



席伟军, 陈大福, 郭睿, 等. 环介导等温扩增 (LAMP) 技术检测东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (1): 118–125.

环介导等温扩增 (LAMP) 技术检测东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 的研究

席伟军^{1,2}, 陈大福¹, 郭睿¹, 李江红¹, 梁勤^{1*},
苏晓玲², 赵东绪², 华启云^{2*}

(1. 福建农林大学蜂学学院, 福州 350002; 2. 金华市农业科学研究院, 浙江金华 321017)

摘要: 应用环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术建立一种准确、灵敏、快速的蜜蜂微孢子虫检测方法。本研究根据东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 的依赖 DNA 的 RNA 聚合酶 II 大亚基 (RPB1) 序列, 用在线软件 PrimerExplorer V4.0 online 设计 4 条特异性引物, 分别对 Mg^{2+} 、dNTP、内引物 FIP/BIP 和甜菜碱浓度及反应温度和时间优化; 选择蜜蜂体内常见病原进行该方法的特异性验证, 用 *Mse* I 酶切扩增产物验证其准确性; 将 *N. ceranae* 的 DNA 梯度稀释进行灵敏度检测并与 PCR 比较分析; 最后在临床检测中验证该技术的可行性。结果表明, 优化的体系可在恒温 57℃ 下完成扩增反应; 引物的病原特异性检测仅 *N. ceranae* 有梯状条带, *Mse* I 酶切产物条带符合理论值; LAMP 反应检测的灵敏度较 PCR 高 10 倍; 能够直接从蜜蜂体内检测出 *N. ceranae*。本研究建立的 LAMP 检测 *N. ceranae* 体系准确、快速、成本低, 可为蜜蜂微孢子虫病的检测提供有力的技术支持。

关键词: 环介导等温扩增; 东方蜜蜂微孢子虫; 快速检测

中图分类号: Q965.8; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 01-0118-08

Study on detection of *Nosema ceranae* through Loop-Mediated Isothermal Amplification method

XI Wei-Jun^{1,2}, CHEN Da-Fu¹, GUO Rui¹, LI Jiang-Hong¹, LIANG Qin^{1*}, SU Xiao-Ling², ZHAO Dong-Xu², HUA Qi-Yun^{2*} (1. College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Jinhua Academy of Agricultural Science, Jinhua 321017, Zhejiang Province, China)

Abstract: The objective of this study is to establish a rapid and sensitive method for detecting the *Nosema ceranae* in epidemiological investigations by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP), and to provide technical supports for monitoring and prevention of *N. ceranae* in honeybee. Four specific primers were designed based on the particular sequence of DNA-dependent RNA polymerase II largest subunit (RPB1) of the *N. ceranae* using the soft of PrimerExplorer V4.0 online. The concentration of Mg^{2+} , dNTP, inner FIP/BIP, betaine and reaction times and reaction temperatures were optimized. The specificity of LAMP was tested by using genomic DNA of the common pathogens that infected honeybee. In order to verify accuracy, the LAMP amplified products were digested with *Mse* I restriction enzyme. Moreover, the sensitivity of LAMP was compared with normal PCR by employing ten-fold serially diluted

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (蜜蜂) 建设专项 (CARS-45-SYZ7)

作者简介: 席伟军, 男, 硕士研究生, 主要从事蜜蜂病害研究, E-mail: xiweijung@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: lq-fz@163.com; Jhmfyjs888@aliyun.com

收稿日期 Received: 2016-06-22; 接受日期 Accepted: 2016-11-14

DNA templates of *N. ceranae*. Finally, the practical reliability was achieved in clinical trials. The results showed that: The amplification was successfully performed under isothermal condition at 57°C. The templates of common pathogens were prepared and tested through this method, however, the unique ladder-like bands can only amplified from *N. ceranae* DNA template. Several bands of enzyme digested with *Mse* I are consistent with theory. Sensitivity of the LAMP assay was 10-fold higher than the conventional PCR method, which was capable of detecting *N. ceranae* directly from the infected bee. Therefore, the LAMP for identifying *N. ceranae* described here was proved to be precise, fast as well as cost-saving and could be applied to other associated research domain.

Key words: Loop-Mediated Isothermal Amplification; *Nosema ceranae*; rapidly detective

蜜蜂微孢子虫病是影响蜜蜂健康的一种胞内寄生型真菌病, 现一致认为东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 较西方蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis* 毒性大, 且前者已普遍寄生于西方蜜蜂 *Apis mellifera* (Huang *et al.*, 2015)。微孢子虫对蜜蜂个体的危害严重, 孢子是通过工蜂的卫生行为和相互取食行为, 以水平传播方式侵染成年蜂的中肠 (Fries *et al.*, 1996), 当孢子侵染消化道后, 蜜蜂寿命缩短, 采集力和泌蜡量显著下降, 而且王浆腺发育不完全; 同时中肠由蜜黄色变为灰白色, 环纹消失, 失去弹性, 极易破裂。

