

## 奥尔森帕金虫环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用

曲 朋<sup>1,2</sup>, 王崇明<sup>2\*</sup>, 任伟成<sup>3</sup>, 梁彦韬<sup>2</sup>,  
贾志磊<sup>1,2</sup>, 黄 健<sup>2</sup>, 潘鲁青<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3. 哥德堡大学, 瑞典 哥德堡 S-413 46)

**摘要:** 奥尔森帕金虫是重要的贝类病原性寄生虫之一, 为建立快速、灵敏、准确和使用简便的检测方法, 实验根据奥尔森帕金虫 5.8S rDNA 中的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列, 建立了环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法, 并对反应温度、反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度和反应时间进行了优化。该方法的检测灵敏度约为 30 拷贝质粒 DNA, 并且特异性较强, 与海水帕金虫、包纳米虫、波豆虫及急性病毒性坏死病毒(acute viral necrosis virus, AVNV)等病原均无交叉反应。使用 LAMP 法对两批菲律宾蛤仔样品进行检测, 结果表明, LAMP 检测与传统 PCR 检测相比, 灵敏度更高, 检测结果更准确。实验所建立的奥尔森帕金虫 LAMP 检测方法简单、快速、灵敏且特异性强, 可以在沿海贝类养殖厂及条件简陋的实验室使用。

**关键词:** 奥尔森帕金虫; 内转录间隔区; 环介导等温扩增; 贝类; 检测

**中图分类号:** S 941.5

**文献标志码:** A

奥尔森帕金虫(*Perkinsus olseni*)为帕金虫的一种, 属于原生动物亚界, 顶复体门, 帕金虫纲, 帕金虫目, 帕金虫科, 帕金虫属<sup>[1-4]</sup>。帕金虫最初于 1946 年在美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)体内发现, 经鉴定为导致美国路易斯安那州墨西哥湾大批牡蛎死亡的病因<sup>[5]</sup>。帕金虫病为 OIE 规定的必检水生动物疫病之一。患病贝类表现为极度消瘦、肉质疏松、消化腺暗灰色、外套膜内缩、性腺发育受阻、生长滞缓或停止<sup>[2-4]</sup>。贝类帕金虫是一种宿主分布较广的病原生物, 存在于美洲、欧洲、澳洲、亚洲和非洲等五大洲的许多贝类包括美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)、澳大利亚黑唇鲍(*Haliotis ruber*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、虾夷扇贝(*Patinopekten yessoensis*)、欧洲扁平牡蛎(*Ostrea edulis*)、香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)和珠母贝(*Pinctada margaritifera*)等体内<sup>[6]</sup>。目前, 已鉴定海水帕金虫(*Perkinsus marinus*)、*P.*

*olseni* (*P. atalaticus*)、*P. qugwadi*、*P. chesapeakei* (*P. andrewsi*)、*P. mediterraneus*、*P. Honshuensis* 和 *P. beihaiensis* 7 种帕金虫有效种<sup>[7]</sup>。

近 20 年来, 随着我国海水贝类养殖品种的增多、规模的扩大以及养殖历史的延长, 加之沿海经济的快速发展和城市化进程加快, 造成近岸海水养殖水域环境日益恶化, 海水贝类病害时有发生。贝类帕金虫常被认为是危害最严重的贝类原虫之一<sup>[6]</sup>。2000 年我国黄海沿岸滩涂暴发菲律宾蛤仔的大规模死亡, 梁玉波等<sup>[8]</sup>通过巯基醋酸盐培养基(fluid thioglycollate media, FTM)培养、组织切片和回感实验证明帕金虫是导致菲律宾蛤仔大规模死亡的病原。

建立奥尔森帕金虫简便、快速、灵敏、可靠的检测方法是了解其流行传播规律的关键, 也是目前近海贝类养殖产业发展的需要。最初, 广泛应用于帕金虫检测的是 Ray<sup>[9]</sup>于 1966 年报道的 FTM 培

收稿日期: 2012-01-18

修回日期: 2012-02-29

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100307); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-48)

通讯作者: 王崇明, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

养帕金虫休眠孢子的方法。后来, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)和间接酶联免疫吸附测定法(iELISA)也被应用于检测贝类帕金虫<sup>[10-11]</sup>。随着分子生物学的发展, 基于帕金虫 5.8S rDNA 中具有种间高度保守和种外高度特异性的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列的聚合酶链式反应(PCR)、实时荧光定量 PCR 及 LUX 荧光 PCR 等多种分子检测手段被相继应用于奥尔森帕金虫病原检测<sup>[12-15]</sup>。

近年来, Notomi 等<sup>[16]</sup>研发了一种新的恒温核酸扩增方法 LAMP(loop-mediated isothermal amplification), 即环介导等温扩增技术, 其特点是设计能特异识别靶序列上 6 个位点的 4 条特异引物, 通过一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase), 在恒温条件(60~65 °C)下, 1 h 左右即可进行核酸扩增, 扩增效率可达到  $10^9 \sim 10^{10}$  个数量级<sup>[16]</sup>。该方法具有特异性强、灵敏度高、操作简便、产物易检测、不需电泳仪和 PCR 仪等优点<sup>[17-21]</sup>。本研究针对 *P. olseni* 的 5.8S rDNA 的 ITS 序列进行 LAMP 引物设计, 首次建立了 *P. olseni* 的 LAMP 检测技术, 并对该方法的灵敏度、特异性和应用性进行了验证。该检测技术的建立, 为 *P. olseni* 的诊断提供了一项适合在条件简陋的实验室或养殖场使用的实用检测方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**寄生虫和质粒** *P. olseni*, *P. marinus*, *Bonamia exitiosa*, *Ichthyobodo* sp. AVNV 均为本实验室鉴定后保存; pMD18-T vector 购自 TaKaRa 生物工程有限公司(大连); 大肠杆菌 *E.coli* DH5 $\alpha$  购自天根生化科技(北京)有限公司, -80 °C 保存。

