

基于核酸适配体吸附检测技术的卵形鲳鲹源溶藻弧菌的快速检测^{*}

朱冬琳¹, 余庆¹, 刘明珠², 肖贺贺^{2,3}, 吴思婷², 牙韩争¹, 覃仙玲¹, 陈宪云¹, 董德信¹, 聂振平²,
肖俊^{4**}, 王一兵⁵, 李鹏飞^{2,6**}

(1. 广西科学院, 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西壮族自治区海洋研究所, 广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000; 3. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007; 4. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021; 5. 广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西南宁 530006; 6. 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室, 广西南宁 530007)

摘要:溶藻弧菌是引起广西等华南沿海地区海水养殖鱼类发生细菌性鱼病的主要致病菌之一, 其引起的鱼病具有发病迅速、死亡率高、流行面广等特点, 严重威胁着华南地区水产养殖业的健康可持续发展。着力发展操作便捷、成本低、耗时短、准确度高的水产致病菌快速检测技术, 对于及早发现、确定病原, 进而有的放矢地制定治疗方案来控制病原扩散、降低损失意义重大。在先前研究中, 我们基于指数富集的配基系统进化技术(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment technology, SELEX)筛选获得特异性识别卵形鲳鲹源溶藻弧菌的核酸适配体, 本研究中我们基于核酸适配体 VA8 开展溶藻弧菌的快速检测诊断技术的研究, 开发出一种新型的能够快速检测溶藻弧菌的核酸适配体吸附检测技术(Aptamer VA8-based enzyme-linked apta-sorbent assay, VA8-ELASA), 并对 VA8-ELASA 技术检测溶藻弧菌的特异性和灵敏性进行分析研究。VA8-ELASA 技术可以用于溶藻弧菌的快速检测, 具有特异性强、灵敏度高的特点。本研究基于核酸适配体 VA8 建立的新型核酸适配体吸附技术(VA8-ELASA), 有望实现对广西卵形鲳鲹养殖中溶藻弧菌病的快速诊断、实时监控和有效预防。

关键词:溶藻弧菌 卵形鲳鲹 ELASA SELEX VA8 特异性 灵敏性 快速诊断

中图分类号: S941.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2019)03-0219-06



微信扫一扫, 与作者在线交流(OSID)

0 引言

广西是我国的水产养殖大省, 主要养殖品种包括

卵形鲳鲹、石斑鱼、草鱼、斑点叉尾鮰、罗非鱼、对虾和贝类等。近年来, 随着市场需求量的不断增加, 广西水产养殖业进入快速发展期, 养殖规模不断扩大, 养

^{*} 广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198176, 2018JJB150002), 广西重点研发计划(2018AB52003), 广西科技人才专项(2018AD19367), 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-46)和广西科学院基本科研业务费项目(2018YJJ903, 2018YJJ902)资助。

【作者简介】

朱冬琳(1990—)女, 硕士, 助理研究员, 主要从事海洋动力学与海洋环境科学研究。

【**通信作者】

肖俊(1982—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事水产遗传育种与健康养殖工作, E-mail: dreamshaw@foxmail.com; 李鹏飞(1988—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事水产疫病防控与高质化生态养殖技术的研究, E-mail: pfli2014@126.com。

【引用本文】

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20190903.010

朱冬琳, 余庆, 刘明珠, 等. 基于核酸适配体吸附检测技术的卵形鲳鲹源溶藻弧菌的快速检测[J]. 广西科学院学报, 2019, 35(3): 219-224.

ZHU D L, YU Q, LIU M Z, et al. Establishment and characterization of enzyme-linked apta-sorbent assay (ELASA) for rapid diagnosis of *Vibrio alginolyticus* infection in cultured *Trachinotus ovatus* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2019, 35(3): 219-224.

