



## 多子小瓜虫 PCR 和 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

曹泽艺<sup>1,2</sup>, 周庆杰<sup>1,2</sup>, 陈凯<sup>2</sup>, 刁丙文<sup>1,2\*</sup>, 谢骏<sup>1,2\*</sup>,  
潘良坤<sup>2</sup>, 毛颖<sup>3</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部稻渔综合种养生态重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 宜兴市水产畜牧站, 江苏 宜兴 214252)

**摘要:** 为克服现有小瓜虫病的显微镜检和 PCR 诊断等方法在该寄生虫的感染早期阶段和环境样本检测中存在的缺陷, 建立特异性强、灵敏度高的多子小瓜虫 PCR 检测方法, 实验根据多子小瓜虫线粒体 CO I 序列设计和筛选了一对引物, 经过 PCR 程序优化、特异性、灵敏性验证以及临床和环境样品检测分析, 分别建立了普通 PCR 和荧光定量 PCR 检测方法。结果显示, 本研究获得的检测引物对多子小瓜虫有较高的扩增特异性, 对同属纤毛虫类的草履虫、四膜虫和肠袋虫以及常见养殖鱼类宿主异育银鲫、草鱼、尼罗罗非鱼和团头鲂等样本均无扩增; 扩增特异性和灵敏度都优于文献报道的方法。其中, 普通 PCR 最低检测的样本浓度为掠食体 2.67 个/ $\mu\text{L}$ , 荧光定量 PCR 在掠食体 0.02 个/ $\mu\text{L}$  时依然能有效检出, 荧光定量 PCR 检测灵敏度高于普通 PCR。研究表明, 在临床样本和养殖水环境样本检测应用中, 基于该引物的两种 PCR 方法表现出很高的一致性, 能有效检出潜伏感染鱼体和养殖水环境中的多子小瓜虫。本研究所建立的多子小瓜虫的检测方法特异性强、灵敏度高, 适用于淡水养殖中小瓜虫病的早期诊断和病原体的检测。

**关键词:** 多子小瓜虫; PCR; 荧光定量 PCR; 小瓜虫病; 检测方法

中图分类号: S 941.5

文献标志码: A

多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 是一种常见的淡水鱼类寄生纤毛虫<sup>[1]</sup>, 其几乎没有宿主专一性, 可以感染绝大多数淡水鱼类<sup>[2]</sup>。当小瓜虫感染侵入宿主皮肤等部位时, 会刺激侵入部位的周围上皮细胞增生, 从而在皮肤、鳍条以及鳃丝等部位出现大量肉眼可见的白点<sup>[3]</sup>, 因此小瓜虫病也被称为“白点病”<sup>[2]</sup>。由于小瓜虫对宿主营养的掠夺, 病鱼常常瘦弱<sup>[1, 4-5]</sup>; 当虫体成熟离开宿主时, 会导致宿主体表、鳃丝出现大量创口,

严重破坏鱼体皮肤的屏障作用以及鳃丝的气体交换功能, 造成呼吸障碍并诱发细菌感染<sup>[6]</sup>, 最终导致鱼类死亡<sup>[3-4]</sup>。小瓜虫病被我国农业农村部列为水生动物三类疫病。

多子小瓜虫的生活史较为简单, 大致可以分为掠食体 (theront) 期、滋养体 (trophont) 期和包裹 (tomont) 期。多子小瓜虫的掠食体 (虫体大小约 20~50  $\mu\text{m}$ ) 与水体中浮游纤毛类相似, 可以在水体中自由游动, 遇到鱼体后钻入鳃、皮肤或鳍条的

收稿日期: 2022-08-09 修回日期: 2022-09-13

资助项目: 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-45)

第一作者: 曹泽艺 (照片), 从事水产动物寄生虫研究, E-mail: caozy@stu.njau.edu.cn

通信作者: 刁丙文, 从事水产动物病害防治研究, E-mail: xibw@ffrc.cn;

谢骏, 从事水产动物病害防治研究, E-mail: xiej@ffrc.cn



上皮细胞间发育形成滋养体<sup>[2]</sup>。滋养体摄取宿主营养逐渐发育成熟, 成虫 (大小 300~800  $\mu\text{m}$ ) 钻出表皮, 沉入水底或附着于悬浮物上, 虫体表面纤毛逐渐消失, 分泌透明胶质膜形成包囊。在适宜水温 (15~25  $^{\circ}\text{C}$ ) 下包囊内虫体经多次二分裂生殖产生数百掠食体释放到水体中, 再次感染鱼体<sup>[2,5]</sup>。由于多子小瓜虫的掠食体与水体中浮游纤毛虫大小和形态非常相似, 常规显微镜检难以准确检测养殖环境中的多子小瓜虫。从掠食体侵入鱼体到出现典型的临床症状“白点”, 通常需要 1 周左右。在此期间, 由于滋养体个体微小, 被感染鱼缺乏典型临床症状, 呈现隐性感染状态, 及时准确的显微镜检非常困难。因此, 传统的显微镜检在小瓜虫病的早期诊断和监测预警等方面存在严重不足。

