

牙鲆弹状病毒环介导等温扩增 检测方法的建立与应用

孙颖杰^{1,2} 岳志芹³ 刘 荭⁴ 赵玉然³
史秀杰⁴ 梁成珠³ 吴 斌² 李 叶² 王 哲^{1**}

1. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001;
3. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266002; 4. 深圳出入境检验检疫局, 深圳 518001

摘要 建立了牙鲆弹状病毒的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法, 首先根据牙鲆弹状病毒的糖蛋白的基因保守序列, 利用 Primer Explorer V3 软件设计了6条引物, 并对LAMP反应温度和反应时间等条件进行了优化。该方法的检测限为30 fg RNA, 比常规RT-PCR灵敏度高100倍, 与鲤春血症病毒、传染性胰脏坏死病毒、传染性造血器官坏死病毒、海洋双RNA病毒、病毒性出血败血症病毒以及病毒性神经坏死病毒等没有交叉反应。该方法检测时间短, 在1 h内即可完成检测。用建立的LAMP方法对临床鱼样进行了检测, 结果表明40尾石鲈样品中有3尾感染HRV, 与病毒分离结果一致, 说明LAMP方法比较适合牙鲆弹状病毒的早期及现场诊断。

关键词 牙鲆弹状病毒; 环介导等温扩增; 聚合酶链式反应; 检测

中图分类号 Q 937.47 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0203-05

弹状病毒是硬骨鱼类病毒中数量最多的群体之一, 它与水产养殖的流行病及重大经济损失有关^[1]。牙鲆弹状病毒(hirame rhabdovirus, HRV), 属于弹状病毒科, 诺拉弹状病毒属, 病毒粒子呈枪弹形, 大小为80 nm × (160 ~ 180) nm。患病鱼体表和鳍部充血, 腹部膨大且内有腹水, 肌肉、鳍基部可见点状出血, 生殖腺淤血, 脑出血。HRV主要感染海水鱼类, 最早于1984年在日本兵库县从牙鲆和香鱼中分离得到^[2], 在黑鲷和鲈鱼中也分离到HRV^[3-4], 1997年韩国南部海域的牙鲆中分离到了该病毒^[5]。桂朗、孙颖杰等分别从国内养殖的牙鲆、石鲈鱼中分离到了该病毒, 并进行了理化性质等的研究^[6-7]。HRV的基因组全序列大小约为11 kb, 包含5种主要的基因, 分别为核蛋白基因、磷酸化蛋白基因、基质蛋白基因、糖蛋白基因以及RNA依赖的RNA聚合酶蛋白基因^[8]。

牙鲆弹状病毒的诊断方法主要为细胞培养分离病毒, 操作繁琐, 周期长, 不能满足快速、敏感、准确

的检测需求。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是日本学者Notomi等于2000年开发的一种新颖的恒温核酸扩增方法^[9]。LAMP技术因其具有高特异性、高效率 and 快速反应的特点, 目前被广泛应用于检测鱼类的各种病原体, 如鲤春血症病毒^[10]、病毒性出血败血症病毒^[11]、传染性造血器官坏死病毒^[12]、虹彩病毒^[13]等。本文建立了HRV的环介导等温扩增检测技术, 为HRV提供快速、敏感、特异的检测方法, 可以进行病毒的现场即时检测。

材料与方 法

试验材料

HRV病料由笔者所在实验室从石鲈鱼中分离鉴定, 采用EPC细胞系进行病毒的增殖^[7]。用于特异性分析的鲤春血症病毒(spring viraemia of carp virus, SVCV)、传染性胰脏坏死病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)、传染性造血器官

收稿日期: 2010-01-04; 修回日期: 2010-02-28

* 国家质量监督检验检疫总局科研项目(2009IK002, 2007IK267)资助

** 通讯作者. E-mail: wangzhe500518@sohu.com

孙颖杰, 女, 1958年生, 研究员. 研究方向: 出入境动物检验检疫. E-mail: sunyj@inciq.gov.cn.

