

气单胞菌和嗜水气单胞菌双重 PCR 检测方法的建立

潘晓艺¹ 沈锦玉¹ 郝贵杰¹ 姚嘉贇¹ 徐洋¹ 尹文林¹ 孙逢明² 吴颖蕾¹

1. 中国水产科学研究院鱼类健康与免疫重点实验室/浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001;
2. 浙江省富阳市水产技术服务站, 杭州 311400

摘要 针对 GenBank 中登录的气单胞菌属 (*Aeromonas*) 的毒力基因甘油磷脂胆固醇酰基转移酶基因 (GCAT) 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的 16S rRNA 基因的保守区设计 2 对特异性引物。通过进行双重 PCR 反应体系优化, PCR 产物的测序鉴定和特异性试验, 建立了一种能同时检测气单胞菌 (*Aeromonas* spp.) 和嗜水气单胞菌的双重 PCR 检测方法。用此方法对 5 株嗜水气单胞菌、7 株其他不同种的气单胞菌和 5 株非气单胞菌属菌株进行双重 PCR 检测。结果显示, 气单胞菌和嗜水气单胞菌在 GCAT 基因的扩增区都能得到有效扩增, 其中嗜水气单胞菌能同时在 16S rRNA 基因扩增区得到有效扩增, 而非气单胞菌属的菌株, 在此两扩增区都为阴性, 表明此检测方法可靠且可行。

关键词 气单胞菌; 嗜水气单胞菌; 16S rRNA; GCAT 基因; 双重 PCR

中图分类号 Q 786; S 941.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)06-0759-05

气单胞菌属 (*Aeromonas*) 细菌是常见的腐物寄生菌, 在自然界分布很广, 水和土壤中都有存在, 在健康人的粪便中偶尔可以分离出, 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是该属的代表种。由气单胞菌引起的水产养殖动物疾病种类繁多, 如鲢鳙腐皮病、草鱼肠道出血症、异育银鲫溶血性腹水病、鲤红斑病和竖鳞病、鳊赤鳍病和鳖穿孔病等^[1-4]。这些疾病的发生不仅给水产养殖业带来严重的经济损失, 还可通过水产动物和水产品感染人畜, 导致人畜腹泻和食物中毒, 影响人类健康^[5-6]。特别是该菌属中的嗜水气单胞菌, 是多种水产动物的主要致病菌, 也是人-畜-水产动物共患病原菌^[7]。因此, 气单胞菌特别是嗜水气单胞菌已引起水产界、医学界和兽医学界的高度重视。传统的细菌鉴定方法主要是通过细菌生理生化特性进行分类, 既费时, 准确率又低。因此, 笔者采用双重 PCR 技术, 通过检测气单胞菌属共有的甘油磷脂胆固醇酰基转移酶基因 (GCAT) 保守区来鉴定气单胞菌, 并同时检测嗜水气单胞菌的 16S rRNA 的保守区, 来进一步鉴定嗜水气单胞菌。该方法的建立将为水产动物气单胞菌和嗜水气单胞菌的快速检测和病原调查提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

17 株菌株, 其中 5 株嗜水气单胞菌、7 株其他种的气单胞菌和 5 株非气单胞菌属菌株, 具体情况如表 1。非标准菌株为笔者所在实验室分离所得, 标准菌株都购自美国标准生物物品收藏中心 (ATCC)。

表 1 菌株列表

Table 1 Strains used in this study

菌株 Strains	来源 Resources	宿主 Hosts
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	ATCC	Milk
<i>A. hydrophila</i> BSK-10	The authors	Crucian carp
<i>A. hydrophila</i> TPS-30	The authors	Bream
<i>A. hydrophila</i> PPL0711	The authors	Bream
<i>A. hydrophila</i> BJK0805	The authors	Crucian carp
<i>A. sobria</i> ATCC 43979	ATCC	Fish
<i>A. caviae</i> ATCC 15468	ATCC	Guinea pigs
<i>A. bestiarum</i> ATCC 51108	ATCC	Fish
<i>A. allosaccharophila</i> ATCC 51208	ATCC	Diseased elvers
<i>A. media</i> ATCC 33907	ATCC	Fish farm effluent
<i>A. eucrenophila</i> ATCC 23309	ATCC	Freshwater fish
<i>A. ichthiosmia</i> ATCC 49904	ATCC	Surface water
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ATCC	Clinical isolate
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC	Clinical isolate
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ATCC	Blood
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 33842	ATCC	Seawater
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 33847	ATCC	Gastroenteritis
<i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749	ATCC	Horse mackerel

