

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200524001

http://www.yykxjz.cn/

邹莹, 郭晓萌, 万晓媛, 邱亮, 张庆利. 十足目虹彩病毒(DIV1)环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 156-164

Zou Y, Guo XM, Wan XY, Qiu L, Zhang QL. Establishment and application of the LAMP detection method for decapod iridescent virus 1 (DIV1). Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 156-164

# 十足目虹彩病毒(DIV1)环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立及应用\*

邹莹<sup>1,2</sup> 郭晓萌<sup>1</sup> 万晓媛<sup>1</sup> 邱亮<sup>1</sup> 张庆利<sup>1,2①</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室  
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室

青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 本研究以十足目虹彩病毒(Decapod iridescent virus 1, DIV1)主要衣壳蛋白基因为靶序列设计引物,建立了DIV1的环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法,并以pMD18-DIV1质粒标准品为模板对该方法的检测灵敏度、检测特异性等进行了评估。结果显示,此方法最适反应温度为64.4℃,优化后的25 μl反应体系中包含2.5 μl 10×Isothermal amplification buffer、4.0 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、1.2 mmol/L dNTPs、6.4 U *Bst* 2.0 WarmStart<sup>®</sup> DNA聚合酶、0.8 μmol/L EvaGreen<sup>®</sup>和4.4 μl ddH<sub>2</sub>O。该方法检测灵敏度下限为3.54×10<sup>2</sup>拷贝/反应;与虾肝肠胞虫(EHP)、致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(*Vp*<sub>AHPND</sub>)、对虾偷死野田村病毒(CMVN)、传染性皮下及造血组织坏死病病毒(IHHNV)、白斑综合征病毒(WSSV)、桃拉综合征病毒(TSV)和黄头病毒(YHV)等主要虾类病原没有交叉反应;具有较好的重复性和稳定性。以GeneFinder<sup>®</sup>替换EvaGreen<sup>®</sup>并将其预置于反应管内,结合上述扩增方法可实现对DIV1的现场快速高灵敏检测。本研究建立的DIV1-LAMP实时荧光定量和现场检测方法具有灵敏、特异和快速等特点,为近几年新发虾类病原DIV1的定性、定量以及现场快速检测提供了新的技术选择,有利于对虾养殖业中开展DIV1的监测、预警和防控。

**关键词** 十足目虹彩病毒(DIV1); 虾血细胞虹彩病毒(SHIV); 环介导等温扩增(LAMP); 检测方法  
中图分类号 S945.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2020)06-0156-09

虾血细胞虹彩病毒(Shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV)和红螯螯虾虹彩病毒(*Cherax quadricarinatus* iridovirus, CQIV)是近年报道的、虹彩病毒科中

可感染甲壳类的2种新发病毒(Xu *et al*, 2016; Qiu *et al*, 2017),对对虾养殖业构成了威胁。2014年,SHIV首次在浙江一养殖场的凡纳滨对虾(*Litopenaeus*

\* 国家重点研发计划项目(2017YFC1404503)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD39)和中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费项目(20603022020005)共同资助 [This work was supported by National R&D Program of China (2017YFC1404503), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD39), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022020005)].

邹莹, E-mail: 15216481627@163.com

① 通讯作者: 张庆利, 研究员, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-05-24, 收修改稿日期: 2020-05-31

vannamei) 中被发现。随后几年的流行病学调查显示, 我国沿海包括河北、山东、江苏、浙江和福建等省部分区域养殖凡纳滨对虾中均有SHIV检出(Qiu *et al.*, 2017、2018)。Xu等(2016)研究显示, 红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)中分离到的一种虹彩病毒(CQIV)对凡纳滨对虾也具有较强致病性。

SHIV基因组为双链DNA, 长度约为166 kb, 与CQIV的基因组同源率为99.97%。2019年, 国际病毒分类委员会将二者作为2个病毒株, 统一命名为十足目虹彩病毒1(Decapod iridescent virus, DIV1), 并将其归入虹彩病毒科的一个新属——十足目虹彩病毒属(*Decapodiridovirus*)(Xu *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2017、2019; 陈彤, 2019)。目前, 虹彩病毒科共有6个属, 其中, 蛙病毒属(*Ranavirus*)、肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)和淋巴囊肿病毒属(*Lymphocystivirus*)均可感染鱼类等脊椎动物(Chinchar *et al.*, 2011; Kurita *et al.*, 2012)。例如, 大鲩虹彩病毒(Giant seaperch iridovirus, GSIV)感染会导致大鲩(*Andrias davidanus*)全身水肿、多脏器受损, 该病毒的流行使大鲩养殖业遭受了重大打击(孟彦, 2013); 而新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)则会引起石斑鱼全身性疾病, 威胁石斑鱼养殖业的发展(Teng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014)。研究发现, DIV1可感染凡纳滨对虾、红螯螯虾、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarki*)和脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的造血组织和血细胞, 被感染细胞出现核固缩, 细胞质内可见嗜碱性包涵体(Qiu *et al.*, 2017、2019)。感染DIV1后的对虾出现肝胰腺颜色变浅、空肠空胃、停止摄食、活力下降等症状(Qiu *et al.*, 2017、2019)。

目前, DIV1的检测主要依赖Qiu等(2018)基于ATPase基因(GenBank登录号: KY681040)建立的TaqMan探针实时荧光定量PCR和套式PCR检测方法(陈蒙蒙, 2017; 邱亮, 2018)。由于DIV1实时荧光定量