**主要试剂** 10 $\times$ ThermoPol Reaction Buffer、Bst DNA 聚合酶(8000 U/mL)购自 New England Biolabs; Premix Ex Taq 购自 TaKaRa 生物工程有限公司(大连); GeneFinder<sup>TM</sup> 购自厦门百维信生物技术有限公司; dNTPs(10 mmol/L)购自北京索莱宝科技有限公司; Betaine 购自 Sigma-Aldrich 公司; E.Z.N.A<sup>TM</sup> Plasmid Mini Kit I 购自 OMEGA BIO-TEK 公司; DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Zymo 公司。

**仪器** PCR 仪(美国应用生物系统公司, Applied Biosystems); 电泳仪(北京六一仪器厂 DYY-16B 型稳压稳流电泳仪); Fuji Film(LAS 3000)

凝胶成像系统; NanoDrop 2000c 超微量分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

### 1.2 LAMP 引物设计

根据 Notomi 等<sup>[16]</sup>的方法, 以 *P. olseni* 5.8S rDNA(GenBank: DQ194979.1)中种内高度特异的 ITS 序列, 采用在线软件 Primer Explorer V4(<http://primerexplorer.jp/e/>)进行 LAMP 引物设计, 4 条引物包括 F3、F2、F1c 和 B3、B2、B1c, 分别识别基因的 6 个位点, 其中 Perk-FIP 由 F1c、TTTT 连接子和 F2 组成; Perk-BIP 由 B1c、TTTT 连接子和 B2 组成引物序列见表 1, 引物均由上海英俊生物技术有限公司合成。

表 1 LAMP 引物  
Tab. 1 Primers used for LAMP

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence
Perk-F3	GCACAAAGGGGATCTTTCCT
Perk-B3	CGAGCATCCAAAGACTCA
Perk-FIP	TCCAAGCGGGATACAAAGCACTTTTTG TCGCTCTTCTCCCGATA
Perk-BIP	CGTTATGTGCGCTTGTGAAGGCTTTTGGGA GGGGCTACAATACGAGA

### 1.3 LAMP 检测奥尔森帕金虫方法的建立和优化

配制 24  $\mu$ L 的 LAMP 初始反应体系, 包括: 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ ThermoPol Reaction Buffer(20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100)、4  $\mu$ L dNTPs(10 mmol/L each)、5  $\mu$ L Betaine(5 mol/L)、1.6  $\mu$ L Perk-FIP(25  $\mu$ mol/L)、1.6  $\mu$ L Perk-BIP(25  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L Perk-B3(5  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L Perk-F3(5  $\mu$ mol/L)、4  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)、1  $\mu$ L Bst DNA polymerase(8000 U/mL)和 2.3  $\mu$ L 无菌水。

反应体系配制完成后, 对奥尔森帕金虫阳性模板( $10^7$  copies/ $\mu$ L)进行 95 °C 变性 5 min, 冰上放置 5 min, 将 1  $\mu$ L 奥尔森帕金虫阳性模板( $10^7$  copies/ $\mu$ L)加入 LAMP 反应体系中, 设置 6 个温度梯度, 分别为 58、60、62、64、66、68 °C, 反应 60 min, 最后 80 °C, 5 min 终止反应, 反应产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳观察, 以确定最适反应温度。确定最适反应温度后, 由于 Mg<sup>2+</sup>是 LAMP 反应的重要因素, 保持其他组分浓度不变, 加入不同体积的 MgCl<sub>2</sub> 和无菌水至 24  $\mu$ L, 使以上反应体系中 Mg<sup>2+</sup>浓度(终浓度)为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 和 14 mmol/L, 以确

定适宜的  $Mg^{2+}$  浓度。再根据以上的结果进行 10、20、30、40、50、60、70 和 80 min 的不同反应时间的优化, 最终得出适宜的 LAMP 反应体系及反应条件。

#### 1.4 LAMP 产物的检测

LAMP 反应结束后, 向管中加入 3  $\mu$ L 稀释 10 倍的 GeneFinder<sup>TM</sup> 核酸染料, 通过肉眼观察反应液颜色变化来判断是否有靶序列进行了扩增<sup>[19-20,22]</sup>, 也可通过直接肉眼观察反应管中的沉淀或浑浊来判断 LAMP 反应的结果<sup>[23]</sup>。另一种方法是用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离, 凝胶置于 GeneFinder<sup>TM</sup> 中染色然后在凝胶成像系统下观察<sup>[16]</sup>。

#### 1.5 奥尔森帕金虫 5.8S rDNA 片段的克隆及质粒标准品的制备

根据世界动物卫生组织(OIE)推荐引物, 构建 *P. olseni* 5.8S rDNA ITS 序列的质粒标准品, 引物为 PerkITS-85: CCGCTTTGTTTGGA, PerkITS-750: ACATCAGGCCTTCTAATGATG, 预计扩增片段大小为 673 bp。

