

养殖沉积环境中气单胞菌属细菌的 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

姜娓娓^{1,2} 李秋芬^{2*} 刘淮德² 李晓龙²

(¹ 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

(² 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 利用 *GyrB* 基因的特异性引物建立沉积环境中气单胞菌属细菌的实时荧光定量 PCR 检测方法。将已知浓度的气单胞菌菌液加入灭菌的沉积物样品中, 作为模拟沉积物样品。通过选择和优化沉积物 DNA 提取方法、特异性引物、标准曲线模板, 建立沉积环境中气单胞菌属细菌准确检验的实时荧光定量 PCR 方法, 同时验证该方法的特异性、灵敏性、重复性。结果表明, 采用改进的溶菌酶-SDS 温和裂解法提取沉积物 DNA, 以扩增 *GyrB* 基因片段的 IAF 和 IAR 为特异性引物, 并直接以模拟沉积物样品 DNA 为标准品构建标准曲线, 可以建立适用于定量检测沉积环境中气单胞菌属细菌的实时荧光定量 PCR 方法。该方法可灵敏、特异、准确地定量检测刺参养殖池塘底泥中气单胞菌属中不同种的细菌, 检出效率可达 10^3 CFU/g。统计分析显示, 变异系数为 0.21% - 0.80%, 均小于 5%, 表明重复性良好。

关键词 *GyrB* 基因; 沉积环境; 气单胞菌属; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 Q939.96 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)03-0126-08

Establishment of the real-time fluorescent quantitative PCR method for detecting *Aeromonas* in sediment environment of aquaculture

JIANG Wei-wei^{1,2} LI Qiu-fen^{2*} LIU Huai-de² LI Xiao-long²

(¹ College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture;

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT *Aeromonas* is one of the pathogens causing skin ulcer syndrome in cultured *Apostichopus japonicus*. It is important to monitor the population of these bacteria in the culture environment for disease control. Unfortunately, current real-time quantitative PCR detection method is mostly based on the pure culture and cannot truly reflect the bacteria population in the sediment environment. Therefore, we established a real-time fluorescent quantitative PCR method to improve the pathogen detection. The simulative sediment samples were made by adding known-concentration bacteria into the sterilized sediment; the DNA extraction method was selected by comparing three improved DNA extraction methods; genus-specific primers were selected based on the *GyrB* gene of *Aeromonas*. Meanwhile, PCR reaction conditions and systems were optimized and a standard curve based-on extracted

国家自然科学基金项目(31170113)资助

* 通讯作者。E-mail: liqf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-07-17; 接受日期: 2013-08-31

作者简介: 姜娓娓(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事环境微生物生态的研究。E-mail: sdnuijiangweiwei@163.com

sediment DNA was utilized to examine the bacteria in the sediment. The results indicated that the modified lysozyme-SDS gentle lyse method and genus-specific primers (IAF and IAR based on *GyrB* gene of *Aeromonas*) were efficient and unique to detect *Aeromonas*. In addition, the standard curve was set up by using the extracted DNA from the simulated sediment samples as template. The new real-time fluorescent quantitative PCR protocol was highly sensitive and specific to detect different species of *Aeromonas* from the sediment with the quantification limit of 10^3 CFU/g. The coefficient of variation fell between 0.21% and 0.80% by statistical analysis (less than 5%), which demonstrated the good repeatability of the method. Thus, we have established a highly sensitive, specific, and reproducible method to measure *Aeromonas* in sediment environment of aquaculture even with low quantification.

KEY WORDS *GyrB* gene; Sediment environment of aquaculture; *Aeromonas*; Real-time fluorescent quantitative PCR

气单胞菌属(*Aeromonas*)细菌在自然界广泛存在,可引起多种养殖动物疾病,如鲢鳙腐皮综合症、草鱼肠道出血症、异育银鲫溶血性腹水病、鲤红斑病和竖鳞病、鳊赤鳍病和鳖穿孔病等(沈锦玉等 1999; Manstan *et al.* 2001; Wahli *et al.* 2005; 张波等 2012)。近年来,又有报道称杀鲑气单胞菌、中间气单胞菌和一种弧菌属的细菌为山东省日照和烟台地区养殖场刺参腐皮综合症的致病菌(王学高等 2007)。刺参腐皮综合症是导致刺参死亡的最为严重的疾病之一,该病传染性极强,死亡率极高,不仅严重影响了刺参养殖业的可持续发展和产出的质量,而且通过养殖的水生动物和水产品感染人畜,进而影响人类的身体健康(Joseph *et al.* 1991; Sechil *et al.* 2002)。因此,快速定量检测刺参养殖系统中气单胞菌的数量变化,可及时对刺参疾病的发生进行预警,以便及时采取防治措施,在一定程度上能够起到预防刺参腐皮综合症的作用。