PCR方法对检测仪器设备要求较高, 检测时间长, 无法现在在取样现场对患病对虾进行快速检测。而环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)具有扩增效率高、扩增速度快、恒温扩增无需复杂仪器设备等特点, 非常适用于现场检测(Priyanka *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2012; Shirato, 2019), 目前已被广泛应用于人类、动物卫生和食品相关病原微生物的检测(Notomi *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020)。因此, 本研究基于DIV1的主要衣壳蛋白基因建立了其LAMP检测技术, 以期对DIV1病原的实验室和现场检测及防控提供新的技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

参考Qiu等(2017)的方法, 对购自山东日照的健康凡纳滨对虾进行DIV1人工感染实验, 并使用基因组DNA提取试剂盒(天根, 北京, 中国)提取健康个体和患病个体的基因组DNA。利用NanoDrop 2000c测定所提取DNA的质量和浓度(Thermo Scientific, Waltham, 美国), 然后, 将DNA保存于-80℃冰箱备用。研究中用到的虾肝肠胞虫(EHP)、致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(*Vp<sub>AHPND</sub>*)、对虾偷死野田村病毒(CMVN)、传染性皮下及造血组织坏死病病毒(IHHNV)、白斑综合征病毒(WSSV)、桃拉综合征病毒(TSV)和黄头病毒(YHV)等病原阳性核酸均来自于作者实验室。

### 1.2 DIV1-LAMP引物设计

本研究利用Primer Explorer V5.0软件, 根据DIV1的衣壳蛋白基因序列(GenBank登录号为ATE87157.1), 设计了3对LAMP扩增引物(表1), 包括2条内引物、2条外引物以及2条环引物。由上海生工生物技术有限公司合成该引物。

表1 DIV1-LAMP反应引物序列  
Tab.1 Primer sequences for DIV1-LAMP assay

引物名称 Primer name	序列 Primer sequence (5'-3')	在MCP基因中的位置 Sites in MCP gene (5'-3')
DIV1-MCP-FIP	CCGCAACATTAGATACGAATCTTCTTTTATCAGTGAGAAGTAATCGGC	332~356 TTTT 290~309
DIV1-MCP-BIP	CCTATGGGATCGAATGCGCTTTTTTACACAACCGCATCACC	359~378 TTTT 419~436
DIV1-MCP-F3	GTGCCTTGTTAGTAGGGTTC	270~288
DIV1-MCP-B3	AATCCAAATGTTTGGTCCAA	437~456
DIV1-MCP-LF	AGATCGTATTCCCCTGATGACT	310~331
DIV1-MCP-LB	CTGATCTGGGTCGAAATCAATCTT	379~402

### 1.3 DIV1-LAMP 反应条件优化

以 DIV1 阳性核酸为模板, 25  $\mu\text{l}$  LAMP 初始反应体系中包含 2.5  $\mu\text{l}$  10 $\times$ Isothermal amplification buffer、4 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ 、1.2 mol/L Betaine、1.2 mmol/L dNTPs、1.6  $\mu\text{mol/L}$  DIV1-FIP/BIP、0.2  $\mu\text{mol/L}$  DIV1-F3/B3、0.8  $\mu\text{mol/L}$  LF/LB、6.4 U *Bst* 2.0 WarmStart<sup>®</sup> DNA 聚合酶、0.8  $\mu\text{mol/L}$  EvaGreen<sup>®</sup>及适量的水, 于实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, California, 美国)中设置 8 个温度梯度(58.0 $^{\circ}\text{C}$ ~68.0 $^{\circ}\text{C}$ ), 反应 50 min (50 个循环, 每个循环 1 min);  $\text{MgSO}_4$  终浓度按照 3.2、4.0、4.8、5.6 mmol/L, dNTPs 终浓度按照 0.8、1.0、1.2、1.4 mmol/L 进行反应体系正交实验优化; *Bst* 2.0 WarmStart<sup>®</sup> DNA 聚合酶用量按照 3.2、4.8、6.4、8.0、9.6 U 进行添加; 核酸染料 EvaGreen<sup>®</sup>终浓度分别按照 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0  $\mu\text{mol/L}$  的添加量进行优化。每个待优化指标的单个变量设置 3 个重复, 依据扩增  $C_t$  值和 SD 值选出最佳反应条件。

### 1.4 DIV1 的质粒标准品制备

以 DIV1 阳性核酸为模板, 通过 DIV1-F3/B3 引物进行 PCR 扩增, 获取 DIV1 靶基因核酸目的片段。将纯化的目的片段接入 pMD18-T 载体(TaKaRa, 大连, 中国)进行克隆和测序验证, 对测序验证正确的克隆扩大培养。随后, 用质粒提取试剂盒(Omega Inc., Norcross, 美国)提取 pMD18-DIV1 质粒, 利用 NanoDrop 2000c 测定质粒浓度。用 TE 缓冲液将 pMD18-DIV1 质粒 10 倍梯度稀释成质粒标准品, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.5 DIV1-LAMP 分析灵敏度检验和标准曲线的建立

使用梯度稀释的 pMD18T-DIV1 质粒( $3.54 \times 10^9 \sim 10^0$  拷贝/反应)和无 RNA 酶  $\text{H}_2\text{O}$  作为模板, 获得 DIV1 的 LAMP 扩增曲线以确定该方法的检测灵敏度, 使用 BioRad CFX96 软件(版本 6.0.14), 以扩增的  $C_t$  值(y)相对于 pMD18-DIV1 质粒浓度的对数值(x)生成标准曲线。每个浓度设置 3 个重复。

