

文章编号: 1000-0615(2005)04-0473-05

应用多重 PCR 检测水生动物源气单胞菌 安徽分离株的毒力基因型分布

方 兵, 李 槿 年, 祖 国 掌, 余 为 一
(安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

摘要: 粘附素(*aha1*)、气溶素(*aerA*)和细胞兴奋性肠毒素(*alt*)是气单胞菌的主要毒力因子。根据 *aha1*、*aerA* 和 *alt* 基因序列设计三对引物建立了可同时检测三种毒力基因的多重 PCR 方法(MPCR)。该方法扩增出气单胞菌的 *aha1* 大小为 1087 bp, *aerA* 为 721 bp, *alt* 为 480 bp, 其敏感度为 10^2 CFU·mL⁻¹。而对金黄色葡萄球菌、恶臭假单胞菌、拟态弧菌以及非致病性气单胞菌均未扩增出任何条带。用限制性内切酶 *EcoRV*、*BamHI* 和 *FbaI* 分别酶切 PCR 扩增产物, 均获得与预期一致的酶切图谱。用建立的 MPCR 对 15 株水生动物源气单胞菌安徽分离株进行毒力基因检测, 结果显示在 13 株致病性气单胞菌中 10 株细菌的毒力基因型为 *alt*⁺ *aha1*⁺ *aerA*⁺, 2 株为 *alt*⁺ *aha1*⁻ *aerA*⁻, 1 株为 *alt*⁺ *aha1*⁺ *aerA*⁻; *alt*、*aha1* 和 *aerA* 基因在气单胞菌中的携带率分别为 100%、84.62% 和 76.92%。表明气单胞菌安徽分离株的主要毒力基因型是 *alt*⁺ *aha1*⁺ *aerA*⁺ 的高毒力表型, *alt* 毒力基因普遍存在于不同表型种气单胞菌中。

关键词: 多重 PCR; 水生动物源气单胞菌; 安徽分离株; 毒力基因型

中图分类号: S917 文献标识码: A

Detection of virulence genotypes distribution in Anhui isolation strains of *Aeromonas* spp. from aquatic animals by multiplex PCR

FANG Bing, LI Jin-nian, ZU Guo-zhang, YU Wei-yi

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Adhesion gene (*aha1*), aerolysin gene (*aerA*) and cytotoxic enterotoxin gene (*alt*) were considered as major virulence genes of *Aeromonas*. According to *aha1*, *aerA* and *alt* gene sequences, a multiplex polymerase chain reaction (MPCR) was developed to detect the above virulence genes simultaneously. The *aha1*, *aerA* and *alt* genes were 1 087 bp, 721 bp and 480 bp PCR products respectively. Digested with *EcoRV*, *BamHI* and *FbaI*, the sizes of digestive fragments of each PCR product were consistent with expectation. Using the same pairs, no PCR product was detected from *S. aureus*, *P. putide*, *V. minicus* and unpathogenic *Aeromonads*. The sensitivity of the MPCR was 10^2 CFU·mL⁻¹ of the bacteria. At the same time, multiplex PCR analysis was performed on 15 strains *Aeromonas* spp. isolated from different aquatic animals in Anhui and the results showed there were 10 strains with virulence genotype *alt*⁺ *aha1*⁺ *aerA*⁺, 2 strains with virulence genotype *alt*⁺ *aha1*⁻ *aerA*⁻ and 1 strain with virulence genotype *alt*⁺ *aha1*⁺ *aerA*⁻ within 13 strains pathogenic *Aeromonas* spp. The positive rates of *alt*, *aha1* and *aerA* genes were 100%, 84.62% and 76.92% respectively. These results indicate that the major virulence genotype of Anhui isolation strains is the high virulence phenotype of *alt*⁺ *aha1*⁺ *aerA*⁺ and the virulence gene *alt* generally exists in different *Aeromonas* phenospecies.

