

真鲷虹彩病毒实时定量 PCR 检测方法的建立与应用

赵玉然¹ 谭乐义¹ 刘 荭² 赵 巍¹ 梁成珠¹ 史秀杰²
徐 彪¹ 朱来华¹ 何俊强² 岳志芹^{1*}

(¹ 山东出入境检验检疫局技术中心, 青岛 266002)

(² 深圳出入境检验检疫局 水生动物疫病国家重点实验室, 518010)

摘要 以真鲷虹彩病毒(Red-sea bream iridovirus, RSIV)主要衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP)的基因保守片段为靶序列,利用 Primer Express 3.0 软件设计定量 PCR 引物,建立了 RSIV 的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法。将 RSIV MCP 基因连接 pMD18-T 载体,构建重组质粒,经过梯度稀释后作为标准品,根据标准品拷贝数(X)与 C_t 值的关系绘制了标准曲线,为 $C_t = -3.184 \lg X + 40.270$,相关系数 $R^2 = 0.9969$ 。溶解曲线分析表明,定量 PCR 产物的 T_m 值为 82.5°C 。该方法的检测限为 2.20×10^2 拷贝/反应,对流行性造血器官坏死病毒、淋巴囊肿病毒、蛙病毒 3、甲鱼虹彩病毒都没有扩增反应,具有特异性。利用该方法对 84 批海水鱼类(石鲈、大菱鲆、鲈鱼)进行检测,其中 5 批鱼样品感染 RSIV,并利用标准曲线对病毒含量进行了定量分析。

关键词 真鲷虹彩病毒 实时定量 PCR 衣壳蛋白基因 SYBR Green I

中图分类号 S942.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)02-0111-06

Development and application of a real-time PCR assay for the detection of red-sea bream iridovirus

ZHAO Yu-ran¹ TAN Le-yi¹ LIU Hong² ZHAO Wei¹ LIANG Cheng-zhu¹
SHI Xiu-jie² XU Biao¹ ZHU Lai-hua¹ HE Jun-qiang² YUE Zhi-qin^{1*}

(¹ Shandong Technical Center of Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002)

(² Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, 518010)

ABSTRACT A sensitive and specific SYBR Green I real-time PCR assay for the detection of red-sea bream iridovirus (RSIV) was established. The real-time PCR primers were designed according to the conserved region of major capsid protein (MCP) gene by using Primer Express 3.0 software. The RSIV MCP gene was inserted into pMD18-T vector to construct the recombinant plasmid. The resulted plasmid was serially diluted and used as the standards. The relationship between plasmid copy number(X) and C_t value was described as a standard curve: $C_t =$

国家质量监督检验检疫总局科研项目(2007IK267)和质检总局公益性项目(10-71)共同资助

* 通讯作者。E-mail: yuezhiqin@126.com, Tel: (0532)80885652

收稿日期: 2010-05-06; 接受日期: 2010-06-29

作者简介: 赵玉然(1983-), 女, 硕士, 主要从事水生动物疫病检验检疫。E-mail: ran-007@163.com, Tel: (0532)80885652

$-3.184 \lg X + 40.270$ (with an R^2 value of 0.9969). The detection limit of the assay was 2.20×10^2 virus copies per reaction. The assay showed specificity and could not be amplified with RSIV and epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV), lymphocystis disease virus (LCDV), frog virus 3 (FV3), or soft-shelled turtle iridovirus (STIV). The T_m of the specific product was obtained as 82.5°C through the melting curve analysis. This assay was applied in detecting whether the sea fish samples (stone flounder, turbot, and weever) of 84 batches were infected by RSIV. It was found that the samples of 5 batches presented positive signals, and the virus was quantified by using the obtained standard curve. The results indicate that the real-time PCR assay is specific, sensitive, fast, and accurate and it has great potential in detecting RSIV and studying the pathogenic mechanism of RSIV.

