

文章编号: 1674-7054(2013)01-0007-04

发病罗非鱼苗沃氏葡萄球菌的分离与鉴定

李晓陀¹ 陈 秦¹ 廖承红¹ 郭桂英^{1,2} 李 祥¹ 贾晓琳¹ 郑继平¹ 俞集楠¹

(1. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 教务处, 海南 海口 570228)

摘 要: 为检测发病罗非鱼苗中可能存在的潜在病原感染, 保证投放鱼苗的健康安全, 对海口市发病罗非鱼苗进行了菌种分离。结果发现, 在发病鱼苗中存在葡萄球菌, 经 16S rRNA 基因序列测定, 显示该菌与沃氏葡萄球菌和巴斯德葡萄球菌高度相似, 后经超氧(化)物歧化酶 *sodA* 基因 PCR 分析, 确认为沃氏葡萄球菌。

关键词: 罗非鱼; 沃氏葡萄球菌; 16S rRNA; *sodA*

中图分类号: Q 93-331

文献标志码: A

罗非鱼原产非洲, 属于鲈鱼目、丽鱼科, 是我国重要的热带养殖鱼类。近年来, 该鱼病害时有发生, 主要有由嗜水气单胞菌感染引起的运动性气单胞菌病^[1]、由荧光假单胞菌感染引起的单胞菌病^[2]、由迟钝爱德华氏菌感染引起的爱德华氏菌病^[1]和由无乳链球菌感染引起的链球菌病^[3]等, 且以链球菌病危害最严重^[3]。因此, 有必要对罗非鱼病原菌进行实时监控, 以便及时确定有效的防治策略。16S rRNA 是微生物检测和鉴定的有力工具, 可对大多数原核生物进行准确分类和鉴定, 但在少数情况下, 即当个别种间的 16S rRNA 基因序列一致率高达 97% 甚至更高, 仅依赖 16S rRNA 工具将无法对它们进行有效区分和种定位(如弯曲杆菌属(*Campylobacter*) 中的部分相关种等^[4]) 时, 需配合新的辅助方法才能准确判定, 如 KA-WASKI 等设计的以促旋酶基因 *gyrB* 为基础的辅助方法^[5]。基于鱼苗在整个水产养殖链中的重要性, 笔者采用 16S rRNA 及超氧(化)物歧化酶 *sodA* 基因 PCR 分析技术对海南冬季发病罗非鱼苗进行了病原分离及鉴定, 旨在为罗非鱼育苗的病原监控提供科学数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 发病的罗非鱼苗 300 尾冬季发病的罗非鱼苗由海南大学海洋学院王世峰博士赠送。鱼龄 2 周, 饲养于淡水水箱中。病鱼普遍游动迟缓, 多数肛门发红, 3 d 后开始逐渐死亡。依据病鱼的发病特征, 初步判断为嗜水气单胞菌感染引起的运动性气单胞菌病。

1.1.2 试剂与培养基 基因组提取试剂盒、T 载体、T4 DNA 连接酶、*Taq*-Plus 聚合酶、感受态细胞 DH5 α 等均购自上海生物公司; BHI 培养基、LB、牛肉膏蛋白胨培养基均依分子克隆常规配制。

1.2 方法

1.2.1 病原分离 每天记录鱼苗病、死情况, 对病鱼活体进行体表消毒后, 用灭菌镊子将其腹部剖开, 由于鱼苗过小, 只能取其能明显辨认的胆囊和肝脏, 用划线平板的方法将组织涂布于 BHI、LB 和牛肉膏蛋白胨培养基上, 37 °C 过夜培养。第 2 天观察菌落特征和革兰氏染色的菌株形态, 将特征一致的分离菌株分别接种于 BHI、LB 和牛肉膏蛋白胨 3 种培养基上进行培养, 以此对分离菌株进行初步判断。

1.2.2 16S rRNA 基因序列分析 按文献[6]的方法, 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物, 即 27F: 5'-AGA

收稿日期: 2013-03-03

基金项目: 海南大学校青年基金(qnj1147, qnj1229); 海南省自然科学基金项目(313043)

作者简介: 李晓陀(1986-), 女, 辽宁阜新人, 海南大学农学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 郭桂英(1973-), 女, 实验师, 主要从事微生物学研究。E-mail: 815827434@qq.com

GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'和 1492R: 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3',对目标菌株进行 PCR 扩增。反应条件为:94 ℃ 4 min 预变性;94 ℃ 30 s 45 ℃ 30 s 72 ℃ 2 min 30 个循环反应;最后 72 ℃ 延伸 5 min。在 T4 DNA 连接酶的作用下,将纯化的 PCR 扩增产物与 T 载体 16 ℃ 过夜连接,然后采用传统的 CaCl_2 转化方法将连接产物转入感受态大肠杆菌 DH5 α 中,经菌落 PCR 和质粒电泳分析确定阳性重组菌株,并送上海生工进行测序分析。

1.2.3 超氧(化)物歧化酶 *sodA* 基因引物设计与扩增 制备目标菌株的基因组 DNA,依据沃氏葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*) 和巴斯德葡萄球菌 (*Staphylococcus pasteurii*) 的超氧(化)物歧化酶 *sodA* 基因序列差异,分别在其 5'端保守区和 3'端非保守区,通过 Primer-BLAST 法设计上、下游引物,并进行 PCR 扩增。沃氏葡萄球菌 *sodA* 基因上、下游引物分别为:5'-ATAAAGAACTATGGAGATT-3'和 5'-ACCATTATTAACAAC-TAAC-3';巴斯德葡萄球菌 *sodA* 基因上、下游引物分别为:5'-TAAAGAACTATGGAGATT-3'和 5'-CCCGT-TATTACTACT-3'。扩增条件采用 94 ℃ 4 min 预变性;94 ℃ 30 s 50 ℃ 30 s 72 ℃ 2 min 30 个循环反应;最后 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物经电泳检测,确定菌株归属。

2 结果与分析

2.1 分离菌形态观察 显微镜观察发现,在 95% 以上的病鱼苗中,优势分离菌为杆状,革兰氏阴性,在约 3% 的病鱼苗中,优势分离菌为球形,革兰氏阳性,在镜下呈葡萄状聚集(见图 1),未发现链球状菌。结合病鱼的发病特征和分离菌株在培养基 BHI、LB、牛肉膏蛋白胨上的菌落形态,初步确定杆菌为嗜水气单胞菌,球菌为葡萄球菌。对于葡萄球菌分离株,除 1 株在 LB、BHI 平板上呈现为金黄色菌落外(推测是金黄色葡萄球菌污染),其余全部表现为白色。

2.2 16S rRNA 基因序列分析 白色菌株经 16S rRNA 基因通用引物 PCR 扩增。扩增的 PCR 产物测序结果显示,扩增片段大小为 1 516 bp。通过 GenBank,对去除两端引物的 1 475 bp 扩增片段进行 BLAST 分析,发现扩增序列与沃氏葡萄球菌和巴斯德葡萄球菌 16S rRNA 基因的对应部分完全一致。

2.3 超氧(化)物歧化酶 *sodA* 基因扩增分析 利用 GenBank 数据,经 BLAST 分析发现,用笔者设计的 *sodA* 基因引物,对沃氏葡萄球菌基因组 DNA 和巴斯德葡萄球菌基因组 DNA 分别进行 PCR 扩增,扩增产物分别为 350 bp 和 349 bp。

通过 Primer-BLAST 对 2 对引物的特异性进行检测,结果发现,沃氏葡萄球菌 *sodA* 基因引物与巴斯德葡萄球菌相似度较低,没有扩增产物,而巴斯德葡萄球菌 *sodA* 基因引物可以在沃氏葡萄球菌扩增 166 bp 的非特异性片段。

白色菌落葡萄球菌基因组 DNA PCR 扩增产物的电泳结果(见图 2)显示,采用沃氏葡萄球菌 *sodA* 基因引物和巴斯德葡萄球菌 *sodA* 基因引物扩增的产物分别是 350 bp 片段和 166 bp 片段。由于未能检测到理论上在巴斯德葡萄球菌中所应扩增出的 349 bp 特异性 DNA 片段,因而可以确定白色菌落葡萄球菌菌株为沃氏葡萄球菌。

3 讨论

研究结果显示,在发病罗非鱼苗的胆囊和肝部,主要分离菌株为革兰氏阴性菌,初步确定为嗜水气单胞菌,其次为少量的革兰氏阳性菌,主要由沃氏葡萄球菌组成。2010 年,杨宪时等人^[7]对养殖的罗非鱼肉的菌群检测结果表明,在活鱼中数量最多的是革兰氏阴性菌,主要由假单胞菌构成,革兰氏阳性菌最少,主要由玫瑰小球菌和沃氏葡萄球菌组成。这种菌群组成上的一致性是否与养殖条件或者是与罗非鱼

