

东北三省致病性嗜水气单胞菌快速检测

李绍戊, 王 荻, 刘红柏, 尹家胜, 卢彤岩*

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:从东北三省养殖鱼类体内分离到 21 株嗜水气单胞菌, 通过生理生化方法对该菌进行初步鉴定, 然后根据已发表的嗜水气单胞菌 16S rDNA 基因和气溶素基因 (*Aer*) 的保守序列, 设计 2 对引物, 利用 PCR 方法对所分离到的 21 株嗜水气单胞菌以及参考株进行 PCR 扩增。结果表明, 相对于常规的微生物生理生化检测, PCR 对嗜水气单胞菌的检出率为 90.48%。本方法的建立为常规理化检测方法提供辅助手段, 从而更加有效、快捷的检测致病性嗜水气单胞菌, 对东北三省地区水产养殖动物的疾病防治、流行病学调查等具有重要意义。

关键词:嗜水气单胞菌; 16S rDNA; 气溶素; 东北三省

中图分类号: Q949.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)03-0585-05

Detecting Pathogenic *Aeromonas hydrophila* in Northeast China by PCR Method

LI Shao-wu, WANG Di, LU Hong-bai, YIN Jia-sheng, LU Tong-yan*

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: 21 *Aeromonas hydrophila* were isolated from cultured fish in Northeast China. Physiological and chemical detection suggested that the 21 isolates belonged to *Aeromonas hydrophila*. Based on the published 16S rDNA gene sequence and aerolysin gene sequence of *Aeromonas hydrophila*, the synthetic oligonucleotide primers were designed and used to perform PCR amplification of the two conservative genes fragments. The results showed that compared to traditional physiological and chemical methods, the detection rate was 90.48% through PCR method. The establishment of PCR method provided supplementary means for traditional methods, which would contribute to efficient and effective detection of *Aeromonas hydrophila*. Meanwhile, this study is of a great significance for aquaculture animal disease control and epidemiological investigation in the Northeast Region.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; 16S rDNA; aerolysin; Northeast China

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 属于弧菌科、气单胞菌属, 普遍存在于淡水、污水、淤泥、土壤和人类粪便中, 它不仅能引发多种水生动物的传染病, 而且也能导致爬行类、两栖类、鸟类以及哺乳类等多种动物全身性败血症或局部感染。近年来, 该病原菌对水产养殖动物的危害尤为严重, 它引起我国淡水养殖鱼类的暴发性败血症, 造成了重大的经济损失, 已成为水产养殖动物的主要细菌病原之一^[1]。大量研究表明, 嗜水气单胞菌可单独与其它致病菌共同感染, 引发人类的腹泻或败血症等病症, 影响食

收稿日期: 2010-03-16 修回日期: 2010-05-04

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (nycytx-49-10)、农业公益性行业专项 (200803013) 和黑水研基本科研业务费专项 (2008HSYZX-YZ-03)

作者简介: 李绍戊 (1982-), 男, 研究实习员, 博士, 主要从事鱼类病害研究, E-mail: swli_1982@163.com; *通讯作者: 卢彤岩, 研究员。

品安全,并且是免疫抑制病人和肝功能疾病患者的机会致病菌。因此,嗜水气单胞菌已成为人-兽-鱼共患病原菌^[2-4],因而受到水产学界、受医学界和医学界的广泛重视。

嗜水气单胞菌毒力差异较大,可分为致病菌株和非致病菌株。国内外学者^[5]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。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;更多报道^[6]指出,嗜水气单胞菌所产生的外毒素是重要的致病因子。已确定的外毒素包括气溶素(aerolysin)、溶血素(hemolysin)、溶血毒素(hemolytic toxin)和细胞毒性肠毒素(cytolytic enterotoxin)等^[7]。传统的细菌分离鉴定要结合毒素的生物或者血清学方法才能确定其致病性,费时、费力且敏感性不高。随着分子生物学技术的发展,PCR技术为细菌病原的检测提供了新的检测手段,储卫华等^[8]利用PCR方法对致病性嗜水气单胞菌16S rDNA基因以及气溶素基因进行鉴定,为嗜水气单胞菌的快速检测提供了理论依据。余晓丽等^[9]的实验结果表明,PCR检测方法可用于鲢鱼嗜水气单胞菌的快速诊断,对有效治疗和控制鱼类嗜水气单胞菌病的流行具有重要意义。除了根据16S rDNA基因以及气溶素基因鉴定嗜水气单胞菌外,王远微等^[10]同时检测了丝氨酸蛋白酶基因,在一定程度上避免了只针对气溶素单个毒力基因进行PCR检测方法所存在的漏检或误检。