KEY WORDS Red-sea bream iridovirus Real-time quantitative PCR
Major capsid protein gene SYBR Green I

真鲷虹彩病毒属于虹彩病毒科 Iridoviridae, 细胞肿大病毒属 *Megalocytivirus* (Hossain *et al.*, 2003), 主要感染真鲷、花鲈、条石鲷等海水鱼类, 患病鱼类主要表现为昏睡、严重贫血、鳃上游瘀斑、脾肿大等症状, 该病在自然界暴发时大多数很突然, 难以治疗, 致死率高, 是目前对各国海水养殖危害最为严重的疾病之一 (孟庆显等 1996; Office International Des Epizooties 2009), 同时严重影响经济鱼类的进出口贸易。鉴于 RSIV 的危害性, 该病被国际兽疫局 (OIE) 列入必检疫病名录, 我国农业部在新公布的“一、二、三类动物疫病病种名录” (中华人民共和国农业部公告 第 1125 号) 中将其列为二类疫病, 韩国实施的新“水生动物疫病管理法”中要求在入境的真鲷、牙鲆、大黄鱼、花鲈、条纹鲈等 35 种鱼类中必须进行 RSIV 的检验检疫。

水生动物病原的检测方法主要有组织病理学检测、细胞培养技术、免疫学检测和分子生物学检测技术 (萧枫等 2004; 史成银等 2003; 姜明等 2000; 王广军 2004; 张家松 2010; Li 2010), 但由于 RSIV 没有合适的细胞培养系、免疫学检测范围窄且存在交叉反应的现象 (Office International Des Epizooties 2009), 因此, 我国 RSIV 的出入境检测、监测方法一直依赖于常规 PCR 扩增, 扩增区域为 DNA 聚合酶基因片段。常规 PCR 方法操作冗繁, 检测结果需要测序确证, 耗时长, 不能满足病毒检测周期短、业务量大的要求; 灵敏度有限, 对病毒感染初期的水生动物病害的监测还存在一定缺陷 (Caipang *et al.*, 2003)。

实时定量 PCR 方法, 具有灵敏、快速、准确、可以定量的优点, 利用荧光染料插入已合成的双链 DNA 中即可产生荧光信号的原理, 可以实现检测信号的增大与 PCR 扩增量的增长同步, 检测结果不需电泳, 被广泛应用于各种水生动物病害的检测、监测, 如对虾白斑综合征 (WSSV) (毕道荣等 2009)、淋巴囊肿病毒 (LCDV) (孙颖杰等 2009)、大菱鲆红体虹彩病毒 (TRBIV) (吴成龙等 2008) 等, 我国还没有 RSIV 实时定量 PCR 检测方法的报道。本实验以 RSIV MCP 基因保守片段为靶序列, 设计特异性引物, 建立了 RSIV 的 SYBR Green I 的实时定量 PCR 检测方法, 以期能为 RSIV 提供一种新的快速定量检测方法, 并应用该方法开展了山东海水养殖区域 RSIV 的疫病调查。

1 材料

1.1 实验样品

感染 RSIV 的病料 (鲈鱼)、用于特异性分析的流行性造血器官坏死病毒 (Epizootic haematopoietic necrosis virus, EHNV) 和淋巴囊肿病毒 (Lymphocystis disease virus, LCDV) 核酸由本实验保存; RSIV MCP 基因由本实验室构建; 蛙病毒 3 (Frog virus 3, FV3)、甲鱼虹彩病毒 (Soft-shelled turtle iridovirus, STIV) 的核酸由深圳出入境检验检疫局提供; 鱼类样品于 2008 年 11 月~2009 年 12 月采自山东威海、莱州、荣成、日照、青岛、烟台 7 个沿海地区海水养殖区域, 包括石鲷、大菱鲆、鲈鱼等共 84 批, 每批 30 尾, 体重 500 g 左右。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂

Fast start Universal SYBR Green Master(ROX)(ROCHE),DNA 提取试剂盒(TaKaRa universal genomic DNA extraction kit)。

1.2.2 仪器

实时定量 PCR 仪(ABI 7900HT),核酸分析仪(Eppendorf AG22331 Hamburg)。

2 方法

2.1 引物设计

利用 DNA STAR 软件,将本实验室分离的 RSIV MCP 基因与 RSIV Ehime-1(Genbank No. BD143114) MCP 基因进行比对,选取保守区域,利用 Primer Express 3.0 软件设计实时定量 PCR 引物。引物由大连宝生物公司合成。引物序列为:

605 RSIV-F:5'-GGGCGGCGGAACCA-3';

605 RSIV-R:5'-TGCAATAACGACCAGTTCAAACCTT-3'。

两个引物分别对应 MCP 基因 1 242~1 255bp、1 282~1 305bp 处。

2.2 病毒 DNA 的提取

分别取患病鱼样品脑、脾、肾,混匀,低温快速研磨后取 200 mg,采用 DNA 提取试剂盒(TaKaRa total genomics extract kit)提取 DNA,通过核酸分析仪检测样品 DNA 浓度,调整至 100 ng/ μ l。