用于构建质粒标准品的 PCR 50  $\mu$ L 反应体系包括: 25  $\mu$ L Premix Ex Taq, 2  $\mu$ L PerkITS-85(10  $\mu$ mol/L)、2  $\mu$ L PerkITS-750(10  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L DNA 模板(1 ng/ $\mu$ L), 20  $\mu$ L 无菌水。

PCR 反应参数: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。对阳性 PCR 产物(673 bp)切胶, 按 Zymo 胶回收试剂盒说明进行胶回收, 纯化产物经 TA 克隆构建重组质粒后使用引物 PerkITS-85/PerkITS-750 引物进行 PCR 检测, 阳性克隆送至上海生物工程有限公司进行测序。

#### 1.6 LAMP 和常规 PCR 检测 *P. olseni* 的灵敏度实验

提取重组质粒 pMD18-5.8S 后电泳检测纯度, 分光光度计测量其浓度, 计算质粒拷贝数, 再进行 10 倍梯度系列稀释成  $3 \times 10^7 \sim 3 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L 进行 LAMP 和常规 PCR 灵敏度测试。取 1  $\mu$ L 质粒标准品 DNA 作为模板进行 LAMP 扩增。反应采用“1.3”中 *P. olseni* LAMP 优化后的体系。常规 PCR 反应体系同“1.5”。

#### 1.7 LAMP 检测 *P. olseni* 特异性实验

为验证所建立的 *P. olseni* LAMP 反应的特异性, 对 LAMP 产物中(约 500 bp)切胶, 胶回收纯化。分别用 Perk-FIP/BIP 进行常规 PCR, PCR 反应体系包括: 25  $\mu$ L Premix Ex Taq, 1  $\mu$ L DNA 模板(50

ng/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L Perk-FIP(20  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L Perk-BIP(20  $\mu$ mol/L)和 22  $\mu$ L 无菌水。

PCR 反应循环参数: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。对以上所获得的阳性 PCR 产物按 Zymo 胶回收试剂盒说明进行胶回收纯化, 再按照 1.5 的方法及步骤, 将纯化产物进行 TA 克隆构建重组质粒并使用引物 RV-M/M13-47 进行 PCR 检测, 对阳性克隆进行测序。

另外, 以 *P. marinus*、*B. exitiosa*、*Ichthyobodo* sp. 及 AVNV 基因组 DNA 为模板, 用 *P. olseni* LAMP 引物进行特异性检测。检测中均设 *P. olseni* 基因组 DNA 作为阳性对照, 无菌水为空白对照, 未感染以上病原的组织提取的核酸为阴性对照。

#### 1.8 LAMP 检测 *P. olseni* 的应用

用已经建立的 *P. olseni* LAMP 检测方法对采自江苏连云港(连蛤 070626)和福建莆田(莆蛤 070708)的 2 批各 10 个菲律宾蛤仔外套膜组织 DNA 样品进行检测, 用健康菲律宾蛤仔外套膜组织 DNA 作为阴性对照, 无菌水作为空白对照, *P. olseni* 5.8S rDNA 质粒标准品( $10^7$  copies/ $\mu$ L)作为阳性对照, 同时使用 PCR 方法对该两批次样品进行检测。检测结果使用琼脂糖凝胶电泳进行分析。在 LAMP 反应结束后, 向管中加 3  $\mu$ L 稀释 10 倍的 GeneFinder<sup>TM</sup> 核酸染料, 通过肉眼观察颜色变化来判断是否有靶序列扩增。

在对以上 2 批次样品进行检测之后, 又应用 LAMP 检测方法对 2010 年 9—11 月青岛流清河湾栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)30 份样品、2011 年 7—8 月河北乐亭县海湾扇贝(*Argopectens irradians*)30 份样品和 2011 年 9 月山东长岛县北五岛虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)30 份样品进行批量检测。

## 2 结果

### 2.1 LAMP 反应条件的优化

**反应温度** 对 *P. olseni* LAMP 反应体系进行不同温度梯度(58, 60, 62, 64, 66 和 68  $^{\circ}$ C)扩增, 结果显示当 LAMP 反应体系反应温度为 64  $^{\circ}$ C 时, 可以得到最清晰明亮的特异性条带(图 1)。因此, 选择 64  $^{\circ}$ C 作为 LAMP 检测 *P. olseni* 的反应温度。

**$Mg^{2+}$  浓度** 确立最适反应温度为 64  $^{\circ}$ C 后, 对 *P. olseni* LAMP 反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 mmol/L)进行优化, 结

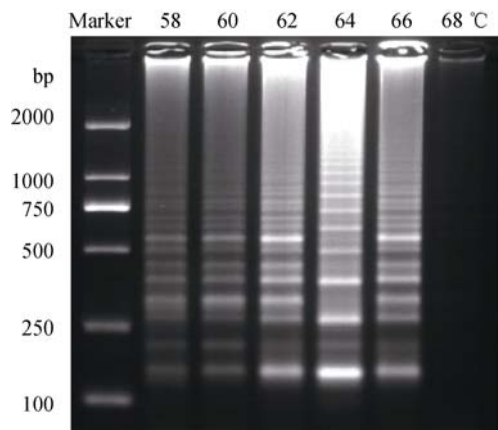


图 1 *P. olseni* LAMP 反应体系不同温度的优化  
Fig. 1 Optimization of the reaction temperature on the LAMP detection of *P. olseni*

果显示当  $Mg^{2+}$  浓度为 6 mmol/L 时有最清晰的特异性条带(图 2), 因此在 *P. olseni* LAMP 反应体系中以 6 mmol/L 作为 LAMP 最佳  $Mg^{2+}$  浓度。

