

文章编号: 1000-7423(2006)-05-0353-03

【实验研究】

PCR 检测大瓶螺体内广州管圆线虫幼虫方法的建立

张仪¹, 周晓农¹, 刘和香¹, 吕山¹, 李莉莎², 林金祥², 李友松²

【摘要】 目的 建立一种基于 PCR 方法检测大瓶螺体内广州管圆线虫幼虫的方法。方法 从美国生物信息中心 GenBank 中获得广州管圆线虫感染性 III 期幼虫 (L₃) cDNA 特异性片断, 应用美国 DNASTAR 公司 Lasergene 软件, 设计特异性引物。TRIzol 一步法抽提广州管圆线虫感染性 L₃ 和大瓶螺总 RNA, 按 RT-PCR 试剂盒提供方法进行 PCR 扩增。结果 用 RT-PCR 方法能检测出阴性与感染性螺, 其最低检出的总 RNA 量相当于 1 条广州管圆线虫 L₃; 将阴性大瓶螺总 RNA 与感染期幼虫总 RNA 不同浓度混合, PCR 法可检测出肉眼能分辨的电泳条带相当于总 RNA 浓度为 128 pg, 此方法可以检测出广州管圆线虫 III 期幼虫 RNA 的最低值为 105 pg。结论 建立了 PCR 检测大瓶螺体内广州管圆线虫幼虫的方法。

【关键词】 大瓶螺; PCR; cDNA; 广州管圆线虫; 幼虫

中图分类号: R383.1 R383.241

文献标识码: A

Development of PCR Assay for Detection of *Angiostrongylus cantonensis* in *Pomacea canaliculata*

ZHANG Yi¹, ZHOU Xiao-nong¹, LIU He-xiang¹, Lv Shan¹,
LI Li-sha², LIN Jin-xiang², LI You-song²

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China)

【Abstract】 Objective To establish a PCR assay for detecting the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis* in *Pomacea canaliculata*. Methods Polymerase chain reaction primers were designed by the software Lasergene, based on the specific cDNA of the third-stage larvae of *A. cantonensis* in Genbank. The total RNA was prepared from the third-stage larvae of *A. cantonensis* and of the snails by TRIzol one-step protocol. Amplification by RT-PCR was carried out following the kit protocol. Results RT-PCR assay revealed a clear differentiation between infected and negative snails. When a mixture of the total RNA from the negative snails and the third-stage larvae of *A. cantonensis* was tested by the PCR assay, the detectable level was 128 pg RNA, a concentration close to one third-stage larva of *A. cantonensis*, minimum concentration that could be found by naked eyes. The minimum detected total RNA concentration of the third-stage larvae of *A. cantonensis* was 105 pg by PCR assay. Conclusion A PCR assay has been developed for detecting *A. cantonensis* larva in *Pomacea canaliculata*.

【Key words】 *Pomacea canaliculata*; PCR; cDNA; *Angiostrongylus cantonensis*; Larva

Supported by the Key Science and Technology Project of the National Tenth Five-Year-Plan of China (No.2003BA712A09-01)

广州管圆线虫病是一种新近被列入我国新发传染性寄生虫病, 也是一种人兽共患的寄生虫病。当食用感染了广州管圆线虫幼虫的中间宿主后, 即获感染并可发病。该病发病凶险, 易被误诊, 如不及时治疗极易致死^[1,2]。近期我国北京、辽宁等省(市)相继有病

例报告, 而福建、浙江、云南等省也时有集体发病的报告^[3-5]。

检测感染性的中间宿主是监测广州管圆线虫病的重要手段。据报道, 广州管圆线虫的中间宿主有 56 种, 我国近年主要以外来入侵有害水生生物大瓶螺(俗称“福寿螺”)为主^[5,6]。目前对其检测的方法主要是直接碾磨或用消化酶消化后在显微镜下检测广州管圆线虫 III 期幼虫 (L₃)^[6-9], 由于大瓶螺个体大, 而广州管圆线虫 L₃ 体积小, 检测其自然感染率和平均

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2003BA712A09-02)

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025; 2 福建省疾病预防控制中心, 福州 350001

