

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00129

## 草鱼呼肠孤病毒逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)检测方法的建立

张金凤<sup>1</sup>, 曾令兵<sup>1,2</sup>, 张辉<sup>2</sup>, 周勇<sup>2</sup>, 肖艺<sup>2</sup>, 苏岚<sup>1</sup>, 高正勇<sup>1</sup>

1. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430071;

2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223

**摘要:** 根据草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV)衣壳蛋白 VP6 编码基因的序列设计特异性引物, 以病毒全基因组 RNA 为模板, 通过对反应条件进行优化, 建立了 GCRV 的逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)检测方法。检测结果表明, 本方法可在 63℃下 1 h 内实现靶片段的大量扩增, 扩增产物经凝胶电泳呈现梯型条带, 反应体系中添加 SYBR Green I 荧光染料后, 绿色阳性结果明显区别于橙色阴性结果。该检测体系针对草鱼呼肠孤病毒的检测灵敏度高, 其最低检测限为 33 pg, 与常规 RT-PCR 方法相比较, 敏感度高 10 倍, 且与斑点叉尾鮰呼肠孤病毒(CCRV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、大鲵虹彩病毒(GSIV)等无交叉反应。该方法灵敏度及特异性高, 且不需昂贵仪器设备, 为快速检测草鱼呼肠孤病毒与诊断草鱼出血病提供了简捷快速的技术手段。

**关键词:** 草鱼出血病; 呼肠孤病毒; 逆转录环介导等温扩增; 检测

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)01-0129-08

草鱼出血病(grass carp hemorrhage)是中国养殖草鱼的一种严重病毒性疾病, 其病原为草鱼呼肠孤病毒<sup>[1]</sup>。草鱼呼肠孤病毒主要感染当年草鱼鱼种, 引起草鱼全身性广泛出血, 死亡率可达 90% 以上。草鱼出血病发病季节长, 流行范围广, 防治方法有限, 给草鱼养殖业造成巨大经济损失<sup>[2]</sup>。由于草鱼出血病发病快、传染性强、危害大, 因此, 研究草鱼出血病的简便快速、灵敏特异的诊断与检测方法对于草鱼出血病的防控具有重要意义。

目前, 国内外学者已建立了多种检测 GCRV 的方法, 包括电镜观察法、细胞培养法、协同凝集试验(SPA-coA)<sup>[3]</sup>、荧光抗体技术<sup>[4]</sup>、Dot-ELISA<sup>[5]</sup>等, 这些方法有的依赖精密仪器, 有的耗时太长, 而有的灵敏度不够。近年建立的检测 GCRV 的 RT-PCR 法<sup>[6]</sup>和实时荧光定量 PCR 法<sup>[7]</sup>, 其特异性和灵敏度得到了显著提高, 但由于依赖 PCR 仪或定量 PCR 仪等贵重仪器以及操作过程复

杂, 无法满足现场诊断与检测的需要。

2000 年 Notomi 等<sup>[8]</sup>首次报道了环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术, 作为一种新型核酸扩增技术, 该方法针对靶基因的 6 个特异位点设计了 2 对 LAMP 引物, 在具有链置换活性的 DNA 聚合酶(*Bst* DNA 聚合酶)的催化下, 不需要高温变性即可快速、特异、灵敏地扩增靶序列<sup>[9]</sup>。逆转录环介导恒温扩增(RT-LAMP)是在常规 LAMP 反应体系中加逆转录酶, 实现了 RNA 模板的一步扩增。近年来, 国内外已将该技术广泛应用于动物医学、人类医学及食品卫生等领域, 并逐渐成为水产动物病原的主要检测方法之一<sup>[10]</sup>。

2004 年 Kone 等<sup>[11]</sup>用 LAMP 方法快速检测了对虾白斑综合症病毒(WSSV), 反应条件优化为 60℃扩增 60 min, 且 LAMP 方法的灵敏度比巢式 PCR 高 10 倍; Sappat 等<sup>[12]</sup>用 Loopamp 实时浊度计

收稿日期: 2012-03-28; 修订日期: 2012-07-10.

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-46-11).

