

病原迟钝爱德华菌毒力基因及双重 PCR 与 LAMP 检测方法的建立

张晓君*, 白雪松, 毕可然, 阎斌伦, 秦 蕾, 陈 丽, 徐 静

(淮海工学院海洋学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏省海洋资源开发研究院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 为明确牙鲆及大菱鲆病原迟钝爱德华菌毒力基因的携带情况并建立分子检测方法, 实验以迟钝爱德华菌 *fimA*、*fimB*、*gadB* 及 *citC* 为靶基因设计特异性引物, 进行 PCR 扩增及环介导恒温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 并对其特异性、灵敏性和实际应用进行了比较。结果显示, 10 株病原迟钝爱德华菌均扩增出 *fimA*、*fimB*、*gadB* 及 *citC* 4 种毒力基因, 目的条带大小分别为 240、217、171 及 119 bp, 4 株对照菌无任何扩增条带; 以 *fimA* 和 *gadB* 设计的两对引物进行的双重 PCR 扩增, 同一 PCR 反应体系中病原迟钝爱德华菌可扩增出 240 和 171 bp 两条目的条带, 且灵敏度为 3.0×10^3 CFU/mL, 4 株对照菌无任何扩增条带; 以 *fimA* 设计的 4 条特异引物进行的 LAMP 扩增, 病原迟钝爱德华菌可扩增出阶梯状条带, 反应产物加入荧光染料 SYBR Green I 后反应液呈现明显的绿色阳性反应, 4 株对照菌无阶梯状扩增条带且呈现橙色阴性反应, 灵敏度为 3.0×10^1 CFU/mL, 比双重 PCR 的检测限要低 100 倍。研究表明, 操作简便、快速且特异性及灵敏性强的 LAMP 检测方法, 对迟钝爱德华菌引起的水产动物疾病的快速诊断具有实践意义。

关键词: 迟钝爱德华菌; 毒力基因; 双重 PCR; 环介导恒温扩增技术 (LAMP)

中图分类号: Q 785; S 941

文献标志码: A

迟钝爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*) 对鱼类的感染是日本学者保科于 1962 年在鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 中首先发现的, 现已知该菌不仅是鳗鲡的一种重要病原细菌, 还可感染多种人工养殖的淡水鱼, 如鲫 (*Carassius auratus*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、虹 鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、大 鳞 大 马 哈 鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*)、黑 鲈 (*Micropterus salmoides*)、紫 鲮 (*Serola purpurascens*)、真 鲷 (*Pagrosomus major*)、黑 鲷 (*Sparus macrocephalus*)、鲮 鱼 (*Mugil cephalus*)、星 斑 川 鲮 (*Platichthys stellatus*)、牙 鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、大 菱 鲆 (*Scophthalmus maximus*) 等均可被感染发病。在鲆鲷鱼类养殖生产中, 该菌危害尤为严重, 引起的牙鲆及大菱鲆感染发病无明显的季节性, 对不同月龄的牙鲆及大菱

鲆均可感染且发病率和致死率均较高; 病鱼表现为摄食减少至停食、游动迟缓, 多数病鱼均有不同程度的腹胀和不等量的腹水 (腹水包括较透明或不很透明、血样腹水、胶冻状等), 部分病鱼在体表 (包括鳍、鳍基、头部、鳃盖、口部、下颌、腹面及其他体表部位等) 有不同程度的出血现象, 个别病鱼肠管脱出肛门外^[1-4]。同时, 该菌也能在一定条件下引发人的胃肠炎^[5]。因此, 明确迟钝爱德华菌毒力基因的携带情况并以毒力基因为分子靶标建立快速检测方法, 对水产养殖生产中由病原迟钝爱德华菌引起的水产动物疾病的快速诊断具有重要的实际意义。

迟钝爱德华菌存在多个毒力基因, *fimA* (fimbrial protein precursor A) 和 *fimB* (fimbrial protein precursor B) 基因起黏附、入侵宿主细胞的

收稿日期: 2013-01-16 修回日期: 2013-03-29

资助项目: 江苏省水产三项工程项目 (PJ2010-58, DY2012-3-7); 中央财政支持地方高校发展专项 (CXTD16); 连云港市科技攻关项目 (CG1134); 江苏高校优势学科建设工程项目 (2011)

