

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)三重 PCR 快速检测方法的建立与应用*

黄锦炉¹ 汪开毓^{1,2} 肖丹³ 刘贝贝¹ 王均¹
黄凌远¹ 付希¹ 王浩丞¹

(1. 四川农业大学鱼病研究中心 雅安 625014; 2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 雅安 625014;
3. 通威股份有限公司 成都 610041)

提要 参照 GenBank 发表的无乳链球菌 *sip*、*cpsE* 这两个高度保守基因设计两组特异性引物, 应用已报道的无乳链球菌 *cpsL* 基因高度保守序列的引物作为阳性对照引物, 经反应条件和反应体系参数优化, 建立一种检测无乳链球菌的三重 PCR 方法, 并应用本三重 PCR 方法检测 40 尾人工感染罗非鱼样本和 22 尾临床上收集的疑似无乳链球菌感染鱼样本。结果表明, 所建立的三重 PCR 方法具有良好特异性, 检测无乳链球菌 DNA 样本时出现三条扩增条带, 检测其他 7 种供试菌株 DNA 则不出现任何扩增条带, 对无乳链球菌 DNA 样本的最低检测浓度为 0.32ng/μl, 最适 Mg²⁺浓度为 37.5mmol/L, 整个检测过程耗时 100min 左右。40 尾人工感染罗非鱼的肝脏、肾脏组织 DNA 样本阳性检出率分别为 100%, 22 尾疑似无乳链球菌感染鱼的肝脏、肾脏组织 DNA 样本阳性检出率分别为 72.7%, 以上两批样本检测结果与常规细菌鉴定方法结果一致。

关键词 无乳链球菌, 三重 PCR, 检测方法

中图分类号 Q7

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*), 也称 B 组链球菌(group B streptococci, GBS), 是一种重要的人、畜、鱼共患的病原菌(Schuchat, 1998; Trigo *et al.*, 2008; 张新艳等, 2008; 祝璟琳等, 2010)。该菌在全世界范围内均有分布, 可感染包括虹鳟、海鲷、罗非鱼、黄鲮鱼、鲮鱼、石首鱼、鲱鱼、鲻鱼和银鲳在内的多种淡水鱼类和海水鱼类, 其发病率和死亡率高, 全球每年因此造成的经济损失十分严重(Amal *et al.*, 2011)。在无乳链球菌的诊断方法中, 常规细菌分离鉴定方法(祝璟琳等, 2010)检测周期长, 达不到对感染鱼样本快速诊断的要求; 靶向于菌体基因组的核酸杂交技术(Rosa *et al.*, 1995; Yancey *et al.*, 1993), 受操作复杂和成本昂贵等因素的制约, 也很难用于生产上对疑似感染鱼样本的诊断; 靶向于某些编码基因

的 PCR 诊断方法(Mawn *et al.*, 1993; Ahmet *et al.*, 1999), 也仅局限于对某些特定类型菌株的检测, 而对其他血清型菌株或溶血型菌株的检测则极易产生假阴性结果。生产上, 无乳链球菌也极易与其它链球菌属成员菌产生诊断混淆。因此, 建立一种适用于生产上快速、准确地检测无乳链球菌, 且具有良好特异性和敏感性的检测方法是十分必要的。

多重 PCR 是指在一个反应体系中加入多对引物, 扩增同一模板或不同模板的特定区域, 因具有高效、快捷、特异、敏感和低成本等优点而得到广泛的应用(黄银花等, 2003), 在传染病领域中包括对病毒、细菌、真菌以及寄生虫等病原的应用性诊断方面已取得了很大进展(Elnifro *et al.*, 2000)。有研究表明, 无乳链球菌编码表面免疫原性蛋白(Surface Immunogenic

* 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目, IRT0848 号; 通威股份有限公司重点资助项目, 2006—2009。黄锦炉, 博士, E-mail: hgl25@163.com

通讯作者: 汪开毓, 教授, 博导, E-mail: kywang@sicau.edu.cn

收稿日期: 2011-07-12, 收修改稿日期: 2011-09-16

Protein)的 *sip* 基因(Rioux *et al*, 2001)和编码半乳糖基转移酶(Galactosyltransferase)的 *cpsE* 基因(Chaffin *et al*, 2005; 汪开毓等, 2011)在各个血清型菌株中都高度保守, 而编码多糖生物合成蛋白(Polysaccharide Biosynthesis Protein)的 *cpsL* 基因(Imperi *et al*, 2010) 603—1290bp 区间序列在各个血清型菌株中也高度保守, 理论上, 以上三个基因已达到作为无乳链球菌 PCR 检测方法的靶基因要求, 然而目前并未见任何关于这三个基因在无乳链球菌 PCR 检测方法的应用报道。本研究中, 作者根据无乳链球菌 *sip*、*cpsE* 和 *cpsL* 基因设计三对特异性引物, 通过引物组合建立一种三重 PCR 快速检测方法, 旨在为水产养殖业上快速、准确地检测无乳链球菌提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)海南分离株、无乳链球菌标准菌株(ATCC51487)、海豚链球菌(*S. iniae*)标准菌株(ATCC29178)、鲷爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)、嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、鲁氏耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)、温和气单胞菌(*A. sobria*)由本实验室保存、提供。

