

实时定量 RT-PCR 检测鱼类传染性造血器官坏死病毒方法的建立与应用

岳志芹¹ 刘 荭² 梁成珠¹ 高宏伟¹ 徐 彪¹ 邓明俊¹ 江育林²

(1. 青岛出入境检验检疫局, 青岛 266002; 2. 深圳出入境检验检疫局, 深圳 518010)

摘要:建立了 Taqman 实时定量 RT-PCR 方法检测传染性造血器官坏死病毒(IHNV)。选取 IHNV 病毒的 N 蛋白基因保守序列,利用 Primer Express 2.0 软件设计引物和探针。以梯度稀释的含有 IHNV 目的扩增片段的质粒作为标准品,进行定量 RT-PCR 反应以确定检测灵敏度。病毒浓度在 5×10^6 —5 个拷贝,共 7 个数量级的范围内,定量 RT-PCR 反应有“S”型扩增曲线,检测灵敏度为 5 个拷贝。根据病毒拷贝数与定量反应 Δ 值的关系,绘制了标准曲线。该方法具有特异性,对鲤春血症病毒(SVCV)、病毒性出血性败血症(VHSV)、传染性胰脏坏死病毒(IPNV)、草鱼呼肠孤病毒(GCRV)、流行性造血器官坏死病毒(EHNV)、EPC 细胞系、牙鲆的核酸都没有扩增反应。在 50 批待检样品中,有 3 批鱼类感染 IHNV,利用标准曲线进行了定量分析。实时定量 RT-PCR 检测 IHNV 方法,灵敏度高,特异性好,可以进行定量分析,在鱼病的快速检测上具有重要意义。

关键词: 传染性造血器官坏死病毒(IHNV);实时定量 RT-PCR;Taqman 探针

中图分类号: Q-31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)01-0091-05

传染性造血器官坏死病(Infectious haematopoietic necrosis, IHN)是感染鲑鳟鱼类的一种严重的传染性疾病。过去 IHN 只流行于北美洲和欧洲一些国家,随着水生动物及其产品进出口贸易的急剧增加, IHN 已经传入我国,并在我国局部地区流行^[1]。IHN 的病原传染性造血器官坏死病毒(Infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV),属弹状病毒科的粒状病毒属(*Novirhabdovirus*)。病毒基因由线状、反义、单链的 RNA 组成,基因组全长约 11 kb,从 3' 端 5' 端依次包含 6 个基因,分别为病毒的核蛋白、磷蛋白、基质蛋白、糖蛋白、非结构蛋白和聚合酶蛋白^[2]。

IHN 的检测方法是通过细胞分离和增殖病毒,确诊和鉴定方法包括免疫学方法如中和实验^[3]、间接免疫荧光^[4]或 ELISA^[5,6];分子生物学方法如 DNA 探针法^[7]和 PCR 方法^[8-12]。这些方法或者操作繁琐,周期长,或者只能进行定性检测而不能定量分析。最近发展起来的荧光定量 PCR 技术^[13],以其灵敏度高,特异性好、快速、准确等优点,在病原体的定性和定量检测等方面得到广泛应用。本文建立了 IHNV 的实时定量 RT-PCR 检测方法,为定量检测 IH-

NV 提供了一种新的快速检测手段。

1 材料与方法

1.1 材料 病毒材料为实验室保存的 IHNV 病料,经过细胞系 EPC(Epithelinoma papulosum cyprini, 鲤鱼上皮瘤细胞)来分离和增殖 IHNV 病毒。用于特异性分析的鲤春血症病毒(SVCV)、病毒性出血性败血症(VHSV)、传染性胰脏坏死病毒(IPNV)、草鱼呼肠孤病毒(GCRV)、流行性造血器官坏死病毒(EHNV)均由实验室保存。扩大试验材料包括:2001 年 3 月采自深圳某养殖场出现大量死亡的牙鲆;2003 年 9 月采自北京某水产养殖场爆发大规模死亡的虹鳟;2003—2004 年间从国外入境的鱼苗和鱼卵,计 50 批次。