收稿日期: 2010-12-02

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项经费 (200803013)、浙江省科技计划项目 (2008C22058) 和湖州市科研计划项目 (2007YN22)

潘晓艺, 硕士, 助理研究员. 研究方向: 水生动物病害预防与控制. E-mail: panxiaoyi@163.com

通讯作者: 沈锦玉, 研究员. 研究方向: 水生动物病害预防与控制. E-mail: sjnyu@126.com

1.2 工具酶和试剂

Taq 酶、dNTP、蛋白酶 K、溶菌酶均购自宝生物工程公司, LB 培养基所用蛋白胨和酵母粉为 OXOID 公司产品, PCR 纯化试剂盒为爱思进生物技术(杭州)有限公司产品; 引物合成和产物测序委托美国 invitrogen(上海)英骏生物技术有限公司完成。

1.3 细菌总 DNA 的提取

取超低温冻存的甘油菌各 1 支, 室温融化后接种于 TSA 培养基, 28 °C 振荡培养 12 h 以上。取 1.5 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 5 000 r/min 离心 1 min, 弃上清; 用灭菌 ddH₂O 悬浮细菌, 6 000 r/min 离心 4 min, 洗涤 2 次; 加入 35 μL ddH₂O 和

35 μL TZ (4% TritonX-100, 5.0 mg/mL NaN₃, 溶于 25 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 中), -20 °C 放置 30~40 min, 沸水浴 10 min, 冰浴 10 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 收集上清作为 PCR 的模板。

1.4 引物设计

根据 GenBank 上已登录的气单胞菌 5 条甘油磷脂胆固醇酰基转移酶基因 (*GCAT*) 序列(登录号分别为 CP000462、CP000644、X70686、X07279 和 AF268080)和嗜水气单胞菌的 16S rRNA 基因序列(登录号: CP000462, 区间: 85627~86313), 在保守区设计了 2 对特异性引物。各引物序列、预期扩增片段长度及其在基因中的位置见表 2。

表 2 双重 PCR 引物设计

Table 2 Primers design for duplex PCR

目的基因 Target gene	引物 Primers	序列(5'-3') Sequences (5'-3')	基因中位置 Gene location	预期扩增长度/bp Expected product size
<i>GCAT</i>	AhGCAT-up	TCCCAAGTATCAGGTCATCAACA	294~316	471
	AhGCAT-dn	GAGGCAAACGGCTTCCACA	746~764	
16S rRNA	Ah16S-up	AGGTTGATGCCTAATACGTA	448~467	683 ^[8]
	Ah16S-dn	CGTGCTGGCAACAAAGGACAG	1 110~1 130	

1.5 双重 PCR 反应体系优化

1) 引物浓度组合比的优化。PCR 反应体系为 50 μL, 其中 ATCC7966 的 DNA 模板 0.5 μL, 10× PCR Buffer 5.0 μL, dNTP 1 μL (每种 dNTP 溶液浓度均为 10 mmol/L), *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, 25 mmol/L 氯化镁 4.0 μL, 引物浓度优化见表 3, 最后用双蒸水补足余下体积。将样品于 4 °C, 3 000 r/min 瞬时离心混合均匀后, 于 95 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 50 s, 54 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s, 共进行 35 个循环, 最后在 72 °C 继续延伸 10 min, 将温度降至 4 °C 保存。以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 3 引物浓度组合比的优化

Table 3 Optimization of primers concentration

引物 Primers	终浓度/(nmol/L) Final concentration					
Ah16S	200	160	120	80	40	20
AhGCAT	200	160	120	80	40	20
Ah16S / AhGCAT	200/40	160/80	120/120	80/160	40/200	/