**反应时间** *P. olseni* LAMP 反应时间的优化结果见图 3, 当反应时间为 60 min 时, 即可见清晰明亮的特异性条带, 因此选择 60 min 作为 5.8S rDNA LAMP 检测 *P. olseni* 的适宜时间。

综合以上的结果, 最终确定检测 *P. olseni* 的 25  $\mu$ L LAMP 反应体系, 包括: 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  ThermoPol Reaction Buffer、4  $\mu$ L dNTPs(10mmol/L each)、5  $\mu$ L Betaine(5mol/L)、1.6  $\mu$ L Perk-FIP(25  $\mu$ mol/L)、1.6  $\mu$ L Perk-BIP(25  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L Perk-B3(5  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L Perk-F3(5  $\mu$ mol/L)、4  $\mu$ L  $MgCl_2$ (25 mmol/L)、2.3  $\mu$ L 无菌水、1  $\mu$ L Bst DNA polymerase(8 000 U/mL)和 1  $\mu$ L DNA 模板, 反应温度为 64  $^{\circ}C$ , 反应时间为 60 min。

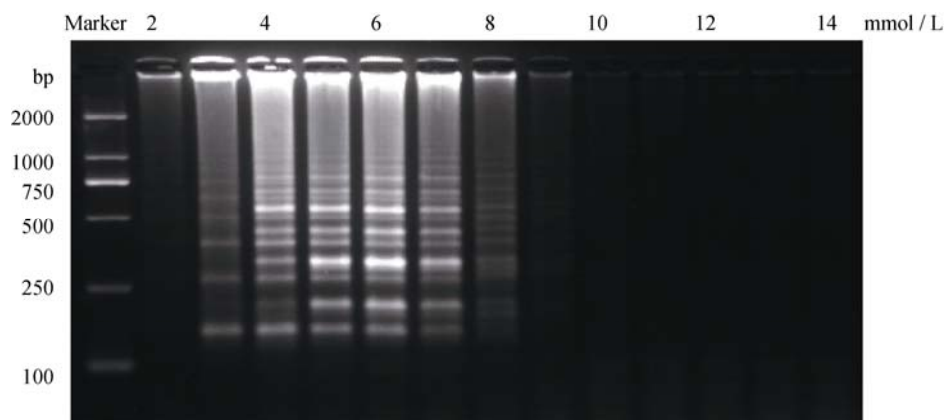


图 2 *P. olseni* 反应体系中不同  $Mg^{2+}$  的优化  
Fig. 2 Optimization of the  $MgCl_2$  concentration on the LAMP detection of *P. olseni*

## 2.2 LAMP 反应产物的鉴定

将 LAMP 产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析(图 1), 产物呈特殊的梯形条带, 这是 LAMP 扩增方法的典型特征。在 LAMP 反应扩增过程中, 生成大量的反应副产物-焦磷酸镁白色沉淀, 反应产物呈浑浊状。所以也可通过肉眼直接观察反应后管中是否形成白色沉淀或出现浑浊来定性判断是否发生扩增反应(图 4-a)。另一种方法是通过加入核酸荧光染料 GeneFinder<sup>TM</sup> 来判断 LAMP 反应的结果, 如果反应混合物变为黄绿色, 则有扩增产物产生; 反之, 若保持橙色不变, 则无扩增产物产生(图 4-b)。

## 2.3 *P. olseni* 5.8S rDNA 质粒标准品的构建与鉴定

对所构建的重组质粒 pMD18-5.8S 使用 PerkITS-85/PerkITS-750 引物进行 PCR 扩增, 产物在 673 bp 处有明亮条带。同时测序结果显示序列与 *P. olseni*(GenBank: DQ194979.1) 中相应序列完全一致, 表明质粒标准品构建正确。

## 2.4 LAMP 与常规 PCR 检测 *P. olseni* 灵敏度的比较

以经过 10 倍系列梯度稀释为  $3 \times 10^7 \sim 3 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L 的 *P. olseni* 5.8S rDNA 基因的质粒标准品为模板, 进行 LAMP 与常规 PCR 灵敏度检测(图 5), 结果显示 *P. olseni* LAMP 检测灵敏度可至 30 拷贝, 常规 PCR 检测灵敏度为  $3 \times 10^3$  拷贝。

## 2.5 LAMP 检测 *P. olseni* 特异性实验

将 Perk-FIP/BIP 的扩增产物进行 TA 克隆构建重组质粒并测序, 结果表明扩增序列与 *P. olseni* 5.8S rDNA(GenBank: DQ194979.1) 中相应序列一致, 表明所设计的 *P. olseni* LAMP 引物在 LAMP 反应中均为特异性扩增。

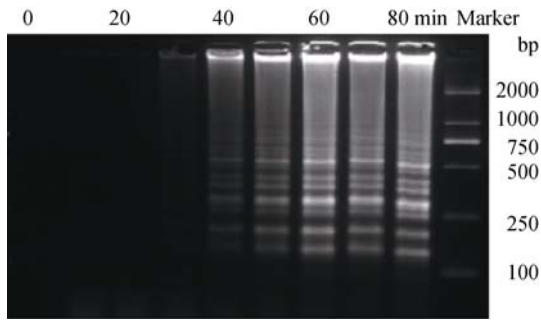


图 3 *P. olsenii* LAMP 反应时间的优化  
Fig. 3 Optimization of reaction time on the LAMP detection of *P. olsenii*

