

3 种主要水产病原菌多重 PCR 检测方法的建立

李 晨^{1,2} 王秀华² 黄 捷^{2*}

(¹上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

(²农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 根据目前水产上常见病原菌鳃弧菌 *Vibrio anguillarum*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、迟缓爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* 的毒力相关基因, 选择具有特异性的鳃弧菌调控毒力蛋白表达的 *toxR* (Positive transcriptional regulator) 基因、嗜水气单胞菌中重要的编码气溶素 (Aerolysin) 基因 *aerA*、迟缓爱德华氏菌中编码分泌系统装置蛋白的基因 *evpA*, 分别设计 1 对特异性引物, 建立可同时特异性地检测 3 种菌的多重 PCR 检测体系。对反应条件进行优化并测试了其特异性和灵敏度。实际样品检测证明, 此多重 PCR 体系具有良好的可靠性。

关键词 鳃弧菌 嗜水气单胞菌 迟缓爱德华氏菌 多重 PCR

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)03-0100-07

Multiplex PCR for the detection of three main aquatic pathogens

LI Chen^{1,2} WANG Xiu-hua² HUANG Jie^{2*}

(¹College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

(²Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT A multiplex polymerase chain reaction (PCR) was developed for synchronous detection of three major pathogens of aquatic animals, including *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*. Three important and special virulent genes were selected for the multiplex PCR, such as positive transcriptional regulator *toxR* gene of *V. anguillarum*, aerolysin gene *aerA*, which encodes important virulent factor of *A. hydrophila*, and *evpA* gene, which encodes the apparatus protein of secretion system T6SS of *E. tarda*. The reaction condition was optimized and the specificity and sensitivity was tested for this method. The detection for real samples also proved its reliability.

KEY WORDS *Vibrio anguillarum* *Aeromonas hydrophila*
Edwardsiella tarda Multiplex PCR

随着水产养殖种类的增加和养殖规模的不断扩大, 养殖环境的恶化或养殖模式的不规范, 使得一些水产病害频频发生。目前水产上主要的细菌性病害有对虾养殖中的对虾幼体菌血病、红腿病(弧菌病)、烂眼病、烂鳃病、幼体肠道细菌病、气单胞菌病等(胡超群等 2000; 陈昌福等 2008; 朱香萍等 2008); 河蟹红腿(肢)病、肠道溃疡

国家高技术研究发展计划(863)课题(2006AA100306)、农业部“948”项目(2005-Z50)、农业公益性行业科研专项经费项目(200803012)和基本科研业务费专项资金项目(2007-GY-03)共同资助

* 通讯作者。E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn, Tel: (0532) 85823062-802

收稿日期: 2009-09-14; 接受日期: 2009-12-24

作者简介: 李 晨(1984-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物病原分子学研究。E-mail: lichen1010@sina.com

病、烂鳃病、腐甲穿孔症等(陈昌福等 2008);鱼类细菌性败血症、细菌性肠炎病等(陈昌福等 2008)。这些疾病多由弧菌属 *Vibrio* 中的鳃弧菌 *Vibrio anguillarum*、气单胞菌属 *Aeromonas* 中的嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、爱德华氏菌属 *Edwardsiella* 中的迟缓爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* 等细菌引起。

目前对于这些水产病害多采用药物或疫苗来控制,但是药物的副作用及疫苗的安全性都存在潜在的风险问题,所以在实际养殖中多采用以防为主,防治结合的方针(唐开华等 2008)来预防疾病。能够对病原菌做到提前预警,对水产病害的防治工作非常重要。比较常用的检测方法有生化鉴定、PCR、基因芯片等(冯家望等 2007;秦蕾等 2008;杨壮志等 2008),对多种细菌进行平行检测的多重 PCR 的方法也有所报道,如嗜水气单胞菌和迟缓爱德华氏菌的多重 PCR 方法(邓显文等 2008)、副溶血弧菌及霍乱弧菌多重 PCR 方法(贺晓龙 2006)及一些食品上常见病原菌多重 PCR 方法的建立(陈伟等 2008;焦豫良等 2005;李博等 2008),而可以同时检测水产上弧菌、气单胞菌、迟缓爱德华氏菌的单管多重 PCR 检测方法鲜有报道。本试验期望建立一种可以同时检测水体中的鳃弧菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌的单管多重 PCR 检测方法,实现对3种主要水产病原菌的平行检测,满足实地大批量样品的检测需求,也有助于预警交叉感染的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用菌株

鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 菌株 MN、3101、VAN 为本实验室鉴定和保存,ATCC43305、ATCC43306 购自美国标准菌种收藏所(American Type Culture Collect, ATCC);嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、溶藻胶弧菌 *Vibrio alginolyticus*、副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*、哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*、费氏弧菌 *Vibrio fischeri*、灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 均为本实验室保种;交替假单胞菌 *Pseudoalteromonas* sp. 菌株 05111102、05112302 为本实验室分离;试验中使用的中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis*、斑节对虾 *Penaeus monodon* 均为本实验室购买,作为宿主代表。

1.1.2 试剂与仪器

试验中所用到的 rTaq (5 U/ μ l)、Ex Taq (5 U/ μ l)、DL2000 DNA Marker 均为宝生物(TAKARA)公司产品;离心机为 TG16A-WS 台式高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);琼脂糖凝胶电泳仪为 BAY-GENE BG-Power600(北京百晶生物技术有限公司);凝胶成像仪为 FUJIFILM LAS-3000(日本富士公司),PCR 仪为 Veriti 96-well Thermal Cycler (ABI);水浴使用 DK-8D 三孔电热恒温水槽(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 细菌培养及模板制备

细菌培养采用 2216E 海水培养基,固体培养基添加 2% 琼脂粉。细菌基因组 DNA 提取采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit, 北京天根生化科技有限公司)提取,并用基因分析仪(NanoDrop ND-1000, 美国 NanoDrop)测定 DNA 浓度;虾组织基因组 DNA 提取采用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Marine Animals DNA Kit, 北京天根生化科技有限公司), -20°C 保存备用。

1.3 基因的确定与引物的设计

在 GenBank 上下载 3 种细菌对应的 *toxR*、*aerA*、*evpA* 基因序列,通过 Accelrys gene 2.5 比对分析,选用序列 AB042547、DQ186611、AY424360,设计出 3 对引物,由上海生工生物技术有限公司合成。

1.4 多重 PCR 方法的建立

1.4.1 多重 PCR 的特异性试验

25 μ l 反应体系包括:*toxR*、*aerA* 和 *evpA* 的 3 对引物,每条引物各 0.2 μ mol/L;10 \times PCR buffer (Mg²⁺ free),2.5 μ l;25 mmol/L Mg²⁺,2.0 μ l;2.5 mmol/L dNTP,1.5 μ l;5 U/ μ l rTaq (TAKARA),0.3 μ l;分别用

鳃弧菌 5 种菌株:MN、3101、VAN、ATCC43305、ATCC43306 和溶藻胶弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、费氏弧菌、灿烂弧菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、05111102、05112302 的基因组 DNA,及宿主中国对虾、斑节对虾的基因组 DNA 1.5 μl 做模板。扩增程序设为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳查看结果,并选择鳃弧菌 ATCC43305 的 *toxR*、嗜水气单胞菌的 *aerA* 及迟缓爱德华氏菌的 *evpA* PCR 产物测序(TAKARA)。

1.4.2 多重 PCR 检测方法的建立及条件优化

1.4.2.1 多重 PCR 退火温度的优化

25 μl PCR 体系:鳃弧菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌的基因组 DNA 各 1.0 μl 混合作为模板,其他成分参照 1.4.1。扩增程序设为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,退火温度设置梯度 55、56、57、58、59、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳查看结果,以选择最合适的退火温度。

1.4.2.2 多重 PCR 的 Mg^{2+} 浓度的优化

25 μl PCR 体系:设置 25mmol/L Mg^{2+} 梯度为 1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 μl ;混合模板采用嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌的基因组 DNA 与鳃弧菌-ATCC43305 或 ATCC43306 的基因组 DNA 混合,其他成分参照 1.4.1。扩增程序同 1.4.2.1,即组成 36 种 T_m 值与 Mg^{2+} 浓度的组合,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳查看结果,以选择最佳的 Mg^{2+} 终浓度。

