

检测鲢鱼腹水病病原菌迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌的嵌套 PCR 方法

薛淑霞^{1,2} 孙金生^{1,2}

(1. 天津市水产研究所, 天津 300221; 2. 天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300074)

摘要: 本文首次建立了用嵌套式聚合酶链式反应 (Nested-PCR) 分别检测天津地区海水工厂化养殖大菱鲈和褐牙鲈腹水病病原菌迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 和溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 的方法。以 E781F 和 E781R 为引物, 扩增迟缓爱德华氏菌溶血素基因中 781bp 的片段, 再以 E485F 和 E485R 为引物, 扩增其中的 485bp 的片段; 以 V899F 和 V899R 为引物, 扩增溶藻弧菌胶原酶基因中 899bp 片段, 再以 V550F 和 V550R 为引物, 扩增其中的 550bp 片段。以其他常见海水鱼类致病菌为阴性对照, 结果均无非特异性扩增。对迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌的检出灵敏度分别可达 10fg 和 1fg 细菌 DNA, 显著优于目前的检测方法。作者应用该技术对天津地区海水工厂化大菱鲈和褐牙鲈于 2006 年 3 月至 10 月连续进行监测, 为有效地控制该病的流行提供了技术支撑。

关键词: 腹水病; 迟缓爱德华氏菌; 溶藻弧菌; PCR; 检测

中图分类号: S943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)06-0856-05

大菱鲈 (*Scophthalmus maximus*) 和褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 是名贵的海洋低温经济鱼类, 近年来已经成为我国北方海水工厂化养殖的主导品种。天津是我国海水工厂化养殖大菱鲈和褐牙鲈的主要地区, 养殖设施先进。但是腹水病的暴发和流行给海水工厂化养殖企业造成了严重的经济损失。2003—2005 年间, 作者对天津地区海水工厂化养殖大菱鲈和褐牙鲈腹水病流行和危害情况进行了调查, 从患腹水病的大菱鲈和褐牙鲈体内分离到两株病原菌, 即迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 和溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)^[1]。迟缓爱德华氏菌是多种淡、海水养殖鱼类的重要病原菌, 同时也能引起贝类、两栖类、鸟类、哺乳类等多种动物的感染^[2-4]。溶藻弧菌是一种广泛存在于海水中的条件致病菌, 也是近年来海水养殖动物的主要病原菌之一^[5-9]。水生动物细菌性疾病的治疗现在大多依赖于抗生素, 抗生素的滥用不仅使病原菌产生了抗性, 同时对人的健康也造成了一定的压力。因此, 建立敏感、快速检测腹水病病原菌的方法, 构建有效的预报预警机制, 在养殖生产中已非常必要和紧迫。本文根据天津地区腹水病的流行情况和特点, 针对迟

缓爱德华氏菌和溶藻弧菌分别建立了 nested-PCR 检测方法, 并在海水工厂化养殖大菱鲈、褐牙鲈生产中应用, 以期为有效地控制天津地区海水工厂化养殖大菱鲈和褐牙鲈腹水病的蔓延与流行提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用大菱鲈和褐牙鲈取自天津市海发海珍品实业发展有限公司。供试菌株迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌为本实验室分离、鉴定、保存; 温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、沙门氏弧菌、副溶血弧菌购自中国农业微生物菌种保藏中心; 鳃弧菌由中国科学院海洋研究所莫照兰博士惠赠。Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker DL2000 购自大连宝生物工程公司; 蛋白酶 K 为 Merk 公司产品。

1.2 引物的设计 在 GeneBank 中查找迟缓爱德华氏菌溶血素基因、溶藻弧菌胶原酶基因序列, 经与 GeneBank 中所公布的其他细菌的溶血素基因和胶原酶基因序列做 BLAST 比对, 在其高度保守区利用 PrimerPremier 5.0 软件设计引物。引物由上海生物技术工程公司合成 (表 1)。

收稿日期: 2007-02-28 修订日期: 2007-12-19

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD09A11); 天津市应用基础研究计划项目 (07JCZDJC04400); 国家自然科学基金项目 (30571421) 资助

