

文章编号:1000-0615(2009)01-0119-07

刺参腐皮综合征病原灿烂弧菌检测探针的制备及应用

王印庚¹, 张凤萍^{1,2}, 李胜忠³, 陈霞⁴, 崔玉龙⁵

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所海水鱼类养殖与设施渔业研究室, 山东 青岛 266071;

2. 浙江省舟山市水产研究所, 浙江 舟山 316000;

3. 新疆农业大学动物科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

4. 青岛九洋红水产科技有限公司, 山东 青岛 266071;

5. 荣成市海洋与渔业局, 山东 威海 264309)

摘要: 腐皮综合征是近年来养殖刺参发生的严重疾病。发病时, 刺参大批死亡, 经济损失惨重。以其主要致病原灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) DNA 为模板, PCR 扩增出 16S-23S 核糖体 RNA 基因间隔区序列, 插入 pMD19-T, 转化大肠杆菌 DH5 α 并测序。根据该间隔区序列, 设计引物扩增 177 bp 的地高辛标记的探针。该探针对照灿烂弧菌呈现特异性, 而对其它细菌 *V. fluvialis*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* 均呈阴性。探针对灿烂弧菌 DNA 的检出限为 6.25 pg, 具有较高敏感度。用该探针人工感染以及从青岛、烟台、威海获取的腐皮综合征发病海参和养殖水体进行斑点杂交, 灿烂弧菌检出率达 100%。结果表明, 该探针具有良好的特异性和敏感性, 可用于快速检测养殖刺参腐皮综合征的病原灿烂弧菌。用该方法检测刺参腐皮综合征尚属首次, 为刺参腐皮综合征的快速诊断和防治提供技术支撑。

关键词: 刺参; 腐皮综合征; 灿烂弧菌; 聚合酶链式反应; 斑点杂交

中图分类号: S 941.42

文献标识码: A

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 具有很高的食用和药用价值, 自古以来就居为“海产八珍”之首^[1-2], 一直倍受青睐。近年来, 我国北方大力发展刺参养殖, 养殖面积近百万亩, 年产值 150 亿元, 成为海水养殖业中经济产值最大的养殖品种之一^[3]。刺参养殖主要在山东省和辽宁省, 而河北省、福建省和浙江省养殖较少。2006 年我国鲜参总产量逾 10 万吨, 为推动沿海区域经济发展做出了重要贡献。然而, 养殖的高速发展和不规范运作导致病害问题日益突出, 出现了多种明显病症和大规模死亡现象, 给广大刺参养殖业者造成了惨重的经济损失, 严重制约了该产业的持续稳定发展。其中“腐皮综合征”的危害最为严重, 死亡率高达 90% 以上, 病情几乎波及所有刺参养殖区, 造成了 2003-2004 年度 10 多亿元的经济损

失^[4](图 1)。到目前为止, 国内对养殖刺参的病害研究水平还处于初级阶段, 疾病仍频频发生, 危

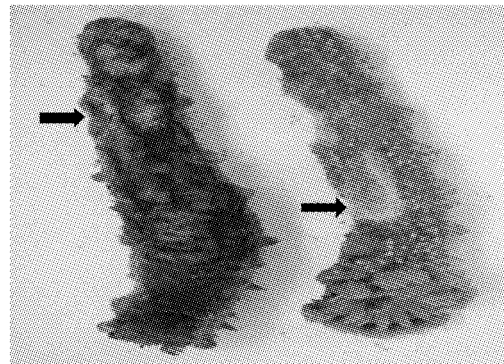


图 1 患有腐皮综合征的养殖刺参 (箭头示溃疡病灶)

Fig. 1 Sea cucumbers with skin ulcer syndrome

收稿日期: 2007-11-28 修回日期: 2008-07-01

资助项目: 山东省科技发展计划项目 (2004GG2205116); 青岛科技发展计划项目 (02-1-kchhh-44); 农业部农业结构调整重大技术研究专项 (06-05-04B); 山东省农业良种工程重大课题

通讯作者: 王印庚, Tel: 0532-85841732, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