殖效益持续增加^[1-2]。其中,卵形鲳鲹肉质细腻,营养丰富,目前国内卵形鲳鲹年产量则超过 10 万吨,养殖效益极为显著。然而在高密度养殖条件下,各种病害频发暴发,造成了巨大经济损失^[3-4]。广西水产疫病防控研究工作比较滞后,针对主要水产养殖品种,既缺少详细系统的流行病学调查,更缺少高效的防控功能产品,这些不利因素影响了广西水产养殖业的健康可持续发展。2017 年夏季,养殖于广西钦州湾海域的近海网箱中的卵形鲳鲹暴发了溶藻弧菌病,给当地卵形鲳鲹养殖业造成了巨大的经济损失^[4]。据华南地区的研究报道,溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是严重危害包括广西北部湾海域在内的华南沿海地区海水养殖鱼类的主要条件致病菌之一,其导致的鱼病具有发病速度快、累计死亡率高、流行范围广的特点^[5-6]。目前溶藻弧菌的检测方法主要包括菌落形态观察结合生理生化反应指标的生物学检验,以及基于细菌 16S DNA 基因测序的分子生物学检测技术等^[7]。这些方法虽然能够实现溶藻弧菌病的检测诊断,但是却存在技术操作繁琐、仪器试剂昂贵、检测耗时长等诸多不足,因此仅适用于实验室条件下少量样品检测。为满足养殖现场对溶藻弧菌病快速准确检测的要求,本研究利用先前筛选获得的特异性识别溶藻弧菌活菌的核酸适配体 VA8^[8],开发出一种能够快速检测溶藻弧菌的新型的核酸适配体吸附检测技术(VA8-based enzyme-linked apta-sorbent assay, VA8-ELASA),并对 VA8-ELASA 技术检测溶藻弧菌的特异性和灵敏性进行了分析研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本实验中所使用的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)从广西钦州湾网箱养殖的发病卵形鲳鲹中分离得到,保存于本实验室,编号为 TOQZ01^[4];哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)从北海铁山港网箱养殖的发病卵形鲳鲹中分离得到,编号为 BHVH01;嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)从广西南宁池塘养殖的发病草鱼中分离获得。TMB 显色液购自碧云天生物技术公司,链霉素标记的 HRP(Streptavidin-HRP)购自 Thermo 公司;生物素标记的核酸适配体 VA8(Biotin-VA8)和生物素标记的非特异性单链核酸文库(Biotin-ssDNA Library)由上海生工合成;本实验使用的仪器包括多功能酶标仪,无菌操作台, Nikon 倒置显微镜, Nikon 激光共聚焦显微镜, Thermo

PCR 仪,生化培养箱,常温低速离心机,低温高速离心机,水浴锅。

1.2 方 法

1.2.1 VA8-ELASA 操作流程

VA8-ELASA 的操作方法参考先前的报道,并进行了优化改进^[9-10]。具体步骤是:将生物素(Biotin)标记的核酸适配体 VA8(Biotin-VA8)在 92℃ 高温水浴变性 10 min,然后迅速插入到冰中复性 10 min;将 Biotin-VA8 (300 nmol/L)与待测菌液在冰上结合 20 min,然后用 PBS 1 000 g 离心清洗 3 次,移除上清,将沉淀的样品与 200 μ L Streptavidin-HRP(1 : 10 000)混匀结合 20 min;用磷酸缓冲盐溶液 PBS 1 000 g 离心清洗 5 次后,将样品与 200 μ L TMB 显色液混匀,避光反应 15 min,加入 50 μ L H₂SO₄(2 mol/L)终止反应;使用多功能酶标仪读取待测样品在 450 nm 处的吸光值并记录结果。每个反应均做 3 个重复。

1.2.2 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌的特异性分析

将生物素(Biotin)标记的核酸适配体 VA8 (Biotin-VA8, 300 nmol/L)经过 92℃ 恒温水浴、冰浴处理;试验组(Test 1)为 Biotin-VA8 (300 nmol/L)与 1 mL 溶藻弧菌菌液(1×10^8 CFU/mL)孵育结合,对照组设置 3 组:对照组 1(Control 1), Biotin-VA8 (300 nmol/L)与 1 mL 哈维氏弧菌菌液(1×10^8 CFU/mL)孵育结合;对照组 2(Control 2), Biotin-VA8 (300 nmol/L)与 1 mL 嗜水气单胞菌菌液(1×10^8 CFU/mL)孵育结合;对照组 3(Control 3), Biotin-ssDNA Library 与 1 mL 溶藻弧菌菌液(1×10^8 CFU/mL)孵育结合;对照组 4(Control 4),未作任何处理的 1 mL 溶藻弧菌菌液(1×10^8 CFU/mL)。孵育结合完成后,将各组样品用 PBS 离心清洗 3 次,然后富集到的样品与 200 μ L Streptavidin-HRP(1 : 10 000)混匀结合 20 min。后续的显色反应与检测步骤参看 1.2.1 小节。每个反应均做 3 个重复。

