

用 16S rRNA 基因的内切酶图谱快速 鉴别几种对虾病原菌*

孔杰 叶军[†] 郭华荣^{††} 刘萍

张岩 徐怀恕[†] 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266003)

[†](青岛海洋大学海洋生物系, 青岛 266003)

^{††}(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 坎普氏弧菌是青岛海洋大学生物系微生物实验室于 1989—1990 年自对虾养殖场中国对虾红腿病虾心脏及血淋巴中分离并鉴定的菌株, 副溶血弧菌和溶藻胶弧菌两菌株于 1994 年 9 月得自中国科学院微生物研究所。为建立快速、准确的中国对虾病原菌的诊断技术, 根据几种细菌的 16S rRNA 基因的序列, 设计并合成该基因的多聚酶链反应的引物 PL1 和 PL2。并用该对引物分别从坎普氏弧菌、副溶血弧菌和溶藻胶弧菌的 DNA 样品中扩增出分子量与原设计相同的 DNA 片段, 然后用 *Alu* I 内切酶对 3 种细菌的多聚酶链反应产物进行酶切, 形成 3 种不同的限制性内切酶图谱。研究结果证明, 用 16S rRNA 基因的限制性内切酶图谱, 可快速、准确地鉴别 3 种对虾病原菌。

关键词 弧菌 16S rRNA 多聚酶链反应 限制性内切酶图谱

在对虾的养殖生产中, 已报道多种弧菌引起对虾疾病, 如溶藻胶弧菌、副溶血、河口弧菌 (*Vibrio fluvialis*) 和鳃弧菌 (*V. anguillarum*) 等 (Delves-Broughton, et al., 1976; Kwei Lin, 1989; Lightner, 1988)。弧菌会引起对虾幼体乃至养殖池中对虾的大量死亡 (Lavilla-Pitogo, et al., 1990; Song, et al., 1990)。细菌性疾病危害面大, 传播速度快, 为此, 快速、准确的病原鉴别技术便成为疾病防治的基础。多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 由于技术操作简捷、快速、灵敏度高而发展成为疾病诊断的主要方法。本文根据细菌编码 16S rRNA 基因的序列, 首次用 PCR 和限制性内切酶图谱 (restriction fragment length polymorphisms, RFLP) 技术对对虾的几种病原菌进行分析, 以期建立对虾病原菌快速、灵敏的鉴别技术。

1 材料和方法

1.1 菌株

坎普氏弧菌 (*V. cambellii*) 是青岛海洋大学海洋生物系微生物实验室于 1989—1990

*国家自然科学基金资助项目, 39370545号。孔杰, 男, 出生于1963年5月, 博士, 副研究员。

收稿日期: 1995年7月25日, 接受日期: 1997年6月11日。

两年中自青岛沿海对虾养殖场中国对虾红腿病虾心脏及血淋巴中分离并鉴定的菌株,编号为 2-5B。副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 和溶藻胶弧菌 (*V. alginolyticus*) 试验菌株于 1994 年 9 月取自中国科学院微生物研究所, 菌株编号分别为 1.1614 和 1.1587。

1.2 PCR 引物设计

3 种弧菌 16S rRNA 序列从 EMBL (European Molecular Biology Laboratory) 查取, 序列的存取号为坎普氏弧菌, X56575; 副溶血弧菌, X56580; 溶藻胶弧菌, X56576。经 MACAW (Multiple Alignment Construction and Analysis Workbench) 计算机软件进行多序列同源性分析和比较, 选择完全同源的碱基序列。用 PCR 引物自动设计及分析系统, 从 3 种细菌的同源序列中设计引物。引物 PL1 的碱基序列为 5' -TTCGAAACGATGGC TAATACCGC - 3', PL2 为 5' -GGTTACCTTGTTACGACTT - 3', 分别对应于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 16S rRNA 基因上的第 166 至 189 碱基和 1385 至 1409 碱基。设计的 PCR 扩增片段长度为 1220 碱基。