Key words: multiplex PCR; *Aeromonas* spp. from aquatic animals; Anhui isolation strains; virulence genotype

收稿日期: 2004-08-30

资助项目: 安徽省自然科学基金项目(01041206); 省高校“十五”优秀人才培养项目

作者简介: 方 兵(1975-), 男, 安徽淮南人, 硕士研究生, 主要从事分子病原微生物学研究。E-mail: fangbinghm@163.com

通讯作者: 李槿年, Tel: 0551-3388375, E-mail: lijinnian2000@163.com

气单胞菌是人、畜以及水产动物共患的常见病原菌, 不仅可引起水产动物的烂鳃病、赤皮病、穿孔病等疾病, 而且可以通过水产动物和水产品感染人畜, 引发人畜腹泻和食物(饲料)中毒^[1]。国内外学者对气单胞菌致病机理的研究结果表明该菌的致病性并非由单一毒力因子所完成, 而是由粘附素(*aha1*)、气溶素(*aerA*)和细胞兴奋性肠毒素(*alt*)等多种毒力因子共同作用, 并且毒力基因的种类及数量在不同菌株间存在差异^[2, 3]。为了解安徽省气单胞菌分离株中毒力基因的携带情况及其主要毒力基因型, 丰富分子流行病学资料, 本研究建立了可同时检测 *aha1*、*aerA* 和 *alt* 三种主要毒力基因的多重 PCR 方法, 并应用该方法对近年来从安徽省不同养殖场不同水产动物体内分离的 15 株气单胞菌进行毒力基因的检测。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

嗜水气单胞菌标准株和金黄色葡萄球菌标准株均购自中科院微生物研究所; 拟态弧菌 HX-4 菌株和恶臭假单胞菌 HX-1 菌株均由本研究室分离鉴定保存; 分离株 BA1、BA3 和 BA11 等 15 株气单胞菌(经动物试验确定 13 株为致病株, 2 株为非致病株)为本研究室从安徽省多个水产养殖场不同水产动物体内分离鉴定和保存(表 1)。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *EcoRV*、*BamHI*、*FbaI* 和 *Taq* DNA 聚合酶均为大连宝生物工程公司产品; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Bacterial Genomic DNA Mini-prep Kit)为杭州维特洁生物技术公司产品; DNA Marker DL2000 和 PCR 试剂为上海生物工程公司产品。

1.3 多重 PCR 方法的建立

引物的设计与合成 根据 GenBank 中登陆的气单胞菌毒力基因—粘附素基因(*aha1*)、气溶素基因(*aerA*)和细胞兴奋性肠毒素基因(*alt*)的全序列^[4-6], 采用 Primer Premier 5.0 软件在其开放阅读框架(ORF)内的高度保守区设计了三对引物(表 2)。各引物由上海生物技术工程公司合成。

DNA 模板提取 挑取嗜水气单胞菌标准株的典型菌落接种于 5 mL LB 培养基, 30 °C, 200 r·min⁻¹ 振荡培养 18 h, 取 1 mL 培养液置于 1.5 mL 离心管中 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 收集菌

体。采用 Bacterial Genomic DNA Mini-prep Kit 提取细菌基因组 DNA 作为 PCR 模板。

表 1 实验菌株的来源

Tab. 1 The source of experimental bacterial strains

菌株 strains	分离年份 isolated time	分离动物 isolated animals	菌株名称 bacterial names
BA1	1996	患病中华鳖 sick <i>Trionyx siliensis</i>	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>
BA3	1996	患病中华鳖 sick <i>T. siliensis</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
BA11	1996	患病中华鳖 sick <i>T. siliensis</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>
BA16	1998	患病中华鳖 sick <i>T. siliensis</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>
BA17	2001	患病中华鳖 sick <i>T. siliensis</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
BA18	2002	患病中华鳖 sick <i>T. siliensis</i>	豚鼠气单胞菌 <i>A. caviae</i>
JA23	1998	患病鲫 sick crucian carp	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>
CA1	2003	患病草鱼 sick grass carp	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>
GA1	2003	患病鳊 sick mandarin fish	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>
CA3	2004	患病草鱼 sick grass carp	气单胞菌* <i>Aeromonas</i>
JA24	2004	患病鲫 sick crucian carp	气单胞菌* <i>Aeromonas</i>
HA6	2003	患病中华绒螯蟹 sick <i>E. sinensis</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
HA7	2003	患病中华绒螯蟹 sick <i>E. sinensis</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
CA2	2003	健康草鱼 healthy grass carp	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
HSA1	2004	健康黄鳝 healthy rice field eel	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>

