

网络出版时间:2016-10-09 10:08 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.11.006
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20161009.1008.012.html

斑点叉尾鮰败血症 3 种病原多重 PCR 检测方法的建立

刘礼辉,张德锋,李宁求,付小哲,林 强,石存斌

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

【摘 要】 【目的】建立可同时快速检测斑点叉尾鮰败血症 3 种病原(嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和鮰爱德华菌)的多重 PCR 检测方法。【方法】根据嗜水气单胞菌溶血素基因(*Hly*)、维氏气单胞菌脱氧核糖核酸酶 I 基因(*DNase I*)以及鮰爱德华菌溶血活化基因(*Eha*)的保守序列,设计 3 对特异性引物,优化并建立斑点叉尾鮰败血症 3 种主要病原菌的多重 PCR 方法,对其特异性和灵敏度进行考察,并将其用于临床样品的检测。【结果】建立的多重 PCR 方法,当 *Hly* 基因、*DNase I* 基因以及 *Eha* 基因的引物浓度分别为 1.0、1.0 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$,退火温度为 59.5 $^{\circ}\text{C}$ 时,各目的片段均可较好地扩增。特异性试验结果表明,建立的多重 PCR 方法可从嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和鮰爱德华菌分别扩增出 1 091、262 和 450 bp 的目的片段,从多种细菌 DNA 的混合种也可扩增出上述目的片段,而对其他对照组的扩增结果均为阴性;敏感性试验结果表明,建立的多重 PCR 最低可分别检测出 200 CFU/mL 的嗜水气单胞菌、300 CFU/mL 的维氏气单胞菌和 200 CFU/mL 的鮰爱德华菌;对临床样本的检出率为 100%,与传统生物学检测结果的符合率为 100%。【结论】建立的多重 PCR 检测方法特异、灵敏、快速,可单独或同时检测斑点叉尾鮰败血症嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和鮰爱德华菌 3 种主要病原菌,也可以用于其他水生动物上嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和鮰爱德华菌的检测。

【关键词】 斑点叉尾鮰;败血症;嗜水气单胞菌;维氏气单胞菌;鮰爱德华菌;多重 PCR

【中图分类号】 S941.41⁺3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)11-0039-08

Establishment of multiplex PCR to detect three pathogens of “septicaemia” from channel catfish, *Ictalurus punctatus*

LIU Lihui, ZHANG Defeng, LI Ningqiu, FU Xiaozhe, LIN Qiang, SHI Cunbin

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

Abstract: 【Objective】 This study established a multiplex PCR method to rapidly detect three pathogens (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* and *Edwardsiella ictaluri*) of “septicaemia” from channel catfish, *Ictalurus punctatus*. 【Method】 Three pairs of primers were designed based on the conservative sequences of hemolytic toxin genes (*Hly*) of *A. hydrophila*, deoxyribonuclease I genes (*DNase I*) of *A. veronii* and haemolysin activator genes (*Eha*) of *E. ictaluri*. Then multiplex PCR condition was optimized and the multiplex PCR for simultaneously detecting *A. hydrophila*, *A. veronii* and *E. ictaluri* was established. The specificity and sensitivity were detected and it was applied to clinical samples detection. 【Re-

【收稿日期】 2015-04-02

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

【作者简介】 刘礼辉(1982—),女,湖南娄底人,助理研究员,硕士,主要从事水产养殖病害研究。E-mail:lhliu0614@163.com

【通信作者】 石存斌(1964—),男,湖南永州人,研究员,主要从事水产养殖病害研究, E-mail:shicunbin2006@163.com

sult】 All target fragments were amplified when the concentrations of *Hly* gene, *DNase I* gene and *Eha* gene were 1.0, 1.0 and 0.5 $\mu\text{mol/L}$ and the annealing temperature was 59.5 $^{\circ}\text{C}$. The specificity test showed that fragments of 1 091, 262 and 450 bp were amplified from the genomic DNA of *A. hydrophila*, *A. veronii* and *E. ictaluri*, respectively. Three fragments were amplified from mixed DNA sample of *A. hydrophila*, *A. veronii*, *E. ictaluri* and other bacteria simultaneously, while no amplification was achieved from other negative control groups. The sensitivity test showed that the multiplex PCR had a high sensitivity with the detection limit of 200 CFU/mL for *A. hydrophila*, 300 CFU/mL for *A. veronii* and 200 CFU/mL for *E. ictaluri*. The coincidence rate of the multiplex PCR method and traditional biology detection method for suspicious clinical samples was 100%.【Conclusion】 The established multiplex PCR method was specific, sensitive and rapid to respectively or simultaneously detect the three pathogens of *A. hydrophila*, *A. veronii* and *E. ictaluri* of “septicaemia” from channel catfish, *I. punctatus* or other aquatic animals.

Key words: channel catfish; septicaemia; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas veronii*; *Edwardsiella ictaluri*; multiplex PCR

斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) 属鲶形目 (Siluriformes)、鲶科 (Ictaluridae)、叉尾鲷属 (*Ictalurus*), 是美国主要的水产养殖品种之一。自 1984 年斑点叉尾鲷被引进我国后, 经过 30 多年的推广, 现在已经在 30 个省(区、市)开展了该鱼的养殖^[1]。随着我国斑点叉尾鲷集约化养殖的迅速发展, 其病害问题日益突出, 严重制约斑点叉尾鲷的健康养殖, 其中最主要的细菌病有肠道败血症和出血性败血症等, 表现为肛门红肿, 体表出血, 鳍条基部充血, 脾和肾肿大等。国内外学者对患病斑点叉尾鲷出血病病原的研究发现, 引起斑点叉尾鲷败血症的主要病原菌为鲷爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*, Ei)^[2-3] 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, Ah)^[4-6], 近年来发现维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*, Av) 也是引起斑点叉尾鲷发生多器官败血症的常见致病菌, 有时还会出现多病原混合感染的情况^[7-8]。

