

# 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)幼体病原肠杆菌 PCR 检测技术的建立与应用\*

陈雪峰 杨国梁<sup>①</sup> 高强 夏正龙 濮剑威 慎佩晶 黄振远

(浙江省淡水水产研究所 国家罗氏沼虾遗传育种中心 浙江省淡水水产遗传育种重点实验室 湖州 313001)

**摘要** 根据罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)幼体培育期主要细菌性病原阴沟肠杆菌 *omp A* 基因序列、产气肠杆菌 *gry B* 基因序列设计特异性引物,通过对 PCR 扩增产物进行测序鉴定与特异性和敏感性试验,建立了两种病原菌的 PCR 快速检测方法,并对发病样品进行了检测。结果显示,设计的阴沟肠杆菌与产气肠杆菌检测引物能分别扩增出与预计大小一致的 385 bp 和 201 bp 的特异性片段,与其余供试菌株无交叉反应。两种检测方法的灵敏度分别为  $10^3$  CFU/ml 和  $10^2$  CFU/ml。罗氏沼虾幼体样品的检测结果与实际发病情况一致,建立的检测方法也可直接对样品进行 PCR 检测,而无需细菌分离培养。本研究建立的阴沟肠杆菌与产气肠杆菌 PCR 检测方法具有较高的特异性和灵敏度,可缩短检测时间,该方法的建立对罗氏沼虾幼体病原的快速诊断、分子流行病学的调查及无特定病原(SPF)群体的建立具有重要意义。

**关键词** 罗氏沼虾; 阴沟肠杆菌; 产气肠杆菌; PCR 检测

**中图分类号** S941 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0099-06

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)为世界最大淡水虾类,具有重要的经济价值,它是世界上许多热带和亚热带地区内陆水产养殖中最重要的经济甲壳动物之一(杨国梁等,2008)。目前,我国是全球罗氏沼虾产业最大国,相关产值在 60 亿元以上(Yang *et al.*, 2012)。浙江省湖州市是我国最大的罗氏沼虾育苗基地,年育苗量占全国罗氏沼虾虾苗生产量的 60%以上。2009 年,我国罗氏沼虾养殖产量达 14.4 万 t,创历史新高。然而,在罗氏沼虾产业快速发展的同时,因苗种供不应求而出现的跨省、跨区域的调苗所带来的疫病风险于 2010 年在全国罗氏沼虾育苗场暴发,此病危害特别严重,90%以上的罗氏沼虾育苗场因相继感染发病而停产,造成主要育苗区的直接经济损失达 2 亿元。该病主要表现为:幼体培育到第 7 天时,食欲和活力下降,空胃,颜色发黑。情况特别严重时,

在幼体培育至 3-4 d 即表现出明显病症,在培育到第 7 天,幼体倒池后发生大量死亡,故该病亦被形象称为“7 日病”。在随后几年的流行病学调查中,该病在部分育苗场依然时有暴发。浙江省淡水水产遗传育种重点实验室通过反复的人工回感实验,发现导致罗氏沼虾幼体发病的主要细菌性病原为阴沟肠杆菌和产气肠杆菌(结果待发表)。为有效遏制疾病发生、减少经济损失,迫切需要建立一种特异、敏感的检测方法,以实现病原的快速诊断与针对性防治。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 本实验所用菌株阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) 315B 株、产气肠杆菌(*Enterobacter*

\* 国家科技支撑计划项目(2012BAD26B04)、浙江省重大科技专项(2012C12907)、浙江省淡水养殖重点科技创新团队项目(2010R50026-02)和湖州市重大科技专项(2011ZD2005)共同资助。陈雪峰, E-mail: chenfenghailan@126.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 杨国梁, 研究员, E-mail: yg10572@163.com

收稿日期: 2014-08-05, 收修改稿日期: 2015-01-07

*aerogenes*) NTH01 株、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 株、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*) CX1 株、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) CX2 株、粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*) NTH03 株、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) NTH071 株、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*) NTH072 株、腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*) NTH04 株均为本实验室保存。其中大肠杆菌、阪崎肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、粘质沙雷菌与阴沟肠杆菌、产气肠杆菌为同属于肠杆菌科的近缘种,嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、腐败希瓦氏菌与阴沟肠杆菌、产气肠杆菌亲缘关系较远。上述菌株的选择有利于验证检测引物的特异性。所有菌株均保存在含 15%甘油缓冲液的保种管中, -80℃ 冰箱保存。

