

文章编号: 1004-7271(2008)01-0028-06

## 三疣梭子蟹感染血卵涡鞭虫 PCR检测方法的建立

施慧<sup>1</sup>, 许文军<sup>1</sup>, 徐汉祥<sup>1</sup>, 李鹏飞<sup>1</sup>, 史海东<sup>2</sup>

(1. 浙江海洋学院海洋与渔业研究所, 浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316100;

2. 浙江省普陀区海洋与渔业局, 浙江舟山 316100)

**摘要:**血卵涡鞭虫病是近年来三疣梭子蟹养殖过程中发生的一种危害较大的流行性疾病,患病蟹的体液和肌肉组织中有大量的血卵涡鞭虫寄生。该病多发生于每年9~11月份的夏秋季节,会在短时间内出现死亡高峰。因该病流行范围广、死亡率高、危害严重,对三疣梭子蟹养殖业发展影响很大。本文根据 GenBank 中登陆的血卵涡鞭虫 18S rDNA 和 ITS1 基因序列设计了 1 对特异性引物,建立了血卵涡鞭虫病的 PCR 检测方法,从感染血卵涡鞭虫的三疣梭子蟹组织 DNA 中扩增出产物大小为 585 bp 的 DNA 片段。本方法可快速、特异地检测出三疣梭子蟹感染和携带血卵涡鞭虫的状况,为三疣梭子蟹的健康养殖和血卵涡鞭虫病的流行病学调查提供了快速、简便的手段。

**关键词:**三疣梭子蟹; 血卵涡鞭虫; ITS1; PCR 检测方法

中图分类号: S 917 文献标识码: A

### Development of an ITS1 gene-targeted PCR-based diagnosis for *Portunus trituberculatus* parasite *Hematodinium* sp.

SHI Hui<sup>1</sup>, XU Wen-jun<sup>1</sup>, XU Han-xiang<sup>1</sup>, LI Peng-fei<sup>1</sup>, SHI Hai-Dong<sup>2</sup>

(1. Marine and Fishery Research Institute of Zhejiang Ocean University, Marine and

Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China;

2. Puto Ocean and Fishery Bureau, Zhoushan 316100, China)

**Abstract:** The *Portunus trituberculatus* from Zhoushan is seasonally infected by a parasitic dinoflagellate of the genus *Hematodinium* sp. . Dinoflagellates were found in haemolymph and tissues of infected crabs where the parasite proliferates and causes mortalities. Methods used to detect infection include a morphological index (pleopod diagnosis) and several immunoassays. The present study describes the development and application of a set of *Hematodinium*-specific polymerase chain reaction (PCR) primers based on the *Hematodinium* 18S ribosomal DNA (18S rDNA) and the first internal transcribed spacer (ITS1). In the PCR assay, a diagnostic band 585 bp was consistently amplified from total genomic DNA isolated from *Hematodinium*-infected *Portunus trituberculatus*. An effective diagnostic tool is provided for detecting *Hematodinium* sp. infections and diagnosing epidemic diseases.

收稿日期: 2007-04-20

基金项目: 浙江省科技厅院所研究开发项目(2006F13002); 浙江省自然科学基金项目(Y3055045); 浙江省科技厅人才培养项目(2006R20009)

作者简介: 施慧(1978-), 女, 江苏启东人, 工程师, 硕士, 主要从事海水养殖病害方面的研究。Tel: 0580-3053386, E-mail: huishi2002@126.com

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; *Hematodinium* sp.; ITS1; PCR-based diagnosis

