

中国大菱鲆虹彩病毒 (TRBIV) PCR 检测方法的建立及其应用

史成银, 黄捷, 杨冰, 刘莉

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 大菱鲆红体病虹彩病毒 (turbot reddish body iridovirus, TRBIV) 是中国工厂化养殖大菱鲆的主要病毒性病原之一。本研究提取了该病毒 DNA, 依据其主要衣壳蛋白基因序列设计了 PCR 引物, 优化了 PCR 反应参数, 建立了 TRBIV 的 PCR 检测方法, 测试了该方法的特异性和灵敏度, 并应用该方法开展了 TRBIV 的流行情况调查及研究了大菱鲆的外观症状 (红体) 与 TRBIV 感染的关系。结果显示, 本研究建立的 TRBIV PCR 检测方法可以从相当于 100 ng 病鱼组织或 10^3 数量级的病毒粒子中检出 TRBIV, 也可以在不杀死被测鱼的情况下, 仅从鱼体中抽取少量血液即可在 1 天的时间内完成大量样品的 TRBIV 检测, 但不能从健康大菱鲆脾组织和患淋巴囊肿牙鲆的囊肿组织中扩增出任何产物, 说明该方法具有很高的灵敏性和特异性; 在所调查的山东半岛 5 家大菱鲆养殖场的 19 尾大菱鲆中, 7 尾为 TRBIV 阳性或弱阳性; 具有“红体”症状的大菱鲆应当划分为“病毒性红体病”、“细菌性红体病”和“非病原性红体症”3 种不同的类型。本研究为 TRBIV 的流行情况和传播途径调查、疾病的快速诊断和控制提供了技术手段; 调查结果显示 TRBIV 已遍布山东半岛沿海地区的大菱鲆主产区, 在地域上相距较远的多个大菱鲆养殖场流行, 今后需要密切关注该病毒的传播和流行。[中国水产科学, 2008, 15(5): 830-836]

关键词: 大菱鲆; 虹彩病毒; 主要衣壳蛋白基因; PCR; 检测

中图分类号: S943

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)05-0830-07

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 是中国北方最重要的工厂化海水养殖鱼类。从 2001 年开始, 在中国养殖大菱鲆中流行一种“病毒性红体病 (Viral reddish body syndrome, VRBS)”, 其病原是大菱鲆红体病虹彩病毒 (Turbot reddish body iridovirus, TRBIV)^[1-3]。研究表明, TRBIV 是一种鱼类虹彩病毒, 其分类地位与真鲷虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus, RSIV) 和传染性脾肾坏死病毒 (Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 相近, 是虹彩病毒科 (Iridoviridae) 细胞肿大病毒属 (*Megalocytivirus*) 的 1 个新成员^[4]。

疾病调查发现, 患 VRBS 的大菱鲆外观病变症状并不明显, 病鱼体表一般无明显损伤, 仅鱼体腹面沿脊椎骨附近皮下淤血、发红, 鳍及鳍基部充血、发红。在生产实践中, 由于尚没有合适的 TRBIV 检测技术, 养殖业者通常只能凭经验将病鱼腹面发红作为诊断该病的主要依据。为了迅速、准确地进行大

菱鲆虹彩病毒的检测和疾病的诊断, 为大菱鲆虹彩病毒病的研究和防治提供重要的工具, 在 TRBIV 主要衣壳蛋白 (Major capsid protein, MCP) 基因研究的基础上, 本研究开展了 TRBIV 的 PCR 检测技术的开发。通过 PCR 引物的筛选、反应参数的优化、检测方法特异性和灵敏度测定等一系列研究, 建立了一种快速、准确、灵敏的 TRBIV PCR 检测方法, 并应用该方法开展了 TRBIV 的流行情况调查。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验用患病毒性红体病大菱鲆分别取自山东省威海市乳山和烟台市莱州的 2 个大菱鲆养殖场, 病鱼具有典型的红体病症状。取病鱼的部分脾脏切成小块置于 2.5% 的多聚甲醛-戊二醛固定液中, 供制作超薄切片使用; 将病鱼的其余脾脏、肾脏等组织冷冻于 -80 °C 冰箱中供提取组织 DNA 使用。从山东省青岛市城阳、烟台市莱州、河北省唐山市

收稿日期: 2007 09 13; 修订日期: 2008 01 15.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471338); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2006CB101802); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项.

