

基于四种水产病原弧菌的简型芯片检测体系的优化^{*}

朱鹏飞¹, 李 壹^{1,2}, 王宗灵¹, 曲凌云^{1*}

(1. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘 要: 基因芯片技术在病原菌检测领域展现出良好的前景, 本文依托水产病原菌基因检测芯片的检测体系, 以水产常见病原弧菌的 *hsp60*、*toxR* 基因检测探针为研究对象, 系统研究不同点样液配方、寡核苷酸探针浓度、荧光标记物质浓度、杂交温度、杂交时长对芯片杂交效果的影响, 并进行相应优化。结果表明, 杂交温度为 60 ℃、杂交时长为 2 h、探针浓度为 1 μmol/L、Cy3 标记的随机引物的用量为 150 pmol 时, 芯片的经济性、灵敏度、检测效率达到均衡; 以 0.1 mol/L 磷酸氢二钠和 25% 二甲基亚砷混合溶液作为点样液, 效果较好。优化后的芯片对 4 种弧菌的检测没有出现交叉杂交现象, 探针特异性达到 100%; 对溶藻弧菌全基因组 DNA 检测灵敏度为 10 fg, 高出 PCR 方法约 2 个数量级。

关键词: 弧菌; 基因芯片; 点样液; 优化

中图分类号: Q503; Q93-332; S917.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-6647(2015)02-0257-13

基因芯片(DNA microarray)检测技术自 20 世纪 80 年代开创以来以其灵敏度高、检测周期短、自动化水平高、可扩展性强的特点被广泛应用于多个领域。在水产养殖行业 and 食品微生物检测领域, 由于微生物检测种类复杂多样, 故利用基因芯片技术进行微生物检测的研究也越来越多。2004 年, Panicker 等^[1] 构建了可同时检测扇贝中的霍乱弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌的基因芯片; 2012 年, Shi 等^[2] 根据 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因构建了 8 种水产病原菌的种特异基因的检测芯片。然而, 由于基因芯片的一些技术特点导致基因芯片目前仍停留在实验室研究阶段, 要达到应用的目标仍有很多问题需要解决^[3]: 首先, 基因芯片检测需要专门的点制、扫描设备, 且需要经过修饰的探针和荧光标记物质, 这使得整个检测流程步骤复杂, 经济性、便捷性成为制约其实际运用的一大瓶颈; 其次, 探针和目的基因片段的杂交动力学过程复杂, 杂交效果受探针的长度和结构、杂交空间位阻、杂交温度和时长等条件的影响^[4], 且由于点制在同一芯片上的不同探针的退火温度(T_m)、探针长度等参数彼此不同, 因此需要根据芯片类型和探针特点摸索最佳的杂交条件; 再次, 水产环境中的病原微生物尤其是弧菌属各菌种的进化关系紧密, 16S rRNA 基因、23S rRNA 基因及其中间序列的序列相似度极高, 仅依靠其作为探针容易出现假阳性结果^[5]。

本研究初步构建了以 4 种弧菌的种特异性基因和毒力相关基因为检测对象的基因芯片检测体系。利用此体系来检验杂交温度、杂交时长、探针浓度及荧光标记物质浓度对芯片杂交效果的影响, 为芯片的经济性、便捷性优化提供理论支持。同时, 对芯片的点样液配方进行了比较及优化, 为提高基因芯片的实际运用性能提供数据。

^{*} 收稿日期: 2014-07-24

资助项目: 国家海洋局海洋公益性行业科研专项——重要鱼类增养区致病细菌基因芯片检测技术研究开发与示范(201105007-1); 国家科技支撑计划——海洋水产病毒实用化检测及预警技术的建立与应用(2012BAD17B01)

作者简介: 朱鹏飞(1989-), 男, 河南永城人, 硕士研究生, 主要从事海水养殖动物病原微生物学研究. E-mail: zpf@fio.org.cn

^{*} 通讯作者: 曲凌云(1975-), 女, 山东荣成人, 研究员, 博士, 主要从事海水养殖动物病原微生物学与海洋微生物学研究。

E-mail: qly@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

1 材料和方法

1.1 菌株来源和全基因组 DNA 提取

本研究使用的菌株保存于国家海洋局第一海洋研究所免疫与疾控实验室的近海微生物资源库。其中创伤弧菌 *Vibrio vulnificus* VIB310、拟态弧菌 *V. minnemicus* VIB298 由中国海洋大学张晓华教授馈赠,鳎弧菌 *V. anguillarum* MVM425 由华东理工大学张元兴教授馈赠,溶藻弧菌 *V. anguillarum* CGMCC1.1607、哈维弧菌 *V. harveyi* CGMCC1.1601、副溶血弧菌 CGMCC1.1997 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (Omega) 提取细菌全基因组 DNA,并用分光光度计测定提取的 DNA 浓度,−20 ℃ 保存备用。

1.2 引物和探针的设计

根据 GenBank 数据库中多种弧菌的热休克蛋白编码基因 *hsp60* 的基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计针对弧菌 *hsp60* 基因的简并引物,引物序列见表 1。使用 ClustalX 2.0 和 MEGA 5.0 软件对多种弧菌的 *hsp60* 基因、跨膜转运蛋白编码基因 *toxR* 的基因序列进行序列比对分析,选择弧菌种间的特异区段,使用 AlleleID 7.0 软件设计探针,探针要求选自序列的高可变区、长度约为 30~50 个脱氧核糖核苷酸碱基 (nt)、解链温度 (T_m) 约 60 ℃、GC 含量为 40%~60%,另在 5' 端使用氨基修饰。使用 NCBI 的在线 BLAST 工具检测所设计探针的特异性,以避免非特异性杂交。引物和探针均交由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 实验中用到的引物序列
Table 1 Primers used in this study

引物名称	目标菌株	扩增基因	引物序列 (5'-3')	扩增片段 长度/bp	退火温度 /℃	对应探针 编号	序列来源
toxRvp	副溶血弧菌	<i>toxR</i>	F: GTCTTCTGACGCAATCGTTG R: ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	350	58	vp-toxR	张蔚 ^[6]
toxRva	溶藻弧菌	<i>toxR</i>	F: TCAAACGTAGCTGTGCTTCG R: ATGCGTTAGAGATCAGCTCG	1 600	58	va-toxR	CHEN 等 ^[7]
toxRvh	哈维弧菌	<i>toxR</i>	F: TTCTGAAGCAGCACTCAC R: TCGACTGGTGAAGACTCA	590	55	vh-toxR	姚东瑞等 ^[8]
VIB-hsp60	弧菌	<i>hsp60</i>	F: ACAACAGCAACGGTACTAGC R: CAACCTTTCACGATGCCAC	600	55	va-hsp60, vp-hsp60, vv-hsp60	本实验

