

许斌福, 陈秀锦, 池洪树, 等. 大黄鱼变形假单胞菌的遗传学和血清学聚类特征初步分析 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (9): 1109–1116.
XU B F, CHEN X J, CHI H S, et al. A Preliminary Study on Genetic and Serological Clustering of Pathogenic *Pseudomonas plecoglossicida* in *Larimichthys crocea* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (9): 1109–1116.

大黄鱼变形假单胞菌的遗传学和血清学聚类特征初步分析

许斌福¹, 陈秀锦², 池洪树¹, 徐梦婷¹, 陈佳³, 林能锋^{1*}, 龚晖^{1*}

(1. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建省疾病预防控制中心, 福建 福州 350002;
3. 大黄鱼育种国家重点实验室, 福建 宁德 352103)

摘要:【目的】内脏白点病是冬春季大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 最主要的细菌性疾病, 变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 是内脏白点病的主要病原。分析大黄鱼来源的变形假单胞菌病原聚类特征, 为大黄鱼变形假单胞菌流行规律研究和科学防控提供参考。【方法】克隆 7 株不同时空来源的大黄鱼变形假单胞菌 16S rDNA、*gyrB*, 测序并构建进化树; 制备上述菌株的 O-特异链血清 (O 抗原血清) 与鞭毛蛋白血清 (H 抗原血清), 进行菌体凝集试验。【结果】16S rDNA 和 *gyrB* 序列分析表明, 所有的变形假单胞菌聚为一簇; O 抗原和 H 抗原凝集结果表明, 7 株变形假单胞菌以及变形假单胞菌标准株均会发生凝集反应, 凝集效价也无明显区别, 与荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 和哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 不发生凝集反应。【结论】本研究所用的 7 株不同时空来源的变形假单胞菌亲缘关系接近, 可能具有共同的起源。

关键词: 大黄鱼; 变形假单胞菌; 16S rDNA; *gyrB*; 血清菌体凝集; 聚类分析

中图分类号: S 941; Q 933

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 09-1109-08

A Preliminary Study on Genetic and Serological Clustering of Pathogenic *Pseudomonas plecoglossicida* in *Larimichthys crocea*

XU Binfu¹, CHEN Xiujin², CHI Hongshu¹, XU Mengting¹, CHEN Jia³, LIN Nengfeng^{1*}, GONG Hui^{1*}

(1. Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou, Fujian 350002, China; 3. State Key Laboratory of Large Yellow Croaker Breeding, Ningde, Fujian 352103, China)

Abstract: 【Objective】Clustering of strains of *Pseudomonas plecoglossicida*, a major pathogen that causes the serious bacterial visceral white spot disease on *Larimichthys crocea* in winter and spring, was studied for disease control and epidemic prevention. 【Method】The 16S rDNA and *gyrB* of 7 suspected *P. plecoglossicida* strains collected from different temporal and spatial sources were cloned and sequenced with evolutionary trees constructed. O and H antigen sera of these strains were prepared for agglutination tests. 【Result】The 7 pathogens could be clustered into a same branch based on their sequences. Their O and H antigen sera agglutinated with those of the standard *P. plecoglossicida* reference without significant differences on titers, but not with that of *P. fluorescens*, *Vibrio alginolyticus*, or *V. harveyi*. 【Conclusion】It appeared that the 7 collected strains of *P. plecoglossicida* were genetically closely related and might have a common origin.

Key words: *Larimichthys crocea*; *Pseudomonas plecoglossicida*; 16S rDNA; *gyrB*; bacterial and serum agglutination; cluster analysis

收稿日期: 2022-06-02 初稿; 2022-09-02 修改稿

作者简介: 许斌福 (1973-), 男, 副研究员, 主要从事水生生物病害防控研究 (E-mail: xbfexj@163.com)

* 通信作者: 林能锋 (1972-), 男, 副研究员, 主要从事水产遗传发育生物学研究 (E-mail: lnfeng@hotmail.com); 龚晖 (1971-), 男, 研究员, 主要从事水生生物病原学、免疫学研究 (E-mail: ghxfjm@163.com)

基金项目: 福建省科技重大专项 (2021NZ033025); 福建省科技计划公益类专项 (2019R1027-8、2020R1022009); 福建省科特派后补助项目 (2022S2095)