1.2 引物和探针的设计 选取 IHNV 病毒的 N 蛋白保守序列(GenBank AY442508),利用 Primer Express 2.0 软件设计引物和探针。引物和探针序列(表 1),由上海闪晶公司合成。

1.3 标准阳性对照质粒的制备 本实验所用的标准阳性对照为实验室构建的含有 IHNV N 蛋白扩增序列的质粒。质粒转化到大肠杆菌 JM109, LB 培养基(含 100 μ g/mL 氨苄青霉素)增殖,采用碱裂解法

收稿日期:2006-12-05;修订日期:2007-01-17

基金项目:国家质量监督检验检疫总局科研项目(编号:2006IK063)资助

通讯作者:岳志芹(1975—),女,汉族,山东烟台人;博士,高级工程师;主要从事出入境水生动物检验检疫。Tel: 0532-86770618, E-mail:

yuezhiqin@126.com

表1 IHNV引物和探针序列

Tab. 1 The sequences of IHNV primers and Taqman probe

引物和探针 Name	序列 Sequence	位置 Location (A Y442508)	扩增片段长度 Amplicon size
正向引物 Forward primer	5'-GGTCGCCGAACCTTCTGGAA-3'	288—306	
反向引物 Reverse primer	5'-GTGCCCAAGTGTCAAAAG-3'	346—328	59 bp
探针 TaqMan probe	5'-FAM-CCCTGGGCTTCTTGCTGGA-TAMRA-3'	308—326	

提取质粒并经过试剂盒纯化。用核酸分析仪测定质粒 DNA 的 OD₂₆₀, 根据阿佛加德罗常数换算出每微升质粒中 DNA 的拷贝数, 为 5×10^6 拷贝/ μL 。

1.4 组织 RNA 的提取 取鱼的肾、脾、脑等组织, 混合在一起进行匀浆, 采用 TOYOBO RNA 提取试剂盒 (MagExtrator[®]-RNA), 按照说明书进行病毒 RNA 的提取, 之后用核酸分析仪进行定量, 调整 RNA 浓度为 100 ng/ μL 。

1.5 实时定量 RT-PCR 反应 定量 RT-PCR 反应体系包括: 1 μL IHNV 质粒或者 1 μL 检测样品的 RNA, 12.5 μL 2 \times Taqman Universal RT-PCR Master Mix (包含 AmpliTaq Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dNTPs, dUTP 以及优化的 PCR 反应成分), 0.6 μL RNA 酶抑制剂, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 探针, 补充水至 25 μL 。PCR 反应参数如下: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10min; 之后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1min 进行 40 个循环。

IHNV 质粒 DNA 以 10 倍系列稀释, 进行实时荧光定量 RT-PCR, 每个稀释度做两个平行。测定该方法的检测灵敏度, 并绘制标准曲线。

分别提取鲤春血症病毒 (SVCV)、病毒性出血性败血症 (VHSV)、传染性胰脏坏死病毒 (IPNV)、草鱼呼肠孤病毒 (GCRV)、流行性造血器官坏死病毒 (EHNV)、EPC 细胞系、牙鲈的核酸, 以其为模板, 进行定量 RT-PCR, 检测引物和探针的特异性。

1.6 数据分析 定量 RT-PCR 反应过程中仪器自动收集荧光信号, 反应结束后, 利用 SDS (Sequence Detection System) 2.1 软件进行数据分析, 包括查看扩增曲线、Ct 值。Ct 值 (Threshold cycle), 是指 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。Ct 值与模板 DNA 的初始拷贝数成反比, 初始拷贝数越多, Ct 值越小。根据质粒拷贝数与 Ct 值的相关性, 计算得到标准曲线, 用于未知样品的定量分析。在结果判断中, 以扩增曲线是否为“S”型以及荧光信号值的大小为主, 以 FAM、TAMRA 的荧光原始数据作为辅助进行结果判定。