1.4.2.3 多重 PCR 的 dNTP 浓度的优化

25 μl PCR 体系:设置 2.5mmol/L dNTP 梯度为 0.5、1.0、1.5、2.0 μl ,其他成分参照 1.4.2.1。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳查看结果,在 T_m 值居中的情况下选择最佳的 dNTP 终浓度。

1.4.2.4 多重 PCR 引物浓度的优化

25 μl PCR 体系:每对引物终浓度分别定为 0.1、0.2、0.4、0.6 $\mu\text{mol/L}$,其他成分参照 1.4.2.1。扩增程序同 1.4.2.3,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳查看结果,以确定最佳的引物终浓度。

1.4.3 多重 PCR 的灵敏度验证

首先分别测定鳃弧菌 ATCC43306、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌基因组 DNA 的浓度,用无 RNAase 水依次进行 $10^0 \sim 10^9$ 倍的稀释,再依次取 1.0 μl 组合成为混合模板。25 μl PCR 体系:使用保真性强的 5 U/ μl *Ex Taq*,0.3 μl ;10 \times *Ex Taq* PCR buffer (+ Mg^{2+}),2.5 μl ;其余成分同 1.4.1。扩增程序同 1.4.2.3,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳查看结果,验证该多重 PCR 检测方法的灵敏度。

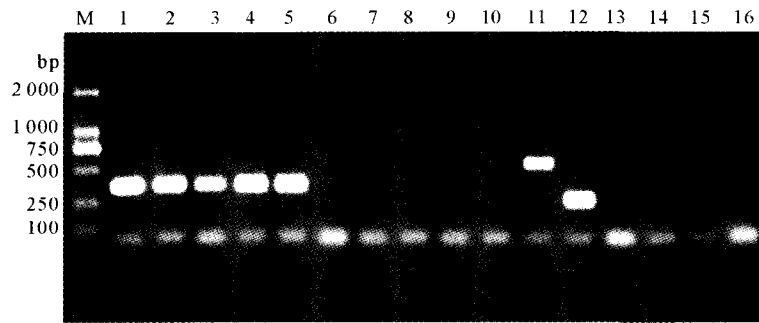
1.5 多重 PCR 方法的实例应用

用某养殖场病鱼的内脏组织在 2216E 海水培养基平板上培养后获取的单菌落扩大培养,再取 1.0 μl 的菌液用无 RNAase 水作 10 倍稀释,取 1.5 μl 做模板,利用多重 PCR 检测体系检验,并做 1 次重复。同时用 16S 通用引物 27F、1492R(分别对应 *E. coli* 16S rRNA 的 8~27 和 1492~1507 碱基)(Suzuki *et al.* 1996)扩增该菌的 16S rDNA 片段,测序(TAKARA)。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 的特异性验证

本试验建立的单管多重 PCR 检测方法可以将目的基因片段成功地扩增,图 1 中的 1~5 泳道分别为鳃弧菌 5 种菌株做模板的 PCR 扩增结果。其中,菌株 MN、ATCC43305 为强毒株,3101、VAN、ATCC43306 为弱毒株。结果表明,此多重 PCR 体系没有强毒株或弱毒株的限制,均可扩增出理想的片段;11 和 12 泳道分别为嗜水气单胞菌的 *aerA* 和迟缓爱德华氏菌的 *evpA* 扩增片段;6~10、13~16 泳道为其他细菌或宿主基因组 DNA 做模板时的 PCR 扩增结果。由图 1 中可以看出,此多重 PCR 体系不与其他细菌及宿主(中国对虾、斑节对虾)基因组 DNA 有扩增反应。



M:DL 2000 DNA marker;1-16泳道扩增物使用的模板依次为:鳃弧菌-MN、3101、VAN、ATCC43305、ATCC43306;溶藻胶弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、费氏弧菌、灿烂弧菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、05111102、05112302、中国对虾、斑节对虾的基因组DNA

