

引用 LAMP 技术检测家蚕微孢子虫孢子的试验

李丽蓉 张国平 张晓 王心果 李双庆

(湖南省蚕桑科学研究所 410127)

摘要:在家蚕微孢子虫孢子生产检测中引用 LAMP 技术, 比对相应蚕种批次的母蛾镜检和成品卵镜检结果, 试验显示 LAMP 检测对家蚕蚕卵中微孢子 DNA 的灵敏度完全适用于生产检测的要求, 同时前者工作流程耗时大大缩短, 相对具有一定优势, 但因成本限制, 可在一定范围内适用。

关键词:家蚕微孢子虫孢子; 显微镜检测; LAMP 检测; 病原检疫

家蚕微孢子病侵染潜伏期长、传播范围广, 可经食下传染和胚种垂直传染, 是一种制约蚕业稳定健康发展的传染性疫病, 因此其主要病原——家蚕微孢子虫孢子成为了蚕种生产上唯一法定的检疫对象^[1]。自 150 多年前 Louis Pasteur 创立母蛾镜检法以来, 几经改进, 我国的蚕种检疫演变成以母蛾集团磨蛾镜检为主、成品卵镜检为辅的技术体系。该技术体系仅靠肉眼观察判断, 判定的准确性主要依赖检疫人员的技术与经验, 人力物力耗费比较大。另外, 该技术体系主要以母蛾检疫结果来推定蚕种质量, 属于间接验证, 依赖于两个关系的确定性: 一是母蛾与蚕种的对应关系, 二是蚕种带毒率与母蛾带毒率的关系。然而, 在实践中, 前一关系由于生产者利益和检疫者职责的对立时有遭到破坏, 后一关系由于病原微孢子虫来源的多样性和遗传的复杂性变得更加不可确定^[2-3], 给现行的母蛾镜检判定带来很多质疑。目前, 蚕种生产从业者趋向认同成品卵检测更符合贸易交往中产品直接检验的要求, 希望蚕种检疫的最终判定能以成品卵检测为主。而在蚕的整个发育过程中, 蛾最容易检出家蚕微孢子虫孢子, 卵最难检出^[4]。因此, 家蚕微孢子虫孢子的生产检疫需要引进新的检测技术, 主要是针对蚕卵的检测, 既能达到典型病原鉴别的目的, 又能进一步提高检疫的准确性、代表性和及时性。

现代生命科学与分子生物学技术的发展, 为深入开展家蚕微孢子检测防控技术研究提供了有利的条件, 已报道的新检测技术有 PCR 技术^[5]、荧光定量 PCR 技术^[6]、LAMP 技术^[7]等。其中, LAMP 技术不仅敏感性高、特异性好, 而且可视觉直观检测、对仪器要求相对较低。目前, 市面上已有成型的 LAMP 试剂盒^[8], 能在 1h 内实现靶基因的有效扩增, 并配

以相对简便的家蚕微孢子 DNA 提取方法, 在实验室就可肉眼直观效果。笔者结合自身技术水平和工作条件, 将 LAMP 检测技术, 与现行的显微镜检测技术进行对比以期获得 LAMP 技术在实践中应用的经验, 为蚕种检疫提升至分子生物技术水平奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 供试样品

蚕卵样品: 编号 1~9, 为一代杂交种的 9 个不同批次。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂: 家蚕典型微孢子核酸检测试剂盒、SYBR Green I 购自广州迪澳生物技术科技有限公司; 溴化乙锭 (ethidium bromide, EB)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)、Triton X-100、异丙醇 (分析纯) 等均购自北京鼎国生物技术有限公司。

主要仪器: 恒温金属水浴锅, 型号 CHB-202, 杭州博日科技有限公司; 离心机, 型号 5418R, Eppendorf 公司。

1.3 CTAB 法提取家蚕微孢子 DNA

取蚕卵样品的研磨液 200 μ L 于无菌的 1.5mL 离心管中, 12 000rpm 离心 5min, 弃上清。沉淀用 2% CTAB 缓冲液 400 μ L 重悬, 加入 20 μ L 蛋白酶 K (20mg/mL), 然后在振荡器上振荡 20~30s, 55 $^{\circ}$ C 水浴 4h 以上或过夜 (隔半小时振荡一次)。将酶消化后的抽提液从水浴锅中取出, 室温下冷却, 加入 300 μ L 氯仿, 振荡混匀, 12 000rpm 离心 10min。将上清液倒入新的 1.5mL 离心管中, 加入 300 μ L 室温保存的 100% 异丙醇溶液混合, 上下颠倒后置于 4 $^{\circ}$ C 保温 1h 以上, 然后 12 000rpm 离心 10min, 弃上清。DNA 沉淀用 70% 乙醇 300 μ L 洗涤 1~2 次, 然后将

