



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

陈京^{1,2}, 于永翔², 张正^{2,3*}, 王印庚^{2,3}, 廖梅杰^{2,3}, 荣小军^{2,3}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 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 266237)

摘要: 以轮虫弧菌的单拷贝基因 *toxR* 基因的高保守区域为目的片段, 设计特异性引物, 构建重组质粒标准品, 建立针对该菌的荧光定量 PCR 检测方法。以此为基础, 实验选用 UF-150 Genechecker 微流控荧光定量 PCR 仪, 通过优化反应体系和反应条件, 建立了轮虫弧菌的微流控荧光定量 PCR 检测方法。结果显示, 该方法能特异性扩增 *toxR* 基因目的片段, 对轮虫弧菌纯培养物检测下限为 1.34×10^0 拷贝/ μL 。在人工感染样品中的应用结果显示, 对鱼体组织中轮虫弧菌的检测下限为 1.34×10^3 CFU/g, 检测结果可以目视判读, 检测时间缩短至 42 min 以内。研究表明, 该检测方法具有特异性强、敏感度高、场地要求低等突出优势, 适于开发水产病原实用性的现场快速检测技术。

关键词: 轮虫弧菌; *toxR* 基因; 实时荧光定量 PCR; 微流控快速检测

中图分类号: Q 785; S 917.1

文献标志码: A

轮虫弧菌 (*Vibrio rotiferianus*) 隶属于弧菌属 (*Vibrio*), 2003 年由 Gomez-Gil 等^[1] 首次将其与坎贝弧菌 (*V. campbellii*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 等其他弧菌区分, 作为一个新种并确定了其标准菌株。近几年来, 轮虫弧菌感染水产动物发病的报道日渐增多, 2011 年 Roy 等^[2] 报道了一株可引起青蟹 (*Scylla* sp.) 幼体患病的轮虫弧菌。2012 年, 陈政强等^[3] 从患病的半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 体内分离得到一株轮虫弧菌, 证实该菌可引起半滑舌鳎皮肤溃疡症。2019 年, 王凯等^[4] 从患皮肤溃疡症的许氏平鲉 (*Sebastes schlegelii*) 中分离出轮虫弧菌, 通过人工回接感染实验证实该菌对许氏平鲉具有较强的致病力, 是许氏平鲉皮肤溃疡症的致病原。上述研究表明, 轮虫弧菌已经成为我国水产养殖动物重要的新发病原之一。

toxR 基因广泛分布于弧菌科 (Vibrionaceae) 细菌^[5-8], 最先在霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 中发现^[9]。目前, 已在副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、鳗弧菌 (*V. anguillarum*)、拟态弧菌 (*V. mimicus*) 和溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 等多种弧菌中发现 *toxR* 基因的存在^[10-14], 同时异种之间的 *toxR* 基因核苷酸序列相似性较低, 是弧菌科种间鉴定理想的分子靶标^[15]。2019 年, Zhang 等^[16] 报道了一株轮虫弧菌的全基因组, 证实轮虫弧菌中也有 *toxR* 基因序列, 全长为 879 bp。因此, *toxR* 基因序列也适用于对轮虫弧菌的识别和检测。

传统的细菌 PCR 检测方法耗时长, 对设备和场地要求高, 因此无法开展野外现场检测。而微流控 PCR 技术有效克服了传统 PCR 的一些弊端, 具有反应时间短、场地要求低、设备便

收稿日期: 2019-12-01 修回日期: 2020-01-02

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900104); 山东省重大科技创新工程项目 (2018YFJH0730)

通信作者: 张正, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

于携带等突出优势, 非常适合开发病原菌的现场快速检测技术。微流控芯片 (microfluidic chip) 又称为微流体芯片, 也可称为芯片实验室 (lab on a chip), 由微通道形成网路, 以可控流体贯穿整个系统, 具有高度集成化的优点^[17], 在生命科学领域, 尤其在核酸检测方面得到了广泛应用^[18-24]。本实验选用上海创坤生物科技有限公司的 UF-150 Genechecker 微流控荧光定量 PCR 仪, 针对轮虫弧菌的 *toxR* 基因设计特异性引物, 基于 *toxR* 基因特异性引物结合微流控 PCR 仪建立了针对该菌的荧光定量微流控快速检测方法, 以期为开发实用化的病原菌现场快速检测技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验用菌株

实验共使用菌株 23 株, 包括美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 (*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*) 3 株、轮虫弧菌 3 株、哈维氏弧菌 3 株、鳗弧菌 2 株、灿烂弧菌 (*V. splendidus*) 2 株、副溶血弧菌 2 株、溶藻弧菌 2 株、费氏弧菌 (*V. fischeri*) 1 株、大菱鲆弧菌 (*V. scophtalmi*) 1 株、嗜环弧菌 (*V. cyclitrophicus*) 1 株、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 3 株。除 5 株菌株为购自北京微生物研究所的标准菌株外, 其余菌株均由本实验室自不同患病水产动物分离所得 (表 1)。

1.2 特异性引物的设计

基于本实验室已经报道的轮虫弧菌全基因组数据 (SRA: PRJNA498661) 中的全长为 879 bp 的 *toxR* 基因序列^[16], 运用 Primer Premier 5.0 软件设计序列长度为 500 bp 的特异性引物, 引物序列为 F: CAAAATCCCCGAGTTTGTA, R: TTGACCTCCAGTAGCGATAA, 退火温度为 60 °C, 由生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表 2)。

1.3 质粒标准品的制备

利用特异性引物扩增全长 500 bp 的目的 DNA 片段, 回收 PCR 产物, 连接至 PMD18-T 载体, 转化 DH-5 α 感受态细胞, 阳性克隆增菌后

