DOI: 10.3969/j.issn.2095-9869.20250326002 http://www.yykxjz.cn/

解恩佩, 万晓媛, 要菲, 魏京广, 吴成龙, 史成银, 张庆利, 谢国驷, 黄倢. 石斑鱼肠孢虫环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用. 渔业科学进展, 2026, 47(1): 151–160

XIE E P, WAN X Y, YAO F, WEI J G, WU C L, SHI C Y, ZHANG Q L, XIE G S, HUANG J. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Enterospora epinepheli*. Progress in Fishery Sciences, 2026, 47(1): 151–160

石斑鱼肠孢虫环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用*

解恩佩 [1,2,3,4] 万晓媛 [2,3,4] 要 菲 [2,3,4] 魏京广 [5] 吴成龙 [1]
史成银 [2,3,4] 张庆利 [2,3,4] 谢国驷 [2,3,4①] 黄 倢 [2,3,4]

(1. 湖州师范学院生命科学学院 浙江 湖州 313000；2. 青岛海洋科学与技术中心 山东 青岛 266237；
3. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071；
4. 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 山东 青岛 266071；
5. 华南农业大学海洋学院 广东 广州 510642)

摘要 石斑鱼肠孢虫(*Enterospora epinepheli*)是当前危害石斑鱼(*Epinephelus* spp.)养殖产业的重要病原，但该病原自 2017 年报道以来，仅有 2 种基于核酸检测方法的报道。本研究以石斑鱼肠孢虫的核糖体小亚基 rRNA (small subunit ribosomal RNA, SSU rRNA)基因为靶序列，设计 3 对环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)引物，建立了该病原的 LAMP 检测方法(LAMP for *E. epinepheli*, *E.ep*_LAMP)。添加 EvaGreen®核酸染料的检测体系置于定量 PCR 仪中，以 2.68×10^2~2.68×10^9 拷贝/μL 的重组质粒标准品 pMD18_*E.ep* 为模板，各浓度均可在 20 min 内完全检测，检测灵敏度为 2.68×10^2 拷贝/反应；分析 pMD18_*E.ep* 中目的基因核酸拷贝数的对数值(x)与其对应 Ct 值(y)的线性关系得到检测方法的标准曲线：$y=-1.719\ 5x+23.971$ ($R^2=0.996\ 2$)；重复性检测中，其批内和批间检测的变异系数(coefficient of variation, CV)范围分别为 0.22%~3.52%和 0.24%~1.70%。特异性检测中，*E.ep*_LAMP 与虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)和肌孢虫(*Ameson portunus*)以及其他 11 种细菌和病毒均无交叉反应。*E.ep*_LAMP 检测体系中使用核酸染料 GeneFinder®后，还可在简易恒温条件下进行现场检测，具有诊断试剂产品开发的前景。总体而言，本研究建立的方法快速、灵敏、特异性强，兼顾定量和可现场诊断的优点，可为当前频发的石斑鱼微孢子虫病的诊断及防控提供新的有效检测方法。

关键词 石斑鱼肠孢虫；环介导等温扩增；检测；核糖体小亚基 rRNA

中图分类号 S942 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2026)01-0151-10

石斑鱼(*Epinephelus* spp.)营养丰富，肉质鲜美， 经济价值高，是我国南方及东南亚地区的海水重要养

* 青岛海洋科学与技术中心山东省专项(2022QNLM030001)、山东省重点研发计划(竞争性创新平台(2024CXPT071-3)、国家重点研发计划(2022YFD2401102)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022023005)、国家现代农业产业技术体系(CARS-48)和中国水产科学研究院海水鱼虾流行病学与病害防控创新团队项目(2023TD42)共同资助。谢恩佩，Email: xieenpei6374@outlook.com

①通信作者：谢国驷，副研究员，Email: xiegs@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2025-03-26, 收修改稿日期: 2025-04-08

殖品种，近年来养殖规模不断扩大，2023 年我国各种石斑鱼的养殖产量达到 24 多万 t，养殖品种多达 10 个属 50 多种(农业农村部渔业渔政管理局等, 2024; 颜远义等, 2018)。但随着集约化规模化程度的提高，各类频发的细菌、病毒和寄生虫病害问题已危害了石斑鱼养殖产业的健康可持续发展(Hoihuan *et al*, 2021; Shen *et al*, 2017; Xiao *et al*, 2019; 刘冉阳等, 2019; 王永波等, 2018; 颜远义等, 2018; 赵志英等, 2024)。

各类寄生虫病害中，微孢子虫病近年来对石斑鱼健康养殖的威胁日益突出。赵志英等(2024)在 2021 年 3 月—2022 年 12 月海南省文昌等 5 个市(县)的石斑鱼养殖场和育苗场开展了微孢子虫感染和流行情况调查，通过组织病理观察，对 5 个市(县) 1 976 份样品检测分析结果表明，育苗场和养殖场的微孢子虫发病率分别为 66.7%和 30.0%，所检测样品中微孢子虫总感染率为 40.7%，其中，珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)、杉虎斑石斑鱼(*E. fuscoguttatus* ♀ × *E. polyphekadion* ♂)、青石斑鱼(*E. awoara*)和赤点石斑鱼(*E. akaara*)的微孢子虫感染率分别为 73.6%、50.3%、41.6%和 18.1%。目前，石斑鱼中有 4 种微孢子虫病原被确定，分别是阿拉伯格留虫(*Glugea arabica*) (Azevedo *et al*, 2016)、匹里虫(*Pleistophora* sp.) (Abdel-Ghaffar *et al*, 2011)、石斑鱼格留虫(*G. epinephelusis*) (Wu *et al*, 2005)和石斑鱼肠孢虫(*Enterospora epinepheli*) (颜远义等, 2018)。石斑鱼肠孢虫自 2017 年首次发现于南方养殖石斑鱼中，2018 年被正式命名(Xu *et al*, 2017; 颜远义等, 2018)以来，在福建、广东、海南和广西等南方地区的大多数石斑鱼养殖场中多有检出，其最高流行率可以达到 95%，感染严重时可致鱼类 100%死亡(Xu *et al*, 2017; 颜远义等, 2018; 赵志英等, 2024)。该病原专性寄生于细胞核内，可致感染鱼厌食、肠壁变薄、鱼体严重消瘦等症状，该病也被渔民称为“瘦身病” (颜远义等, 2018)。