作者简介: 薛淑霞 (1979—), 山东潍坊人; 硕士; 主要研究方向为水产动物病害。E-mail: shuxixu@126.com

通讯作者: 孙金生, Tel: 022-88250781; E-mail: jssun1963@yahoo.com.cn

表 1 引物序列及产物长度
Tab. 1 Sequences of PCR primers and product sizes

基因	引物	引物序列 (5′-3′)	产物长度
Gene	Primers	Sequences of primers	Product sizes (bp)
溶血素 Hemolytic	E781F	atcaggggcagcggtaaagg	781
	E781R	aacagcggattgggggtc	
	E485F	gtgggtggattgacggaggt	485
	E485R	aagaggggcagcgggatt	
胶原酶 Collagenase	V899F	agggggtcatcaatcgg	899
	V899R	cgtgtttccaccagcat	
	V550F	aagagggttactttcatcag	550
	V550R	cgtgtttccaccagcat	

1.3 DNA 模板提取 采用酚 氯仿抽提法^[10]提取细菌基因组 DNA。

1.4 nested-PCR 扩增 检测迟缓爱德华氏菌的 25μL PCR 反应体系中, 包括 10×PCR Buffer 2.5μL, 25mmol/L MgCl₂ 1.5μL, 10mmol/L dNTPs 0.5μL, 引物 (E781F、E781R 或 E485F、E485R) 各 0.5μL, Taq DNA 聚合酶 1.25U, 模板 1μL, 加灭菌的双蒸水至 25μL。反应条件为 94℃预变性 2min, 94℃变性 30s, 60℃复性 45s, 72℃延伸 1min, 30 个循环; 最后, 72℃延伸 10min。检测溶藻弧菌的 25μL PCR 反应体系中, 包括 10×PCR Buffer 2.5μL, 25mmol/L MgCl₂ 1.5μL, 10mmol/L dNTPs 0.5μL, 引物 (V899F、V899R 或 V550F、V550R) 各 0.5μL, Taq DNA 聚合酶 1.25U, 模板 1μL, 加灭菌的双蒸水至 25μL。反应条件为 94℃预变性 2min, 94℃变性 30s, 58℃复性 45s, 72℃延伸 1min, 30 个循环; 最后, 72℃延伸 10min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后观察结果。

1.5 灵敏度的测定 采用模板 10 倍梯度稀释法测定灵敏度。以迟缓爱德华氏菌或溶藻弧菌的 DNA 为模板, nested-PCR 反应按 10 倍稀释设 10ng/μL—0.1fg/μL 9 个梯度, 在每 25μL 反应体系中加入 1μL 模板, 以灭菌的双蒸水为阴性对照。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 以能出现电泳条带的最低模板量定为 PCR 检测的最低极限。

1.6 特异性的测定 以温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、沙门氏弧菌、副溶血弧菌、鳃弧菌等常见海水致病菌的 DNA 为模板, 用上述 nested-PCR 和双重 PCR 进行 PCR 扩增。

2 结果

2.1 迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌的溶血素基因和胶原酶基因 DNA 片段的扩增

以迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌的 DNA 作为

PCR 扩增的模板, 以 E781F、E781R 和 V899F、V899R 为引物, 电泳结果分别显示约 781bp 和 899bp 的 DNA 片段; 以上述 PCR 产物作为模板, 用 E485F、E485R 和 V550F、V550R 为引物, nested-PCR 扩增后, 电泳结果分别显示约 485bp 和 550bp 的 DNA 片段。(图 1)。

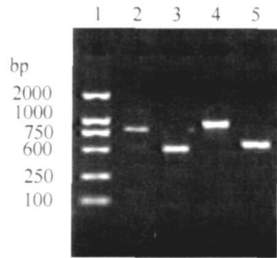


图 1 迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌 PCR、nested-PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 PCR, nested-PCR detection of *Edwardsiella tarda* and *Vibrio alginolyticus*

1. DL2000 Marker 2. 迟缓爱德华氏菌 PCR 扩增 781bp 片段; 3. 迟缓爱德华氏菌 nested-PCR 扩增 485bp 片段; 4. 溶藻弧菌 PCR 扩增 899bp 片段; 5. 溶藻弧菌 nested-PCR 扩增 550bp 片段
1. DL2000 marker 2. 781bp fragment of *Edwardsiella tarda* by PCR; 3. 485bp fragment of *Edwardsiella tarda* by nested-PCR; 4. 899bp fragment of *Vibrio alginolyticus* by PCR; 5. 550bp fragment of *Vibrio alginolyticus* by nested-PCR

