

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220801001

http://www.yykxjz.cn/

刘静静, 李贵阳, 晋怀远, 高晔, 王会林, 李杰. 杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 223-233

LIU J J, LI G Y, JIN H Y, GAO Y, WANG H L, LI J. Development of a PCR method to detect the *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 223-233

杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种 PCR 检测方法的建立*

刘静静^{1,2} 李贵阳¹ 晋怀远^{1,3} 高晔¹ 王会林^{1,3} 李杰^{1,3①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 3. 天津农学院水产学院 天津 300384)

摘要 杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)是一种重要的鱼类致病菌,可以感染多种海淡水鱼类。杀鲑气单胞菌包括5个亚种,目前常用的生理生化特征和16S rDNA序列分析方法很难实现亚种的快速精确区分。为实现杀鲑气单胞菌亚种的快速鉴定和检测,针对我国常见的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*)和杀日本鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *masoucida*),本研究开发了其特异性的PCR检测方法。根据Gene Bank已公布的杀鲑气单胞菌基因组信息,选择杀鲑亚种*phoB*基因和杀日本鲑亚种*LOC111476736*基因作为目标基因,根据其序列设计特异性引物,进一步对PCR反应的退火温度、引物浓度、dNTPs浓度、Mg²⁺浓度和酶浓度5个方面进行了优化,并测试了该方法的特异性、敏感性和应用效果。结果显示,2对引物分别可以扩增出杀鲑气单胞菌杀鲑亚种522 bp的*phoB*特异性基因片段和杀日本鲑亚种515 bp的*LOC111476736*特异性基因片段。杀鲑亚种特异性引物最适退火温度为64℃,10 μmol/L引物、2 mmol/L dNTPs、25 mmol/L MgSO₄和1 U/μL KOD酶的最适添加量分别为1.5、2、1.5和0.5 μL。杀日本鲑亚种特异性引物最适退火温度为64℃,10 μmol/L引物、2 mmol/L dNTPs、25 mmol/L MgSO₄和1 U/μL KOD酶的最适添加量分别为0.75、1、1.5和0.5 μL。以鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)、杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)、杀鲑气单胞菌其他亚种等14种其他水产病原菌或常见环境菌为模板进行PCR检测,均无特异性条带。该方法对杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的检测灵敏度为12.8 CFU/反应(菌体)或17.6 fg/反应(DNA),对杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种的检测灵敏度为23.8 CFU/反应(菌体)或27.2 fg/反应(DNA)。利用杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种分别对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)进行人工感染实验,感染后取病鱼组织进行PCR检测,结果显示,本方法可以从感染后的大菱鲆中分别检测到相应病原。综上所述,本研究建立了杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种的特异性PCR检测方法,该检测方法为杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种的流行病调查和快速诊断提供了支撑。

关键词 杀鲑气单胞菌杀鲑亚种; 杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种; PCR; 检测

中图分类号 S942.2 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)04-0223-11

* 国家重点研发计划(2019YFD0900103)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022021003)和国家自然科学基金-山东省人民政府联合基金(U1706205)共同资助。刘静静, Email: 1181264027@qq.com

① 通信作者: 李杰, 副研究员, Email: lijie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-08-01, 收修改稿日期: 2022-08-14

杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)属气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*),为兼性好氧或需氧革兰氏阴性菌(Najimi *et al*, 2008),主要分为 5 个亚种:杀鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*)、史氏亚种(*A. salmonicida* subsp. *smithia*)、无色亚种(*A. salmonicida* subsp. *achromogenes*)、杀日本鲑亚种(*A. salmonicida* subsp. *masoucida*)和溶果胶亚种(*A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*) (Pavan *et al*, 2000)。杀鲑气单胞菌在国内已报道可以感染多种养殖鱼类并引起疖疮病(张晓君等, 2006; 李绍戊等, 2015; 周冬仁等, 2015; 王晓冉等, 2017)。传统的杀鲑气单胞菌鉴定方法主要根据生理生化特征、菌株形态和培养特性等特征,这些方法繁琐耗时且易与其他病原菌发生交叉反应(Lee *et al*, 2002; Keeling *et al*, 2013)。16S rRNA 基因扩增已用于杀鲑气单胞菌的鉴定(del Cerro *et al*, 2002; Hiney *et al*, 1998; Miyata *et al*, 1996),其他常规 PCR (Byers *et al*, 2002)、多重 PCR (Altinok *et al*, 2008)、荧光定量 PCR (Fernández-Álvarez *et al*, 2016)、环介导等温扩增技术(LAMP) (Kulkarni *et al*, 2009)和免疫学技术(Adams *et al*, 1990)也有广泛报道,但这些方法只能鉴定属或种,无法鉴定到亚种。目前,仅有 2 篇关于杀鲑气单胞菌杀鲑亚种快速检测方法的报道,但根据最新的基因组信息数据,这些方法均具有一定的局限性。Miyata 等(1996)利用 PCR 方法建立了杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的检测方法,但加拿大分离的杀鲑亚种中缺少该方法的目标基因; Fernández-Álvarez 等(2016)建立了 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法检测杀鲑气单胞菌杀鲑亚种,灵敏度可达到 21 fg,但在部分杀日本鲑亚种基因组中也存在检测的目标基因。

基于上述原因,为建立杀鲑气单胞菌亚种的检测方法,本研究以实验室前期分离到的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种为研究对象,通过分析已公布的杀鲑气单胞菌基因组序列信息,选取 *phoB* 基因和 *LOC111476736* 基因设计特异性引物,建立杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种的 PCR 检测方法,为杀鲑气单胞菌病原的快速检测和亚种区分提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 菌株及培养条件

本实验用菌株见表 1,其中,杀鲑气单胞菌、鳃气单胞菌(*Aeromonas encheleia*)在 TSA 培养基 20 °C 培养,大肠杆菌(*Escherichia coli*)在 LB 培养基 37 °C 培养,杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)、嗜水

气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)、海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等其他菌株在 TSA 培养基中 28 °C 培养。杀鲑气单胞菌标准菌株购自美国菌种保藏中心(ATCC),其他菌株由本实验室临床分离并鉴定。

