

大口黑鲈溃疡综合症病毒 *MCP* 基因序列分析及 PCR 快速检测方法的建立

马冬梅, 白俊杰, 邓国成, 李胜杰, 叶星, 江小燕

(中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380)

摘要: 为了早期快速诊断近年来流行于广东省养殖大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)中的病毒性溃疡综合症, 本研究用基因组步移的方法获得了大口黑鲈溃疡综合症病毒(Largemouth bass ulcerative syndrome virus, LBUSV)主要衣壳蛋白(*MCP*)基因, 该基因编码区全长 1 392 bp。通过序列比较分析, 在 *MCP* 基因内确定了一段 241bp 的特异性较强的片段作为靶序列, 设计并合成引物, 经过优化 PCR 反应条件, 建立了可以快速检测大口黑鲈溃疡综合症病毒的 PCR 方法。实验表明, 在 PCR 进行到 30 个循环反应时可以检测到的质粒最小浓度是 10^4 拷贝数/ μL , 相当于 10^4 个病毒粒子。利用该方法, 从天然感染 LBUSV 的大口黑鲈脾脏组织 DNA 可扩增出 241bp 的片段, 而健康大口黑鲈和感染了传染性脾肾坏死病毒样病毒的大口黑鲈脾脏组织则没有扩增条带。本研究建立的 PCR 检测方法具有检测快速、成本低、准确性高的特点, 适用于大范围早期病害诊断的推广应用。[中国水产科学, 2010,17(6): 1149–1156]

关键词: 大口黑鲈溃疡综合症病毒; 大口黑鲈; 虹彩病毒; 主要衣壳蛋白; 序列分析; PCR 检测
中图分类号: S94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005–8737–(2010)06–1149–08

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*), 俗名加州鲈, 具有生长快、耐低温、肉质鲜美和容易起捕等特点, 从 20 世纪 70 年代开始推广到世界各地, 中国目前大口黑鲈的年产量约为 10 万 $\text{t}^{[1-2]}$ 。但 2006–2008 年的每年 6–10 月期间, 一种溃疡综合症在广东省的养殖大口黑鲈中流行, 而且有逐年加重的趋势。感染病毒鱼发病时皮肤和肌肉溃烂, 脾脏和肾脏变大, 病鱼死亡率最高达 60%^[3], 给养殖者造成了巨大的损失, 已对大口黑鲈养殖产业构成了严重威胁。2008 年, 邓国成等^[3]从病鱼中成功分离到一种病毒, 经回归感染确认该病毒就是导致溃疡综合症的病原, 经电镜观察和 DNA 序列分析, 确定了该病毒的分类地位为虹彩病毒科(Iridoviridae)蛙病毒属(*Ranavirus*), 并将该病毒命

名为大口黑鲈溃疡综合症病毒(Largemouth bass ulcerative syndrome virus, LBUSV)。目前这种病毒病还没有有效的治疗方法, 所以对该病的早期快速诊断, 确定病原成为重要的防治手段。

虹彩病毒的一个主要特征是具有直径 120~300 nm 的二十面体衣壳结构^[4], 由一种分子量约 50 kD 的主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)组成, 该结构蛋白占病毒总蛋白量的 40%~45%^[5]。由于 MCP 的氨基酸序列同源性可以反映不同虹彩病毒之间的亲缘关系, 因此该基因被视为研究虹彩病毒分子进化的依据^[6]。

本研究用基因组步移的方法获得了 LBUSV 的 *MCP* 基因编码区全长及其上下游序列, 并根据 *MCP* 基因的不保守区域设计并合成了一对引物,

收稿日期: 2010–04–23; 修订日期: 2010–05–06.

基金项目: 国家科技支撑项目(2006BAD01A1209); 广东省科技计划项目(2007B020708008); 农业部公益性行业科研专项(200903045).

作者简介: 马冬梅(1978–), 女, 博士, 助理研究员, 从事鱼类生物技术研究. E-mail: madongmei2003@163.com

通讯作者: 白俊杰, 研究员. E-mail: baijj2005@21cn.com

经优化 PCR 反应体系和反应条件, 建立了一个可以快速检测大口黑鲈溃疡综合症病毒的 PCR 方法, 旨在为该病的早期诊断提供一种简便适用的技术。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

经传代培养的大口黑鲈溃疡综合症病毒(LBUSV)由本室保存, 将保存的病毒接种于 M-199 培养基上单层生长的鲤鱼表皮瘤细胞系(EPC)细胞, 28℃ 培养 48 h 后用培养液悬浮贴壁细胞转移至离心管中, 12 000 g 离心 10 min 收集感染病毒细胞。

1.2 实验动物

自然感染 LBUSV 的大口黑鲈是 2008 年采集的样品, 已经过电镜观察和检测, 确定病原为 LBUSV^[3]。自然感染传染性脾肾坏死病毒(Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)样病毒的大口黑鲈是 2009 年采集的样品, 病鱼经电镜观察, 脾脏组织 DNA PCR 扩增、序列测定, 回归感染实验, 确定病原为一种与 ISKNV 亲缘关系很近的虹彩病毒。健康大口黑鲈取自珠江水产研究所良种基地。