平板计数法、MPN法、血球计数板计数法等传统的微生物计数法不仅操作繁琐、速度慢、特异性差,而且测定结果容易受到外界条件和人为实验操作的影响,误差较大。目前虽然存在一些气单胞菌属细菌的选择性培养基,但需要辅助生化鉴定试验,操作较为繁琐、时间较长,且对气单胞菌的阳性检出率较低(凌红丽等 1998)。利用实时荧光定量 PCR 方法对细菌进行计数具有简便、快速、特异性强、灵敏度高等特点,因此得到广泛应用。在大多已发表的检测环境细菌的论文(López-Gutiérrez *et al.* 2004; Khan *et al.* 2009)中,均以质粒为模板构建标准曲线建立研究水体环境或土壤环境中的实时定量 PCR 方法,以沉积物 DNA 为标准品建立检测沉积环境中气单胞菌的实时荧光定量 PCR 的方法尚不多见。一方面,由于沉积物样品中含有较多腐殖质和其他有机质,获得完整的大片段 DNA 较为困难(王淑芳等 2011),且沉积物样品中众多的 PCR 反应抑制因子影响实时荧光定量 PCR 检验方法的准确度;另一方面,多数沉积物 DNA 提取方法在提取过程中存在降解和损失,不可能得到 100% 的 DNA。因此,应用已存在的荧光定量 PCR 方法检测沉积环境中气单胞菌不够准确,很有必要优化 DNA 提取方法,去除抑制性因子,提高 DNA 提取效率,并建立以模拟沉积物样品 DNA 为标准品的标准曲线,以提高实时荧光定量 PCR 检测方法的准确度。

利用 PCR 技术检测病原菌,需选择对该类细菌保守而对其他细菌排斥的特异性引物。*GyrB* 基因在大多数细菌中均存在,且该基因的碱基替换频率很高(Kasai *et al.* 1998),作为编码蛋白质的密码子本身具有简并性和特异性,因而可以用来检验不同种属的细菌,甚至是种内细菌。本研究利用针对气单胞菌属 *GyrB* 基因保守区的特异性引物,分析不同沉积物提取 DNA 方法,不断优化实时荧光定量 PCR 反应条件,比较分别以足量高纯度的沉积物样品 DNA 及阳性质粒 DNA 为模板绘制标准曲线建立的实时荧光定量 PCR 方法,从而找出刺参养殖池塘底泥中气单胞菌的快速计数最佳方法,为研究刺参养殖池塘中的微生物生态提供一定的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品制备

研究所用沉积物样品于2012年12月采自山东省青岛市即墨刺参养殖池塘,灭菌沉积物样品制备参照王淑芳等(2011)的灭菌方法:沉积物80℃恒温干燥,研磨成粉末,过200目筛。过筛沉积物高压蒸汽灭菌2h,作为灭菌沉积物样品备用。

1.1.2 菌种来源

实验所用的维氏气单胞菌 *Aeromonas veronii* 菌株由中国水产科学研究院黄海水产研究所海水鱼类养殖与设施渔业研究室鱼病组惠赠,嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 由中国海洋大学海洋生命学院张晓华老师惠赠,6株非气单胞菌属细菌(硝化细菌 *Nitrobacter* sp.、亚硝化单胞菌 *Nitrosomonas* sp.、副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*、假单胞菌 *Pseudomonas* sp.、大肠杆菌 *Escherichia coli*、中度嗜盐属细菌 *Thalassobacillus* sp.)为中国水产科学研究院黄海水产研究所环境微生物实验室分离保存。

1.1.3 主要仪器和试剂

主要仪器: BIO-RAD CFX96 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, 美国)、梯度 PCR 仪(Eppendorf, 德国)、Tanon3500 凝胶成像分析系统、NanoDrop 1000 分光光度计(Nanodrop, 美国)、可调定量移液器(GILSON, 美国)、高速冷冻离心机(Sigma 18K, 德国)。

