

文章编号: 1000-7423(2010)-03-0194-06

【论著】

荧光定量 PCR 检测异尖线虫类病原体

张少雷¹, 王何兰², 刘江¹, 倪芳¹, 徐世三¹, 罗大民^{1*}

【摘要】 目的 运用荧光定量 PCR 法检测异尖线虫类病原体。方法 于鱼类内脏中检获 6 种异尖线虫类幼虫: 抹香鲸异尖线虫、简单异尖线虫、内弯对盲囊线虫、带鱼针蛔线虫、灰海鲠对盲囊线虫和台湾海峡鱼类中一优势种对盲囊线虫。提取各虫体 DNA, PCR 扩增 ITS-2 序列, 测序并进行数据库比对。依据测序结果设计特异引物, 常规 PCR 检验引物特异性。将 ITS-2 序列扩增产物回收、纯化后经 T 克隆转入大肠埃希菌 DH5 α , 提取重组质粒, 鉴定后作为标准品模板建立荧光定量 PCR 标准曲线, 并做敏感性和重复性试验。结果 构建的荧光定量 PCR 标准曲线循环阈值与模板浓度呈良好的线性关系, 相关系数均在 0.998 以上。重复性实验中, 6 种虫体对应的变异系数(*cv*)最小值为 0.18%, 最大值为 2.80%, 试验间平均 *cv* 最小值为 0.55%, 最大值为 1.94%, 无非特异性扩增, 溶解曲线的特异性和重复性良好。灵敏度实验中, 可检出的最低模板浓度为 1×10^2 拷贝/ μl , 比常规 PCR 灵敏度高 100 倍。结论 初步建立了 SYBR Green 荧光定量 PCR 检测异尖线虫类病原体的方法。

【关键词】 异尖线虫病; 异尖线虫; ITS-2 序列; 荧光定量 PCR; SYBR Green

中图分类号: R532.1

文献标识码: A

Detection of Anisakid Nematodes by an SYBR Green Real-time PCR

ZHANG Shao-lei¹, WANG He-lan², LIU Jiang¹, NI Fang¹, XU Shi-san¹, LUO Da-min^{1*}

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005, China)

【Abstract】 Objective To establish an SYBR Green real-time quantitative PCR method for the detection of anisakid nematodes with zoonotic potential from Taiwan Strait. **Methods** Anisakid larvae of six species (*Anisakis simplex*, *A. physeteris*, *Raphidascaris trichiuri*, *Contracaecum aduncum*, *C. muraenesoxi*, and *Contracaecum* sp., a predominant species in fishes in the strait) were obtained from the guts of marine fishes and identified chiefly based on the morphological features. The ITS-2 rDNA sequences from the larvae were amplified by PCR using universal primers, then cloned and bidirectionally sequenced. According to these sequences, six specific forward primers were designed and synthesized. Specificity was determined by a series of conventional PCR respectively, the ITS-2 sequences amplified above were cloned into T vector which was subsequently transformed into *E. coli* DH5 α . Following extraction and identification, the positive recombinant plasmid was used as quantitative template to generate standard curve and melt curve. Sensitivity and reproducibility were determined. **Results** All the 6 standard curves established by the recombinant plasmids showed adequate linear relationship between threshold cycle(Ct) and template concentration. Melt curves were specific and all the 6 correlation coefficients were above 0.998. In the reproducibility test, the coefficients of variation (*cv*) of Ct values for detection of the 6 nematodes ranged between 0.18% and 2.80%, and the *cv* of the inter-assay ranged between 0.55% and 1.94%. The sensitivity of the real-time PCR was 1×10^2 copies/ μl , about 100 times higher than the conventional PCR assays. The real-time quantitative PCR detection needed only 3.5 hours from the sample treatment to result report. **Conclusion** An SYBR Green fluorescent quantitative PCR has been developed for detecting anisakid nematodes with adequate sensitivity and specificity.

【Key words】 Anisakiasis; Anisakid nematode; ITS-2 sequence; Real-time PCR; SYBR Green

Supported by the Science and Technology Project of Fujian Province (No. 2008N2005)

* Corresponding author, E-mail: dmluo@xmu.edu.cn

异尖线虫病是一种重要的食源性人兽共患寄生虫

病^[1-3]。每年全球约有 14 000 例感染病例, 其中日本约 2 000 余例, 韩国 100 余例, 欧美国家 500 多例^[4]。异尖线虫病的病原体有简单异尖线虫 (*Anisakis simplex*)、典型异尖线虫 (*A. typica*)、抹香鲸异尖线虫

基金项目: 福建省科技计划项目 (No. 2008N2005)

作者单位: 1 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005;

