

文章编号: 1000- 0615(2005)01- 0079- 04

## 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

储卫华, 陆承平

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 根据已发表的气单胞菌 16S rDNA 基因序列及气单胞菌气溶素(aerolysin)基因序列, 设计了 2 对引物, 建立了检测致病性嗜水气单胞菌的 PCR 方法。通过对 12 株气单胞菌的检测, 发现 16S rDNA 引物具有高度的特异性, 仅对嗜水气单胞菌扩增阳性。而 Aero 基因引物检测结果与采用生物学方法(鲜血平板法)检测的结果符合率为 97.2%, 且具有高度的敏感性, 可检测最低 1fg 的模板。将 16S rDNA 与 Aero 基因结合 PCR 方法检测致病性嗜水气单胞菌与用致病性嗜水气单胞菌检测试剂盒的符合率为 94.4%。该方法的建立为致病性嗜水气单胞菌的检测提供了一种简便、快速的途径, 是一种比较实用的致病性嗜水气单胞菌的检测方法。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; 16S rDNA; 气溶素基因; 聚合酶链式反应; 检测

中图分类号: S917

文献标识码: A

## PCR detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila* by specific 16S rDNA and aerolysin gene

CHU Wei-hua, LU Cheng-ping

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture,  
Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Based on the published 16S rDNA gene sequence of *Aeromonas* spp. and aerolysin gene sequence of *Aeromonas hydrophila*, the synthetic oligonucleotide primers were used in a polymerase chain reaction (PCR) technique to detect the gene for specific 16S rDNA and aerolysin of pathogenic *A. hydrophila*. *A. hydrophila* can be clearly discriminated from the other *Aeromonas* species by 16S rDNA gene PCR, the detection limit for the aerolysin gene by PCR amplification was 1fg DNA. 36 strains were tested for pathogenic *A. hydrophila* by PCR method and pathogenic aeromonads diagnosis kit and their coincident rate was 94.4%. The PCR can clearly identify *A. hydrophila* from *Aeromonas* species, and can identify aerolysin-producing strain of *A. hydrophila*. In conclusion, this PCR-based method is rapid, sensitive and specific for the detection of pathogenic *A. hydrophila*, and it is a practical method for pathogenic *A. hydrophila* detection.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*; 16S rDNA; aerolysin gene; PCR; detection

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一类广泛存在于水环境的常在菌, 它不仅能引发多种水生动物的传染病, 而且也是爬行类、两栖类、鸟类等动物的重要病原菌, 是我国淡水养殖鱼类暴发性传染病的主要病原<sup>[1]</sup>。近年来大量材料证明, 嗜水气单胞菌亦可单独或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一兽一鱼共患病原菌<sup>[2,3]</sup>。目前, 该菌的检测方法主要有鉴别培养基、Dot-ELISA<sup>[4]</sup>、间接 ELISA 等方法, 但都存在操作复杂或者是特异性不强等缺点。PCR 技术的发展为病原菌的检测提供了新的方法。本研究以公开发表的嗜水气单胞菌 16S

收稿日期: 2003-10-06

作者简介: 储卫华(1972-), 男, 博士, 讲师, 主要从事生物工程方面的研究, 现在南京理工大学化工学院工作。Tel: 025- 84395328, E-mail: chuweihua2002@yahoo.com.cn

通讯作者: 陆承平, Tel: 025- 84396517, E-mail: lucp@nau.edu.cn

rDNA 基因序列和气溶素 Aero 基因序列为靶基因, 设计了两对引物, 建立了 PCR 检测致病性嗜水气单胞菌的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

气单胞菌 16S rDNA 种间特异性比较见表 1。嗜水气单胞菌临床分离株 37 株, 均为致病菌株; 标准株 *A. hydrophila* ATCC7966, ATCC7097 从美国引进, 非致病菌株 W-1 为自行分离(表 2)。气单胞菌参考菌株 10 株, 其中 *A. salmonicida* ATCC4174, *A. sobria* BGAI 和 *A. trota* Ah<sub>2</sub> 由德国吉森大学惠赠。 *A. caviae* ATCC 15468, *A. encrenophila* ATCC 23309, *A. media* ATCC 33907, *A. jandaei* ATCC 49568, *A. schubertii* ATCC43700, *A. sobria* ATCC43979 和 *A. veronii* ATCC 33624 等参考菌株由海安县卫生防疫站王广和先生提供。

