

虾肝肠胞虫TaqMan-MGB荧光定量PCR检测技术的建立

肇慧君*, 胡 强, 庞艳华

大连海关技术中心, 辽宁 大连

收稿日期: 2022年9月1日; 录用日期: 2022年9月12日; 发布日期: 2022年9月26日

摘 要

近年来, 虾肝肠胞虫病(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)严重威胁虾类健康成长, 为了精准快速检测该病原, 本文选取虾肝肠胞虫保守基因片段PTP2为靶序列, 设计并合成TaqMan-MGB实时荧光定量PCR引物及探针, 同时将扩增获得的特异PCR目的基因片段克隆到pMD18-T载体, 得到重组质粒标准品。通过优化反应条件, 建立了EHP TaqMan-MGB实时荧光定量PCR检测方法, 并对该方法进行了灵敏度、特异性和重复性分析。试验结果证明, 该反应体系的最佳退火温度为56℃, 上下游引物浓度为10 μmol/L, 探针浓度为5 μmol/L; 灵敏度检测限最低可达到 2.7×10^2 拷贝/反应。特异性试验表明, 该方法与WSSV、IHHNV和SHIV这三种水生动物病原无交叉反应, 只与目标病原有特异性扩增。重复性试验显示, 该方法具备良好的重复性及稳定性。采用研究建立的检测方法, 初步应用在了实际临床样品检测中, 结果显示, 该方法与TaqMan荧光定量PCR方法具有类似的敏感性。以上结果显示, 研究建立的EHP的TaqMan-MGB实时荧光定量PCR方法具有较高的敏感性、良好的特异性及重复性, 适用于虾类及产品肝肠胞虫的检测与监测。

关键词

虾肝肠胞虫, 实时荧光PCR, TaqMan-MGB, 检测

Establishment of TaqMan-MGB Fluorescence Quantitative PCR for Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Shrimp

Huijun Zhao*, Qiang Hu, Yanhua Pang

Dalian Customs Technical Center, Dalian Liaoning

Received: Sep. 1st, 2022; accepted: Sep. 12th, 2022; published: Sep. 26th, 2022

*通讯作者。

Abstract

In recent years, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) has seriously threatened the healthy growth of shrimp. In order to accurately and quickly detect this pathogen, the conserved gene fragment ptp 2 of EHP was selected as the target sequence, and TaqMan-MGB real-time fluorescent quantitative PCR primers and probes were designed and synthesized. At the same time, the amplified specific PCR target gene fragment was cloned into pMD18-T vector to obtain the recombinant plasmid standard. By optimizing the reaction conditions, a real-time fluorescent quantitative PCR method for EHP TaqMan-MGB was established, and the sensitivity, specificity and reproducibility of the method were analyzed. The results showed that the optimal annealing temperature of the reaction system was 56°C, the concentration of primers in the upstream and downstream was 10 μmol/l and the probe concentration was 5 μmol/L; the sensitivity detection limit can reach at least 2.7×10^2 copies/reaction. The specificity test showed that the method had no cross-reaction with WSSV, IHNV and SHIV, and only had specific amplification with the target pathogen. The repeatability test shows that the method has good repeatability and stability. The established detection method has been applied to the detection of clinical samples. The results show that this method has a similar sensitivity to TaqMan fluorescence quantitative PCR. The above results show that the TaqMan-MGB real-time fluorescence quantitative PCR method for EHP has high sensitivity, good specificity and reproducibility, and is suitable for the detection and monitoring of *Enterocytozoon hepatopenaei* in shrimp and products.

Keywords

Enterocytozoon hepatopenaei (EHP), Real-Time Fluorescent PCR, TaqMan-MGB, Detection