© 1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

感染度不仅费时费力, 且对检测者知识和技术要求较高, 容易漏检。

本文报告运用 RT-PCR 技术检测大瓶螺中的广州管圆线虫感染性幼虫的方法, 以期在广州管圆线虫病宿主监测更有效的手段。

材料与方法

1 材料

1.1 广州管圆线虫 L₃ 该虫从人工感染的阳性大瓶螺中获得。人工感染及获得 L₃ 的方法等参照文献[9]。

1.2 大瓶螺

1.2.1 阴性大瓶螺 本所实验室繁殖由福建现场采集的 F1 代阴性成螺。实验室繁殖饲养方法参照文献[9]。

1.2.2 阳性大瓶螺 对现场采集的大瓶螺逐个用直接碾磨法^[6-9]检测, 查出广州管圆线虫 L₃ 的大瓶螺确定为阳性螺, 保存于-70℃, 用于总 RNA 的抽提。

1.3 主要试剂 TRIzol 和 RT-PCR 试剂盒分别为英国 Invitrogen 公司和美国 Promega 公司产品, 琼脂糖购自美国 Promega 公司。

2 方法

2.1 总 RNA 制备

2.1.1 广州管圆线虫 L₃ 总 RNA 制备 从感染广州管圆线虫 L₃ 的大瓶螺中分离出活的 L₃, 离心, 尽量去除上层液后, 参照 TRIzol 试剂盒说明书操作, 一步法获得 RNA。用紫外分光光度仪测 RNA 吸光度(A₂₆₀ 值)为 1.8~2.0, A₂₆₀/A₂₈₀ 比值 > 2 的 RNA, -20℃保存备用。

2.1.2 大瓶螺总 RNA 制备 取实验室繁殖的 F1 代单个大瓶螺或确定为阳性的、保存于-70℃的成螺, 去壳后, 放入液氮。待冷冻后, 放入预冷的研钵中研磨, 参照 TRIzol 试剂盒说明书, 一步法获得 RNA (方法同 2.1.1), -20℃保存备用。

3 引物设计

根据 GenBank 数据库中广州管圆线虫 L3 cDNA 特异性片段基因序列 (ACU17581), 应用 Lasergene 软件 (美国 DNASTAR 公司) 设计匹配获得 1 对最佳引物, 由上海华诺生物科技有限公司合成。

上游引物 AC-1F: 5'-ATCGCCGAGAACGCATTG-AGC-3'; 下游引物 AC-2F: 5'-AAAAAGGGGGCCAAA-AGCAATGTA-3'。

4 RT-PCR 扩增

参照试剂盒提供的方法进行 PCR 扩增。反应总

体积为 50 μl。反应条件为: 45℃ 45 min, 94℃ 2 min, 随后按 94℃ 30 s, 60℃ 1 min, 68℃ 2 min, 循环 50 次; 68℃ 7 min。4℃ 保存。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

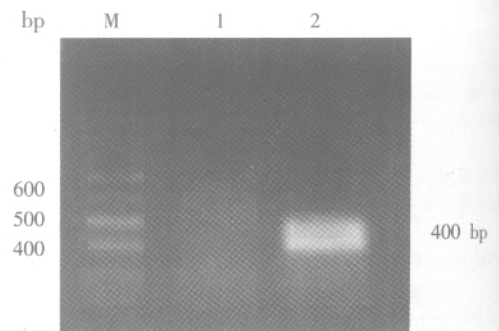
5 敏感性检测

取等量阴性大瓶螺总 RNA, 混合不同量广州管圆线虫 L₃ 总 RNA 后, 按上述 PCR 方法进行扩增。该实验用保存的、不同批次的阴性大瓶螺总 RNA 进行检测, 重复 5 次。

结 果

1 感染广州管圆线虫 L₃ 的大瓶螺总 RNA

经 RT-PCR 扩增后, 在 400 bp 处获得 1 条明亮的特异性条带, 而阴性大瓶螺无扩增条带出现 (图 1)。



M: DNA 标志物, 1: 阴性螺, 2: 阳性螺。

M: DNA marker, 1: Control snail, 2: Infected snail.

