

香鱼格留虫(*Glugea plecoglossi*)环介导等温扩增联合横向流动试纸条检测方法的建立*

康晋伟^{1,2} 金晶磊^{1,2} 段丽君^{1,2,3} 周燕^{1,2}
苗亮² 周前进^{1,2}① 陈炯^{1,2}

(1. 宁波大学 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室 宁波 315211; 2. 宁波大学海洋学院 宁波 315832;
3. 宁波市海曙区畜牧兽医技术管理服务站 宁波 315153)

摘要 我国的养殖香鱼正面临着严重的香鱼格留虫(*Glugea plecoglossi*)感染。本研究联合运用环介导等温扩增技术(LAMP)和横向流动试纸条(LFD)的检测技术,建立了快速便捷地检测 *G. plecoglossi* 的 LAMP-LFD 方法。该方法以 *G. plecoglossi* 的 β 微管蛋白基因为检测靶标,在其保守区域设计并筛选得 6 条特异性引物(其中上游内引物用生物素标记),进行 LAMP 反应,产物再与异硫氰酸荧光素(FITC)标记的特异性探针杂交,在 LFD 上进行结果判断。结果表明,LAMP-LFD 方法能够特异性地检出 *G. plecoglossi*,对梅氏新贝尼登虫、刺激隐核虫、肝肠胞虫阳性的虾组织、派氏异尖线虫、内弯宫脂线虫、鳃弧菌香鱼分离株、杀香鱼假单胞菌,以及香鱼组织等的检测均呈阴性。优化后,LAMP 的反应条件为 65°C 反应 45min,与探针杂交的条件为 65°C 反应 5min,加之 5min 的显色时间,整个检测时程为 55min。利用该方法能够检测到 2.0fg/ μ L 的含 β 微管蛋白的质粒 DNA,针对 *G. plecoglossi* 基因组 DNA 的检测灵敏度为 14.0pg/ μ L;能够从感染强度达到 100 个虫体/克的香鱼肝组织中稳定地检测到虫体。该方法可在简单的恒温加热设备(如水浴锅)中完成核酸扩增和探针杂交,无需昂贵的仪器装置。综上,香鱼格留虫 LAMP-LFD 方法操作便捷、灵敏度高、特异性好、检测快速,而且设备依赖性低,完全适合于基层检测的需求。

关键词 香鱼格留虫(*Glugea plecoglossi*); β 微管蛋白; 环介导等温扩增技术(LAMP); 横向流动试纸条(LFD); 检测

中图分类号 S941.42 doi: 10.11693/hyhz20200300076

香鱼格留虫(*Glugea plecoglossi*)是专性寄生于香鱼(*Plecoglossus altivelis*)体内的一种微孢子虫,最早由日本学者鉴定并命名。感染该虫后,香鱼体腔内会形成一种异质孢囊(xenomias),内含大量的孢子,孢子释放后,可引起淋巴细胞、巨噬细胞等单核类细胞的浸润,造成亚致死感染(sub-lethal infection),破坏

香鱼的体表及外观,不仅加剧了饲料消耗,导致鱼类养殖成本大幅度增加,而且感染后的鱼形体较差,市场价值缩减。在日本,该虫是影响香鱼养殖产业的主要原因(Lee *et al.*, 2004)。

香鱼是东亚特有的一种名贵经济鱼类,日本有“淡水鱼之王”的美誉。在我国北起鸭绿江,南至广西

* 浙江省公益技术研究计划农村农业项目, LGN18C180002 号; 宁波市科技创新团队项目, 2015C110018 号; 宁波市自然科学基金项目, 2018A610342 号; 宁波市江北区农业和社会发展科技计划项目, 2017B02 号; 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室 2020 开放基金项目, KF20200105 号; 浙江省动物预防医学重点实验室开放课题基金项目, ZPKLPVM2017KFKT005 号; 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室开放基金, J2018004 号; 2018 年浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划, 2018R405078 号。康晋伟, 硕士研究生, E-mail: hhsywytzslzcdsh@163.com

通信作者: 周前进, 副教授, 硕士生导师, E-mail: mumu2325@163.com

收稿日期: 2020-03-16, 收修改稿日期: 2020-04-23

北仑河的沿海溪流中均有分布,人工养殖已遍及浙江、福建以及山东等地。规模化、集约化的高密度人工养殖导致香鱼病害急剧增加。近年来,我们首次从浙江宁海等地养殖的香鱼体内分离到了香鱼格留虫,进一步调查发现我国的香鱼养殖正面临着严重的香鱼格留虫的感染,感染率可达30%—40%,高感染阶段尤其集中在幼鱼的长成期和成鱼的产卵期(Zhou *et al.*, 2018)。鉴于香鱼为一年生洄游型鱼类,我们推测香鱼的养殖水环境污染或育种亲鱼感染是导致香鱼格留虫高感染率存在的原因。

香鱼格留虫的虫体大小仅有几微米,香鱼格留虫感染以香鱼组织表面形成肉眼可见的白色异质孢囊为诊断特征。未形成孢囊时,只能通过组织内分离或组织染色,进行显微镜镜检来实现针对虫体进行的早期诊断。这需要检测人员具备相当的专业知识背景和操作技能,不适合于该虫体的快速筛查和及时鉴定。针对核酸的分子检测技术具有检测快速、操作便捷等优点,基于PCR原理的分子检测技术越来越多地应用于单细胞原虫的分型、鉴定以及诊断,尤其体现在弓形虫、隐孢子虫、锥虫以及利士曼原虫等与公共卫生、食品安全及人畜共患等密切相关的原虫病原(Liu *et al.*, 2015; Akhouni *et al.*, 2017; Schijman, 2018; Wang *et al.*, 2018; Thompson *et al.*, 2019)。这些方法在针对病原的实验室诊断方面正发挥着重要作用,但其存在的仪器价格昂贵、工作环境严格及技术操作专业性要求高等问题,极大地限制了此类方法在现场快检与基层检测中的应用。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)作为一种有别于PCR原理的核酸扩增方法,在链置换DNA聚合酶的催化下,恒温条件(如65°C)中,15—60min即可实现核酸的倍数扩增(10^9 — 10^{10} 倍)。除其高灵敏度、高特异性等优点之外,该方法对仪器设备的要求比较低,一台简单的水浴锅即可完成反应,被认为是实现微生物病原基层检测的重要方法(Mori *et al.*, 2013, 2020; Notomi *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2019),同样适用于原虫病原(Lucchi *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Nzelu *et al.*, 2019)。LAMP产物的检测方法有多种,如浊度仪检测白色浑浊、荧光定量PCR仪检测荧光曲线、核酸电泳分析产物带形,以及添加荧光染料肉眼观察产物颜色等。其中,肉眼观察颜色变化,无需特殊仪器,是方法能够应用于基层的关键步骤,但是比较容易出现假阳性。因此,在无需仪器设备的

前提下简便快捷地判读结果是LAMP方法改进的重要方向。在横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)上锚定特定荧光素的抗体,与LAMP产物上标记的荧光素反应,形成的颜色变化显示在LFD的检测线和质控线上,完成结果判读,即为LAMP-LFD方法。该方法只需用不同的荧光素标记的探针与荧光素标记LAMP产物进行杂交,完全摆脱了对仪器设备的依赖,同时特异性探针的存在还很大程度上降低了检测的假阳性。该方法目前已成功用于对虾白斑综合征病毒(Jaroenram *et al.*, 2009)、传染性脾肾坏死病毒(Ding *et al.*, 2010)、河流弧菌(杨梦香等, 2017),以及简单异尖线虫/派氏异尖线虫(乔艳等, 2019)等水产病原微生物的检测。

本研究在香鱼格留虫 β 微管蛋白基因的保守区,设计3对特异性引物(其中,上游内引物由生物素标记),建立了LAMP方法并优化反应条件;同时,设计1条异硫氰酸荧光素标记的探针,建立了LAMP-LFD技术,以期对香鱼格留虫的现场快检和基层检测提供一种便捷可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 实验样品

