

文章编号: 1674 - 5566(2014)04 - 0556 - 08

武汉单极虫巢式聚合酶链反应检测方法的建立与优化

柴 下¹, 陆宏达^{1,2}, 刘俊杰¹, 岳蒙蒙¹, 卢德刚³

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 3. 江苏省扬州市江都区水产管理站, 江苏 扬州 225200)

摘 要: 应用巢式聚合酶链反应(nested PCR)建立了一种检测异育银鲫武汉单极虫(*Thelohanellus wuhanensis*)基因组 DNA 的方法, 提取的 DNA 作为模板进行两次扩增, 第一次扩增用单极虫 18S rRNA 序列通用引物, 5'-CTGCGGACGGCTCAGTAAATCACT-3' 和 5'-CCAGGACATCTTAGGGCATCAGAGA-3', 扩增长度为 1 584 bp; 第二次依据第一次扩增产物中武汉单极虫特有的高度保守区设计特异性引物, 5'-ACCCACTTCTGTGGCCTTTC-3' 和 5'-AATCCGACCTACAACGCTGG-3', 扩增长度为 853 bp。结果表明, 通过 PCR 反应体系中退火温度、dNTP、Mg²⁺、延伸时间、扩增循环数和模板浓度的优化, 优化后的巢式 PCR 最低 DNA 检测量达 10 fg, 优化后比常规 PCR 检测的灵敏度高 10⁴ 倍。因此, 本文所建立的巢式 PCR 检测方法适合于水环境或水生动物中武汉单极虫的微量检测, 也为异育银鲫武汉单极虫病的诊断和流行病学调查提供了一种高灵敏的检测技术。

研究亮点: 目前武汉单极虫的研究方法大多是病理切片、电子显微镜技术和常规 PCR 等, 本文采用巢式 PCR 技术并对其反应条件优化, 达到 10 fg 检测灵敏度, 此外本文中的巢式引物是对武汉单极虫特异的引物。本文所建立的巢式聚合酶链反应检测方法适合于水环境或水生动物中武汉单极虫的微量检测, 也为异育银鲫武汉单极虫病的诊断和流行病学调查提供了一种高灵敏的检测技术。

关键词: 异育银鲫; 武汉单极虫; 巢式 PCR; 检测方法

中图分类号: S 917

文献标志码: A

武汉单极虫(*Thelohanellus wuhanensis*)是异育银鲫武汉单极虫病的致病病原, 隶属粘孢子虫单极虫属种类, 于 1984 年被陈启鏊和谢杏人鉴定命名^[1]; 2012 年竹攸汀等^[2]对该虫进行了形态学重描述, 补充了一些形态学新的特征。

近几年, 该病在有些鱼种场的鱼苗鱼种上每年都会发生, 轻者影响鱼苗鱼种的生长发育, 重者导致死亡, 鱼越小受到影响越大, 死亡率越高。发病早的每年 5 月底左右就会出现该病, 感染率逐渐增加, 发病高峰的时候, 苗种塘中鱼苗鱼种感染率可高达 90% 以上, 武汉单极虫感染后, 逐渐形成孢囊, 变大而引起寄生部位突起和鳞片竖起, 一般在 8 月中、下旬开始消退, 孢囊变小, 9 - 10 月份只看到孢囊的痕迹, 此时显微镜下检查和

病理切片观察, 消退的孢囊中成熟孢子消失, 但有残留物质存在, 为了弄清孢子消失后的去向和残留物质中是否是孢子消退后的成分, 需建立一种灵敏度高特异性强的检测方法, 同时方法的建立可应用于检测可能存在的武汉单极虫中间寄主水生生物体内的病原物质, 对开展武汉单极虫生活史的研究也具有重要的意义。巢式 PCR 检测技术由于具有灵敏度高, 特异性强等优点, 在人^[3]和畜牧^[4]病原生物的检测上已得到广泛的应用。本文通过反应条件的优化, 首次建立武汉单极虫的巢式 PCR 方法。通过病理切片和巢式 PCR 技术相结合可以为深入研究武汉单极虫病的发生、发展和消退规律奠定基础。

收稿日期: 2014-04-02 修回日期: 2014-04-15

基金项目: 上海高校知识服务平台(ZF1206); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 柴 下(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为临床兽医学。E-mail: xiaochai1988@126.com

通信作者: 陆宏达, E-mail: hdlu@shou.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 武汉单极虫的采集

于2012年6月,从江苏省扬州市溧洋湖水产养殖场(32°38'04"N,119°30'50"E)体表出现孢囊的异育银鲫鱼苗发病塘运回患病异育银鲫鱼苗2千尾,分养在上海海洋大学的室内水族箱中,将孢囊从病鱼体表取下,分别置于100%酒精、波恩氏(Bouin's)液中保存,作为病理切片和分子实验材料。

