

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18004

哈维氏弧菌 RT-LAMP 检测方法建立与应用

涂志刚^{1,2}, 杨海朋³, 崔婧¹, 严耿杰¹, 李丹萍¹, 周永灿², 邱名毅¹

1. 海南省海洋与渔业科学院, 海南 海口 571126;

2. 海南大学海洋学院, 海南 海口 570228;

3. 广州迪澳科技有限公司, 广东 广州 510663

摘要: 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是引起海南省后水湾深水网箱养殖卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)“烂身病”的主要病原菌。为了能够快速诊断该病原菌, 急需建立一种耗时短、准确以及便捷的检测方法。本研究利用分离到的致病菌株 QT520 的 ToxR 基因序列设计特异性引物和加入 SYTO-9 特异荧光染料, 建立了一种可以实时、快速检测哈维氏弧菌的 LAMP 法(RT-LAMP)。该方法对哈维氏弧菌的基因组 DNA 及菌液灵敏度分别为 100 fg/ μ L 和 10^3 cfu/mL, 与 Real-time PCR 法检测灵敏度相当, 比普通 PCR 的检测灵敏度要分别高 1000 倍和 10 倍, 能有效区分哈维氏弧菌与坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*); 可以实时观察检测结果, 且检测时间只需要 40 min; 具有耗时短、特异性和灵敏度高、仪器便携、操作简单且能实时观察检测结果等优点, 非常适合在生产现场进行哈维氏弧菌的检测。

关键词: RT-LAMP; 哈维氏弧菌; 卵形鲳鲹; 烂身病; 快速检测

中图分类号: S947

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)06-1325-10

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)为水产养殖中常见的条件性致病菌, 可以感染鲢(*Centropomus undecimalis*)^[1]、居氏鲷(*Acanthopagrus cuvieri*)^[2]、高体鲷(*Seriola dumerili*)^[3]、金头鲷(*Sparus aurata*)、鲈(*Dicentrarchus labrax*)以及塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)^[4-5]、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[6-9]以及大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[10]等多种海水养殖鱼类, 对水产养殖危害较大。

2016 年通过对海南后水湾深水网箱养殖卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)“烂身病”研究发现, 哈维氏弧菌也是引发该病的主要病原, 每年因该病暴发对海南省养殖业造成上亿元的损失^[11]。然而在养殖生产过程中如何快速诊断该病原菌还存在一定的困难, 虽然有时可通过外观症状进行初步判断, 但在海水养殖鱼类疾病中, 包括溶藻弧菌(*V.*

alginoliticus)和创伤弧菌(*V. vulnificus*)等病原均可引起养殖动物体表溃烂等“烂身”症状, 因此仅凭外观症状无法准确确定病原种类。另外, 为了有效控制疾病的传播与危害, 往往需要在疾病发生早期典型症状尚未出现时就要快速准确诊断出病原, 以便尽早采取针对性的防控措施。因此, 迫切需要建立简单、快速、准确的病原检测技术。

目前, 对养殖鱼类细菌病原的检测方法很多, 但是各有优缺点。其中, 传统的病原分离和生理生化鉴定方法虽然操作简单, 但是耗时较长, 而且检测结果准确度不高, 对一些近似菌种也难以区分; 免疫诊断技术需要制作抗体, 成本高, 灵敏度低; 而 16S rRNA 基因的序列分析只能鉴定到科属水平^[12-13]。就哈维氏弧菌检测而言, 虽然多位点序列分析以及基因组测序法能有效区分哈

收稿日期: 2018-01-05; 修订日期: 2018-05-28.

基金项目: 2016 年海南省重大科技计划项目(ZDKJ2016011); 现代农业产业技术体系专项(CARS-47); 2016 年海南省科研院所技术开发专项“海南深水网箱养殖鱼类细菌性病害诊断、病原分析及其综合防治研究”; 2017 年海洋与渔业技术应用推广“水产养殖病害测报与预报”。

作者简介: 涂志刚(1982-), 男, 高级工程师, 博士, 从事水产养殖病害检疫与防治. E-mail: 105639460@qq.com

通信作者: 邱名毅, 男, 高级工程师, 从事渔业技术推广. E-mail: 1832901596@qq.com

维氏弧菌与其他近缘弧菌,但操作步骤烦琐,且测序分析费昂贵,对仪器设备要求也较高,只能适用于科研和专门检测机构,在生产一线难以推广应用^[14-15]。近年来,针对哈维氏弧菌特异性基因的鉴定和筛选成为研究热点,并建立了多种快速检测方法,包括多重 PCR 法、LAMP 法等^[16-19],不过,前者需要 PCR 仪和凝胶电泳仪等较昂贵的检测仪器;后者采用浊度计检测或显色法对扩增结果进行检测,存在灵敏度低和假阳性率高等问题。因此,进一步研究开发简单、快速、准确的哈维氏弧菌检测技术已十分必要。

本研究将根据 LAMP 技术原理,以哈维氏弧菌菌株 QT520 的基因序列设计特异性引物和加入特异荧光染料,在已有相关研究方法基础上进行改良^[16, 18],旨在为生产一线提供一种简单、快速、准确的哈维氏弧菌检测方法—哈维氏弧菌实时荧光环介导等温扩增(Real-time loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)技术。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

大菱鲆弧菌(*V. scophtalmi*)、副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus* ATCC 33847)、哈维氏弧菌(*V. harveyi* CCTCC AB2010414)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、霍乱弧菌(*V. cholerae* CCTCC AB2010414)、拟态弧菌(*V. mimicus* ATCC 33653)、创伤弧菌(*V. vulnificus* ATCC 27562)和坎氏弧菌(*V. campbellii* ATCC 33863)均来自中国科学院南海海洋研究所;沙门氏菌(*Salmonella* sp.)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、副溶血性弧菌(*V. Parahemolyticus*)和创伤弧菌(*V. vulnificus*)购自广州迪澳生物科技有限公司;哈维氏弧菌 LG353 和哈维氏弧菌 QT520 由海南大学和海南省海洋与渔业科学院分离自患病卵形鲳鲹并-80℃保存(表 1)。所有以上菌株都进行了 16S rRNA 鉴定^[20]。