1.3 多重 PCR 扩增和标记

以溶藻弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌的全基因组 DNA 为模板,扩增 *hsp60*、*toxR* 基因片段。多重 PCR 扩增体系为:10×PCR reaction buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2 μL,2.5 mmol/L dNTP 4 μL, *Taq* DNA 聚合酶 2 U,待检样品全基因组 DNA 100 ng,VIB-hsp60 正反向引物均 8 pmol,其余正反向引物均各 10 pmol,双蒸水补足 25 μL。PCR 反应的条件为:94 ℃ 7 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,以上 3 个步骤循环 35 次;72 ℃ 7 min,4 ℃ 保存。

构建荧光标记 PCR 体系:PCR 产物 5 μL,100 μmol/L Cy3 标记的随机引物 1.5 μL,双蒸水补足 19 μL,上述混合物经 95 ℃ 变性 3 min,置于冰上冷激 3 min;加入 Klenow 酶 1 μL,10×Klenow buffer 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTP mixture 2.5 μL。PCR 标记反应的条件为:37 ℃ 90 min,72 ℃ 10 min。−20 ℃ 保存备用。

1.4 基因芯片的制备

使用 1×TE 缓冲液将合成的探针浓度稀释至 10 μmol/L,与点样液 (晶芯,上海博奥) 等比例混合。使

用芯片点制仪(Nanoplotter 1.0,GeSiM)、Nano 级点样针点制探针于醛基芯片(百奥)上,点制参数为每张芯片 4 个阵列,每个阵列包括 4×7 共 28 个点,点制 6 种检测探针,1 种阳性质控探针,每种探针重复点样 3 次,点间距为 1 mm,点样阵列见图 1。

点制之后的芯片放置于 37 ℃湿盒内,水合杂交 12 h,使用 0.2% SDS 清洗,0.2% NaBH₄封闭,清洗甩干。

PC	va-hsp60	va-hsp60	va-hsp60	va-toxR	va-toxR	va-toxR
PC	vp-hsp60	vp-hsp60	vp-hsp60	vp-toxR	vp-toxR	vp-toxR
PC	vh-hsp60	vh-hsp60	vh-hsp60	vv-toxR	vv-toxR	vv-toxR
PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC

注:PC 为阳性质控探针;va-hsp60, vp-hsp60, vv-hsp60 分别为溶藻弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌的 *hsp60* 基因检测探针;va-toxR, vp-toxR, vh-toxR 分别为溶藻弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌的 *toxR* 基因检测探针

图 1 基因芯片点样阵列

Fig. 1 Spotting array of DNA microarray

1.5 不同芯片点样液的效果探究

以溶藻弧菌的 va-hsp60 探针(5 μmol/L)为实验对象,分别使用 24 种不同的点样液配方(表 2)与之混合点制芯片,检测菌液浓度为 4×10⁷ CFU/mL 的溶藻弧菌。根据杂交荧光信号强度、杂交点的完整度、有无漂散等条件筛选出较优的点样液配方。

对初次试验效果较好的配方进行更优浓度配比筛选,设置 13 种不同浓度梯度的配方(表 2),仍按照上述检测流程进行杂交实验,筛选较优配方。

表 2 本实验设计的点样液配方

Table 2 Formulas of different spotting solutions

编 号	配制方法	编 号	配制方法	编 号	配制方法
配方 1	0.5×晶芯点样液 (加 1×TE 缓冲液)	配方 14	25% DMSO	配方 26	5% DMSO+0.01 mol/L Na ₂ HPO ₄
配方 2	0.2×晶芯点样液 (加 1×TE 缓冲液)	配方 15	1×TE 缓冲液(pH=8.0)	配方 27	5% DMSO+0.1 mol/L Na ₂ IIPO ₄
配方 3	0.1×晶芯点样液 (加 1×TE 缓冲液)	配方 16	0.05 mol/L Na ₂ HPO ₄ ^[11]	配方 28	5% DMSO+1 mol/L Na ₂ HPO ₄
配方 4	0.5×晶芯点样液 (加 0.3 mol/L Na ₂ HPO ₄)	配方 17	0.01 mol/L Na ₂ HPO ₄	配方 29	12.5% DMSO+0.001 mol/L Na ₂ HPO ₄
配方 5	0.2×晶芯点样液 (加 0.3 mol/L Na ₂ HPO ₄)	配方 18	1×晶芯点样液	配方 30	12.5% DMSO+0.01 mol/L Na ₂ HPO ₄
配方 6	0.1×晶芯点样液 (加 0.3 mol/L Na ₂ HPO ₄)	配方 19	0.3 mol/L NaHCO ₃ + 3 mol/L 甜菜碱	配方 31	12.5% DMSO+0.1 mol/L Na ₂ HPO ₄
配方 7	2.5% DMSO+0.135 mol/L Na ₂ HPO ₄	配方 20	0.3 mol/L Na ₂ IIPO ₄ + 3 mol/L 甜菜碱	配方 32	12.5% DMSO+1 mol/L Na ₂ HPO ₄
配方 8	12.5% DMSO+0.075 mol/L Na ₂ HPO ₄	配方 21	3×SSC+3 mol/L 甜菜碱 ^[12]	配方 33	25% DMSO+0.001 mol/L Na ₂ HPO ₄
配方 9	22.5% DMSO+0.015 mol/L Na ₂ HPO ₄	配方 22	0.1 mol/L Na ₂ HPO ₄ + 3 mol/L 甜菜碱	配方 34	25% DMSO+0.01 mol/L Na ₂ HPO ₄
配方 10	0.3 mol/L NaHCO ₃	配方 23	25% DMSO+0.75 mol/L 甜菜碱	配方 35	25% DMSO+0.1 mol/L Na ₂ HPO ₄
配方 11	0.3 mol/L Na ₂ HPO ₄	配方 24	25% DMSO+1.5 mol/L 甜菜碱	配方 36	50% DMSO+0.001 mol/L Na ₂ HPO ₄
配方 12	0.1 mol/L Na ₂ IIPO ₄ ^[9]	配方 25	5% DMSO+0.001 mol/L Na ₂ IIPO ₄	配方 37	50% DMSO+0.01 mol/L Na ₂ IIPO ₄
配方 13	50% DMSO ^[10]				