### 1.6 DIV1-LAMP 分析特异性检验

分别以 EHP、 $V_{\text{pAHPND}}$ 、CMNV、IHHNV、WSSV、TSV 和 YHV 等病原的阳性 DNA 或 cDNA 为模板, 检验本研究所建立的 LAMP 方法的特异性。反应以  $3.54 \times 10^5$  拷贝/反应 pMD18-DIV1 质粒为阳性对照, 以未感染 DIV1 的对虾组织 DNA 为阴性对照, 以无 RNA 酶的水为空白对照。

### 1.7 DIV1-LAMP 方法可重复性和可重现性检验

按照世界动物卫生组织(OIE)《水生动物疫病诊

断手册》中检测方法确认章节的要求, 对新建立的 DIV1-LAMP 检测方法进行可重复性和可重现性分析。LAMP 检测方法组内可重复性测试, 采用 10 倍浓度梯度稀释的质粒为模板, 对每个浓度的模板设置 3 次平行测试, 利用平行测试产生的  $C_t$  平均值和标准偏差(SD)来计算组内变异系数 CV。可重现性则以不同实验室环境条件下 LAMP 检测方法对质粒标准品扩增曲线的稳定性来评定, 并利用 SPSS 软件单因素方差分析(One-way ANOVA)对扩增  $C_t$  值进行差异显著性分析。

### 1.8 DIV1-LAMP 方法对实际样品的检验

利用本研究建立的 LAMP 方法对人工感染 DIV1 的凡纳滨对虾样品进行定性分析, 同时, 利用 TaqMan 荧光定量 PCR 对上述样品进行定性和定量分析, 并对比 DIV1-LAMP 检测方法和 TaqMan 荧光定量 PCR 的分析结果。

### 1.9 基于 FTA 卡和 LAMP 的 DIV1 现场快速检测方法

利用 1.2  $\mu\text{l}$  GeneFinder<sup>®</sup> 替换 DIV1-LAMP 反应体系中的 EvaGreen<sup>®</sup>, 并将其通过粘附剂预先封闭于 200  $\mu\text{l}$  PCR 小管管盖内, PCR 管内添加 30  $\mu\text{l}$  DIV1 LAMP 反应预混液(不含模板和荧光染料 EvaGreen<sup>®</sup>); 按照 Whatman FTA 卡说明书, 利用其提取 4 尾人工感染 DIV1 的凡纳滨对虾组织核酸及 2 尾健康对虾组织核酸, 将核酸分别加入上述含有 30  $\mu\text{l}$  DIV1 LAMP 反应预混液的 PCR 小管内, 同时, 设置阳性对照和阴性对照; 在 64.4 $^{\circ}\text{C}$  条件下, 保温 50 min, 然后, 通过在 90 $^{\circ}\text{C}$  条件下保温 3 min 使预置在管盖内的 GeneFinder<sup>®</sup> 染料脱落进入 LAMP 反应预混液, 完成扩增产物染色。PCR 小管内有扩增产物生成, 则显示为荧光绿色, 表明样品为 DIV1 阳性; PCR 小管内无扩增产物生成, 则显示为橙黄色, 表明样品为 DIV1 阴性。

## 2 结果

### 2.1 DIV1 的 LAMP 反应体系条件的优化

LAMP 优化结果显示, 扩增反应温度在 64.4 $^{\circ}\text{C}$  时,  $C_t$  值(15.44)和重复间  $C_t$  值标准偏差(SD 值)(0.09)最小(图 1a)。在 64.4 $^{\circ}\text{C}$  扩增温度下, 综合考虑扩增  $C_t$  均值及重复测试  $C_t$  值标准偏差最小、成本经济和方法稳定等因素, 确立优化后的扩增反应预混体系中 dNTPs 和  $\text{MgSO}_4$  的浓度分别为 1.2 和 4.0 mmol/L (图 1b), *Bst* 2.0 WarmStart<sup>®</sup> DNA 聚合酶的用量为 6.4 U (图 1c), EvaGreen<sup>®</sup> 的用量为 0.8  $\mu\text{mol/L}$  (图 1d)。

2.2 DIV1-LAMP 分析灵敏度检验与标准曲线的建立

使用优化后的 LAMP 反应体系对 10 倍梯度稀释的 pMD18-DIV1 质粒标准品进行检测, 结果显示, 质粒标准品在  $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^2$  拷贝/反应范围内均有较强的荧光信号(图 2a), 说明本研究建立的 DIV1

的 LAMP 检测方法对质粒模板的检测下限可低至  $3.54 \times 10^2$  拷贝/反应。在  $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^3$  拷贝/反应的起始模板浓度范围内, pMD18-DIV1 起始模板浓度对数值与扩增反应  $C_t$  值之间具有良好的线性关系(图 2b)。其关系曲线为  $C_t = -2.918 \text{ Lg}(Sg) + 39.331$ ,  $R^2 = 0.996$ 。