1.2 提取细菌基因组 DNA

本实验使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根,中国)按照说明书步骤提取细菌基因组 DNA。

1.3 特异性引物设计和筛选反应条件

对 GenBank 中已公布的 48 株确定亚种的杀鲑气单胞菌基因组信息进行比较基因组学分析,筛选杀鲑气单胞菌亚种的特异性基因,并将特异性基因的序列与其他病原进行比较分析。根据分析结果,最终选择杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 *phoB* 基因和杀日本鲑亚种 *LOC111476736* 基因作为目标基因。利用 Primer-BLAST 设计特异性引物,并通过 BLAST 筛选,排除引物与其他微生物和大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和褐鳟(*Salmo trutta*)等杀鲑气单胞菌敏感宿主基因组的非特异性结合,选取最适引物用于后期检测(表 2)。按照 KOD 酶(TOYOBO, 上海)说明书配制 25 μL PCR 体系: 2.5 μL 10×PCR buffer、0.75 μL 10 μmol/L 正/反向引物、1 μL 2 mmol/L dNTPs、1.5 μL 25 mmol/L MgSO₄、0.5 μL 1 U/μL KOD 酶、1 μL DNA 模板、17 μL ddH₂O,空白对照以 ddH₂O 作为模板。引物 *A. salmonicida* F1/R1 和 *A. masoucida* F2/R2 的 PCR 条件: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s,分别采用 52、54、56、58、60、62 和 64 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 15 s, 35 个循环; 68 °C 充分延伸 7 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后测序验证。

1.4 PCR 体系的优化

为优化杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种的 PCR 扩增条件,分别对反应体系中的 dNTPs 浓度、引物浓度、MgSO₄ 浓度和酶浓度进行优化,优化条件见表 3。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后比较产物的亮度差异。

1.5 PCR 的灵敏度检测

以平板计数法测定杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 ATCC33658 和杀日本鲑亚种 ATCC27013 的菌液浓

表 1 本研究使用菌株
Tab.1 Bacterial strains used in this study

种 Strain	编号 No.	宿主(来源) Host (Source)
杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	ATCC27013 ASM20200505RZ2L ASM20160705RZ6S ASM20181222LN1G	大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i> 大菱鲂 <i>S. maximus</i> 大菱鲂 <i>S. maximus</i> 大菱鲂 <i>S. maximus</i>
杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	ASS20180101GZ ASS20200608XZ11L ATCC33658	鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i> 亚东鲑 <i>Salmo trutta fario</i> 大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>
杀鲑气单胞菌无色亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	ATCC33659	褐鳟 <i>Salmo trutta</i>
杀鲑气单胞菌史氏亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i>	ATCC49393	拟鲤 <i>Rutilus rutilus</i>
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	DH5 α	本实验室 This laboratory
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	AH20200705GX6L	鲟鱼 <i>Acipenser sinensis</i>
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	VH20200505RZ4L	大菱鲂 <i>S. maximus</i>
哈氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	VH20171120ZGHYDX VH20210117QD2S	条纹斑竹鲨 <i>Chiloscyllium plagiosum</i> 绿鳍马面鲀 <i>Thamnaconus modestus</i>
鳗鱼气单胞菌 <i>Aeromonas encheleia</i>	AE20181222IN1K	大菱鲂 <i>S. maximus</i>
美人鱼发光杆菌 <i>Photobacterium damsela</i>	PD20190927JS2L PD20191102HN	许氏平鲈 <i>Sebastes schlegelii</i> 海水样品 Sea water sample
<i>Vibrio salmonicida</i>	VS20180305RZ4S	硬头鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
海豚链球菌 <i>Streptococcus iniae</i>	SI20200705GX7L	鲟鱼 <i>Acipenser sinensis</i>
副乳房链球菌 <i>Streptococcus parauberis</i>	SP20191120LZ3Z	大菱鲂 <i>S. maximus</i>
停乳链球菌 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	SD20191105HN2K	豹纹鳃棘鲈 <i>Plectropomus leopardus</i>
杀鱼爱德华氏菌 <i>Edwardsiella piscicida</i>	ET20180101HLD1S	大菱鲂 <i>S. maximus</i>
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	BS20180724QD5Y	海水样品 Sea water sample

表 2 本研究中所用引物
Tab.2 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	长度 Length /bp	亚种 Subspecies
<i>A. masoucida</i> F2	ATCCACAGCAGCCATCAATAGAGG	515	杀日本鲑亚种
<i>A. masoucida</i> R2	ACACAGAACAGAAGACGAACACAGT		<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>
<i>A. salmonicida</i> F1	CGGTCATCGCGTTAAACGAT	522	杀鲑亚种
<i>A. salmonicida</i> R1	AGGCAACCGATCAAATCACTG		<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>

表 3 PCR 体系的优化(25 μ L)

Tab.3 Optimization of PCR reaction system (25 μ L)

成分 Component	体积 Volume / μ L
2 mmol/L dNTPs	1.0, 2.0, 3.0, 4.0
25 mmol/L MgSO ₄	1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0
10 μ mol/L 引物 Primer	1.25、1.00、0.75、0.50
1 U/ μ L KOD 酶	0.25、0.50、0.75、1.00

度,用 PBS 将 ATCC33658 菌液梯度稀释至 $1.28 \times 10^5 \sim 1.28 \times 10^0$ CFU/ μ L, 将 ATCC27013 菌液梯度稀释至 $1.19 \times 10^5 \sim 1.19 \times 10^0$ CFU/ μ L, 分别取 1 μ L 稀释的菌液

用于 PCR 扩增并进行电泳检测。

使用 NanoDrop 2000 测定杀鲑气单胞菌的基因组 DNA 浓度, 用 ddH₂O 将基因组梯度稀释至 $1.76 \times 10^3 \sim 1.76 \times 10^0$ fg/ μ L (ATCC33658) 和 $2.72 \times 10^3 \sim 2.72 \times 10^0$ fg/ μ L (ATCC27013)。每个稀释梯度的 DNA 溶液分别取 1 μ L 作为模板用于 PCR 扩增检测。

1.6 PCR 特异性检测

本实验所用细菌见表 1, 用 PBS 将过夜培养的细菌稀释至约 1×10^6 CFU/mL, 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 取 1 μ L 作为模板, 以同样浓度的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种