作者简介: 张金凤(1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产养殖病害研究. E-mail: zhang-jin-feng@126.com

通信作者: 曾令兵, 研究员, 从事水产养殖病害与防治技术研究. E-mail: zenglingbing@gmail.com

对桃拉综合征的 RT-LAMP 反应进行分析, 不仅更加节约时间, 还可以对桃拉综合征病毒(TSV)进行实时定量的监测; Mekata 等<sup>[13]</sup>建立的黄头病毒 RT-LAMP 检测方法灵敏度高(较 PCR 高 10 倍), 特异性好, 与桃拉综合征病毒、白斑综合征病毒等均无交叉反应。中国对 LAMP 方法的研究起步较晚, 但近几年也取得了显著成绩。孙颖杰等<sup>[14]</sup>在牙鲆弹头病毒(Hirame Rhabdovirus, HRV)的 RT-LAMP 检测中加入了环引物, 缩短了反应时间, 且灵敏度比 RT-PCR 高 100 倍。Xu 等<sup>[15]</sup>建立了红斑鮟神经坏死症病毒(Redspotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)的 RT-LAMP 检测方法, 该方法特异性强, 与 WSSV、KHV、MCRV 和 GCRV 等无交叉反应。Chen 等<sup>[16]</sup>用 RT-LAMP 方法检测了锯缘青蟹呼肠孤病毒(Scylla serrata reovirus, SsRV), 该方法的最适扩增温度为 62℃, 检测限比传统的一步法 RT-PCR 高 1 000 倍, 与其他病毒无交叉反应。

长期以来, 草鱼出血病缺乏简便、快速、灵敏的诊断与检测方法, 制约了草鱼出血病防控技术的发展。本研究针对草鱼出血病呼肠孤病毒 VP6 衣壳蛋白编码基因序列, 设计特异性引物, 对反应温度、时间等参数进行优化, 建立草鱼呼肠孤病毒的逆转录环介导等温扩增检测方法, 为草鱼出血病的快速诊断奠定了技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

超速离心机(Beckman); 分光光度计(eppendorf); PCR 扩增仪(Biometra); 凝胶成像仪(BIORAD); 恒温水浴锅和电泳仪(国产); *Bst* DNA 聚合酶大片段(NEW ENGLAND); Betaine(Sigma);

dNTPs、AMV 逆转录酶(BIO BASIC INC.); Trizol Reagent、RNA 酶抑制剂、SYBR Green I(Invitrogen); 限制性内切酶 *Eco*O65 I(Takara); Viral DNA Kit(Omega)。

### 1.2 细胞、病毒及患病草鱼样本

草鱼肾组织细胞系(CIK)<sup>[17]</sup>、斑点叉尾鮰肾组织细胞系(CCK)<sup>[18]</sup>、锦鲤鳍条组织细胞系(Koi-Fin)由本实验室建立并保存。草鱼呼肠孤病毒 GCRV-104 株、斑点叉尾鮰呼肠孤病毒 730 株(CCRV)、大鲵虹彩病毒(GSIV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)由本实验室分离并保存。鲤春病毒血症病毒(SVCV)由美国夏威夷大学公共卫生与健康系 LU Yuanan 教授惠赠。鲤上皮瘤细胞系 (EPC)来源于武汉大学中国典型培养物收集保藏中心。GCRV 在 CIK 细胞上增殖培养; CCRV 在 CCK 细胞上增殖培养; KHV 在 Koi-Fin 细胞上增殖培养; GSIV、SVCV 在 EPC 细胞上增殖培养<sup>[19]</sup>。GCRV RT-LAMP 检测样本分别采自湖北省江北农场三分场、湖北省江陵县文村渔场和河南省虞城县黄河滩渔场, 健康草鱼来源于长江水产研究所试验场。

### 1.3 RT-LAMP 引物的设计及合成

根据 GenBank 公布的 GCRV-104 毒株中编码衣壳蛋白 VP6 的 S8 基因片段序列(HM234682.2), 应用 Primer Explorer 4.0 软件设计 2 对引物 FIP/BIP 和 F3/B3, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列见表 1。

### 1.4 病毒 RNA 提取及阳性模板的确认

待 GCRV-104 感染的 CIK 细胞出现 90% 病变后收集细胞病变材料, 于 -80℃ 至室温条件反复冻融 3 次, 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清转移至 35 mL 超速离心管中, 20 000 r/min 离心 2 h, 悬浮病毒沉淀, 经 Trizol 试剂裂解后, 采用氯仿、异丙