香鱼格留虫取自鲜活香鱼体内的异质孢囊;梅氏新贝尼登虫(*Neobenedenia melleni*)、派氏异尖线虫(*Anisakis pegreffii*)、内弯宫脂线虫(*Hysterothylacium aduncum*),以及鳃弧菌香鱼分离株(*V. anguillarum* ayu-H080701)均由本实验室鉴定并保存;刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)由宁波大学尹飞教授馈赠(Yin *et al.*, 2018)、肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)阳性的虾组织由宁波大学钱冬研究员惠赠(骆云慧等, 2016);杀香鱼假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)由集美大学鄢庆枇教授惠赠(Huang *et al.*, 2018)。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA制备 解剖新鲜香鱼,从肝脏或者性腺等器官上摘取白色异质瘤,使其破裂后获得香鱼格留虫孢子并纯化。将保存的鳃弧菌、杀香鱼假单胞菌从-80°C中取出划线,挑取单克隆培养扩大到所需浓度。按照基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)D3350-01(Omega Bio-Tek, USA)的说明提取香鱼格留虫、梅氏新贝尼登虫、派氏异尖线虫、内弯宫脂线虫、刺激隐核虫、鳃弧菌、杀香鱼假单胞菌、肝肠胞虫阳性的虾组织样品,以及香鱼肝组织的基因组DNA。提取的香鱼格留虫基因组DNA经NanoDrop2000

测定后, 稀释至 70ng/μL 备用。

1.2.2 引物设计及质粒标准品制备 参考 GenBank 上已有的香鱼格留虫 β -*tubulin* 基因序列, 设计特异性引物 Gpl-PF1 与 Gpl-PR1 (表1), 以香鱼格留虫的基因组 DNA 为模板, 扩增 β -*tubulin* 基因。按照琼脂糖凝胶回收试剂盒的说明 (Omega Gel Extraction Kit, USA) 回收 PCR 产物, 将其与 pMD19-T Vector 载体连接, 构建重组质粒 pMD-BT, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞并涂板。挑取单克隆并测序, 鉴定准确后提交 NCBI (GenBank 登录号: MN811004)。按照质粒提取

试剂盒 (Omega Plasmid Mini Kit, USA) 的说明提取质粒 pMD-BT, 经 NanoDrop2000 测定浓度后, 稀释至 1.0ng/μL, 作为 pMD-BT 质粒标准品备用。

以香鱼格留虫 β -*tubulin* 基因序列 (MN811004) 的保守区设计 7 套引物, 用于 LAMP 反应。利用 LAMP 反应的荧光曲线和琼脂糖凝胶电泳等实验结果, 选择 1 套最优的引物组合, 包括外引物 Gpl-F3 和 Gpl-B3, 内引物 Gpl-FIP 和 Gpl-BIP, 环引物 Gpl-LF 和 Gpl-LB (表1, 图1)。在此基础上, 在引物 Gpl-F1 和 Gpl-B1c 之间设计 1 条能够与 LAMP 产物特异性杂交的探针 Gpl-HP (表1,

表 1 根据香鱼格留虫 β -*tubulin* 基因序列设计引物和 DNA 探针序列
Tab.1 The primers and DNA probes targeting β -*tubulin* of *G. plecoglossi* used in this study

引物名称	引物类型	引物长度	引物序列(5'—3')	目的	扩增片段长度(bp)
Gpl-PF1	上游引物	25-mer	CACTATATCGGCAACAACCAAAATC	PCR	981
Gpl-PR1	下游引物	21-mer	TAGGCTTGAGGGTGGGATATC	PCR	
Gpl-F3	上游外引物	20-mer	GGAAGGTGCTGAACTCATAG	LAMP	—
Gpl-B3c	下游外引物	19-mer	TCAGCATTCAACTGACCAG	LAMP	—
Gpl-FIP ^a	(F1c+F2) 上游内引物	42-mer (Gpl-F1c:24-mer Gpl-F2:18-mer)	ACGGTTCAACCACAGTATCAGATG GGTACTGGTGCTGGAATG	LAMP	—
Gpl-BIP	(B1c+B2) 下游内引物	46-mer (Gpl-B1c:25-mer Gpl-B2:21-mer)	GAGGCACTCTACAATATCTGCTCAA CCGCTCATAACAAGTGATACT	LAMP	—
Gpl-LF	环引物	22-mer	ACGAACACATCATCCTATCAGG	LAMP	—
Gpl-LB	环引物	20-mer	TGCCTAATCCTGGTTATGCC	LAMP	—
Gpl-HP ^b	杂交探针	19-mer	CTTGTTGAAAATGCTGACG	LFD 显色	—
Gpl-PF2	上游引物	20-mer	GTGGTACTGGTGCTGGAATG	PCR	90
Gpl-PR2	下游引物	23-mer	GCACAACAGAAAACGAACACATC	PCR	

注: ^a 表示上游内引物 Gpl-FIP 的 5'端用生物素标记; ^b 表示探针 Gpl-HP 的 5'端用异硫氰酸标记

213 TTATACCGAAGGTGCTGAACTCATAGAAAGTGTAAATGGATGTTGTCA
Gpl-F3

260 GACGCGAAGCAGAAAAAAGCAATTGCTTACAAGGATTTCAAATAA

305 CACATTCACCTGGAGGTGGTACTGGTGCTGGAATGGGTACACTTC
Gpl-F2

357 GAAAATACGAGAGGAGTTTCCTGATAGGATGATGTTTCGTTTTTCT
Gpl-LFc

403 GTTGTGCCTGCGCCGAAATCATCTGATACTGTGGTTGAACCGTATA
Gpl-F1

449 ATGCAACACTTTCGATCCATCAACTTGTGAAAATGCTGACGAAACA
Gpl-HP

496 TTCTGTATCGATAATGAGGCACTCTACAATATCTGCTCAAAAACT
Gpl-B1c

543 TAAGTTGCCTAATCCTGGTTATGCCGATTTGAATAGATTAGTATCAC
Gpl-LB

590 TGTTATGAGCGGTGTGACTACCTGTTTACGATTCCCTGGTCAGTT
Gpl-B2c Gpl-B3c

636 GAATGCTGATTACGTAAA

图 1 香鱼格留虫 β -*tubulin* 基因的 LAMP-LFD 引物及 DNA 探针设计

Fig.1 The primers and DNA probe targeting β -*tubulin* gene of *G. plecoglossi* used in LAMP-LFD assay
注: LAMP 反应的引物和 LFD 所用探针序列使用下划线或方框表示。其中, Gpl-B1c, Gpl-B2c, Gpl-B3c 和 Gpl-LFc 是引物 Gpl-B1, Gpl-B2, Gpl-B3 和 Gpl-LF 的互补序列

图 1); 其中, 内引物 Gpl-FIP 的 5'端由生物素标记, 探针 Gpl-HP 的 5'端进行异硫氰酸荧光素标记。另外, 设计特异性引物 Gpl-PF2 与 Gpl-PR2, 用于 PCR 方法鉴定香鱼格留虫(表 1)。以上引物与探针均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2.3 LAMP 反应 LAMP 反应使用的 Bst DNA 聚合酶的最佳温度区间为 60—65°C, 其中 63°C 和 65°C 是研究中最常见使用的。本研究使用 65°C 作为 LAMP 的反应温度, 反应时间为 60min。参考 Ding 等(2010)公布的 LAMP 反应的体系: 10mmol/L KCl, 10mmol/L (NH₄)₂SO₄, 6.5mmol/L MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 1.4mmol/L dNTPs, 8U Bst DNA 聚合酶大片段(New England Biolabs)和 2μL 模板, 外引物 Gpl-F3 和 Gpl-B3 各 0.2μmol/L, 内引物 Gpl-FIP 和 Gpl-BIP 各 1.6μmol/L, 环引物 Gpl-LF 和 Gpl-LB 各 0.4μmol/L。另外, 在 LAMP 反应体系中添加 EvaGreen 后, 可通过实时的荧光曲线进行 LAMP 结果判断。同时, LAMP 产物也通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳和 LFD 方法来判定。