### 1.2 试剂

Taq 酶, dNTP 购自宝生工大连有限公司。

### 1.3 培养基

所有菌株均用 LB 琼脂培养基和 LB 肉汤培养、传代。

### 1.4 细菌染色体 DNA 的提取

参照文献[5]稍加改进, 将过夜培养的细菌液 1.5mL 10 000r·min<sup>-1</sup> 离心 5min, 沉淀用 567μL 的 TE 缓冲液(pH8.0)重悬, 加入 30μL 的 10% SDS 和 3μL 20mg·mL<sup>-1</sup> 的蛋白酶 K, 充分混匀, 37℃水浴 1h, 加入 100 μL 5mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 充分混匀再加入 80 μL CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 65℃水浴 10min, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24◇1)混匀, 12 000r·min<sup>-1</sup> 离心 10min, 吸取上清加入等体积的酚: 氯

仿 异戊醇(25◇24◇1), 混匀, 12 000r·min<sup>-1</sup> 离心 10min, 吸取上清, 加入 0.6 体积的异丙醇, 使 DNA 充分沉淀, 12 000r·min<sup>-1</sup> 离心 20min, 沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2 次, 然后在室温下干燥, 使乙醇挥发, 沉淀用 50 μL 的 TE(pH8.0) 溶解。

### 1.5 PCR 反应

16S rDNA 特异性引物的设计 登录 Genbank, 查找已发表的气单胞菌各种的 16S rDNA 序列, 参照 Dorsch 等<sup>[6]</sup>的方法, 用 DNAtool 软件设计对引物。P1: 5' - GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA - 3' (451 - 473), P2: 5' - CGTGCTGGCAACAAAGGACAG - 3' (1115- 1135)。

Aero 基因引物的设计 通过登录 Genbank 查找已发表的各种气单胞菌的 Aero 基因, 通过 Primer 软件设计 1 对引物。P1: 5' - GAGAAGAAGCCCAGAGCG - 3', P2: 5' - AGTTGGTGGCAGTATCGTAA - 3'。

引物合成 引物合成由宝生工大连有限公司协助完成。

PCR 方法 PCR 反应采用 50μL 反应体系; 其中含 DNA 模板 1μL, 上下游引物各 1μL (50mmol·L<sup>-1</sup>), dNTP 4μL (2.5g·L<sup>-1</sup>), Taq 酶 1U, 用超纯水补足至 50μL。PCR 程序如下: 16S rDNA 扩增: 94℃, 1min, 60℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环, 再 72℃维持 10min。气溶素基因扩增: 94℃, 1min, 50℃, 1min, 72℃, 1min, 30 个循环, 再 72℃维持 10min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖进行凝胶电泳。

### 1.6 PCR 检测结果与鲜血平板检测、致病性气单胞菌检测试剂盒检测结果比较

将待检测细菌接种于含 5% 的兔鲜血平板上,

表 1 气单胞菌 16S rDNA 种间特异性片段(458~ 477)

Tab. 1 16S r DNA sequences discriminating *Aeromonas* species ( position 458- 477)

16S rDNA 特异性片段 specific sequence of 16S rDNA	气单胞菌名 <i>Aeromonas</i> species
CAGUAGCUA AUAUCUGCUGG	豚鼠气单胞菌( <i>A. caviae</i> )、易损气单胞菌( <i>A. trota</i> )
UGAUGCCUA AUACGCAUCAG	嗜泉气单胞菌( <i>A. encrenophila</i> )、中间气单胞菌( <i>A. media</i> )
UGAUGCCUA AUACGUAUCAA	嗜水气单胞菌( <i>A. hydrophila</i> )
CAGUAGCUA AUAUCUGCUGG	简达气单胞菌( <i>A. jandaei</i> )
UGGCGCCUAAU ACGUGUCA	杀鲑气单胞菌( <i>A. salmonicida</i> )
UGGUGGUAAUA CCUGCCAG	舒伯特气单胞菌( <i>A. schubertii</i> )
UGGCAGCUA AUAUCUGUCAG	温和气单胞菌( <i>A. sobria</i> )
UGGUCGCUA AUAACGGCCAA	<i>Aeromonas</i> species
UGGUAGCU AAUAACUGCCAG	凡隆气单胞菌( <i>A. veronii</i> )

表 2 嗜水气单胞菌的溶血性及检测方法的比较(试剂盒与 PCR 法)

Tab.2 Haemolytic activity of *A. hydrophila* and the comparison of the results detected by PCR and detection kit

