

# 水霉菌环介导等温扩增检测方法的建立

王浩 张楠 杨先乐 吕利群\*

(上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306)

**摘要:** 【目的】建立一种快速简单检测水霉病病原菌的方法。【方法】针对水霉菌 ITS 区基因序列设计 4 条特异性引物, 包括两条外引物和两条内引物, 优化反应条件, 观察检测结果。对该方法的特异性和敏感性进行研究。【结果】建立了环介导等温扩增技术检测水霉菌的方法, 确定了其最适反应条件。该方法能够检测到浓度低至  $10^3$  个/mL 的水霉菌孢子, 其灵敏度是普通 PCR 方法的 100 倍。【结论】建立的检测水霉菌的 LAMP 技术, 具有操作简便快速等特点, 可用做特异性水霉及其孢子的快速鉴定。

**关键词:** 水霉, 环介导等温扩增技术, 检测

## Establishment of a loop-mediated amplification assay for the specific detection of *Saprolegnia* and its spores

WANG Hao ZHANG Nan YANG Xian-Le LÜ Li-Qun\*

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** [Objective] To develop a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Saprolegnia*. [Methods] Four specific LAMP primers (two inner primers and two outer primers) were designed by targeting ITS gene of *Saprolegnia*. After optimizing reaction condition, the positive results of LAMP assay were judged through visible green colour. To evaluate the sensitivity and specificity of the assay by detection of *Saprolegnia* spore samples. [Results] The method of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Saprolegnia* was established. The sensitivity was  $10^3$  spores per mL and was 100 times

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(No. CARS-46-12)

\*通讯作者: Tel: 86-21-61900454; 信箱: lqlv@shou.edu.cn

收稿日期: 2012-02-26; 接受日期: 2012-05-18

higher than normal PCR. **[Conclusion]** LAMP assay is specific and simple to operate without the need of special equipment, our assay presents a promising method for detection of *Saprolegnia* and its spores.

**Keywords:** *Saprolegnia*, LAMP, Detection

水霉病是淡水水产动物最常见的疾病之一。水霉菌是引起鱼类发生水霉病的主要病原,其适应温度范围广,分布范围也很广,一年四季都可以引起鱼类发病<sup>[1]</sup>。水霉菌主要为卵菌纲(Oomycetes)、水霉目(Saprolegniales)、水霉科(Saprolegniaceae)的一些种类,包括水霉属(*Saprolegnia*)、绵霉属(*Achlya*)、丝囊菌属(*Aphanomyces*)<sup>[2]</sup>。水霉菌对宿主无严格的选择性,在水生动物的各个生长阶段均有发生,主要寄生在鱼体伤口和死卵上,危害养殖鱼类和降低鱼卵孵化率<sup>[3]</sup>。在适当条件下,水霉菌丝发育为动孢子囊,动孢子囊内形成游动孢子,游动孢子逸出到水体中,当鱼类皮肤或鳃受到机械损伤及其他病原体的伤害时,鱼体抵抗力降低,水霉孢子在伤口处萌发并开始寄生<sup>[3]</sup>。Ebele M.等研究发现适宜条件下,当养殖水体中水霉孢子的浓度达到 $1.5 \times 10^5$ 个/mL时,实验用鱼可感染上水霉<sup>[4]</sup>。因此,养殖水体中水霉菌孢子检测方法的建立,对水霉病爆发的预警具有重要的意义。与此同时,针对菌丝体(包括孢子囊和孢子等细胞器在内的菌丝团)建立的检测方法,可以对取自鱼体的水霉菌株进行鉴定。

水霉菌传统的鉴定方法主要是基于菌丝形态、无性生殖、游动孢子释放方式等对其进行鉴定,然而这些结构的形成需要较长时间的发育,因而形态学方法难以短时间准确鉴定取自鱼体的水霉菌株。随着分子生物学的快速发展,许多分子生物学手段,如DNA指纹(DNA Fingerprinting)、核糖体rDNA内部转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)、扩增多态性DNA(Ran-

dom amplification of polymorphic DNA, RAPD)等已有效的用于水霉菌的分类研究中<sup>[5]</sup>。但由于上述手段均需要昂贵的仪器设备、繁琐的电泳过程以及对检测人员较高的技术要求,而使其难以在基层普及推广。