病原的灵敏特异诊断是病原预警和防控的重要基础，但石斑鱼肠孢虫当前基于核酸的检测仅有常规 PCR (Xu *et al*, 2017)和 TaqMan 探针的荧光定量 PCR (Liu *et al*, 2024) 2 种方法。常规 PCR 方法存在需用多种专业设备和检测时间过长等问题，定量 PCR 方法检测灵敏且特异性强，但对检测设备及条件要求高，限制了其在简易条件下需现场快速检测的应用要求。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种基因等温扩增技术(Nagamine *et al*, 2002; Notomi *et al*, 2000)，LAMP 检测无需专用设备、温度循环和电泳分析等步骤，在一个简易的恒温装置(如水浴锅或金属浴等)中即可完成检测反应，具有检测快速、特异性强、灵敏度高和技术成熟稳定等优点，在包括水生动物病原的各种病原检测及试剂盒开发应用中多有报道(Xie *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2009; 谷莉等, 2022; 康晋伟等, 2020; 李英瑕等, 2022; 马芳等, 2016; 乔艳等, 2019; 翟立文等, 2019; 邹莹等, 2020)。在 LAMP 反应体系中，加入如 EvaGreen® 等核酸染料，置于定量 PCR 仪中，可通过对产物与荧光染料结合后荧光信号的强度分析，实现无荧光基因标记探针条件下的对靶基因的实时定量检测(邹莹等, 2020)。

针对石斑鱼肠孢虫对石斑鱼产业的严重危害，本研究拟建立可兼顾样品定量分析和现场检测的 LAMP 方法，以期为当前频发的石斑鱼微孢子虫病的诊断及防控提供新检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

珍珠龙胆石斑鱼的冰冻样品采集自 2022 年和 2024 年广东、海南和山东省的石斑鱼养殖场。取病鱼的肠组织等样品，使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根，北京)提取基因组 DNA，利用 NanoDrop 2000c 分光光度仪(Thermo Scientific，美国)对所提取 DNA 的质量进行评估并测定浓度，提取的 DNA 置于–20 ℃冰箱备用。

1.2 LAMP 引物设计

利用 Primer Explorer V5.0 软件(http://primerexplorer.jp/e/)，针对石斑鱼肠孢虫的 Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA)基因(GenBank: MH345732)的特异序列设计 LAMP (*E.ep*_LAMP)检测引物 3 对，引物包括 2 对 LAMP 扩增引物和 1 对 Loop 引物(表 1)，委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 质粒标准品的构建

采用 Xu 等(2017)报道的石斑鱼微孢子的检测引物：EnterF125：5′-AACTAACCACGGTAACCTGTGGCTAA-3′和 EnterR1153：5′-CATTCACCATGCCTTGATGAGGCACCGTT-3′，以提取的 1 μL 感染石斑鱼肠孢虫的珍珠龙胆石斑鱼的组织 DNA 为模板，参考其 PCR 扩增程序进行扩增，电泳产物分析时，取 3.5 μL PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳。阳性的 PCR 产物进行胶回收后，按 pMD18-T vector (TaKaRa, 大连)试剂要求进行 T 载体连接以构建重组质粒 pMD18_*E.ep*，

表 1　*E.ep*_LAMP 检测引物

Tab.1　Primer sequences for *E.ep*_LAMP assay

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′~3′)
*E.ep*_F3	AACACGATGATAAAAATCGTAGA
*E.ep*_B3	TGCTAGAATTACAGCGGTAT
*E.ep*_FIP	TCCAGGTAGAGTCTAGAGATTTCATTTTTTTGCTAAATATTGCTAGCGG
*E.ep*_BIP	GAGGCGAAAGCGACGTTCTTTTTTCTAATCACTTTCAATACTCCAGC
*E.ep*_LF	CCTATACCACGTTCCCTATCCATT
*E.ep*_LB	AGACGTATCCGAGGGTCAAG

再转化入大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 感受态细胞(TaKaRa, 大连)，扩大培养后提取该重组质粒并纯化，使用 NanoDrop 2000c 测定质粒浓度。质粒中目的基因的拷贝数浓度(copies/μL)=(6.02×10^{23})×[(质粒浓度(ng/μL)×10^{-9})/(含插入片段的质粒碱基数×660)]。质粒稀释时，用 EASY Dilution (for Real Time PCR) (TaKaRa, 大连)进行 10 倍梯度稀释至 2.68×10^{0}~2.68×10^{9} 拷贝/μL，–20 ℃保存备用。

1.4　*E.ep*_LAMP 反应体系和反应条件

*E.ep*_LAMP 检测于实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, 美国)中进行。LAMP 的反应体系参考谢国驷等(2024)针对血卵涡鞭虫(*Hematodinium perezi*)建立的 LAMP 方法，即 25 μL 包含 10× Isothermal amplification buffer 2.5 μL (含有 2.0 mmol/L Mg^{2+})、100 mmol/L $MgSO_4$ 1.0 μL、5.0 mol/L Betaine 1.0 μL、10 mmol/L dNTPs 3.0 μL、20 μmol/L *E.ep*_FIP/BIP 2.0 μL、10 μmol/L *E.ep*_F3/B3 0.5 μL、20 μmol/L *E.ep*_LF/LB 1.0 μL、8000 U/mL *Bst* 2.0 WarmStart® DNA 聚合酶(New England BioLabs, 美国)1.6 μL、20×EvaGreen® Dye (25 μmol/L, Biotium, 美国) 0.75 μL，DNA 模板 1.0 μL，并补充无 RNA 酶水至 25 μL。*E.ep*_LAMP 检测中，经 95 ℃变性后的待检样品 DNA 模板加入反应体系中。依据前期的优化结果，检测反应温度为 65.7 ℃。检测 60 个循环，每个循环 1 min。检测反应结束后体系置于 80 ℃，5 min 终止反应。