ATCC33658 和杀日本鲑亚种 ATCC27013 菌体为阳性对照,以 ddH₂O 为阴性对照,利用引物 *A. salmonicida* F1/R1、*A. masoucida* F2/R2 对 23 株菌进行 PCR 扩增,并进行电泳检测,确定 PCR 检测方法的特异性。

1.7 鱼体中的病原检测

大菱鲆购于莱阳某养殖场,体重为 50~60 g,实验前养殖于 100 L 循环海水养殖系统中,水温为 18 °C。感染实验前随机取 5 尾鱼解剖,取肝脏、脾脏和肾脏匀浆涂布于 TSA 培养基,确定实验鱼未携带病原。将实验鱼随机分为 2 组,每组 10 尾。利用 PBS 缓冲液将培养好的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 ASS20200608XZ11L 和杀日本鲑亚种 ASM20160705RZ6S 菌液浓度调整至 1×10^6 CFU/mL。采用背部肌肉注射方法,每尾大菱鲆注射 0.1 mL,对照组注射 0.1 mL 的 PBS 缓冲液,饲养于相同条件下。取 50 mg 发病鱼组织加入 PBS 研磨,95 °C 加热 10 min,取 1 μL 作为模板,ASS20200608XZ11L 和 ASM20160705RZ6S 菌体 DNA 为阳性对照。按照上述反应体系和程序进行 PCR。

2 结果

2.1 PCR 检测的最适反应条件

利用引物 *A. salmonicida* F1/R1、*A. masoucida* F2/R2 对杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 ATCC33658 和杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 ATCC27013 进行 PCR,测序结果显示,*A. salmonicida* F1/R1 引物扩增的片段为 522 bp,*A. masoucida* F2/R2 引物扩增的片段为 515 bp,与预测结果一致,且经比对后与 GenBank 中 *phoB*、*LOC111476736* 基因的序列完全一致。以引物 *A. salmonicida* F1/R1 和 *A. masoucida* F2/R2 进行

PCR,退火温度为 52~64 °C 时均能扩增出特异性条带(图 1),亮度无明显差异且无杂带。为保证特异性,2 对引物均以 64 °C 作为退火温度。

2.2 PCR 检测最佳反应体系

为提高灵敏度,对 25 μL PCR 体系进行优化,结果表明,以 *A. salmonicida* F1/R1 为引物的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 PCR 检测体系中,2 mmol/L dNTPs 最适添加量为 2.0、3.0、4.0 μL(图 2a),25 mmol/L MgSO₄ 最适添加量为 1.5、2.0、2.5 μL(图 2b),10 μmol/L 引物最适添加量为 1.5 μL(图 2c),1 U/μL 酶最适添加量为 0.50、0.75 μL(图 2d)。因此,后期引物 *A. salmonicida* F1/R1 采用的反应体系为 2.5 μL 10×PCR buffer、2 μL 2 mmol/L dNTPs、1.5 μL 25 mmol/L MgSO₄、1.5 μL 10 μmol/L 正/反向引物、0.5 μL 1 U/μL 酶、15.5 μL ddH₂O、1 μL 模板。反应程序为 94 °C 预变性 5 min;98 °C 变性 10 s、64 °C 退火 30 s、68 °C 延伸 15 s,35 个循环;68 °C 充分延伸 7 min。

以 *A. masoucida* F2/R2 为引物的杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 PCR 检测体系中,2 mmol/L dNTPs 最适添加量为 1.0、2.0、3.0 μL(图 2e);25 mmol/L MgSO₄ 最适添加量为 1.5、2.0、2.5、3.0 μL(图 2f);10 μmol/L 引物的添加量为 0.75、1.00、1.50 μL(图 2g);1 U/μL 酶最适添加量为 0.50、0.75、1.00 μL(图 2h)。因此,后期引物 *A. masoucida* F2/R2 采用的反应体系为 2.5 μL 10×PCR buffer、1 μL 2 mmol/L dNTPs、1.5 μL 25 mmol/L MgSO₄、0.75 μL 10 μmol/L 正/反向引物、0.5 μL 1 U/μL 酶、17 μL ddH₂O、1 μL 模板。反应程序为 94 °C 预变性 5 min;98 °C 变性 10 s、64 °C 退火 30 s、68 °C 延伸 15 s,35 个循环;68 °C 充分延伸 7 min。

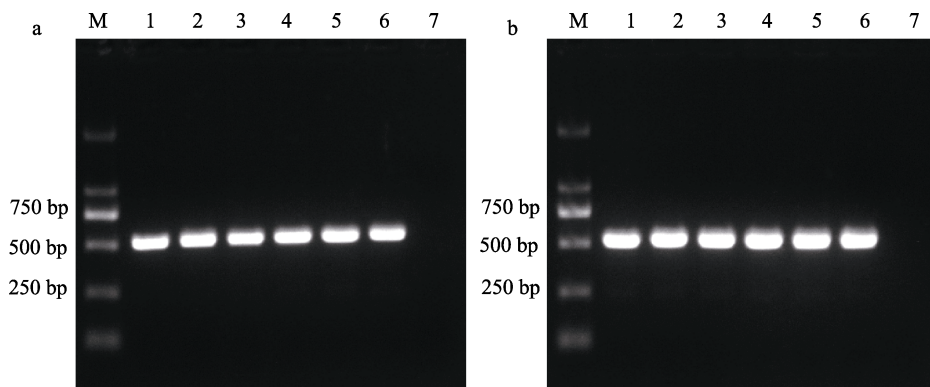


图 1 引物 *A. salmonicida* F1/R1 (a)和 *A. masoucida* F2/R2 (b)退火温度筛选

Fig.1 Screening annealing temperature of primers *A. salmonicida* F1/R1 (a) and *A. masoucida* F2/R2 (b)

M: DL 2000 marker; 1~6: 退火温度为 52、54、56、58、60、62、64 °C; 7: 空白对照。

M: DL 2000 marker; 1~6: Annealing temperature of 52, 54, 56, 58, 60, 62, and 64 °C; 7: Negative control.