害巨大^[5-6]。为有效遏制疾病的发生、减少经济损失,迫切需要建立一种特异、敏感、实用的检测方法。为此,我们在建立玻片直接凝集法、双抗原夹心 ELISA 法、Dot-ELISA、间接荧光抗体技术等快速检测技术的基础上^[7],利用地高辛标记检测试剂盒对特异性扩增产物进行标记,制备 DNA 探针,通过斑点杂交对刺参腐皮综合征重要病原菌——灿烂弧菌进行检测,为刺参腐皮综合征的快速诊断以及防治提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 菌株 050619 分离于患“腐皮综合征”的养殖刺参,经早期研究确定为腐皮综合征病原之一,并鉴定为灿烂弧菌^[8](图 2),由本实验室保存。标准菌株河流弧菌(*V. fluvialis*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、溶藻胶弧菌(*V. alginolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 购自北京微生物研究所。所有菌株均保存在含 15% 甘油的保种管中, -80 °C 冰箱保存。

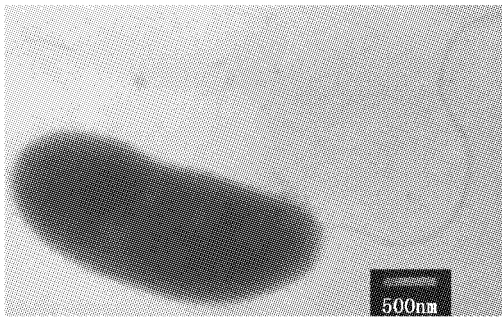


图 2 灿烂弧菌的负染电镜照片(标尺为 500 nm)
Fig. 2 Electronic microphotograph of *Vibrio splendidus* (bar = 500 nm)

试剂 Dig 标记及检测试剂盒,分别购自 TaKaRa、Roche 公司;大肠杆菌 DH5 α 购自 TaKaRa 公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP、PCR 产物纯化试剂盒购自 Bioer Technology 有限公司。

引物的设计 16S-23S 间隔区序列扩增采用 Lee 等^[8]设计的引物,正向引物为 16S/23S-F (5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC -3' (18mer),对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因(rDNA) 上的保守序列(位置为 1390-1407);反向引物

16S/23S-R: 5'-CCTTTCCCTCACGGTACTG-3' (19mer),对应于 *E. coli* 23S rDNA 上的保守序列(位置为 474-456)。根据所测的 16S-23S 间隔区 DNA 序列,利用软件 Primer Premier 5.0 设计了 20 对特异性引物,通过 PCR 检测,从中选出用于扩增核酸探针的特异性引物是 5'-CTATCACCCCTTTACTGCG - 3' (正向)和 5'-CCTGTTGTGAATACA TAGC -3' (反向),扩增产物长度 177 bp。

1.2 方法

细菌 DNA 的提取 培养的细菌悬液经 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 20 mg/mL 蛋白酶 K, 10% SDS 37 °C 孵育 1 h, 用等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提,再用乙醇沉淀,晾干后的 DNA 溶于 TE 缓冲液^[9-10]。

PCR 扩增及 PCR 产物的克隆 每 50 μ L 反应体系中加入 36.5 μ L 灭菌双蒸水, 5 μ L 10 \times Buffer (with 15 mmol/L MgCl₂), 1 μ L dNTP (2.5 mmol/L each), 各 2.5 μ L 10 μ mol/L 引物, 0.5 μ L 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶, 2 μ L 模板。

PCR 反应程序为 94 °C 2 min, 接 94 °C 1 min, 55 °C 1.5 min, 72 °C 2.5 min, 35 个循环;最后在 72 °C 延伸 10 min, 1 个循环。PCR 产物经电泳检查无杂带后,取 1 μ L 产物与 1 μ L 载体 16 °C 连接 30 min, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后,取 200 μ L 涂布于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 °C 培养 12 ~ 16 h。

