

PCR 技术在蜜蜂疾病诊断中的应用*

曹联飞, 李亚辉, 谭 垦, 和绍禹**

(云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 由于蜜蜂疾病的传统诊断方法费时、费力, 因此开发快速诊断技术非常重要。分子生物学技术的发展为其提供了可能。笔者对 PCR 技术在蜜蜂疾病诊断中的应用现状作了综述, 并对其中存在的问题和应用前景进行了探讨。

关键词: 聚合酶链式反应; 蜜蜂疾病; 诊断

中图分类号: S 895 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 390X(2006)06 - 0794 - 05

Detection of Honeybee Diseases by PCR Assays

CAO Lian-fei, LI Ya-hui, TAN Ken, HE Shao-yu

(Animal Scientific and Technological Institute, Y A U, Kunming 650201, China)

Abstract: Since the traditional detections of honeybee disease are laborious and time-consuming, it is very important to develop a rapid method for detecting bee's diseases. And this goal can be achieved with the aid of molecular biological techniques. The current state of PCR assays in honeybee disease has been reviewed in this article. Problems and prospects of the assays have also been discussed.

Key words: polymerase chain reaction; honeybee diseases; detection

蜜蜂疾病种类很多,按其病原可分为生物性因子引起的传染性疾病和非生物性因子引起的非传染性疾病两大类。在传染性疾病中,又可以根据病原的种类和侵染方式,分为传染病(包括病毒病、细菌病、真菌病和螺旋体病)和侵袭病(由寄生螨、寄生性昆虫、原生动物和寄生性线虫等引起)。非传染性疾病主要包括遗传病,生理障碍,营养障碍,代谢异常,中毒病等^[1,2]。

我国农业部 1999 年 2 月 12 日公布的《一、二、三类动物疫病病种名录》将蜜蜂病定为二类疫病,包括美洲幼虫腐臭病,欧洲幼虫腐臭病,蜜蜂孢子虫病,蜜蜂螨病和白垩病。这些疫病可造成重大经济损失,故需采取严格控制、扑灭措施,防止疫病扩散^[3,4]。世界动物卫生组织(OIE)将蜜蜂病定为 B 类法定报告疾病,包括蜂螨病,美洲幼虫腐臭病,欧洲幼虫腐臭病,蜂孢子虫病,瓦螨病^[5],而且这一

标准已被世界贸易组织(WTO)明确规定为动物及其产品进行国际贸易时应遵循的标准,同时此标准也被《中华人民共和国进境动物一、二类传染病,寄生虫病名录》所采用,规定感染这些疾病的动物必须退回或者扑杀,同群其他动物在隔离场或者其他指定地点隔离观察^[6]。

蜜蜂疾病严重影响养蜂生产。一旦发生,轻则造成蜜蜂体衰群弱,影响蜂产品的产量、质量和农作物的授粉,重则造成蜂场毁灭,蜂业破产^[7]。因此,快速准确地诊断蜜蜂疾病,尤其是由病原微生物引起的危害严重的细菌、真菌和病毒类疾病,对防止疾病传播和保证养蜂生产的正常进行具有重要意义。

蜜蜂疾病的传统诊断方法主要有临床症状诊断(包括流行病学)和实验室诊断。临床症状诊断主要是根据蜜蜂患病后的症状,如工蜂的异常行

收稿日期: 2006 - 03 - 28

* 基金项目: 中日合作中草药制剂替代抗生素治疗蜂病的研究。

** 通讯作者

作者简介: 曹联飞(1981 -),男,河南三门峡人,硕士研究生,主要从事蜜蜂分子生物学研究。

为,患病蜜蜂的体态、体色变化,尸体的特征等,同时结合发病季节,进行初步诊断。而蜜蜂疾病的进一步确诊还必须进行实验室诊断。实验室诊断主要包括显微镜诊断、生化试验和病原体分离培养,根据病原体的不同特性,确诊疾病种类^[1,2]。