2004~2005年浙江舟山地区养殖的三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)发生大规模性的死亡,患病蟹通常表现出明显的症状,横切步足,在断口处有乳白色的体液流出;打开蟹盖,其内亦有大量牛奶状体液。本实验室从典型患病三疣梭子蟹的体液和组织中发现并分离到一种寄生原虫。经流行病学调查、感染试验、组织病理学以及电镜观察等研究确定该寄生虫为血卵涡鞭虫(*Hematodinium* sp.)。该寄生虫病发病率通常在20%~50%,平均死亡率约20%左右,疫情严重的死亡率可达60%~70%以上,有的甚至达到100%,给三疣梭子蟹养殖业造成了严重的经济损失<sup>[1]</sup>。血卵涡鞭虫属植鞭动物门、腰鞭虫纲、Syndinida目、血卵涡鞭虫属,是海水甲壳类的重要病原性寄生虫。自1931年Chatton等<sup>[2]</sup>首次报道法国沿岸绿蟹的血卵涡鞭虫感染以来,至今国外许多地区包括澳大利亚、阿拉斯加、苏格兰、加拿大以及美国东部沿岸等地均发现和报道了该寄生虫病。该病的流行已威胁到挪威龙虾(*Nephrops norvegicus*)、蓝蟹(*Callinectes. Sapidus*)、白氏雪蟹(*Chionoecetes. bairdi*)以及蛛雪蟹(*Chionoecetes. opilo*)等许多重要经济甲壳类的渔业生产<sup>[3-6]</sup>。目前血卵涡鞭虫的生活史特征尚不确定,而该寄生虫引发的疾病却往往呈大规模流行趋势,对我国三疣梭子蟹养殖业的发展影响很大。目前为止,国内对于该寄生虫病的诊断还依赖于病原形态学观察,但是血卵涡鞭虫的形态大小与蟹类的血淋巴细胞非常相似,在普通显微镜下不能判断;而电镜观察样本制备的价格比较昂贵且步骤也比较烦琐,因此迫切需要寻找其它方法对该寄生虫病进行检测,目前国外已有该寄生虫病的PCR诊断报道<sup>[7-8]</sup>。本文据GenBank中已发表血卵涡鞭虫的18S rDNA及ITS基因序列设计了针对ITS1基因序列的引物,并对引物的特异性进行了验证,在此引物的基础上建立了针对血卵涡鞭虫的PCR检测方法,并应用于养殖生产上三疣梭子蟹感染血卵涡鞭虫病的检测。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

血卵涡鞭虫样本采自2004-2005年发病的人工养殖的三疣梭子蟹,将蟹血淋巴液样本采集后立即放入95%乙醇中固定后备用。

### 1.2 模板DNA的制备

将固定的蟹血淋巴液样本取出,2 000 r/min离心5 min,弃上清,加入Tris样品缓冲液溶解沉淀;取500  $\mu$ L上述样品处理液,加入88  $\mu$ L 10% SDS和4~6  $\mu$ L的蛋白酶K(20 mg/mL)混匀;再在55 $^{\circ}$ C水浴中保温30~120 min,其间不断混匀;然后加入等体积的酚/氯仿抽提1次,取上清液加入2倍体积的无水乙醇,室温放置5 min,然后12 000 r/min离心10 min,收集沉淀,用75%乙醇洗涤1次,DNA颗粒用适量的TE缓冲液溶解,置-20 $^{\circ}$ C保存备用。蟹源弧菌及三疣梭子蟹DNA样本作为本实验的对照,按同样的方法制备。

### 1.3 引物的设计与合成

对GenBank中公布的血卵涡鞭虫的18S rDNA(DQ084245)和ITS(DQ925236)的基因序列进行酶切分析后设计一对针对ITS1的特异性引物:

Primer 1:5'-CTGATTACGTCCCTGCCCTT-3';

Primer 2:5'-GCATGTCGCTGCGTTCTTC-3'

### 1.4 目的基因的克隆、序列测定及分析

PCR反应体系(25  $\mu$ L)为:2.5  $\mu$ L 10 $\times$  buffer,2  $\mu$ L dNTP(2.5 mmol/L)、Primer 1和2(25  $\mu$ mol/L)各0.25  $\mu$ L、*Taq* DNA聚合酶0.2  $\mu$ L、模板0.5  $\mu$ L,用灭菌去离子水补充反应总体积至25  $\mu$ L,将混合物置PCR仪中反应。PCR循环参数:94 $^{\circ}$ C预变性5 min后开始循环,94 $^{\circ}$ C 45 s、55 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 1 min,共35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。5  $\mu$ L PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后,在紫外凝胶成像仪中照相记录。

用设计的引物,对照样本健康三疣梭子蟹基因组 DNA、蟹源弧菌及发病蟹 DNA 样本,采用相同的 PCR 反应体系和循环参数下进行 PCR 扩增,以确定反应的特异性。用凝胶 DNA 回收试剂盒说明书[宝生物工程(大连)有限公司]回收目的片段。将 PCR 回收产物连接至 pUCm-T 载体,转化 JM109 感受态细胞。随机挑取转化菌落,接种于含氨苄青霉素(100 mg/mL)的 LB 液体培养基中,37 °C 摇菌过夜,提取质粒。用 *Pst* I 酶切鉴定,筛选出的重组阳性菌落,穿刺培养,送上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