作者简介: 史成银 (1971-), 男, 副研究员, 博士, 从事水生生物疾病与控制研究. E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

的多家大菱鲆养殖场取数尾健康大菱鲆, 用上述方法做同样处理, 作为病毒感染的阴性对照样品。患暴发病鳊 (*Siniperca chuatsi*) 的脾组织由中国水产科学研究院珠江水产研究所惠赠, 作为虹彩病毒阳性对照样品。中国养殖牙鲆的淋巴囊肿组织由国家海洋局第一海洋研究所惠赠, 作为虹彩病毒阴性对照样品。

1.2 PCR引物设计

根据已测定的 TRBIV MCP 编码区 DNA 序列, 设计了以下 PCR 引物: MCP TRBIVF (5'-CGTGT TAAGATCCCCTCC-3') 和 MCP TRBIVR (5'-TCT CGTAAATGAGTGACACC-3'), 用于扩增 TRBIV MCP 编码区的 247~1 027 bp 间的区域, 预期扩增产物 781 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 DNA的提取和PCR扩增

取实验鱼组织各 50 mg, 用 High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH 公司) 提取组织总 DNA 作为 PCR 反应的模板, 具体操作按试剂盒说明书进行, 最后溶解在 40 μ L 洗脱液 (10 mmol/L Tris 缓冲液, pH 8.5) 中。

PCR 扩增的总体积为 20 μ L, 反应体系包括: Taq DNA 聚合酶 1 U, 4 种 dNTP 各 250 μ mol/L, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, KCl 40 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 1~2 μ L 模板 DNA, 引物 MCP TRBIVF 和 MCP TRBIVR 各 10 pmol。PCR 扩增参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 59 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增使用英国 Thermo Hybaid 公司的梯度 PCR 仪 (PCR Express) 进行。反应结束后, 取 10 μ L 反应产物在含 0.5 μ g/mL 溴化乙啶的 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 置于紫外灯下观察、拍照。

1.4 TRBIV PCR检测方法的最佳复性温度的确定

为了确定 TRBIV PCR 扩增过程中的引物最佳复性温度, 优化 PCR 检测条件, 采用英国 Thermo Hybaid 公司的梯度 PCR 仪 (PCR Express) 进行了不同复性温度下病鱼样品的 PCR 扩增。以取自山东省烟台市莱州某养殖场的患病毒性红体病大菱鲆的脾组织 DNA 作为 PCR 扩增模板, 分别采用 56.1 $^{\circ}$ C、57.4 $^{\circ}$ C、59.0 $^{\circ}$ C、60.5 $^{\circ}$ C、62.2 $^{\circ}$ C 和 64.0 $^{\circ}$ C 的复性温度进行 PCR 扩增; 同时以健康大菱鲆脾组织 DNA 为模板, 在 59 $^{\circ}$ C 的复性温度下进行 PCR 扩增,

作为阴性对照。反应体系和其他反应参数同 1.3。

1.5 TRBIV PCR检测方法的特异性和灵敏度测定

分别取健康大菱鲆、病毒性红体病大菱鲆、暴发病鳊的脾、肾组织和淋巴囊肿牙鲆的体表囊肿组织, 按 1.3 所述方法提取 DNA。取制备的 DNA 样品各 2 μ L 进行 PCR 扩增, 测试 TRBIV PCR 检测方法的特异性。

制备患病毒性红体病大菱鲆的脾脏组织匀浆液, 并以无菌 PBS (pH 7.2) 进行 10 倍梯度稀释, 使其终质量浓度分别相当于 100 μ g/ μ L、10 μ g/ μ L、1 μ g/ μ L、100 ng/ μ L、10 ng/ μ L、1 ng/ μ L。然后按 1.3 所述方法分别提取 DNA, 并各取 1 μ L 作为 PCR 扩增的模板进行 PCR 扩增, 测试 TRBIV PCR 检测方法对病鱼组织检测的灵敏度。

取纯化的含 TRBIV MCP 基因的重组 pUCm-T 质粒 (大小约 4.35 kb, 由本实验室提供), 以无菌双蒸水进行 10 倍梯度稀释, 使其终质量浓度分别为 5 ng/ μ L、500 pg/ μ L、50 pg/ μ L、5 pg/ μ L、500 fg/ μ L、50 fg/ μ L、5 fg/ μ L、0.5 fg/ μ L。各取 2 μ L 以上样品作为 PCR 扩增的模板, 按 1.3 所述进行 PCR 扩增, 测定 TRBIV PCR 检测方法对病毒基因检测的灵敏度。