1.3 DNA 的提取

用天根(TIANGEN)离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒提取感染 LBUSV 的 EPC 细胞、感染 LBUSV 的大口黑鲈脾脏、健康大口黑鲈脾脏及感染 ISKNV 样病毒大口黑鲈脾脏组织的总 DNA。

1.4 基因组步移扩增 MCP 基因全长及其序列分析

根据 GenomeWalker™试剂盒(BD Clontech)说明书, 在已知主要衣壳蛋白(MCP)基因核心片段序列的基础之上设计合成 4 个引物, 委托上海英俊生物技术有限公司合成, 核心片段序列参照文献[3]。引物 MCPWF1 和 MCPWF2 作为特异引物用来巢式扩增 MCP 基因 3 端序列, MCPWR1 和 MCPWR2 作为特异引物用来扩增 MCP 基因 5' 端序列(表 1)。将提取的感染 LBUSV 的细胞 DNA 分出 4 小份, 每份约 2.5 μg, 分别用限制性内切酶 *Dra* I、*Eco*RV、*Pvu* II 和 *Stu* I 酶切, 纯化的酶切产物与接头用 T₄ DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 构建 4 个 GW(Genome Walker)库, 用于巢式 PCR 扩增。第 1 次 PCR 取 1 μL 稀释 10 倍后的连接产物作为模板, AP1(表 1)和 MCPWF1、MCPWR1 为引物, 用 LA *Taq*(TaKaRa)进行扩增, 反应条件为: 94℃ 变性 25 s, 72℃ 延伸 3 min, 7 个循环; 94℃ 变性 25 s, 67℃ 延伸 3 min, 32 个循环; 67℃ 延伸 7 min。PCR 产物电泳检测后, 以 1:50 稀释, 取 1 μL 作为模板, AP2(表 1)和 MCPWF2、MCPWR2 为引物, 进行第 2 次 PCR 扩增, 反应条件为: 94℃ 变性 25 s, 72℃ 延伸 3 min, 5 个循环; 94℃ 变性 25 s, 67℃ 延伸 3 min, 20 个循环; 67℃ 延伸 7 min。PCR 产物电泳检测, 并用 ABI 3730 自动测序仪进行序列测定。用 DNASTar 软件分析测序列结果, 预测蛋白分子量和等电点; CluxtalX 软件对多个序列进行比较分析; MEGA4 软件构建系统进化树。

表 1 引物及引物序列
Tab. 1 Primer and sequence

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequences of primer (5'-3')	用途 Purpose
MCPWF1	CGCACTCTCGTTCAACGAGATTCAG	基因组步移, 3'端序列扩增特异引物
MCPWF2	TCCTGGACGCCTGGAACGAGTACA	基因组步移, 3'端序列扩增特异引物
MCPWR1	CTGATGGTACCGTCATTGTTAAACTG	基因组步移, 5'端序列扩增特异引物
MCPWR2	CTACGGAAAAAGTGCTGCCCGAAAGC	基因组步移, 5'端序列扩增特异引物
AP1*	GTAATACGACTCACTATAGGGC	基因组步移, 接头引物
AP2*	ACTATAGGGCACGCGTGGT	基因组步移, 接头引物
DMCPF	TCTGTTACGGTTCTGGCATC	病毒检测引物
DMCPR	CCAGCCAAGAGTTGAGCACAT	病毒检测引物
18SF	GGACACGGAAAGGATTGACAG	基因组质量检测引物
18SR	CGGAGTCTCGTTCGTTATCGG	基因组质量检测引物

注: “*” 为 GenomWalker 试剂盒中提供的引物。
Note: “*” means primers were supplied with the GenomWalker kit.

1.5 引物的设计与合成

根据 MCP 编码区的特异性序列, 设计合成 1 对引物 DMCPF 和 DM CPR(表 1), 预期扩增 241bp 片段用于病毒检测, 委托上海英骏生物技术有限公司合成。

1.6 阳性标准品的制备

以 DMCPF 和 DM CPR 为引物, 感染 LBUSV 的细胞 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物与 pMD19-T 载体(TaKaRa)16℃连接过夜, 转化感受态细胞 DH5 α , 筛选阳性克隆, 按质粒小量提取试剂盒(TIANGEN)说明书提取重组质粒。用分光光度计检测重组质粒的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 计算出质粒的浓度和拷贝数, 1OD₂₆₀ 值相当于 50 μ g/mL 双链 DNA, 拷贝数/mL=浓度(g/mL) $\times$ 阿伏加德罗常数(即 6.02×10^{23} 拷贝数/摩尔)/1 个碱基对的平均分子量 $\times$ 碱基对数^[7]。