PCR 技术具有较高的灵敏性和特异性, 被广泛用于水生动物疾病的诊断与病原体检测。近年来, 在传统 PCR 基础上又不断发展出巢式/半巢式 PCR (nPCR)<sup>[7-8]</sup>、荧光定量 PCR (qPCR)<sup>[9-11]</sup> 和数字 PCR (dPCR)<sup>[12-13]</sup> 等多种灵敏度高、特异性好的检测方法。荧光定量 PCR 利用荧光染料或探针与 DNA 链结合后发出荧光的特性, 实时检测扩增信号, 具有特异性强、灵敏度高、定量准确等优点<sup>[10]</sup>。

在开展多子小瓜虫检测过程中发现, 目前文献中的多子小瓜虫 PCR 检测方法多数存在特异性差或灵敏度低等方面缺陷。为了建立特异性强、灵敏度高的多子小瓜虫 PCR 检测方法, 本研究基于线粒体 DNA (mtDNA) 上 *CO I* 基因序列设计一对新扩增引物, 建立了普通 PCR 和基于 SYBR 染料法的荧光定量 PCR 检测方法, 并验证分析了其对临床样本和环境样本的应用效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

多子小瓜虫虫株来源于无锡市花鸟鱼虫市场销售的金鱼, 并通过实验室循环水养殖异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 进行传代保存。草履虫 (*Paramecium* sp.) 固定样本由本实验室保存。四膜虫 (*Tetrahymena* sp.) 和肠袋虫 (*Balantidium* sp.) 固定样本由中国科学院水生生物研究所馈赠。异育银鲫、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉试验基地提供, 分别解剖, 剪取鳃丝

和肌肉样本,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

刮取发病鱼的“白点”放入装有曝气自来水的培养皿中, 在体视镜 (尼康 SMZ18) 下吸除黏液和杂质, 将滋养体转入 50 mL 离心管, 避光条件下 23  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养, 可得含小瓜虫掠食体的虫液。吸取虫液在显微镜下计数计算掠食体的浓度。用于提取基因组 DNA 的掠食体通过 12 000 r/min 离心 5 min 浓缩, 调整虫液浓度至 50  $\mu\text{L}$ , 含有约 10 000 个虫体。

多子小瓜虫感染潜伏期鱼和发病鱼的组织样本由实验室人工感染获得。孵化出的掠食体按 5 000 个/尾与健康异育银鲫在 3 L 曝气自来水中共置 3 h, 转入 150 L 水缸中继续养殖, 24 h 后采集潜伏期鱼组织样本, 7 d 后体表出现大量白点时采集发病鱼组织样本。鱼体采样时, 采用 MS-222 麻醉, 剪取约 5 mg 鳃丝样本于 1.5 mL 灭菌 EP 管中,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

养殖水环境样本分别采集自室外养殖池塘和室内循环水系统。选取南泉试验基地未暴发小瓜虫病的 20 口池塘 (采样前通过试验塘的鱼体显微镜检查鉴定未有小瓜虫病发生), 使用采水器采集池塘中下部水样 2 L, 现场经 40 目筛绢粗滤后装入采样瓶, 冷藏带回实验室处理。室内养殖水样采集自小瓜虫维持传代的循环水养殖系统, 量取 2 L。采集的水样使用 5  $\mu\text{m}$  聚丙烯滤膜真空抽滤。将各样本抽滤后所得的滤膜分别剪碎, 放入 50 mL 离心管,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。本研究根据南京农业大学实验动物福利与伦理委员会的指导方针, 对实验方案进行了审查和批准。

### 1.2 样本 DNA 提取

草履虫、四膜虫、肠袋虫、多子小瓜虫和鱼类组织样本都采用磁珠法微量基因组 DNA 抽提试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 并参照说明书中步骤提取基因组 DNA。养殖水环境样本的基因组 DNA 提取采用 E.Z.N.A.<sup>®</sup> Water DNA Kit (Omega), 提取纯化的基因组 DNA 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中多子小瓜虫的 *CO I* 基因序列 KJ690553.1, 使用 NCBI 提供的 Primer-BLAST 工具<sup>[14]</sup> 设计和筛选出一对特异性引物。同时, 将《中华人民共和国出入境检验检疫行业标准: 多

