

实时荧光定量PCR扩增特异性 *vapA* 基因 检测杀鲑气单胞菌

刘 帅^{1,2}, 王 菡¹, 卢彤岩¹, 曹永生¹,
杨 晨³, 朱国建³, 李绍戊^{1*}

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 新疆额尔齐斯河流域开发工程建设管理局, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: 为实现杀鲑气单胞菌早期快速准确定量检测, 研究旨在建立杀鲑气单胞菌的SYBR Green I实时荧光定量PCR (Real-time PCR)检测方法。根据GenBank中杀鲑气单胞菌毒力阵列蛋白基因(*vapA*)保守序列设计并合成一对特异性引物, 对其特异性、灵敏度、可重复性和应用性进行评价。结果显示, 研究设计的引物具有良好的种间特异性, 仅对杀鲑气单胞菌及其亚种有阳性扩增, 与其他细菌不发生交叉反应。构建的Real-time PCR标准曲线质粒拷贝数与循环阈值呈良好的线性关系, 扩增所得标准曲线分别为 $y = -4.8345x + 42.535$, 相关系数 R^2 为0.998, 最低检测限为34拷贝/ μL , 较常规PCR的灵敏度高出约1000倍。应用建立的方法检测人工感染的虹鳟病样, 15个被检样品呈阳性反应, 与细菌常规鉴定方法结果一致。研究表明, 所建立的基于实时荧光定量PCR技术的杀鲑气单胞菌检测方法快速、特异、灵敏, 可用于临床诊断和疫病监测。

关键词: 虹鳟; 杀鲑气单胞菌; *vapA*基因; 实时荧光定量PCR

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

气单胞菌属(*Aeromonas*)细菌包括嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)和豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)等20个种^[1], 广泛分布于自然界中, 是一类重要的水产养殖动物病原菌, 由其感染引起患病鱼的临床特征主要表现为出血性病征^[2]。其中, 杀鲑气单胞菌是引起鲑鳟鱼类疔疮病及溃疡病的最主要病原菌, 给鲑科(Salmonidae)鱼类养殖带来严重损失^[3]。近年来研究表明, 该菌宿主范围逐渐扩大, 可感染除了鲑科外的其他水产动物, 如刺参(*Oplopanax elatus*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、乌鳢(*Ophicephalus argus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等^[4-7]。此外, Fontes等^[8]于2011年从葡萄牙某猪屠宰场的猪肉中分离到了包括杀鲑气

单胞菌在内的多种气单胞菌。林如涛等^[9]首次在中国重庆地区的山羊体内检测到杀鲑气单胞菌。

目前, 对杀鲑气单胞菌的检测主要依赖于传统的微生物分离培养鉴定方法^[10], 其操作过程费时、繁琐, 且很难得到准确结果, 常常延误病情的诊断, 而且对于已感染该菌但尚未发病的鱼类, 通过常规分离鉴定方法很难得到准确结果^[11]。毒力阵列蛋白基因(virulence array protein A, *vapA*)在杀鲑气单胞菌及其亚种中普遍存在, 主要功能是编码A层蛋白, 因此该基因也被称为A层蛋白基因(*A-layer*)。 *vapA*基因序列在进化上的变异水平决定了其可以用来测定杀鲑气单胞菌^[12], 刘宗晓等^[13]利用*vapA*基因建立了杀鲑气单胞菌的TaqMan探针实时定量检测方法。本研究

收稿日期: 2016-11-09 修回日期: 2017-02-25

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY201503); 新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(2016E02052)

通信作者: 李绍戊, E-mail: lishaowu@hrfri.ac.cn

在上述研究的基础上, 以*vapA*基因为靶基因, 建立了杀鲑气单胞菌的SYBR Green I Real-time PCR检测方法, 该方法不仅具有重复性好、灵敏度高和特异性强的特点, 还具有鉴定迅速、操作简单和结果准确等优点, 为建立特异性强、灵敏度高的杀鲑气单胞菌定量检测法提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用菌种包括杀鲑气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌(*A. sobria*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)、鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)、迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)等10种共13株。各菌株的来源及编号见表1, 鱼体组织待检样品取自黑龙江水产研究所鱼类病害研究实验室。

