

致病性哈维氏弧菌溶血素基因克隆及其检测

陈吉祥, 杨慧, 颜显辉, 钟英斌, 张晓华, 李筠

(中国海洋大学, 生命科学学院, 山东 青岛 266003)

摘要:从山东沿海的发病鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)分离到1株致病性哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*), 从该菌的染色体DNA扩增出一条长约1.4 kb的特异性片段。DNA序列分析表明, 该克隆片段含有完整的1254 bp溶血素基因, 该溶血素基因与哈维氏弧菌 VIB645 的溶血素基因 VhhA 和 VhhB 的相似性分别为 99.0% 和 98.5%; 与副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*) 热稳定性溶血素基因(TDH)的相似性为 74.5%; 与拟态弧菌(*V. mimicus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、霍乱弧菌(*V. cholerae*)磷脂酶基因的序列相似性分别为 57.4%、59.2%、53.0%; 与最小弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌、霍氏弧菌(*V. holisae*)、河流弧菌(*V. fluvialis*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)的溶血素基因的相似性仅为 19.9%~24.8%。根据溶血素基因的保守区段, 设计了1对特异引物。分析表明, 该引物能特异检测哈维氏弧菌, 其可检测的DNA最小量为0.001 ng。用该方法对55株不同来源的患病鱼分离的疑似病原菌进行检测, 结果检出8株哈维氏弧菌, 检出率为14.55%, 从健康动物中检出数占所检弧菌数的6.25%, 海洋环境为10.53%, 海水养殖环境为26.53%, 表明哈维氏弧菌在不同的海水环境及健康海洋动物中普遍存在, 在养殖水体中的数量高于其他海水环境。

关键词:哈维氏弧菌; 溶血素; 基因克隆; 海水环境;

中图分类号: S94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)05-0580-08

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)广泛存在于海洋环境中, 在一定条件下, 可引起海水动物发病^[1]。Montero等^[2]对哈维氏弧菌的研究结果显示, 不同菌株之间存在较大的遗传差异, 致病力是由某种可遗传的毒力因子决定的; 刘秉忠等^[3]研究发现, 从病虾分离的哈维氏弧菌及其胞外产物的致病性比从海水环境中分离的菌株致病性要强。进一步研究发现, 这些哈维氏弧菌的胞外产物中蛋白酶、磷脂酶、溶血素的活性很强, 在斑节对虾(*Penaeus monodon*)的致病性中起重要作用^[4]。溶血素被认为是许多病原菌的致病因子, 在弧菌中普遍存在, 如副溶血弧菌有3种溶血素, 分别称为热不稳定性溶血素、热稳定性溶血素和热稳定相关性溶血素, 纯化的热稳定性溶血素有溶血活性、细胞毒性和心脏毒性。霍乱弧菌 El Tor 溶血素能溶解红细胞和其他哺乳动物细胞, 也具有孔形成毒素的作用, 而且在实验性腹泻模型中显示肠毒素性^[5-6]。鳃弧菌的溶血素毒性可能与被注射鱼的出血症状有关^[7]。张晓华等^[8]对不同来源的19株哈维氏弧菌的致病性及其胞外产物的毒性进行了研究, 结果发现, 致病性强的菌株

中的溶血性和其他胞外产物毒性都很强; 进一步研究还发现强致病性哈维氏弧菌 VIB645 中有两个溶血素编码基因, 而在个别致病力较弱的菌株中没有发现溶血素基因^[9-10]。本实验室曾从发病的鲈鱼体内分离到哈维氏弧菌 SF1^[11], 人工感染鲈鱼表明有较强的致病性, 该菌株有较强的磷脂酶活性和溶血活性。本研究拟克隆其溶血素编码基因, 分析其序列特征, 并以该基因的保守区段设计引物, 检测海水养殖环境等不同来源的哈维氏弧菌分布情况, 旨在通过对不同环境条件哈维氏弧菌溶血素基因的检测, 研究其毒力相关基因分布的多样性。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

哈维氏弧菌 SF-1 及其他病原菌株分离自山东青岛沿海养殖场发病的鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等海水养殖动物; 弧菌标准菌株来自英国 Heriot-Watt 大学和比利时根特大学。

收稿日期: 2004-07-01; 修订日期: 2005-01-20.

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目(2001AA620207); 国家自然科学基金项目(30371108; 30371119).