但是传统诊断方法存在如下问题:

(1)某些蜜蜂疾病发病初期临床症状不典型,不明显,从而给人们及时发现和治疗蜜蜂疾病带来困难。如欧洲幼虫腐臭病^[5]。

(2)某些病原体培养条件苛刻,而亲缘关系较近的微生物种类过快生长也会混淆试验结果,给疾病的实验室诊断造成困难,而且费时费力。如欧洲幼虫腐臭病的病原体培养条件十分苛刻,蜜蜂孢子虫病的病原体还没有可行的培养方法^[5],蜜蜂病毒病的病原体培养也很困难^[2]。

(3)实验室诊断所需时间较长,容易贻误控制疾病的最佳时间。如白垩病病原体的分离培养和诊断需要10 d左右^[8]。

(4)传统诊断方法很难大规模进行,给疾病的定期普查和监控带来困难。

随着分子生物学技术的发展,分子检测技术得到了不断开发和大规模应用,从而为利用分子手段快速准确诊断蜜蜂疾病创造了条件。现就PCR技术在蜜蜂疾病诊断中的应用作简要概述。

1 PCR技术概论

PCR(Polymerase Chain Reaction,聚合酶链式反应)技术又称基因体外扩增技术,是美国Cetus公司人类遗传研究室的科学家MULLIS博士及其同事于1983年发明的一种由特定寡核苷酸引物介导的特异基因或克隆序列的体外酶促扩增技术^[9]。应用PCR技术可使极微量或单拷贝的特定核酸分子迅速扩增到上百万倍而可用于实际检测。PCR技术目前已广泛应用于对突变基因和癌基因的检测,包括从基因组DNA, RNA和cDNA直接克隆目的基因,体外诱变和DNA工程,传染病原分析,基因序列变异分析等方面^[10]。在病原方面,它既可做病原体的检测,也可同时进行不同病原或同一病原不同株的检测,特别适合难以培养的病毒的检测^[11]。

为了适应不同试验的需要,研究人员对常规PCR技术进行了大量改进,已开发出10余种新型PCR技术。如标记PCR(labeled primers PCR),原

位杂交PCR(in situ PCR),多重PCR(multiplex PCR),逆转录PCR(reverse transcriptase PCR),不对称PCR(asymmetric PCR),降落PCR(touchdown PCR),套式引物PCR(nested primers PCR),反向PCR(reverse PCR)等。近年来,PCR技术得到了进一步发展,建立了滚环扩增反应(rolling circle amplification reactions, RCA),连接酶链反应(ligase chain reaction, LCR),荧光探针实时定量-PCR(fluorescent real-time quantitative-PCR, FQ-PCR),特异引物如16SrDNA-PCR反应, NASBA技术等一系列PCR扩增新技术^[9,12]。

PCR具有特异性高、灵敏度高、简单快速、对标本的纯度要求低等优点,在生物科学众多领域的应用日趋广泛^[12],不仅可以用来扩增与分离目的基因,而且在临床医疗诊断、胎儿性别鉴定、癌症治疗的监控、基因突变与检测、分子进化研究,以及法医学等诸多领域都有着重要的用途。

2 PCR技术在蜜蜂疾病诊断中的应用

目前国内外已建立了许多检测动物病原体的PCR方法,从而为诊断和检测动物疫病提供了有效的技术支撑。PCR技术在蜜蜂疾病诊断中的应用也日益广泛。

2.1 PCR技术在蜜蜂细菌性疾病诊断中的应用

2.1.1 在美洲幼虫腐臭病诊断中的应用

美洲幼虫腐臭病是一种细菌引起的蜜蜂幼虫的顽固性传染病,致病菌是蜜蜂幼虫芽孢杆菌。芽孢是诱发此病的主要原因^[5]。西方蜜蜂容易感染,中蜂具有抵抗力。此病是蜜蜂幼虫期和蛹期危害最严重的细菌性疾病,分布广,危害性大,是一种毁灭性的蜜蜂病害^[1]。早期诊断具有重要意义。