Copyright © 2022 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

南美白对虾肝肠胞虫病(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)是近年来全球对虾养殖生产影响较严重的疾病之一, 肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)是一种专性细胞内寄生的微孢子虫, 属于真菌界(Fungi)微孢子虫门(Microsporidia)单倍期纲(Haplophasea)壶孢目(Chytridiopsida)肠胞虫科(Enterocytozoonidae)肠胞虫属(*Enterocytozoon*), 是导致斑节对虾(*Penaeus monodon*)和南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)肝胰腺微孢子虫病(*Hepatopancreatic microsporidiosis*, HPM)的病原。患病虾主要表现为白便综合症(White Feces Syndrome, WFS)及生长迟缓综合症(Monodon Slow Growth Syndrome, MSGS)等症状[1] [2]。2009年在泰国生长缓慢的斑节对虾中被首次发现分离而命名, EHP易感染斑节对虾和凡纳滨对虾, 2013年EHP在国内首次发现, 2017年, 我国超过一半的对虾养殖户出现亏损, 经济损失达3亿元, 肝肠胞虫寄生已成为影响我国沿海地区南美白对虾产业发展的一大障碍[3] [4]。

由于肝肠胞虫病给虾类养殖业带来的严重危害及巨大经济损失, 因此, 非常有必要建立一种准确、快速、灵敏的检测方法对其进行监控, 从而保证虾类养殖业的健康发展。目前, 已知报道的肝肠胞虫检测方法主要有: 组织病理学、套氏PCR法、重组酶介导核酸扩增方法、原位杂交、环介导等温扩增(LAMP)法等[5] [6], 这些方法在检测时限、操作简便程度、易出现假阳性等方面存在一定的不足, 在大量样品同时检测时, 无法满足及时快速出具精准检测结果的实际需求。

近年来, 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术以其简单快速、灵敏度高和成本低廉等优点, 被广泛应用于水生动物病原的分析及检测等领域。相对于普通定性 PCR 方法, 荧光定量 PCR 的检测和分析过程均在密闭的单管里由机器自动完成, 具有自动化程度高、有效解决 PCR 产物污染问题及能定量检测病原体感染等优点, 被认为是实验室检测病原的理想方法。而 TaqMan-MGB 探针是荧光定量 PCR 使用的一种荧光探针, 其 3' 端淬灭基团为不发光的 MGB 结合物, 可实现高 T_m 值的探针长度缩短而有利于提高方法的灵敏度, 且探针 3' 端不发光的淬灭基团与 5' 端报告基团在空间的位置更接近, 使荧光本底降低、检测结果分辨率更高, 因此, TaqMan-MGB 探针在人类及动植物各种病原体的定量检测中得到广泛应用[7]。基于 TaqMan-MGB 探针的优势, 本研究以 EHP 基因保守片段为靶序列, 设计特异性引物, 建立针对 EHP 的快速、敏感、特异的 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 方法检测方法, 实现疾病的早期精准检测与诊断, 为保护我国虾类养殖业发展提供必要的技术支持。

2. 材料与方法

2.1. 阳性组织病料、试剂与仪器

EHP (虾肝肠胞虫)、WSSV (对虾白斑综合征病毒) 及 IHNV (对虾传染性皮下和造血器官坏死病毒)、SHIV (虾血细胞虹彩病毒) 阳性组织病料由本实验室鉴定保存。

Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) 试剂盒、DEPC 水等购于大连宝生物工程公司。

罗氏 LC96 荧光 PCR 仪购于美国罗氏公司; 移液器购于德国 Eppendorf。

2.2. 引物的设计与合成

选取 EHP 特异保守的 PTP2 基因核苷酸片段作为靶序列, 计病原 TaqMan-MGB 特异性引物和探针。利用 BioEdit 软件比对美国国立生物技术信息中心 (NCBI) Genbank 公布的各 EHPPTP2 基因各核苷酸序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件针对目标序列设计 2 条特异性引物及 1 条探针引物。该引物在 EHPPTP2 所在位置如图 1 (黑色方框为上下游引物, 红色方框为探针)。该特异性引物和探针, 由宝生物工程(大连)有限公司合成如下, 具体序列见表 1。

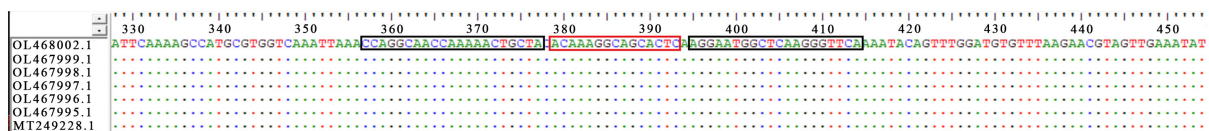


Figure 1. The sequence alignment results of EHP primers and probe

图 1. EHP 引物和探针序列比对结果

Table 1. EHP TaqMan-MGB fluorescent quantitative PCR primer and probe sequences
表 1. EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 引物和探针序列