离心管倒置,让其自然晾干,用 30 ~ 50 μ L ddH₂O 溶解 DNA 沉淀,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存过夜后,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 LAMP 检测家蚕微孢子虫 DNA

1.4.1 LAMP 反应体系的配制

反应混合液在冰盒上配制,体积(25 μ L)为:2 \times Reaction Mix 12.5 μ L, *N. bombycis* 典型引物混合液 1 μ L, *Bst* 聚合酶 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。模板 DNA 加入前需加入 15 μ L 的矿物油于反应液上层,作为密封液,避免反应液的蒸发及气溶胶污染。加样时确保移液枪枪头在密封液液面下注入样品;最后在各反应管管盖内侧顶部加入 2 μ L SYBR Green I,作为显色液,将管盖盖紧。

1.4.2 扩增反应及结果检测

将反应管置于恒温金属水浴锅中,63 $^{\circ}$ C 恒温放置 60min。最后,将反应管管盖内侧顶部的显色液弹入反应管,与反应产物混合。在自然光下通过肉眼观察颜色变化,反应产物颜色变化为绿色,说明待测样品含有病原微孢子;反应产物变为橙红色,则不含有病原微孢子。

2 结果与分析

蚕卵样品批次 1 ~ 9 经越年保护和中间感温处理,冷藏后出库至检测时,胚胎阶段应为戊胚子阶段。每份蚕卵样品各取约 40 粒的蚕卵经液氮研磨,采用 1.3 的方法制备 DNA 样品,再用 1.4 的方法进行 LAMP 检测,结果如图 1。各批次蚕种的母蛾检毒结果、成品卵检毒结果与 LAMP 检测结果的对比如表 1。

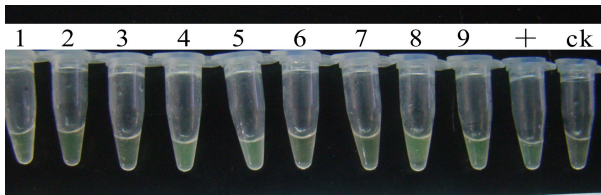


图 1 LAMP 法检测蚕卵样品 1 ~ 9

注:1 ~ 9 为蚕卵样品批次 1 ~ 9 制备的 DNA 样品;+ 为纯 *N. bombycis* 孢子 DNA 对照;ck 为 ddH₂O 对照。

通过图 1 和表 1 可以看到,LAMP 法可以检测出蚕卵中微孢子虫的 DNA,同时母蛾镜检、成品卵镜检以及蚕卵 LAMP 检测结果未完全对应,不过,这

个现象是合理存在的。

表 1 显微镜检结果与 LAMP 检测结果的对比

批次	母蛾镜 检判定	成品卵镜 检判定	LAMP 结果
1	超毒	带毒合格	绿色
2	超毒	带毒合格	绿色
3	超毒	超毒	橙色
4	超毒	带毒合格	绿色
5	超毒	合格	绿色
6	超毒	带毒合格	橙色
7	带毒合格	合格	橙色
8	超毒	合格	绿色
9	超毒	合格	绿色
阳性对照			绿色
空白对照			橙色

研究表明,家蚕微孢子只有在感染了滋养细胞而未感染卵细胞的情况下才能成功发生经卵传染,而其胚种传染率又受蚕品种、微孢子的感染程度和感染时期等因素的影响,大小从 0 到 100% 不等^[4];同时,一代杂交种的母蛾和蚕卵检毒均为抽样调查,尤其是蚕卵样本相对蚕卵整体来说,容量小,样本中病卵出现的概率小,造成生产检测时母蛾微孢子虫孢子的检出率高于成品卵^[9],从显微镜检结果印证了这个规律。

另外,成品卵镜检的样品和 LAMP 检测的蚕卵样品是分别从各批次蚕卵中取得,两个小样本之间具有一定的独立性。笔者曾从一个重约 500g 的超毒蚕卵批次分两次取样本做成品检验,即使在如此小范围,结果仍是第一次无毒,第二次接近超标,而对第二次抽取的大样(约 10g)再次镜检,结果才与第二次镜检相近。