表 1 实验所用菌株

菌株 experiment strains	编号 serial number	来源 source
美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	Pdd0907	实验室分离
	Pdd1611	实验室分离
	Pdd1809	实验室分离
轮虫弧菌 <i>V. rotiferianus</i>	VR1601	实验室分离
	VR1602	实验室分离
	VR1702	实验室分离
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	VH ST -01	北京微生物研究所
	VH0207	实验室分离
	VH1809	实验室分离
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	VA 0205	实验室分离
	VA0531	实验室分离
灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	VS ST -01	北京微生物研究所
	VS1805	实验室分离
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	VP ST -01	北京微生物研究所
	VP0531	实验室分离
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	VAI ST -01	北京微生物研究所
	VAI1811	实验室分离
费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>	AF ST -01	北京微生物研究所
大菱鲆弧菌 <i>V. scophtalmi</i>	VSc0531	实验室分离
嗜环弧菌 <i>V. cyclitrophicus</i>	VC0406	实验室分离
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	EC1810	实验室分离
	EC0701	实验室分离
	EC1811	实验室分离

提取质粒, 进行酶切和测序鉴定。正确构建的重组质粒命名为 p-*toxR*-1, 作为本实验的阳性标准品。根据 Raymond^[25] 报道的方法计算重组质粒标准品的拷贝数。

1.4 反应体系和条件优化

采用 2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂 (Vazyme Biotech Co., Ltd, Nanjing, China), 用

表 2 轮虫弧菌 *toxR* 基因的特异性引物序列

Tab. 2 Specific primers sequences for *V. rotiferianus toxR* gene amplification

基因 gene	引物序列(5'-3') sequence of primers	片段长度/bp size of segment	退火温度/°C annealing temperature
<i>toxR</i>	F: CAAAATCCCCGAGTTTGTA	500	60
	R: TTGACCTCCAGTAGCGATAA		

Eppendorf公司的Realplex型号实时定量PCR仪进行实验,并对反应体系和反应条件不断进行优化,获得最佳参数。

1.5 标准曲线的建立

将构建的质粒标准品 *p-toxR-1* 进行 10 倍梯度稀释成 $1.34 \times 10^2 \sim 1.34 \times 10^8$ 拷贝/ μL , 作为模板, 按优化好的体系及条件进行实时荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 反应, 绘制标准曲线。

1.6 特异性检测

以轮虫弧菌、美人鱼发光杆菌美人鱼亚种等 23 株细菌 (表 1) 基因组 DNA 为模板, 以制备的质粒标准品作为阳性对照、灭菌双蒸水为阴性对照, 在优化反应条件下进行 RT-PCR 扩增, 检测其特异性。

1.7 敏感性实验

将已知浓度的 *p-toxR-1* 标准品梯度稀释成 10 个梯度 ($1.34 \times 10^9 \sim 1.34 \times 10^0$ 拷贝/ μL), 分别作为模板, 按优化好的体系条件进行 RT-PCR, 确定反应的最小检出量。同时选取 $1.34 \times 10^1 \sim 1.34 \times 10^5$ 拷贝/ μL 进行普通 PCR 反应, 比较 2 种检测方法的敏感性。

1.8 微流控检测方法的建立与应用

选用上海创坤生物科技有限公司的 UF-150 Genechecker 微流控荧光定量 PCR 仪进行轮虫弧菌微流控荧光定量 PCR 快速检测技术的研究。该型号仪器外观尺寸为 $22 \text{ cm} \times 20 \text{ cm} \times 18 \text{ cm}$, 净重 2.6 kg, 可使用锂电池或车载 12 V 电源, 具有突出的便携性优势。仪器的反应体系仅有 $10 \mu\text{L}$, 升降温速率为 $8 \text{ }^\circ\text{C}/\text{s}$, 完成整个反应的用时很短。

根据该仪器的特点, 优化获得的 PCR 反应总体积为 $10 \mu\text{L}$, 其中 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix $5 \mu\text{L}$, *toxR-F/R* 上、下游引物 ($10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$) 各 $1 \mu\text{L}$, DNA 模板 $2 \mu\text{L}$, 灭菌双蒸水补齐。PCR 反应程序: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 20 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 s, 30 个循环, 然后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 40 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s 进行熔解曲线的绘制。实时荧光定量 PCR 反应扩增完成的时间为 41 min 29 s。

在实验室的水族系统内, 以许氏平鲈为对象, 设置 5 个实验组, 每组 10 尾鱼 [平均体质量 (40 ± 3) g], 分别注射 0.1 mL 的 1.2×10^5 CFU/mL

的轮虫弧菌、鳗弧菌、哈维氏弧菌、灿烂弧菌和灭菌 1.5% NaCl 溶液, 每天观察实验鱼的状态, 挑选发病或死亡的实验鱼用上述微流控 PCR 方法进行病原菌检测。具体操作方法: 取 0.1~0.2 g 注射部位或鱼体病灶处组织置于 1.5 mL 离心管中, 然后向离心管中加入 $200 \mu\text{L}$ ($2 \times \text{Lysis Buffer}$) 和 $200 \mu\text{L}$ RNase free H_2O , 用手持研磨器适当研磨匀浆后, 金属浴 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 5~10 min, $8000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 2 min 后, 吸取 $10 \mu\text{L}$ 上清液至新的无菌离心管中, 加入 $90 \mu\text{L}$ RNase free H_2O 进行 10 倍稀释, 振荡混匀后即可作为 PCR 的核酸模板, 本实验加样量为 $2 \mu\text{L}$ 。

2 结果

2.1 重组质粒标准品的构建

以合成的单链 DNA 为模板, 利用引物 *toxR-F/R* 进行 PCR 扩增, 获得与预期大小一致的 500 bp 目的片段, PCR 产物经测序分析, 与 GenBank 中登录序列 (CP018312.1) 的同源性达到 100%。用 pMD18-T DH-5 α 成功构建了重组质粒 *p-toxR-1* 标准品 (图 1)。将重组质粒作为阳性标准品, 测