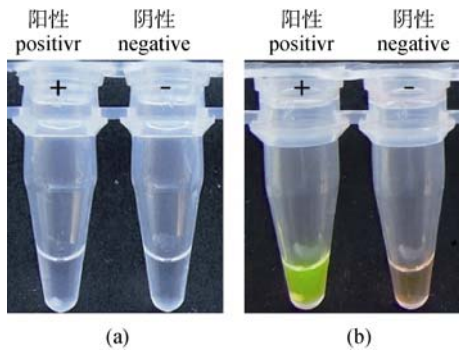


图 4 肉眼直接观察 LAMP 反应产物  
(a) 肉眼观察管中白色沉淀; (b) 加入核酸荧光染料 GeneFinder™, 肉眼观察反应混合物颜色变化。

Fig. 4 Visual inspection of LAMP products  
(a) LAMP reaction visualized by turbidity; (b) visualized by adding GeneFinder™.

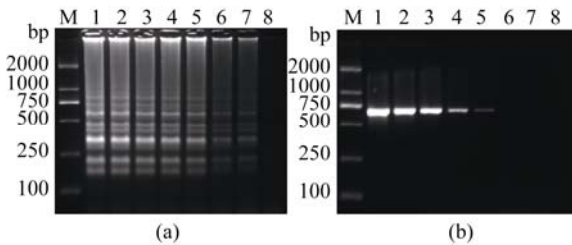


图 5 *P. olsenii* LAMP 与常规 PCR 检测的灵敏度电泳图  
(a) LAMP 反应的灵敏度; (b) PCR 反应的灵敏度。  
1 ~ 8: 10 倍系列稀释的质粒标准品 (pMD18-5.8S), 分别为  $3 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^2$ 、 $3 \times 10^1$  和  $3 \times 10^0$  拷贝; M: DL 2000™ DNA Marker。

Fig. 5 Sensitivity comparison of LAMP and conventional PCR detection methods of *P. olsenii*  
(a) Sensitivity of LAMP detection; (b) Sensitivity of conventional PCR detection.  
Lanes 1-8: Reaction conducted using 10-fold serial dilutions of the plasmid (pMD18-5.8S) DNA:  $3 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^1$  and  $3 \times 10^0$  copies, respectively; M: DL 2000™ DNA Marker.

以 *P. olsenii*、*P. marinus*、*B. exitiosa*、*Ichthyobodo* sp.、AVNV 基因组 DNA 为模板, 检测 *P. olsenii* LAMP 检测方法的特异性(图 6)。结果表明, *P.*

*olseni* LAMP 引物只对 *P. olsenii* 有扩增, 而对其他 3 种寄生虫和 1 种病毒无扩增。

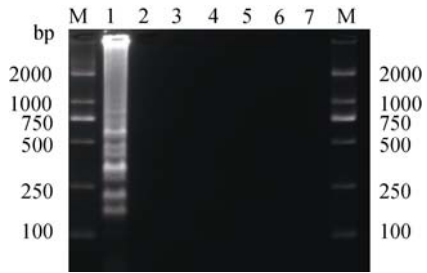


图 6 LAMP 特异性检测电泳图  
1 ~ 8: 1. *P. olsenii*; 2. *P. marinus*; 3. *B. exitiosa*; 4. *Ichthyobodo* sp.; 5. AVNV; 6. 阴性对照(模板为未感染以上种的组织提取的核酸); 7. 空白对照(模板为无菌水); M: DL 2000™ DNA Marker。

Fig. 6 Specificity test of *P. olsenii* LAMP detection using different species.

1-8: 1. *P. olsenii*; 2. *P. marinus*; 3. *B. exitiosa*; 4. *Ichthyobodo* sp.; 5. AVNV; 6. Negative control (DNA template extracted from uninfected tissue); 7. Blank control (Template was sterile water); M: DL 2000™ DNA Marker.

2.6 LAMP 检测 *P. olsenii* 的应用

应用 *P. olsenii* LAMP 方法和 PCR 对 2 批次各 10 个菲律宾蛤仔外套膜组织样品进行检测, 反应后产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明, 连蛤 070626 的 10 份样品 LAMP 检测结果均为阳性, 健康菲律宾蛤仔外套膜组织 DNA 和无菌水均为阴性(图 7-a)。PCR 方法对该 10 份样品的检测结果为 6 号阴性, 其他九个样品为阳性(图 7-b)。同时, 向反应混合物中加入核酸染料对 LAMP 检测该 10 份样品结果进行肉眼观察, 结果显示, 该方法检测 LAMP 样品的结果和电泳分析结果一致(图 7-c)。

LAMP 检测莆蛤 070708 的 10 份样品结果为 3、4 号阴性, 其他八个样品均为阳性, 健康菲律宾蛤仔外套膜组织 DNA 和无菌水均为阴性(图 7-c)。PCR 方法对该 10 份样品的检测结果为 2、3、4、9 号阴性, 其他 6 个样品为阳性(图 7-d)。同时, 向反应混合物中加入核酸染料对 LAMP 检测该 10 份样品结果进行了肉眼观察, 结果显示, 该方法检测 LAMP 样品的结果和电泳分析结果一致(图 7-f)。

在对以上 2 批次实际样品进行检测之后, 又使用 *P. olsenii* LAMP 检测方法对 2010 年 9—11 月青岛流清河湾栉孔扇贝 30 份样品、2011 年 7—8 月河北乐亭县海湾扇贝 30 份样品和 2011 年 9 月份山东长岛县北五岛虾夷扇贝 30 份样品进行批量检测, 检测结果为青岛流清河湾样品阳性率 6.67%, 河北乐亭县样品阳性率 3.33%, 山东长岛县样品阳性率 10%。

