

doi: 10.7541/2023.2022.0380

基于SecA基因的鲮鱼诺卡氏菌qPCR检测方法的建立及进化分析

周可欣^{1*} 潘晓艺^{2*} 蔺凌云² 黄雷² 穆雪姣² 王丛旭² 姚嘉赞²
劳顺健^{3#} 沈锦玉^{1,2#}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201200; 2. 浙江省淡水水产研究所农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 湖州 313001; 3. 湖州市农业科技发展中心, 湖州 313000)

摘要: 为对诺卡氏菌病进行快速早期诊断, 建立了鲮鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)TaqMan qPCR检测方法。以鲮鱼诺卡氏菌的管家基因SecA为靶标设计引物和探针, 对反应条件进行优化, 制作标准曲线, 进行灵敏性、重复性和特异性测试, 并将建立的方法应用于临床样品的检测。结果表明, 优化后, 引物和探针终浓度分别为0.3和0.1 $\mu\text{mol/L}$, 退火延伸温度60℃时, qPCR在 9.85×10^{10} — 9.85×10^0 copies内呈良好的线性关系, 灵敏度最高达9.85 copies; 重复性实验结果显示, 组间和组内变异系数均小于1%; 特异性结果表明, 对无乳链球菌、弗氏柠檬酸杆菌和维氏气单胞菌等13种病菌均无扩增曲线; 临床对42份大口黑鲈样品进行检测, 结果表明, qPCR检出率比普通PCR提高14.24%; 对发病大口黑鲈的组织及结节部位检测显示, 结节部位菌载量大幅高于非结节部位, 最高相差1000倍; SecA基因分析结果显示, SecA基因在传代中和种内高度保守, 种间具有一定的离散性, 是个很好的用于诺卡氏菌种鉴定的靶基因。研究建立的鲮鱼诺卡氏菌qPCR检测方法灵敏性高、特异性强、重复性好, 可用于对鲮鱼诺卡氏菌病的早期诊断和定量检测, 为诺卡氏菌病的早诊断早治疗提供了有效手段。

关键词: 鲮鱼诺卡氏菌; qPCR; 诺卡氏菌病; 大口黑鲈

中图分类号: S941.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)10-1553-08



近年来, 我国各地区水产养殖场频繁发生以体内结节为主要症状的诺卡氏菌病, 已造成乌鳢(*Channa argus*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、四指马鲛(*Eleutheronema rhadinum*)、红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)和美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)等40余种淡水、海水鱼^[1-6]感染, 经病原分离鉴定, 表明该病由鲮鱼诺卡氏菌引起。该病发病后期主要表现为体表出血溃疡, 皮下形成脓疮, 体内多器官出现程度不一的白色结节, 尤其以肾脏和脾脏最为常见^[7, 8], 发病高峰期主要集中在6—10月, 发病率15%—30%, 累计死亡率达100%^[9, 10]。诺卡氏菌病的暴发可能是由于养殖密度过高、水质恶化造成鱼体抵抗力下降^[11], 进而引起体内诺卡氏菌大量繁殖。

鲮鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)^[7]感染潜伏期

长, 早期患病不易发觉, 到后期病菌被包裹入成纤维细胞包裹的肉芽肿结节中, 难以治疗^[10]。因此, 及早诊断诺卡氏菌病, 在结节形成前及时治疗, 是治疗该病的关键。鲮鱼诺卡氏菌具有生长缓慢、菌落小、液体培养菌体集群成团等生长特性, 其培养状态和菌落形态可作为初步鉴定依据。此外, 鱼类感染鲮鱼诺卡氏菌后体内会出现白色结节等典型症状, 也常以此判断是否感染该病菌, 但常与舒氏气单胞菌和香鱼假单胞菌引起的内脏白点病不易区分^[12]。由于鲮鱼诺卡氏菌的培养较慢, 发病潜伏期较长, 而且易与其他分枝杆菌的形态、病症混淆, 因此其检测更多借助分子检测方法, 包括环介导等温扩增(LAMP)检测方法^[13, 14]、PCR^[15-17]、SYBR-Green qPCR^[18]法, 相比而言qPCR灵敏度较高, 操作简单, 较短时间就可以完成对鱼体病菌载

收稿日期: 2022-09-07; 修订日期: 2023-01-17

基金项目: 浙江省财政专项(2022CZZX003)资助 [Supported by the Zhejiang Financial Special Project (2022CZZX003)]

作者简介: 周可欣(1997—), 女, 硕士研究生; 主要从事水生动物病害研究。E-mail: 752870087@qq.com 潘晓艺, 研究员; 主要从事水产动物病原生物学与免疫预防研究。E-mail: panxiaoyi@163.com *共同第一作者

通信作者: 劳顺健, 高级工程师; E-mail: 1229443478@qq.com 沈锦玉, 研究员; E-mail: sjinyu@126.com #共同通信作者

量的检测,可用于掌握病情发展^[19],并且qPCR通过检测荧光信号,扩增产物也不会对环境造成污染。*SecA*是细菌中一种在进化上保守且必不可少的ATPase^[20]。诺卡氏菌的*SecA1*基因序列种内平均相似度达98.6%,种间平均相似度达91.8%,且*SecA1*基因存在足够的可变序列,能将16种诺卡氏菌准确分离为16个独立的分支^[21],其可为诺卡氏菌的鉴定提供比16S rRNA基因更高的鉴别力和精确度^[22],故选择*SecA*基因为靶基因在分子鉴定技术上具有优势。本研究采用特异性的探针法qPCR建立检测鲟鱼诺卡氏菌的定量方法,为检测鲟鱼诺卡氏菌提供新手段,有利于对鲟鱼诺卡氏菌病的早诊断早治疗。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

