

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211224001

http://www.yykxjz.cn/

徐媛媛, 于永翔, 王印庚, 王春元, 李永杰, 刘定远, 秦蕾, 张正. 5种主要海水养殖病原菌多重微流控荧光定量PCR快速检测技术的建立. 渔业科学进展, 2023, 44(3): 222-234

XU Y Y, YU Y X, WANG Y G, WANG C Y, LI Y J, LIU D Y, QIN L, ZHANG Z. Establishment of multiple microfluidic fluorescence quantitative PCR detection technology for five main mariculture bacterial pathogens. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(3): 222-234

5种主要海水养殖病原菌多重微流控荧光定量 PCR快速检测技术的建立*

徐媛媛^{1,2} 于永翔² 王印庚^{2,3} 王春元² 李永杰²
刘定远^{1,2} 秦蕾¹ 张正^{2,3①}

(1. 江苏海洋大学 江苏 连云港 222005;

2. 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食品产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

摘要 在养殖现场开展多病原的快速检测是水产养殖产业健康发展的重要技术需求之一。本研究选取哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的 *vhhA* 基因、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的 *toxR* 基因、大菱鲆弧菌(*Vibrio scophthalmi*)的 *luxR* 基因、鳎弧菌(*Vibrio anguillarum*)的 *empA* 基因和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)的 *Mcp* 基因作为靶基因,设计特异性引物,通过优化反应体系和条件,并在微流控芯片进行集成,建立了可同步检测这5种病原菌的多重微流控荧光定量PCR检测技术。结果显示,本研究所建立的检测技术最佳反应体系: 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μL, Primer F/R 各 1 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 1 μL。反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 61 °C 30 s, 扩增 30 个循环。通过绘制标准曲线发现,在 10⁹~10⁴ copies/μL 浓度范围内均有良好的线性相关性。该方法对哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲆弧菌、鳎弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种特异性强,对5种病原菌的最低检测限分别为 40、20、200、500 和 20 CFU/mL,显示出较高的灵敏度,且样品平均检测时间缩短至 26 min 左右。本研究结果为开发水产养殖多病原快速、精准的现场检测技术奠定了重要基础。

关键词 哈维氏弧菌; 副溶血弧菌; 大菱鲆弧菌; 鳎弧菌; 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种; 微流控PCR; 现场快速检测

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)03-0222-13

进入 21 世纪以来,我国的海水养殖产业发展迅猛,养殖规模不断扩大,产量不断增加,但随之而来的养殖密度过高、水环境恶化等诸多问题导致病害频

发,给产业造成了严重的经济损失。其中,细菌性疾病成为海水养殖中最常见的问题之一,哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、

* 国家重点研发计划课题(2019YFD0900104)、山东省自然科学基金项目(ZR2020QC216; ZR2021MC027)和江苏省研究生科研与实践计划项目(SJCX20_1288)共同资助。徐媛媛, E-mail: 759645785@qq.com

① 通信作者: 张正, 副研究员, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-12-24, 收修改稿日期: 2022-02-14

大菱鲆弧菌 (*Vibrio scophthalmi*)、鳎弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 (*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*) 是近年来频繁见于文献报道的几种重要的海水养殖动物致病菌, 可感染海水鱼类(张飞等, 2012; 陈吉祥等, 2005)、对虾(陈月忠等, 2000; 李翠苹等, 2020)和贝类(Hidalgo *et al*, 2008)等多种海水经济动物发病。这些病原菌具有致病性强、流行面积广、致死率高等显著特点, 对水产养殖生产危害很大, 加强对这些病原菌的快速检测技术研究, 有助于有效防控其传播和感染, 减少养殖业的经济损失。

荧光定量PCR技术因在检测通量、精准性、灵敏度以及成本方面的突出优势而得到迅速发展(何军霞等, 2021), 被广泛应用于食品安全(雷庆等, 2021)、医学诊断(Fidalgo *et al*, 2021)和畜牧兽医(张若楠等, 2020)等众多领域。微流控技术(microfluidics)又被称为芯片实验室, 是一种以在微米尺度空间对流体进行操控为主要特征的科学技术(陈京等, 2020)。将微流控技术与荧光定量PCR技术相结合, 形成的微流控荧光定量芯片检测是利用微流控器件热质量小和比面积高等特点实现快速传热, 从而缩短PCR扩增过程中稳定温度需要的时间, 与常规的实验室荧光定量PCR仪器相比, 微流控荧光定量PCR技术具有检测所需样品量少、升降温速度快、耗时短、成本低、便于携

带、环境条件要求低等显著特点, 在疾病临床诊断(王可可等, 2018)、食品检测(吴姗等, 2009)和畜牧兽医(王楷成等, 2021)等多个领域已经得到广泛应用。

本研究基于微流控荧光定量PCR技术, 针对哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲆弧菌、鳎弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种设计特异性引物, 通过优化反应体系和反应条件, 进行这5种病原菌在微流控检测芯片的集成应用, 实现重要海水养殖病原菌的微流控荧光定量PCR一步式快速检测, 研究结果将为开发在水产养殖现场应用的病原菌多重微流控检测技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

本研究使用15种细菌, 共计28株。其中, 灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 标准菌株购自中国科学院微生物研究所中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC), 坎贝氏弧菌 (*Vibrio campbellii*) 等11株标准菌株购自自然资源部第三海洋研究所海洋微生物菌种保藏管理中心(Marine Culture Collection of China, MCCC), 哈维氏弧菌等17株菌株由本实验室分离自不同的患病水产动物。菌株具体信息见表1。

表1 实验所用菌株

Tab.1 The strains for testing

菌株 Strains	菌株编号 Strain number	来源 Source	菌株 Strains	菌株编号 Strain number	来源 Source
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	ATCC 35084	标准菌株	美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	PDD 1605	实验室分离
	Vha 0207	实验室分离		PDD 1608	实验室分离
	Vha 1809	实验室分离		PDD 1809	实验室分离
坎贝氏弧菌 <i>V. campbellii</i>	ATCC 25920	标准菌株	鳎弧菌 <i>V. anguillarum</i>	Van 020630	实验室分离
	Vca 2007	实验室分离		Van 020605	实验室分离
欧文氏弧菌 <i>V. owensii</i>	DSM 23055	标准菌株	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	标准菌株
	Vow 2007	实验室分离		Vpa 1001	实验室分离
蓝弧菌 <i>V. azureus</i>	DSM 17186	标准菌株	相模原弧菌 <i>V. sagamiensis</i>	KCTC 22354	标准菌株
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	标准菌株	轮虫弧菌 <i>V. rotiferianus</i>	DSM 17186	标准菌株
	Val 1001	实验室分离		Vro 1711	实验室分离
嗜环弧菌 <i>V. cyclitrophicus</i>	Vcy 0406	实验室分离	大菱鲆弧菌 <i>V. scophthalmi</i>	Vsc 0531	实验室分离
贻贝弧菌 <i>V. mytili</i>	ATCC 51288	标准菌株	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	VS ST-01	标准菌株
	Vmy 1006	实验室分离		Vsp 1805	实验室分离
需钠弧菌 <i>V. natriegens</i>	ATCC 14048	标准菌株			
	Vna 0607	实验室分离			

1.2 微流控 PCR 仪器及反应芯片

本研究选用 UF-150 微流控荧光定量 PCR 仪 (GENECHECKER™ Ultra-Fast Real-time PCR System), 由韩国 Genesystem 公司生产, 其微流控反应芯片由聚甲基丙烯酸甲酯材料制成, 尺寸大小为 38 mm×25 mm×6 mm (图 1)。该芯片共有 10 个反应通道且都标有孔号, 奇数孔号在芯片顶部, 偶数孔号在芯片底部, 加

