

# 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中溶源噬菌体与其宿主菌致病力的相关性\*

王 娜<sup>1,2</sup> 王海亮<sup>1</sup> 白 楠<sup>1</sup> 黄 健<sup>1,2,3①</sup> 谢达祥<sup>4</sup>  
谢起浪<sup>5</sup> 於俊琦<sup>5</sup> 万夕和<sup>6</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266237; 4. 广西水产科学研究院 南宁 530021; 5. 浙江省海洋水产养殖研究所 温州 324005;  
6. 江苏省海洋水产研究所 南通 226007)

**摘要** 急性肝胰腺坏死病(Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND)是由副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)引起的对虾病害,本研究从患 AHPND 的凡纳滨对虾样品中分离得到 5 株副溶血弧菌,采用致 AHPND 的副溶血弧菌(VP<sub>AHPND</sub>)的相关质粒的引物 AP2 进行 PCR 检测,表明这 5 株菌中均存在 AHPND 相关质粒。利用丝裂霉素 C 进行溶源性噬菌体筛选和噬菌体诱导发现,其中 2 株副溶血弧菌(20130629002S01 和 20130726001S01)可能存在溶源性噬菌体感染;从经 0.5 μg/ml 丝裂霉素 C 诱导的 20130629002S01 和 20130726001S01 中分别分离得到两种噬菌体 phage1 和 phage2。透射电镜观测显示, phage1 为有尾噬菌体, phage2 为球形噬菌体。将上述 5 株副溶血弧菌进行卤虫无节幼体人工感染实验,结果显示,它们对卤虫无节幼体均有致病力,且各分离株的毒力表现出显著性差异;20130629002S01 和 20130726001S01 两株带有溶源性噬菌体的副溶血弧菌的致病力显著低于无噬菌体的副溶血弧菌(20130721001S02)。本研究结果表明,5 株 VP<sub>AHPND</sub> 分离株都含有 AHPND 相关的质粒,表现出显著的毒力差异,可能携带不同的溶源噬菌体,也可能不携带溶源噬菌体,溶源噬菌体与副溶血弧菌各分离株的毒力并无必然相关性。

**关键词** 副溶血弧菌; 溶源噬菌体; 急性肝胰腺坏死病

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)02-0105-06

急性肝胰腺坏死病(Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND), 又称早期死亡综合征(Early Mortality Syndrome, EMS), 是一种严重危害养殖对虾的疫病(Lightner *et al*, 2012)。该病最早于 2010 年发生于中国南方和越南, 随后在马来西亚和泰国相继暴发, 感染该病的对虾幼苗, 在放苗 10–30 d 内高达 100% 的死亡率(FAO, 2013; Lightner *et al*, 2012),

给亚洲各国对虾养殖业造成巨大经济损失。因此, 对 AHPND 病原的探究引起了国内外学者的广泛关注。本实验室最早在 2010 年从广西北海大规模死亡的凡纳滨对虾中分离到了一株高抗生素抗性和高致病力的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)(张宝存等, 2012)。Tran 等(2013)通过病原学分析确定了引起 AHPND 的病原为副溶血弧菌。副溶血弧菌是一种常

\* 公益性行业科研专项经费项目(201103034)、现代农业产业技术体系(CARS-47)、山东省泰山学者建设工程专项经费和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。王 娜, E-mail: nwang1989@126.com

① 通讯作者: 黄 健, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-04-17, 收修改稿日期: 2015-06-16

见的革兰氏阴性致病菌,对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)危害严重,近年来多次引起凡纳滨对虾大规模死亡(张晓君等,2010;张宝存等,2012;Tran *et al.*,2013;Schryver *et al.*,2014)。

在探究 AHPND 病原的过程中,Lightner 等从引起 AHPND 的副溶血弧菌(VP<sub>AHPND</sub>)中诱导并分离到了一株溶源性噬菌体,并推测该噬菌体是副溶血弧菌的毒力因子(FAO,2013),但 Lightner 等的上述观点并没有相关研究论文的正式报道,随后 Lightner 等又自我否定了溶源性噬菌体是导致副溶血弧菌引发 AHPND 的毒力因子的观点。