主要试剂: UltraSYBR Mixture 购自北京康为世纪生物科技公司, DNA 纯化试剂盒、质粒 DNA 小量抽提试剂盒、DNA 凝胶纯化试剂盒均购自生工生物工程(上海)有限公司, 普通 TaqDNA 聚合酶、dNTPs 购自 TaKaRa 公司, 各沉积物 DNA 提取液自行配制(Fortin *et al.* 1998; 黄婷婷等 2004; 傅莲英等 2006)。

1.2 方法

1.2.1 细菌的定量

挑取少许气单胞菌低温保存菌种置于2216E液体培养基中,28℃恒温振荡培养过夜,灭菌生理盐水10倍连续稀释,采用平板培养计数法计算菌液的浓度(CFU/ml)。

1.2.2 沉积物 DNA 的提取

将已知浓度菌液加入灭菌沉积物样品中,且以灭菌沉积物样品为阴性对照,分别采用以下3种方法提取。

改进的粗提沉积物 DNA 的方法见 Fortin 等(1998):在沉积物中加入5ml灭菌蒸馏水,涡旋振荡5min;加入1ml 250 mmol/L Tris-HCl pH 8.0(溶有100 mg 溶菌酶)和4ml DNA 提取液;30℃和37℃先后水浴30min;加入20 μl 蛋白酶 K(100 mg/ml)37℃震荡1h;加入20% SDS 溶液100 μl,85℃水浴30min;5800 r/min 室温离心15min,取上清液加入7.5 mol/L 乙酸铵,冰上放置15min;7600 r/min 4℃离心15min,上清液加入1倍体积的异丙醇-20℃过夜;次日70%和95%的乙醇洗涤后,风干重悬于无菌水(方法1)。

改进的溶菌酶-SDS 温和裂解提取沉积物 DNA 的方法见傅莲英等(2006),该方法沉积物样品需用 TENP 缓冲液重复洗涤3次, DNA 提取缓冲液涡旋震荡5min,溶菌酶37℃水浴1h,SDS 65℃水浴2h,并分别用酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇抽提一次后,加入0.6倍体积异丙醇-20℃过夜,次日70%的乙醇洗涤风干(方法2)。

改进的冻融裂解提取沉积物 DNA 的方法见黄婷婷等(2004),该方法使用酚/氯仿/异戊醇抽提一次,而不是原方法中直接离心收集上清液,之后用氯仿/异戊醇抽提(方法3)。DNA Clean&Concentrator™-25 试剂盒对提取的沉积物 DNA 纯化浓缩。

1.2.3 引物选择

气单胞菌引物采用 Khan 等(2009)根据 *GyrB* 基因的保守区设计的特异性引物。正向引物为 IAF(CT-GAACCAGAACAAGACCCCG),反向引物为 IAR(ATGTTGTTGGTGAAGCAGTA),由生工生物工程(上海)有限公

司合成。

1.2.4 反应体系及反应条件

普通 PCR 采用 50 μl 体系,包括 10 \times PCR Buffer 5 μl 、DNA 2 μl 、dNTPs 4 μl 、 MgCl_2 4 μl 、DNA *Taq* 酶 0.5 μl 、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 3.0 μl 、灭菌双蒸水 28.5 μl 。反应条件为:95 $^\circ\text{C}$ 5 min;94 $^\circ\text{C}$ 30 s,52 $^\circ\text{C}$ 45 s,72 $^\circ\text{C}$ 2 min,30 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 10 min;实时荧光定量 PCR 采用 25 μl 体系,包括 2 \times Ultra SYRB Mixture 10 μl 、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.6 μl 、DNA 2.0 μl 、RNAase-free 水 12.8 μl 。反应条件为:94 $^\circ\text{C}$ 2 min;94 $^\circ\text{C}$ 10 s,55 $^\circ\text{C}$ 10 s,72 $^\circ\text{C}$ 10 s,40 个循环。

1.2.5 质粒标准曲线的绘制

煮沸法获得气单胞菌 DNA,以 IAF 和 IAR 为特异性引物进行普通 PCR 扩增,切胶纯化后的产物连接至 PMD 18-T Vector,转入 TOP10 感受态细胞中。蓝白斑筛选实验挑取白斑,PCR 鉴定完毕后送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序鉴定。鉴定完毕的细胞利用 Plasmid Mini Preparation Kit 提取重组质粒,Nano-drop1000 分光光度计测定质粒 DNA 的浓度,根据已知重组质粒全序列和阿伏伽德罗常数计算出质粒的拷贝数(2.5×10^9 copies/ μl)。取梯度稀释的质粒 DNA 2 μl 进行实时荧光定量 PCR 扩增,以循环阈值(C_T)值和 log 拷贝数绘制质粒标准曲线。