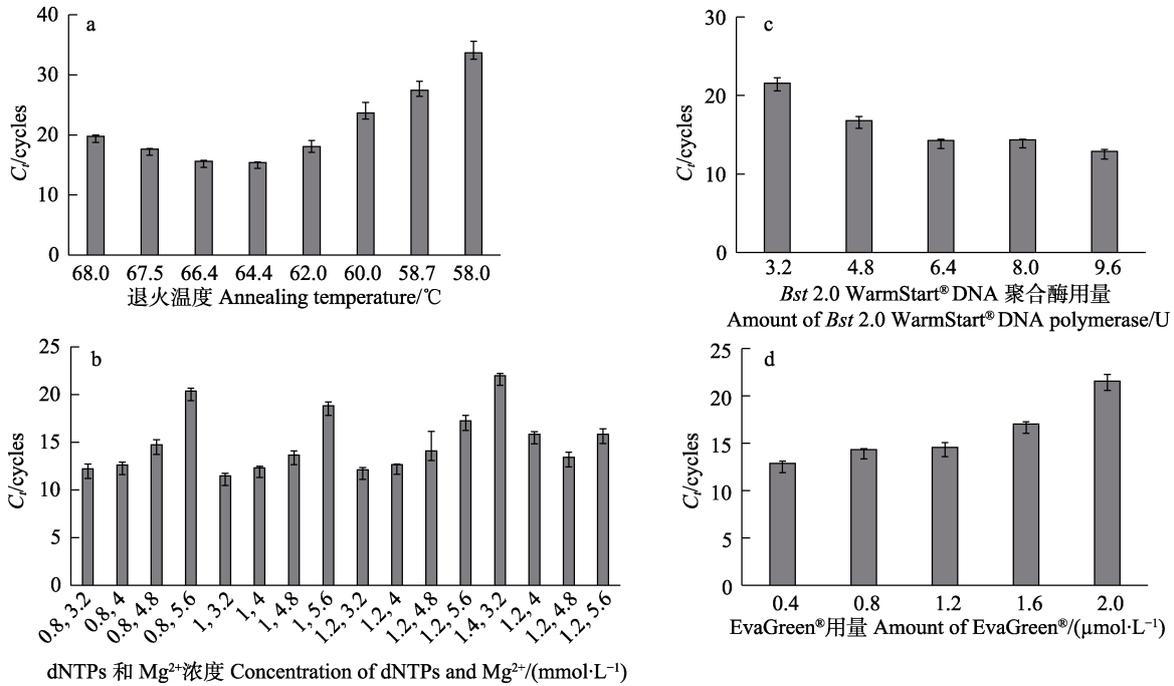


图 1 十足目虹彩病毒(DIV1) LAMP 反应体系的优化  
Fig.1 Optimization of DIV1-LAMP reaction

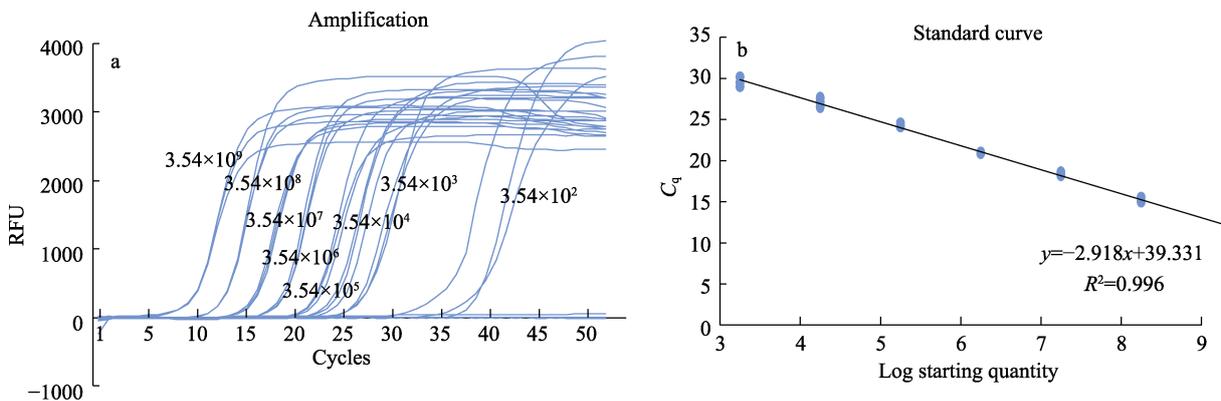


图 2 十足目虹彩病毒(DIV1) LAMP 方法以 pMD18-DIV1 质粒标准品为模板产生的扩增曲线(a)和标准曲线(b)  
Fig.2 Amplification curve (a) and standard curve (b) of DIV1-LAMP detection method by using pMD18-DIV1 plasmid standard as templates

- a: 以梯度稀释的 pMD18-DIV1 质粒标准品为模板的扩增曲线, pMD18-DIV1 质粒的拷贝数:  $3.54 \times 10^9$ ,  $3.54 \times 10^8$ ,  $3.54 \times 10^7$ ,  $3.54 \times 10^6$ ,  $3.54 \times 10^5$ ,  $3.54 \times 10^4$ ,  $3.54 \times 10^3$ ,  $3.54 \times 10^2$  拷贝(从左到右);
- b: 反应起始模板(pMD18-DIV1)质粒浓度对数值和  $C_t$  值之间的标准曲线方程
- a: LAMP amplification curve of serially diluted 10-fold pMD18-DIV1 plasmid. Copies of pMD18-DIV1 plasmids:  $3.54 \times 10^9$ ,  $3.54 \times 10^8$ ,  $3.54 \times 10^7$ ,  $3.54 \times 10^6$ ,  $3.54 \times 10^5$ ,  $3.54 \times 10^4$ ,  $3.54 \times 10^3$ ,  $3.54 \times 10^2$  (from left to right);
- b: Standard curve equation between log concentration of pMD18-DIV1 plasmid and  $C_t$  value.