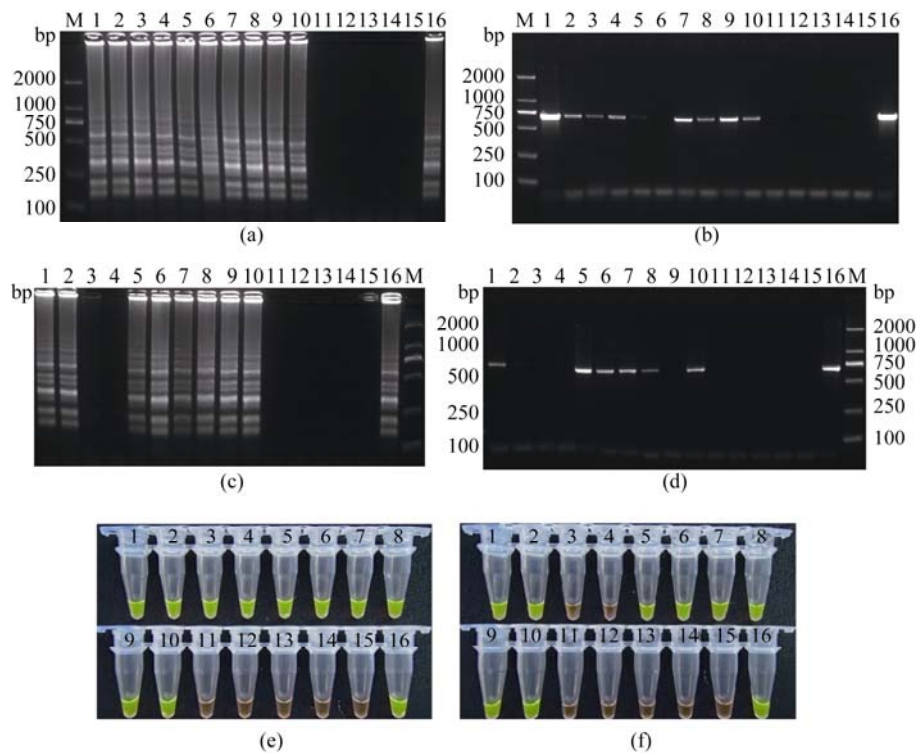


图 7 *P. olsenii* LAMP 检测方法在菲律宾蛤仔样品中的应用

1-10: 菲律宾蛤仔外套膜样品 DNA; 11-14: 健康菲律宾蛤仔外套膜组织 DNA; 15: 无菌水; 16: *P. olsenii* 5.8S rDNA 质粒标准品 ( $10^7$ copies/ $\mu$ L)。

(a), (c) 琼脂糖凝胶电泳观察 *P. olsenii* LAMP 检测结果; (b), (d) 琼脂糖凝胶电泳观察 *P. olsenii* PCR 检测结果; (e), (f) 加入 GeneFinder™ 肉眼观察 *P. olsenii* LAMP 检测结果。

**Fig. 7 Application of *P. olsenii* LAMP detection method in the *R. philippinarum* samples**

Tube1-10: DNA extracted from *R. philippinarum* in mantle tissue; Tube11-14: DNA extracted from healthy *R. philippinarum* in mantle tissue; Tube 15: water; Tube 16: Plasmid standard of *P. olsenii* 5.8S rDNA ( $10^7$ copies/ $\mu$ L).

(a), (c) agarose gel electrophoresis results of *P. olsenii* LAMP assay; (b), (d) agarose gel electrophoresis results of *P. olsenii* PCR assay; (e), (f) visual inspection results of *P. olsenii* LAMP assay.

### 3 讨论

为建立 *P. olsenii* 快速、有效和准确的检测方法, 实验针对 *P. olsenii* 的 5.8S rDNA 中的 ITS 序列为靶序列进行 LAMP 引物设计, 通过对 LAMP 反应体系中反应温度、 $Mg^{2+}$  浓度和反应时间的优化, 建立了贝类寄生虫 *P. olsenii* 的 LAMP 检测方法。目前, 检测 *P. olsenii* 常规的方法主要有 Ray<sup>[9]</sup> 报道采用的 FTM 培养法、免疫学方法 (ELISA 和 iELISA) 和传统 PCR 等<sup>[10-11,13]</sup>。这些方法可以对 *P. olsenii* 进行特异的检测, 但存在明显的费时、费力、灵敏度低和特异性差等缺点。FTM 培养法耗时长 (需 2~7 d)、特异性较低 (只能进行帕金虫种属以上的鉴定)<sup>[6]</sup>、敏感性较低 (检测极限为  $10^3$  /g 组织)<sup>[9-10]</sup>。ELISA 和 iELISA 虽耗时仅为 1 d, 但灵敏度不如 FTM 培养法<sup>[10-11]</sup>。虽然传统 PCR 方法可以作为一种灵敏且特异的病原检测和鉴定技术, 但 PCR 反应需要