坏死病毒(infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV)、海洋双 RNA 病毒(marine birnavirus, MABV)、病毒性出血败血症病毒(viral haemorrhagic septicemia virus, VHSV)、病毒性神经坏死病毒(viral nervous necrosis virus, VNNV)均为笔者所在实验室保存。

试剂与仪器

Bst DNA Polymerase 和 10 × ThermoPol buffer 购自纽英伦生物技术(北京)有限公司; Betaine 购自美国 Sigma 公司; DL2000 DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 和琼脂糖购自美国 Promega 公司; SYBR Green 购自厦门百维信公司, Premix Taq E 混合液购自大连 TaKaRa 公司。

Eppendorf 5810R 离心机, Amersham pharmacia 电泳仪, 三孔恒温水浴锅, Eppendorf 梯度 PCR 仪, Alphamager 2200 凝胶成像仪, PICO 分光光度计。

提取

取鱼的肾、脾、脑等组织混合匀浆, 采用 SV TOTAL RNA Isolation kit for RNA viruses 提取试剂盒(Promega, USA), 按照说明书进行病毒 RNA 的提取, -20 °C 冰箱保存备用。

引物设计

选取牙鲈弹状病毒的糖蛋白(glycoprotein)基因序列, 用 Primer Explorer V3 软件(<http://primerexplorer.jp/elamp3.0.0/index.html>)设计 6 条引物, 分别为正向内引物(FIP)、反向内引物(BIP)、正向外引物(F3)、反向外引物(B3)、正向环引物(LF)及反向环引物(LB), 引物序列见表 1。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of the primers

引物名称 Primers	序列(5' - 3') Nucleotide sequences (5' - 3')
FIP	TTGGCCCCAAAGAACCCTGTTTTGGGG- GAA TACGTCCACAAG
BIP	GAGATGAAACTGGCCCCA GGTTTTAGTA- CA GTGCTGAGGCTGT
F3	GGGAACAA TCTTGGGGACAT
B3	CA TTGGCACCTTGGAGCT
LF	AACATGTGGTTCGGTAAAGGAC
LB	GTGGGAGTGATGACACCACG

反应体系优化及扩增产物检测

RT-LAMP 的反应体系包括: 2.5 μL 10 × ThermoPol buffer, 1.6 μmol/L FIP、BIP, 0.2

μmol/L F3、B3, 0.8 μmol/L LF、LB, 2 mol/L Betaine, 4 μL 10 mmol/L dNTP, 6 mmol/L MgSO₄, 0.5 μL 200 U Reverse Transcriptase M-MLV (in-vitrogen), 0.5 μL 40 U Ribonuclease inhibitor (TaKaRa), 1 μL 8 U Bst DNA 聚合酶(New England Biolabs), 2 μL 模板混匀筒短离心。将该反应混合物分别在 59、60、61、62、63、64 和 65 °C 反应 1 h 进行 LAMP 反应以优化反应温度, 之后 82 °C 10 min 以终止反应。

为了确定环引物对反应时间的影响, 分别采用 4 条引物(FIP, BIP, F3, B3)和 6 条引物(FIP, BIP, F3, B3, LF 和 LB)的反应体系, 在 63 °C 条件下, 分别反应 25、35、45、55、60、65、75、85 和 95 min。

对扩增产物通过凝胶电泳法及荧光染料法进行检测^[14]。电泳法若有典型的梯形条带则表明发生了扩增反应。SYBR GREEN 荧光染料法若颜色变绿, 则发生扩增反应; 若保持橙色不变, 则没有发生扩增反应。

特异性分析

分别取 VHSV、IHNV、SVCV、IPNV、MABV 和 VNNV 的核酸, 以其为模板进行 LAMP 反应, 同时以水为模板设置空白对照。琼脂糖凝胶电泳法及 SYBR Green 法观察结果, 检测方法的特异性。

灵敏度分析及与常规 RT-PCR 的比较

取牙鲈弹状病毒 RNA, 分光光度计检测其浓度为 3 × 10⁷ fg, 将其进行 10 倍梯度系列稀释, 得到模板质量浓度分别为: 3 × 10⁷、3 × 10⁶、3 × 10⁵、3 × 10⁴、3 × 10³、3 × 10²、3 × 10¹ fg, 进行 LAMP 与常规 RT-PCR 反应, 以确定并比较二者的检测限。

常规 RT-PCR 采用 LAMP 的外引物 F3 和 B3 进行扩增, 产物长度为 199 bp。常规 RT-PCR 反应体系包括: 2 μL 5 × M-MLV buffer (TaKaRa, 大连), 0.5 μL 10 mmol/L dNTP (TaKaRa, 大连), 0.5 μL 40 U Ribonuclease inhibitor (TaKaRa), 0.5 μL 200 U Reverse Transcriptase M-MLV (TaKaRa, 大连), 12.5 μL 2 × Premix Taq 混合液 (TaKaRa, 大连), 0.4 μmol/L F3, 0.4 μmol/L B3, 2.0 μL RNA 模板, 补水至 25 μL。PCR 反应程序为: 48 °C 30 min; 94 °C 5 min; 之后 94 °C 30 s, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min 共进行 40 个循环, 最后 72 °C 终止 10 min。