### 2.3 DIV1-LAMP 分析特异性检验

以 DIV1、EHP、 $V_{p_{AHPND}}$ 、CMNV、IHHNV、WSSV、TSV 和 YHV 等主要虾类病原 DNA 或 cDNA 为模板进行 DIV1-LAMP 检测的特异性分析,结果显示,只有当检测样品含有 DIV1 阳性核酸时,扩增反应才产生“S”形扩增曲线,其他病原的核酸均无阳性

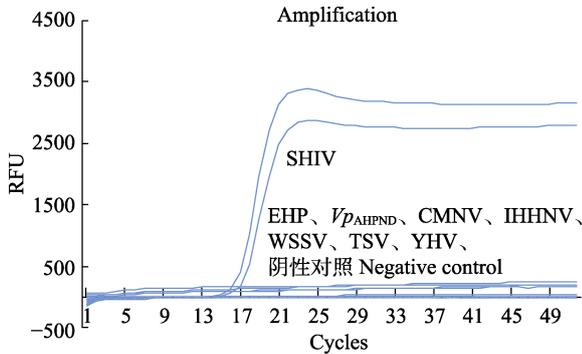


图3 十足目虹彩病毒(DIV1) LAMP 方法的分析特异性  
Fig.3 Analytical specificity of shrimp hemocyte iridescent virus (DIV1) LAMP assay

扩增曲线(图 3)。该结果说明,本研究建立的 DIV1-LAMP 方法与上述其他常见的对虾病原无交叉反应,可特异性检测 DIV1。

### 2.4 DIV1-LAMP 方法可重复性和可重现性分析

以  $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^3$  拷贝/反应的 pMD18-DIV1 质粒标准品为模板,对 DIV1-LAMP 检测方法的可重复性进行评估。结果显示,在起始模板浓度为  $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^3$  拷贝/反应的范围内, DIV1-LAMP 检测方法组内和组间检测的变异系数 CV 分别小于 1.89%和 1.63%(表 2),说明在此起始模板浓度范围内该方法稳定性较好。

以  $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^3$  拷贝/反应的质粒标准品为模板,在 3 个不同实验室环境下进行 DIV1 可重现性分析,结果显示,在上述模板浓度范围内 DIV1-LAMP 反应的组间  $C_t$  值的  $P$  值均大于 0.05(表 3),说明不同环境下,该方法扩增标准曲线与即时检测的标准品曲线差异不显著。说明本研究建立的 DIV1-LAMP 方法在不同实验室环境具有良好的可重现性。

表2 十足目虹彩病毒(DIV1) LAMP 检测组内和组间重复性  
Tab.2 Intra-assay and inter-assay variability of DIV1-LAMP assay

质粒标准品拷贝数 Copies of plasmid standard	组内 Intra-assay $C_t$			组间 Inter-assay $C_t$		
	平均值 Mean	标准偏差 SD	变异系数 CV/%	平均值 Mean	标准偏差 SD	变异系数 CV/%
$3.54 \times 10^9$	12.15	0.15	1.21	11.66	0.04	0.32
$3.54 \times 10^8$	15.23	0.23	1.51	14.62	0.04	0.28
$3.54 \times 10^7$	18.43	0.13	0.71	17.76	0.17	0.94
$3.54 \times 10^6$	20.92	0.02	0.12	20.53	0.13	0.63
$3.54 \times 10^5$	24.40	0.24	0.98	24.04	0.23	0.94
$3.54 \times 10^4$	27.05	0.42	1.55	26.14	0.43	1.63
$3.54 \times 10^3$	29.51	0.56	1.89	28.72	0.26	0.92

表3 DIV1-LAMP 分析法的组间变异性  
Tab.3 Analysis of variance of inter-assay variability of DIV1-LAMP assay

质粒标准品拷贝数 Copies of plasmid standard	组间 Inter-assay $C_t$	
	$F$	$P$
$3.54 \times 10^9$	1.254	0.325
$3.54 \times 10^8$	0.705	0.448
$3.54 \times 10^7$	4.074	0.114
$3.54 \times 10^6$	2.372	0.198
$3.54 \times 10^5$	1.537	0.283
$3.54 \times 10^4$	3.273	0.145
$3.54 \times 10^3$	0.833	0.413

### 2.5 DIV1-LAMP 方法对临床样品的检测

本研究对人工感染 DIV1 3 d 后的 40 尾凡纳滨对虾样品(编号 20191114001~20191114040)分别进行了

LAMP 检测和 TaqMan 荧光定量 PCR 检测,结果显示,2 种方法对病毒载量超过  $10^2$  copies/ $\mu$ l 的样品定性结果基本一致;而对病毒载量低于  $10^2$  copies/ $\mu$ l 的部分样品, LAMP 方法检测结果与 TaqMan 荧光定量 PCR 检测结果不一致(表 4),说明本方法不适用于分析 DIV1 载量低于  $10^2$  copies/ $\mu$ l 的样品。

### 2.6 基于 FTA 卡和 DIV1-LAMP 方法的对虾样品 DIV1 现场快速检测

取 4 尾人工感染 DIV1 的凡纳滨对虾及 2 尾健康凡纳滨对虾,利用 Whatman FTA 卡现场制备核酸,将核酸加入内置 GeneFinder<sup>®</sup>、含有 DIV1-LAMP 扩增反应预混体系的 PCR 小管内进行等温扩增反应,50 min 后进行显色,结果显示,阳性对照和 4 尾人工感染 DIV1 的凡纳滨对虾样品对应的 PCR 管内呈

表 4 利用 DIV1-LAMP 和 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对人工感染 DIV1 凡纳滨对虾的检测结果  
Tab.4 Detection results of DIV1-LAMP and TaqMan qPCR for *L. vannamei* samples artificially infected with DIV1

