

文章编号:1672-6987(2012)01-0038-04

# 溶藻弧菌的依赖于核酸序列恒温扩增 检测方法的建立

秦胜利<sup>1</sup>, 王建广<sup>1,2</sup>

(1. 青岛科技大学 化工学院, 山东 青岛 266042; 2. 山东出入境检验检疫局, 山东 青岛 266002)

**摘要:** 采用自行建立和优化的依赖于核酸序列恒温扩增(NASBA)检测体系,对溶藻弧菌进行检测。采用溶藻弧菌的 *hsp60* 基因为目的片段设计特异性引物,建成可快速检测溶藻弧菌的 NASBA 检测法,并进行了特异性和灵敏度试验。结果表明:所建立起的 NASBA 检测方法,灵敏度为  $6.9 \times 10^2$  cfu · mL<sup>-1</sup>,高于普通 PCR 方法。溶藻弧菌的依赖于核酸序列恒温扩增检测方法具有较高灵敏度和良好特异性,并且对仪器要求更低,用普通恒温设备即可进行反应,具有广阔的推广前景。

**关键词:** 溶藻弧菌; 检测; 依赖于核酸序列恒温扩增

中图分类号: Q 52

文献标志码: A

## Establishment of the Nucleic Acid Sequence-based Amplification Method for Detecting *Vibio Alginolyticus*

QIN Sheng-li<sup>1</sup>, WANG Jian-guang<sup>1,2</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China;

2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

**Abstract:** A new method, based on Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) to detect *Vibio alginolyticus* of samples, was established. A highly specific set of primers was synthesized to target the *hsp60* gene of *Vibio alginolyticus* so as to establish Nucleic Acid Sequence-based Amplification method. Specificity and sensitivity were tested. The results showed that the sensitivity of NASBA was  $6.9 \times 10^2$  cfu · mL<sup>-1</sup> which was higher than the result of PCR method. Detecting *Vibio alginolyticus* with NASBA was more specific and sensitive than PCR method and has lower instrumental requirement. So, there is a broad prospect.

**Key words:** *Vibio alginolyticus*; detection; Nucleic Acid Sequence-based Amplification

溶藻弧菌(*Vibio alginolyticus*)广泛分布于海洋环境中,在一定条件下对海洋动物有较强的致病性,是近年来海水养殖动物的主要致病菌之一<sup>[1-3]</sup>。溶藻弧菌过去一直被认为不致病或仅能引起部分创伤性感染而未受重视,直到1980年才

被发现该菌能引起人类腹泻<sup>[4]</sup>。林业杰等<sup>[5]</sup>对不同溶藻弧菌进行研究后,指出该菌可能含有多种致病因子。随着海水养殖业的不断壮大和进出口水产品的不断增多,检验检疫部门加强了出入境海水养殖产品中溶藻弧菌的检疫。因此,建立一

收稿日期: 2011-05-10

基金项目: 国家质检总局科研项目(2008IK140); 山东出入境检验检疫局科研项目(SK200821)。

作者简介: 秦胜利(1979—),男,硕士研究生。

种快速、简便、成本低的检测方法具有很大的实用价值。

核酸序列恒温扩增(NASBA)技术在 1991 年,由加拿大 Can-gene 公司首先介绍<sup>[6]</sup>。NASBA 技术是由两个引物介导的、连续均一的特异性体外等温扩增核苷酸序列的酶促过程。反应主要依赖于 AMV 逆转录酶、RNase H、T7 RNA 聚合酶和两个特殊设计的引物以及脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、核糖核苷三磷酸(NTP)和适宜的缓冲液。其中一条引物长度约为 45 个碱基,3'端大约 20 个碱基与靶序列互补,5'端具有被 T7 RNA 聚合酶识别的启动子序列;另一条引物长度约为 20 个碱基,与靶 RNA 序列相同。将制备好的模板直接加入反应体系中,整个反应在恒温