鲟鱼诺卡氏菌(GenBank ID: OP999620)、溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)均由浙江省淡水水产研究所鱼病研究室保存。

1.2 实验试剂及仪器

所用试剂主要有细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司),DNA回收纯化试剂盒和质粒提取试剂盒(OMEGA公司),Fast Probe Mixture试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司),组织总DNA磁珠法提取试剂盒(洛阳爱森生物科技有限公司)。

实验仪器主要有MASTERCYCLER梯度PCR仪(德国艾本德股份公司),核酸蛋白凝胶电泳成像系统(Gene Company Limited),NanoDrop2000紫外分光光度计(美国赛默飞世尔科技),LightCycler 96实时荧光定量PCR仪(瑞士罗氏公司),磁珠法全自动核酸提取纯化仪(洛阳爱森生物科技有限公司)。

1.3 引物设计与合成

根据鲟鱼诺卡氏菌特异性基因*SecA*序列(AP017900.1),设计上下游引物*SecA*-tqF/R,探针*SecA*-TqMan, *SecA*全基因扩增引物*SecA3*-F/R、*SecA5*-F/R(表1),均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 引物及探针

Tab. 1 Sequences of the primers and probe

引物名字 Primers	序列 Sequence (5'—3')	用途 Purpose
<i>SecA</i> -tqF	CTGCTCAAGAAGGACCTG	基因克隆、重组质粒构建和qPCR
<i>SecA</i> -tqR	GTCCTTGTCTTGGTGA	
<i>SecA</i> -TaqMan	6' FAM- ACTACGAGACCGACATCA AGAAGC-BHQ1	<i>SecA</i> 基因扩增
<i>SecA3</i> -F	CCGACGACATCCAGGAGA	
<i>SecA3</i> -R	TCCACCGCACCGTTTCAT	
<i>SecA5</i> -F	GAGCGGAGCGTAGGGCAG	
<i>SecA5</i> -R	GTGGAACCTGGCGTTGAGC	

1.4 细菌基因组提取

挑取鲟鱼诺卡氏菌单菌落接种于脑心浸液(BHI)液体培养基,28℃ 150 r/min恒温培养6d,取菌液1 mL,8000 r/min离心3min,弃上清用电动研磨器进行研磨后,用细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌DNA。

1.5 标准质粒制备

对提取的鲟鱼诺卡氏菌DNA进行PCR扩增,反应体系:2×Flash Hot Start MasterMix(Dye) 12.5 μL,上、下游引物*SecA*-tqF/R(10 μmol/L)各0.75 μL,模板DNA 1 μL,ddH₂O 10 μL,反应条件:预变性95℃ 900s,变性95℃ 10s,退火58℃ 20s,延伸72℃ 20s,40循环,产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收纯化。将纯化产物与pMD19-T载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞DH5α中,菌落PCR筛选阳性克隆,送浙江尚亚生物技术有限公司测序,获得pMD19-T-*SecA*标准质粒,紫外分光光度计检测质粒浓度及纯度,计算质粒拷贝数,-20℃保存备用。

1.6 检测方法优化

采用单一变量原则,对10⁴ copies/μL的标准品质粒进行TaqMan qPCR检测。改变*SecA*-tqF/R终浓度(0.1、0.2、0.3和0.4 μmol/L),探针终浓度(0.1、0.2、0.3和0.4 μmol/L),*Ct*值的平均值和标准偏差最小,扩增曲线优于其他组别,确定最佳反应体系:2×Fash Probe Mixture 10 μL, pMD19-T-*SecA* 1 μL,上、下游引物*SecA*-tqF/R(10 μmol/L)各0.6 μL,探针*SecA*-TaqMan 0.2 μL, ddH₂O 7.6 μL。改变退火温度(56℃、58℃、60℃和62℃),确定最佳反应条件:预变性95℃ 900s,变性95℃ 10s,退火/延伸60℃ 20s,40循环。

1.7 标准曲线的建立

将质粒以10倍梯度稀释为9.85×10¹⁰—9.85×10⁰ copies/μL,以1.6中描述的最佳条件进行TaqMan

qPCR检测, 每个质粒浓度及阴性对照重复3次, 建立标准曲线。

1.8 灵敏性及检测下限测试

取 9.85×10^{10} — 9.85×10^0 copies/ μL 的标准品质粒为模板, 用特异性引物SecA-tqF/R进行常规PCR检测, 同时在1.6中描述的条件下进行TaqMan qPCR检测。

1.9 重复性测试

取6个不同浓度(9.85×10^5 — 9.85×10^0 copies/ μL)的标准品质粒, 每个浓度重复3次TaqMan qPCR检测, 进行组内重复性分析, 不同时间点进行重复实验3次, 进行组间重复性分析, 计算标准差和变异系数。

1.10 特异性测试

选取鲷鱼诺卡氏菌(LYK20810)、溃疡分枝杆菌(XYS221012)、无乳链球菌(XYE)、弗氏柠檬酸杆菌(LYK22520)、维氏气单胞菌(MKL22420)、迟缓爱德华氏菌(TL5M)、鳃弧菌(E3-11)、格氏乳球菌(M22107-5)、嗜水气单胞菌(HSY-B639)、乳酸乳球菌(MS)、大肠杆菌(B5-625)、铜绿假单胞菌(NWK090824)、植物乳杆菌(植090211)和类志贺邻单胞菌(GY-1 617)等细菌的核酸作为模板, 进行TaqMan qPCR特异性检测。