图 1 广州管圆线虫 L₃ RT-PCR 扩增产物

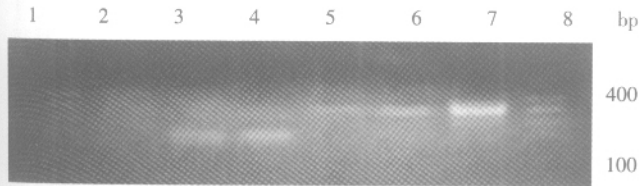
Fig.1 RT-PCR products of total RNA extracted from the third-stage larvae of *A.cantonensis*

2 敏感性检测

在阴性大瓶螺总 RNA 中, 分别混入广州管圆线虫 L₃ 总 RNA 为 105、128、235 pg, 运用上述 RT-PCR 方法扩增, 均在 400 bp 处出现特异性条带, 且扩增产物随浓度的递减而减少 (图 2)。出现肉眼可分辨、较清晰扩增产物的广州管圆线虫 L₃ 总 RNA 量为 128 pg, 相当于 1 条广州管圆线虫 L₃。能检测到广州管圆线虫 L₃ RNA 的最低值为 105 pg。选用阴性大瓶螺不同批的、不同个体的总 RNA 分别用上述方法扩增, 重复 5 次, 结果一致。

讨 论

人直接或间接食用含有广州管圆线虫 L₃ 的食物而被感染得病, 而 L₃ 必需在中间宿主体内才能发育。目前已知的广州管圆线虫的中间宿主淡水螺类有 41 种, 其中大瓶螺、褐云玛瑙螺、蛞蝓等是其主要中间



1, 8: DNA 标志物, 2: 空白对照 (重蒸水), 3、4: 螺总 RNA, 5~7: 等量螺总 RNA+不同量虫总 RNA 105、128、235 pg。

1, 8: DNA marker, 2: Negative control (ddH₂O), 3, 4: Snail total RNA, 5~7: Equal amount of snail total RNA+different amount of total RNA from *A.cantonensis* larvae: 105, 128, 235 pg.

图 2 螺混合广州管圆线虫 L3 RT-PCR 扩增产物

Fig.2 RT-PCR products of total RNA from *Pomacea canaliculata* mixed with that of *A.cantonensis* larvae

宿主。从自然疫源地的调查比较也发现, 大瓶螺、褐云玛瑙螺是广州管圆线虫自然感染率相对比较高的宿主^[10,11]。近年来, 福建和浙江等省相继有广州管圆线虫病暴发, 均由食用大瓶螺引起, 该螺已成为我国广州管圆线虫的优势中间宿主之一。因此本研究选定大瓶螺作为建立检测软体动物体内广州管圆线虫幼虫的模式宿主。

检测螺体内感染期寄生虫幼虫的常规方法有酶消化法和直接碾磨法^[6]。经过酶消化或碾磨螺组织后, 在解剖镜下观察。这种方法需要检测人员有一定的专业知识和技能, 花费时间多, 检测螺内感染的寄生虫前期幼虫的敏感性、特异性都比较低。而 PCR 技术具有较高特异性和敏感性, 尤其在检测宿主的感染率和感染度较低时, 能显出它的优越性。近期, Maleewong 等^[12]、Hertel 等^[13]和 Park 等^[14]运用 PCR 技术开展了在豆螺中检测麝猫后睾吸虫、在双脐螺中检测曼氏血吸虫幼虫及在短沟蜷中检测吸虫等研究, 获得了比较好的结果。目前国内外尚无 PCR 方法检测螺体内广州管圆线虫幼虫的报道, 本研究运用 RT-PCR 技术初步建立的螺体内检测广州管圆线虫幼虫方法, 能检测出相当于 1 条广州管圆线虫 L₃。

广州管圆线虫 L₃ 的相关分子数据、信息尚无文献报道, 加上同一时期实验室内人工获取大量活体 L₃ 比较困难, 所以本实验直接用 RNA 来进行 PCR 检测, 没有按比例稀释 L₃ RNA 然后进行扩增, 而是通过使用不同批次的、不同个体的阴性大瓶螺的总 RNA 量进行扩增。经过多次重复达到一致结果, 可以认为此方法可行、可靠。此检测方法是否适合现场规模应用有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Liang HK. Summary on angiostrongyliasis[J]. Acta Guangzhou Med Col, 1988, 16: 95-101. (in Chinese)
(梁浩昆. 关于广州管圆线虫病的概述[J]. 广州医学院学报, 1988,

16: 95-101.)

- [2] Xu LQ, Yu SH, Xu SH, et al. The distribution and pathogenic impact of human parasites in China[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000. 119-120. (in Chinese)
(许隆祺, 余森海, 徐淑惠. 中国人体寄生虫分布与危害[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 119-120.)
- [3] Lin JX, Jie HY, Li LS. Inspiration from an outbreak of angiostrongyliasis cantonensis[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 341-343. (in Chinese)
(林金祥, 揭鸿英, 李莉莎. 广州管圆线虫病爆发流行给我们的启示[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23: 341-343.)
- [4] Yang FZ, Zhang YZ, Tu SP, et al. An outbreak of angiostrongyliasis cantonensis probably associated with eating snails[J]. Strait J Prev Med, 2004, 10: 44-45. (in Chinese)
(杨发柱, 张莹珍, 屠昭平, 等. 一起疑为食用螺肉引起的广州管圆线虫病爆发调查[J]. 海峡预防医学杂志, 2004, 10: 44-45.)
- [5] Xing WR, Pan CW, Liang ZH, et al. Study on the distribution of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in *Pomacea canaliculata* [J]. Acta Wenzhou Med College, 1998, 28: 297-298. (in Chinese)
(邢文鸾, 潘长旺, 梁韶辉, 等. 温州福寿螺体内广州管圆线虫幼虫分布情况的研究[J]. 温州医学院学报, 1998, 28: 297-298.)
- [6] Lin JX, Li YS, Zhu K, et al. Epidemiological study on group infection of *Angiostrongylus cantonensis* in Changle city[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003, 21: 110-112. (in Chinese)
(林金祥, 李友松, 朱凯, 等. 长乐市广州管圆线虫集体感染的流行病学研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21: 110-112)
- [7] Yang FZ, Zhang YZ, Huang XH, et al. Morphology and experimental infection of *Angiostrongylus cantonensis* in Fujian Province [J]. Practic J Parasit Dis, 1999, 7: 145-148. (in Chinese)
(杨发柱, 张莹珍, 黄晓红, 等. 福建广州管圆线虫形态及实验感染的观察[J]. 实用寄生虫病杂志, 1999, 7: 145-148.)
- [8] Yang FZ, Zhang YZ, Huang XH, et al. A Study on *Angiostrongylus cantonensis* in Fujian[J]. Strait J Prev Med, 2001, 7: 11-14. (in Chinese)
(张莹珍, 杨发柱, 黄晓红, 等. 福建省广州管圆线虫的研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2001, 7: 11-14.)
- [9] Liu HX, Zhang Y, Zhou XN, et al. Studies on susceptibility of different development stage *Pomacea canaliculata* to *Angiostrongylus cantonensis*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 262-265. (in Chinese)
(刘和香, 张仪, 周晓农, 等. 不同发育期福寿螺对广州管圆线虫易感性的实验研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23: 262-265.)
- [10] Zhang YZ, Yang FZ, Tu SP. Investigation on natural epidemic foci of *Angiostrongylus cantonensis* in Fuzhou suburb[J]. Strait J Prev Med, 1999, 5, 1: 20. (in Chinese)
(张莹珍, 杨发柱, 屠邵平. 福州郊区广州管圆线虫自然疫源地调查[J]. 海峡预防医学杂志, 1999, 5, 1: 20)
- [11] Ding BL, He JZ, Zh TC, et al. Investigation on *Angiostrongylus cantonensis* in Guangzhou [J]. Acta Guangzhou Med College, 1982, 4: 1-17. (in Chinese)
(丁步兰, 何竞智, 朱天成, 等. 广州地区广州管圆线虫(*Angiostrongylus cantonensis*)的调查研究[J]. 广州医学院学报, 1982, 4: 1-17)
- [12] Maleewong W, Intapan PM, Wongkham C, et al. Detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected bithynid snails and cyprinoid fishes by a PCR-based method [J]. Parasitology, 2003, 126:63-67
- [13] Hertel J, Haberl B, Hamburger J, et al. Description of a tandem repeated DNA sequence of *Echinostoma caproni* and methods for its detection in snail and plankton samples[J]. Parasitology, 2003, 126: 443-9
- [14] Park BK, Kim MJ, Kim EH, et al. Identification of trematode cercariae carrying *Neorickettsia risticii* in freshwater stream snails [J]. Ann NY Acad Sci, 2003, 990: 239-247.

(收稿日期: 2006-08-24 编辑: 伯韦)