0 引言

【研究意义】大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 物美味鲜, 素有“海水国鱼”的美誉, 是目前中国养殖规模最大的海水鱼类, 2020 年养殖产量达 25.41 万 t, 其中福建省养殖产量为 20.46 万 t^[1]。福建省大黄鱼的养殖区主要集中在宁德蕉城、福安和霞浦的三都澳与福鼎的沙埕港等海域^[2]。随着大黄鱼养殖量的增加, 病害愈加频发, 其中内脏白点病是冬春季低温期大黄鱼最主要的细菌性疾病, 该病的典型症状为内脏 (脾、肾等) 有白色结节, 累计死亡率达 50% 以上, 严重危害大黄鱼产业的健康发展。变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 为低温季节大黄鱼内脏白点病的主要病原^[3,4]。为了精准用药和免疫防控, 了解变形假单胞菌的分型十分必要。【前人研究进展】细菌传统分型主要包括生物分型、抗菌谱分型、血清分型、质粒图谱分型等^[5], 分子生物学细菌近缘种鉴定常用核糖体基因 16S rDNA、RNA 聚合酶基因 *rpoB*、DNA 促旋酶基因 *gyrB*、热激蛋白基因 HSP65 等^[6,7]。高阳等^[8]成功应用血清、鞭毛和脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 对铜绿假单胞菌进行细菌分型; 张嵘等^[9]的研究显示可通过 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列比较分析鉴定沙门氏菌属临床细菌。【本研究切入点】但目前未见变形假单胞菌细菌分型研究报道。【拟解决的关键问题】本研究尝试通过 16S rDNA、*gyrB* 分子分型和血清分型相结合对不同时空分离得到的 7 株大黄鱼变形假单胞菌进行系统聚类分析, 并应用血清菌体凝集验证大黄鱼变形假单胞菌病原聚类特征, 为大黄鱼内脏白点病的流行病学分析和防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本实验室从不同时空分离得到的大黄鱼变形假单胞菌, 购自上海瑞鹿生物技术有限公司的标准株 ATCC700383, 以及本实验室分离的溶藻弧菌、哈维氏弧菌等菌株; 用于血清型分型和分子聚类分析的 7 株大黄鱼变形假单胞菌和其他菌株见表 1。TSA 培养平板和 TSB 培养基购自广东环凯微生物科技有限公司; 昆明鼠 (20 日龄) 购自福建省医学科学研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 16S rDNA 序列分析和系统发育树构建 通过离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (南京诺唯赞生物科技发展有限公司) 制备模板 DNA。设计 16S rDNA 通用引物, 正向 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTG

GCTCAG-3', 反向 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系 (50 μL): $2 \times \text{PCR mix}$ 25 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物各 2 μL , 模板 DNA 1 μL , 超纯水 20 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、90 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 纯化回收目的片段, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司经 ABI 3730 DNA 测序仪双向测序, 用 SeqMan 进行拼接并人工校正。

试验所用菌株的 16S rDNA 序列上传至 GenBank, 菌株编号见表 1。通过 NCBI 网站 BLAST 搜索工具从 GenBank 上获得假单胞菌属菌株的 16S rDNA 序列 (变形假单胞菌 *P. plecoglossicida* BF1、变形假单胞菌 *P. plecoglossicida* PQLYC4、恶臭假单胞菌 *P. putida* NA3、门多萨假单胞菌 *P. mendocina* ATCC 25411、铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* FCC25、产碱假单胞菌 *P. alcaligenes* JS3、丁香假单胞菌 *P. syringae* GBWR14、荧光假单胞菌 *P. fluorescens* HBUAS62417) 与本试验所用菌株 (表 1) 的 16S rDNA 序列用 Clustal 2.1 进行比对并人工对齐, 应用 Mega4.0 软件以邻接法 (NJ) (Bootstrap=1000) 构建系统发育树。

1.2.2 *gyrB* PCR 基因鉴定与序列分析 根据已测序的变形假单胞菌全基因组设计变形假单胞菌 *gyrB* 基因全长 PCR 引物, 上游引物 *gyrB*-F: 5'-TCAAACGTACGACTCCTCCA-3'; 下游引物 *gyrB*-R: 5'-TGATCA GAAGTCCAGGTTCG-3', 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

将-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的待测细菌于 TSA 平板划线, 28 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养单菌落, 挑取单菌落作为 PCR 反应模板。

PCR 反应体系组成: $2 \times \text{Taq Master Mix}$ (Vazyme) 10 μL , 上游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 μL , 模板为平板单菌落, 加 ddH₂O 至 20 μL 。

PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 80 s, 30 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 并将扩增产物回收送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

通过 NCBI 网站 BLAST 搜索工具获得假单胞菌属参考菌株的 *gyrB* 基因序列 (变形假单胞菌 *P. plecoglossicida* PQLYC4、铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* PAO1), 与本研究所测得菌株 (表 1) 的 *gyrB* 序列用 Clustal2.1 进行比对及人工对齐, 应用 Mega4.0 软件以邻接法 (NJ) (Bootstrap=1000) 构建系统发育树。