本研究旨在分析从 AHPND 样品中分离得到的副溶血弧菌携带溶源噬菌体的情况,并分析溶源噬菌体是否是副溶血弧菌导致 AHPND 的主要原因,从而为探究溶源噬菌体、副溶血弧菌与 AHPND 的关系提供直接依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

实验所用菌株为本实验室从 2013 年来自我国广西、浙江和江苏以及 2014 年来自越南的感染急性胰腺坏死病(AHPND)的凡纳滨对虾或养殖水体中分离得到的 5 株副溶血弧菌(表 1)。所用菌株均由本实验室分离、鉴定并保藏。

表 1 实验所用副溶血弧菌菌株

Tab.1 *Vibrio parahaemolyticus* strains used in this study

编号 No.	菌株 Strains	来源 Source
A	20130629002S01	中国广西 Guangxi, China
B	20130721001S02	中国浙江 Zhejiang, China
C	20130722DXES05	
D	20130726001S01	中国江苏 Jiangsu, China
E	2014VN01S01G	越南 Vietnam

### 1.2 细菌总 DNA 的提取

细菌总 DNA 的提取采用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN,北京)。1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

### 1.3 AHPND 相关副溶血弧菌质粒的 PCR 检测

为确定所用副溶血弧菌是否为导致 AHPND 的致病菌株,采用 Flegel 等(2014)公布的针对致 AHPND 的副溶血弧菌(VP<sub>AHPND</sub>)的质粒的检测方法,引物为 AP2 (AP2-F: 5'-TCA CCC GAA TGC TCG CTT GTG G-3'和 AP2-R: 5'-CGT CGC TAC TGT CTA GCT GAA

G-3'),委托上海生工生物进行合成。以 100 ng/μl 细菌总 DNA 为模板,采用 *Ex Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa,大连)进行扩增。扩增产物采用 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.4 丝裂霉素 C 有效浓度的确定和噬菌体溶源性感染菌株的筛选

借鉴梅运军等(2011)的方法,采用丝裂霉素 C 释放细菌中的溶源性噬菌体。为确定丝裂霉素 C 诱导溶源噬菌体的有效浓度,将 5 株副溶血弧菌接种于 25 ml 2216E 培养液中,于 28℃ 160 r/min 振荡培养至  $OD_{660\text{nm}}$  为 0.2 左右。取 5 ml 于 25 ml 灭菌锥形瓶中,加入 0.5 mg/ml 丝裂霉素 C 至终浓度分别为 0、0.1、0.5、1 μg/ml。于 28℃ 继续振荡培养,每小时取 200 μl 菌液在 96 孔酶标板中测定  $OD_{660\text{nm}}$ ,连续监测 10 h。绘制每种丝裂霉素 C 浓度下 5 种细菌生长的均值曲线,选择有效的丝裂霉素 C 浓度。在该浓度下,对 5 株副溶血弧菌进行噬菌体溶源性感染与否的筛选。

### 1.5 噬菌体的分离

噬菌体的分离基本采用 Lan 等(2009)的方法,根据本实验的需要进行了修改。挑取疑似感染有溶源噬菌体的菌株的单菌落,分别接种于 5 ml 2216E 培养液中,28℃ 振荡培养过夜,制备种子液。取 1 ml 种子液接种于 150 ml 2216E 培养液中,于 28℃ 160 r/min 振荡培养至  $OD_{660\text{nm}}$  为 0.2 左右,加入丝裂霉素 C 至有效浓度,继续振荡培养约 4 h。将菌液于 4℃、6000 × g 离心 15 min,上清液用 0.22 μm 滤膜过滤。向滤液中逐步加入 NaCl 固体(国药,北京),使其完全溶解,至终浓度为 1 mol/L。冰上静置 30 min 后,于 4℃、6000 × g 再次离心 15 min。在上清液中逐步加入 PEG 6000,轻轻颠倒混匀,使 PEG 6000 (Sigma,美国)完全溶解,至终浓度为 10%。在 4℃ 竖直静置 24 h。然后,4℃、6000 × g 离心 20 min,弃上清液,沉淀溶于 500 μl TE 缓冲液(pH2.5)中,于 4℃ 暂存。