目前, 对斑点叉尾鲷败血症病原的检测主要采用传统的细菌分离方法, 而该法费时费力, 且操作复杂, 敏感性较低。目前有关病原检测的方法有选择性培养基鉴别培养法、免疫荧光技术、酶联免疫吸附试验、斑点酶联免疫吸附试验、单克隆抗体技术及 PCR 检测技术等, 但这些方法每次试验通常只能检测一种致病菌。而目前斑点叉尾鲷败血症的常见病原菌为鲷爱德华氏菌、嗜水气单胞菌和维氏气单胞菌等, 这就可能需要多次检测才能确定致病菌, 使得检测时间延长, 检测费用增加, 并且延误治疗。因此, 本研究拟建立一种能同时检测鲷爱德华氏菌、嗜水气单胞菌和维氏气单胞菌的多重 PCR 检测方法, 旨在为斑点叉尾鲷败血症病原的快速诊断、疾病防控和

流行病学研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 嗜水气单胞菌 ATCC19570 株、维氏气单胞菌 ATCC51106 株、鲷爱德华氏菌 ATCC33202 株、保科爱德华氏菌 ATCC33379 株、溶藻弧菌 ATCC19108 株、副溶血弧菌 ATCC17802 株、海豚链球菌 ATCC29178 株、无乳链球菌 ATCC12386 株、迟缓爱德华氏菌 ATCC49231 株、温和气单胞菌 ATCC43979 株, 均购买自上海晶赛生物工程有限公司; 嗜水气单胞菌 XS9141、Ci1293、Ci1294 和 Hm093 株, 维氏气单胞菌 IB340、Ci12910、Ci12912 和 Ci12914 株, 鲷爱德华氏菌 HSN-1 株, 舒氏气单胞菌 WL-2 株^[9], 柱状黄杆菌 GHS061212 株^[10], 均为珠江水产研究所水产动物病害与免疫防控实验室分离株。柱状黄杆菌 GHS061212 的培养条件及培养基配方参照文献^[10], 其他菌均采用脑心浸 (BHI) 液体培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48 h。

1.1.2 主要试剂和仪器 $2\times\text{Taq PCR MasterMix}$ (由 *Taq DNA Polymerase*、 $2\times\text{Taq PCR Buffer}$ 、3 mmol/L MgCl_2 、400 $\mu\text{mol/L}$ dNTP mix 以及 PCR 稳定剂和增强剂组成的预混体系) 购自康为世纪生物科技(北京)有限公司, DNA Marker DL1000 和 DNA Marker DL2000 购自大连宝生物工程有限公司, 琼脂糖和细菌 DNA 基因组抽提试剂盒购自 O-MEGA(中国总代理)广州飞扬生物工程有限公司, 多重 PCR 引物由上海生工生物工程有限公司广州分公司合成。主要仪器有高速离心机 (Eppendorf

公司,德国)、核酸蛋白检测仪(Eppendorf 公司,德国)、梯度 PCR 仪(SENSO,德国)、普通 PCR 仪(晶格,中国)、核酸电泳仪(北京六一,中国)和凝胶成像系统 VerSa Doc2000(Bio-Rad,美国)。

1.2 方 法

1.2.1 细菌 DNA 的提取 按 OMEGA 细菌 DNA 基因组抽提试剂盒的说明提取所有菌株的 DNA,用核酸蛋白检测仪测定模板 DNA 的浓度,−20 ℃ 保存备用。

表 1 用于 *Hly*、*DNase I* 和 *Eha* 基因 PCR 扩增的引物信息
Table 1 Primer information for amplification of *Hly*, *DNase I* and *Eha* genes by PCR

基因 Gene	引物序列 Primer	扩增片段长度/bp Size of fragment
<i>Hly</i>	Ah-F1:5'-CAGCGTCCAATACCTGGTGTTA-3'	1 091
	Ah-R1:5'-GCGGGTACGACGCACCTTGC-3'	
<i>DNase I</i>	Av-F2:5'-GCCAAGCAGGATCTGGTGAAG-3'	262
	Av-R2:5'-CTTGTTGAAGCTCGGGGCTCGCT-3'	
<i>Eha</i>	Ei-F3:5'-CCAATTACGTGAGGATACGGCG-3'	450
	Ei-R3:5'-CCCCGGCGGTTATACAGACG-3'	

1.2.3 单项 PCR 引物的特异性验证 对提取的细菌 DNA 模板,采用上述 *Hly*、*DNase I* 和 *Eha* 的引物进行 PCR 扩增,检验单项引物的特异性。PCR 反应体系:2×PCR MasterMix 25 μL,上、下游引物(10 pmol/μL)各 1.0 μL,模板 DNA 0.5 μL,加灭菌双蒸水至 50 μL。PCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 50 s,57 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 ℃ 10 min。PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,目的片段用胶回收试剂盒回收,按照载体说明书与 pMD18-T Vector 连接,转化 DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选后挑选阳性菌落,提取其质粒,进行质粒 PCR 鉴定后,送广州中美泰和生物工程公司测序,并进行序列 BLAST 比对分析。

1.2.4 多重 PCR 反应条件的优化 (1)模板质量浓度组合比的优化。测定提取的嗜水气单胞菌 ATCC19570 株、维氏气单胞菌 ATCC51106 株、鮭爱德华菌 ATCC33202 株的 DNA 质量浓度(ATCC19570 株为 200 ng/μL,ATCC51106 株为 555 ng/μL,ATCC33202 株为 420 ng/μL)后,均稀释为 50 ng/μL,按模板不同质量浓度进行组合,组合中嗜水气单胞菌 ATCC19570 株、维氏气单胞菌 ATCC51106 株、鮭爱德华菌 ATCC33202 株的 DNA 终质量浓度分别为 0.5、0.5、0.5 ng/μL,0.5、1、0.5 ng/μL,0.5、0.5、1 ng/μL,0.5、1、1 ng/μL,1、0.5、0.5 ng/μL,1、1、0.5 ng/μL,1、0.5、1 ng/μL,1、1、1 ng/μL。PCR 反应体系为 50 μL:2×