1.11 临床样品检测

随机选取6尾大口黑鲈(20.0 ± 1.0) g/尾进行鲷鱼诺卡氏菌注射感染, 10d后分别采集肝脏、脾脏、肾脏、肠、胃、鳃、脑和眼等组织, 同时分别采集肝脏、脾脏、肾脏、肠道和胃上的病变结节部位, 采用DNA磁珠法提取试剂盒提取总DNA, 采用TaqMan qPCR检测细菌载量。

此外, 选取2021年6—10月采集的42份无症状疑似患诺卡氏菌病的大口黑鲈脾脏样品, 提取组织DNA, 进行TaqMan qPCR检测, 同时进行常规PCR检测, 比较两者之间检出率差异。

1.12 *SecA*变异进化分析

对鲷鱼诺卡氏菌原始菌株(LYK20810)及经传代61代次菌株(LYK20810F61)用SecA3-F/R、SecA5-F/R进行*SecA*基因全长扩增, 扩增产物由浙江尚亚生物技术有限公司测序。测序结果与其他代表性诺卡氏菌*SecA*基因序列采用ClustalW法进行排列比对, 并采用MEGA-X软件以邻接法(Neighbor-Joining), 自举1000次构建系统发育树。

1.13 统计分析

不同组织感染分布以平均值 $\pm$ 标准误表示, 由软件SPSS 21单因素方差分析进行评估, $P < 0.05$ 视为差异显著。

2 结果

2.1 *SecA*基因扩增与标准质粒验证

用引物SecA-tqF/R对鲷鱼诺卡氏菌的DNA和构建的标准品质粒pMD19-T-SecA进行PCR扩增, 得到目的片段为189 bp, 与预期大小一致(图1)。提取的标准品质粒浓度为311.3 ng/ μL (9.85×10^{10} copies/ μL), 测序结果经BLAST比对, 与AP017900.1序列结果一致。

2.2 引物浓度优化

如图2所示, 引物SecA-tqF/R浓度为0.3 $\mu\text{mol/L}$, 探针SecA-TaqMan浓度为0.1 $\mu\text{mol/L}$, 退火温度60 $^{\circ}\text{C}$ 时(图2E), C_t 值的平均值和标准偏差最小(表2), 扩增曲线优于其他组别, 因此选该组合为最佳反应条件。

2.3 荧光定量标准曲线制作

标准曲线制作结果如图3, 质粒浓度在 9.85×10^{10} — 9.85×10^0 copies/ μL 呈良好的线性关系, 相关系数 $R^2 = 0.999$, 质粒拷贝数与阈值循环数线性关系为 $y = -3.3964x + 38.359$, 扩增效率96.9%。

2.4 灵敏度检测

取 9.85×10^{10} — 9.85×10^0 copies/ μL 的标准品质粒为模板分别进行PCR和TaqMan qPCR检测, 结果显示, 普通PCR最低检出限为 9.85×10^2 copies(图4A), TaqMan qPCR检出限为9.85 copies($C_t = 35.49$), 根据检测限, 设定当 $C_t > 36$ 时, 判定检测结果为阴性,

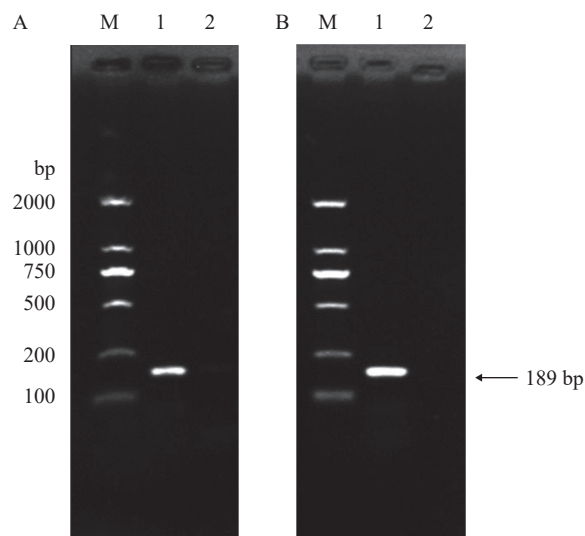


图1 鲷鱼诺卡氏菌*SecA*基因扩增(A)与质粒鉴定(B)

Fig. 1 Amplification of *SecA* gene from *N. seriola*(A) and recombinant plasmid(B)

M. 标准分子量DL2000; 1. 扩增产物; 2. 阴性对照

M. DL2000 DNA marker, 1. amplified products; 2. negative control

qPCR比普通PCR灵敏度高100倍(图 4B)。

2.5 重复性检测

取 $9.85\times10^5\text{--}9.85\times10^0$ copies/ μL 的标准品质粒进行TaqMan qPCR重复性试验, 3次实验组内和组间结果显示, 变异系数均小于1%(表 3)。

2.6 特异性检测

采用建立的TaqMan qPCR方法对鲮鱼诺卡氏菌、溃疡分枝杆菌、无乳链球菌、弗氏柠檬酸杆菌、维氏气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、鳃弧菌、格氏乳球菌、嗜水气单胞菌、乳酸乳球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、植物乳杆菌和志贺邻单胞菌等细菌进行检测。结果显示, 除鲮鱼诺卡氏菌检测为阳性外, 其他溃疡分枝杆菌、无乳链球菌、维氏气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、鳃弧菌、格氏乳

球菌、嗜水气单胞菌、乳酸乳球菌、大肠杆菌、植物乳杆菌、志贺邻单胞菌和阴性对照均无扩增信号, 格氏乳球菌、铜绿假单胞菌和弗氏柠檬酸杆菌 C_t 值大于37(图 5), 表示该方法特异性良好。

