

## 东方蜜蜂微孢子虫环介导恒温扩增检测方法的建立\*

何美妍, 史红霞, 宋珍珍, 党晓群

(重庆师范大学 昆虫病原生物学实验室, 重庆 401331)

**摘要:**以从重庆酉阳分离到的东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)为研究对象,以该物种 16S rDNA 作为靶标,设计引物并采用环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术检测东方蜜蜂微孢子虫。实验结果显示, LAMP 检测的最佳条件为内引物浓度  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 聚合酶用量 800 U;以研究对象 16S rDNA 质粒为模板, LAMP 检测的最低质量浓度为  $1.735 \times 10^{-2} \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , PCR 检测的最低质量浓度为  $1.735 \times 10^{-1} \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ;以研究对象基因组 DNA 为模板, LAMP 检测的最低质量浓度为  $1.475 \times 10^{-3} \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , PCR 检测的最低质量浓度为  $1.475 \times 10^{-1} \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ;以研究对象基因组 DNA、正常中蜂(*Apis cerana*)中肠基因组 DNA、正常意蜂(*Apis mellifera ligustica*)中肠基因组 DNA、正常家蚕(*Bombyx mori*)中肠基因组 DNA、蜜蜂球囊菌(*Ascospaera apis*)孢子基因组 DNA 和中蜂囊状幼虫病毒 cDNA 作为模板进行检测,其中只有以研究对象基因组 DNA 为模板时, LAMP 扩增才有条带。以上研究提示具有高灵敏度和高特异性的 LAMP 检测方法是东方蜜蜂微孢子虫检测的一个有效工具,可为后期在养蜂场建立快速有效的检测工具奠定基础。

**关键词:**东方蜜蜂微孢子虫;环介导等温扩增;16S rDNA;分子检测

**中图分类号:**Q965.8;S895.2<sup>+</sup>3

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-6693(2016)06-0013-06

蜜蜂是一类重要的经济昆虫,在发展与维持自然生态系统和生态农业过程中扮演重要角色<sup>[1]</sup>。世界上已知由昆虫授粉的显花植物共有 16 万种,其中依靠蜜蜂授粉的物种约占 85%<sup>[2]</sup>。然而,蜜蜂的生存受到多种多样的生物与非生物因素的影响。其中,以病原微生物和农药为代表的环境变量因素直接威胁着蜜蜂的生存<sup>[3]</sup>。在蜜蜂病原中,微孢子虫(Microsporidia)的危害尤为显著:当蜜蜂感染微孢子虫后,寿命会减少 1/3,工蜂的工作能力下降<sup>[4]</sup>,产蜜量会减少 40%,蜡分泌量会下降 25%<sup>[5]</sup>,进而造成巨大的经济损失。为了更好地防控微孢子虫引发的微孢子虫病,就需要建立快速可靠的鉴别和检测微孢子虫的方法,从而在感染早期进行及时有效的治疗。优化的 RT-PCR<sup>[6-8]</sup>已被用于东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)的诊断。然而,上述技术检测花费时间长,需要专门的仪器设备,并且只能局限于实验室水平进行分析。2000 年,Notomi 等人研发了环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)法<sup>[9]</sup>。该方法根据靶标上 6 个独立区域,设计两对特异性引物,在恒温条件下利用 Bst DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase)进行基因扩增。该技术可在 45~60 min 内,将几个拷贝的靶核苷酸扩增到  $10^9 \sim 10^{10}$  个的数量级<sup>[10]</sup>。该方法可以直接用肉眼观察扩增结果,实际使用中也可以通过添加荧光染料 SYBR Green I<sup>[11]</sup>的方法来提提高反应结果的可辨识度。由于该方法具有灵敏度高、分析时间短等特点,故已普遍用于细菌、病毒、真菌等不同病原体的快速检测。2011 年, Ma 等人<sup>[12]</sup>把 LAMP 方法应用于中蜂囊状幼虫病毒的检测。2014 年 Ptaszyńska 等人<sup>[13]</sup>使用 LAMP 方法,用 16S rDNA 基因作为靶 DNA 来鉴别和检测西方蜜蜂微孢子虫(*Nosema apis*)和东方蜜蜂微孢子虫。2014 年,笔者所在研究团队对重庆地区的蜜蜂微孢子虫进行了分子鉴定及多态性分析,明确了重庆地区的蜜蜂微孢子虫为东方蜜蜂微孢子虫,并且与 Ptaszyńska 等人检测的东方蜜蜂微孢子虫一样具有遗传多样性<sup>[14]</sup>。因此,本研究拟利用 LAMP 技术这种快速而特异并且可以直接应用到养蜂场检测重庆地区东方蜜蜂微孢子虫的方法,为当地广大养蜂场及时诊断东方蜜蜂微孢子虫并采取有效防治措施提供依据,为养蜂业的健康平稳发展保驾护航。