1.2 主要仪器与试剂

ABI7500荧光定量PCR仪购自美国; 细菌基因组DNA提取试剂盒和胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; thunderbird SYBR[®]qPCR mix试剂盒购自日本Toyobo公司; PCR试剂和

pMD18T载体购自宝生物工程有限公司。

1.3 引物设计与合成

根据GenBank上杀鲑气单胞菌*vapA*基因(登录号: KP184560.1)序列, 利用引物设计软件Primer explorer设计1对特异性引物, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 引物序列: AsV-F 5'-CGTCCGAGACAGGTATCAGC-3', AsV-R 5'-TCCAAGGTGAAGGCCAATT-3'。

1.4 引物特异性检测

利用“引物设计与合成”中设计好的引物, 以提取的上述10种细菌基因组DNA为模板进行常规PCR扩增, 以无菌去离子水为阴性对照, 检测所设计引物的特异性。

普通PCR反应体系 2×PCR premix 10 μL, 10 μmol/L的引物各1 μL, 无菌去离子水7 μL, DNA模板1 μL; PCR反应条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 52 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共30个循环; 最后72 °C延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后由凝胶成像系统分析结果。

荧光定量PCR反应体系 通过预实验对反应体系中退火温度、反应时间和引物浓度等进行摸索, 最终确定的反应体系为thunderbird

表 1 菌株及其来源

Tab. 1 Bacterial strains used in this study

菌株 bacterial strains	编号 no.	来源 source
杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	ATCC®33658	美国模式培养物集存库
杀鲑气单胞菌无色亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	ATCC®33659	美国模式培养物集存库
杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	ATCC®27013	美国模式培养物集存库
杀鲑气单胞菌史氏亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i>	ATCC®49393	美国模式培养物集存库
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	ATCC®7966	美国模式培养物集存库
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	ATCC®35624	美国模式培养物集存库
豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>	CCTCC AB98034	中国典型培养物保藏中心
温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	CCTCC AB98043	中国典型培养物保藏中心
迟缓爱德华菌 <i>E. tarda</i>	ATCC®15947	美国模式培养物集存库
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	CGMCC 1.2386	中国普通微生物菌种保藏管理中心
溶壁微球菌 <i>M. lysodeikticus</i>	CGMCC 1.634	中国普通微生物菌种保藏管理中心
鲁氏耶尔森菌 <i>Y. ruckeri</i>	ATCC®29473	美国模式培养物集存库
荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	ATCC®13525	美国模式培养物集存库

SYBR[®] qPCR mix 10.5 μ L, 上下游引物各0.6 μ L, DNA模板1 μ L, 无菌去离子水7.4 μ L, 总体积为20 μ L。反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性1 min; 95 $^{\circ}$ C变性10 s; 60 $^{\circ}$ C退火34 s; 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共40个循环。

1.5 质粒标准品的构建、重复性及灵敏度检测

质粒标准品的构建 以AsV-F/AsV-R引物扩增vapA基因的部分序列, 将扩增得到的纯化PCR产物连接到pMD18T载体上, 然后转化至DH5 α 感受态细胞中, 通过PCR和测序鉴定阳性克隆。鉴定正确后, 提取重组质粒pMD18-vapA并用微量紫外可见分光光度计测定其浓度和纯度, 根据摩尔定律, 利用下述公式计算出每 μ L质粒中的DNA拷贝数, 该质粒即可作为标准品。

$$\text{质粒拷贝数 (拷贝/}\mu\text{L)} = \frac{\text{质粒浓度 (ng/}\mu\text{L)} \times \text{质粒体积 (}\mu\text{L)} \times (6.023 \times 10^{23})}{[\text{载体长度 (bp)} + \text{片段长度 (bp)}] \times 660 (\text{g/mol})}$$