注:配方 1~24 为初次点样液实验配方;配方 25~37 为进一步优化的点样液实验配方

1.6 芯片的杂交及检测

在芯片探针区加入预杂交混合液($V_{\text{预杂交液}} : V_{100 \mu\text{g/ml 变性鲑精DNA}} = 1 : 10$),加样量 $10 \mu\text{L}/\text{cm}^2$, 60°C 湿盒中预杂交 1 h,离心甩干。配制杂交混合液:将杂交液与荧光标记产物按 $V_{\text{杂交液}} : V_{\text{荧光标记产物}} = 1 : 1$ 比例混合,加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 阳性质控 $1 \mu\text{L}$, 95°C 变性 3 min,置于冰上冷激 3 min。在基因芯片的点样区加入杂交混合液,置于 60°C 湿盒中杂交 2 h。使用洗液 I ($1\times\text{SSC}$ 、 0.2% SDS)、II ($0.2\times\text{SSC}$)、III ($0.1\times\text{SSC}$) 各清洗 15 min,离心甩干。使用 GenePix Pro 4000B 微阵列扫描仪进行扫描,扫描波长为 532 nm,饱和荧光信号值为 65 535。使用 GenePix Pro 6.0 软件对扫描图像进行分析,检测阵列中各点的荧光信号强度和信噪比(Signal Noise Rate, SNR)。

1.7 芯片杂交条件探究

由于 1.2 节中所设计的多条探针的解链温度不同,但是需要在相同杂交温度下杂交,因此需要设置梯度杂交温度来确定最优的杂交温度。分别设置 $42, 50, 55, 60, 65, 70^\circ\text{C}$ 的杂交温度梯度,基因芯片点样阵列如图 2 所示,其他杂交条件与 1.6 节所述保持一致,进行芯片杂交检测荧光信号值,以确定同一芯片上不同探针的最优杂交温度。

分别设置 0.5, 1, 2, 4 h 的杂交时长梯度,使用 1.4 节中构建的基因芯片分别检测创伤弧菌的 *hsp60* 基因、溶藻弧菌的 *hsp60* 基因、哈维氏弧菌的 *toxR* 基因。其他杂交条件与 1.6 节所述保持一致,进行芯片杂交检测荧光信号值,确定最优杂交时长。

va-hsp60	va-toxR	vh-toxR	vv-hsp60
va-hsp60	va-toxR	vh-toxR	vv-hsp60
va-hsp60	va-toxR	vh-toxR	vv-hsp60
vp-hsp60	vp-toxR	PC	
vp-hsp60	vp-toxR	PC	
vp-hsp60	vp-toxR	PC	

注:空白处无探针;PC 为阳性质控探针;va-hsp60 为溶藻弧菌 *hsp60* 基因探针;vp-toxR 为溶藻弧菌 *toxR* 基因探针;vp-hsp60 为副溶血弧菌 *hsp60* 基因探针;vp-toxR 为副溶血弧菌 *toxR* 基因探针;vh-toxR 为哈维氏弧菌 *toxR* 基因探针;vv-hsp60 为创伤弧菌 *hsp60* 基因探针

图 2 不同杂交温度实验所用基因芯片

Fig. 2 Spotting array of DNA microarray for hybridization duration

1.8 芯片经济性优化

以溶藻弧菌的 *hsp60* 基因为实验对象,使用 DNA 质量浓度分别为 $0.15, 1.5, 15, 150 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的 PCR 产物与 $37.5, 75, 150, 300 \text{ pmol}$ 的 cy3 标记的随机引物进行 1.3 节中的荧光标记 PCR 反应。对标记产物分别使用浓度为 $0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 \mu\text{mol/L}$ 的 va-hsp60 探针进行杂交检测,根据荧光信号强度与 PCR 产物浓度、cy3 标记的随机引物浓度及 va-hsp60 探针浓度之间的变化关系,在保证荧光信号可检出、对芯片灵敏度影响不大的前提下,选择较为经济的试剂用量。

1.9 优化后的芯片特异性和灵敏性检测

使用经过优化后的基因芯片检测流程对 1.3 节中不同弧菌的 *hsp60*、*toxR* 基因扩增片段的荧光标记产物分别进行杂交检测,用于评价芯片的特异性。

对 1.1 节中提取的溶藻弧菌 CGMCC 1.1607 全基因组 DNA 按照 10 倍梯度稀释至 $100 \text{ ag}/\mu\text{L}$,并进行 PCR 扩增,同时按照上述杂交步骤对不同稀释度组使用芯片进行检测。

