

嗜水气单胞菌菌落多重 PCR 方法的建立及应用

张静^{1,2}, 王永杰^{*1,2}, 陈红莲^{1,2}, 鲍俊杰^{1,2}, 孙雯^{1,2}

1 安徽省农业科学院水产研究所, 安徽 合肥 230031

2 水产增养殖安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230031

张静, 王永杰, 陈红莲, 鲍俊杰, 孙雯. 嗜水气单胞菌菌落多重 PCR 方法的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 841-850

Zhang Jing, Wang Yongjie, Chen Honglian, Bao Junjie, Sun Wen. Establishment and application of colony multiplex PCR for *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 841-850

摘要:【背景】嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)对水产动物、畜禽和人类均有致病性。基因表达的溶血素、气溶素和肠毒素是重要毒力因子, 在致病性嗜水气单胞菌早期检测及防治中尤为重要。目前采用菌落直接提取 DNA 用于多重 PCR 研究的相关报道较少。【目的】基于菌落 PCR 方法建立针对嗜水气单胞菌溶血性基因、肠毒素基因和 16S rRNA 基因特异性片段(5 个基因片段)的多重 PCR 快速检测方法。【方法】采用选择性 RS (Rimler-Shotts)培养基对样品中嗜水气单胞菌有效富集分离和辨认, 建立并优化嗜水气单胞菌 16S rRNA、*ast*、*alt*、*aerA*、*act* 这 5 个基因的多重 PCR 方法, 比较菌落 PCR 中 DNA 模板不同提取方法对多重 PCR 扩增结果的影响, 并检测该方法对维氏气单胞菌、温和气单胞菌、杀鲑气单胞菌的特异性。【结果】通过对 RS 培养基上单菌落的 16S rRNA 基因鉴定, 初步判定嗜水气单胞菌和其他可培养菌的菌落形态, 对其富集程度进行可视化辨别。多重 PCR 反应体系优化结果显示, 引物浓度最优配比为 16S rRNA:*ast*:*alt*:*aerA*:*act*=1:2:2:3:4。菌落 PCR 结果显示, 新鲜菌液采用煮沸冷冻离心法和煮沸离心法均能扩增出清晰条带, 采用单菌落处理则需煮沸冷冻离心法。该多重 PCR 方法具有特异性。【结论】利用菌落多重 PCR 可以不通过试剂盒抽提获得 DNA 模板, 简便、直观地检测嗜水气单胞菌及其毒力基因, 具有特异性。

关键词: 多重 PCR; 嗜水气单胞菌; 菌落 PCR; 毒力基因

基金项目: 安徽省农业科学院科研团队计划项目(18C0513); 安徽省重点研究和开发计划项目(201904f06020021)

Supported by: Scientific Research Team Program of Anhui Academy of Agricultural Sciences (18C0513); Key Research and Development Program of Anhui Province (201904f06020021)

*Corresponding author: E-mail: hfwangyongjie@163.com

Received: 2021-07-16; Accepted: 2021-08-08; Published online: 2021-11-12

Establishment and application of colony multiplex PCR for *Aeromonas hydrophila*

ZHANG Jing^{1,2}, WANG Yongjie^{*1,2}, CHEN Honglian^{1,2}, BAO Junjie^{1,2}, SUN Wen^{1,2}

1 Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, Anhui, China

2 Key Laboratory of Aquaculture & Stock Enhancement for Anhui Province, Hefei 230031, Anhui, China

Abstract: **[Background]** *Aeromonas hydrophila* is pathogenic to aquatic animals, livestock, poultry, and human. Hemolysin, aerolysin, and enterotoxin are major virulence factors particularly important in the early detection and prevention of *A. hydrophila*. There are few reports using colony PCR to extract templates for multiplex PCR. **[Objective]** Based on colony PCR, a multiplex PCR assay was established for rapid detection of five genes including hemolysin gene, enterotoxin gene, and 16S rRNA gene of *A. hydrophila*. **[Methods]** We used the selective Rimler-Shotts (RS) medium to enrich, isolate, and identify *A. hydrophila* in the sample. Subsequently, we established and optimized the multiplex PCR conditions for the 16S rRNA, *ast*, *alt*, *aerA*, and *act* of *A. hydrophila* and compared the results of multiplex PCR with the DNA templates extracted by different methods in colony PCR. Finally, we evaluated the specificity of the established method by using *A. veronii*, *A. sobria* and *A. salmonicida*. **[Results]** After 16S rRNA identification of single colonies on RS plates, the colony morphology of *A. hydrophila* and other cultivable bacteria was preliminarily characterized, and the enrichment degree of *A. hydrophila* was visually identified. The optimization results of the multiplex PCR system showed that the optimal primer concentration ratio was 16S rRNA:*ast*:*alt*:*aerA*:*act*=1:2:2:3:4. PCR for fresh bacterial liquids treated with both boiling-refrigerated centrifugation method and boiling-centrifugation method could produce clear bands, while the PCR of single colony required the former method. The established multiplex PCR method was specific. **[Conclusion]** Colony multiplex PCR can be used to easily and intuitively detect *A. hydrophila* and its virulence genes without the need of kit extraction of DNA templates, and it was specific.