1.2.3 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌的数量灵敏性分析

将溶藻弧菌稀释至不同的浓度: 5×10^7 CFU/mL, 5×10^6 CFU/mL, 5×10^5 CFU/mL, 1×10^5 CFU/mL, 5×10^4 CFU/mL, 1×10^4 CFU/mL, 5×10^3 CFU/mL, 1×10^3 CFU/mL。试验组(Test)是取 1 mL 不同浓度的菌液用 PBS 1 000 g 离心清洗 3 次,然后与 Biotin-VA8 在冰上结合 30 min。Biotin-ssDNA Library 与相应浓度的溶藻弧菌的孵育实验

作为对照组(Control)。后续具体的检测操作参看 1.2.1 小节。每个反应均做 3 个重复。

1.2.4 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌的时间灵敏性分析

我们随后对 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌的孵育时长灵敏性进行了分析。试验组(Test)是取 1 mL 溶藻弧菌 TOQZ01(1×10^8 CFU/mL)用 PBS 1 000 g 离心清洗 3 次,然后与 Biotin-VA8 在冰上分别孵育结合 60 min, 30 min, 20 min, 10 min, 5 min 和 1 min。Biotin-ssDNA Library 与 1 mL 溶藻弧菌(1×10^8 CFU/mL)孵育相应时长的实验作为对照组(Control)。后续具体的检测操作参看 1.2.1 小节。每个反应均做 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌的特异性高

在先前研究中,基于前沿的指数富集的配基系统

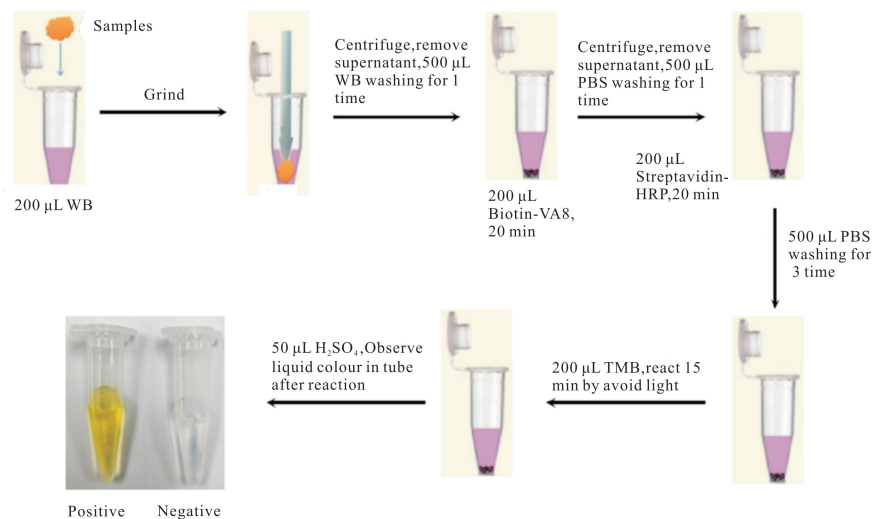


图 1 VA8-ELASA 操作示意图

Fig. 1 Graphic procedure of VA8-ELASA

2.2 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌的数量灵敏性高

使用 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌时,对照组中各组的吸光值均没有明显差异,实验组中溶藻弧菌的数量越多,在 450 nm 处的吸光值就越高,即 VA8-ELASA 是以浓度梯度依赖的方式检测溶藻弧菌 TOQZ01。当溶藻弧菌的数目低至 5×10^4 CFU/mL 时,VA8-ELASA 仍可灵敏地检测到溶藻弧菌(图 3)。