(41℃)条件下进行,1.5~2 h 即可得到理想的结果,操作简单。目前 NASBA 检测方法已经应用于一些病原菌的检测,但还未见到 NASBA 方法检测 *V. alginolyticus* 的报道。本工作尝试选取 *V. alginolyticus* 的 *hsp60* 基因作为检测靶基因<sup>[7]</sup>,自行设计特异性引物,建立检测溶藻弧菌的 NASBA 检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

本研究所用的 11 株实验菌株见表 1。标准菌株分别购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)和中国医学细菌保藏管理中心(CMCC),分离菌株由本实验室和其他检验检疫局实验室分离鉴定获得。

表 1 试验用菌株

Table 1 Reference strains used in experiments

序号	菌株名称	拉丁名	菌株号	菌株数量
1	溶藻弧菌	<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 17749	1
2	溶藻弧菌	<i>Vibrio alginolyticus</i>	分离菌株	2
3	创伤弧菌	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	2
4	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	1
5	霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i> serotype O1	ATCC 14035	1
6	霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i> serotype O139	ATCC 51394	1
7	霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/O139	ATCC 25872	1
8	宋氏志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	CMCC(B)51592	1
9	痢疾志贺氏菌	<i>Shigella dysenteriae</i>	CMCC(B)51252	1
10	福氏志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	CMCC(B)51572	1
11	肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13067	1
12	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 25241	1
13	甲型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi-A</i>	ATCC 9150	1
14	鸭沙门氏菌	<i>Salmonella anatis</i>	ATCC 9270	1
15	大肠埃希氏菌 O157:H7	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150	1
16	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1
17	单核细胞增生李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	1
18	小肠结肠炎耶尔森氏菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CMCC(B)52207	1
19	弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 43864	1
20	产酸克雷伯氏菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 43165	1
21	阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 700323	1

### 1.2 主要试剂

AMV 反转录酶、T7 RNA 聚合酶、RNase 抑制剂、RNaseH,美国 NEB 公司;RNAMaid,维格拉斯生物技术(北京)有限公司;柱式细菌 RNAout 试剂盒,北京天恩泽基因科技有限公司;通用型核酸扩增物快速检测板,杭州优思达生物技术有限公司。

反应液 I:10×buffer[40 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-

HCl(pH 8.5, 25℃), 100 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 12 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol·L<sup>-1</sup> 二硫苏糖醇] 2.0 μL, 二甲基亚砜 2.5 μL, 模板 RNA 5 μL, 引物 F、R(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 1 μL, dNTPs(2.5 mmol·L<sup>-1</sup>)0.5 μL, NTPs(2.5 mmol·L<sup>-1</sup>)1.0 μL, 用 RNase-free H<sub>2</sub>O 补至 20 μL<sup>[8]</sup>。

反应液 II:10×buffer[40 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl(pH 8.5, 25℃), 100 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 12

mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol · L<sup>-1</sup> DTT]0.5 μL, 牛血清蛋白(10 mg · mL<sup>-1</sup>)0.25 μL, T7 RNA 聚合酶(50 000 U · mL<sup>-1</sup>)0.8 μL, AMV 反转录酶(10 000 U · mL<sup>-1</sup>)0.8 μL, RNase 抑制剂(40 000 U · mL<sup>-1</sup>)0.5 μL, RNaseH (500 U · mL<sup>-1</sup>)0.4 μL, 用 RNase-free H<sub>2</sub>O 补至 5 μL<sup>[8]</sup>。

### 1.3 引物设计与合成

根据美国国家生物信息中心(NCBI)上已公布的 *V. alginolyticus* 的 *hsp60* 基因序列(GenBank ACCESSION: DQ279068), 采用 Primer Premier5.0 引物设计软件, 并通过 Blast 软件比对, 设计一对特异性扩增引物和一条探针如下:

F: 5'-CGGTTACCTGTCTCCTTACTTC-3' (5'端标记生物素);

R: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATA-GGG CAACACTGCCTGATTCTTGG-3' (下划线部分表示 T7 DNA 依赖的 RNA 聚合酶启动子序列);