表 1 实验菌株信息
Tab. 1 Experimental strain information

细菌种类 species	菌株名称 name	菌种保藏号 ID	来源 source
大菱鲆弧菌 <i>Vibrio scophtalmi</i>	E352	—	中科院南海所 South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences
副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	E379	ATCC 33847	中科院南海所 South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	E385	CCTCC AB2010414	中科院南海所 South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	E001	—	中科院南海所 South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences
霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	HN375	CCTCC AB2010414	中科院南海所 South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences
拟态弧菌 <i>Vibrio mimicus</i>	1.1969	ATCC 33653	中科院南海所 South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences
创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i>	1.1758	ATCC 27562	中科院南海所 South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences
坎氏弧菌 <i>Vibrio campbellii</i>	1.1596	ATCC 33863	中科院南海所 South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences
沙门氏菌 <i>Salmonella</i> sp.	D011	—	广州迪澳公司 Guang Zhou Deaou Biotechnology Co., Ltd
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	D009	—	广州迪澳公司 Guang Zhou Deaou Biotechnology Co., Ltd
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	D013	—	广州迪澳公司 Guang Zhou Deaou Biotechnology Co., Ltd
单增李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	D017	—	广州迪澳公司 Guang Zhou Deaou Biotechnology Co., Ltd
副溶血性弧菌 <i>Vibrio Parahemolyticus</i>	VPL4-90	—	广州迪澳公司 Guang Zhou Deaou Biotechnology Co., Ltd
创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i>	D005	—	广州迪澳公司 Guang Zhou Deaou Biotechnology Co., Ltd
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	QT520	—	海南省海洋与渔业科学院 Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	LG353	—	海南省海洋与渔业科学院 Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences

1.2 实验试剂

Bst DNA 聚合酶大片段(New England Bio-labs 公司); 甜菜碱(Betaine)、(NH₄)₂SO₄、Tris-HCl、KCl、MgSO₄ 和 Tween-20 (Sigma 公司); Taq DNA 聚合酶和 dNTPs(宝生物工程(大连)有限公司); SYTO-9 荧光染料(Life Technologies 公司); 正向外引物 F3、正向内引物 FIP、反向内引物 BIP 和反向外引物 B3(生工生物工程(上海)有限公司); 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(广州迪澳生物科技有限公司); 普通 PCR 试剂盒(Takara); SuperReal 荧光定量预混试剂盒(天根)。

1.3 实验仪器与设备

-80℃ 冻存柜, DAYA-024 (Thermo Fisher Scientific, 美国); 高速台式离心机, PICO17(Thermo Fisher Scientific, 美国); 漩涡混合器, MS2 (IKA, 德国); 微量移液(Eppendorf, 德国); 分析天平, AL104(梅特勒-托利多仪器有限公司, 瑞士); 超净工作台, SW-CJ-1FD(苏州安泰空气技术有限公司, 江苏); 实时荧光 PCR 仪(ABI, 美国); 微量紫外分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 细菌培养和基因组 DNA 的制备 选用的弧菌划线接种于 TCBS 固体培养基, 30℃ 培养 12~16 h 后, 挑取单菌落于 2216E 培养基中震荡培养至所需浓度; 沙门氏菌、铜绿假单胞菌、单增李斯特、金黄色葡萄球菌划线接种于 BHI 固体培养基, 30℃ 或者 37℃ 培养后, 挑取单菌落于 BHI 液体培养基中震荡培养至所需浓度。细菌基因组的提取选用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒, 操作步骤参考说明书。

1.4.2 引物的设计 以哈维氏弧菌 QT520 ToxR (跨膜转录激活蛋白)基因一段特异 DNA 序列 (GenBank: CP018680.2 Range 1: 3543839 to 3544714) 作为哈维氏弧菌的特异靶标序列^[21], 使用软件 LAMP DESIGNER (<http://www.optigene.co.uk/wp-content/uploads/2012/11/LAMP-Designer-flyer.pdf>) 设计 TOX-1、TOX-2、TOX-3 和 TOX-4 共 4 套特异性引物(表 2)。每套引物主要包括两个外引物和两个内引物, 特异结合靶序列上的 6 个特异区域。内引物 FIP 包含 F1c(与 F1 区域互补)和 F2 序列, 内引物 BIP 包含 B1c(与 B1 区域互补)和 B2 序列, 外引物为 F3 和 B3 序列(图 1)^[22-23]。

表 2 引物序列
Tab. 2 Primer sequence

组名 group	引物名称 name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
TOX-1	F3-1	GAAGTCGCCTGAATTTGTAAA
	B3-1	GCCAACAGGAAGTAGCAG
	FIP-1	GCTCTAAGTCAACGACTGGAGCTTCTGAAGCAGCACTCAC
	BIP-1	GAGCCCACTGCTGAGACAAATTAATGGTTGAGCTGTCCG
TOX-2	F3-2	CGCGTTACCAACTGATT
	B3-2	GTTGGTTAGCATTAACACGC
	FIP-2	GTCTCAGCAGTGGGCTCTGCCGATGTTGATGCTCAAGA
	BIP-2	AAGCAGAAACAGCCGTCGAATTGTGCAGGTGCAGATT
TOX-3	F3-3	CTACGAAGTCGCCTGAATT
	B3-3	GCCAACAGGAAGTAGCAG
	FIP-3	GCTCTAAGTCAACGACTGGAGCCACTATCTTCTGAAGCAGCA
	BIP-3	GAGCCCACTGCTGAGACAAATTAATGGTTGAGCTGTCCG
TOX-4	F3-4	CCGATGTTGATGCTCAAGA
	B3-4	CACTGGCACGTTGTGATAT
	FIP-4	TGGTTGAGCTGTGCGTGCGACTTAGAGCAATTCGCAGA
	BIP-4	GCACCTGCACAAAAGAACACAAGCCAACAGGAAGTAGCAG