**1.1.2 试剂** 10×PCR Buffer(含  $Mg^{2+}$ )、2.5 mmol/L 的 dNTPs、5 U/μl *rTaq* 酶、DL2000 Marker、PCR 产物纯化试剂盒、TA 克隆试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,琼脂糖、Gelsafe 核酸染料购自上海捷瑞生物工程有限公司。

**1.1.3 引物** 通过生物信息学分析,从阴沟肠杆菌基因组 DNA 序列中筛选出保守且特异的 *omp A* 基因,以其为阴沟肠杆菌检测靶基因;从产气肠杆菌基因组 DNA 序列中筛选出保守且特异的 *gry B* 基因,以其为产气肠杆菌检测靶基因。将基因序列导入 Primer 5.0 软件中进行引物设计,要求 GC 含量在 40%–60%之间,扩增产物长度为 150–500 bp。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。设计阴沟肠杆菌检测引物 F: 5'-CAT GAC ACC GGT GTT TCC CCA GT-3'; R: 5'-CGG TCG GTG AAG CCC AGA ACC ACT A-3'。设计产气肠杆菌检测引物 F: 5'-GTA ACC GGT GAA ACC GAA AGC-3'; R: 5'-GAT GCC GCC TTC GTA GTG GAA ATG G-3'。

## 1.2 方法

**1.2.1 细菌基因组 DNA 提取** 将检测菌株接种于 5 ml 营养肉汤液体培养基中,于 35℃ 恒温摇床中振荡培养 12 h 增菌后,取 1 ml 菌液,放入 1.5 ml 无菌离心管中;12000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 500 μl 灭菌双蒸水,用移液器轻轻吹打,重悬菌体,12000 r/min 离心 15 min,弃上清液,收集细菌;加入 100 μl 灭菌双蒸水,用移液器轻轻吹打,重悬菌体,置于沸水中煮 15 min,立即取出,在 -20℃ 放置 30 min。随后 35℃ 解冻,12000 r/min 离心 15 min,取上清液置于 4℃ 备用或 -20℃ 保存。

**1.2.2 PCR 反应体系与条件** 20 μl 反应体系:10×PCR Buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 2 μl,2.5 mmol/L 的 dNTP 1.6 μl,5 U/μl *rTaq* 酶 0.16 μl,20 μmol/L 引物对 0.8 μl,模板 DNA 1–2 μl,最后用灭菌双蒸水补至 20 μl;PCR 反应程序:94℃ 预变性 4 min;进入循环,94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,30 个循环;72℃ 延伸 5 min,降温至 4℃,结束。PCR 扩增产物,用 1.5% 琼脂糖凝胶在 120 V 电压下电泳 30 min,凝胶成像系统观察并照相记录。

**1.2.3 PCR 产物克隆测序及同源性检索** 扩增产物经电泳分离,切下目的条带,用胶回收试剂盒(TaKaRa)纯化,与 pMD18-T 载体(TaKaRa)连接,16℃ 过夜,转化到 DH5α 感受态细胞中,采用蓝白斑挑选阳性克隆,使用 *EcoR* I、*Hind* III(TaKaRa)双酶切验证,阳性克隆送上海捷瑞生物公司测序。所测序列用 DNASTar 软件包中的 EditSeq 进行序列拼接,将拼接好的序列用 NCBI 服务器上的 Blast 软件进行同源性检索。

**1.2.4 特异性检测** 以所有供试菌株提取的基因组 DNA 为模板,DNA 模板统一稀释至 50 ng/μl。用设计的阴沟肠杆菌与产气肠杆菌特异性引物分别对供试菌株进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,检验扩增引物的特异性。

**1.2.5 灵敏度检测** 接种阴沟肠杆菌、产气肠杆菌于 3 ml 营养肉汤液体培养基中,置于 35℃ 恒温摇床中振荡培养 12 h 增菌后,平板法计数得到细菌浓度为  $10^8$  CFU/ml,用灭菌双蒸水以 10 倍稀释法进行倍比稀释,提取各梯度菌液 DNA 模板进行 PCR 扩增,凝胶电泳检测扩增产物,紫外灯照射下观察凝胶电泳结果。