诊断方法有症状诊断,显微镜检查,赫尔斯特牛乳试验,培养技术,过氧化氢酶法,硝酸盐还原试验等^[5]。而最常用的方法是症状诊断,同时结合显微镜检查和分离培养后的生化试验^[1,5]。尽管分离培养和生化试验具有较高的灵敏度和特异性,但是费时费力,价格昂贵,而且致病菌培养条件苛刻,生长缓慢,分离鉴定存在困难^[13]。相反,PCR技术诊断迅速,更适于大规模的检测。

GOVAN等^[14]根据幼虫芽孢杆菌16SrRNA基因设计引物对其进行PCR扩增反应,用于鉴定分离培养后的病原菌。特异扩增出973 bp的片段,而不会扩增在培养基上生长的其它细菌基因。

ALIPPI 等^[15]报道可以从幼虫芽孢杆菌中特异扩增出 550 bp 的片段,同时不会扩增亲缘关系相近的其他细菌基因,尤其是可以与同属幼虫芽孢杆菌的 *Paenibacillus larvae* subsp. *Pulvifaciens* 区别。此种方法可以直接用于检测患病幼虫和蜂蜜中的幼虫芽孢杆菌孢子。

DOBBELAERE 等^[16]根据幼虫芽孢杆菌 16SrRNA 基因设计引物进行 PCR 反应,用于鉴定从患病幼虫中提取的幼虫芽孢杆菌基因,而且不会扩增与幼虫芽孢杆菌亲缘关系较近的或常见于蜂巢中的其它 13 种细菌基因。

PICCINI 等^[17]报道利用 PCR 技术可以检测出纯培养菌落,患病幼虫和被污染蜂蜜中的幼虫芽孢杆菌孢子。灵敏度和特异性都很高。所用引物也是根据幼虫芽孢杆菌 16SrRNA 基因设计的。

ALIPPI 等^[18]从杆菌和相近的属中扩增出约 1.1 kb 的片段,结合限制性酶切片段分析,可以从其它芽孢杆菌和蜂场常见的病原菌中鉴别出幼虫芽孢杆菌。

BAKONYI 等^[13]比较了 PCR 反应中不同引物(来自 16SrRNA 基因区域或金属蛋白酶基因区域)和不同 DNA 提取方法在检测蜂蜜和其他蜂产品中的幼虫芽孢杆菌时的灵敏度和特异性,筛选出了适用于幼虫芽孢杆菌快速检测的合适引物。但同时提出 PCR 引物的特异性还需要进一步提高。

LAURO 等^[19]报道利用降落嵌套式 PCR (touchdown nested PCR) 直接检测蜂蜜和蜂巢中的幼虫芽孢杆菌孢子。灵敏度非常高,可以用于美洲幼虫腐臭病的病情预报和实时流行病学研究。

GENERSCH 等^[20]利用 rep-PCR 技术(repetitive element PCR)成功对德国 1998~2002 年期间美洲幼虫腐臭病发病区的幼虫芽孢杆菌进行了指纹分析,从而将不同来源的幼虫芽孢杆菌分为不同的亚型。同时其认为该技术可以作为研究美洲幼虫腐臭病的流行性病学的分子工具。

2.1.2 在欧洲幼虫腐臭病诊断中的应用

欧洲幼虫腐臭病是由蜂房蜜蜂球菌(*Melissococcus pluton*)引起的蜜蜂幼虫疾病,传播快,危害性大,在世界各地均有报道,在中蜂发生普遍,西方蜂也有发生。虽然病原菌不形成芽孢,但是在死虫的干尸中能长期存活^[1]。

