

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221011001

http://www.yykxjz.cn/

李昊, 张铭洋, 于永翔, 王印庚, 张正, 马翠萍, 陈夫山. 对虾肝胰腺坏死病副溶血弧菌双重微流控荧光定量 PCR 快速检测技术的建立与应用. 渔业科学进展, 2023, 44(3): 235–244

LI H, ZHANG M Y, YU Y X, WANG Y G, ZHANG Z, MA C P, CHEN F S. Establishment and application of dual microfluidic fluorescent quantitative PCR for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp hepatopancreatic necrosis. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(3): 235–244

# 对虾肝胰腺坏死病副溶血弧菌双重微流控荧光定量 PCR 快速检测技术的建立与应用\*

李昊<sup>1,2</sup> 张铭洋<sup>1,2</sup> 于永翔<sup>2</sup> 王印庚<sup>2①</sup> 张正<sup>2</sup> 马翠萍<sup>1</sup> 陈夫山<sup>1</sup>

(1. 青岛科技大学海洋科学与生物工程学院 山东 青岛 266042; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

**摘要** 急性肝胰腺坏死病(AHPND)是对虾养殖过程中最常见、最严重的疾病,给对虾养殖造成重大经济损失。AHPND 病原种类多、基因型复杂,现有的针对不同病原的检测技术目标导向较弱、检测成本高、时间消耗长,对虾健康养殖亟待开发 AHPND 的精准快速诊断技术。本研究针对 AHPND 病原体携带编码一种二元毒素 *pirA* 和 *pirB* 大型质粒的遗传共性,基于 *pirA* 和 *pirB* 基因设计特异性引物并建立微流控荧光定量 PCR 检测方法。该方法对致病基因 *pirA* 和 *pirB* 特异性强、灵敏度高,最低检测限分别为  $5.43 \times 10^0$  和  $4.31 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ,样品平均检测时间为 26 min 左右。为进一步评估该方法在实际应用中的准确性,以含有 *pirA* 和 *pirB* 毒性质粒的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)进行人工感染实验。结果表明,感染后的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)鳃丝、肝胰腺、肠道和肌肉等组织随时间的推迟均能检测到 *pirA* 和 *pirB*;从感染 2 h 的结果来看,*pirB* 比 *pirA* 检出率更高。此外,致病因子 *pirA* 和 *pirB* 比 *toxR* 的检出率更高,更适合对 AHPND 致病原的检测。本研究建立的微流控荧光定量 PCR 检测的方法具有快速、灵敏、高通量、污染少、现场检测、一体化集成等优点。该技术不仅适用于实验室,更符合养殖基层的现场快速检测需求,为及早认知疾病发生风险和病害精准防控提供了新的技术手段与理论支撑。

**关键词** 急性肝胰腺坏死病;副溶血弧菌;*pirA*;*pirB*;微流控芯片;现场检测

**中图分类号** S967 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)03-0235-10

急性肝胰腺坏死病(AHPND)最初被称为早期死亡综合征(EMS),是对虾养殖中最常见、最严重的疾病之一(Shen *et al.*, 2021)。近年来,在中国、越南、马来西亚、菲律宾、泰国和墨西哥等国家都相继报道了 AHPND 的暴发,给全球虾类养殖业造成重大经济

损失(贾丹等, 2018)。2014 年以来,我国养殖对虾的 AHPND 发病率高达 60%~80%,养殖产能降低、产量不稳定,使我国从对虾出口国变为进口国。据报道,可引起 AHPND 的主要致病原是副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) (Wang *et al.*, 2015)。此外,哈维氏

\* 国家重点研发计划课题(2019YFD0900102)、山东省泰山产业领军人才项目(LJNY201802)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2022GH02; 2020TD40)共同资助。李昊, E-mail: lhao169@163.com

① 通信作者: 王印庚, 研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-10-11, 收修改稿日期: 2022-11-22

弧菌(*Vibrio harveyi*) (Kondo *et al.*, 2015)、坎贝氏弧菌(*Vibrio campbellii*) (Ahn *et al.*, 2017)、欧文氏弧菌(*Vibrio owensii*) (Liu *et al.*, 2015)也可造成类似的病症, 呈现明显的病原多样性。

副溶血弧菌是一种革兰氏阴性、嗜盐细菌, 在世界各地的海洋和河口环境中广泛传播(Yang *et al.*, 2019)。研究表明, 不是所有的副溶血弧菌都能引起AHPND, 经全基因组测序及基因敲除发现, *pirA* 和 *pirB* 是引起对虾 AHPND 的主要致病因子(Lee *et al.*, 2015)。其中, *pirB* 毒素主要决定该菌的致病力, *pirA* 毒力相对较弱(Dangtip *et al.*, 2015)。确切地说, AHPND 的致病原因是染色体外毒力质粒 pVA1 中携带二元毒素 *pirA<sup>Vp</sup>* 和 *pirB<sup>Vp</sup>* 的副溶血弧菌的特定菌株(Powers *et al.*, 2021)。其后, 其他弧菌也被发现携带二元毒素基因 *pirA<sup>Vp</sup>* 和 *pirB<sup>Vp</sup>* (Dong *et al.*, 2017; Restrepo *et al.*, 2018; Dhar *et al.*, 2019)。进一步研究表明, 毒力质粒 pVA1 还编码一个分离后杀伤系统以及一套接合转移和动员基因, 可促进其在不同弧菌之间的传播(Yang *et al.*, 2019)。因此, 针对致病因子 *pirA* 和 *pirB* 设计特异性引物用于准确检测 AHPND 及精确防控疾病具有重要的科学价值和现实意义。