表 1 引物序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of the primers used in the study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence(5'-3')
FIP	CGGTCGTCTGACGTACACCGTTTGCAGCATATGGGGTAA
BIP	AGTTGGGTCAATTGGCTACGGTTTAGCACCATGGTACTGTTCG
F3	CAGTGTGATCTGACTTCCG
B3	AGACCAACGCGTCAATCG

醇抽提病毒 RNA, 分光光度计测定 RNA 浓度<sup>[7]</sup>。RT-PCR 检测提取的 RNA, 确认制备的检测模板呈 GCRV 阳性后, 进行 RT-LAMP 检测方法的建立。

### 1.5 RT-LAMP 方法的建立及体系的优化

采用 25 μL 反应体系, 其中包括: 40 pmol FIP、BIP, 5 pmol F3、B3, 1.4 mmol/L dNTP, 0.8 mol/L Betaine, 0.1% Tween20, 10 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 10 mmol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HCl(pH8.8), 8 U *Bst* DNA 聚合酶, 混匀后于 65℃ 温育 60 min, 80℃ 灭活 2 min。

依次改变 Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、Betaine 浓度及反应时间和温度, 分别进行 RT-LAMP 反应, 电泳观察扩增效果, 确定最佳反应体系及反应条件<sup>[20]</sup>。

### 1.6 RT-LAMP 扩增产物的检测

扩增反应进行过程中, dNTP 析出的焦磷酸根离子和反应液中存在的镁离子形成白色焦磷酸镁沉淀<sup>[10]</sup>, 因此检测管出现明显浑浊为阳性, 未见浑浊为阴性, 肉眼即可判断。

反应结束后向反应管中加入 1000×SYBR Green I 2 μL, 静置 1~5 min 后观察结果, 反应液变绿则为阳性, 保持橙色则为阴性。

取 5 μL 扩增产物, 用 2 % 的琼脂糖凝胶, 150 V 电压下电泳 25 min 后, 置于凝胶成像系统中成像, 电泳图片显示梯状 LAMP 特征性条带, 结果为阳性; 若无任何条带, 结果为阴性。

用内切酶 *Eco*O65 I 对 RT-LAMP 产物进行酶切, 参照内切酶说明书配制反应体系, 于 37 ℃ 水浴中过夜, 同上电泳检测。

### 1.7 RT-LAMP 的特异性及灵敏度

Trizol 法提取草鱼呼肠孤病毒(GCRV-104) 及斑点叉尾鮰呼肠孤病毒(CCRV)的 RNA, 用 Viral DNA Kit 提取鲤鱼春季病毒血症病毒(SVCV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)及大鲵虹彩病毒(GSIV)的 DNA, 并以其为模板, 用建立的 GCRV RT-LAMP 方法进行特异性检测。

用分光光度计测定提取的 GCRV 的 RNA 浓度, 然后进行 10 倍比稀释。对上述各浓度 RNA 用 GCRV 的 RT-LAMP 法进行检测, 并用一步 RT-PCR 方法同时进行扩增检测(以 F3、B3 作为

RT-PCR 引物)。

### 1.8 RT-LAMP 在快速检测草鱼呼肠孤病毒中的应用

利用建立的 GCRV RT-LAMP 检测方法对湖北、河南两个省份 3 个渔场收集的疑似患草鱼出血病(由患病草鱼体表症状及解剖观察进行初步判断)的患病草鱼样本肾组织进行草鱼呼肠孤病毒病原检测, 以健康草鱼样本作为阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 草鱼呼肠孤病毒 RT-LAMP 检测方法的建立及条件优化

以特异性引物 FIP、BIP、F3、B3 对 GCRV 进行 RT-LAMP 扩增, 肉眼观察, GCRV 阳性管可见混浊, 而以双蒸水、未接种 GCRV 的 CIK 细胞 RNA 作为检测模板的对照均未出现混浊。加入荧光染料后 GCRV 阳性管反应液变绿, 而对照管仍然为橙黄色; 凝胶电泳检测结果显示, GCRV 阳性管出现梯形扩增条带, 而阴性管无条带(图 1)。阳性 RT-LAMP 扩增产物经 *Eco*O65 I 酶切后, 取 5 μL 用 2 % 琼脂糖进行电泳, 在 170 bp、190 bp 附近出现 2 条电泳带, 与理论上预期的酶切结果相符(图 2)。