1.6 应用TRBIV PCR检测方法从病鱼血液样品中检测TRBIV

取 1 尾患病毒性红体病大菱鲆的肾脏组织 50 mg 和血液样品 200 μ L, 分别按 1.3 所述方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增, 测试 TRBIV PCR 检测方法对病鱼血液样品检测的有效性。

1.7 应用TRBIV PCR检测方法调查TRBIV的流行情况

从山东半岛的烟台市莱州、蓬莱, 威海市乳山和潍坊市昌邑等 5 家大菱鲆养殖场采集 19 尾大菱鲆, 这些大菱鲆多数具有轻重不一的红体症状, 少数病鱼外观没有任何的异常症状。取鱼的脾脏或肾脏, 分别按 1.3 所述方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增, 调查 TRBIV 在山东半岛大菱鲆养殖场的流行情况。

2 结果与分析

2.1 TRBIV PCR检测方法的建立和最佳复性温度的确定

将用于建立 TRBIV PCR 检测方法的患红体病大菱鲆脾脏制成超薄切片, 应用透射电子显微镜进行观察, 发现病鱼脾细胞的细胞质内存在大量的病

毒粒子,其形态和特征与中国大菱鲆虹彩病毒完全一致,证明该病鱼受到了 TRBIV 的严重感染(图 1)。而从健康大菱鲆脾脏的超薄切片上未观察到任何 TRBIV 病毒粒子。

使用 TRBIV 的特异性引物 MCP-TRBIVF 和 MCP-TRBIVR,可以从患病毒性红体病大菱鲆的脾、肾组织中扩增出约 780 bp 的目标 DNA 片段,与预期大小相符,而从健康大菱鲆脾脏组织 DNA 样品中未能扩增出任何产物(图 2)。PCR 检测结果与电镜观察结果相一致,说明该方法作为检测大菱鲆 TRBIV 感染的手段是有效的。

此外,当复性温度在 56.1~64.0 °C 内变动时,TRBIV PCR 扩增的特异性和效率都无明显变化,各反应均可从病鱼脾脏组织中扩增出特异性的目标片段。本研究选择 59 °C 为 TRBIV PCR 检测方法的最佳复性温度。

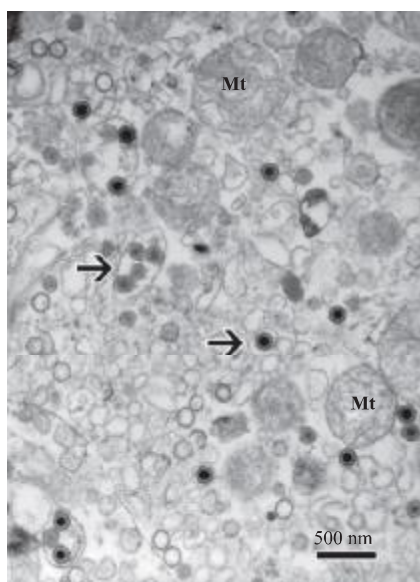


图 1 用于建立 TRBIV PCR 检测方法的患者病毒性红体病的大菱鲆脾脏超薄切片

病变脾脏细胞的细胞质内可见大量的 TRBIV 病毒粒子(实心箭头所指); Mt: 线粒体。

Fig. 1 Transmission electron micrograph of spleen tissues from turbot infected by TRBIV

Numerous virions of TRBIV (solid arrow) distributed throughout the cytoplasm which can be detected by PCR method developed in this study. Mt: mitochondria.