引物和探针 Name	序列 Sequence
上游引物 Forward primer	5'-CCAGGCAACCAAAAAGCTGCTA-3'
下游引物 Reverse primer	5'-TGAACCCTTGAGCCATTCCT-3'
探针 TaqMan probe	5'-(FAM)-ACAAAGGCAGCACTC-(MGB)-3'

采用表中特异性 PCR 上下游引物扩增目标 DNA 片段, 用于制备阳性质粒作为标准品。

2.3. 病原核酸的提取

采用商品化的病原基因组 DNA/RNA 提取试剂盒说明书, 对 EHP、WSSV、IHHNV 及 SHIV 提取核酸后置 -70°C 保存备用。

2.4. EHP 标准品的制备

为了得到可定量和稳定的 EHP 阳性模板, 需要将扩增的 EHP 目的片段(58 bp)克隆到质粒中。具体为: 利用表 1 将 EHP 核酸进行常规 PCR 扩增, 得到 58 bp 的扩增产物。从琼脂糖凝胶中回收扩增产物。将回收产物连接到 pMD-18-T 载体上, 转化在大肠杆菌 DH5 α 中, 筛选阳性克隆, 提取质粒 DNA, 命名为重组质粒 pMD18-T-EHP-PTP2, 即 EHP 标准品。通过核酸分析仪测定质粒的 OD260、OD280 及其质粒 DNA 浓度, 同时将该标准品换算成拷贝数。将该标准品 DNA 以 10 倍梯度连续稀释至 10^{-8} , -20°C 保存备用。

2.5. TaqMan-MGB 反应体系

以 EHP 标准品为模板, 将其在 LC96 荧光 PCR 仪中进行 TaqMan-MGB PCR 扩增。本实验采用的反应体系为: 10 μL Premix Ex Taq (Probe qPCR) (2X), 0.4 μL 上游引物(10 μM), 0.4 μL 下游引物(10 μM), 0.8 μL 探针(10 μM), 2 μL DNA 模板, 加 6.4 μL DEPC 水将反应总体积补齐至 20 μL 。反应程序为: 首先 95°C 预变性 30 s; 然后进行 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 20 s, 并在此步采集荧光信号, 40 个循环。

2.6. TaqMan-MGB 反应条件优化

以重组质粒 pMD18-T-EHP-PTP2 标准品 DNA 为模板, 在 55°C ~ 65°C 范围内, 每间隔 1°C 的温度梯度进行 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 扩增, 以获得较低阈值循环数(CT)和较高相对荧光强度增加值(ΔRn)时的温度为最佳退火温度。同时, 采用不同的上下游引物终浓度(依次为 2、4、6、8、10 及 12 $\mu\text{mol/L}$)与 TaqMan-MGB 探针终浓度(1、2、3、4 和 5 $\mu\text{mol/L}$)组合进行 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 扩增, 以获得较低 CT 和较高 ΔRn 时的浓度组合为最佳引物和探针浓度组合。

2.7. 标准曲线绘制及敏感性试验

重组质粒 pMD18-T-EHP-PTP2 以 10 倍梯度稀释的标准品 DNA 为模板, 采用优化后的 TaqMan-MGB 探针荧光定量 PCR 进行敏感性试验, 建立模板拷贝数(x)对数与 CT 值(y)间的标准曲线和线性回归方程, 从而根据各标准品 DNA 扩增的 CT 值结果推算出模板浓度。

2.8. 特异性试验

按照优化好的各 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 反应条件进行荧光定量 PCR 扩增。以 WSSV、IHHNV 及 SHIV 作为对照病原, 验证该方法是否与其他水生动物病原存在非特异性交叉反应。

2.9. 重复性实验

选择 3 个连续稀释度的重组质粒标准品为模板, 进行 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 的批内及批间重复性试验。同一反应条件下, 每个稀释度的样品同时进行 3 次重复为批内重复试验。而在不同的时间, 同样的反应条件下进行的 3 次荧光定量 PCR 反应为批间重复试验。