现阶段, AHPND 病原菌分子检测的技术手段主要有 PCR、定量 PCR 和环介导等温扩增技术(LAMP)等(Arunrut *et al.*, 2016)。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)与常规 PCR 相比, 具有污染少、定量准确、实时监测、自动化程度高等优点, 该技术已被应用于转基因检测(Michelini *et al.*, 2008)、环境科学(Cummings *et al.*, 2003)以及医学(Lee *et al.*, 2004)等领域。然而, 该技术具有耗时长、涉及多种仪器和试剂、对人员的专业技能和经验要求高等特点。Kongrueng 等(2015)设计的 2 组引物(LAMP-a2 和 LAMP-a3)在 LAMP 检测中用于特异识别引起 AHPND 的副溶血弧菌。上述方法虽然灵敏度高, 但假阳性问题比较严重。微流控芯片检测技术允许多个单元的灵活组合并具有整体可控性, 因此, 包括样品制备和检测在内的一些步骤可以集成到单个芯片中。由于芯片是微米级甚至纳米级的, 它具有高比表面积、高扩散系数、快速传热等特点(Zhao *et al.*, 2019)。值得注意的是, 将 qPCR 技术与微流控芯片技术相结合, 与普通 PCR 相比, 微流控荧光定量 PCR 技术具有实现高灵敏、多通道、自动化和现场快速检测的潜力。

在水产领域, 微流控检测技术研究相对较少, 本实验室在前期研究中, 已经针对鱼类美人鱼发光杆菌

美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*)开展了微流控快速检测技术的研究(Zhang *et al.*, 2021)。Sirikharin 等(2015)研究表明, 尽管毒力质粒编码的二元基因 *pirA<sup>Vp</sup>* 和 *pirB<sup>Vp</sup>* 是 AHPND 的主要致病因素, 但毒力基因 *toxR* 和 *toxA* 在副溶血弧菌中普遍存在, 并在对虾感染过程中通过 16S rRNA 基因的遗传多样性发挥重要作用。基于此, 针对 *pirA* 和 *pirB* 基因设计特异性引物, 通过优化反应体系和反应条件, 本研究建立可用于现场检测的双重微流控荧光定量快速检测方法, 为早期识别疾病风险和快速治疗提供技术保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

实验中使用的病原菌包括含有 *pirA* 和 *pirB* 的副溶血弧菌 *Vp<sub>AHPND</sub>* (标记为 Vp1001), 不含有 *pirA* 和 *pirB* 的副溶血弧菌(标记为 F3-7)。此外, 还包括实验室保藏的其他 7 种病原菌(表 1), 用于特异性检验分析。

表 1 实验所用菌株  
Tab.1 Strains used in the experiment

菌株 Strain	拉丁名 Latin name	菌株编号 Strain number
副溶血弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>	F3-7 Vp1001
哈维氏弧菌	<i>V. harveyi</i>	ATCC 35084
美人鱼发光杆菌 美人鱼亚种	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	PDD 1605
大菱鲆弧菌	<i>V. scopthalmi</i>	Vs0531
鳗弧菌	<i>V. anguillarum</i>	Va020630
灿烂弧菌	<i>V. splendidus</i>	Vs1805
嗜环弧菌	<i>V. cyclitrophicus</i>	Vc0406
轮虫弧菌	<i>V. rotiferianus</i>	Vr1711

### 1.2 引物设计及特异性实验

本研究根据 GenBank 中登录的 *pirA* 和 *pirB* 基因的保守序列设计引物, 再通过 NCBI 中 Blast 验证引物的特异性。设计完成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 *Vp<sub>AHPND</sub>* 作为检测目标菌, 非致 AHPND 的副溶血弧菌(非 *Vp<sub>AHPND</sub>*)、哈维氏弧菌和大菱鲆弧菌等其他 8 株细菌作为对照菌, 无菌水作为空白对照, 使用实验室实时荧光定量 PCR 仪进行扩增, 验证各引物的特异

性。反应体系:  $2 \times Taq$  Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu$ L, 正/反引物各 0.4  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L, 去离子水 7.2  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 30 s, 95  $^{\circ}$ C

5 s, 退火温度(58~63  $^{\circ}$ C) 30 s, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 进行 40 次循环, 并依据扩增效果最终确定最佳退火温度及反应条件。

表 2 实验所用引物  
Tab.2 Primers used in the experiment

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 Sequence of primers (5'~3')	产物长度 Length of the product/bp	参考文献 Reference
<i>pirA</i>	<i>pirA</i> -F	TGACTATTCTCACGATTGGACTG	284	本文 This study
	<i>pirA</i> -R	CACGACTAGCGCCATTGTTA		
<i>pirB</i>	<i>pirB</i> -F	TGATGAAGTGATGGGTGCTC	392	
	<i>pirB</i> -R	TGTAAGCGCCGTTAACTCA		
<i>pirA</i>	F	TTGGACTGTCGAACCAAACG	135	Han 等(2015)
	R	GACCCATTGGTATTGAATG		
<i>toxR</i>	<i>toxR</i> -F	CCTGTGGCTTCTGCTGTGAA	226	徐媛媛等(2022)
	<i>toxR</i> -R	CTGCATGGTGCTTAACGTAGC		

### 1.3 标准曲线的建立

以  $Vp_{AHPND}$  的 DNA 为模板, 用设计的 *pirA* 和 *pirB* 的 2 对引物分别进行常规 PCR 扩增, 扩增产物切胶回收后连接至 pMD-19T 载体, 转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH-5 $\alpha$  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  $Vp_{AHPND}$  已构建的标准品增菌培养后提取质粒, 按 10 倍梯度稀释 6 个梯度分别进行 qPCR 扩增并绘制标准曲线。

### 1.4 双重微流控荧光定量 PCR 灵敏度实验

将构建的 *pirA* 和 *pirB* 质粒标准品分别按 10 倍梯度稀释为  $10^9 \sim 10^0$  copies/ $\mu$ L。将稀释后的标准品分别作为模板进行 qPCR 扩增, 每个梯度设 3 个平行, 验证其灵敏度。