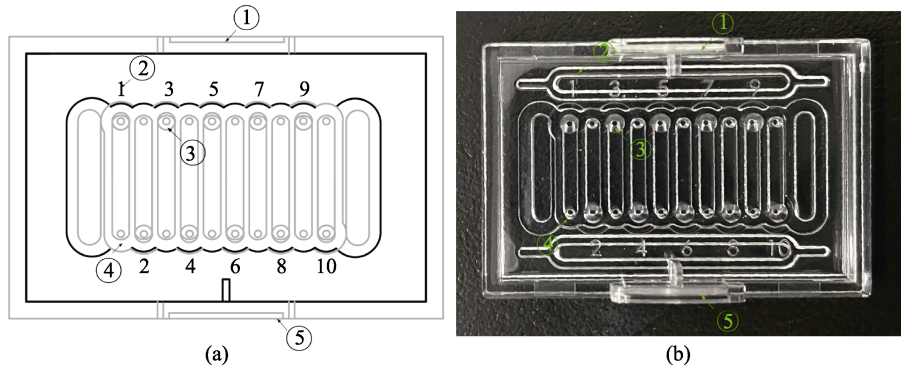


图 1 微流控芯片结构图与实物

Fig.1 Microfluidic chip structure diagram and product

(a)结构图; (b)实物; ①、⑤: 芯片翼; ②: 孔号; ③: 加样孔; ④: 通气孔。

(a) Structure of the chip; (b) Product of the chip; ①, ⑤: Chip wing; ②: Hole numbers; ③: Loading hole; ④: Vent hole.

1.3 细菌模板 DNA 的制备

首先将保存于 -80°C 的 28 株细菌接种于 TSB 培养基, 28°C 培养 18 h 活化后, 挑取单菌落转接至新的 TSB 平板培养基, 在 28°C 下纯化培养 18 h, 然后挑取 1~2 个单菌落于 $100\ \mu\text{L}$ 的无菌水中混匀, 100°C 金属浴 15 min, 再 $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 5 min, 收集上清液即为细菌的 DNA 模板, 保存于 -20°C 备用。

1.4 引物设计及特异性验证

根据 GenBank 中登录的哈维氏弧菌 *vhhA* 基因、副溶血弧菌 *toxR* 基因和大菱鲂弧菌 *luxR* 基因的保守序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物, 再通过 NCBI 中 Blast 验证引物的特异性。鳎弧菌 *empa* 基因和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 *Mcp* 基因的特异性引物分别参考本实验室已有研究结果(刘智超, 2012; Zhang *et al.*, 2021)。设计好的引物序列交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 2。

以哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲂弧菌、鳎弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种作为检测目标菌, 坎贝氏弧菌等其他 10 种细菌作为对照菌, 无菌水作为空白对照, 应用实验室常规实时荧光定量 PCR 仪 (Eppendorf AG 22331 Hamburg, 德国)进行扩增, 验证各引物的特异性。哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲂

样孔位于孔号一侧, 每个加样孔对面是通气孔, 反应通道内的空气和加样时的过量液体会通过通气孔排出。每个反应通道的容量为 $10\ \mu\text{L}$, 将荧光染料预混液、引物和待测样品混匀后加入不同反应通道后, 用封膜胶带密封每个孔, 以防止在热循环期间样品蒸发和污染。反应结束后, 可通过查看反应通道的荧光信号强弱和扩增曲线来判定结果。

弧菌反应体系为 $2\times\text{Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix}$ (Vazyme Biotech Co., Ltd) $10\ \mu\text{L}$, Primer F/R 各 $0.4\ \mu\text{L}$, DNA 模板 $1\ \mu\text{L}$, ddH_2O $8.2\ \mu\text{L}$ 。反应条件为 95°C 预变性 2 min, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s, 扩增 40 个循环。鳎弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种反应体系与反应条件参考刘智超(2012)和 Zhang 等(2021)。

将哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲂弧菌、鳎弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种分别应用 UF-150 微流控荧光定量 PCR 仪进行微流控荧光定量 PCR 扩增, 验证引物在微流控仪器上应用的可行性和特异性, 反应总体系设定为 $10\ \mu\text{L}$: $2\times\text{Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix}$ (Vazyme Biotech Co., Ltd) $5\ \mu\text{L}$, Primer F/R 各 $1\ \mu\text{L}$, DNA 模板 $2\ \mu\text{L}$, ddH_2O $1\ \mu\text{L}$ 。反应条件为 95°C 预变性 30 s, 95°C 变性 5 s, 退火时间 30 s, 退火温度与普通实时荧光定量 PCR 一致, 扩增 30 个循环。

1.5 标准曲线的建立

将上述特异性引物分别进行普通 PCR 扩增, 扩增产物切胶回收后连接至 PMD-19T 载体, 转化至 DH-5 α 感受态细胞, 增菌培养进行菌液 PCR 扩增后测序筛选出阳性菌作为标准品。将标准品增菌培养后

表 2 5 株病原菌的特异性引物序列
Tab.2 The specific primer sequences of 5 pathogen strains

菌株 Strain	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of primers (5'~3')	产物长度 Product length/bp	退火温度 Annealing temperature/°C
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	vhhA-F	GAGATGGTCAGTGCCTCTCAA	211	60
	vhhA-R	TTTGCGGTGTGTCTGTGTAGA		
大菱鲆弧菌 <i>V. scophthalmi</i>	luxR-F	GGCCACTGTTTGTAGCACC	201	60
	luxR-R	AGCTGTCCGCTAGTTTCAACA		
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	toxR-F	CCTGTGGCTTCTGCTGTGAA	226	60
	toxR-R	CTGCATGGTGCTTAACGTAGC		
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	empA-F	CACTATTTTCCGTGCTACTGGC	412	59
	empA-R	AGTTTTCGTTGCTACGACTGAC		
美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	Mcp-F	ACTCGCTTACTTGAATCGGAAAT	344	60
	Mcp-R	TCACGAAAGACATTGAGCATC		

提取质粒, 按 10 倍梯度稀释 6 个梯度分别进行荧光定量 PCR 扩增并绘制标准曲线。

1.6 多病原微流控荧光定量 PCR 快速检测条件优化

分别用哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲆弧菌、鳗弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的 DNA 模板, 比较单重微流控荧光定量 PCR 的退火温度, 分别设定反应温度为 58、59、60、61、62 和 63 °C 进行扩增, 最终筛选 5 株菌最佳的共同退火温度。同时分别设反应循环数为 25、30、35、40, 验证最佳反应循环数。

1.7 集成芯片引物交叉反应分析

将设计好的哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲆弧菌、鳗弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的特异性引物集成到微流控芯片上, 并用制备好的 5 株菌的 DNA 模板在集成的芯片上进行多重微流控荧光定量 PCR 扩增, 验证引物间有无交叉反应。反应总体系设定为 10 μ L: 2 \times Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme Biotech Co., Ltd) 5 μ L, Primer F/R 各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 1 μ L。反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 扩增 30 个循环。

1.8 多病原微流控荧光定量 PCR 快速检测灵敏度分析

按 1.3 章节相同的方法, 将哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲆弧菌、鳗弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种划线接种于 TSB 平板培养基进行纯化培养。取适量纯化好的菌苔用无菌 PBS 溶液分别配制成 4.0 \times 10⁶、2.0 \times 10⁶、2.0 \times 10⁶、5.0 \times 10⁶ 和 2.0 \times 10⁶ CFU/mL 浓度的菌悬液, 按 10 倍梯度依次稀释 6 个梯度, 涂布计数以验证其浓度的准确性。将不同浓度梯度的菌