1.5　*E.ep*_LAMP 的检测评估

以浓度为 2.68×10^{0}~2.68×10^{9} 拷贝/μL (10 倍梯度稀释)的 pMD18_*E.ep* 质粒标准品为模板，无 RNA 酶的水作为阴性对照，进行 *E.ep*_LAMP 的检测效果评估。依据产生扩增曲线对应的最低浓度模板评估方法的检测灵敏度；依据 pMD18_*E.ep* 中目的基因核酸拷贝数的对数值(x)与其对应 Ct 值(y)的线性关系，得出检测方法的标准曲线；依据同一批次和不同 3 批次中各浓度模板的 3 个平行模板所对应的 Ct 平均值和标准差(SD)，按变异系数(coefficient of variation, CV)=(SD/Ct 均值)×100%，分别计算批内和批间的 CV 值，对本方法的检测结果进行重复性评估。上述检测中，各浓度均设有 3 个平行，并设有 3 个用无 RNA 酶的水替代模板的阴性对照。

采用 Xu 等(2017)报道中对石斑鱼微孢子虫的常规 PCR 方法对 2.68×10^{0}~2.68×10^{5} 拷贝/μL 的 pMD18_*E.ep* 进行检测，进行 2 种方法检测灵敏度的评估。

1.6　*E.ep*_LAMP 的特异性检验

特异性检测中所用的病原(表 2)及其提取的 DNA 核酸均来自本实验室(Xie *et al*, 2025)。石斑鱼肠孢虫感染珍珠龙胆石斑鱼的组织 DNA 作为阳性对照，无 RNA 酶的水为空白对照，检测重复 3 次。

1.7　*E.ep*_LAMP 和常规 PCR 在现场样品的检测比较

采用本方法和 Xu 等(2017)采用的常规 PCR，分别对 2022 和 2024 年采集自广东、海南和山东省共 50 份珍珠龙胆石斑鱼的样品进行石斑鱼肠孢虫检测。本方法检测中另加入不同浓度的 pMD18_*E.ep* 质粒标准品，以对样品中的病原载量进行定量分析。检测目的基因组织中载量(拷贝/mg 组织)=(目的基因在核酸中浓度(拷贝/μL)×50 μL/(30mg 组织)。

1.8　*E.ep*_LAMP 的现场显色诊断

*E.ep*_LAMP 反应体系中的核酸染料 EvaGreen®用 GeneFinder®替换，反应在水浴锅中进行，随机取 6 管现场样品的 DNA 核酸为模板进行测试，样品管中添加 pMD18_*E.ep* 质粒标准品或无 RNA 酶水分别作为阳性和阴性对照管，检测反应 20 min，然后 80 ℃、5 min 终止反应，再按 2%体积比添加核酸染料 GeneFinder®于反应管中。诊断结果判定的依据为：阳性对照管应显示为荧光绿色，阴性对照管显示橙黄色，则此次试验有效。

表 2 *E.ep*_LAMP 特异性检测中病原
Tab.2 List of pathogens/samples used for the specificity of the *E.ep*_LAMP

序号 No.	病原/样品 Pathogens/samples	样品编号 Sample No.	宿主 Host	组织 Tissue
1	坎氏弧菌 *Vibrio campbellii*	20160604017-1	三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus*	肝胰腺 Hepatopancreas
2	副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus*	20210817005-2	三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	肝胰腺 Hepatopancreas
3	溶藻弧菌 *V. alginolyticus*	20200523006-1	三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	肝胰腺 Hepatopancreas
4	哈维氏弧菌 *V. harveyi*	20210817004-1	三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	肝胰腺 Hepatopancreas
5	轮虫弧菌 *V. rotiferianus*	20160604015-3	三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	肝胰腺 Hepatopancreas
6	需钠弧菌 *V. natriegens*	20160604017-2	三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	肝胰腺 Hepatopancreas
7	美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 *P. damselae* subsp. *damselae*	20160604014-3	三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	肝胰腺 Hepatopancreas
8	十足目虹彩病毒 1 Decapod iridescent virus 1, DIV1	2022009	三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	肝胰腺 Hepatopancreas
9	螺原体 *Spiroplasma eriocheiris*	20220803001	中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis*	肌肉 Muscle
10	白斑综合征病毒 White spot syndrome virus, WSSV	20220614	凡纳对虾 *Penaeus vannamei*	肌肉 Muscle
11	传染性皮下及造血器官坏死病毒 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, IHHNV	20201125016	三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	肌肉 Muscle
12	虾肝肠胞虫 *Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP	20211222002-1	凡纳对虾 *P. vannamei*	肌肉 Muscle
13	肌孢虫 *Ameson portunus*	20200910007	三疣梭子蟹 *P. trituberculatus*	肌肉 Muscle
14	石斑鱼肠孢虫 *E. epinepheli*	2021_GD_1	珍珠龙胆石斑鱼 *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂	肌肉 Muscle
15	石斑鱼肠孢虫 *E. epinepheli*	2023_GD_1	珍珠龙胆石斑鱼 *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂	肌肉 Muscle

2 结果

2.1 *E.ep*_LAMP 检测评估

依据可产生扩增曲线所对应最低浓度的 pMD18_*E.ep* 质粒标准品模板的结果，*E.ep*_LAMP 在 20 min 内的检测灵敏度为 2.68×10^2 拷贝/反应(图 1A)。分析 pMD18_*E.ep* 中目的基因核酸拷贝数的对数值(x)与其对应 Ct 值(y)的相关性，得到 *E.ep*_LAMP 方法的标准曲线：y=–1.719 5x+23.971，R^2=0.996 2 (图 1B)。采用 Xu 等(2017)中石斑鱼微孢子虫的常规 PCR 方法对 2.68×10^0~2.68×10^5 拷贝/μL 的 pMD18_*E.ep* 进行检测，依据目的产物大小的条带对应的最低浓度模板的结果，该 PCR 的检测灵敏度为 2.68×10^2 拷贝/反应(图 1C)，说明 *E.ep*_LAMP 与该 PCR 方法的检测灵敏度相当。

