

病原性鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 双重 PCR 与 LAMP 检测方法的建立*

孙晶晶¹ 高晓建¹ 张晓君^{1,2①} 马丽娜^{3①} 阎斌伦¹
白雪松¹ 赵佳铭¹ 毕可然¹ 秦 蕾¹

(1. 淮海工学院 连云港 222005; 2. 扬州大学动物科学与技术学院 扬州 225009;
3. 吉林大学再生医学研究所 长春 130021)

摘要 本研究检测了分离自发病大菱鲆、半滑舌鳎及鲤鱼的 22 株病原鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 毒力相关基因的携带情况,并建立了病原鳃弧菌的分子生物学检测方法。以 PCR 方法检测 8 个毒力相关基因的分布,结果显示,22 株病原鳃弧菌均可扩增出 6 个基因(*empA*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*rtxA* 和 *tonB*)目的条带,未扩增出 *virA* 和 *angM* 基因;针对 *vah4* 和 *rtxA* 设计引物进行双重 PCR 扩增,同一 PCR 反应体系可扩增出两条目的条带,灵敏度为 2.4×10^3 CFU/ml,对照菌无任何扩增条带;以 *vah4* 设计引物进行 LAMP 扩增,病原鳃弧菌可扩增出阶梯状条带,呈现阳性反应,6 株对照菌无阶梯状扩增条带且呈现阴性反应,LAMP 扩增灵敏度为 2.4×10^1 CFU/ml。LAMP 检测灵敏度是双重 PCR 的 100 倍,LAMP 技术与 PCR 比较,操作简便、快速、灵敏度高且不需昂贵仪器,LAMP 检测鳃弧菌的方法更适合于养殖生产实际应用。

关键词 鳃弧菌;毒力相关基因;双重 PCR;环介导恒温扩增技术(LAMP)

中图分类号 Q522 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0049-07

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)亦称鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*),是海淡水环境及鱼体微生物区系中的正常菌群,为条件致病菌;同时,鳃弧菌也是引起鱼类弧菌病的高致病性的主要细菌性病原,当水温适宜、营养丰富时,其数量剧增,宿主养殖密度过大、应激状态如感染、损伤、低溶氧量时,常暴发鳃弧菌病(Bolinches *et al*, 1986; Bowser *et al*, 1981)。鳃弧菌可经消化道、鳃以及受损的皮肤侵入鱼体(Wang *et al*, 1998),可导致牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)等多种鱼类的败血症(莫照兰等, 2002; Mo *et al*, 2001; 张晓君等, 2006、2009)。患病鱼体表最初出现局部褪色,鳍条、

鳍基部及鳃骨下部充血发红,肛门红肿,继而肌肉组织有弥散性或点状出血,体表发黑,鳍基部出现溃烂;消化道膨胀并充满液体,解剖时有明显的黄色粘稠腹水,肠粘膜组织腐烂脱落,部分鱼肝脏坏死;个别病鱼体表出现大面积的溃疡症状或局部膨胀病灶,膨隆处肌肉溃烂,剪破皮肤有脓状组织坏死物流出,发展成为出血性败血症的病鱼大多在较短时间内(7 d)死亡,死亡率为 30%~100%。此外,该病原菌能引起世界范围内的多种贝类及甲壳类等发生相应的弧菌病(Vibriosis)(吴后波等, 2001)。

因此,明确鳃弧菌的毒力相关基因并以毒力基因作为分子靶标建立快速检测方法,对鳃弧菌引起的水产动物疾病的诊断、预防及治疗具有重要的现实意义

* 江苏省高校自然科学研究重大项目(14KJA240001)、江苏省水产三项工程项目(Y2014-35; D2013-5-4)、江苏高校优势学科建设工程项目(2014)和教育部留学回国人员科研启动基金共同资助。孙晶晶, E-mail: y0741810@126.com