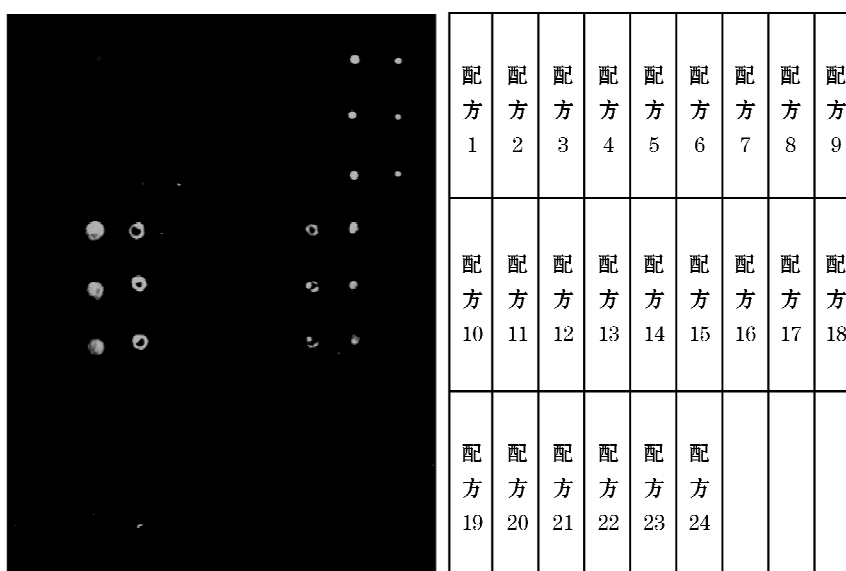
1.10 统计分析

采用 SPSS 20 统计软件,对实验结果进行显著性差异分析,显著性水平等于 5%。

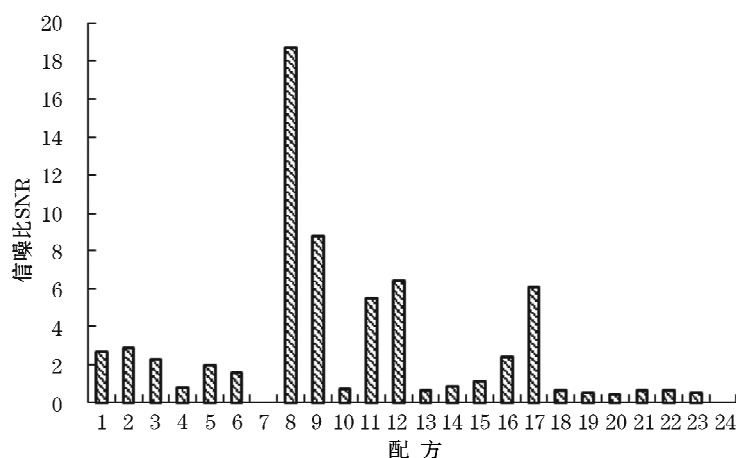
2 结 果

2.1 不同点样液的杂交效果

初次试验了 24 种点样液对探针、荧光信号的影响(图 3)。当探针浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时,配方 8,9,11,12,16,17 的荧光信号较强。结合探针点的完整度、探针点直径、杂交信号强度、有无漂散情况,优选出二甲基亚砜(DMSO)和 Na_2HPO_4 的混合液浓度梯度配方进行进一步的探究。设置 13 组 DMSO 溶液与 Na_2HPO_4 溶液的混合液浓度梯度配方,配制点样液进行杂交检测。如图 4 所示,0.1 mol/L Na_2HPO_4 和 25% DMSO 混合时 va-hsp60 探针的杂交信号强度更高。



(a)不同点样液点样阵列和扫描图像



(b)不同点样液的杂交信号信噪比

图 3 不同点样液对 va-hsp60 杂交结果的影响

Fig. 3 Results of hybridization on DNA microarray assay for different spotting solutions mixed with probe va-hsp60

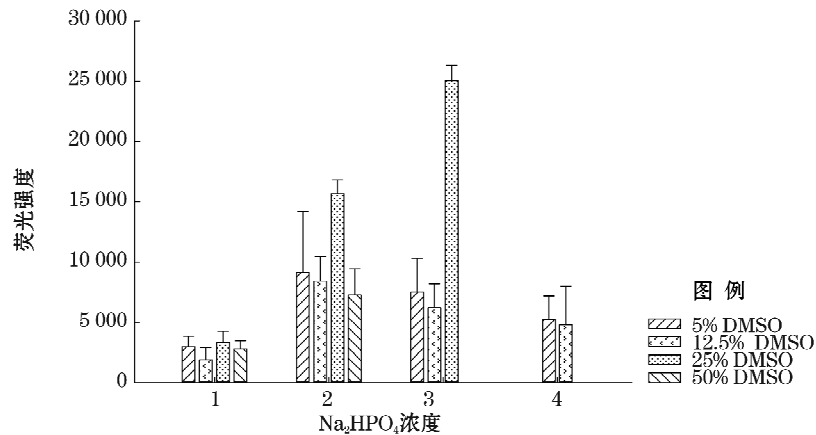
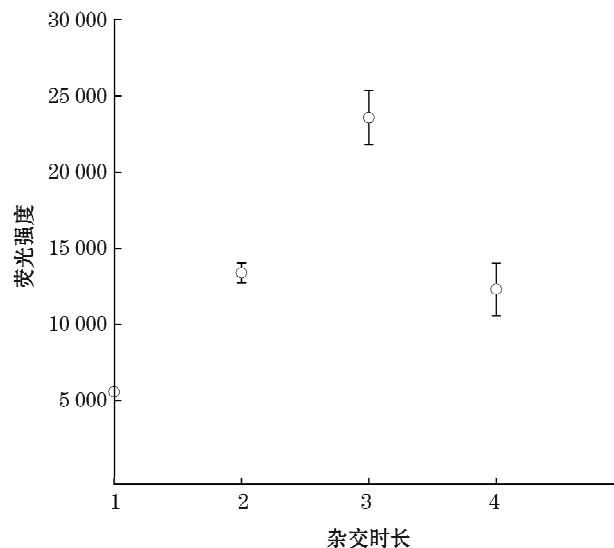


图 4 不同浓度梯度的 DMSO 与 Na_2HPO_4 混合液的杂交结果

Fig. 4 Results of hybridization on DNA microarray with a mixed spotting solution of DMSO and Na_2HPO_4

2.2 杂交时长对芯片检测的影响

不同杂交时长对溶藻弧菌 *hsp60* 基因的芯片检测效果的影响如图 5 所示,当杂交时长小于 2 h 时,检测到的荧光强度值随杂交时长的增加而增加;当杂交时长大于 2 h 时,芯片的荧光强度呈现降低趋势;杂交时长为 2 h 时,芯片的荧光强度最高。由此可知,杂交时间越长,探针所结合的荧光标记产物越多,检测到的荧光信号强度越高,更容易检测出微量的目的基因。但当杂交时长超过一定限度(在本文中为 2 h)时,荧光染料会受到光漂白、氧化等外部条件的影响造成检测出的荧光信号强度下降。综合考量,选择 2 h 作为较优杂交时长。



注:1~4 分别代表杂交时长为 0.5, 1, 2, 4 h

图 5 不同杂交时长条件下 *va-hsp60* 探针杂交信号的荧光信号强度

Fig. 5 Fluorescence intensities of probe *va-hsp60* hybridized for different periods of time

2.3 杂交温度对芯片检测的影响

不同杂交温度对不同探针杂交效果的影响如图 6 所示,4 种探针的荧光信号强度随杂交温度的升高均呈现降低的趋势。不同杂交温度下,基因芯片检测创伤弧菌 *hsp60* 基因的扫描结果如图 7 所示(另两种结果类似故未列),当杂交温度为 42 °C 时,最左一列的 *va-hsp60*, *vp-hsp60* 探针出现非特异性信号,但随着杂交

温度升高,该非特异信号逐渐减弱至消失;而作为检测目标的 *vv-hsp60* 探针的杂交信号在 42 ℃ 时接近饱和,随杂交温度升高而逐渐降低,综合目标探针和非特异探针的杂交情况,选择 60 ℃ 作为最适杂交温度。

