

## 环介导恒温扩增技术检测血卵涡鞭虫

施慧<sup>1</sup>, 张静<sup>2</sup>, 谢建军<sup>1</sup>, 许文军<sup>1</sup>, 徐汉祥<sup>1</sup>, 史海东<sup>3</sup>

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江海洋学院 海洋与渔业研究所, 浙江 舟山 316100; 2. 浙江海洋学院, 浙江 舟山 316100; 3. 浙江省普陀区海洋与渔业局, 浙江 舟山 316100)

**摘要:** 血卵涡鞭虫病是海水甲壳类的重要寄生虫病, 其流行范围广、死亡率高、危害非常严重。本研究根据 GenBank 中已登录的血卵涡鞭虫 (*Hematodinium* sp.) ITS1 序列设计了 1 套引物, 该引物可识别目标基因中 6 个不同区段。以此套引物建立了一种基于环介导恒温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 的血卵涡鞭虫病诊断方法。特异性试验结果表明, 该套引物对血卵涡鞭虫检测具有较高的特异性, 能有效检出血卵涡鞭虫。敏感度试验结果表明, 该 LAMP 技术的灵敏度比常规 PCR 技术高 4 个数量级。分别运用 LAMP 和常规 PCR 技术对 25 份临床疑似病例进行检测, LAMP 方法共检出感染病例 25 份, 常规 PCR 检出感染病例 23 份。该技术能在 65 °C 恒温条件下 45 ~ 60 min 完成目的 DNA 的扩增, 可直接通过肉眼观察反应产物中是否产生白色沉淀或经 SYBR Green I 染色后通过颜色变化、扩增产物的琼脂糖凝胶电泳来定性判断结果, 这将为血卵涡鞭虫病的临床诊断提供一种更加简便、快速、实用的方法。[ 中国水产科学, 2010, 17(5): 1028-1035 ]

**关键词:** 血卵涡鞭虫; 检测技术; ITS1 序列; 环介导恒温扩增

**中图分类号:** S945

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2010)05-1028-08

环介导恒温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是日本学者 Notomi 等<sup>[1]</sup>于 2000 年发明的一种基因恒温扩增新技术, 反应依赖于具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶, 通过使用 1 套 (4 条) 特异性引物分别识别靶基因的 6 个特定区域, 通过链置换反应和 2 个环介导实现等温条件下基因快速扩增。该方法特异性强、灵敏度高、操作简便易行、对设备要求低, 目前已广泛应用于人类及动植物细菌、病毒、寄生虫、真菌等病原体的检测。

血卵涡鞭虫 (*Hematodinium* sp.) 是一类寄生性的原生动物, 其寄生范围广, 是引起三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 等经济甲壳类死亡的重要病原, 给梭子蟹、青蟹的养殖业带来了巨大的经济损失<sup>[2-5]</sup>。该虫体对宿主感染时

间长, 流行范围广, 死亡率高, 在国内外已引起广泛关注。发病蟹甲壳变色, 肉色发白, 味发苦, 蟹的体液内充满了虫体, 但由于该原虫和蟹类血淋巴细胞形态很难区分, 普通显微镜检诊断较难。目前国外已应用聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR)、酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 以及间接荧光抗体检测技术 (Indirect fluorescent antibody technique, IFAT) 等多种现代生物学诊断技术对该类寄生虫进行检测<sup>[6-8]</sup>; 国内也已建立 PCR、IFAT 检测方法<sup>[9-11]</sup>, 但这些技术对仪器设备要求比较高, 操作较为繁琐, 检测时间较长 (一般都耗时 5 ~ 6 h), 局限性较强, 尤其不适合基层推广使用。本研究根据 GenBank 中已发表的血卵涡鞭虫 ITS1 序列设计了 1 套引物 (4 条), 建立了针对血卵涡鞭虫的

收稿日期: 2009-08-17; 修订日期: 2010-04-01.