① 通讯作者: 张晓君, 教授, E-mail: zxj9307@163.com; 马丽娜, 教授, E-mail: malan@jlu.edu.com

收稿日期: 2014-12-16, 收修改稿日期: 2015-01-11

义。目前,国内外学者通过分子生物学水平的研究发现,鳃弧菌的致病性是由许多毒力因子相互作用而形成的一套复杂机制,这些毒力因子主要包括质粒编码的铁吸收系统、细胞外溶血毒素、重复序列毒素、细菌鞭毛蛋白、胞外蛋白酶、细胞表面成分等(Frans *et al.*, 2011)。本研究选取鳃弧菌的 8 个毒力基因分别为:铁吸收系统核糖体多肽合成酶毒力因子 *angM* 基因、铁离子弧菌素复合体转运毒力因子 *tonB* 基因、细胞外溶血毒素毒力因子 *vah1* 和 *vah4* 基因、细菌鞭毛蛋白毒力因子 *flaA* 基因、胞外锌金属蛋白酶侵袭因子 *empA* 基因、细胞表面成分抗原合成有关蛋白毒力因子 *virA* 基因及重复序列毒素 *rtxA* 基因,检测了鳃弧菌分离株中毒力基因的携带情况,建立了双重 PCR 与 LAMP 两种快速检测病原鳃弧菌的方法,并进行了比较研究,旨在为水产养殖中病原鳃弧菌快速检测及分子流行病学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试 22 株鳃弧菌分离自发病大菱鲆、半滑舌鲷和鲤鱼(*Cyprinus carpio*),已通过致病性、表型及分子鉴定(张晓君等, 2006、2009),本实验室保存供用;阴性对照菌需钠弧菌(*Vibrio natriegen*)、哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、美人鱼弧菌(*Vibrio damsela*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、河口弧菌(*Vibrio aestuarianus*)均分离自发病水生动物,本实验室保存,菌株编号及来源见表 1。

1.2 引物设计与合成

根据文献及 GenBank 已收录的鳃弧菌毒力基因序列,利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计 PCR 特异性引物(表 2);以鳃弧菌毒力基因 *vah4* 为靶序列,利用 Primer Explorer V4 软件设计 LAMP 4 条

特异性引物(表 2),各引物均由上海生物工程技术公司合成。

1.3 细菌模板 DNA 的制备

将供试菌株接种于营养肉汤培养基中,28℃培养 18 h,取 2 ml 菌悬液,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海赛百盛生物工程有限公司)所述方法提取的 DNA 作为 PCR 及 LAMP 扩增模板,-20℃保存备用。

1.4 毒力基因检测

以表 2 中 PCR 引物分别对鳃弧菌及对照菌株 DNA 模板进行扩增。20 μl 反应体系:2×Power Taq PCR MasterMix 10 μl,正反引物各 0.5 μl,模板 DNA 1 μl,无菌双蒸水 8 μl;扩增条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 1 min,复性 45 s(*empA*、*vah1* 和 *vah4* 复性温度为 55℃, *virA*、*flaA* 和 *angM* 复性温度为 54℃, *rtxA* 复性温度为 56℃, *tonB* 复性温度为 53℃),72℃延伸 1 min,循环 30 次;最后 72℃延伸 10 min,4℃保温。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

选择鳃弧菌 *vah4* 和 *rtxA* 基因的两对引物对模板 DNA 进行双重 PCR 扩增,优化引物浓度和退火温度,确定鳃弧菌双重 PCR 最佳反应条件;以鳃弧菌 *vah4* 基因的外引物(F3 和 B3)和内引物(FIP 和 BIP)对模板 DNA 进行恒温扩增,优化出鳃弧菌 LAMP 最佳反应条件。以需钠弧菌、哈氏弧菌、美人鱼弧菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌及河口弧菌作为对照菌株,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。将鳃弧菌各菌

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

菌株编号 Strain No.	菌名 Species	来源 Origin
S010610-1-S010610-10, S010623-1-S010623-10	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	大菱鲆 <i>S. maximus</i>
BH1	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>
LD080323	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>
JGB080708-1	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>
S090801	哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	矛尾复鰕虎鱼 <i>Synechogobius hasta</i>
ST1	美人鱼弧菌 <i>V. damsela</i>	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>
JL120508	需钠弧菌 <i>V. natriegen</i>	日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>
LD081008B-1	霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>
TS1	河口弧菌 <i>V. aestuarianus</i>	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>