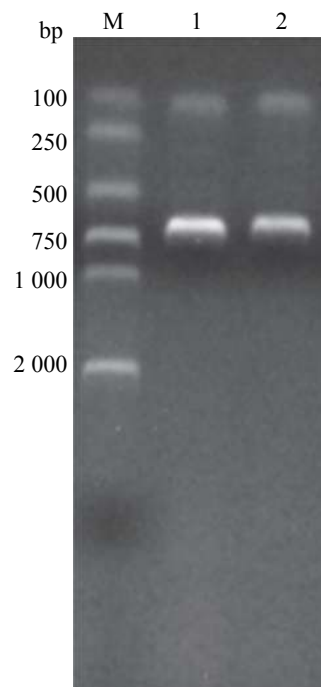


图 1 轮虫弧菌 *toxR* 基因连接转化凝胶电泳图

M. 标准物质 2 000, 1~2. 酶切产物

Fig. 1 Verification of *V. rotiferianus toxR* gene linking transformation gel

M. DNA DL 2 000 marker, 1-2. enzyme-digested products

定质粒含量为 27.94 ng/ μL , 换算成拷贝数为 1.34×10^{13} 拷贝/ μL 。

2.2 反应体系和条件优化

采用矩阵法优选引物最佳浓度配比及退火、延伸温度和时间。优化后的荧光定量 PCR 反应体系 (20 μL): 2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μL 、Primer *toxR*-F/R(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL 、模板 DNA 2 μL , 灭菌 ddH₂O 7.2 μL 。

最佳反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 40 个循环, 退火延伸时收集荧光信号; 熔解曲线分析程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 升至 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 不断收集荧光信号, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 最终形

成熔解曲线。

2.3 标准曲线的建立

将质粒标准品 *p-toxR-1* 梯度稀释成 $1.34 \times 10^2 \sim 1.34 \times 10^8$ 拷贝/ μL , 分别作为模板, 按照优化的荧光定量 PCR 反应条件进行扩增, 绘制扩增曲线(图 2-a)及标准曲线(图 2-b)。标准曲线为 $y = -3.238x + 32.38$ 。质粒起始模板量与 C_t 值之间存在良好的线性关系, *p-toxR-1* 的相关系数 R^2 为 0.994。

2.4 引物的特异性和敏感性

使用本实验设计的引物进行的荧光定量 PCR 检测结果显示, 轮虫弧菌组出现了扩增曲

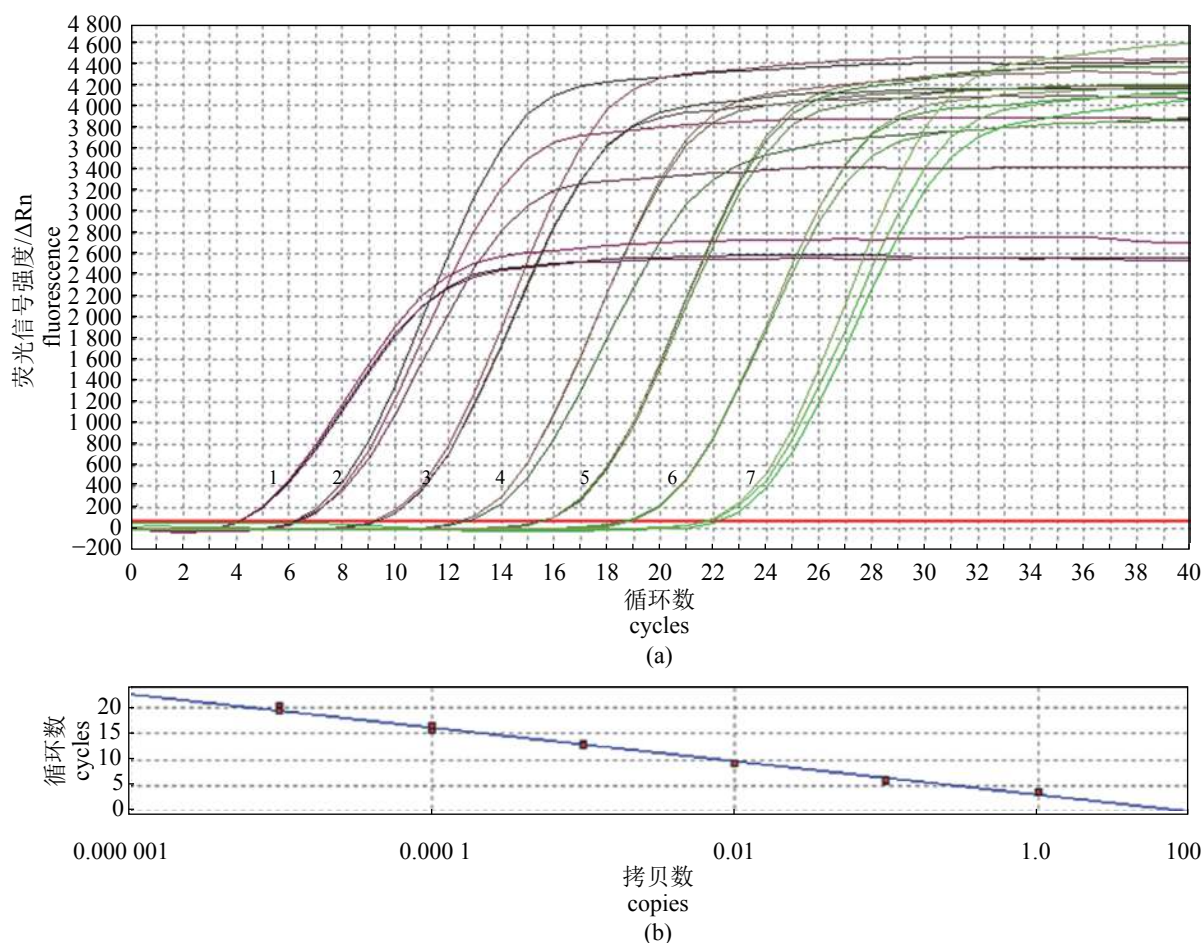


图 2 构建成功的质粒标准品扩增曲线图和标准曲线图

(a) 扩增曲线, (b) 标准曲线; 1. 1.34×10^8 拷贝/ μL , 2. 1.34×10^7 拷贝/ μL , 3. 1.34×10^6 拷贝/ μL , 4. 1.34×10^5 拷贝/ μL , 5. 1.34×10^4 拷贝/ μL , 6. 1.34×10^3 拷贝/ μL , 7. 1.34×10^2 拷贝/ μL 。