2 深圳市福田人民医院体检科, 深圳 518033

* 通讯作者, E-mail: dmluo@xmu.edu.cn

(*A. physeteris*)、伪新地蛔线虫(*Pseudoterranova decipiens*)、内弯对盲囊线虫(*Contracaecum aduncum*)和带鱼针蛔线虫(*Raphidascaris trichiuri*)等^[2,5,6]。随着三文鱼、鲑鱼等逐步进入大中城市市民的生食菜谱,该病有可能在我国人群中出现,应引起高度重视。依据形态学对异尖线虫的检验检验易受检验者的专业知识背景及个人主观因素的影响,在检验检疫中造成误检、漏检。Umehara 等^[7]建立了用于异尖线虫类病原体检测的 PCR 方法,然而当检测靶标增多时易出现引物交叉反应等弊端。此外,常规 PCR 会产生环境污染且不能定量检测。荧光定量 PCR 除了具备常规 PCR 优点外,还具有可定量和无需后续操作等优点^[8-10],是目前广泛应用的病原检测手段。本研究应用荧光染料 SYBR Green 建立一种用于异尖线虫病原线虫幼虫的定性和定量检测的荧光定量 PCR 方法。

材料与方 法

1 线虫来源

于台湾海峡浅滩渔场捕获的鱼内脏中剖检异尖科线虫 期幼虫,镜检分类,初步确定检获的线虫幼虫有 6 种:抹香鲸异尖线虫(*Anisakis physeteris*)、简单异尖线虫(*Anisakis simplex*)、内弯对盲囊线虫(*Contracaecum aduncum*)、带鱼针蛔线虫(*Raphidascaris trichiuri*)、灰海鳗对盲囊线虫(*C. muraenesoxi*)和台湾海峡鱼类中一优势种对盲囊线虫(*Contracaecum sp.*)^[11-16]。

2 主要试剂和仪器

WizardTM DNA 纯化试剂盒购自美国 Promega 公司, *Taq* DNA 聚合酶、DNA 标记物、pGEM-T 载体和凝胶回收试剂盒购自日本 Takara 公司。质粒小量抽提试剂盒和荧光反应预混系统 RealMasterMix (SYBR Green) 荧光定量 PCR 试剂盒购自上海天根生化科技有限公司;水平电泳仪、凝胶成像系统和常规 PCR 仪均购自德国 Biorad 公司,微量紫外可见分光光度计 (ND-1000) 购自美国 Nanodrop 公司,荧光定量 PCR 仪 (Rotor Gene 3000) 购自澳大利亚 Corbett Research 公司。

3 DNA 提取和 ITS-2 克隆测序

采用十二烷基硫酸钠 (SDS)/蛋白酶 K 法提取 6 种线虫 DNA。经 55 °C 处理 1.5 h 后,使用 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA, -20 °C 保存备用。用通用引物 ITS2 (5'-GGTGGATCACTGGGCTCGTG-3') 和 BD2 (5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3') 扩增 ITS-2 序列^[17]。反应体系为: 10×PCR 缓冲液 5 μl、DNA 模板 3 μl、

25 mmol/L MgCl₂ 3 μl、2.5 mmol/L dNTPs 4 μl、10 μmol/L 上、下游引物各 1.5 μl、5 U/μl *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μl、加灭菌双蒸水至 50 μl。扩增条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检验。对 550 bp 左右的条带进行切胶回收。回收片段连入 pMD18-T 载体,转入大肠埃希菌 DH5α 感受态细菌。用含有氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 固体平板培养过夜。挑取单菌落, PCR 检测,阳性克隆送上海英俊生物技术有限公司测序。

4 引物设计

测序结果与 GenBank 相关序列进行比对,将序列比对结果与形态学鉴定结果相核对,确定完全相符后,根据测序结果设计荧光定量 PCR 特异引物 (表 1),通用反义引物 BD2 (5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3')。

表 1 所用引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

虫种 Name	序列来源 (GenBank 登录号) Sequence origin (GenBank accession no.)	引物 (5'-3') Oligonucleotide primer
简单异尖线虫 <i>Anisakis simplex</i>	AB277823	AP (ACGGCTCCTT-GCTTAGTTG)
抹香鲸异尖线虫 <i>Anisakis physeteris</i>	AB277821	ACP (TCTATCTTGG-ACAATATGACGAG)
内弯对盲囊线虫 <i>Contracaecum aduncum</i>	AB277826	EF (CTTTTCAGGAG-AGGTCACTTC)
带鱼针蛔线虫 <i>Raphidascaris trichiuri</i>	FJ009682	CF (GGTTGTGTGTGT-GTGTACTCTTGT)
灰海鳗对盲囊线虫 <i>C. muraenesoxi</i>	EU828749	GF (TACCTTGCTAA-GTCTTTGCTATG)
海峡鱼类中一优势种对盲囊线虫 <i>Contracaecum sp.</i>	FJ009683	HF (CGGCTGGCTC-ACCTCTTA)