样本编号 No. of samples	TaqMan 荧光定量 PCR 检测结果 Result of Real-time PCR(copies/ $\mu$ l)	LAMP 检测结果 Result of LAMP assay	样本编号 No. of samples	TaqMan 荧光定量 PCR 检测结果 Result of Real-time PCR(copies/ $\mu$ l)	LAMP 检测结果 Result of LAMP assay
20191114001	$1.95 \times 10^8$	+	20191114021	$3.67 \times 10^7$	+
20191114002	$3.63 \times 10^8$	+	20191114022	$3.81 \times 10^6$	+
20191114003	$2.89 \times 10^8$	+	20191114023	$1.31 \times 10^4$	+
20191114004	$3.59 \times 10^8$	+	20191114024	$3.63 \times 10^4$	+
20191114005	$3.16 \times 10^8$	+	20191114025	$3.80 \times 10^6$	+
20191114006	$3.94 \times 10^5$	+	20191114026	$2.60 \times 10^3$	+
20191114007	$3.20 \times 10^8$	+	20191114028	$2.42 \times 10^2$	+
20191114008	$1.02 \times 10^9$	+	20191114029	$8.55 \times 10^1$	-
20191114009	$1.80 \times 10^8$	+	20191114030	$1.24 \times 10^3$	+
20191114010	$3.79 \times 10^7$	+	20191114031	$8.53 \times 10^2$	+
20191114011	$5.72 \times 10^8$	+	20191114032	$5.64 \times 10^2$	+
20191114012	$1.66 \times 10^8$	+	20191114033	$9.48 \times 10^1$	-
20191114013	$2.78 \times 10^8$	+	20191114034	$2.05 \times 10^4$	+
20191114014	$4.17 \times 10^8$	+	20191114035	$1.95 \times 10^4$	+
20191114015	$9.37 \times 10^7$	+	20191114036	$6.25 \times 10^4$	+
20191114016	$1.09 \times 10^7$	+	20191114037	$5.11 \times 10^1$	-
20191114017	$1.36 \times 10^8$	+	20191114038	$6.10 \times 10^1$	-
20191114018	$6.36 \times 10^7$	+	20191114039	$7.81 \times 10^1$	-
20191114019	$1.11 \times 10^7$	+	20191114040	$1.04 \times 10^2$	-
20191114020	$1.49 \times 10^6$	+			

注：“+”表示 DIV1-LAMP 检测结果呈阳性，“-”表示 DIV1-LAMP 检测结果呈阴性

Note: "+" indicates the positive result of DIV1-LAMP assay, and "-" indicates the negative result of DIV1-LAMP assay

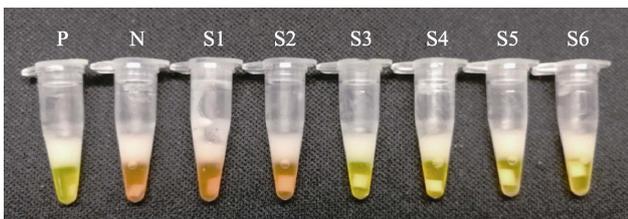


图 4 利用 FTA 卡和 DIV1-LAMP 方法现场检测凡纳滨对虾样品中 DIV1 的显色图

Fig.4 Results of on-site detection of DIV1 in *L. vannamei* by using FTA card and DIV1-LAMP assay

P: 阳性对照; N: 阴性对照; S1~S6: 凡纳滨对虾样品  
P: Positive control; N: Negative control;  
S1~S6: Samples of *L. vannamei*

荧光绿色, 为 DIV1 阳性, 而阴性对照及 2 尾健康凡纳滨对虾样品对应的 PCR 管内呈橙红色, 为 DIV1 阴性(图 4)。该结果说明, 利用 Whatman FTA 卡进行核酸现场制备, 结合核酸染料 GeneFinder<sup>®</sup> 预制于扩增反应体系小管内的方法, 可以实现对感染 DIV1 对虾的现场快速检测。

### 3 讨论

本研究基于 DIV1 主要衣壳蛋白基因设计 DIV1 的 LAMP 扩增引物, 在优化 LAMP 反应温度、各试剂组分浓度和用量的基础上建立了 DIV1-LAMP 实时荧光检测技术。本着成本经济和体系稳定的原则, 以求得扩增反应最小  $C_t$  值和 SD 值为目标, 确定优化后的 DIV1-LAMP 扩增温度和反应体系, 反应温度在  $64.4^\circ\text{C}$  时最佳; 优化后的反应体系中的  $\text{MgSO}_4$  和 dNTPs 浓度分别为  $4.0$  和  $1.2$  mmol/L, *Bst* 2.0 WarmStart<sup>®</sup> DNA 聚合酶和 EvaGreen<sup>®</sup> 的用量分别为  $6.4$  U 和  $0.8$   $\mu\text{mol/L}$ 。该技术通过 *Bst* 2.0 WarmStart<sup>®</sup> DNA 聚合酶进行等温扩增, 利用 EvaGreen<sup>®</sup> 染料指示反应过程, 能够实现对 DIV1 靶基因的实时荧光快速检测。

以 10 倍浓度梯度稀释的 pMD18-DIV1 质粒为模板扩增并构建的标准扩增曲线结果显示, 在  $3.54 \times 10^9 \sim 3.54 \times 10^3$  拷贝/反应的范围内, 起始模板浓