PCR 法扩增核酸探针 每 50 μ L 反应体系中含灭菌水 27.5 μ L, 10 \times Buffer (with 15 mmol/L MgCl₂) 5 μ L, PCR DIG Labeling mix 5 μ L, 10 μ mol/L 引物各 5 μ L, 50 ng/ μ L PCR 扩增后 050619 DNA 2 μ L, 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L。混匀后,进行 PCR 反应: 94 °C 2 min, 94 °C 1 min, 49 °C 1.5 min, 72 °C 2.5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。4 °C 保存,取 3 μ L PCR 产物,在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察照相。将 PCR 产物纯化,按 DIG DNA Labeling and Detection Kit 试剂盒 (Roche) 说明检测探针产量,然后按 2 ng/ μ L 分装,置 -20 °C 冰箱备用^[11]。

斑点杂交检测方法的建立 (1) 取适当大小的硝酸纤维素膜 (NCM), 划成 5 mm \times 5 mm 小格,临用前放置于 20 \times SSC 中平衡 5 min, 再将膜

放置于滤纸上晾干备用。(2)将待测样品的DNA在PCR仪上97℃变性10min,再迅速置于冰水浴中2min以上,直到点样。每个方格点样1μL,在紫外交联仪上交联3min。(3)将点好样的NCM置于盛有预杂交液的杂交袋中,封口。65℃水浴2h。将探针于100℃水浴中煮沸10min,立即置于冰水中,2min后,剪开杂交袋一角加入煮好的探针,封口,65℃水浴中孵育6~16h。(4)分别用2×SSC/0.1% SDS、0.1×SSC/0.1% SDS、缓冲液I(1mol/L Tris,1.5mol/L NaCl,pH 7.5)洗膜,然后将膜置于杂交袋中加入缓冲液II(封闭剂10mg,缓冲液I 1mL),37℃温浴30min,加入1/50体积的100×碱性磷酸酶标记的地高辛抗体,37℃振荡30min。取出膜分别用缓冲液I和缓冲液III(1.0mol/L Tris,1.0mol/L NaCl,0.5mol/L MgCl₂·6H₂O,pH 9.5)洗涤。(5)将膜放入盛有新鲜配制的BCIP/NBT显色液的杂交袋中,室温避光显色15min~2h,待阳性样品明显出现颜色而本底刚刚有所变色时停止显色^[12]。取出膜置于TE缓冲液中15~30min,将膜置于滤纸上晾干,观察照相,最后将膜装于干的杂交袋中备查。

探针的特异性、敏感性检测 将纯化标准菌株 *V. fluvialis*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, *V. alginolyticus* 以及 *V. splendidus* 的DNA在硝酸纤维素膜上点样,用DIG标记DNA探针进行杂交,同时将灭菌双蒸水点于膜上作空白对照。

另外,将纯化的 *V. splendidus* DNA (10 ng/μL)依次按1:10、1:100、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800进行系列稀释后,各取1μL点样于硝酸纤维素膜上进行斑点杂交,以灭菌双蒸水为空白对照。

刺参样品病原菌检测 分别对人工感染和取自青岛、烟台、威海的32头呈现皮肤溃烂等典型“腐皮综合征”的刺参,取溃烂处肌肉研磨后TSB培养基划线培养,培养出的细菌按照细菌DNA提取所述方法提取DNA,进行斑点杂交检测。另取养殖水体进行检测,灭菌滤纸过滤水体样品,滤液用TSB培养基28℃涂布培养水体中细菌,培养出的细菌取优势度超过10%的菌株做斑点杂交^[7],每组取2个水样。每个样品检测设

2个平行组。为了增加检测结果的可信度,同时做生理生化鉴定和PCR检测^[13],并用相应菌株作阳性对照。

用核酸探针斑点杂交检测病灶组织 取上述发病刺参病灶组织,不用分离培养细菌,直接提取DNA(包括刺参组织DNA和细菌DNA),取等量DNA,按照斑点杂交检测方法进行斑点杂交检测,同时取养殖水体进行检测。

2 结果

2.1 DIG标记探针PCR法制备及其产量测定

PCR法制备的DNA探针电泳带大于177bp(图3),表明DIG已成功标记探针,因为DIG标记后会比未标记的探针分子量大。合成的探针经提纯后检测,产量为80 ng/μL。