2.3 实时定量 PCR 反应

定量 PCR 反应在 ABI 7900HT 定量 PCR 仪中进行,反应体系包括:待测 DNA 样品 1 μ l, Fast start Universal SYBR Green Master(ROX)12.5 μ l, 605 RSIV-F/R 各 0.2 μ mol/L, 补充水至 25 μ l。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 10 min;之后 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min 进行 40 个循环。最后进行熔解曲线分析,其程序为 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 升降温速率为每 25 s 温度变化 1 $^{\circ}$ C。利用 SDS(Sequence Detection System)2.1 软件进行结果数据分析,包括查看扩增曲线、 C_t 值、熔解曲线和 T_m 值。 C_t 值(Threshold cycle)是指定量 PCR 扩增过程中,荧光信号开始由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环次数。

2.4 阳性标准质粒的制备

通过将本实验室构建的 RSIV MCP 基因连接 pMD18-T 载体,构建重组质粒 pMD18-RSIV MCP。重组质粒经转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆,提取质粒 DNA,通过核酸分析仪测定质粒的 OD₂₆₀,根据阿伏伽德罗常数换算出每 μ l 质粒的拷贝数,为 2.20×10^7 拷贝/反应。

2.5 灵敏度实验及标准曲线的绘制

利用无菌水将质粒 pMD18-RSIV MCP 进行 10 倍系列稀释,稀释浓度分别为 2.20×10^7 、 2.20×10^6 、 2.20×10^5 、 2.20×10^4 、 2.20×10^3 、 2.20×10^2 、 2.20×10^1 拷贝/ μ l,每个稀释度做两个平行,进行定量 PCR 反应,测定该方法的检测灵敏度。根据质粒拷贝数与 C_t 值的相关性,由 SDS 2.1 软件得到标准曲线。

2.6 特异性实验

分别以健康鲈鱼 DNA 和 EHNV、LCDV、FV3 及 STIV 核酸作为模版,进行实时定量 PCR 扩增,分析该方法的特异性。

2.7 鱼类样品检测

2008 年 11 月~2009 年 12 月,在山东 7 个沿海地区海水养殖区域采集石鲮、大菱鲆、鲈鱼等样品共 84 批次,每批 30 尾,进行 RSIV 的实时定量 PCR 检测,每批样品重复 3 个平行样,以真鲷虹彩病毒核酸、健康鱼核酸、水分别作为阳性对照、阴性对照和空白对照。

3 结果

表 1 RSIV 质粒拷贝数与对应 Ct 值

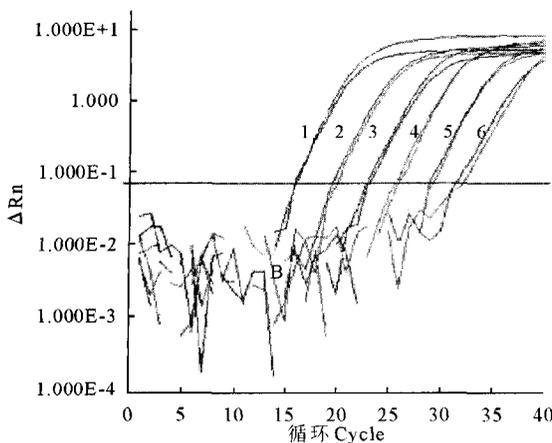
Table 1 The Ct value with different number of RSIV plasmid copies

扩增曲线编号 Amplification curve No.	质粒拷贝数 Copy number of recombinant plasmid	Ct 平均值 Average of Ct	扩增曲线编号 Amplification curve No.	质粒拷贝数 Copy number of recombinant plasmid	Ct 平均值 Average of Ct
1	2.20×10^7	16.00 ± 0.01	4	2.20×10^4	26.01 ± 0.02
2	2.20×10^6	19.75 ± 0.25	5	2.20×10^3	29.02 ± 0.02
3	2.20×10^5	23.01 ± 0.01	6	2.20×10^2	32.01 ± 0.20

3.1 定量 PCR 反应检测 RSIV 的灵敏度实验

通过查看扩增曲线(图 1),可以得出,各样品扩增曲线均呈“S”型,不同稀释梯度样品间扩增平行性好,平行样品间扩增效率相近、重复性好;通过查看各样品浓度与 Ct 值对应关系(表 1),可以得出,质粒浓度在 $2.20 \times 10^7 \sim 2.20 \times 10^2$ 拷贝/反应,共 6 个数量级的范围内,Ct 值与浓度具有很好的对应关系,不同稀释度之间的 Ct 相差均匀,故符合定量 PCR 的 Ct 值与起始拷贝数之间严格的线性关系。标准质粒为 2.20×10^1 拷贝时,该浓度的两个重复都没有扩增信号;标准品拷贝数最低为 2.20×10^2 时有荧光信号,对应的 Ct 值为 33,因此确定该方法的检测限为 2.20×10^2 个拷贝。