5 引物特异性检验及扩增溶解曲线分析

依次以 6 种线虫 DNA 为模板,分别加入上述引物进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检验。溶解曲线分析分别以 6 种线虫 DNA 为模板,加入相应特异引物参照荧光定量 PCR 试剂盒说明进行荧光定量 PCR,每个样品设置一个重复,经荧光定量 PCR 后由仪器自带软件输出溶解曲线,输出温度范围为 70 °C~95 °C。

6 荧光定量 PCR 标准曲线的建立

将含有 ITS-2 序列的阳性单菌落,加入 3 ml 含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 °C 180 r/min 摇床过夜。用质粒提取试剂盒提取重组质粒,经 PCR 鉴定后用

微量紫外可见分光光度计测吸光度 (A_{260} 和 A_{280} 值), 并根据摩尔定律, 计算质粒中的 DNA 拷贝数。然后以标准质粒 10 倍梯度稀释溶液为模板, 进行荧光定量 PCR。荧光定量预混系统 (2.5×Real Master Mix/20× SYBR solution) 9 μ l, 正、反引物各 0.5 μ l (浓度为 10 μ mol/L), 模板 2 μ l, 加无菌水至 20 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 40 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 18 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 荧光信号采集。同时设阴性对照和阳性对照 (高浓度质粒), 荧光定量 PCR 反应结束后制作溶解曲线。阈值的设置选择曲线指数扩增的线性阶段且精度最大、敏感性最大的区域。

7 荧光定量 PCR 的敏感性与可重复性

将上述已知拷贝数的标准质粒稀释至 1×10^8 (拷贝/ μ l), 然后按 10 倍梯度稀释, 以各梯度稀释液为模板进行荧光定量 PCR 反应。线性范围内的最低起始模板浓度即为荧光定量 PCR 反应的敏感性。同时对各模板进行普通 PCR 检验, 比较两种方法的灵敏度。7 d 后重新提取质粒模板, 选取模板浓度为 10^5 拷贝/ μ l 和 10^6 拷贝/ μ l 的重组质粒为模板, 分别设 4 个平行管进行实验, 评价该方法的准确性和稳定性。对初始循环数 (C_t) 进行标准差分析, 以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 计算变异系数 (cv): $cv = s/\bar{x}$, s 为标准差, \bar{x} 为 C_t 平均值^[18]。

结 果

1 引物特异性及荧光定量 PCR 溶解曲线分析

获得的 6 种线虫 ITS-2 序列经数据库比对后发现

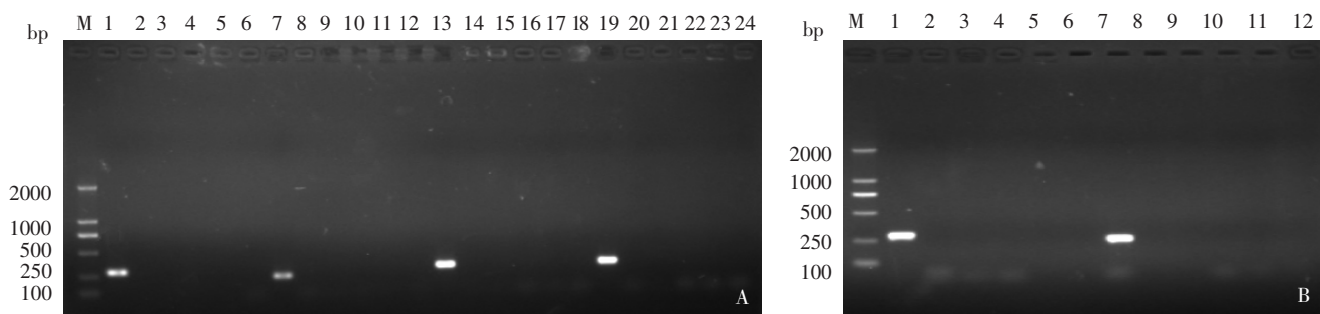
与形态学初步鉴定的结果完全一致^[19]。常规 PCR 特异性检验显示, 只有当加入的模板与特异引物严格对应时才有条带扩增, 未出现非特异条带。6 种引物之间的特异性良好。引物扩增产物长度均在 300 bp 以内 (图 1)。溶解曲线分析结果显示各溶解曲线均为单一吸收峰, 产物专一, 未形成引物二聚体, 可进行下一步荧光定量 PCR 反应^[20]。