2 结果

2.1 定量 RT-PCR 反应检测 IHNV 的灵敏度实验

将 IHNV 质粒进行 10 倍系列稀释, 每个稀释度做两个平行, 进行定量 RT-PCR。图 1 表示各个稀释度质粒的扩增曲线。其中 X 轴代表 PCR 反应循环数, Y 轴 Rn 代表荧光信号强度。可以看出, 质粒浓度为 5×10^6 —5 个拷贝, 7 个数量级的范围内定量 RT-PCR 有“S”型扩增曲线, 即反映了 PCR 的指数增长期, 线性增长期和平台期三个阶段。检测灵敏度为 5 个病毒粒子。进一步分析扩增曲线, 发现指数增长期的曲线平行, 反映了 PCR 的扩增效率相近; 而不同稀释度之间的 Ct 相差均匀, 符合定量 PCR 的 Ct 值与起始拷贝数之间严格的线性关系。每个稀释度的两个重复, 其扩增曲线基本吻合在一起, 反映了实验的平行性好。

根据质粒拷贝数与 Ct 值的相关性, 由 SDS 2.1 软件得到标准曲线, 见图 2。横坐标代表质粒拷贝数 (X), 纵坐标为 Ct 值, 点上的数字代表模板的拷贝数。拷贝数 (X) 与 Ct 的关系为: $Ct = -3.09 \lg X + 39.33$; 相关系数 $R^2 = 0.9984$ 。

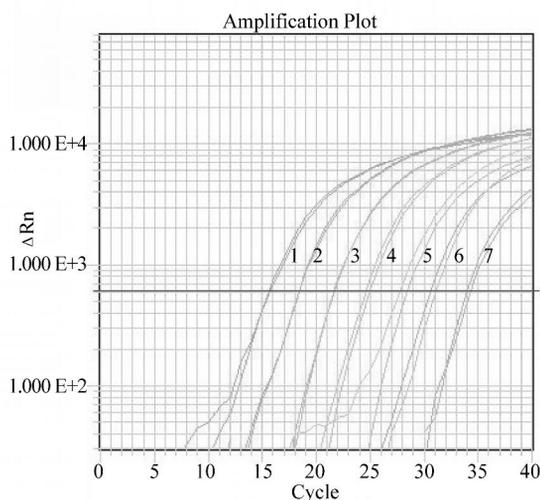


图1 IHNV 质粒定量 RT-PCR 反应的扩增曲线

Fig. 1 Amplification plot of real-time RT-PCR assay for the detection of IHNV plasmid

1-7: 质粒拷贝数分别为 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、5

Plot 1 to 7 represent IHNV plasmid ranging from 5×10^6 to 5 copies, respectively

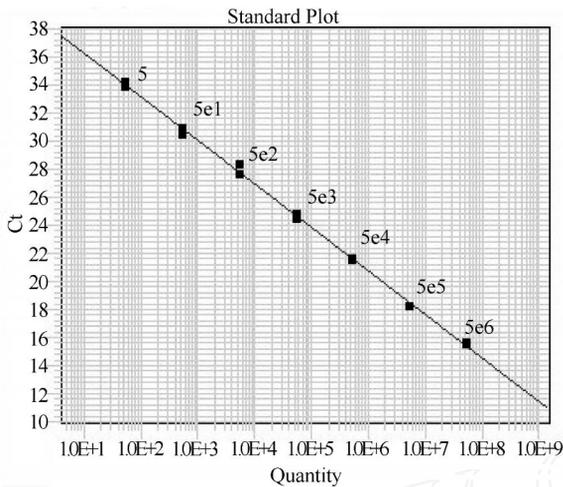


图2 IHNV 定量 RT-PCR 反应的标准曲线

Fig. 2 Standard plot for quantification of IHNV using real-time RT-PCR

2.2 定量 RT-PCR 反应检测 IHNV 的特异性实验

提取 SVCV、VHSV、IPNV、GCRV、EHN、EPC 细胞系、牙鲈的核酸,进行定量 RT-PCR。扩增曲线(图3)。可以看出,IHNV 扩增曲线呈“S”型,而其他病毒、EPC 细胞系、牙鲈的扩增曲线为不规则的折线型,没有典型的“S”型扩增曲线,表明没有发生扩增反应,反映了所设计引物和探针的特异性较好。