子小瓜虫检疫技术规范 (SN/T4290—2015)》<sup>[15]</sup> 和 Howell 等<sup>[16]</sup> 文献资料中所提供的引物合成用于比

较分析。所有引物 (表 1) 均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 本研究所用的引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence	$T_m/^\circ\text{C}$	产物/bp product	来源 source
qIchF	TTCTGCCCGTACTTTAGTTACC	54.08	131	本研究 this study
qIchR	TGGTTGTAATAACACCTGCAA	53.61		
XGCF	GTACTTTATTTAGGAGGAGACT	50.39	326	[15]
XGCR	TGTTTAACGAGAGAAAATCATAAAAT	47.98		
667f	AATGGGCATACGTTTGCAAACC	56.60	118	[16]
765r	ATAGCCCGGATACATCAGCATG	56.91		
765r#	CATGCTGATGTATCCGGGCTAT	56.91		

#### 1.4 普通 PCR 检测

**反应体系和程序设置** 采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系, 包含  $2\times\text{Taq}$  Master Mix (Dye Plus) (Vazyme) 12.5  $\mu\text{L}$ , 正反引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  9.5  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ 。本研究所设计的引物 (qIchF 和 qIchR), 经过优化后反应程序确定为 95  $^\circ\text{C}$  预变性 3 min; 35 个循环的 95  $^\circ\text{C}$  变性 15 s, 51  $^\circ\text{C}$  退火 15 s, 72  $^\circ\text{C}$  延伸 10 s; 最后 72  $^\circ\text{C}$  延伸 5 min。行业标准<sup>[15]</sup> 中的引物 (XGCF 和 XGCR) 和 Howell 等<sup>[16]</sup> 的引物 (667f 和 765r) 所采用的反应程序分别参照文献中说明。PCR 反应结束后都使用 3% 琼脂糖凝胶电泳, 检测拍照。

**特异性检测** 分别以草履虫、四膜虫、肠袋虫、异育银鲫、草鱼、尼罗罗非鱼、团头鲂基因组 DNA 为模板,  $\text{ddH}_2\text{O}$  为阴性对照, 按上述反应条件和程序设置对各组引物对进行特异性检测。

**灵敏度检测** 将“样本 DNA 提取”中所述获得的多子小瓜虫掠食体基因组 DNA 作为标准品, 用  $\text{ddH}_2\text{O}$  进行 5 倍倍比梯度稀释, 得到稀释倍数分别为 1、5、25、125、625、3 125 和 15 625 倍的 7 个浓度梯度。将 30  $\mu\text{L}$  基因组 DNA 洗脱液中所对应的掠食体数量推算到各稀释梯度中, 每微升 DNA 模板所对应的掠食体数量 ( $n$ ) 分别为 333.33、66.67、13.33、2.67、0.53、0.11 和 0.02。由于线粒体  $\text{CO I}$  基因在细胞内具有多拷贝<sup>[17]</sup>, 尽管最高稀释倍数的溶液中掠食体数量小于 1, 但仍可能有完整的  $\text{CO I}$  基因模板。以  $\text{ddH}_2\text{O}$  为阴性对照, 以梯度稀释 DNA 为模板, 使用引物 XGC 和 qIch 进行灵敏度检测。每个样本重复检测 3 次。

**临床样本和养殖水环境样本检测** 将“样

本 DNA 提取”中所述获得的健康异育银鲫、潜伏感染异育银鲫和发病异育银鲫的样本各 20 份、养殖池塘水环境样本 20 份和多子小瓜虫维持传代循环水样本 1 份所提取 DNA 为模板, 使用引物 qIch 进行扩增检测, 所有阳性环境样本同每组鱼体样本中随机抽取的 3 份阳性样本送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 验证是否为多子小瓜虫。

#### 1.5 荧光定量 PCR

**反应体系和程序** 采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系, 包含 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Vazyme) 10  $\mu\text{L}$ , 正反引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.4  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  7.2  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 。反应程序设置: 95  $^\circ\text{C}$  预变性 30 s; 40 次循环的 95  $^\circ\text{C}$  变性 10 s, 60  $^\circ\text{C}$  退火和延伸 30 s, 并采集信号; 最后, 在 65~95  $^\circ\text{C}$  以 0.5  $^\circ\text{C}$  为增量间隔 5 s 采集溶解曲线。

**特异性检测** 与“普通 PCR 检测”所述特异性检测中样本 DNA 模板相同, 以  $\text{ddH}_2\text{O}$  为阴性对照, 对 qIch 引物进行特异性检测。

**灵敏度和扩增效率检测** 以“普通 PCR 检测”所述灵敏度检测中的梯度稀释 DNA 为模板, 以  $\text{ddH}_2\text{O}$  为阴性对照, 用 qIch 引物进行扩增检测, 每个样本重复 3 次。结果以每微升等量掠食体数  $n$  的对数  $\lg n$  为横坐标, 阈值循环数  $C_q$  为纵坐标, 在 Excel 软件中绘制标准曲线并计算扩增效率。