环介导等温扩增(LAMP)技术是Notomi等<sup>[6]</sup>在2000年开发出的一种新的DNA扩增方法,已经广泛应用于细菌、寄生虫和病毒的定性检测<sup>[7-9]</sup>。该技术较常规PCR扩增方法提高了敏感性、特异性,并且具有操作简单、设备要求低、检测费用较少、等温高效的特点<sup>[10]</sup>。Li等<sup>[11]</sup>应用LAMP技术检测一种真菌*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*,而应用LAMP技术检测水霉菌国内外均未见文献报道。为此,本研究建立并优化了LAMP技术检测水霉菌孢子及其菌丝体(包括孢子囊和孢子等细胞器在内的菌丝团)的方法,并与传统的PCR检测技术进行比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养基

本实验所用菌株如表1所示。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和玉米粉琼脂培养基(CMA)用于水霉培养。沙保劳(Sabouraud)琼脂培养基<sup>[12]</sup>用于其他真菌培养。

### 1.2 主要试剂和仪器

PDA和CMA培养基,北京陆桥公司;Betaine和MgSO<sub>4</sub>,Sigma公司;Bst DNA聚合酶和dNTPs,New England Biolabs公司;SYBR Green I,北京百泰克生物公司;Lysis Buffer试剂盒、DNA Marker DL5000等,TaKaRa公司;Agrose, Gene公

表 1 实验菌株

Table 1 List of fungal isolates and their sources that were used in the LAMP experiment

菌株 Strain	来源 Sources
水霉菌 GH1 <i>S. ferax</i>	本实验室分离保藏
水霉菌 L2 <i>S. sp.</i>	本实验室分离保藏
水霉菌 L5 <i>S. sp.</i>	本实验室分离保藏
水霉菌 L6 <i>S. sp.</i>	本实验室分离保藏
水霉菌 L7 <i>S. sp.</i>	本实验室分离保藏
水霉菌 JL1 <i>S. sp.</i>	国家水生动物病原库
节菱孢菌 <i>Arthrinium sp.</i>	国家水生动物病原库
白色念珠球菌 <i>C. albicans</i>	中山大学附属医院
热带念珠菌 <i>C. tropicalis</i>	中山大学附属医院
光滑念珠菌 <i>C. glabrata</i>	中山大学附属医院
克柔念珠菌 <i>C. krusei</i>	中山大学附属医院
近平滑念珠菌标准株 <i>C. parapsilosis</i>	中山大学附属医院

司; LAMP 引物等合成于上海生工生物工程有限公司; DC-1015 型低温恒温槽, 上海贺德试验设备有限公司; T-100型 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 凝胶成像仪器, 天能公司。

### 1.3 引物设计合成

结合本实验室水霉菌株 GH1 (BankIt1499735) 和 JL1 (HM637287) ITS rDNA 序列和 GenBank 上公布的水霉菌株 (HM637287、AM228788、EF460351、DQ322632、EU925560) ITS 区序列, 利用 Eiken 公司在线引物设计软件设计一套特异性的 LAMP 引物, 设计原则如 Notomi 等<sup>[6]</sup>所述包括两条外引物 F3、B3 和两条内引物 FIP、BIP。引物由上海生工生物工程有限公司合成。见表 2。

### 1.4 水霉菌 DNA 样品的制备

**1.4.1 CTAB 法:** 参照可小丽等<sup>[5]</sup>的方法从水霉菌丝体(包括孢子囊和孢子等细胞器在内的菌丝团)中提取 DNA。

**1.4.2 Lysis buffer 裂解法:** 从水霉菌孢子中提取 DNA, 将水霉菌培养在 PDA 培养基上, 放置数颗灭菌油菜籽, 25 °C 培养 3-4 d 后, 将油菜籽菌落无菌接种于过滤的灭菌河水中培养 6-7 d。参照夏文伟等<sup>[13]</sup>用 2-3 层灭菌纱布过滤灭菌河水, 制备成孢子悬液。利用 Lysis buffer 试剂盒 (TaKaRa 公司)对孢子悬液进行处理, 使孢子裂解释放基因组 DNA。

### 1.5 LAMP 反应条件及优化

**1.5.1 LAMP 反应体系:** 总反应体系 25  $\mu\text{L}$  包括: 内引物(FIP 和 BIP)、外引物(F3 和 B3)、 $\text{MgSO}_4$ 、Betaine、*Bst* DNA 聚合酶、dNTPs、ThermoPol buffer 和 DNA 模板。

