

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200331001

http://www.yykxjz.cn/

桑松文, 李小平, 张庆利. 虾类行动障碍野田村病毒(MDNV) TaqMan RT-PCR 检测方法的建立与应用. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 77-85

SANG S W, LI X P, ZHANG Q L. Establishment and application of TaqMan RT-PCR detection method for shrimp movement disorder nodavirus (MDNV). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 77-85

虾类行动障碍野田村病毒(MDNV)TaqMan RT-PCR 检测方法的建立与应用*

桑松文^{1,2} 李小平^{1,2} 张庆利^{1,2①}

(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 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 基于虾类行动障碍野田村病毒(movement disorder nodavirus, MDNV)的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(*RdRp*)基因设计寡核苷酸引物和探针, 以含有 MDNV 靶基因的 pMD18-MDNV 质粒和 RNA 标准品为模板, 通过优化反应体系和反应程序, 建立了 MDNV 的 TaqMan RT-PCR 检测方法。优化后的反应组分: 20.0 μ L TaqMan RT-PCR 反应液预混液中包含 11.0 μ L 一步法 RT-PCR 缓冲液、0.8 μ L 酶混合物、0.3 μ mol/L 正向引物、0.3 μ mol/L 反向引物、0.4 μ mol/L 探针、1.0 μ L 模板和 5.2 μ L RNA-free H₂O; 优化后的反应程序: 54.5 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 1 min; 45 个热循环扩增(95 $^{\circ}$ C 10 s, 60.3 $^{\circ}$ C 30 s)。本研究所建立的方法能实现对 MDNV 的特异性检测, 在 1.4×10^{10} ~ 1.4×10^1 copies/ μ L 标准质粒浓度范围内, 起始模板浓度对数值与反应循环数间呈良好的线性关系; 该方法最低可检测 5.5×10^1 拷贝的 RNA 标准品或 1.4×10^1 拷贝的 pMD18-MDNV 标准质粒。分析结果还显示, 该检测方法批内 C_t 值和批间 C_t 值的变异系数(CV)分别小于 1.27%和 1.83%, 具有良好的重复性和稳定性。利用该方法对 2019 年采自我国部分省市的样品进行检测发现, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中 MDNV 的阳性检出率为 23.5% (16/68)。本研究建立的 MDNV TaqMan RT-PCR 方法具有特异性、快速和灵敏等特点, 可为对虾养殖实践中 MDNV 的定性、定量检测与监测以及有效防控提供技术支持。

关键词 养殖对虾; 行动障碍野田村病毒(MDNV); TaqMan RT-PCR; 定量; 检测方法

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)05-0077-09

近 10 年来, 我国和东南亚养殖对虾中普遍出现了多种新发病原的流行和危害, 如致急性肝胰腺坏死病弧菌(*Vibrio* causing APHND, V_{APHND})、偷死野田村病毒(covert mortality nodavirus, CMNV)和虾肝肠胞

虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)等(Tourtip *et al.*, 2009; FAO, 2013; Aranguren *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014, 2017)。其中, V_{APHND} 主要危害养殖早期的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 并导致被感染对虾

* 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基本科研业务费项目(20603022019003)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 (20603022019003)]. 桑松文, E-mail: 1137059610@qq.com

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

收稿日期: 2020-03-31, 收修改稿日期: 2020-05-22

出现 90%以上的死亡率。CMNV 感染能导致幼虾生长缓慢以及较高的累积死亡率, EHP 感染主要引起生长迟滞(Flegel, 2012; FAO, 2013; Zhang *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2020)。这些新发病原的广泛流行, 使我国和东南亚等地对虾养殖业遭受了严重损失(Flegel, 2012; FAO, 2013; Liu *et al.*, 2018)。除上述 3 种新发病原外, 近年来我国养殖对虾还出现了其他新病原感染情况, 如 2017 年报道的虾血细胞虹彩病毒(shrimp hemocyte iridescent virus, SHIV)已引起国内外的广泛关注(Qiu *et al.*, 2017、2018)。

作者课题组在开展对虾新发疫病病原学和流病研究中发现, 我国沿海地区养殖凡纳滨对虾中, 一些患病凡纳滨对虾表现出游泳能力下降、生长迟缓等症状。检测发现, 这些患病对虾不存在 CMNV、EHP 及传染性皮下及造血器官坏死病毒(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHNV)的感染, 但存在一种新型野田村病毒的感染, 这种新型野田村病毒的形态和大小与 CMNV 类似, 但其基因组中 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(*RdRp*)基因序列与 CMNV *RdRp* 基因片段的相似性仅为 78% (李小平等, 2019)。为了便于将这类新型的野田村病毒与 CMNV 区分开来, 将其命名为行动障碍野田村病毒(movement disorder nodavirus, MDNV)(李小平等, 2019)。李小平等(2019)利用逆转录环介导等温核酸扩增(RT-LAMP)检测技术, 对我国沿海省市养殖虾类中 MDNV 的流行情况进行初步分析发现, MDNV 的流行率呈明显增加的趋势, 其传播危害风险值得关注。

目前, MDNV 的检测主要依赖 RT-LAMP 方法。LAMP 方法具有便捷、快速和适用于现场检测等优点, 但由于方法本身的特性, RT-LAMP 在使用中存在对低拷贝起始模板定量困难的问题, 使得其使用范围受到限制(王德国等, 2015)。为提高 MDNV 定量检测的准确性, 本研究采用基于 MDNV 基因设计的探针和引物, 开发了 MDNV 的一步法 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR (TaqMan RT-PCR)检测技术。