**1.2.6 发病罗氏沼虾幼体病原检测** 采集发病幼体 5 尾,用无菌生理盐水反复冲洗其表面 3–5 次后,匀浆处理,无菌操作条件下,取匀浆液涂布于普通营养肉汤琼脂培养基,于 30℃ 培养箱中过夜培养,挑取优势菌株,增菌培养后,按 1.2.1 的方法提取细菌基因组 DNA 作为 PCR 检测模板,以灭菌双蒸水为阴性对照,阴沟肠杆菌(产气肠杆菌)菌株为阳性对照,进行 PCR 扩增。

将检测到病原阳性的幼体匀浆液置于沸水中煮 15 min,立即取出,在 -20℃ 放置 30 min。随后 35℃ 解冻,12000 r/min 离心 15 min,取上清液作为 PCR 检测模板,进行 PCR 扩增。

## 2 结果

### 2.1 引物扩增结果验证

用扩增阴沟肠杆菌 *omp A* 基因序列的引物对罗

氏沼虾幼体阴沟肠杆菌的基因组 DNA 进行扩增, PCR 产物经纯化、克隆、测序, 所得序列结果见图 1。序列长度为 385 bp, Blast 比对表明, 该片段为预期靶标片段, 属于阴沟肠杆菌 *omp A* 基因序列的一部分。

```
CGGTCGGTGAAGCCCAGAACCCTACGGAACCGTCTTTAGG
ATCCAGGTTGCTCAGCTGGGTGTACAGCTGATCCAGTGCCTG
CTGGCCTTCTGGTTTCAGAGTCGCTTTGTTGAAGTTGAACAG
AACGTCAGACTTCAGAGTAAAGTGCTTGGTCTGTACTTCTGG
AGCTGGAGCCGGCGCTGGAGCAACAACCTGGTGTGCATCTT
CCTGCTGCCGAAACGGTAGGAAACACCTACGCTCAGCATGC
CGTTGTCTGGACGAACGCCAACGGTAGCACCGTCGCCGATG
TTGTTAACCCACTGGTATTCCAGACGGGTAGCGATGTCACGG
GTCATAGCCCACTCAACGCCACCAGCGAATACTGGGGAAAC
ACCGGTGTCATG
```

图 1 阴沟肠杆菌 PCR 扩增产物测序结果

Fig.1 The sequence result of PCR product for *E. cloacae*

用扩增产气肠杆菌 *gry B* 基因序列的引物对罗氏沼虾产气肠杆菌的基因组 DNA 进行扩增, PCR 产物经纯化, 克隆测序, 所得序列结果见图 2, 序列长度为 201 bp, Blast 比对表明该片段为预期靶标片段, 属于产气肠杆菌 *gry B* 基因序列的一部分。

```
GTAACCGGTGAAACCGAAAGCACCGGTACCATGGTGCCTT
CTGGCCAAGCCTGGAACCTTTACCAGCGTCACTGAATTCGA
ATACGAAATCCTGGCGAAACGCTGCGCGAGCTGTCGTTCT
CAACTCCGGGGTCTCTATCCGCTGCGGATAAGCGCGACGG
CAAAGAAGACCATTTCCACTACGAAGGCGGCATC
```

图 2 产气肠杆菌 PCR 扩增产物测序结果

Fig.2 The sequence result of PCR product for *E. aerogenes*

## 2.2 方法特异性

用设计的阴沟肠杆菌特异引物对所有供试菌株进行 PCR 扩增, 结果见图 3, 仅阴沟肠杆菌出现目的片段, 其余菌株无扩增结果。同样, 用设计的产气肠杆菌特异引物对所有供试菌株进行 PCR 扩增, 结果见图 4, 仅产气肠杆菌出现目的片段, 其余菌株无扩增结果。本研究建立的两种病原菌 PCR 检测方法特异性均较强。

## 2.3 方法灵敏度

阴沟肠杆菌检测方法的灵敏度测试结果见图 5, 相应检测细菌浓度为  $10^3$  CFU/ml。产气肠杆菌检测方法灵敏度测试结果见图 6, 相应检测细菌浓度为  $10^2$  CFU/ml。