### 1.6 噬菌体电镜观察

取 20 μl 噬菌体提取液,滴于疏水载玻片上,覆盖铜网于其上,静置 10 min。取铜网,用滤纸吸去多余液体,再将铜网覆于 1 滴 2%的磷钨酸(pH=6.5)液滴上,静置 10 min。用滤纸从侧面吸去多余的液体,干燥后进行电镜观察并拍照。

### 1.7 副溶血弧菌菌株对卤虫无节幼体的感染实验

**1.7.1 菌液的制备** 分别接种各株副溶血弧菌于 30 ml TSB 培养液中,28℃ 摇床过夜培养,制备种子液。次日,分别取 300 μl 种子液加入 30 ml 新鲜的

TSB 培养液中, 28℃、160 r/min 振荡培养 6 h, 至菌浓度约为  $2 \times 10^9$  CFU/ml。

**1.7.2 卤虫卵的孵化** 称取 1 g 卤虫卵(Great Salt Lake, Utah, 美国)于 100 ml 纯水中, 连续充气 1 h 后, 用 100 目筛过滤, 将卤虫卵转移至 50 ml 离心管。加入脱壳液(NaClO 10 ml, NaOH 0.5 g, 纯水 4 ml), 充气 2 min, 立即依次用 1 L 无菌水、2 L 无菌 10%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 1 L 无菌水冲洗。将冲洗后的卤虫卵放入 1 L 盐度约 30 的无菌海水中, 28℃ 充气照明培养 24 h。

**1.7.3 卤虫无节幼体的感染实验** 5 株副溶血弧菌分别进行卤虫无节幼体攻毒, 每组设置 4 个平行。每个平行实验在 9 cm 无菌培养皿中进行。加入 30 ml 无菌海水(盐度约 30), 放入 30 只卤虫无节幼体, 加入 300  $\mu\text{l}$  菌液至终浓度为  $10^7$  CFU/ml。对照组加入 300  $\mu\text{l}$  无菌 TSB 培养液。培养 48 h 后, 对存活卤虫进行计数统计。取 100  $\mu\text{l}$  对照组培养液于 30 ml TSB 中, 在 28℃ 培养箱中放置 5 d, 确定无污染。

**1.7.4 数据分析与处理** 实验数据用 SPSS 18.0 进行处理, 使用 0.05 为显著性水平。

## 2 结果

### 2.1 5 株副溶血弧菌的 AHPND 相关质粒的 PCR 检测

利用 AP2 引物对 5 株副溶血弧菌进行 AHPND 相关质粒的 PCR 检测(图 1), 目的产物约为 700 bp, 表明 5 株菌均为含 AHPND 相关质粒的细菌。其中 20130629002S01, 20130726001S01 及 20130721001S023 株菌的 PCR 产物很亮, 另外 2 株菌编号为 2014VN-01S01G 和 20130722DXES05 的产物亮度较弱, 可能

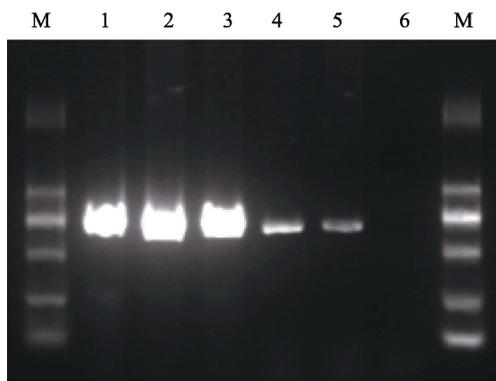


图 1 5 株副溶血弧菌的 AHPND 相关质粒的 PCR 检测  
Fig.1 PCR detection of plasmid associated with AHPND in the five isolates of *V. parahaemolyticus*