2 荧光定量 PCR 标准曲线的建立

稀释的质粒标准品经荧光定量 PCR 后, 根据标准曲线法设定最佳阈值, 只保留线性关系良好的加样孔由仪器自带软件绘制标准曲线。SYBR Green 荧光定量 PCR 标准曲线循环阈值与模板浓度呈良好的线性关系, 6 条曲线中 R^2 值均在 0.998 以上, 说明标准曲线建立成功 (图 2)。

3 荧光定量 PCR 灵敏性与可重复性

本实验荧光定量 PCR 检测的灵敏度为 1×10^2 拷贝/ μ l。在与常规 PCR 灵敏度对比实验中, 以抹香鲸异尖线虫 (*Anisakis physeteris*) 为代表, 常规 PCR 在模板稀释至 10^4 拷贝/ μ l 后, 琼脂糖凝胶电泳检测只有微弱的条带检出, 而荧光定量 PCR 在模板浓度为 10^2 拷贝/ μ l 时仍能检测出荧光信号。所以, 荧光定量 PCR 比常规 PCR 检测的灵敏度高约 100 倍 (图 3)。重复性试验采用 cv 进行方法重现性评价, 各个特异引物荧光定量 PCR 扩增结果的误差很小, 变异系数最小的仅为 0.18%, 表明荧光 PCR 检测方法具

