

# 猪链球菌 2 型基因芯片检测技术的建立

刘玲玲<sup>1</sup>, 李文刚<sup>1\*</sup>, 唐桂芬<sup>1</sup>, 程亚楼<sup>2</sup>

(1. 郑州牧业工程高等专科学校, 河南 郑州 450011; 2. 河南农业大学, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 选取猪链球菌 2 型的 *cps2J* 基因设计引物和探针, 通过 PCR 扩增 Cy3 标记的 DNA 片段与固定于芯片上的探针进行杂交, 并将杂交完毕的芯片进行信号扫描分析, 根据荧光信号的强度来确定是否存在猪链球菌 2 型。结果表明, 采用浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  的探针与 PCR 产物杂交 30 min 即可得到清晰的荧光信号, 表明基因芯片检测技术是一种灵敏度高、特异好的检测方法。该方法的建立可以快速有效地对猪链球菌 2 型做出诊断, 具有较好的应用前景。

**关键词:** 猪链球菌 2 型; 基因芯片; 杂交; 检测方法

中图分类号: S828 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)02-0128-04

## Establishment of Gene Chip Method for Detecting *Streptococcus suis* Serotype 2

LIU Ling-ling<sup>1</sup>, LI Wen-gang<sup>1\*</sup>, TANG Gui-fen<sup>1</sup>, CHENG Ya-lou<sup>2</sup>

(1. Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China;

2. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The *cps2J* gene of *Streptococcus suis* serotype 2 was chosen as a target for the design of primers and probes. Amplified DNA fragments labeled by Cy3 were hybridized with the gene chip fixed with specific probes. Then whether the *Streptococcus suis* serotype 2 was in or not was detected by scanning the signal obtained from the gene chip and the intensity of fluorescent signal. The method that adopt 5  $\mu\text{mol/L}$  of probe to hybridize with PCR product hybrid for 30 min can get clear fluorescent signal. This indicates that this method is a sensitive and specific method for detecting the disease of *Streptococcus suis* serotype 2.

**Key words:** *Streptococcus suis* serotype 2; gene chip; hybrid; detection method

猪链球菌病是国家规定的二类动物疫病, 是由链球菌感染所引起的一类人畜共患的急性、热性传染病的总称。该病分布范围极广, 世界各地均有发生<sup>[1-3]</sup>。根据链球菌荚膜多糖抗原性的差异将其分为 35 个血清型, 其中以 2 型分布范围最广, 毒力最强, 对猪的致死性亦最强, 能引起人类感染, 甚至死亡<sup>[4-8]</sup>。近几年, 我国猪链球菌病的发生和危害日趋严重, 除西藏等少数地区尚未发现外, 该病在大多数省、市、自治区均有不同程度的发生与流行, 并引起从业人员感染和死亡<sup>[9-12]</sup>, 严重威胁了人类公共卫

生安全, 因此, 建立一种新型、快速、准确的猪链球菌 2 型检测方法就尤为重要。

本研究将荧光标记的猪链球菌 2 型标准菌株 PCR 扩增产物与固定于芯片上的探针杂交制作基因芯片, 以达到检测链球菌的目的。制备的猪链球菌 2 型基因芯片, 可以成功检测到猪链球菌 2 型特异区基因, 荧光信号清晰, 敏感性高, 实际应用效果好, 是一种检出率高的诊断方法。该方法不仅为实现多种病原体在同一张芯片上进行检测奠定基础, 同时也为其他致病菌应用基因芯片方法检测提供了

收稿日期: 2012-09-13

基金项目: 河南省科技攻关项目(092102110026)

作者简介: 刘玲玲(1987-), 女, 河南新乡人, 在读硕士研究生, 研究方向: 畜禽疫病分子生物学。E-mail: liulingling678@163.com

\* 通讯作者: 李文刚(1964-), 男, 河南南阳人, 教授, 博士, 主要从事预防兽医学研究。E-mail: wengang-li@126.com

理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 标准菌株

猪链球菌2型菌株(S735),由河南农业大学王川庆教授惠赠。

### 1.2 主要仪器和试剂

基因芯片点样仪(美国 Bio-Dot 公司)、DBT-07 凝胶成像系统(英国 UVITEC 公司)、基因芯片扫描仪(法国 Innopsys 公司)、DYY-31A 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂)、PCR 扩增仪(Biometra 公司)。