注: * CA3 和 JA24 二株细菌的生物学特性符合气单胞菌属的特征, 但编码鉴定未能确定其种

Notes: the biological characteristic of CA3 and JA24 strains accord with the identity of *Aeromonas*, but numerical identification cannot confirm their species

多重 PCR 反应 首先用嗜水气单胞菌标准株对多重 PCR 的条件(引物浓度配比、镁离子浓度以及退火温度等)进行了优化组合, 确立了最佳 PCR 反应体系。50 μL 反应体系中 DNA 模板 3 μL, 10 × PCR Buffer 5 μL, 10 mmol·L⁻¹ dNTPs 1 μL, 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 溶液 7 μL, *alt*、*aerA* 和 *aha1* 3 对引物(5 mmol·L⁻¹)的体积分别为 1.0、1.5 和 2.0 μL, *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, 加双蒸水至 50 μL。各成分瞬间离心混匀后置 PCR 仪中扩增, 循环条件为 94 °C 预变性 2 min, 然后 94 °C 1 min、60 °C 1 min 和 72 °C 1.5 min 重复 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物 4 °C 保存备用。

PCR 产物的鉴定 琼脂糖凝胶电泳鉴定取 3 μL PCR 产物在 0.8% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EB)上 86 V 电泳 30 min 左右,凝胶置紫外凝胶成像系统中观察结果并拍照;酶切鉴定 根据各毒力基因预期的 PCR 产物,利用 Primer

Premier5.0 软件进行酶切位点分析,确定各自合适的单一酶切位点进行酶切反应,各酶切反应成分见表 3,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中酶切 2h 后琼脂糖凝胶电泳观察。

表 2 多重 PCR 引物序列、产物长度以及 ORF 中位置

Tab. 2 Sequences of PCR primers, product sizes and location within ORF

毒力基因 virulence gene	引物 primers	引物序列(5' - 3') sequences of primers	ORF 中位置 location within ORF	产物长度(bp) product sizes
<i>aha1</i>	<i>aha1</i> -1 <i>aha1</i> -2	gcc gct aac gct gca gtg gtt tac gac cgc aga ggc tag att aga agt tgt att g	49- 1135	1087
<i>aerA</i>	<i>aerA</i> -1 <i>aerA</i> -2	tgt cgg gga tga cat gaa cgt g cca gtt cca gtc cca cca ctt ca	474- 1194	721
<i>alt</i>	<i>alt</i> -1 <i>alt</i> -2	atg acc cag tcc tgg cac gg gac gct cag gcc gaa gcc gc	1- 480	480

表 3 PCR 产物的酶切反应成分

Tab. 3 Component of enzyme digestion reaction mixtures

扩增产物 amplified product	产物长度(bp) product sizes	酶切产物(bp) products of enzyme digestion	酶 enzyme	酶切反应体系 reactive system
<i>aha1</i>	1087	409/ 678	<i>EcoR</i> V	<i>EcoR</i> V 1.0 μL 10 \times H buffer 2.0 μL PCR products 10.0 μL ddH ₂ O 7.0 μL total volume 20.0 μL
<i>aerA</i>	721	134/ 587	<i>BanH</i> I	<i>EcoR</i> V 1.0 μL 10 \times K buffer 2.0 μL PCR products 10.0 μL ddH ₂ O 7.0 μL total volume 20.0 μL
<i>alt</i>	480	327/ 153	<i>Fba</i> I	<i>EcoR</i> V 1.0 μL 10 \times K buffer 2.0 μL PCR products 10.0 μL ddH ₂ O 7.0 μL total volume 20.0 μL