1.2 武汉单极虫核酸DNA的提取

DNA的提取方法按ZHANG等^[5]的方法略作改进。具体步骤如下:将孢子放入1.5 mL Eppendorf管中加入500 μL DNA提取裂解液(10 mmol/L Tris-Cl,1 mmol/L EDTA,1% SDS)以及50 μL 蛋白酶K(20 mg/mL)(北京天根生物科技有限公司),55 °C 120 r/min 往复震荡温浴7 h,然后加入550 μL的V(苯酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1(上海索宝生物科技有限公司),上下翻转3 min,12 000 r/min 离心2 min,取上清液,如上反复抽提三次后,取上清液,加入500 μL 氯仿,上下翻转3 min,12 000 r/min 离心2 min,取上清液,加入40 μL 预冷醋酸钠(3 mol/L,pH7.0)和800 μL 预冷无水乙醇,混匀,12 000 r/min 离心10 min,取沉淀,加入40 μL 预冷70%乙醇,12 000 r/min 离心2 min,室温晾干后加入99 μL 双蒸水和1 μL RNase A,即为孢子虫DNA提取液,于-20 °C保存备用。使用前用Bio-Rad Smart SpecTM plus spectrophotometer测定并调节DNA浓度为200 ng/μL作为常规PCR反应体系模板。

1.3 优化前常规PCR和巢式PCR反应体系

常规PCR引物:MX5 5'-CTGCGGACGGCTCAGTAAATCAGT-3'/MX3 5'-CCAGGACATCTTAGGGCATCACAGA-3'^[5];常规PCR扩增的反应体系为25 μL:引物(10 μmol/L)各0.5 μL;Taq DNA酶(0.1 mol/L Taq Polymerase)0.5 μL;10 × Buffer 2.5 μL(20 mmol/L Tris-Cl,pH 8.0;100 mmol/L KCl;10 mmol/L (NH₄)₂SO₄);dNTP 2 μL(500 μmol/L dNTP each);Mg²⁺ 1.5 μL(3 mmol/L MgCl₂);模板1 μL;16.5 μL ddH₂O。

巢式PCR引物:将系统发育树上包括武汉单极虫在内的亲缘关系最接近的6种单极虫18S rRNA经多重序列比对,NCBI在线primer和

primer 5软件结合设计武汉单极虫特异引物ART13F 5'-ACCCACTTCTGTGGCCTTTC-3'/ART13R 5'-AATCCGACCTACAACGCTGG-3',由上海生物工程技术服务有限公司合成。巢式PCR反应体系25 μL:引物(10 μmol/L)各0.5 μL;Taq DNA酶(0.1 mol/L Taq Polymerase)0.5 μL;10 × Buffer 2.5 μL(20 mmol/L Tris-Cl,pH 8.0;100 mmol/L KCl;10 mmol/L (NH₄)₂SO₄);dNTP 2 μL(500 μmol/L dNTP each);Mg²⁺ 1.5 μL(3 mmol/L MgCl₂);模板(以常规PCR扩增产物为模板)1 μL;16.5 μL ddH₂O。

1.3.1 优化前常规PCR灵敏度检测

将基因组DNA等倍稀释,分别在200 ng/μL、100 ng/μL、10 ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL浓度下进行常规PCR。

1.3.2 优化前巢式PCR灵敏度检测

基因组DNA等倍稀释,分别在10 ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL浓度下进行巢式PCR。

1.4 常规PCR反应体系优化

1.4.1 退火温度的优化

取基因组DNA稀释2倍,作为模板进行温度梯度实验,设置温度梯度为:49 °C、51 °C、53 °C、55 °C、57 °C、59 °C、61 °C、0 °C,分别进行PCR,确定引物的最佳退火温度。

1.4.2 dNTP浓度的优化

将dNTP浓度稀释成0.05 mmol/L、0.10 mmol/L、0.15 mmol/L、0.20 mmol/L、0.25 mmol/L、0.30 mmol/L、0.35 mmol/L,取基因组DNA稀释2倍作为模板,进行PCR,确定dNTP的工作浓度。

1.4.3 Mg²⁺浓度的优化

将Mg²⁺浓度稀释成0.5 mmol/L、0.75 mmol/L、1 mmol/L、1.25 mmol/L、1.5 mmol/L、1.75 mmol/L、2 mmol/L,取基因组DNA稀释2倍作为模板,进行PCR,确定Mg²⁺的工作浓度。

1.4.4 PCR扩增时延伸时间的确定

将延伸时间设置为70 s、75 s、80 s、85 s、90 s、95 s、100 s,基因组DNA稀释2倍作为模板分别进行PCR,确定最佳延伸时间。

1.4.5 PCR循环数优化结果

循环数分别设置10循环、15循环、20循环、25循环、30循环、35循环、40循环、45循环,基因

组 DNA 稀释 2 倍作为模板分别进行 PCR, 确定最佳循环数。

1.4.6 优化后常规 PCR 的灵敏度

将基因组 DNA 等倍稀释后, 分别取 100 ng/ μL 、10 ng/ μL 、1 ng/ μL 、100 pg/ μL 、10 pg/ μL 进行常规 PCR, 确定常规 PCR 的灵敏度。

1.5 巢式 PCR 反应体系的优化

1.5.1 退火温度的优化

取常规 PCR 产物 1 μL (1 ng/ μL) 作为模板进行温度梯度试验, 设置温度梯度为: 49 $^{\circ}\text{C}$ 、51 $^{\circ}\text{C}$ 、53 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、57 $^{\circ}\text{C}$ 、59 $^{\circ}\text{C}$ 、61 $^{\circ}\text{C}$ 、0 $^{\circ}\text{C}$, 分别进行 PCR, 以确定引物的最佳退火温度。

1.5.2 dNTP 浓度的优化

将 dNTP 浓度稀释成 0.05 mmol/L、0.10 mmol/L、0.15 mmol/L、0.20 mmol/L、0.25 mmol/L、0.30 mmol/L、0.35 mmol/L, 取常规 PCR 产物 1 μL (1 ng/ μL) 作为模板进行 PCR, 确定 dNTP 的最佳工作浓度。

1.5.3 Mg^{2+} 浓度的优化

将 Mg^{2+} 浓度稀释成 0.5 mmol/L、0.75 mmol/L、1 mmol/L、1.25 mmol/L、1.5 mmol/L、1.75 mmol/L、2 mmol/L, 取常规 PCR 产物 1 μL 作为模板, 进行 PCR, 确定 Mg^{2+} 的工作浓度。

1.5.4 PCR 扩增时延伸时间的确定

将延伸时间设置为 70 s、75 s、80 s、85 s、90 s、95 s、100 s, 取常规 PCR 产物 1 μL (1 ng/ μL) 作为模板分别进行 PCR, 确定最佳延伸时间。

1.5.5 PCR 循环数优化结果

循环数分别设置 10 循环、15 循环、20 循环、25 循环、30 循环、35 循环、40 循环、45 循环, 取常规 PCR 产物 1 μL (1 ng/ μL) 作为模板分别进行 PCR, 确定最佳循环数。

1.5.6 优化后巢式 PCR 的灵敏度

将基因组 DNA 等稀释后, 分别取 10 ng/ μL 、1 ng/ μL 、100 pg/ μL 、10 pg/ μL 、1 pg/ μL 、100 fg/ μL 、10 fg/ μL 、1 fg/ μL 进行巢式 PCR, 确定巢式 PCR 的灵敏度。

1.6 特异性检测

巢式 PCR 引物根据 GenBank 上登录的武汉单极虫 18S rDNA 序列以及系统发育上与之亲缘关系最近的几个单极虫的 18sDNA 序列进行比对, 设计出一对武汉单极虫特异性引物 ART13F/ART13R, 按照上述提取 DNA 方法, 分别提取武

汉单极虫 (*Thelohanellus wuhanensis*)、冷碘泡虫 (*Myxobolus lentisuturalis*)、咽碘泡虫 (*Myxobolus pharynae*) 和乌鳢碘泡虫 (*Myxobolus wulii*) 的 DNA 作为模板, 用 MX5/MX3 和 ART13F/ART13R 两对引物进行 PCR。

1.7 PCR 产物的鉴定

分别取第一次 PCR 扩增和巢式 PCR 扩增回收纯化产物, 与 pMD18T 载体连接, 转化入 DH5 α 感受态菌中, 用北京天根生物公司质粒 DNA 小提试剂盒提取质粒 DNA, 用 pMD18T 载体固有酶切位点 *Bam*H 与 *Hind* 进行酶切鉴定为阳性克隆后送交上海生物工程技术服务有限公司测序。

扩增产物 5 μL , 与 1 μL 6 \times loading buffer 和 1 μL SYBR Green I 核酸染料混匀后, 在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像仪观察并拍照。回收纯化 PCR 产物。

2 结果

2.1 优化前常规 PCR 和巢式 PCR 灵敏度

不同模板浓度下常规 PCR 扩增产物和巢式 PCR 扩增产物电泳结果见图 1。常规 PCR 随模板浓度的降低, 条带也随之变暗, 模板浓度为 100 pg/ μL 时, 无条带出现, 故常规 PCR 的最低灵敏度为 1 ng/ μL (图 1-a); 而巢式 PCR 随模板浓度的降低, 条带也随之变暗, 模板浓度降到为 100 fg/ μL 时, 无条带出现, 故巢式 PCR 的最低灵敏度为 1 pg/ μL (图 1-b)。优化前, 巢式 PCR 的灵敏度远远高于常规 PCR 的灵敏度, 可达 1 pg/ μL 。

引物 MX5/MX3 常规 PCR 扩增 DNA 产物经测序分析为 1584bp, DNA 序列与 GenBank 上登录号 JQ088179 完全一致。引物 ART13F/ART13R 巢式 PCR 扩增 DNA 产物经测序分析为 853bp, 在 GenBank 上的登录号为 KJ813820。

2.2 常规 PCR 反应体系优化

常规 PCR 反应体系优化结果见图 2。扩增产物在 49 $^{\circ}\text{C}$ 、51 $^{\circ}\text{C}$ 、53 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 的退火温度下扩增条带清晰明亮, 没有明显区别, 在 57 $^{\circ}\text{C}$ 、59 $^{\circ}\text{C}$ 、61 $^{\circ}\text{C}$ 的退火温度下条带亮度逐渐减弱 (图 2a)。退火温度越低条带越亮, 但是特异性越低, 为了保证扩增效果和较高的特异性, 综合条带亮度和特异性的要求, 选择 55 $^{\circ}\text{C}$ 作为最佳扩增温度。扩增产物在 dNTP 浓度为 0.15 mmol/L、0.20 mmol/L、0.25 mmol/L 下扩增条带清晰明亮, 低于和高

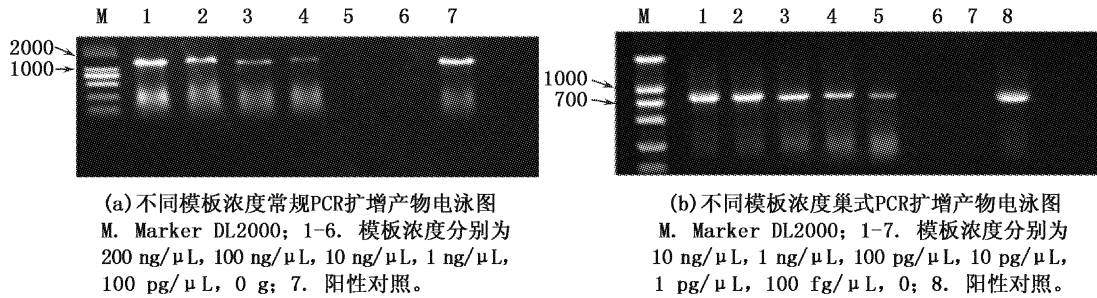


图1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Results of PCR with different concentrations of template

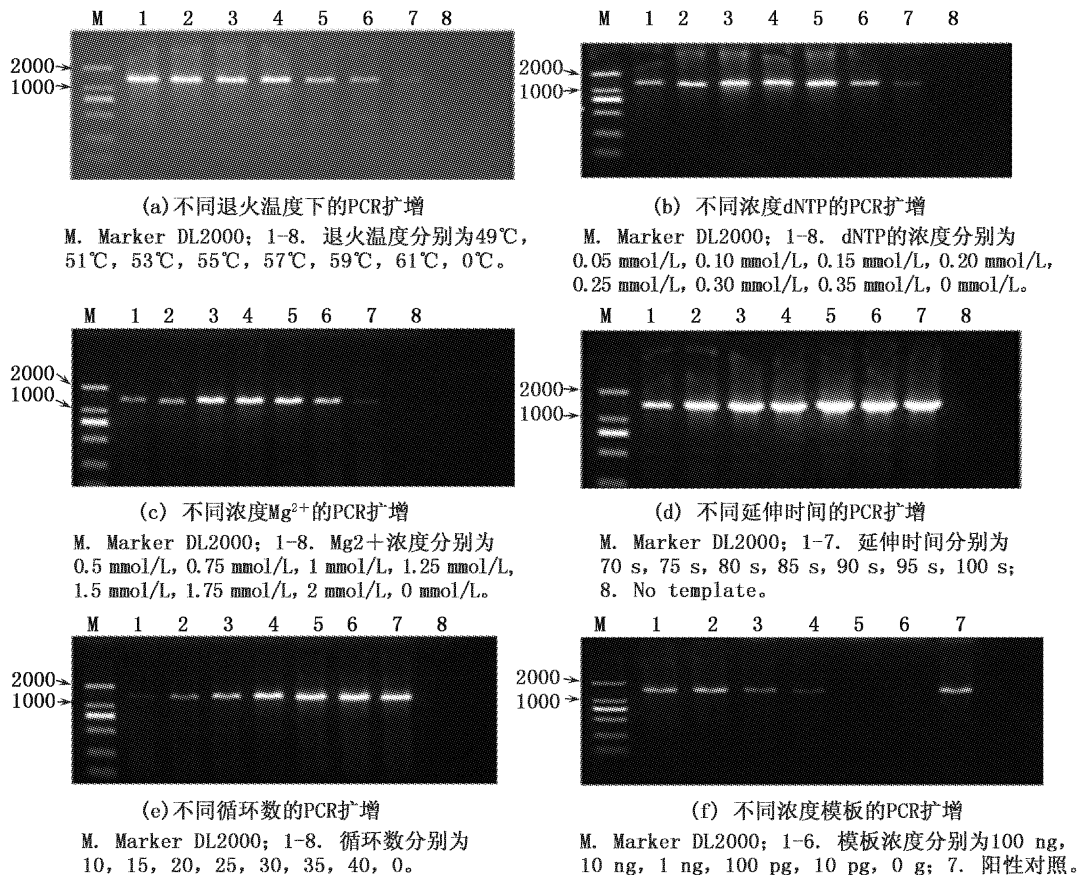


图2 常规PCR反应体系优化结果

Fig. 2 Optimization results of conventional PCR

于该范围的 dNTP 浓度下扩增条带亮度均逐渐减弱(图 2b)。PCR 体系中 dNTP 的价格最贵,在保证扩增效果并节省试剂的条件下,我们选择 0.15 mmol/L 的 dNTP 浓度作为 PCR 反应体系的最适工作浓度。扩增产物在 Mg²⁺ 浓度为 1 mmol/L、1.25 mmol/L、1.50 mmol/L 下扩增条带清晰明亮,低于和高于该范围的 Mg²⁺ 浓度下扩增条带亮度均逐渐减弱,在 2 mmol/L Mg²⁺ 浓度下扩增条

带消失(图 2c),最适 Mg²⁺ 浓度确定为 1 mmol/L。扩增延伸时间除 70 s、75 s、80 s 及 85 s 时的扩增条带亮度较弱外,90 s、95 s 和 100 s 扩增延伸时间对 PCR 扩增没有影响,条带亮度几乎没有差别(图 2d)。实验显示,85 s 之后的条带几乎没有任何的差别,为了不影响扩增效果又节省时间,选择 90 s 作为本实验 PCR 扩增时的最适延伸时间。扩增循环数对 PCR 扩增效果影响比较明显,循环

数从 10 次起,随着循环数的增加扩增条带亮度逐渐增强,30 次循环后条带亮度无明显变化(图 2e)。在确保灵敏度的前提下为节省实验时间,选择 35 次作为本实验常规 PCR 扩增的循环数。PCR 扩增在 100 ng 和 10 ng 模板浓度下,扩增条带亮度无明显变化,1 ng 和 100 pg 模板浓度下,亮度逐渐减弱,100 pg 模板浓度下条带还能可见,10 pg 模板浓度下,无条带出现(图 2f)。常规 PCR 扩增的最低模板浓度为 100 pg。

优化后常规 PCR 扩增的最适条件为:退火温度 55 °C, Mg^{2+} 浓度为 1 mmol/L, dNTP 浓度为 0.15 mmol/L, 循环数为 35, 延伸时间为 90 s, 最低 DNA 检测浓度为 100 pg。

2.3 巢式 PCR 反应体系优化

巢式 PCR 反应体系优化结果见图 3。退火温度优化显示各退火温度条带亮度一致,但是温度越低特异性越低,为了保证扩增效果和较高的特异性,选择 55 °C 作为最佳巢式 PCR 退火温度(图 3a)。在 dNTP 浓度为 0.15 mmol/L 时条带清晰单一并且很亮,而高于和低于 0.15 mmol/L 的其它 dNTP 浓度下条带变暗(图 3b)。PCR 体系中 dNTP 的价格最贵,在保证扩增效果并节省试剂的条件下,我们选择 0.15 mmol/L 的 dNTP 浓度作为巢式 PCR 反应体系的最适工作浓度。当 Mg^{2+} 浓度为 1 mmol/L 时,PCR 扩增时目的条带最亮,表明这种 Mg^{2+} 浓度下 PCR 扩增的效果最好,因此,将 1 mmol/L 作为巢式 PCR 反应体系中的最适工作浓度(图 3c)。不同延伸时间对 PCR 扩增有很大影响,80s 以下的延伸时间随着延伸时间缩短其条带亮度逐渐减弱,但 85s 之后的条带几乎没有任何的差别(图 3d)。为不影响扩增效果又节省时间的情况下,选择 90 s 作为巢式 PCR 扩增时的最适延伸时间。扩增循环数对巢式 PCR 扩增效果影响比较明显,循环数从 10 次起随着循环数的增加扩增条带亮度逐渐增强,30 次循环后条带亮度无明显变化(图 3e)。在确保灵敏度的前提下为节省实验时间,选择 30 次作为巢式 PCR 扩增的循环数。在大于 10 pg 模板浓度下,扩增条带亮度无明显变化,1 pg 模板浓度之后,亮度逐渐减弱,10 fg 模板浓度下条带还能可见,1 fg 模板浓度下,无条带出现。巢式 PCR 扩增的最低模板浓度为 10 fg(图 3f)。

优化后巢式 PCR 的反应条件为:退火温度

55 °C, Mg^{2+} 浓度为 1 mmol/L, dNTP 浓度为 0.15 mmol/L, 循环数为 30, 延伸时间为 90 s, 最低 DNA 检测浓度为 10 fg。

2.4 巢式 PCR 的特异性检测

分别提取武汉单极虫 (*Thelohanellys wuhanensis*)、冷碘孢子虫 (*Myxobolus lentisuturalis*)、咽碘泡虫 (*Myxobolus pharynae*) 和乌鳢碘泡虫 (*Myxobolus wulii*) 的 DNA, 分别作为模板, 分别用 MX5/MX3 和 ART13F/ART13R 两对引物进行常规 PCR 扩增和巢式 PCR 扩增。常规 PCR 扩增, 四种孢子虫都有条带, 而巢式 PCR 扩增, 仅武汉单极虫在 853bp 处有条带(见图 4)。

3 讨论

武汉单极虫病到了后期, 孢囊慢慢消退, 最后在鱼的体表形成有黑色素细胞的斑点, 最终孢子消失, 为了研究孢子消退后的去向, 需要寻找一种简便、灵敏的检测技术。

近年来, 巢式 PCR 检测逐渐应用到寄生虫领域。本文重点开展了武汉单极虫基因组巢式 PCR 检测反应条件的优化, 找到巢式 PCR 最适反应条件, 从而建立高灵敏度并且特异的检测技术。本文中所建立的巢式 PCR 方法最低提取核酸 DNA 检测量达到 10 fg, 适合于检测水环境或鱼体中微量武汉单极虫的检测, 为武汉单极虫病的诊断和分子流行病学调查提供了一种新的技术手段。

对于粘孢子虫病的检测和诊断, 已经发展了多种方法和技术, 例如酶联免疫吸附试验 (ELISA)^[6], 但存在特异性差和敏感性低的缺陷^[14]; 电子显微镜鉴定粘孢子多克隆抗体的免疫组织化学法^[7]、单克隆抗体技术检测种特异性抗原^[8]; DNA 探针检测鱼的粘孢子虫感染以及研究粘孢子虫生活史、DNA 探针杂交技术证实粘孢子虫病的病原^[9]以及运用 SSU rDNA 测序的方法进行粘孢子虫病的诊断^[10-12], 原位杂交技术检测寄生在鱼类碘泡虫的早期发育情况^[13]等。随着分子生物学技术的发展, PCR 作为一项重要的分子生物学技术, 已经广泛应用到粘孢子虫领域。利用常规 PCR、多重 PCR 来检测和鉴定粘孢子虫新种^[14-17], 实时定量 PCR 快速检测鱼类碘泡虫^[18], 鱼类碘泡虫感染检测方法中, 比较定量 PCR 和巢式 PCR 的灵敏度, 发现巢式 PCR 的灵

敏度高于定量 PCR^[19]。在上述检测方法中,巢式 PCR 灵敏度比较好。巢式 PCR 检测技术由于它具有灵敏度高,特异性强等优点,在人^[3]和畜

牧^[4]病原生物的检测上已得到广泛的应用,在某些粘孢子虫上的应用也有报道^[20],巢式 PCR 检测技术在武汉单极虫上的应用未曾报道。

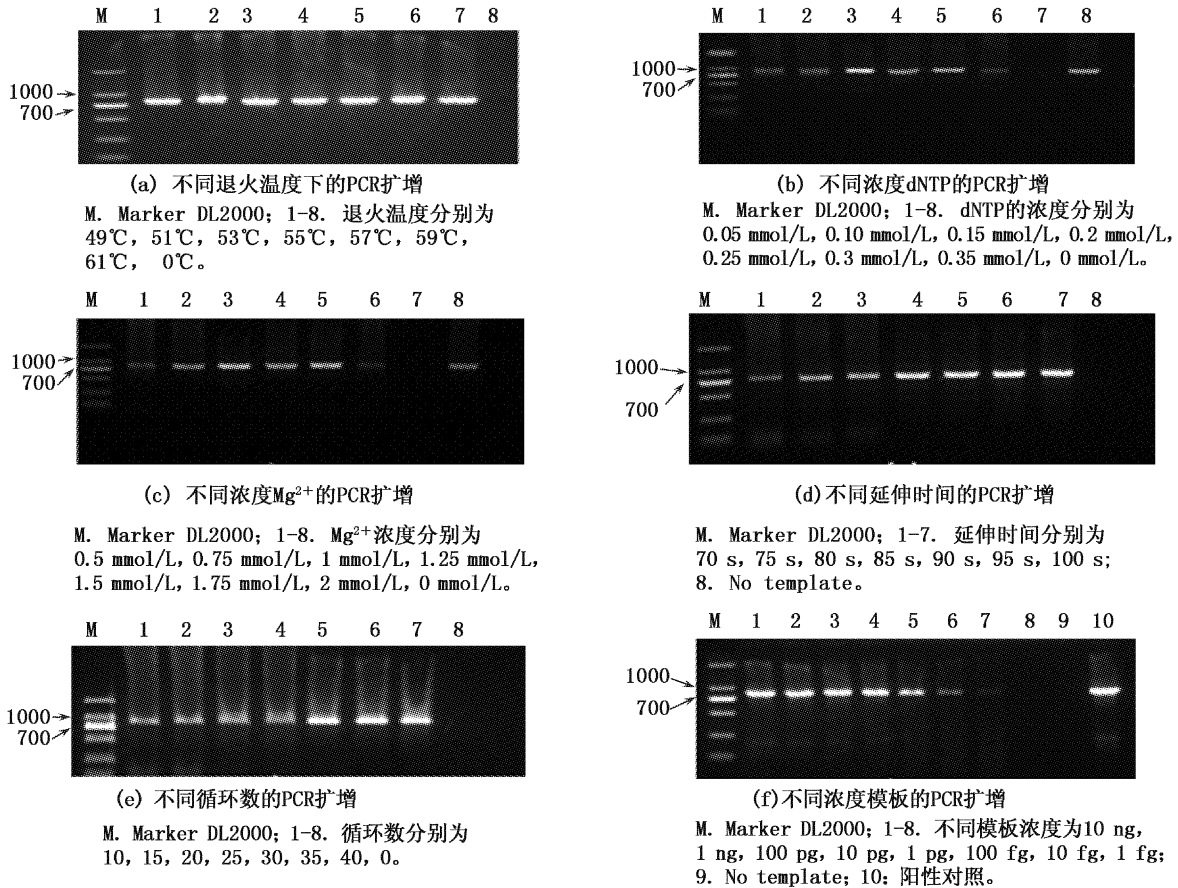


图3 巢式 PCR 反应体系优化结果

Fig. 3 Optimization results of nested PCR

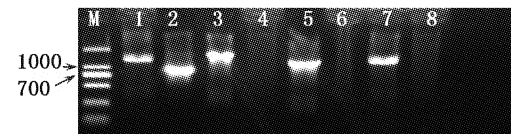


图4 四种粘孢子虫基因组 DNA 的 PCR 扩增

Fig. 4 Results of PCR with four kinds of myxosporean

M. Marker DL2000; 1-2. 分别为武汉单极虫常规 PCR 扩增和巢式 PCR 扩增; 3-4. 分别为冷碘孢子虫常规 PCR 扩增和巢式 PCR 扩增; 5-6. 分别为咽碘泡虫常规 PCR 扩增和巢式 PCR 扩增; 7-8. 分别为乌鳢碘泡虫常规 PCR 扩增和巢式 PCR 扩增。

在本文中,为了达到更高效地提取纯度更高、更微量的粘孢子虫 DNA,改进了前人的提取方法^[5]:将水浴改成气浴;转速由原来的 56 r/min

改为 120 r/min,在此转速下离心管内消化液充分震荡混匀;将孢子消化时间由原来的 3 h 改变为 7 h 时,经过反复试验,所有孢子孢壳完全打开所需时间为 7 h,从而使得在用同样多的孢子情况下 DNA 的提取量增加近一倍,从而更有利于在微量情况下提取更多 DNA,更容易实现通过 PCR 技术检测微量情况下的粘孢子虫。本文重点对两轮 PCR 的反应条件进行优化,取最佳反应条件,从而得到最高灵敏度的巢式 PCR 技术。

本文巢式 PCR 引物为自主设计,首先根据 GenBank 上登录的武汉单极虫 18S rDNA 序列以及系统发育上与之亲缘关系最近的几个单极虫的 18S rDNA 序列进行比对,设计出一对武汉单极虫特异性引物 ART13F/ART13R,该引物仅武

汉单极虫有扩增条带,引物特异性强,其扩增长度为 853 bp,GenBank 上登录号为 KJ813820。

由优化前不同模板浓度 PCR 结果(图 1)可见,在 100 ng 时,条带亮度和宽度适宜,既不会因条带太亮太宽导致温度梯度结果受影响观察不明显,也不会因为条带太暗太细导致结果观察不出,所以取所提取基因组 DNA 稀释 2 倍作为模板。

第二对引物退火温度在 49 ~ 61 °C 之间扩增条带没有明显变化,均有良好的扩增条带出现,说明该引物与模板结合较好。为了既保证扩增效果又没有非特异扩增,选择 55 °C 为最佳工作温度。

常规 PCR 优化后灵敏度提高了 10 倍,巢式 PCR 优化后灵敏度提高了 100 倍,优化后巢式 PCR 比优化后常规 PCR 灵敏度高出 10^4 倍。说明条件的优化是必要的。对 PCR 的反应条件 Mg^{2+} 浓度, dNTP 浓度,引物退火温度等进行了优化,优化后的巢式 PCR 最低可以检测武汉单极虫核酸 10 fg,表明该巢式 PCR 具有良好特异性和灵敏度。

参考文献:

- [1] 陈启鏊, 谢杏人. 中国淡水鱼类寄生粘孢子虫碘泡科一新属及二新种[J]. 动物分类学报, 1984, 9(2): 113 - 117.
- [2] 竹筱汀, 陆宏达, 蔡水局. 武汉单极虫(粘体门, 双壳目)的重描述及基于 18S rDNA 序列系统发育分析[J]. 动物分类学报, 2012, 37(4): 681 - 686.
- [3] 周水茂, 王重新, 吴凯, 等. 巢式 PCR 技术在输入性疟疾监测中的应用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(1): 43 - 45.
- [4] 白方方, 武昱孜, 靳蒙蒙, 等. 巢式 PCR 检测猪鼻支原体方法的建立及应用[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(7): 1007 - 1010.
- [5] ZHANG J Y, YOKOYAMA H, WANG J G, et al. Utilization of tissue habitats by *Myxobolus wulii* Landsberg & Lom, 1991 in different carp hosts and disease resistance in allogynogenetic gibel carp: redescription of *M. wulii* from China and Japan [J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 33(1): 57 - 68.
- [6] 何宏轩, 张西臣, 尹继刚, 等. 应用间接 ELISA 检测微小隐孢子虫抗体的研究[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(6): 24 - 27.
- [7] MUNOZ P, SITJA-BOBADILLA A, ALVAREZ-PELLITERO P. Immunohistochemical characterization of a polyclonal antibody against *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporidia), a parasite from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) [J]. Parasitology Research, 1998, 84(9): 733 - 740.
- [8] ADAMS A, RICHARDS R, MATEO M. Development of monoclonal antibodies to PK 'X', the causative agent of proliferative kidney disease [J]. Journal of Fish Diseases, 1992, 15(6): 515 - 521.
- [9] BARTHOLOMEW J L, RODRIGUEZ R J, ARAKAWA C K. Development of a DNA probe for the myxosporean parasite *Ceratomyxa shasta*, using the polymerase chain reaction with arbitrary primers [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 21(3): 215 - 220.
- [10] ANDREE K B, MACCONNELL E, HEDRICK R P. A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1998, 34(2): 145 - 154.
- [11] HERVIO D, KENT M L, KHATTRA J, et al. Taxonomy of *Kudoa* species (Myxosporidia), using a small-subunit ribosomal DNA sequence [J]. Canadian Journal of Zoology, 1997, 75(12): 2112 - 2119.
- [12] KENT M L, KHATTRA J, HERVIO D, et al. Ribosomal DNA sequence analysis of isolates of the PKX myxosporean and their relationship to members of the genus *Sphaerospora* [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1998, 10(1): 12 - 21.
- [13] ANTONIO D B, EL-MATBOULI M, HEDRICK R P. Detection of early developmental stages of *Myxobolus cerebralis* in fish and tubificid oligochaete hosts by in situ hybridization [J]. Parasitology Research, 1999, 85(11): 942 - 944.
- [14] 鹿连明, 胡秀荣, 张利平, 等. 常规和巢式 PCR 对柑橘黄龙病菌的检测灵敏度比较 [J]. 热带作物学报, 2010, 31(8): 1280 - 1287.
- [15] FREEMAN M A, SHINN A P. Myxosporean hyperparasites of gill monogeneans are basal to the multivalvulida [J]. Parasites & Vectors, 2011, 4: 220.
- [16] HARTIGAN A, PEACOCK L, ROSENWAX A, et al. Emerging myxosporean parasites of Australian frogs take a ride with fresh fruit transport [J]. Parasites & Vectors, 2012, 5: 208.
- [17] OV P B, FIALA I. Molecular evidence for the existence of cryptic species assemblages of several myxosporidia (Myxozoa) [J]. Parasitology Research, 2011, 108(3): 573 - 583.
- [18] KELLEY G O, ADKISON M A, ZAGMUTT-VERGARA F J, et al. Evaluation of quantitative real-time PCR for rapid assessments of the exposure of sentinel fish to *Myxobolus cerebralis* [J]. Parasitology Research, 2006, 99(4): 328 - 335.
- [19] OUMOUNA M, HOFFMANN R W. Susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and carp (*Cyprinus carpio*) to *Myxobolus cerebralis*, the agent of whirling disease [J]. Journal of Cell and Animal Biology, 2011, 5(14): 290 - 298.

- [20] ANDREE K B, GRESOVIAC S J, HEDRICK R P. Small subunit ribosomal RNA sequences unite alternate actinosporean and myxosporean stages of *Myxobolus cerebralis* the causative agent of whirling disease in salmonid fish[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 1997, 44(3): 208 - 215.

Establishment of nested PCR assay for detection of *Thelohanellus wuhanensis* in allogynogenetic crucian carp

CHAI Xia¹, LU Hong-da^{1,2}, LIU Jun-jie¹, YUE Meng-meng¹, LU De-gang³

(1. Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Yangzhou Jiangsu District Fisheries Management Station, Yangzhou 225200, Jiangsu, China)

Abstract: The nested polymerase chain reaction (nested PCR) was developed to amplify a DNA segment of the *Thelohanellus wuhanensis*, which caused disease in allogynogenetic crucian carp [*Carassius auratus gibelio* (♀) × *Cyprinus carpio* var *singonensis* ♂)]. The DNA of *Thelohanellus wuhanensis* was extracted as a template to be amplified. The first PCR amplification reacted with the primers: 5'-CTGCCGACGGCTCAGTAAATCAGT-3' and 5'-CCAGGACATCTTAGGGCATCACAGA-3'. The length of the first PCR amplified DNA was 1584 bp. The second nested PCR amplification reacted with the primers: 5'-ACCACTTCTGTGGCCTTTC-3' and 5'-AATCCGAC CTACAACGCTGG-3'. The length of the second nested PCR amplified DNA was 853 bp. After optimizing the annealing temperature, the time of extension, the amplification cycle number, the concentration of dNTP, magnesium and template, the DNA detected sensitivity of nested PCR was 10000 times higher than that of conventional PCR. The DNA detected quantity of nested PCR was only 10 fg. The established nested PCR could be used for the microquantity detection of the *Thelohanellus wuhanensis* and provided a more sensitive technique of disease diagnosis and molecular epidemiological survey.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; *Thelohanellus wuhanensis*; Nested PCR; detection