

致病性嗜水气单胞菌多重 PCR 检测方法的建立

饶静静¹, 李寿崧², 黄克和¹, 江树勋², 潘群兴¹

(1. 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 福建出入境检验检疫局, 福建 福州 350002)

摘要:致病性嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是近年中国各地大规模流行的淡水养殖鱼类暴发性疾病的主要病原, 本研究针对 GenBank 中登录的致病性嗜水气单胞菌的气溶素基因 (*hlyA*)、溶血素基因 (*aerA*) 以及为气单胞菌属所特有的内参照基因 16S rRNA 保守区设计了 3 对特异性引物, 通过进行多重 PCR 反应体系优化, 多重 PCR 产物的测序鉴定与特异性和敏感性实验, 试图建立一种检测致病性嗜水气单胞菌的多重 PCR 检测方法。对 8 株嗜水气单胞菌、16 株相关菌株进行多重 PCR 检测, 结果显示, 非致病性分离株均未扩增出毒力基因 *hlyA* 和 *aerA*, 而致病性分离株则至少含有 *hlyA* 基因; 对 40 份送检的水产动物样品进行多重 PCR 检测, 结果与常规微生物学检测符合率为 97.5%。多重 PCR 检测方法具有较高的敏感性与特异性, 最低可检测模板量为 10 ng 的样品。该方法的建立对水产动物嗜水气单胞菌病的快速诊断和分子流行病学的调查有重要意义。[中国水产科学, 2007, 14 (5): 749–755]

关键词:嗜水气单胞菌; *hlyA* 基因; *aerA* 基因; 多重 PCR

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)05–0749–07

致病性嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 属于气单胞菌科 (*Aeromonadaceae*) 气单胞菌属 (*Aeromonas*), 是革兰氏阴性短杆菌, 为人、畜及水生动物共患的条件致病菌, 是多种水产动物的主要致病菌^[1]。该菌可引起变温动物, 包括鱼类、蛇类、两栖类动物的出血性败血症, 还可导致不同年龄段人类的急性胃肠炎等^[2]。目前, 对该菌的检测方法主要有 Dot-ELISA^[3]、SPA-CoA^[4]、间接 ELISA^[5] 等免疫学检测技术, 但都存在着操作复杂、特异性不强的缺点。核酸探针等分子生物学检测方法也有较多报道^[6], 如 Wang 等^[7]建立了检测嗜水气单胞菌和温和气单胞菌 (*A. sobria*) 的多重 PCR 方法。

嗜水气单胞菌有致病菌株与非致病菌株之分。国内外学者普遍认为, 嗜水气单胞菌的致病性与其胞外产物即毒力因子密切相关^[8]。目前已发现的嗜水气单胞菌的毒力因子有外毒素、蛋白酶、S 层、菌毛、转铁蛋白和外膜蛋白等, 而外毒素是嗜水气单胞菌的重要致病因子, 已确定的外毒素有气溶素 (Aerolysin)、溶血素 (Hemolysin)、溶血毒素 (Hemolytic toxin) 和细胞毒性肠毒素 (Cytolytic enterotoxin) 等^[9]。已有的致病性气单胞菌检测试剂

盒是建立在检测蛋白酶的基础上的, 它对致病性嗜水气单胞菌的检测必须分两步进行, 首先要对细菌进行鉴定, 以后才检测蛋白酶, 这种方法繁琐、费时, 不能适应流行病学调查和临床病原菌检测的快速、简便的要求。本实验应用多重 PCR 技术检测致病性嗜水气单胞菌的 *hlyA*、*aerA* 基因并辅以内参照基因 16S rRNA (为气单胞菌属所特有), 针对这 3 种基因的特异保守区设计 3 对特异性引物, 试图建立一种检测致病性嗜水气单胞菌的多重 PCR 方法, 以期对水产动物嗜水气单胞菌快速诊断和分子流行病学调查提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 嗜水气单胞菌标准株 Ah10501 购于北京陆桥公司, 嗜水气单胞菌分离株 (NK) 由福建省农业科学院水产所惠赠, 嗜水气单胞菌分离株 (AS1.1801) 购自广东省微生物研究所菌种保藏中心, 嗜水气单胞菌分离株 1.180 1、1.092 7、1.201 7 购自中国普通微生物菌种保藏中心, 嗜水气单胞菌非致病分离株 W0720、W0721、W0722 均由福建出

收稿日期: 2006–12–13; 修订日期: 2007–03–09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671547); 福建省科技厅重点项目 (2004Y046).