## 2.4 样品 PCR 检测

2011 年 3 月, 对湖州两个发病严重的育苗场进

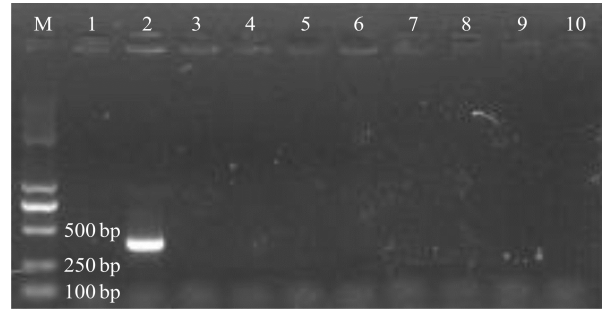


图 3 阴沟肠杆菌引物特异性检测

Fig.3 The specificity of *E. cloacae* primers

M. Marker; 1. 阴性对照; 2. 阴沟肠杆菌; 3. 产气肠杆菌; 4. 大肠杆菌; 5. 阪崎肠杆菌; 6. 弗氏柠檬酸杆菌; 7. 粘质沙雷菌; 8. 嗜水气单胞菌; 9. 温和气单胞菌; 10. 腐败希瓦氏菌

M. Marker; 1. Negative control; 2. *E. cloacae*; 3. *E. aerogenes*; 4. *E. coli*; 5. *E. sakazakii*; 6. *C. freundii*; 7. *S. marcescens*; 8. *A. hydrophila*; 9. *A. sobria*; 10. *S. putrefaciens*

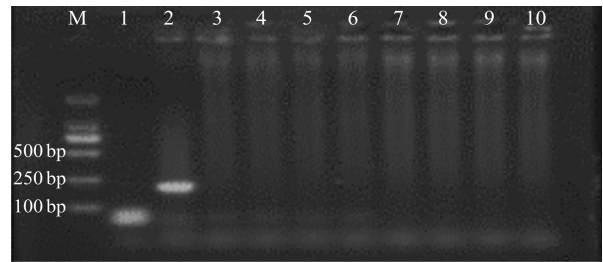


图 4 产气肠杆菌引物特异性检测

Fig.4 The specificity of *E. aerogenes* primers

M. Marker; 1. 阴性对照; 2. 产气肠杆菌; 3. 阴沟肠杆菌; 4. 大肠杆菌; 5. 阪崎肠杆菌; 6. 弗氏柠檬酸杆菌; 7. 粘质沙雷菌; 8. 嗜水气单胞菌; 9. 温和气单胞菌; 10. 腐败希瓦氏菌

M. Marker; 1. Negative control; 2. *E. aerogenes*; 3. *E. cloacae*; 4. *E. coli*; 5. *E. sakazakii*; 6. *C. freundii*; 7. *S. marcescens*; 8. *A. hydrophila*; 9. *A. sobria*; 10. *S. putrefaciens*

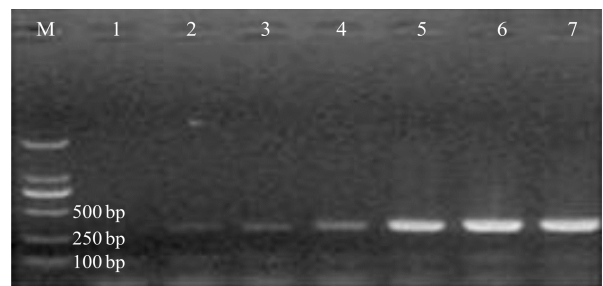


图 5 阴沟肠杆菌 PCR 检测体系的灵敏度

Fig.5 The sensitivity of PCR detection for *E. cloacae* DNA

M. Marker; 泳道 1-7. 菌液浓度梯度分别为  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$  和  $10^8$  CFU/ml

M. Marker; Lane 1-7. The gradient concentrations of DNA templates of *E. cloacae*  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  CFU/ml, respectively

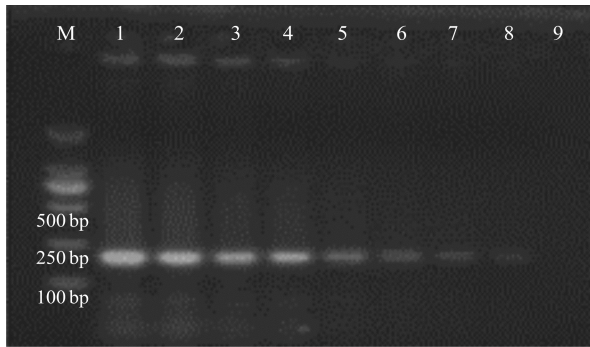


图6 产气肠杆菌 PCR 检测体系的灵敏度

Fig.6 The sensitivity of PCR detection for *E. aerogenes* DNA

M. Marker; 泳道 1-9. 菌液浓度梯度分别为  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  和  $10^0$  CFU/ml

M. Marker; Lanes 1-9. The gradient concentrations of DNA templates of *E. aerogenes*  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  CFU/ml, respectively