**1.5.2 反应条件的优化:** 初始反应体系设置: 10 $\times$ ThermoPol Reaction buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgSO}_4$  10 mmol/L, dNTPs 0.4 mmol/L, Betaine 0.6 mmol/L, 内引物(FIP 和 BIP) 1  $\mu\text{mol/L}$ , 外引物(F3 和 B3) 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 8 U/ $\mu\text{L}$  *Bst* DNA 聚合酶大片段 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA (应用 1.4.1 中 CTAB 法从水霉菌 GH1 菌丝团中提取的 DNA) 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ , 总反应体系 25  $\mu\text{L}$ 。选取不同浓度梯度的  $\text{Mg}^{2+}$ 、Betaine、dNTPs 和不同浓度比的内外引物, 在不同反应时间和温度下进行反应, 并通过 SYBR Green I 显色效果和 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确定最佳反应条件。

表 2 LAMP 引物  
Table 2 LAMP primers

Primer name	Primer sequence (5'→3')
Forward outer (F3)	GCATGCAATTGAAATACAACCTTTC
Backward outer (B3)	AGAAATGAAACAAGGTTGTGTT
Forward inner primer (FIP)	ATTCGCATTACGTATCGCAGTTAGTGGATGTCTAGGCTCG
Backward inner primer (BIP)	TGAGTCATCAAAAATTTGAACGCACACGGACACTGATACAAAC

## 1.6 特异性实验

参照可小丽等<sup>[5]</sup>方法对水霉菌 GH1 (*S. ferax*)、水霉菌 JL1 (*S. sp.*)<sup>[13]</sup>、水霉菌 L2 (*S. sp.*)、水霉菌 L5 (*S. sp.*)、水霉菌 L6 (*S. sp.*)、水霉菌 L7 (*S. sp.*)和对照霉菌节菱孢菌(*Arthrinium sp.*)、白色念珠菌(*C. albicans*)、热带念珠菌(*C. tropicalis*)、光滑念珠菌(*C. glabrata*)、克柔念珠菌(*C. krusei*)、近平滑念珠菌标准株(*C. parapsilosis*)进行扩增培养,并利用 CTAB 法提取以上菌株 DNA。进行 LAMP 反应,观察 SYBR Green I 显色效果和电泳条带,验证其特异性。

## 1.7 灵敏度实验

将水霉菌 GH1 (*S. ferax*)按照 1.4.2 中方法制备孢子悬液,用无菌水分别稀释成  $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$  个/mL,利用 1.4.2 中 Lysis Buffer 裂解法提取 DNA,分别用 LAMP 法和 PCR 法对其进行扩增检测。PCR 反应条件参照 Bala 等<sup>[14]</sup>方法进行扩增。通过 SYBR Green I 显色效果和琼脂糖凝胶电泳条带,比较 LAMP 技术和 PCR 法检测水霉菌的灵敏度。

## 1.8 临床样品的检测应用

参照张书俊等<sup>[15]</sup>方法利用水霉菌 GH1 (*S. ferax*)、水霉菌 JL1 (*Saprolegnia sp.*)和对照菌株节菱孢菌(*Arthrinium sp.*)感染草鱼,刮取病灶处菌丝体作为临床样品,利用 CTAB 法对以上样品提取 DNA,然后通过 PCR 法<sup>[14]</sup>预检,利用优化后的 LAMP 反应体系进行临床检测,观察反应结果。

# 2 结果

## 2.1 LAMP 反应条件的优化

**2.1.1  $Mg^{2+}$  浓度:** 因为反应体系中游离  $Mg^{2+}$  可以影响引物与模板的特异结合以及 DNA 聚合酶的活性<sup>[16]</sup>,因此,对体系中的  $Mg^{2+}$  浓度进行优化。选择  $Mg^{2+}$  浓度 2–16 mmol/L 进行 LAMP 反

应,如图 1 所示,当反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度为 2–10 mmol/L 时均有条带产生,随着  $Mg^{2+}$  浓度的增大到 10 mmol/L 时条带极微弱并逐渐消失。在 8 mmol/L 附近时条带亮度相似且 8 mmol/L 条带比 10 mmol/L 时较好,故选定 8 mmol/L 为  $Mg^{2+}$  浓度。