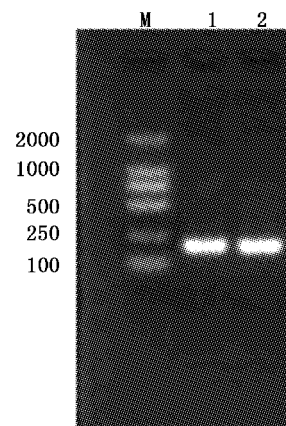


图3 PCR合成探针电泳结果

Fig. 3 Electrophotogram of the probe produced by PCR

M: Marker; 1-2: probes

2.2 探针的灵敏度检测

斑点杂交检测探针的灵敏度示于图4。斑点1、2、3、4呈强阳性,斑点5、6呈弱阳性,斑点7、8、9不显色,斑点10为空白对照不显色。从斑点看,信号与用量成线性关系。敏感性检测表明,探针对同源DNA的检出极限为6.25 pg。

2.3 斑点杂交检测探针的特异性

由图5可见,探针仅对鉴定过的灿烂弧菌的DNA样品呈阳性反应,而对其它标准菌株 *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahemolyticus* 的核酸均呈阴性,空白对照不显色。

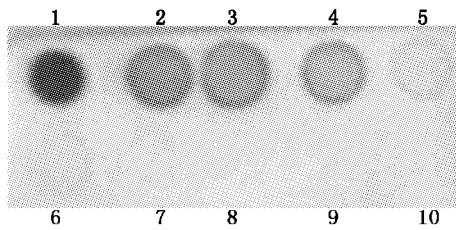


图4 DIG标记DNA探针检测灿烂弧菌的敏感性
Fig.4 Sensitivity of DIG-labeled DNA probe for detection of *V. splendidus*

1: 10 ng/ μ L; 2: 1:10; 3: 1:100; 4: 1:400; 5: 1:800;
6: 1:1600; 7: 1:3200; 8: 1:6400; 9: 1:12800; 10: blank control

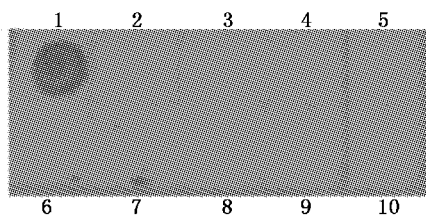


图5 DIG标记DNA探针检测灿烂弧菌的特异性
Fig.5 Specificity of DIG-labeled DNA probe for detection of *V. splendidus*

1: *V. splendidus* DNA; 2: *V. fluvialis* DNA;
3: *V. alginolyticus* DNA; 4: *V. anguillarum* DNA;
5: *Aeromonas hydrophila* DNA; 6: *V. harveyi* DNA;
7: *V. vulnificus* DNA; 8: *V. parahaemolyticus* DNA;
9-10: ddH₂O controls

2.4 刺参样品检测结果

人工感染刺参和自然发病刺参均出现摇头、肿嘴和皮肤溃烂等典型的腐皮综合征症状。对其病灶组织进行分离菌株进行检测,检测结果见表1。另外,利用斑点杂交直接检测刺参病灶组织(不进行细菌分离)的结果见图6。结果显示,斑点杂交对人工感染刺参及青岛、烟台、威海的刺参样品的检出率均为100%。生理生化鉴定、PCR检测结果均与斑点杂交检测结果一致。

3 讨论

3.1 探针的特异性和灵敏度

邓先余等^[14]在研究了6种水产病原菌16S-23S rDNA 间区序列分析及检测技术后,认为16S-23S rDNA 间隔区进化速率比16S rDNA 大10多倍。本研究依据这一事实,制备探针选用的片段来自细菌 *Vibrio splendidus* 16S-23S 间隔区

序列DNA。试验通过斑点杂交来验证探针的特异性,结果表明探针仅对呈现腐皮综合征海参所分离细菌的DNA样品呈阳性反应,与其它细菌 *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。灿烂弧菌是水产动物重要的致病菌之一,并分为生物I型和生物II型^[15]。该探针对这两类型灿烂弧菌的特异性是否存在差异,有待进一步深入研究探讨。

