

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240322002

http://www.yykxjz.cn/

郝文悦, 王锦锦, 葛建龙, 李彬, 王印庚, 廖梅杰, 荣小军, 赵宏晶, 江敏棋, 赵文广, 牛立成, 潘娇. 唇形后口虫 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用. 渔业科学进展, 2025, 46(3): 183–193
HAO W Y, WANG J J, GE J L, LI B, WANG Y G, LIAO M J, RONG X J, ZHAO H J, JIANG M Q, ZHAO W G, NIU L C, PAN J. SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR for parasitic *Boveria labialis* identification from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(3): 183–193

唇形后口虫 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用*

郝文悦^{1,2} 王锦锦^{2,3} 葛建龙^{2,3} 李彬^{2,3} 王印庚^{2,3} 廖梅杰^{2,3}
荣小军^{2,3①} 赵宏晶² 江敏棋² 赵文广² 牛立成² 潘娇⁴

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 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;

3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266237;

4. 中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所 山东 青岛 266003)

摘要 后口虫病是近年来影响刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖效益的重要病害种类之一。唇形后口虫(*Boveria labialis*)是刺参后口虫病的病原。由于缺乏针对该物种的快速、准确的检测方法,研究人员难以系统解析该病原体的传播途径。本研究以测序获得的唇形后口虫部分线粒体基因组序列为基础,根据 *nad10* 基因序列设计唇形后口虫引物,建立其 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法,并对刺参不同养殖区和不同养殖模式下养殖系统中唇形后口虫载量进行检测分析。结果显示,设计的唇形后口虫引物在质粒标准品 $4.05 \times 10^1 \sim 4.05 \times 10^9$ copies/ μ L 范围内建立的标准曲线具有良好的线性关系,相关系数 $R^2=0.997$, 溶解曲线呈现单一峰,无引物二聚体或非特异性扩增;灵敏度实验最低检测限为 40.5 copies/ μ L;所设计的引物仅对唇形后口虫出现特异性扩增,对海洋尾丝虫(*Uronema marinum*)、贪食纤口虫(*Chaenea vorax*)、僧帽肾形虫(*Colpoda cucullus*)和多小核草履虫(*Paramecium multi-micronuleatum*)无交叉反应;重复性实验中各浓度的批内和批间 C_t 值均一性较高,批内实验变异系数(CV)值为 0.32%~0.82%,批间实验 CV 值为 0.40%~0.88%,稳定性较好。利用本方法对 4 种刺参养殖模式不同养殖区的环境样品和饲料进行检测,结合镜检结果对比分析发现,海水中唇形后口虫 DNA 载量与刺参体内唇形后口虫量呈中度正相关($R=0.563$),底泥、附着物样品中的唇形后口虫 DNA 载量与刺参体内唇形后口虫量呈高度正相关($R=0.931$)。推测,鲜海泥是唇形后口虫传播的重要载体之一。本研究结果可为唇形后口虫的快速检测、传播途径解析和防控提供参考。

关键词 刺参; 寄生性疾病; 唇形后口虫; 实时荧光定量 PCR 检测; 传播途径

中图分类号 S942.42 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)03-0183-11

* 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2023CXGC010410)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2023TD29)和青岛市重点研发计划(22-3-3-hygg-1-hy)共同资助。郝文悦, Email: hao_wenyue@163.com

① 通信作者: 荣小军, 研究员, Email: rongxj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-03-22, 收修改稿日期: 2024-04-06

刺参(*Apostichopus japonicus*)是我国重要的海水养殖种类,2022 年全国刺参增殖养殖面积为 25.04 万 hm^2 ,产量达到 24.85 万 t (农业农村部渔业渔政管理局等,2023)。随着刺参养殖产业规模的扩大,病害问题日益凸显。前期已报道的刺参疾病病原以细菌为主,兼有霉菌、寄生虫和敌害生物,且细菌性疾病是造成产业损失的最主要因素,寄生性疾病暴发范围和损失相对较少(王印庚等,2014;廖梅杰等,2021)。然而,近年来刺参病害的流行病学调查发现,以唇形后口虫(*Boveria labialis*)为病原的寄生性后口虫病发生率在 90%以上,成为影响刺参健康养殖的主要病害之一。

唇形后口虫的分类地位为纤毛动物门(Ciliophora)、寡膜纲(Oligohymenophorea)、盾纤亚纲(Scuticociliatia)、吸触目(Thigmotrichida)、半旋虫科(Hemispeiridae)、后口虫属(*Boveria*)。已报道的后口虫有 3 种:亚桶形后口虫(*Boveria subcylindrica*)(Stevens, 1901),唇形后口虫(Ikeda *et al.*, 1918)和 *Boveria teredinidi* (Nelson, 1923)。唇形后口虫的精准检测技术是分析该虫在养殖系统中的分布和传播途径的关键。目前,对于该种类寄生虫的主要检测方法是镜检,即刺参解剖后,取出呼吸树制作为水浸片,然后,通过显微镜进行唇形后口虫的观察和计数。Zhan 等(2018)使用荧光原位杂交的方法来检测唇形后口虫包裹。镜检和荧光原位杂交检测方法可以对唇形后口虫进行定性分析,但无法进行定量研究。另外,水样、泥样和附着物等养殖环境因子中的唇形后口虫难以通过镜检发现,因此,亟需建立一种高效、快速、定量的检测方法。本研究基于测序获得的唇形后口虫线粒体基因组序列设计特异性引物,建立该寄生虫的 SYBR Green I 荧光检测方法,并基于该技术分析工厂化、池塘、网箱和吊笼 4 种刺参主要养殖模式中养殖系统各部分唇形后口虫的载量,相关研究结果可为唇形后口虫的快速检测和传播途径解析及病害防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 唇形后口虫、其他纤毛虫与刺参体壁 DNA 的制备与获取

用于质粒构建的唇形后口虫样品分离自山东省青岛市某养殖场池塘(2023 年 4 月采集自发病池塘,水温为 16~18 $^{\circ}\text{C}$)中刺参呼吸树。剖取刺参呼吸树并镜检确定其唇形后口虫的丰度,选取唇形后口虫载量大的呼吸树组织为样本来源。将呼吸树组织置于装有过滤灭菌海水的培养皿内并剪碎释放唇形后口虫,吸

取含有游离的唇形后口虫的上清液至离心管,2 000 $\times g$ 离心后富集虫体,至虫体密度高于 100 只/mL,利用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取游离虫体 DNA。用于特异性检验的海洋尾丝虫(*Uronema marinum*)、贪食纤口虫(*Chaeneae vorax*)、僧帽肾形虫(*Colpoda cucullus*)和多小核草履虫(*Paramecium multi-micronuleatum*)的 DNA 来自中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所进化基因组学实验室,刺参体壁取自用于分离唇形后口虫的刺参,利用 Mollusc DNA Kit (Omega Bio-Tek, 美国)提取样品基因组 DNA。

1.2 引物设计与筛选

将实验室前期测序获得的唇形后口虫线粒体基因组序列与 NCBI 中其他纤毛虫线粒体序列比对后,选取与其他纤毛虫基因序列同源差异大的 *nad10* 基因的部分 DNA 区段设计引物,并送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。分别以唇形后口虫、海洋尾丝虫、贪食纤口虫、僧帽肾形虫和多小核草履虫的 DNA 和 ddH_2O (空白对照)为模板,退火温度设置为 50~70 $^{\circ}\text{C}$,温度间隔设置为 2 $^{\circ}\text{C}$,与上述引物进行普通 PCR 检测,根据凝胶电泳条带的特异性和亮度确定唇形后口虫引物及 PCR 的退火温度(T_m)。

1.3 重组质粒标准品的构建与鉴定

以所提取的唇形后口虫 DNA 为模板,用所筛选的引物扩增目的片段,目的基因扩增产物经 SteadyPure DNA 凝胶回收试剂盒(艾科瑞生物工程有限公司,湖南)纯化后与 pMDTM19-T 载体(宝日医生物技术有限公司,北京)连接,转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞(宝日医生物技术有限公司,北京),构建重组质粒。涂板培养后进行蓝白斑筛选,并挑取单克隆菌落扩增培养,使用 SteadyPure 质粒 DNA 提取试剂盒(艾科瑞生物工程有限公司,湖南)提取菌液中的质粒,并将经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,使用超微量分光光度计(NanoDrop 1000, 美国)检测并记录质粒浓度,选择 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间的重组质粒作为标准品,根据公式:拷贝数($\text{copies}/\mu\text{L}$)= $[6.02 \times 10^{23} \times \text{质粒浓度}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-9}]/[\text{DNA 长度}(\text{bp}) \times 660]$,计算重组质粒标准品的拷贝数。

1.4 实时荧光定量 PCR 体系的建立

唇形后口虫实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)体系参照 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(诺唯赞医疗科技有限公司,南京)说明书推荐的

20 μL 反应体系, 其中包含 $2\times$ Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix, 引物终浓度梯度分别设置为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 4.05×10^7 copies/ μL 的重组质粒标准品为模板。使用 QuantStudio™ 3 实时荧光定量 PCR 系统进行扩增, 程序为预变性阶段 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环反应阶段 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s、 $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 进行 40 次循环。对不同的引物浓度扩增效果进行对比, 应用 QuantStudio™ Design and Analysis Software Version 1.5.1 分析最佳引物终浓度。

1.5 标准曲线的测定

将制备好的重组质粒标准品原液用 ddH_2O 进行 10 倍梯度稀释, 以获得的终浓度为 $4.05\times 10^0\sim 4.05\times 10^9$ copies/ μL 的 10 个浓度梯度为模板, 每个梯度设置 3 个平行, 按照优化后的反应体系进行 RT-qPCR 扩增, 绘制标准曲线, 分析目的基因拷贝数与 C_t 值的线性关系和熔解曲线的特异性。

1.6 灵敏度实验

选择重组质粒标准品 10 倍梯度稀释的终浓度为 $4.05\times 10^0\sim 4.05\times 10^9$ copies/ μL 的 10 个浓度梯度, 以其为模板, 进行 RT-qPCR 检测, 以 $4.05\times 10^1\sim 4.05\times 10^8$ copies/ μL 的 8 个浓度梯度为模板, 进行普通 PCR 检测, 确定该方法的检测灵敏度。通过比较扩增曲线和 PCR 凝胶电泳成像结果来对比 2 种检测方法对质粒标准品的最低检出限。

1.7 特异性检测

分别以海洋尾丝虫、贪食纤口虫、僧帽肾形虫、多小核草履虫的 DNA、质粒标准品(阳性对照)、刺参体壁基因组 DNA(阴性对照)和 ddH_2O (空白对照)为模板, 利用本研究建立的 RT-qPCR 方法进行检测, 每个样品 3 个重复, 验证该方法的特异性。

1.8 重复性实验

选取浓度为 4.05×10^3 、 4.05×10^5 、 4.05×10^7 copies/ μL 的重组质粒标准品为模板, 分别对所建立 SYBR Green I RT-qPCR 检测方法进行重复性实验。设置批内和批间实验, 批内重复性实验以上述 3 个不同梯度的标准品为模板, 在同一次实验中进行 SYBR Green I RT-qPCR 检测; 批间重复性实验利用选取的 3 组标准品为模板进行 3 次 SYBR Green I RT-qPCR 检测, 每隔 7 d 进行一次。计算批内和批间 C_t 值的平均值、标准差和变异系数(coefficient of variation, CV), 评定该方法的可重复性。

1.9 唇形后口虫 RT-qPCR 检测方法在刺参养殖系统检测中的应用

采集池塘养殖、工厂化养殖、网箱养殖、吊笼养殖 4 种养殖模式系统中的环境、饲料与刺参样品, 每个位点采集 3 个平行样本, 池塘养殖与工厂化养殖模式采集海水、底泥和饲料样品, 网箱养殖与吊笼养殖模式采集海水、附着物和饲料样品, 具体采样位点和样品信息见表 1。同时, 采集相应检测点的养殖刺参, 制作呼吸树水浸片, 于光学显微镜(Nikon E800, 日本)下镜检, 在目镜 \times 物镜放大倍数为 40 倍下判断寄生虫载量, 具体的判别依据: 制备的呼吸树组织水浸片, 每片随机计数 10 个视野, 获得每个视野内的虫体平均数量, 未感染为“-”, 感染 1~200 个为轻度, 计为“+”; 感染 200~500 个为中度, 计为“++”; 感染 500 个以上为重度, 计为“+++”。

不同养殖模式不同地点海水样品采集后立即过滤, 原样过滤 500 mL 海水到 0.22 μm 滤膜, 所有样品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。利用土壤基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)提取不同养殖区养殖系统各部分样品 DNA。使用已建立的 SYBR Green I RT-qPCR 方法对养殖系统样品进行检测。根据已获得的 C_t 值计算拷贝数, 进一步计算原始样本目的基因拷贝数, 计算公式为: 海水原始样品目标基因拷贝数(copies/L)=[拷贝数(copies/ μL) \times 基因组 DNA 体积]/样本抽滤体积; 其他原始样品目标基因拷贝数(copies/g)=[拷贝数(copies/ μL) \times 基因组 DNA 体积]/样本抽提重量。利用 Excel 软件绘制 4 个柱形图, 显示不同养殖模式下采集样本中唇形后口虫 DNA 的载量。使用 SPSS Statistics 25 软件对同种养殖模式单个位点中相同单位的样本进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 采用 LSD 和 Duncan 法进行多重比较, 检验其是否存在显著性差异, 相关性分析采用双变量 Person 检验(若 $P<0.05$ 则表示差异有统计学意义)。根据系统各部分唇形后口虫载量与呼吸树内寄生唇形后口虫量的相关性推测唇形后口虫的传播途径。

2 结果

2.1 重组质粒的构建与鉴定结果

基于凝胶电泳结果条带的特异性和亮度综合判断, 最终选择 H8-1F 和 H8-1R (表 2)作为用于建立 SYBR Green I RT-qPCR 检测方法的引物, $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为退火温度。利用 H8-1F 和 H8-1R 对重组质粒进行 RT-qPCR 扩增, 经过 1%琼脂糖凝胶电泳验证产物,

表 1 用于唇形后口虫检测的样品来源
Tab.1 Samples information table for *B. labialis* detection

模式 Culture pattern	编号 Number	位点 Location	养殖阶段 Culture stage	刺参体重 Sea cucumber weight/g	采样时间 Time for sampling	采集的样品类型 Sample type
池塘 Pond	P1	山东省青岛市即墨区	养成 Grow-out	30~80	2023-10	水样、泥样
	P2	辽宁省锦州市凌海市	养成 Grow-out	30~116	2023-11	水样、泥样、配合饲料
	P3	山东省青岛市黄岛区	养成 Grow-out	6~21	2023-12	水样、泥样
工厂化 Factory	I1	山东省青岛市黄岛区	育苗 Seed production	0.1~1.5	2023-10	水源水、车间用处理水、鲜海泥、投喂的预制饲料
	I2	山东省青岛市黄岛区	育苗 Seed production	0.1~2.0	2023-12	水源水、车间用处理水、鲜海泥、投喂的预制饲料
	I3	山东省烟台市莱州市	养成 Grow-out	40~70	2023-12	水样、泥样、配合饲料、投喂的预制饲料
网箱 Net cage	N1	山东省烟台市芝罘区	养成 Grow-out	25~50	2023-12	水样、网衣附着物
	N2	山东省威海市荣成区	养成 Grow-out	50~80	2023-12	水样、网衣附着物、配合饲料
吊笼 Cage	C1	福建省宁德市霞浦县 溪南镇东安海域	养成 Grow-out	50~80	2024-01	水样、吊笼附着物、海带原料
	C2	福建省宁德市霞浦县 溪南镇沙湾海域	养成 Grow-out	50~80	2024-01	水样、吊笼附着物、海带原料
	C3	福建省宁德市霞浦县 下浒镇雷江海域	养成 Grow-out	50~80	2024-01	水样、吊笼附着物、海带原料、混合粘性饲料

表 2 用于唇形后口虫 RT-qPCR 检测的引物序列
Tab.2 Primers for detection of *B. labialis* using RT-qPCR detection

引物名称 Primer name	序列 Primer sequence (5'~3')	目的基因大小 Target gene size/bp
H8-1F	5'-GGTGGGCAACCTGGTACATA-3'	105
H8-1R	5'-GGGAAGTTGTGCTAATGGAGGA-3'	

出现约为 100 bp 的条带(图 1),与预期相符。重组质粒经过测序后结果比对正确,证明成功构建了质粒标准品。质粒 DNA 提取试剂盒提取的重组质粒经超微量分光光度计测得质量浓度为 90.71 ng/ μ L,根据公式计算获得重组质粒拷贝数为 4.05×10^{10} copies/ μ L。

2.2 RT-qPCR 体系的建立

通过对比不同引物浓度下相应模板扩增结果可以看出,在 62 $^{\circ}$ C 退火温度下,引物 H8-1F 和 H8-1R 在反应体系中的最佳浓度为 0.2 μ mol/L,此浓度下的平均 C_t 值最小(图 2)。20 μ L RT-qPCR 体系中包含 2 \times Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L,终浓度为 0.2 μ mol/L 的 H8-1F 和 H8-1R 各 0.4 μ L,质粒模板 1.0 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。确定 SYBR Green I RT-qPCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

2.3 标准曲线的建立

以 $4.05\times10^0\sim4.05\times10^9$ copies/ μ L 10 个浓度梯度的重组质粒标准品为模板,根据已建立的扩增体系与最佳反应条件进行 RT-qPCR 扩增,并以质粒标准品拷贝数的对数值为横坐标,以 C_t 值为纵坐标,构建 SYBR Green I RT-qPCR 标准曲线。应用 QuantStudio™ Design and Analysis Software Version 1.5.1 软件分析结果,获得相应的荧光定量标准曲线和熔解曲线(图 3),质粒标准模板在 $4.05\times10^1\sim4.05\times10^9$ copies/ μ L 范围内有明显扩增,标准曲线的线性关系式为 $y=-3.272x+36.152$,相关系数 $R^2=0.997$,表明重组质粒拷贝数对数值与 C_t 值之间呈良好的线性关系,9 个浓度梯度的重组质粒标准品的 T_m 值均为 76.9 $^{\circ}$ C 左右,熔解曲线呈现单一峰,表明无引物二聚体或非特异性扩增。

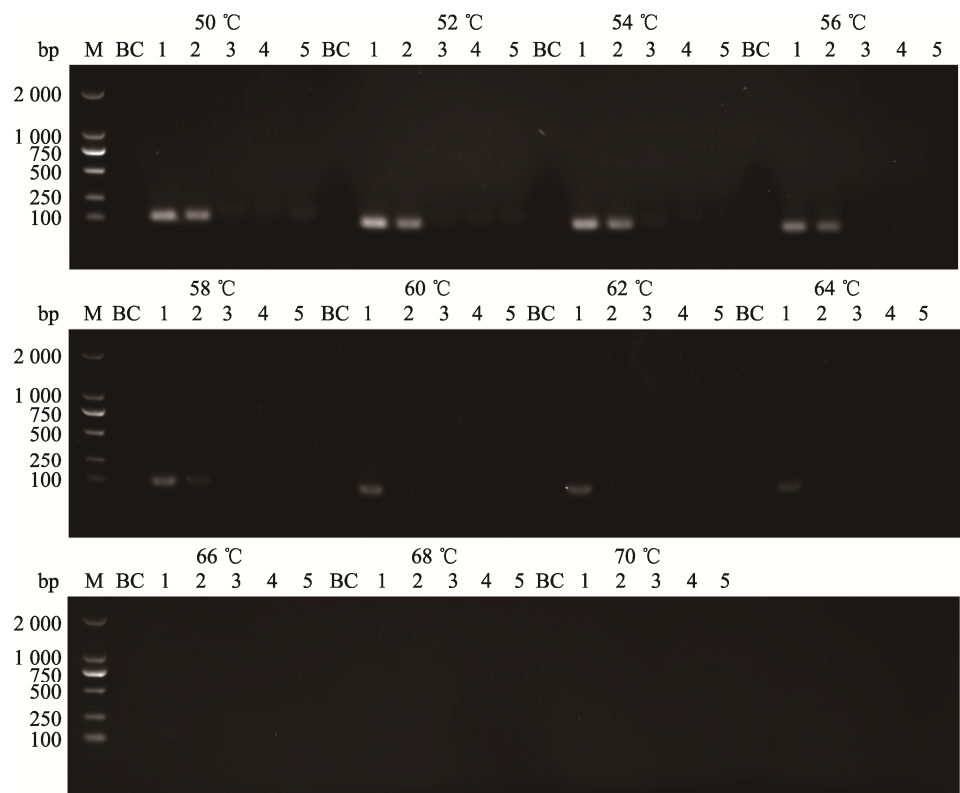


图 1 唇形后口虫检测用 PCR 退火温度优化结果

Fig.1 Optimization results of annealing temperature for PCR detection of *B. labialis*

M: DNA 相对分子量标准; BC: 空白对照; 1: 4.05×10^7 copies/ μL 重组质粒标准品; 2: 海洋尾丝虫;
3: 贪食纤口虫; 4: 僧帽肾形虫; 5: 多小核草履虫。
M: DL2000; BC: Blank control; 1: 4.05×10^7 copies/ μL recombinant plasmid standard; 2: *Uronema* sp.;
3: *Chaenea* sp.; 4: *Colpoda* sp.; 5: *Paramecium* sp..

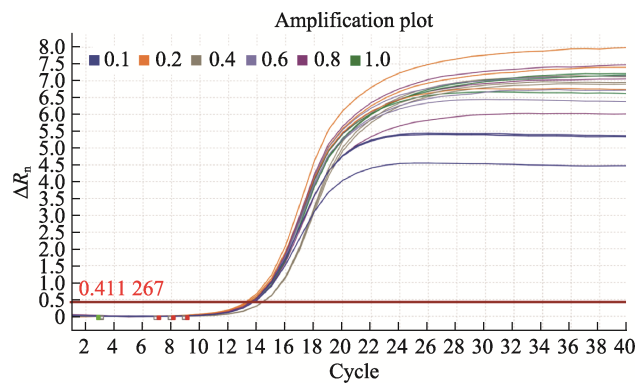


图 2 唇形后口虫检测用 RT-qPCR 引物浓度优化结果
Fig.2 Optimization results of primer concentration for RT-qPCR detection of *B. labialis*

2.4 灵敏度实验

以 $4.05\times10^0\sim4.05\times10^9$ copies/ μL 10 个浓度梯度的重组质粒标准品为模板, 进行 SYBR Green I RT-qPCR 检测, 以 $4.05\times10^1\sim4.05\times10^8$ copies/ μL 8 个浓度梯度的重组质粒标准品为模板进行普通 PCR 检

测。结果显示, 本研究建立的 SYBR Green I RT-qPCR 的最低可检测到的重组质粒标准品拷贝数为 40.5 copies/ μL (图 4), 普通 PCR 最低可检测到的标准品质粒拷贝数为 4.05×10^4 copies/ μL (图 5), 本研究的检测灵敏度达到了普通 PCR 的 1 000 倍。

2.5 特异性检测

利用已建立的 SYBR Green I RT-qPCR 方法, 分别以海洋尾丝虫、贪食纤口虫、僧帽肾形虫、多小核草履虫的 DNA、唇形后口虫质粒标准品(阳性对照)、刺参体壁基因组 DNA(阴性对照)和 ddH₂O (空白对照)为模板验证本检测方法的特异性。结果显示(图 6), 质粒标准品(阳性对照)检测结果为阳性, 海洋尾丝虫、贪食纤口虫、僧帽肾形虫、多小核草履虫的 DNA、刺参体壁基因组 DNA(阴性对照)和 ddH₂O(空白对照)均未见特异性扩增, 表明已建立检测方法的特异性较好。

2.6 重复性实验

分别选取浓度为 4.05×10^3 、 4.05×10^5 、 $4.05\times$

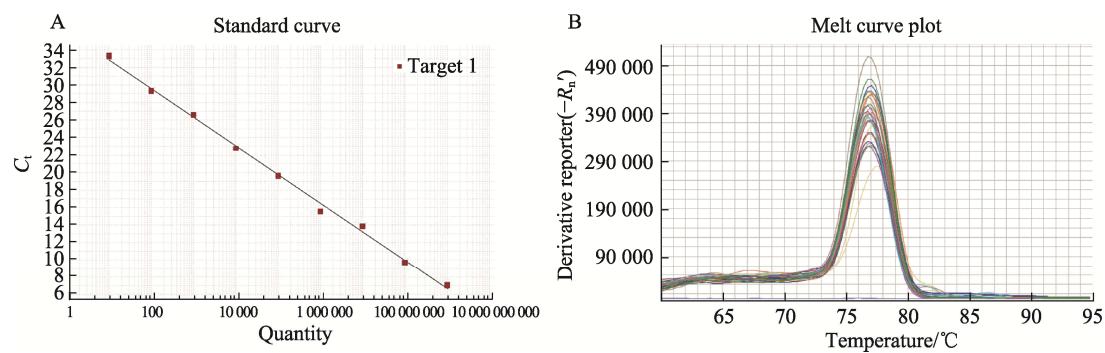


图 3 唇形后口虫检测用 SYBR Green I RT-qPCR 标准曲线(A)与溶解曲线(B)
Fig.3 Standard curve (A) and melting curve (B) of SYBR Green I RT-qPCR detection of *B. labialis*

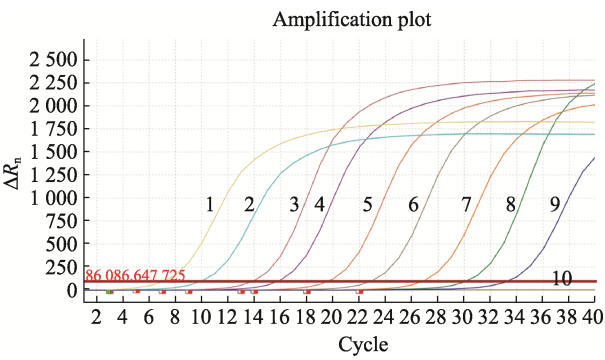


图 4 唇形后口虫检测用荧光定量 PCR 灵敏度实验结果
Fig.4 Sensitivity test results of RT-qPCR detection of *B. labialis*
1~10: $4.05\times10^9\sim4.05\times10^0$ copies/ μL .

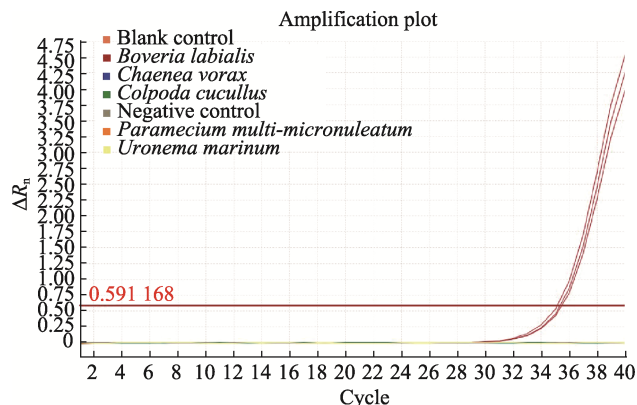


图 6 唇形后口虫检测用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 的特异性检测
Fig.6 Specific detection of SYBR Green I RT-qPCR detection of *B. labialis*

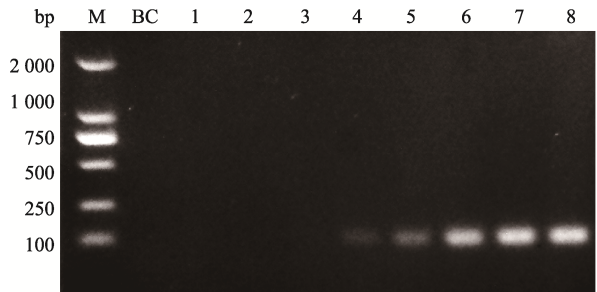


图 5 唇形后口虫检测用普通 PCR 灵敏度实验结果
Fig.5 Sensitivity test results of PCR detection of *B. labialis*

M: DNA 相对分子量标准; BC: 空白对照;
1~8: $4.05\times10^1\sim4.05\times10^8$ copies/ μL 。
M: DL2000; BC: Blank control; 1~8: $4.05\times10^1\sim4.05\times10^8$ copies/ μL .

10^7 copies/ μL 的重组质粒标准品为模板,采用本研究建立的方法进行批内和批间重复性实验,通过计算批内和批间 C_t 值的平均值、标准差和变异系数(coefficient of variation, CV)评价方法的重复性。结果显示(表 3),各浓度的组内 C_t 值均一性较高,批内实验 CV 值为 0.32%~0.82%,批间实验 CV 值为 0.40%~0.88%,CV 值均较低,表明该方法具有良好的重复性,在保证检测结果准确的前提下,可应用于大批量的样品检测。

2.7 临床样品检测

采集刺参不同养殖区和不同养殖模式下养殖系统各部分样品进行 RT-qPCR 检测,采集的刺参样品进行镜检,结果如表 4、图 7 所示,池塘养殖模式中 3 个

表 3 唇形后口虫检测用 SYBR Green I RT-qPCR 组内及组间重复性检测
Tab.3 Inter-batch and intra-batch repeatability of SYBR Green I RT-qPCR detection of *B. labialis*

重组质粒标准品 Recombinant plasmid standard (copies/ μL)		批内重复性实验(C_i 值)		批间重复性实验(C_i 值)	
		Intra-assay reproducibility		Inter-assay reproducibility	
		$\bar{X} \pm \text{SD}$	CV/%	$\bar{X} \pm \text{SD}$	CV/%
1	4.05×10^7	13.845 \pm 0.103	0.74	13.785 \pm 0.121	0.88
2	4.05×10^5	19.650 \pm 0.161	0.82	19.576 \pm 0.153	0.78
3	4.05×10^3	25.645 \pm 0.082	0.32	25.972 \pm 0.104	0.40

表 4 临床样品唇形后口虫镜检与 RT-qPCR 检测结果

Tab.4 Results of microscopic examination and RT-qPCR detection of *B. labialis* in different culture patterns

模式 Culture pattern	编号 Number	位点 Location	刺参内寄生唇 形后口虫量 Degree of infection	水样 Sea water sample/ (copies/L)	泥样/附着物 Soil sample/ Attachment (copies/g)	饲料 Feed sample/ (copies/g)
池塘 Pond	P1	山东省青岛市即墨区	+++	372.48±23.21	416.88±3.48	—
			++	331.71±22.94	277.60±13.60	
			+++	377.75±12.24	503.25±13.96	
	P2	辽宁省锦州市凌海市	++	334.66±6.02	341.59±15.25	0.00±0.00 (配合饲料)
			+	304.65±8.03	153.78±29.13	
			+	296.50±8.62	50.68±16.24	
	P3	山东省青岛市黄岛区	+++	544.35±58.93	320.83±19.38	—
			+++	726.01±18.44	426.81±6.80	
			+++	809.84±9.33	730.32±3.08	
工厂化 Factory	I1	山东省青岛市黄岛区(育苗车间)	—	0.00±0.00	0.00±0.00	465.11±8.35 (预制饲料)
			—	0.00±0.00	0.00±0.00	
			—	0.00±0.00	0.00±0.00	
				101.66±15.35 (水源水样)	504.62±16.67 (鲜海泥)	
	I2	山东省青岛市黄岛区(育苗车间)	—	0.00±0.00	0.00±0.00	471.45±7.19 (预制饲料)
			—	0.00±0.00	0.00±0.00	
			—	0.00±0.00	0.00±0.00	
				117.53±12.69 (水源水样)	498.33±24.62 (鲜海泥)	
	I3	山东省烟台市莱州市(养成车间)	+	186.94±14.01	157.15±9.15	0.00±0.00 (配合饲料) 370.42±20.90 (预制饲料)
			+	117.69±7.66	56.51±2.20	
			+	273.47±1.54	381.97±17.70	
网箱 Net cage	N1	山东省烟台市芝罘区	—	408.44±7.16	0.00±0.00	—
			—	282.80±10.16	0.00±0.00	
			+	412.31±8.50	0.00±0.00	
	N2	山东省威海市荣成区	+++	406.16±2.67	434.71±2.13	0.00±0.00 (配合饲料)
			+++	392.25±5.88	535.21±2.38	
			+++	422.25±13.15	642.30±16.88	
吊笼 Cage	C1	福建省宁德市霞浦县溪南镇东安海域	+++	446.53±5.15	645.65±4.29	0.00±0.00 (海带原料)
			+++	453.85±11.45	662.73±18.00	
			+++	443.79±2.37	577.71±17.36	
	C2	福建省宁德市霞浦县溪南镇沙湾海域	+++	378.00±1.56	652.26±7.72	0.00±0.00 (海带原料)
			+++	389.14±2.41	621.52±20.77	
			+++	372.49±29.73	674.71±5.93	
	C3	福建省宁德市霞浦县下浒镇雷江海域	+++	417.88±5.56	631.96±21.65	0.00±0.00 (海带原料) 94.80±4.93 (混合粘性饲料)
			+++	424.52±8.86	595.05±18.53	
			+++	393.46±2.01	613.51±17.31	

注：“—”表示采样时该位点刺参未投喂饲料；未感染为“—”，感染 1~200 个为轻度，记为“+”；感染 200~500 个为中度，计为“++”；感染 500 个以上为重度，计为“+++”；空格为该位点未采集刺参样品。

Note: “—” indicates that *A. japonicus* was not being fed feed at the time of sampling; infection intensity is categorized as: “—” for no infection, “+” for light infection (1~200 parasites), “++” for moderate infection (200~500 parasites), and “+++” for severe infection (>500 parasites); the blank cell indicates that no sample was collected at the site.

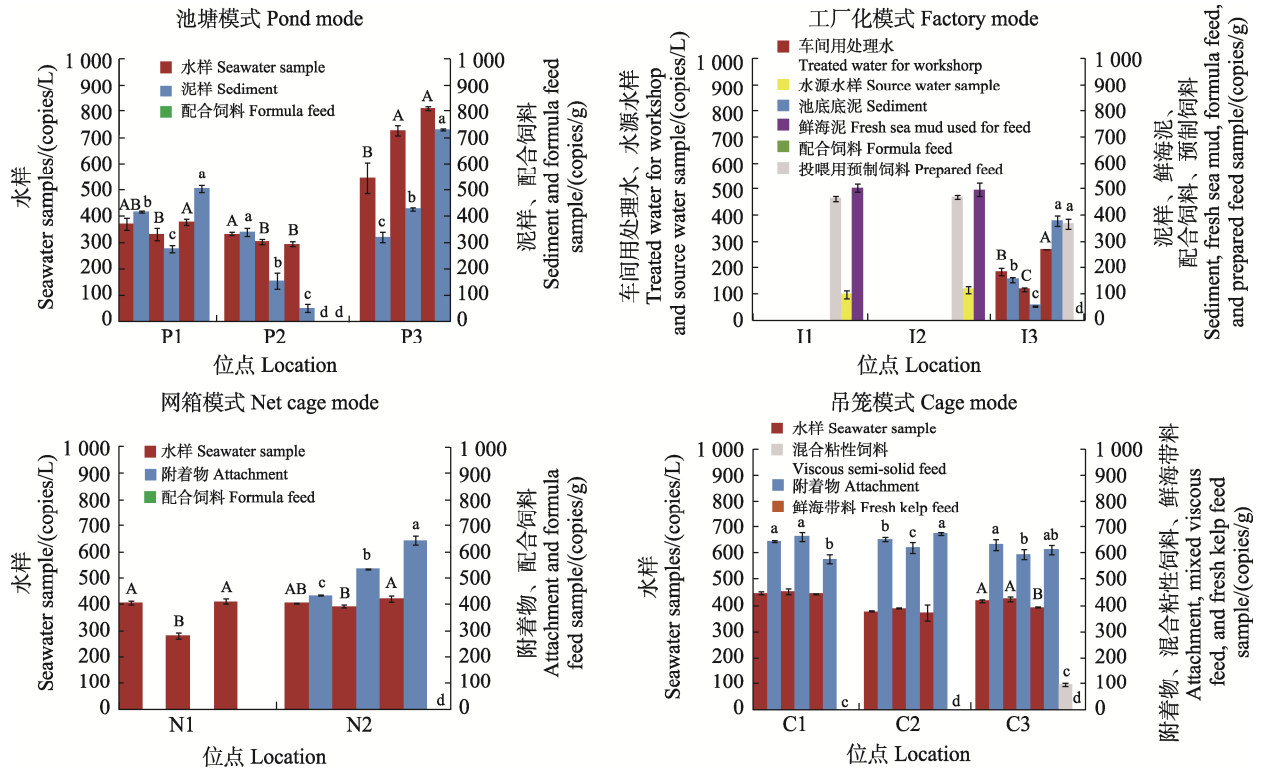


图 7 不同刺参养殖模式环境样品 RT-qPCR 检测结果

Fig.7 RT-qPCR detection results of environmental samples collected from different culture pattern

位点的海水、底泥中均有目的基因检出,海水目标基因拷贝数值为 296.50~809.84 copies/L,底泥目标基因拷贝数值为 50.68~730.32 copies/g,池塘模式下仅有 P2 位点进行饲料投喂,而在投喂的配合饲料粉末原料中未检出目的基因。工厂化养殖模式中,目的基因在 I1 和 I2 位点水源的水样、鲜海泥、投喂的预制饲料和 I3 位点成参池采集的样品中检出, I1 和 I2 位点水源的鲜海泥与投喂的预制饲料中唇形后口虫 DNA 载量无显著性差异,刺参呼吸树未感染唇形后口虫; I3 位点 3 个成参池中海水目标基因拷贝数值为 117.69~273.47 copies/L,底泥目标基因拷贝数值为 56.51~381.97 copies/g,预制饲料与第 3 个养殖池底泥的目标基因拷贝数值无显著性差异。网箱养殖模式中, N1 和 N2 两个位点的海水目标基因拷贝数值为 282.80~422.25 copies/L, N2 位点附着物目标基因拷贝数值为 434.71~642.30 copies/g, N1 位点附着物和 N2 位点投喂的配合饲料未检出目的基因。吊笼养殖模式中, 3 个位点海水目标基因拷贝数值为 372.49~453.85 copies/L, 附着物目标基因拷贝数值为 577.71~674.71 copies/g, 投喂的海带原料均未检出目标基因。4 种模式中,除 N1 位点网箱附着物外,成参养殖环境的海水、底泥和附着物中均检出目的基因,

而配合饲料与海带原料无检出。

海水中唇形后口虫 DNA 载量与刺参体内唇形后口虫量呈中度正相关($R=0.563$, $P<0.05$),底泥和附着物样品中的唇形后口虫 DNA 载量与刺参体内唇形后口虫量呈高度正相关($R=0.931$, $P<0.05$),推测鲜海泥是唇形后口虫传播的重要载体。

3 讨论

目前已经报道的刺参主要寄生虫包括原生动物(Protozoa)、环节动物(Annelida)、扁形动物(Platyhelminthes)、软体动物(Mollusca)、节肢动物(Arthropoda)和纤毛虫(Ciliophora)(战文斌等, 1993; 荣小军等, 2009)。后口虫隶属于盾纤类纤毛虫,我国关于后口虫的报道主要集中在刺参养殖领域,徐奎栋等(2000)在栉江鲷(*Pinna pectinata*)中也有报道,国内外对于刺参唇形后口虫的研究主要集中在形态观察与鉴定、培养和药物筛选等方面(Long *et al*, 2006; 荣小军, 2005)。本实验室采集的刺参样品的镜检结果显示,在山东、辽宁、福建等刺参主养区的 25 个养殖场的样品中均观察到有唇形后口虫寄生。尚未发现唇形后口虫感染直接导致刺参死亡的情况(王印庚等, 2005; 张春云等, 2006)。大量唇形后口虫寄生在呼吸树中导

致的刺参排脏反应,致使刺参生长缓慢,免疫力下降,进而易感细菌性疾病,给刺参养殖业带来巨大损失,需要引起高度重视。但鉴于尚无便捷可靠的虫体检测方法,对于该寄生虫的传播途径研究无法开展。

RT-qPCR 因其全封闭扩增、灵敏度高、重复性好、特异性强等优点,成为近年来病原检测的主流方法之一。其中,SYBR Green I 荧光染料法摒弃价格高昂的探针,降低实验成本,简化操作过程,适用产业的快速检测。储旭等(2023)建立了一种灵敏度高、实用性强的青蟹呼肠孤病毒(MCRV)RT-qPCR 检测方法,既可用于微创条件下无 MCRV 种蟹筛选,也能满足病原感染相关研究的需要。徐媛媛等(2023)建立的5种主要海水养殖病原菌多重微流控 RT-qPCR 快速检测技术与李昊等(2023)建立的对虾肝胰腺坏死病副溶血弧菌双重微流控 RT-qPCR 检测的方法更符合养殖基层的现场快速检测需求,为及早认知疾病发生风险和病害精准防控提供了新的技术手段与理论支撑。在纤毛虫实时定量检测方面,曹泽艺等(2024)建立了多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*) PCR 和 SYBR Green I RT-qPCR 检测方法,由于在适宜水环境与温度条件下,多子小瓜虫仅需约1~2周便可爆发性繁殖,迅速导致鱼体大面积感染及死亡,而该技术高效检测出处于潜在感染状态的鱼类及其养殖环境中的多子小瓜虫,针对淡水养殖中该疾病的早期诊断与病原体鉴定均具有实用价值。鉴于唇形后口虫生活史未知,本研究建立了 SYBR Green I RT-qPCR 技术,对养殖环境样本(如海水、底泥、附着物以及不同类型饲料)进行全面检测,同时结合刺参养殖模式及众多因素进行探讨,以期进一步探究其可能存在的传播途径。

本研究建立的 RT-qPCR 检测方法在引物筛选过程中,仅有一对引物能扩增出唇形后口虫 DNA 目的片段,但对于海洋尾丝虫、贪食纤口虫、僧帽肾形虫以及多小核草履虫的 DNA 产生了非特异性扩增,调整退火温度后,凝胶电泳条带分析显示最低退火温度为 62℃时,该引物未出现非特异性扩增,RT-qPCR 验证揭示,该温度可作为反应体系中最佳退火温度。灵敏度实验结果显示,RT-qPCR 的灵敏度达到了普通 PCR 的 1 000 倍。以上结果印证了所构建唇形后口虫 SYBR Green I RT-qPCR 检测方法的高特异性和高灵敏度。

本研究分析了 4 种刺参养殖模式的环境样品和饲料样品,涉及刺参的主要养殖模式和多种环境因子。镜检和 RT-qPCR 检测结果显示,开放性养殖环境中,海水中唇形后口虫 DNA 载量在 282.80~453.85 copies/L 范围内,其水环境中存在无唇形后口虫寄生的刺参,

而附着物样品的唇形后口虫 DNA 载量与刺参体内唇形后口虫量呈高度正相关($R=0.931$)。据此分析,唇形后口虫可能从附着物中释放从而进入海水环境,刺参呼吸树中央腔连接着泄殖腔,唇形后口虫则通过泄殖腔收缩舒张的作用,被海水输送至呼吸树中央腔内进行生长、发育和繁殖,最终在呼吸树内成功定殖。独立的养殖环境中,工厂化养殖(育苗)模式的 I1 和 I2 位点水源水经过砂滤池过滤与二氧化氯消毒进入养殖池,池中水样未检出唇形后口虫的目的片段,而预制饲料在添加大量鲜海泥的情况下,幼参的呼吸树中并未发现有唇形后口虫寄生,底泥中同样未检出目的片段,转移至 P3 位点池塘后养成成参的呼吸树中观察到大量唇形后口虫。由此推测,稚参和幼参呼吸树中的内环境不适宜唇形后口虫寄生,可能与其呼吸树的微环境、营养成分或者空间结构等因素有关,即使养殖环境中加入带有唇形后口虫包裹的鲜海泥,唇形后口虫也难以在小规格刺参呼吸树中完成定殖。刘彤等(2012)的调查结果与本研究临床样品检测分析结果基本一致,其研究表明,育苗室养殖池中的海参无论规格大小均无后口虫寄生,94%的室外池塘中海参被后口虫感染,且育苗室水源海域的海参存在感染后口虫的情况。推测,砂滤与清塘可以有效过滤或杀灭后口虫,后口虫可以通过换水途径进入池塘,进而感染海参。

综上所述,本研究成功建立了一种特异性强、灵敏度高、重复性好的寄生性唇形后口虫 SYBR Green I RT-qPCR 检测方法,可用于唇形后口虫的快速检测,推测湿海泥为唇形后口虫的重要传播途径,本研究结果为该虫的防控奠定了研究基础。

参 考 文 献

- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2023. Beijing: China Agriculture Press, 2023 [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. 2023 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2023]
- CAO Z Y, ZHOU Q J, CHEN K, *et al.* Establishment and application of PCR and SYBR Green real-time fluorescence quantitative PCR assays for detection of *Ichthyophthirius multifiliis*. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(10): 163–170 [曹泽艺, 周庆杰, 陈凯, 等. 多子小瓜虫 PCR 和 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用. 水产学报, 2024, 48(10): 163–170]
- CHU X, FANG W H, LIU Z Q, *et al.* A new SYBR green qRT-PCR diagnostic method for screening MCRV-free