菌株 strains	来源 resources	宿主 hosts	鲜血平板溶血性 haemolytic activity	PCR	试剂盒检测结果 DoT-ELISA
ATCC <sub>7966</sub>	美国 America	鱼 fish	+	+	+
ATCC <sub>7097</sub>	美国 America	鱼 fish	+	+	+
J- 1	本文作者 The authors	鲫 crucian carp	+	+	+
Y- 1	本文作者 The authors	鳙 bighead carp	+	+	+
S- 1	本文作者 The authors	鳊 rice ell	+	+	+
S169	德国吉森大学 Univ. Giessen	马 horse	+	+	+
1292	德国吉森大学 Univ. Giessen	海豚 porpoise	+	+	+
TM6	J1S 蛋白缺失株 S-Layer deficient strain of J- 1	鲫 crucian carp	+	+	+
TPS30	浙江淡水所 Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries	鲢 sliver carp	+	+	+
HAE1	江苏海安 Jiangsu Haian	鳗 eel	+	+	+
HAE2	江苏海安 Jiangsu Haian	鳗 eel	+	+	+
5457	德国吉森大学 Univ. Giessen	猪 swine	+	+	+
6393	德国吉森大学 Univ. Giessen	猪 swine	+	+	+
P7093	德国吉森大学 Univ. Giessen	猪 swine	+	+	+
4244	德国吉森大学 Univ. Giessen	犬 dog	+	+	+
4248	德国吉森大学 Univ. Giessen	犬 dog	+	+	+
P8519/2	德国吉森大学 Univ. Giessen	犬 dog	-	+	-
4332/2	德国吉森大学 Univ. Giessen	犊 calf	+	+	+
6599	德国吉森大学 Univ. Giessen	鸭 duck	+	+	+
4290	德国吉森大学 Univ. Giessen	不详 unknown	+	+	+
X- 1	本文作者 The authors	蟹 crab	+	+	+
NI- 1	本文作者 The authors	鲢 sliver carp	+	+	-
NI- 4	本文作者 The authors	鲢 sliver carp	+	+	+
GML	本文作者 The authors	鳊 mandarin fish	+	+	+
BJ	本文作者 The authors	鳊 bream	+	+	+
BC	本文作者 The authors	鳊 bream	+	+	+
TZ- 6	本文作者 The authors	鳖 soft turtle	+	+	+
AN- 3	不详 unknown	不详 unknown	+	+	+
AhS- 2	本文作者 The authors	鳊 rice ell	+	+	+
AN- 1	本文作者 The authors	不详 unknown	+	+	+
BX- 50	上海农学院 Shanghai Agricultural College	鳖 soft turtle	+	+	+
BH- 50	江苏海安 Jiangsu Haian	鳖 soft turtle	+	+	+
MF- 1	福州动检局 Fuzhou Service of Animal and Plant Quarantine	欧洲鳗 european eel	+	+	+
SF91 1212D	江苏徐州 Jiangsu Xuzhou	三角帆蚌 mussel	+	+	+
A 7	江苏淡水所 Jiangsu Fisheries Institute	鳖 soft turtle	+	+	+
LS- 4	成都牧医所 Chendu Husbandary and Veterinary Institute	镜鲤 mirror carp	+	+	+
M 13	江苏淡水所 Jiangsu Fisheries Institute	鳗 eel	+	+	+
NI- 2	本文作者 The authors	鲢 sliver carp	+	+	+
NI- 3	本文作者 The authors	鲢 sliver carp	+	+	+
W- 1	本文作者 The authors	水环境 water	-	-	-

培养 24h, 观察溶血情况; 同时按照致病性气单胞菌检测试剂盒的说明对检测细菌进行检测<sup>[4]</sup>, 比较检测结果。

## 2 结果

### 2.1 16S rDNA 特异性检测

通过对 16S rDNA 的扩增, 发现只有嗜水气

单胞菌才能扩增出 685bp 长度的片段, 与预期的结果一致。而气单胞菌其它种的扩增结果均为阴性, 即使将退火温度降低到 50℃ 或者将 MgCl<sub>2</sub> 提高到 6.5mmol·L<sup>-1</sup>, 也不出现扩增条带。

### 2.2 基因溶血素的扩增

通过对包括 ATCC<sub>7966</sub> 在内的嗜水气单胞菌扩增均能扩增出 597bp 大小的片段。将抽提的

DNA10 释后(10<sup>4</sup>fg, 10<sup>3</sup>fg, 10<sup>2</sup>fg, 10fg, 1fg), 进行 PCR 扩增, 结果从 10<sup>4</sup>fg 到 1fg 均可见特异性扩增条带。将 PCR 反应阳性的菌株接种于含有 5% 兔鲜血平板上检测溶血圈, 结果与 PCR 反应结果有高度的一致性。

### 2.3 煮沸法制备 PCR 模板 DNA

由于用提取的细菌染色体组作模板, 费时, 费力, 不便于临床检验, 因此试用煮沸法制备 PCR 模板, 结果发现此法简便、快速、省时、省力, 且不失 PCR 的敏感性。

### 2.4 PCR 检测结果与鲜血平板检测、致病性气单胞菌检测试剂盒检测结果比较

通过将细菌接种在含 5% 兔鲜血平板上检测溶血素与 PCR 检测结果比较, 发现两者符合率为 97.2% (35/36), 而 PCR 方法与用检测试剂盒的符合率为 94.4% (34/36) (表 2)。