表 2 引物序列
Tab.2 Sequence of primers

基因 Gene	产物长度 Product size(bp)	引物序列 Primers sequence (5'-3')	参考文献 Reference /GenBank No.
<i>empA</i>	248	F: CCTTTAACCAAGTGGGCGTA R: CGATTTGTAAGGGCGACAAT	陈吉祥等, 2005
<i>vah1</i>	493	F: TGCGCTATATTGTCGATTTTCAGTT R: GCACCCGTTGTATCATCATCTAAG	Rodkhum <i>et al</i> , 2006
<i>vah4</i>	603	F: ATGAAAACCATACGCTCAGCATCT R: TCACGCTTGTTTTTGGTTTAAATGAAATCG	Rodkhum <i>et al</i> , 2006
<i>rtxA</i>	441	F: GCCTTCTTCGCCTAAACCT R: ATTCGAGCCACTACCAAG	GenBank, EU155486
<i>virA</i>	468	F: TTATTGGGCCTTTCGATACTG R: CTGGGTAACCTGTCCGATTATC	鲁雪, 2010 ¹⁾
<i>angM</i>	500	F: CCTGAAGTTGAGCCTCGTAAG R: CGCTTTGATGCTGAAGTTGAC	鲁雪, 2010 ¹⁾
<i>flaA</i>	435	F: GTGCTGATGACTTCCGTATGG R: GCTCTGCCCGTTGTGAATC	鲁雪, 2010 ¹⁾
<i>tonB</i>	195	F: GGCCTAGAAGGTTTCGTT R: CTCCACAGTCACGGTTTG F3: TTGACCAACCTGCCGATG B3: GCATCAAAGCATGCAGTGG	GenBank, AY644719
<i>vah4</i>	LAMP	FIP: ACGACAAAAGAGGCCAGTTGATTTTCGAGCGTTTTGATTGCC BIP: TCGGCGCTGCACTTTACTTTGATTTTCGTTGCTGTAAAAACGCACC	GenBank, AB189397

株培养至对数生长期, 平板计数。菌液 10 倍比梯度稀释为 2.4×10^8 、 2.4×10^7 、 2.4×10^6 、 2.4×10^5 、 2.4×10^4 、 2.4×10^3 、 2.4×10^2 、 2.4×10^1 、 2.4×10^0 CFU/ml, 提取模板 DNA 后按照上述建立的双重 PCR 与 LAMP 检测方法进行灵敏性检测。

1.7 鳃弧菌双重 PCR 与 LAMP 检测的应用

取市场水产品泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、半滑舌鲷(*C. semilaevis*)、缙蛭(*Sinonovacula constricta*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、文蛤(*Lioconcha castrensis*)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)肌肉组织匀浆, 匀浆液人工感染鳃弧菌, 之后增菌培养 4 h。按照 1.3 方法提取 DNA, 并按照 1.5 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, 琼脂糖凝胶电泳和荧光染料 SYBR Green I 检测试验结果。

2 结果

2.1 鳃弧菌毒力基因

分离自大菱鲂、半滑舌鲷和鲤鱼的 22 株病原鳃

弧菌基因组 DNA 均可扩增出 *empA*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*rtxA* 及 *tonB* 基因条带, 未扩增出 *virA* 和 *angM* 基因条带, 未加模板阴性对照无任何扩增条带, 表明供试 22 株病原鳃弧菌携带 *empA*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*rtxA* 及 *tonB* 6 种毒力基因, 这些分子标记可用于该菌的初步检测, 图 1 为选择的代表菌株 S010610-1 毒力基因的检测结果。

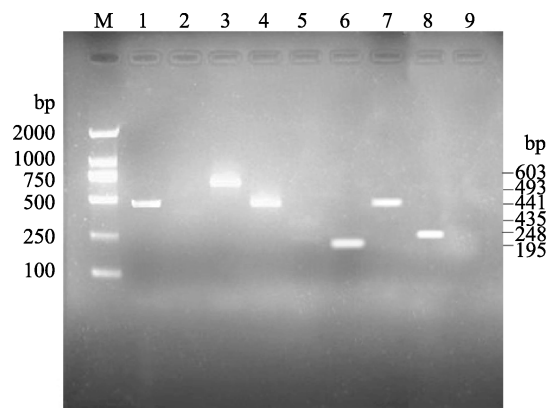


图 1 鳃弧菌毒力基因 PCR 扩增结果
Fig.1 PCR amplification result of virulence genes of *V. anguillarum*