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y3080181, Y3080317, Y3090402); 浙江省科技厅科研院所公共科技服务项目 (2008F4003); 浙江省科技厅面上项目 (2009C32062); 浙江省海洋与海岛管理项目 [ 浙海渔汁 (2008) 130 号 ]。

作者简介: 施慧 (1978-), 女, 工程师, 硕士, 主要从事海水养殖病害的研究. Tel: 0580-3053386; E-mail: huishi2002@126.com

通讯作者: 许文军 (1971-), 男, 教授级高工, 从事海水养殖和疾病防控研究. E-mail: xwenjun@sina.com

LAMP检测方法,并且针对血卵涡鞭虫的普通PCR检测方法进行了对比研究,验证了LAMP技术检测血卵涡鞭虫的特异性和灵敏度。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 虫株与菌株

血卵涡鞭虫、三疣梭子蟹鞭毛虫,蟹源孢子虫、蟹源弧菌均由本实验收集、鉴定并保存;血卵涡鞭虫ITS1阳性重组质粒由本实验室构建并保存<sup>[3]</sup>;三疣梭子蟹为浙江省海洋水产研究所试验场人工养殖蟹。患病蟹为2009年采自舟山地区发病的人工养殖三疣梭子蟹。

#### 1.2 主要试剂

Bst DNA polymerase large fragment为New England Biolabs公司产品,DL2000、100 bp ladder、dNTP、Taq DNA聚合酶为大连宝生物工程有限公司成品;甜菜碱(Betaine)为Sigma公司产品;荧光染料SYBR Green I为厦门百维信生物科技有限公司产品;UNIQ-10柱式动物基因组DNA抽提试剂盒购于上海生工生物工程有限公司。

#### 1.3 DNA模板的制备

血卵涡鞭虫样本是本实验室保存的乙醇固定样,取100 μL固定样本,8 000 r/min离心2 min,加入470 μL

Tris-Cl溶解沉淀,加入25 μL 10%SDS和5 μL蛋白酶K(20 mg/mL)混匀;55 °C水浴中保温30 ~ 120 min,其间不断混匀;然后加入等体积酚/氯仿抽提1次,去上清加入等体积氯仿/异戊醇抽提1次,加入2倍体积的无水乙醇和1/10体积NaCl,置-20 °C放置30 min以上,12 000 r/min离心10 min,收集沉淀,75%乙醇洗涤1次,沉淀用适量TE或超纯水溶解。

蟹源微孢子虫、三疣梭子蟹鞭毛虫DNA样本按相同方法制备;蟹源弧菌DNA样本,采用煮沸法制备;三疣梭子蟹DNA样本,按动物基因组DNA抽提试剂盒介绍的方法提取;血卵涡鞭虫的ITS1重组质粒采用碱裂解法<sup>[12]</sup>提取;所有准备的DNA样本均于-20 °C保存备用。

#### 1.4 引物设计

根据GenBank公布的血卵涡鞭虫ITS1序列,采用LAMP引物在线设计软件Primer Explorer3(<http://venus.netlaboratory.com/partner/lamp/pev1.html>),设计了H-FIP、H-BIP、H-F3、H-B3 4条LAMP引物,引物序列见表1、图1。普通PCR引物序列为ITS1-F:5' -CTGATTACGTCCCTGCCCTT-3';ITS1-R:5' -GCATGTCGCTGCGTTCTTC-3',引物均由上海生工生物技术有限公司合成。

表1 血卵涡鞭虫ITS1 LAMP扩增的引物序列  
Tab. 1 Nucleotide sequence of LAMP primers for *Hematodinium* sp. ITS1

引物 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
H-F3	CAAACATTACCGTGAACCT
H-B3	GGGATGGAGGAGTTCAGTG
H-FIP(F1c+F2)	GCTGTAGTAACCAACACGCCG-TTTT-GCCATTAGCTACGACGACTA
H-BIP(B1c+B2)	ACCTGTCTCTTGCTGCTAGGAG-TTTT-TGTAACCACCCTACCCCTC

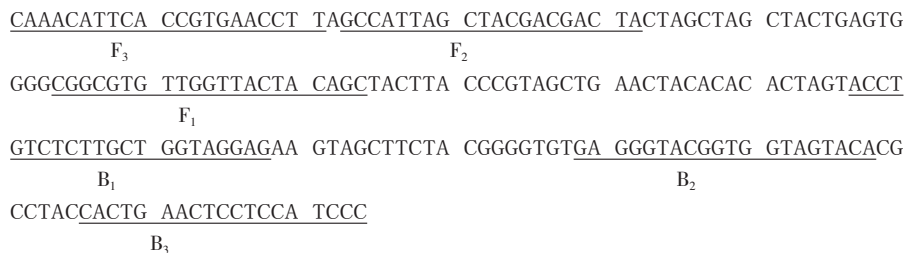


图1 用于外部引物(FIP和BIP)与内部引物(F3和B3)设计的部分ITS1序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of partial ITS1 gene and its primer inner(FIP and BIP) and outer(F3 and B3) primers for LAMP