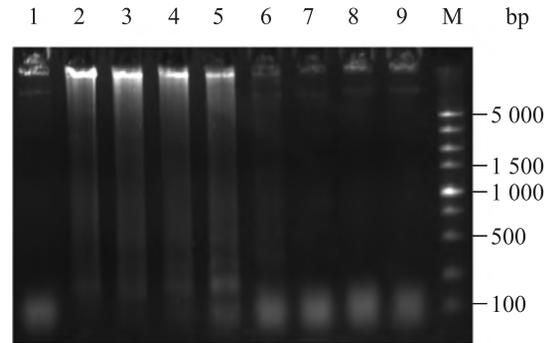


图 1  $Mg^{2+}$  浓度对 LAMP 反应的影响

**Fig. 1 Effects of  $Mg^{2+}$  concentrations on the LAMP reaction**

Note: 1: Negative; 2: 2 mmol/L; 3: 4 mmol/L; 4: 6 mmol/L; 5: 8 mmol/L; 6: 10 mmol/L; 7: 12 mmol/L; 8: 14 mmol/L; 9: 16 mmol/L; M: DL5000.

**2.1.2 Betaine 浓度:** Betaine 可以使双链 DNA 处于不稳定状态,显著性地提高 LAMP 扩增的效率,还可以减少碱基的堆积,使 DNA 聚合酶更容易作用于模板 DNA,在提高整个扩增反应效率的同时,提高对靶序列的选择性,降低非靶序列对于核酸扩增的干扰<sup>[17-18]</sup>,因此对体系中的 Betaine 浓度进行优化。选择 Betaine 浓度为 0–1.2 mol/L 进行反应。由图 2 可知,当反应体系中 Betaine 浓度为 0.6 mol/L 以下时无梯形条带,0.6 mol/L 时开始有较弱条带;0.8 mol/L 时效果最好,之后逐渐减弱,所以选择 0.8 mol/L 为 Betaine 反应浓度。

**2.1.3 dNTPs 浓度:** 反应体系中的 dNTPs 会影响扩增反应的速度以及扩增特异性,所以选择 dNTPs 浓度为 0–1.6 mmol/L 进行反应。由图 3 可知 dNTPs 浓度为 0.8 mmol/L 以下均无条带,浓度

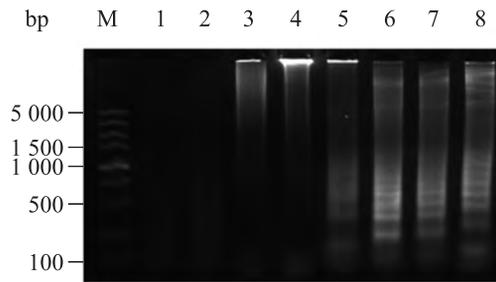


图2 Betaine 浓度对 LAMP 反应的影响

Fig. 2 Effects of Betaine concentrations on the LAMP reaction

Note: M: DL5000; 1: Negative; 2: 0 mol/L; 3: 0.2 mol/L; 4: 0.4 mol/L; 5: 0.6 mol/L; 6: 0.8 mol/L; 7: 1.0 mol/L; 8: 1.2 mol/L.

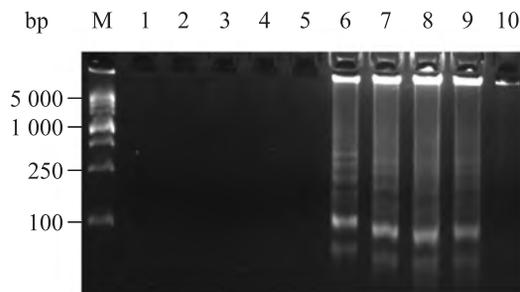


图3 dNTPs 浓度对 LAMP 反应的影响

Fig. 3 Effects of dNTPs concentrations on the LAMP reaction

Note: M: DL5000; 1: Negative control; 2: 0 mmol/L; 3: 0.2 mmol/L; 4: 0.4 mmol/L; 5: 0.6 mmol/L; 6: 0.8 mmol/L; 7: 1.0 mmol/L; 8: 1.2 mmol/L; 9: 1.4 mmol/L; 10: 1.6 mmol/L.