1.2.4 LFD 检测 由荧光素标记的引物进行的 LAMP 反应后, 产物中加入 20pmol 的异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的探针 Gpl-HP, 在相同温度(65°C)下反应, 5min 后, 取反应液 5μL 加入到 100μL 的 LFD buffer (Milena Biotec GmbH, Germany)中并混匀, 将 LFD 试纸条的测试端竖直没于混合液中, 静置 3—5min, 利用肉眼判断结果。

1.2.5 香鱼格留虫的 LAMP-LFD 特异性实验 为验证 LAMP-LFD 方法的特异性, 选择水产养殖中的常见病原, 即鳃弧菌、杀香鱼假单胞菌、梅氏新贝尼登虫、刺激隐核虫、派氏异尖线虫及内弯宫脂线虫, 肝肠胞虫阳性的虾组织样品, 以及香鱼肝组织, 提取其基因组 DNA 并作为模板, 在 65°C 条件下进行荧光 LAMP 反应, 时间为 60min。LAMP 产物与 Gpl-HP 杂交后, 进 LFD 试纸条检测。同时, 产物进 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 香鱼格留虫 LAMP-LFD 的灵敏度实验 将 pMD-BT 质粒标准品进行 10 倍梯度稀释, 选择原浓度的 1.0×10⁻²、1.0×10⁻³、1.0×10⁻⁴、1.0×10⁻⁵、1.0×10⁻⁶ 及 1.0×10⁻⁷ 倍为模板, 各浓度制备三个平行样品, 65°C 条件下, 进行荧光 LAMP 反应 60min。产物通过 LFD 试纸条和 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。同时, 以 Gpl-PF2 与 Gpl-PR2 为引物, 检测 PCR 方法, 作为方

法学的比较。PCR 反应的体系(25μL)包括: 2.5μL 的 10×PCR buffer, 0.15μL 的 rTaq DNA 聚合酶(5U/μL) (TaKaRa, 大连), 2μL 的 dNTPs (2.5mmol/μL), 1μL 的 Gpl-PF2 (10pmol/μL), 1μL 的 Gpl-PR2 (10pmol/μL), 2μL 的倍比稀释的质粒标准品。反应程序: 94°C 预变性 3min; 30 个循环包括 94°C 变性 30s, 56°C 退火 30s, 72°C 延伸 1min; 72°C 延伸 10min。产物通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

将香鱼格留虫基因组 DNA 进行倍比稀释, 选择原浓度的 1.0×10⁻²、1.0×10⁻³、1.0×10⁻⁴、1.0×10⁻⁵、1.0×10⁻⁶、1.0×10⁻⁷ 及 1.0×10⁻⁸ 倍为模板, 各浓度制备三个平行样品, 65°C 条件下荧光 LAMP 反应 60min。产物通过 LFD 试纸条和 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 香鱼格留虫 LAMP-LFD 的时间优化 选择水浴锅作为反应装置, 以灵敏度浓度的香鱼格留虫的基因组 DNA 为模板, 65°C 条件下进行 LAMP 反应, 反应时间分别设定为 20、30、35、40、45、50 和 60min, 分析 LAMP 反应的最佳反应时间。产物分别经 LFD 试纸条和 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.8 LAMP-LFD 重复性实验 分别利用荧光定量 PCR 仪和水浴锅作为反应设备, 以灵敏度浓度的香鱼格留虫的基因组 DNA 为模板, 65°C 条件下进行 LAMP 反应, 反应时间设定为 1.2.7 确定的时间。实验平行进行三次。产物通过 LFD 试纸条和 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.9 香鱼格留虫人工污染香鱼肝组织实验 取若干份香鱼的肝脏组织(鉴定无香鱼格留虫感染)100mg 加入少量无菌水, 充分匀浆后, 定容至 1mL。将香鱼格留虫计数后, 分别取 1.0×10⁰、1.0×10¹、1.0×10²、1.0×10³、1.0×10⁴ 个虫体加入到上述肝脏组织悬液中震荡混匀。每个浓度平行制备三个样品。取香鱼格留虫污染的各肝脏组织, 按照基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型) D3350-01 (Omega Bio-Tek, USA) 的说明提取各样品基因组 DNA, 溶解于 50μL 的 ddH₂O 中, 用作 PCR 和 LAMP 测试的模板。以健康香鱼的肝脏组织(鉴定无香鱼格留虫感染)匀浆液作为阴性对照。

2 结果

2.1 LAMP 引物的筛选

以 1.0×10⁻¹ 原浓度(7ng/μL)的香鱼格留虫基因组 DNA 为模板, 分别使用上述 7 套引物进行 LAMP 反

应。结果表明, 在荧光 LAMP 反应条件下, 每套引物都可以获得典型的“S”型荧光曲线(图 2a), 但是曲线特点有明显不同, 阴性对照无明显扩增。在荧光曲线的起峰时间上, 引物组合 P4~P5<P2<P3<P7<P1<P6; 在荧光强度的峰值上, 引物组合 P5>P4~P1~P3>P7>P6>P2; 在“S”曲线的线型上, 以 P4、P5、P7 和 P1 最为光滑(图 2a)。通过琼脂糖凝胶电泳检测发现, 每套引物的扩增产物均出现典型的梯形条带, 但是带型呈现明显不同(图 2a)。因为荧光曲线的起峰时间与最终的检测时长呈明显相关, 综合考虑下, 我们选择引物组合 P4 作为下一步实验的引物组合, 用于后续反应。引物组合 P4 的各引物序列见表 1 和图 1。

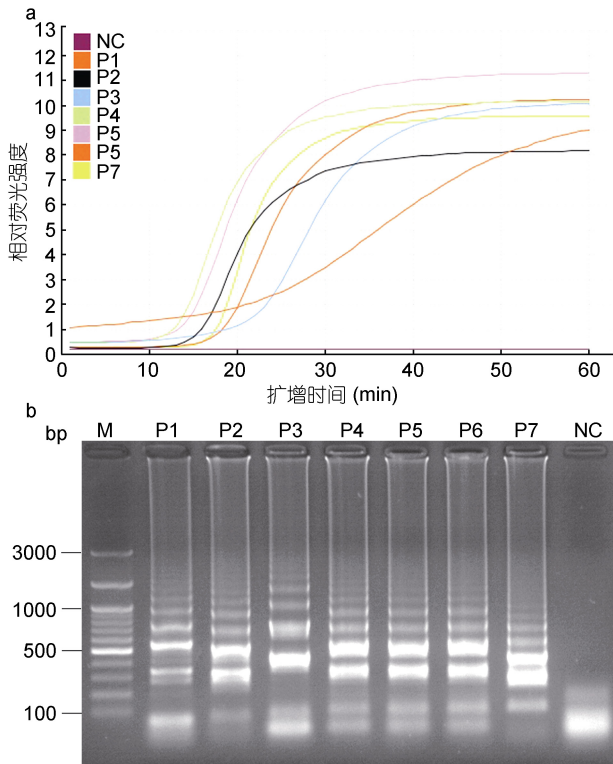


图 2 LAMP 引物的筛选

Fig.2 Selection of optimal primers for use in the LAMP reaction

注: 设计了 7 套引物, 即 P1—P7 用于 LAMP 引物的筛选。a. LAMP 反应中的荧光强度; b. LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳; P1—P7. 分别为 7 套引物; M. GeneRuler 100bp plus DNA Ladder (Fermentas, USA); NC. 以不含香鱼格留虫 DNA 的 ddH₂O 为模板作为阴性对照

