

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2014.01.14

## 鱼致病性舒伯特气单胞菌双重 PCR 检测方法的建立

刘 春, 李凯彬, 王 庆, 王 芳, 曾伟伟, 石存斌, 吴淑勤\*

(中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业部渔药创制重点实验室 / 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380)

**摘 要:** 为快速准确鉴别检测鳢源致病性舒伯特气单胞菌(*A.schubertii*), 本实验根据该菌的促旋酶 B 亚单位基因(*gyrB*)、溶血素基因(*hlyA*)的保守序列设计引物, 建立了检测致病性 *A.schubertii* 的双重 PCR 方法。结果显示 *gyrB* 和 *hlyA* 基因扩增产物分别为 601 bp 和 375 bp; 其最低检出菌体 DNA 量为  $2.3 \times 10^{-2}$  ng, 最低检出菌数为  $3 \times 10^2$  cfu。特异性试验结果显示, 该方法对温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、无乳链球菌、诺卡氏菌、迟缓爱德华氏菌、荧光假单胞菌、柱状黄杆菌、哈氏弧菌以及类志贺邻单胞菌扩增结果均为阴性。应用该方法对 37 份临床病料样品的检测结果与传统细菌分离鉴定结果的符合率为 100%, 表明该方法具有良好的特异性和敏感性, 可以应用于 *A.schubertii* 的快速检测和流行病学研究。

**关键词:** 舒伯特气单胞菌; *gyrB* 基因; *hlyA* 基因; 双重 PCR

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2014)01-0054-04

## Establishment of duplex PCR for detection of pathogenic *Aeromonas schubertii*

LIU Chun, LI Kai-bin, WANG Qing, WANG Fang, ZENG Wei-wei, SHI Cun-bin, WU Shu-qin\*

(Key Laboratory of Fishery Drug Development of Ministry of Agricultural, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** To develop a rapid method to detect pathogenic *Aeromonas schubertii* in fish, a duplex PCR method was established with two pairs of primers designed according to the conservative sequences of *gyrB* and *hlyA* genes of *A.schubertii*, respectively. By optimization of PCR conditions, the results showed that two DNA fragments of 601 bp (*gyrB*) and 375 bp (*hlyA*) were amplified from the genomic DNA extracted from *A.schubertii* by the duplex PCR, with a limit detection of  $2.3 \times 10^{-2}$  ng bacteria genomic DNA or  $3 \times 10^2$  cfu of *A.schubertii*. In addition, the specificity tests showed that there were no cross-reactions with other bacteria such as *A.sobria*, *A.hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Nocardia seriolae*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescens*, *Flavobacterium columnare*, *Vibrio harveyi* and *Plesiomonas shigelloides*. Moreover, the method was applied to detect clinical samples and the results showed 100% consistence with those of the conventional bacterial isolation and identification method. Therefore, the duplex PCR could be used in quick diagnose and epidemiology investigation of *A.schubertii* infection.

**Key words:** *Aeromonas schubertii*; *gyrB* gene; *hlyA* gene; duplex PCR

\*Corresponding author

收稿日期: 2013-04-03

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAD25B02); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-46)

作者简介: 刘 春(1982-), 男, 重庆人, 助理研究员, 硕士, 主要从事水产动物免疫研究。

\* 通信作者: E-mail: wushuqin001@21cn.com

舒伯特气单胞菌(*Aeromonas schubertii*)属于气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)气单胞菌属(*Aeromonas*), 在自然界广泛分布, 该菌为急性腹泻的重要致病菌, 并可以引起食物中毒和外伤感染<sup>[1-3]</sup>, 也有该菌引起人坏死性筋膜炎的报道<sup>[4]</sup>。*A.schubertii* 是一种条件性致病菌, 在水产养殖中比较常见。2009 年以来, 一种由 *A.schubertii* 引起的内脏类结节病在养殖的鳢科鱼类(*Channidae*)中爆发<sup>[5]</sup>, 对鳢养殖业造成了严重的经济损失。