Keywords: multiplex PCR; *Aeromonas hydrophila*; colony PCR; virulence gene

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种广泛存在于水环境的常见病原菌,该菌呈全球性分布,主要出现在淡水、海洋,特别是河口的水生环境,对水产动物、畜禽和人类均有致病性,是一种典型的人-兽-鱼共患病病原。该菌是引起鱼类运动性气单胞菌败血症(motile *Aeromonas* septicemia, MAS)的主要病原体,20世纪80年代以来,我国南方各省淡水养殖鱼类流行暴发性传染病,很多报道认为系该菌所致^[1-3]。2009年美国东南部的MAS暴发,造成斑点叉尾鲷全行业的亏损^[4-5]。这种疾病已日

益突出地制约水产养殖业快速发展。

嗜水气单胞菌是一种条件致病菌,毒力因子众多,存在不同的毒力基因型,有强毒株也有弱毒株,外毒素是重要的致病因子。以往对嗜水气单胞菌的多重PCR研究多围绕毒力基因和16S rRNA基因特异性片段开展,但采用的毒力基因种类和引物数量各不相同,如符贵红等^[6]对溶血素(hemolysin, *hlyA*)、细胞肠兴奋性肠毒素(intestinal cells of excitatory enterotoxin, *act*)、细胞毒性肠毒素(cytotoxic enterotoxin, *alt*)、气溶素(aerolysin, *aer*)和胞外蛋白酶

(extracellular protease, *ahp*)这 5 个毒力基因进行了多重 PCR 扩增研究,余文杰^[7]对 *aerA*、胞外溶血素(extracellular hemolysin, *ahh1*)这 2 个毒力基因和 16S rRNA 基因开展了三重 PCR 研究,韦信贤等^[8]对丝氨酸蛋白酶(serine protease, *ahpA*)、*aerA*、*hlyA* 和 16S rRNA 基因进行了四重 PCR 检测,凌空等^[9]对大鲵致病性嗜水气单胞菌的外膜蛋白(outer membrane proteins, *omps*)、*hlyA*、丝氨酸蛋白酶 *ahpA* 和 16S rRNA 基因进行了四重 PCR 扩增研究,他们的研究结果说明采用多重 PCR 是切实有效的检测手段。本研究主要选用溶血性基因、肠毒素基因和 16S rRNA 基因特异性片段进行多重 PCR 扩增,利用选择性培养基对样品中的嗜水气单胞菌进行富集分离和辨认,采用菌落直接提取 DNA 的方法代替 DNA 试剂盒抽提,提高对嗜水气单胞菌检测的快捷性和检出率,降低试验费用,以期为流行病学调查提供快捷、简便的检测手段。

1 材料与方 法

1.1 样品

嗜水气单胞菌 J6G03、J2K05、J5L09、J1K01-J1K12 于 2019 年从铜陵、合肥地区 2 个养殖基地的患细菌性败血症异育银鲫(*Carassais auratus gibeio*)体内分离纯化、鉴定并保存。气单胞菌属杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*) G1I01、Y1L07, 维氏气单胞菌(*A. veronii*) IPR6、IPR10, 温和气单胞菌(*A. sobria*) Y1L01 均为本实验室保存。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

胰酪大豆琼脂 TSA、胰酶大豆肉汤 TSB、RS 琼脂培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。*Taq* 酶, TaKaRa 公司;引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 仪,

耶拿分析仪器公司。

1.3 菌株分离纯化和 16S rRNA 基因鉴定

无菌操作取患细菌性败血症异育银鲫的肝、肾、肠道、腹水和环境水样品等,取等量分别涂布于 TSA 和 RS 培养基,肠道样品可进行梯度稀释,置于 28 °C、120 r/min 培养过夜。挑取 RS 培养基上单个菌落转接到 TSB 液体培养基,28 °C、120 r/min 培养过夜至菌液浓度为 10⁸ CFU/mL,取适量菌液作为 PCR 反应体系的模板,用于 16S rRNA 基因鉴定。

16S rRNA 基因鉴定方法:16S rRNA 基因 PCR 扩增的引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCT TGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μL): 无菌蒸馏水 37.5 μL, 10×Buffer (含 2 mmol/L MgCl₂) 5 μL, 4×dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL, 正、反向引物(20 μmol/L)各 1 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 0.5 μL, 菌液 1 μL。PCR 反应条件: 94 °C 10 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应结束后进行 1%琼脂糖凝胶电泳,将检测为阳性的 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将测序结果通过 NCBI 的 BLAST 检索系统进行序列同源性比对。