利用斑点杂交探针初步研究 *Vibrio splendidus* 尚属首次。该杂交检测探针的灵敏度试验结果显示,探针对刺参腐皮综合征重要病原 *Vibrio splendidus* DNA 的检出极限为6.25 pg。杨冰等^[16]报道,所研制的相关探针对对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV) DNA 的最低检出限为24.8 pg;徐洪涛等^[17]研发的探针对中国对虾非包涵体型杆状病毒DNA 的灵敏度为6.8 pg。相比较而言,本试验制备的探针具有较高的灵敏度。另外,从不同稀释梯度的 *Vibrio splendidus* DNA 与探针反应结果来看,斑点显色的强度与DNA浓度成正比。为此,该探针反应结果可以用来初步判定刺参感染灿烂弧菌程度的强弱及其参体携带细菌多寡的情况。

3.2 斑点杂交用于样品检测的可行性

目前,海水养殖动物疾病病原菌的检测技术大多是常规培养鉴定、免疫学检测技术(免疫荧光、免疫酶技术)、核酸检测技术(核酸探针、PCR技术、16S rRNA 检测等)、核酸技术与免疫学结合的检测技术(免疫-PCR、PCR-ELISA)等技术^[18]。对于刺参腐皮综合征的诊断,本实验室已在早些时候成功建立了抗原抗体凝集法、双抗原夹心ELISA法、Dot-ELISA、间接荧光抗体技术等检测技术^[7]。本次研制的斑点杂交探针不同于上述检测技术,它可对刺参腐皮综合征初期病征的诊断、饲料中病原、水体中病原检测等更具有实用性。斑点杂交检测方法不需要特殊设备,并且可以同时处理数百份标本,适用于大批量标本检测^[19]。利用斑点杂交对对虾白斑综合征病毒(WSSV)、对虾IHHNV的检测已有相关报道^[16-20],并达到广泛应用。

表1 感染样品中灿烂弧菌的检测结果
Tab.1 The detection of pathogen *V. splendidus* from the infected samples

样品来源 source of samples	检测项目 items	分离细菌代号 和优势度 bacterial code and dominant	斑点杂交检测 阳性菌株(%) positive by dot blot	PCR 检测阳性菌株 positive by PCR	生理生化 鉴定菌株 bacterial identific by biochemistry			
人工感染 artificial infection	溃烂肌肉样品	1	A(80)B(15)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
		2	A(70)B(20)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
		3	A(75)C(20)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌		
		4	A(70)B(28)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
		5	A(75)C(15)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌		
		6	A(70)C(25)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌		
		7	A(80)B(10)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
		8	A(78)B(15)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
青岛样品 Qingdao	水样	1	A(65)B(25)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
		2	A(55)B(36)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
		1	A(90)	A +	A +	A 为灿烂弧菌		
		2	A(65)B(25)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
		3	A(65)C(30)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌		
		4	A(70)B(22)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
		5	A(72)B(20)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
		6	A(65)C(30)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌		
	溃烂肌肉样品	7	A(68)C(25)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌		
		8	A(78)B(20)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌水样		
		水样	1	A(55)B(25)C(15)	A + B - C -	A + B - C -	A 为灿烂弧菌	
			2	A(50)B(40)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌	
			1	A(83)C(15)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌	
			2	A(71)B(26)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌	
		烟台样品 Yantai	溃烂肌肉样品	3	A(82)C(10)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌
				4	A(70)C(20)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌
5	A(75)B(20)			A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
6	A(70)B(25)			A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
7	A(70)C(20)			A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌		
8	A(50)B(25)C(15)			A + B - C -	A + B - C -	A 为灿烂弧菌水样		
水样	1			A(65)B(20)C(10)	A + B - C -	A + B - C -	A 为灿烂弧菌	
	2			A(55)B(15)C(20)	A + B - C -	A + B - C -	A 为灿烂弧菌	
	1		A(80)B(10)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
	2		A(80)B(15)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌		
威海样品 Weihai	溃烂肌肉样品		3	B(55)C(40)	B - C -	B - C -	无灿烂弧菌	
			4	A(75)B(22)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌	
		5	A(72)C(20)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌		
		6	A(70)C(20)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌		
		7	A(67)C(25)	A + C -	A + C -	A 为灿烂弧菌		
		8	A(70)B(20)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌水样		
		水样	1	A(55)B(25)C(15)	A + B - C -	A + B - C -	A 为灿烂弧菌	
			2	A(50)B(40)	A + B -	A + B -	A 为灿烂弧菌	

