

日本对虾(*Penaeus japonicus*)病原需钠弧菌 (*Vibrio natriegens*)表型与分子特征 及 LAMP 检测方法的建立*

陈 丽 白雪松 张晓君^① 毕可然 秦 蕾 阎斌伦

(淮海工学院 江苏省海洋资源开发研究院 连云港 222005)

摘要 采用常规表观生物学特性及 16S rRNA、*gyrB* 及 *rpoA* 基因同源性检索与系统发育学分析等方法,对分离自江苏连云港某育苗场的大批死亡日本对虾蚤状幼体的优势生长菌进行了综合鉴定。结果表明,其形态和生理生化特征与弧菌属的需钠弧菌相近;16S rRNA、*gyrB* 及 *rpoA* 基因同源性检索也均与需钠弧菌相似性最高,分别为 98%、89%和 95%,且三种基因的 NJ 系统发育树也均与需钠弧菌聚为一个分支;分离菌的致病性试验表明其半数致死量 LD_{50} 为 1.8×10^6 CFU/ml。综合分离菌的致病性、形态与生理生化特征及基因同源性系统发育分析结果,认为引起日本对虾蚤状幼体大批死亡的病原为需钠弧菌。基于 *gyrB* 基因序列设计 1 套 LAMP 特异性引物,建立了需钠弧菌的快速特异性检测方法,可用于由需钠弧菌引起的水产动物疾病的诊断及分子流行病学的调查研究。

关键词 日本对虾,需钠弧菌,16S rRNA,*gyrB*,*rpoA*,LAMP

中图分类号 Q346

日本对虾(*Penaeus japonicus*)俗称花虾、竹节虾、花尾虾、斑节虾、车虾,分类于甲壳纲(Crustacea)、对虾科(Penaeidae)、对虾属(*Penaeus*),广泛分布于世界各地,具有适温性广、生长迅速、抗病力强、耐干露、肉质鲜美、营养丰富等特点,在我国北方沿海地区规模化养殖迅速发展并已达到产业化。随着日本对虾集约化养殖业的发展,在白斑综合征病毒病严重限制对虾养殖业发展的同时,细菌病害也日趋严重,由弧菌属(*Vibrio*)细菌引起的“弧菌病(Vibriosis)”是在世界各地对虾养殖中普遍流行且危害最大的细菌性疾病,常表现为发病急剧、流行广泛、发病和致死率高等特点,由于病原弧菌的种类较多,在生产实践中难以做到具有针对性地有效防控,给对虾养殖业带来了巨大的经济损失并已成为制约其养殖发展的重大障碍。在水环境庞大的细菌类群中,近年来已报

道引起日本对虾感染发病的细菌主要有杀虾微杆菌(*Microbacterium shrimpcida* sp.)(房海等,2007)、杀对虾弧菌(*Vibrio penaeicida*)(Ishimaru *et al*, 1995)、鳗弧菌(*V. anguillarum*)(邓欢等,1998)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)(Liu *et al*, 1996)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)(Lee *et al*, 1996)等,且一些新的病原菌仍不断被发现。因此对于细菌感染的病原确定,选择合适的分子靶标,研究开发灵敏度高、特异性强的病原菌快速检测方法已十分重要,以便在对虾处于带菌状态或大规模暴发细菌性疾病之前能进行准确的检测。

江苏连云港赣榆某对虾育苗场日本对虾蚤状幼体出现大批死亡,发病幼体主要表现为摄食减少、活力差;病死幼体体色发红。经对病死幼体检测表明病原为弧菌属的需钠弧菌(*V. natriegens*)。本文报道了病原菌的致病性、表型特征与 16S rRNA、*gyrB* 及 *rpoA*

* 江苏省水产三项工程项目资助, PJ2010-58 号, DY2012-3-7 号; 中央财政支持地方高校发展专项资金资助, CXTD16 号; 连云港市科技攻关项目资助, CG1134 号; 江苏高校优势学科建设工程项目资助, 2011 年; 江苏省“六大人才高峰”资助项目, 2011-NY017 号。陈 丽, 副教授, E-mail: lisachendong@yahoo.com.cn