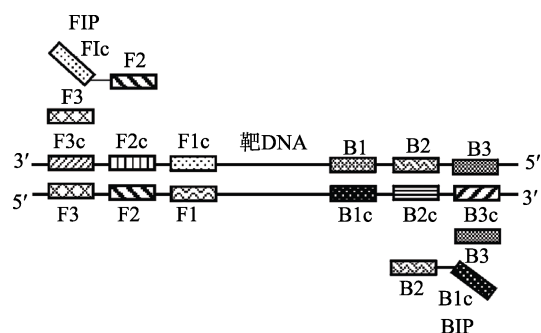


图1 引物组成及对应区域

Fig. 1 Primer composition and corresponding regions

1.4.3 RT-LAMP 反应体系的建立 根据文献[16, 18]略做修改, 确定 25 μL 的反应体系, 其成分包括: 内引物 FIP 和 BIP 各 1.6 $\mu\text{mol/L}$, 外引物 F3 和 B3 各 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L MgSO_4 , 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% Tween-20, 1 mol/L 甜菜碱, 6 mmol/L MgSO_4 , 1.6 mmol/L dNTP, 8 U Bst 大片 DNA 聚合酶, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ SYTO-9。

1.4.4 筛选引物实验 以哈维氏弧菌标准菌株 E385 的 DNA 为模板, 用设计的 4 套引物在 API7500 仪器上进行实时荧光扩增反应, 反应条件为 63 $^{\circ}\text{C}$, 60 min 和 70 min, 以便筛选出无引物自身扩增、出峰时间早、扩增曲线标准的最佳引物。

1.4.5 特异性实验 以各菌株的 DNA 作为特异性反应模板, 用引物 TOX-4 进行 RT-LAMP 反应, 63 $^{\circ}\text{C}$ 运行 60 min, 验证反应的特异性, 利用实时荧光仪 ABI 7500 观察反应结果。

1.4.6 灵敏度实验 将提取的 DNA 用 Tris-HCL (pH 8.0) 进行 10 倍梯度的稀释, 分别为 10 ng/ μL 、1 ng/L、100 pg/ μL 、10 pg/ μL 、1 pg/ μL 、100 fg/ μL 、10 fg/ μL 和 1 fg/ μL , 作为 DNA 灵敏度检测实验的模板。同时, 将过夜培养的哈维氏弧菌 QT520 菌液(浓度为 0.8×10^9 cfu/mL)用无菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释, 分别为 10 cfu/mL、 10^2 cfu/mL、 10^3 cfu/mL、 10^4 cfu/mL 和 10^5 cfu/mL, 作为菌液灵敏度检测实验的模板。

哈维氏弧菌 DNA 灵敏度

以各梯度的 DNA 作为模板, TOX-4 为引物, 按照优化的反应体系进行 RT-LAMP 反应, 每个梯度 2 次重复。反应程序: 63 $^{\circ}\text{C}$ 20 s; 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 个循环。

以各梯度的 DNA 作为模板, 选用 F3-4/B3-4 为引物, 进行普通 PCR 反应, 每个梯度 2 次重复。反应体系为 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL ; Taq 聚合酶 (5 U/ μL) 0.25 μL ; dNTP(各 2.5 mmol/L) 2 μL ; 引物 F3-4(10 $\mu\text{mol/L}$)和引物 B3-4(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2.5 μL ; 超纯水 13.25 μL ; DNA 模板 2 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。反应产物利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 (100 V, 40 min)。

同时, 以各梯度的 DNA 作为模板, 以引物 ToxR F1: CCACTGCTGAGACAAAAGCA, ToxR R1: GTGATTCTGCAGGGTTGGTT, ToxR P1: CAGCCGTCGAACAAGCACCG^[24], 进行 Real-time PCR 反应, 每个梯度 2 次重复。反应体系为 2 $\times$ SuperRealPreMix(Probe) 12.5 μL ; 引物 ToxR F1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL ; 引物 ToxR R1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL ; ToxR P1 0.4 μL ; 超纯水 8.5 μL 以及 DNA 模板 2 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 40 个循环。

哈维氏弧菌菌液灵敏度

以各梯度的菌液的 DNA 为模板, TOX-4 为引物, 进行 RT-LAMP 反应, 每个梯度 2 次重复。

同时, 以各梯度菌液的 DNA 作为模板, 选用 F3-4/B3-4 为引物, 进行普通 PCR 反应, 每个梯度 2 次重复。

以各梯度菌液的 DNA 为模板, 以 ToxR F1、ToxR R1 和 ToxR P1 为引物, 进行 RT-PCR 反应, 每个梯度 2 次重复。

1.5 实际样品检测

将 22 个取自卵形鲳鲹鱼类组织及 24 个分离出的菌株(具体信息见表 3)进行哈维氏弧菌 RT-LAMP 检测。使用 DNA 提取试剂盒提取实际样品的基因组 DNA, 以提取的 DNA 为模板, 用引物 TOX-4 进行 RT-LAMP 反应。

2 结果与分析

2.1 筛选引物实验

4 套引物均能扩增出相应产物, 但是产物出现的时间和曲线规则程度有差异。由图 2 可知, 在

荧光仪 ABI7500 上 63℃ 反应 60 min 后, 4 套引物都没有出现引物自结合的非特异性扩增, 且引物组 TOX-4 出峰时间最早、扩增效率最高; 由图 3 可知, 在 Deaou-308C 上 63℃ 运行反应 70 min 后, 4 套引物也都没有出现引物自结合的非特异扩增, 且引物组 TOX-4 不仅出峰时间最早、扩增效率最高, 且扩增曲线最规则。因此, 引物组 TOX-4 为设计的四套引物中的最佳引物, 后续分析均选用该引物组。