1.2 主要试剂

MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver.2.0(TaKaRa, DV810A); DNA Marker、PCRMix、Goldgreen(北京天根生物技术有限公司); 琼脂糖(Sigma)。

1.3 引物设计与合成

Imperi 等(2010)发现 *cpsL* 部分核酸序列在 *S. agalactiae* 十种血清型基因组中都高度保存, 作者选择该引物为无乳链球菌阳性对照引物。同时, 经过比较分析, 发现不同血清型的 *S. agalactiae* 基因组中 *sip* 基因和 *cpsE* 基因高度保守, 于是选择 *sip* 基因(登录

号为 DQ650634)和 *cpsE* 基因(登录号为 AB017355)为模板分别进行引物设计。引物序列信息详见表 1。

1.4 菌株 DNA 的提取

从低温保存菌种中挑取无乳链球菌分离株、无乳链球菌标准株、海豚链球菌标准株、鲷爱德华氏菌、嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、嗜麦芽寡养单胞菌、鲁氏耶尔森氏菌、温和气单胞菌、荧光假单胞菌接种于脑心浸液琼脂培养基上, 30℃ 恒温培养 24h。分别收集培养菌菌体, 参照细菌 DNA 抽提试剂盒(TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver.2.0)操作说明提取各种细菌的 DNA。

1.5 PCR 扩增和序列鉴定

对无乳链球菌 *cpsE*、*cpsL* 和 *sip* 基因进行 PCR 扩增。反应体系组成如下: Master Mix 12.5μl, 上、下游引物(10mmol/L)各 0.5μl, 无乳链球菌 DNA(10ng/μl) 1μl, 补充 ddH₂O 至 25μl; 反应条件如下: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30sec, 55℃ 退火 35sec, 72℃ 延伸 1min, 72℃ 再延伸 10min, 反应循环次数 30 个。PCR 扩增结束后, 取 5μl 反应产物, 在恒压 100V 条件下, 1%的琼脂糖凝胶电泳 30min 检测结果。同时将 PCR 阳性扩增产物送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.6 引物组合和温度条件优化

参照引物合成说明, 分别将 *cpsE* 引物稀释至 10μmol/L、将 *cpsL* 引物稀释至 2μmol/L、*sip* 引物已稀释至 2μmol/L。由于 PCR 反应时, 扩增基因片段的上、下游引物在反应体系中是等浓度等体积添加的。据此, 分别从浓度为 2μmol/L 的 *cpsE* 上、下游引物溶液取(0.6μl、0.6μl)、(0.3μl、0.3μl)、(0.1μl、0.1μl), 依次命名为 A₁、A₂、A₃; 分别从浓度为 2μmol/L 的 *cpsL* 上、下游引物溶液取(0.8μl、0.8μl)、(0.4μl、0.4μl)、(0.2μl、0.2μl), 依次命名为 B₁、B₂、B₃; 分别从浓度为 2μmol/L 的 *sip* 上、下游引物溶液取(0.8μl、0.8μl)、(0.4μl、0.4μl)、(0.2μl、0.2μl), 依次命名为 C₁、C₂、C₃。通过 A_xB_yC_z (x = 1, 2, 3; y = 1, 2, 3; z = 1, 2, 3) 进行组合, 详见表 2。

表 1 三组引物的信息

Tab.1 The information of the three primers

引物名称	引物序列(5'—3')	扩增片段长度(bp)	位置(bp)
<i>cpsE</i> 上游引物	ATGAAAATTTGTCTGGTTGG	450	1—20
<i>cpsE</i> 下游引物	TTAAAAAATTCCTCCTAAATT		429—450
<i>cpsL</i> 上游引物	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT	688	603—627
<i>cpsL</i> 下游引物	TAGGAACATGTTTCATTAACATAGC		1267—1290
<i>sip</i> 上游引物	ATGGAAATGAATAAAAAGGTAC	1302	1—22
<i>sip</i> 下游引物	TTAGTTAAAGGATACGTGAACGTGG		1277—1302

表 2 三对引物组合表
Tab.2 The combinative table of the three primers

2 μ mol/L 的 <i>cpsE</i> (μ l)	2 μ mol/L 的 <i>cpsL</i> (μ l)			10 μ mol/L 的 <i>sip</i> (μ l)
	B ₁ : (0.8, 0.8)	B ₂ : (0.4, 0.4)	B ₃ : (0.2, 0.2)	
A ₁ : (0.6, 0.6)	A ₁ B ₁ C ₁	A ₁ B ₂ C ₁	A ₁ B ₃ C ₁	C ₁ : (0.8, 0.8)
	A ₁ B ₁ C ₂	A ₁ B ₂ C ₂	A ₁ B ₃ C ₂	C ₂ : (0.4, 0.4)
	A ₁ B ₁ C ₃	A ₁ B ₂ C ₃	A ₁ B ₃ C ₃	C ₃ : (0.2, 0.2)
A ₂ : (0.3, 0.3)	A ₂ B ₁ C ₁	A ₂ B ₂ C ₁	A ₂ B ₃ C ₁	C ₁ : (0.8, 0.8)
	A ₂ B ₁ C ₂	A ₂ B ₂ C ₂	A ₂ B ₃ C ₂	C ₂ : (0.4, 0.4)
	A ₂ B ₁ C ₃	A ₂ B ₂ C ₃	A ₂ B ₃ C ₃	C ₃ : (0.2, 0.2)
A ₃ : (0.1, 0.1)	A ₃ B ₁ C ₁	A ₃ B ₂ C ₁	A ₃ B ₃ C ₁	C ₁ : (0.8, 0.8)
	A ₃ B ₁ C ₂	A ₃ B ₂ C ₂	A ₃ B ₃ C ₂	C ₂ : (0.4, 0.4)
	A ₃ B ₁ C ₃	A ₃ B ₂ C ₃	A ₃ B ₃ C ₃	C ₃ : (0.2, 0.2)

