

贝类派琴虫 PCR 检测方法的建立及初步应用

谢丽基 谢芝勋* 庞耀珊 刘加波 邓显文 谢志勤

(广西兽医研究所, 南宁 530001)

摘 要 根据派琴虫的基因保守序列设计了特异性引物,对派琴虫的 DNA 进行 PCR 扩增并将产物克隆到 pMD18-T 载体后测序。结果表明,扩增大小为 596bp,与预期扩增序列同源率为 99.8%。该 PCR 方法检测灵敏度高,最低可检测 1pg 的派琴虫 DNA;特异性强,对荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌、葡萄球菌、副溶血弧菌、沙门氏菌、诺瓦克样病毒等贝类病原体的扩增均为阴性。用该 PCR 技术对广西沿海的 104 份牡蛎、49 份贻贝和 20 份文蛤病料进行检测,阳性率分别为 14.6%、10.6% 和 15.0%。结果显示,派琴虫广泛存在于中国南方沿海的养殖贝类中,建立的 PCR 方法可用于贝类派琴虫的临床快速检测。

关键词 派琴虫 PCR 应用

中图分类号 S944.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)01-0082-04

Development and application of polymerase chain reaction assay for detection of *Perkinsus* sp. in shellfish

XIE Li-ji XIE Zhi-xun* PANG Yao-shan

LIU Jia-bo DENG Xian-wen XIE Zhi-qin

(Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001)

ABSTRACT According to the gene sequence of *Perkinsus* sp. in GenBank, one pair of specific primers were designed to amplify the specific fragments of *Perkinsus* sp. in shellfish. The obtained 596bp PCR product shared 99.8% identity with the published sequence. This PCR assay was specific and no PCR product was detected from other pathogenic bacteria such as *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella*, and Norwalk virus. The sensitivity determination showed that the lowest amount of *Perkinsus* sp. detected by this PCR was 1pg DNA. In our study, 104 Oyster, 49 Mussel, and 20 Clam samples collected from Guangxi coasts were tested by this PCR method. The percentage of positive results were 14.6%, 10.6%, and 15.0% respectively, suggesting that *Perkinsus* sp. exists widely in the cultivated shellfish in southern China and this PCR assay is a sensitive tool to detect *Perkinsus* sp. in clinical samples.

KEY WORDS *Perkinsus* sp. Polymerase Chain Reaction Application

国家百千万人才工程人选专项资金项目(945200603)和广西科技攻关项目(桂科攻 0630001-3M)共同资助

* 通讯作者。E-mail: xiezhi-xun@126.com, Tel: (0771)3105702

收稿日期: 2009-07-29; 接受日期: 2009-09-09

作者简介: 谢丽基(1981-), 女, 硕士, 主要从事动物传染病病原分子生物学研究。E-mail: xie_liji@yahoo.com.cn, Tel: (0771)3120371

派琴虫是影响贝类养殖业发展的主要病原,为世界动物卫生组织规定的必报水生动物疫病之一,可感染蛤仔、扇贝、牡蛎、鲍鱼、贻贝等贝类。在欧洲、美洲和亚洲等海域均有过贝类感染的报道(Villalba *et al.* 2004)。2000年,我国黄海沿岸暴发了菲律宾蛤仔的大规模死亡,派琴虫是其中危害最大的病原生物之一(梁玉波等 2001)。

在我国,采用巯基醋酸盐培养基(FTM)检测法,在栉孔扇贝 *Chlamys farreri*、虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis*、皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai*、菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum* 体内均检测到了派琴虫(梁玉波等 2001;张喜昌等 2001)。尽管 FTM 检测法已被广泛应用于贝类派琴虫的检测,但该方法既可培养派琴虫,也可培养某些双鞭毛类(Almeida *et al.* 1999),缺乏专一性,且仅能检测到派琴虫的休眠孢子;同时由于 FTM 检测方法需 7d 时间,且敏感性较低,只有当每克组织内原虫数量高于 1 000 个时方可检出,因而在实际工作中具有一定的局限性。本研究建立的 PCR 检测法可以在 8h 内完成检测,而且能够检测到处于生活史不同阶段的派琴虫,具有非常好的应用价值和推广价值。同时本研究利用建立的 PCR 方法,对广西沿海牡蛎(Oyster)、贻贝(Mussel)和文蛤(Clam)的派琴虫感染状况进行了初步调查。

1 材料与方法

1.1 菌株

荧光假单胞菌和嗜水气单胞菌购自中国农业部动植物病原库,派琴虫、葡萄球菌、沙门氏菌、副溶血弧菌、大肠杆菌、诺瓦克样病毒等由本室保存。

1.2 试剂与仪器

pMD18-T 载体及 PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根公司;DNA 片断胶回收试剂盒购自博大泰克公司。PCR 仪为美国 Perkin Elmer Cetus 公司生产的 PE9600 PCR 仪。

1.3 引物设计与合成

根据派琴虫的基因保守序列(EU871715),通过 BLAST 验证,设计 1 对引物 Perkinsus1、Perkinsus2,扩增大小为 596bp。引物序列:Perkinsus1: 5'-GGGCCGTGTTAGGTGATTAT-3'; Perkinsus2: 5'-ACCGA-CAAGCGTGCTATGAT-3'

1.4 核酸抽提

取待检贝类的心脏、消化腺、鳃等共约 100 mg,匀浆后根据海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒的说明书进行 DNA 的提取。对照病原体 DNA 的提取按同样方法进行。诺瓦克样病毒 RNA 的提取参照 Trizol RNA 抽提试剂说明书进行。参照 Sambrook 等(1989)的方法测定核酸的浓度。

1.5 反转录

总反应体系 20 μ l:AMV (5U/ μ l) 1 μ l, 5 \times PCR buffer 4 μ l, RNA 酶抑制剂(40U/ μ l) 0.5~1 μ l, dNTP (10 mmol/L) 2 μ l, 随机引物 1 μ l, 模板 7 μ l, DEPC H₂O 5 μ l。反转录过程为 42 $^{\circ}$ C 1h。

1.6 PCR 反应的优化

总反应体系 100 μ l:10 \times PCR buffer 10 μ l, MgCl₂(25 mmol/L) 5 μ l, dNTP(10 mmol/L) 2 μ l, Taq 聚合酶 (5U/ μ l) 0.5 μ l, 上游引物和下游引物适量, DNA 或 cDNA 模板 5 μ l, 以水补足 100 μ l 体系。以派琴虫的 DNA 为模板,对 PCR 的循环参数和引物浓度等进行优化,确定最佳的 PCR 反应模式。

1.7 PCR的特异性试验

应用建立的PCR方法,对已提取的派琴虫、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌、葡萄球菌、沙门氏菌、副溶血弧菌、贝类组织的DNA或诺瓦克样病毒的cDNA进行扩增,检测其特异性。

1.8 PCR的敏感性试验

将已测定浓度的派琴虫DNA模板,按10倍系列稀释后,进行PCR扩增以检测其敏感性。

1.9 PCR产物的电泳分析及克隆测序

取50 μ l PCR产物进行电泳,然后用凝胶回收试剂盒纯化回收。将回收纯化的PCR产物,与pMD18-T于16 $^{\circ}$ C连接过夜,转化DH5 α 感受态细胞。挑取白色菌落培养过夜并进行PCR快速鉴定,阳性克隆菌送大连TaKaRa公司进行测序。将测序结果进行BLAST比对分析。

应用本研究所建立的PCR方法,对广西沿海的104份牡蛎、49份贻贝和20份文蛤病料进行检测。

2 结果

2.1 PCR反应的优化

通过对PCR反应的优化,最后确定PCR反应中Perkinsus1、Perkinsus2引物的最佳终浓度为0.5 μ mol/L;PCR的最佳反应模式为95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min,于4 $^{\circ}$ C结束反应。

2.2 PCR方法的特异性

应用建立的PCR方法对派琴虫核酸、对照菌毒株(荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌、葡萄球菌、副溶血弧菌、沙门氏菌、诺瓦克样病毒)及贝类组织的核酸进行PCR扩增,结果只有派琴虫扩增出596bp的特异性扩增条带,而其他对照菌毒株及贝类组织均未出现特异性的扩增条带(图1)。

2.3 PCR方法的敏感性

敏感性试验结果表明,建立的PCR方法最低能检出1pg的派琴虫DNA模板(图2)。

2.4 序列分析

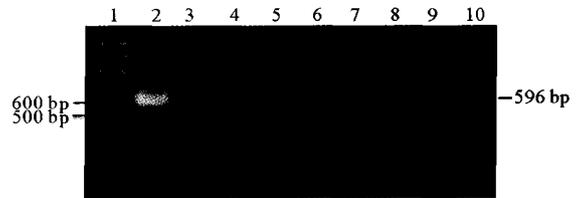
测序结果经BLAST比对分析表明,PCR扩增产物大小为596bp,与设计相符。PCR产物的核酸序列与引物设计模板的同源性为99.8%(另发表)。

对广西沿海的104份牡蛎、49份贻贝和20份文蛤病料的检测结果见表1。

表1 临床样品的PCR检测结果

Table 1 PCR detection results of the clinical samples

样品 Sample	检测份数 Number of samples	阳性 Positive samples	阳性率 Positive percentage (%)
牡蛎 Oyster	104	11	10.6
贻贝 Mussel	49	7	14.6
文蛤 Clam	20	3	15.0

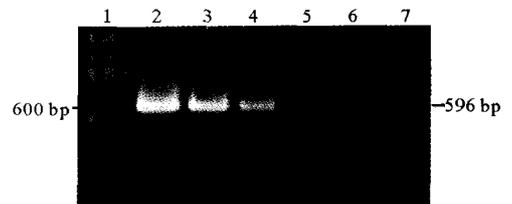


1. 100bp DNA 标准;2. 派琴虫 DNA;3. 嗜水气单胞菌 DNA;4. 荧光假单胞菌 DNA;5. 大肠杆菌 DNA;6. 葡萄球菌 DNA;7. 沙门氏菌 DNA;8. 副溶血弧菌 DNA;9. 诺瓦克样病毒 RNA;10. 贝类组织 DNA

1. 100bp DNA ladder; 2. *Perkinsus* sp. DNA; 3. *Aeromonas hydrophila* DNA; 4. *Pseudomonas fluorescens* DNA; 5. *Escherichia coli* DNA; 6. *Staphylococcus* sp. DNA; 7. *Salmonella* sp. DNA; 8. *Vibrio parahaemolyticus* DNA; 9. Norwalk virus RNA; 10. Shellfish tissue DNA

图1 PCR特异性试验

Fig. 1 Specificity of PCR for *Perkinsus* sp.



1. 100bp DNA ladder; 2. 10ng; 3. 1ng; 4. 100pg; 5. 10pg; 6. 1pg; 7. 100fg

图2 敏感性试验

Fig. 2 Sensitivity of PCR test for *Perkinsus* sp.

3 讨论

派琴虫是危害海水养殖贝类的重要病原体之一,目前使用的 FTM 检测方法在实际工作中具有一定的局限性。本研究建立了派琴虫的 PCR 检测方法,该方法所需时间短,可以在 8h 内完成对派琴虫的检测;特异性强,对派琴虫扩增出 596bp 的特异性扩增条带,而对其他对照病原体及贝类组织则均不能扩增出任何条带;同时该方法的敏感性高,最低可检测到 1pg 的派琴虫 DNA。该方法具有敏感、快速和特异的优点,便于在贝类养殖生产中推广应用,对于在贝类派琴虫的早期感染提供准确的诊断结果,切断其传播途径有重要意义。

原生动物 rRNA 基因上两个内部转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)碱基序列具有很强的变异性,其特征是鉴定原生动物类别的可靠依据。目前已确定的 6 种派琴虫的 ITS 碱基序列均有报道(Goggin 1994; Hamaguchi *et al.* 1998; De *et al.* 2000; Robledo *et al.* 2000; Murrell *et al.* 2002)。因此,分析广西沿海贝类体内派琴虫的 rRNA 片段的碱基序列,并与已知派琴虫的相应序列比较,便可以最终确认该病原生物是否为派琴虫。本研究提取广西沿海贝类体内派琴虫的 DNA,对其 rRNA 基因片段进行 PCR 扩增、克隆和测序,并与派琴虫的相应序列进行了比较。核酸序列测定结果显示,广西沿海贝类体内派琴虫 DNA 的 PCR 产物大小均为 596bp,与 *P. olseni*(或 *P. atlanticus*)相应序列没有差异(另文发表),故而可以认为广西沿海贝类体内的派琴虫属于 *P. olseni*(或 *P. atlanticus*),这与韩国和日本海域菲律宾蛤仔体内的派琴虫鉴定结果(Elston *et al.* 2003)基本是一致的。

牡蛎、贻贝和文蛤是中国南方沿海养殖的最主要经济贝类,也是中国传统的出口海产品。因此本研究应用所建立的 PCR 技术,对取自广西沿海的 104 份牡蛎、49 份贻贝和 20 份文蛤病料进行检测。检测结果表明,在广西沿海牡蛎、贻贝和文蛤中,派琴虫的感染率分别为 10.6%、14.6%和 15.0%,表明派琴虫在广西沿海地区养殖贝类中已呈现出区域性流行趋势。

参 考 文 献

- 梁玉波,张喜昌,王立俊,杨波,张映,蔡春雷. 2001. 北黄海菲律宾蛤仔帕金虫流行病害的研究. 海洋与湖沼, 32(5): 567~575
- 张喜昌,梁玉波,杨波,王立俊,卞正和. 2001. 海产贝类帕金虫病害的研究进展. 海洋环境科学, 20(2): 76~80
- Almeida, M., Berthe, F., Thebault, A., and Dinis, M. T. 1999. Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. Aquaculture, 177: 325~332
- De la Herran, R., Garrido-Ramos, M. A., Navas, J. I., Ruiz Reiz, C., and Ruiz Reiz, M. 2000. Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. Parasitol. 120: 345~353
- Elston, R. A., Dungan, C. F., Meyer, T. R., and Reece, K. S. 2003. *Perkinsus* sp. infection risk for Manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of North and Central America. J. Shellfish Res. 22: 661~665
- Goggin, C. L. 1994. Variation in the two internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA from five isolates of the marine parasite *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa). Mol. Biochem. Parasitol. 65: 179~182
- Hamaguchi, M., Suzuki, N., Usuki, H., and Ishioka, H. 1998. *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam *Tapes*(=*Ruditapes*) *philippinarum* in Japan. Fish Pathol. 33: 473~480
- Murrell, A., Kleeman, S. N., Barker, S. C., and Lester, R. J. G. 2002. Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989. and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. Bull. Euro. Assoc. Fish Pathol. 22: 258~265
- Robledo, J. A. F., Coss, C. A., and Vasta, G. R. 2000. Characterization of the ribosomal RNA locus of *Perkinsus atlanticus* and development of a polymerase chain reaction-based diagnostic assay. J. Parasitol. 86: 972~978
- Sambrook, J., Fritsch, E. T., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Villalba, A., Reece, K. S., Ordas, M. C., Casas, S. M., and Figueras, A. 2004. Perkinsosis in molluscs: a review. Aquat. Living Resour. 17: 411~432
- Xie, Z., Pang, Y., Deng, X., Tang, X., Liu, J., Lu, Z., and Khan, M. I. 2007. A multiplex RT-PCR for simultaneous differentiation of three viral pathogens of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Organ. 76: 77~80