1.7 PCR 反应条件的优化

以 50 ng 病鱼脾脏组织 DNA 为模板, DMTCF 和 DMTCR 为引物, 分别以 68℃、65℃、62℃、59℃、56℃和 54℃作为退火温度进行 30 个循环的 PCR 反应, 选择最适的引物退火温度。在最适退火温度条件下, 分别以 30、28、26、24、22 个循环进行 PCR 扩增, 每个 PCR 反应总体积为 25 μ L, 点样 8 μ L 在 1%琼脂糖上电泳检测, 优化 PCR 循环数。

1.8 灵敏度检测

将含有 MCP 基因片段的质粒 pMD-MCP 按 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 拷贝数/ μ L 系列稀释, 各取 1 μ L 作为模板, 以水为模板作阴性对照, 按优化的退火温度, 分别进行 30 和 35 个 PCR 循环, 1%琼脂糖电泳检测。同时将感染 LBUSV 大口黑鲈脾脏 DNA 稀释 10 倍, 取 1 μ L 作模板, 分析该方法临床检测的灵敏度。

1.9 特异性检测

分别以正常大口黑鲈、感染 ISKNV 样病毒的大口黑鲈和感染 LBUSV 的大口黑鲈的脾脏组织 DNA 作为模板, PCR 扩增检测引物的特异性。同时用引物 18SF 和 18SR(表 1)扩增 18S rRNA 基因

片段作对照, 以检测基因组的质量。

2 结果与分析

2.1 基因组步移法获得 MCP 基因全长和两端侧翼序列

第一次 PCR 产物电泳检测结果显示, 3'端从 4 个 GW 库中扩增出的都是弥散的条带, 5'端从 *Pvu* II 和 *Dra* I 酶切的 GW 库中分别扩增出约 1 000 bp 和 2 000 bp 的清晰条带。第二次 PCR, 3'端从 *Eco*RV 库中扩增出约 1 100 bp 的片段, 5'端从 *Pvu* II 和 *Dra* I 库分别扩增出约 1 000 bp 和 2 000 bp 的片段(图 1), 将 1 100 bp(3'-*Eco*RV)和 2 000 bp(5'-*Dra* I)DNA 片段直接进行序列测定。测序结果经软件拼接后显示共获得 2 378 bp 的序列(图 2), 其中 5'侧翼序列 764 bp, 3'侧翼序列 222 bp, MCP 编码区 1 392 bp (GenBank 登陆号为 GU256635), 推测编码 1 个 463 个氨基酸的蛋白, 预测等电点为 7.05, 分子量为 50 kD。在起始密码子 ATG 上游-13 bp 处有 1 个启动子 TATA box 的典型序列 TATAATA, 在-593 bp 到-315 bp 处存在 11 个 GAGAA(或 G)CCAAGACAGATGA 重复序

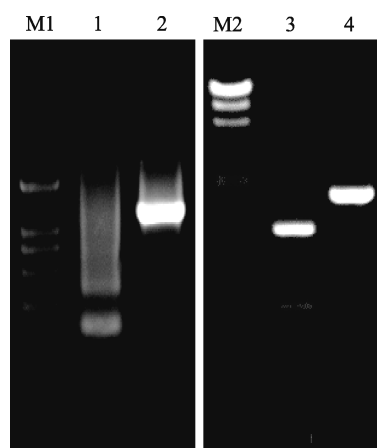


图 1 大口黑鲈溃疡综合症病毒 MCP 基因基因组步移 PCR 结果

1, 3'-*Stu* I 库 PCR 产物; 2, 3'-*Dra* I 库 PCR 产物; 3, 5'-*Pvu* II 库 PCR 产物; 4, 5'-*Eco*RV 库 PCR 产物; M1: DL2000 DNA 分子量标准; M2: λ -*Hind*III DNA 分子量标准。

Fig. 1 Genome walker PCR results of MCP gene from ulcerative syndrome virus of largemouth bass

1, PCR products of 3'-*Stu* I library; 2, PCR products of 3'-*Dra* I library; 3, PCR products of 5'-*Pvu* II library; 4, PCR products of 5'-*Eco*RV library; M1: DL2000 DNA markers; M2: λ -*Hind*III markers.