1.4 多重 PCR 的特异性试验

分别对嗜水气单胞菌标准株、金黄色葡萄球菌标准株、拟态弧菌 HX-4 分离株和恶臭假单胞菌 HX-1 分离株按所建立的多重 PCR 方法进行扩增,以测定其特异性。

1.5 多重 PCR 的敏感性试验

将气单胞菌标准株接种于 LB 培养液,28 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 18 h, 8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 收集菌体,采用平板倾注法^[7]进行活菌计数。根据活菌计数结果将细菌悬液由 10⁹ CFU \cdot mL⁻¹ 稀释至 10 CFU \cdot mL⁻¹,采用常规煮沸法^[8]从各稀释度菌液中提取 DNA 模板进行多重 PCR 扩增,以测定其敏感性。

1.6 15 株气单胞菌安徽分离株的毒力基因检测

按 1.3 方法分别培养 15 株细菌和提取模板 DNA,用上述所建立的多重 PCR 方法进行 *alt*、*aerA* 和 *aha1* 扩增,确定其毒力基因型。

2 结果

2.1 PCR 产物的酶切鉴定结果

由图 1 所示,采用所建立的多重 PCR 方法对气单胞菌标准株进行粘附素基因(*aha1*)、气溶素基因(*aerA*)和细胞兴奋性肠毒素基因(*alt*)扩增,并使用凝胶回收试剂盒对其扩增产物进行回收。*aha1* 扩增产物经 *EcoR* V 酶切获得 409 和 678 bp 两个片段;*aerA* 扩增产物经 *BanH* I 酶切获得 134 和 587 bp 两个片段;*alt* 扩增产物经 *Fba* I 酶切获得 327 和 153 bp 两个片段。这些酶切片段大小与预期片段的大小均一致。

2.2 多重 PCR 的特异性试验

选取气单胞菌标准株、葡萄球菌标准株、拟态弧菌 HX-4 分离株和恶臭假单胞菌 HX-1 分离株进行多重 PCR 扩增。结果如图 2 所示,只有气单胞菌标准株同时扩增出 1 087 bp(*aha1*)、721 bp

(*aerA*) 和 480 bp(*alt*) 3 条目的基因条带, 其余测试菌均未扩增出任何条带。综合酶切鉴定的结果, 表明本研究所建立的多重 PCR 方法具有高度特异性。

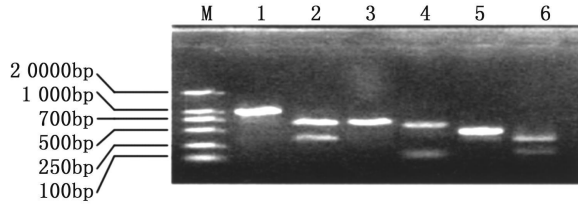


图1 气单胞菌标准株 PCR 产物的酶切鉴定结果

Fig. 1 The results of enzyme digestion for *Aeromonas* standard strain

M. DL- 2 000 Marker; 1. *aha1* PCR 产物; 2. *aha1* PCR 产物酶切; 3. *aerA* PCR 产物; 4. *aerA* PCR 产物酶切; 5. *alt* PCR 产物; 6. *alt* PCR 产物酶切

M. DL- 2 000 Marker; 1. *aha1* PCR product; 2. enzyme digested of *aha1* PCR product; 3. *aerA* PCR product; 4. enzyme digested of *aerA* PCR product; 5. *alt* PCR product; 6. enzyme digested of *alt* PCR product

