

维氏气单胞菌 RCR 快速检测方法的建立及初步应用

边宇¹, 钱宏伟², 孟庆峰³, 康元环¹, 贺德聪⁴, 单晓枫¹, 王伟利³, 钱爱东¹

(1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 2. 吉林电力医院, 长春 130022; 3. 吉林出入境检验检疫局, 长春 130062; 4. 吉林省通化市畜牧总站, 吉林通化 134000)

[收稿日期] 2012-08-01 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 01-0001-03 [中图分类号] S852.61

[摘要] 以维氏气单胞菌的核酸酶基因为靶基因建立了 PCR 快速检测方法。实验证明该方法具有良好的特异性与敏感性, 对维氏气单胞菌基因组 DNA 的最低检测浓度为 1.58×10^{-4} ng; 在人工模拟试验的 30 份样品中: 使用 PCR 检测方法的样本检出率达到了 86.7% (26/30), 高于细菌分离培养的检出率 73.3% (22/30)。该方法的建立为维氏气单胞菌的快速检测提供了新的方法。

[关键词] 维氏气单胞菌; 聚合酶链式反应; 核酸酶

Establishment and Preliminary Application of Rapid Detection Method for *Aeromonas veronii* by PCR

BIAN Yu¹, QIAN Hong-wei², MENG Qing-feng³, KANG Yuan-huan¹, HE De-cong⁴, SHAN Xiao-feng¹, WANG Wei-li³, QIAN Ai-dong¹

(1. College of Animal Science and Technology of Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. The Electric Power Hospital of Jilin Province, Changchun 130022, China; 3. Jilin Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China; 4. Tonghua Animal Husbandry Stationary, Tonghua, Jilin 134000, China)

Abstract: Rapid detection method by PCR for *Aeromonas veronii* was established by nuclease gene regarded as the target gene in this study. The results showed that the method had good specificity and sensitivity, and the minimum detectable concentration of *A. veronii* genomic DNA was 1.58×10^{-4} ng. Trials of 30 artificial simulated pollution samples showed that the detectable rate by PCR reached 86.7% (26/30) and it was higher than the rate of 73.3% (22/30) by bacteria cultivation. The establishment of the method provided a new way for rapid detecting of *A. veronii*.

Key words: *Aeromonas veronii*; PCR; nuclease

维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 是近年来新发现的一种病原菌, 1987 年 Hickman - Brenner 等^[1] 描述其为气单胞菌属的一个新种, 具有广泛的致病性, 可感染多种水生动物, 导致体表皮肤溃疡、败血症等疾病的发生^[2-3]。近年来, 也有哺乳动物感染并患病的报道^[4], 而人误食了污染的食品后,

可引发腹泻、败血症等, 免疫力低下者甚至有死亡的危险^[5-6]。目前, 对 *A. veronii* 的临床诊断多依赖于表观病理观察、细菌的分离鉴定等一般细菌学检测, 而 *A. veronii* 引发疾病的病理现象与其他气单胞菌极为相似, 很难肉眼判定, 因此, 建立 *A. veronii* 的快速检测方法显得尤为重要。本研究拟通过

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201927); 吉林省科技厅项目 (20080218); 国家质检总局科技计划项目 (2013)

作者简介: 边宇, 硕士研究生, 从事动物微生物学研究。

通讯作者: 钱爱东, E-mail: qianaidong0115@163.com; 单晓枫, E-mail: sxf1997@163.com

*A. veronii*的核酸酶基因序列,设计出一对特异性引物,建立高效、快速的维氏气单胞菌 RCR 检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌种 维氏气单胞菌标准株(*Aeromonas veronii*, ATCC35624)、维氏气单胞菌框镜鲤分离株(CY0806)、嗜水气单胞菌标准株(*Aeromonas hydrophila*, ATCC7966)、杀鲑气单胞菌分离株(*Aeromonas salmonicida*, WL0413)由本实验室保存;温和气单胞菌标准株(*Aeromonas sobria*, ATCC43979)、豚鼠气单胞菌标准株(*Aeromonas caviae*, ATCC15468)由浙江省淡水研究所潘晓艺副研究员惠赠;大肠杆菌(*Colibacillus*, ATCC10536)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*, ATCC9207)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, ATCC25241)及阪崎杆菌(*Enterobacter sakazakii*, ATCC51329)均由吉林出入境检验检疫局王伟利研究员惠赠。大肠杆菌感受态 DH5 α 由华大中天生物公司提供。

1.2 主要试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、动物组织基因组 DNA 提取试剂盒由北京索莱宝科技有限公司提供;DL2000 Marker、Ex *Taq* DNA 聚合酶、克隆载体 pMD18-T 由宝生物工程(大连)有限公司提供;RS 培养基由北京陆桥技术有限公司提供;其他试剂为分析纯。