1. 20130629002S01(A); 2. 20130726001S01(D);
3. 20130721001S02(B); 4. 2014VN01S01G(E);
5. 20130722DXES05(C); 6. 空白对照 Blank control;
- M. DL2000 marker (TaKaRa)

代表 AHPND 相关质粒的拷贝数的差异。

### 2.2 丝裂霉素 C 诱导溶源噬菌体的最佳浓度的确定

5 株副溶血弧菌分别接种于 2216E 培养液中 28℃ 至  $OD_{660\text{nm}}$  值约为 0.2, 加入丝裂霉素 C, 使其终浓度分别为 0、0.1、0.5 和 1  $\mu\text{g/ml}$ , 每小时测定各菌  $OD_{660\text{nm}}$ 。监测 10 h 后绘制 5 株副溶血弧菌在不同丝裂霉素 C 浓度下的平均生长曲线(图 2)。结果显示, 丝裂霉素 C 浓度为 0 时, 所有菌株在 10 h 内的生长总体呈上升趋势; 丝裂霉素 C 浓度为 0.1  $\mu\text{g/ml}$  时, 多数副溶血弧菌菌株的生长受抑制, 但作用不明显; 而丝裂霉素 C 浓度为 0.5  $\mu\text{g/ml}$  和 1  $\mu\text{g/ml}$  时, 在 2 h 后细菌生长表现出了抑制作用。因此, 本实验最终选取丝裂霉素 C 的有效浓度为 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 用于诱导溶源噬菌体。

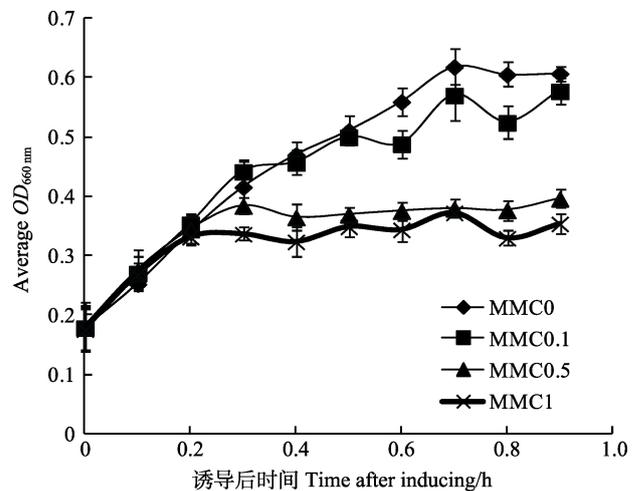


图 2 不同浓度丝裂霉素 C 对 5 种副溶血弧菌的生长影响  
Fig.2 The average effects of mitomycin C at different concentrations on the growth of *V. parahaemolyticus*

### 2.3 溶源性细菌的筛选

在丝裂霉素 C 浓度为 0.5  $\mu\text{g/ml}$  时, 对 5 株副溶血弧菌的生长曲线进行分析(图 3)。结果显示, 20130629002S01 (A)和 20130726001S01 (D)两株菌的生长曲线都呈现先上升后下降的生长趋势, 初步判定这两株菌为溶源性细菌。其中, 20130629002S01 (A)在添加丝裂霉素 C 后 1 h 达到最高值, 之后缓慢下降, 8 h 后基本趋于稳定, 裂解周期较长, 约为 7 h。而 20130726001S01 (D)在添加丝裂霉素 C 3 h 后生长达到最高值, 随后  $OD_{660\text{nm}}$  下降, 4 h 后基本趋于恒定, 裂解周期较短, 约为 1 h。为进一步确定是否携带溶源性噬菌体, 对 5 株副溶血弧菌在丝裂霉素 C 为 0.5  $\mu\text{g/ml}$  下进行诱导过夜培养, 次日, 只有 A 和 D 两菌株的

