

鳃弧菌膜芯片检测条件的优化

闫 丽 李 晨 张庆利 戈 蕾 黄 捷*

(农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 采用带正电的尼龙膜作为片基, 利用手动芯片点样仪将鳃弧菌 6 个毒力基因的寡核苷酸探针点样于膜基底上, 然后进行紫外交联, 制备膜芯片。制备好的膜芯片与 6 个毒力基因的带有地高辛标记的 PCR 产物进行杂交, 通过观察杂交信号来判断是否含有该基因。通过对膜芯片点样浓度、杂交时间及洗膜步骤进行优化, 确定所设计膜芯片最适杂交时间为 30 min、点样探针最适浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ 、洗膜过程只需要 3 步, 时间缩短了 45 min。

关键词 基因芯片 尼龙膜 鳃弧菌 毒力基因

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)02-0117-06

Optimization of the detection protocol for membrane chip of *Vibrio anguillarum*

YAN Li LI Chen ZHANG Qing-li GE Lei HUANG Jie*

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT Gene chip was prepared with the oligonucleotide probes of 6 virulence genes of *Vibrio anguillarum* dot-applied on a piece of positively charged nylon membrane using the microcaster manual arrayer, followed by cross-linkage under the ultraviolet light. The detection of *V. anguillarum* virulence genes was performed by hybridizing with the DIG-labeled PCR products on the membrane chip. Here we report the optimization of the concentration of the probe, the time course of hybridization, and the process of washing steps. After optimization, the hybridization time was reduced to 30min, the concentration of the probe as 50 $\mu\text{mol/L}$, and the process of washing was shortened to 3 steps of only 45 min.

KEY WORDS Gene chip Nylon membrane *Vibrio anguillarum* Virulence gene

鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 可以侵染大多数海水鱼, 是多种海水鱼类出血性败血症的病原菌 (Milton *et al.* 1992), 也是被研究和报道最多的弧菌。鳃弧菌的检测方法有很多, 传统的方法是根据生理生化反应以及病理分析进行鉴定 (范文辉等 2005), 随着现代血清学、免疫学方法以及分子生物学方法的出现与发展, 又出现了免疫学检测如间接荧光抗体技术 (余俊红等 2002)、核酸杂交技术 (Gonzalez *et al.* 2004; Martinez *et al.* 1994)、PCR 检测 (Rodkhum *et al.* 2006) 以及核酸芯片检测 (许 拉等 2008) 等。其中核酸芯片技术近年来在各个领域发展迅速, 其基本原理是利用已知的核苷酸序列作为探针与标记的靶核苷酸序列进行杂交, 通过对信号的检测进行定性与定量分析。基因芯片作为最近出现的检测方法, 具有高通量、高容量的特点, 其基本流程包括芯片的制备、靶样品的制备和标记、杂交、杂交信号的获取和数据分析等。芯片载体一般选择经过特殊处理的硅片、玻璃片、瓷片或聚丙烯膜、尼龙膜等 (吴明煜等 2005), 其中用尼龙膜作为芯片载体制作基

国家高技术研究发展计划(863)课题(2006AA100306)和农业公益性行业科研专项经费项目(200803012)共同资助

* 通讯作者。E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823062-802

收稿日期: 2009-01-15; 接受日期: 2010-12-14

作者简介: 闫 丽(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物病原核酸诊断芯片的研究。E-mail: yan075500@163.com

因芯片的方法方便简单,无需特殊仪器设备即可完成杂交检测过程。刘毅等(2003)利用尼龙膜作为芯片片基,设计完成的基因芯片可对多种细菌鉴定到种或属的水平。张俊仙等(2007)利用膜芯片技术建立了一种快速、简便的分枝杆菌分子菌种鉴定方法。唐子圣等(2006)利用 16S rDNA 结合膜芯片,可准确检测牙龈卟啉菌、中间普氏菌和变黑普氏菌 3 种产黑色素牙周可疑致病菌,具有很高的特异性。本实验室已经初步建立了利用尼龙膜作为片基制作基因芯片对鳗弧菌 6 个毒力基因进行检测的膜芯片技术,但该技术还不完善,如存在杂交时间长、洗膜步骤繁琐等问题,本文将针对这些问题优化膜芯片技术的探针点样浓度、杂交时间及洗膜步骤。