2.2 灵敏度分析

以 E781F、E781R 为引物对迟缓爱德华氏菌的溶血素基因进行第一次 PCR 扩增, 然后再以 E485F、E485R 为引物进行 nested-PCR 扩增; 以 V899F、V899R 为引物对溶藻弧菌的胶原酶基因进行第一次 PCR 扩增, 然后再以 V550F、V550R 为引物进行 nested-PCR 扩增。其检测的灵敏度分别示于图 2、图 3。由图 2 可以看出, 10ng—10fg 的模板在 485bp 处可看到明显的扩增带, 说明 nested-PCR

电泳检测迟缓爱德华氏菌溶血素基因的检出极限为 10 fg。由图 3 可以看出, 10 ng—1 fg 的模板在 550 bp 处可看到明显的扩增带, 说明 nested-PCR 电泳检测溶藻弧菌胶原酶基因的检出极限为 1 fg。

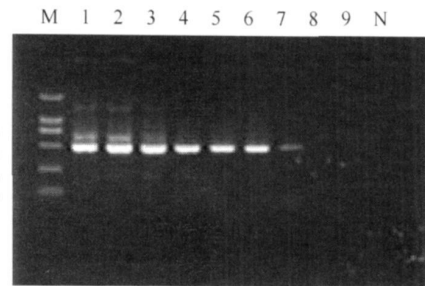


图 2 nested-PCR 检测迟缓爱德华氏菌灵敏度分析电泳谱图

Fig. 2 The analysis of the sensitivity of the detection of *Edwardsiella tarda*

1—9. 10 ng—0.1 fg 10 倍稀释的迟缓爱德华氏菌 DNA 梯度;
M. DL2000 Marker; N. 阴性对照

1—9. Decupled diluted DNA concentration from 10 ng to 0.1 fg of *Edwardsiella tarda*; M. DL2000 Marker; N. Negative control

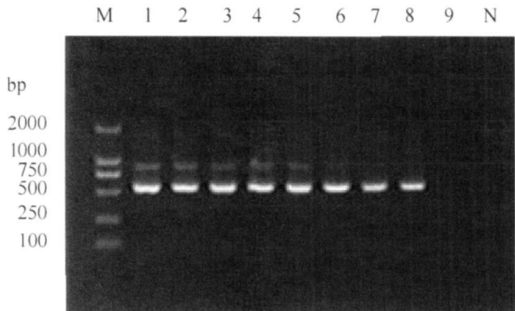


图 3 nested-PCR 检测溶藻弧菌灵敏度分析电泳结果图

Fig. 3 The analysis of the sensitivity of the detection of *Vibrio alginolyticus*

1—9. 10 ng—0.1 fg 10 倍稀释的溶藻弧菌 DNA 梯度 nested-PCR 电泳结果; M. DL2000 Marker; N. 阴性对照

1—9. Decupled diluted DNA concentration from 10 ng to 0.1 fg of *Vibrio alginolyticus*; M. DL2000 Marker; N. Negative control

2.3 特异性分析

以温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、沙门氏弧菌、副溶血弧菌、鳃弧菌等常见海水致病菌的 DNA 为模板, 和迟缓爱德华氏菌或溶藻弧菌一起, 做 PCR、nested-PCR 扩增, 结果显示, 不能从其他基因组 DNA 中扩增出 781 bp 和 485 bp 或者 899 bp 和 550 bp 的 DNA 片段, 表明这一方法具有一定的特异性。

2.4 上述检测方法在工厂化养殖鲆鱼实践中的应用

取海水工厂化养殖场中 7 个批次 32 尾海水工

厂化养殖鲆鱼, 其中有明显腹水症状的鲆鱼 9 尾。抽提其肾脏、肝脏或腹水基因组 DNA 作为 PCR 模板, 用所建立的 nested-PCR 方法检测迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌。检测结果显示, 在 32 个样本中, 23 个样本为迟缓爱德华氏菌阳性, 检出率为 71.9%; 11 个样本为溶藻弧菌阳性, 检出率为 34.4%; 其中 2 个样本迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌均为阳性, 检出率为 6.25%。上述检测结果表明, 天津地区海水工厂化养殖鲆鱼的主要致病菌为迟缓爱德华氏菌, 溶藻弧菌为第二致病病原; 从部分患腹水病的鲆鱼体内可同时检测到迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌; 从外观正常、未出现明显腹水症状的鲆鱼体内检测到了迟缓爱德华氏菌或溶藻弧菌。

