

虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) 基因组不同提取方法的比较

魏俊利^{1,2}, 孙妍^{1,2*}, 陈浩楠^{1,2}, 刘群^{1,2}, 张丽^{1,2}, 董学旺^{1,2}

¹天津市动物疫病预防控制中心, 天津

²天津市水生动物疫病监测中心, 天津

收稿日期: 2023年2月16日; 录用日期: 2023年3月8日; 发布日期: 2023年3月22日

摘要

为探寻最佳EHP基因组提取方法, 本研究采用传统酚/氯仿抽提法、改良酚/氯仿抽提法、几丁质酶法、商品化海洋动物DNA提取试剂盒及商品化植物DNA提取试剂盒共5种方法分别对等量的EHP进行基因组提取。提取的基因组浓度由高到低依次为: 商品化海洋动物DNA提取试剂盒(18.825 ng/ μ L) > 几丁质酶法(17.17 ng/ μ L) > 改良酚/氯仿抽提法(15.06 ng/ μ L) > 传统酚/氯仿抽提法(10.8 ng/ μ L) > 商品化植物DNA提取试剂盒(2.175 ng/ μ L); 提取的基因组完整性由高到低依次为: 商品化海洋动物DNA提取试剂盒 > 改良酚/氯仿抽提法 > 商品化植物DNA提取试剂盒 > 传统酚/氯仿抽提法 > 几丁质酶法。由上述结论可知, 采用商品化海洋动物DNA提取试剂盒提取的EHP基因组浓度最高, 且完整性最好, 是5种方法中最佳的提取方法。

关键词

虾肝肠胞虫, 基因组提取, 传统酚/氯仿抽提法, 改良酚/氯仿抽提法, 几丁质酶法, 商品化海洋动物DNA提取试剂盒, 商品化植物DNA提取试剂盒

Comparison of Different Extraction Methods for the Genome of *Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP

Junli Wei^{1,2}, Yan Sun^{1,2*}, Haonan Chen^{1,2}, Qun Liu^{1,2}, Li Zhang^{1,2}, Xuewang Dong^{1,2}

¹Animal Disease Prevention and Control Center of Tianjin, Tianjin

²Tianjin Surveillance Center of Aquatic Animal Infections Disease, Tianjin

*通讯作者。

文章引用: 魏俊利, 孙妍, 陈浩楠, 刘群, 张丽, 董学旺. 虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)基因组不同提取方法的比较[J]. 水产研究, 2023, 10(1): 23-30. DOI: 10.12677/ojfr.2023.101003

Abstract

In order to explore the most suitable extraction method of the *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) genome, five methods were used to extract genomes of equal amounts of EHP, including traditional and improved phenol/chloroform extraction, enzymatic hydrolysis of chitin, marine animals DNA kit and plant genomic DNA kit. Results showed that the effect on the genomic concentration was in descending order of marine animals DNA kit (18.825 ng/ μ L), enzymatic hydrolysis of chitin (17.17 ng/ μ L), improved phenol/chloroform extraction (15.06 ng/ μ L), traditional phenol/chloroform extraction (10.8 ng/ μ L), plant genomic DNA kit (10.8 ng/ μ L); the effect on the genome integrity was in descending order of marine animals DNA kit, improved phenol/chloroform extraction, plant genomic DNA kit, traditional phenol/chloroform extraction, enzymatic hydrolysis of chitin. Due to the highest extraction concentration and the best integrity, this study confirms that the method of marine animals DNA kit was the most suitable extraction method for EHP genome.

Keywords

Enterocytozoon hepatopenaei, Genome Extraction, Traditional Phenol/Chloroform Extraction, Improved Phenol/Chloroform Extraction, Enzymatic Hydrolysis of Chitin, Commercialized Marine Animals DNA Kit, Commercialized Plant Genomic DNA Kit