度对数值与扩增  $C_t$  值间呈良好的线性关系 ( $R^2=0.996$ ), 利用扩增  $C_t$  值可准确评估起始模板拷贝数, 这表明在该浓度范围内, 本研究所建立的 LAMP 方法适合作为 DIV1 定量检测的有效工具。前期多项有关 LAMP 实时荧光定量方法的研究显示, 由于 LAMP 反应本身的特性, 当起始模板浓度 $<1000$  拷贝时, 起始模板浓度对数值与扩增  $C_t$  值的相关系数明显降低(Mori *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017)。本研究中, DIV1-LAMP 在低拷贝起始模板条件下的定量分析结果与此前的相关报道一致, 这也说明 DIV1-LAMP 方法不适用于对低拷贝( $<1000$ )模板进行准确定量。Qiu 等(2018)基于 DIV1 基因组中 ATPase 基因(*ORF114R*)所设计的引物和探针, 建立了 DIV1 的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法, 该方法于实验室条件下可在 2.5 h 内完成检测, 检测限低至 4 拷贝/反应, 可用于 DIV1 感染早期的检测预警, 适用于对对虾苗种、出入境对虾样品等进行 DIV1 病原的筛查。与已报道的 DIV1 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法相比, 本研究建立的 DIV1-LAMP 检测方法在实验室条件下可在 50 min 完成反应, 检测时间大大缩短, 且成本低廉, 可用于发病对虾(一般携带较高拷贝病原)样品的快速检测和辅助诊断, 适用于水产技术推广部门、研究单位进行 DIV1 流行病学调查的大规模定性或定量检测。

作者实验室此前比较了基于 DIV1 ATPase 基因和衣壳蛋白基因开发的 2 种 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测方法, 发现上述 2 个目标基因对检测方法灵敏度和特异性的影响很小。本研究对人工感染 DIV1 的凡纳滨对虾样品分别进行基于 ATPase 基因的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法和基于衣壳蛋白基因的 LAMP 方法检测, 结果显示, 2 种方法对病毒载量低于  $10^2$  copies/ $\mu$ l 的部分样品的检测结果不一致, 推测其原因可能是由于本研究中所建立的 DIV1-LAMP 方法不适用于分析病毒载量低于  $10^2$  copies/ $\mu$ l 的样品所致。

目前, LAMP 技术在病原检测领域的应用已十分广泛, 该技术也被用于多种水生动物相关致病细菌、病毒和真菌的检测中。如 Arunrut 等(2016)报道一种以胶体金为探针的 LAMP-AuNP 方法, 可快速检测  $Vp_{AHPND}$  的 *PirA* 基因, 检出限为 100 CFU, 具有很高的实用价值。Zhang 等(2017)和李小平(2018、2019)分别利用 RT-LAMP 技术研发出对虾偷死野田村病毒和行动障碍野田村病毒(Movement disorder nodavirus, MDNV)的定量检测方法, 并通过将核酸染料添加到反应体系中的方法, 使 LAMP 检测结果可视化。Kumar 等(2018)利用 LAMP 方法与 Whatman FTA 卡

相结合的方法, 用于检测引起对虾生长缓慢的虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)的 SSU rRNA 基因, 可实现对 EHP 的现场快速检测。基于对虾养殖者、养殖企业、水产技术推广部门和研究单位等开展 DIV1 现场快速检测的需求, 本研究在建立 DIV1-LAMP 荧光定量方法的基础上, 通过结合 Whatman FTA 卡现场制备对虾组织核酸和显色染料预置的方法, 实现了对 DIV1 的现场快速检测。整个检测无需 PCR 仪等复杂或昂贵的仪器设备, 只需温度计和保温杯提供恒温水浴即可完成检测, 检测过程不超过 1 h, 单个检测反应成本相当于 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的 1/10 ~ 1/5。

综上所述, 本研究建立并优化了一种检测 DIV1 的 LAMP 实时荧光定量检测方法, 其特异性强, 速度快, 成本低, 适用于在实验室内对患病对虾进行 DIV1 的快速检测或辅助诊断。同时, 本研究还将 Whatman FTA 卡核酸现场制备方法与 DIV1-LAMP 方法相结合, 进一步开发了 DIV1 的现场快速高效检测技术, 适用于开展养殖对虾的 DIV1 现场快速检测。本研究为 DIV1 这一新发虾类病原提供了可靠的检测方法, 对实现低成本、大规模、快速 DIV1 检疫, 以及控制该病毒性疫病的传播和流行具有重要意义。

**致谢:** 中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室研究生协助 DIV1 感染对虾取样和核酸提取, 谨致谢忱。

## 参 考 文 献

- Arunrut N, Kampeera J, Sirithammajak S, *et al.* Sensitive visual detection of AHPND bacteria using loop-mediated isothermal amplification combined with DNA-functionalized gold nanoparticles as probes. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151769
- Chen MM. Application of real-time PCR in detection of pathogens  $VP_{AHPND}$  and SHIV of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [陈蒙蒙. 实时荧光定量 PCR 在凡纳滨对虾病原  $Vp_{AHPND}$  及 SHIV 检测中的应用. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Chen X. Susceptible host survey of Decapod iridescent virus 1(DIV1). Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019 [陈彤. 十足目虹彩病毒 1(DIV1)的易感宿主调查. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2019]
- Chinchar VG, Yu KH, Jancovich JK. The molecular biology of frog virus 3 and other iridoviruses infecting cold-blooded vertebrates. *Viruses*, 2011, 3(10): 1959-1985
- Jiang T, Liu J, Deng YQ, *et al.* Development of RT-LAMP and real-time RT-PCR assays for the rapid detection of the new duck Tembusu-like BYD virus. *Archives of Virology*, 2012,