通信作者: 张晓君, E-mail: zxj9307@163.com

功能^[6];citC(citrate lyase ligase)基因起调控裂解柠檬酸的功能,gadB(glutamate decarboxylase isozyme)基因使迟钝爱德华菌能在宿主细胞内存活并超越宿主的防御屏障(依赖血清和巨噬细胞介导的杀伤作用)^[7],这些毒力基因可作为检测致病性迟钝爱德华菌的生物学标记。本实验利用 PCR 方法确定迟钝爱德华菌 4 个常见的毒力基因 fimA、citC、fimB、gadB 在鲟鳇鱼类分离株中的分布情况;并以 fimA 和 gadB 两种毒力基因为分子靶标,建立了一种病原迟钝爱德华菌的双重 PCR 检测方法;同时以 fimA 为分子靶标建立了迟钝爱德华菌的 LAMP 快速检测方法,为养殖场中病原迟

钝爱德华菌快速检测及分子流行病学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试迟钝爱德华菌分离自发病牙鲆及大菱鲆,阴性对照鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)、美人鱼弧菌(*V. damsela*)及杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)均分离自发病海水鱼^[8-11],本实验室保存供用,菌株编号及在 GenBank 登录号见表 1。

表 1 供试菌株来源
Tab.1 Origin of strains used in the study

菌株编号 strain No.	菌种名称 species name	来源 origin	16S rRNA 基因登录号 16S rRNA gene accession No.
HC010907-1 至 HC010907-5	迟钝爱德华菌	牙鲆	AY775313 (HC010907-1)
HC010830-1 至 HC010830-5	迟钝爱德华菌	大菱鲆	AY775314 (HC010830-1)
BH1	鳃弧菌	半滑舌鲷	GQ205444
S090801	哈氏弧菌	矛尾复鰕虎鱼	HM236045
ST1	美人鱼弧菌	半滑舌鲷	GU228793
HQ010320-1	杀鲑气单胞菌	石鲈	AY786177

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 上已发表的迟钝爱德华菌毒力基因 fimA (AF491964)、fimB (AF491964)、gadB (AY078505)、citC (AF491963) 序列,采用

Primer Premier 5.0 软件设计 4 对特异性引物(表 2);以毒力基因 fimA 为靶序列,通过 primer explorer V4 软件设计 4 条 LAMP 特异性引物(表 2)。各引物均由上海生物工程技术公司合成。

表 2 引物序列
Tab.2 Sequence of primers

基因 gene	引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	产物长度/bp product length
fimA	Et-fimA-F	TCAACCTGGAGCAGTGTGAG	240
	Et-fimA-R	GCGCCTGCAGGTTAAATATC	
fimB	Et-fimB-F	GGCAGAAAGCGGGTAATC	217
	Et-fimB-R	TGAAACCTCCAGCCTGACT	
gadB	Et-gadB-F	ATTCCCGCTTTGGTTTCAG	171
	Et-gadB-R	CTGGACCCTACTGCTGATAC	
citC	Et-citC-F	GAAGGATTAGCCCTGACG	119
	Et-citC-R	CAAGGTGGTCACGCCAAA	
fimA	Et-fimA-F3	AAGTCCGCATCCAAGGCT	
	Et-fimA-B3	ATCGCTAACAACCGTCACC	
	Et-fimA-FIP	TGACCGCAACGGTATTGCC-CAGATCAACCTGGAGCAGTG	
	Et-fimA-BIP	GGCGAAAGGCGTGGGTATCG-CTGATCGGCGATCGGGAA	

1.3 细菌模板 DNA 的制备方法

上述供试菌模板 DNA 按煮沸法提取:取 1

mL 菌液离心 1 min(12 000 r/min),弃上清,将菌体悬浮于 100 μ L 的灭菌蒸馏水中,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10

min,冰浴中冷却后离心 10 min(12 000 r/min),取上清作为 PCR 模板。

1.4 迟钝爱德华菌 4 种毒力基因检测

以 Et-fimA、Et-fimB、Et-gadB 和 Et-citC 4 对引物分别对模板进行 PCR 扩增。在 25 μ L 反应体系中含有:2 \times Power Taq PCR MasterMix 13 μ L,引物各 1 μ L,模板 2 μ L,双蒸水 8 μ L;扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,接 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,复性 1 min(fimA 和 fimB 复性温度为 55 $^{\circ}$ C、gadB 为 54 $^{\circ}$ C、citC 为 50 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 温育 10 min。扩增后的 PCR 产物,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 双重 PCR 及 LAMP 扩增条件的优化及特异性检测

