环境昆虫学报 2021，43（1）：260－264
Journal of Environmental Entomology
http：//hjkcxb. alljournals. net
doi：10. 3969/j. issn. 1674－0858. 2021. 01. 28

陈大嵩，黄鸿，吴华，李健雄，戴建青. 利用纳米孔测序鉴定蓖麻蚕病害[J]. 环境昆虫学报，2021，43（1）：260－264.

利用纳米孔测序鉴定蓖麻蚕病害

陈大嵩，黄　鸿，吴　华，李健雄，戴建青*
（广东省科学院动物研究所，广东省动物保护与资源利用重点实验室，广东省野生动物保护与利用公共实验室，广州 510260）

摘要： 蓖麻蚕 *Samia ricini* 为大蚕蛾科樗蚕属的绢丝与食用的非滞育型经济昆虫，且是少数可以室内大量圈养的绢丝昆虫，全年可累代饲养。在蓖麻蚕室内大批量圈养的生产过程可能遭受毁灭性病害的侵害，包括蓖麻蚕微粒子病、脓病、软化病等，且随着累代对病原物的不停积累蚕病会呈现愈发严重的趋势，病原愈发难以清除。因此，对蚕病的监测是防控蚕病爆发的重要手段之一。掌上纳米孔测序仪 MinION 是一款便携式高通量测序平台，便于实地进行 DNA 测序并对病原物进行检测。本文通过 MinION 测序仪对蓖麻蚕病蚕 DNA 进行测序，并对未知病原物 DNA 序列进行分析，探讨了利用 MinION 测序仪鉴定蓖麻蚕病原的可行性，对蚕病的监测提供了保障。

关键词： 蓖麻蚕；MinION；病原；鉴定
中图分类号： Q965；S433　　**文献标识码：** A　　**文章编号：** 1674－0858（2021）01－0260－05

Identifying of *Samia ricini* diseases by nanopore sequencing

CHEN Da-Song，HUANG Hong，LI Jian-Xiong，DAI Jian-Qing*（Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization，Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization，Institute of Zoology，Guangdong Academy of Science，Guangzhou 510260，China）

Abstract: *Samia ricini* is a silk produced and edible non diapause economic insect belonging to Saturniidae family. It is one of the rare silk production insects that can be largely reared indoors，which can be reared in successive generations throughout the year. The large-scale indoor rearing production of *S. ricini* may be ruined by destructive diseases which includes microspore disease，nuclear polyhedrosis disease，and soft rot disease. Diseases will become increasing serious with the continuous accumulation of pathogens，and the pathogens become more difficult to remove. Therefore，disease monitoring is the most important means to prevent the disease outbreak. MinION is a portable high-throughput sequencing platform，which is convenient for pathogen DNA sequencing. In this paper，the DNA of sick *S. ricini* was sequenced by MinION，and the unknown pathogen DNA sequences were attempted to be identified. The feasibility of using MinION to identify the pathogen was discussed，which provided a guarantee for the monitoring of silkworm disease.

Key words: *Samia ricini*；MinION；pathogen；indentification.

蓖麻蚕 *Samia ricini*，又叫惠利蚕、木薯蚕，大蚕蛾科 Saturniidae 樗蚕属的驯养绢丝与食用的非滞育经济型昆虫。原产于印度东北部的阿萨姆邦，由宽带樗蚕 *Samia canningi* 驯化而来（Peigler &

基金项目：广东省省级科技计划（2019B030316018）；广东省科学院科技发展专项（2018GDASCX－0107）
作者简介：陈大嵩，男，1986 年生，博士，助理研究员，主要从事昆虫基因组、昆虫化学生态学研究，E－mail：chendasong@ gmail. com/chends@ giabr. gd. cn
* 通讯作者 Author for correspondence：戴建青，男，博士，主要从事昆虫化学生态学研究，E－mail：jqdai@ giabr. gd. cn
收稿日期 Received：2020－10－28；接受日期 Accepted：2020－12－14