### 1.5 双重微流控荧光定量 PCR 反应条件的优化

用含有 *pirA* 和 *pirB* 菌株的 DNA 作为模板, 比较单重微流控荧光定量 PCR 的退火温度, 分别在反应温度为 58~63  $^{\circ}$ C 下进行扩增, 最终筛选出 2 对引物最佳共同退火温度。同时, 分别设反应循环数为 25、30、35 和 40, 验证最佳反应循环数。

### 1.6 双重微流控荧光定量 PCR 芯片集成

以  $Vp_{AHPND}$  和非  $Vp_{AHPND}$  的 DNA 作为模板, 用实验室设计的 *pirA* 和 *pirB* 引物、*toxR* (徐媛媛等, 2022) 和 *pirA* (Han *et al.*, 2015) 于微流控荧光定量 PCR 上集成, 验证本研究设计的 2 对引物在该仪器上应用的可

行性以及准确性。

### 1.7 人工感染

人工感染实验所用凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) (体长为 5~8 cm, 平均体重为 3.3 g) 均购自山东省青岛市某养殖场。将健康对虾在水族实验室水桶中暂养 1 周, 养殖用水经消毒、过滤、沉淀和曝气, 实验期间连续充气, 并保持水温为 (27 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C, 盐度为 20。攻毒实验采取浸浴和注射 2 种方式进行, 实验分为 7 组, 即  $Vp_{AHPND}$  浸浴和注射 2 组, 非  $Vp_{AHPND}$  浸浴和注射 2 组, DH5 $\alpha$  浸浴和注射 2 组, 空白对照 1 组。挑选个体大小均匀、健康的对虾, 每桶 10 尾。

F3-7 和 Vp1001 两株实验菌分别在 TSB 培养基上进行培养, 28  $^{\circ}$ C 恒温培养 18~24 h, 挑取单菌落培养于含有 1.5% NaCl 的 TSB 液体培养基中, 28  $^{\circ}$ C 下恒温培养过夜, 离心重悬后, 在浸浴组养殖水体中加入预先制备好的菌液, 使菌含量的终浓度为  $10^6$  CFU/mL。在注射组中, 注射 30  $\mu$ L 菌液 (浓度为  $10^6$  CFU/mL) 到对虾肌肉中。空白对照组只用养殖水饲养, 实验期间不投喂。

### 1.8 不同对虾组织 *pirAB* 定量检测

分别于攻毒后第 2、6 和 12 小时采集对照组与实验组的水样, 并随机捞取 2 尾凡纳滨对虾, 对肌肉、肝胰腺、鳃丝和肠道 4 个组织进行取样处理。将组织用剪刀剪碎并充分混匀, 按照 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN) 说明书步骤提取组织 DNA。用提取好的 DNA, 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 结果与分析

### 2.1 致病因子 *pirA* 和 *pirB* 引物特异性验证

用预实验最终确定的退火温度(60 °C), 用本研究设计的 *pirA* 和 *pirB* 两对引物分别对 *Vp<sub>AHPND</sub>* 菌株、非 *Vp<sub>AHPND</sub>* 菌株、哈维氏弧菌、美人鱼发光杆菌美人鱼亚种、大菱鲂弧菌、鳗弧菌、灿烂弧菌、嗜环弧菌和轮虫弧菌同时进行 qPCR 检测。实验结果显示, 只有 *Vp<sub>AHPND</sub>* 菌株(菌株 *Vp1001*)成功扩增获得 *pirA* 和 *pirB* 两个基因(图 1), 而其他的病原菌检测结果均为阴性。结果表明, 本研究所设计的 *pirA* 和 *pirB* 两对引物可以特异性检测出含有 *pirA* 和 *pirB* 的病原

菌, 而对其他不含有 *pirA* 和 *pirB* 的病原菌无扩增, 满足特异性检测的需要。

### 2.2 标准曲线的建立

将含有致病因子 *pirA* 和 *pirB* 的 2 个质粒标准品分别按 10 倍梯度稀释成 6 个梯度, 进行 qPCR 扩增, 并绘制标准曲线。结果如图 2a 所示, *pirA* 的标准曲线在  $5.43 \times 10^9 \sim 5.43 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L 浓度范围内有良好的线性相关性( $y = -3.145x + 6.63$ ,  $R^2 = 0.999$ )。如图 2b 所示, *pirB* 的标准曲线在  $4.31 \times 10^9 \sim 4.31 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L 浓度范围内有良好的线性相关性( $y = -3.015x + 5.45$ ,  $R^2 = 0.999$ )。