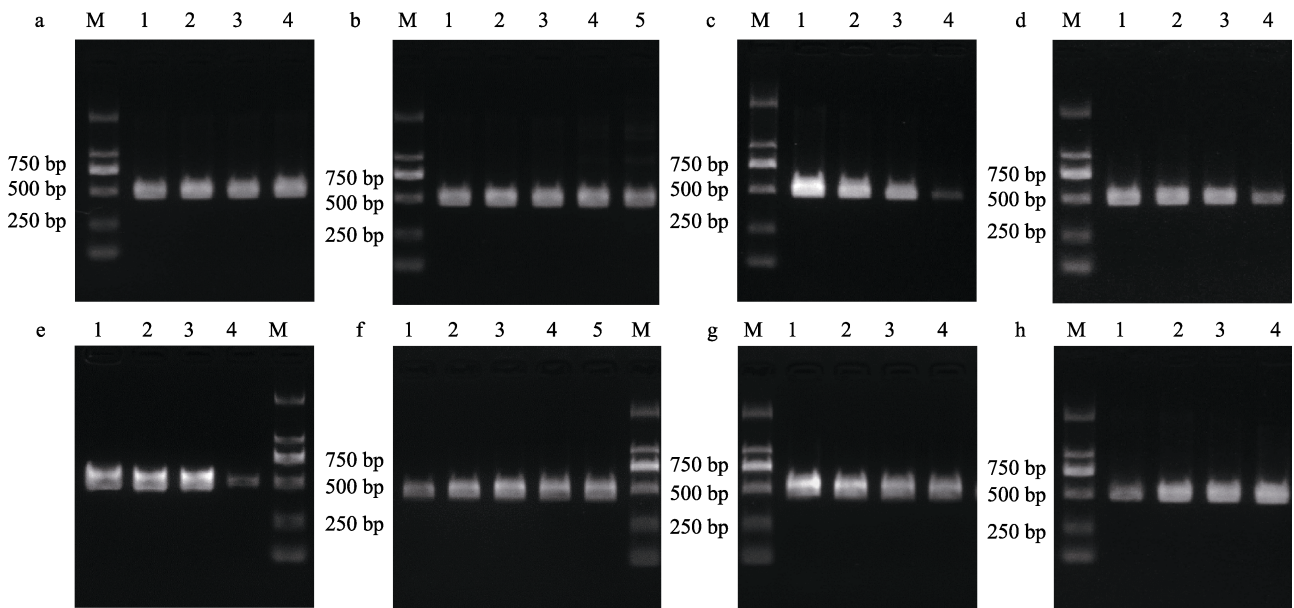


图 2 引物 *A. salmonicida* F1/R1 (a、b、c、d)和 *A. masoucida* F2/R2 (e、f、g、h) PCR 体系优化
Fig.2 PCR system optimization of primers *A. salmonicida* F1/R1 (a, b, c, d) and *A. masoucida* F2/R2 (e, f, g, h)

a, e: 2 mmol/L dNTPs, 1~4: 1, 2, 3, 4 μ L; b, f: 25 mmol/L $MgSO_4$, 1~5: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 μ L; c, g: 10 μ mol/L primer, 1~4: 1.50, 1.00, 0.75, 0.50 μ L; d, h: 1 U/ μ L KOD, 1~4: 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 μ L. M: DL 2000 marker.

2.3 PCR 检测灵敏度

以杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 ATCC33658 梯度稀释的菌液为模板, 菌液浓度为 $1.28 \times 10^5 \sim 1.28 \times 10^1$ CFU/ μ L 时均可扩增出目的条带, 但当菌液浓度为 1.28 CFU/ μ L 时未扩增到目的条带, 因此, 本方法针对杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的检测灵敏度为 12.8 CFU/反应(图 3a)。以 DNA 为模板, 当浓度为 1.76 fg 时未扩增到目的条带, 其他浓度均可检测到条带。因此, *A. salmonicida* F1/R1 引物的 PCR 检测方法检出下限为 17.6 fg/反应(图 3b)。

以杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 ATCC27013 梯度稀释的菌液为模板, 菌液浓度为 $1.19 \times 10^5 \sim 2.38 \times 10^1$ CFU/ μ L 时均可扩增出目的条带, 但当菌液浓度低至 1.19×10^1 CFU/ μ L 时未扩增出目的条带, 因此, 本方法针对杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种的检测灵敏度为 23.8 CFU/反应(图 3c)。以 DNA 为模板, 当浓度为 2.72 fg 时未扩增到目的条带, 其他浓度均可检测到条带。因此, *A. masoucida* F2/R2 引物的 PCR 检测检出下限为 27.2 fg/反应(图 3d)。

2.4 PCR 特异性检测

选取表 1 中的 23 株菌, 包括 4 株杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种、3 株杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和 14 种其他菌属细菌, 检测引物 *A. salmonicida* F1/R1、*A. masoucida* F2/R2 的特异性, 以 *A. salmonicida*

F1/R1 为引物进行 PCR 时, 仅在杀鲑气单胞菌杀鲑亚种中扩增出特异性目的条带(图 4a)。以 *A. masoucida* F2/R2 为引物进行 PCR 时, 仅杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种扩增出特异性目的条带(图 4b), 2 对引物从其他细菌的 DNA 中未扩增出预期 DNA 条带。因此, 本研究设计的 2 对引物能够特异性地检测杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种。

2.5 病鱼组织检测

以杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 ASS20200608XZ11L 和杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 ASM20160705RZ6S 肌肉注射感染大菱鲆, 7 d 内大菱鲆全部死亡。组织检测结果显示, *A. salmonicida* F1/R1 和 *A. masoucida* F2/R2 均能检测到病鱼组织中的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种或杀日本鲑亚种, 而在健康鱼组织中未扩增出预期条带(图 5), 表明引物 *A. salmonicida* F1/R1 和 *A. masoucida* F2/R2 可以从发病的鱼中检测到杀鲑气单胞菌病原。

3 讨论

杀鲑气单胞菌是水产养殖过程中最为常见的病原菌之一, 最早在欧洲的鲑鳟类发现, 严重影响了鲑鳟类的养殖健康。近年来, 杀鲑气单胞菌的感染病例越来越多, 威胁多种海、淡水养殖鱼类。目前, 杀鲑气单胞菌病原的鉴定和亚种区分主要依靠病原培养、生理生化检测和管家基因分析, 如 Long 等(2020)运