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

2009年, 泰国学者首次在生长缓慢的斑节对虾中发现了一种微孢子虫, 经研究命名为肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) [1]。虾肝肠胞虫是一种严格细胞内寄生的单细胞真核生物, 可以引起多种虾发病[2]。感染该寄生虫的对虾生长缓慢, 甚至生长停滞, 导致对虾养殖规格参差不齐, 产量下降, 损失严重, 已成为对虾养殖过程中重要病原之一, 威胁着整个对虾养殖产业。2013年以来, 我国对虾养殖主产区先后发现有 EHP 流行[3]。天津地区养殖对虾也出现该病的流行, 2015~2017年 EHP 的阳性率分别为 56.96%、69.52%、29.28% [4], 2019年 EHP 的阳性检出率为 65.4% [5], 已经成为主要流行病害。

虾肝肠胞虫具有蛋白性孢子外壁和含几丁质的孢子内壁[6], 其孢子壁坚韧, 且外壳对一般的化学物质和不良环境有很强的抵御能力, 常规的 DNA 提取方法不适用, 而应用液氮反复冻融、研磨提纯后的虫体提取核酸, 其核酸获得量虽然较高, 但是完整性相对较差, 并不能满足研究需要。虾肝肠胞虫属于微孢子虫, 很难通过显微镜观察到[7]。快速、准确、高灵敏度地检测出病原, 成为早期防控该疾病有效手段之一。目前, 虾肝肠胞虫的检测方法采用 PCR 技术, 制备虾肝肠胞虫基因组 DNA 是后续实验顺利进行的关键, 提高基因组提取的完整性, 是提高分子检测灵敏度的有效手段, 同时也是全基因组 DNA 测序的必要条件, 对于虾肝肠胞虫病的防治和科学研究具有积极意义。本研究对 5 种虾肝肠胞虫基因组提取方法进行基因组浓度和完整性参数比较, 以选择最适合的虾肝肠胞虫基因组提取方法。

2. 材料与方法

2.1. 病虾来源

患病凡纳滨对虾采集自天津市东丽区某养殖场。

2.2. 主要仪器

组织匀浆仪(SPEX SamplePrep 1600MiniG)、冷冻离心机(Eppendorf 5810R)、核酸分析仪(NanoDrop 2000)、PCR 仪(ProFlex PCR System)、毛细管电泳仪(Bioptic Qsep100)。

2.3. 虾肝肠胞虫的分离、提纯

取新鲜患病虾肝胰腺和肠道组织 3 g 左右, 分装于 5 mL 离心管内, 使用匀浆仪研磨; 将匀浆组织液全部转移到 50 mL 离心管中, 加入 25~30 mL 无菌生理盐水, 混匀, 600 rpm 离心 30 min, 取上层溶液, 弃沉淀; 上层溶液 12000 rpm 离心 30 min, 取沉淀, 用生理盐水悬浮, 12000 rpm 离心 30 min 取沉淀, 用生理盐水悬浮, 获得虾肝肠胞虫粗提物; 粗提物经过蔗糖密度梯度离心, 收集含有肝肠胞虫的条带, 洗涤去除蔗糖残留, 得到纯度高的肝肠胞虫。

2.4. 虾肝肠胞虫基因组 DNA 提取

1) 传统酚/氯仿抽提法提取虾肝肠胞虫基因组参照虾肝肠胞虫病诊断规程[10]的方法制备核酸。取约 10^7 cell 虫体于离心管中, 加入 500 μ L 2% CTAB 溶液, 混匀, 25 $^{\circ}$ C 孵育 2.5 h, 加入 550 μ L 抽提液 I, 用力混合至少 30 sec, 12000 rpm 离心 5 min, 小心吸取上层水相(约 430 μ L), 加入抽提液 II 600 μ L, 用力混合至少 30 sec, 12000 rpm 离心 5 min, 小心吸取上层水相(约 360 μ L), 加入-20 $^{\circ}$ C 预冷的 1.5 倍体积无水乙醇, 倒置混匀数次, -20 $^{\circ}$ C 沉淀核酸 8 h 以上, 12000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用 75% 酒精洗盐一次, 自然干燥, 加入 20 μ L TE 缓冲液溶解, -20 $^{\circ}$ C 暂时保存。