1 材料与方 法

1.1 菌种来源及引物探针的合成

本实验所用鳗弧菌来自中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室。鳗弧菌 6 个毒力基因分别为:鳗弧菌溶血素基因(*vah*),与主要表面抗原生物合成过程有关的毒力蛋白基因(*virA*),未知功能的毒力蛋白基因(*virC*),鳗弧菌非核糖体多肽合成酶基因(*angM*),鞭毛蛋白 A 基因(*flaA*),锌金属蛋白酶基因(*empA*)。

实验中用到的所有引物探针均由上海生工生物工程服务有限公司合成,共包括 6 个基因的 6 对引物和 6 个探针,引物探针长度及扩增片段大小见表 1。

表 1 实验中所使用的引物探针
Table 1 Sequences of the primers and probes in this experiment

| 基因名称 Gene | 引物探针长度 Length of primer and probe (nt) | 序列录入号 GenBank ID | 扩增片段大小 Length of amplified fragment (nt) | 基因名称 Gene | 引物探针长度 Length of primer and probe (nt) | 序列录入号 GenBank ID | 扩增片段大小 Length of amplified fragment (nt) |
|--------------|--|---------------------|--|--------------|--|---------------------|--|
| <i>vah</i> | F 22 | S83534 | 289 | <i>angM</i> | F 21 | NC-005350 | 500 |
| | R 21 | | | | R 21 | | |
| | P 53 | | | | P 52 | | |
| <i>virA</i> | F 22 | L08012 | 468 | <i>flaA</i> | F 21 | L47122 | 435 |
| | R 22 | | | | R 19 | | |
| | P 53 | | | | P 50 | | |
| <i>virC</i> | F 22 | U17054 | 344 | <i>empA</i> | F 20 | L02528 | 402 |
| | R 20 | | | | R 22 | | |
| | P 53 | | | | P 47 | | |

注:“F”表示正向引物,“R”表示反向引物,“P”表示探针 Note:“F” forward primer; “R” reverse primer; P: probe

1.2 地高辛标记 PCR 产物的制备

反应体系 25 μ l 含 10 \times reaction buffer (Mg²⁺ Plus, TaKaRa) 2.5 μ l, DIG PCR Mix (含 0.7 mmol/L DIG-11-dUTP, 1.3 mmol/L dTTP, 2 mmol/L dATP, dCTP, dGTP; Roche, 德国) 2.5 μ l, 正向和反向引物各 1 μ mol/L, 细菌基因组 DNA 2 μ l, Taq DNA 聚合酶 1.5 U。先经 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min, 然后 35 个循环的 94 $^{\circ}$ C 30 s、56 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 40 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增结果, 在 LAS3000 凝胶成像仪(FujiFilm, 日本)下照相。

1.3 膜芯片的制备及探针浓度的优化

用 TE 缓冲液(含 10 mmol/L Tris-HCl 和 1 mmol/L EDTA, pH=8.0)将寡核苷酸探针分别稀释成 100、50、25、12.5 μ mol/L 4 个不同的浓度梯度, 置于 PCR 管中煮沸 2 min 后迅速在冰水中猝冷 2 min, 使探针变性, 变性后的探针加于 384 孔板中, 用手动芯片点样仪(VP470, V&P SCIENTIFIC INC)于尼龙膜上点样, 在紫外交联仪(CL-1000, UVP)交联 3 min。点样探针顺序如图 1。

1.4 膜芯片杂交时间与洗膜步骤的优化

1.4.1 膜芯片杂交时间的优化

按照 1.3 中所述方法点制 6 张膜芯片,将点制完成的膜芯片浸润于预杂交液[1 ml 中含 10 mg 封闭剂(Roche)、5× SSC (0.75 mol/L NaCl, 0.75 mol/L 柠檬酸钠)、0.1% 十二烷基肌氨酸钠(SLS)、0.02% 十二烷基磺酸钠(SDS)]中在 42 °C 预杂交 2 h,然后将膜芯片浸润于杂交液(1ml 含预杂交液和 PCR 扩增的 DIG 标记产物约 3 μl)中进行杂交,杂交时间分别设为 10、20、30、60、90、120 min。