悬液按照 1.3 章节相同的方法制备细菌 DNA 模板, 以灭菌的去离子水为阴性对照, 在优化后的反应条件下分别进行多重微流控荧光定量 PCR 反应, 确定该方法的最低检测限。

1.9 多病原微流控荧光定量 PCR 快速检测技术的应用效果

选取大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、仿刺参(*Apostichopus japonicus*) 为实验对象, 分别取大菱鲆的肌肉、鳃、肝组织, 凡纳滨对虾的肌肉、鳃组织, 仿刺参的呼吸树、肠道组织各 0.1 g, 分别加入 100 μ L 哈维氏弧菌(1.0 \times 10⁶ CFU/mL)、副溶血弧菌(1.2 \times 10⁶ CFU/mL)、大菱鲆弧菌(1.6 \times 10⁶ CFU/mL)、鳗弧菌(2.3 \times 10⁶ CFU/mL)和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(8.0 \times 10⁶ CFU/mL)的菌液, 同时, 以未加菌液的组织作为对照组, 将组织研磨匀浆后取 10 μ L 加入 100 μ L 裂解液(Vazyme Biotech Co., Ltd)混匀, 100 °C 金属浴 15 min 后加入 100 μ L 稳定液(Vazyme Biotech Co., Ltd)混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为模板, 在已经优化好的反应条件下进行多重微流控荧光定量 PCR 扩增, 验证检测效果。

2 结果

2.1 引物特异性验证

应用所设计的引物分别进行普通荧光定量 PCR 和微流控荧光定量 PCR 反应, 引物特异性验证的结果显示, 哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲆弧菌、鳗弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 DNA 出现特异性扩增曲线, 其他细菌 DNA 及阴性对照无扩增曲线出现(图 2), 表明所设计的 5 种菌的引物特异性良好。

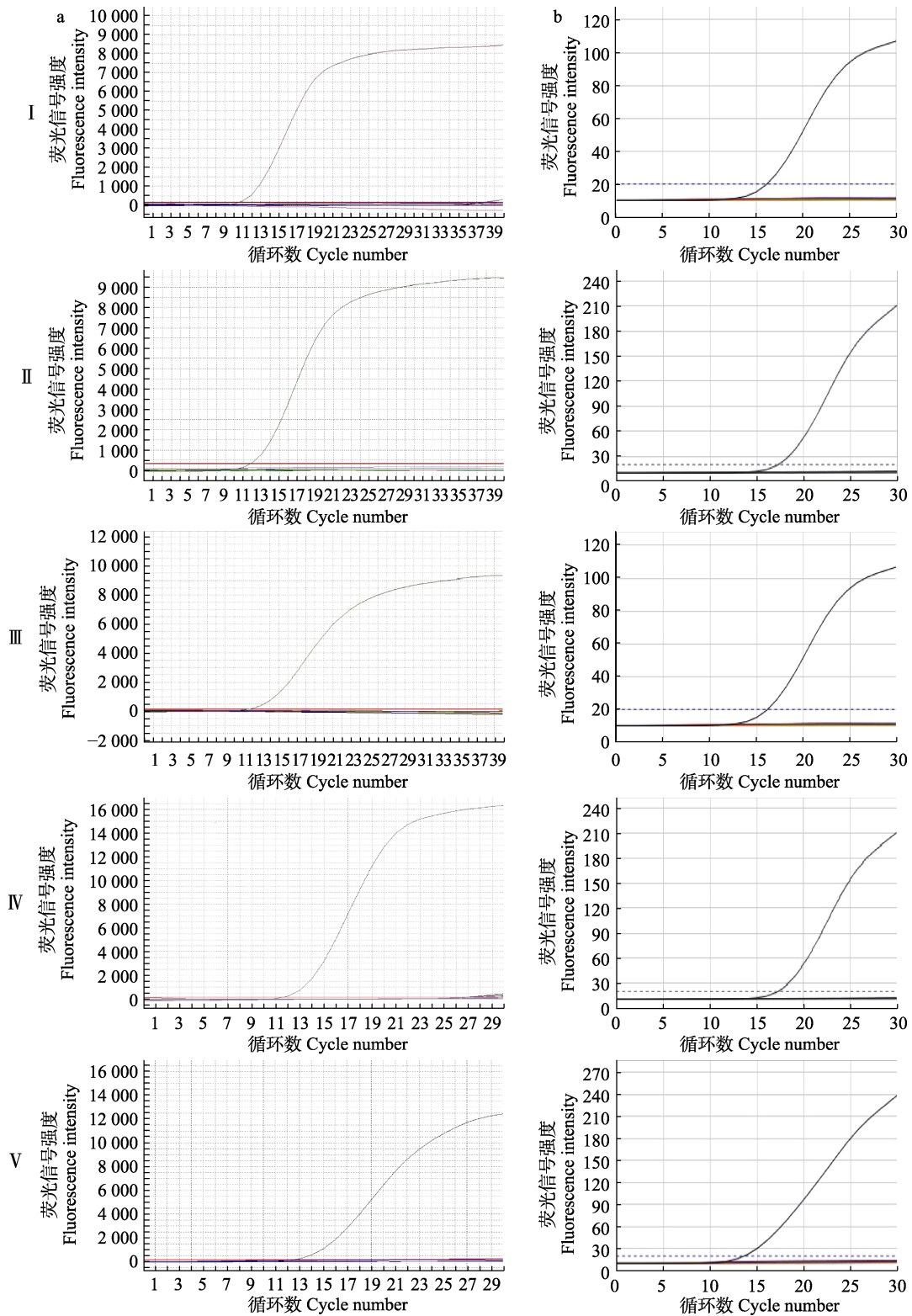


图 2 引物特异性验证

Fig.2 Primer specificity validation

a: 普通实时荧光定量 PCR 特异性实验; b: 微流控荧光定量 PCR 特异性实验;

I: 哈维氏弧菌; II: 副溶血弧菌; III: 大菱鲆弧菌; IV: 鳗弧菌; V: 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种。

a: Conventional real-time quantitative PCR specificity test; b: Microfluidic fluorescence quantitative PCR specific test;

I: *V. harveyi*; II: *V. parahaemolyticus*; III: *V. scopthalmi*; IV: *V. anguillarum*; V: *P. damsela* subsp. *damsela*.

2.2 多病原微流控荧光定量 PCR 快速检测体系集成与反应条件优化

在单重微流控荧光定量 PCR 反应条件的基础上, 对多重微流控荧光定量 PCR 方法的反应条件进行优化。最佳反应条件下的反应结果如图 3 所示, 最终确定多重微流控荧光定量 PCR 反应体系为 $2 \times Taq$ Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μ L, Primer F/R 各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 1 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 扩增 30 个循环。

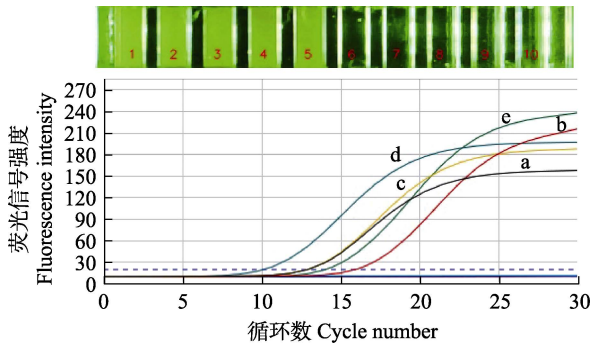


图 3 退火温度 61 $^{\circ}$ C 时微流控荧光定量 PCR 反应结果
Fig.3 Microfluidic fluorescence quantitative PCR result at annealing temperature 61 $^{\circ}$ C

- 1、6: 哈维氏弧菌引物; 2、7: 鳃弧菌引物;
3、8: 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种引物;
4、9: 副溶血弧菌引物; 5、10: 大菱鲆弧菌引物;
6~10: 空白对照; a: 哈维氏弧菌; b: 鳃弧菌;
c: 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种; d: 副溶血弧菌;
e: 大菱鲆弧菌。

- 1, 6: Primers of *V. harveyi*; 2, 7: Primers of *V. anguillarum*;
3, 8: Primers of *P. damsela* subsp. *damsela*;
4, 9: Primers of *V. parahaemolyticus*;
5, 10: Primers of *V. scophthalmi*; 6~10: Negative control;
a: *V. harveyi*; b: *V. anguillarum*; c: *P. damsela* subsp. *damsela*; d: *V. parahaemolyticus*; e: *V. scophthalmi*.

