

嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性^{*}

朱大玲^{1,2}, 李爱华¹, 汪建国¹, 李明¹, 蔡桃珍¹, 胡靖³

(1 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家实验室, 湖北, 武汉 430072)

2 中国科学院研究生院, 北京 100039;

3 南昌大学生命科学学院, 江西 南昌 330029)

摘 要: 采用 PCR 扩增的方法对 9 株鱼源嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 中的气溶素基因 (*aerA*)、溶血素基因 (*hlyA*) 和丝氨酸蛋白酶基因 (*ahpA*) 进行了扩增。结果表明, 6/9 的 *A. hydrophila* 中存在 *aerA* 基因, 8/9 的 *A. hydrophila* 中存在 *hlyA* 基因, 而在 7/9 的 *A. hydrophila* 中检测到 *ahpA* 基因。通过比较基因检测的结果与嗜水气单胞菌对鲫鱼的致病性, 发现 *ahpA* 阴性菌株是无毒株, 强毒株都呈 *aerA*⁺ *hlyA*⁺ *ahpA*⁺ 基因型。 *aerA*⁺ *hlyA*⁺ *ahpA*⁺ 基因型是致病性嗜水气单胞菌主要的基因型。本研究首次发现 *ahpA* 阳性的嗜水气单胞菌皆为毒力菌株, 并且发现 *aerA* 和 *ahpA* 基因存在相关性, 探讨了嗜水气单胞菌致病性与毒力基因分布的关系。

关键词: 嗜水气单胞菌; 毒力基因; PCR 检测; 致病性

中图分类号: S941 Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 01-0082-04

嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 隶属于气单胞菌科 *Aeromonadaceae* 气单胞菌属 *Aeromonas* 广泛存在于水、土壤和水产动物。是水产养殖动物的主要病原菌之一, 可引起养殖水产动物的传染性、暴发性疾病, 导致严重的经济损失。嗜水气单胞菌是条件致病菌, 国内外学者皆对其进行了深入的研究, 大量的研究表明该菌的致病性与其众多的毒力因子密切相关^[1-7]。已报道该菌的主要毒力因子有气溶素^[1]、溶血素^[2]、胞外蛋白酶^[3-5]及 S 层蛋白^[6,7]等。本试验用 PCR 方法对我国九株鱼源嗜水气单胞菌的编码气溶素、溶血素、胞外丝氨酸蛋白酶 3 种毒力基因进行扩增, 分析 3 种基因在不同菌株间的分布情况, 并比较了它们对异育银鲫毒力的差异, 探讨嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株及培养 试验菌株 *A. hydrophila* XS91-4-1^[8]、ST78-3-3^[9]、58-20-9^[10]、C1 和 C2 皆由本实验室分离并鉴定保存; 菌株 T4、HA9、HA15、HA50 来自南京农业大学陆承平教授惠赠, 分离自罹病中华鳖。各菌株均分别接种普通琼脂斜面 (28℃培养 24 h) 复苏。然后接种 5 mL

的 LB 液体培养基 28℃培养 24 h 备用。

1.1.2 实验鱼 异育银鲫 *Carrassius auratus bebieo* (以下简称鲫鱼) 由中科院水生生物研究所关桥养殖场提供, 质量每尾约 80~100 g 实验前在持续流水的水泥池 (容积为 500 L) 中驯养两周, 证实健康无病后, 用于实验。实验期间水温控制在 25℃左右, 隔天投喂商业配合饲料加青饲料。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 检测

(1) 引物设计。根据已报道的文献, 3 种毒力基因分别选择一对特异性引物进行 PCR 扩增, 引物序列见表 1。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 用 DW 按 50 μmol/L 的浓度溶解, -20℃保存备用。