### 1.5 LAMP扩增条件的确立

根据原创文献以及之后的引用文献,采用25  $\mu\text{L}$  LAMP反应体系,其中包含:0.8  $\mu\text{mol/L}$  FIP和BIP,0.2  $\mu\text{mol/L}$ 的F3和B3,1.6  $\mu\text{mol/L}$ 的dNTP,0.8 mol/L的甜菜碱,8 mmol/L的 $\text{MgSO}_4$ ,20 mmol/L的Tris-HCl (pH 8.8),10 mmol/L KCl、10 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,0.1% Triton X-100,1  $\mu\text{L}$ 的DNA模板,8 U Bst DNA聚合酶。反应混合物在65  $^\circ\text{C}$ 温浴60 min,最后80  $^\circ\text{C}$  10 min 终止反应,1.8%琼脂糖凝胶电泳。以Bst DNA聚合酶最佳反应温度65  $^\circ\text{C}$ 作为LAMP扩增温度,分别采用15 min、30 min、45 min、60 min、90 min作为反应时间,根据扩增效果确定适宜反应时间。

### 1.6 LAMP灵敏度验证

紫外分光光度计测得ITS1重组质粒原始浓度为1 ng/ $\mu\text{L}$ ,10倍梯度稀释,取各稀释度分别做为DNA模板,进行LAMP反应和常规PCR扩增反应,LAMP反应体系和反应条件同前;PCR反应为25  $\mu\text{L}$ 体系,含10 mol/L Tris-HCl (pH 8.3),50 mol/L KCl,1.5 mol/L  $\text{MgCl}_2$ ,0.2 mol/L dNTP,0.2  $\mu\text{mol/L}$  ITS1-F,0.2  $\mu\text{mol/L}$  ITS1-R,模板1  $\mu\text{L}$ ,0.25  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA聚合酶;反应条件为94  $^\circ\text{C}$  预变性5 min;94  $^\circ\text{C}$ 变性45 s,55  $^\circ\text{C}$ 复性45 s,72  $^\circ\text{C}$ 延伸1 min,共35个循环;最后72  $^\circ\text{C}$ 延伸7 min,1%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

### 1.7 LAMP特异性验证

用LAMP方法扩增蟹源弧菌、蟹源微孢子虫、三疣梭子蟹鞭毛虫及健康三疣梭子蟹DNA样本,反应体系和条件同前,电泳观察结果。

### 1.8 LAMP扩增结果目视观测

将LAMP反应管瞬时离心,肉眼直接观察反应管底是否形成白色沉淀;或者向LAMP反应管内加入嵌入剂SYBR Green I,通过反应管中荧光颜色变化直接肉眼判断。

### 1.9 临床样品的检测

运用上述建立的LAMP方法和普通PCR对2006–2009年采集的舟山地区25份临床疑似病例及3份健康蟹进行血卵涡鞭虫的检测。随机取1份临床样品的DNA模板做10倍梯度稀释,然后分别作为

模板,进行LAMP和常规PCR扩增。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAMP方法的建立

以本研究设计的LAMP特异性引物扩增血卵涡鞭虫DNA样本,另设双蒸水为模板的阴性对照。分别取5  $\mu\text{L}$ 反应产物进行1.8%琼脂糖凝胶电泳,结果阳性管产物呈现分子量大小不同的特征性梯状条带,阴性对照无扩增。电泳结果显示,血卵涡鞭虫基因组DNA产生特征性梯状条带,以水作为模板的阴性对照未产生条带,表明此套LAMP引物能够有效扩增血卵涡鞭虫DNA样本,电泳结果见图2A。在65  $^\circ\text{C}$ 反应温度下,反应15 min、30 min未检出特征性梯状条带,反应45 min开始出现特异性扩增(图2B)。确定60 min为适宜的反应时间。