诊断方法有症状诊断,显微镜检查,分离鉴定病原菌(或次生菌),试管凝集试验等。分离和鉴

定病原菌是作出诊断的唯一可靠的方法^[5]。但是蜂房蜜蜂球菌培养条件极其苛刻,而且存在不同亚型,诊断的特异性和灵敏度差,费时费力。同时,产品出口检测和流行病学研究也需要特异性和灵敏度更高的检测方法^[13]。

GOVAN 等^[21]利用蜂房蜜蜂球菌 16SrRNA 基因设计引物,可以从纯培养菌落和感染幼虫中扩增出 831 bp 的基因片段。特异性较高,不会扩增用于试验的其它 3 种细菌(*Escherichiacoli*, *Paenibacillus alvei*, *Staphylococcus aureus*)。感染幼虫隔夜培养后只需要 6 h 即可确诊。

DJORDJEVIC 等^[22]根据蜂房蜜蜂球菌 16SrRNA 基因设计的半套式 PCR (hemi-nested PCR) 反应可以特异扩增分离纯化的蜂房蜜蜂球菌的基因,而不会扩增亲缘关系相近或蜂场常见的 27 种细菌的基因,而且灵敏度高于直接培养鉴定法。

MCKEE 等^[23]通过改进 DJORDJEVIC 等(1998)的半套式 PCR 技术的反应体系和循环参数,可以很灵敏的检测出蜂蜜,花粉,幼虫,成年蜂组织中的蜂房蜜蜂球菌,而且特异性很高。从而为欧洲幼虫腐臭病的流行病学研究提供了一种新方法,同时也为蜂产品出口的检疫提供了一种快速灵敏的替代方法。

2.2 PCR 技术在蜜蜂病毒性疾病诊断中的应用

有研究指出:病毒病是引起蜜蜂爬蜂病的主要诱因之一。但由于迄今为止国内外还未找到蜜蜂病毒体外培养的方法,因而限制了对蜜蜂病毒病的研究^[24]。传统诊断只限于临床症状和流行病学诊断^[1,2]。准确性、灵敏度很低,给防治带来困难。

GRABENSTEINER 等^[25]报道利用逆转录 PCR 技术可以快速、灵敏地检测到蜜蜂患病幼虫中的 SBV(囊状幼虫病毒),而且不同地区的病样检测结果一致。

BENJEDDOU 等^[26]利用逆转录 PCR 技术检测 ABPV(急性麻痹病病毒)和 BQCV(黑蜂王台病毒)。他们通过分析两种病毒的基因序列设计 PCR 引物,扩增 ABPV 得到了 900 bp 的片段,扩增 BQCV 得到了 700 bp 的片段。而且灵敏度和特异性都很高。

TENTCHEVA 等^[27]利用 PCR 技术对来自不同地区的外观健康的蜂群进行研究分析,获得了 6 种蜜蜂病毒的地理分布特征。这 6 种蜜蜂病毒分别

是SBV(囊状幼虫病毒),DWV(蜜蜂云翅病毒),KBV(克什米尔病毒),ABPV(急性麻痹病病毒),BQCV(黑蜂王台病毒),CBPV(慢性麻痹病病毒)。

YUE C and GENERSCH E^[28]根据公布的DWV(蜜蜂云翅病毒)ssRNA基因序列设计了一对引物,利用逆转录PCR技术检测蜜蜂和蜂螨体中的蜜蜂云翅病毒。这一技术也可以用于蜜蜂云翅病毒的分子生物学和寄生关系的研究。

2.3 PCR技术在蜜蜂真菌疾病诊断中的应用

白垩病是由蜂球囊菌引起的蜜蜂幼虫的一种顽固性真菌传染病,仅危害西方蜜蜂。该病虽对蜂群摧毁性不大,但因幼虫患病致使蜂群群势骤减,严重影响养蜂业的发展^[1]。传统诊断方法是根据病蜂的典型症状和流行病学特点^[1,2],但灵敏度很低。