根据质粒拷贝数与 Ct 值的相关性绘制标准曲线,见图 2。横坐标代表质粒拷贝数(X),纵坐标为 Ct 值。拷贝数(X)与 Ct 值的关系为: $Ct = -3.184 \lg X + 40.270$,相关系数 $R^2 = 0.9969$ 。



1~6:质粒拷贝数分别为 2.20×10^7 、 2.20×10^6 、 2.20×10^5 、 2.20×10^4 、 2.20×10^3 、 2.20×10^2 ;B:空白对照

1~6. Number of plasmid copies: 2.20×10^7 , 2.20×10^6 , 2.20×10^5 , 2.20×10^4 , 2.20×10^3 , 2.20×10^2 respectively; B. Blank control

图 1 梯度稀释的 RSIV 重组质粒的定量 PCR 反应扩增曲线

Fig. 1 Amplification plot of real-time PCR with

serially diluted RSIV recombinant plasmid concentration

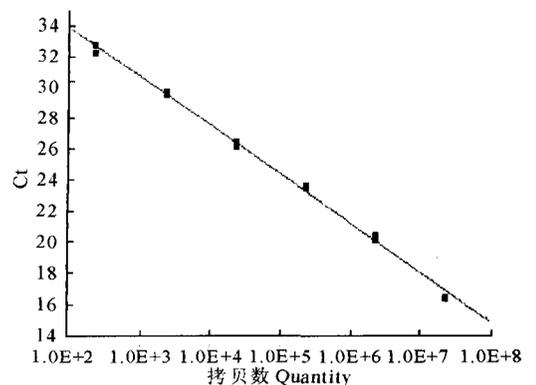


图 2 实时定量 PCR 检测 RSIV 重组质粒的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of real-time PCR assay for RSIV with different copy numbers of recombinant plasmid

3.2 实时荧光定量 PCR 方法检测 RSIV 的特异性实验

实时定量 PCR 检测 RSIV 的特异性实验的熔解曲线结果见图 3。可以看出,真鲷虹彩病毒的熔解曲线荧光信号值高,对应的 T_m 值为 $82.5\text{ }^\circ\text{C}$,而 EHN、LCDV、FV3、STIV 4 种病毒和健康鲈鱼荧光信号值低,且 T_m 均大于 $85\text{ }^\circ\text{C}$,表明所设计的 RSIV 的定量 PCR 引物的特异性较好,与其他病毒没有交叉反应。

3.3 鱼类样品检测结果

根据图 1、图 3 的结果,确立了实时定量 PCR 检测样品是否感染真鲷虹彩病毒的判定标准为:在阳性对照、阴性对照、空白对照都成立的前提下,检测样品若有“S”型扩增曲线、 C_t 值 ≤ 33 且 T_m 值介于 $82.5 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ 之间,则判定为阳性,否则判定为阴性。利用实时定量 PCR 方法检测 84 批鱼类样品,其中有 5 批鱼样有 RSIV 检出,其信息见表 2。其余的 79 批待检样品没有“S”型扩增曲线,且荧光信号值低,判定为不含 RSIV。

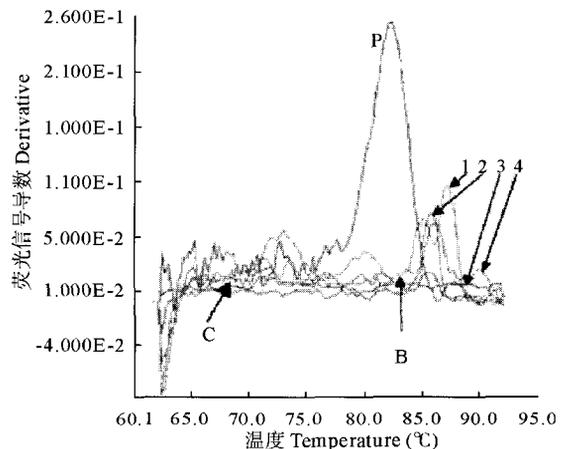
表 2 经 RSIV 实时定量 PCR 方法检出的阳性样品
Table 2 The positive samples detected by the real-time PCR for RSIV