1 材料与方法

1.1 对虾样品与实验材料

对虾样品于 2019 年采集自山东、湖南、广西和海南等地的养殖场, 共 81 份, 包括凡纳滨对虾、日本对虾(*Penaeus japonicus*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)和澳洲龙虾(*Cherax quadricarinatus*)。从养殖池塘中取对虾活体, 然后采集对虾的肝胰腺、鳃丝和附肢等组织样本, 保存于 RNAstore 样本保存液(天根, 北京)中,

使用低温冰袋运回实验室, 冻存于 -80°C 冰箱备用。本研究用到的白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、IHNV、斑节对虾杆状病毒(*Penaeus monodon* bacuiovirus, MBV)和肝胰腺细小病毒(hepatopancreatic parvovirus, HPV)等病原阳性核酸来源于作者实验室。

1.2 样品总 RNA 制备

1.2.1 组织样本的总 RNA 提取与稀释 将上述浸泡在 RNAstore 中的 81 份虾类样品, 分别切取 30 mg 组织, 放入加有 700 μL RNAiso Plus (TaKaRa)的 1.5 mL 离心管中, 充分研磨, 然后按照 RNAiso Plus 使用说明书步骤进行样本组织总 RNA 提取。总 RNA 的质检结果 $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$ 应在 1.8~2.1 范围内, 并将总 RNA 浓度统一稀释到约 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 进行后续实验。

1.2.2 MDNV 的逆转录套式 PCR 检测 以上述制备的样本组织总 RNA 为模板, 采用 TaKaRa 一步法逆转录 PCR 试剂盒对样本进行 MDNV 的逆转录套式 PCR (RT-nPCR)检测, 以便确认 MDNV 阳性核酸样品, 用于后续 MDNV 新方法的建立和应用测试。

第 1 轮扩增反应的体系组分见表 1, 扩增程序: 50°C 逆转录 30 min, 94°C 变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 36 个循环; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保温。第 2 轮扩增反应的体系组分见表 2, 扩增程序: 95°C 变性 4 min; 95°C 变性 20 s, 51°C 退火 20 s, 72°C 延伸 20 s, 35 个循环; 72°C 延伸 5 min; 4°C 保温。MDNV RT-nPCR 所用引物序列见表 3。

第 2 轮 PCR 产物先进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 然后利用 Zymo 胶回收试剂盒(Sigma-Aldrich, 美国)对目的条带进行纯化, 将纯化后的产物连入 pMD18-T 载体(TaKaRa, 大连)并转化到大肠杆菌 DH5 α 中进行克隆, 挑取单克隆菌, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。

表 1 MDNV RT-nPCR 的第 1 轮反应体系
Tab.1 Reaction mixture of the first round MDNV RT-nPCR

组分 Component	用量 Amount/ μL
2 \times step buffer	12.5
MDNV-F1 (10 mmol/L)	0.5
MDNV-R1 (10 mmol/L)	0.5
Enzyme mix	1.0
无菌双蒸水 ddH ₂ O	10.0
总体积 Total volume	24.5
RNA 模板 RNA template	0.5

表 2 MDNV RT-nPCR 的第 2 轮反应体系

Tab.2 Reaction mixture of the second round of MDNV RT-nPCR

组分 Component	用量 Amount/ μ L
10 \times Ex Taq buffer(无 MgCl ₂)	2.5
MgCl ₂ (20 mmol/L)	2.0
dNTP (2.5 mmol/L)	2.0
MDNV-F3 (10 μ mol/L)	1.0
MDNV-R3 (10 μ mol/L)	1.0
Ex Taq 酶 (5 U/ μ L)	0.1
无菌双蒸水 ddH ₂ O	15.4
总体积 Total volume	24.0
模板 Template: 第 1 轮 PCR 产物(稀释 100 倍)	1.0

表 3 MDNV RT-nPCR 所用引物序列

Tab.3 Primers used in MDNV RT-nPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	扩增片段 Length of amplicons /bp
MDNV-F1	ACGGCGATGACGGATTA	612
MDNV-R1	AAGTGCCACAGACCC	
MDNV-F2	AAATCCATCTTACGACCAG	426
MDNV-R2	AAGTGCCACAGACCC	
MDNV-F3	GCTACGGATTCTCTAACACCATT	233
MDNV-R3	AGACTTGTCACGACTTCAGGAT	

1.3 引物和探针的设计

选取 MDNV 的 *RdRp* 基因片段, 利用 Beacon Designer 7.0 软件(Premier Biosoft, 美国)设计用于 TaqMan RT-PCR 检测的寡核苷酸引物和探针。引物包括 MDNV-Taq-F1(5'-AATTCGACCCGAAAGTG G-3')和 MDNV-Taq-R1(5'-TCGGTCAAGCAAGCGT C-3'), 该引物可扩增产生 158 bp 的 PCR 扩增产物; 探针序列为 5'-FAM TCCATCTTACGACCAGAA-ACCCAACATAMRA-3', 探针在 5'末端用 6-羧基荧光素(FAM)标记, 在 3'末端用 TAMRA 淬灭剂标记。在 MDNV-Taq-F1 引物 5'添加 T7 启动子序列, 构建含有 T7 启动子序列的 T7-MDNV-Taq-F1 引物(5'-TAATA CGACTCACTATAGGGAATTCGACCCGAAAGTG G-3'), 以便用于 RNA 标准品构建。正向引物 MDNV-Taq-F1、反向引物 MDNV-Taq-R1、含有 T7 启动子序列的 T7-MDNV-Taq-F1 和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 质粒标准品和 RNA 标准品制备