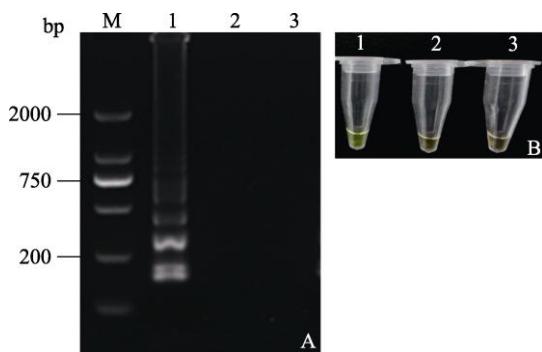


图 1 GCRV 的 RT-LAMP 检测结果

A. 琼脂糖凝胶电泳; B. SYBR Green I 染色. M: DL2000 DNA 分子质量标准. 1: 草鱼呼肠孤病毒; 2: 阴性对照(正常 CIK 细胞); 3: 空白对照(双蒸水).

Fig. 1 Detection of GCRV by RT-LAMP  
A. RT-LAMP products in 2 % agarose gel; B. RT-LAMP products added with SYBR Green I. M: DL2000 DNA marker;  
1: GCRV RNA; 2: negative control (normal CIK cells);  
3: blank control (double distilled water).

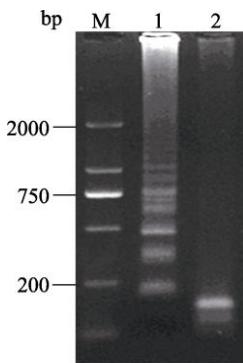


图 2 GCRV RT-LAMP 产物的酶切分析

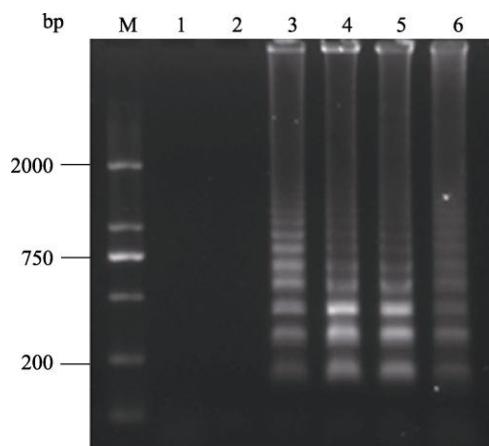
M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: GCRV 的 RT-LAMP 产物;

2: GCRV 的 RT-LAMP 产物经 EcoO65 I 酶切。

Fig. 2 Restriction enzyme digestion analysis of RT-LAMP products of GCRV

M: DL 2000 DNA marker; 1: RT-LAMP products of GCRV; 2: RT-LAMP products of GCRV after digestion with EcoO65 I.

$Mg^{2+}$  浓度为 2 mmol/L 时无梯形条带, 4~10 mmol/L 时均有梯形条带出现, 而  $Mg^{2+}$  浓度为 6 mmol/L 时梯形条带最清晰明亮, 扩增效果最好(图 3); dNTPs 浓度在 0.5~1.5 mmol/L 变化时均有梯形条带出现, 但 1 mmol/L 时条带最清晰, 扩增效果最好(图 4); Betaine 浓度在 0~1.2 mol/L 变化时均有梯形条带出现, 但浓度为 0.6 mol/L 时条带最清晰, 扩增效果最好(图 5)。最终确定最佳反应体系如下: 反应管中含有内引物 FIP 和 BIP 各

图 3  $Mg^{2+}$  浓度对 RT-LAMP 扩增效果的影响

M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2: 2 mmol/L; 3: 4 mmol/L; 4: 6 mmol/L; 5: 8 mmol/L; 6: 10 mmol/L.