2.3 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌的时间灵敏性高

使用 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌时,与对照组

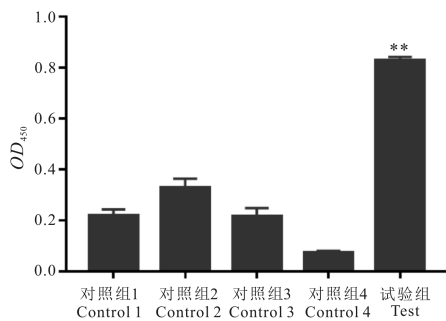
进化技术(SELEX)筛选获得特异性识别溶藻弧菌活菌的核酸适配体 VA8,VA8 的核苷酸序列如表 1 所示。VA8-ELASA 的操作流程如图 1 所示。使用 VA8-ELASA 技术对溶藻弧菌进行检测发现,与 4 个对照组相比,VA8-ELASA 能够特异性地检测溶藻弧菌,而对非靶标细菌没有明显的识别作用。由此证明,VA8-ELASA 能够用于卵形鲳鲹养殖中溶藻弧菌病的特异性检测与诊断(图 2)。

表 1 核酸适配体 VA8 的核苷酸序列

Table 1 The nucleotide sequences of aptamer VA8

核酸适配体 Aptamer	核苷酸序列 Nucleotide Sequences
VA8	5'-GACGCTTACTCAGGTGTGACTCGCGTTTT ATTGGTGTGGGGCTGGGGCGGTGGGTGGCT CTACTGGTTCCGTTCCAAGGACGCAGATGA AGTCTC-3'

中不同孵育结合时间条件下的吸光值均没有明显差异的结果相比,孵育结合时间越长,实验组中待测样品在 450 nm 处的吸光值就越高,即 VA8-ELASA 以孵育结合时长依赖的方式检测溶藻弧菌 TOQZ01。当孵育结合时长短至 1 min 时,VA8-ELASA 仍可灵敏地检测到溶藻弧菌(图 4)。因此,VA8-ELASA 可以用于溶藻弧菌的快速检测诊断。

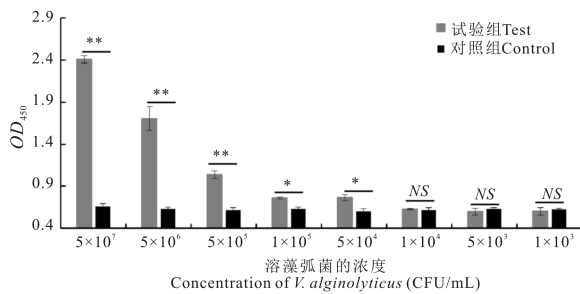


** $P < 0.01$ 差异极显著

** $P < 0.01$ was considered extremely different

图2 VA8-ELASA 特异性检测溶藻弧菌结果

Fig. 2 The results of VA8-ELASA specific detection of *V. alginolyticus*



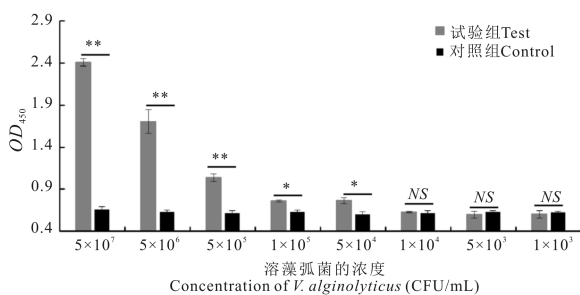
* $P < 0.05$ 差异显著, ** $P < 0.01$ 差异极显著, NS 无显著性差异

* $P < 0.05$ was considered significantly different,

** $P < 0.01$ was considered extremely different, NS was considered no significant difference

图3 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌细胞的数量灵敏性

Fig. 3 The quantity sensitivity of VA8-ELASA for detection of *V. alginolyticus* cells