表 2 养殖鲆鱼体内迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌的检测结果

Tab. 2 The detecting results of *E. tarda* and *V. alginolyticus* of cultured turbot and flounder

样本数 No. of samples	<i>E. tarda</i> 阳性	<i>V. alginolyticus</i> 阳性	<i>E. tarda</i> , <i>V. alginolyticus</i> 阳性
外观健康鱼体 Healthy	17	6	0
有腹水症状鱼体 Diseased	6	5	2
检出率 Detecting rates	71.9%	34.4%	6.25%

3 讨论

选择合适的用于扩增检测的靶基因是保证 PCR 检测方法特异性的关键。本文检测迟缓爱德华氏菌采用的是溶血素基因, 检测溶藻弧菌采用的是胶原酶基因。溶血素是迟缓爱德华氏菌的重要致病因子, 胶原酶虽不是溶藻弧菌的致病因子, 但是在所有的细菌中, 溶藻弧菌的胶原酶分泌活性是最高的^[11], 因此, 溶藻弧菌的胶原酶基因是一个很好的检测靶基因。用 nested-PCR 方法对溶藻弧菌的检测的灵敏度要比对迟缓爱德华氏菌的检测灵敏度高 1 个数量级, 作者推测, 这与溶藻弧菌的胶原酶基因表达活性高是有一定关系的。扩增结果显示, 这两个基因都具有良好的特异性。另外, 本文选择了高退火温度、低镁离子浓度等措施保证了方法本身的高特异性和可靠性。

常规的生理生化方法耗时、费力, 并且如果所鉴定细菌的表型种数较多, 生理生化反应的结果就难以判定, 从而影响了细菌鉴定的准确率。PCR 方法检测灵敏度高, 特异性强, 检验周期短, 操作相对简

便。本文所建立的 nested-PCR 方法对迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌的检出极限分别为 10fg 和 1fg 这与其他检测方法相比, 本方法的检测灵敏度在目前来说是最高。

近年来, 腹水病是流行于我国很多地区海水工厂化养殖场的一种水生动物疾病。腹水病的病原菌不尽相同, 是一种综合性病症, 它是被不同病原感染流行于不同地区的一种水生动物疾病。天津地区养殖大菱鲆和褐牙鲆腹水病的暴发与流行给海水工厂化养殖的企业造成了巨大的经济损失。本文从海水工厂化养殖场中随机抽取了 7 个批次 32 尾养殖大菱鲆和褐牙鲆, 对迟缓爱德华氏菌的检出率为 71.90%, 对溶藻弧菌的检出率为 34.40%, 对迟缓爱德华氏菌和溶藻弧菌的同时检出率为 6.25%。本文对连续监测结果进行分析, 结合生产实际, 及时将诊断报告报送养殖场, 做到早诊断、早预防, 为有效地控制天津地区养殖鲆鱼腹水病的蔓延与流行提供了技术支撑。

参考文献:

- [1] Xue S X, Feng S M, Sun J S Isolation and identification of pathogenic bacteria associated with swollen abdomen of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) and flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2006, **37**: 548—554 [薛淑霞, 冯守明, 孙金生. 海水工厂化养殖大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 和褐牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 腹水病病原菌的分离与鉴定. 海洋与湖沼, 2006, **37**: 548—554]
- [2] White F H, Simpson C F, Williams L E, *et al*. Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida [J]. *Journal of Wildlife Disease*, 1973, **9** (3): 204—208
- [3] Bragg R R. First isolation of *Edwardsiella tarda* from fish in South Africa [J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1998, **8** (4): 87—88
- [4] Janda J M, Abbott S L. Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease [J]. *Clinical Infectious Disease*, 1993, **17** (4): 742—748
- [5] Selvin J, Linton A P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon* [J]. *Dis Aquat Organ*, 2003, **57**: 147—150
- [6] Xie Z H, Hu C, Chen C, *et al*. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, **41**: 202—207
- [7] Liu P C, Lin J Y, Hsiao P T, *et al*. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from disease of *Penaeus monodon* [J]. *Dis Aquat Organ*, 2003, **57**: 147—150
- [8] Francis P, Kheng L, Henry H. *Vibrio alginolyticus* infections in Hawaii [J]. *Clinical Microbiology*, 1977, **5** (6): 670—672
- [9] Zuo F Q, Jian J C, Wu Z H. Characterization of extracellular products from *Vibrio alginolyticus* isolated from maricultured fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (5): 553—558 [左凤琴, 简纪常, 吴灶和. 鱼源溶藻弧菌胞外产物的特性研究. 水生生物学报, 2006, **30** (5): 553—558]
- [10] Liu H, Gao L Y, Shi X J. Detection of *Renibacterium salmoninarum* by nested-PCR [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, **26**: 453—458 [刘荭, 高隆英, 史秀杰. 用 nested-PCR 快速检测鲑鱼肾杆菌. 水产学报, 2002, **26**: 453—458]
- [11] Hiroaki T, Yuji S, Kazuyuki M, *et al*. Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase [J]. *Biochem*, 1992, **281**: 703—708

DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIAL(*EDWARDSIELLA TARDA* AND *VIBRIO ALGINOLYTICUS*) ASSOCIATED WITH SWOLLEN ABDOMEN OF CULTURED TURBOT(*SCOPHTHALMUS MAXIMUS*) AND FLOUNDER(*PARALICHTHYS OLIVACEUS*) BY NESTED-PCR

XUE Shu-Xia^{1,2} and SUN Jin-Sheng^{1,2}

(1. Tianjin Fishery Institute, Tianjin 300222; 2. College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300074)

Abstract Turbot (*Scophthalmus maximus*) and flounder (*Paralichthys olivaceus*) are rare and economic fish in the north of China. In recent years, they have become the dominant cultured varieties. Tianjin is the main cultural area of turbot and flounder. However, the prevalence of diseases of the cultured turbot and flounder has resulted in great loss to the cultural enterprise. Swollen abdomen disease was the serious threat to the turbot and flounder according to the investigation. The mortality can reach 80%—90% while the disease broke out. On the foundation of the former work, we have confirmed that *Edwardsiella tarda* and *Vibrio alginolyticus* were the pathogenic bacterial associated with swollen abdomen disease. *E. tarda* is an important pathogenic bacteria to the maricultured fish, furthermore, it can cause other diseases to birds, amphibian and mammals. *V. alginolyticus* is an opportunist pathogen, which exists extensively in seawater and causes serious diseases to maricultured fish and even human being. The treatment of the aquatic animals' bacterial disease mostly depend on the antibiotics recently. The misuses of the antibiotics have given more pressures to the human's health. Meanwhile, the antibiotics have brought more opportunities to the pathogenic bacterial to adapt it. Hence, it is necessary to develop a sensitive and reliable method to detect the pathogenic bacterial. We expect to build a system which can forecast the prevalence of the swollen abdomen disease through some detecting methods. In this paper, a diagnostic method was first developed. Two pairs of primers E781F and E781R, E485F and E485R, were designed for amplification of 781 bp and 485 bp DNA fragments of the hemolytic gene of *E. tarda* respectively. Similarly, two pairs of primers V899F and V899R, V550F and V550R, were designed for amplification of 899 bp and 550 bp DNA fragments of the collagenase gene of *V. alginolyticus* respectively. No specific fragments were amplified when other principal oceanic fish bacterial pathogens were used as negative controls. The sensitivity of the detection of *E. tarda* and *V. alginolyticus* was 10 fg and 1 fg respectively, which are better than the other diagnostic methods. Nested-PCR detected the presence of *E. tarda* and *V. alginolyticus* in 32 samples which were the cultured turbot and flounder taken from the farms of Tianjin, 23 (23/32) of which were positive for *E. tarda*, 11 (11/32) of which were positive for *V. alginolyticus*, and 2 (2/32) of which were positive for both organisms. The results showed that the nested-PCR was effective and reliable methods for the detection of *E. tarda* and *V. alginolyticus*.

Key words Swollen Abdomen, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio alginolyticus*, PCR, Detecting methods