1.2.3 血清分型 参考文献 [10] 的方法进行变形假单胞菌抗原制备、鼠抗血清制备和血清菌体凝集。

表 1 本研究用菌株及参考菌株
Table 1 Bacterial strains and reference used

菌株编号 Strains	种属 Species	来源地 Locations	物种 Hosts	分离部位 Tissues	分离时间 Dates
H15122403	变形假单胞菌 <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	福建福鼎沙埕（沙埕港）	大黄鱼	脾	2015-12-24
H16040803	变形假单胞菌 <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	福建霞浦东安（东吾洋）	大黄鱼	脾	2016-04-08
H16041203	变形假单胞菌 <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	福建蕉城大湾（三都澳）	大黄鱼	脾	2016-04-12
H16042701	变形假单胞菌 <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	福建蕉城黄湾（三都澳）	大黄鱼	肝	2016-04-27
H17041302	变形假单胞菌 <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	福建蕉城泥土沃（三都澳）	大黄鱼	肾	2017-04-13
H17050402	变形假单胞菌 <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	福建蕉城白秤潭（三都澳）	大黄鱼	肾	2017-05-04
H17052503	变形假单胞菌 <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	福建蕉城白秤潭（三都澳）	大黄鱼	脾	2017-05-25
ATCC700383	变形假单胞菌 <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	日本德岛县	香鱼	肾	1994-03
H13032003	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	福建蕉城大湾（三都澳）	大黄鱼	脾	2013-03-20
H21112606	溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	福建蕉城斗姆（官井洋）	大黄鱼	体表	2021-11-26
H21112601	哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	福建蕉城斗帽（官井洋）	大黄鱼	肝	2011-11-26

（1）菌体抗原（O 抗原）与鞭毛抗原（H 抗原）制备。从大黄鱼分离的 7 株变形假单胞菌分别接种于 TSA 培养基，28 ℃ 培养 24 h，挑取单菌落接种于 20 mL TSB 液体培养液，28 ℃、180 r·min⁻¹ 震荡培养 24 h，平板计数法计数，用 TSB 培养液定容菌液至 50×10⁸ cfu·mL⁻¹，4 ℃ 备用。等分为两份：一份菌液通过隔水煮沸热灭活 40 min，无菌检验后 10 000 r·min⁻¹、4 ℃ 离心 10 min，弃上清留沉淀，用灭菌生理盐水重悬至菌体含量约 10×10⁸ cfu·mL⁻¹，即得菌体 O 抗原，4 ℃ 备用；另一份菌液用 0.3% 福尔马林室温灭活 24 h，无菌检验后 10 000 r·min⁻¹、4 ℃ 离心 10 min，弃上清留沉淀，用灭菌生理盐水重悬至菌体含量约 10×10⁸ cfu·mL⁻¹，即得鞭毛 H 抗原，4 ℃ 备用。

（2）O 抗原与 H 抗原的抗血清制备。抗原与完全弗氏佐剂按体积比 1:1 比例涡旋混匀后，腹腔免疫试验小鼠，每只注射 0.2 mL；7 d 后对应抗原与不完全弗氏佐剂按体积比 1:1 比例涡旋混匀后，按每只注射 0.2 mL 二次腹腔免疫小鼠；7 d 后纯抗原再腹腔免疫小鼠，每只注射 0.2 mL；免疫结束后 10 d 抽样测试血清效价，20 d 后眼球采血收集各组鼠抗血清，-20 ℃ 备用。

（3）血清凝集分析。参照 GB/T 4789.4—2016^[11] 并加以改进，将鼠抗免疫血清用灭菌生理盐水倍比稀释，分别将待测抗原（菌体含量约 10×10⁸ cfu·mL⁻¹）12 μL 与倍比稀释待测血清抗体 12 μL 至 96 孔板内混

匀，加样混匀完毕后将 96 孔试验板置于湿盒中，37 ℃ 孵育 30 min，肉眼观察凝集效价。若待测液变澄清、出现白色凝集块则判断为阳性，能使菌体凝集的最高血清稀释度即为效价。

（4）大黄鱼变形假单胞菌血清型的临床验证。随机挑选 11 株从不同时间、不同地点患内脏白点病大黄鱼上分离得到的大黄鱼变形假单胞菌，将各细菌分别与 7 株大黄鱼变形假单胞菌的鼠抗免疫血清进行血清菌体凝集试验，方法同上。