### 2.2 LAMP特异性

选取其他3种三疣梭子蟹病原DNA样本及三疣梭子蟹DNA本来验证LAMP的特异性,LAMP反应体系和反应条件同前。结果,血卵涡鞭虫DNA样本LAMP扩增呈阳性反应,而蟹源弧菌、蟹源微孢子虫、三疣梭子蟹鞭毛虫及健康三疣梭子蟹DNA样本扩增均呈阴性反应(图3)。

### 2.3 LAMP灵敏度

将ITS1重组质粒进行10倍梯度稀释后作为LAMP反应的模板,结果显示,LAMP检测的最低模板浓度为 $10^{-6}$ ,扩增产物浓度与模板浓度相关性很小(图4A);而常规PCR检测的最低模板浓度为 $10^{-2}$ (图4B),可见血卵涡鞭虫LAMP检测方法的灵敏度比普通PCR方法要高 $10^4$ 倍。

### 2.4 LAMP扩增目视观测结果

LAMP反应的副产物焦磷酸镁形成的白色沉淀物可直接用于结果判定,阳性管可见白色沉淀,阴性对照管无变化,仍透明。加入SYBR Green I后,阳性扩增管变为绿色,阴性反应管为橙色(图5)。

### 2.5 临床样品检测结果

运用上述建立的LAMP方法和常规PCR对2006–2009年采集的25份舟山地区的临床疑似病例

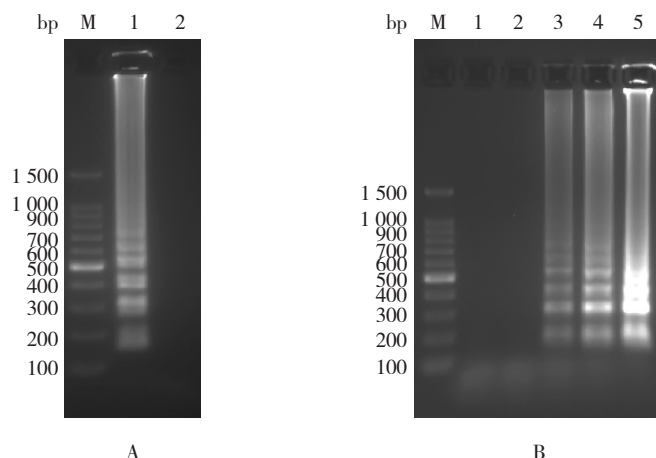


图2 血卵涡鞭虫 LAMP 检测方法的建立

A. 血卵涡鞭虫 LAMP 扩增结果. M: 100 bp DNA 标准分子量; 1: 血卵涡鞭虫的 LAMP 产物; 2: LAMP 阴性对照. B. 不同时间段血卵涡鞭虫 LAMP 扩增结果. M: 100 bp DNA 标准分子量; 1: 15 min; 2: 30 min; 3: 45 min; 4: 60 min; 5: 90 min.

Fig. 2 Establishment of LAMP method for *Hematodinium* sp. detection

A. LAMP products of *Hematodinium* sp.. M: 100 bp DNA marker; Lane 1: LAMP products of *Hematodinium* sp.; Lane 2: negative control. B. LAMP products of *Hematodinium* sp. at different time M: 100 bp DNA marker. Lane 1-5: LAMP carried out for 15 min, 30 min, 45 min, 60 min and 90 min, respectively.

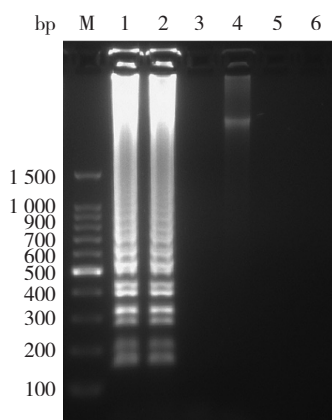


图3 血卵涡鞭虫 LAMP 特异性试验结果

M: 100 bp DNA 标准分子量; 1, 2: 血卵涡鞭虫; 3: 弧菌; 4: 健康三疣梭子蟹; 5: 微孢子虫; 6: 鞭毛虫.

Fig. 3 Specificity of LAMP for *Hematodinium* sp. detection

M: 100 bp DNA marker; Lanes 1, 2: genomic DNA purified from *Hematodinium* sp. from diseased crab; Lane 3: genomic DNA purified from *Vibrio*; Lane 4: genomic DNA purified from healthy *Portunus trituberculatus*; Lane 5: genomic DNA purified from *Nosema* from diseased crab; Lane 6: genomic DNA purified from the flagellate from diseased crab.