作者简介: 陈吉祥(1963-), 男, 博士, 副教授, 从事海洋微生物学与免疫学研究. E-mail: BETCEN@ouc.edu.cn

1.2 试剂和仪器

TaqDNA聚合酶、dNTP、T₄DNA连接酶、X-gal、IPTG、低熔点琼脂糖、pUCm-T质粒购自上海生物工程公司,PE2400型PCR仪(美国PE公司),WD-9403 C型紫外透射反射仪(北京六一仪器厂)。

1.3 哈维氏弧菌溶血素基因克隆及序列分析

哈维氏弧菌染色体DNA提取、PCR扩增、克隆等分子生物学操作按分子克隆试验指南进行^[12]。参考从GenBank下载的哈维氏弧菌VIB 645及其他弧菌溶血素基因序列,设计一对特异性引物,上游引物VP11: 5'-GAGGACGTTTGGTGAGATAA-3',下游引物VP12: 5'-ACGACGAATACAAT-ACAATCTCT-3',扩增片段大小1404 bp。PCR组成体系及循环参数:哈维氏弧菌染色体总DNA质量浓度为1 μg/mL, MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, Taq酶1U,反应总体积100 μL; PCR反应参数:94℃预变性5 min, 94℃变性1 min, 45℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 30个循环, 72℃延伸10 min。

由上海生物工程公司进行克隆片段的DNA序列测定,用BLASTn和BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>)进行DNA序列分析和氨基酸序列分析。

1.4 哈维氏弧菌PCR检测方法的建立

PCR引物的设计是根据哈维氏弧菌溶血素基因序列,并与其他溶血素基因进行序列同源性比较,选择其保守区段的455 bp核苷酸序列。VP21: 5'-TCACCTTCTTTGCAGCCGATAACC-3', VP22: 5'-CAAGGCTTCGCGTAGTCTGATTT-3'。细菌的培养和染色体DNA的提取按常规方法进行,即纯化的菌种用2216 E液体培养基在28℃培养24 h后,取1 mL菌液,于5 000 r/min离心10 min收集菌体,用酚-氯仿法抽提细菌基因组DNA,用紫外分光光度法测定DNA浓度。PCR体系组成:细菌染色体总DNA浓度1 μg/mL, MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, Taq酶1U,反应总体积50 μL; PCR反应参数:94℃预变性5 min, 94℃变性1 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 30个循环, 72℃延伸10 min。

1.5 海水养殖病鱼病原的分离及哈维氏弧菌的检测

发病的牙鲆、大菱鲆、鲈鱼分别来自本研究室在1999~2004年期间从山东沿海的工厂化海水养殖

场。疑似病原菌分离的方法为:病鱼用无菌生理盐水清洗,无菌取病变部位组织,匀浆,用生理盐水稀释,取0.1 mL涂布2216 E平板,28℃培养24 h,取优势菌,平板划线纯化菌种,于-80℃超低温冰箱保存。用时从冰箱取出,菌种活化后,用酚-氯仿法提取DNA,同1.4方法进行PCR检测。

健康鱼用无菌生理盐水清洗,取肝及肠组织,匀浆后用生理盐水稀释,取0.1 mL稀释液涂布TCBS平板,28℃培养24 h,挑取单个菌落,于-80℃超低温冰箱保存,同样方法进行PCR检测。

1.6 不同海水环境中哈维氏弧菌的检测

养殖环境海水样品分别取自山东沿海的工厂化养殖的鱼池、虾池、扇贝育苗池。用无菌海水对样品进行10倍稀释,取0.1 mL涂布TCBS平板,28℃培养24 h,取单菌落,同1.4方法进行PCR检测。

自然环境海水样品分别取自胶州湾内的海水养殖密集区近岸、工业生产区近岸、胶州湾外无污染区近岸、青岛市生活区近岸的海区。用无菌海水对样品进行10倍稀释,涂布TCBS平板,28℃培养24 h,取单菌落,同1.4方法进行PCR检测。

2 结果与分析

2.1 哈维氏弧菌溶血素基因的克隆

以哈维氏弧菌SF1基因组DNA为模板,用特异性PCR引物扩增出一条约1400 bp的条带(图1),与目的片段大小相符。克隆于pUCm-T载体,在含有氨苄青霉素、X-gal和IPTG的LB平板上培养,挑取白色菌落,提取质粒酶切鉴定,并以该质粒为模板,用相同引物再扩增,得到一条约1400 bp的带,可初步断定重组质粒含哈维氏弧菌溶血素基因。

2.2 哈维氏弧菌溶血素基因的序列分析

DNA序列测定结果表明,从哈维氏弧菌SF1克隆的基因产物含有溶血素全基因序列(图2),其SD序列为AGAGAG, -10区序列为ATAAT, -35区的序列为TTCTCA,其ORF由1254 bp组成,编码418个氨基酸残基。在GenBank中的序列登记号为AY487571。通过在GenBank中进行序列同源性分析, SF1菌株的溶血素基因与哈维氏弧菌VIB 645的溶血素基因vhhA和vhhB同源性分别为99.0%和98.5%。与副溶血弧菌的热不稳定溶血素(TL)基因相似性为74.5%,与拟态弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌磷脂酶基因序列相似性分别为57.4%、

59.2%、53.0%,但与霍乱弧菌、霍氏弧菌、河流弧菌、鳗弧菌、创伤弧菌溶血素基因相差较大(相似性19.9%~24.8.0%)。

2.3 PCR 检测哈维氏弧菌的特异性

根据所克隆的哈维氏弧菌 SF1 溶血素基因序列,并在 GenBank 中与其他细菌的溶血素基因进行序列相似性分析比较,发现哈维氏弧菌的溶血素基因在种内高度保守,而与弧菌属的其他种序列相差较大,因此,选择哈维氏弧菌溶血素基因的保守区段 455 bp(350~804 bp)的核苷酸序列设计特异性引物。对 36 株不同种的海洋细菌的检测结果表明,只有在 12 株哈维氏弧菌染色体 DNA 检出一条特异性片段(表 1),表明该引物可作为检测哈维氏弧菌的特异性引物(图 3)。

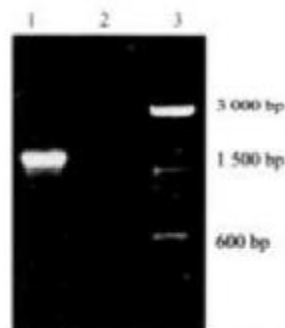


图1 从哈维氏弧菌 SF1 染色体扩增的特异性 DNA 片段

1:从 SF1 染色体扩增的特异性 DNA 片段; 2:空白对照; 3:100 bp DNA marker

Fig.1 Specific PCR products obtained by amplification from *Vibrio harveyi* SF1 DNA

1:PCR product from *Vibrio harveyi*: SF1 2: Negative control; 3:100 bp DNA marker



图2 哈维氏弧菌 SF1 溶血素基因核苷酸及其氨基酸序列(序列中间划线的部分为小片段引物所在位置)

Fig.2 Nucleotide and amino acid sequences of *Vibrio harveyi* SF1 hemolysin gene
(Nucleotide sequences for primers of 455 bp DNA are underlined)

表1 不同海洋细菌中哈维氏弧菌溶血素基因特异性片断 PCR 检测
Tab.1 Detection of hemolysin gene of *Vibrio harveyi* by PCR amplification

菌株 Strain	菌株编号 No. of strain	PCR 检测结果(455 bp) PCR product(455 bp)
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	HW295	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW410	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW395	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW351	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW572	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW645	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW631	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW661	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW646	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW659	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW647	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	HW652	+
鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	VIB1	-
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	HW800	-
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	HW458	-
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	HW798	-
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	HW611	-
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	HW612	-
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	HW799	-
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	HW384	-
坎贝氏弧菌 <i>V. campbelli</i>	HW285	-
辛辛那提弧菌 <i>V. cincinnatiensis</i>	HW287	-
肋生弧菌 <i>V. costicola</i>	HW288	-
费氏弧菌 <i>V. furnissi</i>	HW293	-
拟态弧菌 <i>V. mimicus</i>	HW298	-
海弧菌 <i>V. pelagia</i>	HW305	-
塔氏弧菌 <i>V. tubiashii</i>	HW309	-
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	HW310	-
霍氏弧菌 <i>V. holisae</i>	HW314	-
大神弧菌 <i>V. logei</i>	-	-
漂浮弧菌 <i>V. natsiegens</i>	GI-1	-
气单胞菌 <i>Aeromonas</i> sp.	D1045	-
气单胞菌 <i>Aeromonas</i> sp.	D2109	-
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp.	D5031	-
迟缓爱德华氏菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	CW7	-
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-

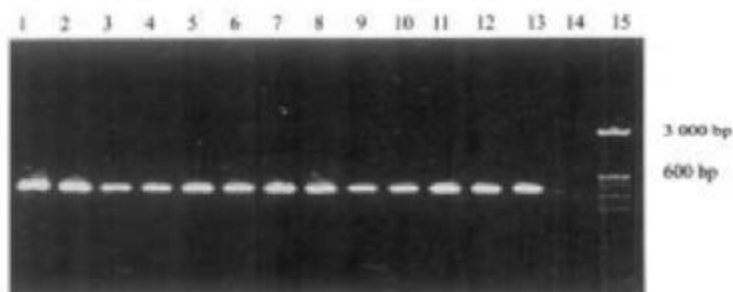


图3 不同菌株哈维氏弧菌溶血素基因 PCR 扩增产物

1~13: SF1, HW295, HW410, HW395, HW351, HW572, HW645, HW631, HW661, HW646, HW659, HW647, HW652; 14: 阴性对照(*E. coli* JM109); 15: 100 bp DNA marker

Fig. 3 PCR products obtained by amplification from *Vibrio harveyi* strains

1~13: SF1, HW295, HW410, HW395, HW351, HW572, HW645, HW631, HW661, HW646, HW659, HW647, HW652; 14: Negative control(*E. coli* JM109); 15: 100 bp DNA marker

2.4 PCR 检测的灵敏性

在 50 μ L 反应体系中哈维氏弧菌染色体 DNA 量分别为 100 ng、10 ng、1 ng、0.1 ng、0.01 ng 和 0.001 ng, PCR 扩增后, 在琼脂糖凝胶电泳中均显示一条 455 bp 左右的特异性带, 因此其 PCR 的最小检出量小于 0.001 ng(图 4)。

2.5 海水养殖发病动物中哈维氏弧菌的检测

对从工厂化海水养殖条件下自然发病动物分离的 55 株优势细菌进行了 PCR 检测, 结果检出哈维氏弧菌 8 株, 占 14.55%, 这些菌株分布在鲈鱼、牙鲆、大菱鲆、对虾等动物(表 2)。另外, 从健康鱼虾分离的 32 株弧菌中检测出 2 株哈维氏弧菌, 占弧菌数的 6.25%。

2.6 养殖环境海水中哈维氏弧菌的分布

分别从山东沿海工厂化鱼、虾、贝的养殖车间提取水样, 用 TCBS 平板分离出 147 株弧菌, 结果检出哈维氏弧菌 39 株, 检出率为 26.53%(表 3)。



图4 不同 DNA 量的 PCR 扩增结果

1: 100 bp DNA marker; 2~8: 分别表示用 100 ng、10 ng、1 ng、0.1 ng、0.01 ng、0.001 ng、0.0001 ng DNA 量扩增产物

Fig. 4 PCR products obtained by amplification with different amount of DNA from *V. harveyi*

1: 100 bp DNA marker; 2~8: PCR products obtained by amplification with 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 0.001 ng and 0.0001 ng DNA.

表 2 发病的海水养殖动物中哈维氏弧菌的检测

Tab. 2 PCR Detection of *Vibrio harveyi* from diseased marine animals

动物 Animal	菌株数量 Number of strains	哈维氏弧菌数量 Number of <i>V. harveyi</i>	哈维氏弧菌检出率/% Percentage
发病对虾 Diseased shrimp	23	4	17.39
发病大菱鲆 Diseased turbot	22	2	9.09
发病牙鲆 Diseased flounder	7	1	14.29
发病鲈鱼 Diseased seabass	3	1	33.33
(总数 Total number)	55	8	14.55
健康动物 Health animals	32	2	6.25

表3 不同养殖环境中哈维氏弧菌的PCR检测

Tab.3 PCR detection of *Vibrio harveyi* in aquaculture marine environment

样品来源 Sources of samples	弧菌数量 Number of <i>Vibrio</i> spp.	哈维氏弧菌数量 Number of <i>V. harveyi</i>	哈维氏弧菌检出率/% Percentage
鱼池海水 Fish rearing seawater	95	28	29.47
虾池海水 Shrimp rearing seawater	40	9	22.50
扇贝苗池海水 Scallop rearing seawater	12	2	16.67
总数 Total	147	39	26.53

2.7 自然海水环境中哈维氏弧菌的分布

对从海水环境中分离的57株弧菌的PCR检测表明,有6株菌的PCR结果呈阳性,总的检出率为

10.53%,而且无论是在生活区近岸的海水,还是在无污染区海域的海水均检测到哈维氏弧菌的存在(表4)。

表4 不同海水环境中哈维氏弧菌的PCR检测

Tab.4 PCR detection of *Vibrio harveyi* in marine environment

样品来源 Sources of samples	弧菌数量 Number of <i>Vibrio</i> spp.	哈维氏弧菌数量 Number of <i>V. harveyi</i>	哈维氏弧菌检出率/% Percentage
生活区近岸海水 Seawater near living region	29	3	10.34
养殖区附近海水 Seawater near aquaculture region	8	1	12.50
工业区近岸海水 Seawater near industrial region	7	1	14.28
无污染区海水 Seawater in clear region	13	1	7.69
总数 Total	57	6	10.53

3 讨论

溶血素被认为是许多病原菌的致病因子,溶血素基因在弧菌中普遍存在,不同弧菌的溶血素基因相差较大。副溶血弧菌有3种溶血素,其中热稳定性溶血素基因(TDH)一般在致病性副溶血弧菌中存在^[13];霍乱弧菌(*V. cholerae*)El Tor溶血素基因序列由2 232 bp组成,编码744个氨基酸残基^[14]。鳃弧菌溶血素基因由2 253 bp组成,编码751个氨基酸残基^[15]。本实验从哈维氏弧菌SF1中克隆到的溶血素基因长度为1 254 bp,编码418个氨基酸残基。通过比较发现哈维氏弧菌SF1的溶血素与国外分离致病性哈维氏弧菌VIB 645的两个溶血素基因vhhA和vhhB的相似性分别达99.0%和98.5%,表明该溶血素基因在哈维氏弧菌中比较保守,与副溶血弧菌热不稳定性溶血素(TLH),拟态弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌的磷脂酶基因序列相似性分别大于53.0%,但与其他弧菌如霍乱弧菌、霍氏弧

菌、河流弧菌、鳃弧菌、创伤弧菌溶血素相似性最高只有24.8%。根据对这些不同弧菌的溶血素基因序列分析和建立的系统发育树分析发现,哈维氏弧菌的溶血素基因与副溶血弧菌的热不稳定性溶血素基因、拟态弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌的磷脂酶基因在进化上比较接近,而创伤弧菌、霍乱弧菌、鳃弧菌的溶血素基因在进化上比较接近,它们可能属于不同的蛋白质类群。

以哈维氏弧菌溶血素基因的保守区段设计特异引物,建立了哈维氏弧菌的PCR检测方法,对不同的弧菌和部分其他细菌检测结果表明,该方法能检出特异哈维氏弧菌。对从海水养殖发病动物分离的55株疑似病原细菌进行了PCR检测,结果检出哈维氏弧菌占14.55%,这些菌株来源于发病的鲈鱼、牙鲆、大菱鲆、对虾等动物,对部分哈维氏弧菌的人工感染试验证实,能引起大菱鲆和鲈鱼发病和死亡,表明哈维氏弧菌可能是养殖动物的一个重要的病原菌。另外,从健康鱼虾中检测出哈维氏弧菌占

弧菌总数的6.25%,表明在健康动物体内也可能存在着潜在条件的致病菌,一旦环境改变或动物的抵抗力降低时,这些潜在的病原菌可能引发疾病。

对不同环境来源的海水样品的分析表明,无论是自然海水环境还是养殖海水环境,都存在致病性相关的哈维氏弧菌,其中养殖环境中哈维氏弧菌的数量明显高于其他环境,占弧菌总数的26.53%。张晓华等^[16]曾利用间接ELISA技术对对虾养殖育苗池中的哈维氏弧菌进行了检测,发现正常育苗池中的哈维氏检出率为20.40%,发病池中哈维氏弧菌的检出率为58.30%,这些结果表明哈维氏弧菌跟养殖动物疾病密切相关,当养殖环境条件及水质恶化时,哈维氏弧菌可能成为一个重要的病原菌。

致谢:生命学院2004届本科生孙妍、陈旭艳同学参加部分研究工作,在此深表谢意。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens [M]. 3ed edition. Chichester: Praxis Publishing Ltd, 1999.
- [2] Montero A B, Austin B. Characterisation of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Borne) [J]. J Fish Dis, 1999, 22:377-386.
- [3] Liu P C, Lee K K, Chen S N. Pathogenicity of Different Isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. Lett Appl Microbi, 1996, 22:413-416.
- [4] Pizzutto M, Hirst R G. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting [J]. Dis Aqu Org, 1995, 21: 61-68.
- [5] Shinoda S. Protein toxins produced by pathogenic *Vibrios* [J]. J Natur Tox, 1999, 8: 259-269.
- [6] Lida T, Honda T. Hemolysins produced by *Vibrios* [J]. J Toxic Tox Rev, 1997, 16: 215-227.
- [7] Munn C B. Production and properties of a hemolytic toxin by *Vibrio anguillarum* [C]. Fish Disease, Third COPRAQ Session. Berlin: Springer Verlag, 1980. 69-74.
- [8] Zhang X H, Austin B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids [J]. J Fish Dis, 2000, 23:93-102.
- [9] Zhang X H. Studies on the pathogenicity mechanisms of the fish pathogen *Vibrio harveyi* [D]. Heriot-Watt: Heriot-Watt University, 2001.
- [10] Zhang X H, Meaden P G, Austin B D. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi* [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7): 3161-3167.
- [11] 王宝坤,余俊红,李 筠,等. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1):52-55.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1992.
- [13] Taniguchi H, Hirano H, Kobayashi, et al. Comparison of the nucleotide sequence of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microb Pathog, 1986, 1: 425-432.
- [14] Ichinose Y, Yamamoto K, Nakaoe N, et al. Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae* [J]. Infect Immun, 1987, 55: 1090-1093.
- [15] Hirose I, Masuda T, Aoki T. Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum* [J]. Microb Pathog, 1996, 21: 173-182.
- [16] 张晓华,李 筠,李 军,等. 中国对虾育苗池水中哈维氏弧菌的快速检测[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(1):70-74.

Cloning of hemolysin gene from a pathogenic *Vibrio harveyi* SF1 and its detection in diseased marine animals and marine environments

CHEN Ji-xiang, YANG Hui, YAN Xian-hui, ZHONG Ying-bin, ZHANG Xiao-hua, LI Yun

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A pathogenic *Vibrio harveyi* strain SF1 was originally isolated from diseased seabass (*Lateolabrax japonicus*) in China. The hemolysin gene was cloned by PCR amplification from chromosomal DNA of *Vibrio harveyi* SF1. The nucleotide sequence was determined. The ORF of the gene consisted of 1254 bp, which encoded a putative polypeptide of 418 amino acids. The nucleotide sequence was highly identical to those of *Vibrio harveyi* 645, and the similarities were 99.0% and 98.5%. The similarities with thermolabile hemolysin genes of *Vibrio parahaemolyticus* was 74.5%. The similarities with lecithinase genes of *V. mimicus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae* were 61.3%, 62.4% and 58.3% respectively, but the nucleotide sequence was very different from the hemolysin genes of *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* and *V. cholerae* (with similarity of 19.9% - 24.8%). A pair of specific primers were designed to detect hemolysin gene of *Vibrio harveyi*. The target gene was detected from 13 *Vibrio harveyi* strains but not from 21 other bacteria strains. The detection limit of the PCR assay was 0.001 ng of DNA. Eight isolates of *Vibrio harveyi* were detected from 55 strains isolated from diseased marine animals, with a positive rate of 14.55%. The distribution of the bacteria in different environment was investigated. The positive rates of 10.53% and 26.53% were obtained from marine environment and aquaculture marine environment respectively. The results show that *Vibrio harveyi* exists widely in marine environment and health marine animals, with a high rate in aquaculture environment, which may compose of potential pathogens in marine animals.

Key words: *Vibrio harveyi*; hemolysin; gene clone; marine environment

欢迎订阅 2006 年《水产学报》

《水产学报》是中国水产学会主办、上海水产大学承办的水产科学技术的学术性刊物,创刊于1964年。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器以及水产基础研究的论文、简报和综述,并酌登学术动态和重要书刊的评价等。

本刊为双月刊,大16开。国内外公开发行。每期单价25元,全年定价150元(含邮费)。国内统一刊号:CN31-1283/S;国际标准刊号:ISSN 1000-0615。国外发行代号:Q-387,国内邮发代号:4-297。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。编辑部还有《水产学报》(1964-2001年)全文检索光盘,定价200元(含邮费),欢迎订阅。

编辑部地址:上海市军工路334号,上海水产大学48信箱 邮编:200090 联系电话和传真:021-65710232

E-mail:jfc@shfu.edu.cn 或 scxuebao@online.sh.cn