醛基化载玻片、杂交缓冲液(上海百傲生物科技有限公司)、Ex Taq 酶、DNA Marker DL2000(大连宝生物工程有限公司)、LB 增菌液(加有 5% 的小牛血清)、5×电泳储存液(5×TBE)、1.0% 琼脂糖凝胶、100×Denhardt、20×SSC、10%SDS、基因芯片点样缓冲液、洗脱液均由郑州牧业工程高等专科学校动物传染病学实验室配制。

### 1.3 细菌基因组 DNA 的提取

用接种环在无菌条件下取保存的猪链球菌2型标准菌株,接种于绵羊血琼脂平板上,37℃下培养约24h,挑取血平板上的单个菌落接种于5mL加入5%小牛血清的LB液体培养基中,37℃、180r/min振荡培养约16h,得细菌培养液,按照基因组DNA提取试剂盒说明书步骤提取模板DNA。

### 1.4 引物及探针的设计与合成

参考文献[13],以猪链球菌2型(菌株号为S735,GenBank序列号为AF118389)的*cps2J*基因为靶序列,利用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物和探针。上游引物:5'-TGGAAT-ACGCAGAGCAAGAT-3',下游引物:5'-Cy3-AG-CAAGTAACCCCTCCCGACA-3';探针:5' NH<sub>2</sub>-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-ACGGTATCAAAAATAG-CACAGCAAA -3'。在下游引物5'端用Cy3进行荧光标记,探针的5'端进行氨基化修饰,修饰氨基和探针之间加上16个T。引物和探针均由上海生工生物工程技术有限公司合成。先用灭菌水将合成好的冻干引物稀释成100μmol/L的母液,再稀释为20μmol/L置于-20℃冰箱中冻存储用。

### 1.5 基因芯片的制备

先用灭菌水将合成好的冻干探针稀释成100μmol/L的母液,取5μL探针母液+45μL灭菌水+50μL点样缓冲液,稀释成终浓度为5μmol/L

的探针。在96孔U形板的A1孔加入100μL点样缓冲液作空白对照,B1加入100μL探针,使用基因芯片点样仪按设定好的程序在醛基化基片上点样。点样环境参数为相对湿度55%~65%,温度15~30℃,各探针点间距为1.5mm,点样阵列设定为2个矩阵,每个矩阵点样为7×3,将点样完毕的芯片与盛有探针固定增效剂的敞口容器一同放入密闭容器内,静置于30℃烘箱干燥过夜备用。芯片点样方式见图1。

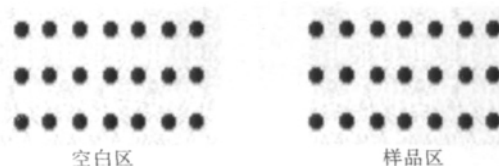


图1 猪链球菌2型基因芯片点样方式

### 1.6 荧光标记PCR产物的制备与鉴定

对PCR反应条件和参数逐个进行优化,确立最佳引物浓度和扩增反应条件,杂交用产物需采用不对称PCR。反应总体积为25μL,其中10×Buffer 2.5μL,dNTPs(10mmol/L)2.0μL,上游引物(20μmol/L)0.2μL,下游引物(20μmol/L)0.5μL,模板DNA1.0μL,Ex Taq酶0.3μL,灭菌水18.5μL,试验时应先预混合上述反应体系中除下游引物以外的其他成分,最后在暗室中加入下游引物,充分混匀后置于PCR仪进行扩增。扩增反应条件为:95℃预变性5min;95℃变性45s,56℃退火45s,72℃延伸1min,共35个循环;最后72℃延伸10min。

将PCR扩增产物在1%的琼脂糖凝胶中电泳,并用凝胶成像分析系统观察拍照。

### 1.7 基因芯片的杂交与信号扫描分析

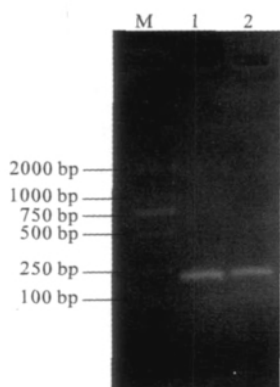
将已标记的PCR扩增产物置于PCR仪上,98℃变性10min后,立即冰浴5min。取PCR产物20μL和杂交缓冲液180μL加于离心管中,混匀后将其全部加到芯片的点样区,将芯片放入杂交盒内,置于42℃水浴锅中避光杂交30min。杂交完毕的芯片放置在玻片架上,立即用洗液1、洗液2、洗液3各洗涤2min,离心干燥后即可用于扫描分析。以上操作均在避光条件下进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 不对称PCR扩增产物分析