2) 改良酚/氯仿抽提法提取虾肝肠胞虫基因组取约 10^7 cell 虫体于离心管中, 加入 500 μ L 2% CTAB, 加入 20 mg/mL 的蛋白酶 K 20 μ L, 混匀, 55 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 冷却至室温后, 加入 550 μ L 抽提液 I, 用力混合至少 30 sec, 12000 rpm 离心 5 min, 小心吸取上层水相(约 450 μ L), 加入抽提液 II 600 μ L, 用力混合至少 30 sec, 12000 rpm 离心 5 min, 小心吸取上层水相(约 360 μ L), 加入 500 μ L 异丙醇, 倒置混匀数次, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min, 12000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用 75% 酒精洗盐一次, 自然干燥, 加入 20 μ L TE 缓冲液溶解, -20 $^{\circ}$ C 暂时保存。

3) 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法提取虾肝肠胞虫基因组使用 TIANGEN 公司海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型), 取约 10^7 cell 虫体, 放入装有 200 μ L GA 缓冲液的离心管中, 漩涡振荡 15 sec; 加入 20 μ L Proteinase K (20 mg/mL), 漩涡混匀, 短离心, 56 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 每小时振荡混合 2~3 次, 每次 15 sec; 加入 200 μ L 缓冲液 GB, 充分颠倒混匀, 70 $^{\circ}$ C 放置 10 min; 加入 200 μ L 无水乙醇, 充分颠倒混匀; 将上步骤溶液加入吸附柱中(吸附柱放入收集管中), 12000 rpm 离心 30 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中; 向吸附柱加入 500 μ L 缓冲液 GD, 12000 rpm 离心 30 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中; 向吸附柱加入 600 μ L 漂洗液 PW, 倒掉废液, 吸附柱放回收集管中; 将吸附柱转入一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 20 μ L TE 缓冲液, 室温放置 5 min, 12000 rpm 离心 2 min, 收集到离心管中, -20 $^{\circ}$ C 暂时保存。

4) 植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法提取虾肝肠胞虫基因组使用 TIANGEN 公司植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型), 取约 10^7 cell 虫体, 加入 400 μ L 缓冲液 LP1 和 6 μ L RNase (10 mg/mL), 漩涡振荡 1 min, 室温放置 10 min; 加入 130 μ L 缓冲液 LP2, 充分混匀, 漩涡振荡 1 min; 12000 rpm 离心 5 min,

将上清液移至新的离心管中；加入 1.5 倍体积的缓冲液 LP3，立即充分振荡混匀 15 sec，全部加入一个吸附柱中，12000 rpm 离心 30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中；加入 600 μL 漂洗液 PW，12000 rpm 离心 30 sec，倒掉废液，将吸附柱放回收集管中，重复漂洗一次；将吸附柱置于室温放置 5 min，放回干净的收集管中，向吸附膜中间部位悬空滴加 20 μL 洗脱缓冲液 TE，室温放置 5 min，12000 rpm 离心 2 min，收集到离心管中， -20°C 暂时保存。

5) 几丁质酶法提取虾肝肠胞虫基因组几丁质酶能够特异性水解几丁质，也是蜗牛消化酶系的一部分，使用几丁质酶替代蜗牛消化酶，参照刘洪岩[7]的方法制备基因组 DNA。取约 10^7 cell 虫体，用 500 μL 无菌生理盐水混悬，加入终浓度 10% SDS 50 μL ，加入浓度 20 mg/mL 蛋白酶 K 25 μL ， 37°C 消化 2 h， 95°C 处理 10 min，冷却至室温后加入浓度 0.5 mg/mL 几丁质酶 500 μL ，酶促反应温度为 37°C ，恒温作用 4 h，冷却至室温后加入等体积抽提液 I，用力混合至少 30 sec，12000 rpm 离心 5 min，小心吸取上层水相，加入抽提液 II 900 μL ，用力混合至少 30 sec，12000 rpm 离心 5 min，小心吸取上层水相(800 μL)，加入 -20°C 预冷的 1.5 倍体积无水乙醇，倒置混匀数次， -20°C 沉淀核酸 8 h 以上，12000 rpm 离心 5 min，弃上清，沉淀用 75% 酒精洗盐一次，自然干燥，加入 20 μL TE 缓冲液溶解， -20°C 暂时保存。