1.4 嗜水气单胞菌单个毒力基因 PCR 温度梯度扩增

将供试嗜水气单胞菌接种到 TSB 中培养过夜后取菌液直接作为 DNA 模板,通过 PCR 仪自动生成 5 个退火温度,对所有引物逐一进行梯度温度 PCR 扩增(表 1),以确定每个引物的最佳退火温度。PCR 反应体系(25 μL): 无菌蒸馏水 18.8 μL, 10×Buffer (含 2 mmol/L MgCl₂) 2.5 μL, 4×dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μL, 正、反向引物(20 μmol/L)各 0.5 μL, *Taq* 酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 新鲜菌液 0.5 μL。PCR 反应条

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

Target genes	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)	Annealing temperature (°C)	References
<i>act</i>	F: GAGAAGGTGACCACCAAGAACA R: AACTGACATCGGCCTTGAAGCTC	232	42	[10-11]
<i>aerA</i>	F: AACCGAACTCTCCAT R: CGCCTTGTCTTGTGTA	301	54	[11-12]
<i>ast</i>	F: TCGTCAGCGACAGCTTCTT R: CTCATCCCTTGGCTTGTGT	504	56	[13]
<i>alt</i>	F: TGACCCAGTCTGGCACGGC R: GGTGATCGATCACCACCAGC	442	60	[10,11,14]
<i>hlyA</i>	F: GGCCGGTGGCCGAAGATACGGG R: GGCGGCGCCGGACGAGACGGGG	597	65	[14-17]
16S rRNA	F: GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA R: CGTGCTGGCAACAAAGGACAG	685	60	[18]

件: 94 °C 10 min; 94 °C 1 min, 分别在 5 个设定温度下退火 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应结束后进行 1%琼脂糖凝胶电泳。

1.5 多重 PCR 方法的建立与优化

根据 1.4 结果选定嗜水气单胞菌 16S rRNA 基因特异性片段和毒素基因 *ast*、*alt*、*aerA*、*act* 进行多重 PCR, 退火温度为 50 °C。多重 PCR 反应体系优化方案为: 选择 25 μL 反应体系, 设计 3 组不同引物配比, 使 16S rRNA:*ast*:*alt*:*aerA*:*act* 的浓度比分别为 1:2:2:3:4、1:2:2:2:3、1:1:1:2:3, 设定 *Taq* 酶为 0.3、0.4、0.5 μL, 总引物(提前将所有基因的上下游引物按比例混匀)为 3、4、5 μL, 延伸时间设定为 1、2、3 min, 循环次数设定为 30。以电泳条带最亮、不产生非特异性扩增、引物二聚体最少为优化指标。

1.6 菌落、菌液不同处理方式提取 DNA 模板

选择实验室分离嗜水气单胞菌菌株 J6G03、J2K05、J5L09 作为供试菌株, 从同一 RS 培养基上挑取大小一致的单菌落, 通过处理作为菌落 PCR 模板, 同时转接 TSB 培养基 28 °C 培养过夜至菌液浓度为 10⁸ CFU/mL, 通过处理作为菌液 PCR 模板。对菌落、菌液分别采取 3 种处

理方式: (1) 直接 PCR 仪加热法: 挑菌落悬浮于 60 μL 无菌水, 取适量作为模板, 采用 PCR 仪进行 95 °C 加热 10 min 前处理, 接着进入 PCR 程序; (2) 煮沸离心法: 挑菌落于 60 μL 无菌水悬浮, 沸水浴 20 min, 10 000 r/min 离心 1 min, 取适量上清作为模板; (3) 煮沸冷冻离心法: 挑取菌落悬浮于 60 μL 无菌水中, 沸水浴 20 min, 之后迅速放置于 -20 °C 冰冻, 室温融化后 10 000 r/min 离心 1 min, 取适量上清作为模板。

1.7 特异性评价

用建立的多重 PCR 方法检测维氏气单胞菌 (IPR6、IPR10)、温和气单胞菌 (Y1L01)、杀鲑气单胞菌 (G1I01、Y1L07) 和嗜水气单胞菌 (J6G03、J5L09、J2K05), 以评价该方法的特异性, 扩增出 16S rRNA 基因和 4 个毒力基因中的任意 1 个且不出现多条非特异性扩增条带即判为阳性, 否则为阴性。

2 结果与分析

2.1 RS 培养基鉴定结果

通过对 RS 培养基上各种颜色形态的单菌落进行 16S rRNA 基因鉴定, 气单胞菌属常见种类为嗜水气单胞菌和维氏气单胞菌, 嗜水气单胞菌菌落直径偏小 (<1 mm), 培养到 24 h 以