作者简介: 饶静静 (1980–), 女, 在读硕士研究生, 从事临床病理与分子诊断学研究.

通讯作者: 黄克和 (1958–), 男, 教授, 博士生导师, 从事动物临床病理与分子诊断学研究. Tel: 025–84395507; E-mail: khhuang@njau.edu.cn

入境检验检疫局微生物所分离并鉴定,单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、某弧菌 (*Vibrio*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、非 O1 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、河弧菌 (*Vibrio fluvialis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 分离株 **XA**、迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 分离株 **EA** 均为本实验室保存。

1.1.2 试剂及仪器 PCR 试剂购自上海生工生物工程技术有限公司, *Taq* DNA 聚合酶 (BBI), dNTP Mixture (各 2.5 mmol)、DL2000 DNA Marker、100 bp DNA Marker (厦门泰京), 其他常规试剂

均为国产分析纯。Tgradient96 梯度 PCR 仪 (德国 Biometra 公司); 水平电泳装置 (美国 Biorad 公司); 琼脂糖凝胶成像系统 (KODAK 公司/美国); UI-tro-spec 1100pro 核酸蛋白分析仪 (英国安玛西亚); 台式高速离心机 (德国 Eppendorf, Minspin)

1.2 引物设计

根据 GenBank 中登录的嗜水气单胞菌气溶素基因、溶血素基因、16SrRNA 的序列 (登录号分别为 M16495、U81555 和 X74677), 按照多重 PCR 引物设计原则, 应用 Oligo 6.0 软件选取目的基因中高度保守区, 设计并合成 3 对特异性引物。各引物序列、预期扩增片段长度及其在开放阅读框 (ORF) 中的位置见表 1。

表 1 PCR 扩增用引物
Tab.1 Primers used for PCR amplification

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	目的基因 Target gene	ORF 中位置 Location within ORF	PCR 扩增产物 长度 /bp Length of PCR amplicon	GenBank 登录号 GenBank accession no.
aerA-f	GCAGAGCCCGTCTATCCAGA	aerA	601-1932	1 332	M16495 ^[4]
aerA-r	CTCCAGCCTCAGGCCTTGAC				
hlyA-f	ACCTCAACGTCAACCGCAAGAT	hlyA	536-1411	876	U81555
hlyA-r	GTCTGCGCTTGTCGGTATCCTC				
Ah16s-f	GGGAGTGCCTTCGGAATCAGA	16s rRNA	1020-1375	356	X74677 ^[2]
Ah16s-r	TCACCGCAACATTCTGATTTG				

1.3 细菌培养与基因组 DNA 提取

挑取嗜水气单胞菌标准株 Ah10501 和迟钝爱德华氏菌致病性分离株 EA 的典型单菌落接种于 5 mL LB 培养液中, 置于 37 ℃, 200 r/min 振荡培养 12~18 h, 使菌液 OD₂₆₀ 值达到 0.4~0.6, 取出 1.5 mL 培养菌液置于 1.5 mL EP 管中, 12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体。细菌染色体 DNA 的提取, 参考文献 [10]。将提取的 DNA 稀释 100 倍后, 在核酸蛋白分析仪上测定 OD₂₆₀ 值, 将 DNA 浓度稀释至 100 ng/μL 作为 PCR 反应的模板, 于 -20 ℃ 贮存备用。

1.4 多重 PCR 反应体系的建立和优化

在薄壁的 Ep 管中依次加入 10×Buffer (不含 Mg²⁺)、Mg²⁺ (25 mmol)、dNTP (2.5 mmol each)、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL)、10 pmol 上下游引物 (aerA-f/r、hlyA-f/r、Ah16s-f/r)、DNA 模板, 最后加

