

罗非鱼链球菌病检测技术

吴山楠

海南出入境检验检疫局,海口 570311

摘要 为了解并掌握罗非鱼链球菌检测技术,探索罗非鱼链球菌不同致病性菌株及其基因分型,给有效防控罗非鱼链球菌病提供科学依据,采用 PCR 扩增技术及 PFGE 图像分析技术对罗非鱼链球菌致病菌株进行分离鉴定,检测分离菌株的致病性特点。结果表明罗非鱼链球菌病分别由海豚链球菌及无乳链球菌 2 种病因引起。罗非鱼链球菌菌株基因型复杂,不同地区的优势菌群存在很大差异,PCR 与 PFGE 相结合的鉴定方法可高效、准确地检测到罗非鱼链球菌。

关键词 罗非鱼;链球菌病;检测技术

罗非鱼是我国南方的主要鱼种之一。在广东、广西、海南、福建四省是罗非鱼的主要养殖地,广东省每年罗非鱼的产量约 60 万 t^[1];广西罗非鱼仅 2010 年养殖总产量达到 21.6 万 t^[2]。因其肉质鲜美,营养丰富而远销欧美等发达国家,因此成为我国水产养殖业不可或缺的重要组成部分。但目前已有许多国家报道食用罗非鱼引发罗非鱼链球菌病的暴发与流行事件^[3]。罗非鱼链球菌病已成为我国乃至世界重要的细菌性疾病之一,不仅危害人类健康,也同时给水产养殖业造成了巨大的经济损失。据文献报道,仅 2012 年罗非鱼链球菌病给我国造成直接经济损失 10 亿~15 亿元^[4],严重制约了罗非鱼养殖业的健康发展^[5]。因此,本次研究过程中将罗非鱼链球菌菌株进行临床分离,探索罗非鱼链球菌病快速检测的高效技术。

1 材料与方法

1.1 选用的检测试剂及标准菌株

1)标准菌株。自中国微生物菌种贮藏中心购置海豚链球菌 ATCC29178、无乳链球菌 ATCC27956。

2)检测试剂。分别自 Omega 公司购置质粒 DNA 提取试剂盒及胶回收试剂盒;自 Invitrogen 公司购置 Novagen His Band 蛋白纯化试剂盒;自广东环凯微生物科技有限公司购置 DAB 显色试剂盒;自上海生

工生物技术有限公司购置 EX-Taq DNA 聚合酶;自 Promega 公司购置 SDS,EDTARNase Free DNase I。

3)发病罗非鱼样本。分别自广西水产引育中心及海南文昌、广东肇庆罗非鱼养殖场采集个体重约 50~150 g,主要体征表现为鱼体黑变、口腔及腮部充血、双眼周充血、单侧或双侧眼球突出、鱼肝及鱼胆肿大异常的病鱼 386 条。

4)健康罗非鱼样本。自福建漳州罗非鱼养殖场选取 40~140 g 健康罗非鱼样本,用于接种菌株。

5)培养基的制备。自北京天根生物制品有限公司采购脑-心浸出液 BHI 琼脂固体培养基,琼脂粉 15 g,将其融入 1 L 蒸馏水中,进行持续加热至沸腾,直至完全溶解,随后以 121 °C 高温进行高压灭菌,此过程须持续 20 min,待温度降至 45 °C 时,在无菌台上混匀,注入脑-心浸萃琼脂平板,保证厚度不超过 4 mm,等待冷却,保存至 4 °C 冷藏箱中。

1.2 分离培养罗非鱼链球菌

用 75%乙醇对罗非鱼体表进行消毒处理,并在无菌操作台下用紫外线照射 20 min。随后直接用医用棉拭子从鱼脑、鱼肝及眼部取样,接种在购置于北京天安生物有限公司的血琼脂平板、脑-心浸出液琼脂平板上。以 38 °C 的恒温培养 18~24 h,选取优势菌株进行再次纯化培养,完成后放置于 4 °C 冷藏箱保存。

收稿日期:2016-12-28

基金项目:海南省科技兴海专项“罗非鱼链球菌病快速检测技术研究(XH201409)”

吴山楠,男,1981 年生,兽医师。

1.3 API 20 Strep 鉴定分离培养的菌株

自法国梅里埃生物医药有限公司采购的 API 20 Strep 生化鉴定体系对菌株进行鉴定。将纯化新鲜的菌株培养物接种在 API 20 Strep 生化鉴定系统的试剂条上,仔细编写菌株号,记录水温,参照判读表进行读数,记录读取结果。