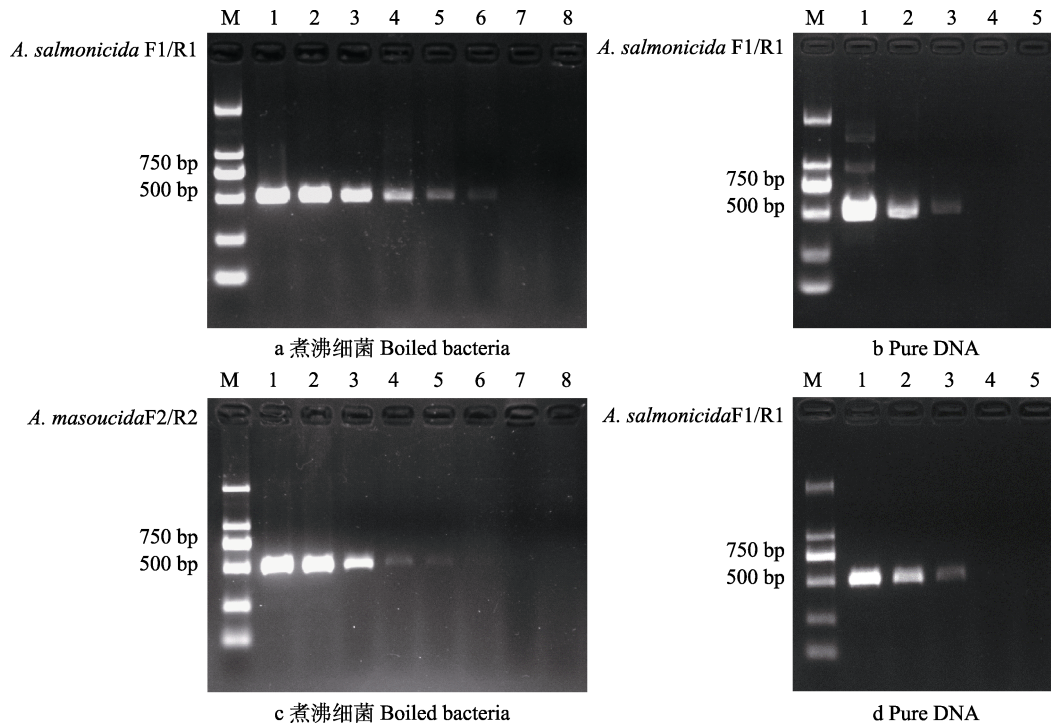


图3 以细菌(a、c)和DNA(b、d)为模板进行PCR灵敏度检测

Fig.3 PCR sensitivity detection using bacteria (a, c) and DNA (b, d) as templates

a: 1~7: 使用引物 *A. salmonicida* F1/R1, 每反应以 1.28×10^5 、 1.28×10^4 、 1.28×10^3 、 1.28×10^2 、 0.256×10^2 、 1.28×10^1 和 1.28×10^0 CFU 的 ATCC33658 菌体为模板进行 PCR; 8: 空白对照。b: 1~4: 使用引物 *A. salmonicida* F1/R1, 每反应以 1.76×10^3 、 1.76×10^2 、 1.76×10^1 、 1.76×10^0 fg 的 ATCC33658 基因组 DNA 为模板进行 PCR; 5: 空白对照。c: 1~7: 使用引物 *A. masoucida* F2/R2, 每反应以 1.19×10^5 、 1.19×10^4 、 1.19×10^3 、 1.19×10^2 、 0.238×10^2 、 1.19×10^1 和 1.19×10^0 CFU 煮沸细菌 ATCC27013 为模板进行 PCR; 8: 空白对照。d: 1~4: 使用引物 *A. masoucida* F2/R2, 每反应以 2.72×10^3 、 2.72×10^2 、 2.72×10^1 、 2.72×10^0 fg 的 ATCC27013 基因组 DNA 为模板进行 PCR; 5: 空白对照。M: DL2000 marker。

a: 1~7: Using primers *A. salmonicida* F1/R1 and 1.28×10^5 , 1.28×10^4 , 1.28×10^3 , 1.28×10^2 , 0.256×10^2 , 1.28×10^1 and 1.28×10^0 CFU boiled bacteria ATCC33658 as template for each PCR; 8: Negative control. b: 1~4: Using primer *A. salmonicida* F1/R1 and 1.76×10^3 , 1.76×10^2 , 1.76×10^1 , and 1.76×10^0 fg of ATCC33658 genomic DNA as the template for each PCR; 5: Negative control. c: Using primers *A. masoucida* F2/R2 and 1.19×10^5 , 1.19×10^4 , 1.19×10^3 , 1.19×10^2 , 0.238×10^2 , 1.19×10^1 and 1.19×10^0 CFU boiled bacteria ATCC27013 as template for each PCR; 8: Negative control. d: 1~4: Using primers *A. masoucida* F2/R2 and 2.72×10^3 , 2.72×10^2 , 2.72×10^1 and 2.72×10^0 fg of ATCC27013 genomic DNA as templates for each PCR; 5: Negative control. M: DL2000 marker.