* $P < 0.05$ 差异显著, ** $P < 0.01$ 差异极显著, NS 无显著性差异

* $P < 0.05$ was considered significantly different,

** $P < 0.01$ was considered extremely different, NS was considered no significant difference

图4 VA8-ELASA 检测溶藻弧菌细胞的时间灵敏性

Fig. 4 The time sensitivity of VA8-ELASA for *V. alginolyticus* cells

3 讨论

近年来,水产养殖中细菌性和病毒性疾病频发暴

发,严重影响着水生生态稳定以及水产养殖业的健康可持续发展。其中,溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是一种条件致病菌,能够感染鱼、虾、蟹、贝等众多海水养殖品种^[7,11]。溶藻弧菌通常在夏季水温高、环境恶化时以及养殖动物免疫力下降时暴发流行,通过在感染和快速增殖过程中向胞外释放细胞毒素等代谢产物来干扰并破坏养殖动物的正常新陈代谢,进而造成严重的细胞损伤和出血性溃疡、内脏器官肿大等组织病变,最终导致动物死亡^[5,7,12]。溶藻弧菌引起的细菌病具有发病迅速、死亡率高、流行面广等特点,给广西等华南沿海地区海水养殖业造成了巨大的损失。为实现广西卵形鲳鲆养殖中溶藻弧菌病的快速诊断、实时监控和有效预防的目的,本研究中我们利用前沿的核酸适配体技术,着力开发用于溶藻弧菌快速检测的核酸适配体吸附检测技术。

核酸适配体是利用指数富集的配基系统进化技术(System evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选最终获得能够特异性识别靶物质的单链寡核苷酸^[13]。核酸适配体具有易筛选获得、合成成本低、易修饰、稳定性强、批次间质量相同、识别结合靶物质的特异性高等诸多优点。作为一种新型的分子探针,核酸适配体在分析检测、临床诊断、新药研发等领域具有广阔的应用前景^[14]。目前,核酸适配体在水生生物病原研究领域也已取得了较快进展。据报道,已成功筛选获得高特异性核酸适配体的水产病害包括新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus)^[15-16],赤点石斑鱼神经坏死症病毒(Red spotted grouper nervous necrosis virus)^[17],卵形鲳鲆源神经坏死病毒(*Trachinotus ovatus* NNV)^[18],鲤春病毒血症病毒(Spring viremia of carp virus)^[19],牙鲆弹状病毒(Hirame rhabdovirus virus)^[20],病毒性出血性败血症病毒(Viral hemorrhagic septicemia virus)^[21],中华鳖虹彩病毒(Soft-shelled turtle iridovirus)^[22],溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)^[8,23],哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)^[24],嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)^[25]和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)^[26]等。基于这些核酸适配体建立了多种新型检测技术中,包括核酸适配体免疫吸附测定技术(Enzyme-linked apta-sorbent assay, ELASA)^[9-10],核酸适配体-纳米金检测技术等^[27]和核酸适配体-荧光分子检测探针检测技术^[28]等。例如,Zhou等^[10]利用特异性结合赤点石斑鱼神经坏死症病毒 CP 衣壳蛋白的核酸适配体 A10,研发

出的 sandwich ELASA 技术, 在病毒感染的细胞数目低至 4 000 个, 以及孵育时间短至 10 min 时, sandwich ELASA 技术均能检测到赤点石斑鱼神经坏死症病毒的感染, 并且 sandwich ELASA 技术检测 RGNNV 感染的灵敏度与 PCR 技术相当, ELASA 技术操作简便快捷、稳定性强。

本研究中, 我们基于特异性识别溶藻弧菌活菌的核酸适配体 VA8 开发出一种新型的核酸适配体吸附检测技术(VA8-ELASA)用于溶藻弧菌的快速检测。当溶藻弧菌 TOQZ01 的浓度低至 5×10^4 CFU/mL, VA8-ELASA 中 Biotin-VA8 与溶藻弧菌 TOQZ01 孵育结合时长短至 1 min 时, VA8-ELASA 均能够清楚地检测到溶藻弧菌。综上, VA8-ELASA 技术具有耗时短、操作便捷、灵敏性高等优点, 能够用于卵形鲳鲹养殖中溶藻弧菌病的特异性检测与快速诊断。本研究成果为丰富和提高水产疫病防控领域的检测技术研究提供了新方法和新思路。

4 结论

本研究开发出一种新型的核酸适配体吸附检测技术(VA8-ELASA)用于溶藻弧菌的快速检测。实验结果表明, VA8-ELASA 能够用于溶藻弧菌病的特异性检测; VA8-ELASA 检测溶藻弧菌具有耗时短、灵敏性高等优点; VA8-ELASA 有望实现对溶藻弧菌病的快速诊断、实时监控和有效预防。

参考文献

- [1] 李鹏飞, 余庆, 覃仙玲, 等. 广西北部湾海水养殖业现状与病害防控技术体系研究展望[J]. 广西科学, 2018, 25(1): 15-25
- [2] 李坚明. “十三五”广西水产养殖业发展战略研究[J]. 中国渔业经济, 2016, 34(4): 25-31.
- [3] LI P, YU Q, LI F, et al. First identification of the nervous necrosis virus isolated from cultured golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in Guangxi, China [J]. Journal of Fish Diseases, 2018, 41(7): 1177-1180.
- [4] 余庆, 李菲, 王一兵, 等. 广西北部湾大宗海水养殖鱼类卵形鲳鲹感染溶藻弧菌及其致病性的研究[J]. 广西科学, 2018, 25(1): 68-73.
- [5] 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.
- [6] 夏立群, 黄郁葱, 鲁义善. 卵形鲳鲹主要病害及其研究进展[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(23): 140-143, 150.
- [7] 赖迎迢, 陶家发, 孙承文, 等. 鱼源溶藻弧菌生物学特性和病理组织学观察[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1378-1384.
- [8] YU Q, LIU M, SU H, et al. Selection and characterization of ssDNA aptamers specifically recognizing pathogenic *Vibrio alginolyticus* [J]. Journal of Fish Diseases, 2019, 42(6): 851-858. DOI: 10.1111/jfd.12985.
- [9] LI P, ZHOU L, WEI J, et al. Development and characterization of aptamer-based enzyme-linked apta-sorbent assay for the detection of Singapore grouper iridovirus infection [J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(3): 634-643.
- [10] ZHOU L, LI P, NI S, et al. Rapid and sensitive detection of redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) infection by aptamer-coat protein-aptamer sandwich enzyme-linked apta-sorbent assay (ELASA) [J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(12): 1831-1838.
- [11] LIU P, CHEN Y C, LEE K K. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. Microbios, 2001, 104(408): 71-77.
- [12] LIU X F, ZHANG H, LIU X, et al. Pathogenic analysis of *Vibrio alginolyticus* infection in a mouse model [J]. Folia Microbiologica, 2014, 59(2): 167-171.
- [13] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature, 1990, 346(6287): 818-822.
- [14] BUNKA D H J, STOCKLEY P G. Aptamers come of age at last [J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(8): 588-596.
- [15] LI P, WEI S, ZHOU L, et al. Selection and characterization of novel DNA aptamers specifically recognized by Singapore grouper iridovirus-infected fish cells [J]. Journal of General Virology, 2015, 96(11): 3348-3359.
- [16] LI P, YAN Y, WEI S, et al. Isolation and characterization of a new class of DNA aptamers specific binding to Singapore grouper iridovirus (SGIV) with antiviral activities [J]. Virus Research, 2014, 188: 146-154.
- [17] ZHOU L, LI P, YANG M, et al. Generation and characterization of novel DNA aptamers against coat protein of grouper nervous necrosis virus (GNNV) with antiviral activities and delivery potential in grouper cells [J]. Antiviral Research, 2016, 129: 104-114.
- [18] YU Q, LIU M, WEI S, et al. Characterization of ssDNA aptamers specifically directed against *Trachinotus ovatus* NNV (GTONNV)-infected cells with antiviral activities [J]. Journal of General Virology, 2019, 100(3): 380-391.
- [19] 于力, 王津津, 卢奕良, 等. 鲤春病毒血症病毒核酸适配体的筛选及分析[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(2): 101-105.
- [20] HWANG S D, MIDORIKAWA N, PUNNARAK P, et al. Inhibition of hiram rhabdovirus growth by RNA aptamers [J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35(12): 927-934.
- [21] PUNNARAK P, SANTOS M D, HWANG S D, et al. RNA aptamers inhibit the growth of the fish pathogen viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) [J]. Marine Biotechnology, 2012, 14(6): 752-761.
- [22] LI P, ZHOU L, YU Y, et al. Characterization of DNA aptamers generated against the soft-shelled turtle iri-