2.7 应用

分别用普通PCR和建立的TaqMan qPCR方法, 对2021—2022年中国不同地区收集的42份无症状疑似患诺卡氏菌病的临床样品进行鲮鱼诺卡氏菌检测(表 4)。结果显示, PCR法阳性检出率为54.76%, TaqMan qPCR法阳性检出率为69%, 较普通PCR法提高了14.24%。

对感染发病的大口黑鲈各组织(肝脏、脾脏、肾脏、肠、胃、鳃、脑、心脏和眼睛)进行Taq-Man qPCR检测, 结果表明各脏器中均可检测到鲮

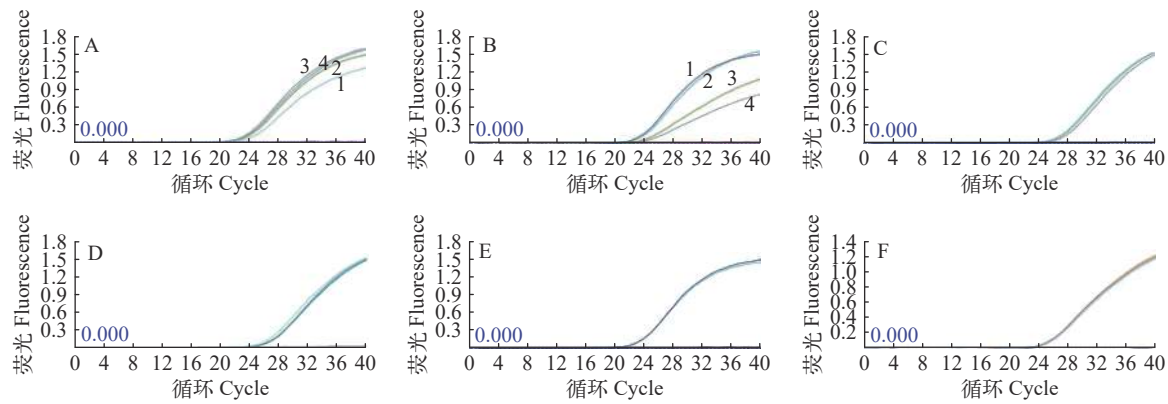


图2 引物浓度与退火温度优化

Fig. 2 Optimization of primers concentration and annealing temperatures

A. 引物浓度优化; 1—4. 引物浓度分别为0.1、0.2、0.3和0.4 $\mu\text{mol/L}$; B. 探针浓度的优化; 1—4. 探针浓度分别为0.1、0.2、0.3和0.4 $\mu\text{mol/L}$; C—F. 退火温度的优化: 分别为56 $^{\circ}\text{C}$ (C)、58 $^{\circ}\text{C}$ (D)、60 $^{\circ}\text{C}$ (E)和62 $^{\circ}\text{C}$ (F)

A. Optimization of the primer concentrations. Lines 1—4. Primer concentrations of 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 $\mu\text{mol/L}$, respectively; B. Optimization of the probe concentrations. Lines 1—4. Probe concentrations of 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 $\mu\text{mol/L}$, respectively; C—F. Optimization of annealing temperatures: 56 $^{\circ}\text{C}$ (C), 58 $^{\circ}\text{C}$ (D), 60 $^{\circ}\text{C}$ (E) and 62 $^{\circ}\text{C}$ (F), respectively

表2 鲮鱼诺卡氏菌荧光定量优化结果

Tab. 2 The results of optimization of *N. seriolae* qPCR reaction conditions

反应条件 Reaction conditions	浓度及退火温度 Concentrations or annealing temperature	C_t 值 C_t			平均 C_t 值 Mean value of C_t	标准偏差 Standard
引物浓度Primer concentrations	0.1 $\mu\text{mol/L}$	23.07	22.75	22.78	22.87	0.14
	0.2 $\mu\text{mol/L}$	22.36	22.44	22.40	22.40	0.03
	0.3 $\mu\text{mol/L}$	21.94	22.00	21.97	21.97	0.02
	0.4 $\mu\text{mol/L}$	22.12	22.11	22.25	22.16	0.06
探针浓度Probe concentrations	0.1 $\mu\text{mol/L}$	21.94	21.94	22.50	21.98	0.05
	0.2 $\mu\text{mol/L}$	21.9	22.4	22.18	22.07	0.12
	0.3 $\mu\text{mol/L}$	23.36	23.33	23.19	23.29	0.70
	0.4 $\mu\text{mol/L}$	24.00	24.09	23.98	24.02	0.05
退火温度Annealing temperatures	56 $^{\circ}\text{C}$	25.56	26.00	25.40	25.65	0.25
	58 $^{\circ}\text{C}$	24.67	25.23	25.29	25.06	0.28
	60 $^{\circ}\text{C}$	21.94	21.94	22.05	21.98	0.05
	62 $^{\circ}\text{C}$	24.17	23.98	24.08	24.08	0.08

鱼诺卡氏菌(图 6A), 其中肝、脾、肾、鳃和心脏中载量较高, 肝脏最高达 $10^{4.77}$ copies/ng DNA。攻毒发病鱼肝脏、脾脏、肾脏、肠道和胃上出现的溃烂结节部位, 病菌载量显著高于非结节部位组织, 相差10—1000倍(图 6B)。

2.8 *SecA*基因变异与遗传进化分析

为检测*SecA*基因的遗传稳定性, 采用SecA3-F/R、SecA5-F/R对LYK20810原始菌株及LYK20810第61代次菌株(LYK20810F61)的*SecA*基因全长进行了分段扩增与测序, 结果发现LYK20810F61 (GenBank ID: OQ162048)的*SecA*基因序列与原始毒株LYK20810(GenBank ID: OQ162047)一致, 表明其在遗传过程中具有高度保守性。与其他诺卡氏菌和分枝杆菌代表株构建进化树(图 7), 表明毒株LYK20810与日本鲈鱼分离株UTF1序列完全一致, 属同一谱系, 并与其他鲈鱼诺卡氏菌聚为一簇。