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Calhoun，2013）。我国自 1951 年，由中国科学院实验生物研究所朱洗教授引进饲养蓖麻蚕。蓖麻蚕茧壳奶白色，可用于生产绢纺原料，为全世界仅次于家蚕与柞蚕的第三大绢丝昆虫，其蚕丝质量仅次于家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 并优于柞蚕 *Antherea pernyi* Guerin-Meneville（van Beek *et al.*，2000），蚕丝可设计成优良的生物材料与细胞支撑介质（Pal *et al.*，2013），其熟蚕与蛹亦是优质昆虫食品（Longvah *et al.*，2011），蚕蛹油脂可提炼优质健康的食用油（王卫飞等，2018），卵可繁殖多种寄生蜂（莫现会等，2016）。蓖麻蚕即可室内饲养亦可放养，除家蚕外，为仅有的几种可以在室内大量圈养的绢丝昆虫。蓖麻蚕的寄主植物相较家蚕与柞蚕更广，一般以大戟科的蓖麻与木薯做饲料大量饲养，替代寄主包括大戟科的乌桕 *Sapium sebiferum*（L.）Roxb.、夹竹桃科的鸡蛋花 *Plumeria rubra*、苦木科的臭椿 *Ajuga lupulina*、马桑科马桑 *Coriaria nepalensis* Wall.、芸香科吴茱萸 *Euodia ruticarpa*、菊科的蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. 和莴苣 *Lactuca sativa* L. var. angustanaIrish. 等。以蓖麻－蓖麻蚕与木薯－蓖麻蚕的形式进行栽培－养殖的联合增加了蓖麻与木薯的产值，是带动蓖麻与木薯种植业的重要因素之一。

蓖麻蚕生产上可能遭受侵害的毁灭性病害包括蓖麻蚕微粒子病（刘士贤等，1964；谢伟东，1989）、脓病（叶育昌，1982；李敏棠等，1985）、软化病等（吴汝章，1987），甚至同时感染多个疾病。此外，被污染的蚕室、蚕具、蚕卵很易残留病原，且随着累代对病原物的不停积累，蚕病会呈现愈发严重的趋势并且病原物亦愈发难以清除。目前常用的分子生物学检测蚕病病原手段包括 PCR、实时荧光 qPCR、环介导等温扩增 LAMP、巢式 PCR 等方法。随着高通量测序方法的发展，测序成本的不断降低，高通量检测方法被广泛应用在各种病原的检测中。在各高通量测序平台中，牛津纳米孔公司 Oxford Nanopore 的掌上纳米孔测序仪 MinION 是一款便携式测序仪，能够直接进行 DNA 和 RNA 测序，拥有超长的读长、实时测序、随时终止等特性，被广泛应用在检测多种病原体中（Warwick Dugdale *et al.*，2019；Wongsurawat *et al.*，2019）。本文通过利用 MinION 测序仪对蓖麻蚕病蚕组织样品的 DNA 进行测序，鉴定病蚕感染的病原物，以实现利用高通量测序技术对蓖麻蚕疾病进行监控。

1　材料与方法

1.1　DNA 提取

蚕病取自江苏省南京市蚕农的蚕室，接种于实验室内饲养的蓖麻蚕 1 龄幼虫，接种后至 2～3 龄幼虫集体发病，幼虫脱离寄主、拒食、拉稀，死后呈现发黑、软化等症状，死后蚕体整体用于 DNA 提取以获得足够量的起始 DNA 浓度。待测蚕体首先在 80℃孵育 5 min 以杀灭病原以防交叉污染，每 1 g 蚕体组织放于 10 mL CTAB 裂解液（2% CTAB，100 mM Tris（pH 8.0），20 mM EDTA，1.4 M NaCl，3%疏基乙醇）中研磨，65℃水浴 2 h。待降温至室温，加入等体积的酚氯仿异戊醇（25∶24∶1）萃取，震荡 10 s 后离心10 min，取上清液重复上一步再次加入等体积的酚氯仿异戊醇萃取。上清液加入等体积的异丙醇沉淀 DNA，颠倒混匀后，离心 10 min。弃上清留取 DNA 沉淀，加入适量 70% 乙醇清洗 DNA，离心5 min 后弃上清并用移液器吸干液体，晾干 DNA 后加入 100 μL 无菌水溶解 DNA。

1.2　纳米孔测序文库构建

DNA 溶液经过微量分光光度计测量 DNA 含量，取 2 μg DNA 溶液加入 Covaris g-TUBE 打断管上部，8 500 r/min 离心 1 min 将 DNA 溶液离心到下部，颠倒后 8 500 r/min 离心 1 min 将 DNA 溶液重新离心到上部，DNA 溶液取出 1 μL 加入微量分光光度计测量 DNA 含量并保证 1 μg 以上的 DNA 用于下一步实验。利用末端修复试剂盒（NEBNext End repair / dA-tailing Module，E7546）对打断的 DNA 进行末端修复，利用磁珠（AMPure XP beads）对 DNA 文库进行回收，取 1 μL 文库加入微量分光光度计测量 DNA 含量并保证 700 ng 以上的 DNA 用于测序。利用末端连接试剂盒（NEB Blunt/TA Ligase Master Mix，M0367）把连接测序试剂盒（1D Genomic DNA by ligation，SQK-LSK108）中的接头连接到 DNA 上，并用 AMPure XP 磁珠回收 DNA 文库，取 1 μL 文库加入微量分光光度计测量 DNA 含量并保证 430 ng 以上的 DNA

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

用于测序。DNA 测序芯片（Flow Cells R. 9. 4. 1）放入 MinION 测序仪并连接电脑，对机器与芯片进行质检并保证芯片有 800 以上的可用纳米孔，从芯片 priming port 孔取出 20 ~ 30 μL 缓冲液以去除气泡，从 priming port 加入 800 μL 测序缓冲液并静置 5 min。打开 sample port 孔，再次从 priming port 加入 200 μL 测序缓冲液，DNA 文库与连接测序试剂盒中的测序珠（LLB）与缓冲液（RBF）混合，一滴一滴加入到 sample port 孔，关闭 sample port 与 priming port。

1.3 纳米孔测序与分析

MinION 测序仪运行 48 h，合并获得 fastq 文件，测序原始数据储存在国家基因库生命大数据可信计算平台（项目编号：CNP0001421，测序编号：CNR0339720）。从公共核酸序列数据库 NCBI 下载各微孢子、各核多角体病毒、白僵菌、柞蚕肠球菌基因组，作为病原体序列数据库，利用 minimap2（v2. 17）把测序序列比对到病原体数据库中，以检测测序结果。

2 结果与分析

通过 MinION 测序仪获得 2 116 314 条 DNA 序列约 1. 87 G 个碱基，最长 53 282 bp，中位数 563，均值 884，序列长度大多超过 300 bp 且集中在 300 ~ 1 500 bp 长度（图 1）。其中，4 476 条序列（占总序列 2. 1‰）被 minimap2 比对到病原数据库（图 2），且与比对到蓖麻蚕基因组类似，序列长度与比对碱基数量的散点图集中在一片 V 字区域，并没有线性关系。比对长度超过 800 pb 的序列中 157 条序列比对到家蚕微粒子 *Nosema bombycis* 基因组，139 条序列比对到柞蚕肠球菌 *Enterococcus pernyi* 基因组（部分比对结果见表 1），比对长度超过 300 bp 的序列分别有 206 和 313 条序列比对到家蚕微粒子和柞蚕肠球菌基因组（图 3），这说明样品组织已经感染两种病原体。

