

多重 PCR 技术检测食用鱼类产品中  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌毒性基因研究

余文杰

(漳州职业技术学院食品与生物工程系,福建漳州 363000)

**摘要** 气溶素和溶血素是  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌的重要毒力因子。为建立检测食用鱼类产品中  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌气溶素基因 (*aerA*) 和溶血素基因 (*ahh1*) 的技术,本文采用多重 PCR 技术检测 28 个来源于食用鱼类产品的  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌样本(包括鲤鱼片、水、鲫鱼片、鳊鱼片、鲢鱼片和带鱼片),并用标准菌株嗜水气单胞菌 ATCC7965 和分离于死蟒蛇的带有  $\beta$ -溶血性毒素基因的嗜水气单胞菌作为对照。结果表明,所有菌株样本(100%)被证实携带嗜水气单胞菌 16S rRNA 基因(356 个碱基对),所有嗜水气单胞菌样本(100%)被证实携带 *ahh1* 毒性基因(130 个碱基对),26 个嗜水气单胞菌样本(93%)被证实携带 *aerA* 基因(309 个碱基对)。本研究证实  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌菌株广泛存在于供人类食用的鱼类产品中,对消费者产生了一定的健康风险。

**关键词** 食用鱼类产品;嗜水气单胞菌;多重 PCR;气溶素;溶血素

**中图分类号** TS254.5 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2019)11-0217-02

### Multiplex PCR Detection of Haemolysin Genes in $\beta$ -Haemolytic *Aeromonas hydrophila* Strains Isolated from Edible Fish Product

YU Wen-jie

(Department of Food and Biological Engineering, Zhangzhou Vocational and Technical College, Zhangzhou Fujian 363000)

**Abstract** Aerolysin and haemolysin are viewed as important virulence factors related to the entero-toxicogenicity of  $\beta$ -haemolytic *Aeromonas hydrophila*. In order to establish a method for detection of genes coding aerolysin (*aerA*) and haemolysin (*ahh1*) in  $\beta$ -haemolytic *A. hydrophila* strains isolated from edible fish products, a multiplex PCR was applied to detect the  $\beta$ -haemolytic *A. hydrophila* strains isolated from 28 samples of edible fish products (including carp cutlets, water, crucian cutlets, trout cutlets, silver carp cutlets, trout cutlets and haitail cutlets), and the study used a reference *A. hydrophila* strain (ATCC 7965) and an *A. hydrophila* strain isolated from a dead anaconda, as positive controls with strong  $\beta$ -haemolytic activity. The results showed that the chromosome gene 16S rRNA (356 bp) was confirmed in all *A. hydrophila* strains (100%), the gene *ahh1* (130 bp) was confirmed in all *A. hydrophila* strains (100%), and the gene *aerA* (309 bp) was confirmed in 26 *A. hydrophila* strains (93%). The presence of  $\beta$ -haemolytic *A. hydrophila* strains in edible fish products causes a risk to the consumer's health.

**Key words** edible fish product; *Aeromonas hydrophila*; multiplex PCR; aerolysin; haemolysin

嗜水气单胞菌普遍存在于水环境中,被视为一种机会主义病原体,可以引发人类肠胃炎、伤口感染、败血症以及鱼类的出血性败血症。众所周知,嗜水气单胞菌在鱼类和鱼类产品中流行,因而日常食用的鱼类产品非常容易受到污染,成为传播病原菌的载体。研究表明,食用鱼类产品的气单胞菌感染比例可以达到 37.3%~93.0%<sup>[1]</sup>。气单胞菌属的分离鉴定表明,食用鱼类产品中嗜水气单胞菌是主要的微生物污染源。

嗜水气单胞菌毒性因子包括溶血素、气溶素、蛋白酶、脂酶、DNA 酶,这些物质都是引发人类和鱼类疾病的主要发病因子<sup>[2]</sup>。嗜水气单胞菌不仅可以在最佳生长温度下形成毒性因子,而且在冰箱条件下也可以形成毒性因子。嗜水气单胞菌引发的肠胃炎是最常见的人类疾病。从溶血性肠胃炎患者身上经常可以分离出嗜水气单胞菌,其原因主要是患者食用了受病原体污染的食物或水。