M:DL 2000 DNA marker; No 1~16 lanes; Amplified fragments of *V. anguillarum*-MN, 3101, VAN, ATCC43305, ATCC43306; *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fischeri*, *V. splendidus*, *A. hydrophila*, *E. tarda*, 05111102, 05112302, *F. chinensis* and *P. monodon* in order

图1 用多重PCR检测体系扩增不同模板的电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR amplified against various DNA templates

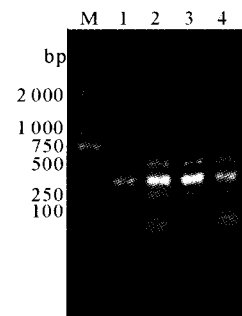
将扩增出的鳃弧菌 *toxR* 片段测序结果在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 中比对,出现的3条同源序列都是鳃弧菌的 *toxR* 序列,且同源率为98%~99%,与目的序列 AB042547 同源率为98%;同样嗜水气单胞菌-*aerA* 片段测序结果 BLAST 后出现的同源序列全是本种 *aerA* 或 Hemolysin gene 序列,与目的序列 DQ186611 同源率为96%;迟缓爱德华氏菌 *evpA* 片段测序结果 BLAST 后4条同源序列分别为迟缓爱德华氏菌的 CP001135 及目的序列 AY424360,同源率为99%,而与同属种鲑鱼爱德华氏菌 *E. ictaluri* 的基因组序列 CP001600 和 AF037441 同源率最高为93%。因此用此多重PCR检测体系可以特异性地扩增出鳃弧菌 *toxR*、嗜水气单胞菌 *aerA*、迟缓爱德华氏菌 *evpA* 的片段,而且不与本实验室现有的其他9株菌及两种宿主基因组DNA间有扩增反应。

2.2 多重PCR条件的优化

经过多次试验,最终选择多重PCR反应的退火温度为58℃;25 μl 反应体系里2.5 mmol/L dNTP最佳用量为1.0 μl,即终浓度0.1 mmol/L(图2)。25 mmol/L Mg²⁺最佳用量为2.0 μl,即终浓度为2.0 mmol/L(图3)。并且它既适用于鳃弧菌强毒株 ATCC43305,也适用于鳃弧菌弱毒株 ATCC43306 分别与嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌基因组DNA的混合模板;引物浓度选择0.2 μmol/L(图4)。至此确定了可以平行检测鳃弧菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌的单管多重PCR检测方法的25 μl 反应体系为:混合模板3.0 μl;引物各0.2 μmol/L;10× PCR buffer (Mg²⁺ free),2.5 μl;25 mmol/L Mg²⁺,2.0 μl;2.5 mmol/L dNTP,1.0 μl;5 U/μl rTaq,0.3 μl;无菌水补齐。扩增程序为:94℃ 4 min;94℃ 20 s,58℃ 30 s,72℃ 40 s,30个循环;72℃ 10 min。

2.3 多重PCR体系30个循环下检测灵敏度的测定

测得所提取鳃弧菌 ATCC43306、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌基因组DNA的浓度分别为125.4、256.0、25.8 ng/μl。260与280 nm处的吸光度比值分别为:2.00、2.03、1.78。当稀释倍数为10³时,即混合模板中含有鳃弧菌 ATCC 43306 基因组DNA 0.125 4ng(125.4 pg)、嗜水气单胞菌基因组DNA 0.256ng(256.0 pg)、

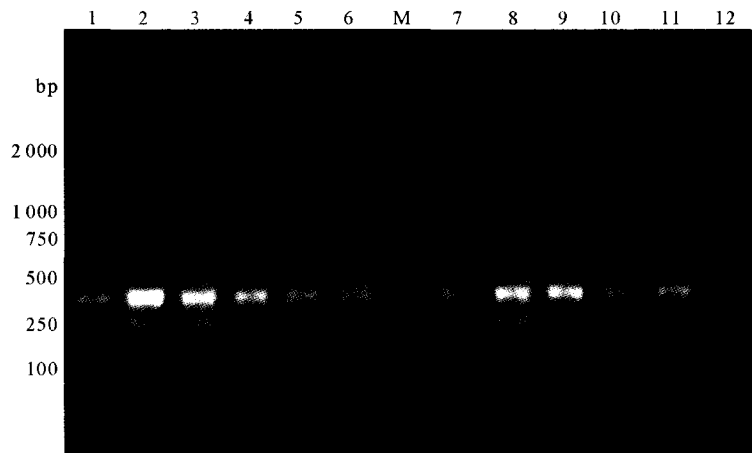


M: DL 2000 DNA marker; 1~4泳道分别使用dNTP浓度为:0.5、1.0、1.5和2.0 μl

M: DL 2000 DNA marker; No 1~4 lanes; different dNTP concentration as 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 μl