2.10. 临床样品检测

将本研究构建的 EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 对收集的 278 份临床虾类样品进行检测, 同时与标准方法中的 TaqMan 荧光定量 PCR 进行比较。

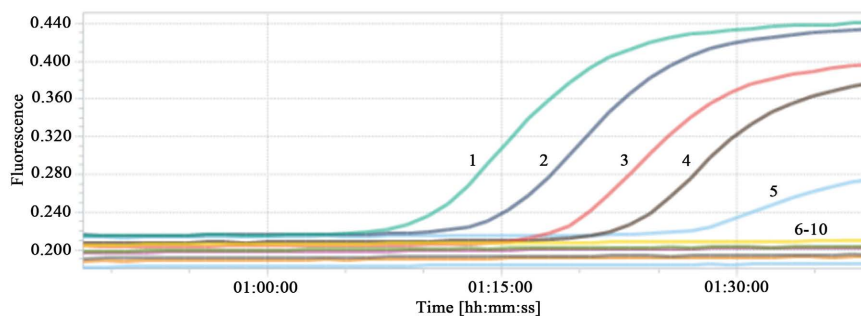
3. 结果与讨论

3.1. EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 最优反应条件

经比较不同退火温度及不同引物和 TaqMan-MGB 探针浓度组合的扩增效果, 最终确定在 EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 20.0 μL 反应体系中, Probe qPCR Mix (2 \times) 10.0 μL , EHP 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL , TaqMan-MGB 探针(5 $\mu\text{mol/L}$) 2.0 μL , DNA 模板 2.0 μL , DEPC 水补足至 20.0 μL 。扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 进行 40 个循环; 在 56 $^{\circ}\text{C}$ 结束时收集荧光信号。

3.2. TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 敏感性试验结果

重组质粒 pMD18-T-EHP-PTP2 以 10 倍梯度稀释的标准品 DNA 为模板, 按照项“2.6”最优反应条件进行荧光定量 PCR 反应, 各稀释度的荧光扩增试验结果如图 2 显示, EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 的检测低限为重组质粒 pMD18-T-EHP-PTP2 标准品的 10^{-4} , 其拷贝数为 2.7×10^2 拷贝/ μL 。



注: 1~10 分别代表重组质粒 pMD18-T-EHP-PTP2 稀释倍数为 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 及阴性对照。

Figure 2. EHP TaqMan-MGB fluorescence quantitative PCR sensitivity test

图 2. EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 敏感性试验

3.3. 标准曲线

根据图 3 得到的不同稀释度的实时荧光扩增曲线。以重组质粒浓度的对数值为横坐标, Ct 值为纵坐标, 绘制标准曲线如下。由图 3 可知, EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 标准曲线的斜率为 -4.95, 截距为 34.95, 相关系数为 0.9993, 得到标准曲线方程为 $y = -4.95 \times \log(X) + 34.95$ 。

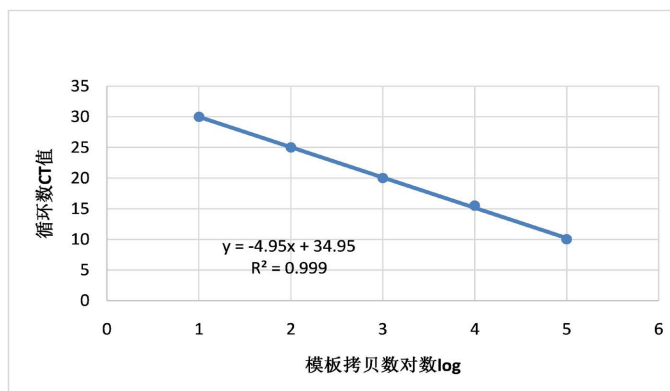
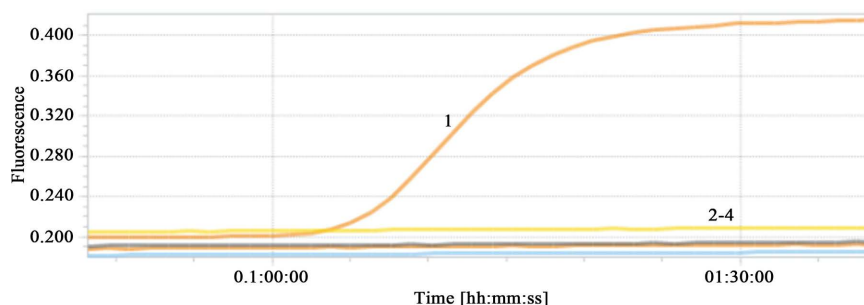