和3份健康蟹进行检测,其中LAMP方法检出血卵涡鞭虫感染病例25份,常规PCR检出感染病例23份,3份健康蟹使用LAMP方法和常规PCR检测结果均为阴性;2009年的样本中有2份疑似病例样品LAMP检测结果为阳性,PCR检测结果为阴性,结果见表2。随机取1份临床样本DNA模板,10倍梯度稀释试验。结果,LAMP检测的最低模板浓度为原始模板

浓度的 $10^{-5}$ ,而常规PCR检测的最低模板浓度为原始模板浓度的 $10^{-2}$ (图6)。

### 3 讨论

血卵涡鞭虫是危害海水甲壳类的重要寄生虫,其宿主范围和流行范围很广<sup>[2]</sup>,自1931年Chatton等<sup>[13]</sup>首次报道法国沿岸的绿蟹被血卵涡鞭虫感染

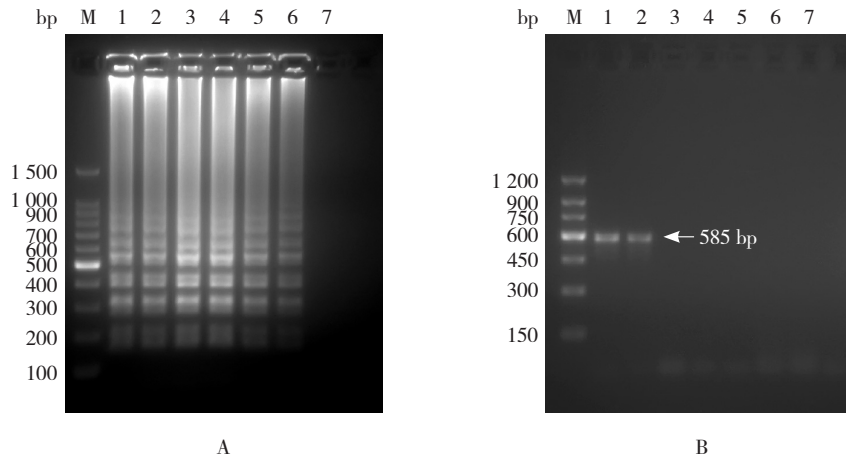


图4 LAMP和PCR方法检测血卵涡鞭虫灵敏度比较试验

A. LAMP反应结果. M: 100 bp DNA 标准分子量; 1-7: 分别以质量浓度为 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^4$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  ng/ $\mu$ L的质粒为模板的LAMP产物. B. PCR反应结果. M: 150 bp DNA 标准分子量; 1-7: 分别以质量浓度为 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^4$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  ng/ $\mu$ L的质粒为模板的PCR产物.

Fig. 4 Sensitivity of *Hematodinium* sp. detection by LAMP and PCR

A. The amplification results obtained by LAMP. M: 100 bp DNA marker; Lanes 1-7: LAMP carried out using plasmid of  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^4$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-7}$  ng/ $\mu$ L, respectively. B. The amplification results obtained by PCR. M: 150 bp DNA marker; Lanes 1-7: PCR carried out using plasmid of  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^4$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-7}$  ng/ $\mu$ L, respectively.

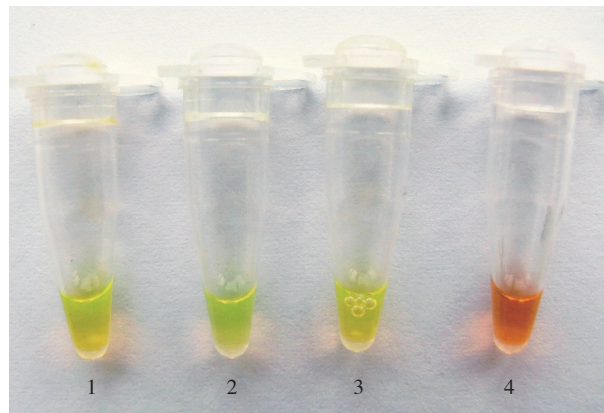


图5 LAMP的目视检测

1-3: LAMP扩增阳性管加入SYBR Green I为绿色; 4: LAMP扩增阴性管加入SYBR Green I为橙色.