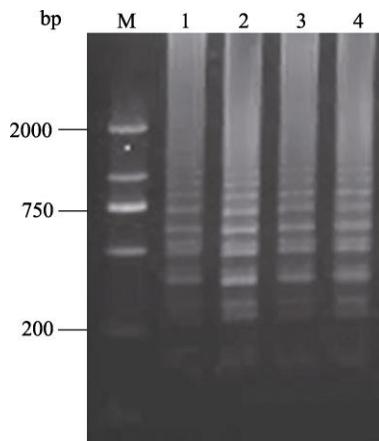
Fig. 3 Effect of  $Mg^{2+}$  on RT-LAMP amplification  
M: DL2000 DNA marker; 1: negative control; 2: 2 mmol/L; 3: 4 mmol/L; 4: 6 mmol/L; 5: 8 mmol/L; 6: 10 mmol/L.

图 4 dNTPs 浓度对 RT-LAMP 扩增效果的影响

M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: 0.5 mmol/L; 2: 1 mmol/L; 3: 1.5 mmol/L; 4: 2 mmol/L.

Fig. 4 Effect of dNTPs on RT-LAMP amplification

M: DL2000 DNA marker; 1: 0.5 mmol/L; 2: 1 mmol/L; 3: 1.5 mmol/L; 4: 2 mmol/L.

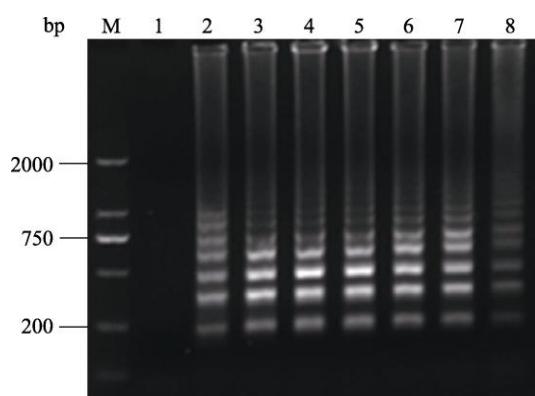


图 5 Betaine 浓度对 RT-LAMP 扩增效果的影响

M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2: 0 mol/L; 3: 0.2 mol/L; 4: 0.4 mol/L; 5: 0.6 mol/L; 6: 0.8 mol/L; 7: 1.0 mol/L; 8: 1.2 mol/L.

Fig. 5 Effect of betaine concentration on RT-LAMP amplification

M: DL2000 DNA marker; 1:Negative control; 2:0 mol/L; 3:0.2 mol/L; 4: 0.4 mol/L; 5: 0.6 mol/L; 6: 0.8 mol/L; 7: 1.0 mol/L; 8:1.2 mol/L.

1.6  $\mu$ mol/L, 外引物 F3 和 B3 各 0.2  $\mu$ mol/L, dNTP 1 mmol/L, 逆转录酶 AMV8 U, Tris-HCl 20 mmol/L,  $MgSO_4$  6 mmol/L, Triton X-100 0.1%,  $(NH_4)_2SO_4$  10 mmol/L, KCl 10 mmol/L, Betaine 0.6 mol/L。

通过改变 RT-LAMP 的反应温度和时间, 发现, 60~65℃时均有明显扩增, 63℃时扩增效果最好。63℃反应 45 min 时开始有明显条带, 此后条带亮度增强, 反应 60 min 时效果最好, 60 min 以后无明显变化(图 6、7)。

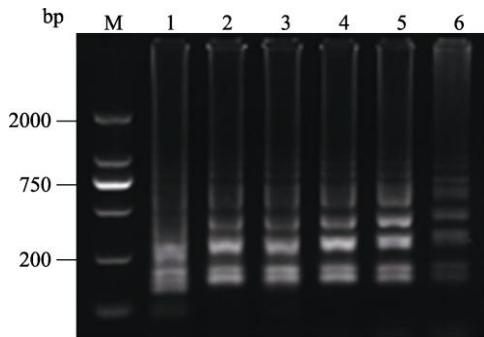


图 6 反应温度对 RT-LAMP 扩增效果的影响  
M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: 60℃; 2: 61℃; 3: 62℃;  
4: 63℃; 5: 64℃; 6: 65℃.  
Fig. 6 Effect of different temperature on RT-LAMP amplification  
M: DL2000 DNA marker; 1: 60℃; 2: 61℃; 3: 62℃; 4: 63℃;  
5: 64℃; 6: 65℃.

