

# 基于 PCR 及焦磷酸测序技术的单孢子虫 鉴定技术研究与应用

王彩霞 林祥梅 邓俊花 吴绍强\*

(中国检验检疫科学研究院 动植物检疫研究所, 北京 100029)

**摘 要** 为适应口岸单孢子虫快速、准确、高通量检测的需求, 建立一种基于 PCR 及焦磷酸测序技术平台的单孢子虫鉴定方法。以 OIE 推荐的 PCR 扩增方法获得单孢子虫特异基因, 根据此基因的保守序列利用焦测序软件 PyroMark Q96ID 设计专用引物进行 PCR 扩增及焦磷酸测序, 测得序列经比对分析确定为单孢子虫序列。同时采用 PCR 焦磷酸测序方法和 OIE 推荐的 PCR 方法对牡蛎样品进行检测。结果表明, 所建立的检测方法可从基因序列水平上准确鉴定牡蛎样品中的单孢子虫, 且检测结果与 OIE 方法的检测结果一致。

**关键词** 尼氏单孢子虫 牡蛎 聚合酶链反应 焦磷酸测序 鉴定

**中图分类号** Q75 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2011)05-0092-05

## Establishment and application of *Haplosporidium nelsoni* identification based on PCR amplification and pyrosequencing

WANG Cai-xia LIN Xiang-mei DENG Jun-hua WU Shao-qi<sup>\*</sup>

(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029)

**ABSTRACT** For rapid, accurate and high throughput detection of *Haplosporidium nelsoni*, pyrosequencing analysis coupled with PCR amplification of the target sequence was developed. *H. nelsoni* DNA sequence was obtained by the OIE reference PCR method. Pyrosequencing special primers were designed targeting the conserved region of the sequence. The DNA of *Haplosporidium*-positive oyster samples was chosen to amplify the target sequence using pyrosequencing primers, and the sequence was analyzed by PyroMark™ ID System. BLAST online showed that the sequence was specific for *H. nelsoni*. Oyster samples were detected by both the PCR-pyrosequencing method and the OIE reference PCR method. The results showed that the PCR-pyrosequencing detection method could identify *H. nelsoni* and the result was consistent with the OIE reference PCR examination. The method meets the requirements of *H. nelsoni* quarantine and provides a new approach for the examination of other animal diseases.

**KEY WORDS** *Haplosporidium nelsoni* Oyster Polymerase Chain Reaction  
Pyrosequencing Identification

2010 年国家质检总局公益性行业科研专项(201010016)资助

\* 通讯作者。E-mail: sqwu@sina.com, Tel: (010)64927408

收稿日期: 2011-01-31; 接受日期: 2011-03-18

作者简介: 王彩霞(1982-), 女, 实习研究员, 主要从事动物检疫研究。E-mail: friday128@sina.com, Tel: (010)64927408

尼氏单孢子虫病是由一种原生动物-单孢子虫门的尼氏单孢子虫(*Haplosporidium nelsoni*, MSX)感染无脊椎动物导致的疾病。1957年春季,美国新泽西州特拉华湾东部的牡蛎首次暴发了单孢子虫疾病(Haskin *et al.* 1996),据记载其后的2~3年间该病曾流行于特拉华海湾,使养殖的美洲牡蛎死亡率达50%~95%(王中卫等 2006)。近几十年来,在国外很多地区都曾暴发过单孢子虫病害。1965~1990年(Andrews *et al.* 1967; Hillman *et al.* 1988; Kem *et al.* 1988; Matthiessen *et al.* 1990)的几十年里,该病的分布已经遍及美国整个东部沿岸,在此期间还伴随了派琴虫病的发生(Ragone *et al.* 2003),使大量牡蛎受到感染并导致了严重的死亡,给美国贝类产业造成了巨大的经济损失。王中卫等(2009)采集大连大窑湾养殖区的长牡蛎抽取血淋巴液在显微镜下观察到了尼氏单孢子虫,2007年5~8月又在大连长海县浮筏式养殖的成体扇贝体内检测到尼氏单孢子虫(王中卫等 2009),说明我国辽东半岛已经存在一定程度的单孢子虫感染。王宗祥等(2011)也报道我国近几年在东海、黄海和南海海域牡蛎均有不同程度的单孢子虫感染,这些报道提示我们必须加大对单孢子虫病的关注和重视,增强对单孢子虫的研究力度和监测力度。

目前,贝类体内尼氏单孢子虫的检测方法有组织涂片、压片、组织切片、电镜观察、病原生物培养、免疫检测、DNA探针等。近些年来发展起来的多克隆和单克隆免疫检测技术,以及DNA探针检测技术,已在尼氏单孢子虫检测方面得到了广泛的应用。在单孢子虫PCR检测方面,王中卫等(2009)对寄生在长牡蛎血淋巴液的尼氏单孢子虫进行了初步研究,建立了PCR检测方法,进而采用特异性DNA探针建立了单孢子虫的原位杂交检测技术。谢丽基等(2009, 2010a, 2010b)建立了贝类单孢子虫的PCR检测方法以及结合派琴虫和马尔太虫的二重、三重PCR检测方法均可对贝类样品中单孢子虫的感染情况进行检测。与传统的检测方法相比,PCR检测具有灵敏度高、取样少、快速简便等优点,但是存在假阳性的可能,必须结合组织病理学观察或者PCR产物测序才能作为感染判定依据(OIE 2006)。

焦磷酸测序技术(Pyrosequencing)是近几年发展起来的一种能够进行定量序列测定的新技术,具有高通量、快速、敏感等特点。目前该技术在物种鉴定、病毒的快速鉴定和分型、微生物的检测等方面已有广泛的应用(陈之遥等 2008)。本研究根据单孢子虫基因序列的保守性,建立了单孢子虫的PCR-焦磷酸测序检测、鉴定技术,并对采集于东海、黄海和南海海域的牡蛎样品进行了检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2009年12月~2010年5月,本实验室从福建、广西及山东等地沿海采集的牡蛎样品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA的提取

按照试剂盒DNeasy Blood and Tissue Kit(QIAGEN)操作步骤提取待检牡蛎鳃组织的DNA, -20℃保存备用。

#### 1.2.2 阳性克隆质粒的构建

以所提牡蛎样品DNA为模板,采用OIE推荐的单孢子虫PCR扩增引物(Stokes *et al.* 1995)MSX-A:5'-CGACTTTGGCATTAGGTTTCAGACC-3'和MSX-B:5'-ATGTGTTGGTGACGCTAACCG-3'按照OIE推荐的反应体系(10×PCR Buffer(TaKaRa)2.5μl, 2.5 mmol/L dNTP(TaKaRa)2μl, 5U/μl Taq DNA聚合酶(TaKaRa)0.5μl, 牡蛎样品组织DNA 2μl, 10μmol/L的上、下游混合引物1μl, 最后添加灭菌ddH<sub>2</sub>O至25μl体系)和反应条件(94℃预变性4min, 94℃变性30s, 59℃退火30s, 72℃延伸1.5min, 共35个循环, 最后72℃再延伸5min)进行扩增, 预期扩增片段长度为573bp。PCR结束后, 进行1%琼脂糖凝胶电泳检测; 采用Agarose Gel DNA Purification Kit (OMEGA)切胶回收目的条带, 并克隆到pGEM-T载体, 转化大肠杆菌*E. coli* JM109感受态细胞。经蓝白斑筛选、PCR鉴定获得含目的基因片段的重组质粒, 纯化后并测序。-20℃保存备用。

#### 1.2.3 单孢子虫PCR-焦磷酸测序方法的建立

### 1.2.3.1 引物设计

分析测得单孢子虫阳性质粒核酸序列片段的保守区域,利用焦磷酸测序检测系统自带软件进行引物设计。上游引物:5'-GGCCAAAGTAATGATTGATAGGAAC-3',生物素标记5'端;下游引物:5'-TTGGTGAATGCTTTCGCATAAG-3',产物长度为107bp,焦磷酸测序引物:5'-TTCGCATAAGTCAGTCTC-3'。引物由上海英维捷基生物技术有限公司合成。

### 1.2.3.2 焦磷酸测序——PCR扩增

以所构建的单孢子虫阳性质粒为模板,以焦磷酸测序引物进行PCR扩增,并对反应体系及退火温度进行优化。其中10 $\mu$ mol/L上下游引物设计0.5、1、1.5、2、2.5 $\mu$ l 5个梯度;2.5mmol/L dNTP设计0.5、1.0、20、30、40 $\mu$ l 5个梯度;5U/ $\mu$ l Ex Taq设计0.2、0.5、1.0、1.2、1.5 $\mu$ l 5个梯度;根据引物T<sub>m</sub>值将退火温度设计52.6、56.6、58.0、59.0 $^{\circ}$ C 4个梯度进行优化试验。

### 1.2.3.3 单链模板制备及焦磷酸测序

取PCR产物10 $\mu$ l加ddH<sub>2</sub>O补至50 $\mu$ l,在产物中分别加入磁珠3 $\mu$ l和结合缓冲液47 $\mu$ l,常温震荡混匀10min;打开真空泵,将真空预装工具在超纯水中清洗30s后抓取磁珠,分别在70%乙醇、变性缓冲液、洗涤缓冲液中清洗5~10s,将磁珠移至预先加入测序引物和退火缓冲液的PSQ96孔板中;将此PSQ96板放在ThermoPlate上在80 $^{\circ}$ C放置3min,取出后自然冷却至室温;设定测序程序及碱基投放顺序和循环数,根据程序给定的剂量,在试剂舱中相应的孔中加入酶混合物、底物混合物以及4种碱基,将试剂舱和96孔测序板放入焦磷酸测序仪PyroMark Q96ID的机箱中进行测序反应。

### 1.2.4 样品检测

采用本研究所建立的方法对本实验室前期保存的经过OIE推荐PCR方法鉴定的样品进行PCR扩增、单链分离及测序试验,反应完毕,仪器自动给出测序结果,比较检测结果。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的构建

回收阳性PCR产物构建重组质粒并对阳性菌液进行测序,共573bp(图1)。经Blast在线分析,与GenBank中*H. nelsoni*基因序列(AB080597.1)的同源性达100%。对阳性菌液提取质粒,用核酸蛋白测定仪ND-1000(NanoDrop)测定双链DNA浓度,换算成拷贝数为 $2.49 \times 10^{10}$ 拷贝/ $\mu$ l,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

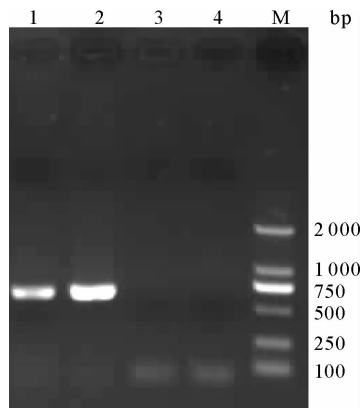
### 2.2 单孢子虫焦磷酸测序-PCR的建立与优化结果

通过试验最终确定的反应体系为:10 $\times$ Ex PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> plus) 5 $\mu$ l,生物素标记上游引物和未标记下游引物各15pmol,dNTP 5mmol,ExTaq 5U,DNA模板2 $\mu$ l,加灭菌水补至50 $\mu$ l。

PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5min,95 $^{\circ}$ C变性20s,58 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,扩增50个循环;最后72 $^{\circ}$ C补充延伸5min。

### 2.3 单孢子虫焦磷酸测序方法的建立

本研究对单孢子虫质粒PCR产物进行焦磷酸测序,测序结果见图2。测得序列为:ACCGGGGTCA TAGAATTTAA CCTCTAACCC GATGATACTA GC。将此序列在网上进行BLAST分析,结果表明,序列一致性较高的均为单孢子虫序列,而且与参照序列的一致性达100%。因此,可以通过此方法来确定样品是否为单孢子虫感染。



注:1,2为阳性菌液;3,4为阴性菌液  
Note:1,2:Positive bacteria solution;  
3,4:Negative bacteria solution

图1 菌液PCR电泳

Fig.1 The identification of recombinant bacterium by PCR