图2 多重PCR检测体系dNTP浓度优化

Fig. 2 Optimization of dNTP concentration for the multiplex PCR detection system



M: DL 2000 DNA marker; 1~6 泳道是使用鳗弧菌-ATCC43305、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌混合模板的扩增结果,7~12 泳道是鳗弧菌-ATCC43306、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌混合模板的多重 PCR 扩增结果;1~6 及 7~12 泳道分别使用 Mg^{2+} 体积为:1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 μl
M: DL 2000 DNA marker; No 1~6 lanes: Amplified fragments of *V. anguillarum* strain ATCC43305 and *A. hydrophila*, *E. tarda* mixed template; No 7~12 lanes: Multiplex PCR amplified fragments of *V. anguillarum* strain ATCC43306, *A. hydrophila* and *E. tarda* mixed template; Mg^{2+} gradient volumn was set as 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 μl

图 3 多重 PCR 检测体系 Mg^{2+} 浓度的优化

Fig. 3 Optimization of Mg^{2+} concentration for the multiplex PCR detection system

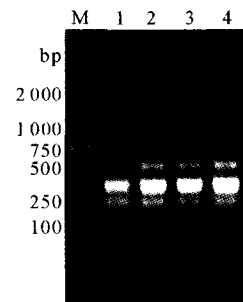
迟缓爱德华氏菌基因组 DNA 0.025 8 ng(25.8 pg)时,鳗弧菌 *toxR* 处有目的条带扩出,嗜水气单胞菌 *aerA* 处也有目的条带扩出,迟缓爱德华氏菌 *evpA* 处有很微弱的目的条带扩出;而当稀释倍数为 10^4 时,只有鳗弧菌 *toxR* 处有微弱的目的条带被扩增出,其他两处有模糊的印迹(图 5)。所以用此多重 PCR 检测体系在扩增 30 个循环后,1% 琼脂糖凝胶电泳显示最低检测水平分别为:鳗弧菌模板 DNA 12.54 pg、嗜水气单胞菌模板 DNA 256.0 pg、迟缓爱德华氏菌模板 DNA 25.8 pg。在多重 PCR 反应体系中基因引物扩增效率的不同,以及单管内多种模板间、多条基因引物间的相互干扰等,都会影响最终多重 PCR 检测方法的灵敏度判定。本次试验结果与沙丹等(2009)建立的 3 种食源性致病菌沙门菌、变形杆菌和金黄色葡萄球菌的多重 PCR 方法灵敏度结果相似,虽没有实时荧光 RT-PCR 方法的灵敏度高(罗卫等 2008),但是此方法相对于其他生化及生物学方法依然有高效、高产、低成本、速度快等优点,对致病菌的监测及提前预警具有重要的意义。

2.4 实际样品的检测结果

如图 6 所示两次采用此多重 PCR 体系检测的结果中,都只有 1 条带,且位置显示为鳗弧菌的 *toxR* 目的片段,而该菌的 16S rDNA 测序结果与 GenBank 上公布的鳗弧菌的 16S rDNA 序列同源率高达 100%。说明此病鱼感染的极可能是鳗弧菌,也进一步验证了本试验建立的多重 PCR 检测方法的可靠性。

3 讨论

多重 PCR (Multiplex PCR), 又称多重引物 PCR 或复合 PCR, 它是在同一 PCR 反应体系里加入两对以上引



M: DL 2000 DNA marker; 1~4 泳道分别是使用不同终浓度引物的多重 PCR 扩增结果,分别为 0.1、0.2、0.4、0.6 $\mu mol/L$