2 结果与分析

2.1 菌株 16S rDNA 序列分析和系统发育树构建

将 7 株大黄鱼源变形假单胞菌长度为 1 536 bp 的 16S rDNA 序列，与 GenBank 上获得的假单胞菌序列进行比较，并以从大黄鱼中分离的溶藻弧菌（H21112606）和哈维氏弧菌（H21112601）的 16S rDNA 序列为外群，以 NJ 法构建大黄鱼变形假单胞菌的系统发育树。结果显示：7 株待分型变形假单胞菌 H15122403、H17050402、H17052503、H16042701、H16041203、H16040803 和 H17041302 与变形假单胞菌标准株 ATCC700383 聚为一簇，遗传亲缘关系近（图 1）。

2.2 变形假单胞菌菌株 *gyrB* 基因序列分析和构建系统发育树

用变形假单胞菌 *gyrB* 引物对本研究所用的菌株

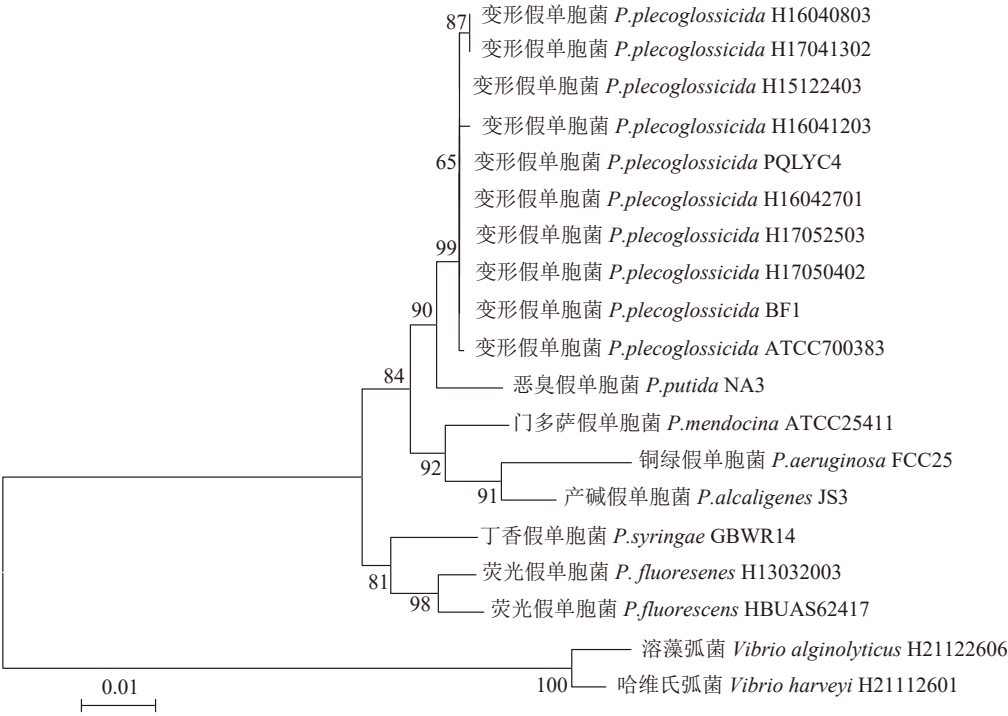
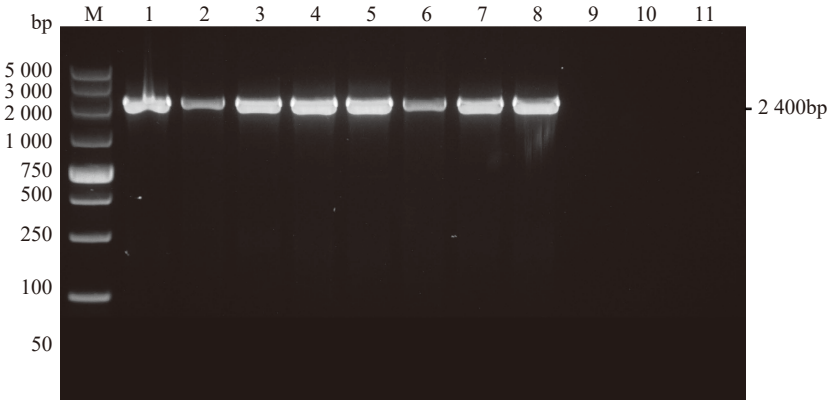


图 1 基于 16S rDNA 序列构建的大黄鱼变形假单胞菌等菌株系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree of *P. plecoglossicida* strains based on 16S rDNA sequences

进行 PCR 扩增，结果显示：仅变形假单胞菌样品出现大小约 2 400 bp 的预期单一条带，其他菌株如溶藻弧菌和哈维氏弧菌扩增结果为阴性（图 2）；7 株待分型变形假单胞菌 H15122403、H17052503、H170