可见在大批量蚕卵中分两次抽样存在一定的随机性,这极有可能导致此次 LAMP 检测结果与成品

卵镜检结果的个别不一致。

3 讨论

目前,蚕种生产上多用双目大视野的显微镜进行家蚕微孢子虫孢子检测,每个视野观察到的孢子数与所检测样品溶液中孢子的浓度有一定的关系。以我们所用的 Leica DM750 相差显微镜(目镜 16×,物镜 40×)为例,通过血细胞计数板(0.01mm,1/400mm²)得出其一个视野下(5×5个最小格)的溶液体积约为 10⁻⁵ mL,若每个视野中均观察到一个微孢子虫孢子,则样品中孢子的浓度为 10⁵ 个/mL。由此,根据观测结果推算出此次成品卵镜检样品研磨液中微孢子虫孢子的浓度大都在 2×10⁴ 个/mL 至 10⁵ 个/mL 的范围。对比结果显示 LAMP 检测能有效地进行鉴别家蚕微孢子虫 DNA。而且,根据燕薇的研究,家蚕微孢子虫 LAMP 法检测的灵敏度甚至可达到 10 个/mL^[10],在目前报道的各种家蚕微孢子虫孢子检测新技术中,只有 LAMP 法的检测灵敏度达到该水平。所以,作为替代显微镜检法的新技术,LAMP 技术相对其它方法具有灵敏度高的优势。

在作业流程方面,成品卵镜检需要经过蚕卵高温多湿催青、孵化培养、手工制样、人工看样等步骤,出具检疫结果须耗时 15 天以上;LAMP 检测需要经过样品 DNA 提取、反应体系制备、扩增反应、显色观察等步骤,出具检疫结果耗时不到 2 天。相比之下,后者可以大大缩短工作时间,在蚕种即浸用种时期,更能及时提供检疫结果。另外,目前一个家蚕微孢子虫孢子检疫团队大致是 6 名检疫员加 6 名临工组成,每天可以完成 1 000 到 1 800 个样品的对检,成本支出主要是人工费、仪器设备折旧费两项。以 LAMP 技术现有操作流程达到同等工作量估计其成本,人工费和仪器设备折旧费最多维持现状,增加的试剂费则是前二者和的 10 倍之多,高昂的成本给该技术的推广带来限制。

所以,目前可以应用 LAMP 技术就有毒样品进行种属鉴别,区分典型家蚕微孢子原虫孢子和其它异种异属的孢子,减少蚕种生产者因非典型孢子淘汰带来的损失。而在生产检测中大范围推广,则需要整合 LAMP 技术的操作流程,立足实现制样、配制反应体系的全自动化,大幅降低人工费的支出,同时提高检测操作的标准化和稳定性;另外,还须大幅降低试剂的生产成本。

参考文献

- [1] 中华人民共和国农业部. 桑蚕一代杂交种检验规程: NY/T 327-1997[S]. 北京:中国标准出版社,1998.
- [2] Takeshi, K. Biology of microsporidians infecting the silk-worm, *Bombyx mori*, in Japan[J]. *Journal of Insect Biotechnology & Sericology*, 2003, 72(1): 1~32.
- [3] 鲁兴萌,吴海平. 桑蚕微粒子的胚种传染率[J]. *蚕桑通报*, 2001, 32(3): 7~10.
- [4] 浙江大学. 家蚕病理学[M]. 北京:中国农业出版社, 2000: 148~173.
- [5] 刘吉平,曹阳,Smith JE,等. 模拟感染家蚕微粒子病的 PCR 分子诊断技术研究[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(12): 1925~1931.
- [6] 何永强,吴珊,鲁兴萌,等. 不同 DNA 抽提方法对普通 PCR 和实时荧光定量 PCR 方法检测家蚕微孢子虫的影响[J]. *昆虫学报*, 2011, 54(11): 1329~1334.
- [7] 刘吉平,程伟,晏育伟,等. 基于 EB1 基因的环介导等温扩增(LAMP)法检测感染家蚕微粒子病的蚕卵[J]. *昆虫学报*, 2015, 58(8): 846~855.
- [8] 刘吉平,杨吉龙. 一种家蚕病原微孢子虫 LAMP 可视化快速检测试剂盒及其检测方法: 中国, 201310026870 [P]. 2013-06-05.
- [9] 黄嫫,彭丽红,邱国祥,等. 家蚕微病母蛾与下一代微孢子孢子检出率关系的初探[J]. *广东蚕业*, 2014, 48(4): 22~24.
- [10] 燕薇. 家蚕微孢子虫检测技术研究及蓝叶虫微孢子虫 RPBI 基因克隆与分析[D]. 镇江:江苏科技大学,2014.