1.3 引物设计及合成 根据 GenBank 公布的 *A. veronii*核酸酶(exu)基因序列设计一对特异性引物,F: GGACATGCACAACCTCTTCC, R: GATTGG-TATTGCCTTGCAAG,引物由华大中天生物公司合成。

1.4 细菌模板 DNA 提取 分别活化 1.1 项中各类病原菌,并依据细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 引物特异性检验 针对 exu 特异性引物进行 PCR 反应,反应条件与体系参照 Ex *Taq* 酶试剂推荐,1.0% 凝胶电泳进行检测,目的片段进行胶回收并与 T 载体相连,转化,挑取阳性菌落并进行质粒的提取,PCR 鉴定后送至华大中天生物公司测序。

1.6 反应条件的确定 按 25 μL 体系,以 exu 特异性引物、*A. veronii* 标准株细菌基因组为模板,对反应的退火温度、循环次数、引物浓度及模板浓度等条件进行优化,以确定最佳反应体系。其 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 特异性与敏感性试验 以 1.4 项提取的细菌基因组 DNA 为模板,以 1.6 项优化的反应体系和

条件进行 PCR 扩增,产物进行电泳分析,以确定反应的特异性。以 *A. veronii* 标准株细菌基因组为阳性模板,用分光光度计测定其含量,并做 10 倍梯度稀释,用建立的 PCR 反应条件和体系进行扩增,依据检测到的最大稀释度,以确定 PCR 反应的敏感性。

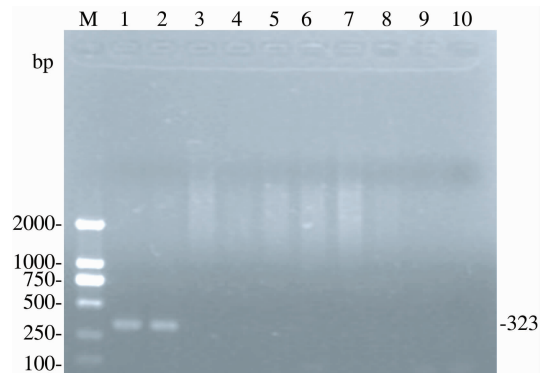
1.8 模拟污染试验 选取健康小白鼠共 30 只,以 LB 液体培养基活化 *A. veronii* ATCC35624 (菌体终浓度为 10^8 CFU/mL), 0.2 mL/只腹腔注射,感染小鼠出现典型症状。剖检,并分离纯化细菌,将纯化好的细菌按参考文献^[7]进行生化鉴定;同时应用动物组织 DNA 提取试剂盒提取小鼠组织 DNA,用本实验建立的 PCR 检测方法进行检测,与细菌分离鉴定结果进行比较。

2 结果

2.1 引物验证 特异性引物扩增出 323 bp 大小的片段,与预期结果相符。基因的目的片段测序、序列比对并分析,其结果与 *A. veronii* ATCC35624 的 exu 序列的同源性为 99%。

2.2 确定的 PCR 反应条件 以 25 μL 体系并参照 Ex *Taq* 酶试剂推荐,梯度 PCR 仪优化的退火温度,最终确定了反应体系与反应条件为:10 \times PCR buffer 2.5 μL , dNTP 2 μL , P_{exu} 上下游引物各 0.5 μL , 模板 0.5 μL , Ex *Taq* 酶 0.25 μL , 加双蒸水至 25 μL ; 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

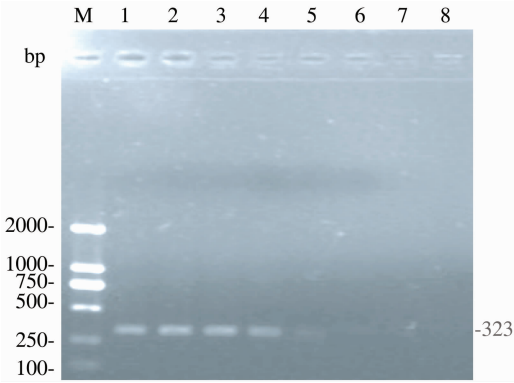
2.3 特异性试验结果 除以 *A. veronii* ATCC35624、*A. veronii* CY0806 株基因组 DNA 为模板,可以扩增出特异性目的条带外,其他菌株均为阴性结果(图 1)。



M. DL 2000 Marker; 1. ATCC35624; 2. CY0806; 3. ATCC7966; 4. WL0413; 5. ATCC43979; 6. ATCC15468; 7. ATCC10536; 8. ATCC9207; 9. ATCC25241; 10. ATCC51329