为 0.8–1.2 mmol/L 时条带相似, 1.4 mmol/L 条带减弱说明反应产物量开始减少, 故选取使用量最低且能达到较好反应效果的 0.8 mmol/L 为 dNTPs 的反应浓度。

**2.1.4 温度:** 因为 Endo 等<sup>[19–21]</sup>报道在 LAMP 反应中 *Bst* DNA 聚合酶大片段最适温度在 63 °C 左右效率最高, 故选择 50 °C–64 °C 条件下进行反应, 比较各温度对反应的影响。由图 4 可知, 在 58 °C–64 °C 均有条带, 在 60 °C–64 °C 条件下条带亮度相似, 但 60 °C 条件下比 58 °C 亮很多故选取 60 °C 为反应温度。

**2.1.5 时间:** Notomi 等<sup>[6]</sup>建立的 LAMP 反应时间为 60 min, 但也有报道<sup>[19–20]</sup>在 60 min 以下即可达

到最高效率。为确保 LAMP 反应的可靠性, 选择反应时间为 20–60 min 进行反应。由图 5 可知, 从 40 min 开始有条带, 并且逐渐变亮, 在 60 min 时条带最亮, 说明反应时间为 60 min 时 LAMP 产物量最大, 达到最高反应效率。

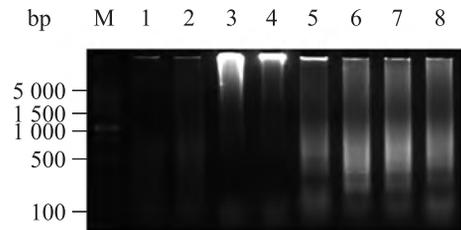


图4 反应温度对 LAMP 反应的影响

Fig. 4 Effects of temperature on the LAMP reaction

Note: M: DL5000; 1: 50 °C; 2: 52 °C; 3: 54 °C; 4: 56 °C; 5: 58 °C; 6: 60 °C; 7: 62 °C; 8: 64 °C.

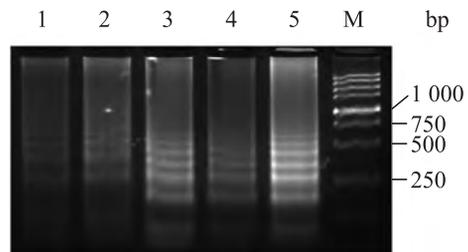


图5 反应时间对 LAMP 反应的影响

Fig. 5 Effects of reaction length on the LAMP reaction

Note: 1: 20 min; 2: 30 min; 3: 40 min; 4: 50 min; 5: 60 min; M: DL5000.

**2.1.6 引物比:** Notomi 等<sup>[6]</sup>报道 4 条引物在 LAMP 扩增反应的起始阶段共同作用识别靶 DNA, 而在扩增循环及延伸阶段仅两条内引物起作用, 所以外引物浓度过高会抑制内引物结合到模板上起始扩增, 浓度太低, 又会导致扩增反应不完全。所以选择外引物和内引物比分别为 1:1、1:2、1:4、1:6、1:8 条件下分别反应。由图 6 可知, 除 1:1 没有条带, 其余比例均有条带, 其中外引物与内引物比为 1:4、1:6、1:8 时条带亮度相似, 但平行试验显示外引物与内引物比为 1:4 时反应结果更稳定, 故选定外引物与内引物比为 1:4。

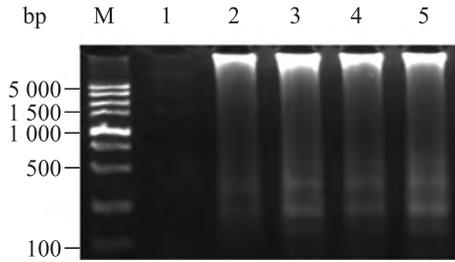


图6 外引物与内引物的浓度比对 LAMP 反应的影响  
Fig. 6 Effects of ratio of outer and inner primers on the LAMP reaction

Note: M: DL5000; 1: Negative; 1: 1:1; 2: 1:2; 3: 1:4; 4: 1:6; 5: 1:8.