2) 镁离子浓度的优化。PCR 反应体系 50 μL 如本文“1.5 1)”, 其中 2 对引物 AhGCAT 和 Ah16S 采用“1.5 1)”中优化的终浓度, 待优化的氯化镁终浓度分别为 1.50、2.00、2.50、3.00 mmol/L, 加入双蒸水补足余下体积。其余各步同“1.5 1)”, 分析镁离子浓度对多重 PCR 扩增效果的影响。

3) 退火温度的优化。PCR 反应采用本文“1.5

1)”和“1.5 2)”优化后的体系。将样品于 4 °C, 3 000 r/min 瞬时离心混合均匀后进行 PCR 扩增, 其循环参数为 95 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 50 s, 分别于 58、56、54 和 52 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s, 共进行 35 个循环, 最后在 72 °C 继续延伸 10 min。以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 分析退火温度对双重 PCR 扩增效果的影响。

1.6 特异性试验

应用建立的双重 PCR 方法分别对嗜水气单胞菌、气单胞菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌等标准株进行 PCR 扩增, 以测定其特异性。

1.7 人工模拟细菌纯培养物检测

将不同来源的细菌按照本文“1.3”的方法提取细菌 DNA 作为模板, 并分别进行 2 种和 3 种细菌 DNA 预混作为模板加入已建立的最佳反应体系中进行检测。

2 结果与分析

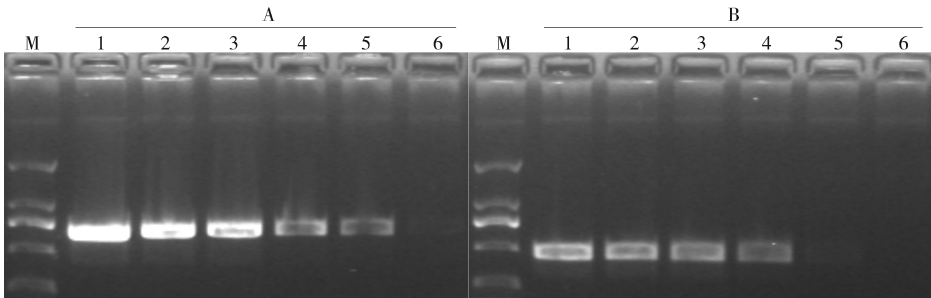
2.1 双重 PCR 反应体系优化

1) 引物浓度组合比的优化。按 2 对引物不同浓度单独和不同浓度组合比进行优化, 采用嗜水气单胞菌标准株 ATCC7966 的核酸进行 PCR 扩增, 图 1 为引物 Ah16S 和 AhGCAT 分别采用不同浓度的

PCR 产物电泳图,图中数字代表引物浓度,图 2 为以上 2 对引物不同浓度组合的 PCR 产物电泳图。由图 1 可看出,PCR 产物随着引物浓度的递减而递减,且引物 AhGCAT 扩增效率低于引物 Ah16S,引物 AhGCAT 浓度最低为 40 nmol/L 时可见目的带,引物 Ah16S 浓度最低为 20 nmol/L 时可见目的带;根据 2 对引物单重 PCR 的优化结果设置双重 PCR 的引物浓度组合比,由优化结果图 2 可看出,3~5 泳道 2 条带都比较清晰,由于 AhGCAT 扩增效率低于 Ah16S,为了减少 AhGCAT 的假阴

性,选择 AhGCAT 扩增效率略高于 Ah16S 的泳道 5 为理想扩增效果,所以引物 AhGCAT 和引物 Ah16S 浓度的理想组合分别为 200 nmol/L 和 40 nmol/L。

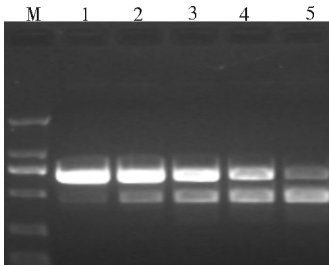
2) 镁离子浓度的优化。按本文“2.1 1)”中的优化结果加入各对引物,镁离子浓度按 4 个浓度梯度设置,模板为嗜水气单胞菌标准株 ATCC7966 的核酸,扩增结果如图 3。当镁离子浓度为 2.50 mmol/L 时,2 个基因都能得到有效扩增,且扩增产量最高。



A: Ah16S; B: AhGCAT. M: DL 2 000 DNA marker; 1: 200 nmol/L; 2: 160 nmol/L; 3: 120 nmol/L; 4: 80 nmol/L; 5: 40 nmol/L; 6: 20 nmol/L.