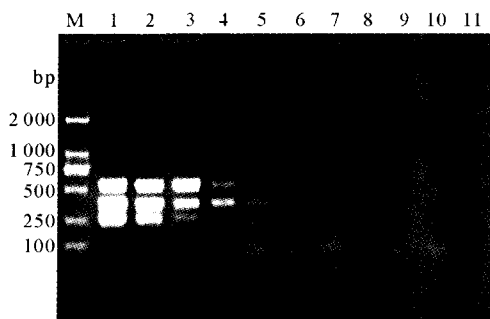
M: DL 2000 DNA marker; No 1~4 lanes: Different concentrations of primers used in multiplex PCR as 0.1, 0.2, 0.4 and 0.6 $\mu mol/L$

图 4 多重 PCR 检测体系引物浓度的优化

Fig. 4 Optimization of primer concentrations for the multiplex PCR detection system

物,同时扩增出多个核酸片段的PCR反应,其反应原理、反应试剂和操作过程与一般PCR相同。最早由 Chamberlian 等于 1988 年首次提出来,目前已被广泛应用于医学及生物领域,包括基因敲除分析、突变、多态性分析、定量分析、RNA 检测及微生物耐药检测等(赵红庆等 2007),不仅是科研的主要手段,也具有很高的实用价值。影响多重 PCR 的因素有很多,其中 Mg^{2+} 的浓度很关键,所以在引物设计相对特异的前提下,实现对多重 PCR 体系中各条件的摸索,尤其是 Mg^{2+} 浓度的优化,是建立起高效、准确的多重 PCR 检测体系的必然过程。

弧菌科 *Vibrionaceae* 细菌,广泛存在于海水、淡水和水生动物中,其中某些种对人、鱼、鳗、蛙、蟹及其他动物有致病性(刘洪等 2007;张保强等 2006),如鳗弧菌、副溶血弧菌等就具有很强的致病力(戈蕾等 2007)。鳗弧菌的保守基因 *toxR* 可以调节毒力蛋白的表达,并且具有一定的种特异性(Okuda *et al.* 2001),

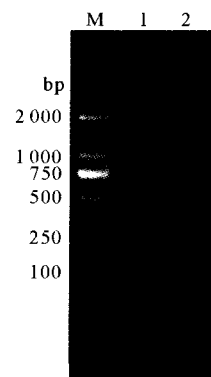


M;DL 2000 DNA marker; 1-10 泳道是稀释 $10^0 \sim 10^9$ 倍后的混合模板多重 PCR 扩增的结果; 11 泳道是阴性对照

M;DL 2000 DNA marker; No 1~10 lanes: Amplification results of multiple PCR against various concentrations of mixed DNA templates with dilution of $10^0 \sim 10^9$ fold; ; No 11 lane: Negative control

图5 验证多重PCR检测体系灵敏度的电泳结果

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis to verify the sensitivity of multiplex PCR



M;DL 2000 DNA marker; 1~2 泳道是样品为模板的多重 PCR 扩增结果,条带位置为鳗弧菌的 *toxR* 片段位置

M;DL 2000 DNA marker; No 1~2 lanes: Amplification results of multiplex PCR against the same sample template, and the stripe was fragment of *V. anguillarum* gene *toxR*

图6 多重PCR体系检测实际样品的电泳结果

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR amplified by the sample template

许拉等(2008)曾利用副溶血弧菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌和溶藻胶弧菌的 *toxR* 基因将它们区分开。所以试验中选择此基因不仅可用于鳗弧菌的鉴定,而且可以为下一步该菌的毒力分析做铺垫。嗜水气单胞菌也是水产养殖上常见的病原菌,尤其是在淡水渔业中(邓显文等 2008);其主要毒力基因为溶血性基因(Hemolysin gene),其中的气溶素基因 *aerA* 研究的较深(朱大玲等 2004)。本试验选用 *Aer* 毒素作为研究对象之一,对该菌的快速诊断、流行病调查及公共卫生检测、检疫等方面具有重要作用(李莲瑞等 2004)。迟缓爱德华氏菌是一种重要的人畜共患病的病原菌,也是爱德华氏菌属中唯一感染人的成员,其毒力机制及毒力相关基因的研究都有不同程度的开展(Abbott *et al.* 2006)。迟缓爱德华氏菌的毒力机制也比较复杂,这里选择其中一个重要的分泌系统 Evp 毒力蛋白编码基因 *evpA*(Cellular protein gene)(Srinivasa *et al.* 2004),和其管家基因 *mukF* 一样,都可用于迟缓爱德华氏菌的鉴定及毒力分析(Mohanty *et al.* 2008)。