本研究在传统的细菌分离培养基基础上,利用PCR技术对从东北三省分离到的21株嗜水气单胞菌中16S rDNA基因以及气溶素基因进行扩增,从而高效、便捷的检测致病性嗜水气单胞菌。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 嗜水气单胞菌参考株购自中国科学院微生物研究所,编号C230801180。嗜水气单胞菌分离株的编号为H-Ah1-7、J-Ah1-7和L-Ah1-7,分别从黑龙江省、吉林省和辽宁省分离培养并进行理化鉴定。

1.1.2 主要试剂和仪器 Taq DNA聚合酶、dNTPs购自Takara公司,细菌基因组DNA提取试剂盒(Cat#HF210-03)购自天津原平皓公司,其他常规试剂均为国产分析纯。普通PCR仪、核酸电泳仪及凝胶成像系统均为BioRad公司生产,台式高速离心机为Sigma公司生产,真空冷冻干燥机购自CHR IST公司。

1.2 嗜水气单胞菌的培养鉴定

嗜水气单胞菌在普通琼脂平板上28℃培养24 h,观察菌落形态。然后对菌株进行革兰氏染色及微量生化鉴定。

1.3 PCR方法的建立

1.3.1 细菌基因组DNA的提取 将嗜水气单胞菌接种于普通营养肉汤置于28℃震荡培养24 h,取培养液按照细菌基因组DNA提取试剂盒的操作说明提取细菌基因组DNA,用于下一步的PCR扩增模板。

1.3.2 PCR扩增 根据GenBank中已公布的嗜水气单胞菌*Aer*基因的保守序列,设计扩增特异性片段的引物。16S rDNA基因的引物参照储卫华等^[8]的设计,采用NCBI网站BLAST工具,在GenBank中进行检索,初步验证特异性后交于上海生工生物工程有限公司合成(表1)。对PCR反应体系进行优化,并按照优化条件进行扩增,利用凝胶电泳检测PCR扩增产物。

表 1 引物信息

Tab 1 Information of primers

基因名称 Gene symbol	引物序列(5'-3') Primers sequences(5'-3')	目的片段大小 /bp Lengths of target fragments
16S rDNA	P1: GAAAGGTTGATGCCTAA TACGTA P2: CGTGCTGGCAACAAA GGACAG	686
<i>Aer</i>	P1: AACCGAACTCTCCAT P2: CGCCTTGICCTTGTA	301

1.3.3 菌种保存 对嗜水气单胞菌分离株进行了甘油冻存及冷冻干燥冻存。甘油冻存中,甘油体积分数为16%,贮存于-20℃冰箱;另外,在嗜水气单胞菌培养液中加入200 g/L的脱脂奶粉,于真空冷冻干燥机中冻存,并贮存于-20℃冰箱。