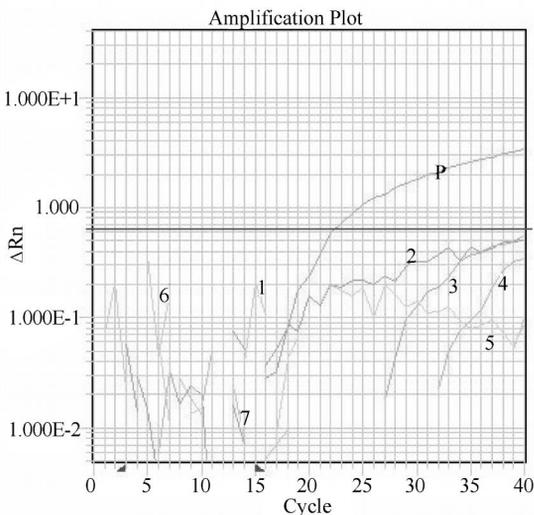


图3 实时定量 RT-PCR 检测 IHNV 的特异性实验

Fig. 3 Specificity test of real-time PCR assay for IHNV

P: IHNV; 1. IPNV; 2. VHSV; 3. GCRV; 4. SVCV; 5. EHN; 6. EPC; 7. 牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)

2.3 定量 RT-PCR 反应检测待检样品的 IHNV

用建立的定量 RT-PCR 反应方法检测 50 批待检的鱼类。在检测过程中,以 IHNV RNA、健康鱼组织 RNA、水为模板,分别作为阳性对照、空白对照、

阴性对照。排除假阳性和假阴性结果。定量 RT-PCR 结果表明,阳性对照有“S”型扩增曲线,空白对照和阴性对照无明显的“S”型扩增曲线,且荧光信号值低。表明试验过程符合质量控制的要求,可以排除假阳性和假阴性结果。定量 RT-PCR 检测发现:有 3 批鱼类样品有“S”型扩增曲线,且荧光信号值高,可判断其含有 IHNV 病毒,扩增曲线(图4)。这 3 批样品分别是 2001 年 3 月采自深圳某养殖场的牙鲈、2003 年 9 月采自北京某水产养殖场的虹鳟以及 2004 年从美国入境的匙吻鲟的鱼卵。3 批样品的 Ct 值分别为:26.06、32.46、34.86。利用标准曲线,计算出鱼体中病毒量分别约为 1.97×10^4 拷贝/ μg RNA、1670 拷贝/ μg RNA、280 拷贝/ μg RNA。其余的 47 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 IHNV 病毒。

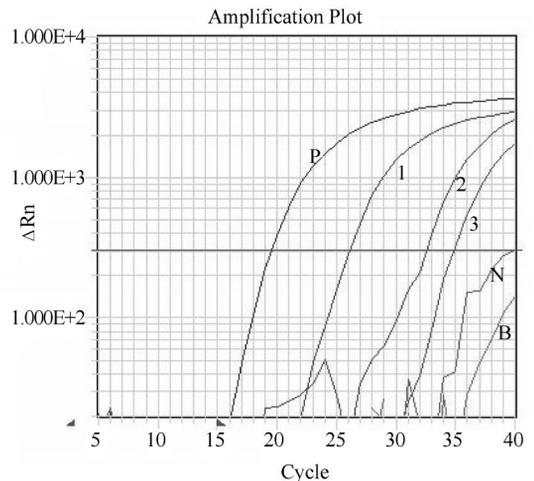


图4 感染 IHNV 的检测样品的实时定量 RT-PCR 扩增曲线

Fig. 4 Amplification plot of real-time RT-PCR samples with IHNV

P: IHNV; N: 阴性对照(健康鱼的 RNA); B: 空白对照(水); 1, 2, 3 分别为牙鲈、虹鳟、匙吻鲟

P: IHNV; N: Negative control; B: Blank; 1. *Paralichthys olivaceus*; 2. *Oncorhynchus mykiss*; 3. *Polyodon spathula*