- dovirus with antiviral effects [J]. *BMC Veterinary Research*, 2015, 11:245-251.
- [23] TANG X M, ZHENG J, YAN Q P, et al. Selection of aptamers against inactive *Vibrio alginolyticus* and application in a qualitative detection assay [J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(6):909-914.
- [24] 郑江, 郝聚敏, 宋林生, 等. 哈维氏弧菌适配子的 SELEX 筛选及其亲和和特异性研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2014, 41(7):704-711.
- [25] 李元跃, 王雷, 陈融斌, 等. SELEX 筛选嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 适体方法的建立[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(2):318-322.
- [26] DUAN N, WU S, YU Y, et al. A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and salmonella typhimurium using aptamer conjugated quantum dots as labels [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 804:151-158.
- [27] HUANG Y F, LIN Y W, LIN Z H, et al. Aptamer-modified gold nanoparticles for targeting breast cancer cells through light scattering [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, 11(4):775-783.
- [28] 李鹏飞, 余庆, 李菲, 等. 新型核酸适配体-荧光分子检测探针用于石斑鱼虹彩病病毒病的快速诊断[J]. *广西科学*, 2018, 25(1):63-67.

Establishment and Characterization of Enzyme-Linked Aptasorbent Assay (ELASA) for Rapid Diagnosis of *Vibrio alginolyticus* Infection in Cultured *Trachinotus ovatus*

ZHU Donglin¹, YU Qing¹, LIU Mingzhu², XIAO Hehe^{2,3}, WU Siting², YA Hanzheng¹, QIN Xianling¹, CHEN Xianyun¹, DONG Dexin¹, NIE Zhenping², XIAO Jun⁴, WANG Yibing⁵, LI Pengfei^{2,6}

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi Key Laboratory for Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanography, Beihai, Guangxi, 536000, China; 3. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan, 453007, China; 4. Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Breeding, Guangxi Academy of Fishery Science, Nanning, Guangxi, 530021, China; 5. School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Nanning, Guangxi, 530006, China; 6. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Nanning, Guangxi, 530007, China)

Abstract: *Vibrio alginolyticus* is one of the main pathogens causing bacterial fish disease in marine fish in coastal area of South China including Guangxi, and its fish disease has the characteristics of rapid onset, high mortality and wide popularity, which seriously threatens the healthy and sustainable development of aquaculture in South China. Focusing on developing rapid detection techniques for aquatic pathogens with convenient operation, low cost, short time and high accuracy are of great significance for early detection and identification of pathogens and then targeting to develop a treatment plan to control the spread of pathogens and reduce losses. In previous studies, ssDNA aptamers against *V. alginolyticus* were screened based on systematic evolution of ligands by exponential enrichment technology (SELEX). In this study, we carried out a research on a rapid detection and diagnosis technology of *V. alginolyticus* based on aptamer VA8, and developed a new type of Aptamer VA8-based enzyme-linked aptasorbent assay (VA8-ELASA) for rapid detection of *V. alginolyticus*. The specificity and sensitivity of VA8-ELASA technology for the detection of *V. alginolyticus* were analyzed. VA8-ELASA technology can be used for the rapid detection of *V. alginolyticus* with strong specificity and high sensitivity. The novel VA8-ELASA technology based on aptamer VA8 is expected to realize rapid diagnosis, real-time monitoring and effective prevention of *V. alginolyticus* disease in *Trachinotus ovatus* aquaculture in Guangxi.

Key words: *V. alginolyticus*, *Trachinotus ovatus*, ELASA, SELEX, VA8, specificity, sensitivity, rapid diagnosis

责任编辑:符支宏