3 讨论

鲈鱼诺卡氏菌作为机会致病菌, 具有免疫逃逸机制, 感染过程中仍能在巨噬细胞中存活^[10, 23], 因此患病后多为亚临床感染, 后期才会出现明显症状, 菌株较难分离且生长周期需5—14d^[5, 10], 给常规分离鉴定带来一定的难度。目前鲈鱼诺卡氏菌鉴定多采用分子鉴定的方法, 一种稳定快速的检测和定量鲈鱼诺卡氏菌技术, 对确定病菌消长动态, 疾病

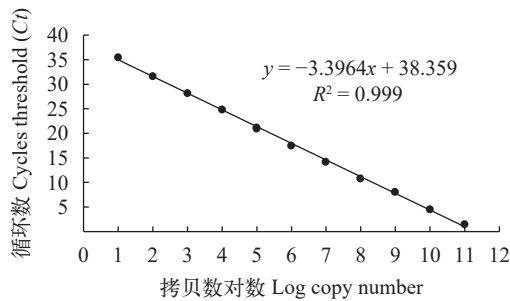


图3 qPCR标准曲线绘制
Fig. 3 Standard curve of the qPCR assay

早期临床筛查和指导用药尤为重要^[6, 24]。

荧光定量PCR作为一种分子鉴定方法, 与PCR、LAMP相比能更好地确定病菌增殖动态, 检测所需时间更短, 避免污染及假阳性的问题^[18, 25], 其高灵敏性和重复性已得到广泛的认可。目前对鲈鱼诺卡氏菌检测, 多选用16S—23S rRNA转录间隔区(ITS)和16S rRNA基因, 其他保守基因仅被提出还未被建立^[16], 16S rRNA基因虽然是细菌进行系统进化常用的管家基因, 但其用于诺卡氏菌种间的

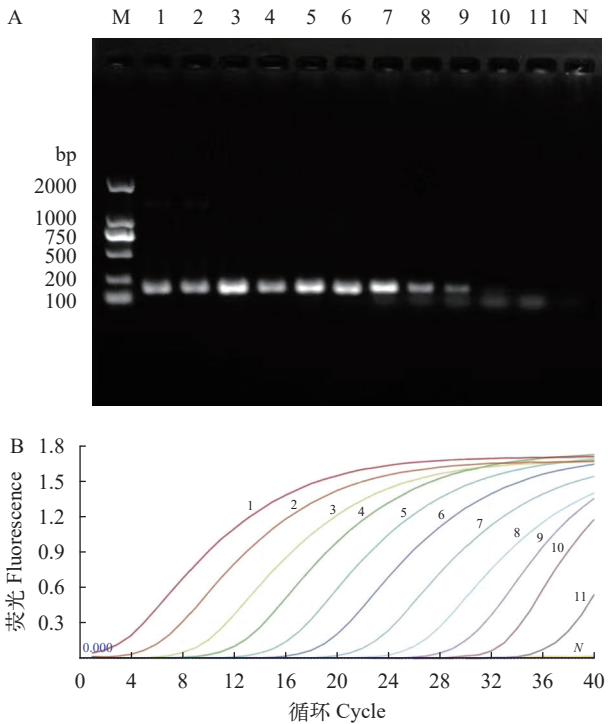


图4 普通PCR(A)和qPCR(B)灵敏度比较
Fig. 4 Comparison of sensitivity between the conventional PCR(A) and *SecA* qPCR(B)
M. 标准分子量DL2000; 1—11. 9.85×10^{10} 、 9.85×10^9 、 9.85×10^8 、 9.85×10^7 、 9.85×10^6 、 9.85×10^5 、 9.85×10^4 、 9.85×10^3 、 9.85×10^2 、 9.85×10^1 和 9.85×10^0 copies; N. 阴性对照
M. DL2000 marker; 1—11. 9.85×10^{10} 、 9.85×10^9 、 9.85×10^8 、 9.85×10^7 、 9.85×10^6 、 9.85×10^5 、 9.85×10^4 、 9.85×10^3 、 9.85×10^2 、 9.85×10^1 and 9.85×10^0 copies; N. negative control

表3 重复性分析结果
Tab. 3 Results of the repeatability analysis

质粒拷贝数/个 Plasmid copy number (copies/ μ L)	重复次数 Number of repetitions (n)	组内重复实验Intra-assay reproducibility(Ct)		组间重复实验Inter-assay reproducibility(Ct)	
		平均值 $\pm$ 标准差 Mean $\pm$ standard deviation	变异系数 CV	平均值 $\pm$ 标准差 Mean $\pm$ standard deviation	变异系数 CV
9.85×10^5	3	17.64 $\pm$ 0.05	0.27	17.55 $\pm$ 0.05	0.42
9.85×10^4	3	21.24 $\pm$ 0.09	0.44	21.19 $\pm$ 0.04	0.19
9.85×10^3	3	25.03 $\pm$ 0.07	0.04	24.92 $\pm$ 0.09	0.39
9.85×10^2	3	28.65 $\pm$ 0.12	0.41	28.45 $\pm$ 0.14	0.49
9.85×10^1	3	32.50 $\pm$ 0.13	0.39	32.74 $\pm$ 0.32	0.99
9.85×10^0	3	35.43 $\pm$ 0.08	0.23	35.64 $\pm$ 0.33	0.94