M. DL2000; 1. *vah1*; 2. *virA*; 3. *vah4*; 4. *rtxA*; 5. *angM*; 6. *tonB*; 7. *flaA*; 8. *empA*; 9. 对照 Control

1) 鲁雪. 鳃弧菌 6 个毒力基因的多重 PCR 与基因芯片检测技术的建立以及创新检测技术的初步探索. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010

2.2 鳎弧菌双重 PCR 及 LAMP 检测方法的建立

经过优化之后的双重 PCR 反应体系(20 μ l): 2 \times Power Taq PCR MasterMix 10 μ l, *vah4* 和 *rtxA* 两对正反引物各 0.25 μ l (10 μ mol/L), 模板 1 μ l, 无菌双蒸水 8 μ l; 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。

经过优化之后的 LAMP 反应体系(25 μ l): 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 1.6 μ l (10 μ mol/L), F3、B3 各 0.2 μ l (10 μ mol/L)、模板 DNA 1 μ l、BstDNA 酶 1 μ l (8000 U)、ddH₂O 8.4 μ l; LAMP 的反应条件: 65 $^{\circ}$ C 恒温保持 60 min, 之后 80 $^{\circ}$ C 终止反应 10 min。

2.3 鳎弧菌双重 PCR 及 LAMP 的特异性

双重 PCR 结果显示, 鳎弧菌代表菌株 S010610-1 株基因组 DNA 可扩增出 603 和 441 bp 两条目的条带, 而其他 6 株对照病原菌均未出现任何扩增条带(图 2), 表明本研究建立的鳎弧菌双重 PCR 检测方法具有较强的特异性。

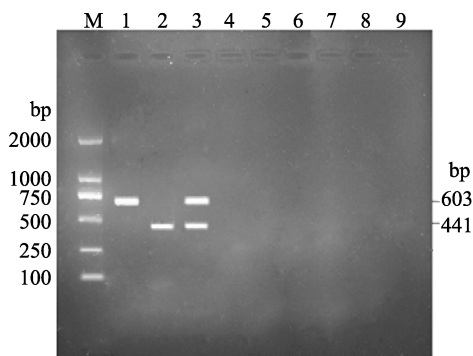


图 2 鳎弧菌双重 PCR 特异性检测结果
Fig.2 Specificity of duplex PCR for detection of *V. anguillarum*

M. DL2000; 1. *vah4*; 2. *rtxA*; 3. *vah4*, *rtxA*;
4-9. 6 株对照菌 Six controls

LAMP 扩增结果表明, 鳎弧菌可扩增出阶梯状条带, 而其他 6 株病原菌均未扩增出任何条带(图 3)。LAMP 反应液经 SYBR Green I 染色, 可见鳎弧菌呈现绿色的阳性反应, 而其他 6 株对照病原菌均呈现橙色的阴性反应(图 4)。该结果表明, 所建立的鳎弧菌 LAMP 检测方法具有很好的特异性。

2.4 鳎弧菌双重 PCR 及 LAMP 检测的灵敏度

10 倍比系列稀释菌液提取 DNA 后按照 2.2 建立

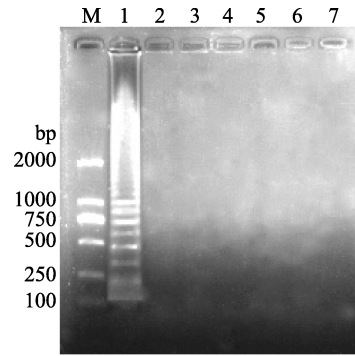


图 3 鳎弧菌 LAMP 特异性检测结果(电泳)
Fig.3 Specificity of LAMP for detection of *V. anguillarum*(electrophoresis)

M. DL2000; 1. 鳎弧菌; 2-7. 6 株对照菌
M. DL2000; 1. *V. anguillarum*; 2-7. Six controls

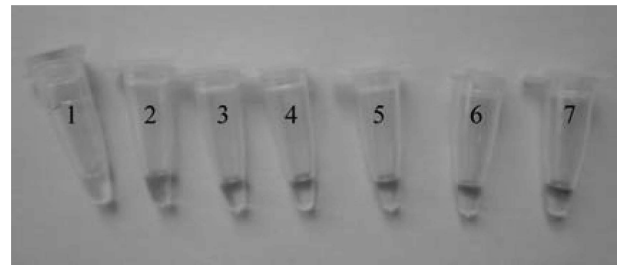


图 4 鳎弧菌 LAMP 特异性检测结果(SYBR Green I)
Fig.4 Specificity of LAMP for detection of *V. anguillarum*(SYBR Green I)