1.4.1 质粒标准品制备 以 1.2 中检测为 MDNV 阳性的对虾 RNA 为模板, 利用引物 MDNV-Taq-F1 和 MDNV-Taq-R1 进行 RT-PCR 扩增, 获取 MDNV

靶基因目标片段, 将目标片段连入 pMD18-T 载体 (TaKaRa)进行克隆, 克隆片段测序验证正确后, 用质粒小量制备试剂盒(Omega, 美国)从阳性克隆菌种中制备含有 MDNV 靶基因片段的 pMD18-MDNV 重组质粒。用 NanoDrop 2000 核酸分析仪(Thermo, 美国)测定上述重组质粒的浓度, 并通过计算换算成目标基因拷贝数; 将 pMD18-MDNV 重组质粒用无 RNA 酶的 H₂O 进行 10 倍的梯度稀释, 作为质粒标准品, 并置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.2 RNA 标准品制备 以 pMD18-MDNV 质粒为模板, 以含有 T7 启动子序列的引物 T7-MDNV-Taq-F1(5'-TAATACGACTCACTATAGGGAATTCGACCCGAAAGTGG-3')和 MDNV-Taq-R1 进行 PCR 扩增, 获取目标片段, 按照 *in vitro* Transcription T7 kit (for siRNA Synthesis)(TaKaRa)说明书, 以表 4 的转录体系进行体外转录, 获得含有 MDNV 靶基因的 RNA 标准品。

表 4 体外转录 RNA 体系配制

Tab.4 Preparation of reaction mixtures for RNA transcription

组分 Component	用量 Amount
10 \times Transcription buffer	2.0 μ L
ATP solution (50 mmol/L)	2.0 μ L
GTP solution (50 mmol/L)	2.0 μ L
CTP solution (50 mmol/L)	2.0 μ L
UTP solution (50 mmol/L)	2.0 μ L
RNA 酶抑制剂 RNase inhibitor (40 U/ μ L)	0.5 μ L
T7RNA 聚合酶 T7 RNA polymerase (50 U/ μ L)	2.0 μ L
无 RNA 酶水 RNase free dH ₂ O	X μ L
线性 DNA 模板 Linear template DNA	20 ng~1 μ g
合计 Total	20.0 μ L

根据 NanoDrop 2000 测定转录获得的 RNA 标准品的浓度, 计算出该 MDNV RNA 标准品的拷贝数, 对其进行 10 倍浓度梯度稀释, 用作反应模板。

1.5 TaqMan RT-PCR 反应的优化

TaqMan PCR 反应在实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96, Bio-Rad, 美国)中进行, 基础反应体系参照 Luna[®] Universal Probe One-Step RT-qPCR kit (New England BioLabs)说明书配制, 20 μ L 反应体系含有试剂 1 Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2 \times) X μ L (X 为试剂 1 的用量, 设定范围为 7~12 μ L), 试剂 2 Luna WarmStart[®] RT Enzyme Mix X μ L (X 为试剂 2 的用量, 设定范围为 0.4~1.6 μ L), 不同终浓度的引物 MDNV-TAQ-R1/MDNV-TAQ-F1、探针 MDNV-TAQ-

P各 X μL (X 为引物、探针浓度, 设定范围各为 0.1~0.6 $\mu\text{mol/L}$)。反应程序优化过程: 首先将逆转录时间分别设为 10、15、20 和 25 min 进行优化; 在优化逆转录时间后, 再优化扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, X $^{\circ}\text{C}$ (X 为退火温度梯度, 设定范围为 52 $^{\circ}\text{C}$ ~65 $^{\circ}\text{C}$) 退火延伸 30 s, 共 45 个循环。优化过程中每组设 3 个重复, 从 3 次重复实验中选定最佳温度、时间和试剂用量。

1.6 TaqMan RT-PCR 方法的分析特异性

以 WSSV、IHHNV、MBV、HPV 和 CMNV 阳性核酸为特异性分析的模板, 同时以 MDNV 阳性核酸为阳性对照, 健康凡纳滨对虾总 RNA 为阴性对照模板, 无 RNA 酶的水为空白对照模板, 进行 MDNV TaqMan RT-PCR 检测方法的分析特异性(analytical specificity, Asp)测试, 每个模板的检测反应设置 3 个重复。

1.7 TaqMan RT-PCR 方法的分析灵敏度

采用优化后的 TaqMan RT-PCR 方法测试 10 倍浓度梯度稀释的 pMD18-MDNV 质粒 (1.4×10^{10} ~ 10^0 copies/ μL) 和阴性对照, 每个浓度测试设置 3 个重复, 使用 Bio-Rad CFX96 软件 (V6.0.14) 绘制扩增 C_t 值(y) 相对于质粒模板起始浓度(x) 的标准曲线。基于该标准曲线明确 MDNV TaqMan RT-PCR 方法以 DNA/cDNA 为模板时对 MDNV 的分析灵敏度(analytical sensitivity, Ase)。