选择 Et-fimA 和 Et-gadB 2 对引物对模板进行双重 PCR 扩增,优化引物浓度和退火温度,优选出迟钝爱德华菌双重 PCR 最佳反应条件;以 1 对外引物(Et-fimA-F3 与 Et-fimA-B3)和 1 对内引物(Et-fimA-FIP 与 Et-fimA-BIP)对模板进行恒温扩增,优化出迟钝爱德华菌 LAMP 最佳反应条件。以鳗弧菌、哈氏弧菌、美人鱼弧菌及杀鲑气单胞菌为对照菌株,检验引物的特异性。LAMP 产物一部分用琼脂糖凝胶电泳检测,另一部分加入 SYBR Green I 荧光染料后观察反应液的颜色变化以判断结果。

1.6 双重 PCR 及 LAMP 扩增的灵敏性检测

以菌液稀释方法进行灵敏性试验。将菌株培养至对数期,平板计数。菌液 10 倍比梯度稀释为: 3.0×10^8 , 3.0×10^7 , 3.0×10^6 , 3.0×10^5 , 3.0×10^4 , 3.0×10^3 , 3.0×10^2 , 3.0×10^1 , 3.0×10^0 CFU/mL,提取模板 DNA 后按照所建立的双重 PCR 与 LAMP 检测方法进行灵敏性检测。

1.7 迟钝爱德华菌双重 PCR 与 LAMP 检测的应用

取市场海产品半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)、矛尾复鰕虎鱼(*Synechogobius hasta*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、凤鲚(*Coilia mystus*)肌肉组织匀浆,匀浆液人工感染迟钝爱德华菌,之后用营养肉汤增菌培养 4 h 后提取 DNA,并按建立的双重 PCR 和 LAMP 方法检测,对照组为未染菌的肌肉组织匀浆液。琼脂糖凝胶电泳及荧光染料 SYBR Green I 检测结果。

2 结果

2.1 迟钝爱德华菌 4 种毒力基因检测结果

分离自牙鲆及大菱鲆的 10 株病原迟钝爱德华菌基因组 DNA 均可扩增出 240、217、171 和 119 bp 4 条目的条带,未加模板阴性对照无任何扩增条带,表明 fimA、fimB、gadB、citC 为病原迟钝爱德华菌携带,可用于该菌的初步检测,图 1 为选择的代表菌株 HC010907-1 4 种毒力基因的检测结果。

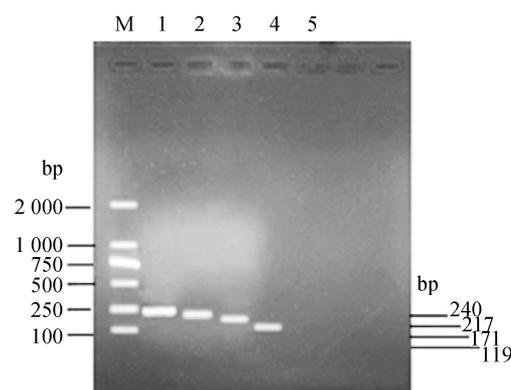


图 1 迟钝爱德华菌毒力基因 PCR 扩增结果

M. DL2000; 1. fimA; 2. fimB; 3. gadB; 4. citC; 5. 对照。

Fig.1 The result of virulence genes of *E. tarda* by PCR amplification

M. DL2000; 1. fimA gene; 2. fimB gene; 3. gadB gene; 4. citC gene; 5. control.

2.2 迟钝爱德华菌双重 PCR 及 LAMP 检测方法的建立

经过优化之后的双重 PCR 反应体系(25 μ L)为:2 \times Power Taq PCR MasterMix 12.5 μ L, Et-fimA 和 Et-gadB 两对引物各 0.5 μ L,模板 2 μ L,双蒸水 8.5 μ L;扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,接着进入循环程序:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,54 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s,共 30 次循环,循环结束后 72 $^{\circ}$ C 温育 10 min。

经过优化之后的 LAMP 反应体系(25 μ L)为 10 \times Thermopol buffer 2.5 μ L、dNTP 2.5 μ L(10 mmol/L)、 Mg^{2+} 2 μ L(25 mmol/L)、甜菜碱 4 μ L(5 mol/L)、FIP、BIP 各 2 μ L(10 μ mol/L)、F3、B3 各 0.5 μ L(10 μ mol/L)、DNA 模板 2 μ L、BstDNA 酶 1 μ L(8 000 U)、 ddH_2O 6 μ L;LAMP 的反应条件为 65 $^{\circ}$ C 下保持 60 min,之后 80 $^{\circ}$ C 终止反应 10 min。