图 1 不同引物浓度扩增结果

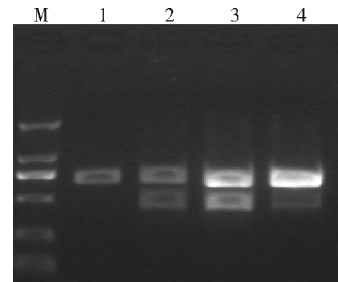
Fig. 1 Result of PCR with different concentration of primers



M: DL 2 000 DNA marker; 1: Ah16S 200 nmol/L, AhGCAT 40 nmol/L; 2: Ah16S 160 nmol/L, AhGCAT 80 nmol/L; 3: Ah16S 120 nmol/L, AhGCAT 120 nmol/L; 4: Ah16S 80 nmol/L, AhGCAT 160 nmol/L; 5: Ah16S 40 nmol/L, AhGCAT 200 nmol/L.

图 2 不同引物浓度组合比扩增结果

Fig. 2 Result of duplex PCR with combination of Ah16S and AhGCAT primers



M: DL 2 000 DNA marker; 1: 1.5 mmol/L; 2: 2.0 mmol/L; 3: 2.5 mmol/L; 4: 3.0 mmol/L.

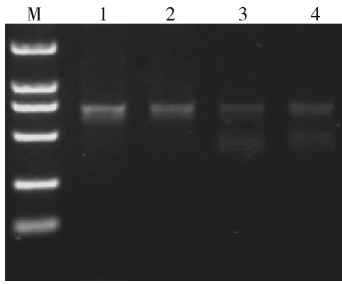
图 3 不同镁离子浓度扩增结果

Fig. 3 Result of duplex PCR with different MgCl₂ concentration

3) 退火温度的优化。根据 2 对引物各自单一 PCR 的结果, Ah16S 引物最高有效退火温度为 58 °C, AhGCAT 最高有效退火温度为 55 °C, 设计了 4 个退火温度, 电泳结果(图 4)显示在 54 °C 和 52 °C 2 个基因得到有效扩增, 由于温度越高, 扩增特异性越好, 因此选 54 °C 为优化后的退火温度。

2.2 双重 PCR 的特异性

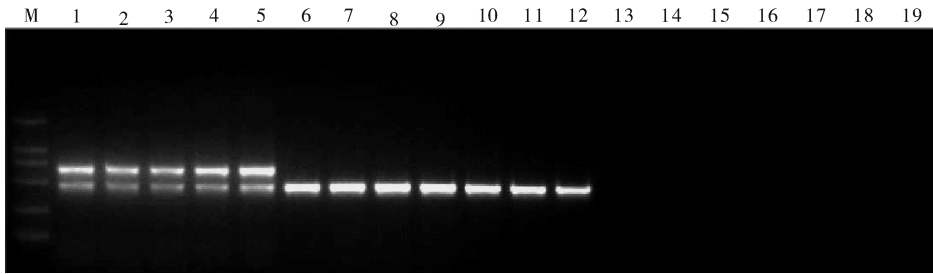
提取笔者所在实验室分离保存的多种气单胞菌和其他不同属的菌株核酸, 作为检测双重 PCR 引物的特异性模板, 双重 PCR 体系和条件参照本文“2.1”的优化结果。扩增结果(图 5)显示, 2 对引物特异性良好。



M: DL 2 000 DNA marker; 1: 58 °C; 2: 56 °C; 3: 54 °C; 4: 52 °C.