用生理生化检测、6个管家基因和16S rRNA系统发育分析等方法, 鉴定了圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)中感染的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种; 刘宁等(2015)利用生化鉴定和16S rRNA序列分析等方法鉴定了细鳞鱼(*Brachymystax lenok*)中感染的杀鲑气单胞菌无色亚种; 我国的国家标准(GB/T 15805.6-2008)也采用了生理生化特征为检测指标, 作为鉴定杀鲑气单胞菌和区分亚种的标准。但生理生化实验需要经过微生物纯化和培养过程, 用时长, 且部分新发现的临床菌株生理生化反应并不完全符合亚种鉴定标准, 给鉴定带来了一定的困难。16S rRNA测序是细菌鉴定和系统发育研究的最有力方法(李志刚等, 2001), 对区分大多数气单胞菌的分类具有重要参考价值(Martinez-Murcia

et al, 1992), 但测序会增加病原检测和鉴定的周期, 且无法区分杀鲑气单胞菌亚种。

在杀鲑气单胞菌的快速检测方面, PCR技术已经得到了广泛应用, 如常规PCR(Beaz-Hidalgo *et al*, 2008)、多重PCR(Onuk *et al*, 2010)、实时荧光定量PCR(Bartkova *et al*, 2017; 刘帅等, 2017)等。其中, *vapA*基因编码A层蛋白(A-layer protein)是杀鲑气单胞菌的重要毒力蛋白, *vapA*基因也是杀鲑气单胞菌鉴定和分型的重要分子标记(Lago *et al*, 2012)。通过对*vapA*基因序列的进化发育分析, 可以将杀鲑气单胞菌分为14个亚型以及缺乏*vapA*基因的溶果胶亚种(Gulla *et al*, 2019)。Gustafson等(1992)建立了基于*vapA*基因的杀鲑气单胞菌PCR检测方法, 检测下限

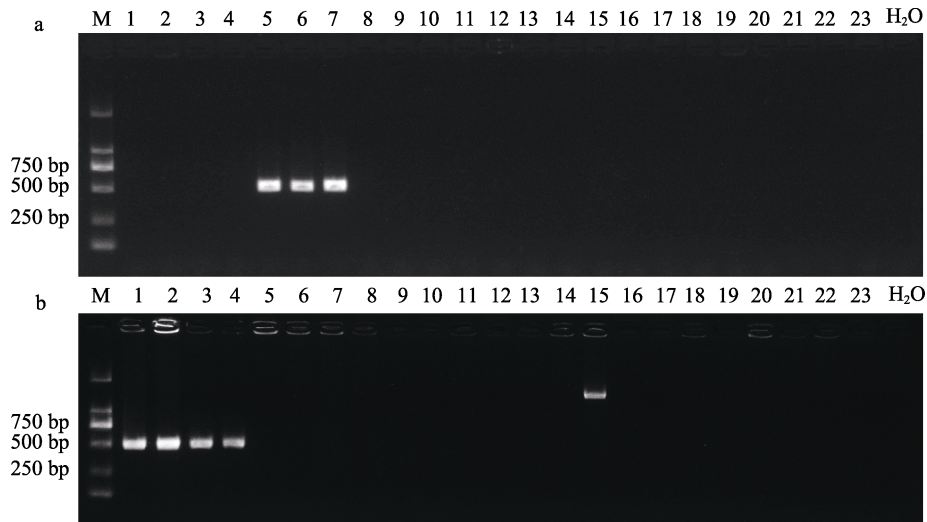


图 4 PCR 检测引物 *A. salmonicida* F1/R1 (a)和 *A. masoucida* F2/R2 (b)的特异性
Fig.4 Specificity of PCR detection with primers *A. salmonicida* F1/R1 (a) or *A. masoucida* F2/R2 (b)

M: DL 2000 marker; 1~4: 杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种; 5~7: 杀鲑气单胞菌杀鲑亚种; 8: 杀鲑气单胞菌无色亚种; 9: 杀鲑气单胞菌史氏亚种; 10: 大肠杆菌; 11: 嗜水气单胞菌; 12: 鳗弧菌; 13~14: 哈氏弧菌; 15: 鳗鱼气单胞菌; 16: 美人鱼发光杆菌; 17: 美人鱼发光杆菌; 18: 杀鲑弧菌; 19: 海豚链球菌; 20: 副乳房链球菌; 21: 停乳链球菌; 22: 杀鱼爱德华氏菌; 23: 芽孢杆菌; 24: 空白对照。

M: DL 2000 marker; 1~4: *A. salmonicida* subsp. *masoucida*; 5~7: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*; 8: *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*; 9: *A. salmonicida* subsp. *smithia*; 10: *E. coli*; 11: *A. hydrophila*; 12: *V. anguillarum*; 13~14: *V. harveyi*; 15: *A. encheleia*; 16: *P. damsela*; 17: *P. damsela*; 18: *V. salmonicida*; 19: *S. iniae*; 20: *S. parauberis*; 21: *S. dysgalactiae*; 22: *E. piscicida*; 23: *Bacillus* sp.; 24: Blank control.

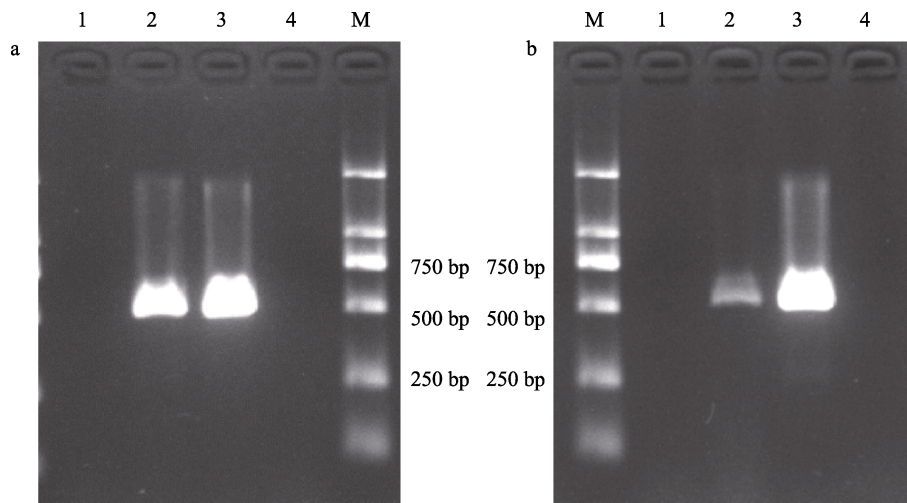


图 5 以发病大菱鲆组织为模板进行 PCR
Fig.5 PCR with infected turbot tissue as template

a: 引物为 *A. salmonicida* F1/R1 进行的 PCR; b: 引物为 *A. masoucida* F2/R2 进行的 PCR;
1: 健康鱼组织液; 2: 病死鱼组织液; 3: 阳性对照; 4: 空白对照; M: DL 2000 marker。

a: PCR with primer *A. salmonicida* F1/R1; b: PCR with primer *A. masoucida* F2/R2;
1: Healthy fish tissue fluid; 2: Infected fish tissue fluid; 3: Positive control; 4: Blank control; M: DL 2000 marker.