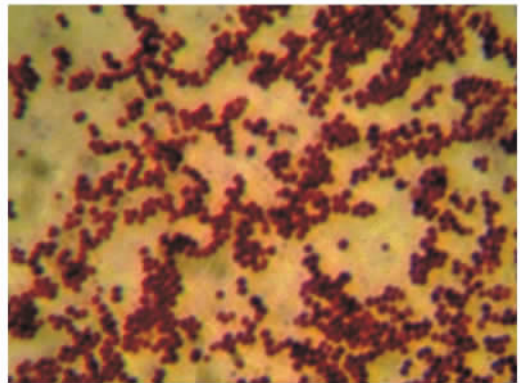


图 1 罗非鱼鱼苗肝和胆囊革兰氏阳性分离菌(100×)

Fig. 1 Gram positive strains isolated from the livers and gallbladders of the diseased Tilapia fingerlings (100 ×)

自身的生理需求有关,目前尚不清楚。2010年,BULUSHI等人^[8]以澳大利亚黄带拟鲔、赤鲷和鲷鱼为研究材料,对比三者保鲜前后的革兰氏阳性菌群变化,发现无论在活鱼或者室温保存的鱼肉中,沃氏葡萄球菌都是检出率最高的革兰氏阳性菌,而且在肌肉中的检出数量高于腮和肠两部位,暗示沃氏葡萄球菌可能与这些鱼的革兰氏阳性菌病害及肉质腐变密切相关。因此,有必要加强对沃氏葡萄球菌在机体内的侵染机制及可能产生的病害等方面的研究。

沃氏葡萄球菌分布极为广泛,在人、动物及植物上均有发现,是一种常见的人类与动物体表共栖菌。作为机会性感染病原,该菌可通过静脉等途径进入人体内,在临床上可引发多种疾病,如感染性椎间盘炎^[9]、尿道炎^[10]、脑膜炎^[11]、整形感染^[12]、脑室分流感染^[13]、心内膜炎^[12]和眼内炎^[14]等,也与牛的感染性流产有关^[15]。此外,该菌也在罗非鱼^[7]、虹鳟鱼^[16]和黄带拟鲔^[8]等多种鱼类及深海污泥中^[17]发现,被认为是鱼类病害的潜在病原。新的证据还显示,该菌可不寻常地存在于苹果^[18]等水果组织中。

近年来,罗非鱼病害日趋严重,在这些病害中,链球菌危害性最大,已成为当前世界性水产养殖的大敌。不过,在本研究中未发现链球菌,在分离的革兰氏阳性菌中,主要为沃氏葡萄球菌。产生的原因,一方面可能与链球菌感染罗非鱼的年龄有关,另一方面也可能与当前重视链球菌的防治有关。海南大学海洋学院对罗非鱼病害的追踪检测结果表明,2012年海南罗非鱼病的病原主要为嗜水气假单胞菌。该结果与笔者本次对发病罗非鱼苗的菌群分析结果相似,说明对鱼苗出苗前的病原检测相当重要。

如何有效确定分离菌株的分类地位一直是微生物学的研究重点。目前,最有效的分子手段是16S rRNA基因分析。在本研究中,笔者采用该技术对怀疑葡萄球菌株进行了鉴定,结果显示,该菌株16S rRNA基因扩增序列与沃氏葡萄球菌和巴斯德葡萄球菌完全一致,说明在一定条件下,仅依据16S rRNA基因1个指标还不足以对检测菌株“种”地位进行归类。超(氧)化物歧化酶是一种几乎涵盖所有生命体的抗氧化基因,在不同种属间具有高度的同源性和保守性。因此,笔者通过GenBank的BLST分析,获取全部已报道的沃氏葡萄球菌和巴斯德葡萄球菌*sodA*基因,经序列比对分析后,选取该基因上的保守区和固定变异区设计2个菌株*sodA*基因的特异性引物。笔者通过该方法成功地确定了分离菌株为沃氏葡萄球菌。2013年,匡云等^[19]在筛选耐亚胺培南(imipenem)菌株时遇到了和笔者同样的问题,鉴定菌株的16S rRNA基因与沃氏葡萄球菌和巴斯德葡萄球菌高度相似,同源性达99%。依据现行公认的16S rRNA基因一致率达97%以上即可认定为是同一种的判断标准,分离菌株应同属沃氏葡萄球菌和巴斯德葡萄球菌。为解决该问题,匡云等根据DNASTar软件构建的系统发育树,认定分离菌株为沃氏葡萄球菌。不过该结论难以令人信服,因为依据笔者对沃氏葡萄球菌和巴斯德葡萄球菌序列的16S rRNA基因序列分析,发现采用27F和1492R细菌通用引物,两者的扩增片段序列应完全一致,GenBank给出的99%同源性结果是因为扩增序列(1 475 bp)与比对的16S rRNA基因(1 480 bp)长度相差5个碱基所致。因此,非常有必要采用新的鉴定标准来辅助确定分离菌株与沃氏和巴斯德葡萄球菌间的亲源关系。事实上,在鉴定葡萄球菌上,2001年,MARTINEAU等^[20]就依据编码延伸因子Tu的基因*tuf*设计了上游引物TStag422: 5'-GGCCGTGTTGAACGTGGTCAAATCA-3'和下游引物TStag765: 5'-TIACCATTTCAGTACCTTCTGCTAA-3',该