采用优化后的 TaqMan RT-PCR 方法测试 10 倍连续梯度稀释的 RNA 标准品模板 (5.5×10^{10} ~ 5.5×10^0 copies/ μL) 和阴性对照, 使用 Bio-Rad CFX96 软件 (V6.0.14) 绘制扩增 C_t 值(y) 相对于 RNA 模板起始浓度(x) 的标准曲线。基于该标准曲线, 明确 MDNV TaqMan RT-PCR 方法以 RNA 为模板时对 MDNV 的 Ase。

1.8 TaqMan RT-PCR 方法的可重复性

使用 10 倍浓度梯度稀释的 1.4×10^9 ~ 1.4×10^2 copies/ μL pMD18-MDNV 质粒作为模板, 每个浓度重复 3 次, 再重复上述实验 3 次, 评估 TaqMan RT-PCR 检测方法的批内和批间重复性。使用变异系数(CV) 评估检测反应的可重复性, 所述 CV 定义为本研究中不同 pMD18-MDNV 质粒稀释物重复扩增的 C_t 值的标准偏差(SD) 与 C_t 平均值的百分比; 使用 SPSS 13 进行方差分析 (ANOVA)。

1.9 TaqMan RT-PCR 方法的应用

利用新建立的 TaqMan RT-PCR 方法对 2019 年采

自我国山东、湖南、广西等地的池塘养殖虾类样品进行 MDNV 检测, 分析 MDNV 在不同养殖虾类中的流行情况及在这些地区养殖虾类中的流行率, 评估该病毒的流行危害风险。

2 结果

2.1 TaqMan PCR 反应的条件优化

以试剂盒说明书推荐的初始反应体系为基础, 通过对反应试剂各组分用量、逆转录时间、引物退火温度等优化, 综合考虑最小标准偏差、最小 C_t 值及经济成本、稳定性等因素, 优化后各反应组分用量: 20.0 μL 反应体系内, 试剂 1 Luna universal probe one-step reaction mix (2 \times) 11.0 μL , 试剂 2 Luna WarmStart[®] RT enzyme mix 8 μL , 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 引物 MDNV-TAQ-R1 和 MDNV-TAQ-F1 分别 0.6 μL 、探针 MDNV-TAQ-P (0.4 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL 。优化后的逆转录温度为 54.5 $^{\circ}\text{C}$, 逆转录时间为 15 min; 优化后的退火温度为 60.3 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 TaqMan RT-PCR 检测方法的特异性分析

利用 WSSV、MBV、IHHNV、HPV、CMNV 和 MDNV 的阳性核酸为模板进行 TaqMan RT-PCR, 结果显示, 只有 MDNV 的阳性核酸能够产生特异性的扩增曲线, 而其他几种病原的阳性核酸均没有扩增曲线产生(图 1)。表明 TaqMan RT-PCR 方法能够特异性扩增 MDNV 核酸, 而不与上述虾类常见的 5 种病原发生交叉反应。

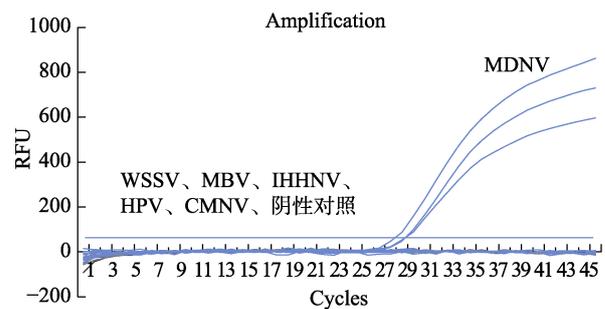


图 1 MDNV TaqMan RT-PCR 方法的分析特异性

Fig.1 Analytical specificity of MDNV TaqMan RT-PCR assay

2.3 以 RNA 为模板时 TaqMan RT-PCR 的分析灵敏度和标准曲线

以 10 倍浓度梯度稀释的 RNA 标准品为模板, 对 TaqMan RT-PCR 方法的灵敏度进行测试。结果显示, 该方法对 RNA 标准品模板的最低检测限可低至 5.5×10^1 copies/反应。在 5.5×10^{10} ~ 5.5×10^1 copies/反应

的起始模板浓度范围内, RNA 标准品起始模板浓度对数值和 C_t 值之间呈线性关系(图 2a、图 2b)。扩增产物阈值循环数 C_t 值与标准模板起始量(Starting quantity, Sq)的关系曲线为 $C_t = -3.455 \log(Sq) + 45.053$, $R^2 = 0.992$ 。

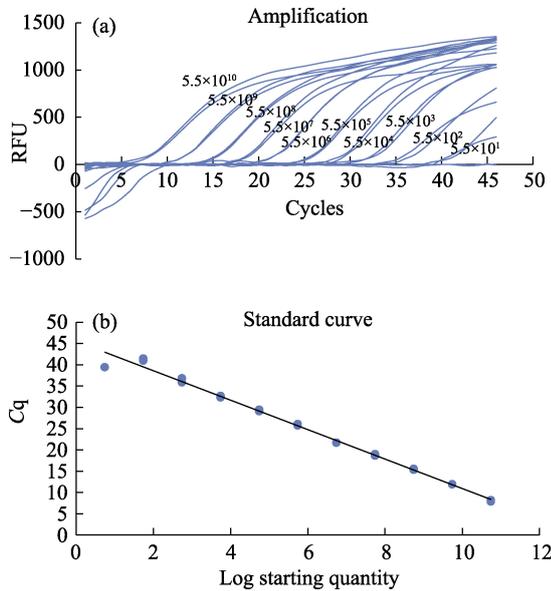


图 2 以 10 倍浓度梯度稀释的 RNA 标准品进行 MDNV TaqMan RT-PCR 的扩增曲线(a)和标准曲线(b)
Fig.2 The amplification plots (a) and standard curve (b) of the serial 10-fold dilutions RNA standards by MDNV TaqMan RT-PCR

