4. 鳃弧菌, 5. 柱状曲挠杆菌,
- 6. 乳酸双歧杆菌, 7. 乙型链球菌, 8. 荧光假单胞菌

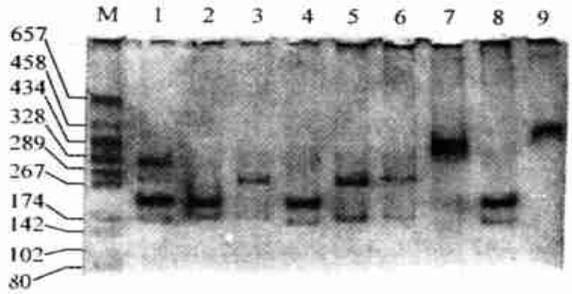


图 2 PCR 产物的限制性酶切图谱
Fig. 2 Restriction diagram and electrophoresis analysis of PCR products
M: pGEM-7Zf(+)/Hae III markers

- 1. 嗜水性气单胞菌 2. 大肠杆菌, 3. 鲁克氏耶尔森菌,
- 4. 鳃弧菌, 5. 柱状曲挠杆菌, 6. 乳酸双歧杆菌,
- 7. 乙型链球菌, 8. 荧光假单胞菌, 9. 嗜水性气单胞菌对照

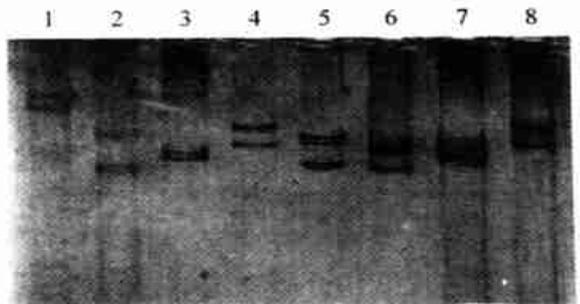


图 3 PCR 产物的 SSCP 分析
Fig. 3 SSCP analysis of PCR products

- 1. 荧光假单胞菌, 2. 乙型链球菌, 3. 乳酸双歧杆菌,
- 4. 柱状曲挠杆菌, 5. 鳃弧菌, 6. 鲁克氏耶尔森菌,
- 7. 大肠杆菌, 8. 嗜水性气单胞菌

细菌, 弥补特异性引物 PCR 技术的不足。

本文从细菌 16S rRNA 保守区中选择引物, 以 8 种病原菌为对象, 成功建立了部分常见鱼病病原菌检测的 UPPCR 技术。在实验中, 我们对 PCR 反应程序和实验条件进行了反复摸索。结果表明, 针对不同细菌的通用引物 PCR 的实验条件除 Mg^{++} 浓度与不同细菌的最佳检出结果有一定关系外, 其余均可达最好效果。并且, 如以较好检测效果为准, Mg^{++} 浓度也可通用。本文 Mg^{++} 浓度为 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 所有细菌的检测均可达到较理想效果。

目前, 从细菌 16S rRNA 基因中设计引物进行 UPPCR 扩增, 虽无用于鱼病病原菌诊断的研究, 但已有用于临床分离菌株检测^[8,9] 和微生物归属确定^[4] 的报道。研究表明, 必须对扩增产物进一步分析, 才有可能确定病原体种类。

本文在对 6 种常见鱼病病原菌检测的同时, 加入 2 种非鱼病病原菌, 结果均为阳性, 亦说明 UPPCR 的产物必须进一步分析才有意义。因此, 本研究拟建立被检细菌的 RFLP 或 SSCP 图谱。建立 RFLP 图谱必须得知目的核酸片段的碱基排列和选择可供鉴别的内切酶。事实上, 要达到这一目的并非易事。特别是因要考虑到通用的目的, 所以最好仅选择一种可以切开所有目的核酸并且所得片段相互不同的内切酶。我们经过反复筛选, 用 Hae II 和 Hinc II 进行实验, 结果有些细菌之间的图谱相同或相似, 无法鉴别。本实验对象仅为 8 种细菌, 如果从实际出发考虑, 细菌种类会大大增加, 更难选择出适当的内切酶。而建立 SSCP 图谱则相对较易。理论上, SSCP 分析可以鉴别相差一个碱基的核酸片段。我们的实验结果亦发现, 每种细菌的 SSCP 图谱具有明显特征, 可资区别。并且, SSCP 操作简单、快捷经济, 在相同条件下操作的重复性好^[5]。因此, 在制备标准 SSCP 分析图谱的基础上, 通用引物 PCR 与 SSCP 分析技术并用, 即采用 UPPCR-SSCP 技术可以达到快速确诊病原菌的目的。

参考文献:

- [1] Marchesi J R, Sato T, Weightman A J, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(2): 795-799.
- [2] Nakajima K, Inouye K, Sorimachi M. Viral diseases in cultured marine fish in Japan[J]. Fish Path, 1998, 33(4): 181-188.
- [3] Rhodes L D, Nilson W B, Strom M S. Sensitive detection of *Renibacterium salmoninarum* in whole fry, blood, and other tissues of Pacific salmon by reverse transcription polymerase chain reaction[J]. Mol Marine Bio Biotech, 1999, 7(4): 270-279.
- [4] Angert E R, Clements K D, Pace N R. The largest bacterium[J]. Nature, 1993, 362(18): 239-241.
- [5] 彭宣宪, 路丽明, 王三英, 等. HBVDNA/Ig-TCIC 中 HBV 基因变异的 PCR-SSCP 分析[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1998, 94-98.
- [6] Cairns M J, Murry V. Rapid silver staining and recovery of PCR production separated on polyacrylamide gels[J]. Biotech, 1994, 17: 209-214.
- [7] 周裕琳, 彭宣宪, 王三英, 等. 检测 HBVDNA/Ig 双特异性免疫复合物的免疫捕捉法 PCR[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(2): 71-75.
- [8] Greisen K, Loeffelholz M, Paurohit A, et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(2): 335-351.
- [9] McCabe K M, Khan G, Zhang Y H, et al. Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequences: Automated analysis and potential for molecular triage of sepsis[J]. Pediatrics, 1995, 95(2): 165-169.