鳢科鱼类是我国重要的淡水经济鱼类, 在我国分布广泛, 目前我国养殖的鳢科鱼类主要有斑鳢(*Channa maculata*)、乌鳢(*C. argus*)和杂交鳢(*C. maculata* ♀ × *C. argus* ♂)<sup>[6]</sup>, 3 者均陆续出现内脏类结节病流行的报道<sup>[5,7-8]</sup>, 该病的主要症状为: 发病初期肉眼观察体表无明显病变, 中期剖检可见腹水, 肝、脾和肾等器官充血肿大、有白色类结节。由于该病初期症状不明显, 而且病程较短, 快速准确的早期诊断对该病的控制十分重要。因此, 本研究建立了一种致病性 *A.schubertii* 的检测方法, 对鳢内脏类结节病的快速诊断、疾病防控和流行病学研究提供技术支撑。

## 1 材料和方法

1.1 菌株 *A.schubertii* 标准株 ATCC43700、鳢源致病性 *A.schubertii* 分离株 WL-2、温和气单胞菌(*A.sobria*) SJ-1、嗜水气单胞菌(*A.hydrophila*)标准株 J-1、嗜水气单胞菌(*A.hydrophila*) M-1、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) LF-1、诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*) JZ-1、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*) HG-2、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) BD-1、柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*) CY-1、哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*) ML-1、类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*) HP-1 均由本实验室保存; 临床样品 37 份来源于广东各地鳢养殖场, 部分病鱼具有腹部肿胀, 内脏类结节等临床症状。

1.2 主要试剂 5% 绵羊血琼脂平板、细菌生化微量鉴定管等购自广州环凯微生物有限公司; 大肠杆菌(*E.coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室保存; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京 TIANGEN 公司; Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、DNA Taq 酶、dNTP、限制性内切酶、pMD18-T 载体、T4 连接酶、DNA

分子 Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; Plasmid Mini Kit I 购自 Omega 公司。

1.3 细菌 DNA 的提取 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取菌株 WL-2 和 ATCC43700 的 DNA。

### 1.4 PCR 检测方法的建立

1.4.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中登录的 *A.schubertii gyrB* (JQ319030)和 *hlyA* (JX996182)基因序列, 利用 Primer5.0 软件设计 2 对扩增引物, 序列为: *gyrB*-P1: 5'-TCAACTCCGCTGTCTCTAACCTG-3'; *gyrB*-P2: 5'-GCACCCTTACGGCAAGTCATC-3'; *hlyA*-P1: 5'-CAGGCTTCCAGCACTGAATAC-3'; *hlyA*-P2: 5'-CCAGTCCCACCACTTCACCT-3', 扩增片段长度分别为 601 bp 和 375 bp, 引物由博尚生物技术有限公司合成。

1.4.2 *gyrB* 和 *hlyA* 基因的扩增 以 WL-2 DNA 为模板, 分别扩增 *gyrB* 和 *hlyA* 基因, 反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s、56 °C 60 s、72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。并利用凝胶回收纯化试剂盒进行纯化后克隆于 pMD18-T 中, 由博尚生物技术有限公司测序, 应用 BLAST 进行序列分析。

1.4.3 *gyrB* 和 *hlyA* 双重 PCR 的建立 以 WL-2 为模板, 在同一 PCR 反应中加入引物 *gyrB*-P1、*gyrB*-P2、*hlyA*-P1 和 *hlyA*-P2, 优化扩增条件经, 反应体系为(25  $\mu$ L): 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR Buffer, *gyrB* 上下游引物各 10 pmol, *hlyA* 上下游引物各 8 pmol 引物, 1.5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.125  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L), 4  $\mu$ L dNTP (2.5 mM), 模板 1  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu$ L, 反应条件同上。1% 的琼脂糖凝胶上电泳观察结果。