2.4 以 DNA 为模板时 TaqMan RT-PCR 的分析灵敏度和标准曲线

利用 10 倍梯度稀释的 pMD18-MDNV 质粒为模板, 对 TaqMan RT-PCR 方法的灵敏度进行测试。结果显示, TaqMan RT-PCR 方法对质粒模板的最低检测限可低至 1.4×10^1 copies/反应。在 $1.4 \times 10^{10} \sim 1.4 \times 10^1$ copies/反应的起始模板浓度范围内, pMD18-MDNV 质粒模板浓度对数值和 C_t 值之间呈现线性关系(图 3a、图 3b)。扩增产物阈值循环数 C_t 值与标准模板起始量的关系曲线为 $C_t = -3.327 \log(Sq) + 42.188$, $R^2 = 0.988$ 。

2.5 TaqMan RT-PCR 检测方法的可重复性

使用 pMD18-MDNV 质粒标准品为模板, 对 TaqMan RT-PCR 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 $1.4 \times 10^9 \sim 1.4 \times 10^2$ copies/反应的范围内, TaqMan RT-PCR 实验的重现性较好, 批内和批间检测反应的 C_t 值 CV 分别小于 1.27% 和 1.83% (表 5)。方差分析结果显示, 各浓度梯度模板 TaqMan RT-PCR 反应的批间 C_t 值均差异不显著($P > 0.05$) (表 6)。

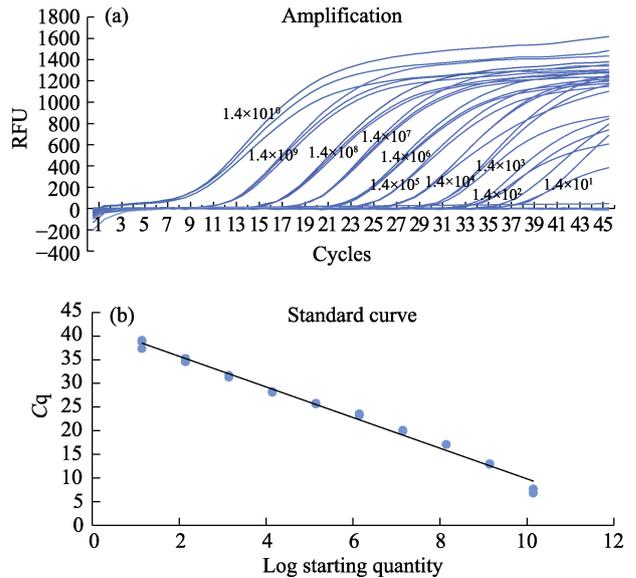


图 3 利用 10 倍浓度梯度稀释质粒标准品进行 MDNV TaqMan RT-PCR 的扩增曲线(a)和标准曲线(b)
Fig.3 The amplification plots (a) and standard curve (b) of the serial 10-fold dilutions plasmids by MDNV TaqMan RT-PCR

表 5 TaqMan RT-PCR 测定法的批内和批间重复性
Tab.5 Intra-assay and inter-assay variability of TaqMan RT-PCR assay

质粒浓度 Concentration of plasmid (copies/reaction)	组内 C_t			组间 C_t		
	Mean	SD	CV/%	Mean	SD	CV/%
1.4×10^9	13.23	0.06	0.45	13.41	0.25	1.83
1.4×10^8	16.36	0.09	0.55	16.38	0.02	0.11
1.4×10^7	20.24	0.16	0.79	20.22	0.02	0.10
1.4×10^6	23.11	0.12	0.52	23.01	0.13	0.56
1.4×10^5	25.86	0.33	1.27	25.59	0.38	1.48
1.4×10^4	28.14	0.07	0.25	28.00	0.20	0.70
1.4×10^3	31.20	0.14	0.45	30.97	0.33	1.08
1.4×10^2	34.06	0.11	0.33	13.41	0.25	0.93

2.6 利用 TaqMan RT-PCR 分析养殖虾类中 MDNV 的流行情况

利用 TaqMan RT-PCR 对 2019 年采自我部分养殖地区的虾类样品进行分析发现(表 7), 养殖凡纳滨对虾、罗氏沼虾和澳洲龙虾中均有 MDNV 阳性检出, 其中, 凡纳滨对虾和罗氏沼虾中 MDNV 的阳性检出率分别为 23.5% (16/68) 和 16.6% (1/6), 另外, 在采自广西的 2 份澳洲龙虾样品中有 1 份检出 MDNV 阳性。从采样地域来看, 广西、海南、湖南和山东等地的虾类样品中均有 MDNV 阳性检出。