本试验根据已有的3种水产病原菌鳗弧菌、嗜水气单胞菌及迟缓爱德华氏菌毒力相关基因的资料,选择3个相对特异性的基因 *toxR*、*aerA*、*evpA*,建立了单管多重PCR检测体系,并对反应条件进行了优化。采用模板稀释方法判定此多重PCR检测方法的最低检测水平分别为:鳗弧菌模板DNA 12.54pg、嗜水气单胞菌模板DNA 256.0pg、迟缓爱德华氏菌模板DNA 25.8pg。此方法的建立不仅可将这3种主要的水产病原菌从本实验室现存的14株菌中特异性地鉴定出,而且比一般的生化检测方法省时、灵敏。它既跳开了传统的分离培养、生化试验等的繁琐过程,又可在较短的时间里,利用一步单管PCR做出判断。虽然鲜有迟缓爱德华氏菌感染对虾的报道,但多有此菌感染鱼的报道;而鳗弧菌、嗜水气单胞菌却是中国对虾及斑节对虾主要的致病菌(李天

道等 1998;徐晓津等 2001),所以试验中选用两种对虾的基因组 DNA 作为模板,来检验此多重 PCR 检测方法的特异性。结果证明,这些引物不与宿主基因组 DNA 有扩增反应,这样就减少了宿主基因组 DNA 对 PCR 结果判断的干扰,也大大提高了此方法在实际应用中的特异性和灵敏性。并且目前利用宿主基因组 DNA 作为模板来验证多重 PCR 检测方法特异性的方式鲜有报道,本试验的开展正好作为一个补充,为病原的检测手段提供一种可行的验证方案。

当前基因芯片技术作为一种新兴的生物技术,已经在水产病害检测中得到了发展和应用(许拉等 2008),可以把多重 PCR 技术与基因芯片技术相结合使用,一方面基因芯片可以检验 PCR 的特异性,另一方面多重 PCR 的应用也节减了基因芯片技术中样品准备的过程和成本,为本方法的后续应用提供了广阔的发展空间。