1.2.6 模拟沉积物样品标准曲线的绘制

纯化的沉积物 DNA 梯度稀释作为标准品,IAF 和 IAR 为引物,按照优化的反应体系进行实时荧光定量 PCR 扩增,系统自动收集荧光信号,根据设定的 C_T 值和 log 细菌浓度绘制环境样品标准曲线。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 的特异性检验

利用已建立的实时荧光定量 PCR 方法对两株气单胞菌属细菌和 6 株非气单胞菌属细菌进行检测,检验该方法的特异性。实时荧光定量 PCR 反应后插入溶解曲线,以此分析引物的特异性及所得产物是否为目的产物,进一步验证实时荧光定量 PCR 引物的特异性,反应条件为:95 $^\circ\text{C}$ 15 s;60 $^\circ\text{C}$ 1 min,95 $^\circ\text{C}$ 15 s,60 $^\circ\text{C}$ 15 s。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 的灵敏性检验

将已知浓度的菌液 1 ml 注入模拟沉积物样品中,按照改进的方法 2 进行沉积物 DNA 提取,纯化产物梯度稀释后作为模板,按照优化的反应体系和反应条件,各取 2 μl 分别进行实时荧光定量 PCR 扩增,以期找出该方法对沉积物环境中气单胞菌的检出限。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 的重复性检验

以气单胞菌的模拟沉积物样品 DNA($2.6 \times 10^6 - 2.6 \times 10^3$ CFU/g)为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增,每个浓度设置 3 个重复,记录 C_T 值,统计分析研究实时定量 PCR 方法检验气单胞菌的重复性。

2 结果与分析

2.1 模拟沉积物样品中 DNA 的提取

对提取的沉积物 DNA 进行电泳检测,结果表明,3 种粗提沉积物 DNA 提取方法均能得到 DNA 条带,但存在一定的 RNA 污染,阴性对照均未出现 DNA 条带(图 1)。图 1 表明,阴性对照中 DNA 含量很低,DNA 提取效率有待进一步提高,杂质也需要进一步去除。

2.2 PCR 扩增结果

根据优化的反应体系和反应条件,以气单胞菌属 *GyrB* 基因的特异性引物(IAF 和 IAR)对模拟沉积物样品 DNA 进行普通 PCR 扩增,

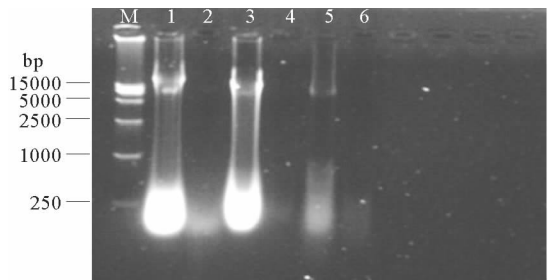


图 1 3 种方法提取的沉积物 DNA 的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of sediment DNA extracted through three methods

M: 15000 bp Marker; 泳道 1, 3, 5 分别为:方法 1、方法 2、方法 3 提取的模拟沉积物样品的 DNA;泳道 2, 4, 6: 分别方法 1、方法 2、方法 3 提取的灭菌沉积物的 DNA

M: 15000 bp Marker; lane 1, 3 and 5: DNA of simulated sediment samples extracted through Method 1, 2 and 3; lane 2, 4 and 6: sterile sediment DNA extracted through Method 1, 2 and 3