目前, 在蜂群中的 *N. ceranae* 比 *N. apis* 常见, 前者是广温性, 后者是狭温性, 前者耐受性更强 (Higes *et al.*, 2010)。有报道, 国内的 12 个省和 2 个自治区检测出 *N. ceranae* 未检测到 *N. apis* (Liu *et al.*, 2008)。在致病性方面, *N. ceranae* 对西方蜜蜂 *A. mellifera* 工蜂的致死率显著高于 *N. apis* 对西方蜜蜂工蜂的致死率 (ID_{50} 也表现为显著差异), 且前者的 ID_{50} 受工蜂日龄影响比后者显著 (Paxton *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2015)。东方蜜蜂 *Apis cerana* 蜂群中, *N. ceranae* 的感染率也比 *N. apis* 高 (Chen *et al.*, 2009)。当使用的烟曲霉素浓度逐渐降低时, 两种孢子的增殖均加剧, 但 *N. ceranae* 的增殖比对照高出 100% (Huang *et al.*, 2013)。另外, 过渡获取蜂产品导致的蜂群营养不协调可能使得孢子更易侵染成年蜂, 从而大量繁殖, 比如工蜂取食商品化的花粉比取食天然花粉更易使孢子增殖 (Fleming *et al.*, 2015), 这种情况在我国饲养的西方蜜蜂中更为突出。因此, 研究一种特异性强、快速、便捷的可用于临床检测单一病原 *N. ceranae* 的技术是必要的, 此种早期诊断法也对蜂群的壮大和获得高产具有重要意义。

对蜜蜂孢子虫病病原的检测方法有, 通过拉取蜜蜂中肠, 然后用普通光学显和相差显微镜观

察孢子虫 (根据孢子大小) (Higes *et al.*, 2006), 以超微结构中的极丝的螺旋数、直径和孢子大小 (Fries *et al.*, 1996), 透射电镜下的胞内结构及根据极丝螺旋数区别两种孢子 (Graaf *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2009); 用流式细胞仪定量检测活性孢子 (Peng *et al.*, 2014); 用普通 PCR (Higes *et al.*, 2006) 和 qPCR (Bourgeois *et al.*, 2010) 检测感染率。在养蜂生产中, 根据观察蜜蜂感染后的中肠的病变形态等临床症状及用光学显微镜方法诊断, 结果均相对滞后且不可靠、检测率低以及不能区别两种孢子; 电镜鉴定方法需要较高的专门操作技术和精密仪器, PCR 检测也需要昂贵的仪器且检测的时间较长。

2000 年 Notomi 等报道了环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术, 其原理是设计 4 条引物而匹配靶序列的 6 个相应区域, 用链置换 DNA 聚合酶 (*Bst* DNA polymerase), 恒温条件下准确高效扩增靶序列; 产物的琼脂糖凝胶电泳条带为梯状, 同时 LAMP 较普通 PCR 灵敏度高, 是普通 PCR 的 10–100 倍; 该方法成本低、反应时间短。目前, LAMP 技术已用于检测多种蜜蜂病原微生物 (Lee *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; 席伟军等, 2016), 2014 年 Ptaszynska 等建立了以 *GspSSD* DNA 聚合酶为基础的扩增 16S rRNA 部分序列的检测 *N. apis* 和 *N. ceranae* (登录号: JQ639306.1, DQ078785) LAMP 反应体系, 2010 年 Lee 等以 *SSU* rRNA (登录号: DQ486027) 为靶序列进行扩增, 建立了检测 *N. ceranae* 的 LAMP 体系。因此, 本试验选择单拷贝的依赖 DNA 的 RNA 聚合酶 II 大亚基 (RPB1) 序列建立 LAMP 体系检测 *N. ceranae*, 其具有准确、灵敏、方便和成本低等优点, 可用于基层单位科研人员的快速检测病原物, 并且对预防和防治蜜蜂微孢子虫病和降低蜂产品中药物残留提供了一定的技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 DNA 聚合酶 (*Bst* DNA Polymerase) 购自 NEB 公司; dNTPs 购自北京全式金生物技术有限公司; *Mse* I 酶购自 NEB 公司; 100 bp ladder DNA marker 购自广州东盛生物科技有限公司; PCR 用 Mix 购自 Thermo 公司; 甜菜碱 (Betaine)、 $MgSO_4$ 购自 Solarbio 公司; 真菌 DNA 抽提试剂盒购自上海生工生物公司; PCR 产物回收试剂盒购自 Promega 公司; Percoll 购自北京索莱宝科技有限公司; 生物光学显微镜 (BK5000) 购自重庆奥特光

学仪器有限责任公司; LAMP 引物和 PCR 引物均委托上海生工生物公司合成。

1.1.2 仪器 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司); Q5000 (V5.4.0) 超微量分光光度计 (Quawell Technology Inc.); DYY-6C 电泳仪 (北京六一仪器厂); JS-680D 成像系统 (上海培清有限公司); 光学显微镜 DK-8D 恒温水槽 (上海精宏实验设备有限公司); G154DS 自动压力蒸汽灭菌器 (致微 (厦门) 仪器有限公司); 阿修罗超纯水机 (重庆阿修罗科技发展有限公司)。

1.2 LAMP 引物的设计与合成

用在线引物设计软件 PrimerExplore V4.0, 根据蜜蜂微孢子虫 RPB1 基因设计引物 (表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of oligonucleotides primers

引物名 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	引物大小 (bp) Primers length
F3	ATGGAATTCCTGTAAAACGAA	21
B3	TATGCACCCCTTCACCAT	18
FIP (F1c-F2)	ACAGGCTGTTTATTTCCACATCC—AAGTGTGTTGTGAGGGAGAA	42
BIP (B1c-B2)	AAGGAATGGGACTTGTTCGT—AAAATAACTTTTCCATCACTGTC	44
Nosc-F	TGGGTTCCCTAAACCTGGTGGTTT	24
Nosc-R	TCACATGACCTGGTGCTCCTTCT	23
Nosa-F	AGCAAGAGACGTTTCTGTTACCTCA	25
Nosa-R	CCTTCACGACCACCCATGGCA	21

1.3 微孢子虫 *Nosema* spp. 的纯化和基因组的提取

2015 年 4 月从教学蜂场的意蜂蜂群巢门口抓取成蜂, 然后用无菌医用镊子拉取其中肠, 400 倍镜检获取侵染孢子的中肠 23 条, 放入 1.5 mL Ep 管中研磨, 然后加 400 μ L 无菌水混合, 低速离心 (3099 $\times$ g) 2 min, 重复 3-4 次直到上清透明为止, Percoll 纯化参照文献 (Huang *et al.*, 2007), 不同浓度的 Percoll (Percoll 用无菌水配制) 液加入顺序为 100%、75%、50%、25%, 并在 4 $^{\circ}$ C, 离心力为 8875 $\times$ g, 离心 30 min, 获取孢子, 用试剂盒提取孢子 DNA, 根据文献引物 (Nosa-F/R 和 Nosc-F/R) 验证确定孢子类型 (Gisder *et al.*, 2013), 然后并在 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 LAMP 法反应体系的建立及优化

以 DNA 为模板, LAMP 反应体系 0.1% Tween-20, Tris-HCl (pH8.8), KCl 10 mmol/L, $(NH_4)_2SO_4$ 10 mmol/L, 外引物 F3 和 B3 分别为 0.5 μ L (10 mmol/L), 1 μ L DNA, 8 U *Bst* DAN 聚合酶

(Notomi *et al.*, 2000)。 Mg^{2+} 终浓度为 0-14 mmol/L, dNTPs 终浓度为 0-1.8 mmol/L, 内引物 FIB/BIF 浓度分别为 0.2-1.8 mmol/L, 甜菜碱终浓度为 0-1.2 mmol/L, 反应温度分别为 55、57、59、61、63、65、67 $^{\circ}$ C, 反应时间 25、30、40、50、60、70、80 min。本试验中凝胶电泳条件为 1 $\times$ TBE 的缓冲液, 5 V/cm 的电场强度, 1.8% 的琼脂糖凝胶。

1.5 LAMP 方法特异性检测和产物的酶切鉴定

以蜜蜂体内的真菌 *Ascosphaera apis*、*N. ceranae* 和 *N. apis*, 欧洲幼虫腐臭病 (Europeanfoulbrood, EFB) 的病原蜂房球菌 *Melissococcus pluton*, 病毒 DWV、SBV、BQCV、IAPV 的 DNA 或 RNA 做特性检测试验。其中 *N. apis*、IAPV 样品由福建农林大学蜂学学院蜜蜂生理病理实验室提供, 其余为笔者实验室保存。用琼脂糖凝胶电泳分析结果, 用胶回收试剂盒回收 LAMP 产物, 酶切体系为产物

13 μL , *Mse* I 9 μL , 5 μL Buffer, 补水到 50 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 8 h, 然后取 2 μL 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 LAMP 方法灵敏度检测与 PCR 灵敏度检测

对 *N. ceranae* 的 DNA 溶液 10 倍梯度稀释, 然后分别进行 LAMP 反应和 PCR 反应, 并对各自产物进行琼脂糖凝胶电泳。PCR 反应体系为上下游引物 (Nosc-F/R) 各 1 μL , Mix 10 μL , *N. ceranae* DNA 1 μL , ddH₂O 7 μL , 扩增片段长度为 662 bp。

1.7 临床样本检测

2015 年 12 月从意大利蜜蜂蜂场中随机选取 30 群蜂, 在每群的巢门口随机取 15 头工蜂, 拉取中肠, 然后在 1.5 mL 离心管中充分研磨, 再加入 400 μL 无菌水振荡混匀, 2152 $\times g$ 离心 2 min, 重复 3-4 次, 直到上清透明为止, 然后尽可能去除中肠组织 (不用 percoll 液纯化孢子)。用真菌基因组抽提试剂盒提取 DNA; PCR 和 LAMP 反应的扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果与分析

2.1 *Nosema* spp. 的确定

引物 Nosc-F/R 和 Nosa-F/R 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增后凝胶电泳图显示, 泳道 2 条带大小为 662 bp, 符号理论条带大小, 泳道 4 无条带 (图 1), 说明获得的孢子为 *N. ceranae*。

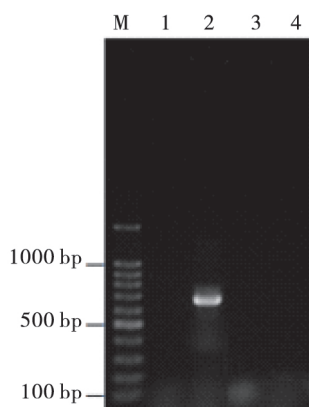


图 1 PCR 鉴定 *N. ceranae* 结果

Fig. 1 The detection result of PCR for *N. ceranae*

注: M, DNA 标准分子量; 1, 引物 Nosc-F/R 阴性对照; 2, 引物 Nosc-F/R; 3, 引物 Nosa-F/R 阴性对照; 4, 引物引物 Nosa-F/R。Note: M, 100 bp ladder size marker; 1, Negative control of Nosc-F/R; 2, The primers of Nosc-F/R; 3, Negative control of Nosa-F/R; 4, The primers of Nosa-F/R.

2.2 LAMP 反应体系优化

2.2.1 镁离子浓度优化

根据试验设置的镁离子终浓度进行反应, 其浓度为 4 mmol/L 时产物的电泳梯度条带最亮, 即泳道 3 所示 (图 2), 因此, LAMP 体系镁离子终浓度为 4 mmol/L。

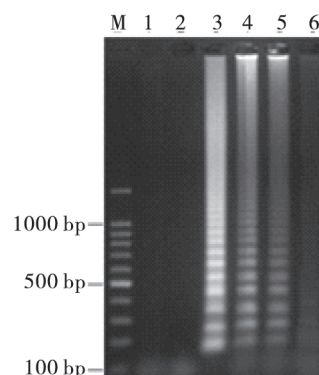


图 2 镁离子浓度对 LAMP 反应的影响

Fig. 2 Effect of Mg^{2+} concentration on LAMP

注: M, DNA 标准分子量; 1, 阴性对照; 2-6, Mg^{2+} 终浓度分别为 0、4、8、12、16 mmol/L。Note: M, 100 bp ladder size marker; 1, Negative control; 2-6, Mg^{2+} concentration was 0, 4, 8, 12, 16 mmol/L, respectively.

2.2.2 甜菜碱浓度优化

根据试验设置的甜菜碱进行反应, 考虑到成本和电泳梯度条带亮度, 选择 0 mol/L 的甜菜碱浓度, 即泳道 2 所示 (图 3), 因此, LAMP 反应中可以不添加甜菜碱。

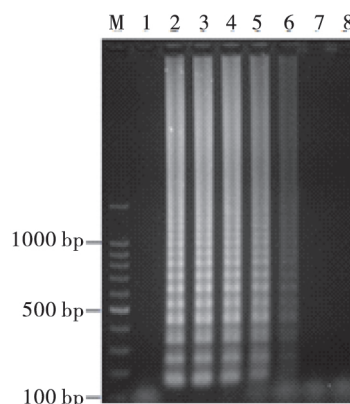


图 3 甜菜碱浓度对 LAMP 反应的影响

Fig. 3 Effect of betaine concentration on LAMP

注: M, DNA 标准分子量; 1, 阴性对照; 2-8, 甜菜碱终浓度分别为 0、0.5、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mol/L。Note: M, 100 bp ladder size marker; 1, Negative control; 2-8, Betaine concentration was 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mol/L, respectively.

2.2.3 dNTPs 浓度优化

根据试验设置的 dNTPs 终浓度进行反应, 考虑到 dNTPs 是酶的底物和条带的亮度, 选择 LAMP 体系 dNTPs 终浓度为 1.0 mmol/L, 即泳道 7 所示条带 (图 4)。

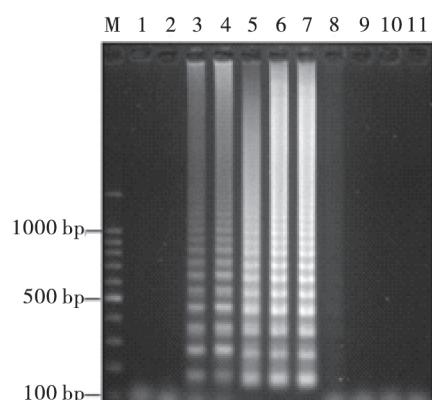


图 4 dNTPs 浓度对 LAMP 反应的影响

Fig. 4 Effect of dNTPs concentration on LAMP

注: M, DNA 标准分子量; 1, 阴性对照; 2-11, dNTPs 终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mmol/L。Note: M, 100 bp ladder size marker; 1, Negative control; 2-11, dNTPs concentration was 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 mmol/L, respectively.

2.2.4 内引物 FIB/BIF 浓度优化

根据试验设置的内引物 FIB/BIF 浓度终浓度进行反应, 随内引物浓度增大, 扩增量先增大后减少, 泳道 9、10 的条带亮度变化不明显, 综合条带亮度和扩增量, 选择泳道 8 所示浓度 (图 5), 即 LAMP 体系 FIB/BIF 终浓度为 1.4 mmol/L。

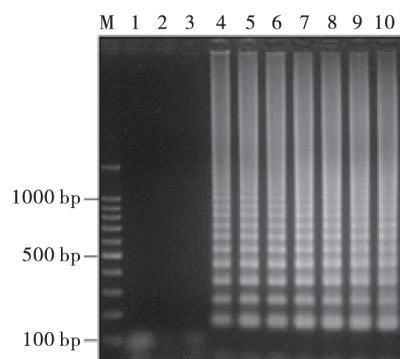


图 5 内引物 FIB/BIF 浓度对 LAMP 反应的影响

Fig. 5 Effect of inner primer concentration on LAMP

注: M, DNA 标准分子量; 1, 阴性对照; 2-10, 内引物 FIB/BIF 终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mmol/L。Note: M, 100 bp ladder size marker; 1, Negative control; 2-10, Inner primer concentration was 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 mmol/L, respectively.

2.2.5 温度优化

根据试验设置温度进行反应, 温度在 55℃ 时电泳条带亮度略亮, 57℃ 和 59℃ 不明显, 考虑假阳性和灵敏度, 选择 57℃ 作为反应温度, 即泳道 3 所示 (图 6)。

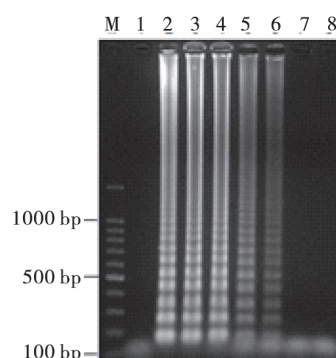


图 6 温度对 LAMP 反应的影响

Fig. 6 Effect of temperature concentration on LAMP

注: M, DNA 标准分子量; 1, 阴性对照; 2-5, 反应温度分别为 55、57、59、61、63、65、67℃。Note: M, 100 bp ladder size marker; 1, Negative control; 2-5, Reaction temperature was 55, 57, 59, 61, 63, 65, and 65℃, respectively.

2.2.6 时间优化

根据试验设置时间进行反应, 反应在 70 min 和 80 min 时电泳条带亮度区别不明显, 反应 80 min 后阴性对照也无条带出现, 说明引物间的反应在时间因素上未引起假阳性及未污染; 为满足检测需要, 可选择反应 70 min 作为反应时间, 即泳道 7 所示 (图 7)。

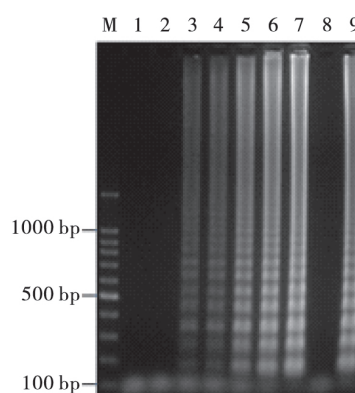


图 7 时间对 LAMP 反应的影响

Fig. 7 Effect of reaction time on LAMP

注: M, DNA 标准分子量; 1 和 8, 分别为 70 min 和 80 min 的阴性对照; 2-7 和 9, 反应时间分别为 25、30、40、50、60、70、80 min。Note: M, 100 bp ladder size marker; 1 and 8, 70 and 80 min negative control, respectively; 2-7 and 9, Reaction time was 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 min, respectively.