**临床样本和养殖水环境样本检测** 将“样本 DNA 提取”中所述获得的健康异育银鲫、潜伏期异育银鲫和发病异育银鲫样本 DNA 模板 (各 20 份)、养殖池塘水环境 DNA 模板 (20 份) 和小瓜虫传代循环水系统的水样 DNA 模板 (1 份) 使用引物 qIch 进行扩增和检测。



## 2 结果

### 2.1 普通 PCR 检测

**特异性检测** 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 引物 qIch 对多子小瓜虫基因组 DNA 的 PCR 反应产生明显扩增条带, 位于 100~150 bp, 与预测的目标产物 131 bp 相对应 (图 1); 以草履虫、四膜虫、肠袋虫、异育银鲫、草鱼、尼罗罗非鱼、团头鲂的基因组 DNA 为模板的 PCR 反应均未产生扩增条带, 说明引物 qIch 在用于本研究的普通 PCR 时具备良好特异性。



图 1 普通 PCR 特异性检测结果

M. DL500 DNA Marker, 1.草履虫, 2.四膜虫, 3.肠袋虫, 4.异育银鲫, 5.草鱼, 6.尼罗罗非鱼, 7.团头鲂, PC.阳性对照, NC.阴性对照, 下同。

Fig. 1 Specificity test of PCR

M. DL500 DNA Marker, 1. *Paramecium* sp., 2. *Tetrahymena* sp., 3. *Balantidium* sp., 4. *C. auratus gibelio*, 5. *C. idella*, 6. *O. niloticus*, 7. *M. amblycephala*, PC. positive control, NC. negative control, the same below.

在采用 Howell 等<sup>[16]</sup>文献中提供的引物组 667f 和 765r 进行的多次 PCR 检测中, 多子小瓜虫基因组 DNA 模板都没有产生有效扩增条带。通过进一步检查分析, 发现两条引物位于 *ssr* DNA 同一单链上。本研究通过将 765r 引物替换为其反向互补序列 (引物 765r#), 合成后检测分析发现, 虽然该组引物对多子小瓜虫能产生明显目的条带扩增, 但对草鱼基因组 DNA 模板产生了明显的非特异性扩增, 且扩增条带小于预测目的条带; 将扩增产物回收后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 并在 GenBank 中进行 Blast 检索分析, 未发现匹配序列。

行业标准<sup>[15]</sup>提供的引物 XGC 具有良好的特异性, 对多子小瓜虫基因组 DNA 在预期位置产生了明显扩增条带, 对本研究中检测的其他基因组 DNA 模板均未产生扩增条带。

**灵敏度检测** 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 引物 qIch 组在稀释 125 倍及以下 (即  $n \geq 2.67$ ) 的浓度梯度模板中都产生了明显的扩增条带, 在稀

释 625 倍的模板中产生了微弱的扩增条带 (图 2)。引物 XGC 组在稀释 25 倍及以下 (即  $n \geq 13.33$ ) 的模板中产生了较为明显的扩增条带, 在稀释 125 倍的模板中产生了微弱的扩增条带。因此, 在本研究 PCR 扩增条件下引物 qIch 的 PCR 检测较引物 XGC 组有更高的检测灵敏度。

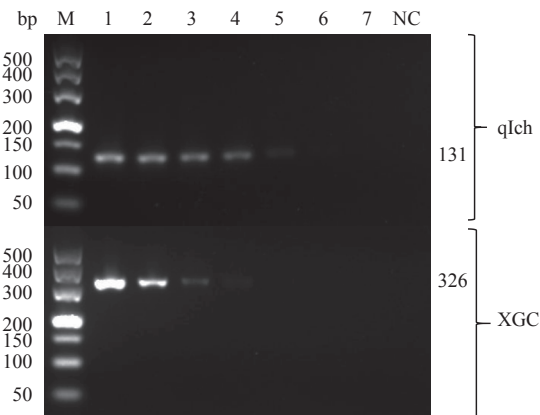


图 2 引物 qIch 和 XGC 的普通 PCR 灵敏度检测

M. DL500 DNA Marker, 1~7. 1、5、25、125、625、3 125、15 625 倍稀释的小瓜虫掠食体基因组 DNA 模板的普通 PCR 产物。

Fig. 2 Sensitivity test of PCR amplified with primers qIch and XGC

M. DL500 DNA Marker; 1-7. standard PCR products of 1, 5, 25, 125, 625, 3 125, 15 625 times diluted genomic DNA templates of *I. multifiliis*.

**临床样本和环境样本检测** 凝胶电泳结果统计 (表 2) 显示, 健康异育银鲫均未产生扩增条带, 潜伏期病鱼和发病鱼均产生了明显的扩增条带, 与实际感染情况相吻合; 实验室用于多子小瓜虫维持传代的循环水样本也检测出明显的扩增条带。在 20 个室外养殖池塘水样本中, 1 个样本观察到极微弱的扩增条带, 经切胶回收、克隆测序和序列 Blast 分析, 与参考序列一致, 鉴定确认为多子小瓜虫。

综合灵敏度检测和应用检测的实验结果, 本研究认为使用引物 qIch 进行普通 PCR 法检测的阳性判断标准应为在 131 bp 产生条带, 测序结果与参考序列一致。

### 2.2 荧光定量 PCR 检测

**特异性检测** 与“普通 PCR 检测”中的结果相似, 对草履虫、四膜虫、肠袋虫、异育银鲫、草鱼、尼罗罗非鱼、团头鲂的基因组 DNA 和小瓜虫基因组 DNA 同时进行扩增, 只有小瓜虫基因组 DNA 模板产生了完整的“S”形扩增曲线, 其他样品 DNA 模板均未产生完整扩增曲线, 或扩增曲

表 2 本研究建立的普通 PCR 和荧光定量 PCR 方法检测临床样本和环境样本结果

Tab. 2 Results of clinical and environmental samples detected by standard PCR and real-time PCR assays established in this study

样本来源 source of samples	普通PCR检出率/(阳性数/样本总数) standard PCR positive rate (positives/samples)	荧光定量PCR real-time PCR	
		检出率/(阳性数/样本总数) positive rate (positives/samples)	$\bar{C}_q$
健康鱼 healthy fish	0 (0/20)	0 (0/20)	-
潜伏期鱼 incubation period fish	100 (20/20)	100 (20/20)	27.15
病鱼 diseased fish	100 (20/20)	100 (20/20)	24.57
池塘水体 out-door pond	5 (1/20)	15 (3/20)	33.87
室内感染传代水体 indoor-water for maintaining ICH	100 (1/1)	100 (1/1)	22.36

注: - 本组样本均为阴性。

Notes: - all samples were negative in this group.

线的  $C_q > 37$ , 结合熔解曲线分析, 都未产生有效扩增。结果表明引物 qIch 用于荧光定量 PCR 时也具备良好的特异性。

**灵敏度检测** 7 个梯度稀释小瓜虫基因组 DNA 均产生了典型的“S”形扩增曲线 (图 3), 扩增产物的熔解曲线 (图 4) 呈现单峰,  $T_m$  值为  $75.5^\circ\text{C}$ 。在本研究所设置的最低浓度 ( $n=0.02$ ) 下, 依然能产生稳定有效的阳性结果。lg  $n$  与  $\bar{C}_q$  (22.53~34.79) 表现出良好的线性关系 (图 5), 回归方程为  $y = -3.445x + 28.876$ ,  $R^2 = 0.994$ , 扩增效率为 95.13%。

**临床样本和环境样本检测** 与“普通 PCR 检测”中的结果相似, 健康异育银鲫样本均未产生完整有效的“S”形扩增曲线且  $C_q > 36$ , 而潜伏期和发病鱼样本均产生了明显的扩增信号, 且发病鱼组的  $\bar{C}_q$  (24.57) 小于潜伏期组的  $\bar{C}_q$  (27.15), 与实

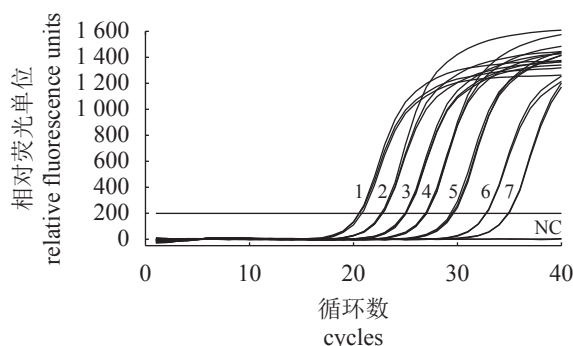


图 3 荧光定量 PCR 灵敏性检测

1~7. 1、5、25、125、625、3 125、15 625 倍稀释的小瓜虫掠食体基因组 DNA 模板的扩增曲线。

Fig. 3 Sensitivity test of real-time PCR

1-7. amplification curve of 1, 5, 25, 125, 625, 3 125, 15 625 times diluted genomic DNA templates of *I. multifiliis*.

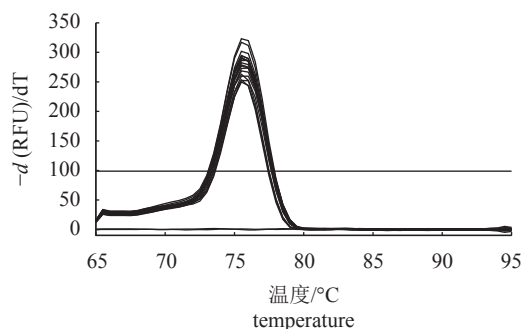


图 4 荧光定量 PCR 扩增产物的熔解曲线

Fig. 4 Melting curve of the real-time PCR products

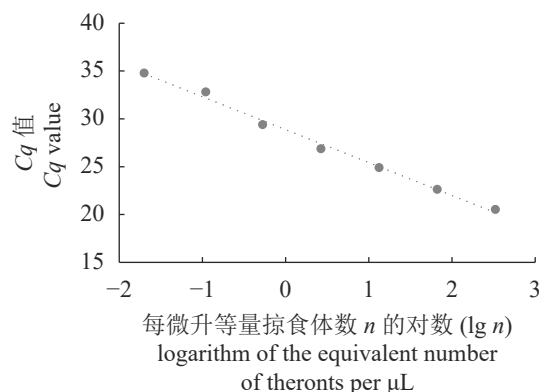


图 5 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 5 Standard curve of real-time PCR

际情况相符。室外养殖池塘水样本中 3 个产生了明显的荧光信号 ( $\bar{C}_q$  为 33.87), 其他 17 个样本均无有效扩增。用于多子小瓜虫传代的循环水系统样本出现了明显的扩增反应 ( $C_q$  值为 22.36) (表 2)。

综合灵敏度检测和应用检测的实验结果, 本研究所使用引物 qIch 进行荧光定量 PCR 法检测时

的阳性判断标准应为  $Cq \leq 35$ , 熔解曲线呈单峰且  $T_m$  值为 75.5 °C。

### 3 讨论

小瓜虫病是世界淡水养殖中重要的寄生虫病之一, 被国家列为三类水生动物疫病和水产苗种产地检疫的重要对象。当前小瓜虫病在一些养殖模式下对一些养殖品种危害尤为严重, 如山泉水或溪水养殖草鱼、网箱养殖虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、保育养殖圆口铜鱼 (*Coreius guichenoti*) (国家二级水生野生保护动物)、池塘养殖黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 和鳊 (*Siniperca chuatsi*) 等。《中华人民共和国国家标准: 淡水鱼类小瓜虫病诊断规程 (GB/T 34734—2017)》<sup>[18]</sup> 对小瓜虫病的流行症状和病原体显微镜检查等给出详细判定标准, 该标准适用于严重感染时患病鱼的疾病诊断。多子小瓜虫在适宜的水环境和温度下, 1~2 周内呈暴发式增殖, 病情发生非常迅速, 引起鱼体大量感染和死亡。因此, 针对小瓜虫病的发生早期阶段 (病原感染数量少, 显微镜检不易检出) 的特异性强、灵敏度高的检测方法对该疾病的早预防、早控制, 具有重要意义。

Jousson 等<sup>[19]</sup> 和 Miller 等<sup>[20]</sup> 也曾设计了用于多子小瓜虫检测的荧光定量 PCR 检测方法。Howell 等<sup>[16]</sup> 研究发现前面 2 种方法分别存在引物靶点区域的序列在不同虫株间有 SNP, 引物序列在其他纤毛虫中高度一致, 扩增特异性不强等问题。本研究在对文献中检测方法进行验证时发现, Howell 等<sup>[16]</sup> 文章中新设计的引物序列, 其中 1 条没有进行反向互补, 2 条引物位于同一 DNA 单链上; 对该引物修正后, 虽然能对小瓜虫进行有效扩增, 但是对质控样本中草鱼 DNA 模板可产生非特异性扩增。相较于以上研究, 国内行业标准<sup>[15]</sup> 选取了核糖体 rDNA 基因片段作为目的基因, 具有较好的特异性。本研究基于线粒体基因组 CO I 序列设计的 qIch 引物, 在普通 PCR 和荧光定量 PCR 检测中都具有良好的特异性。同时, 本研究建立的检测方法灵敏度高于行业标准<sup>[15]</sup> 的 PCR 方法, 这可能是因为本研究所设计的引物 qIch 的扩增子 (131 bp) 明显小于行业标准<sup>[15]</sup> 引物 XGC 的扩增子 (326 bp), 提高了对短链 DNA 的结合概率, 从而提高了扩增效率。另外, 由于行业标准<sup>[15]</sup> 的扩增子过长, 该方法不适用于灵敏度更高的荧光

定量 PCR。

本研究所建立的普通 PCR 方法最低检测浓度达掠食体 2.67 个/μL, 荧光定量 PCR 在掠食体 0.02 个/μL 时依然能有效检出, 表明荧光定量 PCR 具备更高的灵敏性。在临床样本和环境样本适用性检测中发现, 普通 PCR 和荧光定量 PCR 检测结果具有较好的一致性, 并且在多子小瓜虫丰度较低的环境样本检测中, 荧光定量 PCR 具有更高的检出率 (表 2)。在本研究所检测的养殖池塘虽并未观察到小瓜虫病发生, 但 PCR 检测后发现部分样本阳性。这为养殖生产中室外池塘养殖健康的鱼转入水质干净、缺乏浮游生物的室内循环水养殖时, 在短期内暴发严重的小瓜虫病的现象提供了一种可能的解释。因此, 本研究所建立的普通 PCR 和荧光定量 PCR 方法对养殖环境中多子小瓜虫检测都有很好的适用性, 可应用于养殖小瓜虫病临床诊断、流行病学调查和病原监测。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] 倪达书, 李连祥. 多子小瓜虫的形态、生活史及其防治方法和一新种的描述[J]. 水生生物学集刊, 1960(2): 197-215.  
Nie D S, Lee L S. Studies on the morphology and life cycle of *Ichthyophthirius multifiliis* and its control, with a description of a new species[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1960(2): 197-215 (in Chinese).
- [2] Matthews R A. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts[M]//Baker J R, Muller R, Rollinson D. Advances in parasitology: Vol. 59. Washington, DC: Academic Press, 2005: 159-241.
- [3] 方珍珠, 苏文, 陶秉春. 感染小瓜虫草鱼幼鱼组织病理学变化[J]. 水产科学, 2015, 34(7): 433-437.  
Fang Z Z, Su W, Tao B C. Histopathological changes in juvenile grass carp with parasite *Ichthyophthirius*[J]. Fisheries Science, 2015, 34(7): 433-437 (in Chinese).
- [4] Dickerson H W, Dawe D L. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora)[M]//Woo P T K. Fish Diseases and Disorders: Volume 1: protozoan and metazoan infections. London: CAB International, 1995: 181-227.
- [5] Ewing M S, Kocan K M, Ewing S A. *Ichthyophthirius multifiliis*: morphology of the cyst wall[J]. Transactions of the American Microscopical Society, 1983, 102(2):

- 122-128.
- [6] Pasqualetti C, Schmidt J G, Cafiso A, *et al.* Double trouble: could *Ichthyophthirius multifiliis* be a vehicle for the bacterium associated with red mark syndrome in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*?[J]. *Aquaculture*, 2021, 533: 736230.
- [7] 邵辰, 易弋, 黎娅, 等. 罗非鱼无乳链球菌巢式PCR检测方法的建立[J]. *淡水渔业*, 2016, 46(2): 40-44.  
Shao C, Yi Y, Li Y, *et al.* Development of nested PCR for detection of *Streptococcus agalactiae* from tilapia[J]. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(2): 40-44 (in Chinese).
- [8] 杨坤, 高志鹏, 刁丙文, 等. 洪湖碘泡虫单管巢式PCR检测方法的建立及应用[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(8): 927-933.  
Yang K, Gao Z P, Xi B W, *et al.* Development a single-tube, semi-nested PCR method for the detection of *Myxobolus honghuensis* (Myxozoa: Bivalvulida)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(8): 927-933 (in Chinese).
- [9] Cavender W P, Wood J S, Powell M S, *et al.* Real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) to identify *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(3): 205-213.
- [10] 罗丹, 赵媛莉, 刘新华, 等. 洪湖碘泡虫SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测方法的建立及其应用[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(2): 268-274.  
Luo D, Zhao Y L, Liu X H, *et al.* Development of a SYBR Green real-time PCR assay for detection of *Myxobolus honghuensis* and its application[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(2): 268-274 (in Chinese).
- [11] 翟凯旋, 曹泽艺, 刁丙文, 等. 荧光定量PCR检测洪湖碘泡虫寄生异育银鲫组织器官的偏好[J]. *中国水产科学*, 2022, 29(7): 1101-1107.  
Zhai K X, Cao Z Y, Xi B W, *et al.* Quantitative tissue distribution of *Myxobolus honghuensis* in covertly infected allogenyetic gibel carp[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(7): 1101-1107 (in Chinese).
- [12] 郭宏伟, 赵绪永, 李华玮, 等. 数字PCR技术在动物疫病诊断中的应用进展[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(2): 102-106.  
Guo H W, Zhao X Y, Li H W, *et al.* Progress on application of digital PCR in animal disease diagnosis[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(2): 102-106 (in Chinese).
- [13] 马新冉, 肖雨晴, 雷春, 等. 数字PCR技术在水产病原菌检测中的应用[J]. *鲁东大学学报(自然科学版)*, 2020, 36(1): 48-54.  
Ma X R, Xiao Y Q, Lei C, *et al.* Application of digital PCR in detection of aquatic pathogens[J]. *Journal of Ludong University (Natural Science Edition)*, 2020, 36(1): 48-54 (in Chinese).
- [14] Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 134.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 多子小瓜虫检疫技术规范: SN/T 4290—2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Quarantine protocol for *Ichthyophthirius multifiliis*: SN/T 4290-2015[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016 (in Chinese).
- [16] Howell C K, Atkinson S D, Bartholomew J L, *et al.* Development and application of a qPCR assay targeting *Ichthyophthirius multifiliis* in environmental water samples[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2019, 134(1): 43-55.
- [17] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1991, 48(S1): 80-94.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 淡水鱼类小瓜虫病诊断规程: GB/T 34734—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Diagnostic protocols for ichthyophthiriasis of freshwater fish: GB/T 34734-2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [19] Jousson O, Pretti C, Di Bello D, *et al.* Non-invasive detection and quantification of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* by real-time PCR[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 65(3): 251-255.
- [20] Miller K M, Gardner I A, Vanderstichel R, *et al.* Report on the performance evaluation of the fluidigm BioMark platform for High-Throughput microbe monitoring in salmon[R]. Ottawa: Canadian Science Advisory Secretariat, 2016.



## Establishment and application of PCR and SYBR Green real-time fluorescence quantitative PCR assays for detection of *Ichthyophthirius multifiliis*

CAO Zeyi<sup>1,2</sup>, ZHOU Qingjie<sup>1,2</sup>, CHEN Kai<sup>2</sup>, XI Bingwen<sup>1,2\*</sup>, XIE Jun<sup>1,2\*</sup>,  
PAN Liangkun<sup>2</sup>, MAO Ying<sup>3</sup>

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Integrated Rice-Fish Farming Ecology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. Aquatic and Animal Husbandry Station of Yixing City, Yixing 214252, China)

**Abstract:** *Ichthyophthirius multifiliis* is the causative agent of “white spot” disease, which affects numerous freshwater fish and causes severe economic losses to worldwide aquaculture. The disease of *I. multifiliis* infection could develop very fast, and there are few practical measures to treat this heavy infection. To overcome the shortcomings of existing methods, for detecting *I. multifiliis* in the early stage and environmental samples, such as low sensitivity of visual diagnosis with microscope and low specificity of PCR methods developed in the previous studies, here we developed and validated novel PCR assays. In this study, a pair of primers (qIchF 5'-TTCTGCCCCGTA CTTTAGTTACC-3' and qIchR 5'-TGGTTGACTAACACCTGCAA-3') were designed and screened to target the mitochondrial *CO I* gene of *I. multifiliis*. The length of the amplified product is 131 bp. After PCR programme optimization, specificity and sensitivity verification, clinical and environmental samples detection and analysis, standard PCR and real-time PCR assays were established, respectively. The standard PCR was incubated at 95 °C for 3 min; 35 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 51 °C for 15 s, and extension at 72 °C for 10 s; and final extension at 72 °C for 5 min. For real-time PCR was incubated at 95 °C for 30 s; 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing and extension at 60 °C for 30 s. The results showed that the primers obtained in this study had high amplification specificity for *I. multifiliis*. Ciliates *Paramecium* sp., *Tetrahymena* sp., and *Balantidium* sp. were not amplified, nor were common farmed fish hosts *Carassius auratus gibelio*, grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and *Megalobrama amblycephala*. Amplification specificity and sensitivity were better than existing methods. The limit of detection for standard PCR was 2.67 theronts/ $\mu$ L, while real-time PCR could be detected at 0.02 theront/ $\mu$ L. Among them, the detection sensitivity of real-time PCR was higher than that of standard PCR. In the detection application of clinical samples and environmental water samples, the two PCR assays showed high consistency, and could effectively detect the latently infected fish and *I. multifiliis* in the pond water samples. Therefore, the assays developed in this study were suitable tools for early diagnosis and pathogen monitoring of *I. multifiliis* in freshwater aquaculture.

**Key words:** *Ichthyophthirius multifiliis*; PCR; real-time fluorescence quantitative PCR; ichthyophthiriasis; detection assay

**Corresponding authors:** XI Bingwen. E-mail: [xibw@ffrc.cn](mailto:xibw@ffrc.cn);

XIE Jun. E-mail: [xiej@ffrc.cn](mailto:xiej@ffrc.cn)

**Funding projects:** China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-45)