2.2 香鱼格留虫 LAMP-LFD 的特异性分析

选择 6 种常见水产病原, 即梅氏新贝尼登虫、刺激隐核虫、派氏异尖线虫、内弯宫脂线虫、鳃弧菌、杀香鱼假单胞菌, 以及肝肠胞虫阳性的虾组织样品和香鱼肝组织的基因组 DNA, 经与香鱼格留虫的基

因组 DNA 相同的方式进行倍比稀释后, 选择 1.0×10^{-2} 倍原浓度为模板, 进行 LAMP 反应。结果表明当以 $0.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (1.0×10^{-2} 倍原浓度) 的香鱼格留虫基因组 DNA 为模板时, 将探针与 LAMP 产物杂交后, 在 LFD 试纸条的检测线上有明显条带, 结果呈阳性(图 3c), 琼脂糖凝胶电泳与荧光曲线也分别显示结果为阳性(图 3a, 3b)。当以上述其它 8 种水产病原或水产动物组织的 DNA 为模板时, LFD 试纸条的检测线上无明显条带, 结果呈阴性(图 3c), 经琼脂糖凝胶电泳与荧光曲线也分别显示结果为阴性(图 3a, 3b)。

2.3 香鱼格留虫 LAMP-LFD 的灵敏度验证

使用稀释倍数为 1.0×10^{-2} — 1.0×10^{-7} 的 pMD-BT 质粒标准品作为模板, 分析 LAMP-LFD 的灵敏度。

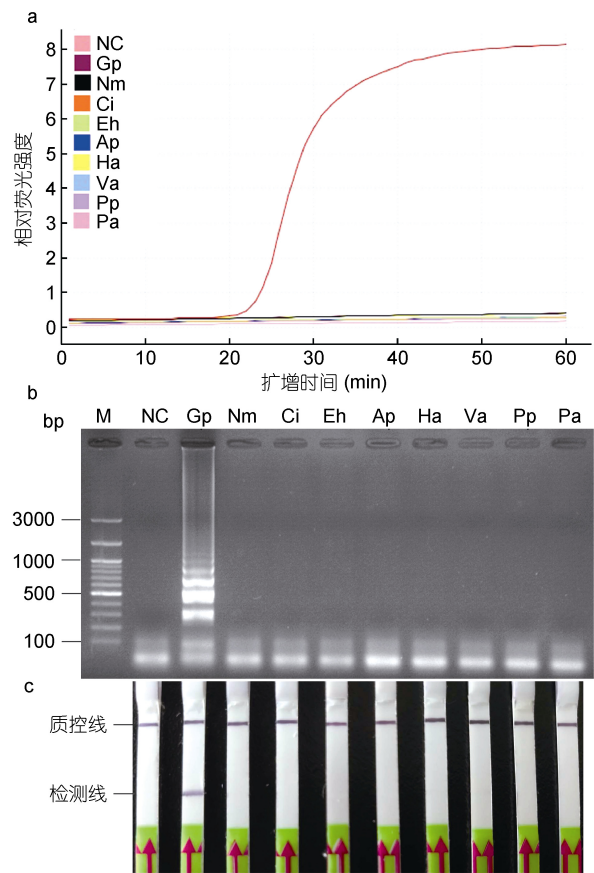


图 3 LAMP (a, b)和 LAMP-LFD (c)的特异性实验结果

Fig.3 Specificity test of LAMP (a, b) and LAMP-LFD (c) for detection of *G. plecoglossi*

注: a, b 和 c: 以各受试样本的基因组 DNA 为模板, 进行有生物素标记的 LAMP 反应。a. LAMP 反应中的荧光强度; b. LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳; c. LFD 检测。M. 同上图; NC. 同上图。Gp, Nm, Ci, Eh, Ap, Ha, Va, Pp 和 Pa 分别代表以香鱼格留虫, 梅氏新贝尼登虫, 刺激隐核虫, 肝肠胞虫阳性的虾组织、派氏异尖线虫, 内弯宫脂线虫, 鳃弧菌, 杀香鱼假单胞菌和健康香鱼肝组织(不含香鱼格留虫 DNA)的基因组 DNA 为模板

结果显示, 当以稀释倍数为 1.0×10^{-6} — 1.0×10^{-2} 的质粒标准品作为模板时, 扩增曲线为典型的“S”型, 结果为阳性(图 4a)。将 LAMP 产物与 Gpl-HP 探针孵育后, 利用 LFD 试纸条检测, LFD 的检测线上出现明显条带(图 4c), 与琼脂糖凝胶电泳检测结果一致(图 4b)。当稀释倍数为 1.0×10^{-7} 时, 扩增曲线在“0”的位置呈线性, 无明显扩增(图 4a), LFD 的检测线上无明显条带(图 4c), 利用琼脂糖凝胶电泳检测也呈阴性(图 4b)。

因此, LAMP-LFD 的检测灵敏度为 pMD-BT 质粒标准品原浓度的 1.0×10^{-6} 倍, 即 $2.0 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 。以 Gpl-PF2/Gpl-PR2 为引物进行的 PCR 反应, 发现当以稀释倍数为 1.0×10^{-6} — 1.0×10^{-2} 的质粒标准品为模板时, 产物经琼脂糖凝胶电泳均可检测到明显的条带(图 4d), 而当稀释倍数为 1.0×10^{-7} 时, 无明显条带, 说明以 Gpl-PF2/Gpl-PR2 为引物的 PCR 方法的检测灵敏度同样为 $2.0 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 的 pMD-BT 质粒标准品。