2%的琼脂糖电泳检测扩增产物,结果如图2所示,可得到目的片段,且目的产物条带单一,大小为130 bp。

2.3 质粒标准曲线和模拟沉积物样品标准曲线的建立

如图3所示,质粒标准曲线在 $2.5 \times 10^7 - 2.5 \times 10^3$ copies/ μl 具有良好的线性相关性,得出 C_T 值和 log 质粒拷贝数 (copies/ μl) 的线性方程,相关系数 $R^2 = 0.982$,斜率为 -3.506 。利用3种方法粗提的沉积物 DNA 为模板,严重影响了实时荧光定量 PCR 扩增,见图4。当菌量在 $2.6 \times 10^7 - 2.6 \times 10^6$ CFU/g 时,由于含有大量腐殖酸等杂质,严重抑制实时荧光定量 PCR 反应,无 C_T 值出现;而当菌量在 $2.6 \times 10^5 - 2.6 \times 10^3$ CFU/g 时,出现了几乎相同的 C_T 值,说明 DNA 含量的减少影响了检测准确度。可见,沉积物 DNA 中杂质影响到实时荧光定量 PCR 的检出效果,DNA 纯化是检验沉积物中气单胞菌的关键一步。利用 DNA Clean&Concentrator™ -25 试剂盒纯化粗提的沉积物 DNA,再次进行实时荧光定量 PCR 扩增,检出效率明显提高,但方法1和方法3虽然有一定改善,检出效率仍然不高,规律不明显,绘制标准曲线仍较困难。方法2提取的沉积物 DNA 经过纯化后效果非常明显,实时荧光定量 PCR 扩增曲线系统自动给出(图5a),在沉积物菌液量为 $2.6 \times 10^6 - 2.6 \times 10^3$ CFU/g 时,具有较佳的线性关系,可绘制出标准曲线(图5b),斜率为 -3.540 ,相关系数 $R^2 = 0.993$,扩增效率为 91.6%。

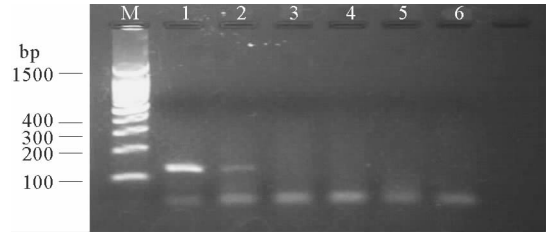


图2 普通 PCR 检测沉积物中气单胞菌的电泳图
Fig. 2 Electrophoresis of the *Aeromonas* cells in sediment with the conventional PCR

M:1500 bp DNA Marker; 条带 1-5:沉积物中气单胞菌的浓度分别为 $10^6 - 10^3$ CFU/g;6:阴性对照

M: 1500 bp DNA Marker; lane 1-5: *Aeromonas* cells in sediment with concentration of $10^6 - 10^3$ CFU/g, respectively; lane 6: negative control

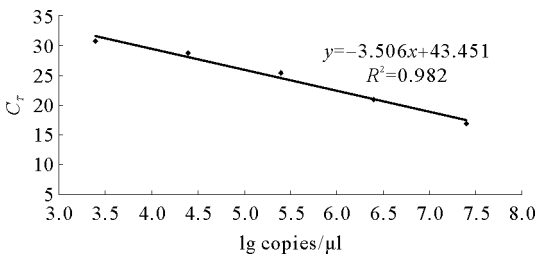


图3 以梯度稀释的质粒($2.5 \times 10^7 - 2.5 \times 10^3$ copies/ μl)为模板构建的标准曲线

Fig. 3 Standard curve based on plasmid with the varying copies ($2.5 \times 10^7 - 2.5 \times 10^3$ copies/ μl) vs the cycle threshold (C_T)

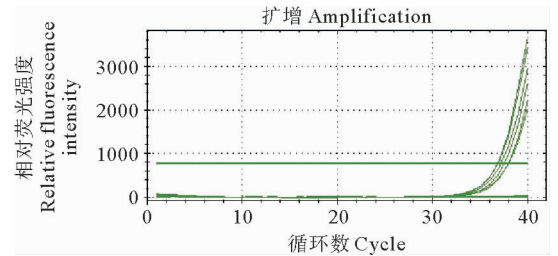


图4 粗提取的沉积物 DNA(方法1)为模板的实时荧光定量 PCR 扩增

Fig. 4 Real-time fluorescent quantitative PCR amplification curve based on crude DNA extracted through Method 1

2.4 特异性试验

采用已建立的实时荧光定量方法特异性检验两株气单胞菌属细菌和6株非气单胞菌属细菌,结果见图6,除两株气单胞菌属细菌外,其他细菌均未出现阳性信号,说明该方法具有较好的特异性。同时,将不同拷贝数的阳性质粒为模板实时荧光定量 PCR 扩增后进行溶解曲线分析,溶解曲线只出现一个特异峰,溶解温度 T_m 为 83°C (图6),无其他非特异性峰出现,从而排除了反应过程中非特异性产物或引物二聚体出现的可能性,同时说明该引物的特异性极好,定量 PCR 的反应条件和反应体系均得到了较好优化,可用于检测环境中气单胞菌属细菌。