综上, 经过优化之后的 LAMP 反应体系 (25  $\mu$ L) 包括: 8 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.8 mol/L Betaine, 0.8 mmol/L dNTPs, 1.6  $\mu$ mol/L 内引物, 0.4  $\mu$ mol/L 外引物, 8 U *Bst* DNA 聚合酶, 1 $\times$ ThermoPol Buffer, 2  $\mu$ L 模板 DNA, 5 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。在 60  $^{\circ}$ C 反应 60 min。

## 2.2 特异性试验结果

如图 7 所示, 12 株测试菌株中, 水霉菌 GH1 (*S. ferax*)、水霉菌 JL1 (*S. sp.*)、水霉菌 L2 (*S. sp.*)、水霉菌 L5 (*S. sp.*)、水霉菌 L6 (*S. sp.*)、水霉菌 L7 (*S. sp.*) 呈现阳性结果且有电泳条带, 对照霉菌节菱孢菌 (*Arthrinium sp.*)、白色念珠球菌 (*C. albicans*)、热带念珠菌 (*C. tropicalis*)、光滑念珠菌 (*C. glabrata*)、克柔念珠菌 (*C. krusei*)、近平滑念珠菌标准株 (*C. parapsilosis*) 呈现阴性结果且无条带。结果表明该方法对水霉菌具有一定的特异性。

## 2.3 灵敏度试验结果

Ebele M 等<sup>[4]</sup>报道, 水体中水霉孢子的浓度为  $1.5 \times 10^5$  个/mL 时, 实验用鱼可感染上水霉, 即水体中孢子浓度为  $1.5 \times 10^5$  个/mL 左右时为水霉爆发的临界浓度。因此选择  $10^3$ – $10^7$  个/mL 进行 LAMP 检测水霉孢子的灵敏度实验, 并与常规 PCR 方法进行对比。由图 8A、8B 所示, 孢子浓度为  $10^3$ – $10^7$  个/mL 时, SYBR Green I 均呈现绿色荧光色, 2% 琼脂糖凝胶电泳均有条带。如图

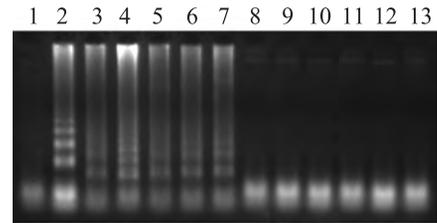


图7 LAMP 特异性检测结果

Fig. 7 The result of LAMP specificity test

注: 1: 阴性对照; 2: 水霉菌 GH1; 3: 水霉菌 JL1; 4: 水霉菌 L2; 5: 水霉菌 L5; 6: 水霉菌 L6; 7: 水霉菌 L7; 8: 对照霉菌节菱孢菌; 9: 白色念珠球菌; 10: 热带念珠菌; 11: 光滑念珠菌; 12: 克柔念珠菌; 13: 近平滑念珠菌标准株。

Note: 1: Negative; 2: GH1 (*S. ferax*); 3: JL1 (*S. sp.*); 4: L2 (*S. sp.*); 5: L5 (*S. sp.*); 6: L6 (*S. sp.*); 7: L7 (*S. sp.*); 8: *Arthrinium sp.*; 9: *C. albicans*; 10: *C. tropicalis*; 11: *C. glabrata*; 12: *C. krusei*; 13: *C. parapsilosis*.

8C 所示, PCR 法检测水霉菌时, 孢子浓度为  $10^5$ – $10^7$  个/mL 时有条带, 而  $10^4$  个/mL 以下无条带。比较 LAMP 和常规 PCR 法检测水霉菌的灵敏度, LAMP 检测方法更加灵敏。

## 2.4 临床检测试验结果

临床样品检测结果如图 9 所示, 水霉菌 GH1 (*S. ferax*)、水霉菌 JL1 (*Saprolegnia sp.*) 感染草鱼病灶处分离的样品经 LAMP 检测后, 呈绿色且有电泳条带; 对照菌株节菱孢菌 (*Arthrinium sp.*) 病灶处分离样品呈橘红色且无电泳条带。说明该 LAMP 法能够应用于水霉菌株的临床检测。