- 157(12): 2273–2280
- Kumar TS, Krishnan AN, Rajan JJS, *et al.* Visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid diagnosis of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection. *Parasitology Research*, 2018, 117(5): 1485–1493
- Kurita J, Nakajima K. Megalocytiviruses. *Viruses*, 2012, 4(4): 521–538
- Li P, Yan Y, Wei S, *et al.* Isolation and characterization of a new class of DNA aptamers specific binding to Singapore grouper iridovirus (SGIV) with antiviral activities. *Virus Research*, 2014, 188: 146–154
- Li XP. Establishment and application of nucleic acid detection techniques for two emerging shrimp viruses. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [李小平. 两种对虾新发病毒核酸检测技术的建立及应用. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- Li XP, Wan XY, Zhang QL, *et al.* Molecular epidemiological survey of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustaceans in China in 2016–2017. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 65–73 [李小平, 万晓媛, 张庆利, 等. 2016–2017 年中国沿海省市虾类偷死野田村病毒 (CMNV) 分子流行病学调查. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 65–73]
- Meng Y. Isolation, identification, genome sequencing of a novel *Ranavirus* isolate in Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) and genetic diversity of Chinese giant salamander. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2013 [孟彦. 大鲵虹彩病毒病原的分离、鉴定、基因组测序及大鲵群体遗传多样性分析. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2013]
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, *et al.* Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2004, 59(2): 145–157
- Notomi T, Mori Y, Tomita N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1): 1–5
- Priyanka N, Siddhant J, Prasad S. An integrated one-step assay combining thermal lysis and loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) in 30 min from *E. coli* and *M. smegmatis* cells on a paper substrate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 291(15): 74–80
- Qiu L, Chen MM, Wan XY, *et al.* Characterization of a new member of Iridoviridae, shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11834
- Qiu L, Chen MM, Wan XY, *et al.* Detection and quantification of shrimp hemocyte iridescent virus by TaqMan probe based real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 154: 95–101
- Qiu L, Chen X, Zhao R, *et al.* Description of a natural infection with Decapod iridescent virus 1 in farmed giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Viruses*, 2019, 11(4): 354
- Qiu L. Viral metagenomics analysis of farmed shrimp and molecular epidemiological study of shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV). Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2018 [邱亮. 养殖对虾的病毒宏基因组分析及虾血细胞虹彩病毒 (Shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV) 的分子流行病学研究. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2018]
- Shirato K. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Microbiology and Immunology*, 2019, 63(10): 407–412
- Silva SJRD, Pardee K, Pena L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of Zika virus: A review. *Viruses*, 2020, 12(1): 193–203
- Suzuki Y, Narimatsu S, Furukawa T, *et al.* Comparison of real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification and real-time reverse transcription polymerase chain reaction for detection of noroviruses in municipal wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 112(4): 369–372
- Teng Y, Hou Z, Gong J, *et al.* Whole-genome transcriptional profiles of a novel marine fish iridovirus, Singapore grouper iridovirus (SGIV) in virus-infected grouper spleen cell cultures and in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Virology*, 2008, 377(1): 39–48
- Wei H, Zeng J, Deng C, *et al.* A novel method of real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification developed for rapid and quantitative detection of human astrovirus. *Journal of Virological Methods*, 2013, 188(1–2): 126–131
- Wong YP, Othman S, Lau YL, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(3): 626–643
- Xu L, Wang T, Li F, *et al.* Isolation and preliminary characterization of a new pathogenic iridovirus from redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 120(1): 17–26
- Zhang QL, Liu S, Yang HL, *et al.* Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative assay of covert mortality nodavirus in shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 150: 130–135

## Establishment and Application of the LAMP Detection Method for Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1)

ZOU Ying<sup>1,2</sup>, GUO Xiaomeng<sup>1</sup>, WAN Xiaoyuan<sup>1</sup>, QIU Liang<sup>1</sup>, ZHANG Qingli<sup>1,2</sup>①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071;  
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection method of Decapod iridescent virus 1 (DIV1) was established and optimized based on primers designed from the DIV1 capsid protein gene in present study. Analytic sensitivity of the newly established method was assessed using the pMD18-DIV1 plasmid standard as a template, and the detection specificity was also determined. The results showed that the optimal reaction temperature for the DIV1-LAMP method was 64.4°C, and the optimized 25 µl reaction system contained 2.5 µl 10×isothermal amplification buffer, 4.0 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 1.2 mmol/L dNTPs; 6.4 U *Bst* 2.0 WarmStart<sup>®</sup> DNA polymerase and 0.8 µmol/L EvaGreen<sup>®</sup>. The detection limit of the new method was 3.54×10<sup>2</sup> copies/reaction; it did not cause a cross-reaction with major shrimp pathogens such as *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), *Vibrio* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (*Vp*<sub>AHPND</sub>), covert mortality nodavirus (CMNV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), white spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV), or yellow head virus (YHV). The newly developed method showed good repeatability and stability. The on-site, rapid, highly sensitive detection method of DIV1 was established by replacing EvaGreen<sup>®</sup> with GeneFinder<sup>®</sup> which was preset in the cap of the reaction tube. The DIV1-LAMP real-time fluorescence and on-site LAMP detection method established in this study is sensitive, specific, and rapid. This novel method will provide new technical options for the qualitative, quantitative, and rapid on-site detection of the emerging DIV1, which will benefit the shrimp farming industry by facilitating the monitoring, early warning, and prevention of DIV1.

**Key words** Decapod iridescent virus 1 (DIV1); Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV); Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); Detection method

① Corresponding author: ZHANG Qingli, E-mail: zhangql@ysfri.ac.cn