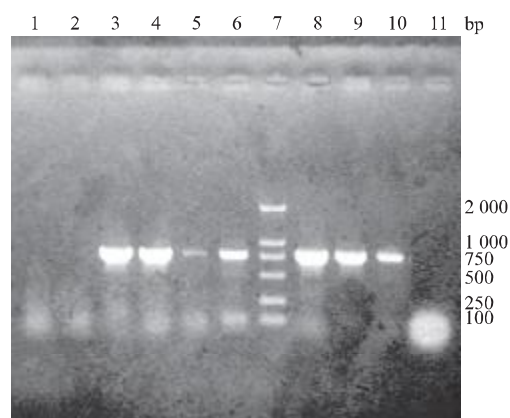


图 2 TRBIV 的 PCR 检测方法的特异性分析结果

1~2: 2 尾健康大菱鲆脾组织, 河北省唐山市; 3: 病毒性红体病大菱鲆脾组织, 山东省威海市乳山; 4: 病毒性红体病大菱鲆肾组织, 山东省烟台市莱州; 5: 无明显红体症状的大菱鲆病鱼脾组织, 山东省烟台市莱州, 与泳道 4 的样品来自同一个养殖场; 6: 暴发病鳃的脾组织, 广东省广州市; 7: DNA 分子量标准 DL2000 (大连宝生物); 8~10: 病毒性红体病大菱鲆脾组织稀释液 (1/20、1/200、1/10 000), 山东省烟台市莱州, 与泳道 4 的样品来自同一尾大菱鲆病鱼; 11: 淋巴囊肿牙鲆体表的淋巴囊肿组织, 山东省。

Fig. 2 Specificity test result of PCR method for TRBIV detection

Lane 1, 2: spleen DNA from two healthy turbot of Tangshan, Hebei province; Lane 3: spleen DNA from diseased turbot of Rushan, Shandong province; Lane 4: kidney DNA from diseased turbot of Laizhou, Shandong province; Lane 5: spleen DNA from asymptomatic turbot of Laizhou, Shandong province; Lane 6: spleen DNA from *Siniperca chuatsi* of Guangzhou, Guangdong province infected by ISKNV; Lane 7: DNA ladder DL2000 (Takara); Lane 8~10: spleen DNA from diseased turbot of Laizhou, Shandong province, homogenates of spleen tissues were diluted by 1/20, 1/200 and 1/10 000, respectively by PBS before DNA extracting; Lane 11: negative control, skin DNA from lymphocystis flounder, Shandong province.

2.2 TRBIV PCR检测方法的特异性和灵敏度

应用本研究建立的 TRBIV PCR 检测方法, 对从健康大菱鲆、患病毒性红体病大菱鲆、患暴发病鳃的脾、肾组织和患淋巴囊肿牙鲆的体表囊肿组织中提取纯化的 DNA 进行扩增, 可从患病毒性红体病大菱鲆的脾、肾组织中扩增出约 780 bp 的目标 DNA 片段, 也可以从患暴发病鳃的脾组织中扩增出同样大小的目标产物, 但不能从健康大菱鲆脾组

组织和患淋巴囊肿牙鲆的囊肿组织中扩增出任何产物 (图 2)。以上结果说明, 该 TRBIV PCR 检测方法具有很高的特异性。

应用本研究建立的 TRBIV PCR 检测方法, 可以从 100 μg 、10 μg 、1 μg 、100 ng 的病鱼组织中扩增出约 780 bp 的目标片段, 但不能从 10 ng、1 ng 的病鱼组织中检测到 TRBIV; 同时, 作为阴性对照的健康大菱鲆脾组织 DNA 样品 (相当于 1 mg 脾组织) 的 PCR 扩增结果为阴性。表明本研究建立的

TRBIV PCR 检测方法可以从低至 100 ng 的病鱼脾组织中检测到 TRBIV 的存在 (图 3A)。

应用本研究建立的 TRBIV PCR 检测方法, 可以从 10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg 的 4.35 kb 重组 pUCm-T 质粒 (分别相当于 2.25×10^9 、 2.25×10^8 、 2.25×10^7 、 2.25×10^6 、 2.25×10^5 、 2.25×10^4 、 2.25×10^3 个拷贝) 中扩增出约 780 bp 的目标片段, 但不能从 1 fg 的重组质粒 (相当于 2.25×10^2 个拷贝) 中扩增出目标片段 (图 3B)。