41302、H16041203、H17050402、H16040803、H16042701 与变形假单胞菌标准株 ATCC700383 聚为一簇，遗传亲缘关系也接近（图 3）。



M: Marker; 1、变形假单胞菌 H17050402; 2、变形假单胞菌 H17052503; 3、变形假单胞菌 H17041302; 4、变形假单胞菌 H16042701; 5、变形假单胞菌 ATCC700383; 6、变形假单胞菌 H15122403; 7、变形假单胞菌 H16040803; 8、变形假单胞菌 H16041203; 9、溶藻弧菌 H21112601; 10、哈维氏弧菌 H21112606; 11、空白。
M: Marker; 1: *P. plecoglossicida* H17050402; 2: *P. plecoglossicida* H17052503; 3: *P. plecoglossicida* H17041302; 4: *P. plecoglossicida* H16042701; 5: *P. plecoglossicida* ATCC700383; 6: *P. plecoglossicida* H15122403; 7: *P. plecoglossicida* H16040803; 8: *P. plecoglossicida* H16041203; 9: *V. alginolyticus* H21112601; 10: *V. harveyi* H21112606; 11: blank.

图 2 变形假单胞菌 *gyrB* PCR 扩增结果
Fig. 2 PCR on *gyrB* of *P. plecoglossicida*

2.3 血清菌体凝集反应

O 抗原与抗 O 抗原血清（表 2）和 H 抗原与抗 H 抗原血清（表 3）的凝集反应表明，7 株用于抗血

清制备的大黄鱼变形假单胞菌相互间的 O 抗原与抗 O 抗原血清的凝集效价为 $2^6 \sim 2^9$ ，而 H 抗原与抗 H 抗原血清的凝集效价为 $2^8 \sim 2^9$ ，各菌株的凝集价无

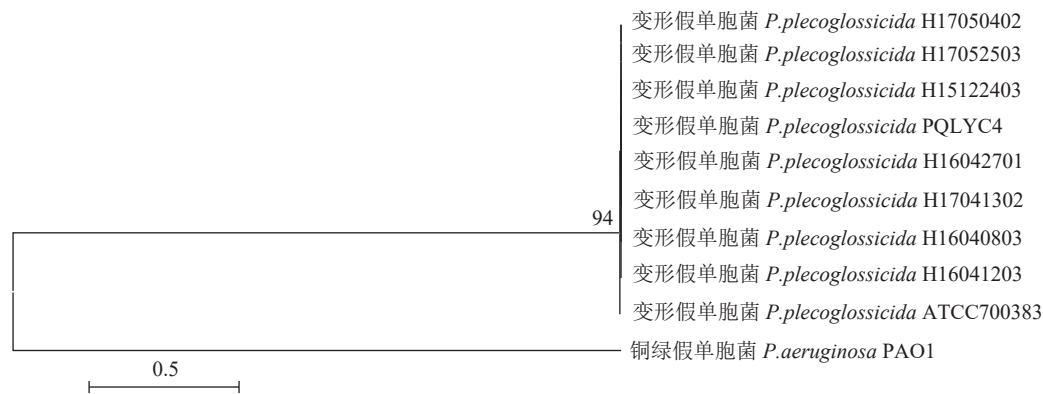


图 3 基于 *gyrB* 序列构建的大黄鱼变形假单胞菌等菌株系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *P. plecoglossicida* strains based on *gyrB* sequences

表 2 各菌株 O 抗原与抗 O 抗原血清的凝集反应结果

Table 2 Agglutination of O antigen and anti-O antigen sera

O 抗原 O antigen	抗 O 抗原血清凝集效价 Serum anti O antigen agglutination titer						
	H15122403	H16040803	H16041203	H16042701	H17041302	H17050402	H17052503
H15122403	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹
H16040803	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸
H16041203	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸
H16042701	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁷	2 ⁹	2 ⁸
H17041302	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁷
H17050402	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁹	2 ⁸
H17052503	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸
ATCC700383	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁹
H13032003	—	—	—	—	—	—	—
H21112606	—	—	—	—	—	—	—
H21112601	—	—	—	—	—	—	—
0.9%NaCl	—	—	—	—	—	—	—

明显差异；抗变形假单胞菌 O 抗原血清和抗变形假单胞菌 H 抗原血清与荧光假单胞菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌均无凝集反应。

从临床分离的其他 11 株大黄鱼变形假单胞菌与制备的 7 种大黄鱼变形假单胞菌抗血清的凝集结果（表 4）显示，临床分离株与 7 种大黄鱼变形假单胞菌抗 O 抗原血清和抗 H 抗原血清的凝集效价为 2⁶~2⁹，不同时空的各菌株凝集效价基本无差异。