1.4.2 膜芯片洗膜步骤的优化

按照 1.3 中所述方法点制 3 张膜芯片,按照 1.4.1 中所述杂交体系杂交 120 min。再按照下列不同的洗膜步骤进行杂交后处理,通过观察显色结果选择最佳的洗膜步骤。

膜 1(对照):按照惯用的膜芯片洗膜步骤洗膜,芯片杂交后先用 2 × SSC/0.1% SDS 于室温清洗两次,5 min/次;0.1 × SSC/0.1% SDS 于 42°C 清洗两次,15 min/次;buffer I (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.5)中室温清洗 2 min;buffer II (1ml buffer II 含 5mg 封闭剂和 1ml buffer I)室温封闭 30 min;AP-DIG 抗体室温结合 30 min;然后在 buffer I 中室温清洗两次,15 min/次;buffer III (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, pH 9.5, 0.05 mol/L MgCl₂ · 6H₂O)中室温清洗 2 min;于 NBT-BCIP 显色液中显色。

膜 2:芯片杂交后用 2×SSC/0.1% SDS 室温清洗两次,5 min/次;buffer I 中室温清洗 2min;buffer II 室温封闭 30 min;AP-DIG 抗体室温结合 30min;然后在 buffer I 中室温清洗 15 min;buffer III 中室温清洗 2 min;于 NBT-BCIP 显色液中显色。

膜 3:芯片杂交后用 2×SSC/0.1% SDS 室温清洗 5 min;0.1×SSC/0.1% SDS 于 42°C 清洗 15 min;buffer II 室温封闭 30 min;AP-DIG 抗体室温结合 30 min;buffer III 中室温清洗 2 min;于 NBT-BCIP 显色液中显色。具体各差异洗膜步骤如表 1。

表 2 优化前后的洗膜步骤对照

Table 2 Steps for the membrane washing optimization process

| 步骤 Process | 2×SSC/ 0.1%SDS | 0.1×SSC/0.1%SDS | Buffer I (1st) | Buffer I (2nd) |
|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| 膜 1 Membrane 1 | 两次,5 min/次 | 两次,15 min/次 | 2 min | 两次,15 min/次 |
| 膜 2 Membrane 2 | 两次,5 min/次 | — | 2 min | 1 次,15min |
| 膜 3 Membrane 3 | 1 次,5 min | 1 次,15 min/次 | — | — |

1.4.3 膜芯片洗膜条件优化后的特异性实验

用 TE 缓冲液分别将基因 *vah*、*virA*、*virC*、*angM*、*flaA*、*empA* 的寡核苷酸探针稀释成 50 μmol/L,于 PCR 管中煮沸 2 min 后迅速置于冰水中 2 min,使探针变性。再利用手动芯片点样仪将探针点于尼龙膜上,制备成 6 张膜芯片,分别与 6 种基因的 PCR-DIG 产物进行杂交,杂交后洗膜步骤依照 1.4.2 中膜 2 的洗膜步骤进行。

2 结果

2.1 鳗弧菌 6 个毒力基因地高辛标记 PCR 扩增

鳗弧菌 6 个毒力基因经 DIG 标记的 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示(图 2)各毒力基因均有清晰扩增条带,标记后分子量有所增加。

2.2 探针浓度的优化

4 个浓度梯度的探针,分别为 100、50、25、12.5 μmol/L。与 6 种基因的 PCR-DIG 产物杂交后的显色结果

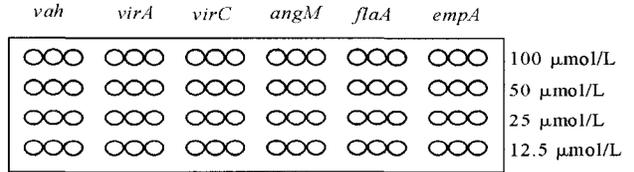
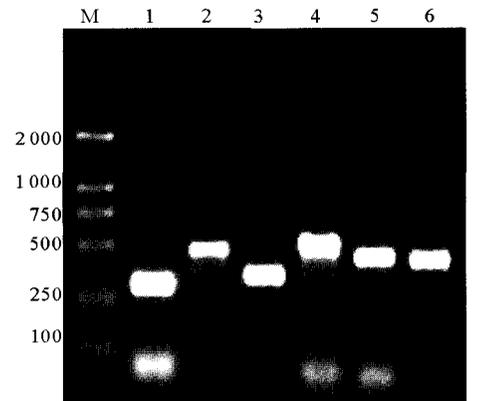