MICHAEL^[8]利用PCR技术,CBP1或CBP2作正向引物,CBP3作反向引物,特异扩增蜂球囊菌核rDNA的ITS1-5.8s-ITS2区域,可以得到分子量约500bp的单一扩增片段,可用于蜜蜂白垩病的诊断。

2.4 PCR技术在蜜蜂微孢子虫病诊断中的应用

蜜蜂孢子虫是侵害蜜蜂中肠上皮细胞的一种寄生虫,蜜蜂在采食或清巢期间因摄入孢子而感染。本病在全世界均有发生,及时诊断有助于防止该病的扩散^[5]。

WEBSTER等^[29]利用特异PCR引物可以迅速检测到蜜蜂微孢子虫。与传统的显微镜诊断相比,灵敏度大大提高。

3 PCR技术存在的问题

3.1 假阳性问题

通常PCR在病原检测应用中所面临的问题之一是假阳性,主要存在3个污染源:(1)标本间的交叉污染;(2)实验室克隆质粒的污染;(3)PCR扩增产物的污染。其中以第3个污染源最主要。卫生部已颁布PCR实验室操作规程,要求严格按照规程操作,每次实验必须有阴性对照以防假阳性。为了克服这一缺点,人们还发明了UTP-UNG酶系统等方法,以防止假阳性^[30]。

此外,与传统方法相比,PCR检测病原微生物的阳性率较高,这是因为它的极高灵敏度决定的,高阳性率有时会造成迷惑,因此还需要结合临床症状和其它方法做出判断。

3.2 假阴性问题

PCR反应假阴性的原因相对较为复杂,主要有仪器设备的质量、试剂的稳定性、操作问题和PCR反应的参数设置等,因此通常需要设置阳性对照以降低误差。选择阳性对照时,应选择扩增弱,且重复性好的样品。

3.3 特异性和灵敏度问题

自然界中微生物种类繁多,许多病原菌常与次生菌或其它亲缘关系较近的微生物共生,因此,检测手段需要有较高的特异性。设计合适的PCR引物是PCR反应的关键,同时还要对扩增的序列有一定的了解,而这些正是PCR技术的最大障碍。

同时,蜜蜂疾病的检测涉及到多种样品,如幼蜂,成年蜂,蜂蜜以及其它蜂产品等,而各种样品的病原菌含量又各不相同,这也给疾病检测的灵敏度提出了更高的要求。

因此,用于蜜蜂疾病检测的PCR技术必将向着更加灵敏,特异性更高,覆盖检测对象更广的方向发展

4 结语

尽管PCR技术还存在着一些问题,但其本身一直处于不断发展之中。同时,PCR技术对于样品要求不是太严格,纯化或抽提的核酸、新鲜或陈旧材料均可,而且更加适用于大规模的疾病普查和监控。因此,随着PCR技术研究的不断深入和拓宽,其在蜜蜂疾病检测中也将被得到更加广泛的应用。

[参考文献]

- [1] 吴杰. 蜜蜂病敌害防治手册[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [2] 杜桃柱,姜玉锁. 蜜蜂病敌害防治大全[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [3] 孙锡斌,程国富,徐有生. 动物检疫检验彩色图谱[M]. 北京:中国农业出版社,2004.
- [4] 郑文波,李凯伦. 动物防疫检疫技术与法规[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [5] 世界动物卫生组织. 哺乳动物、禽、蜜蜂A和B类疾病诊断试验和疫苗标准手册[M]. 农业部畜牧兽医局译. 北京:中国农业科学技术出版社,2002.
- [6] 于大海,崔砚林. 中国进出口动物检疫规范[M]. 北京:中国农业出版社,1997.
- [7] 王建鼎,梁勤,苏荣. 蜜蜂保护学[M]. 北京:中国农