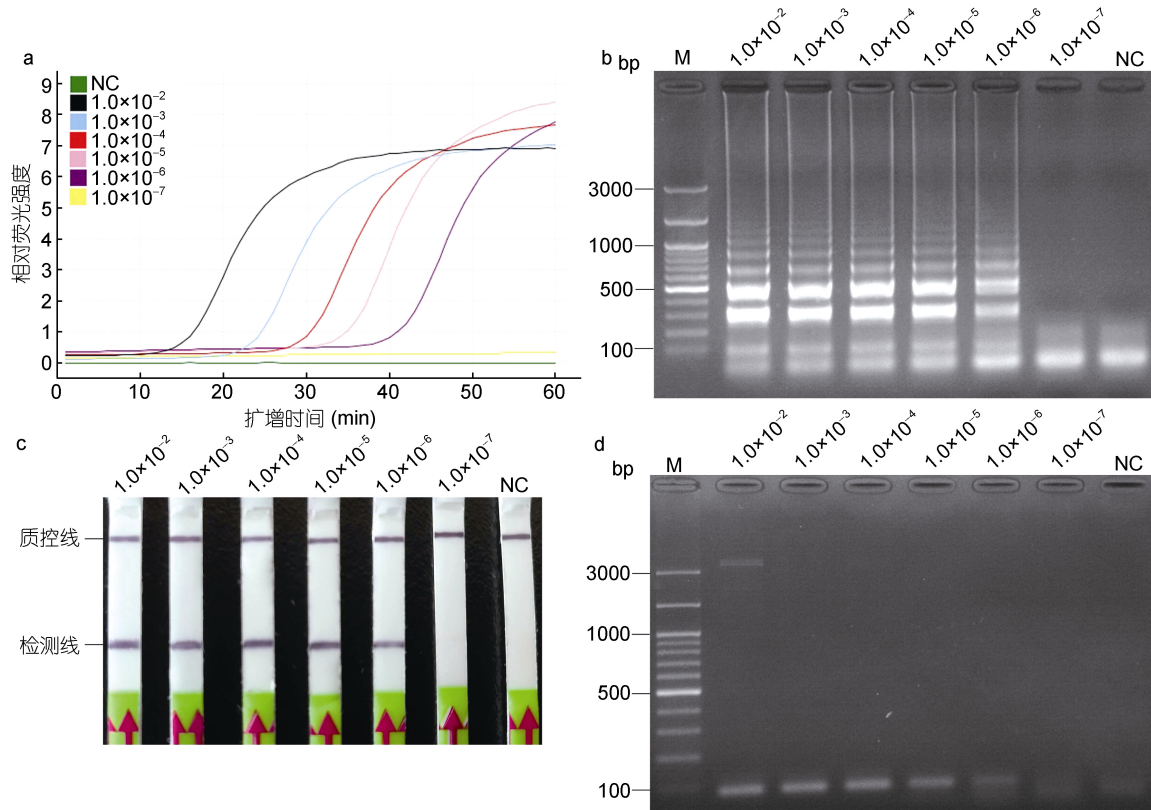


图 4 以质粒标准品为模板的 LAMP-LFD 的灵敏度

Fig.4 Sensitivity of LAMP-LFD to detect plasmid standards

注: a. LAMP 反应中的荧光强度; b. LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳; c. LFD 检测; d. 常规 PCR 产物琼脂糖电泳。M. 同上图; NC. 同上图; 1.0×10^{-2} — 1.0×10^{-7} . 稀释不同倍数的质粒标准品。LAMP 和 LAMP-LFD 检测到的最低模板稀释倍数为 1.0×10^{-6} , 即 $2.0 \text{ fg}/\mu\text{L}$, 常规 PCR 检测到的最低模板稀释倍数为 1.0×10^{-6} , 即 $2.0 \text{ fg}/\mu\text{L}$

以 1.0×10^{-2} — 1.0×10^{-8} 的香鱼格留虫基因组 DNA 作为模板, 进行荧光 LAMP 反应, 并对 LAMP 产物进行 LFD 检测。结果表明, 当以稀释倍数为 1.0×10^{-2} — 1.0×10^{-4} 的基因组 DNA 为模板时, 扩增曲线为典型的 S 型, 结果为阳性(图 5a)。将 LAMP 产物与 Gpl-HP 探针孵育后进行 LFD 检测, LFD 的检测线上出现明显条带(图 5c), 与琼脂糖凝胶电泳检测结果一致(图 5b)。当稀释倍数为 1.0×10^{-5} — 1.0×10^{-8} 时, 扩增曲线在“0”的位置呈线性, 无明显扩增(图 5a), LFD

的检测线上无明显条带(图 5c), 利用琼脂糖凝胶电泳检测也呈阴性(图 5b)。因此, LAMP-LFD 的检测灵敏度为香鱼格留虫基因组 DNA 原浓度的 1.0×10^{-4} 倍, 即 $14 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 。

2.4 香鱼格留虫 LAMP-LFD 的时间优化

LAMP-LFD 的检测时程与 LAMP 反应的有效时间呈正相关, 而一定浓度范围内, LAMP 反应的有效起峰时间与模板浓度呈正相关(Zhou *et al.*, 2014)。以简易设备水浴锅进行加热, 以灵敏度浓度的香鱼格

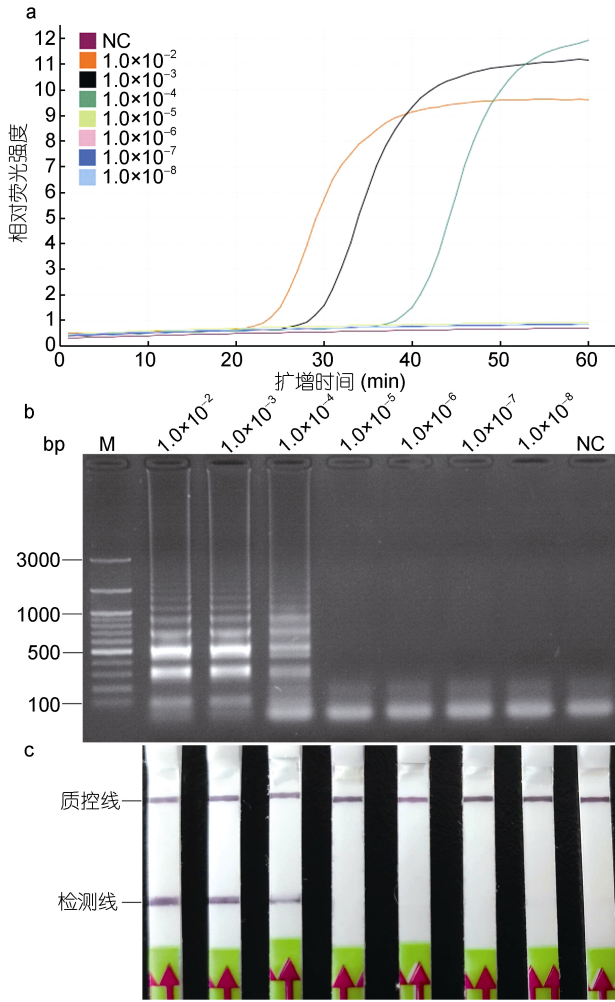


图 5 以香鱼格留虫基因组 DNA 为模板的 LAMP-LFD 的灵敏度

Fig.5 Sensitivity of LAMP-LFD to detect genomic DNA of *G. plecoglossi*
注: a. LAMP 反应中的荧光强度; b. LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳; c. LFD 检测。M. 同上图; NC. 同上图; 1.0×10^{-2} — 1.0×10^{-8} . 稀释不同倍数的香鱼 gDNA; LAMP 和 LAMP-LFD 检测到的最低 gDNA 稀释倍数为 1.0×10^{-4} , 即 $14.0 \text{ pg}/\mu\text{L}$

留虫基因组 DNA 为模板, 进行 LAMP 反应, 分析不同反应时间 LAMP 的产物情况。结果表明: 当反应时间设定为 20、30 和 35min 时, 利用 LFD 试纸条和琼脂糖凝胶电泳均未检测到明显条带(图 6a, 6b); 当反应时间增加到 40min 时, LFD 试纸条的检测线位置出现明显条带, 琼脂糖凝胶电泳检测出现典型的梯形条带; 增加反应时间至 45min 时, LFD 试纸条和琼脂糖凝胶电泳上的条带亮度明显大于 40min 的反应时间; 继续增加反应时间至 50 和 60min 时, LFD 试纸条和琼脂糖凝胶电泳上的条带亮度与反应时间 45min 时无明显变化。综上, 为保证结果的可靠性, 选择

LAMP 的最优反应时间为 45min。

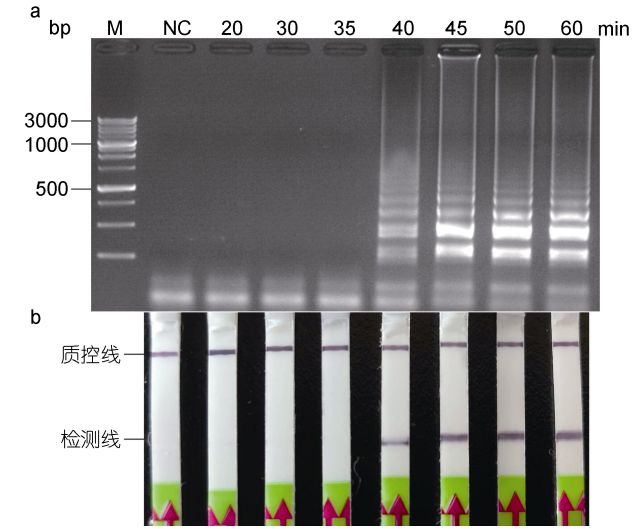


图 6 LAMP 反应最适反应时间的确定

Fig.6 Time optimization of LAMP assay for detection of *Glugea plecoglossi*
注: a. LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳; b. LFD 检测。M. 同上图; NC. 同上图; 1.0×10^{-4} . 稀释倍数为 1.0×10^{-4} 的香鱼格留虫基因组 DNA, 即 $7.0 \text{ pg}/\mu\text{L}$