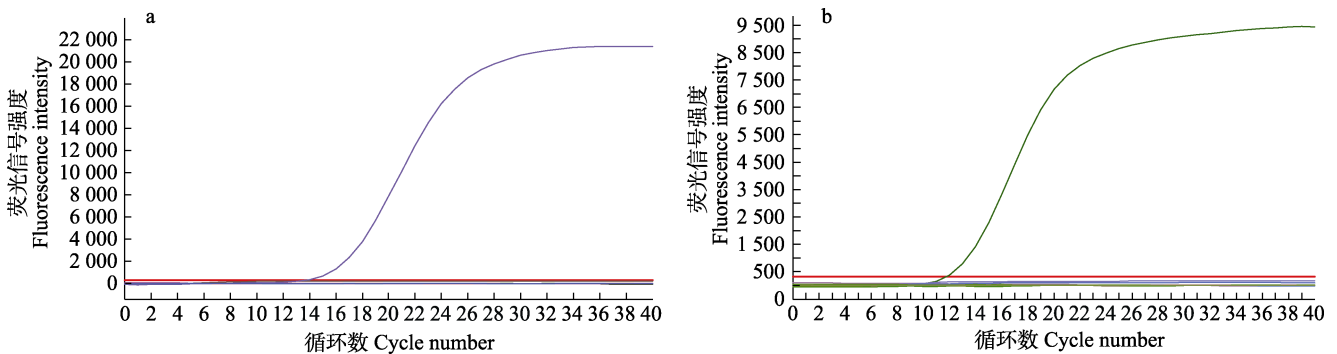


图1 *pirA* 和 *pirB* 引物特异性验证

Fig.1 Specificity validation of *pirA* and *pirB* primer

a: *pirA*; b: *pirB*

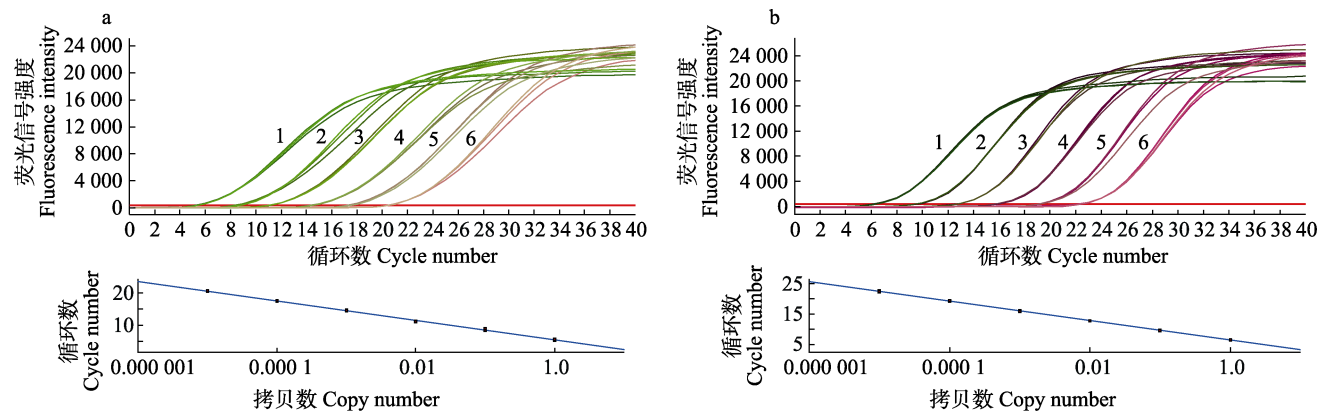


图2 构建成功 *pirA* 和 *pirB* 的质粒标准品扩增曲线和标准曲线

Fig.2 Amplification curve and standard curve of the plasmid standard for the successful construction of *pirA* and *pirB*

a: *pirA*; b: *pirB*; 1:  $10^9$  copies/ $\mu$ L; 2:  $10^8$  copies/ $\mu$ L; 3:  $10^7$  copies/ $\mu$ L; 4:  $10^6$  copies/ $\mu$ L; 5:  $10^5$  copies/ $\mu$ L; 6:  $10^4$  copies/ $\mu$ L

### 2.3 双重微流控荧光定量 PCR 灵敏度实验结果

将含有目的基因靶标的标准品连续稀释 10 倍作为模板, 进行 3 个重复的荧光定量 PCR, 以去离子水进行阴性对照。 *pirA* 标准品 DNA 模板在  $10^1$

和  $10^0$  copies/反应时, 3 个平行实验的  $C_t$  值分别为 31.11、31.12、31.24 和 32.25、32.38、32.29; *pirB* 标准品 DNA 模板在  $10^1$  copies/反应时, 3 个平行实验的  $C_t$  值分别为 31.96、31.99、32.15, 且都有明显的扩增

曲线。在实际应用中, 为保证检测结果的可靠性和准确性, 常以  $C_t$  值 35.00 为界限, 当  $C_t$  值  $\leq 35.00$  且有扩增曲线, 判定为阳性。因此, *pirA* 和 *pirB* 的最低检测限分别为  $5.43 \times 10^0$  和  $4.31 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L (图 3)。

#### 2.4 双重微流控荧光定量 PCR 芯片集成

优化致病因子 *pirA* 和 *pirB* 双重微流控荧光定量 PCR 扩增条件: 以制备好的 *pirA* 和 *pirB* 质粒标准品分别作为模板, 将荧光定量 PCR 体系分别在 58~63 °C 下进行扩增, 对扩增曲线进行分析。最终确定引物浓

度为 1  $\mu$ mol/L, 最佳反应温度为 60 °C, 反应循环数为 30, 检测时间为 26 min 左右。

以  $Vp_{AHPND}$  和非  $Vp_{AHPND}$  的 DNA 作为模板, 用本文设计的 2 对引物(*pirA* 和 *pirB*)和引物 *toxR* 于微流控荧光定量 PCR 上集成, 验证 3 对引物在该仪器上应用的可行性; 同时引用 Han 等(2005)的引物验证本研究设计引物的准确性。结果显示, 共有 5 条扩增曲线, 分别是非  $Vp_{AHPND}$  组的 *toxR* 1 条扩增曲线,  $Vp_{AHPND}$  组的 *pirA*、*pirB* 和 *toxR* 3 条扩增曲线, *pirA* (Han *et al.*, 2005) 1 条扩增曲线, 非  $Vp_{AHPND}$  组 *pirA*、*pirB* 和空白对照组均未产生扩增曲线(图 4)。

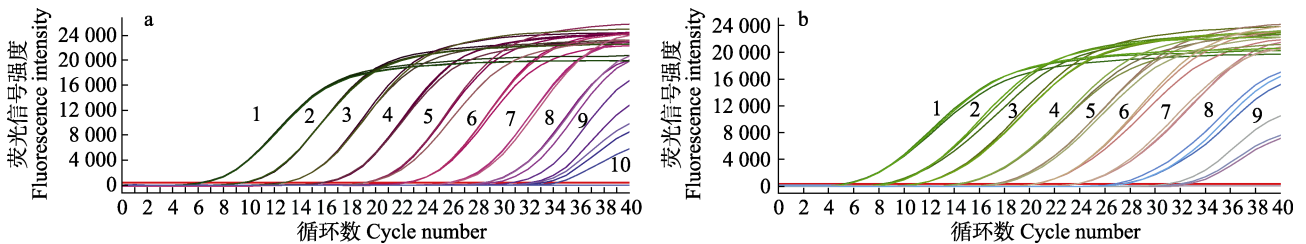


图 3 *pirA* 和 *pirB* 荧光定量 PCR 灵敏度实验

Fig.3 Sensitivity test of *pirA* and *pirB* fluorescence quantitative PCR

a: *pirA*; b: *pirB*; 1~10:  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  copies/ $\mu$ L