上, 菌落由黄色转蓝黑色; 维氏气单胞菌菌落直径较嗜水气单胞菌大, 约为 1–2 mm, 在挑取过程中出现拉丝现象, 部分维氏气单胞菌呈黄色, 部分维氏气单胞菌呈黄色带黑色中心。通过该方法还分离了在 RS 培养基上可培养的除气单胞菌外的其他菌株, 具体特征见表 2。同时对比 TSA 和 RS 培养基菌落富集状况, 可以初步判定嗜水气单胞菌是否为优势菌。

2.2 单个毒力基因温度梯度 PCR 结果

对嗜水气单胞菌单个毒力基因分别进行温度梯度 PCR, 结果显示, *hlyA* 在 50–60 °C 均出现非特异性条带, 温度越高非特异性条带越少; *alt* 在 50–60 °C 电泳条带均清晰; *act* 在 45–55 °C 随着温度升高条带逐渐变淡至消失; 16S rRNA 基因和 *aerA* 进行 50–60 °C 温度梯度双重 PCR 显示, 随着温度升高, *aerA* 条带逐渐变淡至消失; *ast* 在 50–60 °C 电泳条带均清晰。因为 *hlyA* 在 50–60 °C 出现非特异性条带, 不适宜被选用为多重 PCR 引物, 而 16S rRNA、*alt*、*aerA*、*ast*、*act* 在 50 °C 均呈现清晰扩增条带, 并且不产生特异性扩增, 因此选择 16S rRNA、*alt*、*aerA*、*ast*、*act* 基因进行多重 PCR 检验。

2.3 多重 PCR 条件优化结果

多重 PCR 反应体系(25 μL): 10×Buffer (含 2.5 mmol/L Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μL, 总引物 4 μL (浓度比 16S

rRNA:*ast*: *alt*:*aerA*:*act*=1:2:2:3:4, 上下游引物按比例提前混匀, 可–20 °C 保存一段时间), *Taq* 酶(5 U/μL) 0.4 μL, DNA 模板 0.5 μL, 用 DEPC 水补足至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。多重 PCR 优化试验结果显示, 5 条目的基因条带在此反应条件下最清晰(图 1)、均一性最好、扩增效率最高, 因此为多重 PCR 最佳反应条件。

2.4 菌落和菌液不同模板处理方式对 PCR 结果的影响

比较 3 株嗜水气单胞菌的菌落和菌液 3 种不同处理方式对多重 PCR 扩增的影响, 结果显示, 采用新鲜菌液和菌落进行煮沸冷冻离心法(图 2 中 1–6)处理的 3 株嗜水气单胞菌多重 PCR 均能扩增出清晰条带; 采用直接 PCR 仪加热(图 2 中 7–12)直接处理菌落和新鲜菌液的多重 PCR 扩增条带显示度最弱; 煮沸离心法(图 2 中 13–15)中采用菌液提取模板均能扩增出清晰条带, 而采用菌落提取模板(图 2 中 16–18)扩增效果不稳定。

同时还对嗜水气单胞菌 RS 培养基上的单菌落和 TSB 保存菌液在 4 °C 冷藏下保存时长进行检验, 发现 7 d 内的菌落其多重 PCR 扩增均产生清晰的电泳条带, 而保存超过 3 d 的菌液其多重 PCR 扩增结果易出现不均一性。

表 2 各革兰氏阴性菌在 RS 培养基上的菌落特征

Table 2 Colony characteristics of Gram-negative bacteria on RS medium

Strains	Colony color characteristics
<i>Aeromonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas</i>	Yellow. Some <i>Aeromonas hydrophila</i> will change from yellow to blue-black in culture for more than 24 hours
<i>Citrobacter</i> , <i>Aeromonas veronii</i>	Yellow with black centre
<i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Salmonella</i>	The entire colony is pale blue
<i>Edwardsiella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Citrobacter</i>	Blue with black centre

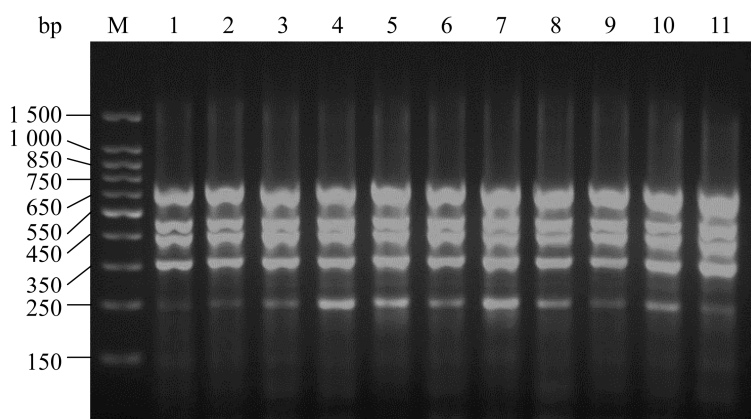


图 1 多重 PCR 电泳图

Figure 1 Multiplex PCR electropherogram. M: DNA Marker J; 1-11: J1K01-J1K12.