## 3 讨论

气单胞菌是一类广泛存在的人畜共患病原微生物, 而嗜水气单胞菌则是其中的主要成员。嗜水气单胞菌有致病菌株与非致病菌株之分, 致病性与其胞外产物(如肠毒素、溶血素、细胞毒素、蛋白酶等)有密切的关系<sup>[7]</sup>。已有的致病性气单胞菌检测试剂盒是建立在检测蛋白酶的基础上的, 它对致病性气单胞菌的检测必须分两步进行, 首先要对细菌进行鉴定, 以后才检测蛋白酶这种方法繁琐、费时, 不能适应现代流行病学调查和临床病原菌检测所需的快速、简便的要求。而用 PCR 方法简便、快捷。

细菌 16S rDNA 基因核苷酸序列具有高度的保守性, 其核苷酸片段长度适宜, 但它的保守性又是相对的, 在保守区之间存在 9~10 个变异区<sup>[8]</sup>, 不同科、属、种间都具有一定的变异, 基于这一特点, 选用嗜水气单胞菌 16S rDNA 基因保守区内的可变区设计特异性引物对气单胞菌的各个种进行扩增, 结果发现只有嗜水气单胞菌扩增阳性, 而气单胞菌的其它菌株均为阴性。嗜水气单胞菌的致病性与其毒素的分泌有着密切的关系<sup>[9]</sup>, 有研究表明, 溶血素基因失活, 嗜水气单胞菌对乳鼠的致病性丧失<sup>[10,11]</sup>。嗜水气单胞菌毒素, 在基因结构上具有相关性<sup>[12]</sup>, 气溶素是嗜水气单胞菌产生的主要毒素, 基本上与其致病性呈正相关。检测毒

素的方法很多, 生物学方法有溶血试验、细胞毒性试验以及肠毒性试验等, 这些方法直观可靠, 但操作复杂, 而且要实验动物; 免疫学方法需制备抗血清, 费时费力, 而 PCR 可直接检测基因, 省时、省力, 敏感性高, 且又避免了有些细菌基因在体外培养条件下不表达的缺点。

通过对嗜水气单胞菌 16S rDNA 和毒素基因扩增结合对临床分离的致病性嗜水气单胞菌进行了检测, 结果与通过细菌生化鉴定和溶血素生物学检验所得的结果符合率为 97.2%; 而与用致病性气单胞菌检测试剂盒检测的结果符合率为 94.4%, 这可能是某些细菌虽然含有毒素基因, 但由于培养条件等原因, 毒素不表达造成的; 说明致病性气单胞菌检测试剂盒与 PCR 有很高的符合率。根据本试验的结果, 16S rDNA 和毒素基因扩增相结合, 可以用于临床、食品、水生动物的检验。

### 参考文献:

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
- [2] Alhwegg M, Geiss H K. *Aeromonas* as a human pathogen[J]. Crit Rev Microbiol, 1989, 16: 253-286.
- [3] Janda J M, Duffey P S. Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy laboratory identification and infectious disease spectrum[J]. Rev Infect Dis, 1988, 10: 980-997.
- [4] 沈素芳, 储卫华, 陆承平. 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.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 672-691.
- [6] Dorsch M, Ashbolt N J, Cox P T, et al. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based screening of environmental isolates[J]. Appl Bacteriol, 1994, 77: 722-726.
- [7] John M P, Stephen P K, Radomin S. Secreted enzymes of *Aeromonas*[J]. FEMS Microbiology, 1997, 15: 1-10.
- [8] Dauga C F, Grimont P A D. Nucleotide sequences of 16S rDNA from ten serratia species[J]. Microbiology, 1990, 141(4): 1139-1149.
- [9] Selma G N, Johnson C H, Spaulding P. Evidence for the direct involvement of beta-hemolysin in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity[J]. Curr Microbiol, 1986, 14: 71-77.
- [10] Wong C Y, Heuzenroeder M W, Flower R L. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model[J]. Microbiology, 1998, 144(2): 291-298.
- [11] Rose J M, Houston C W, Coppenhaver D H, et al. Purification and chemical characterization of a cholera toxin-cross reactive cytolytic enterotoxin produced by a human isolate of *Aeromonas hydrophila*[J]. Infect Immun, 1989, 57: 1165-1169.
- [12] Husslein V, Chakraborty T, Carnahan A, et al. Molecular studies on the aerolysin gene of *Aeromonas* species and discovery of a species specific probe for *Aeromonas trota* species nova[J]. Clin Infect Dis, 1992, 14(5): 1061-1068.