1. 鳎弧菌; 2-7. 6 株对照菌
1. *V. anguillarum*; 2-7. Six controls

的双重 PCR 及 LAMP 检测方法进行灵敏性检测, 结果显示, 双重 PCR 菌体浓度自 2.4×10^8 – 2.4×10^3 CFU/ml 均可扩增出清晰条带(图 5), 表明本研究建立的双重 PCR 方法检测鳎弧菌灵敏度为 2.4×10^3 CFU/ml; LAMP 检测的结果显示, 菌体浓度自 2.4×10^8 – 2.4×10^1 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阳性反应(图 7), 表明本研究建立的 LAMP 检测鳎弧菌灵敏度为 2.4×10^1 CFU/ml。

2.5 鳎弧菌双重 PCR 与 LAMP 检测应用

人工染菌的 10 种水产品组织匀浆增菌液, 提取 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鳎弧菌的样品准确检出。

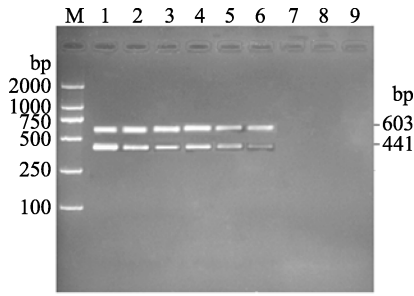


图 5 鳃弧菌双重 PCR 检测方法的灵敏性
Fig.5 Sensitivity of duplex PCR for detection of *V. anguillarum*

M. DL2000; 1-8. *vah4* 和 *rtxA* 扩增片段(菌液 10 倍系列稀释为 2.4×10^8 – 2.4×10^1 CFU/ml); 9. 对照
M. DL2000; 1-8. Amplified fragments of *vah4* and *rtxA* (serially diluted: 2.4×10^8 – 2.4×10^1 CFU/ml); 9. Control

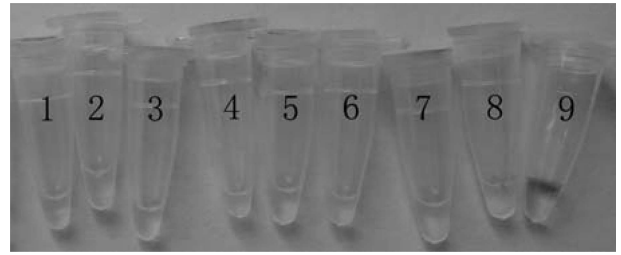


图 7 鳃弧菌 LAMP 检测方法的灵敏性 (SYBR Green I)
Fig.7 Sensitivity of LAMP method for detection of *V. anguillarum* (SYBR Green I)

M. DL2000; 1-8. LAMP 扩增(菌液 10 倍系列稀释为 2.4×10^8 – 2.4×10^1 CFU/ml); 9. 对照
M. DL2000; 1-8. Amplified fragments of LAMP (serially diluted: 2.4×10^8 – 2.4×10^1 CFU/ml); 9. Control

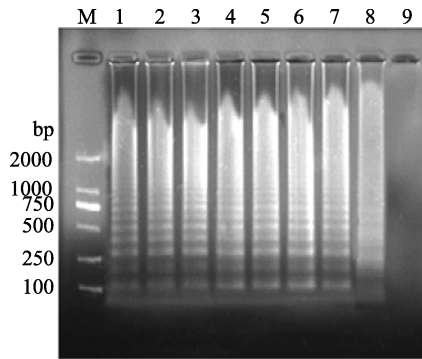


图 6 鳃弧菌 LAMP 检测方法的灵敏性(电泳)
Fig.6 Sensitivity of LAMP methods for detection of *V. anguillarum*(electrophoresis)