行病原检测。随机选择来自育苗场 A 编号为 304a、304b、304c、304d、304e 的幼体与育苗场 B 编号为 W1、W2、W3、W4 的幼体，每个编号幼体取样 5 尾，幼体匀浆后涂板，细菌分离后，进行两种病原菌的检测(表 1)。不经细菌分离，PCR 直接检测上述幼体中病原菌携带情况的结果见图 7。PCR 检测的结果与出现临床症状的结果相吻合，同时，生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列同源性均与 PCR 检测结果一致(结果待发表)。本研究建立的检测方法能快速、准确地确定病原，为临床的对症治疗奠定基础。

### 3 讨论

#### 3.1 检测方法特异性

病原的快速、特异检测能够为临床针对性防控提

表 1 罗氏沼虾幼体样品病原检测结果

Tab.1 Results of pathogen detection in *M. rosenbergii* larvae samples

育苗场 Hatcheries	幼体编号 Larval code	优势菌株 Predominant strain	生理生化鉴定 Biochemistry test	16S rRNA 基因同源结果 Bacterial identification by 16S rRNA gene	PCR 检测结果 Result of PCR test	
					阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>
A	304a	4a1	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-
	304b	4b1	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-
	304c	4c1	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-
	304d	4d1	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	-	+
	304e	4e1	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-
B	W1	W11	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	-	+
	W2	W21	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	-	+
	W3	W31	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-
	W4	W41	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-

供可靠的信息，避免防治的盲目性(倪梦丽等, 2013)。在水产动物病害的研究中，建立了许多病原微生物的快速 PCR 检测方法(李晨等, 2010; 许拉等, 2008)，对水产动物的病害防治与病害预警起到了积极的作用。邓冠华等(2011)、李宝明等(2009)以 16S rRNA 基因为靶基因，建立了阴沟肠杆菌 Real-time PCR 检测方法与产气肠杆菌基因芯片检测方法。本研究分别以 *omp A* 与 *gry B* 基因作为阴沟肠杆菌、产气肠杆菌的检测靶基因，建立了 PCR 检测方法，经过特异性验证，与同属近缘种间菌种的扩增无交叉性；PCR 产物经过克隆测序，所测序列经 Blast 同源搜索后，证实为检测靶基因序列的一部分，表明本方法的引物特异性强。相对已经建立的基于 Real-time PCR 和基因芯片的检测方法，本研究建立的普通 PCR 检测方法，实

验成本与实验技术要求都相对较低，检测时效高，非常适合在基层罗氏沼虾育苗场使用。

#### 3.2 检测方法灵敏性

在水产动物病原菌的研究中，病原菌的数量级是引起疾病暴发的关键因素之一，当病原菌在水产动物体内或养殖环境中达到一定数量级后，就会表现出致病性，因而检测方法灵敏度的高低直接影响能否实现对病害的提前防控。本研究建立的阴沟肠杆菌与产气肠杆菌 PCR 检测方法，灵敏度测定显示，该两种菌的最低检出下限分别为  $10^3$  CFU/ml 和  $10^2$  CFU/ml，灵敏度较高。在水产动物中，尚无病原菌数量级在  $10^2$ – $10^3$  CFU/ml 即导致病害发生的报道，将该两种菌对罗氏沼虾幼体进行感染试验，在育苗水体中阴沟肠杆菌