2.3 迟钝爱德华菌双重 PCR 及 LAMP 的特异性

双重 PCR 结果表明迟钝爱德华菌 HC010907-1 株基因组 DNA 可扩增出 240 和 171 bp 2 条目的条带,而其它 4 株对照病原菌均未出现任何扩增条带(图 2),表明本实验建立的迟钝爱德华菌双重 PCR 检测方法具有较强的特异性。

LAMP 扩增结果表明迟钝爱德华菌可扩增出阶梯状条带,而其它 4 种病原菌均未出现任何扩增条带(图 3),LAMP 反应液经 SYBR Green I 染色,可见迟钝爱德华菌呈现绿色的阳性反应,而其它 4 种对照病原菌均呈现橙色的阴性反应(图 4)。该结果表明所建立的迟钝爱德华菌 LAMP 检测方法具有很好的特异性。

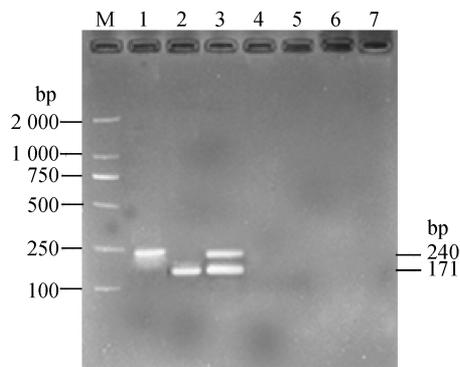


图 2 迟钝爱德华菌双重 PCR 特异性检测结果

M. DL2000; 1. fimA; 2. gadB; 3. fimA 和 gadB; 4~7. 4 株对照菌。

Fig. 2 Specificity of duplex PCR for detection of *E. tarda*

M. DL2000; 1. fimA gene; 2. gadB gene; 3. fimA and gadB genes; 4-7. control of four bacteria.

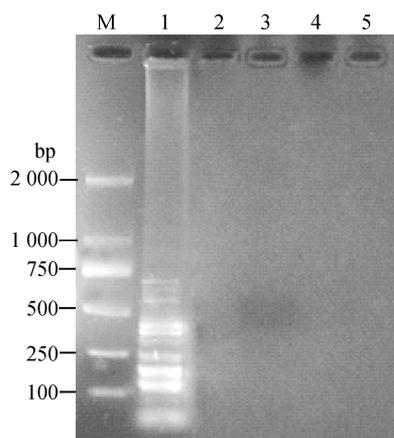


图 3 迟钝爱德华菌 LAMP 特异性检测结果(电泳)

M. DL2000; 1. 迟钝爱德华菌; 2~5. 4 株对照菌。

Fig. 3 Specificity of LAMP for detection of *E. tarda* (electrophoresis)

M. DL2000; 1. *E. tarda*; 2-5. control of four bacteria.

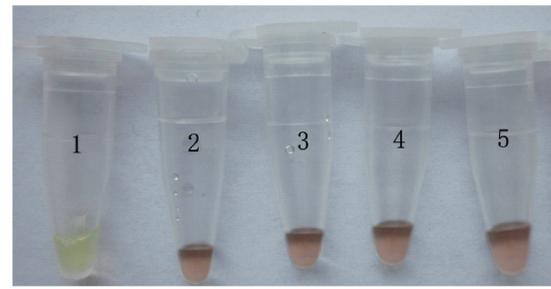


图 4 迟钝爱德华菌 LAMP 特异性

检测结果(SYBR Green I)

M. DL2000; 1. 迟钝爱德华菌; 2~5. 4 株对照菌。

Fig. 4 Specificity of LAMP for detection of *E. tarda*

M. DL2000; 1. *E. tarda*; 2-5. control of four bacteria.

2.4 迟钝爱德华菌双重 PCR 及 LAMP 检测的灵敏度

10 倍系列稀释菌液提取 DNA 后按 2.2 建立的双重 PCR 及 LAMP 检测方法进行灵敏性检测,结果双重 PCR 菌体浓度自 3.0×10^8 CFU/mL 至 3.0×10^3 CFU/mL 均可扩增出清晰条带(图 5),表明本实验建立的双重 PCR 方法检测迟钝爱德华菌灵敏度为 3.0×10^3 CFU/mL;LAMP 检测的结果表明菌体浓度自 3.0×10^8 CFU/mL 至 3.0×10^1 CFU/mL 均可扩增出清晰的阶梯状条带(图 6),且反应液中加入 SYBR Green I 荧光染料后呈现明显的绿色的阳性反应(图 7),表明本实验建立的 LAMP 检测迟钝爱德华菌灵敏度为 3.0×10^1 CFU/mL。