标准曲线的建立及重复性检测 利用上述公式计算出pMD18T-fstA重组质粒中DNA的拷贝数, 并以此重组质粒作为本实验的标准品, 将其10倍系列稀释成 10^9 拷贝/ μ L至 10^1 拷贝/ μ L。取上述10倍系列稀释的pMD18T-vapA重组质粒 10^6 ~ 10^1 拷贝/ μ L共6个稀释度为标准品模板进行荧光定量PCR扩增, 以质粒拷贝数对数值为x轴, 以Ct值为y轴, 构建SYBR Green I实时荧光定量PCR标准曲线。再次选取10倍系列稀释成 10^6 ~ 10^1 拷贝/ μ L的pMD18T-vapA重组质粒, 每个梯度设3个重复, 比较在同一次实验中3个重复间的均一性, 通过组内的Ct值变异系数(标准偏差/重复值平均数)评价该方法的重复性。

灵敏度检测 取上述10倍系列稀释的质粒标准品 10^6 ~ 10^1 拷贝/ μ L共6个稀释度为模板进行荧光定量PCR扩增, 所能检出的最低起始模板浓度即为SYBR Green I实时荧光定量PCR的灵敏度。常规PCR扩增所用质粒标准品浓度分别为 10^8 ~ 10^1 拷贝/ μ L。

1.6 实时荧光定量PCR检测方法的应用

为了评价杀鲑气单胞菌实时荧光定量PCR检测方法的有效性, 分别通过腹腔注射和浸泡途径感染健康虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*), 于攻毒后1、3和7 d采集鳃、脾、肾和肠组织进行研磨, 提取基因组DNA, 按上述方法进行实时荧光定

量PCR检测, 通过样品的Ct值、扩增曲线及熔解曲线进行结果判断。同时, 将病样组织进行常规的细菌分离、培养, 鉴定培养菌株的理化特性和16S rRNA基因序列, 以比较确定该方法的准确率。

2 结果

2.1 引物特异性检测

常规PCR检测结果显示, AsV-F/AsV-R引物的特异性表现良好, 以杀鲑气单胞菌杀鲑亚种、无色亚种、杀日本鲑亚种和史氏亚种的基因组DNA为模板进行PCR均扩增出目的条带, 大小225 bp, 而供试的其他病原菌如嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌、维氏气单胞菌、鲁氏耶尔森菌、迟缓爱德华菌、金黄色葡萄球菌等结果为阴性(图1)。Real-time PCR检测结果同样证明了引物的特异性, 只对杀鲑气单胞菌及其亚种有单一的产物吸收峰, 其余供试菌株均未检测到特异的产物吸收峰(图2)。由熔解曲线可知, T_m 值为83.5~85.6 $^{\circ}$ C, 表明反应过程中未出现非特异性扩增和引物二聚体。



图1 引物特异性检测结果

M. 分子量标准DL2000; 1~11. 杀鲑气单胞菌杀鲑亚种、无色亚种、杀日本鲑亚种、史氏亚种, 嗜水气单胞菌, 豚鼠气单胞菌, 温和气单胞菌, 维氏气单胞菌, 鲁氏耶尔森菌, 迟缓爱德华菌, 金黄色葡萄球菌

Fig. 1 Specific detection of primers

M. molecular weight marker DL2000; 1-11. *A. salmonicida* sp. *salmonicida*, *A. salmonicida* sp. *achromogenes*, *A. salmonicida* sp. *masoucida*, *A. salmonicida* sp. *smith*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *Y. ruckeri*, *E. tarda*, *S. aureus*

2.2 SYBR Green I Real-time PCR标准曲线的建立

根据优化好的杀鲑气单胞菌实时定量PCR反应体系, 取 10^6 ~ 10^1 拷贝/ μ L共6个稀释度为标准品模板用引物AsV-F/AsV-R分别进行荧光定量PCR检测, 建立了相应的质粒拷贝浓度的对数值