2.3 标准曲线的建立

将哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲆弧菌、鳃弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的质粒标准品分别按 10 倍梯度稀释 6 个梯度, 进行荧光定量 PCR 扩增, 并绘制标准曲线。结果如图 4 所示, 哈维氏弧菌的标准曲线在 $2.42 \times 10^4 \sim 2.42 \times 10^9$ copies/ μ L 浓度范围内有良好的线性相关性 ($y = -2.972x + 6.73$, $R^2 = 0.999$), 副溶血弧菌的标准曲线在 $3.83 \times 10^4 \sim 3.83 \times 10^9$ copies/ μ L 浓度范围内有良好的线性相关性 ($y = -3.287x + 7.48$, $R^2 = 0.998$), 大菱鲆弧菌在 $2.87 \times 10^4 \sim 2.87 \times 10^9$ copies/ μ L 浓度范围内有良好的线性相关性 ($y = -3.549x + 8.14$, $R^2 =$

0.998), 鳃弧菌在 $1.39 \times 10^4 \sim 1.39 \times 10^9$ copies/ μ L 浓度范围内有良好的线性相关性 ($y = -3.912x + 7.83$, $R^2 = 0.999$), 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种在 $2.20 \times 10^4 \sim 2.20 \times 10^9$ copies/ μ L 浓度范围内有良好的线性相关性 ($y = -3.969x + 7.07$, $R^2 = 0.992$)。

2.4 集成芯片引物交叉反应分析

将 5 对引物集成到同一芯片上, 进行引物间交叉反应分析。结果显示, 5 对引物在同一芯片上交叉反应影响较小, 在 25 个反应循环数内不影响结果判断 (图 5)。

2.5 多重微流控荧光定量 PCR 对 5 种病原菌的检测灵敏度

将 5 种病原菌的特异性引物集成到同一个微流控芯片上, 分别用哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲆弧菌、鳃弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 DNA 作为模板, 在优化好的体系和反应条件下, 同时进行微流控荧光定量 PCR 扩增, 验证该方法的灵敏度。实验结果如图 6, 集成后的微流控芯片对上述 5 种病原菌的最低检测限分别为 40 CFU/mL (2.0×10^{-3} ng/ μ L)、20 CFU/mL (2.0×10^{-3} ng/ μ L)、200 CFU/mL (2.0×10^{-2} ng/ μ L)、500 CFU/mL (1.0×10^{-2} ng/ μ L)、20 CFU/mL (1.0×10^{-3} ng/ μ L)。因此, 判定集成后的芯片对 5 种病原菌的最低可检限为 100 CFU/mL (0.01 ng/ μ L), 具有较高的灵敏度。

2.6 多重微流控荧光定量 PCR 检测的临床应用效果验证

选取大菱鲆、凡纳滨对虾、仿刺参为实验对象, 验证 5 种病原菌在大菱鲆(肌肉、鳃、肝)、凡纳滨对虾(肌肉、鳃)、仿刺参(呼吸树、肠道)组织中的检出效果, 筛选出最佳检测部位。应用已建立的多重微流控荧光定量 PCR 检测方法对含有 5 种病原菌的上述组织进行样品检测, 同时应用实验室常规实时荧光定量 PCR 进行同步检测作对比。结果如表 3 所示, 普通实时荧光定量 PCR 检测样品结果分别为 100% (21/21)、100% (21/21)、100% (21/21)、100% (21/21)、95.2% (20/21)。所建立的多重微流控荧光定量 PCR 检测方法的准确率达到普通实时荧光定量 PCR 检测方法的 96.2% 以上, 实验中未加菌液的组织检测结果均为阴性。样品平均检测时间仅为 26 min, 检测时长较普通实时荧光定量 PCR 反应时间 (1 h 40 min) 明显缩短。

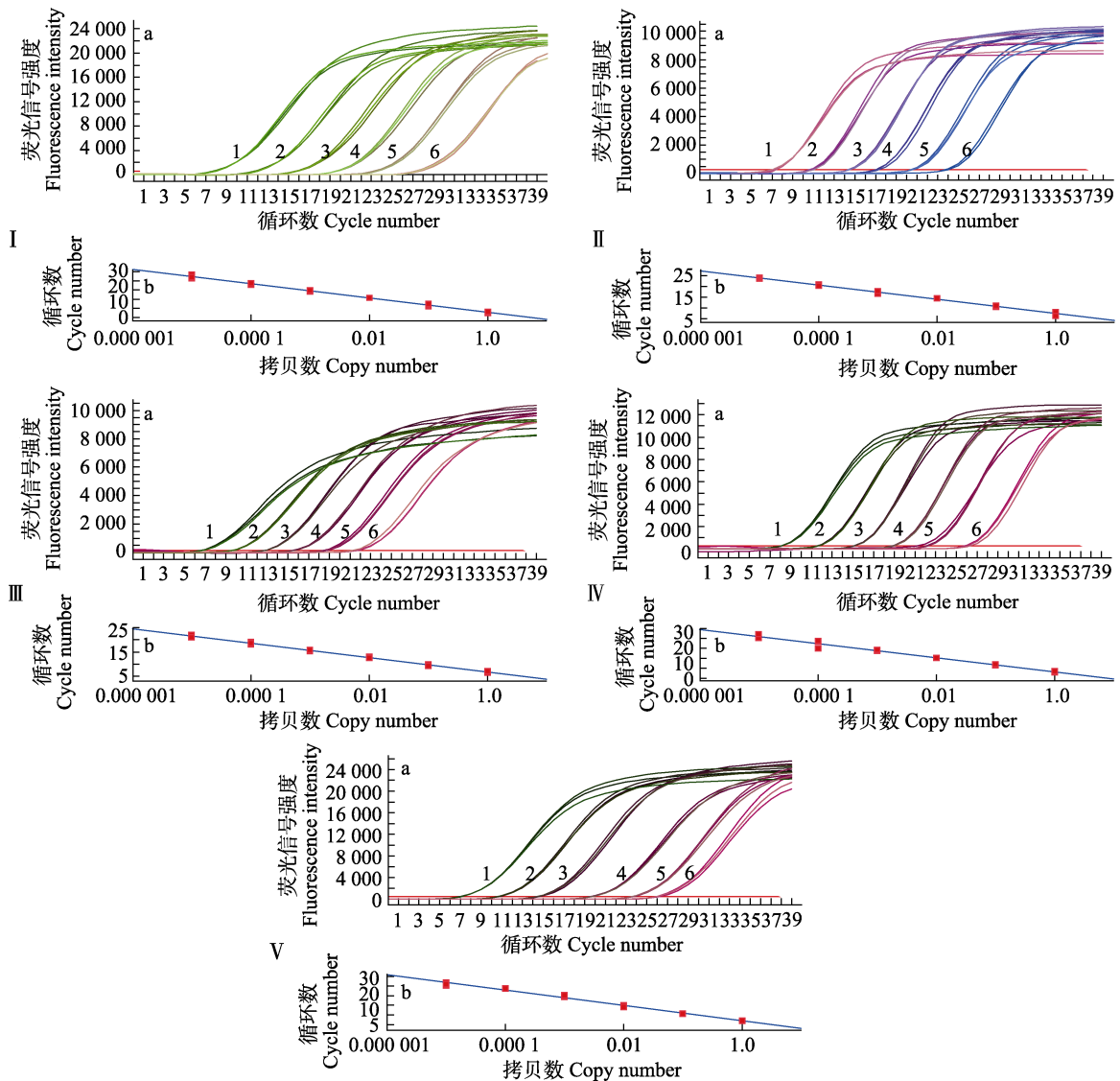


图4 质粒标准品的扩增曲线和标准曲线

Fig.4 Amplification curve and standard curve of plasmid standard

a: 扩增曲线; b: 标准曲线; 1~6 分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 和 10^4 copies / μ L;