2.2.7 特异性和酶切试验

验证建立的 LAMP 体系检测蜜蜂体内病原的特异性, 分别以 *N. ceranae*、*N. apis*、*A. apis* 和 *M. pluton*, 病毒 DWV、SBV、BQCV、IAPV 基因组做

特性检测试验, 电泳图显示只有 *N. ceranae* 可以被检测出, 及泳道 2 所示 (图 8A), 加入 *Mse* I 酶切, 理论片段有 43 bp (产物末端片段, 含量较少)、136 bp 和 190 bp, 泳道 3 所示 (图 8B)。

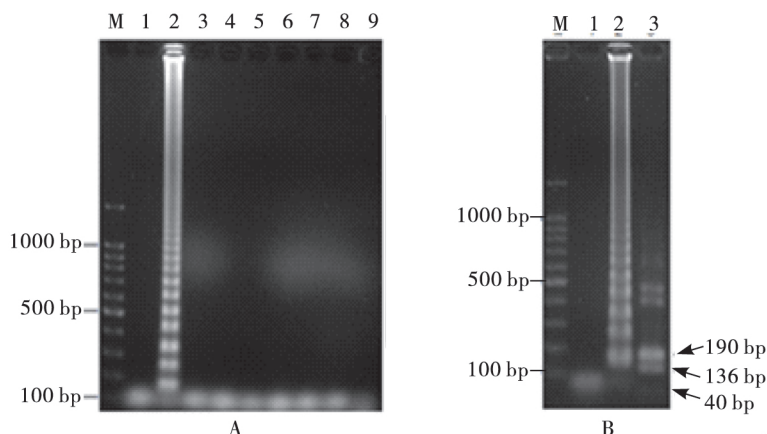


图 8 LAMP 体系的特异性及酶切验证

Fig. 8 The verification of specificity verification of LAMP system and enzyme digestion

注: M, DNA 标准分子量; 1, 阴性对照; A, LAMP 体系的特异性验证; 2-9, 分别为 *N. ceranae*、*N. apis*、*A. apis*、*M. pluton*、DWV、SBV、BQCV 和 IAPV; B, 酶切验证; 2, LAMP 产物; 3, *Mse* I 酶切产物。Note: M, 100 bp ladder size marker, 1, Negative control; A, The verification of specificity verification of LAMP system; 2-9, *N. ceranae*, *N. apis*, *A. apis*, *M. pluton*, DWV, SBV, BQCV, IAPV, respectively; B, The verification of enzyme digestion; 2, Complete LAMP; 3, Complete LAMP product after digestion with *Mse* I.

2.2.8 灵敏度试验

测定提取的 *N. ceranae* DNA 的 $OD_{260}/OD_{280} = 1.91$ 。用 10 倍梯度稀释的 DNA 作为 PCR 和 LAMP 模板。结果显示 PCR 可以检测的最低浓度为

$0.136 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 即泳道 7 所示 (图 9A), LAMP 可以检测到 $0.136 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 即泳道 8 所示 (图 9B), 因此, LAMP 检测 *N. ceranae* 的灵敏度是 PCR 的 10 倍。

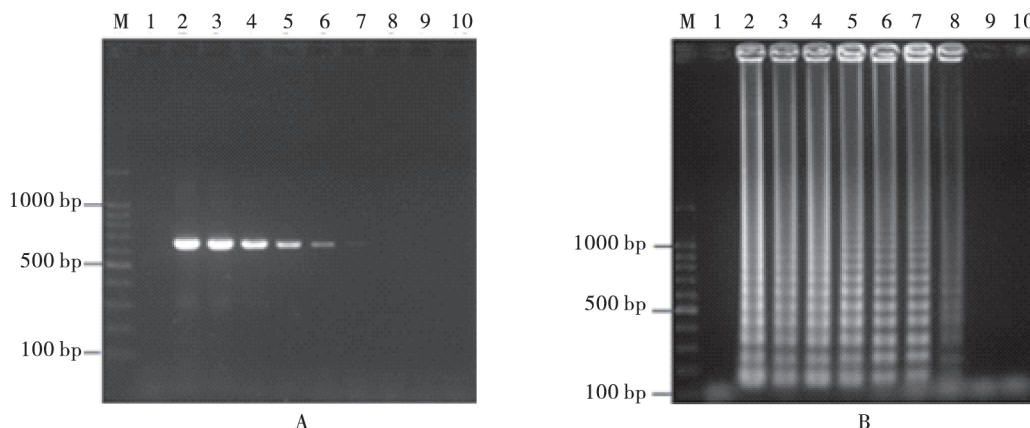


图 9 PCR (A) 和 LAMP (B) 灵敏度试验验证

Fig. 9 Test of sensitivity of PCR (A) and LAMP (B) reaction

注: A, PCR 灵敏度试验; B, LAMP 灵敏度试验; M, DNA 标准分子量; 1, 阴性对照; 2-10, DNA 浓度分别为 0.136 、 0.136×10^{-1} 、 0.136×10^{-2} 、 0.136×10^{-3} 、 0.136×10^{-4} 、 0.136×10^{-5} 、 0.136×10^{-6} 、 0.136×10^{-7} 、 $0.136 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。Note: A and B, Test of sensitivity of PCR and LAMP reaction, respectively; M, 100 bp ladder; 1, Negative control; 2-10, DNA concentration was 0.136 , 0.136×10^{-1} , 0.136×10^{-2} , 0.136×10^{-3} , 0.136×10^{-4} , 0.136×10^{-5} , 0.136×10^{-6} , 0.136×10^{-7} , $0.136 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectively.