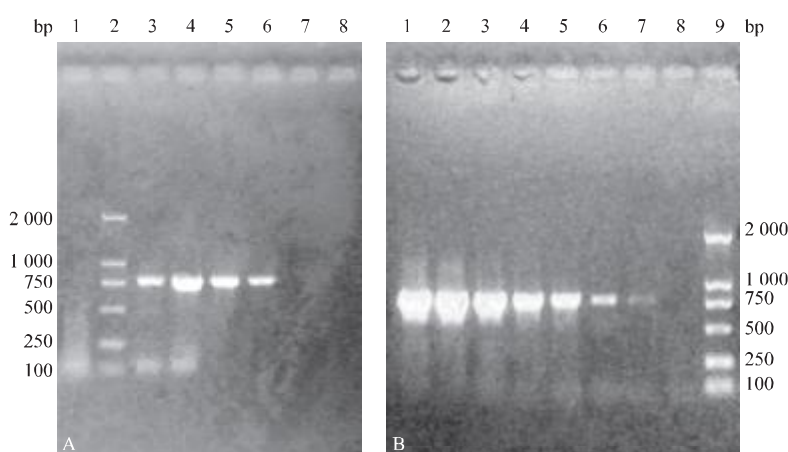


图 3 TRBIV 的 PCR 检测方法灵敏度的测定结果

A 对患病毒性红体病大菱鲆脾组织样品检测的灵敏度。1: 相当于 1 mg 脾组织的健康大菱鲆脾组织 DNA, 阴性对照; 2: DNA 分子量标准 DL2000 (大连宝生物); 3~8: 从梯度稀释的病鱼脾组织匀浆液中抽提的 DNA, 分别相当于 100 μg 、10 μg 、1 μg 、100 ng、10 ng、1 ng 病鱼组织, 低至 100 ng 的病鱼脾组织中的 TRBIV 亦可被检出。

B 对含 TRBIV MCP 基因的重组 pUCm-T 质粒检测的灵敏度。1~8: 梯度稀释的重组质粒, 分别相当于 2.25×10^9 、 2.25×10^8 、 2.25×10^7 、 2.25×10^6 、 2.25×10^5 、 2.25×10^4 、 2.25×10^3 、 2.25×10^2 个拷贝, 低至 2.25×10^3 个拷贝的病毒 MCP 基因亦可被检出; 9: DNA 分子量标准 DL2000 (大连宝生物)。

Fig. 3 Sensitivity test result of PCR method for TRBIV detection

A: Detecting TRBIV from spleen samples of diseased turbot. Lane 1: DNA extracted from 1 mg of spleen from healthy turbot, negative control; Lane 2: DNA ladder DL2000 (Takara); Lane 3~8: spleen DNA from diseased turbot, homogenates of spleen tissues were diluted by PBS before DNA extracting, the corresponding spleen tissue contents were 100 μg , 10 μg , 1 μg , 100 ng, 10 ng and 1 ng, respectively.

B: Detecting MCP gene of TRBIV from recombinant plasmid. Lane 1~8: recombinant plasmid containing MCP gene of TRBIV, the corresponding copies of plasmid were 2.25×10^9 , 2.25×10^8 , 2.25×10^7 , 2.25×10^6 , 2.25×10^5 , 2.25×10^4 , 2.25×10^3 and 2.25×10^2 , respectively; Lane 9: DNA ladder DL2000 (Takara).

2.3 病鱼血液样品的PCR检测结果

从同一尾患病毒性红体病大菱鲆的肾脏组织和血液中分别纯化 DNA 样品并进行 TRBIV 的 PCR 检测, 结果从 2 个样品中均扩增出了相似的约 780 bp 的目标条带 (图 4)。

2.4 TRBIV的流行情况

各大菱鲆养殖场 19 个大菱鲆组织样品的

TRBIV PCR 检测结果如图 5 所示。从图 5 可以看出, 有 4 个样品的 PCR 扩增结果呈强阳性 (泳道 3、11、13、14), 这些样品分别来自山东省烟台市莱州、蓬莱、威海市乳山等地的大菱鲆养殖场; 另有 3 个样品的 PCR 扩增结果呈弱阳性 (泳道 4、12、17); 其余 12 个样品的 PCR 扩增结果呈阴性 (泳道 1、2、5~10、16、18~20)。

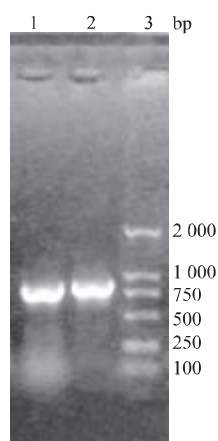


图4 患病毒性红体病大菱鲆血液 DNA 样品中的 TRBIV 检测

1: 从病鱼肾脏组织中提取的 DNA; 2: 从病鱼血液样品中提取的 DNA; 3: DNA 分子量标准 DL2000 (大连宝生物)。

Fig. 4 Detecting TRBIV from blood sample of diseased turbot by PCR method for the detection of TRBIV

Lane 1: kidney DNA from diseased turbot; Lane 2: blood DNA from the same diseased turbot; Lane 3: DNA ladder DL2000 (Takara).