(2) 基因组 DNA 的提取。①常规酚-氯仿抽提法: 参照文献 [14] 稍加改动。②煮沸法: 参照文献 [3] 稍加改动, 步骤如下: 菌接种 LB 普通培养基, 28℃培养 24 h, 5 000 r/min 离心 10 min 收集, 用 TE 洗涤两次, 然后加入 200 μL TE, 混匀, 沸水浴 10 min 离心取上清直接用于 PCR 扩增, 现配现用。

(3) PCR 反应。采用 25 μL 体系: 10×Ex Taq Buffer 2.5 μL; dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 2 μL; 引物 (20 μmol/L) 各 1 μL; 模板 DNA, 1 μL;

* 收稿日期: 2005-03-28

基金项目: 中国科学院水生生物研究所创新领域前沿项目资助项目 (220317)

作者简介: 朱大玲 (1978 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 汪建国; E-mail: wangjie@hb.ac.cn

表 1 3种毒力基因 PCR扩增引物序列

Tab. 1 The primer sequences for PCR amplification of three *A. hydrophila* virulence genes

基因名称	引物名称	引物序列 (5'-3')	预计扩增产物长度 /bp
气溶素基因	A1 ^[11]	CAAGAACAAGTTCAAGTGGCCA	309
	aerA A2	ACGAAGGTGTGGTTCCAGT	
溶血素基因	H1 ^[12]	GGCCGGTGGCCGAAGATACGGG	592
	hlyA H2	GGCGGCGCGGACGAGACGGGG	
丝氨酸蛋白酶基因	PA1 ^[13]	ATTGGA TCCTGCCTA TCG CTTCAG TTCA	911
	ahpA PA2	GCTAAGCTTGCATCCG TGCCG TATTCC	

TaKaRa Ex Taq (5 U μ L), 0.125 μ L; 加灭菌蒸馏水至 25 μ L。然后按以下步骤进行 PCR 循环环: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s 60 $^{\circ}$ C (*aerA*) 或 62 $^{\circ}$ C (*hlyA*) 或 55 $^{\circ}$ C (*ahpA*) 30 s 72 $^{\circ}$ C 2 min 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

(4) PCR反应产物电泳、回收和测序。PCR 扩增产物取 5 μ L 经 $w=1.2\%$ 进口琼脂糖凝胶 (含适量的 EB) 电泳, 用 Gene-Genius 凝胶成像系统拍照、记录和分析。扩增产物用凝胶纯化试剂盒纯化后, 克隆到 pGEM-T 载体, 进行序列测定, 测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2.2 不同 *A. hydrophila* 菌株对鲫鱼的致病性

(1) 细菌数的测定。将两次活化后的嗜水气单胞菌用 $w=0.5\%$ 生理盐水洗脱菌苔, 按李爱华^[15] 所述, 用分光光度计精确调配, 使终浓度为 3×10^8 cfu (菌落形成单位) $\cdot$ mL⁻¹。

(2) 对鲫鱼的毒力试验。将以上方法配制的菌液, 稀释 10 倍终浓度为 3×10^7 cfu $\cdot$ mL⁻¹, 同批同源实验鱼被随机分为 9 个试验组和对照组, 每个实验组各 5 尾鱼。试验组腹腔注射稀释菌液 (0.3 mL / 尾), 对照组注射无菌生理盐水。实验鱼均放在同等规格的水族箱中静水饲养, 每天观察 2 次, 记录死鱼数并及时移出死亡鱼。实验持续 1 周。

2 结 果

2.1 3种毒力基因 PCR扩增结果

2.1.1 电泳分析 9 株嗜水气单胞菌的基因组 DNA 经 PCR 扩增之后, 3 种毒力基因扩增到的片段都与预期的片段大小相吻合。图 1 显示 9 株 *A. hydrophila* 中 3 种基因的分布情况: *aerA* 基因 6 株阳性, 3 株阴性; *hlyA* 基因 8 株阳性, 1 株阴性; *ahpA* 基因 7 株阳性, 2 株阴性。