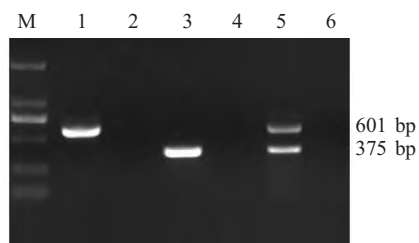
1.5 特异性试验 分别提取菌株 ATCC43700、SJ-1、J-1、M-1、LF-1、JZ-1、HG-2、BD-1、CY-1、ML-1、HP-1 的基因组 DNA, 并进行双重 PCR 扩增, 同时设阴性对照和以 WL-2 为模板的阳性对照。

1.6 敏感性检测 以分光光度法测定 WL-2 DNA 浓度为 230 ng/ $\mu$ L, 10 倍倍比稀释至 2.3 $\times 10^5$  ng/ $\mu$ L, 按上述方法进行 *gyrB*、*hlyA* 基因单独 PCR 和双重 PCR 检测其敏感性。以无菌水将浓度为 3 $\times 10^8$  cfu/mL 的 WL-2 菌液进行 10 倍倍比稀释至 3 $\times 10^3$  cfu/mL, 每个稀释度取 1  $\mu$ L 菌液作为 PCR 模板。按上述条件进行双重 PCR 检测其敏感性。

1.7 临床样品的检测 对 37 份临床样品进行细菌分离,以本研究建立的双重 PCR 方法对分离细菌进行检测,同时用传统生理生化分析方法对分离细菌进行鉴定,以验证双重 PCR 检测方法的准确性。

## 2 结 果

2.1 *gyrB* 和 *hlyA* 基因的 PCR 扩增结果及双重 PCR 反应的建立 以 WL-2 基因组 DNA 为模板,分别对 *gyrB* 和 *hlyA* 基因进行 PCR 扩增,扩增产物经克隆测序表明,所扩增的 *gyrB* 和 *hlyA* 基因大小分别约为 600 bp 和 380 bp,与预期相符(图 1)。BLAST 分析结果显示所获得的 *gyrB* 和 *hlyA* 基因与 GenBank 中登录的 *gyrB* (JQ319030)和 *hlyA* (JX996182)基因的同源性均为 100%。在同一 PCR 反应中同时加入 2 个基因的引物分别进行双重 PCR 扩增,结果显示 WL-2 能够扩增出 2 条特异的目的片段,与预期结果相符(图 1)。



M: DL2000 DNA Marker; 1: *gyrB*; 2: Negative control of *gyrB*; 3: *hlyA*; 4: Negative control of *hlyA*; 5: *gyrB* and *hlyA*; 6: Negative control of duplex PCR

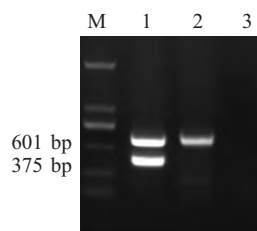
图 1 *gyrB*、*hlyA* 基因单独和双重 PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification of *gyrB* and *hlyA* by single and duplex PCR

2.2 双重 PCR 特异性试验结果 分别以 WL-2 和 ATCC43700 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,结果显示 WL-2 能够扩增出 2 条特异的目的条带,与预期相符;而 ATCC43700 只能扩增出 600 bp 左右的 *gyrB* 条带;阴性对照未扩增到条带(图 2)。

分别以 WL-2、SJ-1、J-1、M-1、LF-1、JZ-1、HG-2、BD-1、CY-1、ML-1、HP-1 菌液基因组为模板进行 PCR 扩增,结果只有 WL-2 能够扩增出 2 条特异的目的条带,与预期结果相符,而其他扩增反应结果均为阴性(图 3)。