图 1 PCR 特异性试验结果

2.4 敏感性试验结果 敏感性结果显示:提取的 *A. veronii* ATCC35624 基因组模板 DNA 浓度为 15.8 ng/ μ L,经 10 倍稀释,在 10^5 倍稀释时经 PCR 扩增仍能检测到 *exu* 的目的条带,但在 10^6 倍稀释时,结果为阴性,所以本方法的敏感度为 1.58×10^{-4} ng/ μ L 的 DNA 模板(图 2)。



M. DL 2000 Marker;1. 1.58 ng/ μ L;2. 1.58×10^{-1} ng/ μ L;
3. 1.58×10^{-2} ng/ μ L ;4. 1.58×10^{-3} ng/ μ L;5. 1.58×10^{-4} ng/ μ L;
6. 1.58×10^{-5} ng/ μ L;7. 1.58×10^{-6} ng/ μ L;8. 阴性对照

图 2 PCR 敏感性试验结果

2.5 模拟污染试验检测结果 30 份模拟污染样本经 PCR 检测,阳性结果样本为 26 份(86.7%);细菌分离鉴定阳性结果样本为 22 份(73.3%),PCR 阳性结果样本包含所有细菌分离鉴定样本。

3 讨论

作为一种较新的人-兽-鱼共患病原菌, *A. veronii* 在引发人的多种疾病的同时,还能感染多种水生动植物和哺乳动物,因此,对 *A. veronii* 的快速诊断具有重要意义。传统的细菌分离鉴定步骤繁琐、费时费力;而免疫学等检测方法国内尚未见报道,且这些方法也存在着诸多缺点^[8],不适宜做流行病学调查。

本研究建立了 PCR 检测方法,以 *exu* 为靶基因,对 *A. veronii* 进行检测。核酸酶基因作为毒力基因已在多种病原菌研究中有所报道^[9-10],本试验的前期研究表明,在绝大多数 *A. veronii* 致病株中均可检测到 *exu* 基因,因此,以该基因为靶基因建立的 *A. veronii* PCR 检测方法,与潘晓艺等^[11]建立的双重 PCR 检测技术相比,其最大优点在于在反应体

系中只需加入一种引物,就可通过结果初步鉴定出待检菌株是否具有潜在致病性的维氏气单胞菌,操作更为简单快捷。

在模拟污染试验中,PCR 检测方法和分离培养法相比,其准确性较高,所用时间较短,说明其具有较高的实际应用价值。因此,该方法的建立,为 *A. veronii* 的快速诊断、流行病学调查等提供了一个快速灵敏的检测方法。

参考文献:

- [1] Hickman - Brenner F W, MacDonald K L, Steigerwalt A G, et al. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase - positive species that may cause diarrhea[J]. J Clin Microbiol, 1987, 25 (5):900 - 906.
- [2] Rahman M, Colque - Navarro P, K hn I, et al. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh [J]. Applied Environmental Microbiology, 2002, 68 (2): 650 - 655.
- [3] 潘晓艺,沈锦玉,李建应,等.青虾“软壳综合症”病原及其特性[J].微生物学通报,2009,36(10):1571 - 1576.
- [4] 李伟杰,赵耘,刘燕,等.狐狸源致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及耐药性分析[J].中国预防兽医学学报,2012,34(4):289 - 292.
- [5] Fraisse T, Lechiche C, Sotto A, et al. *Aeromonas* spp. infections: Retrospective study in Nimes University Hospital, 1997 - 2004 [J]. Pathol Biol, 2008, 56:70 - 76.
- [6] 吴同垒,单晓枫,孟庆峰,等.维氏气单胞菌研究进展[J].中国兽药杂志,2011,45(7):41 - 44.
- [7] 龚倩,高淑琴,单晓枫,等.框镜鲤致病性维氏气单胞菌的分离鉴定[J].中国预防兽医学学报,2010,32(12):981 - 983.
- [8] Figueras M J, Aldea M J, Ferna'ndez N, et al. *Aeromonas* hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007, 58:231 - 234.
- [9] Vancrystne D, Haesebrouck F, Hermans K. Multiplex PCR assay for the detection of high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains[J]. Vet Microbiol, 2007, 121(3):368 - 372.
- [10] Fontaine M C, Perez C J, Willson P J. In vestigation of a novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Infect Immun, 2004, 72(2):774.
- [11] 潘晓艺,蔺凌云,袁雪梅,等.致病性维罗纳气单胞菌检测方法的建立[J].微生物学通报,2011,38(12):1813 - 1819.

(责任编辑:侯向辉)