3 讨论

自1967年第1个野田村病毒(nodamura virus)在日本被分离鉴定后,目前野田村病毒科中已分离鉴定了19种病毒,这些病毒分属于阿尔法野田村病毒属(*Alphanodavirus*)和贝塔野田村病毒属(*Betanodavirus*) (King *et al*, 2011)。从虾类中分离的野田村病毒包括以下5种:罗氏沼虾野田村病毒(*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, MrNV)、凡纳滨对虾野田村病毒(*Penaeus vannamei* nodavirus, PvNV)、CMNV、MDNV和桃红对虾野田村病毒(*Farfantepenaeus duorarum* nodavirus, FdNV)。其中, MrNV主要感染罗氏沼虾, PvNV主要感染凡纳滨对虾, CMNV可感染虾类和鱼类, MDNV主要感染虾类, FdNV分离自健康桃红对虾,不引起宿主发病(Scherer *et al*, 1967; Tang *et al*, 2011;

King *et al*, 2011; Ng *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2014; 李小平等, 2019)。

表6 TaqMan RT-PCR分析法的批间变异性
Tab.6 Analysis of variance of inter-assay variability of TaqMan RT-PCR assay

质粒浓度	组间 C_t Inter-assay C_t	
	<i>F</i>	<i>P</i>
1.4×10^9	6.716	0.061
1.4×10^8	0.723	0.443
1.4×10^7	2.339	0.201
1.4×10^6	0.751	0.435
1.4×10^5	1.602	0.274
1.4×10^4	4.666	0.097
1.4×10^3	2.918	0.163
1.4×10^2	7.578	0.051

表7 TaqMan RT-PCR分析方法检测样品中阳性数据

Tab.7 Analysis of variance of inter-assay variability of TaqMan RT-PCR assay

样本编号 Sample No.	样品种类 Sample species	采集地区 Sampling region
20190611002	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	山东日照 Rizhao, Shandong
20190611003	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	山东日照 Rizhao, Shandong
20190611004	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	山东日照 Rizhao, Shandong
20190611006	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	山东日照 Rizhao, Shandong
20190611007	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	山东日照 Rizhao, Shandong
20190708001	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	广西北海 Beihai, Guangxi
20190708004	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	广西北海 Beihai, Guangxi
20190702004	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	海南东方 Dongfang, Hainan
20190706005	澳洲龙虾 <i>C. quadricarinatus</i>	广西南宁 Nanning, Guangxi
20190706013	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>	广西南宁 Nanning, Guangxi
20190708007	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	广西合浦 Hepu, Guangxi
20190707006	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	广西防城 Fangcheng, Guangxi
20190707015	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	广西钦州 Qinzhou, Guangxi
20190707016	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	广西钦州 Qinzhou, Guangxi
20190721006	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	湖南常德 Changde, Hunan
20190721009	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	湖南常德 Changde, Hunan
20190721012	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	湖南常德 Changde, Hunan
20190718003	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	山东日照 Rizhao, Shandong

CMNV被证实是引起养殖凡纳滨对虾发生病毒性偷死病(viral covert mortality disease, VCMD)的病原(Zhang *et al*, 2014)。2002—2003年前后,该病毒在我国南方省市的高密度养殖对虾中出现,并于2008—2009年在广西、广东和福建等地养殖对虾中大规模暴发,2010年后开始传播到北方的主要对虾养殖地区(Zhang *et al*, 2017)。2013—2019年期间,我国沿海地区养殖对虾中CMNV的年度检出率依次为45.93% (130/283)、27.91% (84/301)、20.85% (54/259)、26.8% (68/254)、16.3% (63/387)、29.15% (58/199)和15.3%

(28/183), CMNV表现出流行率高、流行范围广、产业危害严重的特点,使我国养殖对虾产业遭受了严重的经济损失(Zhang *et al*, 2017; 李小平等, 2019)。除感染主要养殖对虾种类外, CMNV还可引起对虾养殖池塘中多种共生生物感染(Liu *et al*, 2018)。研究发现,牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、鲮鱼虎鱼(*Mugilogobius abei*)和鲫鱼(*Carassius auratus*)等海淡水鱼类中也存在CMNV的自然感染;CMNV是目前已知的19种虾类病原中第1个能跨越物种障碍而感染鱼类的虾类病毒(Zhang *et al*, 2018; 王崇等, 2018; Wang *et al*, 2019)。

感染CMNV的对虾主要表现出肝胰腺萎缩、颜色变浅、空肠空胃、生长缓慢等症状, 还可见病虾腹部肌肉不透明或局部发白(Huang, 2012; Zhang *et al.*, 2014)。2016年, 本实验室在开展对虾流行病学研究中发现, 沿海省市养殖凡纳滨对虾开始出现MDNV感染和流行; 感染MDNV的凡纳滨对虾主要临床症状为游泳能力下降、生长迟缓等, 与CMNV感染所致的症状不尽相同。电镜分析发现, MDNV的病毒颗粒大小与CMNV类似, 但其*RdRp*基因序列与CMNV *RdRp*基因片段的相似性仅为78%, 由此判断, MDNV是养殖对虾中出现的一种新型的野田村病毒。本实验室前期开发了MDNV的RT-LAMP检测技术, 但在检测实践中发现以逆转录的样品cDNA为模板, 当起始模板浓度过低时, MDNV的RT-LAMP方法无法准确定量模板。本研究建立并优化了MDNV的TaqMan RT-PCR方法, 可实现对低浓度(1.4×10^1 copies/反应)模板的准确定量。