通讯作者: 张晓君, 博士, 教授, E-mail: zxj9307@163.com

收稿日期: 2012-03-15, 收修改稿日期: 2012-04-30

等基因的系统发育学分析等,同时建立了环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)快速检测病原需钠弧菌的方法,旨在对该病原菌的有效检验及进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 发病幼体检验及细菌分离

江苏连云港赣榆某育苗场的日本对虾蚤状幼体发生大批死亡,部分池内死亡率达 90%以上。发病幼体主要表现为摄食减少、活力差;病死幼体体色发红。

取部分濒死幼体用无菌生理盐水离心洗涤多次,无菌操作研磨制备成虾体组织悬浮液。取虾体组织悬浮液,划线接种于普通营养琼脂和 Zobell 2216E 海水营养琼脂平板培养基,28℃培养 24h 后,选取优势生长菌落进一步划线纯化后,转接普通营养琼脂斜面保存备用,同时转接甘油管于-40℃保存。菌株编号为 JL120508。取虾体组织悬浮液涂片后革兰氏染色镜检细菌。

1.2 致病作用检验

试验虾选用暂养 3d 后的健康日本对虾仔虾,采用浸浴的感染方式。将供试菌株(JL120508)接种于普通营养肉汤,28℃过夜培养后作为供试菌液,试验设置 5 个菌液浓度梯度,分别为 2.4×10^8 、 2.4×10^7 、 2.4×10^6 、 2.4×10^5 和 2.4×10^4 CFU/ml,同时设立接种无菌营养肉汤作对照。选取健康的日本对虾苗,每个试验组分别放置活力基本一致的仔虾苗 30 尾。每 2h 观察并记录死亡情况,以引起仔虾发病死亡并能重新分离回收到原感染菌作为分离菌致病性的判定标准。

1.3 细菌形态特征与生理生化特性检验

将上述纯培养菌株分别接种于 Zobell 2216E 海水营养琼脂平板和营养肉汤,28℃培养 24h 后观察菌落的表征形态,同时对细菌进行革兰氏染色,在光学显微镜观察细菌形态特征,供试菌株经磷钨酸负染后透射电子显微镜下检查形态。各项生理生化指标的测定主要参照“Bergey's Manual of Systematic Bacteriology”(Brenner *et al.*, 2008)进行。

1.4 16S rRNA、*gyrB* 和 *rpoA* 基因序列测定与系统发育学分析

1.4.1 全基因组 DNA 的制备 将供试菌接种于营养肉汤中 28℃过夜培养后。取 2ml 的菌悬液按细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海赛百盛生物工程有限公司)所述方法提取 DNA 作为 PCR 模板,-20℃保存

备用。

1.4.2 基因 PCR 扩增与测序 16S rRNA 和 *gyrB* 两种基因序列的 PCR 扩增方法参照张晓君等(2009a, b)的方法进行,*rpoA* 基因序列的 PCR 扩增方法按照姚东瑞等(2010)方法进行,利用生工生物工程(上海)有限公司的 DNA 快速纯化试剂盒进行 PCR 产物的回收纯化,纯化产物送上海生工测序。

1.4.3 系统发育树的构建 对分离菌的 16S rRNA、*gyrB* 和 *rpoA* 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性分析,并使用 ClustalX2.0 软件与从 GenBank 数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列进行多序列比对(Multiple Alignments),并对 16S rRNA、*gyrB* 和 *rpoA* 基因采用 MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA)软件构建系统发生树,采用邻接(neighbor joining method)建树方法,并通过 Bootstrap 法(1000 次重复)检验。

1.5 病原菌 LAMP 检测方法的建立

1.5.1 引物设计与合成 以 *gyrB* 基因为靶基因设计需钠弧菌的特异性检测引物,由上海生工合成。FIP: AGC AAG TTT GCC CGG AAG GC-TTTT-AAG CTC GTG AAA TGA CTC GT; BIP: ACA TTG TGG AGG GTG ACT CTG C-TTTT-GCC TGG TTC TTA CGG TTA CG; F3: CAG CAC GTG CTC GTG AAC; B3: GGA TCT ACC TTT CAG CGG C。

1.5.2 LAMP 特异性检测体系的建立 对 LAMP 反应条件和各组分浓度进行优化,确定反应的最佳程序。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶在 80V 电压下电泳 45min,凝胶成像系统成像记录。以鳃弧菌(*V. anguillarum*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、美人鱼弧菌(*V. damsela*)及爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)为 LAMP 特异性检验的对照菌株,4 株对照菌均分离自海水养殖动物,且已通过鉴定(张晓君等, 2009a, b; Zhang *et al.*, 2011; 陈翠珍等, 2005),本实验室保存供用。

2 结果

2.1 供试菌致病性及 LD_{50}

供试菌株(JL120508)每组浸浴感染健康日本对虾仔虾苗 30 尾,供试虾苗死亡情况见表 1。感染后虾苗表现出行动迟缓,对外界刺激反应慢或无反应,体色发暗,虾体较混浊。 LD_{50} 计算方法参考张庆萍等(2000), LD_{50} 为 1.8×10^6 CFU/ml。

取感染死亡虾苗进行细菌学检验,结果分离到大量在形态特征上同原感染菌的细菌,形态特征及

表 1 分离菌(JL120508)的致病性
Tab.1 Pathogenicity of isolates (JL120508)

组别	细菌浓度 (CFU/ml)	感染尾数	感染死亡时间及死亡数								死亡率 (%)
			2h	4h	6h	12h	18h	24h	48h	总数	
试验组	2.4×10^8	30	4	9	12	5	0	0	0	30	100
	2.4×10^7	30	2	1	7	9	5	6	0	30	100
	2.4×10^6	30	0	0	2	2	6	2	1	13	43
	2.4×10^5	30	0	0	0	1	2	3	0	6	20
	2.4×10^4	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0

主要理化特性指标的复核鉴定结果均与原感染菌一致。致病性试验结果表明分离菌为本次引起日本对虾蚤状幼体群体性死亡的病原菌且具有较强的致病性。

2.2 供试菌表型特征

菌株 JL120508 在 Zobell2216E 海水营养琼脂平板上菌落特征为圆形光滑、边缘整齐、中央隆起、半透明、淡黄色的菌落, 培养 24h 观察直径多在 1mm 左右。革兰氏染色后观察可见菌体为革兰氏阴性、杆状、散在、两端钝圆、大小多在(0.5—0.8) $\mu\text{m} \times$ (1.0—2.4) μm ; 经 EM 负染色标本检查, 菌体具多聚- β -羟基丁酸盐颗粒(图 1)。生长需 NaCl, 在无盐水中不能生长, 在普通营养肉汤中 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24h, 呈均匀混浊生长, 有絮状菌体沉淀, 有很轻微的菌环且摇动后易脱落消散。所测理化性状结果见表 2。

2.3 16S rRNA、gyrB 和 rpoA 基因序列的系统发育树构建

分离菌 JL120508 所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1461bp(GenBank 存取号: JX993271); 所扩增的 *gyrB* 基因序列长度为 1179bp(GenBank 存取号: JX993272); 所扩增的 *rpoA* 基因序列长度为 1038bp(GenBank 存取号: JX993273)。

16S rRNA 基因序列在 NCBI 通过 Blast 进行同源检索, 在检索出的序列中主要包括需钠弧菌(*V. natriegens*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)和 *V. ponticus*, JL120508 株与这些弧菌相似性均在 98% 以上。选择嗜水气单胞菌 16S rRNA 基因序列(登录号:



图 1 JL120508 株电镜照片
Fig.1 Electron micrograph of JL120508

注: 示多聚- β -羟基丁酸盐颗粒, 比例尺=500nm

AF099022)作为外围菌将分离菌与检索出的部分弧菌菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析, 其系统发育树如图 2 所示。

gyrB 基因序列检索结果主要包括需钠弧菌(*V. natriegens*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)及溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)等, JL120508 株与需钠弧菌相似性均在 89%, 与其它弧菌相似性在 86%—87%。选择嗜水气单胞菌 *gyrB* 基因序列(登录号: AF074917)作为外围菌进行系统发育学分析, 其系统发育树如图 3 所示。

rpoA 基因序列检索结果主要包括需钠弧菌(*V. natriegens*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)、轮虫弧菌(*V. rotiferianus*)及坎氏弧菌(*V. campbellii*)等, JL120508 株与这些弧菌相似性在 95%—97%, 选择鳗利斯顿氏菌 *rpoA* 基因序列(登录号: AJ842560)作为外围菌进行系统发育学分析, 其系统发育树如图 4 所示。

2.4 菌株分类位置

综合表型特征, 依据《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》(Brenner *et al*, 2008)并结合 16S rRNA、*gyrB* 和 *rpoA* 基因系统发育学分析的结果, 判定分离菌为弧菌属的需钠弧菌。

2.5 病原菌 LAMP 特异性检测

经过多次优化后的 LAMP 反应体系和条件为: 25 μl 反应体系中含有 MgSO_4 2 μl (25mmol/L)、dNTP 2.5 μl (10mmol/L)、betaine 4 μl (5mol/L)、外引物 0.4 μl (10 $\mu\text{mol/L}$)、内引物 1.6 μl (10 $\mu\text{mol/L}$)、BstDNA 聚合酶 1 μl (8000U)、10 \times Thermopol buffer 2.5 μl 、DNA 模板 1 μl 以及双蒸水 8 μl 。LAMP 反应条件: 65 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温保持 60min, 之后 80 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 10min。

以 *gyrB* 基因为靶基因, 对已鉴定的需钠弧菌和其它海水鱼类病原菌基因组 DNA 分别进行 LAMP 扩增, 结果仅需钠弧菌扩增出阶梯状条带, 而鳗利斯顿氏菌、副溶血弧菌、美人鱼弧菌及爱德华氏菌均未出

表 2 分离菌的生理生化特性
Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of isolates

特性	分离菌	需钠弧菌*	特性	分离菌	需钠弧菌*
形态	杆状	杆状	棉子糖	+	v
革兰氏染色	-	-	蜜二糖	-	d
氧化酶	+	+	麦芽糖	+	+
接触酶	+	+	蔗糖	+	+
O-F 试验	F	F	α -甲基-D-葡糖苷	-	d
动力	-	+	尿素酶	-	.
赖氨酸脱羧酶	-	-	淀粉酶	+	.
精氨酸双水解酶	-	-	DNA 酶	-	.
鸟氨酸脱羧酶	-	-	苯丙氨酸脱氨酶	-	.
精氨酸脱羧酶	+	+	明胶酶	+	d
葡萄糖产酸	+	+	乙酰胺酶	-	.
葡萄糖产气	-	-	ONPG	-	.
甘露糖	-	d	葡萄糖铵	+	.
半乳糖	+	d	醋酸盐	-	.
甘露醇	+	+	枸橼酸盐	-	+
肌醇	-	-	丙二酸盐	+	.
山梨糖	-	-	酒石酸盐	-	.
水杨素	+	+	葡萄糖酸盐	+	.
胆汁七叶苷	+	.	硝酸盐还原	+	+
侧金盏花醇	-	-	硝酸盐产气	-	.
纤维二糖	-	d	吡啶	-	-
粘液酸	-	.	硫化氢	-	.
木糖醇	-	.	MR test	-	.
阿拉伯糖	+	+	VP test	-	v
山梨醇	-	-	生长: 4°C	-	-
木糖	-	-	30°C	+	+
糊精	-	.	35°C	+	+
乳糖	+	+	40°C	+	+
松三糖	-	.	NaCl 中生长: 0g/L	-	-
鼠李糖	+	+	10g/L	+	+
赤藓糖	-	-	30g/L	+	+
苦杏仁苷	-	-	60g/L	+	+
卫茅醇	-	-	80g/L	+	+

注: +示阳性, -示阴性, F 示发酵型, d 示 11%—89% 阳性, v 示结果可变, . 示在原文中无记载。上角标*指本栏中数据取自“Bergey's Manual of Systematic Bacteriology” (Brenner *et al.*, 2008)

现任何扩增条带(图 5)。表明建立的需钠弧菌 LAMP 检测方法具有很强的特异性。

3 讨论

需钠弧菌是海洋微生物中常见的兼性厌氧细菌,

广泛存在于河口入海处、近海岸的海水、海底沉积物及海生动物中, 是一种条件致病菌, 可导致水产养殖动物患病死亡。王斌等(1993)报道了需钠弧菌引起中国对虾(*Penaeus chinensis*)的红腿病并导致其死亡, 死亡率高达 90% 以上, 当虾池水中菌数达一定量时

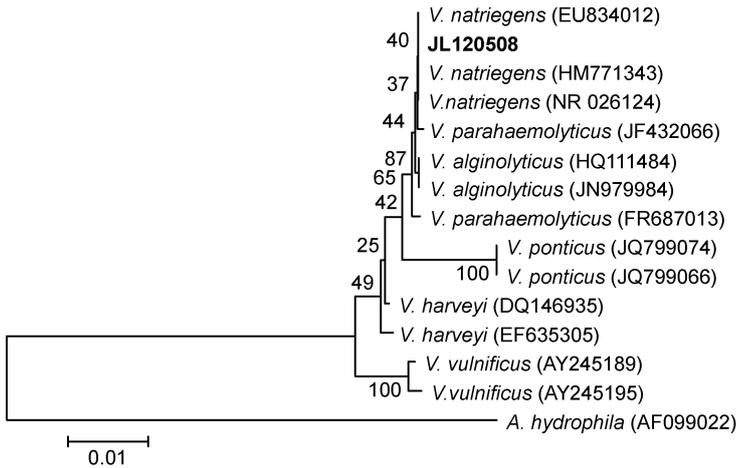


图2 JL120508 株 16S rRNA 基因序列 NJ 系统发育树

Fig.2 NJ phylogenetic tree based on JL120508 16S rRNA gene sequences
注: 图中黑体字为本文研究的菌株编号。下同

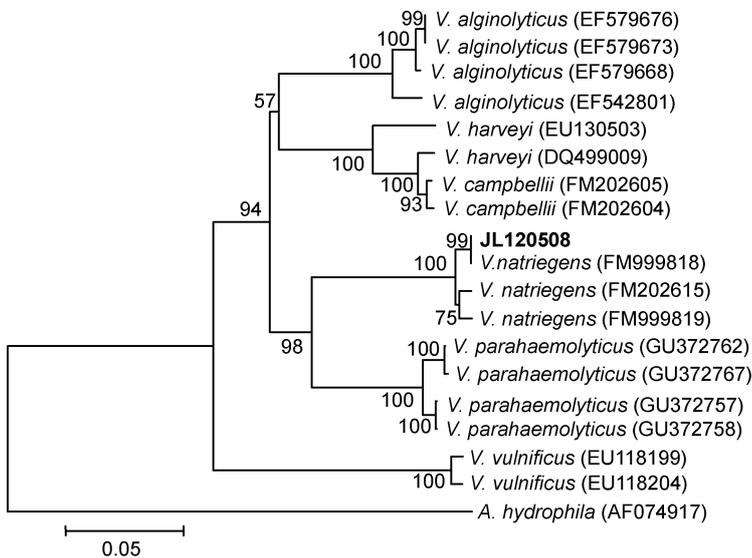


图3 JL120508 株 *gyrB* 基因序列 NJ 系统发育树

Fig.3 NJ phylogenetic tree based on JL120508 *gyrB* gene sequences

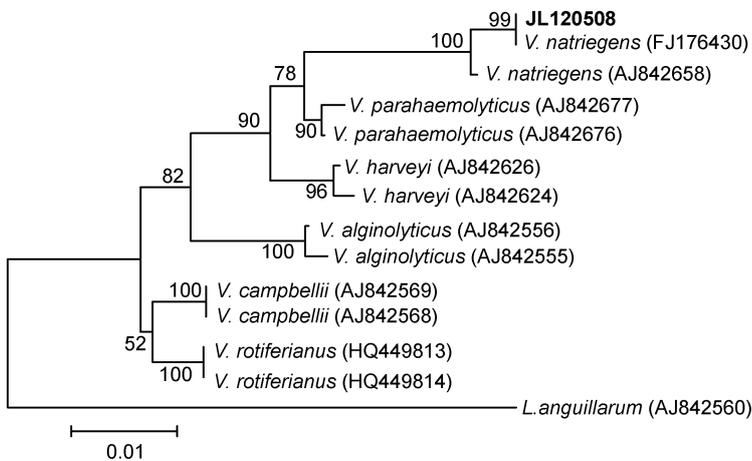


图4 JL120508 株 *rpoA* 基因序列 NJ 系统发育树

Fig.4 NJ phylogenetic tree based on JL120508 *rpoA* gene sequences

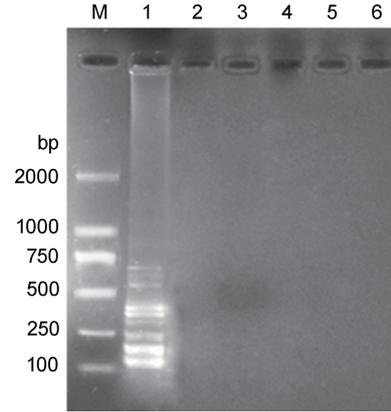


图5 需钠弧菌 LAMP 特异性检测结果

Fig.5 Specificity of LAMP for detection of *V. natriegens*

注: M. DL2000; 1. 需钠弧菌; 2. 爱德华氏菌; 3. 副溶血弧菌; 4. 美人鱼弧菌; 5. 鳗弧菌; 6. 阴性对照

可通过体表或创伤部位侵入虾体引起发病, 有较强的致病性。毕可然等(2010)报道需钠弧菌可导致三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)行动迟缓, 对外界刺激反应慢或无反应, 摄食减少, 最终死亡。邓欢等(2004)报道了需钠弧菌导致海湾扇贝(*Argopecten irradians*)肠道及肾肿胀、生殖腺及外套膜萎缩、壳内面变黑。李国等(2009)报道需钠弧菌可感染文蛤(*Meretrix meretrix*), 发病文蛤不能潜入沙中, 外壳无光泽, 有大量粘液, 闭壳肌肿大, 贝壳不能紧密闭合, 对刺激反应迟钝, 足呈酱红色至紫黑色, 外套膜和鳃糜烂等症状。本研究表明, 该菌可引起养殖日本对虾蚤状幼体发生以摄食减少、行动迟缓、活力差、体色发红等症状, 并呈现群体性死亡。

本试验采用传统的形态、生理生化特征和 16S rRNA、*gyrB* 和 *rpoA* 基因序列的系统发育学分析, 对分离自患病日本对虾的菌株 JL120508 进行了系统研究。其主要理化特征及序列同源性分析与 NJ 系统发生树结果, 均表明分离菌株 JL120508 与需钠弧菌亲缘关系最为接近。综合形态与生理生化特征及多基因分子特征, 鉴定菌株 JL120508 为弧菌属的需钠弧菌。

需钠弧菌作为一种较为常见且致病性较强的病原细菌, 传统的检测手段操作繁琐、耗时长, 不能满足快速、准确检测的需要。本研

究以需钠弧菌的 *gyrB* 基因为靶基因设计一套 LAMP 特异性引物, 通过优化 LAMP 检测体系的条件, 建立一种能够快速、准确的检测需钠弧菌的方法, 相比于普通 PCR 方法, LAMP 检测方法特异性及敏感性较高, 不需昂贵仪器, 更适用于养殖现场检测应用。

参 考 文 献

- 王 斌, 李 华, 王幽峰, 1993. 引起中国对虾红腿病的两种新病原菌的研究. 大连水产学院学报, 8(2/3): 43—48
- 邓 欢, 王年斌, 安育新, 1998. 日本对虾(*Penaeus japonicus*)受弧菌感染的发病情况与感染剂量、温度条件的关系. 水产科学, 17(2): 3—7
- 邓 欢, 陈 倅, 苏 浩等, 2004. 海湾扇贝幼体期流行性弧菌病的研究. 大连水产学院学报, 19(4): 258—263
- 毕可然, 梁立国, 阎斌伦等, 2010. 三疣梭子蟹病原菌检测与分析. 河北科技师范学院学报, 24(4): 23—27
- 李 国, 闫茂仓, 孙 杰等, 2009. 文蛤病原菌需钠弧菌的鉴定和生物学特性分析. 渔业科学进展, 30(6): 103—109
- 张庆萍, 黄晓辉, 谢海棠, 2000. 计算 LD_{50} 的查表法和经验估算法. 中国临床药理学和治疗学, 5(2): 162—163
- 张晓君, 陈翠珍, 阎斌伦等, 2009a. 凡纳滨对虾病原副溶血弧菌的表型及分子特征. 海洋与湖沼, 40(5): 654—661
- 张晓君, 秦国民, 阎斌伦等, 2009b. 半滑舌鳎病原鳃利斯顿氏菌表型及分子特征研究. 海洋学报, 31(5): 1—11
- 陈翠珍, 房 海, 张晓君等, 2005. 牙鲆与大菱鲆病原迟钝爱德华氏菌生物学特性及系统发育分析. 高技术通讯, 15(10): 82—88
- 房 海, 陈翠珍, 张晓君等, 2007. 日本对虾(*Penaeus japonicus*)虾苗杀虾微杆菌(*Microbacterium shrimpcida* sp. nov.)感染及病原菌检验. 海洋与湖沼, 38(2): 151—156
- 姚东瑞, 邢旭文, 朱 明等, 2010. 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)病原温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)分子鉴定及耐药性研究. 海洋与湖沼, 41(5): 756—762
- Brenner D J, Krieg N R, Staley J T, 2008. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (second edition). Volume 2. Springer: 546—551
- Ishimaru K, Akagawa-matsushita M, Muroga K, 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of Kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1): 134—138
- Lee K K, Yu S R, Yang T I *et al*, 1996. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased Kuruma prawns, *Penaeus japonicus*. *Letters in Applied Microbiology*, 22(2): 111—114
- Liu P C, Lee K K, Yii K C *et al*, 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased Kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology*, 33(2): 129—132
- Zhang X J, Qin G M, Bing X *et al*, 2011. Phenotypic and molecular characterization of *Photobacterium damsela*, a pathogen of the cultured tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in China. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 45(1): 1—13

PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION AND THE LAMP DETECTION OF PATHOGENIC *VIBRIO NATRIEGENS* ISOLATED FROM DISEASED *PENAEUS JAPONICUS*

CHEN Li, BAI Xue-Song, ZHANG Xiao-Jun, BI Ke-Ran, QIN Lei, YAN Bin-Lun

(College of Ocean, Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, 222005)

Abstract A mass mortality of zoea of *Penaeus japonicus* broke out in a hatchery in Lianyungang, Jiangsu Province. The dominant bacterial colonies were isolated and confirmed the pathogenicity by challenge experiments, the LD_{50} of the isolates to *P. japonicus* was 1.8×10^6 CFU/ml. The morphological, physiological, biochemical characteristics were examined, and the 16S rRNA gene, *gyrB* gene and *rpoA* gene sequences were amplified and compared with sequences stored in the databases, from which molecular phylogenetic trees were constructed. The isolates showed that properties and biochemical characteristics similar to *Vibrio natriegens*. The sequenced 16S rRNA gene of strain JL120508 (GenBank accession No.JX993271) was 1461bp, the *gyrB* gene of strain JL120508 (GenBank accession No.JX993272) was 1179bp, and the *rpoA* gene of strain JL120508 (GenBank accession No.JX993273) was 1038bp in length. The 16S rRNA, *gyrB* gene and *rpoA* gene sequences displayed high similarity to the genes of *V. natriegens* from GenBank database. The phylogenetic trees based on 16S rRNA, *gyrB* and *rpoA* sequences, JL120508 clustered with the *V. natriegens* strains, and was supported by high bootstrap value, strongly supporting the assignment of isolate JL120508 to *V. natriegens*. In addition, specific primers were designed based on the *gyrB* gene sequences, and the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detecting *V. natriegens* was established. The LAMP is suggested to be useful in the specific and rapid diagnose and epidemiological investigation of the disease caused by *V. natriegens*.

Key words *Penaeus japonicus*, *Vibrio natriegens*, 16S rRNA, *gyrB*, *rpoA*, LAMP