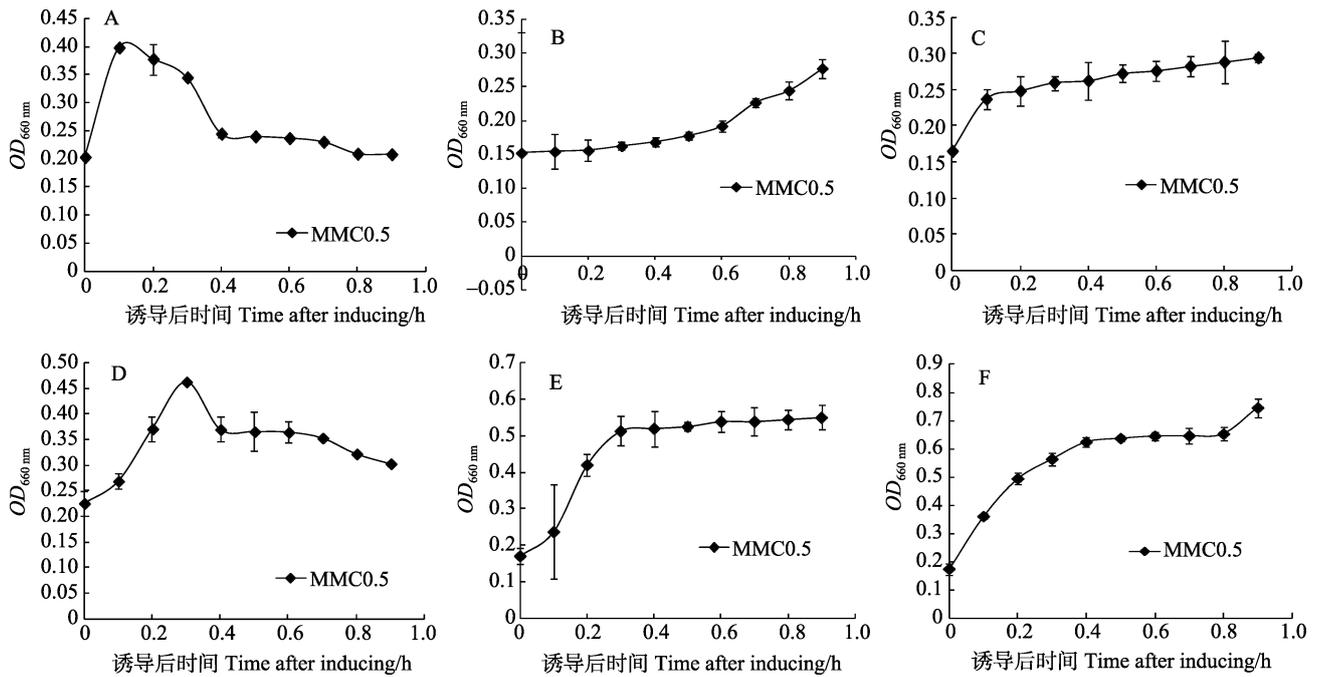


图 3 0.5  $\mu\text{g/ml}$  丝裂霉素 C 浓度对副溶血弧菌生长的影响  
Fig.3 Effects of 0.5  $\mu\text{g/ml}$  mitomycin C on the growth of *V. parahaemolyticus* strains

A. 20130629002S01; B. 20130721001S02; C. 20130722DXES05; D. 20130726001S01; E. 2014VN01S01G

培养液变澄清, 而其他 3 株菌的培养液并没有变澄清。结果表明 A 和 D 两株菌携带溶源性噬菌体。

#### 2.4 噬菌体的分离和电镜观察

为验证 A 和 D 两株菌(20130629002S01 和 20130726001S01)内有溶源噬菌体, 并验证丝裂霉素 C 诱导溶源噬菌体的方法的可行性, 分别分离 5 株菌的噬菌体, 并进行透射电镜观察。电镜观察结果(图 4)显示, 自 20130629002S01 (A)分离得到噬菌体 Phage1(图 4A)分为头尾两部分, 头部为球形, 直径约 50 nm, 有一丝状尾, 长约为 150 nm, 其上有 50 nm  $\times$  16 nm 左右