I: 哈维氏弧菌; II: 副溶血弧菌; III: 大菱鲆弧菌; IV: 鳗弧菌; V: 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种

a: Amplification curve; b: Standard curve; 1~6 indicate 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 and 10^4 copies / μ L, respectively;

I: *V. harveyi*; II: *V. parahaemolyticus*; III: *V. scophthalmi*; IV: *V. anguillarum*; V: *P. damsela* subsp. *damsela*

3 讨论

近年来,病害频发导致了水产养殖业严重的经济损失,2020年我国水产病害损失约为589亿元,达到了历史最高值(崔利锋,2021)。哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲆弧菌、鳗弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种是目前文献报道相对频繁的几种海水养殖主要致病菌,可感染鱼类(Qi *et al*, 2021; 兰欣等, 2020; 靳晓敏等, 2015; Mei *et al*, 2010; Kim *et al*, 2013)、凡纳滨对虾(Paria *et al*, 2021; 郑国兴等, 1990)和贝类

(刘小莉等, 2017; Hidalgo *et al*, 2008)等多种海水经济动物。此外,美人鱼发光杆菌美人鱼亚种对鲸鱼和海豚等海洋哺乳动物(Rivas *et al*, 2013)以及人类也有致病性(Alvarez *et al*, 2006)。加强对上述病原菌的快速检测技术研究,可为防控这些病原菌的感染和传播提供重要的技术支撑。

目前,对病原菌的检测技术研究通常选用管家基因和毒力基因作为靶基因。本研究分别选取了哈维氏弧菌的 *vhhA* 基因、副溶血弧菌的 *toxR* 基因、大菱鲆弧菌的 *luxR* 基因、鳗弧菌的 *empA* 基因和美人鱼发光

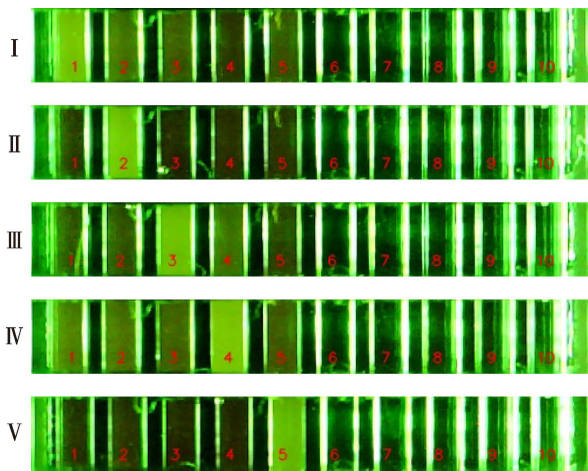


图 5 引物交叉反应的微流控荧光定量 PCR 分析结果
Fig.5 Results of cross reaction analysis through microfluidic fluorescence quantitative PCR

荧光信号强证明发生阳性反应。I: 哈维氏弧菌;
II: 鳗弧菌; III: 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种;
IV: 副溶血弧菌; V: 大菱鲆弧菌; 1、6: 哈维氏弧菌
引物; 2、7: 鳗弧菌引物; 3、8: 美人鱼发光杆菌
美人鱼亚种引物; 4、9: 副溶血弧菌引物; 5、10: 大菱鲆
弧菌引物; 6~10: 空白对照。

The apparent turbidity of the channel was positive reaction.
I: *V. harveyi*; II: *V. anguillarum*; III: *P. damsela* subsp.
damsela; IV: *V. parahaemolyticus*; V: *V. scophthalmi*;
1, 6: Primers of *V. harveyi*; 2, 7: Primers of *V. anguillarum*;
3, 8: Primers of *P. damsela* subsp. *damsela*; 4, 9: Primers
of *V. parahaemolyticus*; 5, 10: Primers of *V. scophthalmi*;
6~10: Negative control.

杆菌美人鱼亚种的 *Mcp* 基因作为目标基因开展快速检测技术研究。*vhhA* 基因是哈维氏弧菌的溶血素编码基因, 最早在高致病性毒株 VIB 645 中被发现 (Zhang *et al*, 2005), 在 NCBI 上 Blast 比对发现该基因序列与哈维氏弧菌簇下其他菌种的溶血素基因相似度在 87% 以下。毒力基因 *toxR* 最先在霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 中被报道, 后来陆续在副溶血弧菌、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、鳗弧菌、拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 等多种弧菌中证实了该基因的存在 (Lin *et al*, 1993)。有研究发现, 异种细菌之间的 *toxR* 基因序列相似性较低, 如副溶血弧菌和溶藻弧菌的 *toxR* 基因同源性仅为 61.7%, 可在种的水平上用于检测副溶血弧菌 (Kim *et al*, 1999)。*luxR* 基因是家族蛋白调控基因, 广泛存在于革兰氏阴性菌中 (Chaparian *et al*, 2016)。高志鑫等 (2015) 以大菱鲆弧菌的 *luxR* 基因为靶点设计 LAMP 扩增引物, 建立了大菱鲆弧菌 LAMP 检测方法。鳗弧菌的 *empA* 是金属蛋白酶的编码基因, 金属蛋白酶被认为是鳗弧菌

侵入宿主体内不可缺少的重要因子 (刘小莉等, 2017)。将病原菌特有的金属蛋白酶基因作为靶基因来检测病原菌, 具有灵敏度高、特异性强等优势 (余俊红等, 2002)。*Mcp* 基因是美人鱼发光杆菌美人鱼亚种特有基因, 可作为美人鱼发光杆菌美人鱼亚种检测的靶基因 (Zhang *et al*, 2021)。本研究分别选用这 5 个基因作为检测目标菌的靶基因, 均具有良好的种间特异性, 为 5 种病原菌多重微流控荧光定量 PCR 检测方法的建立奠定了基础, 保障所建立的检测技术具有较高的特异性和灵敏度。