参 考 文 献

- 戈蕾,黄健,李琪. 2007. 鳃弧菌毒力相关基因的研究进展. 微生物学通报, 34(3): 584~586
- 邓显文,谢芝勋,谢志勤,刘加波,庞耀珊,谢丽基. 2008. 多重聚合酶链反应快速检测嗜水气单胞菌和爱德华菌. 中国人兽共患病学报, 24(8): 752~754
- 冯家望,王小玉,李丹琳,唐食明,刘锐. 2007. 水产品中致病性弧菌 PCR 快速检测研究. 中国国境卫生检疫杂志, 30(6): 383~386
- 刘淇,李海燕,王群,刘萍,戴芳钰,李健. 2007. 梭子蟹牙膏病病原菌——溶藻弧菌的鉴定及其系统发育分析. 海洋水产研究, 28(4): 9~13
- 朱大玲,李爱华,钱冬,汪建国. 2004. 嗜水气单胞菌毒力基因的研究进展. 水生生物学报, 28(1): 80~84
- 朱香萍,张再生,刘宗柱. 2008. 对虾鳃弧菌卵黄抗体(IgY)的制备及其对人工感染的保护研究. 海洋科学, 32(2): 25~28
- 许拉,黄健,戈蕾,杨冰. 2008. 同时检测两种对虾病毒和 4 种弧菌的同步 PCR 方法的建立. 海洋水产研究, 29(4): 39~45
- 许拉,黄健,杨冰. 2008. 病原检测基因芯片应用及在水产病害检测的前景. 海洋水产研究, 29(1): 109~114
- 张保强,董力群,王逊,刘德辉. 2006. 致病性弧菌的研究概况. 职业与健康, 22(24): 2170~2172
- 李博,陈福生,王小红,邵彦春,朱胜梅. 2008. 多重 PCR 检测食品中的金黄色葡萄球菌、志贺菌和沙门菌. 卫生研究, 37(4): 438~442
- 李天道,于佳,俞开康. 1998. 4 种弧菌对中国对虾的致病性研究. 海洋湖沼通报, 1: 57~64
- 李莲瑞,罗红斌,卢强,刘明远. 2004. 嗜水气单胞菌 Aer 毒素的研究进展. 塔里木农垦大学学报, 16(3): 46~51
- 杨壮志,李定霏,王远敬. 2008. 应用 PCR 快速诊断黄鳍嗜水气单胞菌败血症. 水产养殖, 2: 11~13
- 沙丹,凌霞,肖勇,吴家林,张敬平. 2009. 3 种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立及初步应用. 检验医学, 24(3): 177~181
- 陈伟,杨迎伍,邓伟,李正国. 2008. 3 种致病菌多重 PCR 检测体系的建立及应用. 食品与发酵工业, 34(9): 132~136
- 陈昌福,孟长明. 2008. 水产养殖动物细菌性疾病及其防治方法(1). 渔业致富指南, 13: 70
- 陈昌福,孟长明. 2008. 水产养殖动物细菌性疾病及其防治方法(2). 渔业致富指南, 14: 72~73
- 陈昌福,孟长明. 2008. 水产养殖动物细菌性疾病及其防治方法(4). 渔业致富指南, 16: 73~74
- 陈昌福,孟长明. 2008. 水产养殖动物细菌性疾病及其防治方法(6). 渔业致富指南, 18: 63~64
- 陈昌福,孟长明. 2008. 水产养殖动物细菌性疾病及其防治方法(3). 渔业致富指南, 15: 71~72
- 罗卫,李惠芳,刘蕊,陈焕春,范万红,刘宗晓,田飞焱,王侃,吕建强. 2008. 鱼类神经坏死病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立和应用. 中国水产科学, 15(3): 506~510
- 胡超群,陶宝华. 2000. 对虾弧菌病及其免疫预防的研究进展. 热带海洋, 19(3): 84~94
- 贺晓龙. 2006. 霍乱弧菌及副溶血弧菌复合 PCR 检测方法的建立. 青海大学学报(自然科学版), 24(2): 59~61
- 赵红庆,苑锡铜,黄留玉. 2007. 多重 PCR 技术在病原检测中的应用. 生物技术通讯, 18(5): 863~865
- 唐开华,何宝富. 2008. 水产养殖病害的发生及防治措施. 现代农业科技, (15): 294, 297
- 徐晓津,王军. 2001. 我国养殖对虾细菌性疾病. 河北渔业, 3: 22~25, 41
- 秦蕾,徐静,张正. 2008. PCR 法制备地高辛标记探针斑点杂交检测鳃弧菌. 淮海工学院学报(自然科学版), 17(2): 66~69
- 焦豫良,张兴群,李振勇,李智涛,吕文川,郭志武,崔天星,邵大晓,景建洲. 2005. 6 种食品致病菌的多重 PCR 检测. 临床检验杂志, 23(4): 256~258
- Abbott, S. L., and Janda, J. M. 2006. The Genus *Edwardsiella*. Prokaryotes, 6: 72~89
- Mohanty, B. R., and Sahoo, P. K. 2008. Edwardsiellosis in fish; a brief review. J. Bioscience, 32(7): 1331~1344
- Okuda, J., Nakai, T., Chang, P. S., Oh, T., Nishino, T., Koitabashi, T., and Nishibuchi, M. 2001. The *toxR* gene of *Vibrio (Listonella) anguillarum* controls expression of the major outer membrane proteins but not virulence in a natural host model. Infection and Immunity, 69(10): 6091~6101
- Srinivasa, P. S., Rao, Y. Y., Yuen, P. T., and Ka, Y. L. 2004. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. Mol. Microbiol. 53(2): 573~586
- Suzuki, M. T., and Giovannoni, S. T. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62(2): 625~630