\* 收稿日期:2016-03-15 修回日期:2016-05-05 网络出版时间:2016-11-02 13:25

资助项目:国家自然科学基金(No. 31270138; No. 31302037);重庆市基础与前沿研究计划项目(No. cstc2013jcyjA80032);重庆市教委科学技术研究项目(No. KJ1500325);国家级大学生创新创业计划项目(No. 201410637005)

作者简介:何美妍,女,研究方向为昆虫病理学, E-mail:412266693@qq.com;通信作者:党晓群,副教授, E-mail:xqdang@cqnu.edu.cn

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20161102.1325.006.html>

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

试验用东方蜜蜂微孢子虫分离于重庆市酉阳县的蜜蜂养殖场患微孢子病的意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)。经分离纯化后,提取微孢子虫总 DNA,经 16S rDNA 测序鉴定确为东方蜜蜂微孢子虫。实验所用的重组质粒 pMD19-T-Nc16S rDNA 为本实验室何超等人构建<sup>[14]</sup>。

### 1.2 实验方法

1.2.1 东方蜜蜂微孢子虫 16S rDNA 序列引物的设计 LAMP 引物包括 1 对外引物和 1 对内引物,正向内引物 FIP 由 F1c 和 F2 序列组成,即 5'-F1c-F2;反向内引物 BIP 由 B1c 和 B2 序列组成,即 5'-B1c-B2。正向、反向外引物分别由 F3, B3 序列组成,这两对引物能特异的结合靶序列上的 6 个特异区域。另外还设计 1 对正、反向环引物分别为 LF, LB, 以提高 LAMP 反应速度。基于东方蜜蜂微孢子虫的 16S rDNA 序列(GenBank 登录号 DQ078785)用 Primer Explorer version 4 (Net Laboratory, Tokyo, Japan)设计 LAMP 引物<sup>[15]</sup>,引物序列具体信息如表 1 所示。

表 1 检测东方蜜蜂微孢子虫的 LAMP 引物组

Tab. 1 Primers used for LAMP detection of *N. ceranae*

引物名称	长度/bp	基因位点	引物序列(5'~3')
正向内引物 FIP	53	F1c:610~634 F2:560~585	TACTGCTGGAAGTACAATGGTAATTTTTTGTATGTATTTTTTGAACAAGGACG
反向内引物 BIP	45	B1c:636~658 B2:700~718	ACTATGCCGACGATGTGATATGATTTTCATACTACCCCCAGAGCC
正向外引物 F3	18	544~561	AGCGAAAGCTGTACACTT
反向外引物 B3	22	718~739	CTTTAATTTTCAATCGTGCGAT
正向环引物 LF	18	659~676	ATCTTCGCTCCTCCAGCT
反向环引物 LB	18	588~605	AAATATTAATTTGTATTA

1.2.2 东方蜜蜂微孢子虫的分离与纯化 取蜜蜂腹部置于灭菌的研钵中,加入适量灭菌水研磨成匀浆,在 4 °C 下 600 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上层液体以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后,弃上清得到沉淀。多次重复上述步骤得到东方蜜蜂微孢子虫的粗提液;粗提液用相对密度梯度依次为 100%, 75%, 50%, 25% 的细胞分离液 percoll 进行密度梯度离心,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min 后,最底层即为得到纯化的蜜蜂微孢子虫;将纯化得到的蜜蜂微孢子虫加入适量的生理盐水充分洗涤,再以 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min,弃上清,重复 3 次后,得到底层乳白色沉淀物即为纯化的蜜蜂微孢子虫,加入适量生理盐水后,置于 4 °C 冰箱保存备用,取 1 μL 在光学显微镜下观察并采集图像。

