

研究简报

聚合酶链反应(PCR)法检测产 β -溶血素嗜水气单胞菌*

夏 春¹⁾ 马志宏 陈慧英 丁 文 赵玉宝

1) (中国农业大学动物医学院 北京 100094)
(北京市水产科学研究所 100075)

DETECTION OF THE β -HEMOLYSIN GENE IN *AEROMONAS HYDROPHILA* BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION

Xia Chun¹⁾, Ma Zhihong, Chen Huiying, Ding Wen and Zhao Yubao

1) (College of Veterinary Medicine, China Agricultural, Beijing 100094)
(Beijing Fisheries Research Institute, 100075)

关键词 聚合酶链反应法, β -溶血素, 嗜水气单胞菌, 鱼

Key words PCR, β -hemolysin, *Aeromonas hydrophila*, Fish

嗜水气单胞菌(*A. hydrophila* Stanier 下略为 Ah) 隶属弧菌科气单胞菌属, 分布广泛, 是鱼类、两栖类、爬行类和哺乳类的致病菌。一般认为 Ah 的致病机理与其产生的毒素密切相关, 尤其是溶血素^[1-5]。作者推测采用 PCR 法检测 β -溶血素基因也能用于确认鱼类的致病菌株。本文根据鱼源 Ah β -溶血素基因序列设计了两对引物, 用 Nested-PCR 法证实了我国鱼源 Ah 流行株亦存在 β -溶血素的基因后, 探讨了应用 PCR 法检测产 β -溶血素 Ah 的方法及其灵敏度。

1 材料与方法

1.1 菌株 实验共用 5 株嗜水气单胞菌。TPS30 和 J-1 株为 β -溶血型; SC-9611、SC-9624 和 02 株为 α -溶血型。

1.2 引物设计 从 Bio Database CD-Rom 基因库中读取三种鱼源 Ah β -溶血素基因, 其名称分别为 AH4H1HE、AH28HEM22 和 AH28SAHEM。随后在其各 ORF 内的高保守序列中设计一正引物 (AP1) 和二反引物 (AP2 和 AP3), 组成两引物对, 即 AP1 / AP2、AP1 / AP3。AP1 序列为 5'-CAAGAGGTCTGTGGCGACA-3', AP2 序列为 5'-TTTCACCGGTAGCAGGATTG-3', AP3 为 5'-AAGGTGTGGTCCAGTTC-3'。

1.3 聚合酶链反应 Ah TPS30、SC-9611、SC-9624 和 02 株均直接提取其基因组 DNA。J-1 则直接用全菌液在 94℃ 热处理 10min 后作为模板使用。AP1 / AP2 或 AP1 / AP3 引物对各添加 100pmol, 模板添加量为 1 μ l (TPS30、SC-9611、SC-9624 和 02 株各为 0.5 μ g / μ l, J-1 菌液浓度为 20 μ g / μ l)。PCR 反应总体积为 50 μ l。PCR 程序是首先 94℃ 热变性 1min, 然后 55℃ 退火 45Sec, 72℃ 延伸 45Sec。所有 PCR 反应均在美国 ERICOMP 公司 SingleBlock system PCR 仪上循环 30 个周期。

1.4 PCR 的灵敏度 将热处理的 J-1 菌液和 TPS30 基因组 DNA 进行 10⁻² 至 10⁻⁶ 倍稀释后, 采用 AP1 /

* 本研究由北京市自然科学基金资助
1998-01-04 收到, 1998-08-30 修回

AP2 引物对分别对各稀释度进行 PCR 扩增,循环 30 个周期。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖电泳、照相。

2 结果

2.1 Nested-PCR 法和 PCR 法扩增结果 采用 AP1 / AP3 引物对进行 PCR 后,再以 1 μ l PCR 的回收物为模板,以 AP1 / AP2 引物对进行 Nested-PCR 的结果如图 1A 所示。即 J-1 和 TSP30 株均可见到一条约 950bp 的主带(2-3);再采用 AP1 / AP2 引物对进行 Nested-PCR 扩增,结果与预期一样可见到一条 208bp 带。以 AP1 / AP2 引物对 TPS30、SC-9611、SC-9624、02 和 J-1 株分别进行 PCR 扩增的结果如图 1B 所示。即 β -溶血型 J-1 和 TPS30 株在 208bp 处有条特异带;而 α -溶血型 SC9611、SC9624 和 02 菌株均无此带(6-10)。

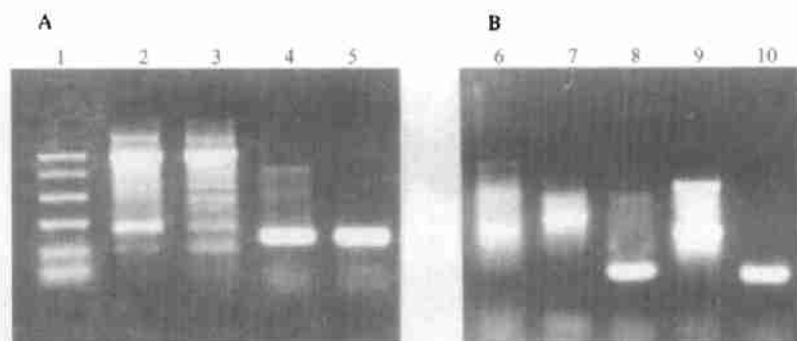


图 1 Nested-PCR 和 PCR 扩增结果

Fig.1 Specificity of PCRs using AP1 / AP3 and AP1 / AP2 primers.

2.2 PCR 的灵敏度 将 J-1 和 TPS30 模板液进行 10^{-2} 至 10^{-6} 倍稀释后,采用 AP1 / AP2 引物对各个稀释度进行 PCR 反应, 10^{-2} 至 10^{-4} 倍稀释后可见 208bp 的特异性片段; 10^{-5} 至 10^{-6} 稀释度则无特异性片段。

3 讨论

作者认为要控制暴发性流行病必须依赖于对病原的早期诊断和长期监控等重要手段。然而,要做到这些就需要建立更特异、灵敏的检测方法。本研究根据鱼源 β -溶血素基因序列设计了引物对,采用 Nested-PCR 法证实了我国 Ah 流行株亦存在 β -溶血素的基因,并建立了 PCR 检测产 β -溶血素 Ah 的方法。

在模板的处理方法上,本研究采用了热处理 J-1 株全菌液后直接用于 PCR。这大幅度地缩短了实验时间,减少了中间操作。热处理的模板也可达到相当高的灵敏度。本 PCR 法检出 Ah 的 DNA 量为纳克级,热处理全菌液的重量为微克级。另外,AP1 / AP2 引物对与扩增人 Ah 株 β -溶血素基因的引物对同源。即本 PCR 反应系只能用于检测产 β -溶血素的 Ah 株,不能检测产 α -溶血素和其它一些毒素原因。

参 考 文 献

- [1] Hiron L, Aoki T, Kozaki S. Nucleotide sequences and characterization of haemolysin genes from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *Microbial Pathogenesis*, 1992, 13(6):433-446
- [2] 陆承平, 陈怀育. 用 PCR 检测嗜水气单胞菌毒素基因. *中国动物检疫*, 1995, 12(5): 5-7
- [3] Lior H, Johnson W. M. Application of the polymerase chain reaction (PCR) to the aerolysin in whole cell cultures of β -hemolytic *Aeromonas hydrophila*. *Experientia*, 1991, 47:421-424
- [4] Pollard D. R, Johnson W. M, Lior H. et al. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28(11):2477-2481
- [5] Peter H. S, Garland W, Green M. et al. T. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(6):2869-2871