2.2 *E.ep*_LAMP 的检测重复性

重复性检测中的批内和批间检测的变异系数 CV 范围分别为 0.22%~3.52%和 0.24%~1.70% (表 3)，说明目的基因为 2.68×10^2~2.68×10^9 拷贝的范围内，采用本方法检测可提供稳定可靠的结果。

2.3 *E.ep*_LAMP 检测特异性

特异性检测中，本方法与甲壳类微孢子虫的 EHP 和肌孢虫，以及其他需钠弧菌等 6 种弧菌、美人鱼发光杆菌美人鱼亚种、中华绒螯蟹螺原体，以及白斑综合症病毒等 3 种病毒，共 13 种病原(表 2)均无交叉反应(图 2)，表明本方法检测具有很好的特异性。

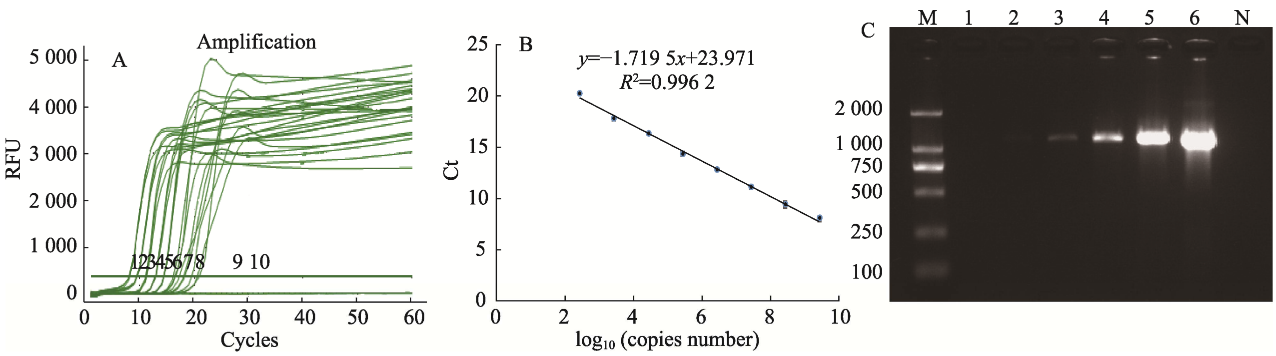

图 1　*E.ep*_LAMP 检测灵敏度和标准曲线

Fig.1　Sensitivity and standard curve of the *E.ep*_LAMP assay

A：灵敏度检测：1~9：模板为 2.68×10^9~2.68×10^1 拷贝的 pMD18_*E.ep*；10：阴性对照；每个浓度设 3 个平行。B：标准曲线：模板为 2.68×10^9~2.68×10^2 拷贝的 pMD18_*E.ep* 目的基因核酸拷贝数的对数值(x)与其对应 Ct 值(y)的线性关系，每个浓度设 3 个平行。C：Xu 等(2017)常规 PCR 检测灵敏度(35 个循环)：M：分子量标准；1~6：模板为 2.68×10^0~2.68×10^5 拷贝的 pMD18_*E.ep*；N：阴性对照。

A: Sensitivity testing; Curves 1–9: Tenfold serial dilutions ranging from 2.68×10^9 to 2.68×10^1 copies of the pMD18_*E.ep* plasmid as templates, respectively; Curve 10: Negative control; Each reaction was performed in triplicate. B: The standard curve: The curve was generated by analyzing the cycle threshold values (y) against the common logarithmic copies [$\log_{10}$ (Copy number) as x] of the pMD18_*E.ep* ranging from 2.68×10^2 to 2.68×10^9 copies; Each point represents the mean of three replicates. C: Sensitivity detection by a conventional PCR assay described by Xu *et al* (2017) after 35 cycles. M: Marker; Lanes 1–6: Tenfold serial dilutions ranging from 2.68×10^0 to 2.68×10^5 copies of the pMD18_*E.ep* plasmid as templates, respectively; N: Negative control.

表 3　*E.ep*_LAMP 检测重复性检测评估

Tab.3　Repeatability results of the intra-and inter-assay for *E.ep*_LAMP

pMD18_*E.ep* 拷贝数 pMD18_*E.ep* copies	批内重复 Intra-assay		批间重复 Inter-assay	
	Ct (Mean±SD)	CV/%	Ct (Mean±SD)	CV/%
2.68×10^9	8.08±0.06	0.75	8.17±0.03	0.37
2.68×10^8	9.42±0.07	0.71	9.26±0.13	1.43
2.68×10^7	11.12±0.08	0.67	11.06±0.03	0.24
2.68×10^6	12.84±0.07	0.56	12.54±0.21	1.70
2.68×10^5	14.36±0.03	0.22	14.19±0.13	0.89
2.68×10^4	16.33±0.20	1.25	16.34±0.13	0.82
2.68×10^3	17.82±0.53	2.99	17.32±0.11	0.61
2.68×10^2	20.26±0.71	3.52	19.32±0.12	0.63

2.4　*E.ep*_LAMP 对现场样品的检测分析

在现场样品检测中，本方法的 50%阳性检出率要优于常规 PCR (Xu *et al*, 2017)的 42%的阳性检测水平，检测样品中的病原载量为 4.54×10^2~3.23×10^6 拷贝/(mg 组织) (表 4)。