1.2.3 东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA 的提取 按照文献[14]中提供的相关 DNA 提取方法进行提取。

1.2.4 阳性克隆质粒的提取 按照试剂盒 OMEGA D6943-01 Plasmid Mini Kit I(100)的步骤提取质粒。

1.2.5 用 LAMP 外引物 F3 和 B3 进行 PCR 反应 以重组质粒 pMD19-T-Nc16S rDNA 为模板进行 PCR 扩增反应,反应程序为:95 °C 预变性 4 min;95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 50 s,共 32 个循环;72 °C 终延伸 10 min,4 °C 保存。

表 2 LAMP 扩增反应体系

Tab. 2 The reaction system of LAMP assay

1.2.6 东方蜜蜂微孢子虫 16S rDNA 的 LAMP 扩增 以重组质粒 pMD19-T-Nc16S rDNA 为模板进行 LAMP 扩增反应(表 2)。反应程序为:除 Bst DNA 聚合酶外,全部反应物加入灭菌 PCR 管中,95 °C,冰浴 5 min;冰上放置冷却 5 min;加入 Bst DNA 聚合酶,60 °C,温浴 60 min;80 °C,失活 3 min,瞬时离心后,进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

反应物	体积/μL	反应物	体积/μL
10×buffer	2.5	LB(10 μmol·L <sup>-1</sup> )	2
甜菜碱(0.8 mol·L <sup>-1</sup> )	5	F3(10 μmol·L <sup>-1</sup> )	1
dNTPs(2.5 mmol·L <sup>-1</sup> )	2	B3(10 μmol·L <sup>-1</sup> )	1
MgSO <sub>4</sub> (25 mmol·L <sup>-1</sup> )	1	Bst DNA 聚合酶(800 U)	1
FIP(5 μmol·L <sup>-1</sup> )	1	模板	0.5
BIP(5 μmol·L <sup>-1</sup> )	1	ddH <sub>2</sub> O	5
LF(10 μmol·L <sup>-1</sup> )	2		

## 2 结果与分析

### 2.1 东方蜜蜂微孢子虫的分离与纯化结果

经过 percoll 密度梯度离心纯化的东方蜜蜂微孢子虫如图 1 所示,微孢子虫纯净,对其进行计数,以备后面的感染实验之用。

### 2.2 东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA 的提取结果

在提取到东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA 后,接着对该 DNA 的质量浓度进行测定,为后续 PCR 扩增和标准曲线绘制做准备。检测结果表明,采用文献[14]的方法所抽提到的东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA 比较完整(图 2),可以用于下一步实验。

### 2.3 pMD19-T-Nc16S rDNA 重组质粒的 LAMP 扩增结果

为了构建阳性对照体系,测定已验证正确的 pMD19-T-Nc16S rDNA 重组质粒的质量浓度,再对该 rDNA 进行 LAMP 扩增,水作为阴性对照。琼脂糖凝胶电泳检测后,重组质粒 pMD19-T-Nc16S rDNA 为模板的泳道可见各种连续的大小不一的条带,而水为模板的泳道没有条带,这与预测的结果相符合(图 3)。

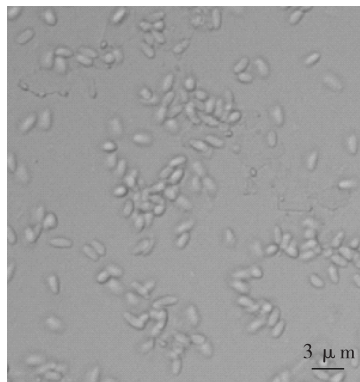
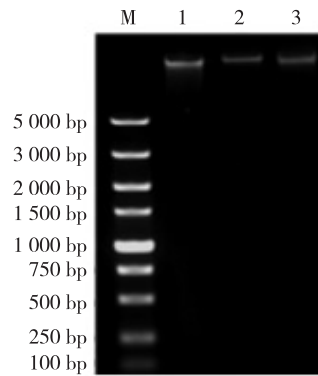


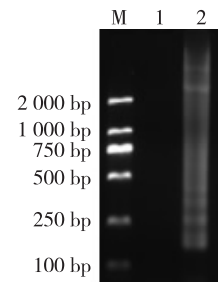
图 1 光学显微镜下的纯化的东方蜜蜂微孢子虫

Fig. 1 The purified *N. ceranae* spores under microscope



注: M 为 DNA 标准分子量(DL5000); 1~3 均为东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA。