2.3 敏感性检测结果 将 WL-2 基因组 DNA 梯度稀释,进行敏感性试验。结果表明,双重 PCR 扩增的灵敏度为  $2.3 \times 10^{-2}$  ng (图 4)。在细菌数目上双重 PCR 扩增的灵敏度为  $3 \times 10^2$  cfu (图 5)。



M: DL2000 DNA Marker; 1: *A. schubertii* WL-2; 2: *A. schubertii* ATCC43700; 3: Negative control

图 2 *A. schubertii* WL-2 和 ATCC43700 双重 PCR 扩增结果  
Fig.2 The specificity detection of *A. schubertii* WL-2 and *A. schubertii* ATCC43700 by the duplex PCR

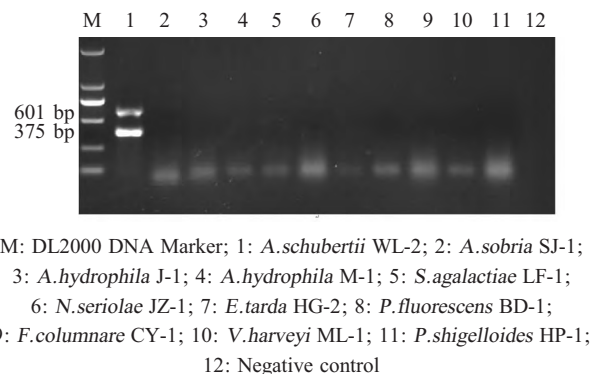
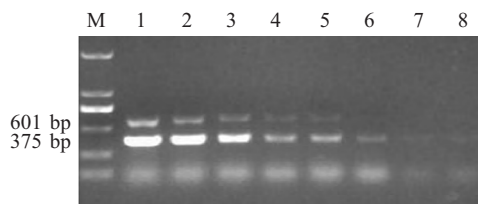


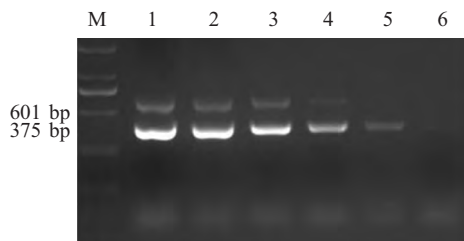
图 3 双重 PCR 的特异性实验结果

Fig.3 The specificity test of the duplex PCR



M: DL2000 DNA Marker; 1-8: 230 ng- $2.3 \times 10^{-5}$  ng

图 4 双重 PCR 敏感性的测定(以 DNA 的量)  
Fig.4 The sensitivity detection of *gyrB* and *hlyA* by the duplex PCR (in the amount of DNA)



M: DL2000 DNA Marker; 1-6:  $3 \times 10^5$  cfu- $3 \times 10^0$  cfu

图 5 双重 PCR 敏感性的测定(以细菌的量)  
Fig.5 The sensitivity detection of *gyrB* and *hlyA* by the duplex PCR (in the amount of bacteria)

2.4 临床样品的双重 PCR 检测结果 应用双重 PCR 方法对临床送检的 37 份疑似样品进行检测,其中检出阳性 29 份,阴性 8 份,与传统微生物学

方法鉴定结果(阳性 29 份, 阴性 8 份)的符合率为 100 %。表明该方法可以准确检测出病料中的致病性 *A.schubertii*, 可以代替传统的病原菌鉴定方法应用于鳢内脏类结节病的快速诊断和流行病学研究。

### 3 讨 论

*A.schubertii* 引起的鳢内脏类结节病是近年新发的细菌病, 死亡率达 40 %~50 %, 给我国水产养殖业造成了严重的经济损失, 目前还没有该病的致病机理和流行病学研究的相关报道。诺卡氏菌、分枝杆菌和类立克次氏体等也能够引起养殖鱼类结节, 与该病的内结节症状相似, 在养殖过程中容易引起误诊<sup>[9-11]</sup>。因此需要建立一种快速、准确的检测方法用于鳢内脏类结节病的诊断和流行病学研究。