Figure 3. EHP TaqMan-MGB fluorescence quantitative PCR standard curve

图 3. EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 标准曲线

3.4. 特异性试验结果

EHP 进行 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 的特异性检测, 试验结果如下图 4。试验结果显示, 本研究构建的 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 只针对目标病原有显著的特异性扩增, 与其他病原 WSSV、IHHNV 及 SHIV 无交叉反应。



注: 1: EHP, 2: WSSV, 3: IHHNV, 4: SHIV。

Figure 4. EHP TaqMan-MGB fluorescence quantitative PCR specificity test

图 4. EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 特异性试验

3.5. 重复性试验结果

EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 重复性试验结果如下表 2 所示, 批内试验与批间试验的变异系数差别不大, 均小于 1%, 通过标准误差和变异系数可知 EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 的重复性较好。

Table 2. Repeatability of EHP TaqMan-MGB fluorescence quantitative PCR detection

表 2. EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测的重复性

模板稀释度 Template dilution	重复次数 Replication	批内试验 Within the group of test			批间试验 Without the group of test		
		平均值 Average value	标准误差 Standard error	变异系数/% Variable coefficient	平均值 Average value	标准误差 Standard error	变异系数/% Variable coefficient
10^{-0}	3	19.2	0.067	0.35	18.78	0.061	0.32
10^{-1}	3	22.78	0.089	0.39	21.95	0.078	0.36
10^{-2}	3	26.35	0.91	0.35	26.47	0.076	0.29

3.6. 临床样品检测

研究共收集了 278 份国内及进境虾类及其产品, 分别用本研究构建的 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 和 SC/T 7232-2020《虾肝肠胞虫病诊断规程》中的 TaqMan 荧光定量 PCR 进行 EHP 的检测, 检测结果详见表 3。结果显示, 两种方法阳性检出率非常接近, 表明了本研究构建的 EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 可初步应用在实际临床样品的检测与监测中。

Table 3. Detection of EHP in clinical samples (278)

表 3. 临床样品(278 份)中 EHP 的检测

检测方法	278 份		
	阳性样品	阴性样品	检出率
TaqMan-MGB 荧光定量 PCR	31	247	11.15%
TaqMan 荧光定量 PCR	32	246	11.51%

4. 讨论与结论

4.1. 讨论

虾肝肠胞虫病的防治，目前尚无特效的方法，只有建立快速灵敏的检测方法，对疾病进行早期的诊断，采取有效防控措施，才能保持虾类养殖业健康发展。

目前报道的虾肝肠胞虫 EHP 检测方法有多种，各个方法都有各自的优缺点。组织病理学及原位杂交检测手段因其样品制备复杂及操作繁琐耗时，不适合作为日常检测的技术。套氏 PCR 方法需要经过 2 次 PCR 过程，检测时间长，容易出现假阳性。LAMP 方法虽然检测的灵敏度高，但是该方法特别容易污染。因此，本研究需要构建一种方便实用、精准有效的 EHP 检测技术，作为 EHP 日常检测与监测的技术手段。

实时荧光定量 PCR 是在 DNA 扩增反应中加入荧光染料，随着反应的进行，这种染料的荧光强度会不断增强，从而可以对反应中的 DNA 进行定量，具有实时、快速等优点。目前，实时荧光定量 PCR 检测技术为样品中虾肝肠胞虫的检测提供了有力的工具。但是，TaqMan 探针定量 PCR 由于探针长度太长，存在敏感性不够理想的问题，而 TaqMan-MGB 探针由于其 3' 端的 MGB 结合物可提高探针的 Tm 值，使高 Tm 值探针的长度缩短，敏感性更好，TaqMan-MGB 探针原则上只要有一个碱基突变，探针就不会与目的片段杂交，即不产生荧光信号，故特异性更强。此外，MGB 探针 3' 端的淬灭基团为不发光的荧光基团，与报告基团的空间距离更接近，淬灭效果更佳，故杂交的本底小，稳定性和分辨率更优，TaqMan-MGB 探针凭借其技术优势在各种病原体检测中已得到广泛应用。因此，本研究构建了虾肝肠胞虫 EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测技术，具体检测技术流程框图如图 5，影响本 EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测技术构建的主要因素包括探针及引物的保守性、阳性标准品的制备、引物浓度及退火温度等。本研究经过特异性试验、敏感性试验及重复性试验验证，表明构建的 EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测技术特异性强、敏感性高、稳定有效，可初步应用于临床样品的检测。