2.2.9 临床检测

用两种方法检测的蜂群样本被 *N. ceranae* 感染的结果, PCR 检测的阳性率为 70% (图 10A),

LAMP 检测的阳性率为 76% (图 10B), 后者比前者在泳道 11 和 27 多检测到 2 个阳性样, 同时也表明两种方法吻合度相当。

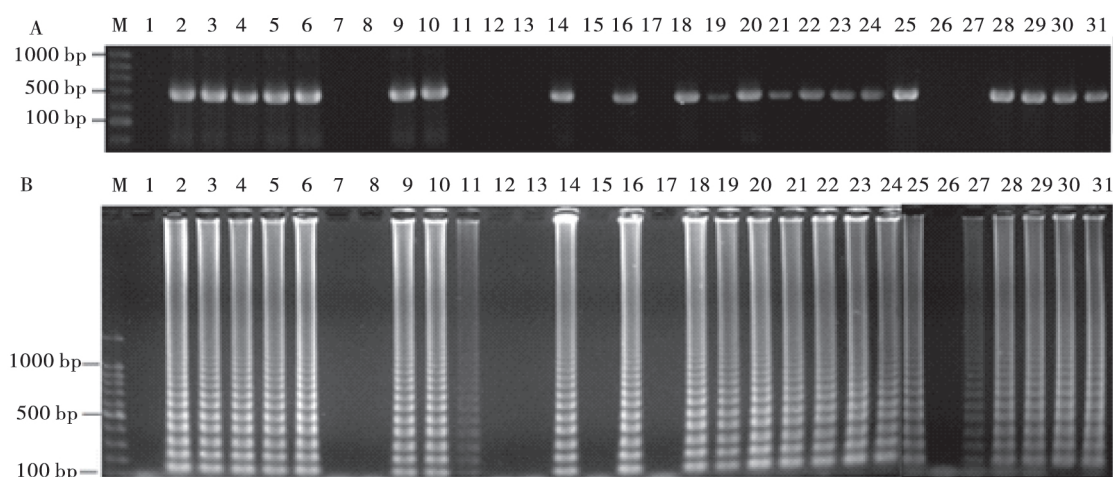


图 10 PCR 和 LAMP 临床检测电泳结果

Fig. 10 Results of PCR (A) and LAMP (B) clinical detection

注: A, PCR 检测结果; B, LAMP 检测结果; M, DNA 标准分子量; 1, 阴性对照; 2-31, 临床样品。Note: A and B, The result of PCR and LAMP, respectively; M, 100 bp ladder; 1, Negative control; 2-31, Several specimen clinical.

3 结论与讨论

N. ceranae 在 IGS 区多态性丰富, SSU 和 16S rRNA 也有插入/缺失及 SNP, 小片段增添现象, 然而这些碱基的变化未影响核糖体的活性 (Sagastume *et al.*, 2011; Sagastume *et al.*, 2014), 但这些序列用于分子检测而区别不同种, 存在一定的交叉性, 如 2013 年 Gisder 等报道了以 16S rRNA 为扩增序列检测两种蜜蜂微孢子虫病混合样时结果的不可靠性和低阳性率, 2012 年 Erler 等研究了以 ITS、SSU 或 16S rRNA 为扩增区检测微孢子 *Nosema* spp. 的 PCR 引物的特异性和灵敏性, 部分引物在 *Nosema bombi*、*N. apis* 和 *N. ceranae* 三者间特异性存在交叉。研究熊蜂微孢子 *N. bombi* rRNA 的 SSU、ITS、LSU 序列表明, 其序列有可变的拷贝 (Tay *et al.*, 2005), 以此三者序列构建系统进化和种群遗传可能存在误导 (O'Mahony *et al.*, 2007), *N. ceranae* 的 rDNA 中 IGS 和 SSU 序列多样性也类似, 即相同样本来源的同一分离孢子有两种序列, 同一单倍型地理来源也不同 (Sagastume *et al.*, 2011)。

2014 年 Ptaszynska 等选择了 Gsp SSD DNA 聚合酶进行 LMAP 反应, 与经典的关键酶 *Bst* DNA 聚合酶为基础的扩增相比较, 其产物是否尽为靶序

列的重复的片段的可靠性未论证。因为前者链替代活性极高且有反转录活性, 后者链替代活性较低且没有反转录活性; LAMP 反应的核心步骤是链替代反应, 同时单次反应产物扩增量较 PCR 极大, 而且 6 条引物间的反应及反应的终止时间是否产生假阳性结果不明。

因此, 本研究选择依赖 DNA 的 RNA 聚合酶 II 大亚基 (RPB1) 序列, 用 DANMAN 8 比对 *N. apis* (登录号: DQ996230.1) 和 *N. ceranae* (登录号: XM_002995356.1) 的 RPB1 序列设计 LMAP 引物, 此外, 微孢子的 RPB1 基因比多态性强的 SSU rRNA 序列分析的结果更能表明它属于真菌 (Hirt *et al.*, 1999)。