去离子水定容至 20 μL。先建立并优化单个靶基因 PCR 检测体系, 继而进行多重 PCR 体系组合和条件优化。

1.4.1 引物浓度组合比的优化 PCR 反应体系为 20 μL, 其中 DNA 模板 200 ng, 10×Buffer (不含 Mg²⁺) 2.0 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.2 μL, dNTP (2.5 mmol/L each) 0.8 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 不同浓度组合比的目的基因引物各 0.4 μL (表 2), 最后用灭菌蒸馏水补足体积至 20 μL。将样品混匀后, 4 000 r/min 瞬时离心, 于 94 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 变性 1 min, 61 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 共进行 30 个循环, 最后在 72 ℃ 继续延伸 7 min, 将温度降至 4 ℃ 保存。以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 (96V 电压下电泳 60 min) PCR 产物, 分析引物浓度组合比对多重 PCR 扩增效果的影响。

表2 引物浓度组合比的优化
Tab.2 Optimization of primers concentration

引物 Primer	组合 Combination						pmol
	1	2	3	4	5	6	
<i>aerA</i> -f/r	15	15	15	10	10	10	
<i>hlyA</i> -f/r	3	3	1	3	3	1	
Ah16s-f/r	2	1	1	2	1	1	

1.4.2 退火温度的优化 PCR反应体系为20 μL , 其中DNA模板200 ng, 10 $\times$ Buffer (不含 Mg^{2+}) 2.0 μL , Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.2 μL , dNTP (2.5 mmol/L each) 0.8 μL , Taq DNA聚合酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , 3对引物初始浓度分别为10 pmol/L (*aerA*)、1 pmol/L (*hlyA*) 和1 pmol/L (16S rRNA), 加入的体积均为0.4 μL , 最后用灭菌蒸馏水补足余下体积。将样品混匀后, 4 000 r/min 瞬时离心后进行PCR扩增, 其循环参数为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min, 分别于56.2 $^{\circ}\text{C}$ 、58.2 $^{\circ}\text{C}$ 、60.6 $^{\circ}\text{C}$ 、63.0 $^{\circ}\text{C}$ 、65.3 $^{\circ}\text{C}$ 和66.2 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min, 共进行30个循环, 最后在72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸7 min, 将温度降至4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。以1.5%琼脂糖凝胶电泳 (96 V 电压下电泳60 min) 检测PCR产物, 分析退火温度对多重PCR扩增效果的影响。

1.4.3 Mg^{2+} 浓度的优化 PCR反应体系为20 μL , 其中DNA模板200 ng, 10 $\times$ Buffer (不含 Mg^{2+}) 2.0 μL , dNTP (2.5 mmol each) 0.8 μL , Taq DNA聚合酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , 3对引物初始浓度分别为10 pmol/L、1 pmol/L 和1 pmol/L, 加入的体积均为0.4 μL , 待优化的 Mg^{2+} 体积依次为2.4 μL 、2.0 μL 、1.6 μL 、1.2 μL 、0.8 μL 和0.4 μL , 使其终浓度分别为3.0 mmol/L、2.5 mmol/L、2.0 mmol/L、1.5 mmol/L、1.0 mmol/L 和0.5 mmol/L, 用灭菌蒸馏水补足余下体积。其余各步同1.4.2, 分析 Mg^{2+} 浓度对多重PCR扩增效果的影响。

1.5 多重PCR产物的鉴定

将*aerA*、*hlyA* 和16s rRNA多重PCR扩增产物回收, 克隆到pMD18-T载体中, 转化大肠杆菌, 提取质粒后, 由上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 并与GenBank登录的*aerA*、*hlyA* 和16S rRNA基因序列进行比对。

1.6 多重PCR的特异性试验

因气单胞菌属的有些种具有肠杆菌科的一些特性, 有些种具有假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和弧菌