## 3 讨论

水霉病是困扰水产养殖业的重要疾病, 由于对寄主没有严格的选择性, 可以感染草鱼、花鲈、大银鱼在内的水产动物卵、苗种和成体<sup>[22]</sup>, 给水产养殖业造成了巨大的危害。水霉菌对养殖水体环境有很强的适应能力, 抗逆性强, 能形成雄器和藏卵器进行有性生殖以抵御不良环境<sup>[23]</sup>。当鱼类皮肤、鳃受到机械损伤或其他病原体的伤害时, 鱼体抵抗力降低, 水霉菌孢子在鱼体伤口处萌发并形成新的菌丝, 对鱼体造成伤害甚至致死<sup>[24]</sup>。

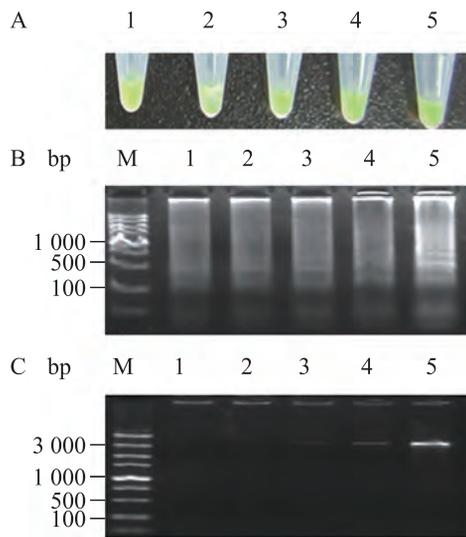


图8 LAMP检测水霉菌的灵敏度试验结果

Fig. 8 Detection limit of LAMP for the mold of *Saprolegnia* genomic DNA

注: M: DL5000; A: LAMP反应可视化结果; B: LAMP反应电泳条带; C: PCR反应电泳条带。1:  $10^3$ 个/mL; 2:  $10^4$ 个/mL; 3:  $10^5$ 个/mL; 4:  $10^6$ 个/mL; 5:  $10^7$ 个/mL。

Note: M: DL5000; A: The visual results of the LAMP reaction; B: Electrophoretic analysis of LAMP reaction; C: Electrophoretic analysis of corresponding PCR reaction. 1:  $10^3$  spores per mL; 2:  $10^4$  spores per mL; 3:  $10^5$  spores per mL; 4:  $10^6$  spores per mL; 5:  $10^7$  spores per mL.

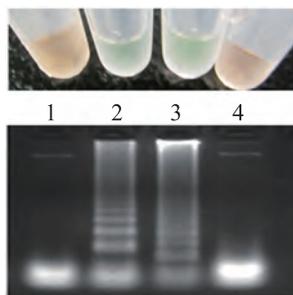


图9 LAMP检测临床样品试验结果

Fig. 9 Detection of LAMP for the clinical samples genomic DNA

注: 1: 阴性对照; 2: 水霉菌 GH1; 3: 水霉菌 JL1; 4: 节菱孢菌。  
Note: 1: Negative; 2: GH1 (*S. ferax*); 3: JL1 (*Saprolegnia* sp.); 4: *Arthrinium* sp..

长期以来孔雀石绿是防治水霉菌的有效药物<sup>[3]</sup>。但由于孔雀石绿能在鱼体内长时间残留,并可可通过食物链对哺乳动物和人类产生致畸、致癌、致

突变等作用<sup>[25]</sup>,所以已禁止在食用鱼类养殖过程中使用孔雀石绿。因此,建立一套快速检测水霉菌丝及孢子的技术,对水霉病的预警、综合防控和水霉病流行病学的研究具有重要的价值。

LAMP技术通过识别靶DNA上6个特定区域的4条引物和一种具有链置换活性的DNA聚合酶,在恒温条件下扩增核酸,保证了扩增的特异性和高效率。LAMP技术方法简便快捷,近些年来在有害微生物检测中发挥着重要的作用<sup>[26-27]</sup>。本研究针对水霉菌ITS区序列设计一套LAMP引物进行扩增,并对反应条件进行优化调整,确保了该扩增方法的可靠性和特异性。对6株非水霉菌真菌进行LAMP扩增,未见有阳性结果。该LAMP检测技术对水霉菌孢子的检测灵敏度可达到 $10^3$ 个/mL,是常规PCR检测方法灵敏度的100倍。同PCR检测方法比较,其耗时短、设备简易、操作简便。本方法提供水霉菌孢子和菌丝体两种样品的检测方案,当养殖水体中孢子浓度达到 $10^3$ 个/mL以上时能定性地检出水霉菌孢子的存在,预警水霉病的爆发;也可以针对鱼体病灶处分离菌丝团进行快速准确的定性检测。