2.1.2 序列测定 随机选取上述 3 种基因的 PCR 扩增片段, 进行测序, 结果发现所有测序片段的大小和序列均和预计的相同。说明所扩增的基因即为目的基因。

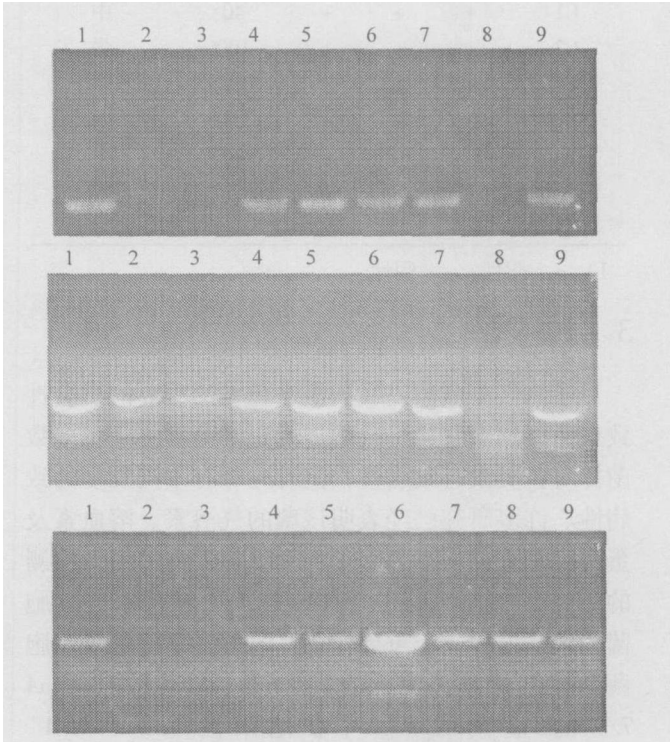


图 1 9 株 *A. hydrophila* 中 *aerA* (A)、*hlyA* (B) 以及 *ahpA* (C) 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of *aerA* (A), *hlyA* (B) and *ahpA* (C) genes from nine strains of *A. hydrophila* (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 代表 *A. hydrophila* 菌株 XS91-4-1, ST78-3-3, 58-20-9, C1, C2, T4, HA9, HA15, HA50, respectively)

2.2 对异育银鲫致死性

9 株毒力基因分布各异的嗜水气单胞菌株中, *A. hydrophila* XS91-4-1 和 C2 当腹腔注射菌液浓度为 3×10^7 cfu 时, 2 d 内的致死率为 100%, 其它菌株对应的实验组有不同程度的死亡情况 (图 2)。其中 *A. hydrophila* ST78-3-3 和 58-20-9 两株菌浓度达到 7.5×10^9 cfu 并以相同剂量腹腔注射鲫鱼, 也未见死鱼现象。根据各菌株的致死率和致死速度判断其相应的致病性见表 2。

表 2 9 株嗜水气单胞菌对异育银鲫毒力 及其与基因分布之间的关系

Tab. 2 The relationship between the distribution of virulence genes of nine *A. hydrophila* strains and their pathogenesis to *Carrasius auratus* lebion (*n*=5)

菌株	基因检测 ¹⁾			致死率 %	致病性
	<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>	<i>ahpA</i>		
XS9141	+	+	+	100	强
ST7833	-	+	-	0	无
58209	-	+	-	0	无
C1	+	+	+	40	中
C2	+	+	+	100	强
T4	+	+	+	100	中
HA9	+	+	+	100	中
HA15	-	-	+	40	中
HA50	+	+	+	40	中
对照组				0	

1) +: 阳性; -: 阴性

3 讨 论

嗜水气单胞菌是我国淡水鱼类的重要的机会性致病菌，然而它又是自然界的正常菌群之一。多数菌株对鱼类没有致病性，但有些却有不同程度的致病性。许多研究已经表明该菌的气溶素、溶血素及蛋白酶是重要的毒力因子^[1-3]。本试验中用于检测的 3 种毒力基因 *aerA*、*hlyA* 及 *ahpA* 在嗜水气单胞菌的致病过程中起重要作用。9 株鱼源嗜水气单胞菌 PCR 扩增结果为，*aerA* 在 6 株、*hlyA* 8 株、*ahpA* 7 株的 *A. hydrophila* 中扩增阳性。*aerA*⁺*hlyA*⁺*ahpA*⁺ 基因型的菌株占 6 株。

PCR 扩增结果与其对鲫鱼致病性实验结果比较发现，当 2 d 内致死率为 100% 的强毒株呈 *aerA*⁺*hlyA*⁺*ahpA*⁺ 基因型。虽然 T4、HA9 和 HA50 菌株的毒力相对较弱，但也属于 *aerA*⁺*hlyA*⁺*ahpA*⁺ 基因型，可见所有具有 *aerA*⁺*hlyA*⁺*ahpA*⁺ 基因型的菌株都是有毒株，有些甚至还是强毒株。

表 2 的结果还显示，所有 *ahpA* 阳性的菌株皆为有毒株，这一现象是我们的首次发现。蛋白酶是嗜水气单胞菌的毒力因子之一，能够直接引起宿主组织损伤，有利于细菌的入侵和营养的供给。所以它的存在与否直接与菌株的毒力相关。菌株 HA15 尽管 *aerA*、*hlyA* 均为阴性，但 *ahpA* 阳性，对鲫鱼的致病性中度。这一结果支持了嗜水气单胞菌毒力是由包括溶血性毒素的众多毒力因子决定的观点^[11-17]。

有研究表明气溶素（*AerA*）和溶血素（*HlyA*）共同影响 *A. hydrophila* 的毒力^[16]，因此常采用 PCR 检测 *aerA* 和 *hlyA* 的方法来鉴定气单胞菌

的潜在致病性^[11-12]。我们研究发现在几乎所有的菌株中都检测到 *hlyA* 基因的存在，此结果与 Micheal^[16] 和 González-Serrano^[17] 的实验结果是一致的，并且没有发现该基因与菌株的毒力存在相关性。菌株 ST78-3-3 和 58-20-9 呈 *ahpA* 阴性，尽管 *hlyA*⁺ 阳性，其菌液浓度达到 7.5×10^9 cfu 致死率仍为 0。与之相反，我们发现 *ahpA* 基因的存在与菌株的毒力相关，且该基因与 *aerA* 基因的存在呈正相关。*aerA*⁻*ahpA*⁺ 基因型的菌株有潜在的致病性，而 *aerA*⁺*ahpA*⁺ 基因型的菌株可能是强毒株。所以建立 *aerA* 和 *ahpA* 双毒力基因的 PCR 检测方法是嗜水气单胞菌毒力预测的可取方法。

此外，对于 PCR 扩增前的基因组的提取，试验发现酚-氯仿法和煮沸法两种方法都可以获得很好的试验结果，煮沸法步骤简单，用时较短，而且比较经济，缺点是需现配现用。

参考文献:

[1] HOWARD S B, GARLAND W J, GREEN M J et al. Nucleotide sequence of the gene for the hole forming toxin and synthesis of *Aeromonas hydrophila* [J]. J Bacteriol. 1987; 169: 2869-2871.

[2] HIRONO I, AOKI T. Nucleotide sequence and expression of an extracellular hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* [J]. Microb Pathog. 1991; 11: 189-197.

[3] CASCÓN A, FREGENEDA J, ALLER M, et al. Cloning, characterization and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila* [J]. J Fish Diseases. 2000; 23: 49-59.

[4] CASCÓN A, YUGUEROS J, TEMPRANO A, et al. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* [J]. Infection and Immunity. 2000; 68: 3233-3241.

[5] CHANG TM, LIU C G, and CHANG M C. Cloning and sequencing analysis of the gene (*epiA1*) encoding an extracellular protease from *Aeromonas hydrophila* [J]. Gene. 1997; 199: 225-229.

[6] THOMAS S R, and TRUST T J. Tyrosine phosphorylation of the tetragonal paracrystalline Array of *Aeromonas hydrophila*. Molecular cloning and high level expression of the S layer protein gene [J]. Journal of Molecular Biology. 1995; 245(5): 568-581.

[7] 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌 S 层的结构和功能 [J]. 水生生物学报. 1998; 22: 6-10.

[8] 徐伯亥, 殷战, 吴玉深, 等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究 [J]. 水生生物学报. 1993; 17(3): 259-266.

[9] 徐伯亥, 葛蕊芳, 熊木林. 鲢鳙鱼的打印病致病细菌的

- 研究[J]. 海洋与湖沼, 1980 11(1): 85-93.
- [10] 王德铭, 葛蕊芳, 吴兰彰, 等. 鲢、青鱼传染性肠炎的研究[J]. 水生生物学报, 1959 3: 241-254.
- [11] WANG G H, CLARK C G, LIU C Y, et al. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR[J]. J Clinical Microbiology, 2003 41: 1048-1056.
- [12] HEUZENROEDER W, WONG C Y F, FLOWER R L P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999 174: 131-136.
- [13] 储卫华, 陆承平. 聚合酶链反应 (PCR) 法检测嗜水气单胞菌丝氨酸蛋白酶基因[J]. 中国兽医学报, 2003 23(5): 463-464.
- [14] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 等译. 北京: 科学出版社出版, 463-468.
- [15] 李爱华. 我国鱼类病原菌耐药性、耐药质粒及几种药物抗菌作用的研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所博士学位论文, 1998 108.
- [16] WONG C Y F, HEUZENROEDER W, FLOWER R L P. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model[J]. Microbiology, 1998 144: 291-298.
- [17] GONZÁLEZ-SERRANO C J, SANTOS J A, GARCÍA-LOPEZ M L, et al. Virulence marker in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002 93(3): 414-419.

The Correlation Between the Distribution Pattern of Virulence Genes and the Virulence of *Aeromonas hydrophila* Strains

ZHU Da-ling^{1,2}, LI Ai-hua¹, WANG Jian-guo¹, LIM ing¹, Cai Tao-zhen¹, HU Ging³

(1. The Key Laboratory of Freshwater ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330029, China)

Abstract Nine strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish or soft shelled tortoise were tested for the presence of three virulence genes including the genes encoding aerolysin, hemolysin and extracellular serine protease (i.e. *aerA*, *hlyA* and *ahpA*, respectively). These genes were investigated using polymerase chain reaction (PCR) with specific primers for each gene. And the pathogenicities to *Carrassius auratus ibeibio* of these strains were also assayed. PCR results demonstrated that the distribution patterns of *aerA*, *hlyA* and *ahpA* were different in these strains. 6/9 of *A. hydrophila* strains were *aerA* positive, 8/9 of strains were *hlyA* positive, whereas 7/9 of strains were *ahpA* positive. However, the assay for pathogenesis found that two strains (*Aeromonas hydrophila* XS91-4-1 and C2) were strong virulent, two strains (*Aeromonas hydrophila* ST78-3-3 and 58-20-9) avirulent and the rest middle virulent to the fish. In conclusion, there are significant correlation between the distribution pattern of the three virulence genes and the pathogenicity to *Carrassius auratus ibeibio*. All strong virulent *A. hydrophila* strains were *aerA*⁺*hlyA*⁺*ahpA*⁺ genotype, and all *aerA*⁺*hlyA*⁺*ahpA*⁺ strains were virulent. Strains with the genotype of *aerA*⁻*hlyA*⁻*ahpA*⁺ had middle pathogenicity. In the present study, we found for the first time that all *A. hydrophila* isolates with the *ahpA* positive were virulent to *Carrassius auratus ibeibio*. Additionally, there was a positive correlation between the virulence of *A. hydrophila* and the presence of *aerA* and *ahpA*.

Key words *Aeromonas hydrophila*; virulence gene; PCR detection; pathogenicity