属 (*Vibrio*) 的某些菌的特性^[5], 因此, 应用建立的多重PCR方法分别对单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、弧菌 (*Vibrio*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、非O1霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、河弧菌 (*Vibrio fluvialis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 分离株XA、嗜水气单胞菌分离株AS1.1801、嗜水气单胞菌致病性分离株NK、嗜水气单胞菌非致病性分离株1.0927、迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 分离株EA (阴性对照)、嗜水气单胞菌标准株 (阳性对照) 这16株菌进行多重PCR扩增。以测定其特异性。

1.7 多重PCR的敏感性试验

将嗜水气单胞菌标准株Ah10501用煮沸法提取的细菌基因组DNA从100 ng/ μL 开始10倍倍比稀释, 将不同稀释度的细菌基因组DNA分别取1 μL 加入反应体系, 作为模板进行多重PCR扩增, 观察结果, 以测定其敏感性。同时3个基因分别做单重PCR的敏感性。比较单重PCR与多重PCR敏感性差别。

1.8 多重PCR与其他方法的比较及其应用

用建立的PCR方法对按常规微生物学方法^[11]分离的8株已知嗜水气单胞菌株进行检测, 并比较两种方法的检测结果。用所建立的多重PCR方法对实验室送检的40份水产品样品进行检测, 并同时做常规微生物学方法检测。

2 结果与分析

2.1 多重PCR反应体系的建立和优化

以嗜水气单胞菌标准菌株基因组DNA为模板, 用设计的*aerA*-f/r、*hlyA*-f/r 和 Ah16s-f/r引物, 分别建立单个靶基因的PCR检测体系。结果显示, 用上述引物扩增*aerA*、*hlyA* 和16S rRNA基因片

段,分别得到约为1 500 bp、900 bp和400 bp的扩增片段,与预期扩增基因片段大小一致;而以单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、弧菌(*Vibrio*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、非O1霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、河弧菌(*Vibrio fluvialis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)分离株XA等菌株的基因组DNA为模板进行扩增,均未观察到相应扩增产物,表明引物有较好的特异性。

在此基础上,对多重PCR检测体系进行组合和条件优化。试验发现,反应体系中引物浓度是多重PCR成功的关键参数。本试验首先对PCR反应体系中的3对引物初始浓度配比进行优化,结果显示,当、*hlyA*和16S rRNA 3个基因的引物初始浓度(pmol)比为10:1:1时,预期扩增的特异性条带最清晰,均一性最好,扩增效率最高。

多数PCR使用标准缓冲液,由1.5 mmol/L Mg^{2+} 、50 mmol/L Tris和50 mmol/L KCl组成(Cetus缓冲液)^[6]。在筛选出最佳引物浓度组合比的基础上,本实验进一步对 Mg^{2+} 终浓度进行了优化。结果显示, Mg^{2+} 终浓度偏低时(≤ 1.0 mmol/L)对大片段目的基因和*hlyA*的扩增效率很低甚至扩不出目的条带;当 Mg^{2+} 浓度为1.5 mmol/L时,*aerA*、*hlyA*和16S rRNA 3条目的基因条带均较清晰,多重PCR扩增效果最佳;而 Mg^{2+} 浓度过高时(≥ 2.0 mmol/L),则出现了非特异性条带,而且还抑制了大片段目的基因的扩增。

用优化后的多重PCR条件对、*hlyA*和16S rRNA 3个目的基因进行PCR扩增后,取10 μ L多重PCR扩增产物与适量上样缓冲液混匀,以1.5%琼脂糖凝胶电泳检测(96 V电压下电泳60 min),然后将其置于紫外凝胶成像系统中观察结果并拍照。结果扩增出预期大小的目的基因(图1),可初步认定扩增出的片段为目的基因条带。

2.2 多重PCR产物的鉴定

*aerA*基因测序结果与GenBank中提交的AF539467、DQ186611、AB021152、M16495等基因序列的同源性在91%~99%之间,说明其为的特异性条带;*hlyA*基因测序结果与GenBank中提交的AB206039、AF146599、AHU81555、

AY442273等*hlyA*基因序列的同源性在88.7%~97.9%之间,说明其为*hlyA*的特异性条带;16S rRNA基因测序结果与GenBank中提交的DQ207728、EF077527、CP000462、DQ990053等16S rRNA基因序列的同源性均在99%以上,说明其为16S rRNA的特异性条带。

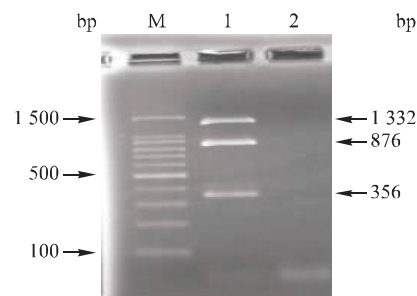


图1 嗜水气单胞菌标准株Ah10501多重PCR产物电泳结果

注:M为DNA标准分子量;1.*aerA*、*hlyA*和16S rRNA PCR产物;2.空白对照。

Fig.1 Electrophoresis identification for multiplex PCR amplification products of *A. hydrophila* standard strain

Note: M. DNA marker; 1. *aerA*, *hlyA* and 16S rRNA PCR products; 2. Negative control

2.3 多重PCR的特异性试验

多重PCR扩增测试菌结果如图2所示,仅有嗜水气单胞菌致病性分离株NK和阳性对照(即嗜水气单胞菌标准株Ah10501)能同时扩增出大小分别约为1 332 bp(*aerA*)、876 bp(*hlyA*)和356 bp(16S rRNA)的3条目的基因条带,嗜水气单胞菌分离株AS1.1801扩增出876 bp(*hlyA*)和356 bp(16S rRNA)2条目的基因条带,嗜水气单胞菌非致病性分离株1.0927仅能扩增出356 bp(16S rRNA)目的基因条带,其余测试菌均未扩增出与目的基因相同大小的条带。综合琼脂糖凝胶电泳鉴定的结果,表明本实验建立的多重PCR检测方法具有高度特异性。

2.4 多重PCR的敏感性

嗜水气单胞菌标准株Ah10501细菌基因组DNA模板10倍比稀释,测定多重PCR的敏感性(图3)。随DNA模板量的减少,扩增条带逐步减弱,当模板低于10 ng/ μ L时,均不能扩增出目的条带。当模板量在10 ng/ μ L以上时,*hlyA*、*aerA*、16S rRNA扩增效果较稳定,但较高时常伴有非特异性扩增。

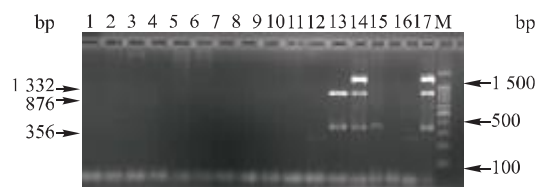


图2 嗜水气单胞菌多重PCR的特异性试验检测结果
注:1:单核细胞增生利斯特氏菌;2:沙门氏菌;3:荧光假单胞菌;4:某弧菌;5:副溶血弧菌;6:非O1霍乱弧菌;7:河弧菌;8:金黄色葡萄球菌;9:大肠杆菌;10:蜡状芽孢杆菌;11:迟钝爱德华氏菌分离株XA;12:嗜水气单胞菌分离株AS1.1801;13:嗜水气单胞菌致病性分离株NK;14:嗜水气单胞菌非致病性分离株1.0927;15:空白对照;16:阴性对照(迟钝爱德华氏菌分离株EA);17:阳性对照(嗜水气单胞菌标准株Ah10501);M为DNA标准分子量。

Fig.2 Specificity assay of multiplex PCR for *Aeromonas hydrophila*

Note 1: *Listeria monocytogenes*; 2: *Salmonella*; 3: *Pseudomonas fluorescens*; 4: *Vibrio*; 5: *Vibrio parahaemolyticus*; 6: *Vibrio cholerae*; 7: *Vibrio fluvialis*; 8: *Staphylococcus aureus*; 9: *E. coli*; 10: *Bacillus cereus*; 11: *Edwardsiella tarda* isolated strain XA; 12: *A. hydrophila* isolated strain AS1.0801; 13: virulent *A. hydrophila* isolated strain NK; 14: invirulent *A. hydrophila* isolated strain 1.0927; 15: negative control; 16: *Edwardsiella tarda* isolated strain EA; 17: positive control (*A. hydrophila* standard strain); M: DNA markers.

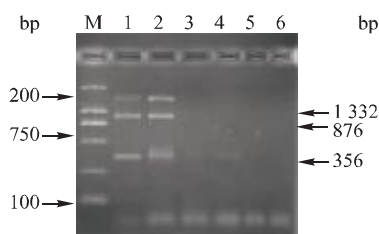


图3 DNA模板稀释法测定的多重PCR敏感性试验
注:M: Marker; 1~6: 模板DNA浓度分别为100 ng/μL、10 ng/μL、1 ng/μL、10⁻¹ ng/μL、10⁻² ng/μL和10⁻³ ng/μL.

Fig.3 Sensitivity assay of multiplex PCR of DNA templates dilution

Note: M: Marker; 1~6: the concentrations of DNA templates is 100 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL, 10⁻¹ ng/μL, 10⁻² ng/μL and 10⁻³ ng/μL, respectively.

2.5 多重PCR方法与其他方法的比较

用建立的多重PCR方法扩增8株已知的嗜水气单胞菌分离株。结果显示,8株嗜水气单胞菌均能扩增出16S rRNA基因(8/8),非致病性分离株均未扩增出毒力基因 $hlyA$ 和 $aerA$ (2/2),而致病性分离株则至少含有 $hlyA$ (6/8)或 $aerA$ (1/8)基因的1种(图4)。

与常规微生物学方法检测结果一致。说明利用该多重PCR方法检测不但快速、特异性强、敏感性高,而且能区分致病性分离株和非致病性分离株。

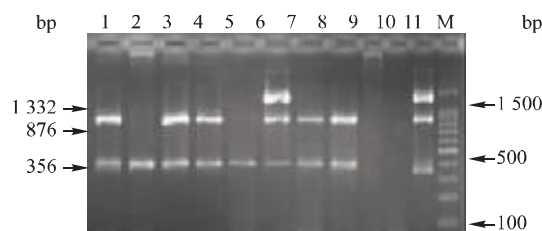


图4 分离菌株的检测

注:1~8:嗜水气单胞菌分离株1.1801、1.0927、1.2017、AS1.1801、W0720、NK、W0721、W0722;9:阴性对照;10:空白对照;11:嗜水气单胞菌标准株Ah10501;M:Marker.

Fig.4 Identification of isolated strains

Note: 1~8: *A. hydrophila* isolated strain 1.1801, 1.0927, 1.2017, AS1.1801, W0720, NK, W0721 and W0722 respectively; 9: negative control; 10: blank control; 11: *A. hydrophila* standard strain; M: Marker.

2.6 多重PCR方法的应用

应用建立的多重PCR方法对临床送检的40份水产品样品进行检测,其中阳性2份,阴性38份,与常规微生物学方法^[11]检测结果(阳性1份,阴性39份)比较,结果符合率为97.5%。

3 讨论

气单胞菌是一类广泛存在的人畜共患病原微生物,而嗜水气单胞菌则是其中的主要成员。嗜水气单胞菌有致病菌株与非致病菌株之分,致病性与其胞外产物(如肠毒素、溶血素、细胞毒素、蛋白酶等)有密切的关系^[8]。目前,对于嗜水气单胞菌的检测方法报道相当多,如常规的微生物学检测、免疫学检测、核酸杂交等,它们均有各自的优势,但也存在一些局限性,比如微生物学检测,在体外培养的条件下,细菌可能丢失产毒素的能力,所以用常规方法检测毒素时,容易漏检,出现假阴性。而免疫学检测,需要制备特异的抗血清。用PCR直接检测毒力基因,再辅以内参照基因,增加了检测的可能性。

细菌16S rDNA基因核苷酸序列具有高度的保守性,其核苷酸片段长度适宜,但它的保守性又是相对的,在保守区之间存在9~10个变异区^[12],不同科、属、种间都具有一定的变异,基于这一特点,选用嗜水气单胞菌16S rDNA基因保守区内的可变区设