- 业出版社,1996.
- [8] MICHAEL H. Literature review of chalk brood, a fungal disease of honeybees [M]. Kingston : RIRDC press, 2001.
- [9] 朱庆义. 现代分子生物学技术在病原微生物快速诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(12): 738.
- [10] 涂健, 祁克宗, 潘鑫. PCR 在畜禽疫病诊断上的应用及研究进展[J]. 动物医学进展, 2004, 25(3): 22.
- [11] 郑林英, 蒋文灿. PCR 技术在畜禽病毒病诊断中的应用[J]. 动物医学进展, 2005, 26(4): 12 - 16.
- [12] 常重杰, 杜启艳. 基因工程原理与应用 [M]. 北京: 中国环境出版社, 2003.
- [13] BAKONYI T, DERAKHSHIFAR I, GRABENSTEINER E, et al. . Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples; comparison with isolation and biochemical characterization [J]. Appl. Environ. Microbiol, 2003, 69(3): 1504 - 1510.
- [14] GOVAN V A, BR ÖZEL V, ALLSOPP M H, et al. . A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. [J]. Appl. Environ. Microbiol, 1999, 65(5): 2243 - 2245.
- [15] ALIPPI A M, L ÓPEZ A C, AGUILAR O M. A PCR - based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. larvae, the Cause of American foulbrood of honeybees, at the Subspecies Level [J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 39(1): 25.
- [16] DOBBELAERE W, DE GRAAF D C, PEETERS J E, et al. . Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. larvae) using a 16S rRNA Gene Based PCR [J]. Apidologie, 2001, 32: 363 - 370.
- [17] PICCINI C, D'ALESSANDRO B, ANTAÚGNEZ K, et al. . Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies larvae spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18(8): 761 - 765.
- [18] ALIPPI A M, LOPEZ A C, AGUILAR O M. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. larvae, the cause of American foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of Genes Encoding 16S rRNA [J]. Appl. Environ. Microbiol. , 2002, 68, (7): 3655 - 3660.
- [19] LAURO F M, FABARETTO M, COVOLO L, et al. . Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol [J]. Int J Food Microbiol, 2003, 81(3): 195 - 201.
- [20] GENERSCH E, OTTEN C. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep - PCR) for Genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. larvae [J]. Apidologie, 2003, 34: 195 - 206.
- [21] GOVAN V A, ALLSOPP M H, DAVISON S. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae [J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1998, 64(5): 1983 - 1985.
- [22] DJORDJEVIC S P, NOONE K, SMITH L, et al. . Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton* [J]. Apic. Res, 1998, 37: 165 - 174.
- [23] MCKEE B A, DJORDJEVIC S P, GOODMAN R D, et al. . The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR [J]. Apidologie, 2003, 34: 19 - 27.
- [24] 周婷, 姚军, 兰文升, 等. 蜜蜂 KBV 和 APV 病毒 RT-PCR 检测技术研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(4): 459 - 462.
- [25] GRABENSTEINER E, RITTER W, CARTER M J, et al. . Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription - PCR [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2001, 8(1): 93 - 104.
- [26] BENJEDDOU M, LEAT N, ALLSOPP M, et al. . Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR [J]. Appl. Environ. Microbiol. , 2001, 67(5): 2384 - 2387.
- [27] TENTCHEVA D, GAUTHIER L, ZAPPULLA N, et al. . Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France [J]. Appl. Environ. Microbiol, 2004, (12): 7185 - 7191.
- [28] YUE C, GENERSCH E. RT - PCR analysis of Deformed Wing Virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*) [J]. Society for Genetal Microbiology, 2005, (86): 3419 - 3424.
- [29] WEBSTER T C, POMPER K W, HUNT G, et al. . Nosema *Apis* infection in worker and queen *Apis mellifera* [J]. Apidologie, 2004, (35): 49 - 54.
- [30] 陈辉, 沈广宇, 毛雄英. PCR 技术及其在传染性疾病预防中的应用 [J]. 当代实用医学, 2002, 14(9): 501 - 502.