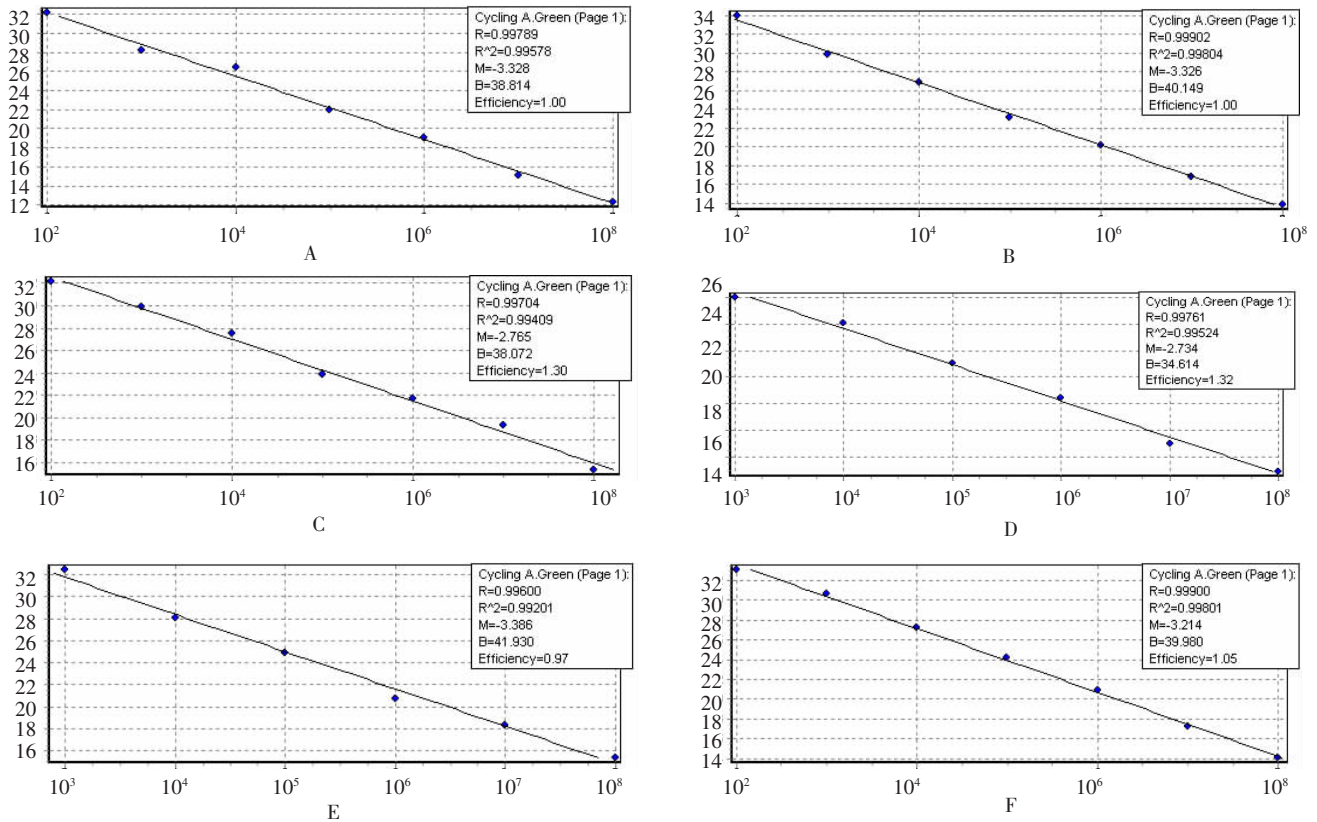


M: DNA 标志物 (DL 2000); 图 A, 1~6: 模板 DNA 均为 *A. simplex*, 正义引物依次为 ACP、AP、CF、EF、HF 和 GF; 7~12: 模板 DNA 均为 *A. physeteris*, 正义引物依次为 AP、ACP、CF、EF、HF 和 GF; 13~18: 模板 DNA 均为 *R. trichiuri*, 正义引物依次为 CF、AP、ACP、EF、HF 和 GF; 19~24: 模板 DNA 均为 *C. aduncum*, 正义引物依次为 EF、AP、ACP、CF、HF 和 GF。图 B, 1~6: 模板 DNA 均为 *Contracaecum* sp., 正义引物依次为 HF、AP、ACP、CF、EF、GF; 7~12: 模板 DNA 均为 *C. muraenesoxi*, 正义引物依次为 GF、ACP、AP、CF、EF、HF。

M: DNA marker (DL 2000); fig. A, 1-6: All templates are *A. simplex*, forward primers are in order of ACP, AP, CF, EF, HF and GF; 7-12: All templates are *A. physeteris*, forward primers are in order of AP, ACP, CF, EF, HF and GF; 13-18: All templates are *R. trichiuri*, forward primers are in order of CF, AP, ACP, EF, HF and GF; 19-24: All templates are *C. aduncum*, forward primers are in order of EF, AP, ACP, CF, HF and GF. fig. B, 1-6: All templates are *Contracaecum* sp., forward primers are in order of HF, AP, ACP, CF, EF and GF; 7-12: All templates are *C. muraenesoxi*, forward primers are in order of GF, ACP, AP, CF, EF and HF.

图 1 PCR 检验引物特异性

Fig.1 Test of specificity by conventional PCR

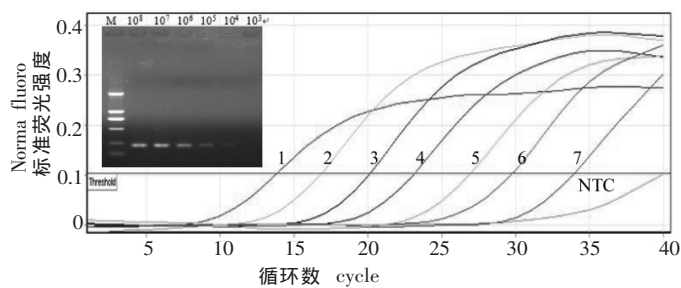


注：纵坐标为 Ct 值，横坐标为标准品浓度的对数。R：相关系数；R²：决定系数；M：斜率；B：截距；E：反应效率。a 模板为 *A. simplex*，正义引物为 ACP；b 模板为 *A. physeteris*，正义引物为 AP；c 模板为 *R. trichiuri*，正义引物为 CP；d 模板为 *C. aduncum*，正义引物为 EP；e 模板为 *Contraecacum* sp.，正义引物为 HP；f 模板为 *C. muraenesoxi*，正义引物为 GP。

Note: Vertical ordinate: Ct (cycle threshold) value, Horizontal ordinate: The original copies; R: Correlation coefficient; R²: Coefficient of determination; M: Slope; B: Intercept; E: Efficiency. a DNA template: *A. simplex*, forward primer: ACP; b DNA template: *A. physeteris*, forward primer: AP; c DNA template: *R. trichiuri*, forward primer: CP; d DNA template: *C. aduncum*, forward primer: EP; e DNA template: *Contraecacum* sp., forward primer: HP; f DNA template: *C. muraenesoxi*, forward primer: GP.

图 2 由重组质粒构建的标准曲线

Fig.2 Standard curve of the real-time PCR established by recombinant plasmid

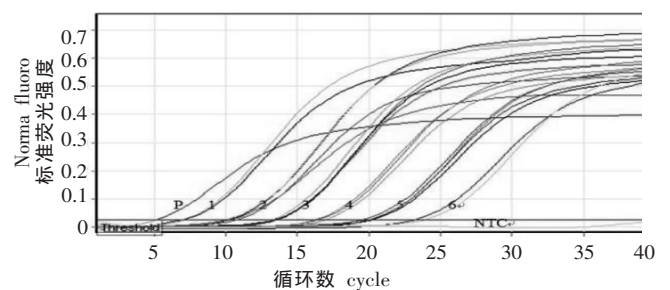


1~7: 重组质粒模板浓度 (拷贝/ μ l): 分别为 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 和 1×10^2 ; NTC: 阴性对照。

1-7: Concentration of the recombinant plasmid (copies/ μ l), 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , and 1×10^2 , respectively; NTC: Negative control.