计特异性引物对 16 株测试菌扩增,结果发现只有嗜水气单胞菌扩增阳性,而其他菌株均为阴性。

PCR 反应条件及体系进行优化结果表明,当 *aerA*、*hlyA* 和 16S rRNA 3 个基因的引物初始浓度 (pmol) 比为 10:1:1 时,预期扩增的特异性条带最清晰,均一性最好,扩增效率最高。因多重 PCR 的循环条件将显著影响反应的可靠性,而任何 PCR 最重要的循环参数是退火温度,退火温度即使有轻微的变化也会影响多重 PCR 反应的效果^[13]。本实验在优化出 PCR 反应最优引物浓度组合基础上进一步优化退火温度,结果显示退火温度为 63 ℃ 时,3 条目的基因扩增条带较为清晰,多重 PCR 扩增效率最佳;退火温度过高 (≥ 65.3 ℃) 时,出现非特异性条带;退火温度过低 (≤ 60.6 ℃) 时,16S rRNA 基因扩增不出。文献报道, Mg^{2+} 终浓度对多重 PCR 引物特异性有显著影响^[13]。 Mg^{2+} 终浓度偏低时 (≤ 1.0 mmol/L) 对大片段目的基因 *aerA* 和 *hlyA* 的扩增效率不高甚至扩增不出目的条带;当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时,*aerA*、*hlyA* 和 *gadB* 3 条目的基因条带均较清晰,多重 PCR 扩增效果最佳;而 Mg^{2+} 浓度过高时 (≥ 2.0 mmol/L),则出现了非特异性条带,而且还抑制了大片段目的基因 *aerA* 的扩增。

特异性试验结果表明,仅有嗜水气单胞菌致病性分离株 NK 和阳性对照(即嗜水气单胞菌标准株 Ah10501)能同时扩增出大小分别约为 1 500 bp (*aerA*)、900 bp (*hlyA*) 和 400 bp (16S rRNA) 3 条目的基因条带,嗜水气单胞菌分离株 AS1.1801 扩增出 900 bp (*hlyA*) 和 400 bp (16S rRNA) 2 条的目的基因条带,嗜水气单胞菌非致病性分离株 1.092 7 仅能扩增出 400 bp (16S rRNA) 目的基因条带,其余测试菌均未扩增出与目的基因相同大小的条带。表明本试验建立的多重 PCR 检测方法具有高度特异性。

敏感性试验结果显示,多重 PCR 最低可检测到

10 ng DNA, 完全可应用于检测实践中。对不同分离菌株的检测进一步证明了该方法的可操作性及适用性,可以用于临床、食品、水生动物的检验。

参考文献:

- [1] 朱大玲,李爱华,钱冬,等.嗜水气单胞菌毒力基因的研究进展[J].水生生物学报,2004,28(1):79-84.
- [2] Subashkumar R, Thayumanavan T, Vivekanandhan G, et al. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in acute gastroenteritis among children[J]. Indian J Med Res, 2006, 123(1): 61-66.
- [3] 马家好,李学勤,王振英,等.Dot-ELISA 快速检测鱼类运动型气单胞菌的研究[J].大连水产学院学报,1997,12(3):72-78.
- [4] 李学勤,王振英,马家好,等.淡水鱼类主要细菌性传染病快速诊断的研究[J].中国兽医学报,1997,17(1):33-35.
- [5] 陈怀青,陆承平,陈琼,等.用点酶法检测鱼类致病性嗜水气单胞菌毒素[J].动物检疫,1993,10(4):60-62.
- [6] Emekdas G, Aslan G, Tezean S, et al. Detection of the frequency, antimicrobial susceptibility, and genotypic discrimination of *Aeromonas* strains isolated from municipally treated tap water samples by cultivation and AP-PCR[J]. Int J Food Microbiol, 2006, 107(3):310-314.
- [7] Wang G, Clark C G, Liu C, et al. Detection and Characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(3):1 048-1 054.
- [8] John M P, Stephen P K, Radamin S. Secreted enzymes of *Aeromonas* [J]. PPMS Microbiol, 1997, 15: 1-10.
- [9] 李莲瑞,罗红斌,卢强,等.嗜水气单胞菌 Aer 毒素的研究进展[J].塔里木农垦大学学报,2004,16(3):46-50.
- [10] 金冬雁,黎孟枫.分子克隆实验指南:第2版[M].北京:科学出版社,1997.
- [11] 中华人民共和国国家标准 GB/T 18652—2002 致病性嗜水气单胞菌检验方法[S].
- [12] Dauga C F, Grimont P A D. Nucleotide sequences of 16S rDNA from ten *Serratia* species[J]. Microbiology, 1990, 141(4): 1 139-1 149.
- [13] [美]穆里斯 K B, 费里 F, 吉布斯 R, 等.聚合酶链式反应[M].北京:科学出版社,1997.

Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of pathogenic *aeromonas hydrophila* and its preliminary application

RAO Jing-jing¹, LI Shou-song², HUANG Ke-he¹, JIANG Shu-xun², PAN Qun-xing¹

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Fujian CIQ, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Aeromonas hydrophila* is gram-negative bacteria of the family *Aeromonadaceae* that are often found in association with hemorrhagic septicemia in cold-blooded animals including fish, reptiles and amphibians. At present, a number of virulence factors derived from *A. hydrophila* have been proposed in an effort to explain the pathogenesis of infections due to these organisms. Exotoxin, protease and outer-membrane protein have been described in *A. hydrophila* and aerolysin (*aerA*), hemolysin (*hlyA*), hemolytic toxin and cytolytic enterotoxin are all exotoxins. Some studies suggested that all virulent *A. hydrophila* isolates carried both *hlyA* and *aerA* genes, so *aerA* and *hlyA* genes were considered as primary virulence genes of *A. hydrophila*. The 16s rRNA gene belonging to *Aeromonas* characteristically acted as an internal control gene. Three pairs of specific primers were designed and multiplex PCR assay was developed to amplify the *aerA*, *hlyA* genes and 16s rRNA gene. The reaction conditions of the multiplex PCR were optimized and PCR products were sequenced. Specificity and sensitivity of multiplex PCR were studied. Eight *A. hydrophila* strains were isolated and the other sixteen strains were tested by multiplex PCR. The results showed that the virulence genes of *hlyA* and *aerA* could not be amplified from nonpathogenetic *A. hydrophila* strains, but the pathogenetic ones contained the genes of *hlyA* at least. Forty aquatic animal specimen were tested by multiplex PCR and conventional microbiology methods and their coherence was 97.5%. It can be concluded that the multiplex PCR is specific and sensitive and can be used in quick diagnose and epidemiology investigation of *A. hydrophila*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 749–755]

Key words: *Aeromonas hydrophila*; aerolysin gene; hemolysin gene; multiplex PCR

Corresponding author: HUANG Ke-he. Tel: 025–84395507; E-mail: khhuang@njau.edu.cn

2008 年《水产科学》征订启示

《水产科学》杂志是由辽宁省水产学会主办的水产科技期刊,辽宁省一级期刊,1982年创刊,国内外发行。中国标准连续出版物号:ISSN 1003–1111 CN 21–1110/S。是中文水产、渔业类核心期刊和全国农业系统优秀期刊之一。

本刊为月刊,A4开本,56页,每月25日出版,定价5.00元/期,全年60.00元。邮发代号8–164。订读者请到邮局订阅,也可直接汇款至本刊编辑部订阅,还可通过银行信汇订阅。开户行:工商银行大连星海支行,账号:3400202309008900681,户名:辽宁省海洋水产科学研究院,请注明订阅《水产科学》。

地址:大连市沙河口区黑石礁街50号 辽宁省海洋水产科学研究院

《水产科学》编辑部

邮政编码:116023

电话:(0411)84679512

传真:(0411)84671027

E-mail: shchxkbjb@yahoo.com.cn