嗜水气单胞菌溶血素属于一大类造孔细菌溶细胞素当中的一种,会导致胞质内容物泄漏,从而破坏细胞膜,最终引发细胞死亡。嗜水气单胞菌目前已经发现存在 2 种主要的溶血性毒素,包括溶血素和气溶素<sup>[3]</sup>。气溶素是一种细胞外的可溶性亲水蛋白,表现出溶血特性和细胞溶解特性,可以绑定到真核细胞的特定糖蛋白受体表面,从而形成毛孔。有研究显示, $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌可以引起广泛存在于兔回肠循环的积液<sup>[4]</sup>。同时有研究表明,2 种  $\beta$ -溶血性嗜水

气单胞菌的毒素蛋白都是由具有强毒性的基因负责翻译生产。*aerA* 基因翻译生产的溶血素蛋白广泛存在于产毒素的菌株中。从食物和水分离得到的气单胞菌属菌株通常包含有毒素基因。基于此,本文研究了基因编码的气溶素和溶血素是否存在于人类食用鱼类产品中,并且证实是否属于  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌,以期为其控制做出比较好的研究基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 供试菌株

本试验是通过从食用鱼类产品中分离得到  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌,采用 API20NE 生化特性对其进行鉴定,样本包括鲤鱼片 ( $n=132$ )、水 ( $n=6$ )、鲫鱼片 ( $n=20$ )、鳊鱼片 ( $n=11$ )、鲢鱼片 ( $n=20$ )、鲑鱼片 ( $n=20$ ) 和带鱼片 ( $n=20$ )。对照菌株是嗜水气单胞菌 ATCC7965,购买自中国菌种保存实验室。同时采用分离于死蟒蛇的含有  $\beta$ -溶血性毒素基因的嗜水气单胞菌作对照。本实验室分离纯化和保存所有的菌株。

### 1.2 供试培养基与试剂

培养基和化学品是从上海一基实业有限公司购买获取,PCR 试剂盒是从深圳市长征生物科技有限公司购买获取。引物的制备是根据前人描述的方法开展。引物是由大连宝生物工程公司进行合成,具体见表 1。

### 1.3 试验菌株 DNA 提取

细菌 DNA 制备过程是根据制造商的产品说明书(北京普洛麦格生物技术有限公司)来开展。

### 1.4 PCR 反应条件

多重 PCR 反应包括 3 对引物。PCR 反应混合物(25  $\mu$ L)

**基金项目** 福建省科技厅科学研究项目(JK2012012)。

**作者简介** 余文杰(1977-),男,福建漳州人,硕士,讲师,从事生物科学的教学及科研工作。

**收稿日期** 2019-02-22

表1 引物和目标基因以及PCR扩增产物

引物	序列(5'-3')	基因	基因定位点	产物大小/bp
AH-ahh1F	GCCGAGCGCCGAGAAGGTGAGTT	<i>ahh1</i>	961-983	130
AH-ahh1R	GAGCGCGGCTGGATCGGGTTGT	<i>ahh1</i>	1090-1071	130
AH-aerAF	CAAGAACAAGTTCAAGTGGCCA	<i>aerA</i>	1323-1344	309
AH-aerAR	ACGAAGGTGTGGTTCCAGT	<i>aerA</i>	1631-1613	309
AH-16SF	GGGAGTGCCTTCGGGAATCAGA	16S rRNA	1020-1041	356
AH-16SR	TCACCCGCAACATTCTGATTG	16S rRNA	1375-1355	356

中包含:12.5 μL Taq 酶和 1.0 μL *ahh1* 引物,1.0 μL *aerA* 引物,0.2 μL 16S rRNA 引物和 1 μL 提取 DNA,余量为双蒸水。

使用 PCR 仪器(ABI-2720,美国贝登仪器公司)进行扩增,PCR 扩增条件:95 °C初始变性 5 min,95 °C变性 30 s,59 °C退火 30 s,72 °C延伸 30 s,50 个循环,最后 72 °C延伸 7 min。

1.5 电泳检测

将扩增的 DNA 片段放置在 2%琼脂糖凝胶进行水平电泳,使用 1xTAE 缓冲溶液(0.04 MTris,0.02 mol/L 醋酸,0.002 mol/L Na<sub>2</sub>EDTA)、100 V、45 min,使用 8 μL PCR 产物。

凝胶使用溴化乙锭 1 μL/mL 进行染色 30 min,紫外线光照下观察。

基因标准品是采用 100 个碱基对的 DNA 梯度标记物(上海启发试验试剂有限公司),从而对其分子量进行识别。

2 结果与分析

食用鱼类产品中 β-溶血性嗜水气单胞菌的发病情况如表 2 所示。经过多重 PCR 证实,28 个 β-溶血性嗜水气单胞菌样本都携带有染色体基因 16S rRNA。所有嗜水气单胞菌

样本(100%)都携带有 *ahh1* 基因。26 个(93%)的嗜水气单胞菌样本携带有 *aerA* 基因。*aerA* 基因不存在于 1 个(25%)鲤鱼片和 1 个(17%)带鱼片中(表 3)。16S rRNA 基因 PCR 扩增产物(356 个碱基对)、*ahh1* 基因扩增产物(130 个碱基对)、*aerA* 基因扩增产物(309 个碱基对)以及多种食用鱼类产品中 β-溶血性嗜水气单胞菌的检测结果见图 1。

表2 食用鱼类产品β-溶血性嗜水气单胞菌的发病情况

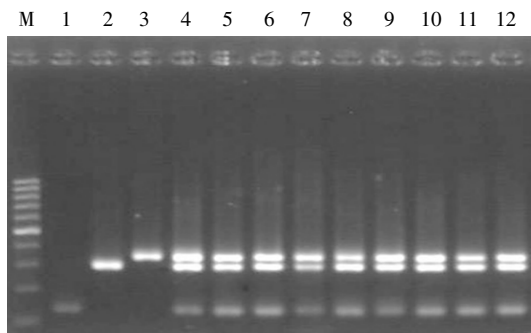
菌株来源	样品数量个	气单胞菌个	β-溶血性嗜水气单胞菌/个
鲤鱼片	132	128	13
水	6	6	1
鲫鱼片	20	14	4
鳊鱼片	11	10	4
鲢鱼片	20	17	6
鲑鱼片	20	19	6
带鱼片	2	2	2
总计	211	196	36

3 结论与讨论

近几年,PCR 是用于检测食品微生物病原体的首选方

表3 β-溶血性嗜水气单胞菌的溶血素编码基因比例

菌株来源	细菌数量个	β-溶血毒力	<i>Ahh1</i>		<i>aerA</i>		16S rRNA	
			数量/个	比例/%	数量/个	比例/%	数量/个	比例/%
嗜水气单胞菌 ATCC7965	1	++++	1	100	1	100	1	100
死鳞蛇嗜水气单胞菌	1	++++	1	100	1	100	1	100
鲤鱼片	4	++++	4	100	3	75	4	100
水	1	++++	1	100	1	100	1	100
鲑鱼片	2	++++	2	100	2	100	2	100
鳊鱼片	3	++++	3	100	3	100	3	100
鲢鱼片	7	++++	7	100	7	100	7	100
鲫鱼片	3	++++	3	100	3	100	3	100
带鱼片	6	++++	6	100	5	83	6	100
总计	28		28	100	26	93	28	100



注:M 为 DNA 标准品,1 为 *ahh1* 对照基因,2 为 *aerA* 对照基因,3 为 16S rRNA 对照基因,4 为嗜水气单胞菌 ATCC7965,5 为死鳞蛇嗜水气单胞菌,6 为鲤鱼片,7 为水体,8 为鲫鱼片,9 为鳊鱼片,10 为鲢鱼片,11 为鲑鱼片,12 为带鱼片。

图1 食用鱼类产品中β-溶血性嗜水气单胞菌多重PCR检测

法,主要原因是其具有速度快、高敏感性和特异性等特点<sup>[5]</sup>。此外,使用特定的毒力基因引物可以将致病性菌株和非致病

性菌株区分开。在本研究中,使用特定的引物来证实嗜水气单胞菌气溶素和溶血素基因的存在,并证实这些是主要毒力因子。研究人员普遍认为,气单胞菌属感染的发病机制是多因素和多毒力因子综合作用的结果<sup>[6]</sup>。一个毒力因子或其中几个的组合可以在不同气单胞菌属中存在并产生相应的毒性。正是如此,还需要更多的研究来区分存在于不同气单胞菌属的几个毒力因子,有助于更好地理解气单胞菌属感染的发病和流行病学机理。因此,在过去的几年中,前人的研究主要集中在溶血素作为气单胞菌属的主要毒力因子。许多研究人员证实溶血性因子是其致病机理,最深入研究的是溶血素和气溶素。

气溶素是溶血性毒素,*aerA* 基因负责编码并起着关键作用,从而引起鱼类感染。气溶素是嗜水气单胞菌致病的主要毒力因子,会导致红细胞溶解,进而致鱼表皮和内脏出血。研究发现,气溶素存在于所有出血性败血症鱼体分离得到

(下转第 225 页)

#### 4 参考文献

- [1] 刘晓梅.V<sub>C</sub>的临床不合理应用及常见不良反应[J].临床合理用药杂志,2012,5(25):37-38.
- [2] SMIROFF N, CONKLIN P L, LOEWUS F A. Biosynthesis of Ascorbic Acid in Plants: A Renaissance[J]. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 2001, 7(52): 437-467.
- [3] NEJATI -YAZDINEJAD M. Indirect determination of ascorbic acid (vitamin C) by spectrophotometric method[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2007, 42(12): 1402-1407.
- [4] 李军明, 张军. 体内维生素的生理功能和日常保健的科学合理摄取[J]. 中国食物与营养, 2009(3): 53-55.
- [5] 宋美晶. 不同品种猕猴桃的成分研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2013.

(上接第 218 页)

的嗜水气单胞菌以及从 60% 的健康鱼嗜水气单胞菌菌株分离得到<sup>6</sup>。

根据前人研究, 一个气单胞菌属菌株可以同时携带编码几个毒力因子的基因<sup>7</sup>。本文研究发现, *ahh1* 基因存在于食用鱼类产品的 41% 温和气单胞菌和 55% 嗜水气单胞菌中。*aerA* 和 *ahh1* 基因被发现在 68% 嗜水气单胞菌中存在。此外, 即使只有 *aerA* 基因,  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌也表现出细胞毒性特性。不同的是, 溶血性温和气单胞菌和非溶血性嗜水气单胞菌没有携带 *aerA* 基因。而分离来自于淡水鱼类产品 53% 的嗜水气单胞菌被发现含有 *aerA* 基因。分离来自海洋鱼类分离得到的 89% 嗜水气单胞菌发现存在气溶素基因 *aerA* 和溶血素基因 *hlyA*。同样的研究结果也证实, 新鲜的鲑鱼、鳕鱼鱼片和切片以及真空包装的熏制鳕鱼和鲑鱼片中分离得到的嗜水气单胞菌都含有 *aerA* 基因, 而 92% 的样本含有 *hlyA* 基因<sup>8</sup>。前人研究表明, 冷冻鱼分离得到的  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌株都含有气溶素基因<sup>9</sup>。相反的结果是, 寿司、水生生物沙拉、鱼肉酱和虾分离得到嗜水气单胞菌没有发现溶血素基因和气溶素基因<sup>10</sup>。本研究中,  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌检测结果都含有 *ahh1* 基因, 而 93% 的样本含有 *aerA* 基因, 其中 1 株从鲤鱼片和 1 株从带鱼片分离得到的菌株均没有携带 *aerA* 基因。

前人研究表明, 嗜水气单胞菌污染的和鱼产品都可以引发人体的腹泻<sup>10</sup>。大多数情况下, 此类疾病与水产养殖产品或冷藏食品直接食用息息相关。此外, 有研究发现, 气单胞菌属菌株与其他菌株相比较, 同时携带有 *ahh1* 和 *aerA* 基因的菌株具有更高的细胞毒性滴度<sup>11</sup>, 从而证实  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌气溶素是一种重要的毒力因子。嗜水气单胞菌的致病性是多因素造成的, 可能取决于各种毒性因子的协同效应。在前人研究中, 发现所有分离来自鱼的嗜水气单胞菌菌株含有 *aerA* (100%) 和分离来自腹泻患者的菌株含有 *hlyA* (83%) 基因。溶血素也是人类气单胞菌属感染的发病机理重要组成成分。前人研究表明, 从腹泻病人的粪便中分离出 6 个嗜水气单胞菌菌株都含有  $\beta$ -溶血性 *ahh1* 基因, 1/2 的菌株同时含有气溶素编码基因<sup>12</sup>。

考虑到免疫活性差和免疫力低下的人群越来越多, 有可能受到气单胞菌属感染潜在风险, 而且广泛的气单胞菌属存在于环境中, 长期监测潜在致病性气单胞菌属有助于公众健康。本研究表明, 毒性嗜水气单胞菌的 PCR 鉴定方法相比传统的微生物鉴定方法, 非常有用, 具有敏感、快速的特

- [6] 郭远凯, 郑艳霞, 梁奇峰. 铜磷钼蓝分光光度法测定维生素 C 的含量[J]. 煤炭与化工, 2018, 41(7): 156-160.
- [7] 陈亚斌, 何建国, 马天兰, 等. 维生素 C 荧光光谱的机理研究[J]. 食品工业科技, 2016, 3(22): 112-115.
- [8] 周宁菱. 饮料中维生素 C 含量的测定[J]. 食品安全导刊, 2018(34): 74-76.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中抗坏血酸的测定: GB 5009.86—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [10] 王淼. HPLC 法同时测定阿司匹林维生素 C 泡腾片中药物含量[J]. 海峡药学, 2018, 30(11): 65-68.
- [11] 余以刚, 肖性龙. 食品质量与安全检验实验[M]. 北京: 中国质检出版社, 2014.

点。本研究结果证实, 嗜水气单胞菌菌株存在毒力基因编码毒力因子。这些菌株是危险的, 有可能导致食物中毒。食用鱼类产品的安全性受到众多因素的影响, 包括鱼的来源、鱼的特性和加工方法。新鲜的鱼经过适当的加热进行食用是低风险的, 然而如果食用生鱼, 不够熟或仅进行简单处理会增加食用风险。食用鱼类产品含有嗜水气单胞菌对人类是危险的, 特别是对敏感的人群, 例如儿童、老年人和免疫功能不全的人。

本研究证实人类食用的鱼类产品存在  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌。此外, 研究发现, 所有这些菌株携带 *ahh1* 基因, 多数  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌携带 *aerA* 基因, 从而证实  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌溶血素基因和气溶素基因普遍存在于鱼类和鱼类产品中, 对消费者的健康造成潜在风险。因此, 有必要通过多重 PCR 检测技术进行快速有效的  $\beta$ -溶血性嗜水气单胞菌的分离鉴定, 预防其对人体产生危害。

#### 4 参考文献

- [1] JANDA J, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(1): 35-73.
- [2] SUNEE K, SUWAT D, RUNGRWAN C, et al. Distribution of *Aeromonas hydrophila* Serogroups in different clinical samples and the development of polyclonal antibodies for rapid identification of the genus *Aeromonas* by direct agglutination[J]. Microbiol Immunol, 2002, 46(12): 875-879.
- [3] GRIM C J, KOZLOVA E V, SHA J, et al. Characterization of *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes[J]. Microbiology, 2013, 4(2): 64-73.
- [4] ANSARY A, HANEEF R M, TORRES J L, et al. Plasmids and antibiotic resistance in *Aeromonas hydrophila* isolated in Malaysia from healthy and diseased fish[J]. J Fish Dis, 1992, 15(2): 191-196.
- [5] GONZÁLEZ-SERRANO C J, SANTOS J A, GARCÍA-LÓPEZ M L, et al. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case[J]. J Appl Microbiol, 2002, 93(3): 414-419.
- [6] SUBASHKUMAR R, THAYUMANAVAN T, VIVEKANANDHAN G, et al. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in acute gastroenteritis among children[J]. Indian J Med Res, 2006, 123(1): 61-66.
- [7] 储卫华, 陆承平. PCR 扩增特异性 16SrDNA 和溶血素基因检测致病性嗜水气单胞菌[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 79-82.
- [8] 王远微, 汤承, 于学辉, 等. 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 947-951.
- [9] CHEN Q, YAN Q, WANG K, et al. The portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into *Pseudosciaena crocea* and characteristic of the bacterial adhesion to the mucus[J]. Dis Aqu Organ, 2008, 80: 181-188.
- [10] 郭松林, 关瑞章, 柳佩娟. 双重 PCR 法快速检测欧鳊鲫嗜水气单胞菌[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2007, 12(4): 294-300.
- [11] SHEMESH M, TAM A, STEINBERG D. Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions[J]. Microbiology, 2007, 153: 1307-1317.
- [12] 毛宁, 王志明, 郑莺, 等. 嗜水气单胞菌与其拮抗菌 R-15 的生长曲线研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2008, 24(1): 82-85.