3 讨论

传统诊断 IHNV 的方法是先利用细胞将病毒分离培养,再通过中和试验或 ELISA 的方法进行鉴定,这些方法均需较长时间。由于 IHNV 是弹状病毒,有囊膜,并且囊膜来自宿主细胞,容易产生非特异性抗体,因而难以制备高效价抗血清;并且可与其他鱼类弹状病毒如 SVCV、VHSV 等发生交叉反应,影响了鉴定的可靠性^[8]。本文结合 ABI 7900HT 荧光检测系统,建立了 Taqman 探针实时定量 RT-PCR 法快速、准确检测鱼类的 IHNV。反应体系包括一对引物

和一条探针(长度为都为 19 bp),探针 5 端标记荧光报告基团,3 端标记荧光淬灭基团。当探针完整时,两基团在空间结构上距离相互靠近,5 端报告基团产生的荧光被 3 端淬灭基团淬灭,故体系中没有荧光信号的产生。在 PCR 退火和延伸过程中,探针与模板特异性结合,随着引物的延伸,Taq DNA 聚合酶利用其 5' 3' 外切酶活性,对探针进行切割,报告基团远离淬灭基团,报告基团所释放的荧光可以被检测,荧光量的增加与 PCR 产物的积累量呈比例关系,可以达到定量检测的目的^[13]。

本文建立的 IHNV 的检测体系中,引物和探针只与 IHNV 核酸特异性地结合,与 SVCV、VHSV、IPNV、GCRV、EHNV 的核酸都没有反应,表明引物和探针的特异性较好。定量 PCR 反应在模板浓度为 5×10^6 —5 个拷贝,共 7 个数量级的范围内有扩增,对于模板浓度要求较宽,同时表明检测灵敏度较高,为 5 个拷贝。定量 PCR 仅需要 2h 操作,一次可以进行 96 个样品的检测,PCR 反应结束后可立即观察结果,不需要电泳、染色,因此更方便、快速。

在定量 PCR 反应中,预防非特异性扩增和污染是保证定量准确性的前提。本实验采用 UNG 酶(Uracil-N-Glycosylase)和热启动的方法来解决这一问题。UNG 酶的作用原理是降解含有 dU 的双链或单链 DNA,由于 PCR 试剂盒以 dUTP 取代 dTTP,所以 PCR 产物都是含有 dU 的 DNA 链。在 50℃ 反应 2min,UNG 酶可将已有的 PCR 产物降解,防止污染。试剂盒中的金牌 Taq 酶经过特殊修饰,常温下其活性部位被封闭,只有经过 95℃ 10min 的热启动以后,封闭被解除,才能开始 DNA 链延伸,避免了普通 Taq 酶在室温下的非特异性扩增导致的杂讯,保证定量的准确性。

IHNV 是 RNA 病毒,以质粒 cDNA 作标准时,虽然存在样品的 RNA 提取和逆转录效率问题,但 cDNA 比较稳定,便于贮存和标准化。Hayward^[14]等认为尽管对不同的目的片段 RT 效率相差很大,但对于同一个靶片段来说,其 RT 效率是稳定的。因此,本试验采用了质粒作为标准品,结果表明是可行的。

总之,本文建立的 IHNV 的荧光定量 RT-PCR 检测方法,操作简单,速度快,线性范围宽,定量准确,重复性好,可以在短时间内同时对大量样品进行定量检测,非常适合鱼类病毒快速检验检疫;在水产养殖业中,可以对 IHNV 进行早期诊断,及时切断其传播途径,从而保护水产养殖业的健康发展。

参考文献:

- [1] Niu L Q, Zhao Z Z. The epidemiological IHN and IPN of rainbow trout in northeast China [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1988, 12:327—332 [牛鲁祺,赵志壮. 东北地区虹鳟 IHN 和 IPN 流行病学的初步研究. 水产学报,1988, 12:327—332]
- [2] Kurath G, Ahern K G, Pearson G D, et al. Molecular cloning of the six mRNA species of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus, and gene order determination by R-loop mapping [J]. *J Virol*, 1985, 53: 462—468
- [3] Office International des Epizooties Paris France. OIE diagnostic manual for aquatic animal diseases (3rd edition) [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2000, 45 [世界动物卫生组织(OIE)编. 水生动物疫病诊断手册(第三版). 北京: 中国农业出版社. 2000, 45]
- [4] La Patra S E, Roberti K A, Rohovec J S, et al. Fluorescent antibody test for the rapid diagnosis of infectious hematopoietic necrosis [J]. *J. Aquat. Anim. Health*, 1989, 1: 29—36
- [5] Dixon P R, Hill B J. Rapid detection of fish rhabdoviruses by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Aquaculture*, 1984, 42: 1—12
- [6] Medina D, Chang P, Bradley T, Yeh M T, Sadasiv E. Diagnosis of infectious hematopoietic necrosis in Atlantic *Salmo salar* by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Dis. Aquat. Org*, 1992, 13: 147—150
- [7] González M P, Sánchez X, Ganga M A, et al. Detection of the infectious hematopoietic necrosis virus directly from infected fish tissues by dot blot hybridization with a non-radioactive probe [J]. *J Virol Methods*, 1997, 65: 273—279
- [8] Gao L Y, Shi X J, Liu H, et al. Detection of spring viremia of carp virus (SVCV) gene using reverse-polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26: 452—456 [高隆英,史秀杰,刘荏,等. 用 RT-PCR 法快速检测鲤春病毒血症病毒基因. 水生生物学报, 2002, 26: 452—456]
- [9] Arakawa C K, Deering R E, Higman K H, et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus [J]. *Dis. Aquat. Org*, 1990, 8: 165—170
- [10] Chiou P P, Drolet B S, Leong J C. Polymerase chain amplification of infectious hematopoietic necrosis virus RNA extracted from fixed and embedded fish tissue [J]. *J. Aquat. Anim. Health*, 1995, 7: 9—15
- [11] Kim C H, Dummer D M, Chiou P P, et al. Truncated particles produced in fish surviving infectious hematopoietic necrosis virus infection: mediators of persistence [J]? *J Virol*, 1999, 73: 843—849
- [12] Murta A, Sylvia R, Sara I, et al. Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus [J]. *J Virol Methods*, 1999, 81: 1—9
- [13] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Res*, 1996, 6: 986—994
- [14] Hayward A L, Oefner P J, Sabatini S, et al. Modeling and analysis of competitive RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 1998, 26 (11): 2511—2518

REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR ASSAY FOR DETECTION OF IHNV IN FISH

YUE Zhi-Qin¹, LIU Hong², LIANG Cheng-Zhu¹, GAO Hong-Wei¹, XU Biao¹,
DENG Ming-Jun¹ and JIANG Yu-Lin²

(1. Qingdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002; 2. Shenzhen Entry-Exit Inspection
and Quarantine Bureau, Shenzhen 518010)

Abstract : A real-time quantitative RT-PCR assay was developed for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). Primers and probe were designed based on the nucleocapsid gene of IHNV by Primer Express 2.0 software. The plasmid containing the target sequence was constructed to detect the sensitivity and prepare the standard curve. The real-time RT-PCR assay had a detection limit of 5 copies, with a dynamic range of detection between 5×10^6 —5 copies. The standard curve was prepared based on the linear relationship between the amount of plasmid DNA and cycle threshold (Ct). The primers and probe were specific for IHNV and did not react with either spring viremia of carp virus (SVCV), viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), infectious pancreatic necrosis (IPNV), grass carp reovirus (GCRV), epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV), EPC cell line or fish tissue RNA. Collected samples were detected with the real-time RT-PCR assay and three positive samples were used for quantitative analysis. The real-time RT-PCR assay that described here with high sensitivity, specificity and accuracy is considered to be a powerful tool for the rapid detection and quantification of IHNV in fish.

Key words : IHNV; Real-time quantitative RT-PCR; Taqman probe