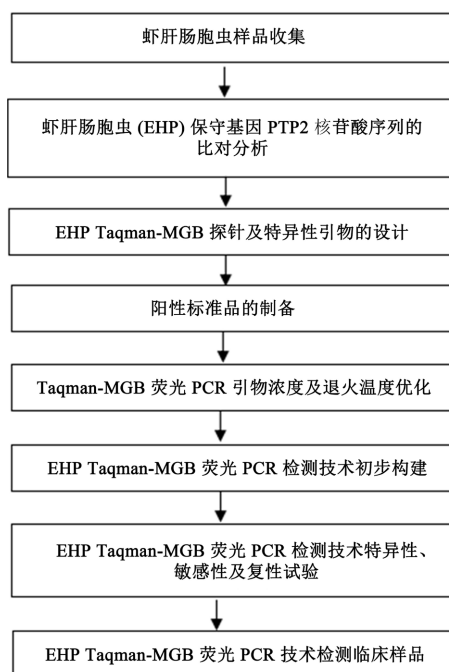


Figure 5. Flow chart of EHP TaqMan-MGB fluorescence quantitative PCR detection technology

图 5. EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测技术流程图

4.2. 结论

本研究建立的 EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测方法实用性较强。在反应过程中, 只需加入引物、探针、模板、反应液便可进行反应。在实验中值得注意的是, 质粒阳性标准品的制备也是建立 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测方法的关键环节, 标准品的制备保障了验证分析 EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测方法时的稳定性及可靠性。本研究采用构建的重组质粒作为阳性标准品, EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 的检测低限为重组质粒 pMD18-T-EHP-PTP2 标准品的 10^{-4} , 其拷贝数为 2.7×10^2 拷贝/ μL 。特异性试验结果显示, 该方法对 WSSV、IHHNV 及 SHIV 等其他水生动物病原均无特异性扩增反应, 特异性良好, 是一种比较实用的鉴别诊断检测方法。重复性试验表明了研究构建的检测方法具有良好的重复性。同时, 该方法初步应用在了临床虾类样品的 EHP 检测中, 与标准方法中推荐使用的 TaqMan 荧光定量 PCR 相比, 两者阳性检出率基本一致, 表明了本研究构建的 EHP TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 技术适用于日常虾类及其产品的检测与检测, 为水产品病原诊断及防控提供了便捷简单的技术手段。

基金项目

海关总署科研项目(2020HK143)。

参考文献

- [1] Chayaburakul, K., Nash, G., Pratanpipat, P., *et al.* (2004) Multiple Pathogens Found in Growth-Retarded Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, **60**, 89-96. <https://doi.org/10.3354/dao060089>
- [2] Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Redman, R.M., *et al.* (2015) Development of *in Situ* Hybridization and PCR Assays for the Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a Microsporidian Parasite Infecting Penaeid Shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, **130**, 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.009>
- [3] 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.
- [4] 乔毅, 沈辉, 万夕和, 等. 南美白对虾肝肠胞虫的分离及形态学观察[J]. 中国水产科学, 2018, 25(5): 1051-1058.
- [5] Rajendran, K.V.R.H., Shivam, S., Ezhil Praveena, P., *et al.* (2016) Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in Farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture*, **454**, 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.034>
- [6] 刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 119-126.
- [7] 马来, 童桂香, 韦信贤, 等. 基于 TaqMan-MGB 探针的虾肝肠胞虫荧光定量 PCR 检测方法[J]. 西南农业学报, 2020, 33(6): 1319-1326.