图 3 常规 PCR 与荧光定量 PCR 灵敏度比较

Fig.3 Comparison of sensitivity for *A. physeteris* detection between the real-time PCR and the conventional PCR



1~6: 重组质粒模板浓度 (拷贝/微升), 分别为 6.91×10^8 、 6.91×10^7 、 6.91×10^6 、 6.91×10^5 、 6.91×10^4 和 6.91×10^3 ; P: 阳性对照; NTC: 阴性对照。

1-6: Concentration of the recombinant plasmid (copies/ μ l), 6.91×10^8 , 6.91×10^7 , 6.91×10^6 , 6.91×10^5 , 6.91×10^4 , and 6.91×10^3 , respectively; P: Positive control; NTC: Negative control.

图 4 *A. simplex* 的动力曲线

Fig.4 Dynamic curve of the real-time PCR for *A. simplex*

有较高的可重复性，从而保证了不同样品间检测结果的可靠性和稳定性。图 4 列举了重复性实验中采用特

异引物 ACP 荧光定量 PCR 扩增 *A. simplex* 的动力曲线，直观的反映了荧光定量 PCR 良好的重复性。

表 2 荧光定量 PCR 的重复性实验
Table 2 Reproducibility of the real-time PCR

DNA 模板 DNA	样品浓度 (拷贝/反应) Concentration (copies/reaction)	初始循环数 No. Ct					
		Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	$\bar{x} \pm s$	变异系数 <i>cv</i> (%)
抹香鲸异尖线虫 <i>A. physeteris</i>	5.90×10 ⁶	17.50	17.78	17.54	17.98	17.70±0.22	1.27
	5.90×10 ⁵	20.30	19.99	20.08	20.28	20.16±0.15	0.75
简单异尖线虫 <i>A. simplex</i>	6.91×10 ⁶	13.69	14.05	13.85	13.87	13.87±0.15	1.06
	6.91×10 ⁵	17.41	17.83	16.94	16.76	17.24±0.48	2.80
内弯对盲囊线虫 <i>C. aduncum</i>	6.38×10 ⁶	19.29	19.07	19.20	18.75	19.08±0.24	1.24
	6.38×10 ⁵	21.75	22.15	22.06	21.87	21.96±0.18	0.82
台湾海峡鱼类中一优 势种对盲囊线虫 <i>Contracaecum</i> sp.	6.88×10 ⁶	17.77	17.92	18.02	17.78	17.87±0.12	0.67
	6.88×10 ⁵	20.63	20.16	20.42	20.22	20.36±0.21	1.04
灰海鳗对盲囊线虫 <i>C. muraenesoxi</i>	5.17×10 ⁶	18.36	18.11	18.23	18.38	18.27±0.13	0.69
	5.17×10 ⁵	20.50	20.91	20.29	20.44	20.53±0.27	1.30
带鱼针蛔线虫 <i>R. trichiuri</i>	7.11×10 ⁶	14.24	14.35	14.28	14.59	14.41±0.13	0.90
	7.11×10 ⁵	16.73	16.76	16.80	16.75	16.76±0.03	0.18

讨 论

在我国，简单异尖线虫被列为国家禁止入境的二类动物寄生虫，我国各地海关相继报道进口鱼类中检出异尖线虫类病原体^[4]。然而，我国当前的异尖线虫类病原体检验主要依靠形态学，敏感性低且对检验者背景知识要求高。为建立简单、快速、操作方便的分类及检测方法，Lee 等^[21]建立了 PCR-限制性酶切的方法；Umehara 等^[7]建立了 PCR 扩增、测序的方法；曹庭盛等^[22]建立了只针对简单异尖线虫的 PCR 检测方法。荧光定量 PCR 较常规 PCR 具有更高的敏感性和特异性，且具有无污染、可定量、耗时短等优点，将该方法应用于检测寄生虫是一种发展趋势^[9,18]。本研究将荧光定量 PCR 的方法应用于异尖线虫类病原体的检验，不仅可以高特异性的检测出微量的病原线虫，还可以对病原线虫初始模板含量进行准确定量。实验在以 10 倍稀释梯度情况下可检测出的初始模板最低拷贝数在 1×10²~1×10³ (拷贝/μl) 之间，具有很高的敏感性。由于不需要凝胶电泳等 PCR 后续操作，荧光定量 PCR 较常规 PCR 还具有省时的优点，本实验从材料处理到获得检测报告仅需 3.5 h。实验中材料的匀浆、DNA 提取效率、琼脂糖的选择及实验环境等都会影响实验结果^[23]。