取样时间(年-月) Sampling time	地点 Site	种类 Species	C_t 平均值 Average of C_t	平均病毒量(拷贝/反应) Average volume of virus (copies per reaction)
2008-11	黄岛某 养殖渔场	石鲷 (<i>Kareius bicoloratus</i> L.)	30.21	1 445
2008-11	黄岛	石鲷 (<i>Kareius bicoloratus</i> L.)	27.98	7 244
2008-11	黄岛	大菱鲆 (<i>Scophthalmus maximus</i>)	28.30	5 754
2008-12	荣成	鲈鱼 (<i>Lateolabrax japonicus</i>)	28.01	7 087
2009-05	威海	石鲷 (<i>Kareius bicoloratus</i> L.)	32.00	398

4 讨论

由于真鲷虹彩病毒致死率高,分布范围广,因此,真鲷虹彩病毒作为进出口二类疫病,一直受到严格的检测和监控。我国出入境检验检疫行业标准中规定的 RSIV 检测方法一直采用以 DNA 聚合酶基因片段为靶序列的常规 PCR 方法,2008 年 11 月~2009 年 12 月,本实验室人员按此方法,从山东周边海域中多次检出 RSIV,并对扩增片段进行了测序,但由于 Genbank 中缺少同源病毒株 DNA 聚合酶基因的序列资源,因此获得的病毒株无法进行详尽的系统分类。

虹彩病毒的 MCP 基因具有特异、保守的特性,成为虹彩病毒系统分类的主要依据(Tidona *et al.* 1998; 张奇亚等 2001; He *et al.* 2001)。目前,NCBI 中登陆的绝大部分虹彩病毒科病毒的核苷酸序列多为 MCP 基因。本实验建立了以 RSIV MCP 基因为基础的检



P: 真鲷虹彩病毒质粒; 1: 流行性造血器官坏死病毒; 2: 淋巴囊肿病毒、
3: 蛙病毒 3、4: 甲鱼虹彩病毒; B: 阴性对照; C: 空白对照
P: RSIV plasmid; 1: EHN; 2: LCDV; 3: FV 3;
4: STIV; B: Negative control; C: Blank control

图 3 实时定量 PCR 检测 RSIV 的特异性试验的熔解曲线
Fig. 3 Dissociation curve of specificity test of real-time PCR assay for RSIV

测方法,为实验室检测资源与国际化资源相接轨奠定了基础。目前,我国已经建立了以 MCP 基因片段为靶序列的多种虹彩病毒的实时定量 PCR 方法,如淋巴囊肿病毒(LCDV)(孙颖杰等 2009)、大菱鲆红体虹彩病毒(TRBIV)(吴成龙等 2008),但未有 RSIV 此类检测方法的建立。

RSIV 的定量 PCR 检测方法在模板浓度为 $2.20 \times 10^7 \sim 2.20 \times 10^8$ 拷贝/反应,共 6 个数量级的范围内都有扩增,表明该检测方法具有较高的灵敏度。由于定量 PCR 的高灵敏度,Caipang 等(2003)认为该方法适合于病毒感染初期、未出现临床病症样品的检测。该方法能够特异性扩增衣壳蛋白基因保守片段,并与虹彩病毒科的其他属的病毒如 EHNV、LCDV、FV3、STIV 没有交叉反应,表明检测方法的特异性好。由于定量 PCR 扩增产物的 GC 含量、长度和序列等因素决定了熔解曲线的 T_m 值,特异的定量 PCR 产物具有固定的 T_m 值,因此,本研究还结合熔解曲线及 T_m 值的分析,达到对检测结果进行准确判定,从而避免了由于非特异性扩增及引物二聚体等产生荧光信号而导致的“假阳性”。

SYBR Green I 实时定量 PCR 检测 RSIV 的方法,不需要设计合成昂贵的探针,对于高度变异靶序列都能有检出。此外,定量 PCR 检测具有快速高效的优点,利用荧光染料插入双链 DNA 后即可产生荧光的特性,实现了 DNA PCR 扩增产物与荧光信号的同步,从而使用反应结果可通过荧光信号直接读取,无需电泳检测,简化了检测步骤,该检测方法在 2h 内完成,最多可一次性检测 96 个样品,大大缩短了样品检测的时间,适合大量样品的快速检测,该方法对于定量 PCR 仪器没有型号要求,因而适合推广应用(周 优等 2007;王雪鹏等 2004)。