本研究检测引物是参照细菌 *gyrB* 和 *hlyA* 基因序列设计的。*gyrB* 基因编码菌体 DNA 促旋酶的 B 亚单位蛋白, 因为不显现频繁的基因横向转移, 近年来常被用于细菌系统发育分析及细菌鉴定, 该基因在气单胞菌属内分类鉴定中具有比 16S rRNA 基因更高的分辨率<sup>[12]</sup>。溶血素(*hlyA*)是气单胞菌的重要毒力因子, 大多数气单胞菌属于条件致病菌, 具有致病菌株与非致病菌株之分, *hlyA* 基因能够用于致病菌株的检测<sup>[13]</sup>。本研究建立的双重 PCR 检测方法表明可以通过是否扩增出 *hlyA* 基因片段区分致病菌株 WL-2 和非致病的标准菌株 ATCC43700, 表明建立的检测方法能够特异地鉴别检测致病菌株。

多重 PCR 具有高效、快捷、经济、简便等优点, 已广泛应用于病原学检测<sup>[14-15]</sup>。本研究建立的双重 PCR 方法, 可以检测致病性 *A.schubertii*。该方法与温和气单胞菌等 9 种水产养殖常见病原菌均无交叉反应, 表明该方法的特异性良好。敏感性试验结果表明该方法敏感性较高, 而且可以检测出最低菌体 DNA 的量为  $2.3 \times 10^{-2}$  ng 和最低检出菌数为  $3 \times 10^2$  cfu。双重 PCR 检测临床病料样品试验结果与传统的病原菌鉴定结果相符, 表明该方法能够准确鉴别致病性 *A.schubertii*, 满足临床检测的需要, 为鳢内脏类结节病的诊断和流行病学研究提供方法。

### 参考文献:

- [1] 高海英, 潘慧英, 王芳. 江阴市首次从食品中检出舒伯特气单胞菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(3): 329.
- [2] 冷如意. 从骨折术后伤口感染患者脓液中分离出 1 株舒伯特气单胞菌[J]. 中国现代医学杂志, 1996, 6(6): 73.
- [3] Amy M C, Marii M A, Fanning G R, et al. Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections [J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(8): 1826-1830.
- [4] Kao T L, Kao M L. A fatal case of necrotizing *Aeromonas schubertii* fasciitis after penetrating injury [J]. J Emerg Med, 2012, 30, 258.e3-258.e5.
- [5] Liu Jin-yu, Li Ai-hua. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China [J]. J Fish Dis, 2012, 35(5): 335-342.
- [6] 刘文奎, 樊启学, 朱邦科, 等. 饵料密度对杂交鳢仔鱼生长、存活的影响[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(3): 367-370.
- [7] Chen Yan-feng, Liang Ri-shen, Zhuo Xiao-lei, et al. Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepede) [J]. J Fish Dis, 2012, 35(6): 421-430.
- [8] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)内脏类结节病病原菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1119-1125.
- [9] 王国良, 金珊, 徐益军. 养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 277-283.
- [10] Enrico T, Alessandro B, Elena B, et al. Identification of the newly described *Mycobacterium poriferae* form tuberculous lesions of snakehead fish (*Channa striatus*) [J]. Comp Immun Microbial Infect Dis, 1996, 19: 25-29.
- [11] 郭琼林, 贾伟章, 韩先朴, 等. 我国淡水养殖乌鳢的类立克次体感染[J]. 自然科学进展, 2004, 14(1): 59-64.
- [12] 侯晓丽, 曹清毅, 潘劲草, 等. 霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 *gyrB* 基因系统发育分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 884-889.
- [13] 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.
- [14] 刘阳, 孔繁德, 徐淑菲, 等. 副溶血弧菌和溶藻弧菌双重 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(8): 647-650.
- [15] 王远微, 汤承, 于学辉, 等. 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 947-951.

(本文编辑: 张朝霞)