1.2.2 PCR 引物的设计与合成 根据嗜水气单胞菌溶血素基因(*Hemolysin*, *Hly*)、维氏气单胞菌脱氧核糖核酸酶 I 基因(*Deoxyribonuclease I*, *DNase I*)以及鮭爱德华菌溶血活化基因(*Hemolysin activator*, *Eha*)序列,通过 Primer 5.0 软件,经 NCBI Blast 比对分别设计多对引物,并用阳性 DNA 进行 PCR 特异性试验,最后筛选特异性高的 3 对 PCR 引物,其序列见表 1。

PCR MasterMix 25 μL,3 个基因的上、下游引物(10 pmol/μL)各 1.0 μL,再用双蒸水补齐至 50 μL。以单项 PCR 反应中的扩增程序来确定最佳模板质量浓度。

(2)引物浓度组合比的优化。以取得的最佳模板质量浓度比混匀作为模板,对各引物对的终浓度进行组合,组合中 *Hly*、*DNase I* 和 *Eha* 的引物对终浓度分别为 0.5、0.5、0.5 μmol/L,0.5、0.5、1 μmol/L,0.5、1、0.5 μmol/L,0.5、1、1 μmol/L,1、0.5、0.5 μmol/L,1、0.5、1 μmol/L,1、1、0.5 μmol/L,1、1、1 μmol/L),PCR 反应体系中另含 2×PCR MasterMix 25 μL,最后用双蒸水补齐至 50 μL。采用多重 PCR 反应确定最佳引物浓度。

(3)退火温度的优化。PCR 反应采用模板质量浓度和引物浓度优化后的体系进行 PCR 扩增,其循环参数为:95 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 50 s,分别于 48.4、51.5、54.0、56.8、59.5、62.1、64.5 和 66.0 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 ℃ 10 min。筛选出多重 PCR 扩增的最佳退火条件。

1.2.5 多重 PCR 的特异性试验 分别准备样品 1(嗜水气单胞菌 ATCC19570 株、鮭爱德华菌 ATCC33202 株、维氏气单胞菌 ATCC51106 株、温和气单胞菌 ATCC43979 株、舒氏气单胞菌 WL-2 株、迟缓爱德华菌 ATCC49231 株)、样品 2(嗜水气单胞菌 ATCC19570 株、维氏气单胞菌 ATCC51106 株)、样品 3(嗜水气单胞菌 ATCC19570 株、鮭爱德

华菌 ATCC33202 株)、样品 4(维氏气单胞菌 ATCC51106 株、鲎爱德华菌 ATCC33202 株)、样品 5(嗜水气单胞菌 ATCC19570 株)、样品 6(维氏气单胞菌 ATCC51106 株)、样品 7(鲎爱德华菌 ATCC33202 株)和样品 8(温和气单胞菌 ATCC43979 株、舒氏气单胞菌 WL-2 株、副溶血弧菌 ATCC17802 株、溶藻弧菌 ATCC19108 株、迟缓爱德华菌 ATCC49231 株),以各样品的基因组 DNA 为模板,按最佳多重 PCR 体系及方法进行扩增,检验引物的特异性。

1.2.6 多重 PCR 的敏感性试验 取 28 ℃ 培养 20 h 的嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌及培养 48 h 的鲎爱德华菌菌液,参照国标方法(GB/T 4789. 2—2003)进行细菌计数,调整 3 种菌的浓度分别为 2×10^8 CFU/mL 的嗜水气单胞菌、 3×10^8 CFU/mL 的维氏气单胞菌、 2×10^8 CFU/mL 的鲎爱德华菌,再

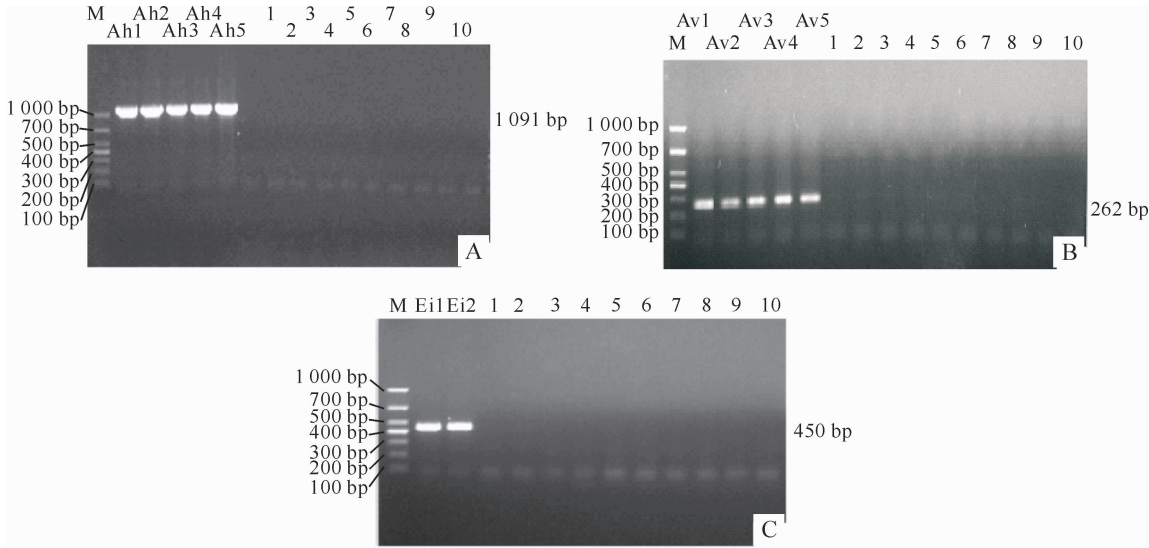
分别对菌液进行 $10^2\sim 10^7$ 的倍比稀释。取上述不同稀释度菌液 1 mL 离心($10\ 000\ g$, 1 min)后收集菌体,提取基因组 DNA 制备 PCR 模板,用优化的反应体系和条件进行多重 PCR 扩增,以检测多重 PCR 反应的灵敏度。

