

# 养殖刺参“腐皮综合征”致病菌——灿烂弧菌的原位杂交检测方法的建立与应用

王印庚<sup>1</sup> 荣小军<sup>1</sup> 张凤萍<sup>1,2</sup> 王 岚<sup>1</sup> 廖梅杰<sup>1</sup> 邹安革<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 黑龙江省宁安市水产局, 157400)

(<sup>3</sup> 蓬莱市安源水产有限公司, 烟台 265600)

**摘 要** 以养殖刺参“腐皮综合征”的重要致病菌——灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 的 16S~23S 间隔区序列, 设计特异性引物, 用 PCR 方法制备地高辛 (DIG) 标记探针, 建立了原位杂交技术检测感染刺参体内灿烂弧菌的技术方法, 并利用该方法对人工感染刺参和健康刺参各组织进行检测。结果显示, 感染刺参的体壁结缔组织、肌肉组织、肠粘膜上皮、辐水管等组织的原位杂交检测呈阳性, 而与健康刺参组织无交叉反应。在感染组织中, 阳性信号 (显色) 强弱清晰, 能准确反映出灿烂弧菌的侵染部位及感染程度, 这为探明灿烂弧菌的感染途径、感染病程等致病机理研究奠定了基础, 也为养殖刺参疾病预防和健康管理提供了技术支持。

**关键词** 刺参 腐皮综合征 灿烂弧菌 PCR 原位杂交

**中图分类号** S968.9 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2013)02-0114-05

## Establishment and application of *in situ* hybridization detection of *Vibrio splendidus* causing skin ulcer syndrome in cultured *Apostichopus japonicus*

WANG Yin-geng<sup>1</sup> RONG Xiao-jun<sup>1</sup> ZHANG Feng-ping<sup>1,2</sup>

WANG Lan<sup>1</sup> LIAO Mei-jie<sup>1</sup> ZOU An-ge<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> Fishery Bureau of Ningan, Heilongjiang, 157400)

(<sup>3</sup> Penglai Anyuan Fisheries Co. Ltd, Yantai 265600)

**ABSTRACT** The skin ulcer syndrome is a serious disease causing massive mortality and economic losses in cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Vibrio splendidus* was identified as one of the most severely pathogeneses of this disease. In the present study, a DIG-labeled *V. splendidus* DNA probe based on the sequence of the 16S~23S rDNA intragenic spacers was synthesized and was used to establish *in situ* hybridization for detecting the bacterium in

科研院所技术开发研究专项 (2011EG34219)、山东省农业良种工程重大课题“速生、抗病、耐高温刺参良种选育”、国家自然科学基金项目 (31202016)、“十二五”863 项目 (2012AA10A412) 和青岛市科技计划项目 (11-1-11-hy) 共同资助

收稿日期: 2011-09-21; 接受日期: 2012-05-17

作者简介: 王印庚 (1963-), 男, 研究员, 主要从事海参健康养殖相关研究。E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85841732

*A. japonicus*, *V. splendidus*-positive cells were observed in connective tissue, muscle tissue, epithelium of intestine and water-vacular tissues in artificial infected *A. japonicus*, while no cross-reaction was observed in tissues of healthy sea cucumber. The positive signals were clear in infected tissues, which could reveal the location and degree of the infection. Therefore, this established approach is useful to indicate the infection route and the pathogenesis of *V. splendidus* infection, which will provide basic data for disease control and animal health management.

**KEY WORDS** *Apostichopus japonicus* Skin ulcer syndrome *Vibrio splendidus*  
PCR *In situ* hybridization

近年来,随着刺参养殖的快速发展,病害问题也日益凸出,给广大刺参养殖业者造成了严重的经济损失,严重制约了该产业的稳定发展。其中由灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 感染导致的“腐皮综合征”(也称化皮病)的危害最为严重,死亡率可达90%以上(牛化欣等 2008),造成了2004~2006年期间每年度约10亿元的经济损失(王印庚等 2004)。此病几乎波及所有刺参养殖区,波及面广、传染性强。一旦病症发生,短期内就会导致大批死亡(张春云等 2004;王印庚等 2005、2004),为此,迫切需要建立相应的防治措施。而灵敏、快捷的病原检测技术方法可为早期发现疾病、了解感染部位和感染程度,实现疾病的有效预防和健康养殖提供科学依据。因此,需要探索并建立相应的病原快速检测技术。原位杂交能在成分复杂的组织中进行单一细胞的研究而不受同一组织中其他成分的影响,对于组织中含量很少的靶序列有很高的敏感性,并可完整地保持组织与细胞的形态,准确地反映出组织细胞的相互关系及功能状态。因此,原位杂交成为在细胞水平上对细菌、病毒进行研究的必要技术。该技术应用于对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)、肝胰腺细小样病毒(Hepatopancreatic parvo-like virus, HPV)、白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)的研究工作较多(Carr *et al.* 1996;Pantoja *et al.* 1999;Kalagayan *et al.* 1991)。本研究应用PCR方法制备地高辛(DIG)标记探针,建立了刺参“腐皮综合征”病原灿烂弧菌的原位杂交检测方法,为探明细菌侵染途径、解析刺参患病机理提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验时间为2009年5~6月,试验用刺参为山东省烟台放流增殖海域采集的健康刺参,体重30~45g,体长8~10cm,暂养3d后用于实验。灿烂弧菌为中国水产科学研究院黄海水产研究所海水鱼类养殖实验室早期分离、保存并证实为“腐皮综合征”致病原的菌株(王印庚等 2005、2004)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 人工感染实验

将刺参平均分养于6个20L的实验水槽中,每个水槽饲养10头。实验分为人工感染实验组和对照组共两组,每组3个平行。

将-80℃冰箱保存的灿烂弧菌经胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB培养基)活化后,转接到新的TSB培养基,28℃培养18h后,用灭菌的1.5% NaCl洗下,离心洗涤3次,利用比浊法配置浓度为 $1 \times 10^8$  CFU/ml的菌悬液(菌液浓度的计算采用比浊法)。用1ml无菌注射器经腹腔注射,对刺参进行人工感染,注射剂量为0.2ml/头,对照组注射等量的灭菌的1.5% NaCl溶液。每天记录各实验组刺参的生理状态、发病症状,保存感染组发病个体和对照组的健康个体的结缔组织、辐水管、肠和肌肉等组织。

#### 1.2.2 组织切片的制备

将人工感染所得化皮症状明显的病参和对照组的健康刺参的结缔组织、辐水管、肠和肌肉等组织直接浸入

10倍体积的Davidson's APA固定液中(Bell *et al.* 1998),固定24 h后,转移到70%乙醇中,然后进行脱水、浸蜡、包埋、切片,切片厚度为5 $\mu$ m,展片于涂有一层多聚赖氨酸的载玻片上。

### 1.2.3 地高辛标记的核酸探针的制备

灿烂弧菌DNA的提取采用细菌DNA提取试剂盒(天根),用紫外分光光度计检测DNA浓度并定量至50ng/ $\mu$ l。扩增核酸探针的特异性引物是5'-CTATCACCCCTTTACTGCG-3'和5'-CCTGTTGTGAATACATAGC-3'(王印庚等 2009)。每50 $\mu$ l反应体系中含灭菌水27.5 $\mu$ l,10 $\times$ Buffer(with 15mmol/L MgCl<sub>2</sub>)5 $\mu$ l,PCR DIG Labeling mix 5 $\mu$ l,10 $\mu$ mol/L引物各5 $\mu$ l,50ng/ $\mu$ l灿烂弧菌DNA 2 $\mu$ l,5U/ $\mu$ l Taq DNA聚合酶0.5 $\mu$ l。混匀后,进行PCR反应:94 $^{\circ}$ C 2min,1个循环;94 $^{\circ}$ C 1min,49 $^{\circ}$ C 1.5min,72 $^{\circ}$ C 2.5min,35个循环;72 $^{\circ}$ C 10min,1个循环。4 $^{\circ}$ C保存。切胶回收纯化PCR产物,按DIG DNA Labeling and Detection Kit试剂盒(Roche)说明测定探针产量,然后按2ng/ $\mu$ l分装,置-20 $^{\circ}$ C冰箱备用。

### 1.2.4 原位杂交

参考Bruce等(1993)和Nunan等(1997)的方法进行。组织切片脱蜡后,往每张组织切片上加蛋白酶K溶液(0.1mg/ml),37 $^{\circ}$ C消化15min;在0.4%的4 $^{\circ}$ C多聚甲醛溶液中浸15min;室温2 $\times$ SSC漂洗5min;在湿盒中,吸预杂交缓冲液于组织切片上,42 $^{\circ}$ C预杂交30min;将变性的核酸探针加入预杂交缓冲液(30~50ng/ml),吸该溶液于组织切片上,90~95 $^{\circ}$ C变性10min,冰上猝冷5min;在湿盒内40~42 $^{\circ}$ C杂交16~18 h;依次用2 $\times$ SSC、1 $\times$ SSC、0.5 $\times$ SSC、Buffer I漂洗组织切片;37 $^{\circ}$ C用Buffer II封闭组织切片30 min;将碱性磷酸酶联抗DIG抗体(B. M. in Germany)溶于Buffer II(1 $\mu$ l/ml)中,吸该溶液于组织切片上,37 $^{\circ}$ C湿盒中温浴30min;用Buffer I、Buffer III漂洗玻片;吸500 $\mu$ lBCIP/NBT显影液于每张组织切片上,室温下黑暗中放置1~3 h;用Buffer IV漂洗玻片15min;组织切片依次通过蒸馏水、0.5%Brismark Brown Y、95%酒精、纯酒精、二甲苯;中性树脂封片;在明视野显微镜下寻找蓝黑色或黑色细胞沉淀物并拍照。阳性强度的判断采用目前国内习惯用法:若阳性细胞数量<25%,为弱阳性+,25%~50%为阳性++,>50%为强阳性+++。

## 2 结果

### 2.1 人工感染实验结果

刺参经灿烂弧菌注射感染,第2天发生死亡,在7d内死亡率达到100%。人工感染刺参的症状与自然发病刺参的症状基本相同:初期,触手过度张开,接着口部肿大,分泌粘液增多,触手失去伸展活力;中期,口部出现溃烂,起初是小的白斑,然后扩展到整个口部,溃烂处产生大量粘液,病情严重时刺参体表开始溃烂;末期,躯体变成鼻涕状死亡。从溃烂处再次分离到大量的灿烂弧菌,与注射的菌株完全一致。对照组刺参没有死亡,健康状况良好(图1)。

### 2.2 DIG标记探针的PCR法制备及其产量测定

由电泳结果可知,利用PCR法制备的DNA探针大小约为177bp(图2),合成的探针经提纯后检测,产量为80ng/ $\mu$ l。

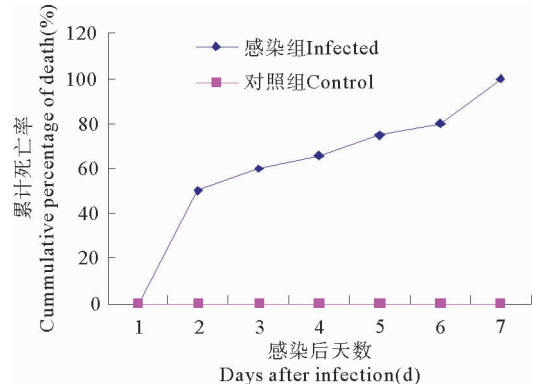
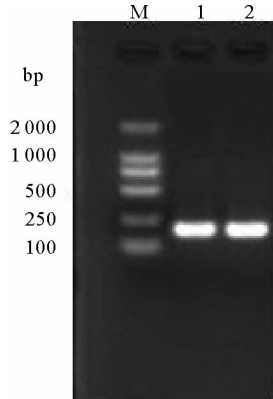


图1 刺参感染灿烂弧菌的死亡结果  
Fig.1 Mortality of *A. japonicus* challenged with *V. splendidus* for 7 days



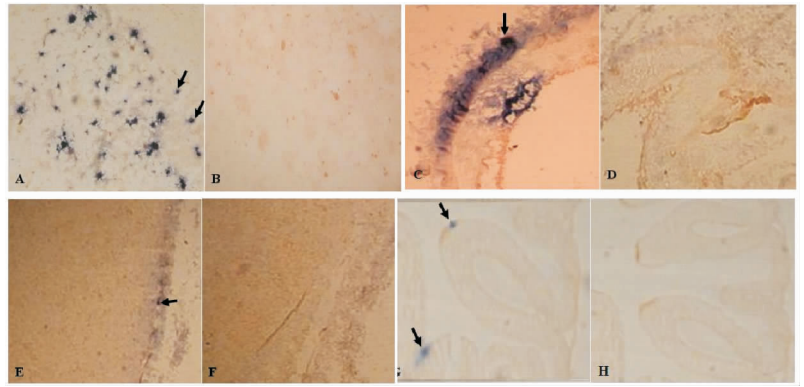
M: Marker; 1~2: Probes produced by PCR

图2 PCR合成探针电泳结果

Fig.2 Electrophotogram of the DNA probe produced by PCR

### 2.3 灿烂弧菌在人工感染刺参组织内的分布

采用 DIG-标记的核酸探针对 3 头感染后的刺参和 3 头健康刺参组织样品进行原位杂交,在光学显微镜下观察,所有感染的海参组织中均可见蓝色或紫黑色的沉淀,此沉淀是原位杂交阳性的信号;而对对照组健康刺参的组织细胞内无蓝黑色沉淀,原位杂交结果显示为阴性。感染刺参的体壁结缔组织、肌肉组织、肠粘膜上皮、辐水管均有蓝色或蓝黑色沉淀,表明原位杂交均呈阳性。用 PCR 法制备的 DIG 标记探针与对照组刺参样品进行原位杂交,结果均为阴性(图 3)。不同组织的感染程度见表 1。由图 3 可知,刺参体壁结缔组织为感染最严重的部位,在肌肉组织、肠粘膜上皮和辐水管组织也能被特异探针标记。



A: 感染刺参的体壁结缔组织; B: 健康刺参的体壁结缔组织; C: 感染刺参的辐水管; D: 健康刺参的辐水管; E: 感染刺参的肌肉组织; F: 健康刺参的肌肉组织; G: 感染刺参的肠; H: 健康刺参的肠; 箭头表示所检测到的阳性信号  
A: Connective tissue of infected sea cucumber; B: Connective tissue of healthy sea cucumber; C: Water vacuolar of infected sea cucumber; D: Water vacuolar of healthy sea cucumber; E: Muscle tissue of infected sea cucumber; F: Muscle tissue of healthy sea cucumber; G: Epithelium of intestines of infected sea cucumber; H: Epithelium of intestines of healthy sea cucumber; Arrow indicated positive signals

图 3 原位杂交检测人工感染的刺参组织(100×)

Fig. 3 Bacterial infected tissues of *A. japonicus* detected by *in situ* hybridization

表 1 人工感染刺参原位杂交检测不同组织的感染程度

Table 1 The infection degree in different tissues of *A. japonicus*, detected by *in situ* hybridization

组织部位 Tissue	体壁结缔组织 Connective tissue	肌肉组织 Muscle tissue	肠粘膜上皮 Epithelium of intestines	辐水管 Water vacular
感染情况 Degree of infection	+++	+	+	++

注:“+++”强阳性;“++”阳性;“+”弱阳性

Note: “+++”strong positive; “++”positive; “+”weak positive

### 3 讨论

原位杂交技术是一项利用标记的 DNA 或 RNA 探针直接在染色体、细胞或组织水平定位靶核酸序列的分子细胞遗传学技术,是宏观的细胞学和微观的分子生物学之间的桥梁。由于原位杂交能在成分复杂的组织中进行单一细胞的研究而不受同一组织中其他成分的影响,且不需要从组织中提取核酸,对于组织中含量极低的外源染色体片段亦有极高的敏感性,此技术自 1993 年始就广泛应用于对虾病毒的检测及对虾病毒病的诊断(雷质文等 2002)。Bruce 等(1993)用此技术检测对虾杆状病毒(BP),Bonnie 等(1994)用此技术检测斑节对虾杆状病毒(MBV),Mari 等(1995、1993)用此技术检测肝胰腺细小病毒(HPV)和传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV),Wongteerasupaya 等(1996)用此技术检测对虾白斑病病毒(WSSV)。

腐皮综合征是养殖海参的重要细菌性疾病,对其主要致病原灿烂弧菌已建立了多种检测方法。其中,玻片抗原抗体凝集法,灵敏度偏低,约为  $1.5 \times 10^8$  cell/ml(谢建军 2007);双抗原夹心法 ELISA,灵敏度约为  $1.87 \times 10^4$  cell/ml(谢建军 2007);Dot-ELISA 快速检测法,灵敏度达到  $9.4 \times 10^3$  cell/ml(谢建军等 2007);间接荧光抗体技术,灵敏度  $2.4 \times 10^4$  cell/ml(王印庚等 2010);本课题组利用灿烂弧菌的 16S~23S 间隔区序列,设计特异性引物,并建立了灿烂弧菌的 PCR 检测方法和斑点杂交检测方法,特异性引物的检测结果表明所涉

及的探针仅对灿烂弧菌的 DNA 样品呈阳性反应,与其他细菌 *V. fluvialis*、*V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*Aeromonas hydrophila*、*V. harveyi*、*V. vulnificus*、*V. parahaemolyticus* 的核酸均无交叉反应,说明制备的探针对 *Vibrio splendidus* 具有良好的特异性(张凤萍等 2008;王印庚等 2009)。所建立的 PCR 检测法对灿烂弧菌 DNA 的检出限为 0.5pg/ $\mu$ l,斑点杂交检测法对灿烂弧菌 DNA 的检出限为 6.25pg/ $\mu$ l。上述检测方法都需要从动物组织中分离、纯化细菌,且无法了解细菌在动物体内的数量、感染组织部位和感染程度。而原位杂交技术无需从组织样品中提取细菌 DNA,而且还可以直接检测该细菌对样品感染组织和感染程度,结果更为直观。

本研究采用 PCR 法制备 DIG 标记探针,利用原位杂交技术在人工注射感染刺参样品的结缔组织、辐水管、肠和肌肉中检测到被灿烂弧菌感染的阳性细胞,阳性信号(显色)清晰。在严重感染的组织中,蓝黑色沉淀呈多点分布,浓密而浓重;在轻度感染的组织中,也显示清晰的单细胞的点位显色反应。说明这一检测技术灵敏度较高,能够准确反映灿烂弧菌的侵染部位及感染程度,这为进一步探明灿烂弧菌的感染途径、感染病程等致病机理研究奠定了基础。在后续的研究中,将对刺参所有的器官组织进行切片和侵染观察分析,以阐明灿烂弧菌在刺参体内的侵染途径和了解灿烂弧菌侵染刺参的所有靶组织;同时,在技术方法上进行改良,将已经建立的 PCR 方法与原位分子杂交技术结合起来(Josian *et al.* 1993),将会进一步提高检测的快捷程度和灵敏度。

## 参 考 文 献

- 牛化欣,常杰,方波,唐峰. 2008. 养殖海参养成期腐皮综合症的病原学研究. 黑龙江畜牧兽医, (7):70-71
- 王印庚,荣小军. 2004. 我国刺参养殖存在的主要问题与疾病综合防治技术要点. 齐鲁渔业, 21(10): 29-31
- 王印庚,荣小军,张春云,孙慧玲. 2005. 养殖海参主要疾病及防治技术. 海洋科学, 29(3): 1-7
- 王印庚,荣小军,张春云,孙素凤. 2004. 养殖刺参暴发性疾病——腐皮综合症的初步研究与防治. 齐鲁渔业, 21(5):44-48
- 王印庚,张凤萍,李胜忠,陈霞,崔玉龙. 2009. 刺参腐皮综合症病原灿烂弧菌检测探针制备及应用. 水产学报, 33(1): 119-125
- 王印庚,谢建军,荣小军,廖梅杰,张正. 2010. 养殖刺参腐皮综合症 2 种致病菌间接荧光抗体快速检测方法. 中国水产科学, 17(2): 329-336
- 张凤萍,王印庚,李胜忠,荣小军,廖梅杰,张正. 2008. 应用 PCR 方法检测刺参腐皮综合症病原—灿烂弧菌. 海洋水产研究, 29(5): 100-106
- 张春云,王印庚,荣小军,孙慧玲,董树刚. 2004. 国内外海参自然资源、养殖现状及存在问题. 海洋水产研究, 25(3): 89-97
- 谢建军. 2007. 养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)腐皮综合症主要致病菌快速检测技术研究. 见:上海水产大学硕士研究生学位论文
- 谢建军,王印庚,张正,荣小军. 2007. 养殖刺参腐皮综合症两种致病菌 Dot-ELISA 快速检测. 海洋科学, 31(8): 59-64
- 雷质文,黄健,杨冰,史成银,俞开康. 2002. 应用原位杂交技术检测感染中国对虾和克氏原螯虾体内的白斑综合征病毒. 中国预防兽医学报, 24(3): 227-230
- Bell TA, Lightner DV. 1998. A handbook of normal penaeid shrimp histology, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana: 2-6
- Bonnie TP, Mari J, Bonami JR and 2 others. 1994. Using of non-radioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Pmonodon* by in situ hybridization on fixed tissue. J Virol Methods 49:187-194
- Bruce ID, Redman RM, Lightner DV. 1993. Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using in situ hybridization. Dis Aquat Qrg 17: 215-221
- Carr WH, Sweeney JN, Nunan L and 3 others. 1996. The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. Aquaculture 147: 1-8
- Kalagayan H, Godin D, Kanna R. 1991. IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. J World Aquacult Soc 22(4): 235-243
- Mari J, Bonami JR, Bonnie TP. 1995. Partial cloning of the genome of an unusual parvovirus (HPV), the use of gene probe in disease diagnosis. Dis Aquat Org 22 : 129-134
- Mari J, Bonami JR, Lightner D. 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps: diagnosis of the disease using a specific probe. J Gen Virol 74: 2 637-2 643
- Nunan LM, Lightner DV. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). J Virol Methods 63: 193-201
- Pantoja CR, Lightner DV, Holtschmit KH. 1999. Prevalence and geographic distribution of IHNV parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. J Aquat Anim Health 11: 23-34
- Witcox JN. 1993. Fundamental principles of in situ hybridization. J Histochem Cytochem 12 :1 725-1 733
- Wongteerasupaya C, Wongwisansri S, Boonsaeng V and 5 others. 1996. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. Aquaculture 143 :23-32