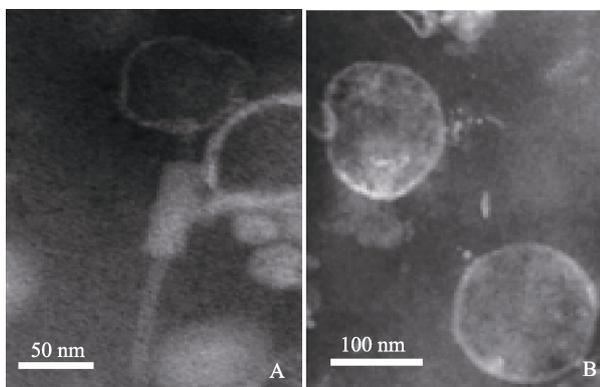


图 4 噬菌体电镜照片

Fig.4 Transmission electron microscopy of phages

A. 噬菌体 Phage1; B. 噬菌体 Phage2

的圆柱形鞘; 自 20130726001S01 (D)分离得到的噬菌体 Phage2(图 4B), 为球形, 直径约为 120 nm, 没有观察到尾部。噬菌体分离和电镜观察结果表明两株菌释放的噬菌体种类不相同。而其余 3 株副溶血弧菌未分离和观察到噬菌体, 表明它们并非溶源性细菌。

#### 2.5 副溶血弧菌对卤虫无节幼体的致病力

采用无菌培养的卤虫无节幼体测试 5 株副溶血弧菌的致病力。各组卤虫无节幼体的存活率用 SPSS 18.0 进行统计分析(图 5)。结果显示, 各组中卤虫无节幼体的存活率都存在显著差异( $P < 0.05$ )。其中, B 组(20130721001S02)卤虫存活率最低, 该菌株毒力最强。两株含有溶源噬菌体的菌株 A (20130629002S01)和 D (20130726001S01)的毒力介于 B、E (2014VN01S01G)之间, 显著低于菌株 B。中卤虫存活率可看出, 菌株 A 和菌株 D 对卤虫无节幼体的致病性分别为菌株 B 的 60.8%和 53.2%。

### 3 讨论

导致 AHPND 的副溶血弧菌( $VP_{\text{AHPND}}$ )对对虾的致病原因曾引起国际上的广泛关注, Lightner 等 2012 从部分  $VP_{\text{AHPND}}$  菌株中分离到了溶源性噬菌体, 因此怀疑溶源性噬菌体可能与  $VP_{\text{AHPND}}$  的致病性有关 (FAO, 2013)。随后的研究表明,  $VP_{\text{AHPND}}$  对对虾的致

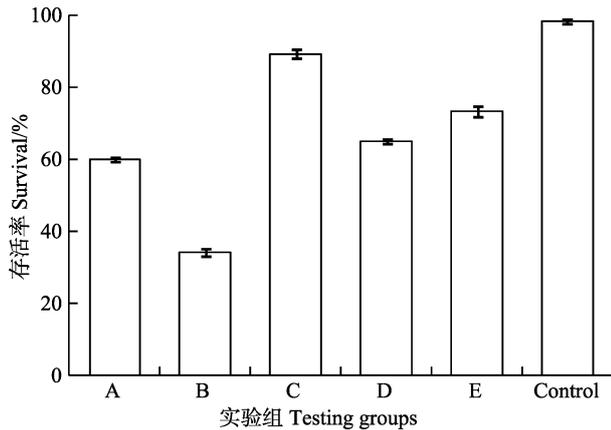


图 5 副溶血弧菌对卤虫无节幼体的致病力测试

Fig.5 Virulence testing of 5 isolates of *V. parahaemolyticus* on *Artemia nauplii*

A. 20130629002S01, B. 20130721001S02,  
C. 20130722DXES05, D. 20130726001S01,  
E. 2014VN01S01G, Control, Control group without  
*V. parahaemolyticus*

病性应该与副溶血弧菌携带了特定的质粒有关 (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Kondo *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), 在此之后 Lightner 等也否定了其原来的观点, 但这一过程并没有正式的研究报告。

本研究采用 Flegel 等 (2014)公开的  $VP_{AHPND}$  相关的质粒的检测方法, 对 5 株副溶血弧菌进行了 PCR 检测, 表明这 5 株副溶血弧菌均含有与 AHPND 相关质粒, 说明这 5 株副溶血弧菌均为 AHPND 的病原菌, 经卤虫无节幼体的感染实验, 证明了这 5 株副溶血弧菌具有不同的致病力, 而且 PCR 所得到较强条带的目标产物的 3 株菌对卤虫无节幼体的致病力也较强。

丝裂霉素 C 可用于分离细菌的溶源性噬菌体, 不同细菌所采用的丝裂霉素 C 的浓度有所不同 (Oakey *et al.*, 2000; Lan *et al.*, 2009)。本研究用 5 株副溶血弧菌测试对丝裂霉素 C 的敏感性, 确认 0.5  $\mu\text{g/ml}$  为适宜的使用浓度, 在此浓度下, 有两株副溶血弧菌 (2013-0629002S01 和 20130726001S01) 的生长曲线表现出溶源性噬菌体进入烈性周期的趋势, 表明只有一部分副溶血弧菌菌株中可能含有溶源性噬菌体, 这一结果不支持  $VP_{AHPND}$  的致病力是溶血性噬菌体赋予的观点。

超离心收集诱导释放的溶源性噬菌体, 经透射电镜下观察, 证明上述两株副溶血弧菌的噬菌体提取物中的确存在噬菌体, 但这两株副溶血弧菌中的噬菌体形态和大小完全不同, 属于两种不同的噬菌体, 形态上来看, phage1 类似 Wang 等 (2010) 的描述, 可能属于肌尾病毒科, 而 phage2 可能属于盖病毒科盖噬菌体属 (冯书章等, 2007), 具体种属有待进一步验证。该

结果表明所分离的噬菌体可能与  $VP_{AHPND}$  的 AHPND 致病性无关。

卤虫无节幼体可以作为副溶血弧菌致病力测试的动物模型, 其测试结果与副溶血弧菌对对虾的致病力具有相关性。采用卤虫无节幼体对 5 株副溶血弧菌的致病力测试结果进一步表明, 虽然两株含有溶源性噬菌体的副溶血弧菌对卤虫具有致病力, 但最高致病力的副溶血弧菌并不含溶源性噬菌体, 卤虫致病力的强弱与 AHPND 相关的质粒有关联, 而与溶源性噬菌体的有无无关, 噬菌体的存在也没有表现为副溶血弧菌致病力的提升。2014 年初, 本实验室从副溶血弧菌毒力株中鉴定了毒力相关蛋白 VPP19 (GenBank Accession KM035408), 这 5 株副溶血弧菌也含有 VPP19 基因。Sirikharin 等 (2014) 也从  $VP_{AHPND}$  鉴定了可能的毒力蛋白基因, 并建立了  $VP_{AHPND}$  的 PCR 检测方法。目前, 基因组学比较表明,  $VP_{AHPND}$  的毒力是由于染色体外的一个新发现的约 70 kb 的质粒所赋 (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Kondo *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014)。本研究结果进一步表明, 部分副溶血弧菌毒力株可能携带溶源性噬菌体, 但是溶源性噬菌体与副溶血弧菌的毒力无关。副溶血弧菌毒力株也存在致病力差异, 但是, 该差异产生的原因与溶源性噬菌体也没有必然联系。