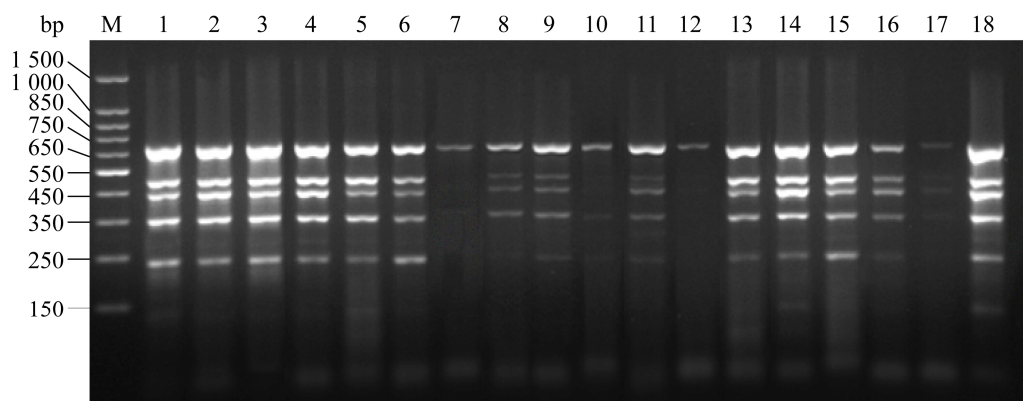


图 2 菌液和菌落不同处理方法的多重 PCR 结果 M: DNA 标准品 Marker J; 1-3: 菌液煮沸冷冻离心法; 4-6: 菌落煮沸冷冻离心法; 7-9: 菌液直接 PCR 仪加热法; 10-12: 菌落直接 PCR 仪加热法; 13-15: 菌液煮沸离心法; 16-18: 菌落煮沸离心法

Figure 2 Multiplex PCR results of different processing methods of bacterial liquid and colony. M: DNA Molecular Weight Standard Marker J; 1-3: Bacterial liquid boiling refrigerated centrifugation method; 4-6: Colony boiling refrigerated centrifugation method; 7-9: Bacterial liquid PCR instrument heating method directly; 10-12: Colony PCR instrument heating method directly; 13-15: Bacterial liquid boiling centrifugal method; 16-18: Colony boiling centrifugal method.

2.5 多重 PCR 特异性分析

特异性检测试验结果表明, 只有嗜水气单胞菌菌株 J6G03、J5L09、J2K05 的多重 PCR 扩增结果(图 3)出现与其单基因扩增相对应片段大小的特异性条带, 而检测实验室保存的气单胞菌属其他菌株杀鲑气单胞菌、维氏气单胞菌、温和气单胞菌时均未扩增出目标片段, 而且出

现非特异性扩增, 结果表明该多重 PCR 检测方法具有特异性。

3 讨论与结论

嗜水气单胞菌不但给水产养殖业造成了巨大的经济损失, 还威胁着人类的健康, 因此, 快速、准确地诊断对该病原菌的防治具有重要

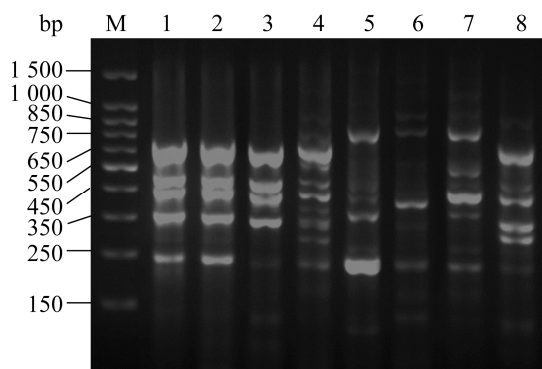


图3 多重 PCR 特异性结果

Figure 3 The specificity of multiple PCR. M: DNA Molecular Weight Standard Marker J; 1-8: J6G03, J5L09, J2K05, G1I01, IPR10, Y1L01, IPR6, Y1L07.

意义。与传统的细菌分离鉴定方法相比,分子生物学方法具有快捷、准确等优点,适用于病原快速诊断和流行病学定性调查。常用分子生物学检测手段包括实时荧光定量 PCR、loop-mediated isothermal amplification (LAMP)、多重 PCR 等。实时荧光定量 PCR 对仪器要求较高,试验费用较贵,对引物要求也较高,引物二聚体的产生对试验结果影响较大,一般多用 2-3 对引物进行试验,限制了多重引物使用^[19]。LAMP 技术虽然对仪器的要求低,可视觉直观检测,但其突出的问题就是无法做多重扩增,仅限于二三个靶点,再多难度就非常大。嗜水气单胞菌毒力因子众多,存在多种毒力基因型,实时荧光定量 PCR 和 LAMP 技术无法满足对其多个基因扩增的需求,并且攻毒试验检验菌株致病力耗时较长。本研究建立在对嗜水气单胞菌选择性富集分离基础上,采用多重 PCR 对其多个关键毒力基因和 16S rRNA 基因特异性引物进行扩增,可同时做分类鉴定和毒力基因鉴定,不经过试剂盒抽提获得目标菌株 DNA 模板,缩短了模板提取步骤,节省了实验费用。