Fig. 5 Visual inspection of LAMP

1-3: positive LAMP reaction visualized green by adding SYBR Green I; 4: negative LAMP reaction visualized orange by adding SYBR Green I.

以来,至今国外许多地区包括澳大利亚、阿拉斯加、苏格兰、加拿大以及美国东部沿岸等地均发现和报道了该寄生虫病的流行,其流行已影响到挪威龙虾(*Nephrops norvegicus*)、兰蟹(*Callinectes sapidus*)、白氏雪蟹(*Chionoecetes bairdi*)以及蛛雪蟹(*C. opilo*)等许多重要经济甲壳类的渔业生产<sup>[13-19]</sup>。国内2006年首次报道养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染<sup>[2]</sup>,之后在锯

缘青蟹中也发现该寄生虫感染<sup>[4]</sup>。在血卵涡鞭虫的检测技术方面,除了常规的形态学观察方法以外,国外还开展了包括PCR、ELISA以及IFAT等多种现代生物诊断技术的研究<sup>[6-8]</sup>,但这些技术都需要特殊的仪器设备和实验室条件,需要耗费较长时间。

核酸扩增技术是目前生物学领域最重要的工具之一,除了聚合酶链式反应(PCR)外,其他核酸扩

表2 临床样品LAMP和PCR检测结果  
Tab. 2 The LAMP and PCR assay results with clinical samples

样品采集年份 Collection year	PCR		LAMP	
	+	-	+	-
2006	5	5	5	5
2007	5	5	5	5
2008	5	5	5	5
2009	8	10	10	10
健康蟹 Healthy	0	3	0	3

注:“+”为阳性结果;“-”为阴性结果.表中数字为个体数量.

Note:“+” represents positive;“-” represents negative. Figures in the table are individual numbers.

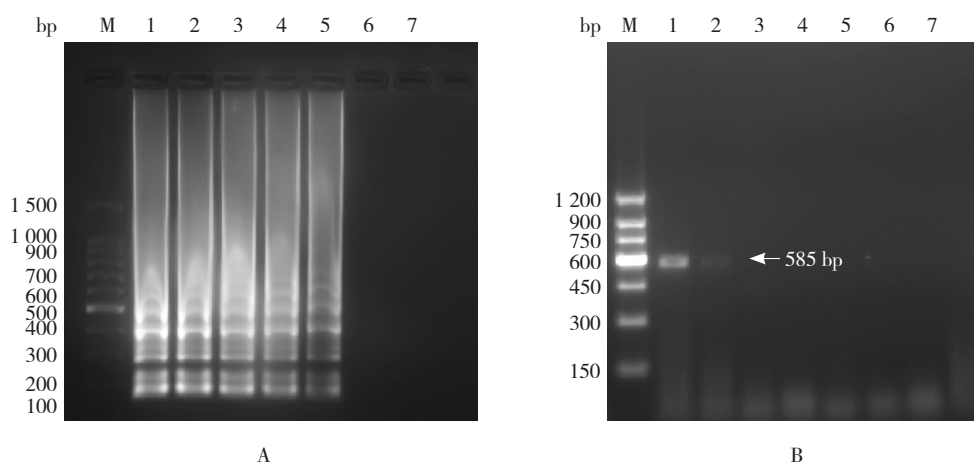


图6 LAMP和PCR方法检测临床样品灵敏度比较试验

A. LAMP反应结果. M: 100 bp DNA 标准分子量; 1-7: 分别以 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^4$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 稀释度稀释的临床DNA样品. B. PCR反应结果. M: 150 bp DNA 标准分子量; 1-7: 分别以 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^4$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 稀释度稀释的临床DNA样品.

Fig. 6 Sensitivity of *Hematodinium* sp. detection by LAMP and PCR

A. The results obtained by LAMP. M: 100 bp DNA marker; Lanes 1-7: *Hematodinium* sp. DNA with  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^4$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  delution, respectively. B. The results obtained by PCR M: 150 bp DNA marker; Lanes 1-7: *Hematodinium* sp. DNA with  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^4$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  delution, respectively.

增技术如依赖核酸序列扩增(Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、自主序列复制(Self-sustained sequence replication, 3SR)以及链置换技术(Strand displacement amplification, SDA),都只需少量核酸片段即可进行快速扩增。但这些方法中除了SDA外,其余均需特殊的仪器;而且这些方法对目的DNA的浓度和纯度也要求高,扩增效果也不理想。2000年Notomi等<sup>[1]</sup>首先报道了环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术, LAMP与其他核酸扩增技术相比,可以在等温条件下,快速、高效、高特异地扩增靶序列。该方法操作简便,反应不需PCR仪等特殊设备,只需可以进

行65℃恒温的水浴锅,非常适合基层单位以及分子流行病学调查或大规模的临床检疫工作。自2000年报道以来, LAMP在病原体诊断、基因诊断和治疗以及胚胎性别鉴定等领域被广泛应用,近年在水产养殖领域LAMP技术也迅速发展<sup>[20-28]</sup>。

血卵涡鞭虫诊断研究在国外有很多报道,学者Hudson和Adlard发现血卵涡鞭虫属间rDNA序列有很强特异性,在此基础上将PCR技术应用于血卵涡鞭虫病的检测<sup>[29]</sup>。本研究利用LAMP引物设计专用软件针对血卵涡鞭虫ITS1部分序列设计了1套特异性引物(F3、B3、FIP和BIP),目标DNA为1段204 bp的序列,反应条件是65℃水浴60 min, LAMP反应

结束后,直接向扩增管中加入适量的嵌入剂SYBR Green I,无反应的管呈橙色,有扩增的管变绿色。实验结果显示反应45 min左右即可判定结果,也即在临床上可以更快地检测出血卵涡鞭虫病。将制备的质粒DNA模板梯度稀释后分别用于LAMP和PCR检测,结果发现,普通PCR只能检测到 $10^{-2}$  ng/ $\mu$ L, LAMP能检测到 $10^{-6}$  ng/ $\mu$ L, LAMP的灵敏度比普通PCR高了4个数量级。本研究中将建立的LAMP方法应用于临床诊断,结果该方法可以检出常规PCR未能检出的阳性病例,表明该LAMP比普通的PCR灵敏度高。

综上所述,本研究建立的血卵涡鞭虫病LAMP检测方法操作十分简便,全部反应均在1个反应管中进行,只需要65℃水浴锅加热60 min,通过加入嵌入剂SYBR Green I产生的颜色反应即可判断反应结果。该LAMP检测方法灵敏度也相对较高,结果易于判读,适用于甲壳类感染血卵涡鞭虫病的检测。这对养殖生产中血卵涡鞭虫病诊断和防治具有十分重要的应用价值。

#### 参考文献:

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucl Acids Res, 2000, 28: E63.
- [2] 许文军,徐汉祥,施慧,等. 三疣梭子蟹血卵涡鞭虫病诊断与综合防治措施[J]. 现代渔业信息, 2006, 21: 27-28.
- [3] 许文军,施慧,徐汉祥,等. 养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染的初步研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 27-31.
- [4] 许文军,施慧,徐广庆,等. 锯缘青蟹黄水病原研究及综合防控初报[J]. 中国水产, 2006(8): 54-56.
- [5] 许文军,徐汉祥,Shield J,等. 海产甲壳类血卵涡鞭虫病研究进展[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 695-701.
- [6] Small H J, Neil D M, Taylor A C, et al. Molecular detection of *Hematodinium* spp. in Norway lobster *Nephrops norvegicus* and other crustaceans [J]. Dis Aquat Org, 2006, 69: 185-195.
- [7] Small H J, Wilson S, Neil D M, et al. Detection of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* in the Norway lobster *Nephrops norvegicus* by ELISA [J]. Dis Aquat Org, 2002, 52: 175-177.
- [8] Stentiford G D, Neil D M, Coombs G H. Development and application of an immunoassay diagnostic technique for studying *Hematodinium* infections in *Nephrops norvegicus* populations [J]. Dis Aquat Org, 2001, 46: 223-229.
- [9] 施慧,许文军,徐汉祥,等. 三疣梭子蟹感染血卵涡鞭虫PCR检测方法的建立[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(1): 28-33.
- [10] 施慧,许文军,李鹏飞,等. 应用PCR方法检测患“黄水病”锯缘青蟹中的血卵涡鞭虫[J]. 海洋渔业, 2008, 30: 74-79.
- [11] 谢建军,许文军,施慧,等. 海产蟹类血卵涡鞭虫间接荧光抗体快速检测技术[J]. 水产学报, 2009, 33: 126-131.
- [12] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 27-30.
- [13] Chatton E, Poisson R. Sur l'existence, dans le Sang des crabs, de peridinien parasites: *Hematodinium perezii* n.g., n.sp. (Syndinidae) [J]. C R Seances Soc Biol Paris, 1931, 105: 553-557.
- [14] Field R H, Chapman C J, Taylor A C, et al. Infection of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* by a *Hematodinium*-like species of dinoflagellate on the west coast of Scotland [J]. Dis Aquat Org, 1992, 13: 1-15.
- [15] Messick G A. *Hematodinium perezii* infections in adult and juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* from coastal bays of Maryland and Virginia, USA [J]. Dis Aqua Org, 1994, 19: 77-82.
- [16] Hudson D A, Shields J D. *Hematodinium australis* n.sp., a parasitic dinoflagellate of the sand crab *Portunus pelagicus* from Moreton Bay, Australia [J]. Dis Aquat Org, 1994, 19: 109-119.
- [17] Field R H, Appleton P L. A *Hematodinium*-like infection of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*: observation on pathology and progression of infection [J]. Dis Aquat Org, 1995, 22: 115-128.
- [18] Stentiford G D, Green M, Bateman K, et al. Infection by a *Hematodinium*-like parasitic dinoflagellate causes Pink Crab Disease (PCD) in the edible crab *Cancer pagurus* [J]. J Invertebr Pathol, 2002, 79: 179-191.
- [19] Field R H, Chapman C J, Taylor A C, et al. Infection of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* by a *Hematodinium*-like species of dinoflagellate on the west coast of Scotland [J]. Dis Aquat Org, 1992, 13: 1-15.

- [ 20 ] 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 ]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 2616–2622.
- [ 21 ] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289: 150–154.
- [ 22 ] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, et al. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification [ J ]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 5023–5028.
- [ 23 ] Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, et al. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP [ J ]. Arch Virol, 2003, 148: 1713–1720.
- [ 24 ] Parida M, Posadas G, Inoue S, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus [ J ]. J Clin Microbiol, 2004, 42: 257–263.
- [ 25 ] Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, et al. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification [ J ]. J Clin Microbiol, 2004, 42: 140–145.
- [ 26 ] Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes [ J ]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 5517–5524.
- [ 27 ] Fukuta S, Kato S, Yoshida K, et al. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction [ J ]. J Virol Methods, 2003, 112: 35–40.
- [ 28 ] Kono T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification [ J ]. J Virol Methods, 2004, 115: 59–65.
- [ 29 ] Hudson D A, Adlard R D. DCR-techniques applied to *Hematodinium* spp. and *Hematodinium*-like dinoflagellates in decapod crustaceans [ J ]. Dis Aquat Org. 1994, 20: 203–206.

## Detection of *Hematodinium* in marine crustacean by loop-mediated isothermal amplification

SHI Hui<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, XIE Jianjun<sup>2</sup>, XU Wenjun<sup>1</sup>, XU Hanxiang<sup>1</sup>, SHI Haidong<sup>3</sup>

(1. Marine and Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Marine and Fishery Research Institute of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316011, China; 2. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316011, China; 3. Zhejiang Province Puto Ocean and Fishery Bureau, Zhoushan 316100, China)

**Abstract:** Dinoflagellate in the genus of *Hematodinium* is an important parasite of marine crustacean. A rapid, convenient and reliable *Hematodinium* detection system was developed by using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. A set of four primers including two outer primers and two inner primers were designed from the first internal transcribed spacer (ITS1) of *Hematodinium* sp.. LAMP assay amplifies *Hematodinium* sp.'s DNA extracted from infected crabs under constant temperature of 65 °C within 1 h. The amplification products can be detected visually by observing whether white deposition comes into being or using SYBR green I dye, which turns green in the presence of amplified products and remains orange in its absence, or by electrophoresis. The LAMP assay was found to be 10<sup>4</sup> fold more sensitive than PCR assay. A comparison between LAMP and PCR assay using 25 clinical samples showed good correlation. The developed LAMP assay is simple, rapid, cost-effective, specific and highly sensitive for *Hematodinium* disease detection. [ Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (5): 1028–1035 ]

**Key words:** *Hematodinium* sp.; detection; ITS1; loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

**Corresponding author:** XU Wenjun. E-mail: xwenjun@sina.com