图 2 东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA  
Fig. 2 Genomic DNA of *N. ceranae*



注: M: DNA 标准分子量(DL2000); 1、2 分别为无菌水、pMD19-T-Nc16S rDNA 重组质粒。

图 3 LAMP 扩增检测 pMD19-T-Nc16S rDNA 质粒

Fig. 3 LAMP assay to detect pMD19-T-16NcS rDNA plasmid DNA

### 2.4 LAMP 引物以及 Bst DNA 聚合酶用量的优化

将内引物 FIP, BIP 按 10 倍稀释进行测定,确定最佳引物浓度,通过琼脂糖凝胶电泳检测以及对扩增产物的电泳图进行灰度值曲线绘制,确定内引物 FIP 和 BIP 的最佳浓度为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 4a, 5a)。然后,对反应需要的 Bst DNA 聚合酶用量按 10 倍稀释进行测定,最后通过琼脂糖凝胶电泳检测确定反应最佳 Bst DNA 聚合酶的用量为 800 U(图 4b, 5b)。

### 2.5 东方蜜蜂微孢子虫 16S rDNA 阳性质粒的灵敏度验证

为了检测 LAMP 方法对东方蜜蜂微孢子虫 16S rDNA 重组质粒的检测灵敏度,在其他反应条件都一致的情况下,以按 10 倍稀释的东方蜜蜂微孢子虫 16S rDNA 重组质粒作为模板,分别用 LAMP 和 PCR 进行灵敏度实验,结果显示 LAMP 检测的最低质量浓度为  $1.735 \times 10^{-2} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , PCR 检测的最低质量浓度为  $1.735 \times 10^{-1} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (图 6)。

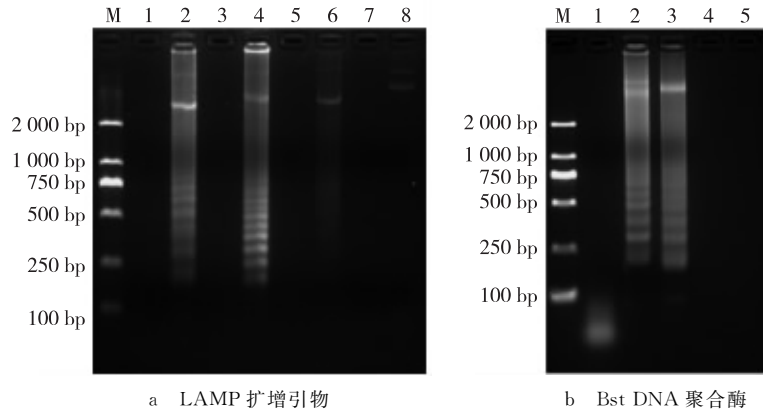
### 2.6 东方蜜蜂微孢子虫 16S rDNA 阳性质粒 LAMP 检测的特异性验证

为了完善 LAMP 检测体系,对 LAMP 检测东方蜜蜂微孢子虫 16S rDNA 重组质粒的特异性进行了初步试验。在其他反应条件都一致的情况下,分别把 16S rDNA 重组质粒 Nc、东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA、正常中蜂(*Apis cerana*)中肠基因组 DNA、正常意蜂(*Apis mellifera ligustica*)中肠基因组 DNA、正常家蚕(*Bombyx mori*)中肠基因组 DNA、蜜蜂球囊菌(*Ascospaera apis*)孢子基因组 DNA 和中蜂囊状幼虫病毒 cDNA 作为模板,进行 LAMP 特异性实验,反应结果如图 7 所示。结果显示,东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA 有扩增条带,其他几个物种的基因组 DNA 或 cDNA 均未有扩增条带。

### 2.7 东方蜜蜂微孢子虫基因组的灵敏度验证

为了比较 LAMP 技术与常规 PCR 的优劣,将东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA 按 10 倍稀释后作为模板,分

别用 LAMP 和 PCR 进行灵敏度实验,反应结果如图 8 所示。其中,LAMP 检测的最低质量浓度为  $1.475 \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,PCR 检测的最低质量浓度为  $1.475 \times 10^{-1} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,因此前者的检测灵敏度比后者高出 100 倍。