1.2.7 多重 PCR 方法的临床应用 应用建立的多重 PCR 方法对 50 份临床病例进行检测,同时对组织病料进行细菌分离鉴定,以验证多重 PCR 检测方法的实用性。

2 结果与分析

2.1 PCR 方法的建立

2.1.1 引物的特异性 提取 1.1 节中多种细菌的基因组 DNA, *Hly*、*DNase I* 和 *Eha* 基因的单项 PCR 扩增结果见图 1。

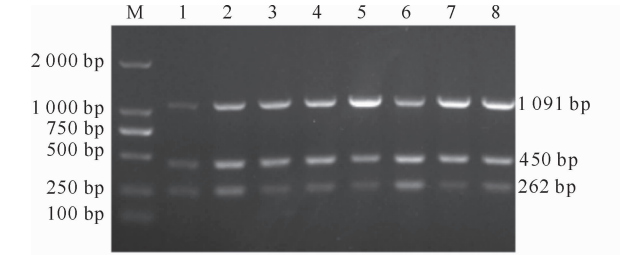


M. DL1000 DNA 分子质量标准 DL1000 DNA Marker;图 A,Ah1~Ah5 依次为嗜水气单胞菌 ATCC19570 株、XS9141 株、Ci1293 株、Ci1294 株和 Hm093 株 Figure A,Ah1—Ah5 were *A. hydrophila* strains Ah strain ATCC19570,XS9141,Ci1293,Ci1294 and Hm093,respectively;图 B,Av1~Av5 依次为维氏气单胞菌 ATCC51106 株、IB340 株、Ci12910 株、Ci12912 株和 Ci12914 株 Figure B, Av1—Av5 were *A. veronii* strains ATCC51106,IB340,Ci12910,Ci12912 and Ci12914,respectively;图 C,Ei1 和 Ei2 依次为鲎爱德华菌 ATCC33202 株和 HSN-1 株 Figure C,Ei1—Ei2 were *E. ictaluri* strains ATCC33202 and HSN-1,respectively;
1. ATCC33379 株 Strain ATCC33379;2. ATCC19108 株 Strain ATCC19108;3. ATCC17802 株 Strain ATCC17802;4. ATCC29178 株 Strain ATCC29178;5. ATCC12386 株 Strain ATCC12386;6. ATCC49231 株 Strain ATCC49231;7. ATCC43979 株 Strain ATCC43979;
8. WL-2 株 Strain WL-2;9. GHS061212 株 Strain GHS061212;10. 空白对照 Blank

图 1 嗜水气单胞菌、维氏单胞菌和鲎爱德华菌单项 PCR 扩增引物的特异性验证
Fig.1 Specificity for amplification of primers of *A. hydrophila*,*A. veronii* and *E. ictaluri* by single PCR
由图 1 可见,嗜水气单胞菌 ATCC19570、XS9141、Ci1293、Ci1294 和 Hm093 株均扩增出 1 091 bp 的片段,维氏气单胞菌 ATCC51106、IB340、Ci12910、Ci12912 和 Ci12914 株均扩增出 262 bp 的片段,鲎爱德华菌 ATCC33202 和 HSN-1 株均扩增出 450 bp 的片段,而其他种类细菌和空白对照均未扩增出相应条带,与预期结果一致,表明供试引物具有较高的特异性。测序结果经 BLAST 比对分析,结果显示所获得的 3 个基因 *Hly*、*DNase I* 和 *Eha* 测序结果与 GenBank 中登录的嗜水气单胞

菌 *Hly* (CP000462. 1)、维氏气单胞菌 *DNase I* (CP002607. 1)和鲷爱德华菌 *Eha* (CP001600. 2)基因的同源性均为 100%。

2.1.2 多重 PCR 反应条件的优化结果 1)模板质量浓度组合比的优化。对 3 种菌基因组 DNA 不同质量浓度组合比进行优化的 PCR 产物电泳结果(图 2)显示,嗜水气单胞菌 ATCC19570 株、维氏气单胞菌 ATCC51106 株、鲷爱德华菌 ATCC33202 株 DNA 的质量浓度组合为 0.5,0.5,0.5 ng/ μ L(泳道 1)时扩增效率低于其他质量浓度组合。同样体积的 DNA 中维氏气单胞菌(第 3、5 和 7 泳道)的含量较少时,*DNase I* 基因(262 bp)的特异性条带相对较弱,但也能有效扩增。泳道 6 中 3 个基因的特异性



M. DL2000 DNA Marker;1—8.嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和鲷爱德华菌 3 种菌基因组 DNA 模板质量浓度比分别为 0.5, 0.5,0.5;0.5,1,0.5;0.5,0.5,1;0.5,1,1;1,0.5,0.5; 1,1,0.5;1,0.5,1;1,1,1 ng/ μ L DNA concentration of three pathogens (*A. hydrophila*, *A. veronii* and *E. ictaluri*) were 0.5,0.5,0.5; 0.5,1,0.5;0.5,0.5,1;0.5,1,1;1,0.5,0.5; 1,1,0.5;1,0.5,1;1,1,1 ng/ μ L, respectively