2.5　样品现场诊断

检测在水浴锅中进行，随机取 6 管现场样品的 DNA 为模板，进行本研究方法的现场检测测试。检测反应 20 min 后，通过在检测反应管中添加核酸染料 GeneFinder®，相较阴性对照管和 2 个阴性样品管(样品编号为 20221024001 和 20241121001)中显示的橙黄色，石斑鱼肠孢虫检测阳性管(样品编号为 20221024003、20221024005、20240919012 和 20241121003)中显示为荧光绿色(图 3)，该结果与定量检测分析中阳性诊断结果一致(见表 4)。上述结果也验证了本方法可应用于简易恒温条件下对样品的现场快速诊断。另对阳性反应管的产物进行电泳，也呈现出 LAMP 反应产物典型的阶梯状条带(数据未显示)。

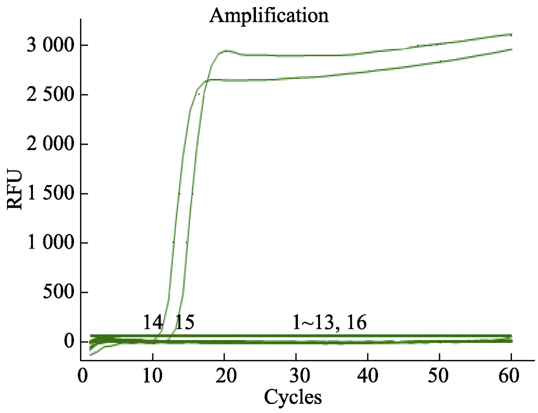

图 2 *E.ep*_LAMP 特异性检测

Fig.2 Specificity test of *E.ep*_LAMP assay

曲线 1~13：检测 DNA 对应的模板病原分别为坎氏弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、轮虫弧菌、需钠弧菌、美人鱼发光杆菌美人鱼亚种、中华绒螯蟹螺原体、白斑综合症病毒、十足目虹彩病毒 1、传染性皮下和造血组织坏死病毒、虾肝肠胞虫和肌孢虫；曲线 14~15：DNA 提取自石斑鱼肠孢虫感染的珍珠龙胆石斑鱼的组织；曲线 16：阴性对照。

Curves 1–13: DNA of different pathogens/samples extracted from *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. natriegens*, *P. damselae* subsp. *damselae*, *S. eriocheiris*, WSSV, DIV1, IHHNV, EHP and *A. portunus*, respectively. Curves 14 and 15: DNA extracted from tissue of *E. epinepheli*-infected *E. fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus* ♂; Curves 16: Negative control.

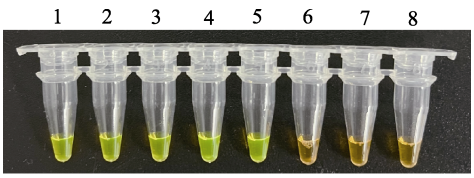

图 3 *E.ep*_LAMP 检测的后可视化诊断

Fig.3 Visual inspection of *E.ep*_LAMP amplified products by the naked eye

反应管 1：2.68×10^4 copies 的 pMD18_*E.ep*；反应管 2~7：组织 DNA 样品(编号分别为 No. 20221024003、20221024005、20240919012、20241121003、20221024001 和 20241121001)；反应管 8：阴性对照(无菌水)。

Tube 1: pMD18_*E.ep* (2.68×10^4 copies); Tubes 2–7: Tissue DNA samples (No.20221024003, 20221024005, 20240919012, 20241121003, 20221024001 and 20241121001, respectively); Tube 8: Sterile water.

3 讨论

微孢子虫病是当前危害鱼类和甲壳类等产业健康发展的重要寄生虫病害，近年其新种也在不断发现(Tourtip *et al*, 2009; Wang *et al*, 2017; 颜远义等, 2018)。微孢子虫没有特效药物可用。赵志英等(2024)通过组织病理观察所调查的海南不同种类石斑鱼18.1%~73.6%的微孢子虫流行情况，为更好地进行有针对的防控，有必要采用特异的分子检测方法进行微孢子虫种类的确定，以便掌握更详细的流行病学数据，也为不同石斑鱼微孢虫子病防控措施的制定提供依据。

本研究建立了 *E. ep*_LAMP 检测方法，检测体系中所添加的核酸染料 EvaGreen 可实现无探针标记的定量检测，节约了检测成本。本研究中所选用的 EvaGreen 染料较常规 SYBR Green 等染料，具有更好的稳定性，对 PCR 抑制低而不易产生非特异性扩增，高浓度使用时可增加更强荧光信号而提高检测灵敏度(Lee *et al*, 2017; Mao *et al*, 2007)。本方法在定量检测中，加完样后反应管全程不开盖，可有效克服常规 LAMP 检测中如产物电泳分析等存在的气溶胶污染的问题(Njiru *et al*, 2008)。

与现有石斑鱼肠孢虫检测方法相比较，在检测特异性上，本研究的 *E.ep*_LAMP 包括 4 条扩增引物在内的 LAMP 检测方法相较于 Xu 等(2017)常规 PCR 方法的 2 条引物更具优势；在检测灵敏度上，本方法的 2.68×10^2 拷贝/反应的灵敏度与 Yang 等(2017)和邹莹等(2020)建立的同样是基于 EvaGreen 染料的另外 2 个定量 LAMP 的检测方法相当，也与 Xu 等(2017)采用的常规 PCR 的灵敏度相当，但低于 Liu 等(2024)建立的 Taqman 探针定量 PCR 的 10 拷贝/反应的检测水平；在检测时间上，本方法的检测引物中包括可加速反应的一对 Loop 环引物，20 min 即可完成 2.68×10^2 拷贝/反应的目的基因的快速检测，检测时间明显短于上述的该病原的 PCR 和定量 PCR 方法；在检测方法应用上，网箱养殖和池塘养殖是当前石斑鱼的重要养殖模式，该模式下养殖成本较低，但也存在各类病害多发、易传播等问题，养殖户急需现场快速的病原诊断方法，而本研究建立的 *E.ep*_LAMP 方法可在简易恒温条件(如金属浴和水浴锅等)快速完成检测，且可以达到常规 PCR 的检测灵敏度的水平，既可以满足养殖户现场诊断的特异、灵敏和快速的需求，也可以进行病原的定量检测分析，具有很强的实用性。