以猪链球菌2型基因组DNA为模板,用其特异性引物进行不对称PCR扩增,经琼脂糖凝胶电泳

鉴定扩增结果见图 2。由图 2 可见,扩增片段大小约为 209 bp,与预计目的片段相同。



M. Marker DL2000;

1、2. 上下游引物浓度为 1 : 2.5 的链球菌 2 型 PCR 产物

图 2 猪链球菌 2 型基因不对称 PCR 扩增结果

## 2.2 芯片杂交扫描结果分析

用 2 型链球菌的不对称 PCR 扩增产物与固定在芯片上的探针进行杂交后经扫描仪扫描,荧光信号强度结果见图 3,其中左边区域为空白对照,右边区域为 5  $\mu\text{mol/L}$  的探针与样品杂交扫描结果。

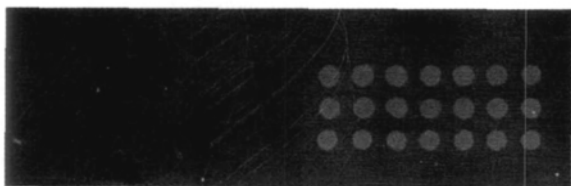


图 3 猪链球菌 2 型检测芯片杂交扫描结果

## 3 结论与讨论

### 3.1 基因芯片技术特点

基因芯片是生物芯片中的一种,又称为 DNA 芯片、cDNA 芯片或寡核苷酸芯片,它在基片上固定大量的目的基因,利用核酸杂交的原理,用荧光素标记的待检样品核酸探针与芯片在相同条件下杂交,杂交结果经精密扫描仪扫描、计算机软件分析获得数据信息<sup>[14-17]</sup>。因此,基因芯片检测技术与现代分子生物学技术如 PCR 等相比具有以下特点:(1)高通量,即一张芯片可以固定成千上万个靶基因(最多的可以达到 10 万个以上),可以同时成千上万个样品进行检测与分析;(2)并行性,即在同一反应条件下的检测能力,它有效地避免了试验操作误差、设备造成的系统误差,使检测结果可信度高;(3)自动化,芯片杂交后使用激光共聚焦扫描仪扫描芯片信息,经计算机软件分析处理而获得结果,在这个过程

中避免了人工操作的误判,结果客观准确,真实可靠<sup>[18]</sup>。

### 3.2 目的基因的标记和探针的修饰

目的基因的标记方法很多,如反转录标记、随机引物扩增标记、限制性显示标记和 PCR 扩增标记等<sup>[19]</sup>。本试验中目的基因的标记采用 PCR 扩增标记,其优点是在完成对目的基因荧光标记的同时,实现目标片段的特异性扩增,提高了检测的灵敏度。

本试验对探针的 5' 端进行了氨基化修饰,以便与醛基玻片的表面结合,从而固定在玻片上。芯片杂交是游离的靶序列寻找并与一端以共价键固定于玻片上的寡核苷酸探针结合的过程。如果探针与玻片之间的距离太小,杂交时的空间位阻就会很大,使得靶序列难以接近探针与之结合。为增加探针与玻片之间的距离,本研究合成探针时人为地在探针与玻片结合的一端加上了 16 个 T,主要作用是增加探针与玻片的距离,降低空间位阻,促进芯片杂交的顺利进行<sup>[20]</sup>。

本研究制备的猪链球菌 2 型基因芯片,可以成功地检测到猪链球菌 2 型特异区基因,荧光信号清晰,敏感性高,实际应用效果好,是一种检出率高的诊断方法。通过对试验条件的反复摸索,采用浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  的探针与 PCR 产物杂交 30 min 即可得到清晰的荧光信号,较之前的相关研究大大缩短了检测时间,采用较低浓度的探针也降低了成本。本试验将基因芯片技术应用于动物疫病的检测,成功建立了基因芯片检测技术平台,解决了疫病检测中的难题,具有一定的理论意义和应用价值。

### 参考文献:

- [1] 江定丰,陈灵芝.猪链球菌 2 型感染猪和人的现状及研究进展[J].动物医学进展,2008,29(5):82-85.
- [2] 路玲玲,李蓉,郑玉玲,等.2 型猪链球菌毒力因子研究进展[J].中国卫生检验杂志,2008,18(3):570-572.
- [3] 王显清.猪链球菌病的诊断与防治[J].现代农业科技,2008(24):246-248.
- [4] 李雅静,高志清,赵宝华.猪链球菌检测及猪链球菌病防治的研究进展[J].中国兽药杂志,2007,41(10):39-43.
- [5] 仲永庆.猪链球菌病的鉴定及中草药体外抑菌试验[J].现代农业科技,2010(21):339-342.
- [6] 黄凤清,邱英,钟远宣,等.猪败血性链球菌病的发生与防治[J].现代农业科技,2010(13):373-374.