鱼样检测结果

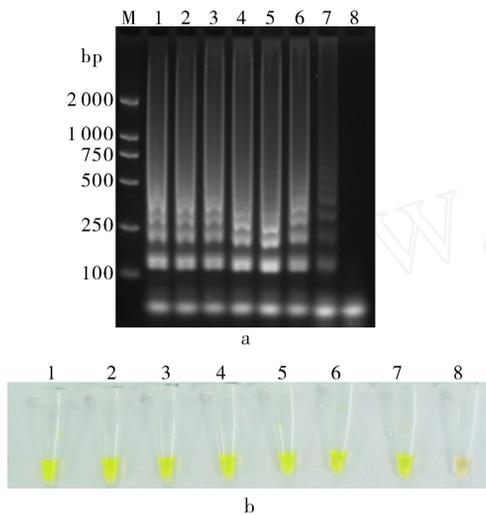
用建立的 LAMP 反应方法检测 40 尾待检的石鲈鱼, 在检测过程中, 以 HRV RNA、水为模板, 分

别作为阳性对照和空白对照。同时采用病毒分离法比较与 LAMP 的检测结果。

结果与分析

的反应体系优化结果

1) 反应温度的优化。LAMP 反应在 59、60、61、62、63、64 及 65 都有扩增,且扩增产物量接近,表明设计的引物好,反应条件宽松。但在 63 时梯形条带的产量更高,因此确定优化的 LAMP 反应温度为 63,电泳结果及 SYBR Green 检测结果见图 1。



a. 琼脂糖凝胶电泳图谱 Agarose gel electrophoresis pattern; b. SYBR Green 检测结果 Visual detection of HRV LAMP using SYBR Green; M. DL2000 DNA marker; 1~7. 温度分别为 59、60、61、62、63、64 和 65 1~7 represent reactions at 59, 60, 61, 62, 63, 64 and 65, respectively; 8. 空白对照 Blank control.

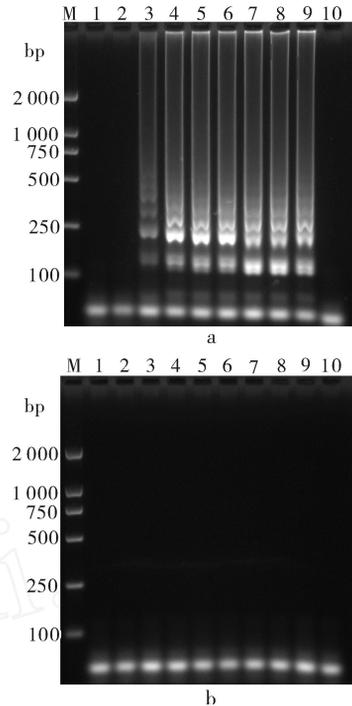
图 1 HRV LAMP 反应温度的优化

Fig. 1 Optimization of reaction temperature of HRV LAMP assay

2) 反应时间的优化。在环引物存在的条件下,反应至 45 min 就可见明显的扩增,而在无环引物存在时,LAMP 在反应时间到 95 min 时仍无扩增产物(图 2)。表明在环引物存在的条件下可以缩短反应时间。为了对低浓度的样本能够进行有效检测,在本试验中采用了 60 min 的反应时间。

特异性试验结果

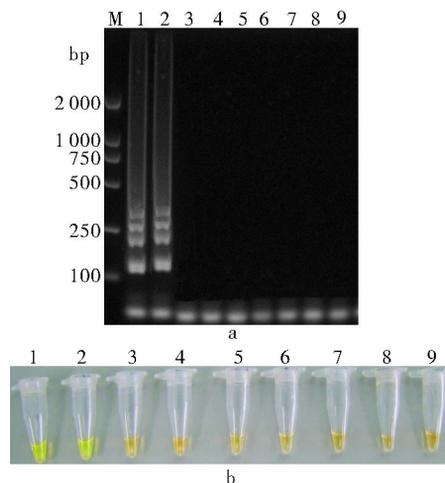
LAMP 反应检测 HRV 的特异性试验中,只有 HRV 出现典型的梯形扩增条带;而其它 6 种病毒 VHSV、IHNV、SVCV、IPNV、MABV 和 VNNV 都没有扩增,说明设计的 LAMP 引物具有良好的特异性。琼脂糖凝胶电泳结果和 SYBR Green 检测结果见图 3。



a. 6 条引物(有环引物)扩增结果 Agarose gel electrophoresis pattern of amplification with six primers (FIP, BIP, F3, B3, LB, LF); b. 4 条引物(无环引物)扩增结果 Agarose gel electrophoresis pattern of amplification with four primers (FIP, BIP, F3, B3) M. DL2000 DNA marker; 1~9. 代表反应时间分别为 25、35、45、55、60、65、75、85 和 95 min 1~9 represent reactions at 25, 35, 45, 55, 60, 65, 75, 85 and 95 min; 10. 空白对照 Blank control.