Fig. 2 Amplification curve and standard curve of recombinant plasmid

(a) amplification curve, (b) standard curve; 1. 1.34×10^8 copies/ μL , 2. 1.34×10^7 copies/ μL , 3. 1.34×10^6 copies/ μL , 4. 1.34×10^5 copies/ μL , 5. 1.34×10^4 copies/ μL , 6. 1.34×10^3 copies/ μL , 7. 1.34×10^2 copies/ μL 。

线,且循环阈值小于35,而美人鱼发光杆菌美人鱼亚种、哈维氏弧菌等其他病原菌实验组、空白对照实验组均未产生扩增曲线(图3),证实了引物良好的特异性。

以 $1.34 \times 10^9 \sim 1.34 \times 10^0$ 拷贝/ μL 的 *p-toxR-1* 标准品分别作为模板进行荧光定量 PCR 和普通 PCR 检测。结果显示荧光定量最小检出量为 1.34×10^0 拷贝/ μL (图4-a)。普通 PCR 最小检出量为 1.34×10^3 拷贝/ μL (图4-b)。

2.5 微流控检测方法的建立及应用

应用所建立的轮虫弧菌微流控荧光定量 PCR 检测方法,分别进行引物的特异性实验及对人工注射感染的许氏平鲈组织进行检测。特异性实验结果显示,1、2通道出现明显的荧光信号(图5),证明仅1、2通道出现特异性扩增,表明引物 *toxR-F/R* 具有稳定的特异性,并且完成全部荧光定量 PCR 检测的时间仅为约41 min,检测结果可以目视查验。

根据所能检测到的 C_t 值,其中最大 C_t 值为27.07,通过标准曲线进行计算分析,计算出拷贝数为 1.34×10^2 拷贝(图6)。由于 *toxR* 基因在轮虫弧菌中为单拷贝基因,即拷贝数等于菌个数,并且由于在制作模板的过程中需要加入水,将组织做成匀浆液,经过比例换算,得出对许氏

平鲈组织中轮虫弧菌的最低检测限为 1.34×10^3 CFU/g。

3 讨论

迄今为止,已有轮虫弧菌感染鱼^[26]、虾^[27]等不同水产动物的报道。而在我国,轮虫弧菌属于较新发现的水产动物病原,相关的研究和报道还比较少见。但从本实验室一些流行病学和病原学的研究结果来看,轮虫弧菌感染养殖动物发病后造成的损失也非常严重^[4],应引起足够的重视。开展其检测技术研究,可以有效防控养殖生产中轮虫弧菌的感染和传播。本研究基于获得的轮虫弧菌 *toxR* 基因全长序列,针对其中高度保守的区域设计引物,成功扩增了500 bp的目标片段,通过实时荧光定量 PCR 反应验证了其具有极高的特异性和敏感性,为开发轮虫弧菌的快速检测技术奠定了基础。

传统的细菌检测多采用16S *rDNA* 基因作为靶标序列,并成功建立了某些细菌的PCR分类鉴定方法。然而,由于弧菌种间的16S *rDNA* 的同源性较高,如霍乱弧菌和拟态弧菌的16S *rDNA* 同源性为99.6%,溶藻弧菌和副溶血弧菌的16S *rDNA* 同源性高达99.8%,因此难以用16S *rDNA* 基因序列进行弧菌的准确区分。而 *toxR* 基

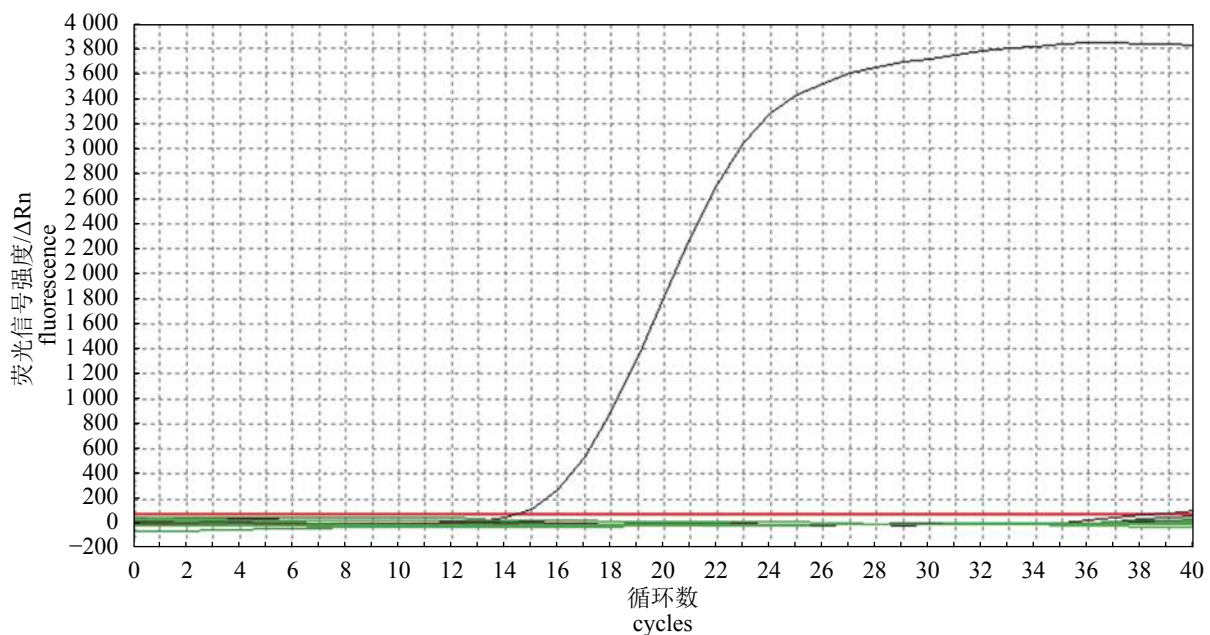


图3 荧光定量 PCR 特异性实验

Fig. 3 Specificity test of real-time PCR

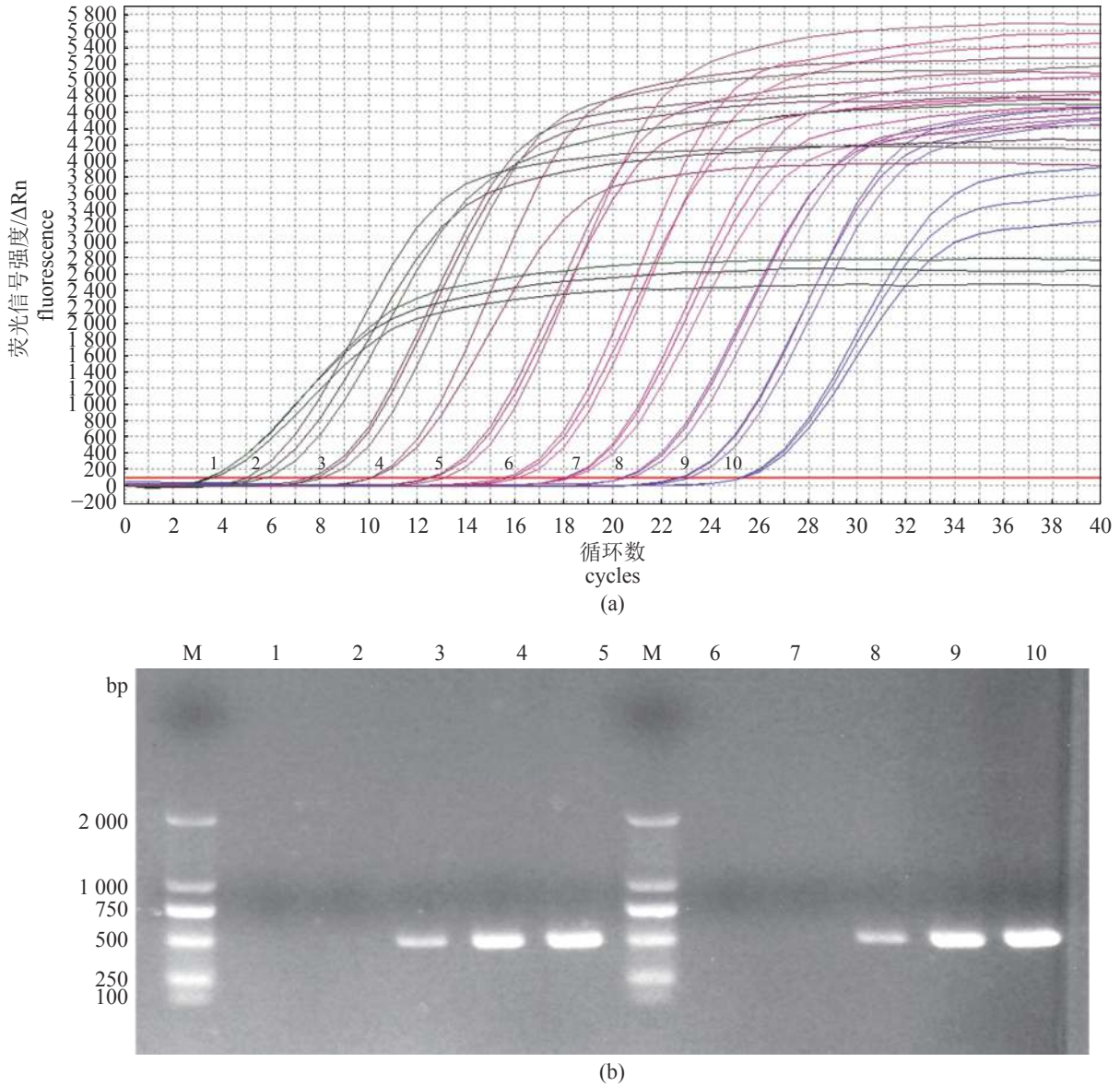


图 4 荧光定量 PCR 敏感性实验结果图和普通 PCR 敏感性实验结果

(a) 荧光定量 PCR 敏感性实验, 1. 1.34×10^9 拷贝/ μL ; 2. 1.34×10^8 拷贝/ μL ; 3. 1.34×10^7 拷贝/ μL ; 4. 1.34×10^6 拷贝/ μL ; 5. 1.34×10^5 拷贝/ μL ; 6. 1.34×10^4 拷贝/ μL ; 7. 1.34×10^3 拷贝/ μL ; 8. 1.34×10^2 拷贝/ μL ; 9. 1.34×10^1 拷贝/ μL ; 10. 1.34×10^0 拷贝/ μL ; (b) 普通 PCR 敏感性实验, 1, 6. 1.34×10^1 拷贝/ μL ; 2, 7. 1.34×10^2 拷贝/ μL ; 3, 8. 1.34×10^3 拷贝/ μL ; 4, 9. 1.34×10^4 拷贝/ μL ; 5, 10. 1.34×10^5 拷贝/ μL ; M. 标准物质 2000

Fig. 4 Fluorescence quantitative PCR sensitivity test and normal PCR sensitivity test

(a) fluorescence quantitative PCR test, 1. 1.34×10^9 copies/ μL ; 2. 1.34×10^8 copies/ μL ; 3. 1.34×10^7 copies/ μL ; 4. 1.34×10^6 copies/ μL ; 5. 1.34×10^5 copies/ μL ; 6. 1.34×10^4 copies/ μL ; 7. 1.34×10^3 copies/ μL ; 8. 1.34×10^2 copies/ μL ; 9. 1.34×10^1 copies/ μL ; 10. 1.34×10^0 copies/ μL ; (b) normal PCR sensitivity test; 1, 6. 1.34×10^1 copies/ μL ; 2, 7. 1.34×10^2 copies/ μL ; 3, 8. 1.34×10^3 copies/ μL ; 4, 9. 1.34×10^4 copies/ μL ; 5, 10. 1.34×10^5 copies/ μL ; M. DNA DL2000 marker

因比 16S *rDNA* 基因具有更高的多态性, 如霍乱弧菌和拟态弧菌的 *toxR* 基因的同源性只有 71.2%, 溶藻弧菌和副溶血弧菌的 *toxR* 基因同源性仅为 61.7%, 因此 *toxR* 基因比 16S *rDNA* 更适合建立弧菌种间的 PCR 鉴定方法^[28]。国内有很多关于

基于 *toxR* 基因进行荧光定量检测病原菌的报道, 2009 年文万饶等^[29] 建立了基于 *toxR* 基因快速检测河流弧菌 (*V. fluvialis*) 的方法。2011 年翁仕强等^[30] 建立了基于 *tlh* 和 *toxR* 特异性基因对副溶血弧菌进行快速分离鉴定的方法。随后, 霍乱弧

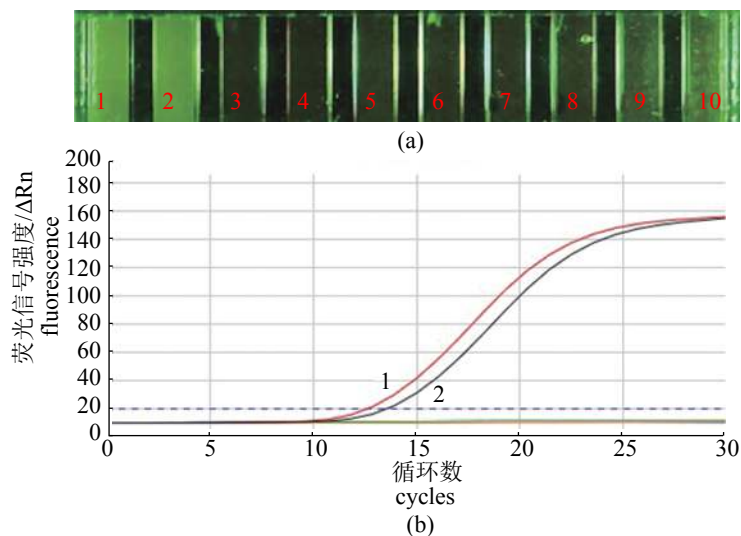


图5 微流控检测细菌纯培养物的芯片目检图和轮虫弧菌 *toxR* 基因特异性扩增曲线图

(a) 微流控检测芯片图, 1~2. 轮虫弧菌; 3~4. 鳃弧菌; 5~6. 哈维氏弧菌; 7~8. 灿烂弧菌; 9. 1.5% NaCl; 10. ddH₂O; (b) *toxR* 基因特异性扩增曲线图. 1~2. 轮虫弧菌

Fig. 5 Visual inspection of microfluidic chip (a) and *toxR* gene-specific amplification curve (b) of *V. rotiferianus*

(a) microfluidic chip test, 1-2. *V. rotiferianus*; 3-4. *V. anguillarum*; 5-6. *V. harveyi*; 7-8. *V. splendidus*; 9. 1.5% NaCl; 10. ddH₂O; (b) *toxR* gene-specific amplification curve; 1-2. *V. rotiferianus*

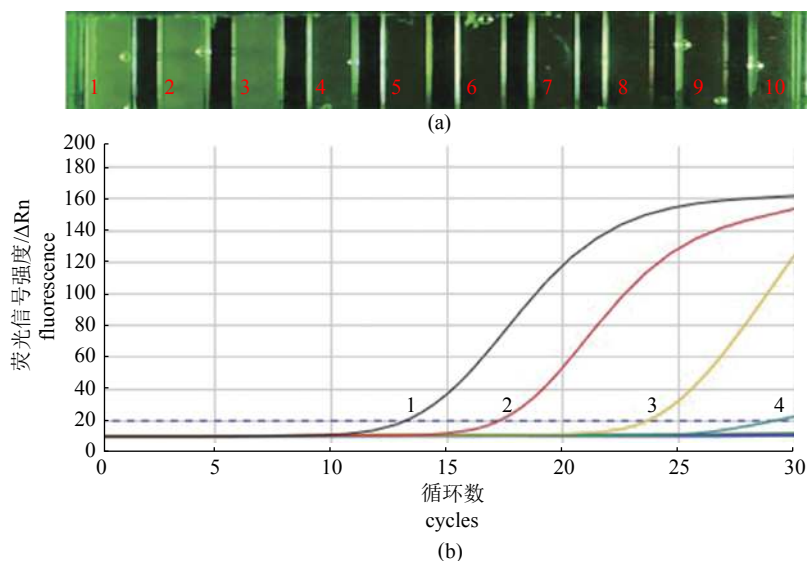


图6 微流控检测鱼体组织的芯片目检图和组织样品梯度稀释检测结果

(a) 微流控检测芯片图, 1. 原组织液; 2. 10^{-1} 原组织液; 3. 10^{-2} 原组织液; 4. 10^{-3} 原组织液; 5. 10^{-4} 原组织液; 6. 10^{-5} 原组织液; 7. 10^{-6} 原组织液; 8. 10^{-7} 原组织液; 9. 10^{-8} 原组织液; 10. ddH₂O; (b) *toxR* 基因特异性扩增曲线图, 1. 原组织液; 2. 10^{-1} 原组织液; 3. 10^{-2} 原组织液; 4. 10^{-3} 原组织液

Fig. 6 Visual inspection of microfluidic chip and gradient dilution test results of tissue samples

(a) microfluidic chip test, 1. original tissue fluid; 2. 10^{-1} of the original tissue fluid; 3. 10^{-2} of the original tissue fluid; 4. 10^{-3} of the original tissue fluid; 5. 10^{-4} of the original tissue fluid; 6. 10^{-5} of the original tissue fluid; 7. 10^{-6} of the original tissue fluid; 8. 10^{-7} of the original tissue fluid; 9. 10^{-8} of the original tissue fluid; 10. ddH₂O. (b) *toxR* gene-specific amplification curve; 1. original tissue fluid; 2. 10^{-1} of the original tissue fluid; 3. 10^{-2} of the original tissue fluid; 4. 10^{-3} of the original tissue fluid

菌、哈维氏弧菌等多种弧菌基于 *toxR* 基因的检测方法被建立起来^[31-34]。这些研究充分证明,

toxR 基因是非常适用于弧菌种间鉴定的靶标序列。而本研究的结果也充分证明, *toxR* 基因用于轮虫

弧菌的 PCR 检测特异性和敏感性都很高。

微流控作为分子生物学领域的一项新兴技术, 具有耗时短、成本低等特点^[35-36], 在医学和兽医等研究领域已经进行了广泛的应用^[37-38], 但在水产动物疾病诊断方面的应用较少。本研究选用的 UF-150 Genechecker 微流控快速荧光定量 PCR 仪, 更是具有突出的便携性优势, 非常适合开发新型的现场快速检测平台。本研究基于该仪器平台, 用设计的特异性引物, 通过优化 PCR 反应的体系和条件, 成功建立了轮虫弧菌的微流控荧光定量检测技术, 实现了检测结果的目视定性判读。通过对感染动物的检测应用, 证实该方法对动物组织中轮虫弧菌的最低检出限为 1.34×10^3 CFU/g, 显著低于其对许氏平鲷的半致死浓度^[4], 检测时间只有约 41 min, 缩短了荧光定量 PCR 反应的时间, 已经具备了现场应用的能力, 这为进一步开发实用化的水产动物病原现场精准快速检测技术奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] Gomez-Gil B, Thompson F L, Thompson C C, *et al.* *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(1): 239-243.
- [2] Roy C P, Boucher Y, Hassan K A, *et al.* Genome sequence of *Vibrio rotiferianus* strain DAT722[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(13): 3381-3382.
- [3] 陈政强, 姚志贤, 林茂, 等. 半滑舌鲷病原菌轮虫弧菌 (*Vibrio rotiferianus*) 的分离与鉴定[J]. *生物技术通报*, 2012(6): 147-153.
- Chen Z Q, Yao Z X, Lin M, *et al.* Characterization of pathogenic bacteria *Vibrio rotiferianus* isolated from *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012(6): 147-153(in Chinese).
- [4] 王凯, 王印庚, 姜勇, 等. 一株感染深水网箱养殖许氏平鲷的病原菌分离与鉴定[J]. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 119-126.
- Wang K, Wang Y G, Jiang Y, *et al.* Isolation, identification, and biological characteristics of a pathogenic bacterial strain from cage-cultured black rockfish (*Sebastes schlegelii*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 119-126(in Chinese).
- [5] Osorio C R, Klose K E. A region of the transmembrane regulatory protein *toxR* that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(2): 526-528.
- [6] Conejero M J U, Hedreyda C T. Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(3): 602-611.
- [7] 郝景伟, 高保全, 王崇, 等. 致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌 (VpAHPND) 自然感染三疣梭子蟹[J]. *水产学报*, 2019, 43(7): 1647-1660.
- Hao J W, Gao B Q, Wang C, *et al.* Natural infection of *Portunus trituberculatus* with acute hepatopancreas necrosis disease causing by *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(7): 1647-1660.
- [8] Lee S E, Shin S H, Kim S Y, *et al.* *Vibrio vulnificus* Has the transmembrane transcription activator *toxRS* stimulating the expression of the hemolysin gene *vwA*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(12): 3405-3415.
- [9] Miller V L, Mekalanos J J. Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81(11): 3471-3475.
- [10] Miller V L, Mekalanos J J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(6): 2575-2583.
- [11] Chen C, Wang Q B, Liu Z H, *et al.* Characterization of role of the *toxR* gene in the physiology and pathogenicity of *Vibrio alginolyticus*[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2012, 101(2): 281-288.
- [12] 王青柏, 胡超群, 罗鹏, 等. 拟态弧菌全长 *toxR* 基因的克隆和序列分析[J]. *热带海洋学报*, 2008, 27(3): 50-54.
- Wang Q B, Hu C Q, Luo P, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of full-length *toxR* gene of *Vibrio mimicus*[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2008, 27(3): 50-54(in Chinese).
- [13] Okuda J, Nakai T, Chang P S, *et al.* The *toxR* gene of *Vibrio (Listonella) anguillarum* controls expression of the major outer membrane proteins but not virulence in a natural host model[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(10): 6091-6101.
- [14] 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[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(12): 3844-3855.
- [15] 姚东瑞, 朱明, 陈丽, 等. 基于 *toxR* 基因病原哈氏弧菌 PCR 检测方法的建立[J]. *水产科学*, 2011, 30(9): 559-562.
- Yao D R, Zhu M, Chen L, *et al.* Development of PCR method for detection of pathogenic bacterium *Vibrio Harveyi* based on *toxR* gene[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(9): 559-562(in Chinese).
- [16] Zhang Z, Yu Y X, Jiang Y, *et al.* First report of isolation and complete genome of *Vibrio rotiferianus* strain SSVR1601 from cage-cultured black rockfish (*Sebastes schlegelii*) associated with skin ulcer[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(5): 623-630.
- [17] Park S, Zhang Y, Lin S, *et al.* Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 830-839.
- [18] Erickson D, Li D Q. Integrated microfluidic devices[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 507(1): 11-26.
- [19] Hofgartner W T, Huhmer A F R, Landers J P, *et al.* Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis using microchip electrophoresis of PCR products[J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(12): 2120-2128.
- [20] Chen Y H, Wang W C, Young K C, *et al.* Plastic microchip electrophoresis for analysis of PCR products of hepatitis C virus[J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(11): 1938-1943.
- [21] Liao C S, Lee G B, Liu H S, *et al.* Miniature RT-PCR system for diagnosis of RNA-based viruses[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(18): e156.
- [22] Marcus J S, Anderson W F, Quake S R. Parallel picoliter RT-PCR assays using microfluidics[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(3): 956-958.
- [23] Lagally E T, Scherer J R, Blazej R G, *et al.* Integrated portable genetic analysis microsystem for pathogen/infectious disease detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(11): 3162-3170.
- [24] Pal R, Yang M, Lin R, *et al.* An integrated microfluidic device for influenza and other genetic analyses[J]. *Lab on a Chip*, 2005, 5(10): 1024-1032.
- [25] Raymond C R, Wilkie B N. Th-1/Th-2 type cytokine profiles of pig t-cells cultured with antigen-treated monocyte-derived dendritic cells[J]. *Vaccine*, 2004, 22(8): 1016-1023.
- [26] Austin B, Austin D, Sutherland R, *et al.* Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*[J]. *Environmental microbiology*, 2005, 7(9): 1488-1495.
- [27] Zhang X J, Yan B L, Bai X S, *et al.* Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio rotiferianus* associated with mass mortality of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2014, 33(1): 61-68.
- [28] 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[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(4): 1173-1177.
- [29] 文万饶, 谢珍玉, 徐先栋, 等. 基于 *toxR* 基因的河流弧菌 PCR 快速检测方法的建立[J]. *水产科学*, 2009, 28(10): 575-578.
- Wen W R, Xie Z Y, Xu X D, *et al.* Establishment of a rapid PCR detection method for *Vibrio fluvialis* based on *toxR* gene[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(10): 575-578(in Chinese).
- [30] 翁仕强, 赵勇, 潘迎捷, 等. 基于特异性基因的副溶血性弧菌快速分离鉴定[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(3): 417-421.
- Weng S Q, Zhao Y, Pan Y J, *et al.* Rapid isolation and identification method based on specific gene for *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(3): 417-421(in Chinese).
- [31] 秦国民, 张晓君, 毕可然, 等. 基于 *lolB* 和 *toxR* 两种基因的水产品中霍乱弧菌双重 PCR 检测方法[J]. *食品科学*, 2011, 32(22): 273-275.
- Qin G M, Zhang X J, Bi K R, *et al.* Detection of *Vibrio cholerae* from aquatic animals by duplex PCR based on *lolB* and *toxR* genes[J]. *Food Science*, 2011, 32(22): 273-275(in Chinese).
- [32] 张晓君, 梁利国, 阎斌伦, 等. 基于 *toxR* 基因的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测病原副溶血弧菌方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(4): 543-547.
- Zhang X J, Liang L G, Yan B L, *et al.* Development of a SYBR green I real-time PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus* based on *toxR* gene[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32(4): 543-547(in Chinese).
- [33] 曹冬梅, 袁慕云, 许龙岩, 等. 食品中副溶血性弧菌 *toxR* 和 *tdh* 基因双色荧光 PCR 检测方法的建立[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(5): 1451-1457.
- Cao D M, Yuan M Y, Xu L Y, *et al.* Detection of *Vibrio parahaemolyticus toxR* and *tdh* genes in foods by dual-

- color fluorescent real-time PCR[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2013, 4(5): 1451-1457(in Chinese).
- [34] 高晓建, 姚东瑞, 孙晶晶, 等. 4株长牡蛎(*Crassostrea gigas*)致病性哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)鉴定及其毒力基因检测[J]. *海洋湖沼通报*, 2015(3): 87-96.
- Gao X J, Yao D R, Sun J J, *et al.* Identification of 4 pathogenic *Vibrio harveyi* strains isolated from diseased oyster (*Crassostrea gigas*) and detection of their virulence genes[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(3): 87-96(in Chinese).
- [35] Zhang Q, Zhu L, Feng H H, *et al.* Microbial detection in microfluidic devices through dual staining of quantum dots-labeled immunoassay and RNA hybridization[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 556(1): 171-177.
- [36] Irawan R, Tjin S C, Fang X Q, *et al.* Integration of optical fiber light guide, fluorescence detection system, and multichannel disposable microfluidic chip[J]. *Bio-medical Microdevices*, 2007, 9(3): 413-419.
- [37] 苑宝龙, 王晓东, 杨平, 等. 用于农药残留现场快速检测的微流控芯片研制[J]. *食品科学*, 2016, 37(2): 198-203.
- Yuan B L, Wang X D, Yang P, *et al.* Fabrication and analytical application of microfluidic chip for rapid on-site detection of pesticide residues[J]. *Food Science*, 2016, 37(2): 198-203(in Chinese).
- [38] 叶嘉明, 邵佳美, 杨平, 等. 用于农残快速检测的离心式微流控芯片研制[J]. *食品科学*, 2017, 38(12): 292-297.
- Ye J M, Shao J M, Yang P, *et al.* Fabrication and application of centrifugal microfluidic chip for rapid detection of pesticide residues[J]. *Food Science*, 2017, 38(12): 292-297(in Chinese).

Establishment of a fluorescence quantitative microfluidic rapid detection technique for *Vibrio rotiferianus* based on *toxR* gene

CHEN Jing^{1,2}, YU Yongxiang², ZHANG Zheng^{2,3*}, WANG Yingeng^{2,3},
LIAO Meijie^{2,3}, RONG Xiaojun^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy 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 266237, China)

Abstract: The highly conserved region of *toxR* gene of *Vibrio rotiferianus* was selected as the target fragment for the specific primer design. The recombinant plasmid was constructed based on the primers and we established a fluorescence quantitative PCR method for *V. rotiferianus*. And UF-150 Genechecker microfluidic quantitative real-time PCR instrument was used as a platform to develop a microfluidic quantitative real-time PCR detection method for *V. rotiferianus* via the optimized reaction system and reaction conditions. The results indicated that, this method can specifically amplify *toxR* gene target fragment, and the lower detection limit for *V. rotiferianus* is 1.34×10^0 copies/ μ L. Artificial infection detection results show that the lower detection limit for *V. rotiferianus* in fish tissues is 1.34×10^3 CFU/g. The results can be visually interpreted and the detection time was less than 42 min. This method has prominent advantages of strong specificity, high sensitivity and low site requirements, and it is suitable for developing practical field rapid detection technology of aquatic pathogens.

Key words: *Vibrio rotiferianus*; *toxR* gene; quantitative real-time PCR; microfluidic rapid detection

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

Funding projects: National Key R & D Program of China (2019YFD0900104); Key Projects of Science and Technology Innovation of Shandong Province (2018YFJH0703)