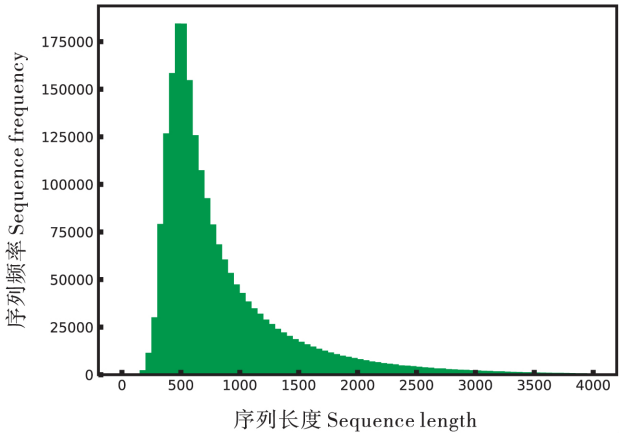

图 1 MinION 测序序列长度分布图

Fig. 1 Distribution of the sequence lengths obtained by MinION

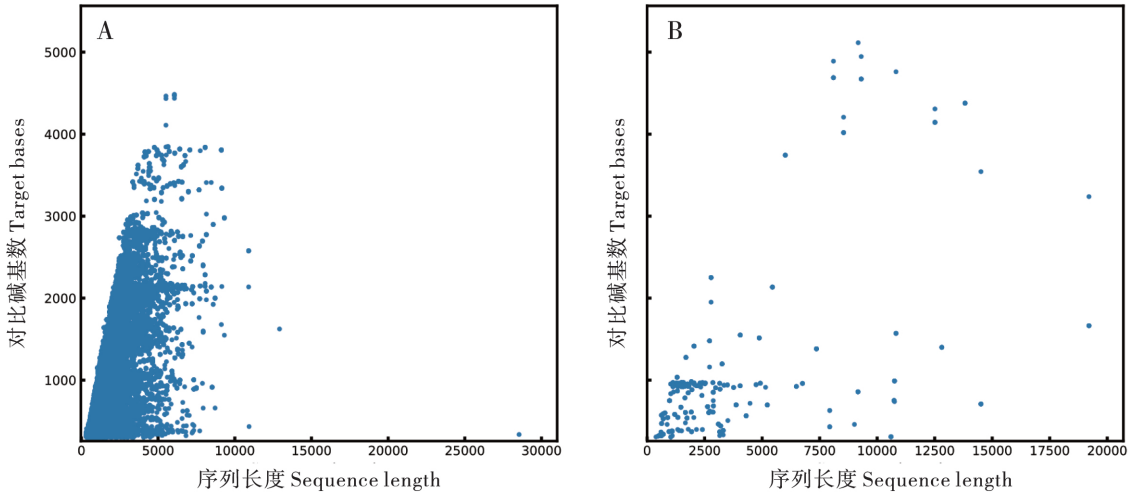

图 2 序列比对结果散点图

Fig. 2 Scatter plot of mapping result

注：A 图，序列与蓖麻蚕基因组比对结果；B 图，序列与病原数据库比对结果。Note: A, mapping results to genome; B, mapping results to pathogen database.

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　部分序列比对结果

Table 1　Sequence mapping results

比对序列 Query name	序列长度 Length	比中 ID Target ID	比中病原 Target pathogeny	比中序列长度 Target bases
Seq1	9174	NZ_KV388085. 1	*Enterococcus pernyi*	5115
Seq2	9307	NZ_KV388085. 1	*Enterococcus pernyi*	4947
Seq3	8100	NZ_KV388085. 1	*Enterococcus pernyi*	4890
Seq4	10818	NZ_KV388085. 1	*Enterococcus pernyi*	4761
Seq5	13820	NZ_KV388085. 1	*Enterococcus pernyi*	4378
Seq6	12511	NZ_KV388085. 1	*Enterococcus pernyi*	4308
Seq7	8540	NZ_KV388085. 1	*Enterococcus pernyi*	4207
Seq8	6008	NZ_KV388085. 1	*Enterococcus pernyi*	3744
Seq9	14511	NZ_KV388085. 1	*Enterococcus pernyi*	3543
Seq10	19205	NZ_KV388085. 1	*Enterococcus pernyi*	3238
Seq11	1924	KB909441. 1	*Nosema bombycis*	982
Seq12	1496	KB908947. 1	*Nosema bombycis*	972
Seq13	1579	KB909432. 1	*Nosema bombycis*	971
Seq14	2403	KB908947. 1	*Nosema bombycis*	970
Seq15	2859	KB909441. 1	*Nosema bombycis*	970
Seq16	1279	KB909441. 1	*Nosema bombycis*	966
Seq17	2298	KB909432. 1	*Nosema bombycis*	964
Seq18	2529	KB909441. 1	*Nosema bombycis*	964
Seq19	1385	KB908947. 1	*Nosema bombycis*	962
Seq20	4922	KB909432. 1	*Nosema bombycis*	962

注：分别挑选比对到柞蚕肠球菌和微孢子且长度最长的 10 条序列。Note：Each 10 longest sequences mapping to *E. pernyi* and *N. bombycis* were shown.

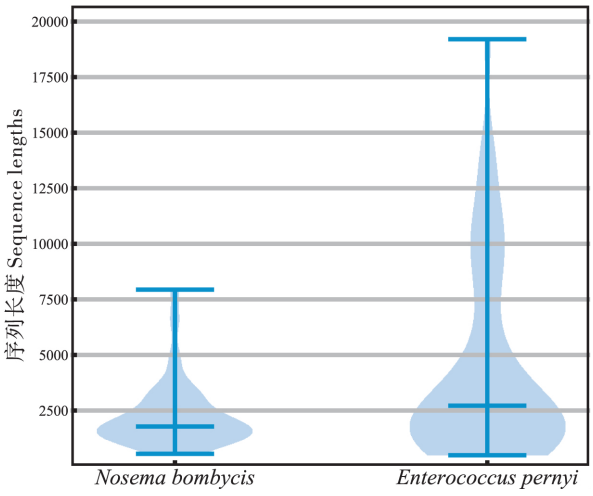

图 3　比对到病原基因组且比对长度超过 300 bp 的序列长度分布小提琴图

Fig. 3　Violin plot of the sequence length mapped to pathology genomes with more than 300 pb mapping length

注：小提琴图宽度代表序列的数量。Note：Widths of violin plot represent the sequence amount.

3　结论与讨论

昆虫组织具有高蛋白质、高脂肪的特性，并且在被病原体感染后，坏死组织的 DNA 被降解，然而高通量测序对 DNA 提取的质量有较高的要求并且起始建库的 DNA 须达到足够数量，因此昆虫 DNA 的提取质量决定了最终测序结果的优劣。本研究采用提高裂解液与增加萃取次数的方式提高 DNA 的提取纯度与数量，为昆虫构建高通量测序文库提供参考。

单分子纳米孔测序技术具有高通量、超长读长、可以直接检测碱基甲基化修饰、无需 PCR 扩增和体积较小便于携带等优势，可应用于动植物和微生物基因组测序、宏基因组测序、RNA 直接测序、微生物检测、DNA 与 RNA 甲基化检测、mRNA 的 polyA 长度定量等研究（曹影等，2020。然而，单分子纳米孔测序的结果具有较高的错误

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

率，是阻碍其应用的关键。目前 MinION 测序仪的单碱基准确率约 85%，修正后的一致性序列的准确率可达 97% ~99%，因此对单分子纳米孔测序的分析具有一定的挑战。在 DNA 文库构建时，本研究通过 DNA 低速离心打断管以获取更长的 DNA 片段以构建测序文库，有利于增加序列比对的长度以增加可信度。值得注意的是，minimap2 的比对长度并未与序列长度成线性关系，可能与 minimap2 的算法有关，因此本研究选取的置信区间为最低 300 bp 的比对长度，即比对长度超过 300 bp 为可信比对结果。同时，比对数据库中病原物基因组序列的丰富度与病原物种类的选择，会对鉴定结果起关键作用并影响最终鉴定结果。因此，在选择病原物种核酸序列时，应尽可能涵盖所有蚕病病原的基因组序列，降低比对错误与假阳性。本实验选择真菌性病害病原、细菌性病害、微粒子基因组以及所有杆状病毒基因组序列，尽可能构建全面的病原序列数据库以降低鉴定的误差，并且通过过滤序列本身长度短且比对长度较短的序列，以增加比对结果可靠性。

本研究通过 MinION 测序仪对蓖麻蚕病蚕基因组进行测序，与病原基因组序列库进行比对，无需 PCR 扩增步骤，降低了假阳性。利用 MinION 等高通量测序手段对病蚕、蚕具或蚕室进行检测不仅可以一次性准确的鉴定蚕病，也摒弃了 PCR 方法可能具备的假阳性现象，而且其不需要模板设计引物，甚至可以鉴定新病原等的特性，可以与 PCR 鉴定方法形成互补，对蚕病的全面监测提供保障。

参考文献 (References)

Cao Y, Li W, Chu X, *et al*. Research progress and application of nanopore sequencing technology [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36 (5): 811 - 819. [曹影, 李伟, 褚鑫, 等. 单分子纳米孔测序技术及其应用研究进展 [J]. 生物工程学报, 2020, 36 (5): 811 - 819]

Longvah T, Mangthya K, Ramulu P. Nutrient composition and protein quality evaluation of eri silkworm (*Samia ricinii*) prepupae and pupae [J]. *Food Chemistry*, 2011, 128 (2): 400 - 403.