首先采用 RS 培养基对嗜水气单胞菌进行

分离纯化。根据文献和项目组多次试验结果显示,RS 培养基对嗜水气单胞菌的分离率不高,普遍出现假单胞菌、爱德华氏菌、柠檬酸杆菌等常见病原微生物。Jenkins 等研究发现 RS 对除气单胞菌以外的其他细菌抑制率为 20%^[20],但 RS 培养基更适用于严重污染病料或腹泻动物粪便等样品中嗜水气单胞菌的分离^[1]。通过 16S rRNA 基因测序比对辨认 RS 上可培养的细菌菌落形态,鉴定结果显示,嗜水气单胞菌菌落直径偏小呈黄色,培养 24 h 以上,菌落由黄色转蓝黑色。RS 培养基中加入抑制剂脱氧胆酸钠和新生霉素,以消除革兰氏阳性菌和弧菌,菌落颜色变化主要是因为嗜水气单胞菌在 RS 培养基上发酵麦芽糖,使 pH 值显酸性,随后将溴麝香草酚蓝变成黄色,由黄转蓝或蓝黑色主要是因为对硫代硫酸钠或 L-半胱氨酸盐酸盐或两者同时利用产生硫化氢,并利用柠檬酸铁铵使该反应可视化^[21]。

嗜水气单胞菌的毒力基因研究是非常广泛且深入的,基因表达的溶血素、气溶素、肠毒素对宿主的破坏力非常强,所以对于毒力嗜水气单胞菌的早期预测及防治变得尤为重要^[16]。嗜水气单胞菌产生的毒素主要包括气溶素 AerA、细胞毒性肠毒素 Act、热稳定细胞兴奋性肠毒素 Ast、热不稳定细胞兴奋性肠毒素 Alt、胞外溶血素 Ahhl、溶血素 HlyA 等,目前研究较多的有气溶素、溶血素、细胞毒性肠毒素及细胞兴奋性肠毒素^[22]。act 具有溶血性、细胞毒性、肠毒性,活性毒素与靶细胞表面的糖蛋白结合并寡聚化,在宿主细胞膜上形成孔,导致细胞死亡^[23]。aer 与 act 产生的毒素性质十分相似,都具有溶血性、细胞毒性、肠毒性,该基因编码的气溶素 Aer 是细胞通道形成毒素,两者有 73.1%–96.9%的相似性,可能因为种间差异,导致基因水平和毒素性质有些微小的差异^[24]。

细胞兴奋性肠毒素分为兴奋性肠毒素 Alt 和兴奋性肠毒素 Ast, 有不同的分子量和对胆汁抗毒素的不同反应^[22]。Alt 蛋白质序列与磷脂酶 C 的 C 端有 45%–51% 的相似性, 纯化的 Alt 能使中国仓鼠卵母细胞延长, 引起鼠肠液积聚, 用同源的气溶素单克隆抗体中和细胞毒素活性后在细菌培养滤过物中仍能检测到肠毒素活性^[16], 而 Ast 会刺激大鼠小肠中的液体分泌并增加粘膜细胞中的 cAMP 水平^[25]。储卫华等针对嗜水气单胞菌 16S rRNA 基因保守区内的可变区设计特异性引物, 实现了对嗜水气单胞菌特异性的扩增^[18]。通过对溶血性基因、肠毒素基因和嗜水气单胞菌 16S rRNA 基因特异性片段进行多重 PCR 扩增, 可达到同时鉴定嗜水气单胞菌和毒素基因的目的。

退火温度是影响 PCR 特异性的一个主要因素, 退火温度越高特异性越强, 为了保证单个毒力基因的特异性, 兼顾条带扩增成功及其亮度, 最后确定最佳退火温度为 50 °C。通过预实验分别在 5 对引物间进行三重、四重 PCR, 最终确定五重 PCR 引物配比方案。重点对 5 对引物组合比、延伸时间、酶添加量、引物用量进行了优化, 产生了目标片段扩增效率高、均一性好的清晰条带。通过比较发现, 多重 PCR 扩增条件中引物合理配比是关键, 多重 PCR 反应体系酶量为单管酶量的 2 倍, 需保证足够的延伸时间。

有研究报道菌落 PCR 提取 DNA 作为模板可用于常规单 PCR 程序^[26-28], 也有用于毒素型产气荚膜梭菌的多重 PCR^[29-30], 对嗜水气单胞菌毒素基因和 16S rRNA 基因特异性片段进行多重 PCR 尚未见报道。为了缩短检测流程、节省实验成本, 本实验不用试剂盒抽提 DNA 模板, 直接以菌体加热、冻解和离心后的 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增。实验比较了煮沸冷冻