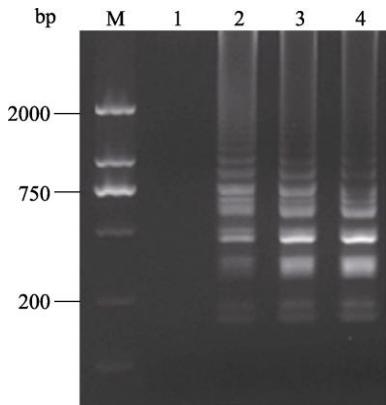


图 7 反应时间对 RT-LAMP 扩增效果的影响  
M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: 30 min; 2: 45 min;  
3: 60 min; 4: 90 min.  
Fig. 7 Effect of reaction time on RT-LAMP amplification  
M: DL2000 DNA marker; 1: 30 min; 2: 45 min; 3: 60 min;  
4: 90 min.

## 2.2 RT-LAMP 检测方法的特异性

RT-LAMP 检测 GCRV 的特异性试验中, 只有 GCRV 出现典型的梯形扩增条带, 而 CCRV、SVCV、KHV、GSIV 等均无梯形条带扩增(图 8), 说明设计的 RT-LAMP 引物对 GCRV 具有良好的特异性。

## 2.3 RT-LAMP 和 RT-PCR 的灵敏度检测

将 10 倍稀释的 GCRV 基因组 RNA 模板分别进行 RT-LAMP、RT-PCR 检测, 结果显示, RT-LAMP 方法的检测限为 33 pg, 而 RT-PCR 的检测限为 332 pg, 比 RT-LAMP 检测限高 10 倍(图 9)。

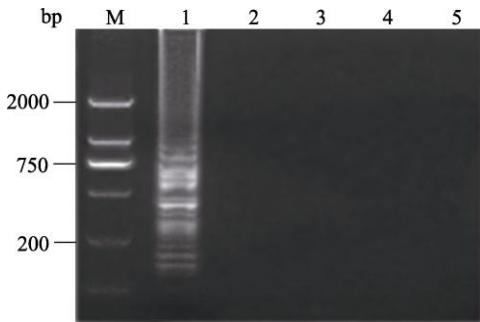


图 8 GCRV RT-LAMP 检测的特异性  
M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: GCRV; 2: CCRV;  
3: SVCV; 4: KHV; 5: GSIV.  
Fig. 8 Specificity of GCRV detection by RT-LAMP  
M: DL2000 DNA marker; 1: GCRV; 2: CCRV; 3: SVCV;  
4: KHV; 5: GSIV.

## 2.4 RT-LAMP 快速检测草鱼呼肠孤病毒的应用

对 3 个渔场疑似草鱼出血病的草鱼样本以及健康草鱼样本的肾组织进行 RT-LAMP 检测, 结果显示, 健康草鱼样本为 GCRV 阴性, 湖北省江北农场三分场样本、湖北省江陵县文村渔场及河南省虞城县黄河滩渔场的疑似患草鱼出血病的草鱼样本均为 GCRV 阳性(图 10)。随后的病毒分离培养、基因组 SDS-PAGE 分析等试验(另文报道)证实了该结果, 可以证明 RT-LAMP 检测 GCRV 的准确性。

## 3 讨论

GCRV VP6 蛋白是草鱼呼肠孤病毒的核衣壳蛋白<sup>[21]</sup>, 对 GCRV 病毒粒子的三维结构重建、衣壳蛋白结构及特性研究表明, 其 VP6 蛋白与哺乳动物正呼肠孤病毒 δ2 蛋白相似, 该蛋白属于内衣壳蛋白还是外衣壳蛋白仍存在争论, 但可以肯定其在内核和外壳的连接中起着重要作用<sup>[22-24]</sup>。因此本研究针对 GCRV VP6 蛋白基因序列设计引物用于 GCRV 病毒检测。

目前, 国内外检测草鱼呼肠孤病毒的常用方法是免疫学检测方法及 RT-PCR 方法<sup>[4-7]</sup>, 但免疫学方法的特异性有待提高, RT-PCR 对实验的要求高, 且需要昂贵的 PCR 仪器, 限制了其大规模应用。