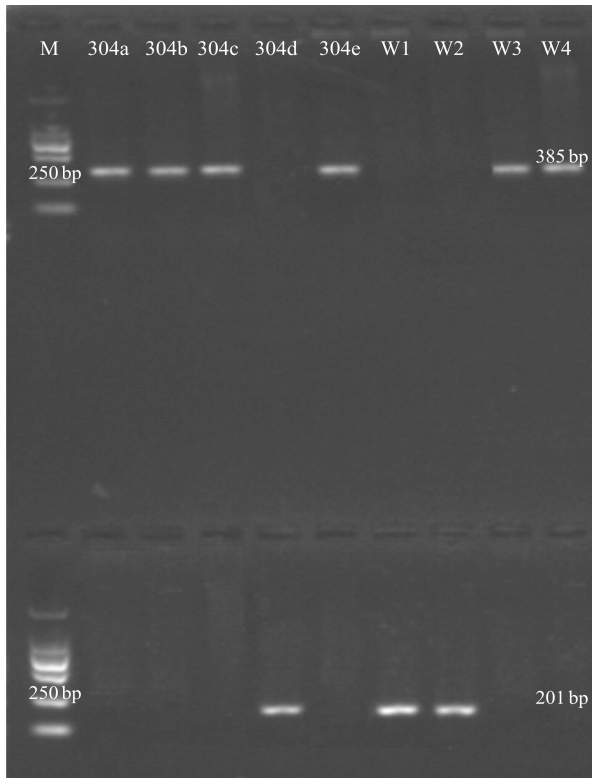


图 7 阴沟肠杆菌与产气肠杆菌阳性样品直接 PCR 结果  
Fig.7 PCR results of *E. cloacae* and *E. aerogenes* positive samples

与产气肠杆菌浓度达  $10^5$  CFU/ml 时, 幼体开始出现与生产中一致的病症, 而本研究建立的检测方法检出下限为  $10^3$  CFU/ml 和  $10^2$  CFU/ml, 可以实现病害的提前预警。此外, PCR 产物条带的强弱与细菌的浓度成正比, 因此, 检测结果也可以用来初步判断幼体感染病原菌程度的强弱。

### 3.3 检测方法快速性

一般常规的细菌分离鉴定方法需要经过细菌分离、形态学鉴定、生理生化鉴定乃至细菌 16S rRNA 基因序列的扩增与测序, 至少需要 5-7 d 的时间, 诊断时间长, 贻误病害的防控时机(梁万文等, 2007)。通过建立目标病原的快速 PCR 方法, 根据目的产物的有无进行病原快速诊断, 已成为水产动物病原诊断的重要手段(张世秀等, 2006)。刘天强等(2013)建立了鲷爱德华氏菌 PCR 快速诊断方法, 可在 5 h 内对患病鱼进行精准的诊断。张凤萍等(2008)建立了养殖刺参腐皮综合征病原灿烂弧菌 PCR 检测方法, 可以在不分离细菌的情况下, 直接检测病灶组织病原感染情况。用本研究建立的阴沟肠杆菌与产气肠杆菌 PCR 检测方法, 对两个育苗场的患病幼体进行检测, 直接水煮法提取样品中细菌基因组 DNA 而后检测, 与通

过先分离细菌、提取细菌基因组 DNA 再检测的结果一致, 前者仅需约 3 h 左右, 而后者得出检测结果的时间需 2 d。该方法在缩短了检测时间与简化检测步骤的同时, 特异性、精准度不变, 为罗氏沼虾育苗期幼体病害的防控赢得充足的时间。

### 3.4 检测方法的现实意义

病害已经成为罗氏沼虾产业进一步发展的主要瓶颈, 病害的发生时常使育苗、养殖生产遭受巨大的经济损失(Li *et al*, 2005; Chen *et al*, 2001), 同时对罗氏沼虾育种、保种工作也具有较大的危害。阴沟肠杆菌与产气肠杆菌为革兰氏阴性菌, 是重要的条件致病菌。目前, 对该菌的研究主要集中在该菌对人类与动物的致病性以及该菌耐药机制(Robicsek *et al*, 2006; Zhou *et al*, 2012)。有关它们对水产动物的致病性报道还非常少, 仅见 Thillai 等(2008)报道了阴沟肠杆菌对健康鲮鱼(*Mugil cephalus*)具有较强的致病性, 鲮鱼感染该菌会造成大量死亡。在罗氏沼虾育苗中, 这两种菌都会造成幼体的大量死亡, 影响虾苗培育的成活率, 在对这两种细菌防控的过程中发现, 早期诊断出病原菌的存在是防控的关键, 通过早发现, 及时治疗, 能够保障育苗成活率, 对虾苗场提高出成率和虾苗质量意义重大, 对遗传育种中心和良种场建立 SPF 群体意义更大。

## 参 考 文 献

- 邓冠华, 郑璇, 胡一敏, 等. 应用基因芯片快速检测临床常见细菌. 中华检验医学杂志, 2011, 34(11): 1012-1016
- 许拉, 黄健, 杨冰. 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, 2008, 29(1): 109-114
- 刘天强, 黄冠军, 刘衍鹏, 等. 鲷爱德华氏菌常规 PCR 检测体系的建立. 淡水渔业, 2013, 43(4): 76-79
- 李晨, 王秀华, 黄健. 3 种主要水产病原菌多重 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2010, 31(3): 100-105
- 李宝明, 高丽娟, 李小鹏, 等. 肠道菌群多重实时荧光定量 PCR 检测体系的建立. 中国微生物学杂志, 2009, 18(4): 266-269
- 张世秀, 张新中, 谢珍玉, 等. PCR 技术在水产养殖动物细菌性病原检测中的应用. 现代渔业信息, 2006, 21(7): 11-13, 17
- 张凤萍, 王印庚, 李胜忠, 等. 应用 PCR 方法检测刺参腐皮综合征病原——灿烂弧菌. 海洋水产研究, 2008, 29(5): 101-106
- 杨国梁, 罗坤, 孔杰, 等. 罗氏沼虾不同养殖条件下的生长和存活率相关分析. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 74-79
- 倪梦丽, 杨冰, 王春德, 等. 贝类中不同种类病原生物的快速检测方法. 生命科学研究, 2013, 17(2): 156-162

- 梁万文, 陈明, 余晓丽, 等. 斑点叉尾鲴肠败血症病原菌的分离与鉴定. 西南农业学报, 2007, 20(5): 1124–1129
- Chen SC, Lin YD, Liaw LL, *et al.* *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Dis Aquat Org, 2001, 45(1): 45–52
- Li JT, Lee PP, Chen OC, *et al.* Dopamine depresses the immune ability and increases susceptibility to *Lactococcus garvieae* in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Fish Shellfish Immun, 2005, 19(3): 269–280
- Robicsek A, Jacoby GA, Hopper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. The Lancet Infectious Diseases, 2006, 6(10): 629–640
- Thillai SV, Santiago TC, Vijayan KK, *et al.* Involvement of *Enterobacter cloacae* in the mortality of the fish, *Mugil cephalus*. Lett Appl Microbiol, 2008, 46(6): 667–672
- Yang GL, Finsko M, Chen XF, *et al.* Current status of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) industry in China, with special reference to live transportation. Aquac Res, 2012, 43(7): 1049–1055
- Zhou Q, Zhang M, Wang AL, *et al.* Eight-year surveillance of antimicrobial resistance among *Enterobacter cloacae* isolated in the first Bethune hospital. Physics Procedia, 2012, 33: 1194–1196

(编辑 冯小花)

## Development and Application of the PCR Detection Method of Pathogenic Enterobacters in the Larvae of the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*

CHEN Xuefeng, YANG Guoliang<sup>①</sup>, GAO Qiang, XIA Zhenglong, PU Jianwei, SHEN Peijing, HUANG Zhenyuan

(National Genetic Breeding Center for *Macrobrachium rosenbergii*, Key Laboratory of Freshwater Animal Genetic Breeding of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

**Abstract** The current study was to develop a PCR-based method to detect *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* in *Macrobrachium rosenbergii*. Two pairs of primers targeted sequences located within the *omp A* gene of *E. cloacae* and *gyr B* gene of *E. aerogenes* were used to detect *E. cloacae* and *E. aerogenes*. Samples collected from infected larvae were detected with the developed PCR method. The expected DNA fragments of 385 bp and 201 bp were from *E. cloacae* and *E. aerogenes*, respectively, and no PCR products were amplified from other bacterium. The sensitivity test showed that the detection limits of PCR were  $10^3$  CFU/ml for *E. cloacae* and  $10^2$  CFU/ml for *E. aerogenes*. In addition, the detection results of larval samples were consistent with the actual case of the infectious disease. In summary, the PCR diagnostic method was specific and sensitive and is a reliable tool for identification of *E. cloacae* and *E. aerogenes* in infected samples with a little time and cost, which would play an important role in quick diagnose, epidemiology investigation and SPF populations construction of the giant freshwater prawn.

**Key words** *Macrobrachium rosenbergii*; *Enterobacter cloacae*; *Enterobacter aerogenes*; PCR detection

① Corresponding author: YANG Guoliang, E-mail: yg10572@163.com