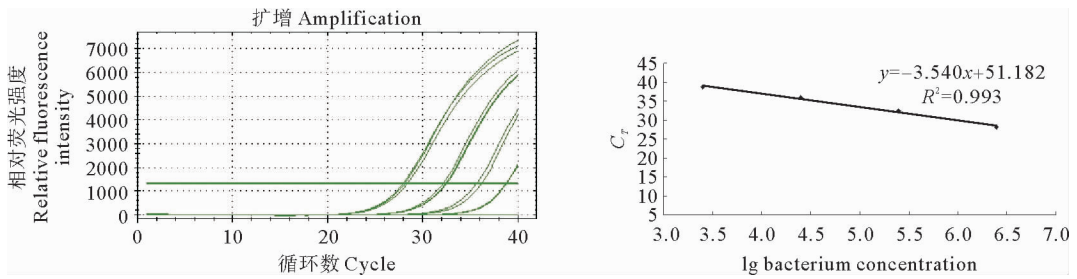


图5 (a) 模拟沉积物样品($10^6 - 10^3$ CFU/g)的实时荧光定量 PCR 标准曲线扩增;
(b) 以梯度稀释的模拟沉积物样品($10^6 - 10^3$ CFU/g)为标准品构建的标准曲线

Fig.5 (a) Real-time PCR amplification signals detecting simulated sediment samples with the varying number of *Aeromonas* cells ($10^6 - 10^3$ CFU/g); (b) standard curve based on simulated sediment samples with known number of cell equivalents ($10^6 - 10^3$ CFU/g) vs the cycle threshold (C_T)

2.5 灵敏性试验

常规 PCR 方法对含有 $2.5 \times 10^7 - 2.5 \times 10^3$ CFU/g 细菌量的沉积物 DNA 进行检测时,发现检出限为 10^6 CFU/g,低于 10^6 CFU/g 时未出现 PCR 产物(图2)。实时荧光定量 PCR 对沉积物中气单胞菌的检出极限为 10^3 CFU/g,敏感性比常规 PCR 高出 1000 倍(图5a),当沉积物中气单胞菌浓度低于 10^3 CFU/g 时,荧光定量 PCR 扩增的重复性和准确度不高,不能准确定量沉积环境中气单胞菌的数量,但弱的荧光信号仍然可以检验出气单胞菌的存在。

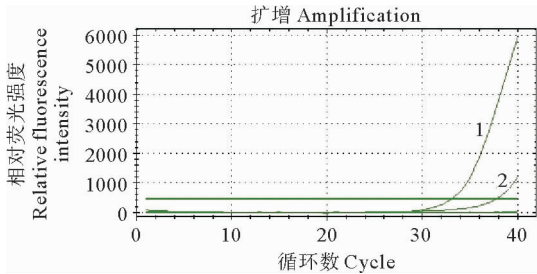


图6 实时荧光定量 PCR 特异性检验的扩增曲线

Fig.6 Real-time fluorescent quantitative PCR amplification curve for specificity assay

1. 嗜水气单胞菌;2. 维氏气单胞菌
1. *A. hydrophila*; 2. *A. veronii*

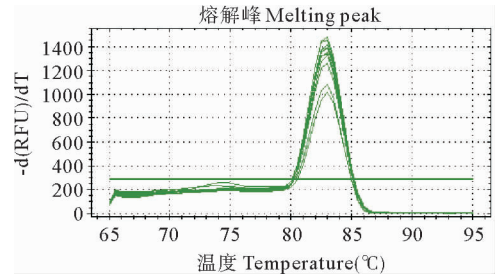


图7 实时荧光定量 PCR 扩增产物的溶解曲线

Fig.7 Real-time fluorescent quantitative PCR melting curve for amplicons

2.6 重复性试验

重复性实验结果显示,各浓度间 C_T 值变异系数 CV 在 0.21% - 0.80% 之间,均小于 5%,表明建立的实时荧光定量 PCR 方法检验环境中气单胞菌属的重复性良好,见表1。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术是目前最为快速和重现性最好的核酸分子定量和定性的检测方法,广泛用于转基因和基因表达研究及疾病检测等领域(刘志勇等 2012)。应用实时荧光定量 PCR 技术对微生物检测,既能定性又能定量,且该技术直接针对基因序列,无需对微生物进行表型鉴定,用于检测微生物较为快速、简便,因此采用实时荧光定量 PCR 技术可快速定量沉积物中气单胞菌属细菌的数量。针对水体中气单胞属细菌的实时荧光定量 PCR 检测方法,国内外均有报道,如王蓉等(2012)以嗜水气单胞菌溶血素基因(*hlyA*)为靶序列设计

表 1 模拟沉积物样品中实时荧光定量 PCR 的重复性检验

Table 1 Repeatability of real-time PCR for detection of simulated sediment samples

细菌浓度 Bacterium concentration (CFU/g)	C_T					
	重复 1 Replicate 1	重复 2 Replicate 2	重复 3 Replicate 3	平均数 Mean	标准差 SD	变异系数 (%) Coefficient of variation
10^6	28.17	28.05	28.44	28.22	0.200	0.71
10^5	32.19	32.45	32.55	32.40	0.186	0.57
10^4	35.47	35.72	36.24	35.91	0.287	0.80
10^3	38.81	38.69	38.85	38.78	0.083	0.21

引物和探针,仅 30 min 即可特异地从病人腹泻物或水产品病变部位中检出嗜水气单胞菌,与本研究最低检出限相当,检出范围为 $5.4 \times 10^3 - 5.4 \times 10^8$ CFU/ml。Yu 等(2008)根据气单胞菌属 16S rRNA 基因序列设计特异性引物,能够快速、特异地检出水体中气单胞菌属细菌,检出限为 20 copies,该方法能够有效地用于污水处理过程中气单胞菌的检测。与水体中总 DNA 提取有所不同,沉积物样品组成复杂,杂质多, DNA 提取步骤较复杂,极大影响了 DNA 提取质量及后续实验分析(赵勇等 2005),使得本研究检出效率低于于昌平等的研究。环境样品中存在众多影响 PCR 扩增的因素,如腐殖酸、腐殖酸样物、酚类化合物、重金属(铁离子等)、不明沉淀物、RNA 和非靶序列 DNA 等,其中以腐殖酸和腐殖酸样物抑制作用最显著(杨瑞馥 2000)。DNA 提取效率受到多方面因素影响,如地理环境、操作条件、实验方法等,在高效裂解细菌细胞的同时,对已经释放的微生物 DNA 不予破坏是提高 DNA 提取效率的关键因素,其中主要受到细胞裂解方式和缓冲液处理两方面的影响(傅莲英等 2006)。方法 1 未去除腐殖酸等抑制因子,基因组 DNA 纯度不高,方法 3 采用反复冻融裂解细胞的方法,对释放的 DNA 造成了一定的机械损伤,影响了提取 DNA 的质量,纯化后均得不到预期效果。方法 2 采用较为温和的 SDS-溶菌酶裂解法,并对温度、裂解时间加以完善,选择 TENP 洗涤缓冲液去除腐殖酸等抑制性杂质,有效裂解细胞的同时获得高质量、高纯度的基因组 DNA。

本研究分别以阳性质粒和模拟沉积物样品 DNA 为标准品构建标准曲线,利用质粒标准曲线可以快速检测刺参养殖池塘底泥中气单胞菌的相对数量,可进行不同地点和不同季节样品间比较,反映其季节变化规律,但不能反应沉积物中气单胞菌的绝对数量变化;而后者根据 C_T 值和模拟沉积物标准曲线可以准确检测沉积物中气单胞菌属细菌的绝对数量,但沉积物样品自身原因导致优化条件较困难(Wilson *et al.* 1997)。本研究将梯度稀释的模拟沉积物样品作为标准品,使标准曲线构建过程与检测环境样品的过程较一致,解决了沉积物 DNA 提取效率影响检测准确度的问题,减少了误差,最大程度保证定量的准确性。然而,该方法以全基因组序列为标准品,相对来说,稳定性比质粒差,保存时间有限,且沉积物中腐殖酸等杂质在 DNA 提取过程中去除不完全而影响检出效率。如何高效提高沉积物 DNA 的质量和纯度将在今后研究中做进一步探讨。灵敏性试验证实该方法的检出限为 10^3 CFU/g,高于普通 PCR 3 个数量级,但同水体中气单胞菌的定量检测方法相比,灵敏度仍较高,今后研究中有待进一步提高。另外,还会对刺参养殖池塘沉积物中气单胞菌属细菌的数量变化做进一步的实际检测,以期找到其周年变化规律。

综上所述,实时荧光定量 PCR 技术定量检测刺参养殖池塘底泥中气单胞菌属是可行的,该方法简便、快速、特异性强、灵敏度高、重复性好,克服了传统方法的弊端,能够有效地运用于生产实践中,对刺参养殖业乃至水产养殖业的病害发生具有一定的预警作用。