样品核酸的有效提取也是病原有效诊断的前提之一。微孢子虫孢子外被结实的蛋白性孢子外壁和含几丁质的孢子内壁，常规方法或试剂盒可能存在不能有效提取微孢子虫核酸的现象，进而影响对病原的准确诊断。Guo 等(2024)进行了几丁质酶或蛋白酶的不同组合处理后对 EHP 核酸提取效果的比较，确定了该两种酶预处理后均可有效提高肝胰腺和粪便样品中 EHP 的提取质量和产量，并提供一种处理 EHP 组织样品提取 DNA 的优选方案。该方法可为包括石斑

表 4　*E.ep*_LAMP 和常规 PCR 对现场样品的检测比较

Tab.4　Comparison of *E.ep*_LAMP and conventional PCR for *E. epinepheli* detections using clinical samples

样品编号 Sample No.	病原载量(拷贝/mg 组织) Concentration of SSU rRNA (copies/mg tissue)	常规 PCR Conventional PCR	样品编号 Sample No.	病原载量(拷贝/mg 组织) Concentration of SSU rRNA (copies/mg tissue)	常规 PCR Conventional PCR
20221024001	–	–	20240919018	–	–
20221024002-2	–	–	20240919019	6.40×10^4	+
20221024003-2	1.44×10^5	+	20240919020	6.56×10^4	+
20221024004	–	–	20240919021	–	–
20221024005	4.97×10^4	+	20240919022	–	–
20221024006	–	–	20240919023	4.00×10^3	–
20221024007	–	–	20240919024	6.48×10^4	+
20221024008	–	–	20241121001	–	–
20240919001	–	–	20241121002	–	–
20240919002	–	–	20241121003	2.27×10^5	+
20240919003	–	–	20241121004	2.98×10^3	–
20240919004	–	–	20241121005	–	–
20240919005	–	–	20241121006	1.17×10^5	+
20240919006	–	–	20241121007	3.23×10^6	+
20240919007	–	–	20241121008	–	–
20240919008	1.57×10^5	+	20241121009	–	–
20240919009	2.04×10^6	+	20241121010	8.18×10^2	–
20240919010	–	–	20241121011	6.40×10^5	+
20240919011	4.54×10^2	–	20241121012	1.48×10^4	+
20240919012	3.68×10^4	+	20241121013	5.14×10^4	+
20240919013	3.73×10^4	+	20241121014	–	–
20240919014	2.22×10^4	+	20241121015	1.81×10^4	+
20240919015	–	–	20241121016	4.47×10^4	+
20240919016	–	–	20241121017	1.91×10^4	+
20240919017	2.94×10^5	+	20241121018	1.39×10^4	+

注：“+”和“–”分别代表阳性和阴性的检测结果。常规 PCR 采用 Xu 等(2017)的方法。

Note: “+” and “–” represent positive and negative detections, respectively. Conventional PCR assays were performed according to previous reports described by Xu *et al* (2017).

鱼肠孢虫在内的各种石斑鱼微孢子虫的检测核酸的有效提取提供方法参考。

目前，石斑鱼微孢子虫均无有效的防控方法，赵志英等(2024)调查的海南地区石斑鱼微孢子虫调查中育苗场的发病率要高于养殖场的发病率的结果，也提示对苗种疫病检测的重要性。近年来，生物安保(Biosecurity)在水产养殖业中的重要性已为产业所接受和重视，该理念强调从病原入手开展系统的风险分析，重点针对由明确病原所导致的疫病风险进行有针对性的防控和健康管理，达到对疫病有效防控的目的(董宣等, 2025; 黄倢等, 2016)。石斑鱼微孢子虫病的防控也建议优先构建种业的生物安保体系，加强无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)苗种场建设，从种业源头保障产业的健康发展。

4　结论

本研究建立了一种检测石斑鱼肠孢虫的实时荧光定量 LAMP 检测方法，具有特异性强、快速、可重复和灵敏度较好等优点，可以在无需荧光基团标记探针下开展病原的定量分析，还可用于简易条件下的病原现场诊断，具有商业开发的应用前景。本方法的建立为当前频发的石斑鱼微孢子虫病的检测提供了新的有效方法。

参　考　文　献

董宣, 黄倢. 生物安保保障水产养殖绿色高质量发展: 回顾与展望. 渔业科学进展, 2025, 46(1): 161–182 [DONG X, HUANG J. Ensuring the sustainable and high-quality development of aquaculture through biosecurity: A review and prospects. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(1): 161–182]

谷莉, 郑玉东, 张翔, 等. 鲍疱疹病毒原位 LAMP 检测方法的建立与初步应用. 水产学报, 2022, 46(5): 885–894 [GU L, ZHENG Y D, ZHANG X, *et al*. Establishment and application of *in situ* LAMP for detection of Haliotid herpesvirus 1 (HaHV-1). Journal of Fisheries of China, 2022, 46(5): 885–894]

黄倢, 曾令兵, 董宣, 等. 水产生物安保发展趋势与政策建议. 中国工程科学, 2016, 18(3): 15–21 [HUANG J, ZENG L B, DONG X, *et al*. Trend analysis and policy recommendation on aquatic biosecurity in China. Engineering Sciences, 2016, 18(3): 15–21]

康晋伟, 金晶磊, 段丽君, 等. 香鱼格留虫(*Glugea plecoglossi*)环介导等温扩增联合横向流动试纸条检测方法的建立. 海洋与湖沼, 2020, 51(6): 1501–1512 [KANG J W, JIN J L, DUAN L J, *et al*. A loop-mediated isothermal amplification technique combined with a lateral flow dipstick for the detection of *Glugea plecoglossi*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(6): 1501–1512]

李英瑕, 徐婷婷, 刘爽, 等. 虾肝肠胞虫(EHP)现场快速高灵敏度检测试剂盒的性能评价研究. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 218–225 [LI Y X, XU T T, LIU S, *et al*. Validation of a highly sensitive kit for the rapid detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in field. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 218–225]