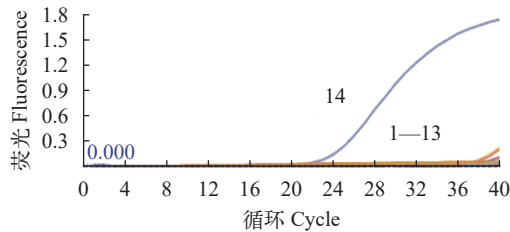


图5 鲱鱼诺卡氏菌qPCR特异性检测

Fig. 5 Assessment of the specificity of the *SecA* qPCR assay

1—13. 溃疡分枝杆菌、无乳链球菌、弗氏柠檬酸杆菌、维氏气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、鳗弧菌、格氏乳球菌、嗜水气单胞菌、乳酸乳球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、植物乳杆菌和类志贺单胞菌; 14. 鲱鱼诺卡氏菌

1—13. *M. ulcerans*, *S. agalactiae*, *C. freundii*, *A. veronii*, *E. tarda*, *V. anguillarum*, *L. garvieae*, *A. hydrophila*, *L. lactis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. plantarum*, *P. shigelloides*; 14. *N. seriolae*

表4 TaqMan qPCR和PCR反应检测对比

Tab. 4 Comparison of *SecA* qPCR and PCR assay

样品量 Number of samples	普通PCR Conventional PCR		Taqman 荧光定量PCR Taqman qPCR	
	阳性样品 检出量 Number of positive samples	阳性样品 检出率 Positive detection rate (%)	阳性样品 检出量 Number of positive samples	阳性样品 检出率 Positive detection rate (%)
42	23	54.76	29	69

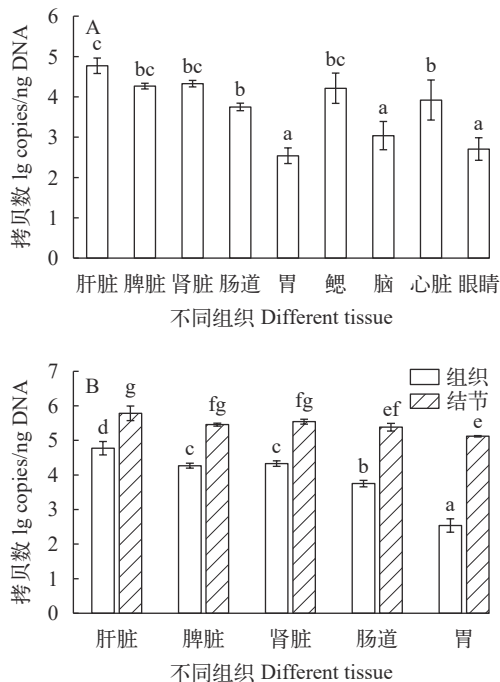
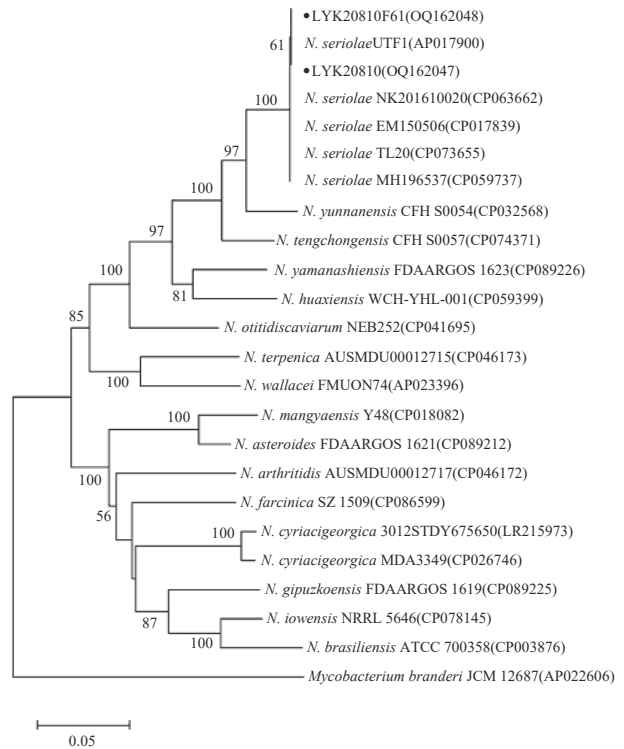


图6 鲱鱼诺卡氏菌在受感染大口黑鲈各组织中的载量

Fig. 6 Bacterial load in organs of *M. salmoides* infected by *N. seriolae*

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), $n = 5$

Different letters mean the significant difference ($P < 0.05$), $n = 5$

图7 基于*SecA*基因序列的系统进化树Fig. 7 Phylogenetic tree based on sequences of *SecA* gene

•表示原始菌株及传代后菌株; 标线代表5%的序列差别

• represents the original strain and subcultured strain; Bar. Nucleotide divergence is 5%

分类不具优势^[26]。诺卡氏菌的*SecA1*基因具有较高的种内保守型, 较低种间进化速率, *SecA1*基因在种内分型上更具优势性^[21]。

本研究根据鲱鱼诺卡氏菌的管家基因*SecA*设计引物和探针, 对反应条件进行优化, 建立的鲱鱼诺卡氏菌qPCR法在1h内, 即可实现快速量化检测, 最低检出限可达到 9.85×10^0 copies, 灵敏度较常规PCR高100倍, 组内组间重复性变异系数均小于1%, 与已报道的鲱鱼诺卡氏菌检测方法相比, 具有较高的敏感性和重复性^[13, 15, 17, 18]。在14种常见细菌中只能检出鲱鱼诺卡氏菌, 具有较高的特异性。对来自不同地区的42份无症状疑似鲱鱼诺卡氏菌的临床样品检测结果表明, TaqMan qPCR的阳性检出率69%, 比普通PCR提高14.24%, 表明该方法比PCR检测方法更敏感和可靠。