- breeding mud crabs. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(5): 172–181 [储旭, 房文红, 刘志强, 等. 一种筛选无青蟹呼肠孤病毒(MCRV)种蟹的荧光定量 RT-PCR 检测方法及其应用. *渔业科学进展*, 2023, 44(5): 172–181]
- IKEDA I, OZAKI Y. Notes on a New *Boveria* Species, *Boveria labialis* n. sp. *Journal of the College of Science. Tokyo Imperial University*, 1918, 40: 1–25
- LI H, ZHANG M Y, YU Y X, *et al.* Establishment and application of dual microfluidic fluorescent quantitative PCR for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp hepatopancreatic necrosis. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(3): 235–244 [李昊, 张铭洋, 于永翔, 等. 对虾肝胰腺坏死病副溶血弧菌双重微流控荧光定量 PCR 快速检测技术的建立与应用. *渔业科学进展*, 2023, 44(3): 235–244]
- LIAO M J, WANG Y G, LI B, *et al.* Present status and existing problem for sea cucumber culture industry in China and discussion on its counter measures (Continued). *Scientific Fish Farming*, 2021(3): 26–27 [廖梅杰, 王印庚, 李彬, 等. 我国海参养殖产业现状、存在问题及对策探讨(中). *科学养鱼*, 2021(3): 26–27]
- LIU T, LI K, SONG X Y, *et al.* Preliminary investigation on parasitic *Boveria labialis* in cultured sea cucumber in Dalian. *Shandong Fisheries*, 2012, 29(4): 16–17 [刘彤, 李坤, 宋晓阳, 等. 大连地区养殖海参体内寄生性后口虫的初步调查. *齐鲁渔业*, 2012, 29(4): 16–17]
- LONG H A, SONG W B, CHEN J X, *et al.* Studies on an endoparasitic ciliate *Boveria labialis* (Protozoa: Ciliophora) from the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2006, 86(4): 823–828
- NELSON T C. On *Boveria teredinidi* sp. nov. from gills of the *Teredo* and *Bankia*. *Anatomical Record*, 1923, 26: 356
- RONG X J. Epidemiological and histopathological studies of main diseases of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* and its parasitic etiology. Master's Thesis of Ocean University of China, 2005 [荣小军. 养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)主要疾病的流行病学和组织病理学研究以及寄生虫病原学初探. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2005]
- RONG X J, LIAO M J, YANG Z, *et al.* A Survey of Studies on parasitic diseases of sea cucumber abroad. *Fisheries Science & Technology Information*, 2009, 36(1): 30–33 [荣小军, 廖梅杰, 杨志, 等. 国外海参寄生虫病研究概况. *水产科技情报*, 2009, 36(1): 30–33]
- STEVENS N M. Studies on ciliate infusoria. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 1901, 3: 1–42
- WANG Y G, RONG X J, LIAO M J, *et al.* Sea cucumber culture and disease control technology. Beijing: China Agriculture Press, 2014 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 中国农业出版社, 2014]
- WANG Y G, RONG X J, ZHANG C Y, *et al.* Main diseases of cultured *Apostichopus japonicus*: Prevention and treatment. *Marine Sciences*, 2005, 29(3): 1–7 [王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖海参主要疾病及防治技术. *海洋科学*, 2005, 29(3): 1–7]
- XU K D, SONG W B. Studies on pathogenetic ciliates from marine molluscs III. Thigmotrichine ciliates (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatida). *Journal of Qingdao Ocean University*, 2000, 30(2): 230–236 [徐奎栋, 宋微波. 海洋贝类的危害性纤毛虫研究III. 触毛亚目盾纤类纤毛虫. *青岛海洋大学学报*, 2000, 30(2): 230–236]
- XU Y Y, YU Y X, WANG Y G, *et al.* Establishment of multiple microfluidic fluorescence quantitative PCR detection technology for five main mariculture bacterial pathogens. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(3): 222–234 [徐媛媛, 于永翔, 王印庚, 等. 5 种主要海水养殖病原菌多重微流控荧光定量 PCR 快速检测技术的建立. *渔业科学进展*, 2023, 44(3): 222–234]
- ZHANG C Y, WANG Y G, RONG X J. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(1): 118–123 [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. *水产学报*, 2006, 30(1): 118–123]
- ZHAN W B, YU K K. Diseases of sea cucumbers and sea urchins. *Transaction of Oceanology and Limnology*, 1993, 15(1): 95–101 [战文斌, 俞开康. 海参和海胆的疾病. *海洋湖沼通报*, 1993, 15(1): 95–101]
- ZHAN Z F, LI J, XU K D. Detection and quantification of two parasitic ciliates *Boveria labialis* and *Boveria subcylindrica* (Ciliophora: Scuticociliatia) by fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2018, 65(4): 440–447

(编辑 马瑾艳)

SYBR Green I Real-Time Fluorescence Quantitative PCR for Parasitic *Boveria labialis* Identification from the Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

HAO Wenyue^{1,2}, WANG Jinjin^{2,3}, GE Jianlong^{2,3}, LI Bin^{2,3}, WANG Yingeng^{2,3}, LIAO Meijie^{2,3}, RONG Xiaojun^{2,3①}, ZHAO Hongjing², JIANG Minqi², ZHAO Wenguang², NIU Licheng², PAN Jiao⁴

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods,

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

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,

Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China;

4. Institute of Evolution and Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract *Boveria* disease affects the aquaculture efficiency of sea cucumbers. *Boveria labialis* causes *Boveria* disease in *Apostichopus japonicus*. Owing to the lack of rapid and accurate detection methods, analyzing the transmission route of the pathogen remains complicated. Based on the partial mitochondrial genome sequence of *B. labialis* obtained using sequencing, primers were designed to amplify *nad10* and a SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR detection method was established. The concentration of *B. labialis* in different culture areas and different culture modes of *A. japonicus* was detected and analyzed. The standard curve established by the designed primers had a good linear relationship in the range of the plasmid standard of 4.05×10^1 – 4.05×10^9 copies/ μ L, with a reliability (R^2) of 0.997. The melting curve showed a single peak, without primer dimers or nonspecific amplification. The minimum detection limit of sensitivity test was 40.5 copies/ μ L. The designed primers showed specific amplification for *B. labialis* only and exhibited no cross reaction to *Uronema* sp., *chaenea* sp., *Colpoda* sp. and *Paramecium* sp. In the repeatability test, the homogeneity of C_t values in the intra-assay and inter-assay of each concentration was high, the CV values of intra- and inter-assay tests were 0.32%–0.82% and 0.40%–0.88%, respectively, indicating good stability. This method was used to detect environmental samples and feeds in different culture areas of four kinds of *A. japonicus* culture modes. Combined with the comparative analysis of microscopic examination results, there was a moderate positive correlation ($R=0.563$) between the DNA load of *B. labialis* in sea water and the infection degree of *B. labialis* in *A. japonicus*. A high positive correlation ($R=0.931$) was found between the DNA load of *B. labialis* in sediment and attachment samples and the infection degree of *B. labialis* in *A. japonicus*. Fresh sea mud was an important carrier for *B. labialis* transmission. The relevant research results provide reference for the rapid detection, transmission route analysis, and *B. labialis* prevention and control.

Key words *Apostichopus japonicus*; Parasitic disease; *Boveria labialis*; Real-time fluorescent quantitative PCR detection; Transmission route

① Corresponding author: RONG Xiaojun, Email: rongxj@ysfri.ac.cn