图 4 不同退火温度扩增结果

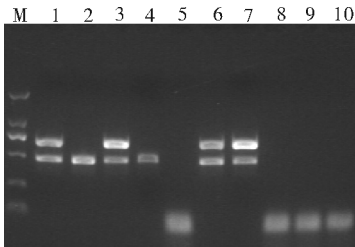
Fig. 4 Result of duplex PCR under different annealing temperature



M: DL 2 000 DNA marker; 1: ATCC 7966; 2: BSK-10; 3: TPS-30; 4: PPL0711; 5: BJK0805; 6: ATCC 43979; 7: ATCC 15468; 8: ATCC 51108; 9: ATCC 51208; 10: ATCC 33907; 11: ATCC 23309; 12: ATCC 49904; 13: ATCC 25922; 14: ATCC 25923; 15: ATCC 27853; 16: ATCC 33842; 17: ATCC 33847; 18: ATCC 17749; 19: Control.

图 5 特异性试验结果

Fig. 5 Specificity test of duplex PCR



M: DL 2 000 DNA marker; 1: ATCC 7966 + ATCC 43979; 2: ATCC 43979 + ATCC 25922; 3: ATCC 7966 + ATCC 25922; 4: ATCC 43979 + ATCC 33842; 5: ATCC 25922 + ATCC 33842; 6: ATCC 7966 + ATCC 43979 + ATCC 25922; 7: ATCC 7966 + ATCC 25922 + ATCC 33842; 8: ATCC 25922 + ATCC 25923 + ATCC 33842; 9: ATCC 25922 + ATCC 25923 + ATCC 27853; 10: Control.

图 6 双重 PCR 检测结果

Fig. 6 Results of duplex PCR

确性不高,不利于疾病的治疗。气单胞菌是水产动物常见的致病菌,根据本实验室水产动物门诊的检出情况分析,气单胞菌引起的疾病的发病率比其他细菌引起的病害的发生率普遍要高,且病情更为严重,给水产动物的养殖造成了严重的经济损失。

为了寻求更快速、特异、灵敏的检测方法,近年

2.3 人工模拟细菌纯培养物检测

将不同来源的 2 种或 3 种细菌 DNA 预混,作为模板加入已建立的最佳反应体系进行检测。双重 PCR 体系和条件参照本文“2.1”的优化结果,扩增结果如图 6 所示,提示双重 PCR 检测方法建立成功。

3 讨论

水产动物细菌病的诊断,通常是采用对患病动物的症状、组织病理、环境条件和用药情况进行观察分析,并同时进行了细菌分离鉴定和感染试验,以确定病原。细菌鉴定的传统方法主要是通过对细菌的生理生化特性进行分离,这需要一个较长的周期,且准

来,国内外学者进行了多种方法的尝试,主要是免疫学和分子生物学方法。此类免疫学检测方法都需要制备特异的抗血清,操作过程复杂且容易出现偏差。分子生物学方法也早已被用于细菌的鉴定中,最为常见的当属细菌的 16S rRNA 鉴定,由于需要进行序列测定,费时又不经济,该方法不适用于细菌的快速鉴定。但是也有不少研究者采用了 PCR 和多重 PCR 的方法检测致病性嗜水气单胞菌^[9-14],都无一例外地检测嗜水气单胞菌,忽略了检测气单胞菌属的其他种。本研究通过在气单胞菌共有基因甘油磷脂胆固醇酰基转移酶基因的保守区设计引物,对 4 株气单胞菌分离株、8 株气单胞菌标准株和 6 株非气单胞菌属的标准株进行扩增,结果发现只有气单胞菌属的菌株扩增阳性。为了能进一步同时检测气单胞菌属中的嗜水气单胞菌,本研究同时采用了刘永杰等^[8]在嗜水气单胞菌 16S rRNA 保守区内设计的特异性引物,用于扩增嗜水气单胞菌 16S rRNA 的保守区,从而能直接检测出嗜水气单胞菌。通过 PCR 反应体系的优化、特异性试验和人工模拟细菌