1.4 细菌 DNA 基因的抽提及 PCR 鉴定

将分离的细菌菌株在 TSB 液体培养基中以恒温 28 ℃ 培养 24 h,按照试剂盒的说明书提取细菌 DNA,参照 Messick JB^[6]的研究方法进行引物设计,并从上海生工生物技术有限公司购置引物,建立罗非鱼链球菌 PCR 鉴定方法,将 16SrRNA 进行 PCR 扩增。链球菌引物基因链结构为:P1(5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3') 和 P2(5'-CAGTAATCAAGC-CCAGCAA-3')。PCR 反应条件为 94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,共 30 个循环,72 ℃ 终极延伸 10 min。

1.5 PFGE 基因型分析

根据文献已报道的 Oliveira 等^[7]使用的方法,在菌株 PCR 反应结束后,对于细菌 DNA 采用脉冲场凝胶电泳分析。将菌株置于 5%的琼脂血平板上,培养 48 h,用 1.0%细胞悬浊液冲洗血平板后抽提细菌基因组 DNA。对 PCR 扩增片段使用琼脂糖凝胶进行回收、克隆。采用 Vector NTI suite 9.0 软件和 PFGE 图像分析工具进行基因型分析。

2 结 果

在本次研究采集的病鱼体内均可分离出链球菌。多数分离出的链球菌培养 24 h 后,在琼脂血平板上和 BHI 平板上生长迅速,菌落体积大。挑选出的优势菌株进行纯化培养后,均呈现出白色、表面光滑、表面微微隆起且边缘整齐。在 BHI 培养基中培养的菌体多双排列链状形态。革兰染色呈阳性。通过 API 20 Strep 生化鉴定,培养菌株多为无乳链球菌。经 PCR 基因测序鉴定后,菌株多为无乳链球菌,7 个基因型分别为研究文献所述常见的基因型,未扩增出任何其他条带。测序结果显示,无乳链球菌及海豚链球菌对比明显,无乳链球菌扩增出 485 bp 大小的特异性条带,而海豚链球菌扩增出 286 bp 的特异性条带,体现出了 PCR 方法及时有效地鉴定流行菌株的优势。

3 讨 论

通过 PCR 检测及 PFGE 基因型分析结果表明,我国目前出现的罗非鱼链球菌病以无乳链球菌为主,准确地鉴别了 2008 年前文献中曾报道的“我国罗非鱼链球菌病主要以海豚链球菌作为主要致病菌”的结论^[8],具有简便、快速的优点。而 PFGE 法对染色体的基因型进行分析,可以对 DNA 仅有微变化的不同菌株进行鉴别,在 20 世纪就已被国际公认为细菌基因鉴定的“金标准”^[9]。

目前,罗非鱼链球菌病已严重危害到公共安全和人类健康。北美与亚洲国家均有罗非鱼链球菌病的文献报道,都是通过直接接触病鱼引发的病例^[10]。因此探讨高效的罗非鱼链球菌检测方法为罗非鱼链球菌病的防控提供了不可忽视的重要科学依据。

参 考 文 献

- [1] 卢迈新,黄樟翰.罗非鱼遗传育种研究[J].上海水产大学学报,2005,14(2):186-191.
- [2] 明俊超,袁新华,袁永明.广西罗非鱼产业链发展的现状、问题与对策[J].中国水产,2012(11):20-23.
- [3] 卢迈新.罗非鱼链球菌病研究进展[J].南方水产科学,2010,6(1):75-79.
- [4] 李莉萍,王瑞,黄婷,等.广西罗非鱼链球菌病流行菌株 PCR 鉴定和 PFGE 基因型分析[J].水产学报,2013,37(6):927-935.
- [5] 胡大胜,黄钧,黄艳华,等.12 种药物对罗非鱼无乳链球菌的抑菌试验[J].中国水产,2012(8):60-63.
- [6] MESSICK J B, BERENT L M, COOPER S K, et al. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis [J]. J Clinical Microbiology, 1998, 36(2): 462-466.
- [7] OLIVEIRA I C, DE MATTOS M C, AREAL M F, et al. Pulsed-field gel electrophoresis of human group *B streptococci* isolated in Brazil [J]. Journal of chemotherapy (Florence Italy), 2005, 17(3): 258-263.
- [8] ZHOU S M, XIE M Q, ZHU X Q, et al. Identification and genetic characterization of *Streptococcus iniae* strains isolated from diseased fish in China [J]. Journal of Fish Diseases, 2008, 35(10): 93-95.
- [9] OLIVE D M, BEAN P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbacterial organisms [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(6): 1661-1669.
- [10] LAU S K, WOO P C, LUK W K, et al. Clinical isolates of *Streptococcus iniae* from Asia are more mucoid and beta-hemolytic than those from North America [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2006, 54(3): 177-181.