生物学中常用的遗传标记基因有线粒体细胞色素 C 氧化酶 1 (COX 1) 基因、18S rRNA 基因和 rDNA 的转录间隔区 (internal transcribed spacer, 简称 ITS) 序列等。COX 1 基因演化快于 (或等于) 核 DNA^[18,24]，可能会造成同种虫体内出现遗传差。荧光定量 PCR 具有很高的敏感性，这种遗传差异会影响荧光定量 PCR 检测的敏感性以及适用范围。18S rRNA 基因是一种

持家基因 (house-keeping gene)，其进化速率在核糖体 DNA 中最慢^[18]，十分保守，不适于本实验。ITS 既具有保守性，又在属、种水平具有特异性^[19]，应用 ITS 作为分子标记进行物种鉴别得到了广泛应用^[25-28]，并且 ITS 序列在基因组中拷贝数相当大，以串联多拷贝的形式组成庞大的多基因家族，可大大提高检测的敏感性。ITS 序列含两个插入间隔序列，即 ITS-1 和 ITS-2。较之 ITS-1，ITS-2 间隔区集中了更多的信息位点，这类信息可以更好的反映系统发育关系^[19]，更有利于设计具有种间特异性的引物。因此，本研究设计的特异引物全部位于 rDNA 的 ITS-2 部分，成功构建了具有高特异性的荧光定量 PCR 检测方法，为异尖线虫病原线虫的鉴别及快速、灵敏、定量检测提供了技术支撑。

参 考 文 献

- [1] Sun SZ, Koyama T, Kagei N. Morphological and taxonomical studies on Anisakidae larvae found in marine fishes of China II. Gulf of Tong King[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1992, 10(2): 108-112. (in Chinese)
(孙世正, 小山力, 影井升. 近海鱼类异尖科幼线虫形态分类学研究 北部湾部分[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1992, 10(2): 108-112.)
- [2] Luo DM, Fang WZ. Study on infestation and dynamic of anisakiasis pathogen in marine fishes from Taiwan Strait[J]. J Oceanogr Taiwan Str, 2000, 19(2): 218-221. (in Chinese)
(罗大民, 方文珍. 异尖线虫病原线虫在台湾海峡鱼类中的分布及动态[J]. 台湾海峡, 2000, 19(2): 218-221.)
- [3] Li HM, Xu Z, Zhang LP. Advances on the research of *Anisakis* [J]. J Pathog Biol, 2006, 1(5): 391-393. (in Chinese)
(李会敏, 徐真, 张路平. 异尖属线虫研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1(5): 391-393.)
- [4] Huang WY. Survival of the third stage larvae of *Anisakis simplex* in various conditions and experimental infection in rats[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(2): 106-109. (in Chinese)
(黄维义. 异尖线虫 期幼虫在不同条件下生存试验及人工感染大鼠观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(2): 106-