为 5 fg。我国出入境检验检疫行业标准(SN/T 2095-2010)也以 *vapA* 基因为靶点进行 PCR 检测来鉴定杀鲑气单胞菌。但目前大多数杀鲑气单胞菌的特异性 PCR 检测方法只能检测到种,无法确定亚种,亚种鉴

定还需要依靠生理生化分析和基因序列进化分析。

不同的杀鲑气单胞菌亚种在毒力、宿主偏好性和疫苗交叉免疫等方面均有差异,因此,确定其亚种对于疾病的诊断、治疗和预防具有重要意义。目前,杀

鲑气单胞菌亚种的快速检测方法非常少,只有 2 种针对杀鲑亚种的检测(Miyata *et al*, 1996; Fernández-Álvarez *et al*, 2016),但随着更多的菌株基因组测序,通过 GenBank 中最新的基因组序列信息分析发现,这 2 种方法在检测中均存在一定的不足,可能漏检某些地理区域的临床株,或发生非特异性扩增。本研究针对杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 *phoB* 基因和杀日本鲑亚种 LOC111476736 基因设计了引物 *A. salmonicida* F1/R1 和 *A. masoucida* F2/R2,可以特异性地检测杀鲑气单胞菌的杀鲑亚种和杀日本鲑亚种。经过反应体系优化,该方法检测灵敏度在 DNA 水平上分别达到 17.6 和 27.2 fg,在细胞水平达到 12.8 和 23.8 CFU/反应,与 Høie 等(1997)以质粒序列为靶基因建立的 PCR 检测方法的检测灵敏度相当,具有较高的检测灵敏度。同时,本方法以 23 株水产常见的其他病原菌和环境菌株进行了特异性检测,结果显示,只有杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种检测到特异性条带,其他细菌中无特异性条带,说明该检测方法具有较高的特异性。本方法也可以从人工感染发病鱼的组织中检测到杀鲑气单胞菌的 2 个亚种,具有较好的产业应用性。综上所述,本研究建立的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和杀日本鲑亚种的特异性检测方法具有较高的灵敏度和特异性,且应用方便,可作为流行病学调查和疾病快速诊断的一个重要依据。

参 考 文 献

- ADAMS A, THOMPSON K. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1990, 2(4): 281–288
- ALTINOK I, CAPKIN E, KAYIS S. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. *Veterinary Microbiology*, 2008, 131(3/4): 332–338
- BARTKOVA S, KOKOTOVIC B, SKALL H F, *et al*. Detection and quantification of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(2): 231–242
- BEAZ-HIDALGO R, MAGI G E, BALBOA S, *et al*. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Veterinary Microbiology*, 2008, 128(3/4): 386–394
- BYERS H, GUDKOV N, CRANE M. PCR-based assays for the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. I. Evaluation of three PCR primer sets for detection and identification. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 49(2): 129–138
- DEL CERRO A, MARQUEZ I, GUIJARRO J A. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 5177–5180
- FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ C, GONZÁLEZ S F, SANTOS Y. Development of a SYBR green I real-time PCR assay for specific identification of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(24): 10585–10595
- GULLA S, BAYLISS S, BJÖRNSDÓTTIR B, *et al*. Biogeography of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* inferred by *vapA* genotyping. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(7): 1–7
- GUSTAFSON C E, THOMAS C J, TRUST T J. Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(12): 3816–3825
- HINEY M P, SMITH P R. Validation of polymerase chain reaction-based techniques for proxy detection of bacterial fish pathogens: Framework, problems and possible solutions for environmental applications. *Aquaculture*, 1998, 162(1/2): 41–68
- HØIE S, HEUM M, THORESEN O F. Evaluation of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Aeromonas salmonicida* ss *salmonicida* in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1997, 30(1): 27–35
- KEELING S, BROSNAHAN C, JOHNSTON C, *et al*. Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 2013, 36(5): 495–503
- KULKARNI A, CAIPANG C M, 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*. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 2009, 17(4): 476–489
- LAGO E P, NIETO T P, FARTO R. Virulence factors of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains associated with infections in turbot *Psetta maxima*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2012, 99(2): 145–151
- LEE C, CHO J C, LEE S H, *et al*. Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93(6): 976–985
- LI S W, WANG D, LIAN H M, *et al*. Isolation, identification and pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 234–240 [李绍戊, 王荻, 连浩淼, 等. 大西洋鲑杀鲑气单胞菌无色亚种的分离鉴定和致病性研究. *水生生物学报*, 2015, 39(1): 234–240]
- LI Z G, YANG G P, ZHU Y H. The relationship between

- polymorphism of bacterial 16S rDNA restriction fragment length and community structure of aquatic bacteria. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(2): 111–115 [李志刚, 杨官品, 朱艳红. 水环境细菌 16S rDNA 限制性片段长度多型性及群落结构分析. *水生物学报*, 2001, 25(2): 111–115]
- LIU N, SHI X, DU Y C, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas salmonicida* from diseased *Brachymystax lenok*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(1): 88–92 [刘宁, 时晓, 杜迎春, 等. 患病细鳞鱼杀鲑气单胞菌的分离与鉴定. *淡水渔业*, 2015, 45(1): 88–92]
- LIU S, LU T Y, WANG D, *et al.* Establishment and application of SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Aeromonas salmonicida*. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(7): 2884–2891 [刘帅, 卢彤岩, 王荻, 等. 杀鲑气单胞菌 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(7): 2884–2891]
- LONG M, LI T T, JIANG Y, *et al.* Isolation and characterization of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* from largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) cage-cultured in the upper reaches of Yangtze River. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(1): 153–161
- MARTINEZ-MURCIA A J, BENLLOCH S, COLLINS M D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: Lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992, 42(3): 412–421
- MIYATA A, INGLIS V, AOKI T. Rapid identification of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* by the polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 1996, 141(1/2): 13–24
- NAJIMI M, LEMOS M L, OSORIO C R. Identification of siderophore biosynthesis genes essential for growth of *Aeromonas salmonicida* under iron limitation conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2341–2348
- ONUK E E, CIFTCI A, FINDIK A, *et al.* Development and evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in culture fisheries. *Journal of Veterinary Science*, 2010, 11(3): 235–241
- PAVAN M E, ABBOTT S L, ZORZOPULOS J, *et al.* *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(3): 1119–1124
- WANG X R, CHEN S Q, MO Z L, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas salmonicida* associated with furunculosis in cultured sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 25–31 [王晓冉, 陈四清, 莫照兰, 等. 养殖裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)疥疮病原菌的分离与鉴定. *渔业科学进展*, 2017, 38(5): 25–31]
- ZANG X J, FANG H, CHEN C Z, *et al.* Biological characterization and phylogenetic analysis of pathogenic new subspecies of *Aeromonas salmonicida* isolated from stone flounder (*Kareius bicoloratus* L). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(6): 917–923 [张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 杀鲑气单胞菌一新亚种的生物学特性及系统发育学分析. *中国水产科学*, 2006, 13(6): 917–923]
- 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*). *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(3): 64–70 [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. *海洋湖沼通报*, 2015(3): 64–70]