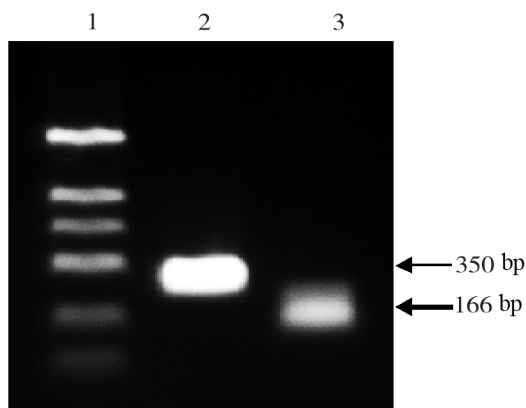


图2 分离菌株超氧(化)物歧化酶*sodA*基因PCR产物电泳分析

1. DNA分子标记(bp): 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100; 2. 沃氏葡萄球菌超(化)物歧化酶*sodA*基因特异性引物; 3. 巴氏葡萄球菌超(化)物歧化酶*sodA*基因特异性引物

Fig. 2 *sodA* PCR assay of genome DNA that was extracted from gram positive strain isolated from the livers and gall-bladders of the diseased Tilapia fingerlings.

Lane 1. DNA marker (bp): 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100; Lane 2. *sodA* primers of *Staphylococcus warneri*; Lane 3. *sodA* primers of *S. pasteurii*

引物可在葡萄球菌中特异性扩增 370 bp 的 DNA 片段,通过对产物的序列测定和分析,可准确有效地将所测葡萄球菌鉴定至‘种’的水平。本研究没有采用该方法,是因为在不能确定分离菌株的种属地位时,采用保守的 16S rRNA 基因通用引物可更稳妥地确定其‘属’地位,然后依靠笔者所设计的 *sodA* 基因引物,经 PCR 和简单的电泳分析就可轻松地判定分离菌株的‘种’地位,从而省去了再次序列测定的步骤。因此,该方法可为今后同类相似问题提供一个有效的解决方法。值得一提的是,在链球菌种属分类上,历史上的无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和难辨链球菌(*Streptococcus difficile*) 2 种菌,目前已同归无乳链球菌 1 个种,原因在于两者 16S rRNA 基因序列的高度相似。因此,目前尚不清楚未来是否也会将沃氏葡萄球菌和巴斯德葡萄球菌合二为一,但难免会引起人们的相关猜测。

参考文献:

- [1] 邓显文,谢芝勋,刘加波,等.嗜水气单胞菌、爱德华氏菌灭活菌苗免疫保护及药物治疗试验[J].广西农业科学,2010,41(3):266-269.
- [2] 邓显文,谢芝勋,刘加波,等.PCR 检测诊断罗非鱼荧光假单胞菌病技术的建立[J].湖南农业科学,2010(7):126-128.
- [3] 郭玉娟,张德锋,樊海平,等.中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究[J].水产学报,2012,36(3):399-406.
- [4] GORKIEWICZ G,FEIERL G,SCHÖBER C,et al.Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing[J].J. Clin. Microbiol.,2003,41(6):2537-2546.
- [5] KAWASAKI S,FRATAMICO P M,WESLEY I V,et al.Species-specific identification of campylobacters by PCR-Restriction fragment length polymorphism and PCR targeting of the gyrase B gene[J].Appl. Environ. Microbiol.,2008,74(8):2529-2533.
- [6] 潘晓磊,丛茜,李晓陀,等.海口地区产脂肪酶菌株的分离与 16 rRNA 序列分析[J].热带生物学报,2012,3(1):32-35.
- [7] 杨宪时,郭全友,许钟.罗非鱼冷藏过程细菌种群的变化[J].中国水产科学,2008(6):1050-1055.
- [8] ALBELUSHI I M,POOLE S E,BARLOW R,et al.Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish[J].International Journal of Food Microbiology,2010,138(1/2):32-38.
- [9] ANNOUN N,MATTEI J P,JAOUA S,et al.Multifocal discitis caused by *Staphylococcus warneri*[J].Joint Bone Spine,2004,71(3):240-242.
- [10] LEIGHTON P M,LITTLE J A. Identification of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from urinary tract infections[J].Am. J. Clin. Pathol.,1986,85(1):92-95.
- [11] INCANI R N,HERNÁNDEZ M,CORTEZ J,et al.*Staphylococcus warneri* meningitis in a patient with Strongyloides stercoralis hyperinfection and lymphoma: first report of a case[J].Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo,2010,52(3):169-170.
- [12] CAMPOCCIA D,MONTANARO L,VISAI L,et al.Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections[J].Int. J. Artif. Organs,2010,33(9):575-581.
- [13] MARTÍNEZ-LAGE J F,MARTÍNEZ-LAGE A L,ALMAGRO M J. *Staphylococcus warneri* ventriculoperitoneal shunt infection: failure of diagnosis by ventricular CSF sampling[J].Childs. Nerv. Syst.,2009,26(12):1795-1798.
- [14] TATINENI S,MOTUKUPALLY N R S R,MANDERWAD G P. First case report of traumatic endophthalmitis caused by the *Staphylococcus warneri*[J].International Journal of Bioassays,2013,2(1):298-299.
- [15] BARIGYE R,SCHAAN L,GIBBS P S,et al.Diagnostic evidence of *Staphylococcus warneri* as a possible cause of bovine abortion[J].J. Vet. Diagn. Invest.,2007,19(6):694-696.
- [16] GIL P,VIVAS J,GALLARDO C S,et al. First isolation of *Staphylococcus warneri* from diseased rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in northwest Spain[J].J. Fish. Diseases,2008,23(4):295-298.
- [17] XU M X,WANG P,WANG F P,et al. Microbial diversity at a deep-sea station of the Pacific nodule province[J].Biodiversity and Conservation,2005,14(14):3363-3380.
- [18] KINI G D,PATEL K,PARRIS A R,et al. An unusual presentation of endocarditis caused by *Staphylococcus warneri*[J].Open Microbiol J,2010,21(4):103-105.
- [19] 匡雪,杨国淋,陈培富.1 株猪源沃氏葡萄球菌的分离鉴定及耐药特性分析[J].云南农业大学学报,2013,28(2):201-204.
- [20] MARTINEAU F,PICARD F,KE D,et al. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels[J].Journal of Clinical Microbiology,2001,39(7):2541-2547.

(下转第 24 页)

Cloning and Sequence Analysis of the *apo-14* Gene in *Marsupenaes japonicus*

QIAO Ying , WANG Jun , ZHONG Shengping , LIU Hongtao , MAO Yong

(College of Ocean and Earth Sciences , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

Abstract: Full length of apolipoprotein-14 (*apo-14*) gene was cloned from the total RNA of *Marsupenaes japonicus*. Sequence analysis showed that the full cDNA sequence was 784 bp in length including the coding region of 420 bp and encoded 139 amino acids. Homology analysis of the *apolipoprotein-14* amino acid sequence indicated high sequence similarity in *apo-14* amino acid sequences between *M. japonicus* and other fish.

Key words: *Marsupenaes japonicus*; apolipoprotein; *apo-14*; cloning; sequence analysis

(上接第 10 页)

Isolation and Identification of *Staphylococci warneri* from Diseased Tilapia Fry

LI Xiaotuo¹ , CHEN Qin¹ , LIAO Chenghong¹ , GUO Guiying^{1 2} , LI Xiang¹ ,
JIA Xiaolin¹ , ZHENG Jiping¹ , YU Jinan¹

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources , Ministry of Education;

2. Academic Affairs Office , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: Strains of *Staphylococci* , the largest Gram positive stains , were isolated by direct plating and Gram stain from the samples of livers and gallbladders from the diseased Tilapia fry collected in Haikou. Analysis of 16S rRNA gene sequence showed that these isolates were highly homologous with *Staphylococcus pasteurii* and *Staphylococcus warneri* , but further identified to be *Staphylococcus warneri* by PCR amplification of the *sodA* gene for superoxide dismutase.

Key words: tilapia; *Staphylococcus warneri*; 16S rRNA; *sodA* gene