将表 2 中设置的每一个引物组合分别在退火温度为 49℃、51℃、53℃、55℃、57℃、59℃ 时进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 25 μ l, 其试剂组成见表 3。PCR 完成后, 取每一个引物组合在不同退火温度条件下的扩增产物 5 μ l, 与 1 μ l 6 \times Loading Buffer 充分混匀后, 在恒压 100V 条件下, 1%的琼脂糖凝胶电泳 30min 检测结果。如果 *cpsE*、*cpsL* 和 *sip* 三个目的条带同时出现, 且无非特异性条带出现, 这种结果对应的引物组合和退火温度为最佳条件。并以此最佳条件建立无乳链球菌三重 PCR 检测方法。

表 3 反应体系试剂组成
Tab.3 The content of the reagent in the reaction system

试剂	体积(μ l)	说明
10 \times Buffer	2.5	
25mmol/L MgCl ₂	1.5	
dNTP	1.0	各 2.5mmol/L
模板 DNA	1.0	
5U/ μ l <i>Taq</i> 酶	0.5	
引物组合 A _x B _y C _z	对应表 4 添加	$x = 1, 2, 3; y = 1, 2, 3; z = 1, 2, 3$
ddH ₂ O	补至 25	

1.7 特异性试验

分别以无乳链球菌海南分离株、无乳链球菌标准菌株(ATCC51487)、海豚链球菌标准菌株(ATCC29178)、鲍爱德华氏菌、嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、嗜麦芽寡养单胞菌、鲁氏耶尔森氏菌、温和气单胞菌的基因组 DNA 为模板, 根据 1.6 筛选出来的最佳条件, 按表 3 反应体系试剂组成加样后进行 PCR 扩增, 然后在恒压 100V 条件下, 1%的琼脂糖凝胶电泳 30min 检测结果。其中, 以无乳链球菌标准菌株(ATCC51487) DNA 模板扩增结果为阳性对照, 以无菌超纯水代替 DNA 模板的扩增结果为阴性对照。

1.8 敏感性试验

利用 SmartSpec plus 核酸蛋白测定仪, 对所提取的无乳链球菌标准菌株(ATCC51487)基因组 DNA 浓度进行浓度测定, 并将无乳链球菌 DNA 溶液稀释至 80ng/ μ l, 作为 DNA 溶液的母液, 然后按照 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 进行倍比稀释后分别为模板 DNA 浓度, 参照步骤 1.7 进行 PCR 扩增, 最终确定三重 PCR 检测方法在检测无乳链球菌样本时所需的最低模板 DNA 浓度。

1.9 Mg²⁺浓度优化

在步骤 1.6、1.7、1.8 的优化结果的基础上, 通过改变反应体系中 Mg²⁺的浓度, 以确定反应体系中 Mg²⁺的最适需要量(表 4)。具体操作为: 通过加入不同体积的浓度为 25mmol/L 的 MgCl₂, 即 0 μ l、0.5 μ l、1.0 μ l、1.5 μ l、2.0 μ l、2.5 μ l, 并与最佳引物组合和最低模板 DNA 浓度组成反应体系, 在最佳退火温度条件下进行 PCR 扩增, 根据电泳检测结果, 筛选出反应体系中 Mg²⁺的最佳需要量。

表 4 反应体系试剂组成
Tab.4 The content of the reagent in the reaction system

试剂	体积(μ l)	说明
10 \times Buffer	2.5	
25mmol/L MgCl ₂	V	V = 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 μ l
dNTP	1.0	各 2.5mmol/L
模板 DNA	1.0	最低模板浓度
5U/ μ l <i>Taq</i> 酶	0.5	
最优引物组合 A _x B _y C _z	对应表 4 添加	$x = 1, 2, 3; y = 1, 2, 3; z = 1, 2, 3$
ddH ₂ O	补至 25	

1.10 重复性试验

对 5 株已鉴定为无乳链球菌的菌株进行菌株基

因组 DNA 提取(提取方法同步骤 1.4), 用于检验所建立的无乳链球菌三重 PCR 检测方法是否具有可重复性。每个阳性 DNA 样本重复检测 3 次, 每次检测都以标准菌株 ATCC51487 的 DNA 样本作为模板 DNA 设置为阳性对照。

1.11 应用

应用所建立的三重 PCR 检测方法, 对 40 尾人工感染无乳链球菌的罗非鱼肝脏和肾脏组织以及 22 尾疑似无乳链球菌感染鱼的肝脏和肾脏样本进行检测, 同时应用常规细菌分离鉴定方法对每一份检测样本进行检测, 最后对这两种方法的检测结果进行比较。检测样本组织总 DNA 抽提参照 Takara Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 说明书进行。

2 结果

2.1 三对特异性引物的扩增结果

三对引物都能单独扩增出一条特异性条带(图 1A)。

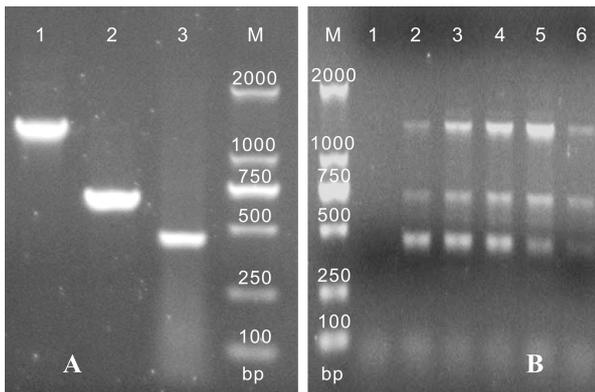


图 1 单一引物 PCR 扩增结果以及引物组合 $A_2B_2C_1$ 的温度优化结果

Fig.1 The amplification with the single primer, and the primers compose $A_2B_2C_1$ in different temperatures

A. 单一引物 PCR 扩增结果, 1、2、3 分别表示 *sip*、*cpsL* 和 *cpsE* 基因的扩增片段。B. 引物组合 $A_2B_2C_1$ 的温度优化结果, 1: 49°C; 2: 51°C; 3: 53°C; 4: 55°C; 5: 57°C; 6: 59°C。M: DL2000 Marker

泳道 1 的扩增条带位于 1000—2000bp 之间, 与 *sip* 基因长度的实验预期相符; 泳道 2 的扩增条带位于 500—750bp 之间, 与 *cpsL* 基因长度的实验预期相符; 泳道 3 为的扩增条带位于 250—500bp 之间, 与 *cpsE* 基因长度的实验预期相符。三对引物的扩增产物测序结果表明, *sip*、*cpsL*、*cpsE* 的扩增产物的核酸序列与无乳链球菌 *sip*、*cpsL*、*cpsE* 基因的同源性分别达到 100%、100%、100%。

2.2 引物组合和温度条件优化

由 *cpsE*、*cpsL*、*sip* 三对引物组成的 $A_xB_yC_z$ 组合共 27 组, 所有引物组合的 PCR 扩增结果表明, 只有引物组合 $A_2B_2C_1$ 在 PCR 扩增时能获得良好的结果(图 1B), 即当 *cpsE* 引物(2 μ mol/L)、*cpsL* 引物(2 μ mol/L)和 *sip* 引物(10 μ mol/L)分别对应浓度为(0.3 μ l、0.3 μ l)、(0.4 μ l、0.4 μ l)和(0.8 μ l、0.8 μ l)时, 在退火温度 53°C、55°C、57°C 条件下, 无乳链球菌 DNA 均能同时扩增出三条条带, 且条带之间也没有出现非特异性杂带。而其他引物组合的扩增结果都不理想, 有的是同一泳道中三条目的条带粗细不均匀, 或是部分目的条带不能被扩增出来, 亦或是所有目的条带都很不明显等等。综合以上结果, 初步建立三重 PCR 检测方法, 以 2 μ mol/L 的 *cpsE* (0.3 μ l、0.3 μ l) + 2 μ mol/L 的 *cpsL* (0.4 μ l、0.4 μ l) + 10 μ mol/L 的 *sip* (0.8 μ l、0.8 μ l) 为最佳引物组合, 以 55°C 为退火温度。

2.3 特异性检测

无乳链球菌海南分离株 DNA 扩增结果(如泳道 9)和无乳链球菌标准菌株(ATCC51487)DNA 扩增结果(如泳道 10)一致, 三条目的基因条带都能同时被扩增出来, 而分别以海豚链球菌标准菌株(ATCC29178)、鲍爱德华氏菌、嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、嗜麦芽寡养单胞菌、鲁氏耶尔森氏菌、温和气单胞菌的 DNA 作模板的则不能扩增出任何条带, 结果与阴性对照一致(图 2A)。

2.4 敏感性检测

分别以无乳链球菌 DNA 五个稀释浓度为模板的

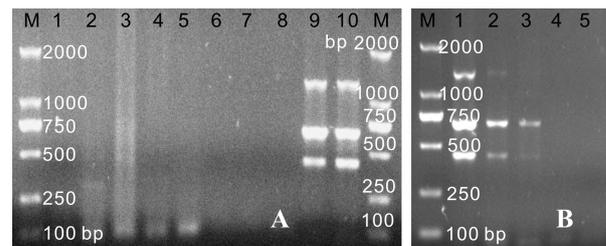


图 2 三重 PCR 方法的特异性检测结果以及无乳链球菌 DNA 模板的敏感性检测结果

Fig.2 The specificity result of triple PCR assay, and the sensitivity result of the *S. agalactiae* DNA template

A. 三重 PCR 方法的特异性检测结果, 1: 海豚链球菌标准菌株(ATCC29178); 2: 鲍爱德华氏菌; 3: 嗜水气单胞菌; 4: 维氏气单胞菌; 5: 嗜麦芽寡养单胞菌; 6: 鲁氏耶尔森氏菌; 7: 温和气单胞菌; 8: 阴性对照; 9: 无乳链球菌海南分离株; 10: 无乳链球菌标准菌株(ATCC51487)。B. 无乳链球菌 DNA 模板的敏感性检测结果, 1: DNA 浓度 10^{-1} ng/ μ l; 2: DNA 浓度 10^{-2} ng/ μ l; 3: DNA 浓度 10^{-3} ng/ μ l; 4: DNA 浓度 10^{-4} ng/ μ l; 5: DNA 浓度 10^{-5} ng/ μ l。M: DL2000 Marker

PCR 扩增结果表明, 当模板 DNA 浓度为 $80 \times 10^{-1} \text{ng}/\mu\text{l}$ 时, 扩增结果同时出现三条扩增条带(泳道 1); 当模板 DNA 浓度为 $80 \times 10^{-2} \text{ng}/\mu\text{l}$ 时, 扩增结果同时出现三条扩增条带, 但 *sip*、*cpsE* 基因扩增条带明显弱化; 当模板 DNA 浓度为 $80 \times 10^{-3} \text{ng}/\mu\text{l}$ 时, *sip*、*cpsE* 基因扩增条带严重弱化, *cpsL* 目的基因条带的也明显弱化; 当模板 DNA 浓度为 $80 \times 10^{-4} \text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $80 \times 10^{-5} \text{ng}/\mu\text{l}$ 时, 电泳结果中则完全检测不到 *sip*、*cpsL*、*cpsE* 基因条带。见图 2B。

2.5 Mg^{2+} 浓度优化

当引物组合为 $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_1$ 、无乳链球菌 DNA 溶液浓度为 $8 \text{ng}/\mu\text{l}$ 时, 含不同 Mg^{2+} 浓度的反应体系的扩增结果存在较大差异。当 Mg^{2+} 浓度为零时, 反应体系不能扩增出任何条带(泳道 1); 当 Mg^{2+} 浓度为 12.5mmol/L 时, 反应体系仅能扩增出 *sip*、*cpsE* 这两条目的条带, 而未能扩增出 *cpsL* 目的条带(泳道 2); 当 Mg^{2+} 浓度为 25mmol/L 、 50mmol/L 、 62.5mmol/L 时, 反应体系均能扩增出三条目的条带, 但扩增结果都存在部分扩增条带弱化的缺点; 当 Mg^{2+} 浓度为 37.5mmol/L 时, 反应体系也能扩增出三条目的条带, 且扩增效果明显优于其他 Mg^{2+} 浓度的扩增效果。由此可知, 当三重 PCR 方法反应体系中 Mg^{2+} 浓度为 37.5mmol/L 时, 可以与最佳引物组合和最低模板 DNA 浓度等组分扩增出良好的结果。见图 3A。

2.6 重复性

在 $25 \mu\text{l}$ 反应体系中, 当引物组合为 $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_1$ 、 Mg^{2+} 浓度为 37.5mmol/L 、 dNTP 各 2.5mmol/L 、*Taq* 酶 $2.5 \text{U}/\mu\text{l}$ 时, 以 5 份阳性 DNA 样本为模板 DNA 均能同时扩增出三条特异性条带(泳道 1—泳道 5), 与标准对照结果的扩增结果相同。三次重复性检测的结果完全一致, 见图 3B。

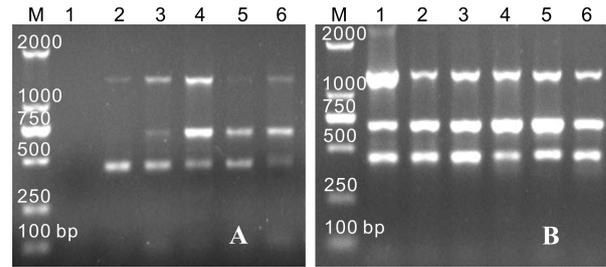


图 3 Mg^{2+} 浓度优化结果以及重复性检测结果

Fig.3 The optimization result of the Mg^{2+} concentration, and the repeatability result of the detection
A. Mg^{2+} 浓度优化结果, 1: 0; 2: 12.5mmol/L ; 3: 25mmol/L ; 4: 37.5mmol/L ; 5: 50mmol/L ; 6: 62.5mmol/L . B. 重复性检测结果, 1—5: 模板 DNA 为无乳链球菌 DNA 样本; 6: 模板 DNA 为标准菌株 DNA 样本。M: DL2000 Marker

2.7 应用

40 尾人工感染无乳链球菌的罗非鱼肝脏和肾脏样本, 三重 PCR 方法的阳性检出率为 100%, 与常规细菌分离鉴定结果相吻合。22 尾疑似感染鱼样本中, 三重 PCR 方法检测结果显示其中 16 尾的肝脏和肾脏无乳链球菌检出结果为阳性, 其余样本检测结果为无乳链球菌阴性, 该结果也与常规细菌分离鉴定结果完全吻合(表 5)。

3 讨论

3.1 三重 PCR 检测方法的应用价值

无乳链球菌是一种重要的人、畜、鱼共患的病原菌。许多学者在无乳链球菌检测方法研究方面取得很大进展, 但由于大多数方法的检测倾向性差异较大而不具有通适性。如曾经用于临床上检测无乳链球菌的革兰氏染色法, 因其敏感性和特异性差而只能成一种辅助检测应用(Hagay *et al*, 1993); 许多通过检测

表 5 样品检测结果

Tab.5 The detection result of the samples

检测样品来源	组织名称	诊断方法	阳性检出数/样本总数	阳性率(%)
人工感染样品	肝脏	常规细菌分离鉴定	40/40	100
		三重 PCR 检测方法	40/40	100
	肾脏	常规细菌分离鉴定	40/40	100
		三重 PCR 检测方法	40/40	100
疑似临床样品	肝脏	常规细菌分离鉴定	16/22	72.7
		三重 PCR 检测方法	16/22	72.7
	肾脏	常规细菌分离鉴定	16/22	72.7
		三重 PCR 检测方法	16/22	72.7

菌株释放特定色素建立的选择性培养基鉴定法,也因某些菌株无色素产生而导致假阴性检测结果(Gil *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1988); 金标准检测技术的出现,为人们在无乳链球菌的特异性诊断方面做了重要贡献(Philipson *et al.*, 1995),但因有效检测时实际需要菌量较多和诊断结果时间长等不足,而不适合于对无乳链球菌早期感染样本的快速检测。随着分子生物学技术在病原检测领域的广泛应用, Greisen 等(1994)首先以 16S rRNA 基因为靶序列进行扩增,再利用特异性寡核苷酸探针检测扩增序列,建立特异检测无乳链球菌的方法,但由于操作繁杂、耗时、检测成本贵等问题而遭淘汰;于是 Ahmet 等(1999)通过条件优化,建立了一种灵敏性更高和特异性更强的 PCR 检测方法,并在人医临床检测应用上取了广泛认同,然而由于该方法只适用于 β -溶血型无乳链球菌的检测,其检测结果可能存在 γ -溶血型无乳链球菌严重漏检的风险。根据本实验室的研究,严重危害海南养殖罗非鱼的无乳链球菌毒株均为 γ -溶血型,若应用上述方法进行病原的诊断,既存在无法对早期感染病例的快速诊断的不足,也有可能因漏检而出现假阴性检测结果。为此,作者参考大量文献资料,最终选定以无乳链球菌 *cpsL*、*sip*、*cpsE* 三个高度保守基因片段为靶向检测对象,建立一种具有良好敏感性和特异性的三重 PCR 检测方法,经过反复试验,证实了所建立的三重 PCR 方法完全适用于鱼源 γ -溶血型无乳链球菌的检测,丰富了鱼源 γ -溶血型无乳链球菌 PCR 检测技术的理论研究。

3.2 特异性和敏感性问题

特异性和敏感性是衡量三重 PCR 检测方法成功与否的关键因素。若检测结果具有良好的特异性,则可最大化避免假阳性检测结果的出现;若检测模板浓度的极限要求越低,则可最大化降低假阴性检测结果的出现。本实验中,基于无乳链球菌基因组设计的 *cpsE*、*cpsL*、*sip* 三对引物,为非嵌套引物,从技术层面上避免了二次扩增时因移行污染导致出现假阳性结果。在单一 PCR 中,*cpsE*、*cpsL*、*sip* 三对引物均能获得特异性扩增,且无非特异性扩增条带出现;在三重 PCR 中,*cpsE*、*cpsL*、*sip* 三对引物可以从无乳链球菌海南分离株和无乳链球菌标准菌株(ATCC51487)模板 DNA 获得特异性扩增,而从包括海豚链球菌标准菌株(ATCC29178)在内的其它 7 种菌株模板 DNA 扩增结果与阴性对照一致,即电泳时没有检测到任何扩增条带,这说明了,本方法在特异性方面已经达

到了区别鉴定无乳链球菌与其它 7 种常见鱼类病原菌的实验要求。另一方面,当 25 μ l 反应体系中模板 DNA 的添加量<8ng 时,即模板 DNA 的浓度<0.032ng/ μ l 时,三重 PCR 的实验结果并不理想,其中 *sip*、*cpsE* 序列的扩增条带开始弱化,而当反应体系中模板 DNA 的浓度 \geq 0.32ng/ μ l 时,三重 PCR 可以获得良好的实验结果,据此可初步认为本三重 PCR 的对模板的最低检测浓度为 0.32ng/ μ l。根据该方法在临床疑似样品的应用性检测结果可知,仅需耗时约 100min 就可以实现对无乳链球菌疑似感染样品进行快速、特异和敏感的检测,这说明,本方法适用于对临床早期感染鱼病例的诊断,也可为病情评估和防治措施制订提供重要参考。

3.3 三重 PCR 反应体系参数优化

在多重 PCR 反应体系中,影响目的片段扩增的主要因素有引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、*Taq* 酶活性、dNTP 浓度等,通过优化反应体系参数可以进一步提高三重 PCR 的通适性(赵宏宇等, 2008)。当验证多对引物时,由于缺少可以预测到选定引物对反应特征的有效方法,因此对引物对进行经验检验和反复试验是必需环节(Henegariu *et al.*, 1997)。本实验中,当 25 μ l 反应体系中 10 \times Buffer 2.5 μ l、25mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μ l、2.5mmol/L dNTP 1.0 μ l、模板 DNA 1.0 μ l、5U/ μ l *Taq* 酶 0.5 μ l 时,*sip*、*cpsL*、*cpsE* 三个基因的引物对以等体积等浓度加入时,扩增结果出现非特异性条带,引物二聚体的信号很强,而目的片段仅可见 *Sip* 目的片段扩增出来,*cpsL*、*cpsE* 扩增条带信号极弱。为了使 *sip*、*cpsL*、*cpsE* 三个基因片段获得特异性的扩增效果,且最大化的减少引物二聚体的产生,用于构建三重 PCR 检测方法的 *sip*、*cpsL*、*cpsE* 三个基因的引物的浓度需要进行差异化浓度组合优化。由表 4 的 27 个引物浓度组合扩增结果表明,只有引物组合 A₂B₂C₁ 在上述反应体系中获得良好的扩增效果,同时也没有出现非特异性扩增条带和过亮的引物二聚体,这说明,*sip*、*cpsL*、*cpsE* 三个基因的引物在同一反应体系中进行特异性扩增时,差异化的引物浓度组合可以最大化的减少因引物间的配对、引物间的竞争性抑制而造成对三重 PCR 扩增效果的影响。

反应体系中的 *Taq* 酶(含 *Taq* polymerase 5U/ μ l, 终浓度为 10 \times *Taq* PCR Buffer)、25mmol/L $MgCl_2$ 、2.5mmol/L dNTP mix 均为购自天根公司的商品化试剂,稳定性能良好。在三重 PCR 中,DNA 聚合酶需要自由的镁离子,模板 DNA 也需要自由的镁离子

(Henegariu *et al*, 1997)。然而为了进一步评估三重 PCR 对 Mg^{2+} 浓度的最低需要量, 本实验以 Mg^{2+} 梯度浓度继续进行优化, 结果表明, 当反应体系中 Mg^{2+} 浓度低于或高于 37.5mmol/L 时, Mg^{2+} 浓度对三重 PCR 检测方法都产生明显的抑制作用; 只有当 Mg^{2+} 浓度为 37.5mmol/L 时才适合本三重 PCR 检测方法, 此时反应体系中的 dNTP 浓度为 200 μ mol/L、*Taq* 聚合酶活性为 0.5U。这说明, 当三重 PCR 反应体系中 Mg^{2+} 浓度为 37.5mmol/L 时, 可以达到平衡体系中 dNTP 和 *Taq* 聚合酶反应时对 Mg^{2+} 的竞争性需要, 本结论也与 Chamberlain 等(1988)的研究发现相吻合。

3.4 三重 PCR 反应条件优化

影响多重 PCR 的因素有变性温度、变性时间、退火温度、延伸时间、循环次数等, 其中最重要的影响因素是退火温度和延伸时间。退火温度是影响三重 PCR 特异性与产量的重要条件, 退火温度高, 特异性强, 但退火温度过高则可能造成引物与模板结合不牢固, 导致 DNA 扩增效率下降; 退火温度低, PCR 产物产量高, 但退火温度过低则可能造成引物与模板错配, 导致非特异性扩增产物增加(赵邦荣等, 2011)。三重 PCR 的延伸时间与基因座靶序列的扩增长度密切相关, 且随着靶序列碱基数量的增加而延长(Chamberlain *et al*, 1992)。然而如果退火时间和延伸时间过长, 则可能出现非特异扩增的情况的出现。在本实验中, 当三重 PCR 检测方法的变性温度、变性时间与单一 PCR 设置相同时也是适合。基于实验前对 *Taq* 聚合酶活性和欲扩增片段长度的综合分析, 预设三重 PCR 的延伸时间为 70s, 并应用为所有引物组合的在不同退火温度下的延伸时间。当退火温度范围在 51—59 $^{\circ}$ C 之间时, 引物组合 A2B2C1 在预定的延伸时间内都能扩增出三条目的条带, 且无非特异性扩增产物出现; 但当退火温度分别为 51 $^{\circ}$ C、59 $^{\circ}$ C 时, 其扩增条带明显比 53 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C 和 57 $^{\circ}$ C 的扩增条带弱。这说明, 在 70s 的延伸时间内, 适合引物组合 A₂B₂C₁ 并获得良好扩增结果的退火温度范围初步认为是 53—57 $^{\circ}$ C 之间。然而为了提高引物与模板的结合牢固性、降低引物与模板的错配率, 最终确定了最佳退火温度为 55 $^{\circ}$ C。

参 考 文 献

- 汪开毓, 付 希, 肖 丹等, 2011. 罗非鱼源无乳链球菌 *cpsE* 基因的克隆和分子特性分析. 水产学报, 35(5): 660—667
- 张新艳, 樊海平, 钟全福等, 2008. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究. 水产学报, 32(5): 772—779
- 赵邦荣, 张香改, 齐娜娜等, 2011. 优化多重 PCR 扩增效果的实验研究. 河北医药, 33(11): 1674—1676
- 赵宏宇, 蔡 禄, 赵秀娟等, 2008. 应用正交实验法优化 DNA 重复序列的 PCR 扩增体系. 内蒙古科技大学学报, 27(4): 346—350
- 祝璟琳, 杨 弘, 邹芝英等, 2010. 海南养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验. 海洋与湖沼, 41(4): 590—594
- 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬等, 2003. 影响多重 PCR 扩增效果的因素. 遗传, 25(1): 65—68
- Ahmet Z, Stanier P, Harvey D *et al*, 1999. New PCR primers for the sensitive detection and specific identification of Group B b-hemolytic streptococci in cerebrospinal fluid. Molecular and Cellular Probes, 13(5): 349—357
- Amal M N A, Zamri-Saad M, 2011. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science, 32(2): 195—206
- Chaffin D O, Mentele L M, Rubens C E, 2005. Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. Journal Of Bacteriology, 187(13): 4615—4626
- Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E *et al*, 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Research, 16(23): 11141—11156
- Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E *et al*, 1992. Detection of gene deletions using multiplex polymerase chain reactions. Methods in Molecular Biology, 9(12): 299—312
- Elnifro E M, Ashshi A M, Cooper R J *et al*, 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clinical Microbiology Reviews, 13(4): 559—570
- Gil E G, Rodriguez M C, Bartolome R *et al*, 1999. Evaluation of the Granada agar plate for detection of vaginal and rectal group B streptococci in pregnant women. Journal of clinical Microbiology, 37(8): 2648—2651
- Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A *et al*, 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. Journal of clinical Microbiology, 32(2): 335—351
- Hagay Z J, Miskin A, Goldchmit R *et al*, 1993. Evaluation of two rapid tests for detection of maternal endocervical group B streptococcus: enzyme-linked immunosorbent assay and Gram stain. Obstet Gynecol, 82(1): 84—87
- Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R *et al*, 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. Biotechnology, 23(3): 504—511
- Imperi M, Pataracchia M, Alfarone G *et al*, 2010. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. Journal of Microbiological Methods, 80(2): 212—214

- Mawn J A, Simpson A J, Heard A J, 1993. Detection of the C protein gene among group B streptococci using PCR. *Journal of Clinical Pathology*, 46(7): 633—636
- Philipson E H, Palermino D A, Robinson A, 1995. Enhanced antenatal detection of group B streptococcus colonization. *Obstet Gynecol*, 85(3): 437—439
- Rioux S, Martin D, Ackermann H W *et al*, 2001. Localization of surface immunogenic protein on Group B *Streptococcus*. *Infection and Immunity*, 69(8): 5162—5165
- Rosa C, Clark P, Duff P, 1995. Performance of a new DNA probe for the detection of group B streptococcal colonization of the genital tract. *Obstet Gynecol*, 86(4): 509—511
- Schuchat A, 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3): 497—513
- Teixeira L A, Figueiredo A M S, Benchetrit L C, 1992. Liquid medium for rapid presumptive identification of group B streptococci. *Journal of clinical Microbiology*, 30(2): 506—508
- Trigo G, Ferreira P, Ribeiro N *et al*, 2008. Identification of immunoreactive extracellular proteins of *Streptococcus agalactiae* in bovine mastitis. *Can J Microbiol*, 54(11): 899—905
- Wang E E L, Hammerberg O, Lyn P *et al*, 1988. Rapid detection of group B streptococcal carriage in parturient women using a modified starch serum medium. *Clinical and Investigative Medicine*, 11(1): 52—56
- Yancey M K, Clark P, Armer T *et al*, 1993. Use of a DNA-probe for the rapid detection of group B streptococci in obstetric patients. *Obstet Gynecol*, 81(4): 635—640

THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A TRIPLE PCR METHOD FOR RAPID DETECTION OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

HUANG Jin-Lu¹, WANG Kai-Yu^{1,2}, XIAO Dan³, LIU Bei-Bei¹, WANG Jun¹,
HUANG Ling-Yuan¹, FU Xi¹, WANG Hao-Cheng¹

(1. Fish Disease Research Center of Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014; 3. Tongwei Co. Ltd., Chengdu, 610041)

Abstract A pair of specific primers were designed based on the two well conserved genes of *sip* and *cpsE* of *Streptococcus agalactiae* published on the GenBank, respectively. The primer of *cpsL* gene well conserved in *S. agalactiae* was chosen to be the positive control. After the optimization of the reaction conditions and reaction system parameters, the triple PCR method for *S. agalactiae* detection was developed. The method was evaluated by examining samples of forty tilapia with artificial infection and twenty two suspected fish collected clinically. Results showed that the triple PCR method was well specific. The detection result of *S. agalactiae* DNA showed three bands, and those of other seven strains showed no bands. The minimum detection concentration of the *S. agalactiae* DNA was 0.32ng/μl, the optimization value of Mg²⁺ concentration was 37.5mmol/L, and it took about 100min to perform the examination. The positive rates of forty liver DNA samples and forty kidney DNA samples from the tilapia with artificial infection were 100%, respectively, and those of the twenty two liver DNA samples and twenty two kidney DNA samples from the suspected fish were 72.7%, respectively. Detection results of the two groups of samples were consistent with the results using general bacterial identification method.

Key words *Streptococcus agalactiae*, Triple PCR, Detection method