图 2 HRV LAMP 的扩增时间的优化

Fig. 2 Optimization of reaction time of HRV LAMP assay



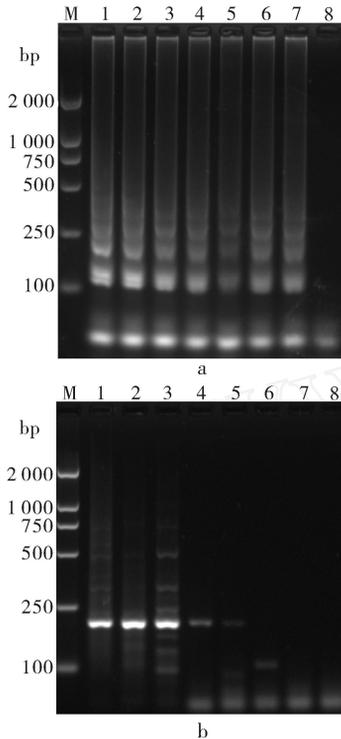
a. 琼脂糖凝胶电泳结果 Agarose gel electrophoresis pattern; b. SYBR Green 检测结果 Visual detection of LAMP using SYBR Green; M. DL2000 DNA marker; 1~2. HRV; 3. VHSV; 4. IHNV; 5. SVCV; 6. IPNV; 7. MABV; 8. VNNV; 9. 空白对照 Blank control.

图 3 HRV LAMP 的特异性试验

Fig. 3 Specificity test for HRV LAMP assay

灵敏度分析与常规检测限的比较结果

LAMP 法与常规 PCR 灵敏度检测结果见图 4。其中 LAMP 能检测到 30 fg HRV RNA, 而 RT-PCR 的检测限为 3×10^3 fg HRV RNA, LAMP 的检测限比 RT-PCR 高 100 倍。



a. LAMP 的琼脂糖电泳结果 Agarose gel electrophoresis of LAMP products; b. RT-PCR 的琼脂糖电泳结果 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products; M. DL2000 DNA marker; 1~7. HRV RNA 浓度分别为: 3×10^7 , 3×10^6 , 3×10^5 , 3×10^4 , 3×10^3 , 3×10^2 , 30×10^1 fg; 1~7. 3×10^7 , 3×10^6 , 3×10^5 , 3×10^4 , 3×10^3 , 3×10^2 , 3×10^1 fg of HRV RNA; 8. 空白对照 Blank control.

图 4 HRV LAMP 的灵敏度试验

Fig. 4 Sensitivity test for HRV LAMP assay

鱼样检测结果

用建立的 LAMP 反应方法检测 40 尾待检鱼样。其中阳性对照有扩增, 而空白对照没有扩增, 表明检测过程符合质量控制的要求, 可以排除假阳性和假阴性。LAMP 结果显示, 3 尾石鲈样品感染 HRV, 与病毒分离结果一致。

讨论

糖蛋白 (glycoprotein, G) 基因是弹状病毒的重要组成部分, 本研究选取 G 基因序列设计引物, 经过 Blast 搜索, 引物可与 GenBank 中已公布的 HRV 序列 U24073、AB103462、AF104985、NC_005093

等完全匹配, 表明所建立的方法对牙鲈弹状病毒韩国株和中国株都能有效地检测。建立的牙鲈弹状病毒的 LAMP 检测方法, 与诺拉弹状病毒属 (*Norvirhabdovirus*) 的 IHNV 和 VHSV、水泡性病毒属 (*Vesiculovirus*) 的 SVCV 都没有交叉反应 (IHNV、VHSV、SVCV 与牙鲈弹状病毒同属弹状病毒科); 与亲缘关系较远的 IPNV、MABV、VNNV 也无交叉反应, 表明设计的引物特异性好, 能够满足检测要求。

本试验中, 2 条环引物的存在可以使反应时间在 45 min 即有扩增产物, 而没有环引物时反应时间到 95 min 亦无扩增产物。环引物的存在可以明显加快反应速度, 其主要原理是 LB 的引物位置位于 B1 和 B2 之间, 方向为 B1 → B2, 环引物可以与茎环结构杂交, 启动 DNA 合成中的链置换过程, 从而缩短反应时间^[14]。