2.5 香鱼格留虫 LAMP-LFD 重复性分析

以原浓度稀释倍数为 1.0×10^{-4} 的香鱼格留虫的基因组 DNA 为模板, 65°C 条件下进行 LAMP 反应 45min, 分别使用荧光定量 PCR 仪和水浴锅作为反应装置, 判断 LAMP-LFD 方法的重复性。结果表明, 以该灵敏度浓度为模板进行的 LAMP 反应, 荧光曲线稳定地呈典型的“S”型, 在起峰时间、荧光强度, 曲线的线型等方面都具有很高的吻合度(图 7a); 经 LFD 试纸条和琼脂糖凝胶电泳的方法检测, 均稳定性地出现明显的条带(图 7b, 7c); 以蒸馏水为模板时, 检测结果呈阴性(图 7a, 7b, 7c), 说明该 LAMP-LFD 方法在不同的反应装置下均具有良好的可重复性。

2.6 采用 LAMP-LFD 方法检测香鱼格留虫污染香鱼肝组织的适用性分析

分别用不同数量的香鱼格留虫与香鱼的肝组织悬液充分混匀, 提取混合匀浆液的基因组 DNA, 经 LAMP-LFD 和 PCR 分别检测。结果表明, 分别使用 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 个虫体污染时, 利用 LAMP-LFD 和 PCR 方法均能够从污染的肝脏组织中稳定检测到病原; 当仅使用 1 个香鱼格留虫孢子污染 100mg 香鱼肝组织时, LAMP-LFD 和 PCR 方法均不能从污染样品中检测到虫体的存在(表 2)。这表明, LAMP-LFD 方法的灵敏度为 100 个虫体/g 或 0.4 个虫体/反应。

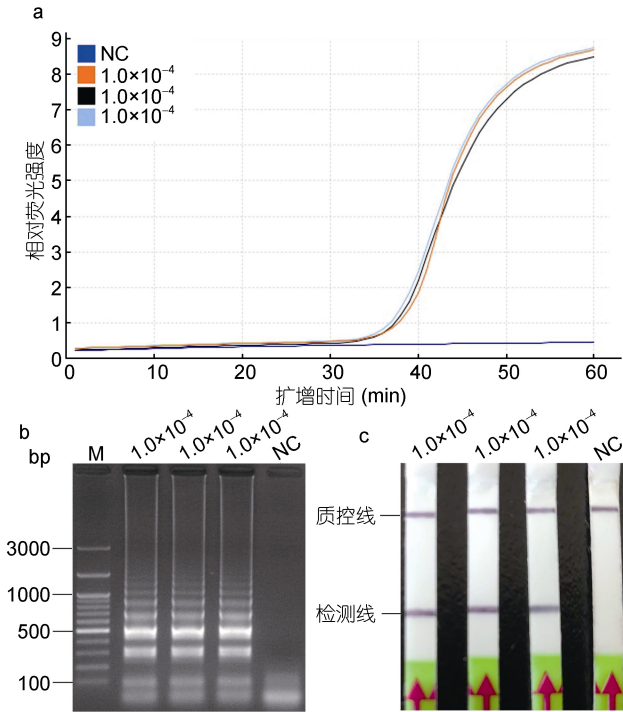


图 7 LAMP (a, b)和 LAMP-LFD (c)的重复性试验

Fig.7 Reproducibility of LAMP (a, b) and LAMP-LFD (c) of detection for *G. plecoglossi*

注: a. LAMP; b. 琼脂糖电泳; c. LAMP-LFD. M. 同上图; NC. 同上图; 1.0×10^{-4} . 稀释倍数为 1.0×10^{-4} 的香鱼格留虫基因组 DNA, 即 $14.0 \text{ pg}/\mu\text{L}$

3 讨论

香鱼格留虫是香鱼体内普遍存在的一种寄生原虫, 也可感染虹鳟等其他鱼类。香鱼格留虫感染致死率较低, 多呈隐性状态, 容易被忽视, 导致香鱼群体品质下降, 引起较大的经济损失。据不完全统计, 2016—2018年香鱼出口创汇逾430万美元, 是我国养殖的淡水鱼种中能够出口的几个鱼种之一, 而目前我国养殖香鱼群体中香鱼格留虫的感染已经比较严

重, 实现该病原的快速诊断和准确鉴定, 消除其在养殖环境、亲本香鱼等的污染, 对于维持香鱼的安全高效繁养和高品质具有重要意义。但是, 迄今为止, 还未见应用于香鱼格留虫检测的分子检测技术。因此, 本研究选择香鱼格留虫 β 微管蛋白基因作为检测靶标, 建立了快速、便捷、低成本的 LAMP-LFD 技术, 特异性地应用于香鱼格留虫的早期诊断。

灵敏度是衡量分子检测技术优劣的决定性技术指标之一。应用于其他原虫病原的分子检测技术给我们提供了借鉴。用于弓形虫检测的 PCR 技术最早出现于 1989 年, 以弓形虫的 B1 基因为靶标, 能够从细胞裂解产物中检测到单个虫体的 DNA (Burg *et al*, 1989)。运用巢式 PCR 技术, 选用 529bp 的重复元件为靶标时, 可检测到 640fg 的虫体 DNA, 以 B1 基因为靶标, 可检测到 5.12fg 的虫体 DNA (Fallahi *et al*, 2014a)。同样地, 巢式 PCR 也被应用于隐孢子虫的实验室诊断。Nikaeen 等(2005)以微小隐孢子虫的 hsp70 基因为靶标, 建立了可特异性检测香鱼格留虫的巢式 PCR 方法, 能够从自来水样品中检测到单个卵囊的污染。Mero 等(2017)针对隐孢子虫、贾地鞭毛虫及溶组织内阿米巴原虫等建立了多重 PCR 技术, 检测灵敏度为 $0.1 \text{ ng}/\text{mL}$ 的隐孢子虫 DNA。Njiru 等(2005)以锥虫的核糖体内转录间隔区 1(ITS1)为靶标, 建立了用于锥虫检测的 PCR 技术, 针对不同锥虫的检测灵敏度在 $10\text{--}100 \text{ pg}$ 虫体 DNA。Hong 等(2017)以动基体大型环状 DNA 为靶标, 分别建立了特异性检测肌锥虫和路易锥虫的 PCR 方法, 可检测到 0.1 ng 的锥虫 DNA。自 LAMP 方法公布以来, 很多研究集中于原虫病害 LAMP 检测技术的开发, 并取得了系列成果。以弓形虫为例, 针对不同类型样品中弓形虫的污染或感染情况, 以及针对不同的检测靶标, 开发了多个 LAMP 方法(Sotiriadou *et al*, 2008; Fallahi *et al*,

表 2 LAMP-LFD 检测香鱼格留虫人工污染的香鱼肝组织样品

Tab.2 Detection of *Glugea plecoglossi* from artificial-contaminated liver samples of *P. altivelis* by LAMP-LFD assays

	污染香鱼肝组织所用的香鱼格留虫数量(个)					未被污染的健康香鱼的肝组织(CFU/mL)
	1.0×10^4	1.0×10^3	1.0×10^2	1.0×10^1	1.0×10^0	0
LAMP-LFD	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	-	-
PCR	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	-	-