2.5. 虾肝肠胞虫 PCR 检测

参照虾肝肠胞虫病诊断规程[8]的方法进行。套式 PCR 第一步：PCR 反应体系(25 μL)包括 514F 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)和 514R 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ，Premix Ex Taq 12.5 μL ，模板基因组 DNA (提取的虾肝肠胞虫基因组 DNA) 1 μL ，最后用 DEPC 水定容至 25 μL 。PCR 反应条件为： 95°C 5 min； 95°C 30 s、 58°C 30 s、 68°C 45 s、30 个循环； 68°C 延伸 5 min，最后 4°C 保温。套式 PCR 第二步：PCR 反应体系(25 μL)包括 147F 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)和 147R 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ，Premix Ex Taq 12.5 μL 及套式 PCR 第一步反应产物 1 μL ，最后用 DEPC 水定容至 25 μL 。PCR 反应条件为： 95°C 5min； 95°C 30 s、 58°C 30 s、 68°C 45 s、35 个循环； 68°C 延伸 5 min，最后 4°C 保温。使用毛细管电泳仪分析结果。

2.6. 虾肝肠胞虫基因组 DNA 检测

将提取的基因组 DNA 直接进行毛细管电泳分析。

3. 结果与分析

3.1. 虾肝肠胞虫核酸提取浓度

使用 NanoDrop2000 型核酸测定仪检测浓度，每种方法测量四个平行样，取平均值，测量结果见表 1。由表 1 可见，核酸浓度由大到小的顺序为海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法 > 几丁质酶法 > 改良酚/氯仿抽提法 > 传统酚/氯仿抽提法 > 植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法。

Table 1. Genome concentration of EHP under different extraction methods

表 1. 不同提取方法下虾肝肠胞虫基因组浓度

提取方法	浓度(ng/ μL)
传统酚/氯仿抽提法	7.775
改良酚/氯仿抽提法	10.425
海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法	18.825
植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法	2.175
几丁质酶法	12.775

本研究采用 5 种方法提取 EHP 核酸, 分析、比较提取方法, 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法与植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法属于离心柱法, 所有提取的核酸都被回收, 而另外三种核酸抽提均采用商品试剂(抽提液 I、II), 由于操作的局限性, 只回收了部分核酸。根据操作步骤, 实际核酸浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$) = 测量核酸浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$) \div 回收率; 回收率计算, 改良酚/氯仿抽提法为 69.23%, 传统酚/氯仿抽提法为 72%, 几丁质酶法为 74.42%。由此推算改良酚/氯仿抽提法实际提取浓度为 $15.06 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 传统酚/氯仿抽提法为 $10.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 几丁质酶法为 $17.17 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。提取效果由大致小为海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法($18.825 \text{ ng}/\mu\text{L}$) > 几丁质酶法($17.17 \text{ ng}/\mu\text{L}$) > 改良酚/氯仿抽提法($15.06 \text{ ng}/\mu\text{L}$) > 传统酚/氯仿抽提法($10.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$) > 植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法($2.175 \text{ ng}/\mu\text{L}$)。

3.2. 虾肝肠胞虫 PCR 检测结果

套式 PCR 第一、二步电泳均出现目的条带, 说明采用的五种提取虾肝肠胞虫基因组 DNA 的方法都可以制备符合该病原检测要求的核酸。根据该病诊断规程, 套式 PCR 第一步 541 bp 处出现目的条带就可以判定为阳性, 电泳结果见图 1。