综上所述,本实验建立的水霉菌LAMP检测方法具有灵敏度强,方便、易操作等特点,适合在基层推广使用,为水霉病综合预警、药物防治提供了新的检测方法。

## 参 考 文 献

- [1] Steciow MM, Paul A, Bala K. *Saprolegnia bulbosa* sp. nov. isolated from an Argentine stream: taxonomy and comparison with related species[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 268(2): 225-230.
- [2] Daugherty J, Evans TM, Skillom T, et al. Evolution of spore release mechanisms in the Saprolegniaceae (Oomycetes): evidence from a phylogenetic analysis of internal transcribed spacer sequences[J].

- Fungal Genetics and Biology, 1998, 24(3): 354-363.
- [3] 陈本亮, 张其中. 水霉及水霉病防治的研究进展[J]. 水产科学, 2011, 30(7): 429-434.
- [4] Llondu EM, Arimoro FO, Sodje AP. The use of aqueous extracts of *Vernonia amygdalina* in the control of saprolegniasis in *Clarias gariepinus*, a freshwater fish[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(24): 7130-7132.
- [5] 可小丽, 汪建国, 顾泽茂, 等. 水霉菌的形态及 ITS 区分子鉴定[J]. 水生生物学报, 2010, 34(2): 293-301.
- [6] Notom T, Okayam H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e62.
- [7] 张如胜, 宋克云, 苏良, 等. 环介导等温扩增技术快速检测副溶血性弧菌[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(3): 217-219.
- [8] 卢潍媛, 袁忠英, 沈玉娟, 等. 环介导等温扩增技术检测蓝氏贾第鞭毛虫[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2010, 37(3): 145-147.
- [9] 尹斐斐, 吴家强, 刘少宁, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 LAMP 检测方法的建立[J]. 家畜生态学报, 2011, 32(2): 50-54.
- [10] Endo S, Komori T, Ricci G. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification(LAMP) method[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 234(1): 93-97.
- [11] Li Y, Cai SH. Sensitive and rapid detection of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* by loop-mediated isothermal amplification[J]. Current Microbiology, 2011, 62(5): 1400-1404.
- [12] 张序, 闫常平, 张春艳, 等. 鸡念珠菌病的诊治[J]. 中国兽医杂志, 2001, 37(1): 50.
- [13] 夏文伟, 曹海鹏, 王浩, 等. 彭泽鲫卵源致病性水霉的鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(1): 57-62.
- [14] Bala K, Robideau GP, Désaulniers N, et al. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *pythium* from Canada[J]. Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 2010, 25: 22-31.
- [15] 张书俊, 杨先乐, 李聃, 等. 施氏鲟水霉病病原的初步研究[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 89-96.
- [16] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase[J]. Science, 1988, 239(4839): 487-491.
- [17] Henke W, Herdel K, Jung K, et al. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(19): 3957-3958.
- [18] Rees WA, Yager TD, Korte J, et al. Betaine Can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. Biochemistry[J]. 1993, 32(1): 137-144.
- [19] Endo S, Komori T, Ricci G, et al. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 234(1): 93-97.
- [20] 杨素, 沙才华, 顾海洋, 等. 猪繁殖与呼吸综合征 RT-LAMP 检测方法研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(6): 136-141.
- [21] 尹斐斐, 吴家强, 刘少宁, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 LAMP 检测方法的建立[J]. 家畜生态学报, 2011, 32(2): 50-54.
- [22] 黄琪琰. 水产动物疾病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [23] 李爱华, 聂品, 卢全章. 花鲈水霉病及其病原的初步研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(4): 389-391.
- [24] 倪达书. 鱼类水霉病的防治研究[M]. 北京: 农业出版社, 1982: 1-70.
- [25] 桂英爱, 王洪军, 刘春林, 等. 孔雀石绿及其代谢

产物在水产动物体内的残留、危害及检测研究进展[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(4): 293-298.

- [26] Morj Y, Kjtao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. Journal of Biochemical and

Biophysical Methods, 2004, 59(2): 145-157.

- [27] Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, et al. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 132(1/2): 216-221.

~~~~~  
(上接 p.1834)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达.....

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA, RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>