3 讨论与结论

细菌分型是区分菌株并研究其相关性的手段^[12]，是菌株系统发育、疫病诊断监测和病害免疫防控研究的重要依据。内脏白点病是目前大黄鱼低温季节危害最大的细菌性疾病，尚未见对其病原变形假单

胞菌的分型报道。

素有“细菌化石”之称的 16S rRNA 是编码原核生物核糖体小亚基 rRNA（16S rRNA）的基因，该基因序列几乎可以对所有的细菌进行属水平上的鉴定，为非编码蛋白基因的细菌系统发育分类^[6]。宁德三都澳海域是大黄鱼主养区，本研究选择不同时间从宁德三都澳的蕉城、霞浦养殖区以及福鼎沙埕不同海区分离的 7 株变形假单胞菌代表株进行聚类分析，其 16S rRNA 的系统发育树显示 7 株待测变形假单胞菌与变形假单胞菌标准菌株 ATCC700383 和参考菌株 BF1、PQLYC4 聚于一支，再与恶臭假单胞菌（*P. putida*）聚类，显示变形假单胞菌与恶臭假单胞菌具有较近的亲缘关系，而与其他假单胞菌属细菌的亲缘关系较远，该结果与 Nishimori 等^[13]的研究结果

表 3 各菌株 H 抗原与抗 H 血清的凝集反应结果
Table 3 Agglutination of H antigen and anti-H antigen sera

H抗原 H antigen	抗H抗原血清凝集效价 Serum anti H antigen agglutination titer						
	H15122403	H16040803	H16041203	H16042701	H17041302	H17050402	H17052503
H15122403	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁸
H16040803	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁸
H16041203	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹
H16042701	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁸
H17041302	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹
H17050402	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹
H17052503	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁹
ATCC700383	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁹
H13032003	—	—	—	—	—	—	—
H21112606	—	—	—	—	—	—	—
H21112601	—	—	—	—	—	—	—
0.9%NaCl	—	—	—	—	—	—	—

表 4 其他临床分离菌株与 7 株变形假单胞菌抗血清的凝集结果
Table 4 Agglutination between individual strains and sera of 7 strains of *P. plecoglossicida*

抗原 Antigen			抗O抗原血清/抗H抗原血清凝集效价 Serum anti O antigen/ Serum anti H antigen agglutination titer						
菌株 Strains	时间 Dates	来源 Locations	H15122403	H16040803	H16041203	H16042701	H17041302	H17050402	H17052503
H13032002	2013.03.20	宁德蕉城（三都澳）	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁷ /2 ⁷	2 ⁶ /2 ⁶	2 ⁷ /2 ⁸
H14060603	2014.06.06	宁德蕉城（三都澳）	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁷	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁸
H15012203	2015.01.22	宁德蕉城（三都澳）	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁹
H16031803	2016.03.18	宁德霞浦（东吾洋）	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁷ /2 ⁸	2 ⁸ /2 ⁹
H16032302	2016.03.23	宁德福鼎（沙埕港）	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁷ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁸
H16032303	2016.03.23	宁德蕉城（三都澳）	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁷	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹
H16042703	2016.04.27	宁德蕉城（三都澳）	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁸ /2 ⁹
H17030202	2017.03.02	宁德蕉城（三都澳）	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁸
H19040303	2019.04.03	宁德霞浦（东吾洋）	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁸
H20031102	2020.03.11	宁德蕉城（三都澳）	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁸	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁹	2 ⁷ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹
H22042903	2022.04.29	宁德蕉城（三都澳）	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁸ /2 ⁸	2 ⁷ /2 ⁸	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹	2 ⁹ /2 ⁹
0.9%NaCl			-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

相一致。*gyrB* 基因即细菌 DNA 促旋酶的 B 亚单位基因，其属于与 DNA 复制、限制、修饰或修复有关信号通路中的蛋白编码基因，是单拷贝的看家基因，且不发生水平转移并普遍存在于各种细菌中，是近年常用于区分和鉴定细菌近缘种的靶基因^[6,7,14]；前人研究发现用 *gyrB* 基因测序构建系统发育树可区分

恶臭假单胞菌 *P. putida* 生物变种 A 和 B，而 16S rDNA 不能；对放线菌 *Micromonospora* 属的 15 个种和 4 个亚种进行 *gyrB* 序列分析，结果 *gyrB* 能更好区分属内 G+C mol% 含量高的种和亚种^[7]。而本研究 *gyrB* 基因测序和系统发育树结果显示 7 株待测变形假单胞菌与标准菌株 ATCC700383 也聚为同一支，因而

推测 *gyrB* 基因可用于区分假单胞属内的种, 但该基因在变形假单胞菌中变异较少。

本试验显示源自大黄鱼的变形假单胞菌病原在 16S rDNA 和 *gyrB* 基因 DNA 序列高度相似, 因而设想通过血清学方法研究大黄鱼变形假单胞菌病原的差异特征。细菌血清学分型是国际通行的基本分型方法, 通过血清菌体凝集反应可判定细菌血清型, 具有简便、快速等特点。基于菌体抗原 (O) 和鞭毛抗原 (H) 等表面抗原可区分同种细菌, 大部分血清型细菌鉴定的物质基础包括菌体抗原和鞭毛抗原等, 菌体 O 抗原的组成和结构决定了细菌的抗原特异性, O 抗原由寡糖聚合物构成, 每一个重复单位由 1~8 个糖基组成, 单糖合成酶基因、糖基转移酶基因和寡糖单位处理酶基因等编码合成多聚糖菌体 O 抗原决定簇, 基因组编码序列差异决定了 O 抗原的多样性。H 抗原主要由细菌的鞭毛蛋白质构成, 其特异性主要由鞭毛蛋白中氨基酸的排列顺序和空间构型以及蛋白高级结构共同决定^[12,15,16]。如沙门氏菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌等血清分型可直接购买按照国际抗原分型系统 (IATS) 标准制备的商品化诊断血清^[11,17,18], 而变形假单胞菌尚无商品化的诊断血清。本试验制备 7 株变形假单胞菌 O 抗原鼠抗血清和 H 抗原鼠抗血清, 对所分离的大黄鱼源变形假单胞菌进行了细菌分类, 结果显示 7 株变形假单胞菌 O 抗原鼠抗 O 血清和 H 抗原鼠抗 H 血清均能特异性检测变形假单胞菌, 但不同时空、来源的变形假单胞菌之间交叉凝集价无明显差异, 可能是它们为同一血清型, 或者为不可血清分型菌株^[19]。将不同时间和不同区域分离的感染大黄鱼的变形假单胞菌菌株与本研究 7 株变形假单胞菌 O 抗原鼠抗血清和 H 抗原鼠抗血清进行血清凝集试验, 结果显示所有感染大黄鱼的变形假单胞菌菌株间无明显的血清学差异。

本研究通过血清学、分子遗传学 16S rDNA 和 *gyrB* 基因多维度结合区分变形假单胞菌病原, 结果基本一致, 有必要通过比较基因组学进行更精细区分, 还需通过致病性、耐药性等进一步分析病原特征。聚类综合分析表明 7 株不同时空的变形假单胞菌可能为共同起源菌株, 未发现血清型和基因型分化。研究结果有助于了解变形假单胞菌的传播规律, 为大黄鱼内脏白点病免疫防控提供数据支持。

参考文献:

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2021[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 22.
- [2] 谢书秋, 刘振勇. 闽东大黄鱼养殖现状分析与发展对策[J]. 福建水产, 2006, 28 (3): 95-97.
- [3] 张杰, 毛芝娟. 大黄鱼内脏白点病病原杀香鱼假单胞菌及其毒力因子研究进展[J]. 浙江万里学院学报, 2015, 28 (6): 69-76, 81.
- [4] 胡娇, 张飞, 徐晓津, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)内脏白点病病原分离鉴定及致病性研究[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45 (2): 409-417.
- [5] 赖福才, 汪能平, 耿穗娜, 等. 应用铜绿假单胞菌4种分型方法的探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2001, 11 (2): 81-83.
- [6] 李献梅, 王小芬, 杨洪岩, 等. 促旋酶(*gyrA*)B亚单位基因*gyrB*在鉴别细菌近缘种中的应用[J]. 微生物学报, 2008, 48 (5): 701-706.
- [7] 郝云婕, 韩素贞. *gyrB*基因在细菌系统发育分析中的应用[J]. 生物技术通报, 2008 (2): 39-41.
- [8] 高阳, 李璐璐, 骆延波, 等. 铜绿假单胞菌的血清分型、鞭毛分型和脉冲场凝胶电泳分型[J]. 中国兽医学报, 2018, 38 (2): 341-348.
- [9] 张嵘, 蔡加昌, 张书梅, 等. *gyrB*基因和16S rRNA基因序列分析在沙门菌属细菌鉴别中的临床应用评价[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27 (4): 368-369.
- [10] 许斌福, 龚晖, 李素一, 等. 鳗源创伤弧菌的鉴定与血清型分析[J]. 渔业研究, 2016, 38 (5): 351-356.
- [11] 赵建梅, 李月华, 宋传周, 等. PCR鉴定沙门氏菌血清分型方法的建立与应用[J]. 中国动物检疫, 2018, 35 (1): 73-77.
- [12] XIE S Q, LIU Z Y. Analysis of current situation and development countermeasures of *Pseudosciaena crocea* culture in East Fujian [J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2006, 28 (3): 95-97. (in Chinese)
- [13] ZHANG J, MAO Z J. Research progress on *Pseudomonas plecoglossicida* and its virulence factors of large yellow croaker(*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Journal of Zhejiang Wanli University*, 2015, 28 (6): 69-76, 81. (in Chinese)
- [14] HU J, ZHANG F, XU X J, et al. Isolation, identification and virulence of the pathogen of white-spots disease in internal organs of *Pseudosciaena crocea* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45 (2): 409-417. (in Chinese)
- [15] LAI F C, WANG N P, GENG S N, et al. Investigation of four typing methods for *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2001, 11 (2): 81-83. (in Chinese)
- [16] LI X M, WANG X F, YANG H Y, et al. Application of *gyrB* in the identification of closely related bacteria —a review [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (5): 701-706. (in Chinese)
- [17] HAO Y J, HAN S Z. Application of *gyrB* gene in bacterial phylogenetic analysis [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008 (2): 39-41. (in Chinese)
- [18] GAO Y, LI L L, LUO Y B, et al. Serotyping, flagella typing and pulse field gel electrophoresis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38 (2): 341-348. (in Chinese)
- [19] ZHANG R, CAI J C, ZHANG S M, et al. Evaluation of clinical application of *gyrB* gene and 16S rRNA gene sequence analysis in the identification of *Salmonella* [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2007, 27 (4): 368-369. (in Chinese)
- [20] XU B F, GONG H, LI S Y, et al. Identification and serotypes analysis of *Vibrio vulnificus* from *Anguilla anguilla* [J]. *Journal of Fisheries Research*, 2016, 38 (5): 351-356. (in Chinese)

- ZHAO J M, LI Y H, SONG C Z, et al. Establishment and application of PCR assay for serotype identification of *Salmonella* [J]. *China Animal Health Inspection*, 2018, 35 (1) : 73-77. (in Chinese)
- [12] 吴雨辰, 胡燕燕, 张嵘. 细菌分型方法的研究进展 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21 (5) : 617-623.
- WU Y C, HU Y Y, ZHANG R. Advances in bacterial typing methods [J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2021, 21 (5) : 617-623. (in Chinese)
- [13] NISHIMORI E, KITA-TSUKAMOTO K, WAKABAYASHI H. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov. , the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(Pt 1): 83-89.
- [14] IZUMI S, YAMAMOTO M, SUZUKI K, et al. Identification and detection of *Pseudomonas plecoglossicida* isolates with PCR primers targeting the *gyrB* region [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30 (7) : 391-397.
- [15] 王晓婷. 7株变形杆菌的O抗原基因簇的破译和特异基因的鉴定[D]. 天津: 南开大学, 2011.
- WANG X T. Specific gene identification and O antigen gene clusters analysis of 7 *Proteus*[D]. Tianjin: Nankai University, 2011.
- [16] 李可, 方莹, 张晓峰, 等. 沙门氏菌的血清分型及分子鉴定研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7 (10) : 3947-3951.
- LI K, FANG Y, ZHANG X F, et al. Research progress of *Salmonella* serotyping and molecular identification methods [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2016, 7 (10) : 3947-3951. (in Chinese)
- [17] 郭维植, 程法稷, 林成水, 等. 能与大肠杆菌O157(H7)抗血清交叉凝集的5种细菌的分离和鉴定 [J]. 海峡预防医学杂志, 2000, 6 (4) : 4-6.
- GUO W Z, CHENG F J, LIN C S, et al. Isolation and identification of 5 species bacteria cross reacting with *E. coli* O157 (H7) anti serums [J]. *Strail Journal of Preventive Medicine*, 2000, 6 (4) : 4-6. (in Chinese)
- [18] 邵西群, 胡博, 章秀婷, 等. 水貂出血性肺炎病原铜绿假单胞菌的分子特征 [J]. 中国兽医科学, 2014, 44 (4) : 340-345.
- SHAO X Q, HU B, ZHANG X T, et al. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from minks with haemorrhagic pneumonia [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2014, 44 (4) : 340-345. (in Chinese)
- [19] 宋程, 陈小玲. PCR技术用于病原微生物的血清型鉴定研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2001, 35 (1) : 59-62.
- SONG C, CHEN X L. Research progress of PCR technology in serotype identification of pathogenic microorganisms [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2001, 35 (1) : 59-62. (in Chinese)

(责任编辑: 张梅)