3 讨论

PCR 检测技术作为一种灵敏的病原检测手段,已在许多虹彩病毒的检测中得到了应用^[5-9]。近年来,应用多重 PCR、套式 PCR、荧光实时定量 PCR、原位杂交以及 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification, 环介导的等温扩增) 等技术检测真鲷虹彩病毒、台湾石斑鱼虹彩病毒和大黄鱼虹彩病毒等也有相关报道^[8,10-13]。本研究建立的 TRBIV 的 PCR 检测方法,可以从感染 TRBIV 的 100 ng 病鱼组织或 10 fg 重组质粒 (相当于 2.25×10^3 个拷贝) 中扩增出特异性的目标片段,而对淋巴囊肿病毒和健康大菱鲆组织的检测呈阴性,证明该 PCR 检测方法对 TRBIV 具有高度的特异性和灵敏度。此外,本研究建立的从病鱼血液样品中检测 TRBIV 的 PCR 方法,可以在不杀死被测鱼的情况下,仅从鱼体中抽取少量血液即可在 1 d 的时间内完成大量样品的 TRBIV 检测,非常适合于对价格昂贵的大菱鲆亲鱼进行病毒检测。TRBIV PCR 检测方法的建立为 TRBIV 病毒的流行情况和传播途径调查、大菱鲆病毒性红体病的快速诊断和控制提供了技术手段。

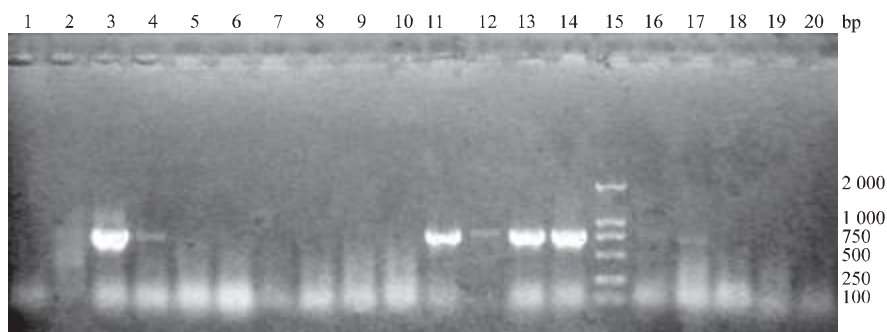


图5 山东半岛多家大菱鲆养殖场中 TRBIV 的流行情况调查结果

1~12: 莱州某养殖场大菱鲆; 13: 乳山某养殖场大菱鲆; 14: 蓬莱某养殖场大菱鲆; 15: DNA 分子量标准 DL2000 (大连宝生物); 16: 昌邑某养殖场大菱鲆; 17~20: 蓬莱另一家养殖场大菱鲆。

Fig.5 Investigation of prevalence of TRBIV in several turbot farms in Shandong peninsular by PCR method

Lane 1~12: spleen DNA from turbot of Laizhou; Lane 13: spleen DNA from turbot of Rushan; Lane 14: spleen DNA from turbot of Penglai (Farm A); Lane 15: DNA ladder DL2000 (Takara); Lane 16: spleen DNA from turbot of Changyi; Lane 17~20: spleen DNA from turbot of Penglai (Farm B).

本研究显示,患病毒性红体病大菱鲆的 TRBIV PCR 检测结果与病鱼外观“红体”症状在多数情况下是一致的。然而,在 19 尾大菱鲆病鱼样品中,有 2 尾样品,虽然呈现明显的红体症状,但其 TRBIV 的 PCR 检测经多次重复,结果始终为阴性 (图 5 中

的第 16 和 18 泳道)。这 2 尾大菱鲆样品分别来自山东省潍坊市昌邑和烟台市蓬莱的 2 个大菱鲆养殖场,全长分别为 12.5 cm 和 20 cm 左右。外观检查发现,这 2 尾大菱鲆病鱼鳍出血,鳍基部和腹面脊椎骨沿线充血发红,这些特征与大菱鲆病毒性红体病