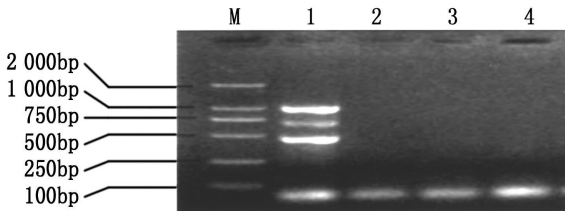


图2 气单胞菌标准株多重 PCR 的特异性试验

Fig. 2 Specificity assay of multiplex PCR for *Aeromonas* standard strain

M. DL- 2 000 Marker; 1. 气单胞菌标准株; 2. 拟态弧菌 HX- 4 菌株; 3. 恶臭假单胞菌 HX- 1 菌株; 4. 金黄色葡萄球菌

M. DL - 2 000 Marker; 1. *Aeromonas* standard strain; 2. *V. mimicus* HX- 4 strain; 3. *P. putida* HX- 1 strain; 4. *S. aureus*

2.3 多重 PCR 的敏感性试验

对不同稀释度的气单胞菌培养物进行多重 PCR 扩增。结果如图 3 所示, 所建立的多重 PCR 方法最低检出 10^2 CFU · mL⁻¹ 菌的 *aha1*、*aerA* 和 *alt* 3 种毒力基因。

2.4 15 株气单胞菌安徽分离株的毒力基因检测

15 株气单胞菌安徽分离株中 2 株非致病菌未扩增出任何毒力基因条带(图 4、表 4)。

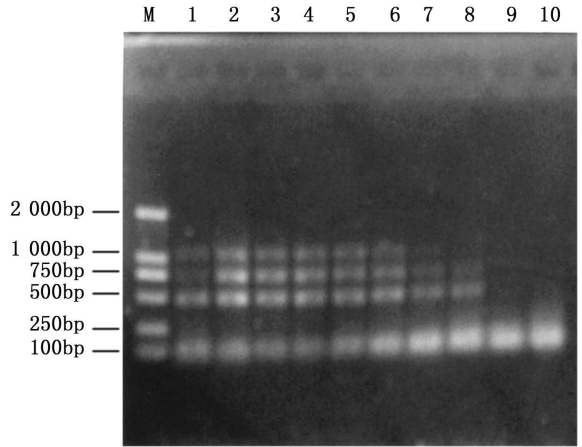


图3 气单胞菌标准株多重 PCR 的敏感性试验

Fig. 3 Sensitivity assay of multiplex PCR for *Aeromonas* standard strain

M. DL- 2 000 Marker; 1- 10. 细菌个数分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10 和 1

M. DL- 2 000 Marker; 1- 10. the number of bacterial cells is 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10 and 1 respectively

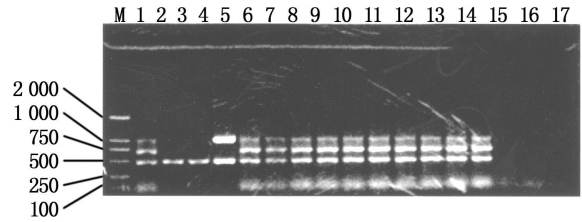


图4 15 株气单胞菌的多重 PCR 检测结果

Fig. 4 Detective results of virulence gene for 15 *Aeromonas* strains by multiplex PCR

M. DL- 2 000 Marker; 1. 气单胞菌标准株; 2. CA1; 3. BA16; 4. HA6; 5. BA1; 6. BA3; 7. BA11; 8. BA17; 9. BA18; 10. JA23; 11. JA24; 12. GA1; 13. HA7; 14. CA3; 15. CA2; 16. HSA1; 17. 拟态弧菌 HX- 4 菌株

M. DL- 2 000 Marker; 1. *Aeromonas* standard strain; 2. CA1; 3. BA16; 4. HA6; 5. BA1; 6. BA3; 7. BA11; 8. BA17; 9. BA18; 10. JA23; 11. JA24; 12. GA1; 13. HA7; 14. CA3; 15. CA2; 16. HSA1; 17. *V. mimicus* HX- 4 strain

13 株致病性气单胞菌均扩增出数量不等的毒力基因条带, 它们分布于三个不同的毒力基因型。其中 CA1 和 BA16 二株细菌的毒力基因型为 *alt*⁺ *aha1*⁻ *aerA*⁻, 占 15.38%; HA6 菌株的毒力基因型为 *alt*⁺ *aha1*⁺ *aerA*⁻, 占 7.69%; 其余 10 株气单胞菌的毒力基因型均为 *alt*⁺ *aha1*⁺ *aerA*⁺, 占 76.92%。*alt*、*aha1* 和 *aerA* 毒力基因在 13 株致病性气单胞菌中的携带率分别为 100%、84.