Li MT, Dai PH, Xin JH, *et al*. Restriction endonuclease map and electron microscopic observation of ribonucleic acid of *Philasomia ricini* nuclear polyhedrosis virus [J]. *Science of Sericulture*, 1985, 11 (1): 52 - 54. [李敏棠, 戴培桦, 忻纪厚, 等. 蓖麻蚕核多角体病毒核糖核酸的限制性内切酶酶解图谱和电镜观察 [J]. 蚕业科学, 1985, 11 (1): 52 - 54]

Liu SX, Li AQ, Zhu DZ. Relationship between microspore disease of eri-silkworm and field insects [J]. *Science of Sericulture*, 1964, 1: 53 - 58. [刘士贤, 李爱羣, 朱德贞. 蓖麻蚕微粒子病与野外昆虫的关系 [J]. 蚕业科学, 1964, 1: 53 - 58]

Mo XH, Luo Q, Yang QB, *et al*. Review and prospect of cassava silkworm industry in Guangxi [J]. *Guangxi Sericulture*, 2016, 53 (1): 55 - 59. [莫现会, 罗群, 杨其保, 等. 广西木薯蚕(蓖麻蚕)产业发展回顾与展望 [J]. 广西蚕业, 2016, 53 (1): 55 - 59]

Pal S, Kundu J, Talukdar S, *et al*. An emerging functional natural silk biomaterial from the only domesticated non-mulberry *Silkworm Samia ricini* [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2013, 13 (8): 1020 - 1035.

Peigler RS, Calhoun JV. Correct authorship of the name*Phalaena ricini* and the nomenclatural status of the name *Saturnia canningi* (Lepidoptera: Saturniidae) [J]. *Tropical Lepidoptera Research*, 2013, 23 (1): 39 - 43.

van Beek JD, Beaulieu L, Schäfer H, *et al*. Solid-state NMR determination of the secondary structure of *Samia cynthia ricini* silk [J]. *Nature*, 2000, 405 (6790): 1077 - 1079.

Warwick Dugdale J, Solonenko N, Moore K, *et al*. Long-read viral metagenomics captures abundant and microdiverse viral populations and their niche-defining genomic islands [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6800.

Wongsurawat T, Jenjaroenpun P, Taylor MK, *et al*. Rapid sequencing of multiple RNA viruses in their native form [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 260.

Wang WF, Zou YX, Liao ST, *et al*. Research progress on composition, exploitation and utilization of silkworm pupal oil [J]. *Science of Sericulture*, 2018, 44 (2): 321 - 328. [王卫飞, 邹宇晓, 廖森泰, 等. 蚕蛹油脂的组成和开发利用研究进展 [J]. 蚕业科学, 2018, 44 (2): 321 - 328]

Wu RZ. Identification and control of soft rot disease, blood type nuclear polyhedrosis disease and microspore disease of eri - silkworm [J]. *Guangxi Sericulture*, 1987, 2: 30 - 32. [吴汝章. 蓖麻蚕软化病、血液型脓病和微粒子病的识别和防治 [J]. 广西蚕业通讯, 1987, 2: 30 - 32]

Xie WD. Ultrastructural study on microspore of eri - silkworm [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1989, 35 (4): 345 - 347, 457. [谢伟东. 蓖麻蚕微孢子虫的超微结构研究 [J]. 动物学报, 1989, 35 (4): 345 - 347, 457]

Ye YC. Studies on the nucleopolyhedrosis virus of *Philasomia cynthia ricini* and its control [J]. *Science of Sericulture*, 1982, 4: 221 - 226. [叶育昌. 蓖麻蚕核多角体病毒的研究及其预防试验 [J]. 蚕业科学, 1982, 4: 221 - 226]

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net