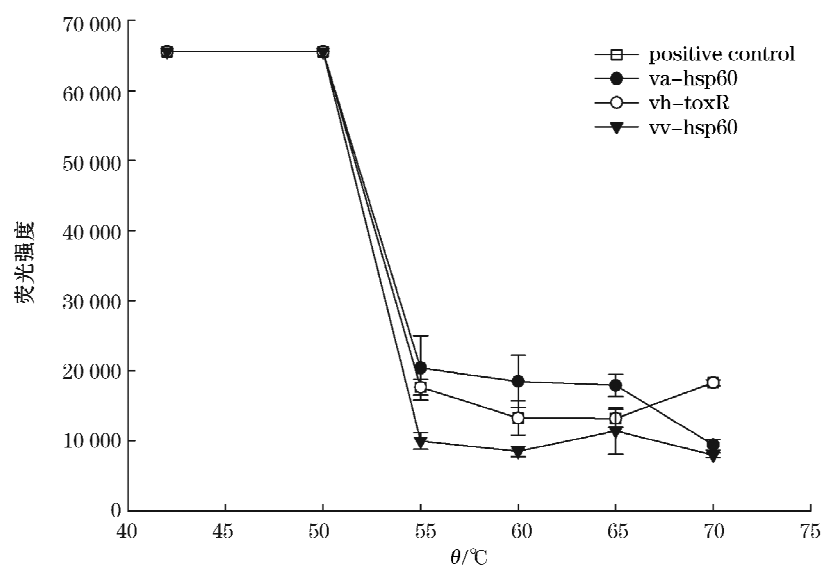


图 6 不同杂交温度条件下 *va-hsp60*, *vh-toxR*, *vv-hsp60* 三种探针杂交荧光信号强度

Fig. 6 Fluorescence intensities of *va-hsp60*, *vh-toxR* and *vv-hsp60* hybridized at different temperatures

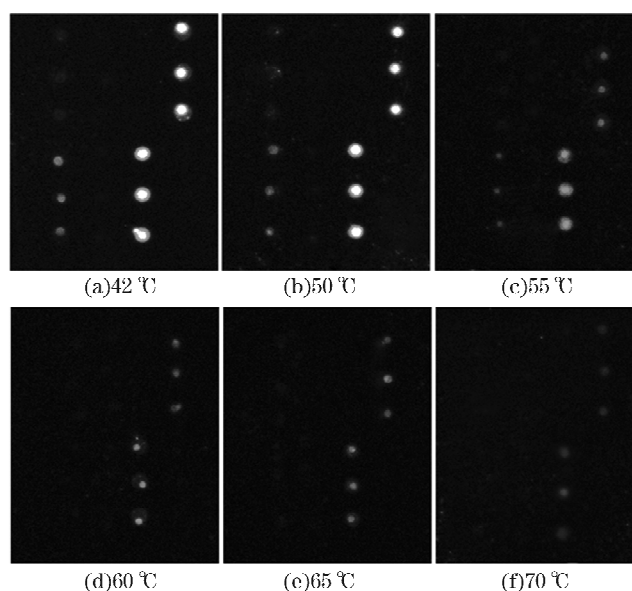


图 7 不同杂交温度条件下基因芯片的杂交情况

Fig. 7 Results of probe *vv-hsp60* hybridized in different temperatures

2.4 芯片经济性优化

以溶藻弧菌的 *hsp60* 基因为实验对象,对探针、PCR 产物、Cy3 标记的随机引物设置浓度梯度分别进行芯片检测,以探究杂交信号强度同以上三者之间的关系(图 8)。当探针浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$ 时,芯片最低可以检测浓度介于 0.15~1.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 之间 PCR 产物;当 PCR 产物浓度较高时(大于 15 $\text{ng}/\mu\text{L}$),使用 300 pmol 和 150 pmol 的 Cy3 标记的随机引物均可使杂交信号饱和;当 PCR 产物浓度较低时(1.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$),使用 150

pmol 的 Cy3 标记的随机引物荧光信号强度仍在 20 000 左右, 足以满足检测需求。因此, 选择 150 pmol 作为 Cy3 标记的随机引物的实验标准用量。

如图 9 所示, 当 Cy3 标记的随机引物浓度为 150 pmol 时, 芯片的荧光强度信号随探针浓度的降低呈现非线性的降低趋势。当探针浓度在 $0.25 \sim 8 \mu\text{mol/L}$ 的范围内时, 除 $15 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 浓度组外, 其他浓度组芯片的信号强度变化均不大, 而且当 PCR 产物质量浓度为 $15 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 时, 探针浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 时, 信号强度仍为 35 000 左右, 可以满足检测需求。因此选择 $1 \mu\text{mol/L}$ 作为探针的实验标准浓度。

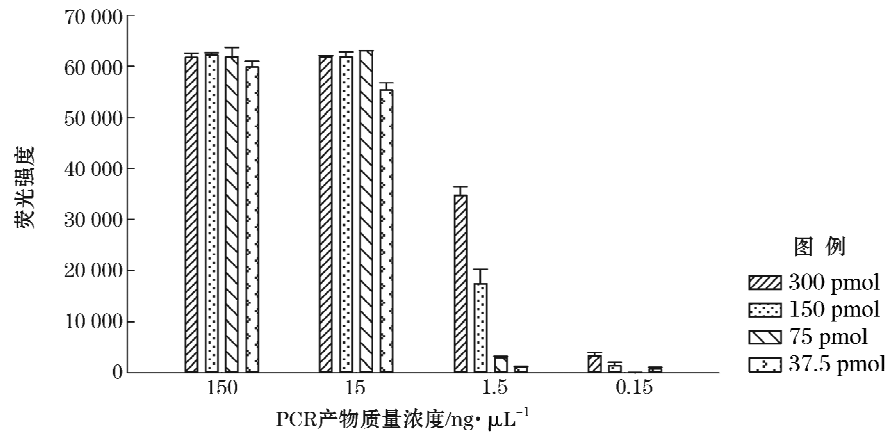
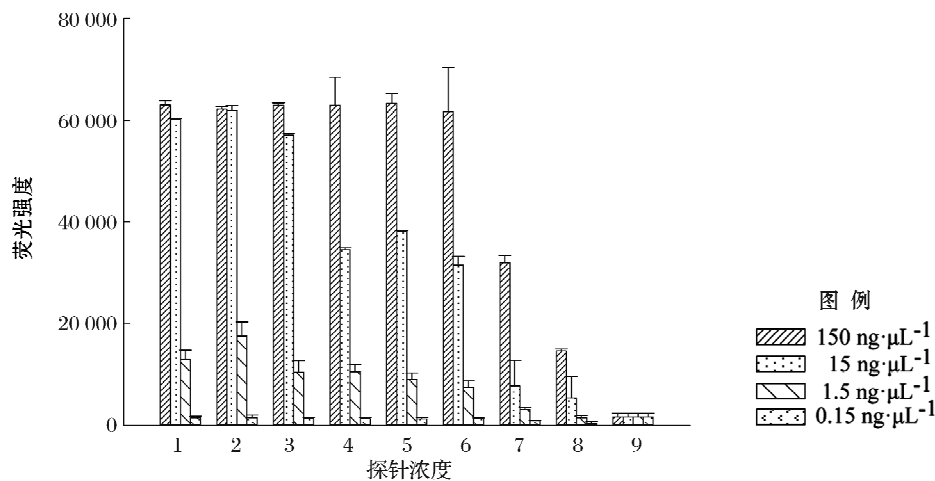


图 8 探针浓度为 $4 \mu\text{mol/L}$ 时, 不同浓度的 PCR 产物与 Cy3 标记的随机引物的标记产物的荧光信号强度

Fig. 8 Fluorescence intensity of labeled products of different concentrations PCR products with Cy3-random primer when the concentration of probe was $4 \mu\text{mol/L}$



注: 1~8 分别代表探针浓度为 $8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 \mu\text{mol/L}$; 9 代表空白

图 9 Cy3 标记的随机引物为 150 pmol 时, 不同浓度的模板 DNA 与探针的杂交荧光信号强度

Fig. 9 Fluorescence intensity of different concentrations of template DNA hybridized with probe when the Cy3-random primer was 150 pmol

2.5 优化后的芯片特异性检验

以副溶血弧菌、溶藻弧菌、哈维弧菌、创伤弧菌、鳃弧菌(未列)、拟态弧菌(未列)的 *hsp60* 基因、*toxR* 基因扩增片段的荧光标记产物与芯片各个阵列分别进行杂交。如图 10 所示, 所设计的探针的特异性良好, 只与目的菌种的基因结合, 未与近似弧菌的基因发生非特异性杂交。

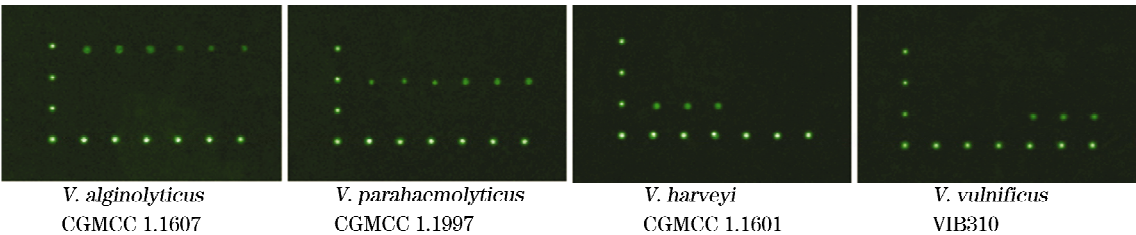
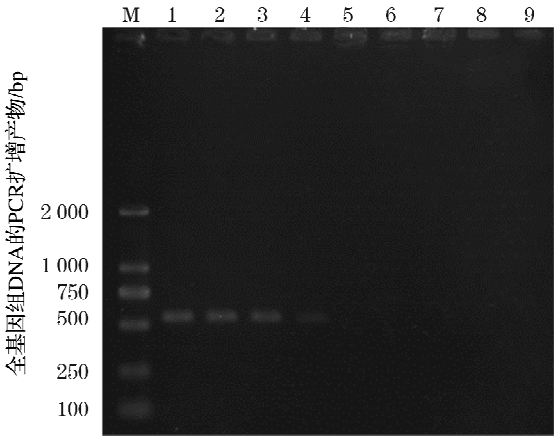


图 10 芯片特异性杂交检测结果

Fig. 10 Results of specificity test of DNA microarray for 4 pathogenic Vibrios

2.6 优化后的芯片灵敏度检测

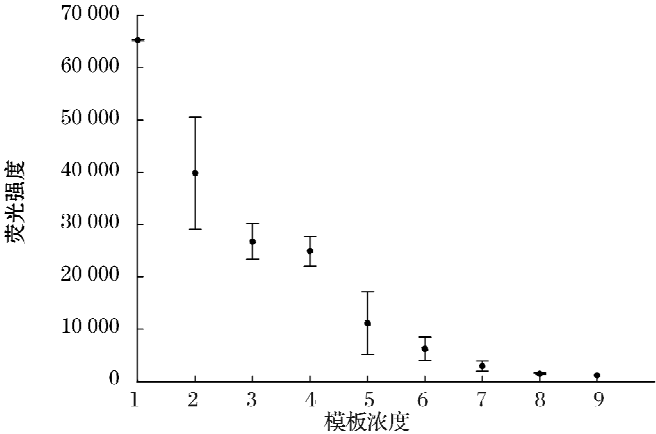
对溶藻弧菌的全基因组 DNA 进行梯度稀释,进行 PCR 扩增、电泳检测,并按照上述芯片检测流程对不同的稀释组进行检测。结果显示,PCR 扩增并通过琼脂糖凝胶的检测方法的检出限约为 1 pg 全基因组 DNA(图 11),而芯片可以检测出低至 10 fg 的全基因组 DNA(图 12)。对 10 fg 全基因组 DNA 的杂交荧光强度与阴性对照组进行差异显著性分析,得出 10 fg 全基因组 DNA 的杂交荧光强度与对照组之间的差异显著($P<0.05$)。



注:泳道 M 为 DS™ 2000 DNA Marker;泳道 1~8 分别为 1 ng,100 pg,10 pg,1 pg,100 fg,10 fg,1 fg,100 ag 溶藻弧菌全基因组 DNA;泳道 9 为阴性对照。

图 11 梯度浓度溶藻弧菌的全基因组 DNA PCR 检测结果

Fig. 11 Sensitivity of PCR assay in detecting whole genome DNA of *V. alginolyticus*



注:1~8 分别代表模板浓度为 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag;9 为空白

图 12 梯度浓度溶藻弧菌的全基因组 DNA 基因芯片检测结果

Fig. 12 Sensitivity of DNA microarray assay in detecting whole genome DNA of *V. alginolyticus*

3 讨论

水产养殖动物自身的微生物种群结构复杂,其和养殖环境中的菌种共同作用影响养殖动物健康状态,此外水产环境还存在多种菌种共感染的现象,因此需要检测通量高、检测效率高的检测方法提前预警、快速诊断^[2,13]。目前,传统的生理生化鉴定方法较为可靠,但过程繁琐、费时费力,难以检测处于“活的不可培养状态”(VBNC)的细菌^[14]。PCR 技术检测手段多样,但其检测灵敏度往往受限于琼脂糖凝胶的灵敏度^[15],且检测大量、复杂样本的能力有限。针对特定病原菌表面抗原的免疫检测技术特异性高、便携性好,但也存在检测菌种单一的问题^[16]。

基因芯片技术是基于碱基互补配对原则,通过固定于固相载体的核苷酸序列识别结合特定基因序列。从最早的使用放射性同位素标记的大型芯片(如 Southern blotting)到平面芯片(如硅质玻片),再到三维芯片(如悬浮微珠芯片),其自动化水平、检测效率和灵敏度已经取得巨大的进步^[17]。其中点阵打印平面芯片的打印密度已可以达到每张芯片 30 000 个点甚至更多,如此巨大的检测通量潜力对于检测复杂样本中多样化的 DNA 优势明显^[18]。

基因芯片检测技术的能力在实验室条件下已经得到验证,但制约其推广应用的因素之一就是经济性不佳。基因芯片中的点样液、经过修饰的探针和荧光标记物是要长期大量使用的耗费品,成本较高。本文研究了检测芯片的荧光信号强度同探针浓度、荧光标记物浓度、模板 DNA 浓度三者之间的关系,发现在一定范围内,芯片的荧光信号强度同三者均大致呈线性关系,这和 Breslauer 等^[19]、Santalucia^[20] 构建的杂交动力学模型预测的结果一致,这就为合理降低探针、荧光标记物的使用量提供了理论基础。在不至于影响灵敏度的前提下,荧光标记物的建议使用量为 150 pmol,探针的建议浓度(1 $\mu\text{mol/L}$)较已有报道的最低探针浓度^[21]减少了三分之一。

点样液直接影响探针在芯片的固定率、探针承载量,进而影响芯片的检测灵敏度和检测通量。Dawson^[21]曾将 3~4 $\mu\text{mol/L}$ 的寡核苷酸探针溶于 3 $\times$ SSC 进行点制芯片;DMSO 在基因芯片的应用范围也很广泛^[22-23]。本文试验了 37 种点样液配方对杂交结果的影响,除已有报道的配方 12,13,16,21 等配方外,还设置了新配方和混合配方。经过杂交检测实验,从中优选出配方 35(25% DMSO 和 0.1 mol/L Na_2HPO_4 溶液的混合配方)作为点样液配方,该配方相比于其他已报道配方,探针点径更小(<1 μm)、点阵规则圆滑、无黏连,且探针在醛基芯片上结合率高,更小的点径使得表面积有限的芯片可以承载更多探针,提升芯片的检测通量。

探针是基因芯片检测技术的关键。为避免假阳性和假阴性的结果,在设计探针时,所选择的基因的序列片段要在分析现有细菌全基因组信息的基础上合理选择,要求既能区分种间差异,又能包含种内碱基突变的情况。寡核苷酸探针的长度一般在 25~80 nt 之间选择,长探针(>50 nt)的解链温度更高,允许有一定的错配情况存在,其能够结合更多的、有碱基突变的目的基因序列,使得杂交的信号值和灵敏度更高,但相对特异性降低^[17];与之相反,短探针(<30 nt)检测单核苷酸多态性(SNP)的能力强,特异性更高,可以检测同一菌种的不同表型,但由于核苷酸链短,结合非特异性序列片段的能力易受杂交温度等条件影响,加之存在空间位阻现象,使得总体检测灵敏度受限^[24-25]。Relógio 等^[4]通过对比认为长度为 30 nt 的探针能够维持较好的平衡。基于以上原则,本文针对 6 种病原性细菌的 13 种基因设计优选出 31 种探针序列(另文发表),探针序列长度多在 35~55 nt 之间,对于个别长度小于 20 nt 的探针,通过在探针 5'端添加 15 个寡聚 T(胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸)的连接体延伸探针长度、降低空间位阻,检测结果显示所设计的探针特异性均达到 100%。

基于多重 PCR 扩增技术的基因芯片的检测效果还受 PCR 的扩增效率、荧光标记效率、探针和荧光标记物的浓度、杂交条件等条件影响。在杂交过程中,探针和靶基因的结合会受杂交温度、杂交时长的直接影响。杂交温度较低时,探针可能和存在较大序列差异的非目的产物结合,产生交叉杂交信号;当杂交温度过高时,目的基因片段和探针的结合会减少,从而降低信号强度而影响灵敏度^[4]。杂交时间的长短同样影响目的基因片段和探针的结合。在本文中,杂交温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,非特异性信号基本消失,特异杂交信号强度适中(如

vv-hsp60 探针的荧光信号强度为 8 504,信噪比为 11.192);杂交时间为 2 h 时,荧光强度最高。芯片检测溶藻弧菌全基因组 DNA 的灵敏度约为 10 fg,高出 PCR 检测方法约 2 个数量级,和已报道的其他检测芯片的最低灵敏度量级持平^[15]。

16S rRNA 基因因其进化的相对保守性,已广泛地用于细菌的分类鉴定^[26],也经常被用为基因芯片的检测对象^[2, 23, 27]。Urakawa 等^[5]分析了弧菌属 34 种弧菌的 16S rRNA 基因序列,认为 34 种弧菌的 16S rRNA 基因的相似度大于 90%。高度的序列相似性导致难以寻找到足够特异的探针,以至于有较高概率出现假阳性结果^[28]。本文选择编码热休克蛋白家族的 *hsp60* 基因作为探针,*hsp60* 基因作为一种在细菌中广泛存在的管家基因,其保守程度较 16S rRNA 基因低,依据其作为分子鉴定靶标可更好地辨别进化关系较近的细菌^[28]。而且随着相关研究的深入,更多、更特异的毒力基因将被加入到基因检测的靶标中来,使检测结果更加有针对性^[29]。

基因芯片技术以其快速、自动化、检测通量较高、灵敏度高、扩展性强的特点已在微生物检测领域展现出良好的应用前景^[24, 27, 30]。本文基于多重 PCR 技术,以初步构建的基因芯片检测平台,进行一系列经济性优化和流程改良,优化后的基因芯片特异性、灵敏度良好,且经济性高。在已建立的芯片检测平台上可以逐步完善加入更多病原菌的毒力相关基因以及养殖环境微生物群落的特征基因,来快速、准确检测养殖环境、水产品中的细菌种类,这为食品病原菌快速诊断、水产养殖环境的疾病预防控制提供了一个可行的方向。

参考文献(References):

- [1] PANICKER G, CALL D R, KRUG M J, et al. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7436-7444.
- [2] SHI Y H, CHEN J, LI C H, et al. Detection of bacterial pathogens in aquaculture samples by DNA microarray analysis[J]. Aquaculture, 2012, 338: 29-35.
- [3] SEVERGNINI M, CREMONESI P, CONSOLANDI C, et al. Advances in DNA microarray technology for the detection of foodborne pathogens[J]. Food and Bioprocess Technology, 2011, 4(6): 936-953.
- [4] REL GIO A, SCHWAGER C, RICHTER A, et al. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(11): e51.
- [5] URAKAWA H, KITA-TSUKAMOTO K, OHIWADA K. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 152(1): 125-132.
- [6] ZHANG W. Virulence characteristics and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from clinical patients and environment in Hangzhou, China[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004. 张蔚. 杭州地区临床及环境来源副溶血弧菌的毒力基因特征和分子分型[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [7] CHEN C, WANG Q B, LIU Z H, et al. Characterization of role of the *toxR* gene in the physiology and pathogenicity of *Vibrio alginolyticus*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2012, 101(2): 281-288.
- [8] YAO D Y, ZHU M, CHEN L, et al. Development of PCR method for detection of pathogenic bacterium *Vibrio harveyi* based on *toxR* gene[J]. Fisheries Science, 2011, 30(9): 559-562. 姚东瑞,朱明,陈丽,等. 基于 *toxR* 基因病原哈氏弧菌 PCR 检测方法的建立[J]. 水产科学, 2011, 30(9): 559-562.
- [9] WU P, HOGREBE P, GRAINGER D W. DNA and protein microarray printing on silicon nitride waveguide surfaces[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21(7): 1252-1263.
- [10] FRYE J G, LINDSEY R L, RONDEAU G, et al. Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the national center for biotechnology information database[J]. Microbial Drug Resistance, 2010, 16(1): 9-19.
- [11] PINGLE M, RUNDELL M, DAS S, et al. PCR/LDR/universal array platforms for the diagnosis of infectious disease[C]//CHITTUR S V. Microarray Methods for Drug Discovery. New York: Humana Press, 2010: 141-157.
- [12] WANG Q, WANG S, BEUTIN L, et al. Development of a DNA microarray for detection and serotyping of enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(6): 2066-2074.
- [13] LEROY Q, RAOULT D. Review of microarray studies for host intracellular pathogen interactions[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 81(2): 81-95.

- [14] THOMPSON F L, IIDA T, SWINGS J. Biodiversity of vibrios[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(3): 403-431.
- [15] KIM D H, LEE B K, KIM Y D, et al. Detection of representative enteropathogenic bacteria, *Vibrio* spp., pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *Yersinia enterocolitica*, using a virulence factor gene-based oligonucleotide microarray[J]. The Journal of Microbiology, 2010, 48(5): 682-688.
- [16] SONG X L, HUANG J, SHI C Y. Production and application of monoclonal antibodies of *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(6): 522-527. 宋晓玲, 黄健, 史成银. 溶藻弧菌单克隆抗体的制备及应用[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 522-527.
- [17] MILLER M B, TANG Y W. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2009, 22(4): 611-633.
- [18] TAVANTI A, LANDI S, SENESI S. APEX DNA microarray for the identification of pathogenic fungi[C]//O'CONNOR L, GLYNN B. Fungal Diagnostics. New York: Humana Press, 2013: 63-70.
- [19] BRESLAUER K J, FRANK R, BLOCKER H, et al. Predicting DNA duplex stability from the base sequence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986, 83(11): 3746-3750.
- [20] SANTALUCIA J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(4): 1460-1465.
- [21] DAWSON E D, REPERT A E, ROWLEN K L, et al. Spotting optimization for oligo microarrays on aldehyde-glass[J]. Analytical Biochemistry, 2005, 341(2): 352-360.
- [22] FU Y, PAN Y, PAN M, et al. Development of a high-throughput DNA microarray for drug-resistant gene detection and its preliminary application[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 89(2): 110-118.
- [23] ZHOU G, WEN S, LIU Y, et al. Development of a DNA microarray for detection and identification of *Legionella pneumophila* and ten other pathogens in drinking water[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 293-300.
- [24] CALL D R. Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2005, 31(2): 91-99.
- [25] CLEVELAND B E, PALKA-SANTINI M, GIELEN J, et al. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(7): 2389-2397.
- [26] CANO-GOMEZ A, BOURNE D G, HALL M R, et al. Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects[J]. Aquaculture, 2009, 287(1): 1-10.
- [27] LIEVENS B, FRANS I, HEUSDENS C, et al. Rapid detection and identification of viral and bacterial fish pathogens using a DNA array-based multiplex assay[J]. Journal of Fish Diseases, 2011, 34(11): 861-875.
- [28] WANG G L, ZHU J L, JIN S. Molecular identification and phylogenetics of pathogenic vibrios in cultured large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* Richardson[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(2): 162-167. 王国良, 祝璟琳, 金珊. 养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 3 种致病弧菌的分子鉴定及其系统发育学分析[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(2): 162-167.
- [29] LI C, HUANG J, XIE G S, et al. Establishment of a reduced microarray for detection of three aquatic bacterial pathogens[J]. Periodical of Ocean University of China, 2011, 41(3): 37-42. 李晨, 黄健, 谢国骥, 等. 3 种水产病原菌微型基因芯片检测技术的建立[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2011, 41(3): 37-42.
- [30] LU X. Development of multiplex PCR for simultaneous microarray detection of six virulence factors of *Vibrio anguillarum* and primary exploration of innovative detection technologies[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010. 鲁雪. 鳃弧菌 6 个毒力基因的多重 PCR 与基因芯片检测技术的建立以及创新检测技术的初步探索[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.

Optimization of DNA Microarray Detection System for Aquaculture Pathogenic Vibrios

ZHU Peng-fei¹, LI Yi^{1, 2}, WANG Zong-ling¹, QU Ling-yun¹

(1. *The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China;*

2. *College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China*)

Abstract: DNA microarray has shown potential advantages in pathogen detection. In this study, spotting and hybridization protocols are optimized on an aquaculture pathogen detection DNA microarray, which targets the heat shock protein 60 encoded gene (*hsp60*) and toxin transcriptional activator encoded gene (*toxR*) of common pathogenic vibrios. Experimental variables including oligo probe concentration, Cy3 labelled random primer concentration, spotting buffer formula, hybridization temperature and duration were examined. As a result, optimized system contains the use of 1 $\mu\text{mol/L}$ oligo probe in a mixed buffer of 0.1 mol/L Na_2HPO_4 and 25% DMSO, 150 pmol Cy3 labelled random primer and 2 hours hybridization at 60 °C. The specificity and detection limit of optimized DNA microarray is 100% and 10 fg of genome DNA of *Vibrio alginolyticus*, respectively. The results of this study indicate that the established detection system is cost-effective and efficient in the aquaculture pathogen detection.

Key words: vibrio; DNA microarray; spotting buffer; optimization

Received: July 24, 2014