M. DL2000; 1-8. 扩增片段(菌液 10 倍系列稀释为 2.4×10^8 – 2.4×10^1 CFU/ml); 9. 对照
M. DL2000; 1-8. Amplified fragments (serially diluted: 2.4×10^8 – 2.4×10^1 CFU/ml); 9. Control

3 讨论

鳃弧菌广泛存在于沿岸海水、沉积物和海洋动物体中,是海水鱼、虾、贝类的一种常见的细菌性病原。本研究选取鳃弧菌 8 个毒力基因 *angM*、*tonB*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*empA*、*virA*、*rtxA*, 检测了本实验室保存的分离自半滑舌鲷、大菱鲆和鲤鱼的 22 株病原鳃弧菌毒力基因的携带情况,结果显示,22 株病原鳃弧菌基因组 DNA 均可扩增出 *empA*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*rtxA*、*tonB* 基因目的条带,而没有扩增出 *virA* 和 *angM* 基因目的条带,可能供试菌株不表达 *virA* 和 *angM* 两种基因调控的毒力蛋白,病原鳃弧菌携带的 *empA*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*rtxA*、*tonB* 6 种毒力基因,可用于该菌的初步检测。溶血素(Hemolysin)和重复序列毒素(Repeat in toxin, RTX)是鳃弧菌产生的两个重要毒力因子,在鳃弧菌的致病性上发挥重要作用,本研究选择调控溶血素和重复序列毒素的 *vah4* 和 *rtxA* 两种

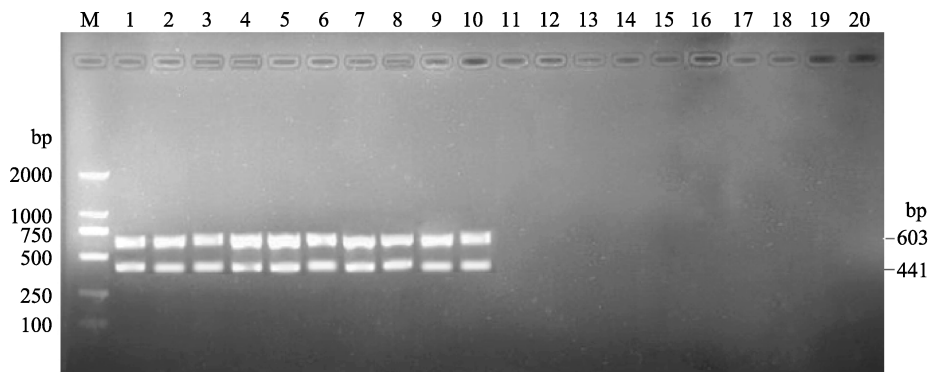


图 8 鳃弧菌的双重 PCR 检测应用
Fig.8 Application of duplex PCR for detection of *V. anguillarum*

M. DL2000; 1-10. 10 种水产品染菌组织匀浆增菌液; 11-20. 10 种水产品未染菌组织匀浆液
M. DL2000; 1-10. Bacterial enrichment of 10 aquatic products; 11-20. Bacterial no-enrichment

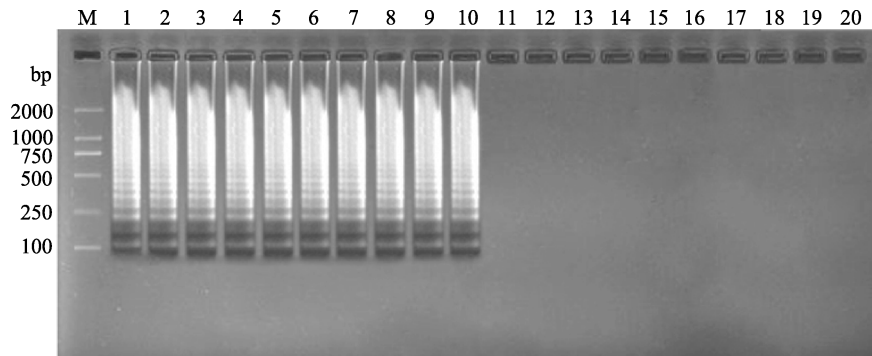


图9 鳃弧菌的 LAMP 检测应用(电泳)

Fig.9 Application of LAMP for detection of *V. anguillarum* (electrophoresis)