序列的系统关系分析使用 MEGA(version3.1)分析软件, Kimura-2 法计算遗传距离,进行 1 000 次抽样自展(bootstrap), 聚类法(UPGMA)构建分子系统树。

### 1.5 临床样品的检测

应用建立的 PCR 检测方法,检测临床初步确定为患血卵涡鞭虫病的三疣梭子蟹样品 22 份及 7 份非血卵涡鞭虫感染的样品。

## 2 结果

### 2.1 目的基因的 PCR 扩增和特异性检验

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电泳结果显示,应用所设计的引物从实验用的样本中成功扩增出一条约 585 bp 左右的特异条带,其大小与预计完全吻合。用所设计的引物对发病蟹 DNA 样本、健康三疣梭子蟹及蟹源弧菌的 DNA 样本进行 PCR 扩增反应。结果只有从患病蟹的 DNA 样本中扩增与试验设计大小相符的 585 bp 的明亮条带,而对照其它样本均未扩增出目的条带(图 1)。

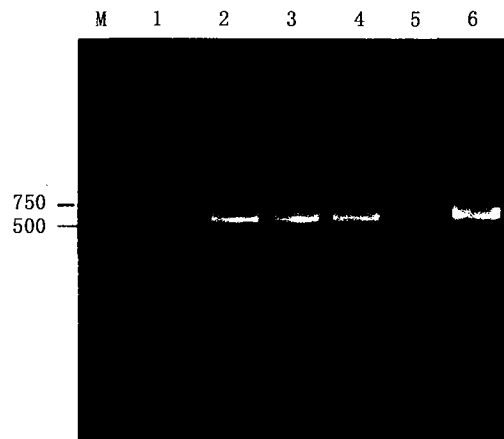


图 1 血卵涡鞭虫 PCR 检测特异性电泳

Fig.1 *Hematodinium* sp. detection sensitivity using *Hematodinium*-specific primer sets

### 2.2 PCR 序列分析

将 4 个阳性重组质粒进行序列测定后,用 DNASTAR 软件测定结果进行分析,测到的 ITS1 基因序列共 585 碱基(图 2)。所测定的 ITS1 基因序

列与寄主为蓝蟹的血卵涡鞭虫 ITS1 基因序列的同源性最高,达 92.02%。将测定的 4 个样本的 ITS1 基因序列和从 GenBank 中获取的 5 个来自不同寄主的血卵涡鞭虫 ITS1 基因序列进行比较,来自三疣梭子蟹的 4 株血卵涡鞭虫的 ITS1 与来自大西洋寄居蟹(EF032013)、挪威海螯虾(EF032010)、蛛雪蟹(EF032007)、普通黄道蟹(EF032001)的血卵涡鞭虫的 ITS1 明显存有遗传距离,但与来自蓝蟹的血卵涡鞭虫的 ITS1 聚在了一起,说明我们分离到的虫株的 ITS1 与该株虫的 ITS1 基因序列很相近(图 3)。

### 2.3 临床样品的检测结果

应用上述建立的 PCR 方法对 2004 ~ 2006 年采集的 22 份临床初步确定为患血卵涡鞭虫病的三疣梭子蟹样品和 7 份非血卵涡鞭虫感染的样品进行血卵涡鞭虫的检测,结果见表 1。

## 3 讨论

三疣梭子蟹血卵涡鞭虫病是近年来梭子蟹养殖过程中发生的一种危害较大的疾病,该病在浙江的舟山、宁波等三疣梭子蟹主要养殖区每年均有不同程度的发生,并呈流行趋势。有关血卵涡鞭虫完整的生活史至今尚没有完全确定;在血卵涡鞭虫的检测技术方面,除了常规的形态学观察方法以外,国外开展了包括 PCR、ELISA 以及间接荧光抗体法(IFAT)等多种现代生物技术诊断技术的研究<sup>[9-12]</sup>。本文针对 rDNA 的 ITS1 区域设计了一对特异性引物,在此基础上建立了血卵涡鞭虫病的 PCR 检测方法,为三

