

一株嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 的 16S—23S rDNA 间区序列分析及应用^{*}

邓先余, 王智学, 叶巧真, 何建国
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 根据细菌的 16S rDNA 3' 端和 23S rDNA 5' 端的高度保守区设计引物, 扩增了一株中华鳖 *Trionyx sinensis* “红板病”病原菌——嗜水气单胞菌的 16S—23S rDNA 间区, 克隆到 pGEM-T 载体上, 测序。用 BLAST 和 DNASTAR 软件对 16S—23S rDNA 间区序列以及其内 tRNA 基因与已发表的嗜水气单胞菌和近缘种的 IGS^G 序列进行比较分析, 设计出对嗜水气单胞菌特异的 PCR 引物, 建立了检测嗜水气单胞菌的 PCR 方法, 进行了特异性、灵敏性检测, 并用此方法检测了不同的水样。

关键词: 嗜水气单胞菌; 16S—23S rDNA 间区; tRNA^{Glu} 基因; 特异性; 灵敏性

中图分类号: Q93-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 04-0074-05

细菌的 16S—23S rDNA 间区 (intergenic spacer, IGS) 大多数包含编码不同的 tRNA 基因, 长度差异和进化速率比 16S rDNA 大 10 多倍, 近年来在细菌系统分类, 特别是相近种和菌株的区分和鉴定方面倍受关注^[1], 不少学者相继报道了荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*^[2]、霍乱弧菌 *V. cholera*^[3]、最小弧菌 *V. mimicus*^[3]、分枝杆菌 *Mycobacterium mycobacterium*^[4]、气单胞菌属 *Aeromonas*^[5] 和河口弧菌 *V. aestuarianus* 等弧菌^[6] 的 16S—23S rDNA IGS, 并据之建立了相应的菌株^[2]、种^[3,4,6] 及属间^[5] 特异的分子鉴定手段。

嗜水气单胞菌广布于近岸海水、河流湖泊、下水道废水中, 是一种条件致病菌, 可以引起人和多种动物的败血症、腹泻等疾病, 在一定的条件下会引起暴发流行。近年来, 我国常有因嗜水气单胞菌引起许多动物 (特别是水产动物) 发病或大量死亡以及使人类致病的报道^[7-15]。弄清嗜水气单胞菌的 16S—23S rDNA IGS 的结构, 有利于阐明此菌的核糖体 RNA 操纵元的进化路径及建立新的检测鉴定方法。笔者在本文中测定了一株从患“红板病”的中华鳖体内分离到的嗜水气单胞菌的 16S—23S rDNA IGS 序列, 得到 2 个片段, 将这 2 个片段与其他属种的相应序列进行比较, 设计出对嗜水气单胞菌特异的 PCR 引物, 建立了一种新的快速检测嗜水气单胞菌的 PCR 方法, 并对其特异性、灵敏性进行了探讨, 应用此方法检测了不同地方的水样

品。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 嗜水气单胞菌 (Ah961004) 分离自患“红板病”的中华鳖; 嗜水气单胞菌 (PPD (134/91)) 由国家海洋局第三海洋研究所陈新华博士赠送; 其他菌株如温和气单胞菌 *A. sobria*、副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus*、河弧菌 *V. fluvialis* 等菌均保藏于本实验室。

1.1.2 试剂 Taq DNA 聚合酶, dNTPs, DL2000 相对分子质量标准购自 TAKARA 公司; pGEM-T 载体试剂盒购自 Promega 公司, *E. coli* TG1 由本实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 菌株培养 将嗜水气单胞菌用营养肉汤液体培养基于 28℃, 220 r/min 振荡培养 18~20 h。

1.2.2 模板 DNA 的制备 取 1.5 mL 菌液, 4 000 r/min 离心 5 min, 得菌体, 弃净上清。用 500 μ L 无菌水重悬。100℃水浴裂解 10 min。8 000 r/min 离心 10 min, 取上清备用。

1.2.3 16S—23S rDNA 间区的 PCR 扩增反应 引物依据文献 [16] 设计合成。正向引物 F: 5'-AAGTCGTAACAAGGTA-3' (16 mer), 对应于 *Escherichia coli* 16S rDNA 上的保守序列 (位置为 1491—1506); 反向引物 R:

* 收稿日期: 2003-09-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30000128)

作者简介: 邓先余 (1972 年生) 男, 博士研究生; 通讯联系人: 何建国; E-mail: lsbr05@zsu.edu.cn

5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTC-3' (21 mer), 对应于 *E. coli* 23S rDNA 上的保守序列 (位置为 188-208)。50 μ L PCR 反应体系内含: 3.0 μ L 10 $\times$ buffer (100 mmol/L Tris HCl (pH 9.0), 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂, $w=1\%$ TritonX 100), 引物各 0.5 μ mol/L, dNTPs 为 250 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 2 U, 模板 DNA 约 50 ng。反应在热循环仪上进行, 循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 60 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应完毕后取 8 μ L 进行 $w=2.5\%$ 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统下分析结果。

1.2.4 PCR 产物的连接、转化及测序 取经纯化的 PCR 产物进行连接和转化。按照 pGEM-T 载体系统操作手册, 将 5 μ L 纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接, 然后将连接产物转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞, 涂于含有 Amp^r/X-gal/IPTG 的 LB 平板, 培养过夜。随机挑选 10 个圆滑的白色菌落, 提取质粒, 进行 DNA 测序。

1.2.5 序列比较分析 序列分析利用 BLAST 在线同源性查询软件查询所测片段序列的属性, 利用 DNASTAR 软件包中的 Editseq 程序对 16S-23S rDNA 间区序列及其内的 tRNA 基因进行分析, 用 Megalign 软件与文献 [5] 等报道的嗜水气单胞菌以及 GenBank 内的近缘种和远缘种的相对应序列进行比较分析。

1.2.6 嗜水气单胞菌特异 PCR 引物的设计 根据序列比较结果, 在 16S-23S rDNA 间区内选取对嗜水气单胞菌特异的序列作 PCR 引物。

1.2.7 最适退火温度 (T_a) 的选择 以嗜水气单胞菌总 DNA 为模板, 退火温度在 40~60 $^{\circ}$ C 间进行 PCR。25 μ L 反应体系组成如下: 1.5 μ L 10 $\times$ buffer (100 mmol/L Tris HCl (pH 9.0), 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂, $w=1\%$ TritonX 100), 引物各 0.3 μ mol/L, dNTPs 为 120 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U, 模板 DNA 约 25 ng。除退火温度有变外, 其它循环参数与 1.2.3 相同。

1.2.8 PCR 检测方法特异性的检测 以嗜水气单胞菌 Ah961004、PPD (134/91)、温和气单胞菌、副溶血弧菌、河弧菌、溶藻弧菌 *V. alginoliticus*、创伤弧菌 *V. vulnificus*、大肠杆菌 *E. coli*、大肠气杆菌 *Aerobacter coli*、荧光假单胞菌和痢疾志贺菌 *Shigella dysenteriae* 的总 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。

1.2.9 PCR 检测方法敏感性的检测 灵敏度检测参照文献 [17] 的方法, 略作改变: 嗜水气单胞菌 (Ah961004) 经营养肉汤液体培养基于 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 h 后, 取 1 mL 菌液加入到 10 mL 营养肉汤液

体培养基 28 $^{\circ}$ C 继续振荡培养 2 h, 取 1 mL 培养液做 10 倍梯度稀释, 取适当稀释液用营养肉汤固体培养基做菌落计数, 同时取适量稀释液, 用煮沸法制备模板 DNA, PCR 扩增。

1.2.10 PCR 检测方法的应用 为了评价环境水体样品是否受嗜水气单胞菌污染, 我们选取自来水、饮用水、珠江水、海水及对虾养殖池水等水样作检测样品。各样品的模板 DNA 制备过程如下: 取各水样 50 mL, 1 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 0.5 mL 无菌水振荡悬浮沉淀, 转入 2 mL 离心管中, 煮沸法制备模板 DNA, PCR 检测。若检出为阳性, 则对该样品用细菌自动检测仪鉴定确认。

2 结果

2.1 PCR 结果

PCR 扩增结果表明: 嗜水气单胞菌 (Ah961004) 的 16S-23S rDNA IGS 至少扩增出 4 条带, 大小在 450~800 bp 范围内 (图 1), 这表明嗜水气单胞菌 16S-23S rDNA IGS 具有明显的长度多态现象 (Length polymorphisms)。另外, 各带的密度不一, 说明各 IGS 在菌体内的拷贝数亦可能不相同。

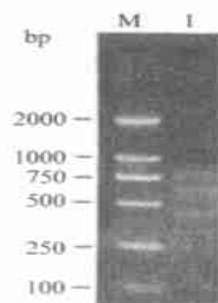


图1 嗜水气单胞菌 (Ah961004) 的 16S-23S rDNA IGS PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of the PCR-amplified 16S-23S rDNA intergenic spacers of *A. hydrophila* Ah961004

M: 相对分子质量标准; 1: PCR 扩增产物

2.2 测序

随机挑选了 10 个 IGS 克隆进行测序, 得到了 2 个长度不等的序列。每个克隆片段末端的序列与高度保守的 16S 和 23S rDNA 末端序列一致, 表明扩增的产物为 16S-23S rDNA IGS。2 个 IGS 长度分别为 521 bp 和 513 bp。用 BLAST 查询所测片段序列的属性结果表明, 2 个不同的 IGS 内含有的 tRNA 基因数目均为 1 个, 而且 IGS 类型相同, 同为 IGSC, 即内含的 tRNA 基因为 tRNA^{Glu} 基因。序列

结构见图 2。

2.3 序列分析比较及引物设计

为了评价所测的嗜水气单胞菌 (Ah961004) 的 2 个 IGSG 序列中是否有可变区域适合设计种间特异的 PCR 引物, 用 Megalign 软件把它们分别与文献 [5] 报道的水气单胞菌 *A. hydrophila* ATCC 7966, *A. hydrophila* ATCC 13444, *A. hydrophila* ATCC 23211, *A. hydrophila* ATCC 23213, *A. caviae* ATCC 15468; *A. enteropelogenes* ATCC 49803; *A. jandaei* ATCC 49568; *A. schubertii* ATCC 43700; *A. trota* ATCC 49657; *A. veronii* ATCC 35624) 以及 GenBank 内查询得到的某些近缘种 (*A. caviae* AN10, *A. culicicola* MTCC 3249, *A. veronii* ACW3,) 和远缘种 (*Salmonella enterica* Ty2, *Escherichia coli* CFT073, *Curtobacterium albidum* ATCC 15831, *Vibrio parahaemolyticus* ZSU009) 的相对应的 IGSG 序列进行比较分析, 发现长度为 521 bp 的 IGSG 序列与近缘种及远缘种的 IGSG 序列有较高的序列差异性 (图略), 其中位于嗜水气单胞菌 (Ah961004) IGSG 内的第 114 个到 132 个碱基 (序列为 3'-CC AACGAGAG AAGCCCTT 5') 为所选用的 5 株嗜水气单胞菌的共有序列, 可以作为设计特异性检测嗜水气单胞菌的 PCR 正向引物 (AhyF), 与 Kong 等^[3] 的结论相同。反向引物选用 *E. coli* 23S rDNA 上的保守序列 (5'-GGT ACTT AGATGTTTCAGTTC 3' (位置为 188—208))。用引物对嗜水气单胞菌扩增嗜水气单胞菌得到的片段大小为 615 bp 左右 (图 3, 4)。

(a)
5'-CACCTCCCTTACCTTAAATGATGACGAAGTTGTTGAGTGTTCACACAGATTGCCTTGATTCAAAGTAGTTAGAGCAAGACCTGATGCGCCTTGCGCTGTCAGTGCTTGTGTTGGTGAAAGCCAAACGAGAGAAGCCCTTTTGTTGGGTGTTGGGATGTGAATTAATGGCGAAAGTCGTTACCCAACTACCTGCGCGCAAGCGCAAGACAAATCCGGTCCCTTTCGCCTAGAGGCCTAGGACACCGCCCTTTCACGGCGGTAAAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGCCACTTCTCTTCTTGCTAACAGAATGCAGACAATAGCATACGTGTTTATGTCTGTTTTCCTTCGGTCACTGACCGTTGCAACATGCTCTTTAACATCTGGAAGCTGATTTAAAAAGTAGTTCTCAACATTTGTTACAAAGTGCCTTGGAACTTCTTGGCGAAAACCAAATTTTATTTGGTCCCTTGTGTACAGCAACTGAATGCCGTTCGACGACACTTCTTGGGGTGTATGGTTA-3'

(b)
5'-CACCTCCCTTAGATGACGAAGTTGTTGAGTGTTCACACAGATTGCTTGATTCAAAGTAGTTAGAGCAAGACCTGATGCGCCTTGCGCTGTCAGTGCTTGTGTTGGTGAAAGCCAAATCGAGACAAGCCATATGTTGGTGTTGTTGGGATGTGAATTAATGGCGCATGCGTTACCCAAATCACCTGACGCGCAAGCAAAATCCGGTCCCTTTCGCCTAGAGGCCTAGGACACCGCCCTTTCACGGCGGTAAAGGGGTTCGAATCCCTAGGGACGCCACTTCTCTTCTTGCTAACAGAATGCAGACAATAGCAT

TACGTGTTTATGTCTGTTTTCCTCGGTCTAGTACCGTTGC AACATGCTCTTTAACATCTGGAAGCTGATTTAAAAAGTAGTTCTCAACATTTGTTACAAAGTGCCTTGGAACTTCTTGGCGAAAACCAAATTTTATTTGGTCCCTTGTGTACAGCAACTTGTGCCGTTCGACGACACTTCTTGGGGTGTATGGTTA3'

图 2 嗜水气单胞菌 (Ah961004) IGSG 序列

Fig 2 The IGSG sequences of *A. hydrophila* Ah961004
序列 a 为全长 521 bp 的 IGSG 序列;
序列 b 全长 513 bp 的 IGSG 序列。
5'端的 CACCT 为 16S rDNA 末端序列,
3'端的 GGTTA 为 23S rDNA 起始端序列;
方框部分为 tRNA^{Glu} 序列, 斜黑体部分为 boxA 序列

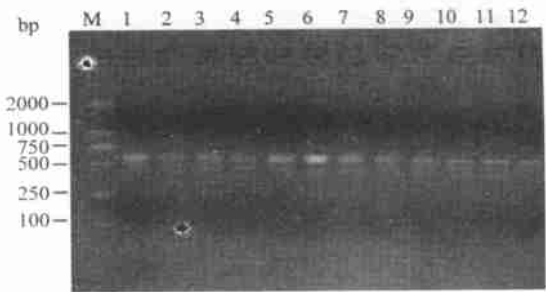


图 3 用引物 AhyF, R 在不同退火温度下扩增嗜水气单胞菌基因组的电泳图

Fig 3 Electrophoresis of the PCR-amplified *A. hydrophila* Ah61004 genome with the Ahyf and R primers on different annealing temperature

M: DNA 相对分子质量标准; 1: 40.0 °C; 2: 40.5 °C; 3: 41.7 °C; 4: 43.2 °C; 5: 45.5 °C; 6: 48.4 °C; 7: 51.7 °C; 8: 55.6 °C; 9: 56.8 °C; 10: 58.4 °C; 11: 59.6 °C; 12: 60.0 °C

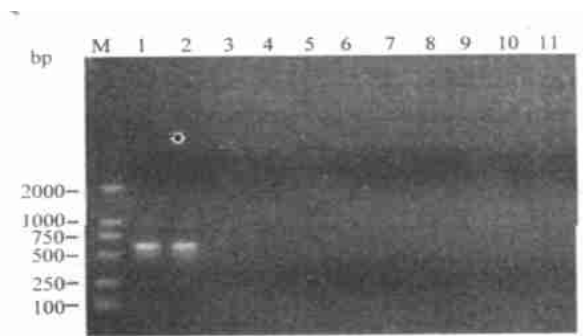


图 4 PCR 检测方法的特异性检测图

Fig 4 Specificity study of this PCR method

1: 嗜水气单胞菌; 2: 嗜水气单胞菌; 3: 温和气单胞菌; 4: 副溶血弧菌; 5: 河弧菌; 6: 溶藻弧菌; 7: 创伤弧菌; 8: 大肠杆菌; 9: 大肠气杆菌; 10: 荧光假单胞菌; 11: 痢疾志贺菌; M: DNA 相对分子质量标准

2.4 最适退火温度选择

决定扩增特异性的一个重要参数是退火温度

(T_a)。每条引物的退火温度根据公式

$$T_a = T_m - 10,$$

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

计算。两条引物算出的退火温度不同时, 按温度较低的计算。在算出的 T_a 附近 ($40 \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) 设计梯度实验验证, 选取最佳退火温度。根据图 4 所示实验结果, 选取的退火温度为 $49\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.5 特异性检测

用新建立的 PCR 检测方法对嗜水气单胞菌及其某些近缘菌、远缘菌进行了检测, 结果如图 5 所示, 只有 2 株嗜水气单胞菌样品检测为阳性, 表明新 PCR 引物是对嗜水气单胞菌特异的。

2.6 敏感性检测

敏感性检测结果见图 5, 可以看出新建 PCR 检测方法对嗜水气单胞菌增菌液的检测低限为 5×10^2 CFU/mL。按每次处理样品 $500\text{ }\mu\text{L}$ 菌液, PCR 反应模板量占 DNA 总量的 2% (φ) 计算, 每 $25\text{ }\mu\text{L}$ PCR 反应体系的检测低限为 5 个细菌。

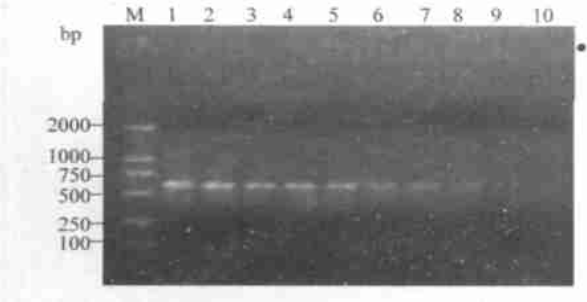


图 5 新 PCR 方法扩增嗜水气单胞菌灵敏度检测图
Fig 5 Sensitivity study of *A. hydrophila* by the new PCR method
1—10: 嗜水气单胞菌增菌液的 10 倍梯度稀释液

2.7 PCR 方法的应用

用 PCR 检测方法对自来水、饮用水、珠江水、海水及对虾养殖池水等水样品做了检测 (图 6), 发现珠江水 (取自中山大学码头) 和海南莺歌海对虾养殖场海水阳性, 表明 2 水样中含有嗜水气单胞菌。2 水样经培养, 分离纯化后, 用自动微生物鉴定系统 (VITEK AMS 60) 鉴定为嗜水气单胞菌的可能性分别达 100% 和 99.8%, 这说明 PCR 方法用于检测水样中的嗜水气单胞菌结果准确、可靠。

3 讨论

本文以嗜水气单胞菌的 16S-23S rDNA 间区为靶区, 选取其内高度保守的序列为引物, 建立了一种新的嗜水气单胞菌的 PCR 检测方法。

随机挑选的 10 个克隆经测序, 得到了 2 个长度不等的 ICS 序列。尽管测出的每一个间区都代表

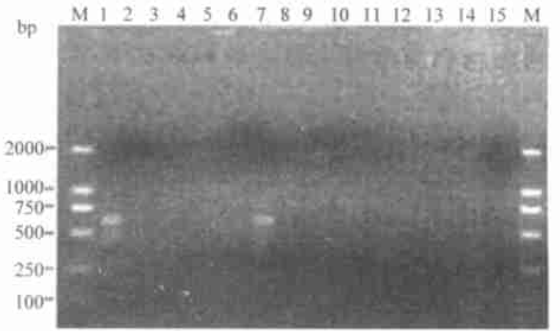


图 6 新 PCR 方法对不同水样的检测结果
Fig 6 The detection result of different water samples using the new PCR method

- 1: 珠江水; 2: 中山大学东湖水; 3: 中山大学北湖水; 4: 中山大学生命科学学院鱼塘水; 5: 自来水; 6: 饮用水 (自来水过滤所得); 7: 海南莺歌海对虾养殖场海水; 8: 海南莺歌海对虾养殖场过滤水; 9: 1 号养殖池水; 10: 2 号养殖池水; 11: 3 号养殖池水; 12: 湛江恒兴对虾养殖场亲虾养殖池水; M: DNA 相对分子质量标准

了来自一个 *rrn* 操纵元 (*rrn* operon) 的序列, 但是每一菌株的 *rrn* 操纵元数目并不能确定, 因为并非所有的间区都能被克隆上, 并被挑出测序^[19]。同时, 由于挑选克隆的随机性及数目的有限性, 使得测出的 ICS 序列数目少于扩增电泳图谱上的 4 条。

新建 PCR 检测方法可以检出菌液中 5×10^2 cfu/mL 或 5 cfu/25 μL 反应体系, 如此高的敏感度可能跟细菌 16S-23S rDNA 间区为多拷贝的特点有关^[4]。如此高的灵敏度, 也使得即使目的菌含量很低的样品, 都可以被检出。

用 PCR 方法检测水样品中的嗜水气单胞菌优越性很多, 表现在以下几个方面: ①操作简便; 检验周期短, 每一批样品从样品准备到检出只需要约 3~4 h; ②灵敏度高, 结果准确; ③检测成本低。由于用 PCR 方法检测水样品中的嗜水气单胞菌有着快速、简便的特点, 可以大大缩短检验周期, 适应了环境监测和水质检测迅速发展的需要, 具有较强的实用价值。

本文新建的 PCR 检测方法主要应用在水样品中的嗜水气单胞菌检测上, 若对不同来源的嗜水气单胞菌采取相应的总 DNA 抽提技术, 此方法可更广泛地应用于人和动物因嗜水气单胞菌感染的临床诊断, 水产养殖的病害防治等方面。

致谢: 感谢广东省人民医院老干所何其勇先生用自动微生物鉴定系统快速鉴定细菌; 感谢翁少萍老师指导部分实验。

参考文献:

[1] JIAO Z Q, LIU X M. A new hot spot in taxonomy and in-

- dentification of bacteria; the 16S—23S rDNA intergenic spacer[J]. Microbiol, 2001, 28(1): 85—89.
- [2] BROWN G, GAGNE S, DION P. Identification of variability of ribosomal DNA spacer from *Pseudomonas* soil isolates[J]. Can J Microbiol, 1993(40): 541—547.
- [3] CHUN J, HU Q A, COLWELL R. Analysis of 16S—23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*[J]. Amer Soc microbiol, 1999, 65(5): 2202—2208.
- [4] KONG R Y C, PELLING A, SO C L, et al. Identification of oligonucleotide primers targeted at the 16S—23S rDNA intergenic spacers for Genus- and Species-specific detection of *Aeromonas*[J]. Marine Pollut Bullit, 1999, 38(9): 802—808.
- [5] LEE S K Y, WANG H Z, LAW S H W, et al. Analysis of the 16S—23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences[J]. Marine Pollut Bullit, 2002, 44: 412—420.
- [6] ZHANG L X, ZHUANG Y H. The study on Differentiation and detection of *Mycobacterium* species by PCR amplification [J]. Microbiol, 2001, 28(1): 55—58.
- [7] TANG D M. Analysis on pathogen of explosive epidemic disease of the high density cultured tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. Guangxi Agricultural Science, 1997(1): 45—46.
- [8] WANG G X, XIA Z L, FANG D. Investigation into the cause of enuptive death of fish occurring in Xuanwu Lake, Nanjing [J]. J Lake Sci, 1997, 9(1): 41—48.
- [9] JIANG J J. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* of Chinese turtle [J]. J Nanjing Agricultural College, 1997(1): 16—19.
- [10] LI W K, YU X, WEN X R, et al. Study on pathogen of explosive epidemic disease of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis* H. Milne-Edward) in Liaoning [J]. Fisheries Science, 1999, 18(4): 10—13.
- [11] HE L J. Causes of explosive epidemic hemorrhage disease of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. J Sichuan Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2001, 15(1): 27—30.
- [12] WANG J H, KONG Q M. One septicemia case caused by *Aeromonas hydrophila* [J]. J Binzhou Medical College, 1997, 20(3): 297.
- [13] YIN Z Y, LIU R F, FENG Z H, et al. The detection and analysis of *Aeromonas* in 1126 diarrhea cases [J]. J Preventive Medical Information, 1999, 15(1): 5—7.
- [14] FENG H Q. One case of food poisoning caused by *Aeromonas hydrophila* [J]. Preventive Medical Literature Information, 2002, 8(6): 722—723.
- [15] ZHOU T L, LI C, DAI M J. One case of wound infection caused by *Aeromonas hydrophila* [J]. China J Orthop & Trauma, 2002, 15(2): 91.
- [16] GÜRTLER V, STANISICH V A. New approached to typing and identification of bacteria using the 16S—23S rDNA spacer region[J]. Microbiol, 1996, 142: 3—16.
- [17] KOU Y T, MA H M, LIU C G. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR method in seafood [J]. Marine Science, 2002, 26(9): 66—70.

Analysis and Application of the Sequences of 16S—23S rDNA Intergenic Spacer of *Aeromonas hydrophila*

DENG Xian yu, WANG Zhi xue, YE Qiao zhen, HE Jian guo

(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Using the conserved regions at 3' end of 16S and 5' end of 23S rDNAs as primers, the 16S—23S rDNA IGSs of *A. hydrophila*, isolated from diseased Chinese turtle (*Trionyx sinensis*), were amplified and cloned into pGEM T vector. Different clones were selected to be sequenced and the sequences were analysed with the software BLAST and DNASTAR. Based on the results from multiple sequence alignment of representative IGS^G types, a pairs of primers which were specific to *A. hydrophila* were successfully designed for PCR. Then, a new PCR method was developed and its species specificity and sensitivity were tested. Finally, this method was used to detect *A. hydrophila* in different water samples.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; 16S—23S rDNA intergenic spacer (IGS); species specificity; sensitivity