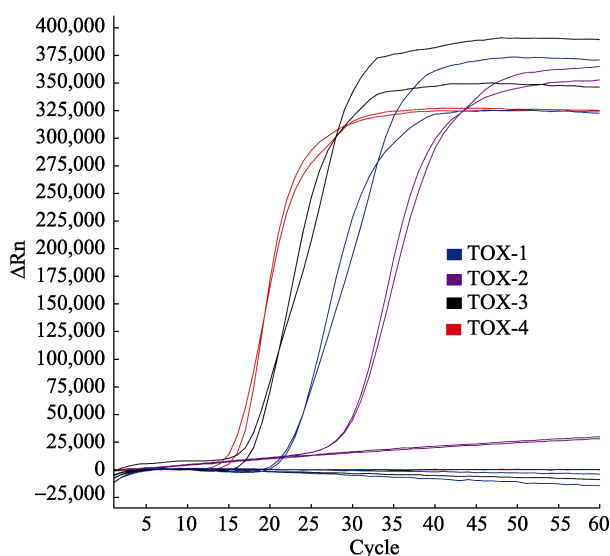


图 2 以哈维氏弧菌 E385 DNA 为模板利用不同引物 RT-LAMP 法扩增结果(ABI 7500)

Fig. 2 The results of RT-LAMP using different primers and DNA from *Vibrio harveyi* E385 as the template in ABI 7500

2.2 特异性实验

哈维氏弧菌株 E385、LG353 和 QT520 菌均出现比较规则的扩增曲线, 而坎氏弧菌 1.1596 菌株以及其他弧菌或细菌均没有扩增反应。由此可见, 以引物组 TOX-4 为引物对哈维氏弧菌的扩增特异性良好, 且能够区分哈维氏弧菌与坎氏弧菌等其他弧菌。

2.3 灵敏度实验

2.3.1 哈维氏弧菌 DNA 灵敏度检测 以 10 ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL 和 100 fg/μL 的 DNA 为模板的扩增反应均有出现标准 S 形曲线, 而以 10 fg/μL 和 1 fg/μL 的 DNA 为模板的扩增反应均没有扩增反应(图 4A); 普通 PCR 反应检出限为 100 pg/μL (图 4B); RT-PCR 方法对哈维氏弧菌

的 DNA 检测的灵敏度为 100 fg/μL, 当浓度为 10 fg/μL 时检测结果为弱阳性(图 4C)。由此可见, 以 Tox-4 为引物的 RT-LAMP 法对哈维氏弧菌 DNA 的检测灵敏度与 RT-PCR 法相当, 要比普通 PCR 高 1000 倍。

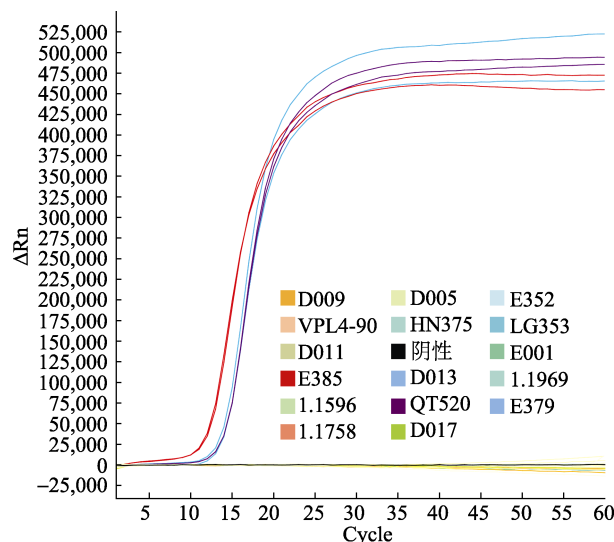


图 3 以 16 株弧菌 DNA 为模板检测哈维氏弧菌 RT-LAMP 法的特异性检测

Fig. 3 The specificity of RT-LAMP was tested using DNA templates extracted from 16 strains of *Vibrio* sp.

2.3.2 哈维氏弧菌菌液灵敏度 RT-LAMP 法对菌液 DNA 检测的灵敏度可达 10^3 cfu/mL, 当浓度为 10^2 cfu/mL 时, 2 个重复有一个检出(图 5A); 普通 PCR 反应检测的灵敏度为 10^4 cfu/mL(图 5B); RT-PCR 反应检测的灵敏度为 10^3 cfu/mL(图 5C)。由此可见, 对于哈维氏弧菌菌液, RT-LAMP 法的检出限为 10^3 cfu/mL, 其灵敏度与 RT-PCR 法相当, 要比普通 PCR 高 10 倍。

2.4 样品检测

对 2016 年 8—10 月采集到的 22 份卵形鲳鲅组织样品及 24 份菌株样品进行哈维氏弧菌 RT-LAMP 检测, 结果如表 3 所示, 共检测到 25 份阳性样品, 其中阳性组织样品 17 份, 阳性菌液 8 份, 与 16S rDNA 测序鉴定结果一致^[11] (华大基因公司, 深圳)。

3 讨论

哈维氏弧菌是引起深水网箱养殖卵形鲳鲅

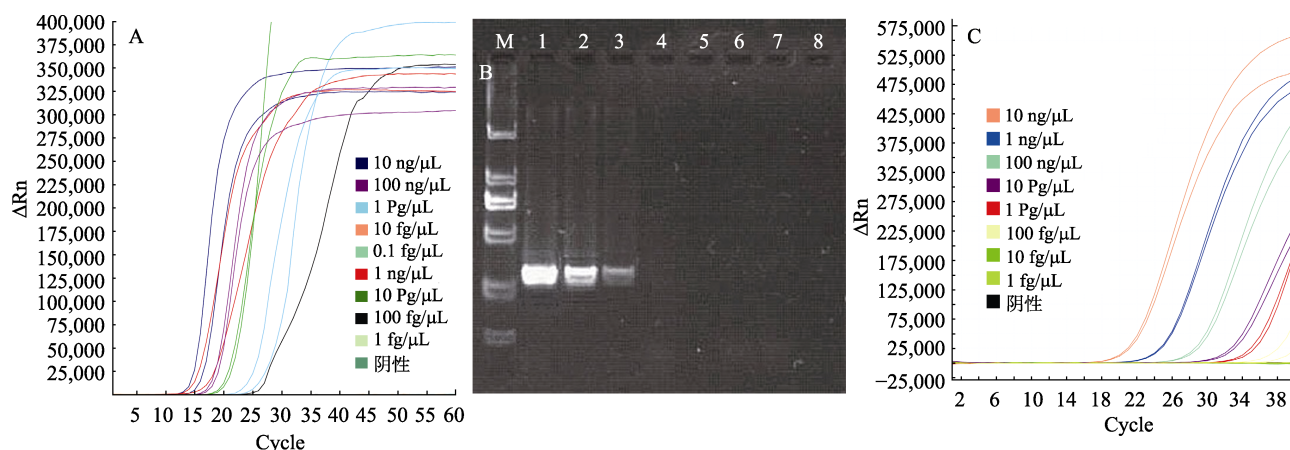


图 4 以 10 倍梯度稀释的哈维氏弧菌 QT520 DNA 为模板 RT-LAMP(A)、普通 PCR 法(B)以及 RT-PCR 法(C)的检测灵敏度

M: DL2000 Marker; 1: 10 ng/μL; 2: 1 ng/μL; 3: 100 pg/μL; 4: 10 pg/μL; 5: 1 pg/μL; 6: 100 fg/μL; 7: 10 fg/μL; 8: 1 fg/μL

Fig. 4 Sensitivity test for RT-LAMP(A), general PCR(B) and RT-PCR(C) using the 10-fold series dilutions of DNA templates from *Vibrio harveyi* QT520

M: DL2000 Marker; 1: 10 ng/μL; 2: 1 ng/μL; 3: 100 pg/μL; 4: 10 pg/μL; 5: 1 pg/μL; 6: 100 fg/μL; 7: 10 fg/μL; 8: 1 fg/μL

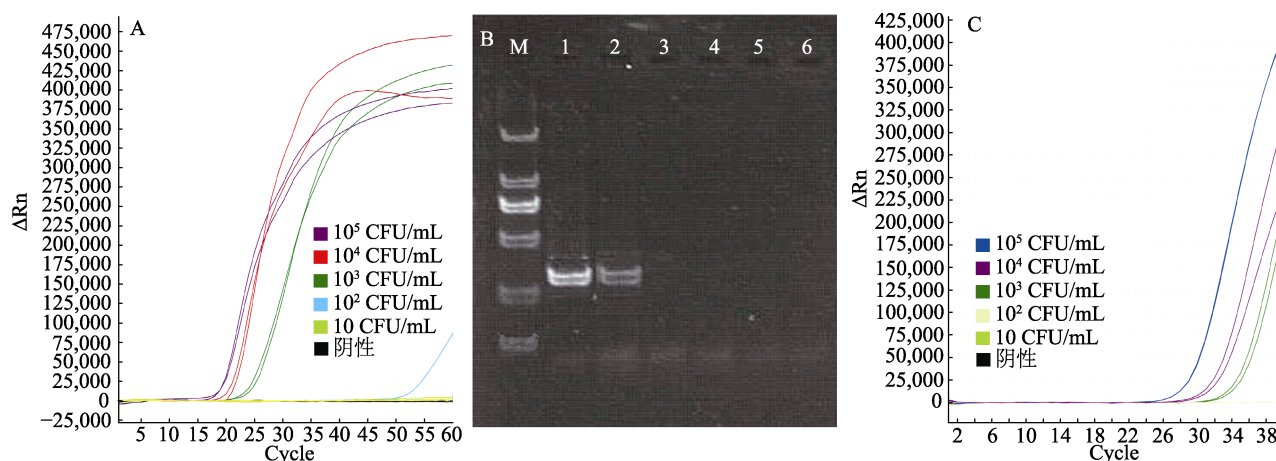


图 5 以 10 倍梯度稀释的哈维氏弧菌菌液 DNA 为模板 RT-LAMP(A)、普通 PCR 法(B)以及 RT-PCR 法(C)灵敏度检测

M: DL2000 Marker, 1: 10^5 cfu/mL, 2: 10^4 cfu/mL, 3: 10^3 cfu/mL, 4: 10^2 cfu/mL, 5: 10 cfu/mL, 6: 阴性对照。

Fig. 5 Sensitivity test for RT-LAMP(A), general PCR(B) and RT-PCR(C) using the 10-fold series dilutions of DNA templates from *Vibrio harveyi* QT520.

M: DL2000 Marker, 1: 10^5 cfu/MI, 2: 10^4 cfu/mL, 3: 10^3 CFU/mL, 4: 10^2 cfu/mL, 5: 10^1 cfu/mL, 6: negative control

“烂身病”的主要病原菌，为了能够在发病早期及时检测出该病原菌，以减少疾病暴发造成的损失，急需建立一种快速的、准确的检测方法。

LAMP 技术是一种新的恒温扩增方法，自 2000 年首次报道以来，已经在核酸研究、疾病诊断、性别鉴定、转基因及病原检测等领域广泛应用^[25]。近年在水产养殖领域应用发展较快，2004 年 LAMP 技术首次被应用于牙鲆病原菌爱德华氏菌的检测^[26]，此后鱼诺卡氏菌(*Nocard iaseriolae*)、柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、溶藻弧菌等病原菌的

LAMP 法检测相继报道^[27-30]。

Imai 等^[31]认为环介导等温扩增技术具有比 PCR 更加高的灵敏度；Cao 等^[16]提出检测哈维氏弧菌的 LAMP 法，根据 ToxR 基因设计了 4 条引物，以 SYBR Green I 为荧光染料，通过显色法对样品哈维氏弧菌进行检测，灵敏度为 17.2 cfu/reaction，比普通 PCR 高 10 倍，其缺点在于荧光染料 SYBR Green I 会一定程度抑制 LAMP 反应的进行，不能提前直接加入反应体系，需要等反映后开盖加入荧光染料，容易造成扩增产物污染，出现假阳性。LAMP 法和试纸条法结合起来，以

表 3 RT-LAMP 检测与 16S rDNA 测序对不同样品中哈维氏弧菌的检测结果比较
Tab. 3 Comparison of the test results of *Vibrio harveyi* in different samples using the RT-LAMP and 16S rDNA sequencing methods

样品编号 sample number	采集地 place collect	采集日期 collect date	样品类型 sample type	来源 sources	TCBs 上菌 落颜色 colony color in TCBs	16S rDNA 检 测结果 16S rDNA test results	RT-LAMP 检测结果 RT-LAMP test results
DLG08M1	临高 Lingao	2016.8.3	肌肉 muscle	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
DLG08M2	临高 Lingao	2016.8.3	肌肉 muscle	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄绿色 yellow green	+	+
HLG08M	临高 Lingao	2016.8.3	肌肉 muscle	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	无	—	—
DHW08M	昌江 Changjiang	2016.8.3	肌肉 muscle	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
DLG08GZ	临高 Lingao	2016.8.3	肝 liver	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
HHW08GZ	昌江 Changjiang	2016.8.3	肝 liver	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
QT08GZ	澄迈 Chenmai	2016.8.3	肝 liver	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	—	—
QT08M	澄迈 Chemai	2016.8.3	肌肉 muscle	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	—	—
LG09M	临高 Lingao	2016.9.19	肌肉 muscle	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
DLG09GZ	临高 Lingao	2016.9.19	肝 liver	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	绿色 green	—	—
DLG09GZ	临高 Lingao	2016.9.19	肝 liver	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
DLG09BZ	临高 Lingao	2016.9.19	体表溃疡 体表溃疡	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	绿色 green	+	+
HHWGZ09	昌江 Changjiang	2016.9.18	肝 liver	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄绿色 yellow green	+	+
HHWM09	昌江 Changjiang	2016.9.18	肌肉 muscle	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄绿色 yellow green	+	+
DQT09BZ	澄迈 Chemai	2016.9.20	体表溃疡 surface ulcers	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
DQT09M	澄迈 Chemai	2016.9.20	肌肉 muscle	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
DQT09GZ	澄迈 Chemai	2016.9.20	肝 liver	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	绿色 green	—	—
HQT09GZ	澄迈 Chemai	2016.9.20	肝 liver	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
HLGGZ10	临高 Lingao	2016.10.17	肝 liver	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
dLGD10	临高 Lingao	2016.10.17	肠 gut	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
dLGM10	临高 Lingao	2016.10.17	肌肉 muscle	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
dLGGZ10	临高 Lingao	2016.10.17	肝 liver	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
HW08-5	昌江 Changjiang	2016.8.2	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	—
HW08-6	昌江 Changjiang	2016.8.2	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	+
HW08-8	昌江 Changjiang	2016.8.2	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	—
HW08-11	昌江 Changjiang	2016.8.2	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	+	+
HW08-12	昌江 Changjiang	2016.8.2	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	—
HW08-24	昌江 Changjiang	2016.8.2	菌液 bacteria solution	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	绿色 green	—	—
HW08-25	昌江 Changjiang	2016.8.2	菌液 bacteria solution	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	绿色 green	—	—
HW08-28	昌江 Changjiang	2016.8.2	菌液 bacteria solution	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
HW08-41	昌江 Changjiang	2016.8.2	菌液 bacteria solution	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+
HW091-1	昌江 Changjiang	2016.9.18	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	—
HW091-4	昌江 Changjiang	2016.9.18	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	—
HW091-6	昌江 Changjiang	2016.9.18	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	—
HW092-5	昌江 Changjiang	2016.9.18	菌液 bacteria solution	海水 seawater	绿色 green	—	—
HW093-1	昌江 Changjiang	2016.9.18	菌液 bacteria solution	海水 seawater	绿色 green	—	—
HW093-5	昌江 Changjiang	2016.9.18	菌液 bacteria solution	海水 seawater	绿色 green	—	—
HW094-3	昌江 Changjiang	2016.9.18	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	—
HW094-4	昌江 Changjiang	2016.9.18	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	—
HW094-6	昌江 Changjiang	2016.9.18	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	—
QT092	澄迈 Chenmai	2016.9.20	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄绿色 yellow green	+	+
QT094	澄迈 Chenmai	2016.9.20	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	+	+
QT097	澄迈 Chenmai	2016.9.20	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	—	—
QT0917	澄迈 Chenmai	2016.9.20	菌液 bacteria solution	海水 seawater	黄色 yellow	+	+
QT0923	澄迈 Chenmai	2016.9.20	菌液 bacteria solution	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	绿色 green	—	—
QT0924	澄迈 Chenmai	2016.9.20	菌液 bacteria solution	卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	黄色 yellow	+	+