62% 和 76.92%。表明气单胞菌安徽分离株的主要毒力基因型是 $alt^+ aha1^+ aer A^+$ 的高毒力表型, alt 毒力基因广泛存在于不同表型种气单胞菌中。

表 4 13 株致病性气单胞菌的毒力基因型分布

Tab. 4 Virulence genotypes distribution of 13 pathogenic *Aeromonas* strains

菌株 strains	表型种 phenospecies	毒力基因型 virulence genotypes
BA1	<i>A. hydrophila</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^+$
BA3	<i>A. hydrophila</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^+$
BA11	<i>A. sobria</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^+$
BA17	<i>A. hydrophila</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^+$
BA18	<i>A. caviae</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^+$
JA23	<i>A. sobria</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^+$
GA1	<i>A. sobria</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^+$
HA7	<i>A. hydrophila</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^+$
CA3	<i>Aeromonas</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^+$
JA24	<i>Aeromonas</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^+$
HA6	<i>A. hydrophila</i>	$alt^+ aha1^+ aer A^-$
CA1	<i>A. sobria</i>	$alt^+ aha1^- aer A^-$
BA16	<i>A. sobria</i>	$alt^+ aha1^- aer A^-$

3 讨论

由于气单胞菌表型种多,生化反应较复杂,采用常规细菌学方法鉴定气单胞菌费时费力,并且准确率不高。而我们建立的多重 PCR 方法在 12 h 内即可从病料中或分离菌中检测出一种或任何组合的毒力基因,特异性强,敏感度高达 10^2 CFU \cdot mL $^{-1}$ 。因此,该方法在气单胞菌病的早期诊断和分子流行病学调查中具有应用价值。

多重 PCR 的特异性与敏感性取决于一系列参数^[9],试验中我们对三对引物浓度配比(1:1:1;

1:1.5:1.5; 1:1.5:2)、反应体系中 Mg^{2+} 浓度(2.5 mmol \cdot L $^{-1}$; 3.0 mmol \cdot L $^{-1}$; 3.5 mmol \cdot L $^{-1}$; 4.0 mmol \cdot L $^{-1}$)和退火温度(56 $^{\circ}$ C; 58 $^{\circ}$ C; 60 $^{\circ}$ C; 62 $^{\circ}$ C)等关键参数进行了优化组合。虽然优化后的多重 PCR 方法可特异性扩增出三条目的基因条带,但电泳图谱显示仍存在引物二聚体,尚有待于通过进一步优化试验条件来消除。

参考文献

- [1] 王增福,谢红梅,张 静. 水产动物嗜水气单胞菌病的研究进展[J]. 水利渔业, 2002, 22(2): 18- 19.
- [2] 朱大玲,李爱华,钱 东,等. 嗜水气单胞菌毒力基因的研究进展[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1): 80- 84.
- [3] Sechi L A, Deriu A, Falchi M P, et al. Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea[J]. Applied Microbiology, 2002, 92: 221 - 227.
- [4] Fang H M, Ge R, Sin Y M. Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16(5): 645- 658.
- [5] Husslein V, Huhle B, Jarchau T, et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *aerC aerA* region of *Aeromonas sobria* encoding aerolysin and its regulatory region [J]. Mol Microbiol, 1988, 2(4): 507- 517.
- [6] Chopra A K, Peterson J W, Xu X J, et al. Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila* [J]. Microb Pathog, 1996, 21(5): 357- 377.
- [7] 沈 萍,范秀容,李光武,等. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [8] 姜 泊,张亚历,周殿元,等. 分子生物学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1996.
- [9] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. Biol Tech, 1997, 23(3): 504- 511.