通过建立的方法对受鲱鱼诺卡氏菌感染的大口黑鲈临床样品进行定量, 结果表明各组织均可检测到鲱鱼诺卡氏菌, 其中肝脏非结节部位中最高达 $10^{4.77}$ copies/ng DNA, 结节处含量高达 $10^{5.78}$ copies/ng DNA, 在实际检测应用时, 可以直接取结节处进行检测, 结果更直观。对鲱鱼诺卡氏菌原始菌株及第61代次菌株进行*SecA*基因测定比对, 结果表明

传代菌株没有发生位点变异。以分枝杆菌JCM 12687为外群建立系统发育树分析,证实*SecA*基因种内保守,种间分离,可以作为鲮鱼诺卡氏菌检测靶基因。

4 结论

本研究建立的鲮鱼诺卡氏菌TaqMan qPCR检测方法具有优秀的灵敏度和特异性,是一种可靠的检测手段。该方法不仅可作为有效的流行病学调查工具,还可用来进行鲮鱼诺卡氏菌病的临床筛查,对疾病进行早期诊断,提前判断疾病发生,合理指导用药,减少鲮鱼诺卡氏菌对水产行业的危害。

参考文献:

- [1] Zhang N, Zhang H R, Dong Z D, *et al.* Molecular identification of *Nocardia seriolae* and comparative analysis of spleen transcriptomes of hybrid snakehead (*Channa maculata* female×*Channa argus* male) with nocardiosis disease [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022(13): 778915.
- [2] Ding Z H, Zhao Z C, Li G H, *et al.* Isolation, identification and antibiotic sensitivity of a pathogenic bacterium from *Trachinotus ovatus* [J]. *Natural Science Journal of Hainan University* (Natural Science Edition), 2021, **39**(2): 153-159. [丁泽昊, 赵子晨, 李桂华, 等. 1株卵形鲳鲹病原菌的分离、鉴定及其药敏试验 [J]. 海南大学学报(自然科学版), 2021, **39**(2): 153-159.]
- [3] Liu Z G, Dong J J, Ke X L, *et al.* Isolation, identification, and pathogenic characteristics of *Nocardia seriolae* in largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2022(149): 33-45.
- [4] Liao P C, Tsai M A, See M S, *et al.* Isolation and characterization of *Nocardia seriolae*, a causative agent of systematic granuloma in cultured East Asian four finger threadfin, *Eleutheronema rhadinum*, and red snapper, *Lutjanus erythropterus* [J]. *Aquaculture Research*, 2020, **52**(2): 763-770.
- [5] Del Rio-Rodriguez R E, Ramirez-Paredes J G, Soto-Rodriguez S A, *et al.* First evidence of fish nocardiosis in Mexico caused by *Nocardia seriolae* in farmed red drum (*Sciaenops ocellatus*, Linnaeus) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2021, **44**(8): 1117-1130.
- [6] Liu Y S, Chen G Q, Xia L Q, *et al.* A review on the pathogenic bacterium *Nocardia seriolae*: aetiology, pathogenesis, diagnosis and vaccine development [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2023, **15**(1): 14-34.
- [7] Wang W J, Chen J L, Hou S Y, *et al.* A Histopathological Study of *Nocardia seriolae* Infection in Hybrid Snakehead [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, **38**(10): 4439-4446. [王文基, 陈建林, 侯素莹, 等. 鲮鱼诺卡氏菌感染乌斑杂交鲮的组织病理学研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, **38**(10): 4439-4446.]
- [8] He S Y, Wei W Y, Liu T, *et al.* Isolation, identification and histopathological study on lethal sarcoidosis of *Micropterus salmoides* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, **44**(2): 253-265. [何晟毓, 魏文燕, 刘韬, 等. 大口黑鲈致死性结节病原的分离、鉴定及组织病理学观察 [J]. 水产学报, 2020, **44**(2): 253-265.]
- [9] Teng J, Chen H J, Xue L Y, *et al.* Isolation, identification, and histopathological observation of pathogen causing nocardiosis in *Channa argus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, **46**(5): 836-847. [滕建, 陈红菊, 薛良义, 等. 乌鳢诺卡氏菌病致病菌的分离、鉴定及组织病理学观察 [J]. 水产学报, 2020, **46**(5): 836-847.]
- [10] Chen H X, Zhu Y J, Dong B L, *et al.* Research progress of fish nocardiosis [J]. *Scientific Fish Farming*, 2021(3): 48-51. [陈海新, 朱宇嘉, 董碧莲, 等. 鱼类诺卡氏菌病的研究进展 [J]. 科学养鱼, 2021(3): 48-51.]
- [11] Xu H S, Xu R P, Wang X N, *et al.* Co-infections of *Aeromonas veronii* and *Nocardia seriolae* in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022(173): 105815.
- [12] Liu L H, Hu L, Yang Y Y, *et al.* Development and application of a real-time PCR assay for detection of *Aeromonas schubertii* [J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2019, **47**(8): 17-24. [刘礼辉, 胡蕾, 杨圆圆, 等. 舒伯特气单胞菌实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, **47**(8): 17-24.]
- [13] Wang G L, Liu L, Xu Y J. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of fish pathogenic *Nocardia seriolae* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, **42**(1): 27-31. [王国良, 刘璐, 徐益军. 鱼类致病鲮鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)的LAMP检测技术建立与应用 [J]. 海洋与湖沼, 2011, **42**(1): 27-31.]
- [14] Itano T, Kawakami H, Kono T, *et al.* Detection of fish nocardiosis by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, **100**(6): 1381-1387.
- [15] Jiang Y Y, Li A X. Establishment of a specific PCR assay to detect *Nocardia seriolae* [J]. *South China Fisheries Science*, 2011, **7**(6): 47-51. [蒋依依, 李安兴. 鲮诺卡氏菌特异性PCR快速检测方法的建立 [J]. 南方水产科学, 2011, **7**(6): 47-51.]
- [16] Chen G Q, Huang B Y, Zhang Z W, *et al.* Establishment of a specific PCR method for detection of *Nocardia seriolae* [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, **40**(Z2): 2656-2665. [陈国权, 黄碧艳, 张子雯, 等. 鱼类鲮鱼诺卡氏菌特异性PCR检测方法的建立 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, **40**(Z2): 2656-2665.]
- [17] Lü L L. Isolation and identification of *Nocardia seriolae* and establishment of its fluorescent quantitative PCR detection method [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2021: 29-34. [吕丽丽. 鲮鱼诺卡氏菌的分离鉴定及其荧光定量PCR检测方法建立 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2021: 29-34.]
- [18] Wang G L, Liu L, Li S Y. Development of a SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Nocardia*