1.3 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

3 种弧菌均用 ZoBell 2216E 液体培养基培养, 收集细菌, 提取 DNA 后进行 PCR 扩增。建立 50 μ l 的 PCR 反应体积, 其中包括 Tris-HCl (pH = 9.0, 25 $^{\circ}$ C), 50mmol / L MgCl₂, 1.5mmol / L; 4 种脱氧核苷酸, dATP, dTTP, dGTP 和 dCTP 各 0.2mmol / L; 各种引物为 50pmol; Taq DNA 聚合酶 1 单位。反应混和液加盖 50 μ l 矿物油以后, 置 PCR 仪上循环 30 次。循环参数为: 94 $^{\circ}$ C, 1min; 55 $^{\circ}$ C 1min; 72 $^{\circ}$ C, 1.5min。PCR 反应完毕, 取 5 μ l 反应产物于 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查。

1.4 PCR 产物酶切及电泳

PCR 反应产物经酚、酚 / 氯仿、氯仿抽提后, 用酒精沉淀。将沉淀干燥, 重溶于 18 μ l 无菌蒸馏水中。建立 20 μ l 酶切反应体积, 加入 2 单位 *Alu* I 内切酶 (8—10u / μ l) 后, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴中 2—3h。取 10 μ l 上述酶切 PCR 产物, 点样于 2.5% 琼脂糖凝胶进行电泳、摄影。

2 结果

2.1 PCR 扩增及 PCR 产物特征

根据细菌 16S rRNA 基因序列设计的引物 PL1, PL2, 能从 3 种不同的菌株中扩增出 DNA 片段 (图版 I: 1)。在上述的反应系统和反应条件下, PCR 产生清晰的单一条带。从 3 种菌株的 DNA 中扩增的 PCR 产物在电泳图中的迁移距离相同, 说明 3 者长度近等。标准分子量的 DNA 标记显示 3 个 PCR 产物的分子量与实验设计相同。

2.2 三种弧菌 16S rRNA 基因的 RLFP 分析与比较

从 PCR 产物的电泳图谱中不能区别 3 种细菌, 但产物经 *Alu* I 内切酶酶切后, 3 种不同菌株的酶切图谱互不相同, 为此根据内切酶的酶切图谱很容易区分 3 种细菌 (图版 I: 2)。小分子量 (< 200bp) 的 DNA 片段不易读取, 但较大分子量 (> 200bp) 的图谱足以清楚地显示出菌种之间的差别。坎普氏弧菌缺少分子量为 600 左右的条带; 其次副溶血弧菌缺少 350 左右的条带; 溶藻胶弧菌的酶切带数最多, 包括上述两菌种酶切图谱中的所有条带。

3 讨论与结语

PCR 和 RFLP 技术的关键在于两个方面, 首先是 PCR 能够准确、特异性地扩增出所期望的 DNA 片段; 其次是选用的内切酶将靶 DNA 片段切开后, 电泳图谱能够区分所要检

测的种类。实验结果表明,无论是 PCR 扩增,还是 *Alu* I 内切酶对 3 种不同弧菌 PCR 扩增产物的酶切图谱,均符合上述两个条件。影响酶切图谱的另一个因素是酶切程度,不完全酶切会产生多余的条带,从而导致失真图谱以及图谱的重复性差等。在本研究中,*Alu* I 内切酶对 3 种 16S rRNA 的 PL1 / PL2 扩增产物的酶切,曾进行过多次的重复,降低酶切 DNA 总量、加大酶量和充分延长酶切时间等:不同批次的实验结果均产生相同的酶切图谱。

在理论上,酶切产生各片段的分子量之和与酶切前完整 DNA 的分子量应当相同。但是,16S rRNA PL1 / PL2 扩增片段经 *Alu* I 酶切后,在坎普氏弧菌和副溶血弧菌的电泳图谱中不能建立这种对应关系。主要的原因是,在 2.5% 的琼脂糖电泳中,分子量较小的带分辨率不够高,难以读出小分子量的 DNA 片段;其次,酶切可能会产生相近或相同长度的 DNA 片段,两个分子量相同或相近的 DNA 片段在电泳凝胶中形成一条带而直接造成电泳带数目的减少,从而造成总分子量偏低。因为菌种(株)鉴别依赖于 PCR 扩增片段酶切后形成的特定图谱,所以,上述问题对检测结果的稳定性无影响。