T: 5'-CCTTACTTCATCAACAACCAAGA-3' (3'端标记 FITC)。

引物和探针均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

### 1.4 细菌模板 RNA 提取

按传统培养方法分别增菌培养表 1 中的 11 株实验菌株。各取试验菌株的培养液 1 mL, 用柱式细菌 RNAout 试剂盒提取细菌 RNA 加入适量 RNase 抑制剂, 保存于 -20 °C 备用。所提取的细菌模板 RNA, 用于特异性和灵敏度等试验。

### 1.5 NASBA 方法的建立

反应液 I 在 65 °C 水浴中孵育 5 min, 再迅速放入 41 °C 水浴中孵育 5 min, 然后把反应液 II 迅速加入反应液 I, 小心混匀, 置于 41 °C 水浴中孵育 90 min。

反应结束后, 加入 RNA 保护剂 RNAMaid 1.5 μL, 探针 T(10 μmol · L<sup>-1</sup>)1 μL, 混匀, 94 °C 变性 3 min, 55 °C 退火 2 min, 用通用型核酸扩增物快速检测板检测产物<sup>[9]</sup>。

### 1.6 NASBA 方法的优化及验证

对影响 NASBA 扩增的因素进行优化。在反应结束后加入了 RNA 保护剂, 避免了主要产物单链 RNA 的降解。

按照建立及优化的反应体系和反应条件对 3 株 *V. alginolyticus* 阳性菌株进行检测, 以验证所建方法的可行性。

### 1.7 产物检测

扩增产物利用通用型核酸扩增物快速检测板检测<sup>[9]</sup>。核酸扩增完成后, 在反应管中加入探针与扩增产物杂交。把检测板水平放置在操作台上, 取杂交产物 10 μL 加入检测板的样品孔中, 再加入 100 μL 缓冲液进行层析, 10 min 左右判读结果。

通用型核酸扩增物快速检测板见图 1。其中, C 是质控线, T 为检测线, S 为样品孔。检测板 1 为未使用检测板; 仅 C 显红色为阴性(检测板 2); C 和 T 均显示为红色, 结果为阳性(检测板 3); C 线和 T 线均不显色, 说明检测板失效。



图 1 通用型核酸扩增物快速检测板应用示意图

Fig. 1 Instruction of universal nucleic acid detection device

### 1.8 特异性实验

用已建立的 NASBA 方法对表 1 所列的 3 株 *V. alginolyticus* 和其他非 *V. alginolyticus* 共计 22 株实验菌株模板 RNA 进行 NASBA 扩增, 利用通用型核酸扩增物快速检测板检测产物<sup>[9]</sup>, 确定特异性。

### 1.9 灵敏度实验

将经过增菌培养的 *V. alginolyticus* ATCC 17749 菌株, 用质量分数 0.85% 生理盐水做成菌悬液。对菌悬液进行平板计数并取 1 mL 菌悬液提取 RNA, 提取的 RNA 进行 10 倍梯度稀释, 取各梯度 RNA 进行 NASBA 扩增, 利用通用型核酸扩增物快速检测板检测产物<sup>[9]</sup>, 确定灵敏度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应条件的优化

分别把反应时间定为 30, 45, 60, 90, 120 min, 确定最佳反应时间。结果表明 90 min 效果最好, 故选定反应时间为 90 min。

适量二甲基亚砜(DMSO)可以破坏模板二级

结构,促进引物与模板退火,但如果浓度过高又会抑制酶的活性<sup>[10]</sup>,因此加入量需要进行优化。把 DMSO 的浓度分别定为 4%、6%、8%、10%、12%、14%,进行 NASBA 反应,扩增产物用质量分数 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明 DMSO 的较佳浓度为 10%。

## 2.2 NASBA 方法验证

溶藻弧菌的 NASBA 检测结果见图 2。检测结果显示,3 株 *V. alginolyticus* 阳性菌株均呈现阳性,初步表明该 NASBA 方法可用于 *V. alginolyticus* 的检测。