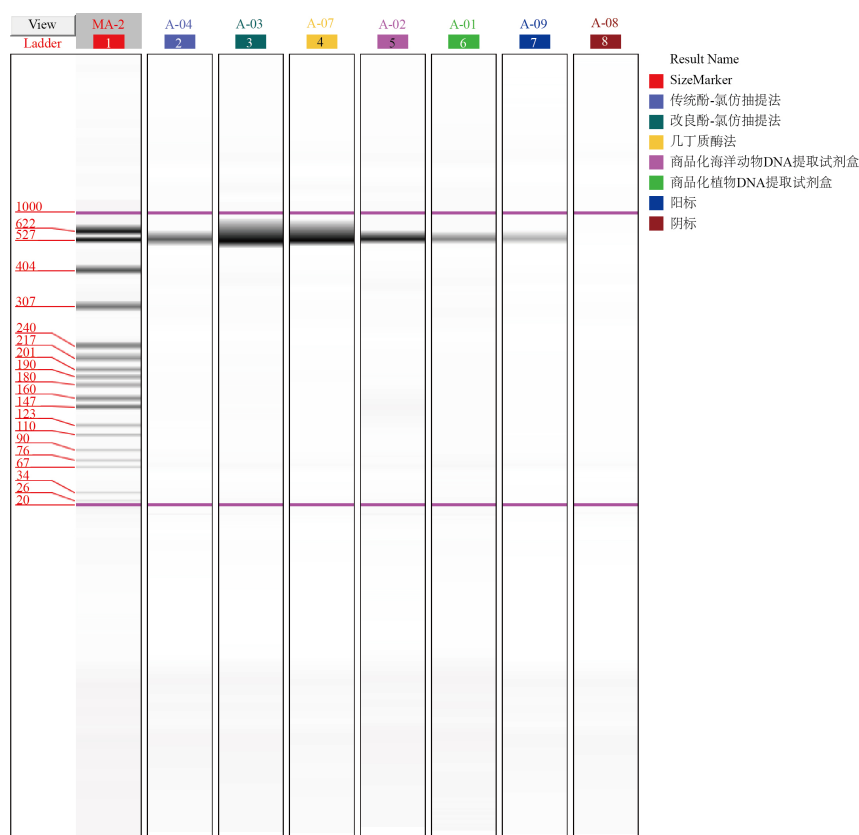


Figure 1. The capillary electrophoresis imaging on the first step of EHP nested PCR

图 1. 虾肝肠胞虫套式 PCR 第一步毛细管电泳成像

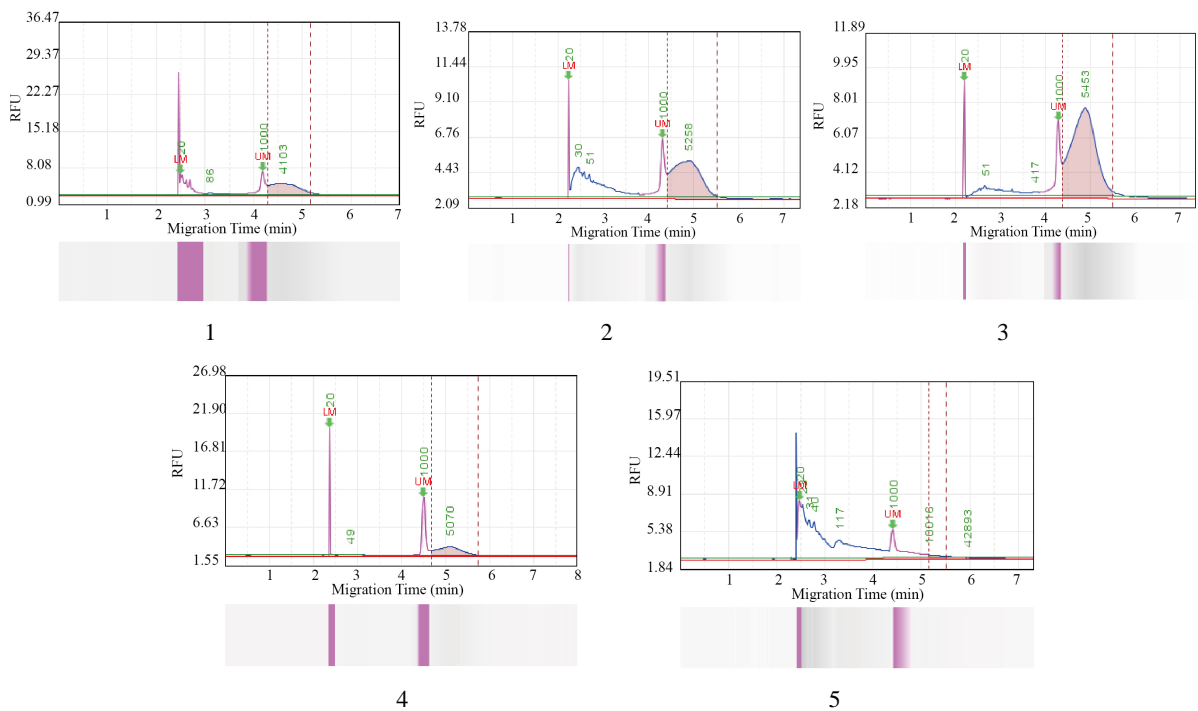
3.3. 虾肝肠胞虫基因组 DNA 检测结果

基因组检测范围选定从 1200~20000 bp, 由表 2 可见, 从浓度上比较, 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法最高, 其次是改良酚/氯仿抽提法, 再次传统酚/氯仿抽提法, 随后植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法, 最后几丁质酶法。DQN 值可以定义 DNA 样本的完整性, 满分为 10 分, 越接近 10 说明 DNA