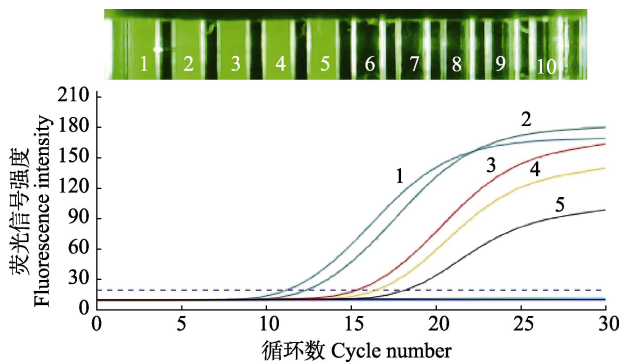


图 4 微流控集成图

Fig.4 Microfluidic integration diagram

- 1:  $Vp_{AHPND}$  *pirA*; 2:  $Vp_{AHPND}$  *pirB*;  
3: 非  $Vp_{AHPND}$  *toxR* (Non- $Vp_{AHPND}$  *toxR*); 4:  $Vp_{AHPND}$  *toxR*;  
5: *pirA* (Han *et al.*, 2005); 6: 非  $Vp_{AHPND}$  *pirA* (Non- $Vp_{AHPND}$  *pirA*);  
7: 非  $Vp_{AHPND}$  *pirB* (Non- $Vp_{AHPND}$  *pirB*); 8: ddH<sub>2</sub>O

#### 2.5 不同凡纳滨对虾组织样品检测结果

选取凡纳滨对虾为实验对象, 应用已建立的方法对 7 个实验组的水样和 4 个组织部位(鳃丝、肝胰腺、肌肉和肠道)进行样品检测, 与实验室常规实时荧光定量 PCR 进行同步检测作对比。实验中, 非  $Vp_{AHPND}$  组、大肠杆菌阳性对照组和空白组的样本检测结果均

为阴性,  $Vp_{AHPND}$  组在对虾感染 AHPND 过程中不同感染方式的检测结果不同, 在不同时间段各个组织先后感染程度也不相同(表 3、表 4)。

*pirA* 基因在注射的实验组中, 水样检测结果均为阴性, 浸浴实验组水样均为阳性。且在注射实验组中, 2~12 h 时所取对虾的 4 个组织样品的检测结果均为阳性。在浸浴实验组中有着不同实验结果, 2 h 时, 肝胰腺和肠道检测为阴性, 鳃和肌肉为阳性; 6 h 时, 只有肝胰腺为阴性, 其他样品均为阳性; 12 h 时, 全部组织均为阳性。

*pirB* 基因的检测结果与注射感染 *pirA* 时的检测结果相同, 与浸浴感染 *pirA* 时有所不同。在浸浴 2 h 时, 只有肠道为阴性, 其他样品均为阳性; 6 h 和 12 h 的全部样品均为阳性。

$Vp_{AHPND}$  和非  $Vp_{AHPND}$  组的 *toxR* 基因的检测结果相同。浸浴组中, 2 h 时水样检测为阳性, 4 个组织检测结果均为阴性; 6 h 和 12 h 的所有样品均为阳性。注射组中, 除了水样检测为阴性外, 所有时间段的其他样品均为阳性。

在菌株检测水平, *pirA* 的灵敏度优于 *pirB*, 但在人工感染实践中 *pirB* 比 *pirA* 有更高的灵敏度, 因此, 实验中的结果应用于生产实践时需结合宿主做进

表3 基于 *pirA* 和 *pirB* 微流控荧光定量 PCR 的应用效果对比Tab.3 Comparison of application effects of microfluidic fluorescence quantitative PCR based on *pirA* and *pirB*

基因 Gene	时间 Time/h	感染方式 Mode of infection	养殖水样 Aquaculture water sample	鳃丝 Gill filament	肝胰腺 Hepatopancreas	肌肉 Muscle	肠道 Intestinal tract
<i>pirA</i>	2	浸浴 Bath	+++ / +++	+++ / +++	--- / ---	+++ / +++	--- / ---
		注射 Injection	--- / ---	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
	6	浸浴 Bath	+++ / +++	+++ / +++	--- / ---	+++ / +++	+++ / +++
		注射 Injection	--- / ---	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
	12	浸浴 Bath	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
		注射 Injection	--- / ---	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
<i>pirB</i>	2	浸浴 Bath	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	--- / ---
		注射 Injection	--- / ---	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
	6	浸浴 Bath	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
		注射 Injection	--- / ---	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
	12	浸浴 Bath	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
		注射 Injection	--- / ---	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++

注: +: 阳性; -: 阴性; +++ / +++: 荧光定量 PCR/微流控荧光定量 PCR (3 次平行实验检测结果)。下同。

Note: +: Positive; -: Negative; +++ / +++: qPCR result/microfluidic fluorescence quantitative PCR result (from 3 parallel experiments). The same as below.