- seriolae* and its application [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, **36**(4): 509-513. [王国良, 刘璐, 李思源. 鲈鱼诺卡氏菌SYBRGreen I 实时荧光定量PCR检测方法的建立与应用 [J]. *水产学报*, 2012, **36**(4): 509-513.]
- [19] Lin Q, Fu X, Liu L, *et al.* Application and development of a TaqMan real-time PCR for detecting infectious spleen and kidney necrosis virus in *Siniperca chuatsi* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017(107): 98-105.
- [20] Cabelli R J, Chen L, Tai P C, *et al.* SecA protein is required for secretory protein translocation into *E. coli* membrane vesicles [J]. *Cell*, 1988, **55**(4): 683-692.
- [21] Si C C, Li Z J, Tang L, *et al.* Identification of *Nocardia* species based on *secA1* gene [J]. *Disease Surveillance*, 2016, **31**(12): 1001-1006. [司晨琛, 李振军, 唐璐, 等. *secA1*基因用于诺卡菌种鉴定分型的研究 [J]. *疾病监测*, 2016, **31**(12): 1001-1006.]
- [22] Zhu Z, Wang S, Shan S O. Ribosome profiling reveals multiple roles of SecA in cotranslational protein export [J]. *Nature Communications*, 2022(13): 3393.
- [23] Ito S, Hirai T, Hamabe S, *et al.* Suppurative necrotizing bronchopneumonia caused by *Nocardia cyriacigeorgica* infection in a stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in Japan [J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2021, **83**(1): 146-150.
- [24] Nath B K, Das S, Das T, *et al.* Development and applications of a TaqMan based quantitative real-time PCR for the rapid detection of Pigeon circovirus (PiCV) [J]. *Journal of Virological Methods*, 2022(308): 114588.
- [25] Zhang H, Yang W Y, Xie L L, *et al.* Development and comparison of seminested PCR, qPCR, and LAMP for the rapid detection of *Arthrrium phaeospermum*, the causal agent of Bamboo Blight [J]. *Forests*, 2022, **13**(6): 850.
- [26] Roth A, Andrees S, Kroppenstedt R M, *et al.* Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, **41**(2): 851-856.

ESTABLISHMENT OF QPCR DETECTION ASSAY AND PHYLOGENETIC ANALYSIS BASED ON *NOCARDIA SERIOLAE* *SECA* GENE

ZHOU Ke-Xin¹, PAN Xiao-Yi², LIN Ling-Yun², HUANG Lei², MU Xue-Jiao², WANG Cong-Xu²,
YAO Jia-Yun², LAO Shun-Jian³ and SHEN Jin-Yu^{1,2}

(1. School of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201200, China; 2. Ministry of Agriculture and Rural Areas Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China; 3. Huzhou Agricultural Science and Technology Development Center, Huzhou 313000, China)

Abstract: *Nocardia seriolae* is one of the most common pathogenic bacteria in aquaculture animals, and the nocardiosis caused by it has brought huge economic losses to the global aquaculture industry. In order to perform diagnosis of *N. seriolae* infection quickly and early, a TaqMan qPCR detection method for *N. seriolae* was established. The primers and probes were designed with the housekeeping gene *SecA* of *N. seriolae*, and the reaction conditions were optimized, and standard curves was developed. Then the established qPCR method was tested for sensitivity, reproducibility and specificity, and applied for the detection of clinical diseased fish samples. The assay of qPCR showed high linearity in the range of 9.85×10^{10} — 9.85×10^0 copies with a sensitivity of up to 9.85 copies under the optimal primers concentration (0.3 $\mu\text{mol/L}$), the optimal probe concentration (0.1 $\mu\text{mol/L}$), and the optimal annealing extension temperature (60°C). The results of the repeatability experiment showed that the coefficient of variation between groups and within groups was less than 1%. The specificity showed that there was no amplification curve for 13 pathogens such as *S. agalactiae*, *C. freundii* and *A. veronii*. The test results of the 42 diseased *M. salmoides* samples showed that the positive rate of qPCR was 14.24% higher than that of normal PCR, and the content of nocardia in the nodules was significantly higher than that in the non-nodal site of tissues, with a maximum difference of 1000-fold. The results of *SecA* gene analysis showed that *SecA* gene was highly conserved in passage and within species, and has certain discreteness among species, so it was a good target gene for *Nocardia* species identification. The qPCR method established in this study exhibits remarkable sensitivity, specificity and repeatability, and can be used in early diagnosis and quantitative detection of *N. seriolae*, and provides an effective tool for early diagnosis and treatment of nocardiosis.

Key words: *Nocardia seriolae*; Quantitative PCR; Nocardiosis; *Micropterus salmoides*