注: “+”表示检测结果阳性; “-”表示检测结果阴性

2014b; Durand *et al.*, 2020)。Zhang 等(2009)以 529bp 的重复元件为靶标建立了 LAMP 方法, 最低可检测到 1pg/ μ L 的弓形虫 DNA; Lin 等(2012)和 Kong 等(2012)分别将最低检测线优化到最低可检测 1pg/ μ L 和 0.6fg 的弓形虫 DNA; Qu 等(2013)以弓形虫的 18S rRNA 为靶标建立了 RT-LAMP 方法, 能够从 1g 的猪肉中最低可检测到 1 个速殖子; 而 Lalle 等(2018)同样以 529bp 重复元件为靶标, 建立的 LAMP 方法检测即食沙拉中污染的弓形虫, 每 50g 即食小莴苣中最低可检测到 25 个卵囊; Varlet-Marie 等(2018)建立了 LAMP 方法用于贻贝中弓形虫的调查, 每克组织或每毫升血淋巴中最低可检测到 5 个卵囊。Karanis 等(2007)以隐孢子虫 60kDa 的糖蛋白基因为检测靶标, 建立了 LAMP 方法, 最低可检测到 400fg/ μ L 的虫体 DNA 或者 0.1 个隐孢子虫卵囊; Plutzer 等(2010)将 LAMP 方法应用于饮用水中隐孢子虫的筛查, 能够从 10L 的过滤的饮用水中最低检测到 1 个卵囊的污染。Njiru 等(2008b)以锥虫的重复插入移动元件(RIME)和血清抗性相关基因(SRA)为检测靶标, 建立了 2 种 LAMP 方法, 最低检测限为 0.001 虫体/mL 和 1 个虫体/mL。Thekisoe 等(2007)以锥虫的核糖体 DNA 的 5.8S-ITS2 区段、18S RNA 以及 VSG RoTat 1.2 序列为靶标, 建立了可用于不同锥虫种的 LAMP 方法, 均能够检测到 1fg 的锥虫 DNA 或 0.01 个锥虫虫体。Hayashida 等(2015)通过优化, 建立了干式 LMAP 方法, 用于血液样品中锥虫的快速检测, 以 RIME、18S rRNA 和 SRA 为检测靶标条件的灵敏度分别为 0.01、0.1 和 1 个虫体 DNA。在水产养殖领域, Karthikeyan 等(2017)以虾肝肠胞虫(EHP)阳性组织样品的 DNA 为模板, 梯度稀释后, 最低检测灵敏度为阳性组织样品的 3—10 倍; Sathish 等(2018)以虾肝肠胞虫的核糖体小亚基(SSU)为检测靶标, 建立了 LAMP 方法, 灵敏度为 10 个拷贝/反应。本研究建立的 LAMP-LFD 技术能够检测到 2.0fg/ μ L 的 β 微管蛋白所含质粒的 DNA, 最低能够检测出 14.0pg/ μ L 的虫体基因组 DNA, 表现出良好的方法灵敏性。

检测时间是决定快检类技术实用性和推广的重要参考。根据分子靶标与引物设计等条件, LAMP 可在 15—60min 不等的时间内完成反应, 再通过有效的检测手段进行结果判断。Zhang 等(2009)以 529bp 序列为靶标建立的检测弓形虫的 LAMP 方法, 反应时间为 60min, 通过琼脂糖凝胶电泳来判断结果, 整个

检测时间超过 60min; 同样, Kong 等(2012)、Fallahi 等(2014b)和 Sotiriadou 等(2008)分别选择 B1 基因或 529bp 序列建立了针对弓形虫的 LAMP 方法, 优化后的反应时间均为 60min, 加上琼脂糖凝胶电泳判断 LAMP 产物的时间, 检测时程均超过 60min。同时, Kong 等(2012)和 Fallahi 等(2014b)通过在 LAMP 反应产物中添加 SYBR Green I 染料, 通过颜色变化进行结果判定, 减掉了因制胶和电泳所耗费的时间, 使整个检测时程缩减为 60min; Lalle 等(2018)优化了 Zhang 等(2009)的方法, 将 LFD 试纸条引入到弓形虫 LAMP 方法的检测, 有效地缩短了检测时程; 有经验者, 甚至可通过肉眼判断有无焦磷酸镁白色浑浊进行结果判定, 也可缩短检测时间(Fallahi *et al.*, 2014b)。在其它原虫病原的检测中; Plutze 等(2010)针对隐孢子虫病原建立的 LAMP 方法, 优化后的反应时间控制在 60min, 可凭借上述提及的焦磷酸镁白色浑浊进行判定; Ghodrati 等(2017)针对利什曼原虫的 LAMP 方法, 优化后的反应时间同样定在 60min; 而 Njiru 等(2008a)建立的针对锥虫的 LAMP 方法, 通过使用染料 SYTO-9 根据扩增曲线实时判断或添加 SYBR Green I 进行肉眼判定, 优化后的反应时间仅为 35min。在水产原虫病原的检测方法中, Sathish 等(2018)针对虾肝肠胞虫建立的 LAMP 方法, 优化后的反应时间为 45min。本研究针对香鱼格留虫的 LAMP-LFD 方法, 优化后的反应时间为 45min, 加上 5min 的探针孵育和 5min 的 LFD 试纸条显色, 整个检测时程仅需 55min。

4 结论

本研究以香鱼格留虫的 β 微管蛋白基因为分子靶标建立了 LAMP-LFD 方法, 能够特异检出香鱼格留虫, 对梅氏新贝尼登虫、刺激隐核虫、派氏异尖线虫、内弯宫脂线虫、鳃弧菌、杀香鱼假单胞菌及虾肝肠胞虫等水产养殖中的常见致病微生物及香鱼组织没有交叉反应。该方法的整个检测时程仅需 55min, 包括核酸扩增 45min、与探针孵育 5min, 及 LFD 检测 5min。该方法检测灵敏度高, 最低能够检测到 2.0fg/ μ L 的含 β 微管蛋白的质粒 DNA 或 14.0pg/ μ L 的香鱼格留虫基因组 DNA, 能够从感染强度达到 100 个虫体/克的香鱼肝组织中稳定地检测到虫体。该方法的仪器依赖性很低, 操作便捷, 完全适用于香鱼格留虫的基层检测和现场快检。

参 考 文 献

- 乔 艳, 周前进, 李孝军等, 2019. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条检测简单异尖线虫/派氏异尖线虫方法的建立. 海洋与湖沼, 50(2): 324—335
- 杨梦香, 柴方超, 周前进等, 2017. 应用 LAMP-LFD 技术可视化检测河流弧菌 (*Vibrio fluvialis*) 的研究. 海洋与湖沼, 48(2): 383—391
- 骆云慧, 石 坚, 方 磊等, 2016. 虾肝肠胞虫 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用. 中国兽医科学, 46(7): 847—852
- Akhoundi M, Downing T, Votýpka J *et al*, 2017. *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 57: 1—29
- Burg J L, Grover C M, Pouletty P *et al*, 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(8): 1787—1792
- Deng M H, Zhong L Y, Kamolnetr O *et al*, 2019. Detection of helminths by loop-mediated isothermal amplification assay: a review of updated technology and future outlook. *Infectious Diseases of Poverty*, 8(1): 20
- Ding W C, Chen J, Shi Y H *et al*, 2010. Rapid and sensitive detection of infectious spleen and kidney necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Archives of Virology*, 155(3): 385—389
- Durand L, La Carbona S, Geffard A *et al*, 2020. Comparative evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) vs qPCR for detection of *Toxoplasma gondii* oocysts DNA in mussels. *Experimental Parasitology*, 208: 107809
- Fallahi S, Kazemi B, Seyyed tabaei S J *et al*, 2014a. Comparison of the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* infection in children with cancer. *Parasitology International*, 63(1): 37—41
- Fallahi S, Tabaei S J S, Pournia Y *et al*, 2014b. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and nested-PCR assay targeting the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* in blood samples of children with leukaemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(3): 347—354
- Ghodrati M, Spotin A, Hazratian T *et al*, 2017. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification assay as a field molecular tool for rapid mass screening of old world *Leishmania* infections in sand flies and in vitro Culture. *Iranian Journal of Parasitology*, 12(4): 506—515
- Hayashida K, Kajino K, Hachaambwa L *et al*, 2015. Direct blood dry LAMP: a rapid, stable, and easy diagnostic tool for Human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3): e0003578
- Hong X K, Zhang X, Fusco O A *et al*, 2017. PCR-based identification of *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma musculi* using maxicircle kinetoplast DNA. *Acta Tropica*, 171: 207—212
- Huang L X, Zhao L M, Su Y Q *et al*, 2018. Genome sequence of *Pseudomonas plecoglossicida* strain NZBD9. *Genome Announcements*, 6(4): e01412-17
- Jaroenram W, Kiatpathomchai W, Flegel T W, 2009. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Molecular and Cellular Probes*, 23(2): 65—70
- Karanis P, Thekisoe O, Kiouptsi K *et al*, 2007. Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17): 5660—5662
- Karthikeyan K, Sharma A, Mekata T *et al*, 2017. Rapid and sensitive real-time loop mediated isothermal amplification for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* of shrimp. *Aquaculture*, 481: 119—123
- Kong Q M, Lu S H, Tong Q B *et al*, 2012. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasites & Vectors*, 5(1): 2
- Lalle M, Possenti A, Dubey J P *et al*, 2018. Loop-Mediated Isothermal Amplification-Lateral-Flow Dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad. *Food Microbiology*, 70: 137—142
- Lee S J, Yokoyama H, Ogawa K, 2004. Modes of transmission of *Glugea plecoglossi* (Microspora) via the skin and digestive tract in an experimental infection model using rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 27(8): 435—444
- Li Y M, Fan P H, Zhou S S *et al*, 2017. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 107: 54—61
- Li S, Liu Y, Wang Y *et al*, 2019. Lateral flow biosensor combined with loop-mediated isothermal amplification for simple, rapid, sensitive, and reliable detection of *Brucella* spp. *Infection and Drug Resistance*, 12: 2343—2353
- Lin Z B, Zhang Y L, Zhang H S *et al*, 2012. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 185(2—4): 296—300
- Liu Q, Wang Z D, Huang S Y *et al*, 2015. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 8(1): 292
- Lucchi N W, Ndiaye D, Britton S *et al*, 2018. Expanding the malaria molecular diagnostic options: opportunities and challenges for loop-mediated isothermal amplification tests for malaria control and elimination. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(2): 195—203
- Mero S, Kirveskari J, Antikainen J *et al*, 2017. Multiplex PCR detection of *Cryptosporidium* sp, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* directly from dried stool samples from Guinea-Bissauan children with diarrhoea. *Infectious Diseases*, 49(9): 655—663
- Mori Y, Kanda H, Notomi T, 2013. Loop-mediated isothermal