LBUSV	MSSVTGSGITSGFIDLATYDNLKALYGGK-----DATTYFVKEHYPVGWFTKLPATAATKTSSTPAFGQHFVSVGVPRSGDYVLNSWLVLKTEV : 89
EHN	MSSVTGSGITSGFIDLATYDNLKALYGGK-----DATTYFVKEHYPVGWFTKLPATAATKTSSTPAFGQHFVSVGVPRSGDYVLNSWLVLKTEV : 89
FV3	MSSVTGSGITSGFIDLATYDNLKALYGGK-----DATTYFVKEHYPVGWFTKLPATAATKTSSTPAFGQHFVSVGVPRSGDYVLNSWLVLKTEV : 89
ISKNV	MSAISGANVTSGFIDISAFDAMEHLYGGD-----NAVYFVARETVRSSWYKLPVTLKQTHANFGQEFVSVTVARGGDYVLINWLRVKIISI : 89
LCDV1	MSSVAGSVTSAFIDLATYDTIEKHLYGGD-----SAVAYFVRETCKKCTWFKLPVLLTRCSGSPNFDQEFVSVNVSRRGDYVINAMMTVRIPAV : 89
CzIV	---MSSS---ITSGFIDLATVDEIEKMYGGP-----TBTAYFVRETRKSTWFTQVPLSRSTGTSDEGQNWVSISRAADYLLQTVLRVITIQV : 88
IIV3	---MSSS---ITSGFIDLATVDEIEKMYGGP-----TBTAYFVRETRKSTWFTQVPLSRSTGTSDEGQNWVSISRAADYLLQTVLRVITIQV : 92
LBUSV	KLLAANQFNNDGTIRWTKNPMHNVVEHAALSFEIQAQFNTAFILDAWNEYTMEAKRIGYNNMIGNTSDLVNAPATGQAGARVLPKAKNLVLPLP : 185
EHN	KLLAANQFNNDGTIRWTKNPMHNVVEHAALSFEIQAQFNTAFILDAWNEYTMEAKRIGYNNMIGNTSDLVNAPATGQAGARVLPKAKNLVLPLP : 185
FV3	KLLAANQFNNDGTIRWTKNPMHNVVEHAALSFEIQAQFNTAFILDAWNEYTMEAKRIGYNNMIGNTSDLVNAPATGQAGARVLPKAKNLVLPLP : 185
ISKNV	TSSKENSY-----IRWCDNLHNLVEEVSVSFNDLVAQTLTSEFLDFNACMMGSKGSGYNNKIMGRSDLVN-----AGITNGQTMPTAVYINLPLP : 175
LCDV1	KIKNNNRNMNANGTIRWCKNLHNLVKQTSVQFNDLVAQKFFESYFLDFNSAFGCMGSKGHVGYDNNMIGNTIDMTQF-----VDSNGQLPEKVLVLPLP : 180
CzIV	TIN-AQLGP-TFGLRWTRNFMHNLIREATITFNDLVAAREDNHYHLDWFSAFTVFAKRIKGYDNNMIGNTISATNPE--VAPGGSLGSLVGGINLPLP : 180
IIV3	TIA-ATATPATLSLRWTRNFMHNLIREITISENDLVGSRDLNRYFLDMNSAFTTASKRNGYDNNMIGNTISTTDE--VGPGGSLGHTGGTVINLPLP : 185
LBUSV	EFFGRDSCIALPTVTLPLPYNEIRITISIRSIODLLILOHK-TTGEVKEIV---ATDEGGGLPDTVEAHVYMTVGLVTAARQAMSSSVRDMVVEQV : 276
EHN	EFFGRDSCIALPTVTLPLPYNEIRITISIRSIODLLILOHK-TTGEVKEIV---ATDEGGGLPDTVEAHVYMTVGLVTAARQAMSSSVRDMVVEQV : 276
FV3	EFFGRDSCIALPTVTLPLPYNEIRITISIRSIODLLILOHK-TTGEVKEIV---ATDEGGGLPDTVEAHVYMTVGLVTAARQAMSSSVRDMVVEQV : 276
ISKNV	EFFGRDSCIALPTVTLPLPYNEIRITISIRSIODLLILOHK-TTGEVKEIV---ATDEGGGLPDTVEAHVYMTVGLVTAARQAMSSSVRDMVVEQV : 276
LCDV1	YFFSRDSCIALPLSAALPYNEIRITLTFHLRDGTTELLIFONK-NDSTIMELT---AGDEWGRKPLDKVQVWITNVVVVNEERRLGTVPRDILVEQV : 271
CzIV	YFFSRDSCIALPLSAALPYNEIRITLTFHLRDGTTELLIFONK-NDSTIMELT---AGDEWGRKPLDKVQVWITNVVVVNEERRLGTVPRDILVEQV : 275
IIV3	YFFSRDSCIALPLSAALPYNEIRITLTFHLRDGTTELLIFONK-NDSTIMELT---AGDEWGRKPLDKVQVWITNVVVVNEERRLGTVPRDILVEQV : 280
LBUSV	QMAFVHMVNPKNATVFHADLRFSHAVKALMFMVQNVTHPSVGSNYTCVTPVVGAGNTVL-EPALAVDEPVKSASLVYENTTRLPDMSVEYYSVLQVW : 371
EHN	QMAFVHMVNPKNATVFHADLRFSHAVKALMFMVQNVTHPSVGSNYTCVTPVVGAGNTVL-EPALAVDEPVKSASLVYENTTRLPDMSVEYYSVLQVW : 371
FV3	QMAFVHMVNPKNATVFHADLRFSHAVKALMFMVQNVTHPSVGSNYTCVTPVVGAGNTVL-EPALAVDEPVKSASLVYENTTRLPDMSVEYYSVLQVW : 371
ISKNV	QVAPRPVPTPADNSLVHDLRFSHEVKKALFAVKNVTHRNQVSNYTAASPVY-VNNKUN-LPLMATNELSEVSLIYENTPRHLQMGVDYFTSVDPY : 361
LCDV1	QVAPRPVPTPADNSLVHDLRFSHEVKKALFAVKNVTHRNQVSNYTAASPVY-VNNKUN-LPLMATNELSEVSLIYENTPRHLQMGVDYFTSVDPY : 367
CzIV	QVAPRPVPTPADNSLVHDLRFSHEVKKALFAVKNVTHRNQVSNYTAASPVY-VNNKUN-LPLMATNELSEVSLIYENTPRHLQMGVDYFTSVDPY : 370
IIV3	QVAPRPVPTPADNSLVHDLRFSHEVKKALFAVKNVTHRNQVSNYTAASPVY-VNNKUN-LPLMATNELSEVSLIYENTPRHLQMGVDYFTSVDPY : 375
LBUSV	YYAPALPISCTGHHLYSYALSNDPSPSGSTNEGRILTNASINVSLSAEAGTAAGGGGADNSGYKNPOKALVVM-INHNIIIRIMNGSMGFPLL : 463
EHN	YYATSIPIVSTGHHLYSYALSNDPSPSGSTNEGRILTNASINVSLSAEAGTAAGGGGADNSGYKNPOKALVVM-INHNIIIRIMNGSMGFPLL : 463
FV3	YYATSIPIVSTGHHLYSYALSNDPSPSGSTNEGRILTNASINVSLSAEAGTAAGGGGADNSGYKNPOKALVVM-INHNIIIRIMNGSMGFPLL : 463
ISKNV	YFAPSMPMDVMTYCYTLDMGNINPMGSTNYGRLSNVTLSCVKYDNAKTAAGGGGNGSGYTAOKFEELVVI-VNHNIIIRIMNGSMGFPLL : 453
LCDV1	YFGGSIPIVDTGYHMYCYSLNMMVDVPMGSTNYGRLSNVTLSCVKYDNAKTAAGGGGNGSGYTAOKFEELVVI-VNHNIIIRIMNGSMGFPLL : 459
CzIV	YHAPTIPSSIGYHLYSYSLHFFDLPMGSTNYGRILTNVSVVPOASPAVTAAGGSCAAGSCADYAOSEYFVIIIGVNNIIIRISGGALGFVPL : 462
IIV3	YHAPTIPSSIGYHLYSYSLHFFDLPMGSTNYGRILTNVSVVPOASPAVTAAGGSCAAGSCADYAOSEYFVIIIGVNNIIIRISGGALGFVPL : 466

图 3 大口黑鲈溃疡综合症病毒 MCP 与其他 6 种虹彩病毒 MCP 氨基酸序列比较

在所有序列中都相同的氨基酸残基用黑色背景和白色字体表示, 80%以上同源的氨基酸残基用深灰色背景和白色字体表示; 60%以上同源的氨基酸残基用浅灰色背景和黑色字体表示。

Fig. 3 Multiple alignment of LBUSV MCP amino acid sequence with other 7 MCP proteins

Identical amino acid residues in all sequences are highlighted with black shading and white letter, dark gray shading and white letter was used for regions with more than 80% identity, as well as weak gray and black letter showed regions with more than 60% identity.

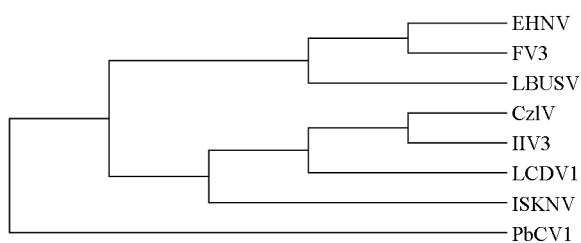


图 4 根据 8 种病毒的 MCP 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on MCP amino acid sequences from 8 virus strains

rus), 这与先前研究的 LBUSV 分类地位结果一致^[3]。

2.3 病毒检测 PCR 方法的建立

同源性比较结果显示, LBUSV MCP 基因核苷酸序列 3'端(7~247 bp)与 FV3(FJ459783.1)和 EHN(FJ433873.1)MCP 相应序列同源性较低, 分别为 75%和 73%, 为了方便、快速地检测感染 LBUSV 的病鱼, 根据这段序列设计了一对引物 DMCPF

和 DMCPR, 用于 LBUSV 的 PCR 检测。

首先对引物的退火温度进行了优化, 结果表明退火温度在 54~68℃都可以扩增出 PCR 产物, 59~65℃扩增效果比较理想, 最终确定 65℃为检测用退火温度(图 5)。另外, PCR 循环数优化结果显示(图 6), 在 25 μL PCR 反应体系, 点样 8 μL, 在 26 个循环以上可以检测到肉眼可见的条带。优化后的 PCR 反应条件为: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 65℃退火 30 s, 72℃延伸 20 s, 30

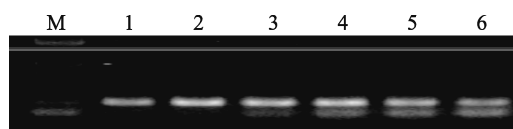


图 5 PCR 退火温度的优化

1-6, 退火温度分别为 68℃、65℃、62℃、59℃、56℃和 54℃时的 PCR 产物; M: DL2000 DNA 分子量标准。

Fig. 5 Optimization of PCR annealing temperature
1-6, PCR products with annealing temperature 68℃, 65℃, 62℃, 59℃, 56℃ and 54℃; M: DL2000 DNA marker.

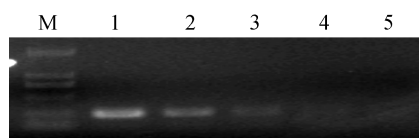


图 6 PCR 循环数的优化

1-5, 循环数分别为 30、28、26、24 和 22 时的 PCR 产物; M: DL2000 DNA 分子量标准。

Fig. 6 Optimization of the number for PCR cycles

1-5, PCR products with 30, 28, 26, 24 and 22 cycles. M: DL2000 DNA marker.

个循环; 72 °C 延伸 7 min。

2.4 灵敏度试验

引物 DMCPF 和 DMCPR 的扩增产物插入 pMD19-T 载体, 构建质粒 pMD-MCP, 将该质粒按 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 拷贝数/ μ L 系列稀释作为模板, 进行 PCR 扩增, 琼脂糖电泳检测结果显示, 30 个循环 PCR 反应可以检测到的质粒最小浓度是 10^4 拷贝数/ μ L, 35 个循环反应可以检测到的质粒最小浓度是 10^3 拷贝数/ μ L(图 7), 说明该 PCR 方法 30 个循环和 35 个循环能检测到的最少病毒粒子数分别为 10^4 个和 10^3 个。同时以稀释 10 倍的感染 LBUSV 大口黑鲈脾脏 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果也扩增到明显的 241 bp 条带。

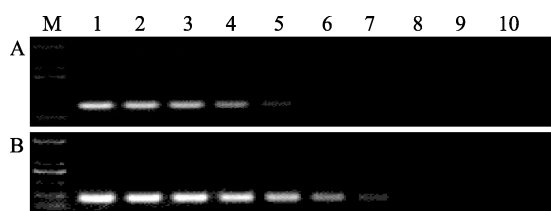


图 7 PCR 灵敏度检测结果

A: 30 个循环 PCR 检测结果; B: 35 个循环 PCR 检测结果; 1-10, 质粒 pMD-MCP 按 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 拷贝数/ μ L 系列稀释作为模板的 PCR 产物; M: DL2000 DNA 分子量标准。

Fig. 7 Sensitivity assay of PCR

A: PCR results with 30 cycles; B: PCR results with 35 cycles; 1-10, PCR products with serial diluted templates of 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 copies/ μ L plasmid pMD-MCP. M: DL2000 DNA marker.

2.5 特异性检测

特异性检测实验表明, 仅自然感染了 LBUSV 的病鱼脾脏组织 DNA 能检测到扩增产物, 而正常大口黑鲈、自然感染了 ISKNV 样病毒的大口黑

鲈脾脏组织 DNA 均无扩增产物(图 8), 说明该方法具有良好的特异性。

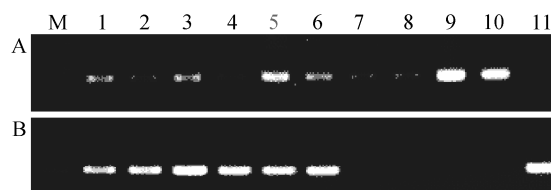


图 8 PCR 检测方法特异性试验结果

A: PCR 扩增 *18S rRNA* 基因片段检测基因组质量结果; B: PCR 扩增 *MCP* 基因片段检测病毒结果; 1-6, 大口黑鲈溃疡综合症病毒感染的大口黑鲈脾脏 DNA 扩增产物; 7 和 8, 健康大口黑鲈脾脏 DNA 扩增产物; 9 和 10, 感染了传染性脾肾坏死病毒样病毒的大口黑鲈脾脏 DNA 扩增产物; 11, *18S rRNA* 基因的对照是以 ddH₂O 为模板的扩增产物, *MCP* 基因的对照是以 pMD-MCP 为模板的扩增产物。M: DL2000 DNA 分子量标准。

Fig. 8 Specificity tests of PCR

A: PCR products of *18S rRNA* gene for genome quality detection; B: PCR products of *MCP* gene for virus detection; 1-6, PCR products of spleen DNA from LBUSV-infected largemouth bass; 7 and 8, PCR products of spleen DNA from healthy largemouth bass; 9 and 10, PCR products of spleen DNA from ISKNV-like virus infected largemouth bass. 11, Negative control of *18S rRNA* gene is ddH₂O as template, and positive control of *MCP* gene is plas- mid pMD-MCP as template. M: DL2000 DNA marker.

3 讨论

对多种病毒主要衣壳蛋白(MCP)氨基酸序列的比较研究表明, MCP 既具有病毒分类所需的保守区域, 又具有足以区分不同病毒的可变区, 虽然仅以 MCP 序列来区分虹彩病毒分离株之间亲缘关系的依据还不够充分, 但作为研究病毒进化的靶基因还是适合的^[8]。Mao 等^[9]根据蛙病毒属 MCP 保守区域设计引物, 可以将蛙病毒属的成员从虹彩病毒科的其他属病毒中区分出来, 本实验室也利用这对引物确定了 LBUSV 的分类地位为蛙病毒属^[3]。本研究在此基础上获得了大口黑鲈溃疡综合症病毒 MCP 基因的全长, 经过同源比较, 利用基因的可变区设计特异性引物, 可将 LBUSV 从已知序列的其他蛙病毒属成员中区分出来。MCP 基因序列不仅可用于虹彩病毒科的分类^[8], 还适用于其他病毒科的分类, 如对藻类 DNA 病毒科(Phycodnaviridae)MCP 基因序列比较的研究表明, MCP 序列也可以作为区分该病毒科不同的病毒属的依据^[10-11]。由此表明, MCP 基因对于病毒分类地位和病毒进化的研究具有重要意义。

LBUSV MCP 5'端序列(−764 ~ −600bp)潜在编码的蛋白与 FV3 的 OFR89 蛋白有一定的(37%)同源性, 3'端序列(−764 ~ −600 bp)潜在编码一个 immediate early protein (ICP-46)蛋白, 与 FV3 的 ICP-46 同源性为 59%, 这 3 个基因在 LBUSV 基因组中的排列顺序与在 FV3 基因组(AY548484)相同, 但与新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus)基因组中(YP_164257.1)这 3 个基因的位置和排列顺序不同。在研究 DNA 甲基转移酶(DNA MTase)时也发现, 即使是同一个属(*Ranavirus*)的不同病毒, DNA MTase 基因和它的上下游基因在基因组中的位置和排列方式也存在较大差异, 这些都说明在病毒基因组进化过程中基因存在快速的重排。可移动序列转座子、反转录子^[12], 以及非编码区的重复序列如长末端重复序列(Long terminal repeats, LTRs)、短散在元件(Short interspersed elements, SINEs)和长散在元件(Long interspersed elements, LINEs)能促使 DNA 的重排和重组^[13], 他们在新基因组结构进化中起到决定性的作用^[14]。LBUSV MCP 基因编码区上游−593 bp 到−315 bp 处存在 11 个 GAGAA(或 G) CCAAGACAGATGA 散在重复序列, 在−160 bp 到−140 bp 处存在 3 个 TCCTCCT 散在重复序列。这些重复序列可能就是病毒基因组正在进化重排的热点位置。

本研究建立了一个快速检测 LBUSV 的 PCR 方法, 在优化 PCR 反应条件时发现, 退火温度在 54~68℃ 范围内都可以扩增出 PCR 产物, 适用温度范围较广, 但为了进一步增强了扩增的特异性,

采用了较高的退火温度 65℃。循环数优化实验结果表明, 26 个 PCR 循环以上, 就可以检测到病鱼体内的病毒, 说明该方法灵敏度已足够高, 30 个循环已可以确保检测出病毒。PCR 灵敏度检测结果表明, 30 个循环 PCR 反应可以检测到的质粒最小浓度是 10⁴ 拷贝数/μL, 35 个循环反应可以检测到的质粒最小浓度是 10³ 拷贝数/μL, 35 个循环反应虽然可以检测到更少的病毒粒子, 但由于循环数过多, 且该 PCR 反应灵敏度高, 易造成阴性对照的假阳性扩增, 所以优化后的 PCR 反应数确定为 30 个循环。另外, 感染了 LBUSV 的病鱼脾脏 DNA 稀释 10 倍后仍可以检测到明显的扩增条带, 也说明该方法灵敏度完全可以满足临床应用的要求。普通 PCR 方法与荧光定量 PCR 相比, 灵敏度要低于荧光定量 PCR, 荧光定量 PCR 至少能检测到 10² 拷贝数/μL 的标准质粒, 但普通 PCR 方设备简单、检测成本低, 更有利于推广应用。

本研究只采用了 ISKNV 样病毒作为阴性病毒对照。通过设计引物时的比较分析表明, DMCPF 和 DMCPR 引物序列与 EHNV、FV3、LCDV1 和 ISKNV 的 MCP 基因相应序列同源性仅为 76%、76%、71%和 48%(表 2), 认为该引物不仅不会对 ISKNV 基因组进行扩增, 也不会对亲缘关系更近的 EHNV、FV3 和 LCDV1 进行扩增。为了证实这一想法, 本研究还根据引物 DMCPF 和 DMCPR 在 FV3 MCP 基因中相应序列设计合成一对引物, PCR 扩增 LBUSV 病毒, 结果显示没有扩增阳性条带(结果略), 可以说明该 PCR 检测方法中的引物具有良好的特异性。

表 2 5 种病毒 MCP 基因中 DMCPF 和 DMCPR 引物相应序列比较
Tab. 2 Comparison for homologous sequences of DMCPF and DMCPR primers in five MCP genes

病毒 Virus	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	与 LBUSV 同源性/% Identity to LBUSV
LBUSV	T-TG-TA-G---T-TGGCA-C	C--G---AGAG--G-GC-CA-	
EHNV	T-TG-AA-C---T-AGGTA-C	C--A---GGCG--G-GG-TG-	76
FV3	T-TG-AA-T---T-AGGTA-C	C--A---GGCG--G-GG-TG-	76
LCDV1	T-TG-AG-A---T-AAGCG-C	T--T---AGCG--A-TC-CG-	71
ISKNV	G-AA-CT-A---G-AAACG-A	G--G---CACA--A-TG-GG-	48
Consensus	C T C GGT C T	CA CCA TT A A T	

参考文献:

- [1] 张韵桐, 何幼发. 大口黑鲈养殖研究[J]. 湛江水产学院学报, 1994, 14(1): 23–28.
- [2] 梁素娴, 白俊杰, 叶星, 等. 养殖大口黑鲈的遗传多样性分析[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(4): 260–263.
- [3] 邓国成, 谢骏, 李胜杰, 等. 大口黑鲈病毒性溃疡病的病原分离和鉴定初步研究[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 871–877.
- [4] Williams T. The iridoviruses. *Adv Virus Res*, 1996, 46: 345–412.
- [5] Chinchar V G, Essbauer S, He J G, et al. Family Iridoviridae. in: Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al (Eds.), *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses[R]. San Diego: Academic Press, 2005: 145–162.
- [6] 张奇亚, 桂建芳. 水生病毒学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 220.
- [7] 严进, 关育芳, 李中华, 等. 禽(番鸭)呼肠孤病毒 *TaqMan* 探针荧光 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(11): 869–873.
- [8] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, et al. Is the Major Capsid Protein of Iridoviruses a Suitable Target for the Study of Viral Evolution? [J]. *Virus Genes*, 1998, 16(1): 59–66.
- [9] Mao J, Wang J, Chinchar G D, et al. Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. *Dis Aquat Organ*. 1999, 37(2): 107–114.
- [10] Larsen J B, Larsen A, Bratbak G, et al. Phylogenetic analysis of members of the Phycodnaviridae virus family, using amplified fragments of the major capsid protein gene[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(10): 3048–3057.
- [11] Dunigan D D, Fitzgerald L A, Van Etten J L. Phycodnaviruses: a peek at genetic diversity[J]. *Virus Res*, 2006, 117: 119–132.
- [12] Volff J N. Turning junk into gold: Domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes[J]. *Bio Essays*, 2006, 28: 913–922.
- [13] Shapiro J A. A 21st century view of evolution: Genome system architecture, repetitive DNA, and natural genetic engineering[J]. *Gene*, 2004, 345: 91–100.
- [14] Shabalina S A, Spiridonov N A. The mammalian transcriptome and the function of noncoding DNA sequences[J]. *Gen Biol*, 2004, 5: 105.

Sequence analysis of *MCP* gene from largemouth bass ulcerative syndrome virus and rapid detection by PCR assay

MA Dongmei, BAI Junjie, DEND Guocheng, LI Shengjie, YE Xing, JIANG Xiaoyan

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Chinese Academy of Fishery Sciences of China, Guangzhou 510380, China)

Abstract: For rapid detecting the virus disease, largemouth bass ulcerative syndrome, which broke out in cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in Guangdong Province, the full-length major capsid protein (*MCP*) gene of LBUSV was identified by genome walking. The open reading frame (ORF) of *MCP* gene is 1 392 bp encoding 463 amino acids. Multiple alignment analysis indicated that the virus belonged to the genus *Ranavirus* of family Iridoviridae. A pair of specific primers was designed and synthesized to amplify a 241bp *MCP* gene fragment for virus detection. Optimizing PCR reaction condition showed that the suitable annealing temperature ranged from 59°C to 65°C, and the suitable cycle number was 30. PCR sensitivity assay indicated that the PCR method could detect 10^4 copies/ μ L diluted plasmid templates amounting to 10^4 virions within 30 PCR cycles. The method could detect naturally LBUSV-infected largemouth bass, while the healthy fish and the naturally ISKNV-infected fish had no amplified products. In addition, the method shares many advantages, such as rapidness, lower-cost, exactness, therefore the PCR detection method will be applied extensively. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1149–1156]

Key words: largemouth bass ulcerative syndrome virus (LBUSV); *Micropterus salmoides*; Iridoviridae; major capsid protein (MCP); sequence analysis; PCR detection

Corresponding author: BAI Junjie. E-mail: baijj2005@21cn.com