M. DL2000; 1-10. 10 种水产品染菌组织匀浆增菌液; 11-20. 10 种水产品未染菌组织匀浆液
M. DL2000; 1-10. Bacterial enrichment of 10 aquatic products; 11-20. Bacterial no-enrichment

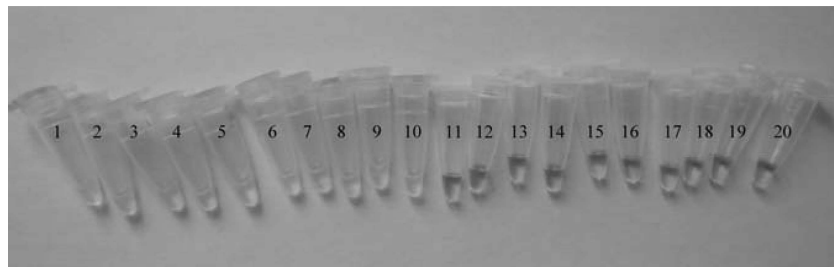


图10 鳃弧菌的 LAMP 检测应用(SYBR Green I)

Fig.10 Application of LAMP for detection of *V. anguillarum* (SYBR Green I)

M. DL2000; 1-10. 10 种水产品染菌组织匀浆增菌液; 11-20. 10 种水产品未染菌组织匀浆液
M. DL2000; 1-10. Bacterial enrichment of 10 aquatic products; 11-20. Bacterial no-enrichment

毒力基因,设计两对特异性引物建立双重 PCR 检测方法,其特异性强,检测灵敏度为 2.4×10^3 CFU/ml;以溶血素毒力基因 *vah4* 为分子靶标设计的 4 条引物(FIP、BIP、F3、B3)建立 LAMP 检测方法,其灵敏度为 2.4×10^1 CFU/ml, LAMP 检测方法的灵敏度是双重 PCR 方法的 100 倍,双重 PCR 与 LAMP 对人工感染鳃弧菌的 10 种水产品检测应用试验,证明了所建立的双重 PCR 与 LAMP 两种检测方法均能将感染鳃弧菌的样品准确检出。

有关鳃弧菌的分子检测技术,国内外学者已多有报道,陈吉祥等(2005)用金属蛋白酶基因和溶血素基因建立了鳃弧菌的 PCR 检测方法;鲁雪(2010)¹⁾用 6 个毒力基因建立了鳃弧菌的多重 PCR 检测方法;Xiao 等(2009)用 *empA* 基因建立了鳃弧菌的 PCR 检测方法;Gao 等(2010)以 *empA* 基因建立了鳃弧菌的 LAMP 检测方法,这些检测技术为水产养殖中病原鳃弧菌快

速检测及分子流行病学研究奠定了重要的理论基础。本研究以 *vah4* 和 *rtxA* 两种毒力基因建立了鳃弧菌的双重 PCR 及 LAMP 检测方法,并对两种检测方法进行了分析比较,两种检测方法均具有较好的特异性和灵敏性,以人工染菌的 10 种水产品进行的双重 PCR 和 LAMP 检测,人工染菌组均呈现阳性扩增,对照组呈阴性,表明本研究建立的双重 PCR 与 LAMP 两种检测方法在实际应用中的可行性,为病原鳃弧菌养殖场快速检测及分子流行病学研究奠定了基础。检测过程中注意外源性 DNA 污染问题,避免出现假阳性结果。LAMP 技术与 PCR 比较,操作简便、耗时短,不需要精密的仪器,检测结果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)或向扩增管中加入嵌入剂 SYBR Green I 通过颜色变化来判断扩增结果等优点,但由于 LAMP 扩增的阳性反应呈现弥散和一些低分子质量的带,一旦产生非特异性扩增,

1) 鲁雪. 鳃弧菌 6 个毒力基因的多重 PCR 与基因芯片检测技术的建立以及创新检测技术的初步探索. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010