- amplification (LAMP): recent progress in research and development. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19(3): 404—411
- Mori Y, Notomi T, 2020. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 26(1): 13—17
- Nikaeen M, Mesdaghinia A R, Tehrani M J *et al*, 2005. A nested-PCR assay for detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water samples. *Iranian Journal of Public Health*, 34(1): 13—18
- Njiru Z K, Constantine C C, Guya S *et al*, 2005. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitology Research*, 95(3): 186—192
- Njiru Z K, Mikosza A S J, Armstrong T *et al*, 2008a. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(2): e147
- Njiru Z K, Mikosza A S J, Matovu E *et al*, 2008b. African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *International Journal for Parasitology*, 38(5): 589—599
- Notomi T, Mori Y, Tomita N *et al*, 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 53(1): 1—5
- Nzelu C O, Kato H, Peters N C, 2019. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(11): e0007698
- Plutzer J, Törökné A, Karanis P, 2010. Combination of ARAD microfibre filtration and LAMP methodology for simple, rapid and cost-effective detection of human pathogenic *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in drinking water. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1): 82—88
- Qu D F, Zhou H Y, Han J Z *et al*, 2013. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a diagnostic tool of *Toxoplasma gondii* in pork. *Veterinary Parasitology*, 192(1—3): 98—103
- Sathish K T, Navaneeth K A, Joseph S R J *et al*, 2018. Visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid diagnosis of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection. *Parasitology Research*, 117(5): 1485—1493
- Schijman A G, 2018. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 184: 59—66
- Sotiriadou I, Karanis P, 2008. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62(4): 357—365
- Thekisoe O M M, Kuboki N, Nambota A *et al*, 2007. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomiasis. *Acta Tropica*, 102(3): 182—189
- Thompson R C A, Ash A, 2019. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections-What's new? *Infection, Genetics and Evolution*, 75: 103951
- Varlet-Marie E, Sterkers Y, Perrotte M *et al*, 2018. A new LAMP-based assay for the molecular diagnosis of toxoplasmosis: comparison with a proficient PCR assay. *International Journal for Parasitology*, 48(6): 457—462
- Wang R J, Li J Q, Chen Y C *et al*, 2018. Widespread occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: Epidemiology, clinical feature, diagnosis, and therapy. *Acta Tropica*, 187: 257—263
- Wong Y P, Othman S, Lau Y L *et al*, 2018. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3): 626—643
- Yin F, Liu W C, Bao P B *et al*, 2018. Comparison of the susceptibility and resistance of four marine perciform fishes to *Cryptocaryon irritans* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 77: 298—303
- Zhang H S, Thekisoe O M M, Aboje G O *et al*, 2009. *Toxoplasma gondii*: sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Experimental Parasitology*, 122(1): 47—50
- Zhou Q J, Chai F C, Chen J, 2018. First record of *Glugea plecoglossi* (Takahashi & Egusa, 1977), a microsporidian parasite of ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis* Temminck & Schlegel, 1846) in Mainland China. *Journal of Fish Diseases*, 41(1): 165—169
- Zhou Q J, Wang L, Chen J *et al*, 2014. Development and evaluation of a real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification assay integrated on a microfluidic disc chip (on-chip LAMP) for rapid and simultaneous detection of ten pathogenic bacteria in aquatic animals. *Journal of Microbiological Methods*, 104: 26—35

A LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION TECHNIQUE COMBINED WITH A LATERAL FLOW DIPSTICK FOR THE DETECTION OF *GLUGEA PLECOGLOSSI*

KANG Jin-Wei^{1,2}, JIN Jing-Lei^{1,2}, DUAN Li-Jun^{1,2,3}, ZHOU Yan^{1,2}, MIAO Liang², ZHOU Qian-Jin^{1,2},
CHEN Jiong^{1,2}

(1. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315832, China; 3. Ningbo Haishu District Animal Husbandry and Veterinary Medicine Technical Management Service Station, Ningbo 315153, China)

Abstract Recently, the farming of fish *Plecoglossus altivelis* in China is facing severe infection of *Glugea plecoglossi*. Therefore, we developed a novel LAMP-LFD method for rapid detection of *G. plecoglossi* infection based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) integrated with the visualization on a lateral flow dipstick assay (LFD). With this method, the β -*tubulin* gene of *G. plecoglossi* was targeted, and six primers designed in its conserved regions were used among them the forward inner primer was biotinylated. A biotinylated LAMP assay was carried out and the amplicon was hybridized exclusively with fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled probe, and then the hybrid product was visualized on a lateral flow dipstick (LFD). Results demonstrate that this LAMP-LFD method could specifically detect *G. plecoglossi*, and no characteristic amplification was observed when using genomic DNA of *Neobenedenia melleni*, *Cryptocaryon irritans*, shrimp tissue with *Enterocytozoon hepatopenaei*, *Anisakis pegreffii*, *Hysterothylacium aduncum*, *Vibrio anguillarum* ayu-H080701, *Pseudomonas plecoglossicida*, and *P. altivelis* tissue. The optimal conditions of LAMP assays were 65°C for 45min, followed by 5min hybridization at 65°C and 5min visualization on LFD. Thus, the whole detection of *G. plecoglossi* could be completed within 55min. The detection limit of LAMP-LFD was 2.0fg/ μ L for plasmid DNA with β -*tubulin* gene and 14.0pg/ μ L for *G. plecoglossi* genome DNA; and it could detect the spores stably from *P. altivelis* liver tissue contaminated by *G. plecoglossi* with an infection intensity of no more than 100 spores/g. In addition, LAMP-LFD could be used in a simple heating equipment such as water bath to complete nucleic acid amplification and probe hybridization without expensive instruments. Therefore, the LAMP-LFD method is easy to operate, sensitive, specific, rapid, and instrument-free, which shows great potential in the routine detection and monitoring of *G. plecoglossi*.

Key words *Glugea plecoglossi*; β -*tubulin* gene; loop-mediated isothermal amplification; lateral flow dipstick; detection