与经典的细菌检测方法相比较,PCR 和 RFLP 技术具有灵敏度高、检测速度快、特异性强等优点。因此在病原检测中有较广阔的应用前景。但 PCR 和 RFLP 技术的进一步的完善,还需在几个方面进行更深入的研究,如内切酶的酶切图谱的研究(单酶酶切或混合酶酶切),引物的选择及待扩增 DNA 片段的变异程度等。PCR 的灵敏度已成为该技术的优越性能之一。因此,提高 PCR 和 RFLP 技术的分辨精度是今后应努力的方向。

参 考 文 献

- Delves-Broughton, J. et al., 1976, *Aquaculture*, 7: 201—217.
- Kwei Lin, C., 1989, *World Aquacult.*, 20: 19—20.
- Lavilla-Pitogo, C. R. et al., 1990, *Aquaculture*, 91:1—13.
- Lightner, D. V., 1988, *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, ed. by Sindermann, C. J., Elsevier (Amsterdam), pp.42—47.
- Song Y. L. et al., 1990, *Proceedings of ROC-Japan Symposium at Taipei*, ed. by Kai, G. H. et al., NSC Symposium Series (Taiwan), 16: 172—179.

RAPID IDENTIFICATION OF SHRIMP BACTERIAL PATHOGENS BY ENZYMATIC AMPLIFICATION AND DIGESTION OF 16S rRNA GENE

Kong Jie, Ye Jun[†], Guo Huarong^{††}, Liu Ping,
Zhang Yan, Xu Huishu[†], Yang Conghai

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266003)

[†](Department of Biology, Qingdao Ocean University, Qingdao 266003)

^{††}(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract *Vibriosis* is an important bacterial pathogen in the shrimp culture industry. Classical techniques of species (strain) identification are hampered by time consuming and complicated test protocols. Based on the 16S rRNA sequence data in the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), polymerase chain reaction (PCR) primers were designed and synthesized in 1994. The reference strains were *Vibrio cambellii* (isolated and identified by the Microbiology Laboratory, Ocean University of Qingdao in 1989—1990 from shrimp farm near Qingdao), *V. paraheamolyticus* and *V. alginolyticus* (provided by the Microbiology Research Institute, Chinese Academy of Sciences in September 1994), and the database accession number were X56575, X56580 and X56576, respectively. Paired primers PL1 / PL2 were selected for a feasibility study of using them to distinguish 3 test *Vibrio* species, *V. cambellii*, *V. paraheamolyticus* and *V. alginolyticus*, by PCR and restriction fragment length polymorphisms (RFLP). PL1 covered the sequence from position 166 to position 189 and PL2 position 1385 to position 1409 (*Escherichia coli* numbering). The length of the amplified fragment was 1220 base pairs.

Fifty microliters amplification reaction volumes were established. After 30 cycles of the following incubation: 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 1.5min at 72°C, 5μl of the reaction mixture was used to estimate the reaction efficiency on 1% agarose gel. The rest was purified and digested with 2 units of *Alu* I restriction enzyme. The restriction fragments were resolved on 2.5% agarose gel.

The DNA fragments, aseptected, can be amplified from *V. cambellii*, *V. paraheamolyticus* and *V. alginolyticus* DNA extracts in PCR employing PL1 and PL2. Digested by enzyme *Alu* I, the PCR products of those three bacterial species produced three different profiles of fragment length. Each species could be rapidly identified on the basis of their respective band pattern. The combined uses of PCR and RFLP appear to be a powerful tool for bacterial pathogen identification in shrimp aquaculture. (Plate I: 1,2)

Key words *Vibrio* 16S rRNA PCR RFLP