离心法、煮沸离心法和直接 PCR 仪加热法对多重 PCR 扩增结果的影响。由于新鲜菌液培养需分离纯化得到单菌落后再进行培养过夜, 增加了实验步骤, 因此同时比较了分别从 TSB 培养的新鲜菌液和 RS 平板培养的单菌落提取的 DNA 作为模板对多重 PCR 扩增的影响。结果显示, 新鲜菌液采用煮沸冷冻离心法和煮沸离心法均能扩增出清晰条带, 如若采用单菌落进行多重 PCR 扩增出清晰条带则需煮沸冷冻离心法。菌落多重 PCR 节约了时间和实验成本, 降低了对仪器设备和操作的要求, 是一种可用于致病性嗜水气单胞菌定性检测的经济快捷的好方法。

REFERENCES

- [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
Lu CP. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it[J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(3): 282-288 (in Chinese)
- [2] 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
Yang SM, Wang MS. *Aeromonas hydrophila* and its pathogenesis to humans[J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2006, 10(5): 511-514 (in Chinese)
- [3] 沈锦玉. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2008, 27(1): 78-86
Shen JY. Research progresss on *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University: Natural Science, 2008, 27(1): 78-86 (in Chinese)
- [4] Pridgeon JW, Klesius PH. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 94(3): 249-253
- [5] Hossain MJ, Sun DW, McGarey DJ, Wrenn S, Alexander LM, Martino ME, Xing Y, Terhune JS, Liles MR. An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish[J]. mBio, 2014, 5(3): 1-7
- [6] 符贵红, 肖丹, 胡鲲, 杨先乐. 鲫源嗜水气单胞菌毒力基因多重 PCR 检测及 ERIC-PCR 分子分型[J]. 海洋渔业, 2014, 36(6): 549-556

- Fu GH, Xiao D, Hu K, Yang XL. Multiplex PCR and ERIC-PCR genotype in virulence genes of *Aeromonas hydrophila* in Crucian carp[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(6): 549-556 (in Chinese)
- [7] 余文杰. 多重 PCR 技术检测食用鱼类产品中 β -溶血性嗜水气单胞菌毒性基因研究[J]. 现代农业科技, 2019(11): 217-218, 225
- Yu WJ. Multiplex PCR detection of haemolysin genes in β -haemolytic *Aeromonas hydrophila* strains isolated from edible fish product[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2019(11): 217-218, 225 (in Chinese)
- [8] 韦信贤, 杨先乐, 童桂香, 吴祥庆, 谢宗升, 黄国秋, 廖永志, 叶欣宇, 黎小正. 四重 PCR 检测致病性嗜水气单胞菌[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(6): 587-593
- Wei XX, Yang XL, Tong GX, Wu XQ, Xie ZS, Huang GQ, Liao YZ, Ye XY, Li XZ. Detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila* by quadruple PCR[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29(6): 587-593 (in Chinese)
- [9] 凌空, 丁诗华, 金娟, 吴兴镇. 一种检测大鲵致病性嗜水气单胞菌的四重 PCR 法[J]. 生物技术通报, 2014(9): 201-207
- Ling K, Ding SH, Jin J, Wu XZ. Detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila* in *Andrias davidianus* by quadruple PCR[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(9): 201-207 (in Chinese)
- [10] 熊静, 赖晓健, 余钦, 郭松林, 徐继松, 黄文树. 7 株鳃鲃致病性气单胞菌毒力基因胞外产物及其活性比较[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(1): 76-85
- Xiong J, Lai XJ, Yu Q, Guo SL, Xu JS, Huang WS. Analysis of virulence genes, extracellular products and activities among seven *Aeromonas* strains isolated from eels[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2017, 36(1): 76-85 (in Chinese)
- [11] 胡萌. 江苏地区气单胞菌分离鉴定及强毒株生物学特性分析[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2012
- Hu M. Isolation and identification of *Aeromonas* from Jiangsu and characterizations of virulent strains[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [12] 范腾飞. 气单胞菌的毒力基因检测及环境因子对毒力基因表达的影响[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2013
- Fan TF. Detection of virulence genes in *Aeromonas* strains and the influence of environmental factors on virulence genes expression[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2013 (in Chinese)
- [13] 付乔芳, 邱军强, 胡鲲, 杨先乐, 安健. 嗜水气单胞菌国内分离株的毒力因子分布与致病性相关性分析[J]. 生物学杂志, 2011, 28(6): 53-57
- Fu QF, Qiu JQ, Hu K, Yang XL, An J. The analyse of virulence factors-pathogenicity relationships of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from China[J]. Journal of Biology, 2011, 28(6): 53-57 (in Chinese)
- [14] 王一娟. 江苏地区大宗淡水鱼养殖池塘气单胞菌分离、鉴定和遗传多样性研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2010
- Wang YJ. Studies on isolation, Identification&Genetic diversity of *Aeromonas* from conventional freshwater fish ponds in Jiangsu Province[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese)
- [15] Wong CYF, Heuzenroeder MW, Flower RLP. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model[J]. Microbiology: Reading, England, 1998, 144(Pt2): 291-298
- [16] 朱大玲. 嗜水气单胞菌毒力基因及基因工程疫苗[D]. 武汉: 中国科学院研究生院(水生生物研究所)博士学位论文, 2006
- Zhu DL. The virulence genes and genetic engineering vaccines of *Aeromonas hydrophila*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Sciences (Institute of Hydrobiology), 2006 (in Chinese)
- [17] Cascón A, Fregeneda J, Aller M, Yugueros J, Temprano A, Hernanz C, Sánchez M, Rodríguez-Aparicio L, Naharro G. Cloning, characterization, and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(1): 49-59
- [18] 储卫华, 陆承平. PCR 扩增特异性 16SrDNA 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
- Chu WH, Lu CP. PCR detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila* by specific 16S rDNA and aerolysin gene[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 79-82 (in Chinese)
- [19] 高建忠, 魏雪, 童琰, 黄玉邦. MGB 探针实时定量 PCR 检测致病性嗜水气单胞菌[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(19): 8911-8913
- Gao JZ, Wei X, Tong Y, Huang YB. Application of real-time PCR for detection of *Aeromonas hydrophila* by using MGB fluorescence probe[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(19): 8911-8913 (in