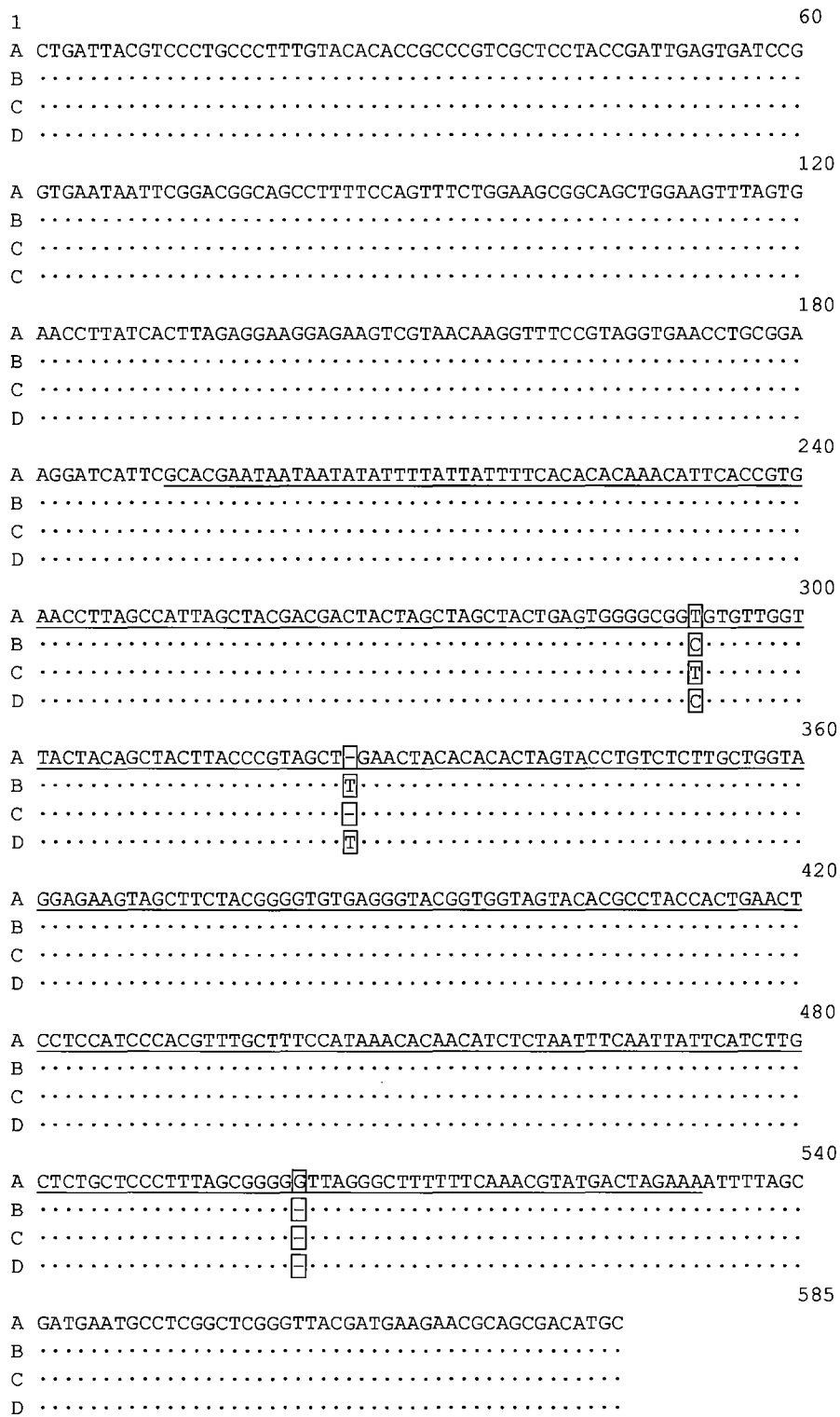


图2 测定4株血卵涡鞭虫的核苷酸序列

Fig.2 Alignments of nucleotide sequences of the ribosomal DNA gene complex from 4 isolates of *Hematodinium* sp.

疣梭子蟹养殖生产中血卵涡鞭虫病害的诊断提供了一个快速、简便、可靠的新方法。在本研究中,对患血卵涡鞭虫病的梭子蟹 DNA 样本、健康三疣梭子蟹及蟹源弧菌的 DNA 样本进行 PCR 扩增反应,结果仅从患病蟹 DNA 样本中扩增出 1 条 585 bp 长的目的片段,而对照样本均无此目的条带出现。本文获

得的 4 株血卵涡鞭虫的 ITS1 基因序列之间只有个别碱基存有差异(图 2)。将这 4 株血卵涡鞭虫的 ITS1 基因序列与 GenBank 中其它已发表的不同寄主的血卵涡鞭虫的 ITS1 基因序列进行比较,发现不同寄主的 ITS1 基因序列存在较大差异。国外的蓝蟹也即我们讲的三疣梭子蟹<sup>[13]</sup>,两者只是地域不同,所以寄生于两者的血卵涡鞭虫的 ITS1 序列同源。所测序列与其它虫株的序列之间的差异还有待进一步研究。

PCR 技术是 Saiki 等人 1985 年建立的一种体外扩增克隆技术,能在 2~3 h 内将靶 DNA 特异性放大扩增数百万倍,极大地提高了对靶 DNA 的检测和分析能力。由于其具有快速、简便、敏感、特异性强和易于自动化等特点,近年来 PCR 技术在传染性疾病病原体的检测和诊断上已得到广泛应用,并显示出巨大应用发展潜力。PCR 技术可以通过扩增寄生虫核苷酸的特定基因序列,突破原虫类寄生虫虫体小、形态相似而无法准确区分的局限,目前已被应用于多种寄生虫病的诊断<sup>[14-17]</sup>。有关血卵涡鞭虫诊断研究国外报道较多,学者 Hudson 和 Adlard<sup>[18]</sup>发现血卵涡鞭虫属间 rDNA 序列有很强特异性,在此基础上将 PCR 技术应用于血卵涡鞭虫病的检测,目前主要是针对 rDNA 基因的 18S、5.8S 区段。核糖体的 ITS 基因片段具有高度种间特异性,本文设计了针对血卵涡鞭虫 ITS1 基因序列的引物。其中上游引物位于 rDNA 的 5.8S 区域,下游引物位于 ITS 区域,能扩增出完整的 ITS1 基因序列。所建立的 PCR 方法检测血卵涡鞭虫的扩增片段为 585 bp 与预设产物大小一致。应用本文建立 PCR 方法对获得的 22 份初步确定为患血卵涡鞭虫病的临床样品进行了 PCR 检测,结果血卵涡鞭虫检测阳性率与组织病理学研究结果相吻合,说明本文建立的 PCR 检测方法对三疣梭子蟹的血卵涡鞭虫病的检测具有高度特异性,这对三疣梭子蟹生产中血卵涡鞭虫病害的诊断和防治,具有十分重要的价值。

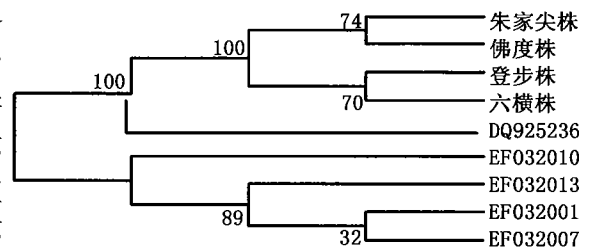


图 3 三疣梭子蟹上 4 株血卵涡鞭虫与国外 5 株血卵涡鞭虫的 ITS1 序列的分子系统树

Fig. 3 The phylogenetic tree for ITS1 of 4 strains of *Hematodinium* sp. on *Portunus trituberculatus* and 5 foreign strains of *Hematodinium* sp.

EF032013: 宿主为大西洋寄居蟹; EF032010: 宿主为挪威海螯虾; EF032007: 宿主为蛛雪蟹; EF032001: 宿主为变通黄道蟹

表 1 临床样品 PCR 检测结果

Fig. 1 Results of the detection of *Hematodinium* sp. in clinical samples

| 样品            | 样品数(份) | 临床表现 | PCR 检测结果 |
|---------------|--------|------|----------|
| 2006 年登步      | 7      | +    | +        |
| 2006 年嵛山      | 2      | +    | +        |
| 2006 年佛度      | 3      | +    | +        |
| 2006 年六横      | 2      | +    | +        |
| 2005 年佛度      | 2      | +    | +        |
| 2005 年小沙      | 1      | +    | +        |
| 2004 年朱家尖     | 4      | +    | +        |
| 2005 年普陀      | 1      | +    | +        |
| 2005 年感染酵母菌的蟹 | 5      | -    | -        |
| 2005 年健康蟹     | 1      | -    | -        |
| 2006 年健康蟹     | 1      | -    | -        |

注:“+”为阳性结果,“-”为阴性结果。

应用本文建立的 PCR 方法可以判断三疣梭子蟹是否感染血卵涡鞭虫,但有关感染虫体的定量测定,不同组织感染程度的变化等情况的分析,还有待于定量 PCR 和原位杂交的后续研究。

## 参考文献:

- [1] 许文军,徐汉祥,施 慧,等. 三疣梭子蟹血卵涡鞭虫病诊断与综合防治措施[J]. 现代渔业信息,2006,21,27 - 28.
- [2] Chatton E, Poisson R, Sur L' existence, et al. *Hematodinium Perezi* n. g., n. sp. (syndinidae) [J]. CR Seances Soc Biol Paris, 1931, 105: 553 - 557.
- [3] Messick G A. *Hematodinium perezii* infections in adult and juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* from coastal bays of Maryland and Virginia, USA [J]. Dis Aquat Org, 1994, 19: 77 - 82.
- [4] Maclean S A, Ruddell C L. Three new crustacean hosts for the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezii* (Dinoflagellata: Syndinidae) [J]. J Parasitol, 1978, 64: 158 - 160.
- [5] Shielda J D. The parasitic dinoflagellates of marine crustaceans [J]. Annu Rev Fish Dis, 1994, 4: 241 - 271.
- [6] Taylor D M, Khan R A. Observations on the occurrence of *Hematodinium* sp. (Dinoflagellate: Syndinidae), the causative agent of bitter crab disease in Newfoundland snow crab (*Chionoecetes opilio*) [J]. J Invertebr Pathol, 1995, 65: 283 - 288.
- [7] Gruebl T, Frischer M E, Sheppard M, et al. Development of an 18S rRNA genotargeted PCR based diagnostic for the blue crab parasite *Hematodinium* sp. [J]. Dis Aquat Org, 2002, 49: 61 - 70.
- [8] Small H J, Neil D M, Taylor A C, et al. Molecular detection of *Hematodinium* sp. in Norway lobster *Nephrops norvegicus* and other crustaceans [J]. Dis Aquat Org, 2006, 69: 185 - 195.
- [9] Stentiford G D, Neil D M, Coombs G H. Development and application of an immunoassay diagnostic technique for studying *Hematodinium* infections in *Nephrops norvegicus* populations [J]. Dis Aquat Org, 2001, 46: 223 - 229.
- [10] Field R H, Appleton P L. An indirect fluorescent antibody technique for the diagnosis of *Hematodinium* sp. infection of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* [J]. Dis Aquat Org, 1996, 24: 199 - 204.
- [11] Small H J, Wilson S, Neil D M, et al. Detection of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* in the Norway lobster *Nephrops norvegicus* by ELISA [J]. Dis Aquat Org, 2002, 52: 175 - 177.
- [12] Gruebl T, Frischer M E, Sheppard M, et al. Development of an 18S rRNA genotargeted PCR based diagnostic for the blue crab parasite *Hematodinium* sp. [J]. Dis Aquat Org, 2002, 49: 61 - 70.
- [13] 宋海棠, 俞存根, 薛利建, 等. 东海经济虾蟹类 [M]. 北京: 海洋出版社, 2006: 83.
- [14] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M] // Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J. PCR Protocols: A Guide to methods and application, Academic Press, San Diego, California, 1990: 315 - 322.
- [15] Henson J M, French R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis [J]. Annu Rev Phytopathol, 1993, 31: 81 - 109.
- [16] Moukhamedov R, Hu X, Nazar R N, et al. Use of polymerase chain reaction-amplified PCR ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus* [J]. Phytopathology, 1994, 84: 256 - 259.
- [17] 孙春燕, 赵元君. DNA 序列分析在黏孢子虫系统学研究和病原检测中的应用 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 159 - 164.
- [18] Hudson D A, Adlard R D. PCR-techniques applied to *Hematodinium* spp. and *Hematodinium*-like dinoflagellates in decapod crustaceans [J]. Dis Aquat Org, 1994, 20: 203 - 206.