图 1 探针点样顺序

Fig. 1 The sketch map of the probe array



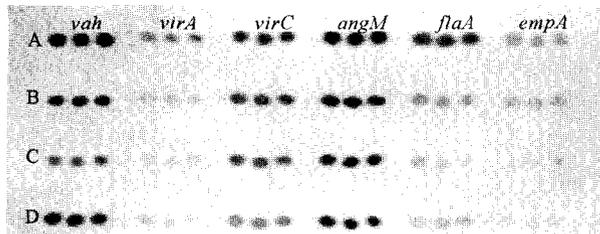
1. *vah* 289bp; 2. *virA* 468bp; 3. *virC* 344bp; 4. *angM* 500bp; 5. *flaA* 435bp; 6. *empA* 402bp

图 2 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物
Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR products on 1% agarose

见图 3。由图 3 可以看出,随着探针浓度的降低,各基因显色信号有所变化,但探针浓度为 $50\mu\text{mol/L}$ 时各点显色仍可见,当探针浓度降至 $25\mu\text{mol/L}$ 时,毒力基因 *empA* 难以观察到显色。综合考虑探针的成本、膜芯片的显色效果等要求,探针浓度为 $50\mu\text{mol/L}$ 时最为适宜。

2.3 膜芯片杂交时间的优化

6 张点有相同浓度梯度探针的膜芯片与 6 种基因的 PCR-DIG 产物进行杂交,经过不同的杂交时间、相同的洗膜步骤、相同的显色时间后所得到的芯片显色结果见图 4。从图 4 可以看出,杂交 30 min 时,膜 3 所示显色较为清晰,且背景干扰小;杂交时间少于 30 min 时,膜 1、膜 2 所示各点显色较微弱;杂交时间大于 30 min 时,膜 5、膜 6 所示与膜 3 无明显差异,为节省杂交时间、快速检测,杂交时间 30 min 即很适宜。这比惯用的杂交时间节省了 1.5 h。

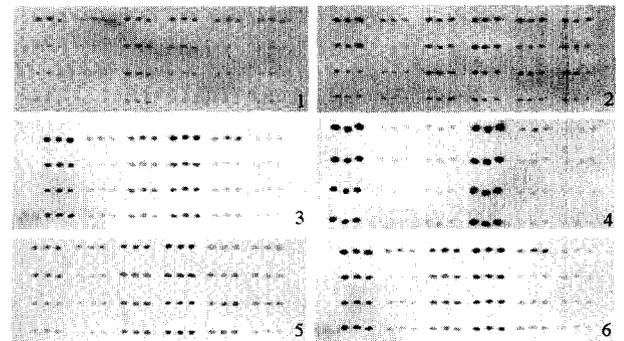


A. 探针浓度 $100\mu\text{mol/L}$; B. 探针浓度 $50\mu\text{mol/L}$;
C. 探针浓度 $25\mu\text{mol/L}$; D. 探针浓度 $12.5\mu\text{mol/L}$

A. $100\mu\text{mol/L}$; B. $50\mu\text{mol/L}$; C. $25\mu\text{mol/L}$; D. $12.5\mu\text{mol/L}$

图 3 不同探针浓度检测结果

Fig. 3 Detection results at different probe concentration



1. 10 min; 2. 20 min; 3. 30 min; 4. 60 min; 5. 90 min; 6. 120 min

图 4 杂交不同时间芯片检测结果

Fig. 4 Detection results for different hybridization time

2.4 杂交后洗膜步骤的优化

按照表 2 中所列洗膜步骤进行的膜芯片杂交后的处理,显色结果如图 5 所示。膜 2 按照优化后洗膜步骤进行,洗膜方法比膜 1 按照的惯用洗膜方法省略了 1 个步骤,缩短了 45 min。结果显示,该方法显色效果较好,其背景清晰,与膜 1 的显色结果无大差别。膜 3 的洗涤步骤则省略了两个步骤,缩短了 52 min,但结果表明,其显色结果背景较乱。

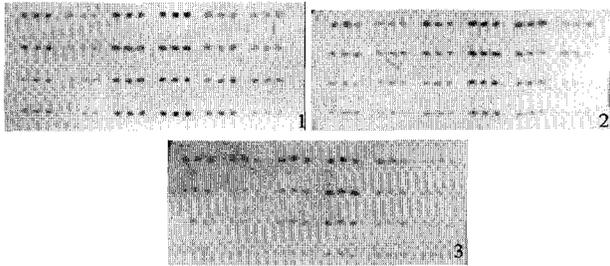
2.5 膜芯片洗膜条件优化后的特异性显色结果

6 张膜芯片分别与基因 *vah*、*virA*、*virC*、*angM*、*flaA*、*empA* 的 PCR-DIG 产物进行杂交,按照优化条件进行洗膜,结果如图 6 所示。结果显示,加入相应基因的 PCR-DIG 产物后,该毒力基因的探针位点清晰显色;未加入相应的 PCR-DIG 产物的探针位点均无显色,这说明优化后的洗膜步骤效果好,杂交特异性强,不存在非特异性杂交。

3 讨论

20 世纪 90 年代初,美国 Affymetrix 公司率先开展基因芯片的研究,并生产出世界上第一块寡核苷酸芯片 (Fodor *et al.* 1991);1995 年美国斯坦福大学研制成功了第一块以玻璃为载体的基因芯片。近年来,基因芯片技术发展迅速,在基因发现与分类、新药发现、基因表达与诊断、基因测序、遗传作图与多态性检测等方面均展示了广泛的应用前景。与此同时,尼龙膜作为芯片基片制作基因芯片的研究也日渐广泛,其主要优点是基因表达量的探测较灵敏,线性范围大。本文主要研究了探针浓度,杂交时间以及洗膜检测步骤对杂交反应信号的影响。探针浓度直接影响杂交反应信号的强弱,探针浓度过高会增加探针与目的片段的空间位阻,不利于杂交反应的进行(徐根明等 2007);而探针浓度过低,探针与基片结合量就少,杂交效率随之降低,导致检测灵敏度降低。本实验设计 4 个浓度梯度的探针与鳃弧菌 6 种基因的 PCR-DIG 产物相杂交。实验结果表明,探针浓度为 $50\mu\text{mol/L}$ 时,6 种基因的探针检测位点均清晰显色,认为该浓度为最适的探针浓度。

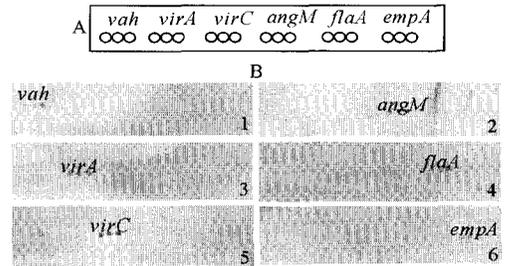
杂交时间对芯片的灵敏度也有明显影响,杂交时间长利于目的序列与片基的充分杂交,但为节省实验所需时间,使膜芯片检测过程快速完成,本文对膜芯片杂交时间进行了优化。研究表明,杂交时间为 30 min 时,即可得到清晰检测信号,大大缩短了杂交时间。



1. 表 2 中膜 1 的显色结果;2. 表 2 中膜 2 的显色结果;
3. 表 2 中膜 3 的显色结果
1. Membrane 1 in Table 2; 2. Membrane 2 in Table 2;
3. Membrane 3 in Table 2

图 5 不同洗膜步骤的显色结果

Fig. 5 Detection results of different washing processes



1. 与 *vah* 的 PCR-DIG 产物进行杂交;2. 与 *angM* 的 PCR-DIG 产物进行杂交;
3. 与 *virA* 的 PCR-DIG 产物进行杂交;4. 与 *flaA* 的 PCR-DIG 产物进行杂交;
5. 与 *virC* 的 PCR-DIG 产物进行杂交;6. 与 *empA* 的 PCR-DIG 产物进行杂交;

Hybridization with DIG-labeled PCR products of:

1. *vah*; 2. *angM*; 3. *virA*; 4. *flaA*; 5. *virC*; 6. *empA*

图 6 A. 膜芯片上各基因的探针分布;

B. 杂交后按照优化步骤洗膜的显色结果

Fig. 6 A. Sketch map of the probe array on nylon chip; B. Detection results of optimized washing processes after hybridization

带正电荷的尼龙膜具有多孔性很强的阴离子结合能力,因此尼龙膜作为芯片片基的杂交后洗膜过程就相对繁琐。本文针对这一问题进行了优化,通过实验研究表明膜芯片杂交后,室温下 $2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ 清洗两次,5 min/次,buffer I 清洗 2 min,然后在 buffer II 中封闭 30 min,加入碱性磷酸酶抗地高辛标记抗体室温结合 30 min,再经 buffer I 洗膜 15 min,buffer III 洗膜 2 min 后,膜在 NBT-BCIP 显色液中 30 min 即可清晰检测到杂交信号。膜芯片特异性实验显色结果表明,该优化步骤显色结果可靠,无非特异性显色。

通过膜芯片检测过程的优化,本实验缩短了膜芯片检测的时间、改善了膜芯片的显色结果、提高了检测效率,为海水养殖动物病原的核酸诊断膜芯片的研制奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- 许拉,黄健,杨冰. 2008. 病原检测基因芯片应用及在水产病害检测的前景. 海洋水产研究, 29(1): 109~114
- 刘毅,韩金祥,黄海南,梁浩,黄海燕. 2003. 应用基因芯片技术检测 20 种病原菌的初探. 中华检验医学杂志, 26(10): 629
- 范文辉,黄健,王秀华,史成银,刘莉. 2005. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析. 微生物学报, 45(2): 665~670
- 张俊仙,吴雪琼,梁建琴,陆阳,雷红,张光宇,乐军,张丽水. 2007. 应用膜芯片技术快速鉴定分枝杆菌菌种. 实用医学杂志, 23(5): 616~618
- 吴明煜,郭晓红,王万贤,柯文山,杨毅,吴燕. 2005. 生物芯片研究现状及应用前景. 科学技术与工程, 5(7): 422~428
- 余俊红,姚斐,俞勇,纪伟尚,徐怀恕. 2002. 应用间接荧光抗体技术快速检测花鲈病原菌——鳃弧菌. 海洋水产研究, 23(2): 38~44
- 徐根明,丁先锋,朱聪,郭江峰. 2007. 植物病毒检测芯片的杂交条件优化. 中国生物工程杂志, 27(10): 75~80
- 唐子圣,曹慧敏,刘正,赵淑娟,王蓓,梁景平,赵建龙. 2006. 应用 16S rDNA 结合膜芯片检测 3 种产黑色素牙周可疑致病菌. 上海口腔医学, 15(3): 290~293
- Fodor, S. P. A., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A., and Solas, D. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251: 767~773
- Gonzalez, S. F., Osorio, C. R., and Santos, Y. 2004. Evaluation of the AQUARAPID-Va, AQUAEIA-Va and dot-blot assays for the detection of *Vibrio anguillarum* in fish tissues. *Journal of Fish Disease*, 27(11): 617~621
- Martinez-Picado, J., Blanch, A. R., and Jofre, J. 1994. Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using a specific oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(2): 732~737
- Milton, D. L., Norqvist, A., and Wolf-watz, H. 1992. Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* 174(22): 7 235~7 244
- Rodkhum, C., Hirono, I., Crosa, J. H., and Aoki, T. 2006. Multiplex PCR for simultaneous detection of five virulence hemolysin genes in *Vibrio anguillarum*. *J. Microbial Methods*, 65(3): 612~618