2 结果与分析

2.1 培养特性

嗜水气单胞菌在普通琼脂平板上,28℃ 培养 24 h 后的菌落为光滑、微凸、圆整、无色或淡黄色,有特殊气味;AHM 培养基上菌落边缘整齐呈桃红色,中央略凸黑色。

2.2 革兰氏染色及微量理化鉴定

革兰氏染色结果显示嗜水气单胞菌分离株均呈革兰氏阴性,微量理化鉴定结果均呈现嗜水气单胞菌的典型反应,表 2 中列出了部分菌株的鉴定结果。

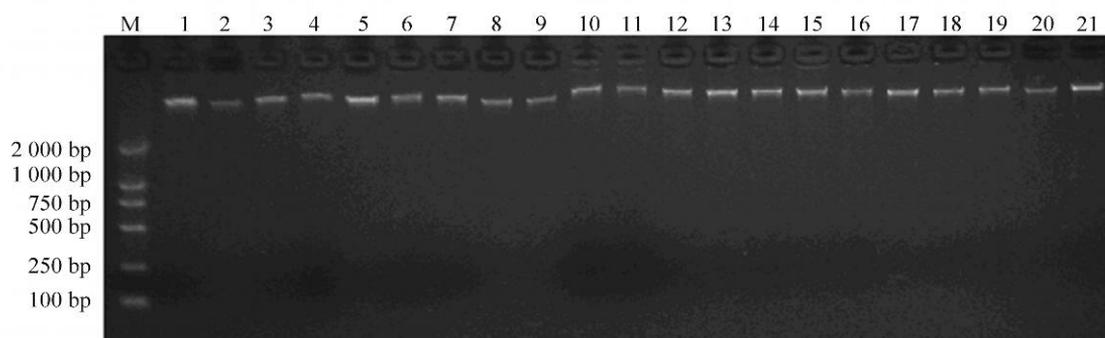
表 2 微量生理生化鉴定结果

Tab 2 Results of micro-physiological and biochemical identification

菌株名称 Strains name	氧化酶 Peroxidase	赖氨酸 Lysine	精氨酸 Arginine	鸟氨酸 Ornithine	葡萄糖产气 Gas production from glucose	蔗糖 Sucrose	甘露醇 Mannitol	水杨素 Salicin	60 g/L 氯化钠 胨水 60 g/L NaCl peptone water	枸橼酸盐 Citrate
H - Ah1	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
H - Ah2	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
H - Ah3	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
J - Ah1	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
J - Ah2	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
J - Ah3	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
L - Ah1	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
L - Ah2	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
L - Ah3	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

2.3 细菌基因组 DNA 的提取

按照试剂盒的方法,对嗜水气单胞菌分离株的基因组 DNA 进行提取。紫外分光光度计测定其浓度,并通过电泳检测 DNA 的完整性(图 1)。结果表明,提取的细菌基因组 DNA 浓度在 300 ng/μL 左右,电泳条带单一完整,无降解现象,提示可以用于进一步的 PCR 扩增。



M:DL2000;泳道 1 - 7 为 J - Ah1 - 7;泳道 8 - 14 为 L - Ah1 - 7;泳道 15 - 21 为 H - Ah1 - 7。

M: DL2000; Lane 1 - 7: J - Ah1 - 7; Lane 8 - 14: L - Ah1 - 7; Lane 15 - 21: H - Ah1 - 7。

图 1 嗜水气单胞菌分离株基因组 DNA 提取

Fig 1 Genomic DNA extraction of *Aeromonas hydrophila* isolates

2.4 16S rDNA 基因和 *Aer* 基因的特异性扩增

特异性检测实验表明(图 2),利用 16S rDNA 基因和 *Aer* 基因引物进行 PCR 扩增均得到目的片段,分别为 686 bp 和 301 bp。参考株中 16S rDNA 基因和 *Aer* 基因均得到有效扩增。在 21 株经常规微生物生理生化鉴定为嗜水气单胞菌的分离株中,PCR 检出率为 90.48% (19/21)。从吉林省渔场分离的 7 株嗜水气单胞菌中,只有 6 株在 686 bp 处呈现特异性目的片段扩增,*Aer* 基因片段扩增表明 6 株中只有 2

株为致病性嗜水气单胞菌。从辽宁省渔场分离的 7 株嗜水气单胞菌中,有 6 株在 686 bp 出呈现特异性目的片段扩增,其中有 4 株为致病性嗜水气单胞菌。而黑龙江省的 7 株分离菌中,5 株为致病性嗜水气单胞菌。阴性对照见泳道 1,无目的条带扩增,表明了该 PCR 体系的准确性。

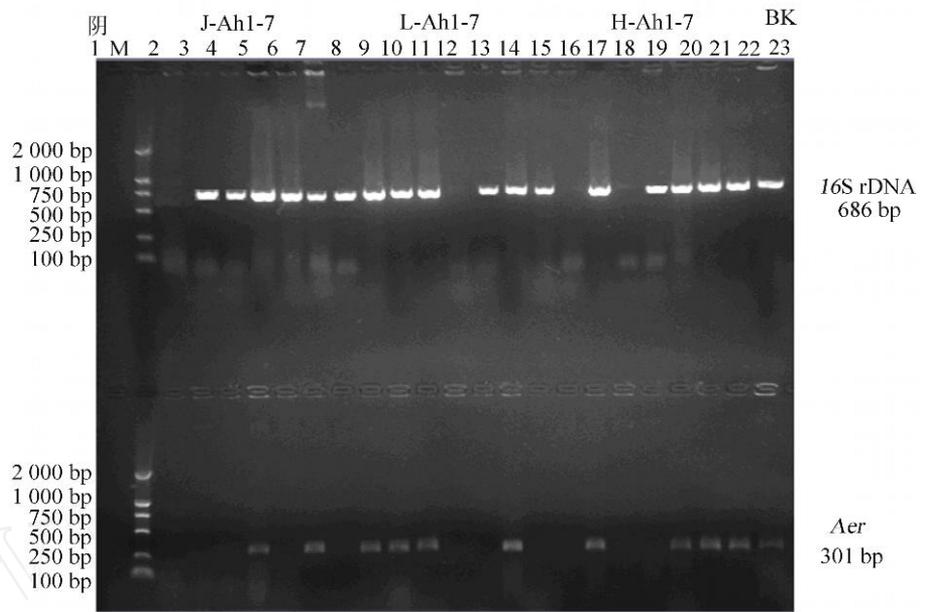
3 讨论

气单胞菌是一类广泛存在的人畜共患病原微生物,而嗜水气单胞菌是其中的主要成员。嗜水气单胞菌因其致病性给水产养殖业造成了

重大的经济损失,同时也威胁人类的健康,因此快速、准确的检测对该病的防治具有重要的意义。目前,对于嗜水气单胞菌的检测方法报道很多,如常规的微生物学检测^[11]、血清学方法^[12-14]、免疫学检测^[15]、核酸杂交等,它们均有各自的优势,但也存在一些局限性,如微生物学检测方法直观可靠,但操作复杂;血清学方法虽然较为简便,但嗜水气单胞菌不同菌株所产生的毒素有抗原性的差异,在体外培养的条件下,细菌可能会丢失产毒素的能力,从而导致漏检现象发生;另外,免疫学检测则需要制备特异的抗血清等。因此,这些方法都不适于该病快速诊断、大规模检疫及流行病学调查。

16S rDNA 结构既有高度的保守性又具有高变性,保守性反映生物物种的亲缘关系,高变性则揭示生物物种的特征核酸序列,使其具有了进行种属鉴定的分子基础,而且它广泛分布于除真菌和病毒之外的所有微生物,这些特点使其在微生物的分类鉴定和发现新物种中发挥了非常重要的作用^[16]。关于 Aer 毒素的致病机理,有研究报道指出,嗜水气单胞菌能产生铁传递蛋白(Siderophores),这种蛋白质分子具有很强的结合铁的能力,它能从机体的铁蛋白上夺取铁,供细菌生长。若宿主体内的游离铁不足以满足细菌繁殖所需,细菌就产生铁传递蛋白获取铁。嗜水气单胞菌 Aer 毒素能破坏机体的红细胞,使之释放血红素,为嗜水气单胞菌生长提供铁^[17]。嗜水气单胞菌 Aer 毒素的溶血过程包括结合-聚合-插入 3 个步骤。鉴于嗜水气单胞菌 Aer 毒素在其致病性上所具有的重要作用,因而毒素的检测在嗜水气单胞菌的快速诊断、流病调查及公共卫生检测、检疫等方面具有重要作用。

本研究基于 16S rDNA 基因和 Aer 基因的特性,对于从东北三省分离得到的 21 株嗜水气单胞菌分离株进行了特异性的检测。结果表明,在 21 株经常规微生物生理生化鉴定为嗜水气单胞菌的分离株中,通过 PCR 方法对 16S rDNA 基因进行了目的扩增,结果与传统的微生物生理生化鉴定所得结果的符合率为 90.48%。由于 Aer 基因的有效扩增可以从分子层面上反映出嗜水气单胞菌菌株的致病性,本研究通过对 Aer 基因的 PCR 检测发现,21 株待检菌株中有 11 株为致病性嗜水气单胞菌;其中,吉林省的检出率较低,仅占 33.3%,而黑龙江省和辽宁省的检出率分别为 71.4% 和 66.7%,该结果可能是由于某些细菌虽然含有毒素基因,但由于培养条件等原因,毒素不表达造成。根据本试验的研究结果,可以表明利用 PCR 方法可以有效快捷的检出致病性嗜水气单胞菌,该方法对东北三省地区水产养殖动物的疾病防治、流行病学调查等具有重要意义。



M: DL2000;泳道 1 为阴性对照;泳道 23 为参考株对照;泳道 2~8 为 J - Ah1 - 7;泳道 9~15 为 L - Ah1 - 7;泳道 16~22 为 H - Ah1 - 7。

M: DL2000; Lane 1: negative control; Lane 23: the control of BK; Lane 2~8: J - Ah1 - 7; Lane 9~15: L - Ah1 - 7; Lane 16~22: H - Ah1 - 7.

图 2 PCR 特异性检测结果

Fig 2 Specificity of PCR amplification

参考文献:

- [1] 鄯闯,王永坤.嗜水气单胞菌研究进展[J].水产科学,2003,22(6):48-51.
- [2] Rathinasamy S, Thangavelu T, Govinadasamy V, et al Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in acute gastroenteritis among children[J]. Indian J Med Res, 2006, 123(1): 61-66.
- [3] 张呈念,史雨红,黎明云,等.一株引起香鱼出血症的嗜水气单胞菌的鉴[J].水产科学,2009,28(7):370-373.
- [4] 杨守明,王民生.嗜水气单胞菌及其对人的致病性[J].疾病控制杂志,2006,10(5):511-514.
- [5] John M P, Stephen P K, Radam in S Secreted enzymes of *Aeromonas hydrophila*[J]. PPM SMicrobiol, 1997, 152(1): 1-10.
- [6] 韩文瑜.现代分子病原细菌学[M].长春:中国人民解放军农牧大学出版社,1999:61-62.
- [7] 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.
- [8] 储卫华,陆承平. PCR 扩增特异性 16S rRNA 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.
- [9] 余晓丽,秦春香,陈明,等.鲢鱼嗜水气单胞菌 PCR 检测方法的建立[J].广西农业科学,2008,39(5):681-684.
- [10] 汪远微,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.
- [11] 汪利.鱼类嗜水气单胞菌的几种检测方法[J].中国兽药杂志,2002,36(8):39-40.
- [12] Delamare A P L, Echeverrigaray S, Duarte K R, et al Production of a monoclonal antibody against *Aeromonas hydrophila* and its application to bacterial identifications[J]. Appl Microbe, 2002, 92(5): 936-940.
- [13] Sunee K, Suwat D, Rungrawan C, et al Distribution of *Aeromonas hydrophila* Serogroups in different clinical samples and the development of polyclonal antibodies for rapid identification of the genus *Aeromonas hydrophila* by direct agglutination[J]. Microbiol Immunol, 2002, 46(12): 875-879.
- [14] 沈素芳,储卫华,陆承平.鱼类致病性气单胞菌诊断试剂盒的研制[J].中国兽医学报,2000,20(5):462-464.
- [15] 陈昌福.用直接荧光抗体和细菌培养法对中华鳖体内的嗜水气单胞菌的检测[J].华中农业大学学报,1998,17(3):264-266.
- [16] Jill E C. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2004, 17(4): 840-862.
- [17] Rose J M. Bioactivity and immunological characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*[J]. Infect Immun, 1989, 57(4): 1170-1176.