刘冉阳, 史成银, 谢国驷, 等. 真鲷虹彩病毒自然感染杂交石斑鱼“褐龙斑” 的组织病理分析. 渔业科学进展, 2019, 40(3): 103–112 [LIU R Y, SHI C Y, XIE G S, *et al*. Histopathology of hybrid grouper (*Epinephelus bruneus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) naturally infected with red seabream iridovirus (RSIV). Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(3): 103–112]

马芳, 张庆利, 万晓媛, 等. 基于 LAMP 技术的对虾白斑综合征病毒现场快速高灵敏度检测试剂盒的评价. 中国预防兽医学报, 2016, 38(4): 316–321 [MA F, ZHANG Q L, WAN X Y, *et al*. Validation of the LAMP-based high sensitive detection kit for rapid use on field for white spot syndrome virus. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2016, 38(4): 316–321]

农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2024 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2024 [Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2024. Beijing: China Agriculture Press, 2024]

乔艳, 周前进, 李孝军, 等. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条检测简单异尖线虫/派氏异尖线虫方法的建立. 海洋与湖沼, 2019, 50(2): 324–335 [QIAO Y, ZHOU Q J, LI X J, *et al*. A loop-mediated isothermal amplification technique combined with a lateral flow dipstick for the detection of *Anisakis simplex* sensu stricto/*Anisakis pegreffii* in commercial fish. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2019, 50(2): 324–335]

王永波, 刘金叶, 陈傅晓, 等. 对海南地区石斑鱼养殖中鱼蛭病的初步研究. 海南大学学报(自然科学版), 2018, 36(3): 262–270 [WANG Y B, LIU J Y, CHEN F X, *et al*. Leech *Zeylanicobdella arugamensis* parasitic of grouper culture in Hainan. Natural Science Journal of Hainan University, 2018, 36(3): 262–270]

谢国驷, 黄倢, 毕竟男, 等. 血卵涡鞭虫的检测引物组和探针及其应用. 中国专利: ZL202410137099.3, 2024 [XIE G S, HUANG J, BI J N, *et al*. Primers and probes for the detection of *Hematodinium perezi* and their applications. Chinese patent: ZL202410137099.3, 2024]

颜远义, 刘新华, 徐力文, 等. 南海石斑鱼苗种肠道微孢子虫病病原的鉴定. 水生生物学报, 2018, 42(5): 942–949 [YAN Y Y, LIU X H, XU L W, *et al*. The taxonomic position of causative agent of enteric microsporidiosis of hatchery-bred juvenile grouper, *Epinephelus* spp., cultured in the area off coast of South China Sea. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(5): 942–949]

翟立文, 刘文枝, 许晨, 等. 鲤浮肿病病毒环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立. 中国水产科学, 2019, 26(5): 1004–1013 [ZHAI L W, LIU W Z, XU C, *et al*. Establishment of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of carp edema virus. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(5): 1004–1013]

赵志英, 骆大鹏, 胡琳琳, 等. 海南地区石斑鱼微孢子虫病流行情况调查. 海南师范大学学报(自然科学版), 2024, 37(4): 491–496 [ZHAO Z Y, LUO D P, HU L L, *et al*. Epidemiological investigation of microsporidiosis in grouper in Hainan. Journal of Hainan Normal University (Natural Science), 2024, 37(4): 491–496]

邹莹, 郭晓萌, 万晓媛, 等. 十足目虹彩病毒(DIV1)环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 156–164 [ZOU Y, GUO X M, WAN X Y, *et al*. Establishment and application of the LAMP detection method for decapod iridescent virus 1(DIV1). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 156–164]

ABDEL-GHAFFAR F, BASHTAR A R, MEHLHORN H, *et al*. Microsporidian parasites: A danger facing marine fishes of the Red Sea. Parasitology Research, 2011, 108(1): 219–225

AZEVEDO C, ABDEL-BAKI A S, ROCHA S, *et al*. Ultrastructure and phylogeny of *Glugea Arabica* n. sp. (Microsporidia), infecting the marine fish *Epinephelus polyphekadion* from the Red Sea. European Journal of Protistology, 2016, 52: 11–21

GUO X M, GAO W, WANG H L, *et al*. Chitinase and proteinase K treatments enhance the DNA yield of microsporidium *Ecytonucleospora hepatopenaei* spores. Journal of Invertebrate Pathology, 2024, 207: 108222

HOIHUAN A, SOONSON P, BUNLIPATANON P, *et al*. Molecular genotyping and phenotyping of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased, brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) in Thailand with preliminary vaccine efficacy analysis. Aquaculture, 2021, 545: 737188

LEE S H, BAEK Y H, KIM Y H, *et al*. One-pot reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detecting MERS-CoV. Frontiers in Microbiology, 2017, 7: 2166

LIU Q L, WANG Y, CHEN J, *et al*. Establishment of a TaqMan probe-based qPCR assay for detecting microsporidia *Enterospora epinepheli* in grouper. Journal of Fish Diseases, 2024, 47(3): e13893

MAO F, LEUNG W Y, XIN X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. BMC Biotechnology, 2007, 7: 76

NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16(3): 223–229

NJIRU Z K, MIKOSZA A S J, ARMSTRONG T, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2008, 2(1): e147

NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63

SHEN G M, SHI C Y, FAN C, *et al*. Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio harveyi*, the causal agent of skin ulcer disease in juvenile hybrid groupers *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(10): 1351–1362

TOURTIP S, WONGTRIPOP S, STENTIFORD G D, *et al*. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(1): 21–29

WANG Y, LI X C, FU G H, *et al*. Morphology and phylogeny of *Ameson portunus* n. sp. (Microsporidia) infecting the swimming crab *Portunus trituberculatus* from China. European Journal of Protistology, 2017, 61(Pt A): 122–136

WU H B, WU Y S, WU Z H. Occurrence of a new *Microsporidium* in the abdominal cavity of *Epinephelus akaara*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(2): 150–154