图 2 斑点叉尾鲷 3 种病原多重 PCR 检测模板质量浓度比的确定

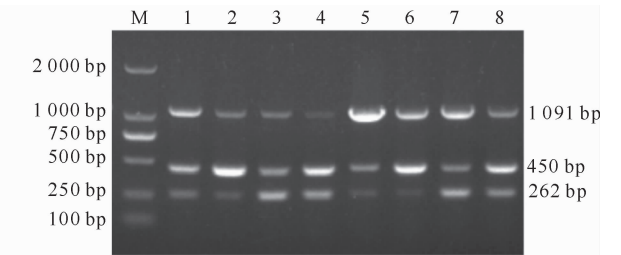
Fig. 2 Determination of optimal DNA concentration for multiplex PCR for detecting three pathogens(*A. hydrophila*, *A. veronii* and *E. ictaluri*) from channel catfish

3)退火温度的优化。选取不同的退火温度(48.4,51.5,54.0,56.8,59.5,62.1,64.5 和 66.0 $^{\circ}$ C)进行多重 PCR 反应,结果(图 4)显示,各温度下 3 个基因均得到有效扩增,其中在第 5 泳道(59.5 $^{\circ}$ C)和第 6 泳道(62.1 $^{\circ}$ C)3 个基因的扩增效率最为均一,为避免退火温度太高引起的假阴性,因此选 59.5 $^{\circ}$ C 为优化后的最佳退火温度。

多重 PCR 优化结果表明,其最佳反应体系为:2 $\times$ *Taq* PCR MasterMix 25 μ L, *P*_{Hly} 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L, *P*_{DNase I} 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L, *P*_{Eha} 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,以 2:2:1 比例混合的嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、鲷爱德华菌基因组 DNA 1 μ L,加双

条带都均一旦亮度较高,为理想扩增结果,所以最佳模板组合为嗜水气单胞菌 1 ng/ μ L、维氏气单胞菌 1 ng/ μ L、鲷爱德华菌 0.5 ng/ μ L。

2)引物浓度组合比的优化。取不同浓度的引物组合进行多重 PCR 反应,结果(图 3)表明,当维氏气单胞菌 *DNase I* 的引物浓度为 0.5 μ mol/L(泳道 1、2、5 和 6)时,扩增结果显示 *DNase I* 基因(262 bp)的扩增效率较低。当鲷爱德华菌 *Eha* 基因的引物浓度为 1.0 μ mol/L(泳道 2、4、6 和 8)时,嗜水气单胞菌 *Hly* 基因(1 091 bp)的扩增效率相对降低。因此,嗜水气单胞菌 *Hly*、维氏气单胞菌 *DNase I*、鲷爱德华菌 *Eha* 进行多重 PCR 扩增时引物终浓度分别为 1.0,1.0 和 0.5 μ mol/L 时扩增效果最好。



M. DL2000 DNA Marker;1~8.嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和鲷爱德华菌 3 种菌基因引物浓度比分别为 0.5,0.5,0.5;0.5,0.5,1;0.5,1,0.5;0.5,1,1;1,0.5,0.5; 1,0.5,1;1,0.5,1;1,1,1 μ mol/L Primers concentration for *A. hydrophila*, *A. veronii* and *E. ictaluri* were 0.5,0.5,0.5; 0.5,0.5,1;0.5,1,0.5;0.5,1,1;1,0.5,0.5;1,0.5,1; 1,1,0.5;1,1,1 μ mol/L, respectively

图 3 斑点叉尾鲷 3 种病原多重 PCR 检测引物浓度的确定

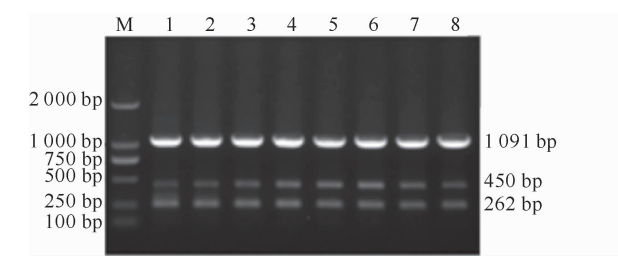
Fig. 3 Determination of optimal primer concentration for multiplex PCR for detecting three pathogens(*A. hydrophila*, *A. veronii* and *E. ictaluri*) from channel catfish

蒸水补足至 50 μ L。最佳反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,59.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,进行 30 个循环;然后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,反应结束。

2.2 多重 PCR 的特异性检测

多重 PCR 扩增测试菌的结果如图 5 所示。由图 5 可知,样品 1 检测出 1 091,450 和 262 bp 共 3 条特异性的扩增条带,样品 2 检测出 1 091 和 262 bp 的 2 条特异性条带,样品 3 检测出 1 091 和 450 bp 的 2 条特异性条带,样品 4 检测出 450 和 262 bp 的 2 条特异性条带,样品 5 检测出 1 091 bp 的特异性条带,样品 6 检测出 262 bp 的特异性条带,样品 7 检测出 450 bp 的特异性条带,样品 8 检测结果为阴

性。可见,建立的检测方法对嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和鲷爱德华菌具有特异性。

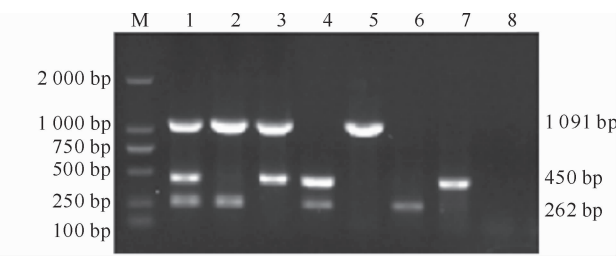


M, DL2000 DNA Marker;1~8. 退火温度分别为 48.4, 51.5,54.0,56.8,59.5,62.1,64.5 和 66.0℃
Annealing temperatures were 48.4,51.5,54.0, 56.8,59.5,62.1,64.5,and 66.0℃,respectively

图 4 斑点叉尾鲷 3 种病原多重 PCR 检测退火温度的确定
Fig.4 Determination of optimal annealing temperature for multiplex PCR for detecting the three pathogens (*A. hydrophila*,*A. veronii* and *E. ictaluri*) from channel catfish

2.3 多重 PCR 的敏感性检测

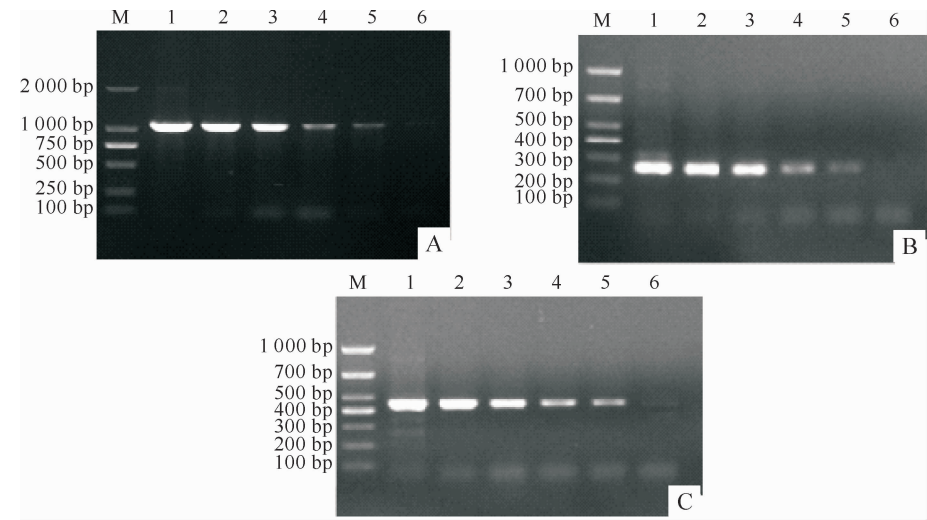
从图 6 可以看出,多重 PCR 方法对嗜水气单胞



M, DL2000 DNA Marker;
1~8. 样品 1~8 的 DNA DNA of sample 1-8

图 5 斑点叉尾鲷 3 种病原多重 PCR 检测方法的特异性

Fig.5 Specificity of multiplex PCR for detecting three pathogens (*A. hydrophila*, *A. veronii* and *E. ictaluri*) from channel catfish
菌、维氏气单胞菌、鲷爱德华菌 3 种病原菌的灵敏度分别为 2×10^2 , 3×10^2 和 2×10^2 CFU/mL。



M, DL1000 DNA Marker;1~6 依次为 $10^2\sim10^7$ 稀释菌液的嗜水气单胞菌(A)、维氏气单胞菌(B)和鲷爱德华菌(C)基因组 DNA 的扩增产物 Genome DNA of different dilutions of *A. hydrophila*(A), *A. veronii*(B) and *E. ictaluri*(C) from 10^2-10^7 respectively

图 6 斑点叉尾鲷 3 种病原多重 PCR 检测方法的敏感性
Fig.6 Sensitivity of multiplex PCR for detecting three pathogens (*A. hydrophila*, *A. veronii* and *E. ictaluri*) from channel catfish

2.4 临床样品的多重 PCR 检测

50 份待检样本中,采用多重 PCR 方法同时检出嗜水气单胞菌和鲷爱德华菌的样品有 2 份,同时检出嗜水气单胞菌和维氏气单胞菌的样品有 1 份,单一检出嗜水气单胞菌、鲷爱德华菌和维氏气单胞菌的样品分别有 31 份、2 份和 14 份,其检出率为

100%。再采用传统生物学检测方法进行验证,符合率达 100%。

3 讨论

斑点叉尾鲷败血症是造成斑点叉尾鲷养殖损失最严重的疾病,该病有急性和慢性死亡 2 种类型,急

性型来势猛,呈暴发性,有明显的死亡高峰期,死亡率较高;慢性型则死亡缓慢,无死亡高峰期,日死亡率低,但死亡可持续 1 个月左右,导致累计死亡率较大。鲷爱德华菌、嗜水气单胞菌和维氏气单胞菌引起斑点叉尾鲷败血症在发病症状上都会表现为体表出血(多出现在头部、腹部、体侧或鳍条基部),感染后症状难以区分,且有时会出现这几种菌复合感染的可能。因此,快速、准确地获知该病的病原是控制该病和减少经济损失最有效的方法^[11]。目前,这 3 种病原菌的鉴定主要通过病原分离及传统生化鉴定等方法,在诊断过程中易引起误诊和漏检。随着分子生物学的发展,PCR 检测方法也被广泛用于疾病病原检测领域,如采用 PCR 技术、实时荧光定量 PCR、环介导等温扩增技术 LAMP 及特异噬菌体等多种方法对单一病原鲷爱德华菌^[12-15]、致病性嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌进行检测^[16-17]。多重 PCR 方法因其快速、灵敏和特异的特点,及具有一次检测多个病原基因的优势,针对某些难培养或不能培养的细菌检测以及临床混合感染的诊断尤为有效^[18]。饶静静等^[19]建立了多重 PCR 方法,对嗜水气单胞菌和迟缓爱德华菌的混合感染进行了检测;隗黎丽等^[20]建立了鲷爱德华菌和迟钝爱德华菌的二重 PCR 检测技术;Persson 等^[21]通过多重 PCR 技术开展了气单胞菌的快速鉴定方法的研究。由于斑点叉尾鲷败血症病日益严重与复杂,因此需要建立一种快速、准确的检测方法用于该病的诊断和流行病学调查。

本研究检测引物是基于细菌的 *Hly*、*DNase I* 和 *Eha* 基因序列设计的。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^[22-24]。脱氧核糖核酸酶 I (*DNase I*)是一种细胞外酶,主要用于肠杆菌科细菌种的鉴定^[25-26]。爱德华菌溶血相关基因 *Eha* 作为毒力调控基因,在迟缓爱德华菌中研究较多,在鲷爱德华菌中研究较少。本研究根据 *Hly*、*DNase I* 和 *Eha* 这 3 个基因合成了 3 对特异性引物,从混合 3 种菌的菌液中提取了细菌 DNA,运用多重 PCR 技术成功扩增出了长度分别为 1 091、262 和 450 bp 的特异性片段。在建立多重 PCR 检测方法时,由于各模板质量浓度、各引物间的比例和退火温度等因素对试验结果的影响较大,因此有必要对多重 PCR 的反应条件进行优化。试验结果表明,3 种菌的模板质量浓度对扩增结果影响不大,均能有效扩增出

特异性条带。3 对特异性引物间的比例对多重 PCR 扩增效率有一定的影响,由于维氏气单胞菌 *DNase I* 基因的扩增片段较小,当 *DNase I* 基因的引物含量较低时,容易出现假阴性的结果,因此反应体系中应适量增加 *DNase I* 基因的引物含量;鲷爱德华菌 *Eha* 基因的引物浓度太高时会影响嗜水气单胞菌 *Hly* 基因的扩增,因此,反应体系中引物终浓度以 *Hly* 上下游引物各 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、*DNase I* 上下游引物各 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、*Eha* 上下游引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时扩增效果最好。本研究中退火温度对多重 PCR 试验结果的影响不大,在 48~66 $^{\circ}\text{C}$ 均能扩增出特异条带,其中 59.5 和 62.1 $^{\circ}\text{C}$ 的扩增效果最好,为了避免由于退火温度高导致的漏检,因此选用 59.5 $^{\circ}\text{C}$ 作为多重 PCR 方法的最佳退火温度。特异性试验结果表明,优化的多重 PCR 方法对斑点叉尾鲷及水产动物中常见的病毒检测结果均为阴性,显示了良好的特异性。传统的酶联免疫吸附法 (ELISA) 对鲷爱德华菌的最低检测限为 10^6 CFU/mL,且全过程需要 4~7 d,而本研究建立的多重 PCR 方法对嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、鲷爱德华菌 3 种病原菌的灵敏度分别为 2×10^2 、 3×10^2 和 2×10^2 CFU/mL,且可以直接从组织中提取细菌基因组进行 PCR 扩增与电泳,整个过程只需 3~5 h,说明本研究建立的多重 PCR 方法比传统细菌分离鉴定方法更敏感、快速且简便。

将本研究建立的多重 PCR 方法应用于临床上,检测 50 份样品中嗜水气单胞菌、鲷爱德华菌和维氏气单胞菌的感染情况,结果共检出 3 例混合感染的阳性样品以及 47 份单一感染的样品,用传统生物学检测方法经多次分离后的检测结果与单项 PCR 方法检测结果一致,表明该方法能够准确鉴定这几种菌引起的败血症病,可以满足临床检测的需要,能够用于斑点叉尾鲷败血症病的流行病学调查中。在 PCR 扩增时,组织总 DNA、菌落及菌液等均可作为反应模板,不仅大大缩短了检测时间,简化了操作过程,而且降低了检测成本,同时也降低了采样和病料保存要求;将组织总 DNA 用作检测模板,使得该 PCR 诊断方法可以将病料集中处理及诊断,增强了不同地区鱼病流行病学调查的准确性和可靠性。

4 结 论

建立的多重 PCR 检测方法快速、特异、灵敏,可单独或同时检测斑点叉尾鲷败血症病的 3 种病原嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和鲷爱德华菌,也可以用

于其他水生动物中嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和鮠爱德华菌的检测。

[参考文献]

- [1] 刘堂水,汪成竹,陈昌福. 斑点叉尾鮠细菌性病原的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(5): 550-554.
Liu T S, Wang C Z, Chen C F. Isolation and identification of pathogenic bacteria from Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2006, 25(5): 550-554.
- [2] Evgeny V, Ludmila N, Malcolm B. The structure of the antigenic O-polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Edwardsiella ictaluri* strain MT104 [J]. Carbohydrate Research, 2005, 340: 1509-1513.
- [3] Hawke J P. A bacterium associated with disease of pond cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Fish Res Board Can, 1979, 36: 1508-1512.
- [4] Harikrishnan R, Nisha M, Balasundaram C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection [J]. Aquaculture, 2003, 221: 41-50.
- [5] Pridgeon J W, Klesius P H, Mu X, et al. An *in vitro* screening method to evaluate chemicals as potential chemotherapeutants to control *Aeromonas hydrophila* infection in channel catfish [J]. J Appl Microbiol, 2011, 111: 114-124.
- [6] 苏应兵, 邹桂伟, 袁科平, 等. 斑点叉尾鮠暴发性败血症病原的分离与鉴定 [J]. 淡水渔业, 2006, 36(5): 37-41.
Su Y B, Zou G W, Yuan K P, et al. Isolation and identification of the pathogen of fulminant septicemia from *Ictalurus punctatus* [J]. Freshwater Fisheries, 2006, 36(5): 37-41.
- [7] 黄小丽, 汪开毓. 斑点叉尾鮠维氏气单胞菌病的诊断与防治 [J]. 水产科技情报, 2009(5): 240-241.
Huang X L, Wang K Y. Diagnosis and treatment to channel catfish infected with *Aeromonas veronii* [J]. Fisheries Science & Technology Information, 2009(5): 240-241.
- [8] 牟巧凤. 四川地区斑点叉尾鮠源维氏气单胞菌分子流行病学调查 [D]. 成都: 四川农业大学, 2012.
Mou Q F. Molecular epidemiological investigation of *Aeromonas veronii* from channel catfish in Sichuan district [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2012.
- [9] 刘 春, 李凯彬, 王 庆, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)内脏类结节病原菌的分离、鉴定与特性分析 [J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1119-1125.
Liu C, Li K B, Wang Q, et al. Isolation, identification and characterization of *Aeromonas schubertii* from hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(7): 1119-1125.
- [10] 刘礼辉, 李宁求, 石存斌, 等. 斑点叉尾鮠烂鳃病原柱状黄杆菌的分离及鉴定 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(17): 7124-7126.
Liu L H, Li N Q, Shi C B, et al. Isolation and classification of pathogenic bacterium caused by gill-rot disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2008, 36(17): 7124-7126.
- [11] Durborrow R, Taylor P, Crosby D, et al. Fish mortality in the Mississippi Catfish farming industry in 1988: causes and treatment [J]. Wildlife Dis, 1991, 27: 144-147.
- [12] Sakai T, Yuasa K, Sano M, et al. Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by species-specific polymerase chain reaction targeted to the upstream region of the fimbrial gene [J]. Aquat Anim Health, 2009, 21(2): 124-132.
- [13] Bilodeau A, Waldbieser G, Terhune J, et al. A real-time polymerase chain reaction assay of the bacterium *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish [J]. Aquat Anim Health, 2003, 15: 80-86.
- [14] Savan R, Igarashi A, Matsuoaka S, et al. Sensitive and rapid detection of *Edwardsiellosis* in fish by a loop-mediated isothermal amplification method [J]. Appl Environ Microb, 2004, 70(1): 621-624.
- [15] Walakira J, Carrias A A, Hossain M, et al. Identification and characterization of bacteriophages specific to the catfish pathogen, *Edwardsiella ictaluri* [J]. Appl Microbiol, 2008, 105(6): 2133-2142.
- [16] Graf J. Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species [J]. Clin Microbiol, 1999, 37: 3194-3197.
- [17] Kupfer M, Kuhnert P, Korczak B M, et al. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences [J]. Syst Evol Microbiol, 2007, 56: 2743-2751.
- [18] 陈光达, 许信刚, 童德文. PCV-2/PPV 和 PRV 多重 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(11): 1-6.
Chen G D, Xu X G, Tong D W. Establishment and initial application of multiplex PCR assay for detecting PCV-2, PPV, and PRV infection [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2011, 39(11): 1-6.
- [19] 饶静静. 嗜水气单胞菌和迟钝爱德华氏菌多重 PCR 检测方法的建立与应用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
Rao J J. Multiplex PCR assay for the detection of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.
- [20] 隗黎丽, 吴华东, 刘 毅. 黄颡鱼“裂头病”病原二重 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 生物技术通报, 2014(2): 64-68.
Wei L L, Wu H D, Liu Y. Establishment and application of duplex PCR to the pathogen of “Cracked Head” from Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Biotechnology Bulletin, 2014(2): 64-68.

- feron gamma [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2009, 33(2): 235-246.
- [11] 黄 贝, 陈善楠, 黄文树, 等. 斜带石斑鱼 IFN- γ 基因的克隆与表达分析 [J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 269-275.
Huang B, Chen S N, Huang W S, et al. Molecular characterization and expression of interferon gamma (IFN- γ) in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 269-275.
- [12] Zou J, Yoshiura Y, Dijkstra J M, et al. Identification of an interferon gamma homologue in Fugu, *Takifugu rubripes* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(4): 403-409.
- [13] Clemens F, Marit S, Bore R. Molecular characterization and expression analysis of interferon gamma in Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(2): 285-292.
- [14] Savan R, Ravichandran S, Collins J R, et al. Structural conservation of interferon gamma among vertebrates [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2009, 20(2): 115-124.
- [15] Subramaniam P S, Mujtaba M G, Paddy M R, et al. The carboxyl terminus of interferon-gamma contains a functional polypeptidic nuclear localization sequence [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(1): 403-407.
- [16] Gessani S, Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 1998, 9(2): 117-123.
- [17] Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells; synergism with IL-18 for IFN-gamma production [J]. Journal of Immunology, 1998, 161(7): 3400-3407.
- [18] Di Marzio P, Puddu P, Conti L, et al. Interferon gamma upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages [J]. Journal of Experimental Medicine, 1994, 179(5): 1731-1736.
- [19] Hebert P A, Jerald A, Boyd B. Histological enzyme and flow cytometric analysis of channel catfish intestinal tract immune cells [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2002, 26(1): 53-62.
- [20] Persson S, Al-Shuweli S, Yapici S, et al. Identification of clinical *Aeromonas* species by rpoB/gyrB sequencing and development of multiplex PCR for the detection of *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* and *A. media* [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(2): 653-656.
- [22] Xie G S, Huang J, Zhang Q L, et al. A real-time PCR targeted to the upstream regions of HlyB for specific detection of *Edwardsiella tarda* [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2012, 30(5): 731-737.
- [23] Heuzenroeder M W, Wong C Y F, Flower R L P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 174(1): 131-136.
- [24] 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.
Rao J J, Li S S, Huang K H, et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila* and its preliminary application [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(5): 749-755.
- [25] 苏明权, 孙怡群, 徐修礼. 脱氧核糖核酸酶鉴别肠杆菌科的应用价值 [J]. 临床检验杂志, 1988, 6(2): 91.
Su M Q, Sun Y Q, Xu X L. The diagnostic value of DNase for Enterobacteriaceae [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 1988, 6(2): 91.
- [26] Barozzi I, Bora P, Morelli M J. Comparative evaluation of DNase-seq footprint identification strategies [J]. Front Genet, 2014(5): 278.

(上接第 46 页)