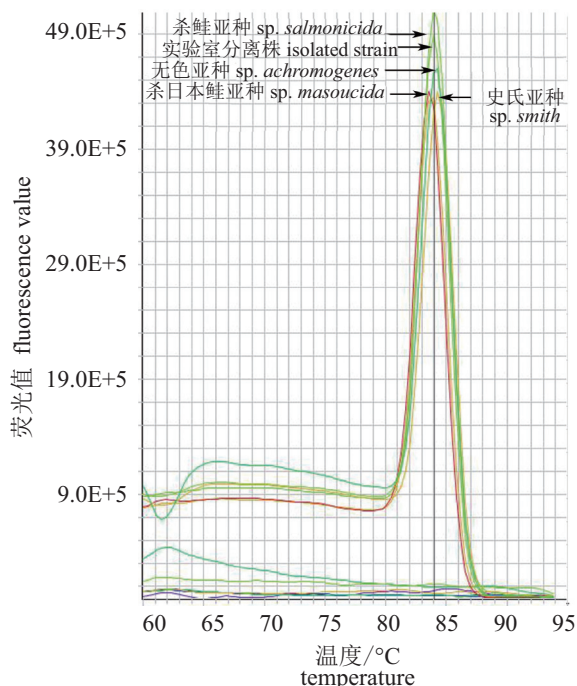


图2 标准品pMD18-vapA实时定量PCR熔解曲线

Fig. 2 Melting curve of Real-time PCR for strand plasmid of pMD18-vapA

与Ct值相关关系的定量标准曲线。标准曲线方程为 $y = -4.8345x + 42.535$, 相关系数 R^2 为0.998, 质粒拷贝数与PCR的Ct值之间呈现良好的线性关系。

2.3 灵敏度检测

以10倍浓度梯度稀释的质粒标准品为模板, 利用AsV-F/AsV-R引物分别进行常规PCR和Real-time PCR扩增, 以检测方法的灵敏度。结果显示, 实时荧光定量PCR方法对重组质粒进行扩增, 最低检测限为34拷贝/ μL (图3); 而常规PCR在模板浓度为 3.4×10^5 拷贝/ μL 时能观察到目的条带(图4), 在浓度为 3.4×10^4 拷贝/ μL 时的条带亮度较为模糊, 由此可以看出荧光定量PCR的灵敏度比常规PCR高1000倍。

2.4 实时荧光定量PCR的重复性分析

分别以 $10^6 \sim 10^1$ 拷贝/ μL 等6个浓度梯度的质粒标准品为模板, 每个梯度选取3个重复管, 进行组内SYBR Green I荧光PCR重复性分析, 计算其Ct均值、标准差和变异系数(表2)。标准品浓度为 $10^6 \sim 10^1$ 拷贝/ μL 的3个重复的Ct值基本一致, 标准差为0.175~0.477, 变异系数为0.57%~1.80%。统计结果表明, 本研究所建立的SYBR Green I实

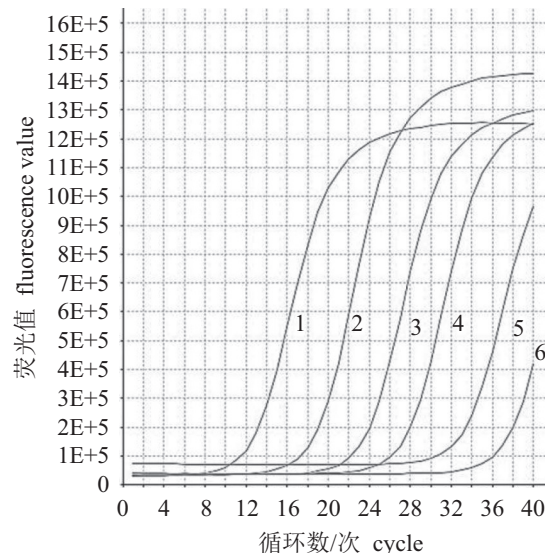


图3 实时荧光定量PCR灵敏度检测结果

1~6. 质粒稀释为 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 拷贝/ μL

Fig. 3 Sensitivity of Real-time PCR for detection of *A. salmonicida*

1-6. plasmid diluted to 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 copies/ μL