纯培养物检测,成功建立了气单胞菌和嗜水气单胞菌双重PCR检测方法。这对水产动物气单胞菌和嗜水气单胞菌的快速检测具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] WAHLI T, BURR S E, PUGOVKIN D, et al. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis*[J]. J Fish Dis, 2005, 28(3): 141-150.
- [2] MASTAN S A, QURESHI T A. Role of bacteria in the epizootic ulcerative syndrome(EUS) of fishes[J]. J Environ Biol, 2001, 22(3): 187-192.
- [3] 沈锦玉,尹文林,钱冬,等. 养殖鳖主要细菌性疾病病原的初步研究[J]. 浙江海洋学院学报, 1999, 18(1): 29-33.
- [4] 张波,曾令兵,罗晓松,等. 草鱼肠道出血症病原菌的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 607-612.
- [5] SECHI L A, DERIU A, FALCHI M P, et al. Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhea[J]. J Appl Microbiol, 2002, 92(2): 221-227.
- [6] JOSEPH S W, CARNAHAN A M, BRAYTON P R. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(3): 565-569.
- [7] 吕爱军,李槿年,余为一. 嗜温气单胞菌研究进展[J]. 中国动物检疫, 2000, 17(11): 42-43.
- [8] BI Z X, LIU Y J, LU C P. Contribution of AhyR to virulence of *Aeromonas hydrophila* J-1[J]. Res Vet Sci, 2007, 83(2): 150-156.
- [9] 陆承平,陈怀青. 用PCR检测嗜水气单胞菌毒素基因[J]. 中国动物检疫, 1995, 12(5): 5-7.
- [10] 程天印,刘洵,常小斌. 嗜水气单胞菌Lamp检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(12): 1013-1016.
- [11] 刘加波,谢芝勋,唐小飞. 二温式PCR检测罗非鱼嗜水气单胞菌的研究[J]. 水利渔业, 2007, 27(4): 99-100.
- [12] 储卫华,陆承平. PCR扩增特异性16S rDNA和溶血素基因检测致病性嗜水气单胞菌[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 79-82.
- [13] 方兵,李槿年,祖国掌. 应用多重PCR检测水生动物源气单胞菌安徽分离株的毒力基因型分布[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 473-477.
- [14] 饶静静,李寿崧,黄克和,等. 致病性嗜水气单胞菌多重PCR检测方法的建立[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 749-755.

Development of a duplex PCR for detection of *Aeromonas* spp. and *Aeromonas hydrophila*

PAN Xiao-yi¹ SHEN Jin-yu¹ HAO Gui-jie¹ YAO Jia-yun¹
XU Yang¹ YIN Wen-lin¹ SUN Feng-ming² WU Ying-lei¹

1. Key Laboratory of Fish Health and Immunology, Chinese Academy of Fishery Science / Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China;
2. Fuyang Fishery Technical Extension Station of Zhejiang Province, Hangzhou 311400, China

Abstract *Aeromonas* is one of the major pathogens which frequently cause the bacterial diseases in freshwater fish terrapin and crustaceans. *Aeromonas hydrophila* caused economic losses widely. In order to detect *Aeromonas* spp. and *Aeromonas hydrophila*, two pairs of specific primers were designed according to the glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase (GCAT) gene of *Aeromonas* spp. and the 16S rRNA gene of *Aeromonas hydrophila*. So a duplex PCR assay was developed to amplify the 16S rRNA gene and the GCAT gene. The reaction conditions of the duplex PCR were optimized and PCR products were sequenced. Meanwhile, the specificity of duplex PCR was studied. Five *Aeromonas hydrophila* strains, seven *Aeromonas* strains and the other five strains of non *Aeromonas* were tested by duplex PCR. The results showed that the GCAT gene and the 16S rRNA gene could be amplified from *Aeromonas hydrophila* strains, but only the GCAT gene from the other *Aeromonas* species and neither from the other five strains. It could be concluded that the duplex PCR was specific and could be used in quick diagnose *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas* spp.

Key words *Aeromonas* spp.; *Aeromonas hydrophila*; 16S rRNA; GCAT gene; duplex PCR

(责任编辑:边书京)