则不易鉴别, 因此, 设计及筛选引物时, 应特别关注反应的特异性。

参 考 文 献

- 吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病. 中国水产科学, 2001, 8(1): 89-93
- 张晓君, 陈翠珍, 房海, 等. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.) 病原鳃利斯顿氏菌的鉴定. 海洋与湖沼, 2006, 37(5): 417-423
- 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. 海洋学报, 2009, 31(5): 112-122
- 张晓君, 阎斌伦, 邢旭文, 等. 鲤病原鳃利斯顿氏菌的分离鉴定及生物学特性研究. 淡水渔业, 2009, 39(5): 47-53
- 陈吉祥, 李彩凤, 颜显辉, 等. 大菱鲂病原鳃弧菌生物学及分子特征研究. 高技术通讯, 2005, 15(6): 92-96
- 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定. 微生物学报, 2002, 42(3): 263-269
- Bolinches J, Toranzo AE, Silva A, et al. Vibriosis as the main causative factor of heavy mortalities in the oyster culture industry in northwestern Spain. Bull Eur Assoc. Fish Pathol, 1986, 6: 1-4
- Bowser PR, Rosemark R, Reiner CR. A preliminary report of vibriosis in cultured American lobsters, *Homarus americanus*. J Invertebr Pathol, 1981, 37(1): 80-85
- Frans I, Michiels CW, Bossier P, et al. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. J Fish Dis, 2011, 34(9): 643-661
- Gao HW, Li FH, Zhang XJ, et al. Rapid, sensitive detection of *Vibrio anguillarum* using loop-mediated isothermal amplification. Chin J Oceanol Limnol, 2010, 28(1): 62-66
- Mo ZL, Tan XG, Xu YL, et al. A *Vibrio anguillarum* strain associated with ulcerative skin in cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. Chin J Oceanol Limnol, 2001, 19(4): 319-326
- Rodkhum C, Hirono I, Crosa JH, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of five virulence hemolysin genes in *Vibrio anguillarum*. J Microbiol Meth, 2006, 65: 612-618
- Wang XH, Oon HL, Ho GWP, et al. Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio fish epithelial cell interactions. Microbiology, 1998, 144(11): 2987-3002
- Xiao P, Mo ZL, Mao YX, et al. Detection of *Vibrio anguillarum* by PCR amplification of the *empA* gene. J Fish Dis, 2009, 32(3): 293-296

(编辑 冯小花)

Detection of Pathogenic *Vibrio anguillarum* by Using Duplex PCR and LAMP Assays

SUN Jingjing¹, GAO Xiaojian¹, ZHANG Xiaojun^{1,2①}, MA Lina^{3①}, YAN Binlun¹,
BAI Xuesong¹, ZHAO Jiaming¹, BI Keran¹, QIN Lei¹

(1. Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005; 2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009; 3. Jilin University, School of Pharmaceutical Sciences, Changchun 130021)

Abstract *Vibrio anguillarum* widely exists in aquatic environments and has been recognized as one of the prominent waterborne pathogens that undermine the aquaculture industry worldwide. In this study, we investigated the prevalent distribution of eight virulence-associated genes in the *V. anguillarum* strains isolated from *Scophthalmus maximus*, *Cynoglossus semilaevis* and *Cyprinus carpio*, and improved the detection of *V. anguillarum* by using duplex PCR and LAMP assays. Six genes (*empA*, *vah1*, *vah4*, *flaA*, *rtxA*, and *tonB*) were detected in all 22 pathogenic strains of *V. anguillarum*, but *virA* and *angM* were not detected. The duplex PCR assay was established with *vah4* and *rtxA* genes as molecular markers. Two gene fragments from the chromosomal DNA of *V. anguillarum* were detected in one PCR reaction with the detection limit of 2.4×10^3 CFU/ml. The assay in 6 other control strains generated negative results. The LAMP assay was established with *vah4* as the molecular marker. The positive reaction was shown as stair-step amplified bands and the detection limit was 2.4×10^1 CFU/ml. The assay produced negative reactions in 6 types of control pathogenic bacteria (no amplified bands). The LAMP method was 100 times more sensitive than the PCR method. Therefore we concluded that the LAMP assay could be a sensitive, rapid and simple tool for the detection of *V. anguillarum*, and recommend to employ this method in the early diagnosis of *V. anguillarum* infection in aquatic animals.

Key words *Vibrio anguillarum*; Virulence gene; Duplex PCR; LAMP

① Corresponding author: ZHANG Xiaojun, E-mail: zxj9307@163.com; MA Lina, E-mail: malan@jlu.edu.com