1,空白对照;2,溶藻弧菌 ATCC 17749;  
3,溶藻弧菌;4,分离菌株。

图 2 溶藻弧菌的 NASBA 检测结果

Fig. 2 NASBA detection for *Vibrio alginolyticus*

## 2.3 特异性实验

不同溶藻弧菌 NASBA 检测结果见图 3。



1,空白对照;2,溶藻弧菌 ATCC 17749;3~4,溶藻弧菌分离菌株;  
5,创伤弧菌 ATCC 17802;6,霍乱弧菌 ATCC 14035;7,霍乱弧菌  
ATCC 51394;8,霍乱弧菌 ATCC 25872;9,宋氏志贺氏菌 CMCC  
(B)51592;10,痢疾志贺氏菌 CMCC(B)51252;11,福氏志贺氏菌  
CMCC(B)51572;12,肠炎沙门氏菌 ATCC 13067。

图 3 不同溶藻弧菌 NASBA 检测结果

Fig. 3 Specificity of NASBA detection system in  
detection of *Vibrio alginolyticus*

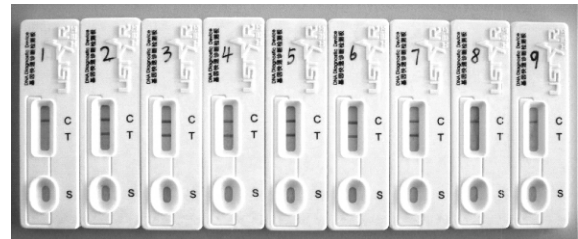
检测结果显示,3 株 *V. alginolyticus* 阳性菌株都呈阳性,其余菌株均呈阴性。图 3 仅示意了部分检测图谱,检测结果说明该 NASBA 方法对于 *V. alginolyticus* 有较好的特异性。

NASBA 反应在恒定温度下进行,无需温度循环,因此不会受到双链 DNA 的污染。同时,由

于外来双链 DNA 无 T7 启动子序列,不可能被扩增,所以 NASBA 检测方法的特异性很高<sup>[11]</sup>。

## 2.4 灵敏度实验

NASBA 方法检测不同稀释度溶藻弧菌 ATCC 17749 的 DNA 的电泳图谱见图 4。



1,空白对照;2, $6.9 \times 10^7$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>;3, $6.9 \times 10^6$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>;  
4, $6.9 \times 10^5$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>;5, $6.9 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>;6, $6.9 \times 10^3$   
cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>;7, $6.9 \times 10^2$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>;8, $6.9 \times 10^1$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>;  
9, $6.9 \times 10^0$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。

图 4 NASBA 方法检测不同稀释度溶藻弧菌  
ATCC 17749 的 DNA 的电泳图谱

Fig. 4 Sensitivity test of NASBA for *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749

检测结果显示,稀释度  $6.9 \times 10^1$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 时没有扩增产物。可以得出,NASBA 方法的最低检测限为  $6.9 \times 10^2$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。

汪笑宇等<sup>[12]</sup>和祝璟琳等<sup>[13]</sup>分别建立了溶藻弧菌的 PCR-凝胶电泳检测法,灵敏度均为  $1.0 \times 10^2$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>;韩一凡等<sup>[14]</sup>也建立了溶藻弧菌的 PCR-凝胶电泳检测法,灵敏度为  $3.7 \times 10^2$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。与上述 PCR-凝胶电泳检测法的灵敏度比较,可知本实验所建立方法的灵敏度高于 PCR-凝胶电泳检测法。

NASBA 方法扩增的主要产物为单链 RNA,这就为用探针检测提供了便利,本实验尝试了把 NASBA 技术与核酸薄膜层析检测技术进行结合,据报道,核酸薄膜层析检测技术的检测灵敏度比琼脂糖凝胶电泳检测法高 50~200 倍,检测时间能节约 0.5~1 h<sup>[9]</sup>。

## 3 结 论

所建立的 *V. alginolyticus* 的依赖于核酸序列恒温扩增检测方法有较好的特异性,灵敏度为  $6.9 \times 10^2$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,高于普通 PCR 方法。NASBA 检测方法具有较高灵敏度和良好特异性,用普通恒温设备即可进行反应,具有广阔推广前景。

(下转第 46 页)

### 3 结 论

利用 DTT 替代反应,使得荧光素标记的信号 DNA 脱离纳米金表面而被释放到溶液中,通过荧光光谱法测定荧光强度来得到 HBV-DNA 的浓度。优化了实验条件,建立了一种新的灵敏的 HBV-DNA 检测方法。