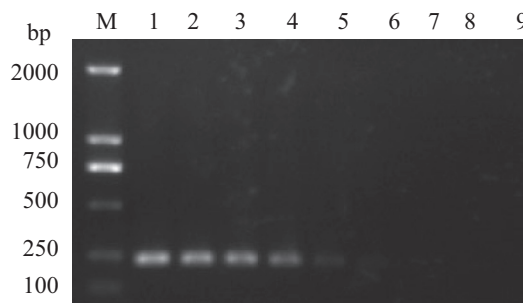


图4 普通PCR灵敏度检测结果

1~8. 质粒稀释为 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 拷贝/ μL ;
9. 阴性对照

Fig. 4 Sensitivity of conventional PCR for detection of *A. salmonicida*

1-8. plasmid diluted to 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 copies/ μL ;
9. negative control

时荧光定量PCR检测方法重复性好, 可进行稳定、可靠的检测。

2.5 实时荧光定量PCR检测方法应用结果

利用本实验建立的杀鲑气单胞菌实时定量PCR方法, 对人工感染1、3和7 d后的虹鳟肝、脾、肾、肠和鳃进行检测。结果显示, 在各组待检组织样品中, 注射组和浸泡组均有阳性检出(表3)。根据已建立的标准曲线即可计算出对应基因的拷贝数(表4)。常规细菌分离鉴定结果

表 2 以 pMD18-vapA 重组质粒为标准模板的实时荧光定量 PCR 重复实验

Tab. 2 Reproducibility of pMD18-vapA standard template in Real-time PCR assay

浓度梯度 concentration gradient	拷贝数/(拷贝/μL)			copies	变异系数/% CV
	1	2	3	标准差 SD	
3.4×10 ⁶	13.82	13.55	14.04	0.248	1.80
3.4×10 ⁵	18.20	18.71	18.89	0.356	0.94
3.4×10 ⁴	22.25	22.59	22.51	0.175	0.78
3.4×10 ³	27.08	26.36	27.07	0.412	1.47
3.4×10 ²	32.95	32.69	32.58	0.188	0.57
3.4×10 ¹	38.02	37.06	36.98	0.579	1.55

表 3 待检样品实时荧光定量 PCR 检测的 Ct 值

Tab. 3 The Ct value of Real-time PCR of infected samples

待检样品 samples	样品 Ct 值 Ct values of samples		
	1 d	3 d	7 d
鳃 gill	4.60	4.71	7.93
肝 liver	14.75	33.42	34.29
脾 spleen	5.43	5.81	7.43
头肾 head kidney	6.17	6.08	6.89
肠道 intestine	4.89	5.97	8.32

表 4 待检样品 Ct 值所对应基因的拷贝数

Tab. 4 The gene copies corresponding to Ct value by Real-time PCR detection

待检样品 samples	Ct 值对应基因的拷贝数/(拷贝/μL) the gene copies corresponding to Ct value		
	1 d	3 d	7 d
鳃 gill	1.7×10 ⁸	1.7×10 ⁸	3.8×10 ⁷
肝 liver	1.6×10 ⁶	2.6×10 ²	1.7×10 ²
脾 spleen	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁸	4.9×10 ⁷
头肾 head kidney	8.5×10 ⁷	8.5×10 ⁷	6.2×10 ⁷
肠道 intestine	1.6×10 ⁸	9.6×10 ⁷	3.2×10 ⁷