在可引起试验污染方面, 由于该方法扩增的产物量较 PCR 高, 所以极易因环境中扩增子气溶胶的污染而引起假阳性, 所以试验中加样区和反应区需独立, 同时试剂器材也应保证无污染物存在, 加样前可用 UV 提前处理试验用品, 按照先阴性后阳性加样。另外, 加入环引物可使得反应时间缩短 1/3, 但考虑到引物多引起假阳性高及污染性, 所以本试验中未涉及加入一条或 2 条环引物试验。此外, 不开盖情况下, LAMP 检测的阳性结果也可以根据反应后瞬时低速离心观察反应生成的白色焦磷酸镁沉淀或反应前加入钙黄绿素而反应后反应液变为浅绿色来判定。

参考文献 (References)

- Bourgeois AL, Rinderer TE, Beaman LD. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103 (1): 53–58.
- Chen YP, Evans JD, Zhou L, et al. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 101 (3): 204–209.
- Chen YP, Evans JD, Murphy C, et al. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera* [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2009, 56 (2): 142–147.
- Erler S, Lommatzsch S, Lattorff HM. Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for three pathogens (Microsporidia, *Nosema* spp.) in the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* [J]. *Parasitology Research*, 2012, 110 (4): 1403–1410.
- Fleming JC, Schmehl DR, Ellis JD. Characterizing the impact of commercial pollen substitute diets on the level of *Nosema* spp. in honey bees (*Apis mellifera* L.) [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (7): e0132014.
- Fries I, Feng F, Silva AD, et al. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora: Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae) [J]. *European Journal of Protistology*, 1996, 32: 356–365.
- Lee GJ, Lim HY, Yoon BS. Development of specific detection method for fungal pathogens in honey bee by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Journal of Apiculture*, 2013, 28 (4): 245–250.
- Gisder S, Genersch E. Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 113 (1): 1–6.
- Graaf DC, Raes H, Sabbe G, et al. Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honey bee (*Apis mellifera*) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1994, 63: 74–81.
- Higes M, Garcia-Palencia P, Botias C, et al. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature [J]. *Environmental Microbiology Reports* 2010, 2 (6): 745–748.
- Higes M, Martin R, Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2006, 92 (2): 93–95.
- Hirt RP, Logsdon JM J, Healy B, et al. Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1999, 96: 580–585.
- Huang WF, Jiang JH, Chen YW, et al. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Apidologie*, 2007, 38 (1): 30–37.
- Huang WF, Solter LF, Yau PM, et al. *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees [J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9 (3): e1003185.
- Huang WF, Solter L, Aronstein K, et al. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees [J]. *Journal Invertebr. Pathol.*, 2015, 124: 107–113.
- Lee BR, No JN, Phu NV, et al. Development of method for the detection of *Nosema ceranae* by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Journal of Apiculture*, 2010, 25 (4): 267–274.
- Lee JS, Yong SJ, Lim HY, et al. A simple and sensitive gene-based diagnosis of *Aspergillus flavus* by loop-mediated isothermal amplification in honeybee [J]. *Journal of Apiculture*, 2015, 30 (1): 53–59.
- Liu F, Wang Q, Dai PL, et al. Natural stripe of microsporidia of honeybee in China [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2008, 45 (6): 963–966.
- Notomi T, Hiroto O, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28: 63–69.
- O'Mahony EM, Tay WT, Paxton RJ. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi* [J]. *Journal Eukaryotic Microbiology*, 2007, 54 (1): 103–109.
- Paxton RJ, Klee J, Korpela S, et al. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis* [J]. *Apidologie*, 2007, 38 (6): 558–565.
- Peng Y, Lee-Pullen TF, Heel K, et al. Quantifying spore viability of the honey bee pathogen *Nosema apis* using flow cytometry [J]. *Cytometry Part A*, 2014, 85 (5): 454–462.
- Ptaszynska AA, Borsuk G, Wozniakowski G, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybees [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2014, 357 (1): 40–48.
- Sagastume S, Carmen del Águila, Martin-Hernandez R, et al. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees [J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13 (1): 84–95.
- Sagastume S, Martin-Hernandez R, Higes M, et al. Ribosomal gene polymorphism in small genomes: Analysis of different 16S rRNA sequences expressed in the honeybee parasite *Nosema ceranae* (Microsporidia) [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2014, 61 (1): 42–50.
- Tay WT, O'Mahony EM, Paxton RJ. Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2005, 52 (6): 505–513.
- Xi WJ, Li JH, Chen DF, et al. Diagnosis of the *Ascosphaera apis* by the loop-mediated isothermal amplification [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49 (4): 765–774.
- 席伟军, 李江红, 陈大福, 等. 环介导等温扩增 (LAMP) 技术检测蜜蜂球囊菌 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49 (4): 765–774.