## 参 考 文 献

- 冯书章, 刘军, 孙洋. 细菌的病毒—噬菌体最新分类与命名. 中国兽医学报, 2007, 27(4): 604-606
- 张宝存, 刘飞, 边慧慧, 等. 一株凡纳滨对虾病原菌的分离、鉴定及其致病力分析. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 56-62
- 张晓君, 梁利国, 阎斌伦, 等. 水产动物致病性副溶血弧菌双重 PCR 检测方法的研究. 海洋科学, 2010, 34(10): 7-12
- 梅运军, 陈锦, 沈萍. 诱导溶源性嗜盐古生菌产生噬菌体的方法. 生物技术, 2011, 21(6): 58-59
- FAO. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304) Hanoi, Vietnam, 25-27 June, 2013, FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053
- Flegel T, Lo CF. Announcement regarding free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). NACA News, 2014, [http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication\\_id=1128](http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication_id=1128)
- Gomez-Gil B, Soto-Rodríguez S, Lozano R, *et al.* Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. Genome Announc, 2014, 2(2): e14-e55
- Kondo H, Tinwongger S, Proespraiwong P, *et al.* Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. Genome Announc, 2014,

- 2(2): e214–e221
- Lan SF, Huang CH, Chang CH, *et al.* Characterization of a new plasmid-like prophage in a pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 strain. *Appl Environ Microb*, 2009, 75(9): 2659–2667
- Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, *et al.* Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, 15(1): 40
- Oakey HJ, Owens L. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *J Appl Microbiol*, 2000, 89(4): 702–709
- Schryver PD, Defoirdt T, Sorgeloos P. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathog*, 2014, 10(4): 1–2
- Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sritunyalucksana K, *et al.* A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria, 2014, [http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article\\_id=2030](http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030)
- Tran L, Nunan L, Redman RM, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ*, 2013, 105(1): 45–55
- Wang S, Jiang H, Chen J, *et al.* Isolation and rapid genetic characterization of a novel T4-like bacteriophage. *J Med Coll PLA*, 2010, 25(6): 331–340
- Yang YT, Chen IT, Lee CT, *et al.* Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc*, 2014, 2(5): e814–e816

(编辑 刘丛力)

## Isolation of Lysogenic Phage in *Vibrio parahaemolyticus* and Its Relationship with the Pathogenicity of the Host Bacteria

WANG Na<sup>1,2</sup>, WANG Hailiang<sup>1</sup>, BAI Nan<sup>1</sup>, HUANG Jie<sup>1,2,3①</sup>, XIE Daxiang<sup>4</sup>,  
XIE Qilang<sup>5</sup>, YU Junqi<sup>5</sup>, WAN Xihe<sup>6</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200; 4. Guangxi Academy of Fishery Science, Nanning 530021; 5. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 324005; 6. Jiangsu Institute of Oceanology and Marine Fisheries, Nantong 226007)

**Abstract** Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is caused by infection with *Vibrio parahaemolyticus*. In this study, five strains of *V. parahaemolyticus* were isolated from *Litopenaeus vannamei* with AHPND. The primer set AP2 targeting the plasmid harbored in AHPND-causing *V. parahaemolyticus* (VP<sub>AHPND</sub>) was used in the PCR amplification, and it was found that all five isolates carried the AHPND related plasmid. Mitomycin C was used to induce and screen the lysogenic phages in VP<sub>AHPND</sub> isolates. The growth curves showed that two isolates of *V. parahaemolyticus*, 20130629002S01 and 20130726001S01, contained lysogenic phages. Phage 1 and Phage 2 were released from 20130629002S01 and 20130726001S01 respectively after the induction with 0.5 μg/ml mitomycin C. Transmission electron microscopy revealed that Phage 1 had a tailed shape and Phage 2 had a spherical shape. The challenge test on *Artimia nauplii* suggested that the virulence was significantly different between the 5 strains of *V. parahaemolyticus*. The pathogenicity of two lysogenic phages-containing strains, 20130629002S01 and 20130726001S01, was significantly lower than that of phage-free 20130721001S02. Our study suggested that the presence of lysogenic phage might not necessarily correlate with the pathogenicity of the host bacterium *V. parahaemolyticus*.

**Key words** *Vibrio parahaemolyticus*; Lysogenic phage; Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn