

DOI:10.16378/j.cnki.1003-1111.2016.05.023

龟致病性维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌 双重 PCR 检测方法的建立

丁 利¹, 代小梅¹, 方振华², 汪继超¹, 史海涛¹

(1. 海南师范大学 生命科学学院, 海南 海口 571158;

2. 海南职业技术学院 生物工程学院, 海南 海口 570216)

摘 要: 应用 2 对特异性引物, 通过对反应条件和体系的优化, 成功建立了能快速检测维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌两种病原的双重 PCR 方法。研究表明, 该方法特异性强, 仅对龟鳖维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌有扩增, 而对其他龟鳖常见病原无扩增; 该方法对维氏气单胞菌最低检测核酸质量浓度为 1.75×10^{-3} ng/ μ L, 对鲍曼不动杆菌最低检测核酸质量浓度为 3.96×10^{-3} ng/ μ L, 检出率较传统检测方法高。该研究所建立的双重 PCR 方法灵敏度高、特异性好, 可为临床龟鳖维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌感染的诊断和流行病学调查等提供帮助。

关键词: 维氏气单胞菌; 鲍曼不动杆菌; 双重 PCR

中图分类号: S947

文献标识码: A

文章编号: 1003-1111(2016)05-0587-04

维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 属于弧菌科、气单胞菌属中近年来发现的新种, 可以引起人的胃肠炎、脑膜炎、腹泻、菌血症等疾病^[1-2]。近年来, 越来越多的报道表明, 其可感染水生动物并引发疾病, 国内学者已从框镜鲤 (*Cyprinus carpio*)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 和泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 等水生动物体内分离到具有较强致病性的维氏气单胞菌^[3-7]。鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 是奈瑟氏球菌科、不动杆菌属中的一种革兰阴性球杆菌, 该菌能通过多种方式感染人和其他动物^[8-9], 目前研究发现, 不动杆菌也存在于患病的水生动物体内^[10-13]。笔者自患病龟体内同时分离出维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌, 通过动物回归试验证实这两种菌对龟鳖有较强的致病性。两种病原菌在龟鳖发病症状、剖检变化等方面有较多的共同点, 表现为腹甲和背甲有明显的溃烂, 颈部和四肢有大小不一的白点; 剖检腹腔有恶臭, 肝脾肿大, 有瘀血, 质脆易碎, 呈紫黑色^[14]。该病原常呈混合感染, 传统的检测技术很难准确、快速地作出判断。因此建立一种鉴别维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌及两种病原混合感染的 PCR 检测方法十分必

要。该研究选择维氏气单胞菌 *gryB* 基因及鲍曼不动杆菌 *rpoB* 基因保守序列为靶基因设计了 2 对特异性引物, 建立了快速鉴别诊断维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌及其混合感染的双重 PCR 诊断方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

龟源维氏气单胞菌、鲍曼不动杆菌、松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*)、摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*)、假单胞菌 (*Pseudomonadaceae*) 均为实验室分离、鉴定并保存。

1.2 主要试剂

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒; ExTaq 酶 (5 U/ μ L)、pMD18-T 载体为 Promega 公司产品; 感受态细胞购自上海润成生物科技有限公司; dNTP、DL2000 DNA Marker 等购自大连宝生物工程有限公司; 琼脂糖为 Sigma 公司产品。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中登录的维氏气单胞菌 *gryB* 基因及鲍曼不动杆菌 *rpoB* 基因保守序列设计两对特异性引物 (表 1), 由上海生物工程技术服务有限公司合成。

收稿日期: 2016-02-16; 修回日期: 2016-05-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31502036, 31372228); 海南省自然科学基金资助项目 (314076, 20153086); 海南省高等学校研究项目 (Hnky2016-15).

作者简介: 丁利 (1982—), 女, 副教授, 博士; 研究方向: 动物疾病. E-mail: dingli705@163.com. 通讯作者: 史海涛 (1963—), 男, 教授, 博士生导师; 研究方向: 龟鳖生态学及保护生物学. E-mail: Haitao-shi@263.net.

表 1 PCR 引物的核苷酸序列、扩增长度及登录号

引物	核苷酸序列	扩增长度/bp	登录号
gyrB-F	5'-CAGGATGGTATCGGCGTTGA-3'	379	AB829164
gyrB-R	5'-TGACCACGATCTGGCATCG-3'		
rpoB-F	5'-GAATTCGTACGTATGCCGCC-3'	752	FJ715474
rpoB-R	5'-CTTTGTCGCCAAGTTCACG-3'		

1.4 DNA 模板的制备

将维氏气单胞菌、鲍曼不动杆菌在普通营养琼脂平板上划线培养,取单个菌落接种于 LB 液体培养基中,28 ℃ 震荡培养 24 h,取菌液 2 mL 按照细菌 DNA 提取试剂盒的说明书提取 DNA,待检病料组织 DNA 的提取步骤按照说明书进行。

1.5 PCR 扩增及双重反应条件的优化

分别针对维氏气单胞菌 *gyrB* 基因及鲍曼不动杆菌 *rpoB* 基因 2 对特异性引物进行 PCR 反应,反应条件与体系参照 ExTaq 酶试剂推荐,1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,目的片段进行凝胶回收与 pMD18-T 载体连接,转化,挑取单个阳性菌落并进行重组质粒(pMD-*gyrB* 和 pMD-*rpoB*)的提取,质粒经 PCR 鉴定后由上海生物工程技术服务有限公司进行序列测定。采用 2 对特异性引物,对反应的退火温度、dNTP 浓度、Mg²⁺ 浓度、引物浓度等条件进行优化,以确定最佳反应体系。按 25 μL 反应体系:退火温度分别为 54、55、56、57、58、59、60 ℃ 和 61 ℃,dNTP(2.5 mmol/L)分别为 1、1.5、2、2.5 μL,Mg²⁺(25 mmol/L)分别为 1、1.5、2 μL 和 2.5 μL,引物(10 pmol/L)分别为 0.5、1.0、1.5 μL 和 2.0 μL 进行双重 PCR 反应条件的优化,优化一项时保持其他项参数不变。

1.6 特异性试验

分别用龟源维氏气单胞菌、鲍曼不动杆菌、松鼠葡萄球菌、摩氏摩根菌、假单胞菌基因组 DNA 作为模板,按优化好的反应体系和反应条件进行 PCR 扩增,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析特异性结果。

1.7 敏感性试验

提取维氏气单胞菌、鲍曼不动杆菌的 DNA,经核酸蛋白定量仪测定质量浓度。将 2 种菌的 DNA 等量混匀作为模板,并做 10 倍稀释,用建立的双重 PCR 方法进行扩增,以获得双重 PCR 反应的敏感性。

1.8 PCR 检测方法的应用

采集来自海南省海口、东方市等地区不同养龟场发病龟的肝脏组织参照 1.4 方法进行 DNA 模板的制备并进行双重和单重 PCR 检测,并与传统方法的鉴定结果进行比较。

1.9 临床病料的常规检测方法

无菌采取疑似病料,低温条件下研磨后,用无

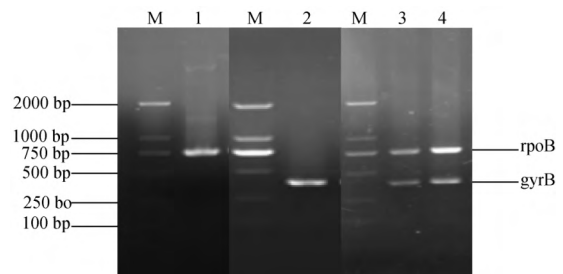
菌生理盐水进行稀释,无菌接种于普通营养琼脂平板,置于 28 ℃ 恒温箱中培养 18~24 h,再挑取单个菌落在无菌条件下进行划线分离、培养,重复以上步骤,直至菌落特征相同时,再挑取单个菌落涂片,进行革兰氏染色并镜检,观察菌落形态及染色特点,并将分离菌纯培养物进行生化试验鉴定。

2 结果

2.1 PCR 扩增及双重 PCR 反应条件的优化结果

通过用 2 对特异性引物分别扩增维氏气单胞菌 *gyrB* 基因及鲍曼不动杆菌 *rpoB* 基因,出现 379、752 bp 大小的片段,与预期结果一致(图 1)。目的片段测序结果进行比对分析,结果显示,测序结果与 NCBI 中维氏气单胞菌 *gyrB* 基因及鲍曼不动杆菌 *rpoB* 基因序列的同源性分别为 96% 和 95%。

分别对 *gyrB* 基因和 *rpoB* 基因的引物浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTP 浓度、退火温度进行优化,结果为:10xPCR 缓冲液 2.5 μL,25 mmol/L 的 Mg²⁺ 2 μL,2.5 mmol/L 的 dNTP 2 μL,5 U/μL 的 Taq DNA 聚合酶 0.25 μL,*gyrB* 基因上、下游引物(10 pmol/L)各 0.75 μL,*rpoB* 基因上、下游引物(10 pmol/L)各 1 μL,模板 2 μL,ddH₂O 补至 25 μL。反应条件为:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 30 s,共 34 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,出现 2 条清晰的条带,大小分别约 379 bp 和 752 bp(图 1)。

图 1 *gyrB*、*rpoB* 基因单独和双重 PCR 扩增结果

2.2 特异性试验

特异性试验结果显示,维氏气单胞菌 *gyrB* 基因及鲍曼不动杆菌 *rpoB* 基因出现 2 条清晰条带,大小分别约 379 bp 和 752 bp,而龟源假单胞菌、摩氏摩根菌、松鼠葡萄球菌及阴性对照均未扩增出目的片段(图 2)。

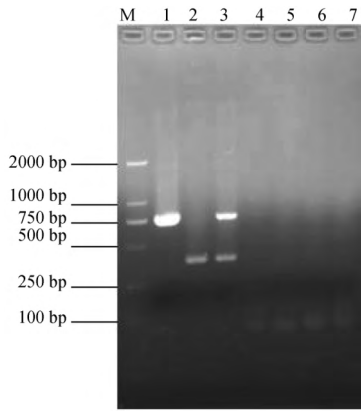


图2 双重 PCR 的特异性试验结果

注:M,DL2000 DNA Marker; 1,鲍曼不动杆菌; 2,维氏气单胞菌; 3,鲍曼不动杆菌和维氏气单胞菌; 4,假单胞菌; 5,摩氏摩根菌; 6,松鼠葡萄球菌; 7,阴性对照。

2.3 敏感性试验

分别对维氏气单胞菌 DNA(17.5 ng/ μ L)和鲍曼不动杆菌的 DNA(39.6 ng/ μ L)进行 $10^0 \sim 10^6$ 倍比稀释作为扩增模板,模板混合物双重 PCR 产物经电泳分析表明,双重 PCR 对维氏气单胞菌最低检测核酸质量浓度为 1.75×10^{-3} ng/ μ L,鲍曼不动杆菌最低检测核酸质量浓度为 3.96×10^{-3} ng/ μ L(图3)。

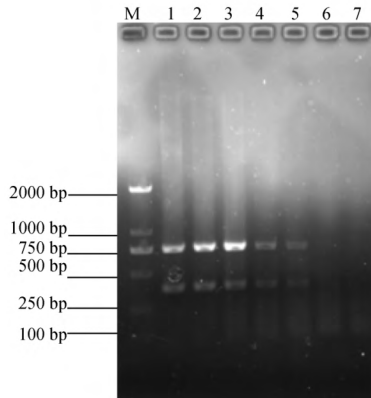


图3 双重 PCR 的敏感性试验

注:M,DNA 标准 DL2000; 1~7,模板 DNA 依次稀释 $10^0 \sim 10^6$ 倍。

2.4 临床样本检测结果

对临床疑似病料进行常规细菌分离培养和 PCR 方法检测,36 份病料,采用常规细菌分离培养方法检出维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌分别为 11 份和 14 份,检出率分别为 30.5%和 38.9%;双重 PCR 方法检测到维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌感染样品分别为 13 份和 15 份,阳性检出率分别为 36.1%和 41.7%,混合感染阳性样品 6 份,阳性检出率为 16.7%(表2)。这与单一 PCR 的阳性检出率一致,且敏感度高于常规检测方法。

表2 送检样品的检测结果

检测方法	检测项目	阳性数	阳性率/%
常规方法	维氏气单胞菌	11	30.5
	鲍曼不动杆菌	14	38.9
双重 PCR	维氏气单胞菌	13	36.1
	鲍曼不动杆菌	15	41.7
	混合感染	6	16.7

3 讨论

鲍曼不动杆菌作为重要条件致病菌可引发多种动物感染^[9],也有发现不动杆菌存在于患病的水生动物体内^[10-12]。目前研究发现维氏气单胞菌除感染人外,还可引起多种水生动物患病^[3-5],本研究发现龟维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌是严重危害我国龟鳖养殖业的两种细菌性传染病,在临床上症状接近且经常呈现混合感染,给我国龟鳖养殖业造成重大损失。

维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌传统的检验方法包括形态学检测、生理生化特征检测和血清学鉴定等,这些检测手段不仅工作量大,且耗时较长。目前也有针对维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌建立的双重 PCR 检测方法^[15-16],但建立的方法均是针对单一菌的检测。维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌引发龟鳖发病的研究几乎未见,对疾病的快速诊断增加了难度,并且作为主要病原菌往往混合感染,导致龟鳖发病。传统的检测方法已不能满足水产养殖生产上的诊断要求^[17]。研究特异性强、灵敏度高的快速诊断技术和方法应用于水产养殖已十分必要。与传统检测方法相比,该研究针对龟维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌所建立的双重 PCR 检测方法操作简单,具有较好的特异性、稳定性和较高的敏感性和准确性,能够实现对上述两种病原的同步快速检测和区分诊断,为临床诊断提供参考。

本次研究检测引物是参照维氏气单胞菌的 gyrB 和鲍曼不动杆菌 rpoB 基因序列设计的。近年来,gyrB 基因和 rpoB 基因常分别被应用于气单胞菌属和不动杆菌属菌种分类鉴定^[18-19]。该研究所设计的 2 对特异性引物在优化的试验条件下分别从维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌中扩增出 379 bp 和 752 bp 的 2 个 DNA 片段,而龟源松鼠葡萄球菌、摩氏摩根菌、假单胞菌及阴性对照均未扩增出目的条带,说明建立的双重 PCR 方法具有较高的种特异性。

本次研究对建立的双重 PCR 诊断方法的敏感性、临床实用性进行了分析。结果显示,所建立的双重 PCR 对维氏气单胞菌最低检测核酸质量浓度为 1.75×10^{-3} ng/ μ L,鲍曼不动杆菌最低检测核酸

质量浓度为 3.96×10^{-3} ng/ μ L。相较于传统检测方法,本试验建立的检测方法对两种菌的检出率高。这说明本试验所建立的双重 PCR 检测方法可为龟鳖维氏气单胞菌和鲍曼不动杆菌感染的临床诊断和流行病学调查提供帮助。

参考文献:

- [1] Figueras M J, Aldea M J, Fernández N, et al. *Aeromonas hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature* [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 58(2):231-234.
- [2] Fraisse T, Lechiche C, Sotto A, et al. *Aeromonas spp. infections: retrospective study in Nimes University Hospital, 1997—2004* [J]. *Pathol Biol*, 2008, 56(2):70-76.
- [3] 李聪,蔡岩,周永灿,等. 海南罗非鱼致病性维氏气单胞菌分离鉴定及药敏特性研究[J]. *水产科学*, 2015, 34(10):640-646.
- [4] 房海,陈翠珍,张晓君,等. 中华绒螯蟹病原维氏气单胞菌的检验[J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(1):45-49.
- [5] 张德锋,刘礼辉,李宁求,等. 我国南方地区鱼源气单胞菌不同种类的流行特征[J]. *水产科学*, 2015, 34(11):673-682.
- [6] 秦蕾,徐静,张晓军. 泥鳅的凡隆气单胞菌感染[J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(12):1100-1102.
- [7] 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.
- [8] Méndez J A, Mateos J, Beceiro A, et al. Quantitative proteomic analysis of host-pathogen interactions: a study of *Acinetobacter baumannii* responses to host airways[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1):1-21.
- [9] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 4版. 北京:中国农业出版社, 2007.
- [10] 林溪,田国明,朱凝瑜,等. 浙江地区异育银鲫内脏携带细菌多样性与毒力基因分析[J]. *水产科学*, 2014, 33(12):785-789.
- [11] 顾天钊,陆承平,陈怀青. 鲍氏不动杆菌—鳊鱼暴发性死亡的新病原[J]. *微生物学通报*, 1997, 24(2):104-106.
- [12] 顾泽茂,柳阳,陈昌福,等. 鲍曼不动杆菌斑点叉尾鮰株的分离与鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 24(4):489-493.
- [13] 陆文浩,陈辉,邹勇,等. 银鲫不动杆菌病原菌鉴定及药敏试验[J]. *水产科学*, 2010, 29(3):156-161.
- [14] 丁利,黎俊瑜,代小梅,等. 乌龟鲍曼不动杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *水产科学*, 2016, 35(4):426-430.
- [15] 边宇,钱宏伟,孟庆峰,等. 框镜鲤致病性维氏气单胞菌双重 PCR 检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(4):304-307.
- [16] 闫中强,沈定霞,罗燕萍,等. 多重 PCR 方法检测多耐药鲍曼不动杆菌基因型[J]. *临床检验杂志*, 2008, 26(6):422-424.
- [17] 李莉,陈颖,张超,等. 水产动物气单胞菌鉴定方法研究进展[J]. *水产科学*, 2015, 34(2):128-134.
- [18] Chacon M R, Castro-Escarpulli G, Soler L, et al. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2002, 44(3):221-225.
- [19] 王建峰,傅鹰,王海萍,等. rpoB 基因在不动杆菌属菌种鉴定中的应用[G]//中华医学会,浙江省医学会,中华医学会微生物与免疫学分会,等. 中华医学会第十次全国临床微生物学术年会暨第九届全球华人临床微生物与感染学术论坛暨 2013 年浙江省医学微生物与免疫学及医学病毒学学术年会. 杭州:中华医学会, 2013:103.

Establishment of Duplex PCR for Detection of *Aeromonas veronii* and *Acinetobacter baumannii* from Turtles

DING Li¹, DAI Xiaomei¹, FANG Zhenhua², WANG Jichao¹, SHI Haitao¹

(1. College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China;

2. School of Biological Engineering, Hainan College of Vocation and Technique, Haikou 570216, China)

Abstract: In this study, a duplex PCR (dPCR) was established and optimized to detect pathogenic bacteria *Aeromonas veronii* and *Acinetobacter baumannii* simultaneously in turtles, and two sets of specific primers were designed for development of the duplex PCR. After optimization of PCR components and reaction profile, a duplex PCR method was established. The results showed that the assay is highly specific to *A. veronii* and *A. baumannii*, and no-target pathogens were detected with the minimum detectable nucleic acid concentration of 1.75×10^{-3} ng/ μ L in *A. veronii* and 3.96×10^{-3} ng/ μ L in *A. baumannii*, more sensitive than conventional methods. The duplex PCR established in this study is specific and sensitive, and will be useful for clinical detection and identification of *A. veronii* and *A. baumannii*.

Key words: *Aeromonas veronii*; *Acinetobacter baumannii*; duplex PCR