溶血素基因序列设计引物, 可以将该方法的灵敏度提高到 2 cfu/reaction 和 0.6 cfu/reaction^[32-33]。

本研究建立的 RT-LAMP 法, 主要以分离到的病原菌 QT520 的 ToxR 基因序列设计引物, 灵敏度为 10^3 cfu/mL 或者 20 cfu/reaction, 与 Cao 等^[16]提出哈维氏弧菌的 LAMP 法相当。不过, 本研究建立的 RT-LAMP 法以 SYTO-9 为荧光染料, 可以不开盖实时监测到扩增结果, 消除了 LAMP 产物污染源, 克服了上述提到的假阳性问题。以 SYTO-9 为荧光染料的 RT-LAMP 法应用于对创伤弧菌的检测, 也取得良好的效果^[34]。

在检测耗时方面, Cao 等^[16]、Thongkao 等^[32]和程蝶等^[33]利用 LAMP 进行检测的时间分别为 50 min, 60 min 和 90 min, 而本研究建立的 RT-LAMP 法, 可实时监测到检测结果, 仅需 40 min, 就可以知道全部检测结果。

监测仪器选择方面, 因为 LAMP 法是基于恒温扩增, 不仅 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪器适用, 其他的恒温荧光检测仪, 如 Deaou-308C、ESE Quant Tube Scanner 仪器同样适用于本检测方法, 不仅价格低廉, 而且携带方便, 非常适合在基层防疫部门和养殖生产基地推广应用。

总之, 本方法具有高特异性, 高灵敏度, 耗时短且操作简单, 能实时观测结果等优点, 非常适合在生产现场进行哈维氏弧菌的检测, 为其引起的相关疾病的监控与预防奠定了良好基础。

4 小结

选择菌株 QT520 的一段特异性 ToxR 序列 (GenBank: CP018680.2 Range 1: 3543839 to 3544714) 进行 RT-LAMP 引物设计; 经引物筛选后, 确定引物组 TOX-4 为本研究最适用的引物。

RT-LAMP 法检测哈维氏弧菌的基因组 DNA 及菌液灵敏度分别为 100 fg/ μ L 和 10^3 cfu/mL 或者 20 cfu/reaction, 其灵敏度与 RT-PCR 法相当, 比普通 PCR 的检测灵敏度要分别高 1000 倍和 10 倍。此外, RT-LAMP 法检测哈维氏弧菌消除了 LAMP 产物污染源, 且检测时间只需要 40 min, 少于 LAMP 法的 50~90 min, 具有耗时短、特异性和灵敏度高、仪器简单、安全高效等优点, 非常适合

在生产现场进行哈维氏弧菌的检测。

参考文献:

- [1] Kraxbergerbeatty T, McGarey D J, Grier H J, et al. *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity[J]. Journal of Fish Diseases, 1990, 13(6): 557-560.
- [2] Saeed M. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait[J]. Aquaculture, 1995, 136: 21-29.
- [3] Wu H B, Pan J P. Pathological studies on the vibriosis of marine cage cultured *Seriola dumerili*[J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(2): 206-209. [吴后波, 潘金培. 海水网箱养殖高体鲷弧菌病理学研究[J]. 水产学报, 1999, 23(2): 206-209.]
- [4] Chabrilón M, Rico R M, Arijo S, et al. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup)[J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28(9): 531-537.
- [5] Pujalte M J, Sitjà-Bobadilla A, Macián M C, et al. Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and european sea bass[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26(2): 284-292.
- [6] Mei B, Zhou Y C, Xu X D, et al. Isolation and identification of bacteria pathogens from *Epinephelus coioides* with tail-rotted disease[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(6): 118-124. [梅冰, 周永灿, 徐先栋, 等. 斜带石斑鱼烂尾病病原菌的分离与鉴定[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(6): 118-124.]
- [7] Chen X G, Wu S Q, Shi C B, et al. Isolation and identification of pathogenetic *Vibrio harveyi* from estuary cod *Epinephelus coioides*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(4): 313-317. [陈献稿, 吴淑勤, 石存斌, 等. 斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 313-317.]
- [8] Cui J, Fan X T, Liu W Z, et al. Isolation and identification of vibriosis pathogens of marine cultured fishes in southern China[J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2014, 32(3): 244-251. [崔婧, 范雪亭, 刘文竹, 等. 华南地区海水养殖鱼类主要弧菌病原的分离与鉴定[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2014, 32(3): 244-251.]
- [9] Cui J. The typing of fish pathogen *Vibrio harveyi* in South China and the research of its prevention strategies[D]. Hainan University, 2014. [崔婧. 华南地区鱼类病原哈维氏弧菌分型及其防治策略研究[D]. 海口: 海南大学, 2014.]
- [10] Shi Y S, Tong G Z, Xue C B, et al. Identification and drug

- sensitive test of *Vibrio harveyi* isolated from the tail-rotted *Pseudosciaena crocea* in Zhoushan[J]. Chinese of Journal of Health Laboratory Technology, 2005, 15(3): 267-269. [石亚素, 童国忠, 薛超波, 等. 舟山养殖大黄鱼烂尾病中哈氏弧菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(3): 267-269.]
- [11] Tu Z G. Studies on microbial diversity and rot body disease of *Trachinotus ovatus* in deep-sea cage aquaculture area in Houshui Bay, Hainan[D]. Haikou: Hainan University, 2017. [涂志刚. 海南后水湾深水网箱养殖区微生物多样性及其卵形鲳鲹“烂身病”研究[D]. 海口: 海南大学, 2017.]
- [12] Gomezgil B, Sotorodriguez S, Garciasgasca A, et al. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms[J]. Microbiology, 2004, 150(6): 1769-1777.
- [13] Canogomez A, Bourne D G, Hall M R, et al. Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: current methods and future prospects[J]. Aquaculture, 2009, 287(1): 1-10.
- [14] Gurtler V, Mayall B C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(1): 3-16.
- [15] Thompson C C, Vicente A C P, Souza R C, et al. Genomic taxonomy of vibrios[J]. BMC Evolutionary Biology, 2009, 9(1): 258.
- [16] Cao Y T, Wu Z, Jian J, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Vibrio harveyi* in cultured marine shellfish[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(1): 24-29.
- [17] Haldar S, Neogi S B, Kogure K, et al. Development of a haemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 50(2): 146-152.
- [18] Zhang J, Shi H, Xie J J, et al. Rapid detection of pathogenic *Vibrio harveyi* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(5): 601-607. [张静, 施慧, 谢建军, 等. 利用 LAMP 法快速检测致病性哈维氏弧菌[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(5): 601-607.]
- [19] Canogomez A, Hoj L, Owens L, et al. A multiplex PCR-based protocol for identification and quantification of *Vibrio harveyi*-related species[J]. Aquaculture, 2015, 437: 195-200.
- [20] Gauger E J, Gomezchiarri M. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 52(1): 39-46.
- [21] Tu Z, Li H, Zhang X, et al. Complete genome sequence and comparative genomics of the golden pompano (*Trachinotus ovatus*) pathogen, *Vibrio harveyi* strain QT520[J]. PeerJ, 2017, 5(12): e4127.
- [22] Kuang Y Y, Ye W X, Lv J Z, et al. Loop mediated isothermal amplification (Lamp) method for detection of *Vibrio cholerae*[J]. Chinese Journal of Public Health, 2009, 25(11): 1310-1312. [匡燕云, 叶卫翔, 吕敬章, 等. 霍乱弧菌环介导等温扩增 LAMP 技术检测[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(11): 1310-1312.]
- [23] He L. Study on a loop mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid detection of pathogens in aquatic animals[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012. [何琳. 环介导等温扩增技术快速检测水产动物病原的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.]
- [24] Schikorski D, Renault T, Paillard C, et al. Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture[J]. Aquaculture, 2013, 392-395: 106-112.
- [25] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [26] Savan R, Igarashi A, Matsuoka S, et al. Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 621-624.
- [27] Wang G L, Liu L, Li S Y. Development of a SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Nocardia seriolae* and its application[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 509-513. [王国良, 刘璐, 李思源. 鲷鱼诺卡氏菌 SYBRGreen I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 水产学报, 2012, 36(4): 509-513.]
- [28] Wang G L, Liu L, Xu Y J. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of fish pathogenic *Nocardia seriolae*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(1): 27-31. [王国良, 刘璐, 徐益军. 鱼类致病病鲷鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)的 LAMP 检测技术建立与应用[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(1): 27-31.]
- [29] Cheng T Y, Liu X, Chang X B. Establishment and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Aeromonas hydrophila*[J]. Veterinary Science in China, 2007, 37(12): 1013-1016. [程天印, 刘洵, 常小斌. 嗜水气单胞菌 Lamp 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(12): 1013-1016.]
- [30] Ding W C, Hu J R, Shi Y H, et al. Establishment of

- loop-mediated isothermal amplification for detection of *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2009, 42(1): 70-76. [丁文超, 胡健饶, 史雨红, 等. 环介导恒温扩增技术快速检测溶藻弧菌[J]. 分子细胞生物学报, 2009, 42(1): 70-76.]
- [31] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection[J]. Vaccine, 2006, 24(44): 6679-6682.
- [32] Thongkao K, Longyant S, Silprasit K, et al. Rapid and sensitive detection of *Vibrio harveyi* by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick targeted to *vvh* P2 gene[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(5): 1122-1131.
- [33] Cheng D, Chai F C, Cai Y, et al. Visual detection of *Vibrio harveyi* based on loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(6): 60-68. [程蝶, 柴方超, 蔡怡, 等. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条可视化检测哈维氏弧菌的研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 60-68.]
- [34] Han F, Ge B. Quantitative detection of *Vibrio vulnificus* in raw oysters by real-time loop-mediated isothermal amplification[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 142(1): 60-66.

Development and application of real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for detection of *Vibrio harveyi*

TU Zhigang^{1,2}, YANG Haipeng³, CUI Jing¹, YAN Genjie¹, LI Danping¹, ZHOU Yongcan², QIU Mingyi¹

1. Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences, Haikou 571126, China;

2. The Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, China;

3. Guangzhou Deaou Bio-Tech Co., Guangzhou 510663, China

Abstract: *Vibrio harveyi* is considered a major pathogen of the golden pompano (*Trachinotus ovatus*) causing rot body disease in the deep-sea cage aquaculture area in Houshui Bay, 2016. Building a more rapid, accurate, and convenient technical detection analysis rather than the conventional methods, for example, physiological and biochemical identification, 16S rRNA gene sequence analysis, and immunodiagnostic technique, which are labor-intensive and time-consuming, is of great importance to disease prevention and control. According to the principle of the LAMP method, real-time loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) techniques were developed for detection of fish pathogenic *V. harveyi* through designing specific primers based on ToxR genes of *V. harveyi* QT520 after adding fluorescent dye SYTO-9 to the reaction system. The results showed that this method could effectively distinguish the *V. harveyi* and *V. campbellii*, and the detection limit of this method for *V. harveyi* with both of pure cultures and DNA concentrations were found to be 10^3 CFU/reaction and 100 fg/uL, being equivalent to real-time PCR (RT-PCR), which was 1000 and 10 times that of general PCR, respectively. Furthermore, the detection process through this method only took 40 min and the results could be displayed on the LCD panel. Thus, it has high specificity, high sensitivity, and the interpretation of results is simple and objective. Furthermore, it has simple operation characteristics, being suitable for application and promotion in basic levels of fishery technology promotion departments and fishery professional cooperatives.

Key words: RT-LAMP; *Vibrio harveyi*; *Trachinotus ovatus*; rot body disease; rapid detection

Corresponding author: QIU Mingyi. E-mail: 1832901596@qq.com