在实验室内, 用琼脂糖凝胶电泳的方法对其产物进行分析, 并且需要 PCR 仪等设备。这在一定程度上限制了检测技术的实用性。实时荧光定量 PCR 技术和 LUX 荧光 PCR 的建立实现了对 *P. olsenii* 的定量检测, 而且检测灵敏度很高, 可以分别达到 26 拷贝和 30 拷贝质粒 DNA<sup>[14-15]</sup>。但是, 这两种方法需要实时荧光定量 PCR 仪、LUX 荧光 PCR 仪和 TaqMan 探针等昂贵的设备和试剂, 这些局限性使得该方法很难在基层推广使用。近年来, 出现了一种新的恒温核酸扩增方——环介导等温扩增技术 (LAMP)<sup>[16]</sup>, 该方法已经被用来快速检测水产动物病原微生物, 如迟缓爱德华菌、鲑肾杆菌、鱼类虹彩病毒、栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒、牡蛎疱疹病毒等<sup>[19-20,24-26]</sup>。在国内, LAMP 技术起步较晚, 相关研究报道不多, 而应用 LAMP 技术检测奥尔森帕金虫国内外均未见文献报道。

本实验所建立的 LAMP 方法克服了传统检测

技术的某些缺陷,可以在 64 °C 恒温条件下,1 h 内实现对样品的检测,该方法不需要模板的热变性、长时间温度循环、繁琐的电泳、紫外观察等过程,而且可以通过直接观察反应后是否有焦磷酸镁白色沉淀或者加入 GeneFinder™ 等核酸荧光染料的方法进行 LAMP 产物的鉴定。

在灵敏度实验中,本研究以建立的 5.8S rDNA 标准质粒 DNA 为模板进行验证,结果表明 5.8S rDNA 基因 LAMP 检测与常规 PCR 相比,灵敏度提高了 100 倍,检测极限为 30 拷贝,和巢式 PCR、实时荧光定量 PCR 和 LUX 荧光 PCR 具有相同的灵敏度。并且在实际样品的检测过程中,连蛤 070626 的 10 份样品 LAMP 检测结果为 10 个阳性,与 PCR 检测结果的 9 个阳性呈现 90% 的一致性;莆蛤 070708 的 10 份样品 LAMP 检测结果为 8 个阳性,与 PCR 检测结果的 6 个阳性呈现 80% 的一致性。此结果同时也表明, *P. olseni* LAMP 检测比常规 PCR 检测灵敏度高,检测结果更准确,适合于对无症状的样品进行病原检测。用 *P. olseni* LAMP 引物进行特异性检测,结果表明该引物与 *P. marinus*、*B. exitiosa*、*Ichthyobodo* sp. AVNV 基因组 DNA 均无交叉反应,而且测序结果也表明 LAMP 反应的产物特异性。由以上结果可知,LAMP 反应在检测时间、检测成本、检测灵敏度和特异性方面较 PCR 等检测方法都有较大的提高。

应用奥尔森帕金虫的菲律宾蛤仔实际样品进行检测,LAMP 反应产物使用琼脂糖凝胶电泳进行分析,同时在反应结束后的产物中加入核酸荧光染料 GeneFinder™,并进行肉眼观察,感染样品与阳性对照均有明显的黄绿色,与阴性对照所显橙色有明显的差异,并且所得结果与琼脂糖凝胶电泳分析完全相同,表明本实验所建奥尔森帕金虫的 LAMP 检测方法可以不必通过琼脂糖凝胶电泳分析,而是通过向反应产物管中加入 GeneFinder™ 核酸染料,观察管中混合液颜色变化来判断靶序列是否进行了扩增进行检测结果的判断,具有较强的实用性,可适用于现场快速诊断。

在使用奥尔森帕金虫 LAMP 检测方法对青岛流清河湾栉孔扇贝 30 份样品、河北乐亭县海湾扇贝 30 份样品和山东长岛县北五岛虾夷扇贝 30 份样品进行批量检测后,检测结果显示青岛流清河湾样品阳性率为 6.67%,河北乐亭县样品阳性率为

3.33%,山东长岛县样品阳性率为 10%。此结果表明,奥尔森帕金虫在北方贝类养殖区的主要养殖贝类中有较为广泛的分布。利用 LAMP 方法检测奥尔森帕金虫在全国贝类中分布及发病情况是今后需要继续进行的工作。

#### 参考文献:

- [1] 张喜昌,梁玉波,杨波,等. 海产贝类帕金虫病害的研究进展[J]. 海洋环境科学, 2001, 20(2): 76-80.
- [2] 吴信忠,潘金培,江静波. 贝类病害学研究进展 II. 贝类寄生虫病学研究[J]. 海洋通报, 1997, 16(1): 76-85.
- [3] 梁玉波,王立俊,张喜昌. 贝类病原性寄生虫种类[J]. 海洋环境科学, 2002, 21(2): 69-73.
- [4] 梁玉波,张喜昌,王立俊. 贝类典型寄生虫病害[J]. 海洋环境科学, 2003, 22(4): 72-75.
- [5] Makin J G, Owen H M, Collier A. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin)[J]. Science, 1950, 111(2883): 328-329.
- [6] 王芳,黄纪徽,顾志峰,等. 海洋贝类帕金虫及其病害发生[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3): 583-593.
- [7] Villalba A, Reece K S, Ordas M C, et al. Perkinsosis in molluscs: A review[J]. Aquatic Living Resources, 2004, 17(4): 411-432.
- [8] 梁玉波,张喜昌,王立俊,等. 北黄海菲律宾蛤仔帕金虫流行病害的研究[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(5): 502-511.
- [9] Ray S M. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions[J]. Proceedings of the National Shellfisheries Association, 1966, 54: 55-69.
- [10] 樊景凤,梁玉波,宋立超,等. 贝类帕金虫间接酶联免疫吸附测定法的建立[J]. 海洋环境科学, 2006, 25(2): 62-64.
- [11] Ottinger C A, Lewis T D, Shapiro D A, et al. Detection of *Perkinsus marinus* extracellular proteins in tissues of the eastern oyster *Crassostrea virginica*: potential use in diagnostic assays[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2001, 13(2): 133-141.
- [12] 谢芝勋,谢丽基,刘加波,等. 贝类奥尔森派琴虫实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(7): 517-519.
- [13] Takishita K, Fujiwara Y, Kawato M, et al. Molecular identification of the ichthyosporean protist *Pseudoperkinsus tapetis* from the mytilid mussel *Adipicola pacifica* associated with submerged whale carcasses in Japan[J]. Marine Biotechnology, 2008, 10(1), 13-18.