表4 基于 *toxR* 微流控荧光定量 PCR 的应用效果对比Tab.4 Comparison of application effects of microfluidic fluorescence quantitative PCR based on *toxR*

时间 Time/h	感染方式 Mode of infection	养殖水样 Aquaculture water sample	鳃丝 Gill filament	肝胰腺 Hepatopancreas	肌肉 Muscle	肠道 Intestinal tract
2	浸浴 Bath	+++ / +++	--- / ---	--- / ---	--- / ---	--- / ---
	注射 Injection	--- / ---	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
6	浸浴 Bath	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
	注射 Injection	--- / ---	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
12	浸浴 Bath	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
	注射 Injection	--- / ---	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++

一步验证。同时,以上检测结果表明,致病因子 *pirA* 和 *pirB* 均具有较高的检出率与检测灵敏度,适用于 AHPND 致病原的检测。

### 3 讨论

近年来,由弧菌引起的 AHPND 感染对虾比较频繁,该病可使对虾在感染后较短时间内大规模死亡,自 2009 年以来已给全球对虾养殖业造成 430 亿美元的损失(Kumar *et al.*, 2021)。在我国,流行病学研究发现,该疾病致死率高、传播范围广,患病对虾通常表现为肝胰腺肿大,后期逐渐萎缩,其颜色从黄褐色、红褐色到浅褐色甚至白色,呈现厌食、空肠、空胃状态,甲壳变软、不易褪壳,池水常常漂浮白便。一般 5~7 d 内出现大批死亡,其死亡率高达 80% 以上(Chen *et al.*, 2022)。在养殖实践中,养殖者往往通过肉眼观察发病后期所体现出的症状来判断疾病的发

生,延误了治疗的最佳时期,最终导致对虾大批死亡。因此,以精准、灵敏、快速的现场检测手段,建立一种能够诊断 AHPND 的早期感染态,是及早认知疾病发生风险和快速进行治疗的重要措施。

从诊断技术发展进程来看,临床体征和组织病理学是早期检测 AHPND 的方法(Mai *et al.*, 2021)。自 2014 年起,有学者建立了用于检测 AHPND 急性或终末期感染的 PCR 和反转录 PCR (RT-PCR) 方法(Dangtip *et al.*, 2015)。尽管 PCR 的方法具有高灵敏性和精确性,但花费时间长,操作精细,需要专业人员完成检测。随着 *pirA* 和 *pirB* 二元毒素基因的发现,Cruz-Flores 等(2019)设计了双重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法,可同时检测 *pirA* 和 *pirB*,检测时间约为 27 min,但该方法对操作人员要求较高,也不能进行现场检测。Arunrut 等(2016)基于 LAMP,结合使用 DNA 功能化、ssDNA 标记的纳米金探针(AuNP),



实现对 AHPND 阳性扩增产物的可视化,总检测时间为 50 min,虽然能实现现场检测,但检测时间较长。Mai 等(2021)针对 *pirA* 和 *pirB* 致病基因建立了等温重组酶聚合酶扩增(RPA)检测方法,完成检测 AHPND 的时间为 70 min,检测时间较长。陈蒙蒙等(2018)采用 qPCR 的方法检测 AHPND,灵敏度为  $10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ,而本研究中基于 *pirA* 的微流控荧光定量 PCR 灵敏度更高( $5.43 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ )。微流控芯片检测技术具有体积小、样品和试剂消耗量少、检测速度快、兼具微型化和可集成化等优点,已成为检测技术关注的新热点。本研究针对 AHPND 建立了二元毒素编码基因 *pirA* 和 *pirB* 的微流控荧光定量 PCR 的检测方法,结果显示,微流控荧光定量 PCR 检测方法对致病因子 *pirA* 和 *pirB* 具有良好的特异性,能准确检测出  $V_{p\text{AHPND}}$ ,非  $V_{p\text{AHPND}}$  以及对照组均未出现荧光信号。对 *pirA* 和 *pirB* 目的片段构建标准曲线发现,*pirA* 的标准曲线在  $5.43 \times 10^0 \sim 5.43 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  浓度范围内有良好的线性相关性( $y = -3.145x + 6.63$ ,  $R^2 = 0.999$ ),*pirB* 的标准曲线在  $4.31 \times 10^0 \sim 4.31 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  浓度范围内有良好的线性相关性( $y = -3.015x + 5.45$ ,  $R^2 = 0.999$ )。2 个基因在相同体系和条件下在同一芯片进行集成化,反应时间为 26 min 左右,满足了快速、灵敏、高通量、一体化集成的现场检测的实际需求。

Kumar 等(2021)研究指出,除了 *pirAB*<sup>VP</sup> 毒素,AHPND 相关菌株还有其他特定的毒力因子,可能与 AHPND 引起的细菌的毒力和疾病有关。本研究的人工感染实验采用注射和浸浴 2 种方式进行,在不同时间段取样,对所建立的方法进行临床验证并且比较其在对虾不同组织中检测的效果,可以更好地分析病原菌的侵染途径。结果发现,以注射为感染方式的实验组,除水样检测为阴性外,各个时间段的组织均为阳性。以浸浴为感染方式的实验组,不同时间段和不同基因检测的结果不同。从感染方式来看,采用注射方法,细菌 2 h 就可以到达各组织;而采用浸浴感染方法,浸浴 6 h 肝胰腺还未能检测到靶标基因,说明注射侵染组织速度快于浸浴感染方式。从浸浴感染的 3 个基因比较结果来看,*pirB* 只有在 2 h 肠道检测为阴性,其他时间的组织都为阳性;*pirA* 在 2 h 的肝胰腺和肠道检测为阴性,6 h 只有肠道为阴性,12 h 均为阳性;*toxR* 在 2 h 各组织检测都为阴性,说明 *pirB* 基因侵染速度最快,*pirA* 基因次之,*toxR* 基因最慢。从组织被侵染速度来看,在 2 h 时,鳃丝和肌肉中均检测到 *pirA* 和 *pirB*,被侵染速度最快。陈蒙蒙等(2018)研究表明,对虾的鳃丝比表面积大,是病原菌侵入的

通道,并直通虾胃及肝胰腺,更可能成为病原菌直接入侵的通道。与本研究中 *pirA* 在浸浴 2 h 时肝胰腺和肠道的检测结果为阴性、鳃丝为阳性的结果相似。Lai 等(2015)对人工感染对虾进行取样,6 h 内对虾肝胰脏组织明显脱落,并检测出高浓度的 *pirB*,感染 18 h 后才检出 *pirA*,表明 *pirB* 的侵染速度快于 *pirA*。这与本研究 *pirB* 比 *pirA* 基因检出率高的结果是一致的。综上,由于 *pirB* 检出率最高,鳃丝和肌肉被侵染速度最快,因此,以 *pirB* 为引物、以鳃丝或肌肉为靶组织的检测策略更适用于 AHPND 的现场快速检测。

综上所述,本研究建立了一种具有高灵敏度和特异性强的 AHPND 微流控荧光定量 PCR 检测方法,该方法对 *pirA* 的最低检测限可达到  $5.43 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ ,对 *pirB* 的最低检测限可达到  $4.31 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ,具有较高灵敏度,检测时间为 26 min 左右,可以快速、准确地确认携带 *pirA* 和 *pirB* 的致病弧菌,为及早认知疾病发生风险和快速进行治疗提供技术保障。此外,本研究使用的仪器具有良好的便携性便于在养殖现场操作,并且检测反应时间短,对于 AHPND 的现场快速诊断具有良好的开发应用前景。

## 参 考 文 献

- AHN Y S, PIAMSOMBOON P, TANG K F J, *et al.* Complete genome sequence of acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio campbellii* LA16-V1, isolated from *Penaeus vannamei* cultured in a Latin American country. *Genome Announcements*, 2017, 5(37): e01011-17
- ARUNRUT N, KAMPEERA J, SIRITHAMMAJAK S, *et al.* Sensitive visual detection of AHPND bacteria using loop-mediated isothermal amplification combined with dna-functionalized gold nanoparticles as probes. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151769
- CHEN M M, DONG X, QIU L, *et al.* Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus* ( $V_{p\text{AHPND}}$ ) in infected *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 93-100 [陈蒙蒙,董宣,邱亮,等. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌( $V_{p\text{AHPND}}$ )的定量分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 93-100]
- CHEN Y L, KUMAR R, LIU C H, *et al.* *Litopenaeus vannamei* peritrophin interacts with WSSV and AHPND-causing *V. parahaemolyticus* to regulate disease pathogenesis. *Fish and Shellfish Immunology*, 2022, 126: 271-282
- CRUZ-FLORES R, MAI H N, DHAR A K. Multiplex SYBR Green and duplex TaqMan real-time PCR assays for the detection of photorhabdus insect-related (*Pir*) toxin genes *pirA* and *pirB*. *Molecular and Cellular Probes*, 2019, 43:

20–28

- CUMMINGS D E, SNOEYENBOS-WEST O L, NEWBY D T, *et al.* Diversity of Geobacteraceae species inhabiting metal-polluted freshwater lake sediments ascertained by 16S rDNA analyses. *Microbial Ecology*, 2003, 46(2): 257–269
- DANGTIP S, SIRIKHARIN R, SANGUANRUT P, *et al.* AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 2015, 2: 158–162
- DHAR A K, PIAMSOMBOON P, ARANGUREN CARO L F, *et al.* First report of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occurring in the USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2019, 132(3): 241–247
- DONG X, WANG H, XIE G, *et al.* An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the *pir<sup>VP</sup>* gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerging Microbes and Infections*, 2017, 6(1): e2
- HAN J E, TANG K F J, PANTOJA C R, *et al.* qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 2015, 442: 12–15
- JIA D, SHI C Y, HUANG J, *et al.* Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 103–111 [贾丹, 史成银, 黄健, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 103–111]
- KONDO H, VAN P T, DANG L T, *et al.* Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announcements*, 2015, 3(5): e00978-15
- KONGRUENG J, TANSILA N, MITRAPARP-ARTHORN P, *et al.* LAMP assay to detect *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Aquaculture International*, 2015, 23(5): 1179–1188
- KUMAR V, ROY S, BEHERA B K, *et al.* Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. *Toxins*, 2021, 13(8): 524
- LAI H C, NG T H, ANDO M, *et al.* Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1006–1014
- LEE C T, CHEN I T, YANG Y T, *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): 10798–10803
- LEE C W, SUAREZ D L. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *Journal of Virological Methods*, 2004, 119(2): 151–158
- LIU L, XIAO J, XIA X, *et al.* Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease. *Genome Announcements*, 2015, 3(6): e01395-15
- MAI H N, ARANGUREN CARO L F, CRUZ-FLORES R, *et al.* Development of a recombinase polymerase amplification (RPA) assay for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) detection in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Molecular and Cellular Probes*, 2021, 57: 101710
- MICHELINI E, SIMONI P, CEVENINI L, *et al.* New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: An update. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 392(3): 355–367
- POWERS Q M, ARANGUREN F L, FITZSIMMONS K M, *et al.* Crayfish (*Cherax quadricarinatus*) susceptibility to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2021, 186: 107554
- RESTREPO L, BAYOT B, ARCINIEGAS S, *et al.* *Pir<sup>VP</sup>* genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal *Orientalis* clade. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 13080
- SHEN H, SONG T, LU J, *et al.* Shrimp AHPND causing *Vibrio anguillarum* infection: Quantitative diagnosis and identifying antagonistic bacteria. *Marine Biotechnology*, 2021, 23(6): 964–975
- SIRIKHARIN R, TAENGCHAIYAPHUM S, SANGUANRUT P, *et al.* Characterization and PCR detection of binary, *pir*-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126987
- WANG R, ZHONG Y, GU X, *et al.* The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 144
- XU YY, YU YX, WANG YG, *et al.* Establishment of multiple microfluidic fluorescence quantitative PCR detection technology for five main mariculture bacterial pathogens. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(3): 222–234 [徐媛媛, 于永翔, 王印庚, 等. 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]
- YANG Q, DONG X, XIE G, *et al.* Comparative genomic analysis unravels the transmission pattern and intra-species divergence of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Molecular Genetics and Genomics*, 2019, 294(4): 1007–1022
- ZHANG Z, YU Y, 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

ZHAO X, LI M, LIU Y. Microfluidic-based approaches for foodborne pathogen detection. *Microorganisms*, 2019, 7(10): 381

(编辑 马瑾艳)

## Establishment and Application of Dual Microfluidic Fluorescent Quantitative PCR for Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shrimp Hepatopancreatic Necrosis

LI Hao<sup>1,2</sup>, ZHANG Mingyang<sup>1,2</sup>, YU Yongxiang<sup>2</sup>, WANG Yingeng<sup>2①</sup>,  
ZHANG Zheng<sup>2</sup>, MA Cuiping<sup>1</sup>, CHEN Fushan<sup>1</sup>

(1. School of Marine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China;  
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China)

**Abstract** Shrimp has become a highly traded global seafood product, with 8 million tons of shrimp produced annually. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is the most prevalent and severe disease affecting shrimp aquaculture, resulting in considerable economic losses. The AHPND incidence in shrimp farming was as high as 60%–80% in China, resulting in reduced farming capacity and unstable production. *Vibrio parahaemolyticus* has been identified as the main causative agent of AHPND. In addition, *V. harveyi*, *V. cambelii*, *V. alginolyticus*, and *V. owenii* are capable of causing similar diseases, demonstrating a distinct pathogenic diversity. Previous studies have indicated that not all of the above-mentioned *Vibrios* species are capable of causing AHPND, and whole gene sequencing and knockout genes have revealed that *pirA* and *pirB* are the primary pathogenic factors responsible for AHPND in shrimp. Specifically, the causative agent for AHPND should be a specific strain of *Vibrio* carrying the binary toxins *pirA<sup>Vp</sup>* and *pirB<sup>Vp</sup>* on the extrachromosomal virulence plasmid pVA1. Among them, the *pirB* toxin mainly determines the pathogenicity of the bacterium, whereas the *pirA* virulence is relatively weak. Furthermore, it has been demonstrated that the virulence plasmids encoding the binary genes *pirA<sup>Vp</sup>* and *pirB<sup>Vp</sup>* are the main causative agents of AHPND. The virulence gene *toxR* is prevalent in *Vibrio* and plays an important role through the genetic diversity of 16S rRNA genes during shrimp infection. Real-time fluorescence quantitative PCR technology has less contamination, more accurate quantification, real-time monitoring, and greater automation than conventional PCR technology, which has been utilized in the fields of transgenic detection, environmental science, and medicine. However, this technique is time-consuming, involves multiple instruments and reagents, and requires personnel with extensive professional skills and experience. As a result of its small size, low sample and reagent consumption, rapid detection speed, miniaturization, and integration, microfluidic chip assay technology has emerged as a new focal point in assay technology. Therefore, in this study, we designed specific primers and established a microfluorescence quantitative PCR assay based on two genes, *pirA* and *pirB*, to address the genetic similarity of AHPND pathogens carrying a large plasmid encoding a binary toxin, *pirA* and *pirB*. The method was specific for the pathogenic *pirA* and *pirB* genes,

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

and only when DNA from AHPND-infected samples was tested could the two genes be successfully amplified, while all other pathogenic bacteria were detected with negative results. The sensitivity was high, and the minimum detection limits for the *pirA* and *pirB* genes were  $5.43 \times 10^0$  and  $4.31 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , respectively. Standard curves for *pirA* and *pirB* were constructed and demonstrated good linearity in the concentration range of  $5.43 \times 10^0$ – $5.43 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  for *pirA* ( $y = -3.145x + 6.63$ ,  $R^2 = 0.999$ ) and  $4.31 \times 10^0$ – $4.31 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  for *pirB* ( $y = -3.015x + 5.45$ ,  $R^2 = 0.999$ ), with an average sample detection time of approximately 26 min. In order to evaluate the efficacy of the method in practice, artificial infection experiments with *V. parahaemolyticus* were performed. In this study, artificial infection experiments were induced by both injection and immersion, and samples were collected at different time periods to clinically validate the established method and compare its effectiveness in detecting different shrimp tissues, thereby facilitating a more thorough analysis of the pathogenic pathways of infection. The experimental group with injection as the mode of infection was found to be positive for all tissues in all time periods except the water test, which was negative. The experimental group that used immersion as the infection method showed different results for various time periods and with different genetic tests. In terms of the infection method, the tissues could be infiltrated within 2 h using the injection method, whereas the target genes were not detected in the hepatopancreas at 6 h using the immersion method. This indicated that the injection method infiltrated the tissues more rapidly than the immersion method. According to the comparison results of the three genes, *pirB* was only negative in the intestine at 2 h and positive in all tissues the rest of the time; *pirA* was negative in the hepatopancreas and intestine at 2 h, only the intestine was negative at 6 h, and all tissues were positive at 12 h; and *toxR* was negative in all tissues at 2 h. The rate of infestation from rapid to slow showed that  $pirB > pirA > toxR$ . Based on the rate of tissue infestation, *pirA* and *pirB* were detected in both cheek filaments and muscles at 2 h, making them the most rapid infiltration agents. Therefore, the strategy of using *pirB* as the primer and gill filament or muscle as the target tissue is more suitable for the rapid detection of AHPND in the field. In this study, we established a method for microfluidic fluorescent quantitative PCR that has the advantages of being rapid, sensitive, high throughput, less contaminated, on-site detectable, and integrated. The method is not only applicable to the laboratory but also meets the requirements of rapid field detection at hatcheries and farms, and can be used as a new technical method for shrimp fry quality detection and disease control.

**Key words** AHPND; *Vibrio parahaemolyticus*; *pirA*; *pirB*; Microfluidic chip; Field detection