基于设计引物应尽可能选择在目标基因的保守区域内, 而又不与近缘物种相应基因发生非特异性结合的原则(Rose *et al.*, 2003; Zlateva *et al.*, 2011; Cassar *et al.*, 2017), 本研究在依据 MDNV *RdRp* 基因设计 TaqMan RT-PCR 引物和探针时, 首先利用多序列比对软件对 MDNV *RdRp* 靶基因与 MrNV、PvNV 和 FdNV 的 *RdRp* 基因进行序列比对分析。结果显示, MDNV *RdRp* 靶基因与后三者 *RdRp* 基因的同源性低于 25%, MDNV 的 TaqMan RT-PCR 引物和探针与后三者 *RdRp* 基因及基因组的同源性低于 30%。因此, 所设计的引物和探针与 MrNV、PvNV 和 FdNV 不存在非特异性结合并产生非特异性扩增的可能性。多序列比对结果显示, MDNV *RdRp* 靶基因与 CMNV 对应区段的同源性为 79.87%, 当以 CMNV RNA 为模板进行 TaqMan RT-PCR 方法特异性分析时, TaqMan RT-PCR 引物亦未与 CMNV 核酸发生非特异性反应。因此, 本研究所建立的 TaqMan RT-PCR 方法可用于 MDNV 的特异性检测。传统的组织病理分析和反转录 PCR 方法在鉴定病原微生物时耗时较长、效率较低(Zhang *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2007), 本研究优化后的 MDNV TaqMan RT-PCR 方法检测所需时间大约为 1.5 h, 在较短时间内即可高效地完成逆转录和核酸靶序列扩增, 并通过探针荧光信号的变化监测整个反应过程, 非常适于开展 MDNV 大规模检测。本实验室前期建立的 MDNV RT-LAMP 分析方法最低可检测到浓度为 2.61×10^3 copies/反应的 MDNV RNA 标准品, 当起始模板浓度低于 1000 copies/反应时, 起始模板浓度与扩增 C_t 值的相关系数则明显下降(李小平,

2019)。以 RNA 标准品为模板时, 本研究建立的 TaqMan RT-PCR 最低可检测到 5.5×10^1 copies/反应的 RNA。当以质粒模拟 cDNA 为模板时, 具有可检测扩增信号的最低起始模板浓度为 1.4×10^1 copies/反应, 说明该方法较前期建立的 RT-LAMP 方法具有更高的灵敏度。DNA 模板浓度在 $1.4 \times 10^{10} \sim 1.4 \times 10^1$ copies/反应之间、RNA 模板浓度在 $5.5 \times 10^{10} \sim 5.5 \times 10^1$ copies/反应之间时, MDNV TaqMan RT-PCR 扩增反应的 C_t 值与 $\log(\text{Sq})$ 呈良好的线性关系, 反映出该方法适合对起始模板浓度范围较广的样品进行准确的定量分析。另外, 在起始模板浓度为 $1.4 \times 10^9 \sim 1.4 \times 10^2$ copies/反应的范围内, 本研究建立的 TaqMan RT-PCR 方法的批内和批间 CV 分别小于 1.27% 和 1.83%, 表明该方法具有良好的稳定性和可重复性。

李小平等(2019)利用 RT-LAMP 方法对 MDNV 开展分子流行病学调查的结果显示, 2016 年我国沿海省市虾类样品中 MDNV 的阳性检出率为 9.4%(24/254)。本研究利用 TaqMan RT-PCR 方法对 2019 年采自我国部分地区的养殖虾类样品进行 MDNV 流行情况分析结果显示, 养殖凡纳滨对虾、罗氏沼虾和澳洲龙虾中均有 MDNV 的阳性检出, 其中, 凡纳滨对虾中 MDNV 的阳性检出率高达 23.5%(16/68); 从采样地域来看, 广西、海南、湖南和山东等地的虾类样品均有 MDNV 阳性检出。上述研究表明, MDNV 已扩散到更多虾类养殖地区, 且具有较高的流行率, 其传播危害风险值得进一步研究。

综上所述, 本研究建立的 MDNV TaqMan RT-PCR 方法具有快速、灵敏和特异性强等特点, 可为对虾养殖实践中 MDNV 的定性、定量检测与监测以及有效防控提供技术支持。养殖对虾中 MDNV 的高检出率也提示, 当前 MDNV 这一新发病原在我国养殖甲壳类中的流行危害应引起水产管理部门和养殖从业人员的高度关注。

参 考 文 献

- ARANGUREN L F, HAN J E, TANG K F J. *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2017, 471: 37-42
- CASSAR O, CHARAVAY F, TOUZAIN F, *et al.* A novel human T-lymphotropic virus type 1c molecular variant in an indigenous individual from New Caledonia, Melanesia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2017, 11(1): e0005278
- FAO. Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis

- syndrome (AHPND) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam, 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053, 2013, Rome, 54 pp
- FLEGEL T W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 166–173
- FU S, WEI D, YANG Q, *et al.* Horizontal plasmid transfer promotes the dissemination of Asian acute hepatopancreatic necrosis disease and provides a novel mechanism for genetic exchange and environmental adaptation. *mSystems*, 2020, 5(2): e00799-19
- HUANG J. Experience in EMS/AHPNS from China. In: NACA. The Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS). Bangkok, Thailand, 2012
- KING A M Q, ADAMS M J, CARSTENS E B, *et al.* Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, San Diego: Elsevier Academic Press, 2011
- LI X P, WAN X Y, ZHANG Q L, *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]
- LIU S, WANG X H, XU T T, *et al.* Vectors and reservoir hosts of covert mortality nodavirus (CMNV) in shrimp ponds. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 154: 29–36
- NG T F F, ALAVANDI S, VARSANI A, *et al.* Metagenomic identification of a nodavirus and a circular ssDNA virus in semi-purified viral nucleic acids from the hepatopancreas of healthy *Farfantepenaeus duorarum* shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(3): 237–242
- QIU L, CHEN M M, WAN X Y, *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 M M, WANG R Y, *et al.* Complete genome sequence of shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV) isolated from white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Archives of Virology*, 2018, 163(3): 781–785
- ROSE T M, HENIKOFF J G, HENIKOFF S. CODEHOP (consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3763–3766
- SCHERER W F, HURLBUT H S. Nodamura virus from Japan: A new and unusual arbovirus resistant to diethyl ether and chloroform. *American Journal of Epidemiology*, 1967, 86(2): 271–285
- TANG K F J, PANTOJA C R, REDMAN R M, *et al.* Development of in situ hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 75(3): 183–190
- TANG K F J, PANTOJA C R, REDMAN R M, *et al.* Ultrastructural and sequence characterization of *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV) from Belize. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, 94(3): 179–187
- TOURTIPI S, WONGTRIPOP S, STENTIFORD G D, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporidia: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 102(1): 21–29
- WANG C, LIU S, LI X P. Infection of covert mortality nodavirus in Japanese flounder reveals host jump of the emerging alphanodavirus. *Journal of General Virology*, 2019, 100(2): 166–175
- WANG C, WANG X H, LIU S, *et al.* Preliminary study on the natural infection of *Carassius auratus* with covert mortality nodavirus (CMNV). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 25–32 [王崇, 王秀华, 刘爽, 等. 鲫鱼自然感染对虾偷死野田村病毒(CMNV)的初步研究. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 25–32]
- WANG D G, WANG Y Z, WANG A P. Study on false-positive amplification of loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Xuchang University*, 2015, 34(5): 81–83 [王德国, 王永真, 王爱萍. 环介导等温扩增技术的假阳性扩增研究. *许昌学院学报*, 2015, 34(5): 81–83]
- ZHANG Q L, LIU Q, LIU S, *et al.* A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *Journal of General Virology*, 2014, 95(12): 2700–2709
- ZHANG Q L, LIU S, LI J, *et al.* Evidence for cross-species transmission of covert mortality nodavirus to new host of *Mugilogobius abei*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1447
- ZHANG Q L, XU T T, WAN X Y, *et al.* Prevalence and distribution of covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustacean. *Virus Research*, 2017, 233(2): 113–119
- ZLATEVA K T, CRUSIO K M, LEONTOVICH A M, *et al.* Design and validation of consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for broad and sensitive detection of corona- and toroviruses. *Journal of Virological Methods*, 2011, 177(2): 174–183

Establishment and Application of the TaqMan RT-PCR Detection Method for the Shrimp Movement Disorder Nodavirus (MDNV)

SANG Songwen^{1,2}, LI Xiaoping^{1,2}, ZHANG Qingli^{1,2}①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Marine Aquaculture 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, Shandong 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract For the establishment of the TaqMan RT-PCR detection method for the shrimp movement disorder nodavirus (MDNV), primers and probes were designed based on the RNA-dependent RNA polymerases (*RdRp*). The pMD18-MDNV plasmid and RNA standard containing the MDNV target gene were used as templates to optimize the reaction mixtures and program. The optimized reaction with 20.0 μL master mix included the following components: 11.0 μL one-step RT-PCR buffer, 0.8 μL enzyme mixture, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ forward primer, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ reverse primer, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ probe, 1.0 μL template, and 5.2 μL RNA-free H_2O . The optimized reaction procedure was as following: incubation at 54.5 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min, incubation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, then 45 thermal cycling amplifications (95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 s, 60.3 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s). The newly established method was specific for MDNV detection, showing a good linear relationship between the log value (Starting quality, Sq) and number of reaction cycles within the range of $1.4 \times 10^{10} \sim 1.4 \times 10^1$ copies/ μL pMD18-MDNV standard plasmid. The method could detect as low as 5.5×10^1 copies of the RNA standard or 1.4×10^1 copies of the pMD18-MDNV standard plasmid. Meanwhile, the newly developed assay showed that the coefficient of variation of the C_t value intra-assay and the C_t value inter-assay were less than 1.27% and 1.83%, respectively, indicating a good repeatability and stability. In the samples collected from shrimp farming provinces in China in 2019 using this new method, the positive detection rate of MDNV in *Litopenaeus vannamei* was 23.5% (16/68). The TaqMan RT-PCR method established in this study was specific, fast, and sensitive in the detection of MDNV. This method could provide technical support for the qualitative and quantitative detection and monitoring of MDNV in shrimp farming practices, as well as effective prevention and control of MDNV.

Key words Farming shrimp; Movement disorder nodavirus (MDNV); TaqMan RT-PCR; Quantification; Detection method

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