XIAO H H, LIU M Z, LI S Q, *et al*. Isolation and characterization of a ranavirus associated with disease outbreaks in cultured hybrid grouper (♀ tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus*×♂ giant grouper *E. lanceolatus*) in Guangxi, China. Journal of Aquatic Animal Health, 2019, 31(4): 364–370

XIE G S, HUANG J, ZHANG Q L, *et al*. Specific and rapid diagnosis of *Edwardsiella tarda* by a novel loop-mediated isothermal amplification targeting the upstream region of *hlyb* gene. Journal of Aquatic Animal Health, 2013, 25(2): 110–118

XIE G S, WANG H L, ZHU M T, *et al*. A TaqMan-MGB probe quantitative PCR assay detecting *Hematodinium perezi*. Journal of Fish Diseases, 2025, 48(5): e14082

XU L W, LIU X H, ZHANG J Y, *et al*. Outbreak of enteric microsporidiosis of hatchery-bred juvenile groupers, *Epinephelus* spp., associated with a new intranuclear microporidian in China. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(2): 183–189

YANG J, CHEN H, WANG Z Z, *et al*. Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of novel goose parvovirus. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2472

ZHANG Q L, SHI C Y, HUANG J, *et al*. Rapid diagnosis of turbot reddish body iridovirus in turbot using the loop-mediated isothermal amplification method. Journal of Virological Methods, 2009, 158(1/2): 18–23

(编辑　马璀艳)

Establishment and Application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of *Enterospora epinepheli*

XIE Enpei[1,2,3,4], WAN Xiaoyuan[2,3,4], YAO Fei[2,3,4], WEI Jingguang[5], WU Chenglong[1], SHI Chengyin[2,3,4], ZHANG Qingli[2,3,4], XIE Guosi[2,3,4①], HUANG Jie[2,3,4]

(1. *College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou* 313000, *China*; 2. *Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao* 266237, *China*; 3. *State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071, *China*; 4. *Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity. Qingdao* 266071, *China*; 5. *College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou* 510642, *China*)

Abstract　*Enterospora epinepheli* are a major pathogen for cultured groupers (*Epinephelus* spp.),

① Corresponding author: XIE Guosi, Email: xiegs@ysfri.ac.cn

located on the coast of Fujian, Guangdong, Shandong, and Hainan Provinces, as well as the Guangxi Zhuang autonomous region, and can cause large economic losses to the grouper farming industry. Early and specific diagnosis is essential for the treatment and management of this emerging pathogen. However, since it was reported in 2017, there are only two nucleic acid-based techniques assays including PCR and qPCR assays, based on the TaqMan probe assay for the detection of *E. epinepheli*. This study developed a method for quick and accurate detection of *E. epinepheli* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with three primer pairs by targeting the small subunit ribosomal RNA gene (SSU rRNA) of *E. epinepheli* (LAMP for *E. epinepheli*, *E.ep*_LAMP). The sensitivity, specificity, repeatability, and clinical applications of the developed *E.ep*_LAMP assay were verified. The constructed recombinant plasmid standard pMD18_*E.ep*, diluted with 10-fold gradient into different concentrations from 2.68×10^9 to 2.68×10^1 copies/μL, were used as a template to generate the standard curve and used to evaluate the detection sensitivity for *E.ep*_LAMP. The results showed that the detection limit of *E.ep*_LAMP was as low as 2.68×10^2 copies per reaction. The standard curve, $y=-1.719\ 5x+23.971$ ($R^2=0.996\ 2$), was obtained by plotting the threshold cycle values (y) against the common logarithmic copies ($\log_{10}$ [Copy number] as x) of pMD18_*E.ep* plasmids template ranging from 2.68×10^2 to 2.68×10^9 copies/μL. To assess the repeatability of the *E.ep*_LAMP, the intra-assay (variance within runs) and inter-assay (variance between runs) were evaluated, the coefficient of variation (CV), which are equal to the percentage of the standard deviation (SD) to the mean of the Ct, of intra-assay and inter-assay values were ranged from 0.22% to 3.52%, indicating that this assay was highly repeatable and reproducible over a wide range of detection from 2.68×10^2 to 2.68×10^9 copies of the pMD18_*E.ep* plasmid template. To test the detection specificity of *E.ep*_LAMP, different gDNA extracted from different pathogens and diseased grouper tissue was used as templates. The results showed that the developed assay was also highly specific to *E. epinepheli* and had no cross-reaction with *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), *Ameson portunus*, and another 11 pathogens, including *Vibrio campbellii*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. natriegens*, *Spiroplasma eriocheiris*, *P. damselae* subsp. *damselae*, white spot syndrome virus, decapod iridescent virus 1, and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis. In validation of the *E.ep*_LAMP on clinical samples, a total of 50 g DNA samples extracted from clinical grouper samples were applied to detect the quantitation of *E. epinepheli* copies by the *E.ep*_LAMP assay, and to detect by the conventional PCR assays described in a previous report, respectively. The results showed that 50% of the total samples were detected positive using *E.ep*_LAMP, and loads of *E. epinepheli* in these positive clinical samples varied within the range from 4.54×10^2 to 3.23×10^6 copies per mg tissue. By contrast, 42% of the total samples were detected positive using the PCR assay. These results showed that the *E.ep*_LAMP exhibited more sensitivity in detecting *E. epinepheli* in clinical samples. The *E.ep*_LAMP can be carried out on a simple heating device for incubation. By replacing the fluorescent dyes EvaGreen® with GeneFinder® in the tubes of LAMP products, green fluorescence can be observed clearly with the naked eye in the positive control reaction tubes and *E. epinepheli*-infected samples, whereas it was orange in the negative control. We are currently exploring the development of a diagnostic kit based on this developed *E.ep*_LAMP assay. Taken together, the *E.ep*_LAMP diagnostic protocol developed in the present study was rapid, specific, and sensitive, and can be used as a diagnostic tool for the detection of microsporidian disease occurring in grouper culture.

Key words *Enterospora epinepheli*; LAMP; Detection; SSU rRNA