- [14] 吴绍强, 李海艳, 林祥梅, 等. 贝类派琴虫实时荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 58–63.
- [15] 许遐, 王彩霞, 吴绍强, 等. 贝类派琴虫 LUX 荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(9): 31–33.
- [16] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12), E63–E63.
- [17] 岳志芹, 梁成珠, 吕朋, 等. LAMP 技术及其在水生动物疫病诊断中的应用[J]. 检验检疫科学, 2006, 16(5): 70–74.
- [18] 赵飞, 邹为民. LAMP 法在水产动物病原快速检测中的应用[J]. 南方水产, 2007, 3(2): 71–75.
- [19] Ren W C, Tristan Renault, Cai Y Y, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 DNA[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 170(1-2): 30–36.
- [20] Ren W C, Wang C M, Cai Y Y. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of acute viral necrobiosis virus in scallop *Chlamys farreri*[J]. *Acta Virologica*, 2009, 53(3): 161–167.
- [21] 任伟成. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒基因组全序列的测定和核酸诊断技术的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [22] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(6): 2616–2622.
- [23] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, *et al.* Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289(1): 150–154.
- [24] Caipang C M, Haraguchi I, Ohira T, *et al.* Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 121(2): 155–161.
- [25] Saleh M, Soliman H, El-Matbouli M. Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish[J]. *BMC Veterinary Research*, 2008, 4(1): 1–10.
- [26] Yeh H Y, Shoemaker C A, Klesius P H. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 63(1): 36–44.



## Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for *Perkinsus olseni* detection

QU Peng<sup>1,2</sup>, WANG Chong-ming<sup>2\*</sup>, REN Wei-cheng<sup>3</sup>, LIANG Yan-tao<sup>2</sup>,  
JIA Zhi-lei<sup>1,2</sup>, HUANG Jie<sup>2</sup>, PAN Lu-qing<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Department of Rheumatology and Inflammation Research, University of Gothenburg, Gothenburg S-413 46, Sweden)

**Abstract:** *Perkinsus olseni* (*P. olseni*) is one of the important pathogenic parasites of the shellfish. With the purpose of building a rapid, sensitive, accurate and easy to use detection method for *P. olseni*, we established a *P. olseni* loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) based on the internal transcribed spacer (ITS) of *Perkinsus olseni* 5.8S rDNA sequences. We used the online software Primer Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>) and designed a set of 4 LAMP primers (Perk-FIP, Perk-BIP, Perk-F3 and Perk-B3) of the *P. olseni*, then we optimized the reaction conditions, mainly about the reaction temperature, magnesium ion concentration of the reaction system and the reaction time. After that, we got the *P. olseni* 25  $\mu$ L LAMP reaction system, including: 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ ThermoPol Reaction Buffer, 4  $\mu$ L dNTPs (10 mmol/L each), 5  $\mu$ L Betaine (5 mol/L), 1.6  $\mu$ L Perk-FIP (25  $\mu$ mol/L), 1.6  $\mu$ L Perk-BIP (25  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L Perk-B3 (5  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L Perk-F3 (5  $\mu$ mol/L), 4  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 2.3  $\mu$ L sterile water, 1  $\mu$ L Bst DNA polymerase (8 000 U/mL) and 1  $\mu$ L DNA template, the optimal reaction temperature is 64  $^{\circ}$ C and the optimal reaction time is 60 min. In this research, the LAMP products were detected mainly using agarose gel electrophoresis and visual inspection of a color change due to addition of fluorescent dye. Before confirming the minimum threshold of the LAMP, we constructed *P. olseni* positive plasmid, also based on *P. olseni* 5.8S rDNA ITS sequences. The result shows that the minimum threshold of the LAMP assay is approximately 30 copies of plasmid DNA. We proved that the developed LAMP method was highly specific for *P. olseni*, and no cross-reaction was observed with other pathogens, such as *Perkinsus marinus* (*P. marinus*), *Bonamia exitiosa* (*B. exitiosa*), *Ichthyobodo* sp. and Acute Viral Necrosis Virus (AVNV). A comparative evaluation of the LAMP and PCR assays using 20 *Ruditapes philippinarum* (*R. philippinarum*) samples showed that LAMP is more sensitive and accurate than PCR and the shellfish parasite *P. olseni* is widely distributed in farming shellfish of North shellfish farming area. Totally, these results indicate that the LAMP method is a kind of simple, sensitive, specific, and reliable technique for the detection of *P. olseni*. The LAMP technique could be used for the detection of *P. olseni* in the coastal shellfish farms and laboratories with simple equipment.

**Key words:** *Perkinsus olseni*; internal transcribed spacer; loop-mediated isothermal amplification; shellfish; assay

**Corresponding author:** WANG Chong-ming. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn