

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19350

洪湖碘泡虫单管半巢式 PCR 检测方法的建立及应用

杨坤^{1,2}, 高志鹏¹, 习丙文^{1,2}, 陈凯², 谢骏^{1,2}, 潘良坤²

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081

摘要: 在异育银鲫(*Carassius auratus gibelio* Bloch)养殖过程中, 因感染洪湖碘泡虫(*Myxobolus honghuensis*)引起的“喉孢子虫病”常会导致池塘养殖苗种和成鱼大量死亡。因此, 建立一种特异性强、灵敏度高和易于操作的检测方法对于该病的早期诊断以及防治具有重要意义。本研究基于洪湖碘泡虫 18S rDNA 基因序列设计合成两组特异性引物, 通过外引物组和单条内引物组合及条件优化, 建立了洪湖碘泡虫单管半巢式 PCR 检测方法, 并对该方法的特异性、灵敏度及临床应用分别进行了验证。结果显示, 该检测方法特异性好, 只有洪湖碘泡虫扩增为阳性, 瓶囊碘泡虫(*Myxobolus ampullicapsulatus*)、吴李碘泡虫(*Myxobolus wulii*)、武汉单极虫(*Thelohanellus wuhanensis*)及异育银鲫肌肉样品等均为阴性; 最低检测灵敏度极限为 4.2 copy/μL; 对疫区养殖池塘健康异育银鲫的卵巢、肾脏及脾脏组织样品检测发现洪湖碘泡虫阳性率分别为 40%、32%和 8%, 检出率显著高于普通 PCR。因此, 本研究所建立的检测方法特异性强、灵敏度高, 可应用于洪湖碘泡虫的早期快速检测。

关键词: 异育银鲫; 洪湖碘泡虫; PCR; 喉孢子虫病

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)08-0927-07

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio* Bloch)是中国重要的大宗淡水养殖鱼类品种, 具有生长快速、出肉率高、对水体环境适应能力强等特点^[1-3]。江苏省是异育银鲫的主要养殖区, 养殖面积近 5 万 hm², 年产量可达 200 万 t^[4]。近年来, 疾病问题严重困扰异育银鲫养殖, 其中黏孢子虫病是最为严重疾病之一, 每年都造成异育银鲫苗种和成鱼大量死亡。迄今为止, 异育银鲫报道可感染黏孢子虫超过 62 种^[5], 其中以引起“喉孢子虫病”的洪湖碘泡虫危害最为严重。洪湖碘泡虫可感染异育银鲫不同组织器官, 营养体可在鱼体咽上皮与颅骨间形成大量发育成熟的孢子和胞囊^[6]。发病鱼呈现上浮、离群独游、头背部发黑、反应迟缓、摄食困难, 单侧或双侧眼球突出、鳃盖不能闭合, 打开喉部可见咽上皮红肿, 特别严重的出现创口

和空洞^[7-10]。由于感染早期阶段受感染鱼体并无明显症状, 但当洪湖碘泡虫在鱼体内发育成熟, 形成大量胞囊, 此时药物已经很难控制鱼体死亡。因此, 建立一种快速、灵敏、特异性强的早期检测方法对于该病的早期诊断以及防治具有重要意义。

目前, 对于洪湖碘泡虫检测应用最多的检测方法主要包括形态学检测方法以及分子生物学检测方法。形态学检测方法主要基于显微镜观察成熟孢子, 检测效率较低, 容易对处于营养体阶段的洪湖碘泡虫感染出现漏检, 并且当镜检出现孢子时多数已处于感染后期; 显微镜检对洪湖碘泡虫的早期感染不能进行有效确诊^[11]。基于 PCR 技术的分子生物学检测方法凭借其较高的特异性与灵敏度, 目前被广泛应用在疾病临床诊断中, 其

收稿日期: 2019-11-21; 修订日期: 2020-02-05.

基金项目: 农业农村部国家大宗淡水鱼产业技术体系项目(CARS-45); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费项目(2019JBFZ08).

作者简介: 杨坤(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类寄生虫. E-mail: 764513834@qq.com

通信作者: 习丙文, 研究员. E-mail: xibw@ffrc.cn

常见技术有常规单轮 PCR 法、多轮 PCR 法、荧光定量 PCR 法以及巢式 PCR 法等^[12-13]。

巢式 PCR 是利用内外侧两对引物对靶标 DNA 序列进行两轮 PCR 扩增, 其中内侧引物在外侧引物扩增产物的片段上, 通过连续两轮扩增, 显著提高了检测的灵敏度与特异性^[14-16]。将巢式 PCR 中的一条引物既用作外引物又用作内引物, 即反应体系中只用到 1 对半引物, 则称为半巢式 PCR^[17-18]。为了建立一种既高效又无污染风险的洪湖碘泡虫 PCR 检测方法, 本研究基于洪湖碘泡虫 18S rDNA 基因序列, 设计并合成两对特异性引物, 并通过退火温度的不对称设置, 将两条外侧引物和一条内侧引物同时加入一管 PCR 体系中, 连续完成二轮 PCR 扩增, 建立了洪湖碘泡虫单管半巢式 PCR 检测方法, 并初步应用于临床样品的检测。

1 材料与方法

1.1 实验材料

特异性检测实验所用的洪湖碘泡虫(*Myxobolus honghuensis*)、瓶囊碘泡虫(*Myxobolus ampullicapsulatus*)、吴李碘泡虫(*Myxobolus wulii*)、武汉单极虫(*Thelohanellus wuhanensis*)等黏孢子虫样本均由本实验室采集与保存。临床检测异育银鲫样品于 2019 年 5 月购自江苏盐城并暂养在中国水产科学院淡水研究中心养殖池塘, 随机采集 50 尾(体长 11~16.5 cm), 解剖采集肌肉、卵巢、肾脏、脾脏、肝脏及脑组织(每采集完一个组织后所用镊子及剪刀都要冲洗干净, 防止交叉污染), 放入 1.5 mL 灭菌 EP 管中, 记录编号, 置于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2 主要试剂及仪器

PCR 反应体系试剂 Premix Ex Taq 聚合酶、DL2000 DNA Marker 和 6X Loading Buffer 购自宝生生物(TaKaRa), Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒、质粒提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。主要仪器包括 eppendorf 梯度 PCR 仪、Nano Drop 2000 分光光度计、Bio-Rad 凝胶成像系统等。

1.3 样品 DNA 提取

黏孢子虫基因组 DNA 提取: 将保存在乙醇(80%~100%)中的胞囊和组织样品取出, 放入超纯水浸泡过夜, 期间置换 2~3 次。按照 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒说明书步骤提取虫体 DNA; 保存于 -20 ℃ 备用。

异育银鲫组织基因组 DNA 提取: 将之前采样得到的鱼体组织解冻后, 取小块, 剪碎放入 1.5 mL 灭菌 EP 管中, 按照 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒说明书步骤提取组织 DNA 并保存于 -20 ℃ 备用。

1.4 质粒模板的制备

根据洪湖碘泡虫(*Myxobolus honghuensis*) GenBank 中核酸序列(HM188545)选取大于外引物组 PCR 扩增的片段(620 bp), 由生工生物工程(上海)股份有限公司进行基因合成并重组至 pUC57 载体上(pUC57-M, 编号 190629PA4127-1R30)。

将 pUC57-M 质粒转入大肠杆菌(Top10)并接种至含氨苄 LB 培养基中扩大培养; 按照质粒提取试剂盒说明书步骤提取质粒。使用 Nano Drop 2000 分光光度计测定纯度和浓度, 计算质粒拷贝数。拷贝数计算公式^[19]: 拷贝数=质粒浓度 $\times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} / (660 \times \text{质粒总长度})$, 6.02×10^{23} 为阿伏伽德罗常数, 660 为每个碱基的平均分子质量。提取后的质粒保存于 -20 ℃ 备用。

1.5 引物设计及合成

根据 GenBank 中洪湖碘泡虫、瓶囊碘泡虫、吴李碘泡虫、武汉单极虫和异育银鲫的 18S rDNA 基因序列, 用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计出两对洪湖碘泡虫特异性引物(引物信息见表 1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.6 常规 PCR 检测方法

采用 25 μL 反应体系, 包括: Premix Ex Taq 12.5 μL , 内引物正向 Mh-in-f (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 内引物反向 Mh-in-r (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , DNA 模板 1.0 μL , ddH₂O 10.5 μL 。

反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 57 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 35 个循环;

表 1 单管半巢式 PCR 引物设计
Tab. 1 Single tube semi-nested PCR primer design

引物 primer	名称 name	序列(5'-3') sequence	T _m /℃	产物/bp product
外引物正向 out-forward	Myh-1176F	GTTGGTCCCCCTGGGAAACC	61.91	462
外引物反向 out-reverse	Myh-1618R	TCCATGAGGCAGCGTAAAGG	57.75	
内引物正向 in-forward	Mh-in-f	GTCCGGACATCGAAAGGAT	54.50	239
内引反向 in-reverse	Mh-in-r	AGCGAGCCCAGAATGCTAC	57.97	

72 ℃延伸 7 min。PCR 扩增结束后 1.2 %的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.7 单管半巢式 PCR 检测方法的建立

1.7.1 PCR 反应体系及反应程序 采用 25 μL 反应体系, 包括: Premix Ex Taq 12.5 μL, 引物正向 Myh-1176F (10 μmol/L) 0.5 μL, 外引物反向 Myh-1618R (10 μmol/L) 0.2 μL, 内引物反向 Mh-in-r (10 μmol/L) 0.4 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH₂O 10.4 μL。

经过对反应条件的摸索, 优化后的反应程序设置为 94 ℃预变性 5 min, 首轮循环: 94 ℃变性 30 s, 61 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 15 个循环; 第二次循环: 94 ℃变性 30 s, 56 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 25 个循环; 72 ℃延伸 7 min。PCR 扩增结束后, 1.2 %的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.7.2 特异性检测试验 以洪湖碘泡虫、瓶囊碘泡虫、吴李碘泡虫、武汉单极虫的基因组 DNA 作为模板, 同时以异育银鲫肌肉组织基因组 DNA 及 ddH₂O 作为阴性对照, 按照 1.7.1 中反应体系及条件进行 PCR 扩增。PCR 扩增结束后, 产物经 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7.3 灵敏度检测试验 将携带洪湖碘泡虫 18S rDNA 片段的质粒作为基因拷贝数的标准品, 用 ddH₂O 作 10 倍梯度稀释, 分别得到 10⁹~10⁰ copy/μL 系列 DNA 模板。以稀释后不同浓度的标准质粒 DNA 作为模板, 同时以异育银鲫肌肉组织 DNA 及 ddH₂O 作为阴性对照, 分别采用常规 PCR 法及单管半巢式 PCR 法进行扩增。PCR 扩增结束后, 产物经 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测, 通过比较这两种检测方法的最低检测极限, 验证该方法的灵敏度。

1.7.4 临床样品检测 以 50 尾异育银鲫的肾、脾、肝、脑及卵巢组织基因组 DNA 作为模板, 同

时以异育银鲫肌肉组织基因组 DNA 及 ddH₂O 作为阴性对照, 分别采用单管半巢式 PCR 法及常规 PCR 法进行扩增。PCR 扩增结束后, 使用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 分别记录单管半巢式 PCR 法和常规 PCR 法检出阳性组织及数量, 统计阳性率。每个组织随机抽取 3 个阳性样品, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 进一步确认检测结果是否为洪湖碘泡虫。通过比较两种检测方法的阳性检出率, 验证该方法的临床应用效果。

2 结果与分析

2.1 单管半巢式 PCR 特异性

以洪湖碘泡虫、瓶囊碘泡虫、吴李碘泡虫、武汉单极虫的基因组 DNA 作为模板, 使用单管半巢式 PCR 法进行扩增和电泳分析, 结果显示只有洪湖碘泡虫基因组 DNA 可以扩增出目的条带; 外引物组(Myh-1176F+Myh-1618R) PCR 产物大小为 462 bp, 外引物正向(Myh-1176F)和内引物反向(Mh-in-r)的 PCR 产物大小为 381 bp, 其他黏孢子虫及阴性对照均无条带(图 1), 说明建立的单管半巢式 PCR 检测方法特异性良好。同时, 当样品模板浓度较低时外引物组 PCR 产物 462 bp 条带较弱。

2.2 重组质粒构建及浓度

基因合成洪湖碘泡虫 18S rDNA 片段连接至 pUC57 载体后, 构建获得重组质粒 pUC57-M, 大小为 3330 bp。重组质粒在大肠杆菌中扩大培养, 提取标准质粒 DNA 样品。Nano Drop 2000 测定质粒浓度为 154.9 ng/μL, A₂₆₀/A₂₈₀ 值为 1.89。参照拷贝数计算公式, 获得的质粒浓度为 4.2×10¹⁰ copy/μL。

2.3 单管半巢式 PCR 法的灵敏度验证

将质粒 DNA 用 ddH₂O 作 10 倍梯度稀释, 分别得到 4.2×10⁹~4.2×10⁰ copy/μL 系列标准 DNA

模板; 分别使用单管半巢式 PCR 法和常规 PCR 法进行扩增。电泳结果显示, 使用单管半巢式 PCR 法在模板浓度为 $4.2\times10^9\sim4.2\times10^3$ copy/ μL 时可得到大小为 462 bp 和 381 bp 的两条条带, 在模板浓度为 $4.2\times10^2\sim4.2\times10^0$ copy/ μL 时可得到一条大小为 381 bp 的条带(图 2)。单管半巢式 PCR 法的最低检测限可以达到 4.2×10^0 copy/ μL 。使用常规 PCR 法在模板浓度为 $4.2\times10^9\sim4.2\times10^1$ copy/ μL 可得到一条大小为 239 bp 的条带(图 3), 即常规 PCR

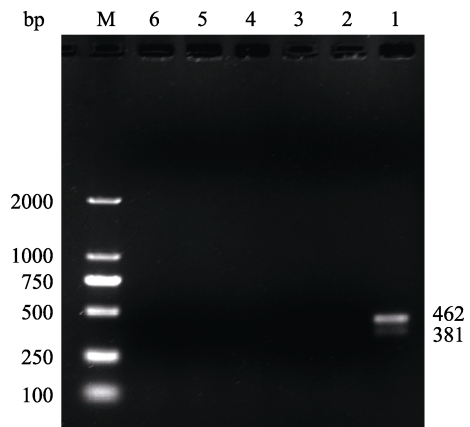


图 1 单管半巢式 PCR 特异性验证
M: DL2000 DNA marker; 1: 洪湖碘泡虫;
2: 吴李碘泡虫; 3: 瓶囊碘泡虫; 4: 武汉单极虫;
5: 异育银鲫肌肉组织; 6: 阴性对照。
Fig. 1 The specificity test of single tube semi-nested PCR
M: DL2000 marker; 1: *Myxobolus honghuensis*;
2: *Myxobolus wulii*; 3: *Myxobolus ampullicapsulatus*;
4: *Thelohanellus wuhanensis*; 5: muscle of *Carassius auratus gibelio*; 6: negative control.

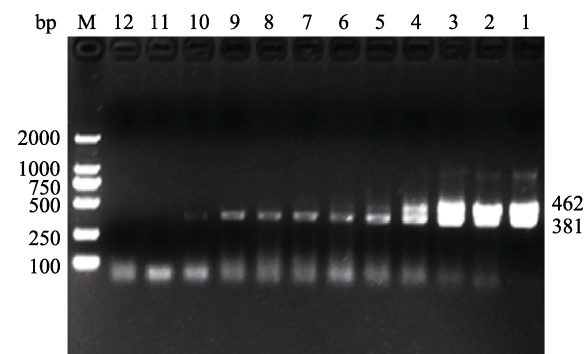


图 2 单管半巢式 PCR 灵敏度验证
M: DL2000 DNA marker; 1~10: $4.2\times(10^9\sim10^0)$ 拷贝质粒 PCR 产物; 11: 异育银鲫肌肉组织; 12: 阴性对照。
Fig. 2 The specificity test of single tube semi-nested PCR.
M: DL2000 marker; 1~10: $4.2\times(10^9\sim10^0)$ copies/reaction standard plasmids; 11: the muscle tissue of *Carassius auratus gibelio* Bloch; 12: negative control.

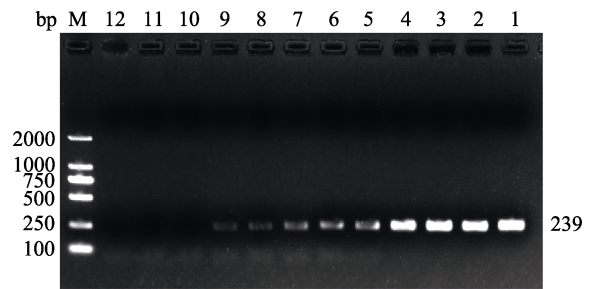


图 3 常规 PCR 灵敏度
M: DL2000 DNA maker; 1~10: $4.2\times(10^9\sim10^0)$ 拷贝质粒 PCR 产物; 11: 异育银鲫肌肉组织; 12: 阴性对照。
Fig. 3 The specificity of normal PCR.
M: DL2000 marker; 1~10: $4.2\times(10^9\sim10^0)$ copies/reaction standard plasmids; 11: the muscle tissue of *Carassius auratus gibelio* Bloch; 12: negative control.

法的最低检测限为 4.2×10^1 copy/ μL 。结果表明, 新建立的单管半巢式 PCR 检测方法灵敏度较高, 较常规 PCR 法提高 10 倍。

2.4 临床样品检测

分别采用常规 PCR 法和单管半巢式 PCR 法对收集到的异育银鲫卵巢、肾脏、肝脏、脾脏及脑组织样品就行检测, 结果见表 2。常规 PCR 法在卵巢、肾脏阳性检出率分别为 26%和 18%, 脾脏、肝脏和脑样品都未检出。单管半巢式 PCR 法在卵巢、肾脏的阳性检出率分别为 40%和 32%, 在脾脏检出率为 8%, 在肝脏和脑组织样品中也未检出。结果表明单管半巢式 PCR 法对各组织的阳性检出率均高于常规 PCR 法, 说明检测效率更

表 2 常规 PCR 和单管半巢式 PCR 临床样品检测
Tab. 2 Detection of common PCR and one-tube semi-nest PCR for clinical samples
n=50

组织 tissue	普通 PCR			单管半巢式 PCR		
	阳性/个 positive	阴性/个 negative	阳性率/% positive ratio	阳性/个 positive	阴性/个 negative	阳性率/% positive ratio
卵巢 ovary	13	37	26	20	30	40
肾脏 kidney	9	41	18	16	34	32
脾脏 spleen	0	50	0	4	46	8
肝脏 liver	0	50	0	0	50	0
脑 brain	0	50	0	0	50	0

高。随机抽取阳性样品测序结果 BLAST 比对分析均为洪湖碘泡虫。本研究所建立的单管半巢式 PCR 检测方法应用性较强, 可应用于洪湖碘泡虫的早期检测。

3 讨论

分子生物学检测方法特异性强、灵敏度高, 并且不受黏孢子虫不同发育阶段形态差异的影响, 目前已成为黏孢子虫病检测的重要技术手段。由于 18S rDNA 序列在种内非常保守, 容易获得, 并且在 GenBank 数据库中是不同物种提交的最多序列信息之一, 因此, 被广泛应用为物种鉴定的分子标记靶点^[20]。本研究基于洪湖碘泡虫 18S rDNA 序列, 设计合成了内外两组特异性引物并建立了洪湖碘泡虫单管半巢式 PCR 检测方法。

本研究采用将两轮 PCR 反应所需的 3 个引物同时置于一管 PCR 反应体系中的单管半巢式 PCR 法, 只需进行一次加样, 相较巢式 PCR 法操作更为简便, 避免了开盖加样可能造成的气溶胶污染。为保证检测的特异性及灵敏度, 单管半巢式 PCR 法对于引物设计的要求较为特殊, 即外引物的 T_m 值设计要较内引物的 T_m 值高^[21-23], 其目的是在第一步 PCR 反应的若干轮循环中, 只有外引物片段可以进行扩增, 而内引物在较高温度下则不与模板 DNA 结合; 当外引物耗尽后, 它们就会“退出”反应, 在第二步 PCR 反应的若干轮循环中, 在较低的退火温度下, 内引物“加入”反应, 再与第一轮扩增的 DNA 产物结合, 可以显著提高内引物的扩增效率^[24-25]。另外, 为了确保外引物在开始的第一次循环中被消耗完全, 可以适当减少外引物的量。

本研究在特异性验证方面, 检测了包括与洪湖碘泡虫亲缘关系较近的瓶囊碘泡虫和异育银鲫常见感染的 4 种黏孢子虫以及宿主异育银鲫的肌肉组织。由实验结果可知, 只有洪湖碘泡虫基因组扩增结果为阳性, 其余扩增结果均为阴性, 说明新建立方法特异性较好。在灵敏度检测方面, 单管半巢式 PCR 法最低检测限为 4.2×10^0 copy/ μ L, 较常规 PCR 灵敏度(4.2×10^1 copy/ μ L)高出一个数

量级; 相较于李丹等^[26]建立的洪湖碘泡虫 PCR 检测方法的灵敏度(2.74×10^3 copy/ μ L)高出约 3 个数量级, 表明该方法灵敏度较高。同时, 本研究所设置的常规 PCR 法较李丹等^[26]建立的常规 PCR 法的灵敏度也提高了 2 个数量级, 可能由于本次实验扩增的目的片段更小(249 bp), 扩增效率相对较高。荧光定量 PCR 与本研究所建立的单管半巢式 PCR 法相比, 灵敏度及特异性相近, 但是荧光定量 PCR 的实施需要昂贵仪器, 成本较高, 在实际生产及部分实验室中难以普及推广。

应用单管半巢式 PCR 和常规 PCR 对临床样品的检测都表明来自疫区的体表健康异育银鲫存在洪湖碘泡虫的潜伏感染; 新建立的单管半巢式 PCR 检出率显著高于常规 PCR, 尤其是脾脏样品。本研究首次通过 PCR 在异育银鲫卵巢中检测到洪湖碘泡虫并且感染率高达 40%, 并进一步通过寡核苷酸荧光原位杂交分析确认卵巢中存在洪湖碘泡虫(数据待发表)。本研究结果表明在养殖中防控异育银鲫的洪湖碘泡虫病, 开展苗种和亲本携带病原的 PCR 检测非常重要。

综上所述, 本研究所建立的洪湖碘泡虫单管半巢式 PCR 检测方法特异性强, 灵敏度高, 临床应用性较好, 在生产中可用于洪湖碘泡虫的早期快速检测, 为疾病早期诊断防治提供了一种新的、可靠的技术手段。

参考文献:

- [1] Li D, Zhai Y H, Gu Z M, et al. Development of a multiplex PCR method for the simultaneous detection of four myxosporeans infecting gibel carp *Carassius auratus gibelio*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2017, 124(1): 31-39.
- [2] Ye L T, Li W X, Zou H, et al. The population dynamics of myxosporean parasites in pond-reared allogynogenetic gibel carp, *Carassius gibelio*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 1092-1097. [叶灵通, 李文祥, 邹红, 等. 池塘养殖异育银鲫寄生黏孢子虫的种群动态[J]. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1092-1097.]
- [3] Sun X L, Yang S Y, Bi X D, et al. Effects of *Spirulina platensis* on growth, antioxidant and non-specific immunity indices of *Carassius auratus gibelio*[J]. Feed Industry, 2019, 40(14): 58-64. [孙学亮, 杨树元, 毕相东, 等. 钝顶螺旋藻对“中科 3 号”异育银鲫生长、抗氧化及非特异性免疫指

- 标的影响[J]. 饲料工业, 2019, 40(14): 58-64.]
- [4] Xi B W, Xie J, Zhou Q L, et al. Mass mortality of pond-reared *Carassius gibelio* caused by *Myxobolus ampullicapsulatus* in China[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 93(3): 257-260.
- [5] Guo Q X, Jia L, Qin J H, et al. Myxozoans and our dinner table: Pathogenicity studies of *Myxobolus honghuensis* (Myxosporidia: Bivalvulida) using a suckling mice model[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2015, 12(8): 653-660.
- [6] Li L S, Huang L P, Shao R Q, et al. Investigation on myxosporidiosis of *Carassius auratus gibelio*[J]. Aquaculture, 2008(5): 40-42. [李林思, 黄丽萍, 邵汝强. 异育银鲫粘孢子虫病调查[J]. 水产养殖, 2008(5): 40-42.]
- [7] Ma Y, Zhou J X, Wang H, et al. Investigation report on myxosporidiosis of *Carassius auratus gibelio* “Zhongke No.3” in Jilin Province[J]. Scientific Fish Farming, 2015(12): 84-85. [马悦, 周井祥, 王好, 等. 吉林省异育银鲫“中科 3 号”黏孢子虫病调查报告[J]. 科学养鱼, 2015(12): 84-85.]
- [8] Yang L, Whipps C M, Gu Z M, et al. *Myxobolus honghuensis* n. sp. (Myxosporidia: Bivalvulida) parasitizing the pharynx of allogynogenetic gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) from Honghu Lake, China[J]. Parasitology Research, 2012, 110(4): 1331-1336.
- [9] Zhao D D. Life cycle of several freshwater myxozoans and taxonomy of actinosporean collective groups[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017. [赵丹丹. 几种淡水粘体动物的生活史及其放射孢子虫集合群的分类学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.]
- [10] Wang Z. Establishment and preliminary application of ELISA detection method of *Myxobolus honghuensis*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016. [王钊. 洪湖碘泡虫 ELISA 检测方法的建立与初步应用[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.]
- [11] Gómez D, Bartholomew J, Sunyer J O. Biology and mucosal immunity to myxozoans[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 43(2): 243-256.
- [12] Hallett S L, Bartholomew J L. Application of a real-time PCR assay to detect and quantify the myxozoan parasite *Ceratomyxa shasta* in river water samples[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 71: 109-118.
- [13] Li D. Establishment and preliminary application of PCR detection methods for myxosporidians in *Carassius auratus gibelio*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016. [李丹. 异育银鲫粘孢子虫 PCR 检测方法的建立与初步应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.]
- [14] Qin X L, Huang J M, Xue Y H, et al. Establishment and preliminary application of single-tube nested realtime PCR in detecting *Mycobacterium leprae*[J]. China Journal of Leprosy and Skin Diseases, 2014, 30(10): 579-582. [覃晓琳, 黄进梅, 薛耀华, 等. 单管巢式实时 PCR 检测麻风杆菌方法的建立及初步应用[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2014, 30(10): 579-582.]
- [15] Yao Q, Song H, Chen F. DNA extraction from soybean oil and detection of genetically-modified components by single-tube nested PCR[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(21): 183-186. [姚芹, 宋浩, 陈枫. 食用精炼大豆油 DNA 提取及单管巢式 PCR 检测[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 183-186.]
- [16] Yan W, Xu Z H, Long L K, et al. Screening of genetically modified foods by single-tube semi-nested PCR[J]. Food Science, 2015, 36(2): 194-197. [闫伟, 徐桢惠, 龙丽坤, 等. 应用单管半巢式 PCR 技术筛查转基因食品[J]. 食品科学, 2015, 36(2): 194-197.]
- [17] Kan S H. Establishment of single-tube nested PCR as well as ITS1 and 529 bp sequence analysis of *Toxoplasma gondii* in dairy goat[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2014. [阚松鹤. 弓形虫单管巢式 PCR 检测方法的建立及奶山羊弓形虫 ITS1 与 529bp 基因序列分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.]
- [18] Huang K L, Luo Y B. Detecting genetically modified soybean roundup ready ingredient in foodstuffs by nested PCR and semi-nested PCR[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(5): 461-466. [黄昆仑, 罗云波. 用巢式和半巢式 PCR 检测转基因大豆 Roundup Ready 及其深加工食品[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5): 461-466.]
- [19] Chi H, Zheng X X, Gai W W, et al. Development of a semi-nested PCR assay for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus[J]. Journal of Pathogen Biology, 2018, 10(1): 1-5. [迟航, 郑学星, 盖微微, 等. 中东呼吸综合征冠状病毒半巢式 PCR 检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(1): 1-5.]
- [20] Fiala I. The phylogeny of Myxosporidia (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis[J]. International Journal for Parasitology, 2006, 36(14): 1521-1534.
- [21] de Faveri Pitz A, Koishi A C, Tavares E R, et al. An optimized one-tube, semi-nested PCR assay for *Paracoccidioides brasiliensis* detection[J]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2013, 46(6): 783-785.
- [22] Li H P, Feng H Q, Ba C F, et al. A diagnostic method to detect *Mycoplasma suis* using the semi-nested PCR[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2008, 24(4): 322-326. [李慧平, 冯会权, 巴彩凤, 等. 猪附红细胞体半巢式 PCR 诊断方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(4): 322-326.]
- [23] Wen W G, Sheng L, Zhang J H, et al. Establishment of

- semi-nested PCR detection method for trace transgenic rice materials[J]. Food Science, 2008, 29(12): 622-626. [闻伟刚, 盛蕾, 张吉红, 等. 痕量及微量转基因大米成分半巢式 PCR 检测方法的建立[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 622-626.]
- [24] Alexander A, Subramanian N, Buxbaum J N, et al. Drop-in, drop-out allele-specific PCR: A highly sensitive, single-tube method[J]. Molecular Biotechnology, 2004, 28(3): 171-174.
- [25] Thongsri Y, Wonglakorn L, Chaiprasert A, et al. Evaluation for the clinical diagnosis of *Pythium insidiosum* using a single-tube nested PCR[J]. Mycopathologia, 2013, 176(5-6): 369-376.
- [26] Li D, Liu Y, Zhai Y H, et al. Development and preliminary application of PCR method for the detection of *Myxobolus honghuensis* (Myxosporea: Bivalvulida)[J]. Freshwater Fisheries, 2017, 47(1): 12-16. [李丹, 柳阳, 翟艳花, 等. 洪湖碘泡虫 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 淡水渔业, 2017, 47(1): 12-16.]

Development a single-tube, semi-nested PCR method for the detection of *Myxobolus honghuensis* (Myxoporea: Bivalvulida)

YANG Kun^{1,2}, GAO Zhipeng¹, XI Bingwen^{1,2}, CHEN Kai², XIE Jun^{1,2}, PAN Liangkun²

1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: The Gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), is an important freshwater farming species that grows rapidly, has a high meat yield, and wide adaptability. However, in the past decade, diseases have been a severe challenge to successful culture systems. The parasitic disease caused by *Myxobolus honghuensis* causes massive deaths of the larval and adult Gibel carp every year. Establishing an efficient, sensitive, and specific detection method is of great significance for the early diagnosis and prevention of the disease. In this study, a single-tube, semi-nested polymerase chain reaction assay to detect and monitor the infection of *M. honghuensis* was developed with two newly designed primer pairs, which were designed based on 18S rDNA. The specificity, sensitivity, repeatability, and applicability of the assay were evaluated. The results indicated that amplification was positive only in the *M. honghuensis* sample, and the other Myxosporea and the muscle of *Carassius auratus gibelio* Bloch were all negative; the lowest detection was 4.2 copy/ μ L of the target gene. The clinical detection samples showed that *M. honghuensis* was present in the ovaries, kidneys, and spleen of asymptomatic Gibel carp from the epizootic zone, with a positive incidence of 40%, 32%, and 8%, respectively. In conclusion, the method developed in this study is of high specificity and sensitivity, which provides a new and reliable technical means for the early diagnosis and control of *M. honghuensis*.

Key words: *Carassius auratus gibelio* Bloch; *Myxobolus honghuensis*; PCR; myxozoan disease

Corresponding author: XI Bingwen. E-mail: xibw@ffrc.cn