的质量越好, 计算方式是框选的主片段占整个样本的百分比; DON 值表明, 传统酚/氯仿抽提法、海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法与植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法相差不大, 基因组有降解但不大, 改良酚/氯仿抽提法居中, 几丁质酶法基因组降解非常严重。

Table 2. Genomic DNA test results of EHP under different extraction methods
表 2. 不同提取方法下虾肝肠胞虫基因组 DNA 检测结果

提取方法	平均摩尔浓度(nmole/L)	DQN
传统酚/氯仿抽提法	116824.71	8.9
改良酚/氯仿抽提法	123258.12	5.8
海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法	198663.98	8.4
植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法	49215.5	7.9
几丁质酶法	4020.67	0.9



注: 1: 传统酚/氯仿抽提法, 2: 改良酚/氯仿抽提法, 3: 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法, 4: 植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法, 5: 几丁质酶法

Figure 2. Genomic DNA capillary electrophoresis map
图 2. 基因组 DNA 毛细管电泳图谱

由图 2 可见, 基因组 DNA 提取的完整性高低依次为海洋动物组织提取试剂盒法(5453 bp)、改良酚/氯仿抽提法(5258 bp)、植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法(5070 bp)、传统酚/氯仿抽提法(4103 bp)、几丁质酶法。植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法基因组完整性尚可, 但是浓度小, 不推荐使用。几丁质酶法提取基因组, 小片段 DNA 多, 集中在 20~1000 bp, 且含量低, 不能满足研究需要。以上结果表明, 提取虾肝肠胞虫基因组 DNA, 首先建议使用海洋动物组织提取试剂盒法, 其次使用改良酚/氯仿抽提法。

4. 讨论

当前, 虾肝肠胞虫(EHP)已经在全世界对虾养殖基地被检测到, 对印度[9]、泰国[10]、越南[11]、中国[12]等亚洲国家的对虾养殖产业造成了严重的经济损失。EHP 可以感染斑节对虾[1]、凡纳滨对虾[12]、脊尾白虾[13]等养殖虾类, 是当今虾养殖产业的重要病害之一。针对该病原进行快速、准确、高灵敏度的检测能够在一定程度上阻断病原传播, 从而减少疫病的扩散, 降低经济损失。目前, EHP 的检测主要依靠分子生物学方法, 而获得含有高质量的 EHP 基因组 DNA 就成为了准确检测该病原的前提条件。

本文采用 5 种提取虾肝肠胞虫核酸的方法, 在第一步 PCR 检测中都出现条带, 表明 5 种提取方法均能满足 PCR 检测的要求, 均适用于虾肝肠胞虫核酸的制备; 比较提取浓度由大致小为海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法(18.825 ng/ μ L) > 几丁质酶法(17.17 ng/ μ L) > 改良酚/氯仿抽提法(15.06 ng/ μ L) > 传统酚/氯仿抽提法(10.8 ng/ μ L) > 植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法(2.175 ng/ μ L), 显示出明显的差异性, 前三种方法提取效果好, 传统酚/氯仿抽提法是目前广泛采用的方法, 前三种方法优于该方法, 说明更适用于核酸的制备, 植物组织基因组 DNA 提取试剂盒法浓度低, 当病原载量低时可能影响检测的准确性, 相对而言不建议采用该方法制备虾肝肠胞虫基因组 DNA。