环介导等温扩增(LAMP)技术是一种快速、灵敏的检测方法, 反应在恒温条件下进行, 不需要高温即可使 DNA 双链解链, 可在 1 h 内对数个拷

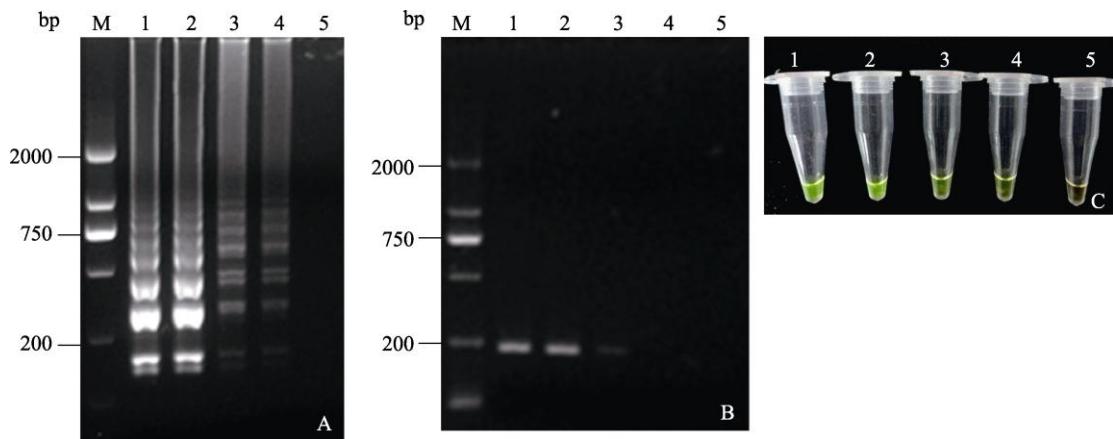


图 9 RT-LAMP 与 RT-PCR 对 GCRV 检测的灵敏度比较

A. RT-LAMP 产物 2% 琼脂糖凝胶分析. B. RT-PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶分析. C. RT-LAMP 产物 SYBR Green I 染色分析.  
M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1:  $10^{-4}$ ; 2:  $10^{-5}$ ; 3:  $10^{-6}$ ; 4:  $10^{-7}$ ; 5:  $10^{-8}$ .

Fig. 9 Sensitivity of GCRV detection by RT-LAMP and RT-PCR

A. RT-LAMP products in 2% agarose gel; B. RT-PCR products in 2% agarose gel. C. RT-LAMP products added with SYBR Green I.  
M: DL2000 DNA marker; 1:  $10^{-4}$ ; 2:  $10^{-5}$ ; 3:  $10^{-6}$ ; 4:  $10^{-7}$ ; 5:  $10^{-8}$ .

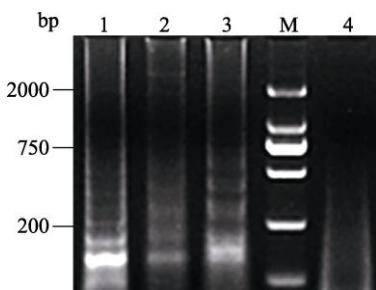


图 10 GCRV RT-LAMP 对草鱼病样的检测结果

M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: 湖北省江北农场三分场;  
2: 湖北省江陵县文村渔场; 3: 河南省虞城县黄河滩渔场;  
4: 健康草鱼样本.

Fig. 10 Results of GCRV RT-LAMP with diseased samples  
M: DL2000 DNA marker; 1: diseased grass carp sample from the third Jiangbei farm of Hubei Province; 2: sample from the Wencun fish farm Jiangling county of Hubei Province; 3: the Yellow River Beach fish farm of Yucheng county of Henan Province; 4: healthy grass carp sample.