注:M 为 DNA 标准分子量(DL2000)。a 图中 1,3,5,7 分别是模板为水的 LAMP 扩增产物,其中所用 FIP 浓度分别为 10,5,2,1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,BIP 浓度设置与 FIP 的情况相同;2,4,6,8 分别是模板为质粒的 LAMP 扩增产物,其中 FIP、BIP 浓度设置与 1,3,5,7 中的情况相同。b 图中 1 是模板为水的 LAMP 扩增产物;2~5 是模板为质粒的 LAMP 扩增产物;2,3,4,5 的 Bst DNA 聚合酶用量分别为 8 000,800,80,8 U。

图 4 LAMP 扩增引物以及 Bst DNA 聚合酶用量的优化

Fig. 4 Optimized the concentration of LAMP primers and the dosage of Bst DNA polymerase

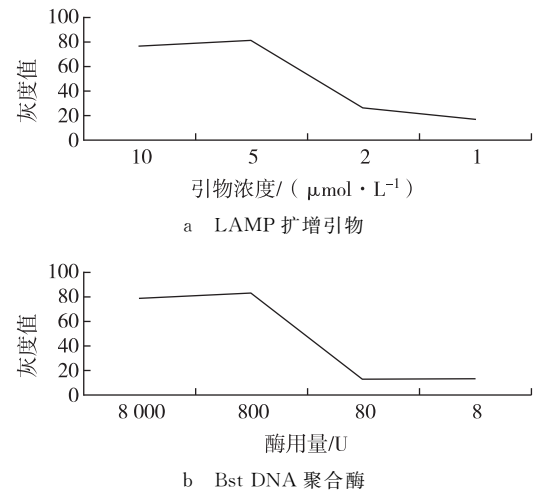
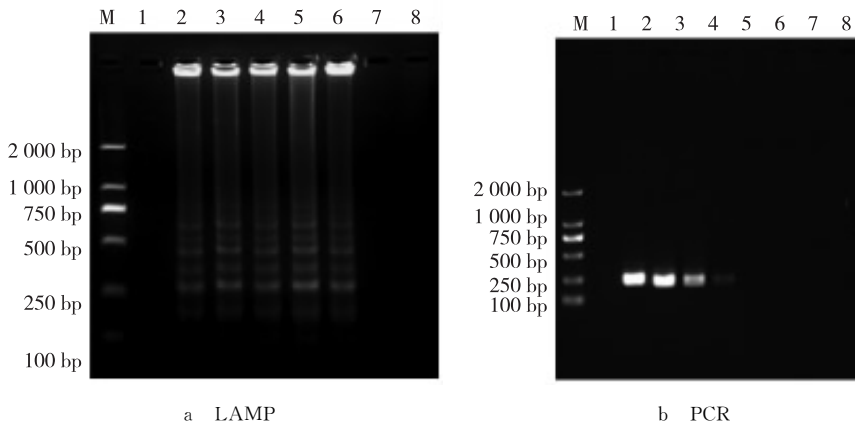


图 5 LAMP 扩增引物以及 Bst DNA 聚合酶用量的灰度值曲线图

Fig. 5 The gray value curve of the concentration of LAMP primers and the dosage of Bst DNA polymerase



注:M 为 DNA 标准分子量(DL2000);1 中模板为水;2~8 中 pMD19-T-Nc16SrDNA 质粒质量浓度分别为  $1.735 \times 10^2, 1.735 \times 10^1, 1.735, 1.735 \times 10^{-1}, 1.735 \times 10^{-2}, 1.735 \times 10^{-3}, 1.735 \times 10^{-4} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

图 6 对 pMD19-T-Nc16S rDNA 的 LAMP 和 PCR 灵敏度检测

Fig. 6 Detection sensitivity of LAMP and PCR method for pMD19-T-Nc16S rDNA plasmid

分别用两者的 16S rRNA 设计的引物去检测时未发现交叉反应<sup>[13]</sup>。本研究根据对东方蜜蜂微孢子虫的 16S rDNA 序列分析所设计的 LAMP 引物,使用 Bst DNA 聚合酶,采用 LAMP 方法对重庆地区的东方蜜蜂微孢子虫病进行检测。实验过程中,分别对内引物 FIP 和 BIP 的浓度以及 Bst DNA 聚合酶的用量进行了优化,当引物浓度为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Bst DNA 聚合酶的用量为 800 U 时的条带相对另外 3 个浓度的条带更为清晰和明亮(图 4),且灰度值最大(图 5)。据此,本研究确定内引物 FIP 和 BIP 的最佳浓度为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,反应最佳 Bst DNA 聚合酶的用量为 800 U。

为了更好地完善重庆地区东方蜜蜂微孢子虫 LAMP 检测体系并且与常规 PCR 方法作比较,本研究分别用上述两种方法对东方蜜蜂微孢子虫检测的灵敏度和特异性进行试验。结果显示,东方蜜蜂微孢子虫 16S rDNA 重组质粒的 LAMP 检测极限为  $1.735 \times 10^{-2} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,PCR 方法的检测极限为  $1.735 \times 10^{-1} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,故 LAMP 方法的检测灵敏度比 PCR 方法高 1 个数量级。LAMP 对东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA 的检测极限为

### 3 讨论

蜜蜂微孢子虫严重影响蜜蜂种群的健康并对养蜂业造成严重的损失。因此,对蜜蜂微孢子虫的早期诊断和预防对于养蜂场生产力的维持和蜂群的健康至关重要。LAMP 作为一种新颖的病原检测技术<sup>[9]</sup>,因具有特异性强、灵敏度高、操作简便、设备要求低等特点,故有其他技术无法替代的优势,现已逐步应用于病毒、细菌、真菌和寄生虫等病原体的检测中<sup>[16-18]</sup>。2014 年,Ptaszyńska 等人<sup>[13]</sup>使用 LAMP 方法,用 GspSSD DNA 聚合酶及多拷贝的 16S rDNA 基因作为靶 DNA 来鉴别和检测西方蜜蜂微孢子虫和东方蜜蜂微孢子虫。当



$1.475 \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 而常规 PCR 的检测极限为  $1.475 \times 10^{-1} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 可见 LAMP 方法的检测灵敏度比 PCR 方法高 2 个数量级。因此, LAMP 比常规 PCR 检测更灵敏, 操作更简便, 反应时间更短, 对设备要求更低, 在养蜂场的应用则更具优势。LAMP 方法的特异性试验结果表明, 东方蜜蜂微孢子虫检测呈阳性, 但是未感染微孢子虫的正常的中蜂、意蜂和家蚕以及蜜蜂球囊菌和中蜂囊状幼虫病毒都没有扩增出条带, 这一结果显示本研究建立的 LAMP 检测方法具有特异性。为了使检测体系更加完善并能更好的应用于实际, 今后还会对蜜蜂带毒组织进行检测灵敏度等实验。

蜜蜂在农业生产以及全球生态中扮演的重要角色使得对微孢子病的检测防控不容忽视。早期诊断对于养蜂国家和养蜂场的重要性不言而喻。虽然 LAMP 技术原理相对比较复杂, 尤其引物设计更需要专业人士设计, 然而对应用人员来说, 操作非常的简便, 只需简单加样, 不需要特别的仪器, 检测结果的判别也相对简单。LAMP 反应扩增结果的判定主要有 3 种: 1) 反应液里加入  $\text{MgSO}_4$ , 副产物焦磷酸镁沉淀可肉眼观测, 管内液体浑浊则呈阳性反应, 离心有白色沉淀集于管底, 阴性反应则无此现象; 2) 产物中加入荧光染料 SYBY Green I, 橙红色为阴性反应, 绿色的为阳性反应; 3) 采用 2% 琼脂糖凝胶电泳, LAMP 电泳结果显示特征性梯状条带, 如无任何条带则结果为阴性<sup>[19]</sup>。第一种方法虽然简便, 但是主要是通过肉眼直接观察, 具有一定的主观性, 并且可能导致较低

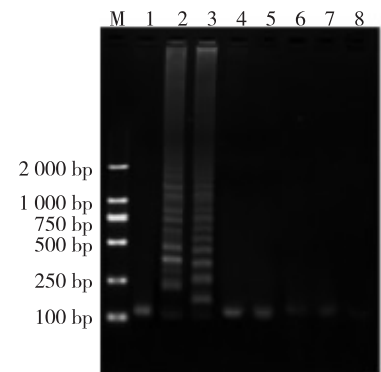
的检测极限; 第二种方法通过加入荧光染料观察颜色变化, 但是试验过程中发现由于阴性管中引物形成的二聚体也会发微弱的绿色荧光, 因此该方法对准确判定结果会产生一定的影响; 所以本研究选定的是第三种方法即电泳检测, 因为这种方法可以直观并且客观地观察到结果。

本研究初步建立了用 LAMP 快速简便检测重庆地区东方蜜蜂微孢子虫的体系, 为广大养蜂场及时检测

东方蜜蜂微孢子虫提供了可能性, 也为大范围全面开展东方蜜蜂微孢子虫的检测和防控提供了有效方法。下一步将简化病蜂基因组的提取步骤, 优化反应体系及其稳定性, 尽早实现 LAMP 检测技术在养蜂场的应用。

#### 参考文献:

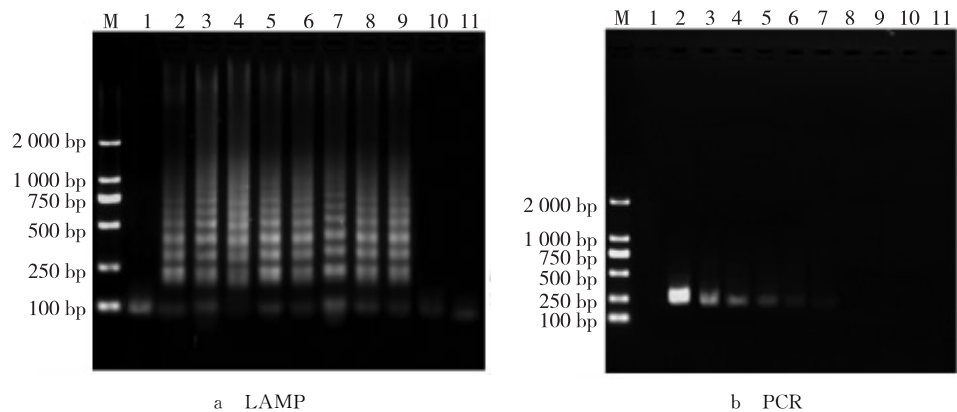
- [1] Dussaubat C, Brunet J L, Higes M, et al. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. [J]. Plos One, 2012, 7(5): 934-937.
- [2] Losey J E, Vaughan M. The economic value of ecological services provided by insects[J]. Bioscience, 2006, 56(4): 311-323.
- [3] Aufaivre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, et al. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides[J]. Plos One, 2014, 9(3): e91686.
- [4] Fries I. *Nosema apis*-a parasite in the honey bee colony[J]. Bee World, 1993, 74(1): 5-19.
- [5] Dubiel S. Choroby pszczol i ich zwalczanie[J]. Lubuski Informator Rolniczy, 1999, 8: 31-32.
- [6] Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, et al. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20): 6331-6338.



注: M 为 DNA 标准分子量(DL2000), 1~8 中模板分别为水、pMD19-T-Nc16S rDNA 质粒、东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA、蜜蜂球囊菌基因组 DNA、中蜂囊状幼虫病毒 cDNA、正常中蜂中肠基因组 DNA、正常意蜂中肠基因组 DNA、正常家蚕中肠基因组 DNA。

图 7 LAMP 方法的特异性检测

Fig. 7 Detection specificity of LAMP method



注: M 为 DNA 标准分子量(DL2000); 1 中模板为水; 2 中模板为 pMD19-T-Nc16S rDNA 质粒; 3~11 中东方蜜蜂微孢子虫基因组 DNA 的质量浓度分别为  $1.475 \times 10^3$ ,  $1.475 \times 10^2$ ,  $1.475 \times 10^1$ ,  $1.475$ ,  $1.475 \times 10^{-1}$ ,  $1.475 \times 10^{-2}$ ,  $1.475 \times 10^{-3}$ ,  $1.475 \times 10^{-4}$ ,  $1.475 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

图 8 对东方蜜蜂微孢子虫基因组的 LAMP 和 PCR 灵敏度检测

Fig. 8 Detection sensitivity of LAMP and PCR method for the DNA from *N. ceranae*

- [7] Bourgeois A L, Rinderer T E, Beaman L D, et al. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 103(1): 53-58.
- [8] Burgher-Maclellan K L, Williams G R, Shutler D, et al. Optimization of duplex real-time PCR with melting-curve analysis for detecting the microsporidian parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* [J]. Canadian Entomologist, 2010, 142(3): 271-283.
- [9] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [10] Kevan P G, Guzman E, Skinner A, et al. Colony collapse disorder (CCD) in Canada; do we have a problem? [J]. Hive Lights, 2007, 20(2): 15-18.
- [11] Malone L A, Giacomini H A. Effects of *Nosema apis* Zander on inbred New Zealand honey bees (*Apis mellifera ligustica* L.) [inbred colonies, longevity, seasonal effect] [J]. Apidologie, 1996, 27(6): 479-486.
- [12] Ma M, Chen M, Li M, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Chinese sacbrood virus [J]. Journal of Virological Methods, 2011, 176(1/2): 115-119.
- [13] Ptaszyńska A A, Borsuk G, Woźniakowski 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.
- [14] 何超. 重庆地区东方蜜蜂微孢子虫的遗传多样性鉴定及 30 kD 蛋白质的 LC-MS/MS 分析[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2014.
- He C. Identification of molecular genetic diversity and 30 kD size protein by LC-MS/MS in *Nosema ceranae* from Chongqing area [D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2014.
- [15] Ptaszyńska A A, Borsuk G, Woźniakowski 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.
- [16] 丁文超, 胡健饶, 史雨红, 等. 环介导恒温扩增技术快速检测溶藻弧菌 [J]. 分子细胞生物学报, 2009, 42(1): 70-76.
- Ding W C, Hu J R, Shi Y H, et al. Establishment of LAMP detection method and study on molecular vaccines co-expressing two genes of *Brucellosis* [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2009, 42(1): 70-76.
- [17] Thekisoe O M M, Kuboki N, Nambota A, et al. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomiasis [J]. Acta Tropica, 2007, 102(3): 182-189.
- [18] Zheng F, Lin G, Zhou J, et al. A reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification assay for detection of bovine ephemeral fever virus in the blood of infected cattle [J]. Journal of Virological Methods, 2011, 171(1): 306-309.
- [19] 陈传, 凌霄, 郭震, 等. LAMP 技术在食源性病原微生物检测中的应用 [J]. 生命科学研究, 2014, 8(2): 140-144.
- Chen C, Ling X, Guo Z, et al. The application of LAMP technology in detection for forborne pathogenic microorganisms [J]. Life Science Research, 2014, 18(2): 140-144.

## Animal Sciences

### Rapid Detection of *Nosema ceranae* by Loop-mediated Isothermal Amplification Assay

HE Meiyang, SHI Hongxia, SONG Zhenzhen, DANG Xiaoqun

(Laboratory of Insect Pathogen Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** *Nosema ceranae* which isolated from Youyang Chongqing used as subject for the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with specific primers targeting 16S rDNA. The optimized condition of LAMP assay is that the concentration of inner primers are  $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  and the dosage of polymerase was 800 U. Using the recombinant plasmid pMD19-T-Nc16S rDNA as subject, the sensitivity of LAMP was  $1.735 \times 10^{-2} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  whereas PCR was  $1.735 \times 10^{-1} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Then DNA of *N. ceranae* was applied to LAMP and PCR testing, respectively. LAMP has ability to detect as low as  $1.475 \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  DNA comparing PCR which can detect  $1.475 \times 10^{-1} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  DNA. Further, the DNA of *N. ceranae*, the midgut of normal *Apis ceranae*, the midgut of normal *Apis mellifera*, the midgut of normal *Bombyx mori*, *Ascospaera apis*, the cDNA of Chinese sacbrood virus were tested with LAMP, we found that only the DNA of *N. ceranae* had the corresponding amplified bands. The present study showed that the LAMP which has both higher sensitivity and higher specificity compared with the standard PCR was an effective tool to detect *N. ceranae*. This study laid a foundation for the following study of establishment a rapid and effective detection tool in apiculture.

**Key words:** *Nosema ceranae*; loop-mediated isothermal amplification; 16S rDNA; molecular detection

(责任编辑 方 兴)