显示, 所分离的细菌均为杀鲑气单胞菌, 进一步证明了该实时荧光定量 PCR 的准确性。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术与普通 PCR 技术相比, 可以对 DNA 模板定量, 同时还具有灵敏度

高、自动化程度高、特异性强和污染性小等优势^[14]。TaqMan 探针法、SYBR Green I 染料法和分子信标法是常用的几种方法^[15]。石晓璐等^[16]采用 TaqMan-MGB 和分子信标技术, 建立了 2 种针对沙门菌的实时荧光定量 PCR 检测方法, 2 种方法的检出限都达到了 32 CFU/mL 菌液浓度。李富祥等^[17]利用 TaqMan 荧光定量 PCR 法检测猪丹毒杆菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 最低能检测到 76 拷贝/μL; 荣小军等^[18]利用 SYBR Green I 荧光定量法检测迟缓爱德华菌, 最低能检测到 60 CFU/mL; 王国良等^[19]利用 SYBR Green I 荧光定量法检测鲫鱼诺卡氏菌 (*Nocardia seriolae*), 检测灵敏度可达 10⁶ μg/μL 的 DNA 含量。荧光定量 PCR 还可以与多重 PCR 结合使用, 可同时定量检测多个目的片段, 一次 PCR 反应可完成多个检测目的, 极大提高了检测效率^[20]。Alperi 等^[21]根据 16S rRNA 基因建立了多重 PCR 方法, 可同时检测出包括杀鲑气单胞菌在内的 3 种常见鱼类致病菌。Kulkarni 等^[22]根据 *gyrB* 基因设计了特异性引物并应用环介导等温扩增技术检测大西洋鳕 (*Gadus morhua*) 非典型疝病的病原杀鲑气单胞菌, 结果显示其灵敏度是普通 PCR 的 10 倍。

杀鲑气单胞菌是一种常见的条件致病菌, 有关该菌的特异性检测技术已陆续见报道。童裳亮^[23]利用 ELISA 技术建立了快速检测水样中杀鲑气单胞菌的方法, 其检测灵敏度可达到 5 个细菌/mL, 具有检测时间短、特异性强、准确性高等优点; 刘宗晓等^[13]建立了杀鲑气单胞菌的 TaqMan 探针实时定量检测方法, 本实验与其选择同样的目的基因但仍与之有不同之处, 例如本实验选用 SYBR Green I 染料法, 与其选用的 TaqMan 探针法相比具有不需要荧光探针、检测方法简单、操作方便、成本低等优点; 此外, 本研究为构建重组质粒并根据质粒浓度、载体长度等计算基因拷贝数, 而其采用血球计数板计数; 刘宗晓等^[13]建立的方法缺乏与常规 PCR 结果的比较分析、RT-PCR 重复性分析、检测方法应用效果评价等研究, 而本实验对这些做了详细的结果分析。本实验以含有杀鲑气单胞菌 *vapA* 基因的质粒为标准品, 构建标准曲线, 建立了杀鲑气单胞菌实时定量 PCR 检测方法。直线回归方程的相关系数达到 0.998, 表明此反应体系精确度高、稳定性好, 是理想的标准曲线。其灵敏度检测结果表明, 至少可检测到 34 个拷贝的

基因, 其检测灵敏度是常规PCR的1000倍。对人工感染的虹鳟组织样品进行检测, 实际应用结果显示该方法在生产中具有较好的适用性。因此, 本检测方法对水产养殖过程中的杀鲑气单胞菌的检测和预防具有重要意义。

参考文献:

- [1] Janda J M, Abbott S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35-73.
- [2] Coscelli G A, Roberto B, Ana P L, *et al.* Acute *Aeromonas salmonicida* infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Histopathological and immunohistochemical studies*[J]. *Aquaculture*, 2014, 430: 79-85.
- [3] Erdal J I, Reitan L J. Immune response and protective immunity after vaccination of *Atlantic salmon* (*Salmo salar* L.) against furunculosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1992, 2(2): 99-108.
- [4] 杨嘉龙, 周丽, 邢婧, 等. 养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(6): 981-989.
- Yang J L, Zhou L, Xing J, *et al.* Identification of *Aeromonas salmonicida* associated with skin ulceration of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* and characterization of the extracellular products[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(6): 981-989(in Chinese).
- [5] 杨移斌, 胥宁, 董靖, 等. 斑点叉尾鲷源杀鲑气单胞菌无色亚种分离鉴定及药敏特性[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(4): 787-792.
- Yang Y B, Xu N, Dong J, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* from *Ictalunes punctatus* and its antimicrobial susceptibility[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(4): 787-792(in Chinese).
- [6] 周冬仁, 罗毅志, 杭小英, 等. 1株乌鳢源杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的分离与鉴定[J]. *海洋湖沼通报*, 2015(3): 64-70.
- Zhou D R, Luo Y Z, Hang X Y, *et al.* Isolation and identification of pathogens *Aeromonas Salmonicida Salmonicida* subsp. from northern snakehead (*Ophicephalus Argus*)[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(3): 64-70(in Chinese).
- [7] 吕俊超, 张晓华, 王燕, 等. 养殖大菱鲆病原菌——杀鲑气单胞菌无色亚种的分离鉴定和组织病理学研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(1): 91-95.
- Lu J C, Zhang X H, Wang Y, *et al.* Isolation and identification of bacterial pathogen: *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* in cultured turbot and histopathological study[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, 39(1): 91-95(in Chinese).
- [8] Fontes M C, Saavedra M J, Martins S C, *et al.* Phylogenetic identification of *Aeromonas* from pigs slaughtered for consumption in slaughterhouses at the north of Portugal[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146(2): 118-122.
- [9] 林如涛, 周作勇, 王小林, 等. 羊源杀鲑气单胞菌16S rRNA基因的克隆测序及分析[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2011, 33(8): 46-51.
- Lin R T, Zhou Z Y, Wang X L, *et al.* Cloning and sequence analysis of the 16S rRNA gene of *Aeromonas salmonicida* in goat[J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2011, 33(8): 46-51(in Chinese).
- [10] Austin B, Austin D A. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*[M]. 4th ed. Netherlands: Springer, 2007: 162-164.
- [11] 曹成易, 汪开毓, 王玲, 等. 大西洋鲑杀鲑气单胞菌的分离鉴定[J]. *淡水渔业*, 2009, 39(1): 54-57.
- Cao C Y, Wang K Y, Wang L, *et al.* Isolation and identification of pathogenic bacteria causing ulcer disease of Atlantic salmon[J]. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(1): 54-57(in Chinese).
- [12] Gulla S, Lund V, Kristoffersen A B, *et al.* vapA (A-layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(3): 329-342.
- [13] 刘宗晓, 刘蕊, 史秀杰, 等. 杀鲑气单胞菌的实时定量PCR检测方法的建立和应用[J]. *海洋水产研究*, 2008, 29(5): 83-88.
- Liu Z X, Liu H, Shi X J, *et al.* Development and application of real-time PCR assay for detection of *Aeromonas salmonicida*[J]. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(5): 83-88(in Chinese).
- [14] 张惟才, 朱力, 王玉飞. 实时荧光定量PCR[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- Zhang W C, Zhu L, Wang Y F. *Real-time Quantitative*