在灵敏度试验中, LAMP 能检测到 10^{-6} 稀释度, 约为 30 fg, 而常规 RT-PCR 的检测限为 10^{-4} 稀释度, LAMP 比常规 RT-PCR 的检测限还要高出 100 倍, 说明其具有良好的检测灵敏度。扩大试验中, 40 尾样品的 LAMP 检测结果与病毒分离结果一致, 表明 LAMP 方法具有较高的准确度。

本文建立的 HRV 的环介导等温扩增检测方法, 具有检测特异性好、灵敏度高、检测快速、方便、准确等优点, 从核酸提取、核酸扩增到完成检测只需要 2 h, 不需要昂贵的仪器, 仅凭肉眼观察即可进行结果判断, 非常适用于在养殖场、出入境口岸等进行 HRV 的现场即时检测, 可以保护我国水产养殖业的可持续发展和水生动物贸易的发展。

参考文献

- [1] ESSBAUER S, AHNE W. Viruses of lower vertebrates [J]. J Vet Med B, 2001, 48(6): 403-475.
- [2] KIMURA T, YOSHIMIZU M, GORIE S. A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hiram (Japan flounder) *Paralichthys olivaceus* and ayu *Plecoglossus altivelis* [J]. Dis Aquat Org, 1986, 1: 209-217.
- [3] SANO T, FU KUDA H. Principal microbial disease of mariculture in Japan [J]. Aquaculture, 1987, 67: 59-70.
- [4] YOSHIMIZU M, NISHIZAWA T, OSEKO N, et al. Rhabdovirus disease of hiram (Japanese flounder) [J]. Fish Pathol, 1987, 22: 54-55.
- [5] OH M J, SIM D S, SOHN S G, et al. Effects of environmental seawater on the infectivities of HRV (habdovirus liivaceus), FBV (flounder birnavirus) and RVS (rerovirus of salmonid) [J]. J Fish Path, 1997, 10: 165-176.

- [6] 桂朗,李正秋,张奇亚. 牙鲆一种弹状病毒病原的分离与鉴定[J]. 水生生物学报,2007,31(3):345-353.
- [7] 孙颖杰,江育林,刘荭,等. 石鲈鱼鱼苗中一种弹状病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽医学报,2009,29(3):277-232.
- [8] KIM D H,OH H K,EOU J I,et al. Complete nucleotide sequence of the hirame rhabdovirus, a pathogen of marine fish [J]. Virus Res,2005,107(1):1-9.
- [9] NOTOMI T,OKAYAMA H,MASUBUCHI H,et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res,2000,28(12):63.
- [10] LIU Z,TENG Y,XIE X,et al. Development and evaluation of a one-step loop-mediated isothermal amplification for detection of spring viraemia of carp virus[J]. J Appl Microbiol,2008,105:1220-1226.
- [11] SOLIMAN H,MATBOULIM E I. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS) [J]. Vet Microbiol,2006,114(3/4):205-213.
- [12] GUNIMALADEVI I,KONO T,LAPATRA S E,et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Arch Virol,2005,150(5):899-909.
- [13] CAIPANG C M,HARAGUCHI I,OHIRA T,et al. Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. J Virol Methods,2004,121(2):155-161.
- [14] 李琼,岳志芹,凌宗帅,等. 淋巴囊肿病毒环介导等温扩增检测方法的建立与应用[J]. 华中农业大学学报,2009,29(3):341-345.

Development and Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification for Fast Detection of Hirame Rhabdovirus

SUN Ying-jie^{1,2} YUE Zhi-qin³ LIU Hong⁴ ZHAO Yu-ran³ SHI Xiu-jie⁴
LIANG Cheng-zhu³ WU Bin² LI Ye² WANG Zhe¹

1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;
2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China;
3. Technical Center, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;
4. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518001, China

Abstract A set of six specific primers were designed based on glycoprotein gene of hirame rhabdovirus (HRV) using Primer Explorer V3 software. The parameter of reaction time and temperature was optimized. The primers were specific with HRV and could not amplify spring viraemia of carp virus (SVCV), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV), marine birnavirus (MABV), viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) or viral nervous necrosis virus (VNNV). The detection limit of LAMP assay was approximately 30 fg HRV RNA, which was 100-fold higher than that of conventional RT-PCR. The LAMP reaction could be finished within an hour and clinical fish samples were detected using LAMP. The results showed that 3 fish out of 40 samples were infected with HRV by LAMP assay, which was consistent with virus isolation method. The LAMP assay has great potential in field diagnosis of early HRV infection.

Key words hirame rhabdovirus (HRV); loop-mediated isothermal amplification (LAMP); RT-PCR; detection

(责任编辑:边书京)