注:TSB 平板培养溃烂组织及水体优势度小于 10% 的细菌菌落未作检测;“+”表示检测结果阳性,“-”表示检测结果阴性
Notes: The test was not carried out as the isolated bacteria dominant less than 10%; “+”, positive; “-”, negative

试验利用斑点杂交对人工感染和取自青岛、烟台、威海的刺参发病样品及水样进行检测,结果检出率均为 100%,并与经典的细菌分离培养鉴定和 PCR 方法作比较,结果表明探针的特异性和准确性是可靠的。威海样品有一份为阴性,通过

细菌学检测可知,该样品不含有灿烂弧菌。王印庚等^[21]报道,除了灿烂弧菌导致刺参发生腐皮综合征之外,假交替单胞菌以及恶劣环境也可引发腐皮综合征。因此,该探针的准确性极高,可用于刺参腐皮综合征重要病原灿烂弧菌的检测。腐皮

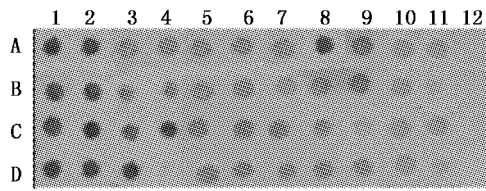


图6 斑点杂交探针检测刺参病灶组织的结果
 A1, B1, C1, D1: 阳性对照; A12, B12, C12, D12: 阴性对照;
 A2 ~ A9: 人工感染样品; B2 ~ B9: 青岛自然发病样品;
 C2 ~ C9: 烟台自然发病样品; D2 ~ D9: 威海自然发病样品;
 A10 ~ A11: 人工感染水样; B10 ~ B11: 青岛养殖水样;
 C10 ~ C11: 烟台养殖水样; D10 ~ D11: 威海养殖水样
Fig. 6 The results of hybridization by using dot-blot probe to detect DNA from the foci of diseased *Apostichopus japonicus*
 A1, B1, C1, D1: positive controls; A12, B12, C12, D12: negative controls; A2 - A9: the artificial infected samples; B2 - B9: the natural infected samples from Qingdao; C2 - C9: the natural infected samples from Yantai; D2 - D9: the natural infected samples from Weihai; A10 - A11: the polluted water; B10 - B11: the polluted water from Qingdao; C10 - C11: the polluted water from Yantai; D10 - D11: the polluted water from Weihai

综合征是近年来刺参养殖最重要的疾病之一,导致刺参大批死亡和惨重的经济损失,这一准确性和灵敏度较高的检测技术的建立将对防病治病、实现健康养殖、提高生产效益具有重要的现实意义。

本文仅对发病刺参和养殖水体进行了初步研究,而未对不发病刺参进行检测,有关定量方面的研究还有待于进一步的研究探讨。

参考文献:

- [1] 樊绘曾. 海参:海中人参——关于海参与其成分保健医疗功能的研究与开发[J]. 中国海洋药物, 2001, (4): 37-44.
- [2] 张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 国内外海参自然资源、养殖状况及存在问题[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(3): 89-97.
- [3] 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2006, 13(4): 610-616.
- [4] 王印庚, 荣小军. 我国刺参养殖存在的主要问题与疾病综合防治技术要点[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(10): 29-31.
- [5] 王印庚, 荣小军, 张春云. 养殖海参主要疾病及防治技术[J]. 海洋科学, 2005, 29(3): 1-7.
- [6] 王印庚, 荣小军, 张春云. 养殖刺参暴发性疾病腐皮综合征的初步研究与防治[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(5): 44-48.