(编辑 马瑾艳)

Development of a PCR Method to Detect the *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*

LIU Jingjing^{1,2}, LI Guiyang¹, JIN Huaiyuan^{1,3}, GAO Ye¹, WANG Huilin^{1,3}, LI Jie^{1,3}①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract *Aeromonas salmonicida* is an important pathogen that can infect a variety of marine and freshwater fish. There are five subspecies of *Aeromonas salmonicida*: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *smithia*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, and *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*. Traditionally, the detection of *A. salmonicida* has been based on 16S rRNA sequencing and physiological and biochemical characterization, but it is difficult to identify the subspecies using these methods. Outer membrane protein (A-layer protein, VapA), which is encoded by the *vapA* gene and regulated by the *luxS* gene, is an important secretion protein of *A. salmonicida*. It is involved in bacterial self-agglutination induction, macrophage phagocytosis resistance, and provides protection against chemicals such as antibiotics and disinfectants. In addition, the *vapA* gene is also an effective molecular marker for the identification of *A. salmonicida* subspecies, however, gene sequencing and phylogenetic analysis are required for subspecies determination. To establish an accurate and sensitive rapid detection of *A. salmonicida* subspecies, in this study we tried to establish a specific PCR method for *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* and *A. salmonicida* subsp. *masoucida* identification. Based on genome analysis, the *phoB* and *LOC111476736* genes were used as molecular markers for PCR amplification with specific primers designed according to the sequences in the GenBank database. The target gene was amplified using the genomic DNA of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* or *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, and the method was optimized to improve the efficiency and accuracy of distinguishing these two subspecies from other pathogens in aquaculture. First, the annealing temperature, primer concentration, dNTPs concentration, Mg²⁺ concentration, and enzyme dosage of the PCR system were optimized to improve the sensitivity of the detection method. The results showed that the primers could amplify the *phoB* gene fragment of 522 bp and the *LOC111476736* gene fragment of 515 bp. The optimal annealing temperature of specific primers for *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* was 64 °C, and the optimal volume of 10 μmol/L primers, 2 mmol/L dNTPs, 25 mmol/L MgSO₄, and 1 U/μL enzyme were 1.5 μL, 2.0 μL, 1.5 μL, and 0.5 μL (25 μL reaction system), respectively. The optimum annealing temperature of specific primers for *A. salmonicida* subsp. *masoucida* was 64 °C, and the optimum volume of 10 μmol/L primers, 2 mmol/L dNTPs, 25 mmol/L MgSO₄, and 1 U/μL enzyme were 0.75 μL, 1.00 μL, 1.50 μL, and 0.50 μL (25 μL reaction system), respectively. The sensitivity of the detection method was determined using a gradient diluted *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC33658 bacterin as the template, and the target band could not be amplified when the bacterin concentration was lower than 12.8 CFU/reaction. The detection limit of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* based on the *phoB* gene sequence established in this study was 12.8 CFU/reaction. With DNA as the template, when the concentration of the

① Corresponding author: LI Jie, E-mail: lijie@ysfri.ac.cn

DNA template was lower than 17.6 fg/reaction, the target band could not be amplified. Thus, the detection limit of specific primers based on the *phoB* gene sequence for *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* was 17.6 fg/reaction. When the gradient dilution of *A. salmonicida* subsp. *masoucida* ATCC27013 bacterin was used as the template, the target band could not be amplified when the bacterin concentration was lower than 23.8 CFU/reaction. Thus, the detection limit of the method for *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, based on the *LOC111476736* gene sequence was 23.8 CFU/reaction. With DNA of ATCC27013 as the template, when the concentration of the DNA template was lower than 27.2 fg/reaction, the target band could not be amplified. Thus, in this study, the detection limit of DNA for *A. salmonicida* subsp. *masoucida* using specific primers designed according to the *LOC111476736* gene sequence was 27.2 fg/reaction. The specificity of the detection method using specific primers based on the *phoB* and *LOC111476736* genes was also determined in this study. Aquaculture pathogens or environmental bacteria, such as *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela*, *Edwardsiella piscicida*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi*, *Aeromonas encheleia*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Bacillus subtilis*, were used as templates for specificity testing. No specific products were found for any of the other pathogens tested. The specific PCR products could only be amplified from the bacterins of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* or *A. salmonicida* subsp. *masoucida*. We also tested the application of detection methods using an experimentally infected turbot as a model. Turbot was infected with *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strain ASS20200608XZ11L or *A. salmonicida* subsp. *masoucida* strain ASM20160705RZ6S by intramuscular injection. All turbot died within 7 days post-infection, and the liver, spleen, and kidney of moribund fish were used as templates. The results showed that the established method could accurately detect *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* or *A. salmonicida* subsp. *masoucida* in the turbot, without nonspecific amplification in the tissues of the healthy turbot. In conclusion, we established a specific PCR method to detect two subspecies of *A. salmonicida*, and these methods could be used as effective tools for investigating the epidemiology of *A. salmonicida*.

Key words *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*; *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*; PCR; Detection