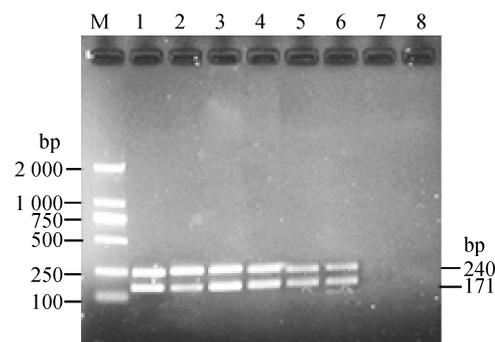


图 5 迟钝爱德华菌双重 PCR 检测方法的灵敏度

M. DL2000; 1~8. fimA 和 gadB 扩增片段(菌液 10 倍系列稀释为 $3 \times 10^8 \sim 3 \times 10^1$ CFU/mL)。

Fig. 5 Sensitivity of duplex PCR for detection of *E. tarda*

M. DL2000; 1-8. amplified fragments of fimA and gadB (serially diluted 10-fold from $3 \times 10^8 \sim 3 \times 10^1$ CFU/mL).

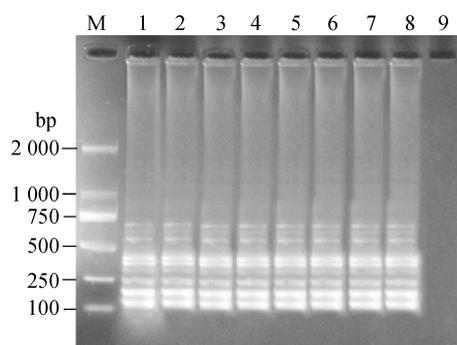


图6 迟钝爱德华菌 LAMP 检测方法的灵敏度(电泳)

M. DL2000; 1~8. 扩增片段(菌液 10 倍系列稀释为 $3 \times 10^8 \sim 3 \times 10^0$ CFU/mL)。

Fig. 6 Sensitivity of LAMP methods for detection of *E. tarda* (electrophoresis)

M. DL2000; 1-8. amplified fragments (serially diluted 10-fold from $3 \times 10^8 - 3 \times 10^0$ CFU/mL).

2.5 迟钝爱德华菌双重 PCR 与 LAMP 检测应用

人工染菌的8种海产品组织匀浆增菌液,提

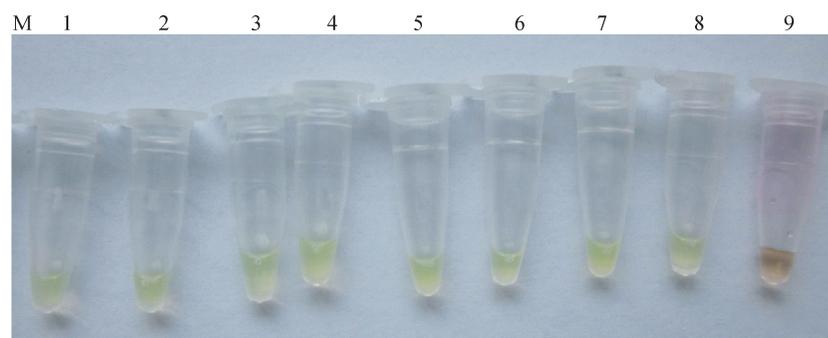


图7 迟钝爱德华菌 LAMP 检测方法的灵敏度(SYBR Green I)

M. DL2000; 1~8. 阳性扩增(菌液 10 倍系列稀释为 $3 \times 10^8 \sim 3 \times 10^0$ CFU/mL)。

Fig. 7 Sensitivity of LAMP methods for detection of *E. tarda*

M. DL2000; 1-8. positive of amplification (serially diluted 10-fold from $3 \times 10^8 - 3 \times 10^0$ CFU/mL).

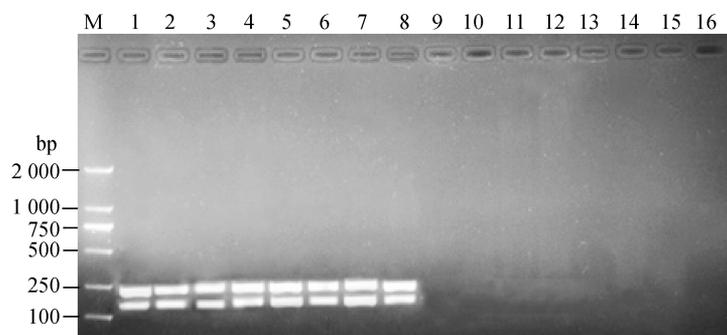


图8 迟钝爱德华菌的双重 PCR 检测应用

M. DL2000; 1~8. 8 种海产品染菌组织匀浆增菌液; 9~16. 8 种海产品未染菌组织匀浆液。

Fig. 8 Application of duplex PCR for detection of *E. tarda*

M. DL2000; 1-8. bacterial enrichment of 8 marine products; 9-16. bacterial no-enrichment.

取 DNA 后分别进行双重 PCR 和 LAMP 检测。双重 PCR 和 LAMP 检测电泳结果显示,人工染菌组均呈现阳性扩增,未染菌组均无电泳条带(图 8,图 9);LAMP 反应液中加入 SYBR Green I 染色,可见人工染菌组呈现绿色阳性反应,未染菌组呈现橙色阴性反应(图 10)。该结果表明双重 PCR 与 LAMP 两种方法均能将感染迟钝爱德华菌的样品准确检出。

3 讨论

迟钝爱德华菌是水产养殖生产中常见且危害严重的病原细菌,毒力作用包括侵入表皮细胞、产生耐巨噬细胞介导的杀伤作用和酶产物的作用,在迟钝爱德华菌中存在多个毒力基因,这些基因可作为检测迟钝爱德华菌的生物学标记。本文根据 *fimA*、*fimB*、*gadB*、*citC* 的 4 个毒力基因序列设计的 4 对引物,扩增供试迟钝爱德华菌基因组 DNA,结果迟钝爱德华菌均可扩增出与目的条带大小一致的条带,表明 10 株鲆鲽类病原迟钝爱德

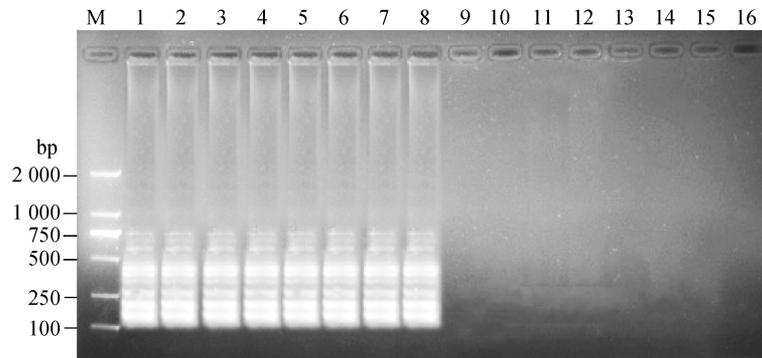


图9 迟钝爱德华菌的 LAMP 检测应用(电泳)

M. DL2000; 1~8. 8 种海产品染菌组织匀浆增菌液; 9~16. 8 种海产品未染菌组织匀浆液。

Fig. 9 Application of LAMP for detection of *E. tarda* (electrophoresis)

M. DL2000; 1-8. bacterial enrichment of 8 marine products; 9-16. bacterial no-enrichment.

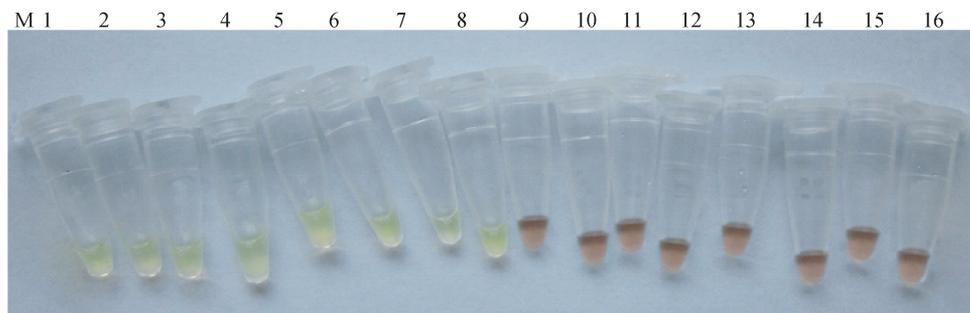


图10 迟钝爱德华菌的 LAMP 检测应用(SYBR Green I)

M. DL2000; 1~8. 8 种海产品染菌组织匀浆增菌液; 9~16. 8 种海产品未染菌组织匀浆液。

Fig. 10 Application of LAMP for detection of *E. tarda*

M. DL2000; 1-8. bacterial enrichment of 8 marine products; 9-16. bacterial no-enrichment.

华菌均携带此 4 种毒力基因,此 4 种毒力基因可用于鲟鳇鱼类致病性迟钝爱德华菌的 PCR 检测。以 *fimA* 和 *gadB* 两种毒力基因设计引物建立的双重 PCR 检测体系特异性强,菌体灵敏度为 3×10^3 CFU/mL,而以毒力基因 *fimA* 作为分子靶标建立的 LAMP 检测技术灵敏度要高于双重 PCR 方法 2 个数量级,两种分子检测方法为养殖场中病原迟钝爱德华菌快速检测及分子流行病学研究奠定基础。但两种检测方法都应注意检测到检测过程中外源性 DNA 污染问题,避免出现假阳性结果。

LAMP 反应有极高的特异性,一是通过琼脂糖凝胶电泳,观察产生各种片断长度的茎环结构的扩增产物,在电泳图谱中显示为从点样孔处开始的条带;二是直接向扩增管中加入嵌入剂 SYBR Green I,无扩增反应的管子呈橙色,有扩增反应的管子将变为绿色;三是可以用肉眼观察或浊度仪检测反应管中的沉淀(焦磷酸镁沉淀)浊度判断扩增与否。LAMP 技术因其具有高特异

性、高效率 and 快速反应的特点,于 2003 年开始逐步被用于医学的临床检测,Maruyama 等^[12]首次采用 LAMP 方法检测海洋环境中的大肠杆菌;Song 等^[13]用 LAMP 检测志贺氏菌属和肠道侵袭性大肠埃希氏菌,以 *ipaH* 基因为目标,起始模板仅为 8 cfu,扩增反应可在 2 h 内完成。目前国内外学者在爱德华菌检测研究方面已多有报导,Yeh 等^[14]以 *eip18* 基因为分子标记建立了斑点叉尾鲷爱德华菌的 LAMP 检测方法;Savan 等^[15]以溶血素基因(*ethA*)设计引物建立了迟钝爱德华菌的 LAMP 检测方法,对分离自鳗鲡、罗非鱼、比目鱼、鳗鲡养殖池水和海鲷的 5 种不同迟钝爱德华菌株作了 LAMP 特异性检测,检测限 1×10^3 CFU/mL;在日本比目鱼养殖池水体中,LAMP 可以检测 3.8×10^2 CFU/mL 的迟钝爱德华菌病原体;邓显文等^[16]以 23 S rDNA 基因设计引物建立了迟钝爱德华菌的 PCR 检测技术;李晨等^[17]建立了包括迟钝爱德华菌在内的 3 种主要水产病原

菌多重 PCR 检测方法。此外,采用 LAMP 技术建立了对诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)^[18]、柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)^[19]等病原菌的检测方法,其特异性强,灵敏度高,都是 PCR 法无法相比的。

LAMP 技术操作简便、耗时短,不需要精密的仪器或昂贵的耗材等特点,非常适用于水生动物疫病即时、现场、快速检测大量样本的病原体的要求。但 LAMP 技术也有自身的局限性,首先是 LAMP 对于实验设计要求很高,需要设计的引物数目多,结构复杂,还要考虑靶序列的片段及茎环结构等因素;由于 LAMP 扩增的阳性反应呈现 smear 和一些低分子质量的带,并不像 PCR 只呈现单带,一旦产生非特异性扩增,则不易鉴别,因此应特别关注反应的特异性;另外,LAMP 技术却不能在 1 次反应中同时检测 2 个或多个病原体。

参考文献:

- [1] 张晓君,战文斌,陈翠珍,等. 牙鲆迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究[J]. 水生生物学报,2005,29(1):31-37.
- [2] 张晓君,房海,陈翠珍,等. 大菱鲆爱德华氏菌病[J]. 中国兽医学报,2007,27(4):516-520.
- [3] 陈翠珍,房海,张晓君,等. 牙鲆与大菱鲆迟钝爱德华氏菌生物学特性及系统发育学分析[J]. 高技术通讯,2005,15(10):82-88.
- [4] 张晓君,陈翠珍,房海,等. 牙鲆迟钝爱德华氏菌喙喙阴性变异株感染症及其病原特性研究[J]. 中国人兽共患病杂志,2004,20(12):1079-1083.
- [5] 聂青和. 感染性腹泻[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:462-468.
- [6] Sakai T, Kanai K, Osatomi K, et al. Identification of a 19.3-kDa protein in MRHA-positive *Edwardsiella tarda*: putative fimbrial major subunit [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 226(1):127-133.
- [7] Rao P S S, Lim T M, Leung K Y. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis [J]. Infection and Immunity, 2003, 71(3):1343-1351.
- [8] 张晓君,秦国民,阎斌伦,等. 半滑舌鳎病原鳃利斯顿氏菌表型及分子特征研究[J]. 海洋学报,2009,31(5):112-121.
- [9] Zhang X J, Qin G M, Bing X W, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Photobacterium damsela*, a pathogen of the cultured tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in China [J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 2011, 45(1):1-13.
- [10] 张晓君,毕可杰,阎斌伦,等. 矛盾鰕虎鱼病原哈氏弧菌的鉴定及特异性检测方法的建立[J]. 水产科学,2011,30(2):758-763.
- [11] 张晓君,房海,陈翠珍,等. 石鲈(*Kareius bicoloratus* L.)源杀鲑气单胞菌杀鲈亚种生物学性状的研究[J]. 海洋与湖沼,2005,36(1):51-60.
- [12] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, et al. Detection of bacteria carrying the stx2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8):5023-5028.
- [13] Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 243(1):259-263.
- [14] Yeh H Y, Shoemaker C A, Klesius P H. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 63(1):36-44.
- [15] Savan R, Igarashi A, Matsuoka S, et al. Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1):621-624.
- [16] 邓显文,谢芝勋,谢丽基,等. 二温式聚合酶链反应鉴别诊断迟缓爱德华氏菌病[J]. 水生态学杂志,2009,2(2):158-160.
- [17] 李晨,王秀华,黄健. 3种主要水产病原菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 渔业科学进展,2010,31(3):100-106.
- [18] Itano T, Kawakami H, Kono T, et al. Detection of fish nocardiosis by loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(6):1381-1387.
- [19] Yeh H Y, Shoemaker C A, Klesius P H. Sensitive and rapid detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus* by a loop-mediated isothermal amplification method [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(5):919-925.

Virulence genes and duplex PCR and the LAMP methods for the detection of pathogenic *Edwardsiella tarda*

ZHANG Xiaojun* , BAI Xuesong , BI Keran , YAN Binlun , QIN Lei , CHEN Li , XU Jing
(Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu , College of Ocean , Huaihai Institute of Technology ,
Lianyungang 222005 , China)

Abstract: *Edwardsiella tarda* is widely distributed in aquatic environments and can be pathogenic to a broad range of hosts. It is currently one of the most important fish pathogens that affect the aquaculture industries worldwide. Though the pathogenesis of *E. tarda* is poorly understood for the present, previous studies have shown that several factors may contribute to the virulent mechanisms of *E. tarda*. The adhesive properties such as fimbrial protein precursor A (fimA) and fimbrial protein precursor B (fimB), glutamate decarboxylase isozyme (gadB), citrate lyase ligase (citC) were observed to be the virulence genes that correlated with the mortality of infected fish. In this study, we investigated the prevalence distribution of the four virulence-associated genes and that of *E. tarda* isolated from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*), and established the methods of duplex PCR and LAMP that will detect *E. tarda*. Four pairs of primers were designed according to the published nucleotide sequence of virulence genes (fimA, fimB, gadB and citC) for screening the virulence genes of pathogenic *E. tarda*, and the methods of duplex PCR and LAMP that will detect *E. tarda* were established using fimA and gadB genes as molecular marker. The results showed fimA, fimB, gadB and citC genes were detected simultaneously in 10 pathogenic strains of pathogenic *E. tarda*, and 240, 217, 171 and 119 bp gene fragments from chromosomal DNA of *E. tarda* could be amplified, and no positive reaction was detected in 4 other control strains; the PCR primers designed by fimA and gadB genes could detect *E. tarda* at a level of as low as 3.0×10^3 CFU/mL using duplex PCR method; the LAMP primers designed by fimA gene could detect *E. tarda* at a level of as low as 30 CFU/mL within 60 min under isothermal condition at 65 °C using the LAMP detection system. The green amplified products were observed directly by naked-eye in the reaction tube by addition of SYBR Green I, and negative reaction (no amplified bands and with orange color) was detected in 4 kinds of control pathogenic bacteria, including *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. damsela* and *Aeromonas salmonicida*. These methods could be used as the rapid diagnosis of the disease caused by *E. tarda* in aquaculture.

Key words: *Edwardsiella tarda*; virulence gene; duplex PCR; LAMP

Corresponding author: ZHANG Xiaojun. E-mail: zxj9307@163.com