参 考 文 献

- 王高学,原居林,赵云奎,袁明. 2007. 刺参表皮溃烂病原菌的分离鉴定与药敏试验. 西北农业大学学报(自然科学版), 35(8): 87-96
 王淑芳,马桂珍,钱媛媛,陈月. 2011. 采用实时荧光定量 PCR 技术比较提取土壤真菌 DNA 方法的差异. 安徽农业科学, 39(33): 20318-20321
 王蓉,王忠发,王志铮,赵蓓蓓,许欣. 2012. 实时荧光定量 PCR 快速检测嗜水气单胞菌方法的建立. 现代预防医学, 39(13): 3339-3341

- 刘志勇, 赵雪涛, 钱子煜. 2012. 金黄色葡萄球菌荧光定量 PCR 计数法的建立. 职业与健康, 28(11): 1307-1310
- 张波, 曾令兵, 罗晓松, 徐进, 肖艺, 周勇. 2010. 青鱼肠道出血症病原菌的分离与鉴定. 华中农业大学学报, 29(5): 607-612
- 沈锦玉, 尹文林, 钱冬, 曹铮, 沈智华, 吴颖蕾, 张念慈. 1999. 养殖鳖主要细菌性疾病病原的初步研究. 浙江海洋学院学报, 18(1): 29-33
- 杨瑞馥. 2000. 从土壤中分离 DNA 的研究进展. 微生物学免疫学进展, 28(2): 57-61
- 赵勇, 周志华, 李武, 刘彬彬, 潘迎捷, 赵立平. 2005. 土壤微生物分子生态学研究总 DNA 的提取. 农业环境科学学报, 24(5): 854-860
- 凌红丽, 陆承平, 陈怀青, 马向东. 1998. 嗜水气单胞菌选择培养基鉴别效果的比较. 中国兽药杂志, 32(4): 6-9
- 黄婷婷, 曹慧, 王兴祥, 崔中利. 2004. 一种土壤微生物总 DNA 的高效提取方法. 土壤, 36(6): 662-666
- 傅莲英, 席峰, 袁建军, 王桂忠, 田蕴, 郑天凌. 2006. 海水养殖沉积环境微生物总 DNA 的提取方法研究. 厦门大学学报(自然科学版), 45(6): 841-846
- Fortin N, Fulthorpe RR, Allen DG and 1 other. 1998. Molecular analysis of bacterial isolates and total community DNA from kraft pulp mill effluent treatment systems. Can J Microbiol 44(6):537-546
- Joseph SW, Carnahan AM, Brayton PR and 5 others. 1991. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. J Clin Microbiol 29(3):565-569
- Lopez-Gutierrez JC, Henry S, Hallet S and 3 others. 2004. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. J Microbiol Methods 57(3):399-407
- Kasai H, Watanabe K, Gasteiger E and 4 others. 1998. Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria. Genome Inform Ser Workshop Genome Inform 9:13-21
- Khan IU, Loughborough A, Edge TA. 2009. DNA-based real-time detection and quantification of aeromonads from fresh water beaches on Lake Ontario. J Water Health 7(2):312-323
- Mastan SA, Qureshi TA. 2001. Role of bacteria in the epizootic ulcerative syndrome (EUS) of fishes. J Environ Biol 22(3):187-192
- Sechi IA, Deriu A, Falchi MP and 2 others. 2002. Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from patients with diarrhea. J Appl Microbiol 92(2):221-227
- Wahli T, Burr SE, Pugovkin D and 2 others. 2005. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis*. J Fish Dis 28(3):141-150
- Wilson IG. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 63(10):3741-3751
- Yu CP, Farrell SK, Robinson B and 1 other. 2008. Development and application of real-time PCR assays for quantifying total and *aerolysin* gene-containing *Aeromonas* in source, intermediate, and finished drinking water. Environ Sci Technol 42(4):1191-1200

《渔业科学进展》动态

(1) DOI 注册 《渔业科学进展》已加入“中文 DOI”服务,获得出版机构会员资格。本刊可为 2013 年第 6 期以来已出版的论文注册 DOI。

(2) 版式改动 《渔业科学进展》的版式从 2014 年第 4 期开始,由现在的通栏改为双栏。

《渔业科学进展》编辑部

2014 年 6 月 20 日