利用该方法对山东 7 个沿海地区的海水养殖区域的鲈鱼、石鲈、大菱鲆共 84 批鱼样进行抽样检测,发现在未出现明显临床症状的情况下,5 批鱼有 RSIV 检出。RSIV 的定量 PCR 检测方法适用于 RSIV 的监测,可以对 RSIV 进行早期诊断,以便及时切断其传播途径,保护水产养殖业的健康发展。该方法可应用于鲈鱼、石鲈、大菱鲆等鱼类的出入境快速检验检疫,在水生动物贸易中具有重要的应用价值。另外,该方法在研究鱼体携带病毒量与疫病暴发的关系、RSIV 致病机理等理论研究方面有广泛的应用空间。

参 考 文 献

- 王广军. 2004. 虹彩病毒生物学研究现状及展望. 湛江海洋大学学报, 24(3): 74~78
- 王雪鹏, 同茂仓, 岳永生. 2004. 分子生物学技术在水产动物疾病诊断中的研究进展. 水利渔业, 24(3): 4~6
- 史成银, 王印庚, 黄 健, 王清印. 2003. 大菱鲆病毒性疾病研究进展. 高技术通讯, (9): 99~104
- 孙颖杰, 周 优, 岳志芹, 陈 晓, 梁成珠, 应 俊, 王 哲, 汪东风. 2009. 淋巴囊肿病毒实时定量 PCR 检测方法的建立和应用. 中国海洋大学学报, 39(2): 253~258
- 毕道荣, 岳志芹, 梁成珠, 凌宗帅, 赵 巍, 张 建, 邓明俊, 刘 荪, 徐 彪, 郑小龙, 何俊强. 2009. 实时定量 PCR 快速检测对虾白斑综合征病毒. 山东农业大学学报, 40(1): 54~58
- 吴成龙, 史成银, 黄 健, 孔晓瑜. 2008. Real-time PCR 技术用于大菱鲆红体病虹彩病毒的组织敏感性检测及病毒流行性情况调查. 农业生物技术学报, 16(5): 752~758
- 张家松, 王印庚, 陈义平, 张 健, 雷霖霖, 李卓佳. 2010. 环介导等温扩增法(LAMP)在水生动物病害检测中的应用. 中国动物检疫, 27(2): 71~73
- 张奇亚, 肖 枫, 李正秋, 桂建芳. 2001. 从我国分离的 3 株蛙虹彩病毒与蛙病毒 3 型主要衣壳蛋白基因同源性的比较. 病毒学报, 17(4): 272~274
- 孟庆显, 俞开康. 1996. 海水养殖动物病害学. 北京: 中国农业出版社, 54~55
- 周 优, 岳志芹, 孙 敏, 梁成珠, 刘 荪, 邓明俊, 汪东风. 2007. 实时定量 PCR 技术及其在水产动物研究中的应用. 中国水产科学, 14(7): 116~122
- 姜 明, 范瑞青, 汝少国, 李永祺, 刘 云. 2000. 一种真鲷球形病毒的形态及细胞病理学电子显微镜观察. 水产学报, 24(1): 52~55
- 肖 枫, 张奇亚. 2004. 水生动物虹彩病毒的分子生物学. 水生生物学报, 28(2): 202~206
- Caipang, C. M. A., Hirano, I., and Aoki, T. 2003. Development of a real-time PCR assay for the detection and quantification of red seabream iridovirus(RSIV). Fish Pathology, 38(1): 1~7
- He, J. G., Deng, M., Weng, S. P., Li, Z., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z., and Chan, S. M. 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infection spleen and kidney necrosis iridovirus. Virology, 291: 126~139
- Hossain, M., Song, J. Y., Kitamura, S. I., Jung, S. J., and Oh, M. J. 2003. Phylogenetic analysis of lymphocystis disease virus from tropical ornamental fish species based on a major capsid protein gene. J. Fish Diseases, 31, 473~479
- Office International Des Epizooties. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 6 Edition, 2009. Paris: OIE, 251~261
- Li, Q., Yue, Z. Q., Liu, H., Liang, C. Z., Zheng, X. L., Zhao, Y. R., Chen, X., Xiao, X. Z., and Chen, C. F. 2010. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of lymphocystis disease virus. J. Virological Methods, 163: 378~384
- Tidona, C. A., Schnitzler, P., Kehm, R., and Darai, G. 1998. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? Virus Gene, 16: 59~66