- 109.)
- [5] Luo DM. Notes on nematodes of fishes from Taiwan Strait [J]. Acta Zoota Sin, 2001, 26(2): 154-160. (in Chinese)
(罗大民. 台湾海峡鱼类寄生虫种类记述 [J]. 动物分类学报, 2001, 26(2): 154-160.)
- [6] Li L, Xu Z, Zhang LP. Advances in the *Hysterothylacium* (Nematoda, Raphidascaridae) from the fishes[J]. Acta Parasitol Med Entomol Sin, 2006, 13(4): 244-250. (in Chinese)
(李亮, 徐真, 张路平. 鱼类寄生宫脂属线虫研究进展[J]. 寄生虫与医学昆虫报, 2006, 13(4): 244-250.)
- [7] Umehara A, Kawakami Y, Araki J, et al. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes [J]. Parasitol Int, 2008, 57(1): 49-53.
- [8] Yin JL, Shackel NA, Zekry A, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I[J]. Immunol Cell Biol, 2001, 79(3): 213-221.
- [9] MacMillan K, Blok V, Young I, et al. Quantification of the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* from soil samples using real time qPCR[J]. Int J Parasitol, 2006, 36(14): 1453-1461.
- [10] Bell AS, Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology[J]. Trends Parasitol, 2002, 18(8): 337-342.
- [11] Zhang L, Hu M, Shamsi S, et al. The specific identification of anisakid larvae from fishes from the Yellow Sea, China, using mutation scanning-coupled sequence analysis of nuclear ribosomal DNA[J]. Mol Cell Probe, 2007, 21(5): 386-390.
- [12] Shih HH. Parasitic helminth fauna of the cutlass fish, *Trichiurus lepturus* L., and the differentiation of four anisakid nematode third-stage larvae by nuclear ribosomal DNA sequences[J]. Parasitol Res, 2004, 93(3): 188-195.
- [13] Luo DM, Fang WZ. Study on ordination of marine-fish parasitic nematode larvae in Taiwan Strait [J]. J Oceanogr Taiwan Str, 1999, 18(4): 403-406. (in Chinese)
(罗大民, 方文珍. 台湾海峡鱼类 8 种寄生线虫幼虫的特征排序 [J]. 台湾海峡, 1999, 18(4): 403-406.)
- [14] Luo DM. A study on the infection state of parasitic nematode larva of marine fishes from Taiwan Strait [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci), 1999, 38(4): 604-610. (in Chinese)
(罗大民. 台湾海峡经济鱼类感染寄生线虫幼虫的调查 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(4): 604-610.)
- [15] Luo DM, Fang WZ. Study on dynamic of fish-parasitic nematode larva in Taiwan Strait [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci Ed), 1999, 38(6): 902-906. (in Chinese)
(罗大民, 方文珍. 台湾海峡鱼类寄生针晶蛔和对盲囊线虫幼虫的动态 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(6): 902-906.)
- [16] Luo DM. A new species of genus *Contracaecum* (Ascaridae: Heterochilidae): *Contracaecum muraenesoxi* n sp. and study on its morphological variation [J]. Acta Parasitol Med Entomol Sin, 1999, 6(4): 215-221. (in Chinese)
(罗大民. 台湾海峡鱼类对盲囊线虫一新种及其内部变异研究 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1999, 6(4): 215-221.)
- [17] Zheng Y, Luo X, Jing Z, et al. Comparison of 18S ribosomal RNA gene sequences of *Eurytrema coelmaticum* and *Eurytrema pancreaticum* [J]. Parasitol Res, 2007, 100(3): 645-646.
- [18] Zhou L, Liang B, Wang YF, et al. Fluorescent quantitative real-time PCR for detection of *Schistosoma japonicum* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2008, 26(4): 299-303. (in Chinese)
(周立, 梁冰, 王业富, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测日本血吸虫 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(4): 299-303.)
- [19] Zhang SL, Xu SS, Luo DM. Sequence analysis of rDNA of anisakid nematodes with zoonotic potential from Taiwan Strait [J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(7): 660-664. (in Chinese)
(张少雷, 徐世三, 罗大民. 台湾海峡异尖线虫病病原线虫幼虫的 rDNA 序列分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(7): 660-664.)
- [20] Huang F, Tang LH, Chen B, et al. Effect of daphnetin and its derivatives on gene expression of ribonucleotide reductase from *Plasmodium falciparum* in vitro detected by real-time PCR [J]. Chin J Pathog Biol, 2008, 3(4): 288-291. (in Chinese)
(黄芳, 汤林华, 陈博, 等. 实时荧光定量 PCR 测定瑞香素类抗疟化合物对恶性疟原虫核糖核酸还原酶基因表达的影响 [J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(4): 288-291.)
- [21] Lee M, Doo S, Choi C. Molecular genotyping of *Anisakis* species from Korean sea fish by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) [J]. Food Con, 2009, 20(7): 623-626.
- [22] Cao TS, Li XJ, Cai WM, et al. Establishment of the PCR assay for detection of *Anisakis simplex* [J]. Chin J Prev Vet Med, 2009, 31(4): 279-282. (in Chinese)
(曹庭盛, 李孝军, 蔡渭明, 等. 简单异尖线虫 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(4): 279-282.)
- [23] Zhang JX, Chao SY, Ding M, et al. Establishment of SYBR green I real-time PCR assay for detection of porcine circovirus type 2 [J]. Chin Anim Husbandry, 2008, 35(9): 30-33. (in Chinese)
(张锦秀, 晁生玉, 丁敏, 等. 检测猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(9): 30-33.)
- [24] Hoeh WR, Blakley KH, Brown WM, et al. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA [J]. Science, 1991, 251(5000): 1488-1490.
- [25] Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens [J]. Med Mycol, 2002, 40(1): 87-109.
- [26] Zhu XQ, Robin RB, Gasser, et al. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences [J]. Int J Parasitol, 1998, 28(12): 1911-1921.
- [27] Zhu X, D'Amelio S, Paggi L, et al. Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contracaecum osculatatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) [J]. Parasitol Res, 2000, 86(8): 677-683.
- [28] Zhu X, D'Amelio S, Hu M, et al. Electrophoretic detection of population variation within *Contracaecum ogmorhini* (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) [J]. Electrophoresis, 2001, 22(10): 1930-1934.

(收稿日期: 2009-09-10 编辑: 衣凤芸)