微流控芯片最早由 Manz 等 (1990) 提出, 是通过细微加工技术将微型功能元件组装成具有微流体控制的集成分析系统, 具有自动化、集成化、便携化、成本低和快速化等特点 (朱婧昞等, 2021)。本实验室在前期的研究中, 已经针对单一的病原菌开展了微流控快速检测技术的研究 (陈京等, 2020; Zhang *et al*, 2021)。而将不同病原菌的反应体系和反应条件在同一芯片进行集成化, 可以满足多样品和多病原的实时、快速检测需求, 显著提高检测效率, 进而可开发应用于养殖现场的多病原微流控同步快速检测技术。余东阳等 (2020) 结合微流控与荧光定量 PCR 技术建立了寨卡病毒 (ZIKV)、登革病毒 (DENV)、黄热病毒 (YFV) 和基孔肯雅病毒 (CHIKV) 的快速核酸检测方法, 25 min 内即可完成 1 次上述 4 种病毒的同时快速检测, 适用于现场检测与早期诊断。El-tholoth 等 (2021) 基于微流控装置建立了环介导等温扩增 (RT-LAMP) 技术, 实现了猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 和猪三角洲冠状病毒 (PDCoV) 的同时检测, 耗时仅需 30 min。但在水产领域, 微流控检测技术研究相对较少, 也未开展实践应用。本研究基于 UF-150 微流控荧光定量 PCR 仪平台, 通过对微流控芯片的集成应用, 建立了针对水产动物 5 种常见病原菌的多重微流控荧光定量 PCR 检测方法, 实现了在同一检测芯片特异性扩增哈维氏弧菌、副溶血弧菌、大菱鲆弧菌、鳗弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 5 种病原菌, 并且具有较高的灵敏度。通过应用所建立的多重微流控荧光定量 PCR 检测方法对水产动物样品进行临床检测, 以及与实验室普通荧光定量 PCR 检测准确率进行对比, 发现该方法检测动物组织样品的准确率可达到实验室普通实时荧光定量 PCR 检测方法准确率的 96.2% 以上, 但检测时间只需 26 min 左右, 较实验室普通实时荧光定量 PCR 的检测时间明显缩短, 为进一步开发实用化的水产多病原现场快速检测技术奠定了工作基础。

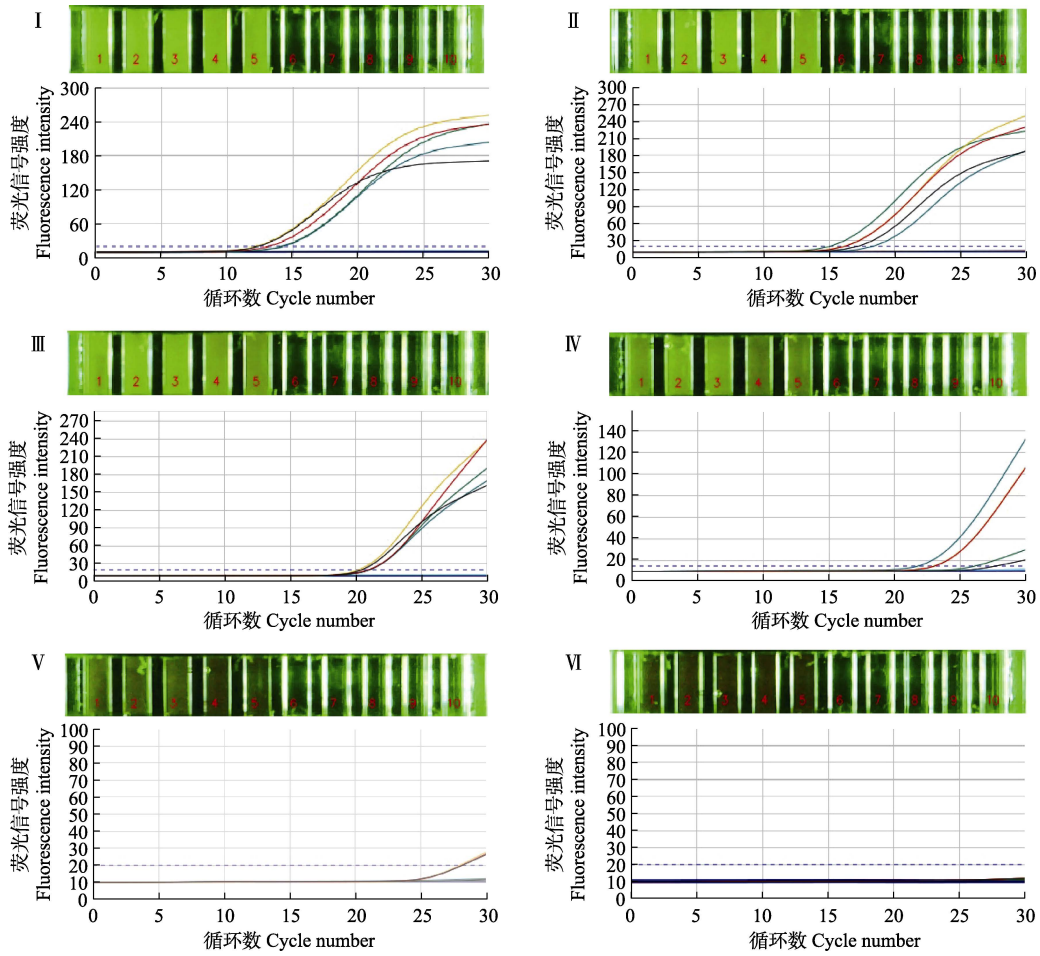


图 6 微流控荧光定量 PCR 集成芯片对 5 种病原菌同步检测的灵敏度验证结果
 Fig.6 Sensitivity of multiplex microfluidic quantitative PCR on the 5 pathogenic bacteria

I~VI 分别为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 和 10^0 CFU/mL 的菌液；1：哈维氏弧菌；2：副溶血弧菌；3：美人鱼发光杆菌美人鱼亚种；4：鳗弧菌；5：大菱鲆弧菌；6~10：空白对照。

I~VI indicated 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 and 10^0 CFU/mL bacteria suspension, respectively; 1: *V. harveyi*; 2: *V. parahaemolyticus*; 3: *P. damsela* subsp. *damsela*; 4: *V. anguillarum*; 5: *V. scophthalmi*; 6~10: Negative control.

表 3 微流控荧光定量 PCR 检测不同组织中 5 种病原菌的应用效果

Tab.3 Results of microfluidic fluorescence quantitative PCR in different tissues of 5 pathogens

宿主 Host	组织 Tissue	菌株 Strains					美人鱼发光杆菌 美人鱼亚种 <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
		哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	大菱鲆弧菌 <i>V. scophthalmi</i>	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>		
大菱鲆 <i>S. maximus</i>	鳃 Gill	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / ++-	-++ / +++	
	肌肉 Muscle	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	
	肝脏	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / ---	+++ / +++	
凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	鳃 Gill	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	
	肌肉 Muscle	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / -++	+++ / +++	
仿刺参 <i>A. japonicus</i>	呼吸树 Respiratory tree	+++ / -++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	
	肠道 Gut	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / ---	

注：+：检测结果为阳性；-：检测结果为阴性；+++ / +++：普通荧光定量 PCR 检测结果/微流控荧光定量 PCR 检测结果。

Note: +: Positive test result; -: Negative test result; +++ / +++: Conventional fluorescence quantitative PCR detection result / microfluidic fluorescence quantitative PCR detection result.