#### 参 考 文 献

- [1] Srorhoff J J, Elghanian R, Mucic R C, et al. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes [J]. J Am Chem Soc, 1998, 120(9): 1959-1964.
- [2] Cao Y W C, Jin R C, Mirkin C A. Nanoparticles with raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection [J]. Science, 2002, 297(5586): 1536-1540.
- [3] Josephson L, Perez J M, Weissleder R. Magnetic nanosensors for the detection of oligonucleotide sequences [J]. Angew Chem Int Ed, 2001, 40(17): 3204-3206.
- [4] He L, Musick M D, Nicewarner S R, et al. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection

of DNA hybridization [J]. J Am Chem Soc, 2000, 122(38): 9071-9077.

- [5] Wang J, Polsky R, Merkoci A, et al. "Electroactive beads" for ultrasensitive DNA detection [J]. Langmuir, 2003, 19(4): 989-991.
- [6] Wang J, Xu D, Polsky R, Magnetically-induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization [J]. J Am Chem Soc, 2002, 124(16): 4208-4209.
- [7] Elghanian R, Storhoff J J, Mucic R C, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles [J]. Science, 1997, 277(5329): 1078-1081.
- [8] Wang Y F, Pang D W, Zhang Z L, et al. Visual gene diagnosis of HBV and HCV based on nanoparticle probe amplification and silver staining enhancement [J]. J Med Virol, 2003, 70(2): 205-211.
- [9] Hanne H, Ghourchian H, Ziaee A A. Nanoparticle-based electrochemical detection of hepatitis B virus using stripping chronopotentiometry [J]. Analytical Biochemistry, 2007, 370: 195-200.
- [10] 马丽, 白燕, 刘仲明, 等. 血清样品中乙肝病毒的 DNA 电化学传感器检测[J]. 分析测试学报, 2003, 22: 42-44.

(责任编辑 林 琳)

(上接第 41 页)

#### 参 考 文 献

- [1] Liu P C, Chen Y C, Lee K K. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. Microbios, 2001, 104(408): 71-77.
- [2] Selvin J, Lipton A P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon* [J]. Dis Aquat Organ, 2003, 57: 147-150.
- [3] Liu P C, Lin J Y, Hsiao P T, et al. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum* [J]. Journal of Basic Microbiology, 2004, 44(1): 23-28.
- [4] 林业杰, 林勇, 林金财, 等. 海产品携带溶藻弧菌调查[J]. 海峡预防医学杂志, 2000, 6(2): 45.
- [5] 林业杰, 欧剑鸣, 董新平, 等. 溶藻弧菌的病原性研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2001, 7(1): 46.
- [6] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. Nature, 1991, 350(6313): 91-92.
- [7] 中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局, 中华人民共和国汕头出入境检验检疫局, 中华人民共和国深圳出入境检验检疫

局, 等. SN/T 1869-2007, 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.

- [8] 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用[M]. 1 版. 北京: 科学出版社, 2009: 22-34.
- [9] 尤其敏, 胡林, 林源吉, 等. 核酸薄膜层析快速检测方法及其试纸条及其用途: 中国, 2006100034291[P]. 2006.
- [10] 乔岩梅. 炭疽芽孢杆菌特征基因恒温扩增检测方法的研究[D]. 武汉: 中国科学院武汉病毒研究所, 2007.
- [11] 颜进. NASBA(依赖核酸序列的扩增)及其在医学上的应用[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1997, 1(2): 66-69.
- [12] 汪笑宇, 周遵春, 关晓燕, 等. 仿刺参及养殖环境中溶藻弧菌和灿烂弧菌的 PCR 快速检测[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(3): 125-130.
- [13] 祝璟琳, 王国良, 金珊. 养殖大黄鱼病原弧菌多重 PCR 检测技术的建立和应用[J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 156-164.
- [14] 韩一凡, 莫照兰, 李杰, 等. 溶藻弧菌的 PCR 快速检测方法[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(6): 1237-1240.

(责任编辑 林 琳)