毛细管电泳仪检测基因组 DNA 结果, 框选检测范围, 比较提取浓度, 显示出差别, 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒法明显高于其它四种方法, 改良酚/氯仿抽提法略高于传统酚/氯仿抽提法, 传统酚/氯仿抽提法是目前常用的方法, 说明前两种方法更适用于基因组 DNA 的制备, 植物基因组 DNA 试剂盒法与几丁质酶法平均摩尔浓度低, 说明后两种方法不适于基因组 DNA 的检测。从完整性分析, 依次为海洋动物组织提取试剂盒法 5453 bp、其次为改良酚/氯仿抽提法 5258 bp、再次为植物组织提取试剂盒 5070 bp、接下来为传统酚/氯仿抽提法 4103 bp、最后为几丁质酶法。植物组织提取试剂盒法完整度尚可, 但是浓度低; 几丁质酶法提取的核酸大多是小片段, 集中在 20~1000 bp。所以, 海洋动物试剂盒法、改良酚/氯仿抽提法与传统酚/氯仿抽提法适于提取虾肝肠胞虫大片段核酸的方法, 为该领域的研究提供技术支撑。

5. 结论

本文采用 5 种方法提取虾肝肠胞虫基因组 DNA, 从提取浓度分析、比较, 海洋动物组织基因组 DNA 试剂盒法最高; 选用 5 种方法提取的基因组 DNA, 套式 PCR 第一步出现明显条带, 说明 5 种方法均能满足虾肝肠胞虫病 PCR 检测对核酸的要求; 框选大片段基因组 DNA (1200~20000 bp)进行毛细管电泳, 海洋动物组织基因组 DNA 试剂盒法提取浓度最高, 完整性较好。综上所述, 海洋动物组织基因组 DNA 试剂盒法是最佳的提取方法。

资助基金

天津市农业发展服务中心青年科技创新项目“虾肝肠胞虫定量检测技术的建立及应用研究”, 项目编号: ZXKJ201926。

参考文献

- [1] Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G.D., et al. (2009) *Enterocytozoon hepatopenaei* sp.nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a Parasite of the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda:Penaeidae): Fine Structure and Phylogenetic Relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, **102**, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.004>
- [2] 赵若恒. 虾肝肠胞虫的流行病学及防控药剂的筛选和效果的研究[D]: [硕士学位论文]. 大连: 大连海洋大学, 2019.
- [3] 许杰, 邓威, 李军, 等. 虾肝肠胞虫(EHP)流行病学与检测技术研究进展[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(2): 64-67.

- [4] 许杰, 霍文慧, 邓威, 等. 2015-2017 年天津市虾肝肠胞虫流行情况调查[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(8): 13-16.
- [5] 崔利锋, 于秀娟, 陈家勇, 等. 2020 中国水生动物卫生状况报告[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 20-21.
- [6] 刘洪岩, 赵彦华, 孙梦玲, 等. 蜗牛消化酶提取河蟹微孢子虫基因组反应条件的优化[J]. 水产养殖, 2017, 38(4): 35-39. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-2091.2017.04.008>
- [7] 王博雅, 王力, 刘美如, 等. 凡纳滨对虾 3 种主要病毒和虾肝肠胞虫在辽宁地区的流行情况分析[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(2): 119-126
- [8] 天津市水生动物疫病预防控制中心, 中国水产科学研究院黄海水产研究所. SC/T7232-2020 虾肝肠胞虫病诊断规程[S]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [9] Biju, N., Sathiyaraj, G., *et al.* (2016) High Prevalence of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Shrimps *Penaeus Monodon* and *Litopenaeus Vannamei* Sampled Slow Growth Ponds in India. *Diseases of Aquatic Organisms*, **120**, 225-230. <https://doi.org/10.3354/dao03036>
- [10] Flegel, T.W. and Sriyuni Aluucksana, K. (2019) Recent Research on Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and *Enterocytozoon hepatopenaei* in Thailand. *Aquaculture International*, **27**, 609-620.
- [11] Tang, K.F.J., Aranguren, L.F., Piamsomboon, P., *et al.* (2017) Detection of the Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and Taura Syndrome Virus in *Penaeus Vannamei* Cultured in Venezuela. *Aquaculture*, **480**, 17-21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.043>
- [12] 施慧, 许文军, 谢建军, 等. 舟山地区大棚凡纳滨对虾生长缓慢病因的调查分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 387-394.
- [13] 段健诚, 胡吉卉, 沈宇航, 等. 虾肝肠胞虫感染对脊尾白虾肠道菌群的影响[J]. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 75-83.