参 考 文 献

- ALVAREZ J R, LAMBA S, DYER K Y, *et al.* An unusual case of urinary tract infection in a pregnant woman with *Photobacterium damsel*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2006(2): 80682
- CHAPARIAN R R, OLNEY S G, HUSTMYER C M, *et al.* Integration host factor and LuxR synergistically bind DNA to coactivate quorum-sensing genes in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology*, 2016, 101(5): 823–840
- CHEN J X, YANG H, YAN X H, *et al.* Cloning of hemolysin gene from a pathogenic *Vibrio harveyi* SF1 and its detection in diseased marine animals and marine environments. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(5): 580–587 [陈吉祥, 杨慧, 颜显辉, 等. 致病性哈维氏弧菌溶血素基因克隆及其检测. *中国水产科学*, 2005, 12(5): 580–587]
- CHEN J, YU Y X, ZHANG Z, *et al.* Establishment of a fluorescence quantitative microfluidic rapid detection technique for *Vibrio rotiferianus* based on *toxR* gene. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(12): 2066–2075 [陈京, 于永翔, 张正, 等. 基于 *toxR* 基因的轮虫弧菌荧光定量微流控快速检测技术的建立. *水产学报*, 2020, 44(12): 2066–2075]
- CHEN Y Z, ZHONG S L, ZHOU C. Prevention and treatment of luminous disease of adult prawns. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39(S1): 218–223 [陈月忠, 钟硕良, 周宸. 成虾发光病原体的分离鉴定及防治技术研究. *中山大学学报(自然科学版)*, 2000, 39(S1): 218–223]
- CUI L F. China aquatic animal health report 2021. Beijing: China Agriculture Press, 2021 [崔利锋. 中国水生动物卫生状况报告 2021. 北京: 中国农业出版社, 2021]
- EI-THOLOTH M, BAI H, MAUK M G, *et al.* A portable, 3-D printed, microfluidic device for multiplexed, real time, molecular detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine deltacoronavirus at the point of need. *Lab on a Chip*, 2021, 21(6): 1118–1130
- FIDALGO B, RUBIO E, PASTOR V, *et al.* Improved diagnosis of gastrointestinal infections using a semi-automated multiplex real-time PCR for detection of enteropathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 2021, 70(9): 001367
- GAO Z X, ZHANG M, WANG X X, *et al.* The development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Vibrio scophthalmi* and its initial application. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 2015, 32(4): 284–288 [高志鑫, 张敏, 王西西, 等. 大菱鲆弧菌 LAMP 快速检测方法的建立与初步应用. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2015, 32(4): 284–288]
- HE J X, TIAN X H. Application of PCR in detection of foodborne pathogens. *China Food Safety Magazine*, 2021(6): 183 [何军霞, 田香红. 食源性致病菌检测中 PCR 技术的应用. *食品安全导刊*, 2021(6): 183]
- HIDALGO R B, CLEENWERCK I, BALBOA S, *et al.* Diversity of *Vibriosis* associated with reared clams in Galicia (NW Spain). *Systematic and Applied Microbiology*, 2008, 31(3): 215–222
- JIN X M, GE M X, ZHANG Y Y, *et al.* Detection of drug resistance phenotypes and genes in *Vibrio anguillarum* from turbot *Scophthalmus maximus*. *Fisheries Science*, 2015, 34(8): 510–514 [靳晓敏, 葛慕湘, 张艳英, 等. 大菱鲆源鳃弧菌耐药表型及耐药基因检测. *水产科学*, 2015, 34(8): 510–514]
- KIM S H, WOO S H, LEE S J, *et al.* The infection characteristics of *Vibrio scophthalmi* isolated from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology*, 2013, 26(3): 207–217
- KIM Y B, OKUDA J, MATSUMOTO C, *et al.* Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(4): 1173–1177
- LAN X, LI J, LI G Y, *et al.* Sequencing and phylogenetic analysis of the 16S rRNA genes of bacterial strains isolated from diseased flatfish. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 142–150 [兰欣, 李杰, 李贵阳, 等. 发病鲆鲽类分离菌株的 16S rRNA 基因测序分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 142–150]
- LEI Q, ZHAO Z K. Simultaneous quantitative detection of four mixed cooked meat provenances by multiple fluorescence quantitative PCR. *China Food Safety Magazine*, 2021(21): 83–87 [雷庆, 赵中开. 多重荧光定量 PCR 法同时定量检测 4 种混合熟肉种源. *食品安全导刊*, 2021(21): 83–87]
- LI C P, ZHAI Q Q, WANG X, *et al.* Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from shrimp culture ponds and analysis of its drug resistance and virulence genes. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(6): 174–180 [李翠苹, 翟倩倩, 王想, 等. 对虾养殖池副溶血弧菌的分离鉴定及其耐药特征、毒力基因分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 174–180]
- LIN Z, KUMAGAI K, BABA K, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *Journal of Bacteriology* 1993, 175(12): 3844–3855
- LIU X L, HOU C Z, LAI Y K, *et al.* Metabolic responses of Manila clam *Ruditapes philippinarum* to *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* challenges. *Fisheries Science*, 2017, 36(2): 143–147 [刘小莉, 侯承宗, 来涌凯, 等. 两种弧菌对菲律宾蛤仔代谢途径影响的比较研究. *水产科学*, 2017, 36(2): 143–147]
- LIU Z C. Development of multiplex PCR and real-time PCR for the detection of 4 bacterial pathogens in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 [刘智超. 养殖大菱鲆 4 种致病细菌多重 PCR 和荧光定量 PCR 检测方法的建立. 中国海洋大学硕士学位论文, 2012]
- MANZ A, GRABER N, WIDMER H M. Miniaturized total

- chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1990, 1(1/2/3/4/5/6): 244–248
- MEI B, ZHOU Y C, XU X D, *et al.* Isolation and identification of bacteria pathogens from *Epinephelus coioides* with tail-rotted disease. *Journal of Tropical Oceanography*, 2010, 29(6): 118–124
- PARIA P, BEHERA B K, MOHAPATRA P D, *et al.* Virulence factor genes and comparative pathogenicity study of *tdh*, *trh* and *tlh* positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from Whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in India. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2021, 95: 105083
- QI L J, CHEN Y D, SHI K P, *et al.* Combining of transcriptomic and proteomic data to mine immune-related genes and proteins in the liver of *Cynoglossus semilaevis* challenged with *Vibrio anguillarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2021, 39: 100846
- RIVAS A J, LEMOS M L, OSORIO C R. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 283
- WANG K C, SUN R N, JIANG N, *et al.* Application of microfluidic chip technology in microbial detection. *China Animal Health Inspection*, 2021, 38(1): 87–93 [王楷晟, 孙瑞妮, 姜楠, 等. 微流控芯片技术在微生物检测中的应用. *中国动物检疫*, 2021, 38(1): 87–93]
- WANG K K, YANG K, ZHAO J, *et al.* Rapid detection of hepatitis B virus nucleic acid based on microfluidic chip using fluorescence quantitative PCR. *Journal of Analytical Science*, 2018, 34(4): 450–454 [王可可, 杨柯, 赵俊, 等. 基于微流控芯片的荧光定量 PCR 法快速检测乙肝病毒核酸. *分析科学学报*, 2018, 34(4): 450–454]
- WU S, WU Z Y, ZHANG X F, *et al.* Comparison on sensitivities of PCR, real-time PCR and microfluidic chip for detection of foreign gene in soybean products. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2009, 9(2): 176–186 [吴姗, 吴志毅, 张晓峰, 等. 普通 PCR 法、荧光定量 PCR 法及微流控芯片法检测大豆产品中外源基因灵敏度的比较. *中国食品学报*, 2009, 9(2): 176–186]
- YU D Y, LI A Q, LIU Y, *et al.* Development and evaluation of the detection method of microfluidic real-time RT-PCR assays for Zika, Dengue, Yellow fever and Chikungunya viruses. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2020(2): 186–190 [余东阳, 李阿茜, 刘洋, 等. 寨卡病毒、登革病毒、黄热病毒、基孔肯雅病毒微流控荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及评价. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2020(2): 186–190]
- YU J H, CHEN J X, LI Y, *et al.* Detection of *Vibrio anguillarum* from *Lateolabrax japonicus* by using polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Oceanography of Huanghai and Bohai Seas*, 2002, 20(2): 60–64 [余俊红, 陈吉祥, 厉云, 等. 聚合酶链反应(PCR)检测花鲈鳃弧菌感染. *黄渤海海洋*, 2002, 20(2): 60–64]
- ZHANG F, SU Y Q, WANG J, *et al.* Studies on the isolation, identification and virulence of *Photobacterium damsela* isolated from *Pseudosciaena crocea*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(6): 1202–1208 [张飞, 苏永全, 王军, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)源美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)的分离鉴定及致病性研究. *海洋与湖沼*, 2012, 43(6): 1202–1208]
- ZHANG R N, YU L, WANG Z, *et al.* Application of multiple fluorescence quantitative PCR in animal detection. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020, 41(4): 75–78 [张若楠, 于雷, 王钊, 等. 多重荧光定量 PCR 在动物检测中的应用. *山东畜牧兽医*, 2020, 41(4): 75–78]
- ZHANG X H, AUSTIN B. Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(5): 1011–1019
- ZHANG Z, YU Y X, CHEN J, *et al.* Development of a microfluidics-based quantitative real-time PCR to rapidly identify *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* with different pathogenicity by detecting the presence of *Mcp* or *Dly* gene. *Journal of Ocean University of China*, 2021, 20(2): 445–453
- ZHENG G X, SHEN Y L, LI H. *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in *Penaeus orientalis* Kishinouye. *Journal of Fisheries of China*, 1990, 14(1): 1–7 [郑国兴, 沈亚林, 李何. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究. *水产学报*, 1990, 14(1): 1–7]
- ZHU J Y, DONG X H, ZHANG W Y, *et al.* Application of microfluidic technology in food safety rapid detection. *Chemical Reagents*, 2021, 43(5): 632–639 [朱婧昕, 董旭华, 张维宜, 等. 微流控技术在食品安全快速检测中的应用. *化学试剂*, 2021, 43(5): 632–639]

(编辑 马瑾艳)

Establishment of Multiple Microfluidic Fluorescence Quantitative PCR Detection Technology for Five Main Mariculture Bacterial Pathogens

XU Yuanyuan^{1,2}, YU Yongxiang², WANG Yingeng^{2,3}, WANG Chunyuan²,
LI Yongjie², LIU Dingyuan^{1,2}, QIN Lei¹, ZHANG Zheng^{2,3}①

(1. Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academic of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China)

Abstract *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio anguillarum*, and *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* are important pathogenic bacteria frequently reported in mariculture animal diseases in recent years. These pathogens exhibit strong pathogenicity, wide epidemic area, and high mortality rates, which usually cause serious economic losses in aquaculture. Strengthening the research on rapid detection technology of these pathogens can help to effectively prevent and control their transmission and infection, and reduce economic losses of the aquaculture industry. Therefore, rapid detection of multiple pathogens in this field can promote the disease control technology development of the aquaculture industry. In this study, the *vhhA* gene of *V. harveyi*, *toxR* gene of *V. parahaemolyticus*, *luxR* gene of *V. scophthalmi*, *empA* gene of *V. anguillarum*, and *Mcp* gene of *P. damsela* subsp. *damsela* were selected as the target genes. Specific primers were designed using Primer Premier 5.0 software. *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. scophthalmi*, *V. anguillarum*, and *P. damsela* subsp. *damsela* were used as the target bacteria, *V. campbellii* and 10 other bacterial species were used as the control group, and sterile water was used as the blank control. The specificity of the primers was verified by the laboratorial conventional real-time quantitative PCR. Thereafter, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. scophthalmi*, *V. anguillarum*, and *P. damsela* subsp. *damsela* were amplified using the UF-150 microfluidic fluorescence quantitative PCR instrument to verify the feasibility and specificity of the designed primers on microfluidic fluorescence quantitative PCR. The PCR products were digested and recycled, then ligated to PMD-19T vector and transformed into DH-5 α competent cells to construct the standard reference material. The extracted plasmid DNA was used as a template for fluorescence quantitative PCR amplification after 10-fold gradient dilution, and a standard curve was drawn. The DNA of *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. scophthalmi*, *V. anguillarum*, and *P. damsela* subsp. *damsela* were used to optimize the annealing temperatures for single microfluidics quantitative PCR. The annealing temperatures were set at 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, and 63 °C, respectively, and the optimal common annealing temperatures of the five strains were finally screened. Meanwhile, the number of reaction cycles was set at 25, 30, 35 and 40, respectively, to verify the optimal number of reaction cycles. The designed specific primers of *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. scophthalmi*, *V. anguillarum*, and *P. damsela* subsp. *damsela* were integrated into the microfluidic chip; multiple microfluidic fluorescence quantitative PCR was performed on the integrated chip with the DNA template of the five strains to verify the cross-reaction between the primers. Based on the reaction systems and conditions of single detection methods, the reaction systems and conditions of multiple microfluidic fluorescence quantitative PCR were optimized, and the microfluidic chip was integrated to establish a multiple

① Corresponding author: ZHANG Zheng, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

microfluidic fluorescence quantitative PCR detection technology that could simultaneously detect these five pathogens: *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. scophthalmi*, *V. anguillarum* and *P. damsela* subsp. *damsela*. *Scophthalmus maximus*, *Litopenaeus vannamei*, and *Apostichopus japonicus* were selected as the experimental organisms. The five pathogens were mixed with the tissues of *S. maximus* (muscle, gill and liver), *L. vannamei* (muscle and gill), and *A. japonicus* (respiratory tree and intestine). The established multiple microfluidic fluorescence quantitative PCR method was used to detect these tissues which contained the five pathogens, and the conventional real-time fluorescence quantitative PCR was performed for comparison. The results showed that the optimal reaction system of the established detection method was as follows: 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μL, primer F/R 1 μL, DNA template 2 μL, and ddH₂O 1 μL. The reaction conditions were as follows: 95 °C for 30 s, 95 °C for 5 s, 61 °C for 30 s, and 30 cycles of amplification. The standard curves of *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. scophthalmi*, *V. anguillarum*, and *P. damsela* subsp. *damsela* showed good linearity in the range of 10⁴–10⁹ copies/μL. The linear equations were as follows: $y = -2.972x + 6.73$, $R^2 = 0.999$; $y = -3.287x + 7.48$, $R^2 = 0.998$; $y = -3.549x + 8.14$, $R^2 = 0.998$; $y = -3.912x + 7.83$, $R^2 = 0.999$; $y = -3.969x + 7.07$, $R^2 = 0.992$, respectively. The method showed strong specificity and high sensitivity to *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. scophthalmi*, *V. anguillarum*, and *P. damsela* subsp. *damsela*, and the minimum detection limits for these bacteria were 40, 200, 200, 500 and 20 CFU/mL, respectively. The established multiplex microfluidic fluorescence quantitative PCR method was used to detect these pathogens in animal samples and compare the results to those of conventional fluorescence quantitative PCR. The results showed that the accuracy of the established multi-microfluidic fluorescence quantitative PCR method was higher than 96.2% of the conventional real-time fluorescence quantitative PCR method. The average detection time of the samples was only 26 min, which was significantly shorter than that of the conventional real-time fluorescence quantitative PCR reaction time of 1 h 40 min. The multiplex microfluidic fluorescence quantitative PCR method established in this study for the detection of five kinds of mariculture pathogens has strong specificity, high sensitivity, low environmental condition requirements, outstanding portability, and detection accuracy (same as that of conventional real-time fluorescence quantitative PCR), which is suitable for the development of rapid detection technology for aquatic pathogens.

Key words *Vibrio harveyi*; *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio scophthalmi*; *Vibrio anguillarum*; *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; Microfluidic fluorescence quantitative PCR; On-site rapid detection