- [7] 谢建军, 王印庚, 张正, 等. 养殖刺参腐皮综合征两种致病菌 Dot-ELISA 快速检测[J]. 海洋科学, 2007, 31(8): 59-64.
- [8] Lee S K Y, Wang H Z, Law S H W, et al. Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences [J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 44: 412-420.
- [9] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Preparation of genomic DNA from bacteria: miniprep of bacterial genomic DNA [M]// Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, PP. 2.4.1-2.4.2.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning A laboratory manual (2nd edition) [M]. Beijing: Academic Press, 1992: 137.
- [11] 闫冬春, 董双林, 黄健, 等. PCR-核酸探针斑点杂交法检测痕量白斑综合征病毒(WSSV) [J]. 高技术通讯, 2004, 33-36.
- [12] 史成银, 宋晓玲, 黄健, 等. 核酸斑点杂交分析法检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV) [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(5): 486-490.
- [13] 张凤萍, 王印庚, 李胜忠, 等. 应用PCR方法检测刺参腐皮综合症病原—灿烂弧菌[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(5): 100-106.
- [14] 邓先余, 何建国. 6种水产病原菌16S-23S rDNA 间区序列分析及检测技术 [D]. 广东: 中山大学, 2003.
- [15] 杨少丽, 王印庚, 董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展 [J]. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 75-83.
- [16] 杨冰, 黄健, 宋晓玲, 等. PCR法制备地高辛标记DNA探针斑点杂交检测对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV) [J]. 中国水产科学, 2004, 11(2): 95-98.
- [17] 徐洪涛, 朴春爱, 杨朵, 等. PCR方法制备地高辛标记DNA探针检测中国对虾非包涵体型杆状病毒 [J]. 病毒学报, 2000, 16(1): 73-75.
- [18] 宋立超, 樊景凤, 刘述锡, 等. 病原性海洋弧菌快速检测方法的研究进展 [J]. 海洋环境科学, 2005, 24(1): 65-69.
- [19] 雷质文, 史成银, 黄健, 等. PCR法制备地高辛标记探针斑点杂交检测白斑综合征病毒(WSSV) [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 201-204.
- [20] Nunan L M. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV) [J]. Virological Methods, 1997, 63:

- 193-201.
[21] 王印庚,方波,张春云,等. 养殖刺参保苗期重大

疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析[J]. 中国水产科学,2006,13(4):610-616.

Detection of *Vibrio splendidus* causing skin ulcer syndrome of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with DNA probes

WANG Yin-geng¹, ZHANG Feng-ping^{1,2}, LI Sheng-zhong³, CHEN Xia⁴, CUI Yu-long⁵

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Zhounshan Fisheries Research Institute, Zhoushan 316000, China;

3. College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

4. Sunny Oceans Aquaculture Technology Co., Ltd, Qingdao 266071, China;

5. Municipal Department of Ocean and Fishery of Rongcheng, Weihai 264309, China)

Abstract: The skin ulcer syndrome is a serious disease causing massive mortality and economic losses in cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). The causative agent was identified as *Vibrio splendidus*. As *V. splendidus* DNA was gained, the 16S-23S rDNA intergenic spacers were amplified by PCR, and cloned into pMD19-T vectors and finally sequenced. A fragment (about 177 bp) was obtained by PCR, and it was labeled with digoxigenin-dNTP to form a dot-blot hybridization probe for *V. splendidus* DNA. The results showed that the probe was only positive for *V. splendidus* DNA, while it was all negative for DNAs of bacteria *V. fluvialis*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* and *Aeromonas hydrophila*. The sensitivity test illustrated that the detection limit of the dot-blot hybridization probe was 6.25 pg *V. splendidus* DNA. In addition, the probe was considered to be accurate in the detection of *V. splendidus* as the positive ratio was as high as 100% for the total samples from Qingdao, Weihai and Yantai areas. This probe was the first time to be established and applied in China to detect *V. splendidus* in *A. japonicus*. As it is sensitive and accurate in detection of *V. splendidus*, it would be helpful in the disease control and health management in cultured *A. japonicus*.

Key words: *Apostichopus japonicus*; skin ulcer syndrome; *Vibrio splendidus*; PCR; dot-blot hybridization