- Chinese)
- [20] Jenkins JA, Taylor PW. An alternative bacteriological medium for the isolation of *Aeromonas* spp.[J]. Journal of Wildlife Diseases, 1995, 31(2): 272-275
- [21] Aboyadak IM, Ali NG, Goda AM, Saad W, Salam AM. Non-selectivity of R-S media for *Aeromonas hydrophila* and TCBS media for *Vibrio* species isolated from diseased *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Aquaculture Research & Development, 2017, 8(7): 1-5
- [22] 庞茂达. 嗜水气单胞菌流行株基因组特征及毒力相关基因研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2015
- Pang MD. Genomic characteristics and virulence-associated genes analysis of *Aeromonas hydrophila*[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [23] Tomás JM. The main *Aeromonas* pathogenic factors[J]. ISRN Microbiology, 2012, 2012: 256261
- [24] Cascón A, Anguita J, Hernanz C, Sánchez M, Fernández M, Naharro G. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(4): 1167-1170
- [25] Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis[J]. Microbes and Infection, 1999, 1(13): 1129-1137
- [26] 陈书霞, 王晓武, 房玉林. 单菌落 PCR 法直接快速鉴定重组克隆[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 52-56
- Chen SX, Wang XW, Fang YL. Rapid characterization of recombination clone by PCR screening of individual bacterial colonies[J]. Microbiology China, 2006, 33(3): 52-56 (in Chinese)
- [27] 徐丽, 蔡俊鹏. 菌落 PCR 方法的建立及其与常规 PCR 方法的比较[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2004, 32(5): 51-55
- Xu L, Cai JP. Establishment of colony PCR method and its comparison with conventional PCR method[J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science, 2004, 32(5): 51-55 (in Chinese)
- [28] 潘渠, 杨维华, 王颖, 余小平, 陈恬, 陈玮. 设计乳杆菌特异性引物并运用菌落 PCR 技术快速检出和鉴定四川泡菜中的乳杆菌[J]. 微生物学通报, 2011, 38(8): 1300-1305
- Pan Q, Yang WH, Wang Y, Yu XP, Chen T, Chen W. Rapid detection and identification *Lactobacillus* from Sichuan pickle by colony PCR using *Lactobacillus*-specific primers[J]. Microbiology China, 2011, 38(8): 1300-1305 (in Chinese)
- [29] 李伟杰, 于建慧, 魏财文, 蒋桃珍. 产气荚膜梭菌毒素型菌落多重 PCR 方法的建立及应用[J]. 西北农业学报, 2016, 25(6): 823-827
- Li WJ, Yu JH, Wei CW, Jiang TZ. Establishment and application of colony multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2016, 25(6): 823-827 (in Chinese)
- [30] 董洁, 杨晓静, 苗承霞, 沈晶, 杨柳, 姜艳芬, 许信刚. 产气荚膜梭菌菌落多重 PCR 方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(12): 1842-1847
- Dong J, Yang XJ, Miao CX, Shen J, Yang L, Jiang YF, Xu XG. Development and preliminary application of colony multiplex PCR for serotyping of *Clostridium perfringens* strains[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 33(12): 1842-1847 (in Chinese)