的外观症状相似。但昌邑病鱼的鳃和肾脏鲜红, 肠壁充血发炎, 肠内有食物, 这些特征与大菱鲆病毒性红体病的特征明显不同^[3]。细菌分离结果显示, 病鱼可能受多种细菌的感染。因此, 这2尾外观症状呈现“红体”的大菱鲆病鱼, 不是患有由 TRBIV 感染引起的病毒性红体病, 而是患有由细菌感染引起的细菌性疾病。

养殖生产中, 通常把大菱鲆表现出的鳍基部和腹面脊椎骨沿线充血发红等“红体”症状通称为“大菱鲆红体病”, 但该“红体”症状实际上可由多种病原性或非病原性因素引起。多数情况下, 大菱鲆红体病是由病毒性病原 (TRBIV) 引起的, 此时可称之为“大菱鲆病毒性红体病”; 少数情况下大菱鲆红体病是由细菌性病原引起的, 此时应称之为“大菱鲆细菌性红体病”; 最后, 本研究通过调查发现, 在养殖水温过高时或鱼体死亡后不久, 大菱鲆有时也会表现出“红体”症状, 但这些“红体”症状是由非病原性因素引起的, 此时可称之为“大菱鲆非病原性红体症”。养殖大菱鲆表现出的病原性或非病原性外观“红体”症状可能是大菱鲆对环境胁迫产生的一种病理变化或应激反应。

类似的情况在对虾白斑综合征 (white spot syndrome, WSS) 的研究中早有发现。虽然对虾头胸甲的甲壳内表面出现许多白色斑点, 通常与对虾白斑综合征病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 的感染密切相关, 但有时头胸甲的甲壳内表面出现白色斑点的对虾, 其体内并没有 WSSV 的感染。研究证实, 这些白色斑点实际上主要是由一种细菌 *Bacillus subtilis* 的感染引起的, 这种“白斑病”实际上是“细菌性白斑综合征” (Bacterial white spot syndrome, BWSS)^[14]。

因此, 有必要强调, 由 TRBIV 引起的大菱鲆红体症才可称之为“大菱鲆病毒性红体病”。鉴于大菱鲆的“红体”症状可以由多种不同的原因引起, 而且轻度感染 TRBIV 的大菱鲆并不表现为“红体”症状, 因此仅仅依靠鱼体外观的“红体”症状来诊断大菱鲆病毒性红体病是不可靠的。TRBIV PCR 检测方法的建立对大菱鲆病毒性红体病的诊断具有重要的意义。

应用本研究建立的 TRBIV PCR 检测方法, 在多个大菱鲆养殖区进行了 TRBIV 的流行情况调查。结果发现, TRBIV 已在地域上相距较远的多个大菱鲆养殖场流行, 并且已遍布山东半岛沿海地区

的大菱鲆主产区, 甚至在河北唐山和福建东山等地的养殖大菱鲆中也有发现 (资料未显示)。这显示 TRBIV 已在中国各地养殖的大菱鲆中迅速蔓延, 对中国的大菱鲆养殖产业的健康发展构成了巨大的威胁。

近年来在东亚地区 (包括日本、韩国、中国台湾) 和东南亚地区 (包括中国广东、香港, 马来西亚、新加坡、泰国), 感染养殖鱼类的虹彩病毒频繁流行^[8,15-19], 它们大多属于虹彩病毒科细胞肿大病毒属, 与感染中国养殖大菱鲆的 TRBIV 在分类地位上相近。2003 年在韩国的养殖大菱鲆中也发现了一种虹彩病毒^[20], 通过对韩国大菱鲆虹彩病毒和中国 TRBIV MCP 基因核苷酸序列的比对, 发现韩国与中国的大菱鲆虹彩病毒很可能是同一种病毒^[4]。这一结果说明, TRBIV 的流行地域已不仅仅局限于中国, 该病毒很可能已经在东亚和东南亚的范围内广泛存在, 需要密切关注该病毒的传播和流行。

参考文献:

- [1] Shi C Y, Wang Y G, Yang S L, et al. The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China [J]. *Aquaculture*, 2004, 236 (1-4): 11-25.
- [2] Chen S L, Ren G C, Sha Z X, et al. Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) for virus isolation [J]. *Dis Aquat Org*, 2004, 60 (3): 241-246.
- [3] 史成银, 王印庚, 秦蕾, 等. 我国养殖大菱鲆病毒性红体病及其流行情况调查 [J]. *海洋水产研究*, 2005, 26 (1): 1-6.
- [4] 史成银, 王印庚, 黄健, 等. 中国大菱鲆虹彩病毒主要衣壳蛋白基因的 PCR 扩增及序列分析 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12 (5): 588-593.
- [5] Kurita J, Nakajima K, Hirano I, et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV) [J]. *Fish Pathol*, 1998, 33 (1): 17-23.
- [6] 邓敏, 何建国, 左涛, 等. 鳊鱼传染性脾坏死病毒 (ISKNV) PCR 检测方法的建立及虹彩病毒新证据 [J]. *病毒学报*, 2000, 16 (4): 365-369.
- [7] 李新辉, 吴淑勤, 李凯斌, 等. 鳊鱼病毒 PCR 诊断方法的建立 [J]. *水产学报*, 2001, 25 (1): 43-46.
- [8] Chao C B, Yang S C, Tsai H Y, et al. A nested PCR for the detection of grouper iridovirus in Taiwan (TGIV) in cultured hybrid grouper, giant sea perch, and largemouth bass [J].

- J Aquat Anim Health, 2002, 14(2): 104–113.
- [9] Grizzle J M, Altinok I, Noyes A D. PCR method for detection of largemouth bass virus [J]. Dis Aquat Organ, 2003, 54(1): 29–33.
- [10] Jeong J B, Park K H, Kim H Y, et al. Multiplex PCR for the diagnosis of red sea bream iridovirus isolated in Korea [J]. Aquaculture, 2004, 235(1–4): 139–152.
- [11] Chao C B, Chen C Y, Lai Y Y, et al. Histological, ultrastructural, and in situ hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus* hybrids infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV) [J]. Dis Aquat Organ, 2004, 58(2–3): 127–142.
- [12] Caipang C M A, 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.
- [13] Wang X W, Ao J Q, Li Q G, et al. Quantitative detection of a marine fish iridovirus isolated from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, using a molecular beacon [J]. J Virol Methods, 2006, 133(1): 76–81.
- [14] Wang Y G, Lee K L, Najiah M, et al. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus [J]. Dis Aquat Organ, 2000, 41(1): 9–18.
- [15] Inouye K, Yamano K, Maeno Y, et al. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major* [J]. Fish Pathol, 1992, 27(1): 19–27.
- [16] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊鱼暴发性传染病病原的研究 [J]. 水产学报, 1997, 21(增刊): 50–56.
- [17] 何建国, 翁少萍. 鳊鱼暴发性流行病病原的研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(5): 74–77.
- [18] Chou H Y, Hsu C C, Peng T Y. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan [J]. Fish Pathol, 1998, 33(4): 201–206.
- [19] 张奇亚, 李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到3种病毒 [J]. 科学通报, 1999, 44(2): 192–195.
- [20] Kim W S, Oh M J, Jung S J, et al. Characterization of an iridovirus detected from cultured turbot *Scophthalmus maximus* in Korea [J]. Dis Aquat Org, 2005, 64(2): 175–180.

PCR method for detection of turbot reddish body iridovirus (TRBIV): development and application

SHI Cheng-yin, HUANG Jie, YANG Bing, LIU Li

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Recently a new piscine virus was identified from farmed turbot (*Scophthalmus maximus*) in China. The virus which is subsequently named as ‘turbot reddish body syndrome iridovirus’ (TRBIV) can induce viral reddish body syndrome (VRBS) in farmed turbos. Based on the sequenced major capsid protein (MCP) gene of TRBIV, a PCR method was developed for the detection of TRBIV. With this method, a 780 bp DNA fragment can be amplified from TRBIV genome. Viral DNA extracted from 100 ng spleen or kidney tissues of infected turbot, or 10 fg (2.25×10^3 copies) recombinant plasmid DNA containing MCP gene of TRBIV can be detected. In contrast, there is no amplification of TRBIV DNA from healthy fish or from fish with lymphocystis disease. The PCR method developed in this study can also amplify TRBIV from blood samples of diseased turbot. The present results show that the PCR method is a quick, reliable, and sensitive tool for detection of TRBIV. Finally, the prevalence of TRBIV in Shandong province was investigated by the developed PCR method, and it was found that 7 of 19 investigated turbot from 5 farms in Shandong peninsular were TRBIV positive. The results reveal that TRBIV has spread quickly among farmed turbot in China. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(5): 830–836]

Key words: *Scophthalmus maximus*; iridovirus; major capsid protein gene; PCR; detection