- [7] 季志东,孙顺清,马墉,等.猪链球菌病的调查与防治[J].天津农业科学,1998(10):49-50.
- [8] 陈进喜,蒋碧桂,杨拥军.猪链球菌9型钦州株的分离及其 *cps9H* 基因序列分析[J].现代农业科技,2010(17):317-319.
- [9] 杨维中,余宏杰,景怀琦,等.四川省一起伴中毒性休克综合征的人感染猪链球菌2型暴发[J].中华流行病学杂志,2006,27(3):185-191.
- [10] 孙志华.当前猪病的发病特点及综合防控措施[J].现代农业科技,2012(4):346-347.
- [11] 郭小参,崔保安,陈红英,等.淮南猪 *IL-2* 全基因的克隆与遗传进化分析[J].华北农学报,2008,23(4):14-18.
- [12] 赵恒章,姜金庆,赵坤,等.原场猪链球菌蜂胶苗的制备及免疫效果试验[J].山西农业科学,2007,35(3):83-85.
- [13] 赵冉,孙建和,陆承平.猪链球菌国内分离株毒力因子的分布特征[J].上海交通大学学报,2006,24(6):495-498.
- [14] 帕提古丽,罗薇.基因芯片的应用[J].西南民族大学学报,2004,30(3):341-345.
- [15] Bryant P A, Venter D, Robins-Browne R, *et al*. DNA chip[J]. Lancet Infect Dis, 2004, 4(2):100-111.
- [16] 叶芬,蔡家利.基因芯片技术在猪病毒性疾病诊断中的应用[J].动物医学进展,2010,31(7):87-90.
- [17] 崔淼.生物技术的进展与趋势[J].天津农业科学,2010,16(3):50-53.
- [18] Khan A S. Genomics and microarray for detection and diagnostics[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2004, 51(4):463-467.
- [19] 吕翠,马小明,尹燕博,等.猪流感病毒 M 基因核酸探针的制备与应用[J].华北农学报,2009,24(1):87-92.
- [20] 潘继红,韩金祥,黄海南,等.寡核苷酸芯片探针固定化和杂交条件的优化[J].临床检验杂志,2003,21(3):150-152.
- (上接第 119 页)
- [13] 徐惠珠,金义兴,赵子恩,等.三峡库区特有植物疏花水柏枝繁殖的初步研究[J].长江流域资源与环境,1999,8(2):158-161.
- [14] 赵兰枝,齐振威,王明玲.合欢种子不同温度的发芽试验[J].山东林业科技,2004,28(4):10-11.
- [15] 韩玉竹,伍莲,曾兵,等.贮藏温度和种子含水量对高羊茅种子活力的影响[J].种子,2011,30(6):41-44.
- [16] 芦光新,李希来,乔有明,等.丸粒化处理对几种牧草种子萌发及生理特性的影响[J].草地学报,2011,19(3):451-457.
- [17] 李连发,廖建雄,江明喜,等.干藏和淹水对三峡库区21种草本植物种子萌发的影响[J].武汉植物学研究,2010,28(1):99-104.
- [18] 龚记熠,邵峰,乙引,等.观赏辣椒种子萌发特征研究[J].种子,2011,30(6):93-95.
- [19] 解楠楠,骆文坚,姜琴,等.温度与含水量对金钱松种子贮藏的影响[J].江西农业大学学报,2011,33(6):1100-1106.
- [20] 傅家瑞.种子生理[M].北京:科学出版社,1985.
- [21] 杨丽华,胡泉剑,管开云.秋海棠属三种植物种子贮藏和萌发特性的初步研究[J].云南农业大学学报,2010,25(6):844-849.
- [22] 杨期和,尹小娟,叶万辉,等.顽拗型种子的生物学特性及种子顽拗性的进化[J].生态学杂志,2006,25(1):79-86.