- PCR[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2013 (in Chinese).
- [15] Bustin S A, Benes V, Nolan T, *et al.* Quantitative real-time RT-PCR—a perspective[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, 34(3): 597-601.
- [16] 石晓璐, 扈庆华, 张佳峰, 等. 多重实时PCR快速同时检测沙门菌和志贺菌[J]. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(12): 1053-1056.
- Shi X L, Hu Q H, Zhang J F, *et al.* Rapid simultaneous detection of *Salmonella* and *Shigella* using modified molecular beacons and real-time PCR[J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2006, 27(12): 1053-1056(in Chinese).
- [17] 李富祥, 赵德宏, 宋建领, 等. 猪丹毒杆菌TaqMan荧光定量PCR检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(5): 385-389.
- Li F X, Zhao D H, Song J L, *et al.* Development of Taq-Man real-time PCR assay for detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(5): 385-389(in Chinese).
- [18] 荣小军, 廖梅杰, 张正, 等. 迟缓爱德华氏菌SYBR Green I实时荧光定量PCR检测方法的建立及其应用[J]. *水产学报*, 2013, 37(12): 1829-1838.
- Rong X J, Liao M J, Zhang Z, *et al.* Development of an SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Edwardsiella tarda* and its application[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(12): 1829-1838(in Chinese).
- [19] 王国良, 刘璐, 李思源. 鲟鱼诺卡氏菌SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测方法的建立与应用[J]. *水产学报*, 2012, 36(4): 509-513.
- Wang G L, Liu L, Li S Y. Development of a SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Nocardia seriolae* and its application[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(4): 509-513(in Chinese).
- [20] O'Regan E, McCabe E, Burgess C, *et al.* Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples[J]. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 156.
- [21] Alperi A, Figueras M J, Inza I, *et al.* Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation[J]. *International Microbiology*, 2008, 11(3): 185-194.
- [22] Kulkarni A, Caipang C M A, Brinchmann M F, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification—an assay for the detection of atypical furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in Atlantic cod, *Gadus morhua*[J]. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 2009, 17(4): 476-489.
- [23] 童裳亮, 王作芸, 周建玲. 杀鲑气单胞菌的快速检测[J]. *动物检疫*, 1993, 10(5): 7-8.
- Tong S L, Wang Z Y, Zhou J L. Rapid detection of *Aeromonas salmonicida* using ELISA[J]. *Animal Quarantine*, 1993, 10(5): 7-8(in Chinese).

Real-time PCR detection of *Aeromonas salmonicida* by amplification of specific vapA gene

LIU Shuai^{1,2}, WANG Di¹, LU Tongyan¹, CAO Yongsheng¹,
YANG Chen³, ZHU Guojian³, LI Shaowu^{1*}

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Xinjiang Erqis River Basin Development Construction Management Bureau, Urumqi 830000, China)

Abstract: In order to implement the early and quick quantitative determination of *Aeromonas salmonicida*, a SYBR Green I Real-time PCR method of *A. salmonicida* was established based on the pathogen sequence information. Based on the vapA of virulence array protein gene sequence of *A. salmonicida*, a pair of primers was designed and used in a real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay. The specificity, sensitivity, repeatability and application of the system were also evaluated. The results showed that *A. salmonicida* and its subspecies can be clearly discriminated from the other 10 bacteria species by SYBR Green I Real-time qPCR, which indicated that the primer pair has good inter-species specificity. The standard curve established by recombinant plasmid showed a fine linear relationship between initial templates and threshold cycle, which can be described as $y = -4.8345x + 42.535$ ($R^2 = 0.998$). The sensitivity analysis showed that the detection limit was 34 copies/ μL , which suggested that the sensitivity of Real-time qPCR was about 1000 times higher than that of the conventional PCR assay. The established method was applied to detect the samples in rainbow trout after artificial infection. Results showed that 15 of those samples were positive, which had complete agreement (100%) with bacteriological analysis by isolation and culture. In conclusion, the developed Real-time PCR assay for *A. salmonicida* is fast, highly specific, and sensitive. This method had a broad application for clinical diagnosis and disease surveillance in aquaculture.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; *Aeromonas salmonicida*; vapA gene; Real-time qPCR

Corresponding author: LI Shaowu. E-mail: lishaowu@hrfri.ac.cn

Funding projects: The Central-level Non-profit Scientific Research Institutes Special Funds (HSY201503); Xinjiang Uygur Autonomous Region Collaborative Innovation Project (2016E02052)