贝的 DNA 进行  $10^9$  倍的扩增<sup>[25]</sup>。对于 RNA 病毒, 只需在反应体系中加入逆转录酶, 即可实现 RNA 的 RT-LAMP 扩增<sup>[26]</sup>。另外, 同 RT-PCR 依赖价格昂贵的 PCR 仪相比, LAMP 反应是在恒温环境下进行, 只需用普通水浴锅或其他有稳定热源的装置即可进行反应<sup>[20]</sup>, 操作简便。加入荧光染料 SYBR Green I 后, 可通过溶液的颜色变化直接肉眼观察判断扩增结果<sup>[25]</sup>。尽管 LAMP 检测方法有诸多优越性, 同时也存在一些不足。该方法的引

物设计要求较高, 且因其极其灵敏, 检测过程中较易出现假阳性, 不易辨别, 可以通过限制性酶切或加入核酸探针等方法提高其特异性<sup>[27]</sup>, 或在常规 dNTP 混合物中加入适量 dUTP 也可达到抗污染的效果<sup>[20]</sup>。

通过对扩增体系的优化发现, dNTPs、Mg<sup>2+</sup>浓度对反应的影响较大。dNTPs 作为核酸扩增的原料, 浓度太低满足不了 RT-LAMP 的高效扩增, 浓度太高不仅造成试剂的浪费, 还会增加非特异反应, 根据本实验结果, 最适 dNTPs 浓度为 1.4 mmol/L。Mg<sup>2+</sup>浓度会影响引物的退火、模板及中间产物的解离温度和 DNA 聚合酶的活性, 还会导致引物二聚体的生成, 如 Mg<sup>2+</sup>浓度过低会导致酶活力显著下降, 浓度过高又会催化非特异扩增<sup>[28]</sup>, 本实验中最适 Mg<sup>2+</sup>浓度为 6 mmol/L。Betaine 虽然不是 LAMP 反应必需的试剂, 但 Betaine 具有降低螺旋 DNA 稳定性的作用, 因此对 RT-LAMP 反应中 DNA 二级结构的破坏有一定的促进作用<sup>[29-30]</sup>, 而过多的 Betaine 又会抑制 RT-LAMP 的扩增, 本实验中 Betaine 的最适浓度为 0.6 mol/L。

本研究建立的草鱼呼肠孤病毒(GCRV)的 RT-LAMP 快速检测方法操作简单, 反应迅速, 反应体系于 63℃ 恒温保持 1 h 即可完成扩增, 反应

后加入荧光染料 SYBR Green I 即可肉眼观察结果, 检测灵敏度比 RT-PCR 方法高 10 倍。而且与 CCRV、SVCV、KHV、GSIV 等病毒没有交叉反应, 表明设计的引物特异性好, 能够满足检测需求。该方法简便快速、灵敏特异, 可应用于草鱼出血病的现场应急诊断与检测中, 可为草鱼出血病的有效防控提供有力的技术支撑。

## 参考文献:

- [1] 王菁, 张丽, 韩进刚, 等. 草鱼呼肠孤病毒的检测方法[J]. 天津水产, 2010, 2: 21–24.
- [2] 李军, 王铁辉, 陆仁后, 等. 鱼出血病病毒的研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(4): 445–453.
- [3] 杨广智, 罗毅志, 叶雪平. 葡萄球菌 A 蛋白协同凝集试验快速检测草鱼出血病病毒的研究[J]. 水产学报, 1991, 15(1): 27–33.
- [4] 江育林, 李正秋. 病毒感染的草鱼细胞产生类干扰素物质的研究[J]. 病毒学报, 1991, 7(1): 30–35.
- [5] 邵健忠, 项黎新, 李亚南, 等. 应用 Dot-ELISA 技术检测草鱼出血病病毒的研究[J]. 水产学报, 1996, 20(1): 6–12.
- [6] 王铁辉, 李军, 易咏兰, 等. 用逆转录酶链式反应监测草鱼出血病病毒的研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 1–6.
- [7] 周勇, 曾令兵, 范玉顶, 等. 草鱼呼肠孤病毒 TaqMan real-time PCR 检测方法的建立[J]. 水产学报, 2011, 35(5): 774–779.
- [8] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucl Acid Res, 2000, 28 (12): E63.
- [9] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16: 223–229.
- [10] 宋克云, 张如胜, 欧新华, 等. RT-LAMP 快速检测 Norwalk 病毒 GII 型[J]. 病毒学报, 2009, 25(4): 291–295.
- [11] Kone T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods, 2004, 115(1): 59–65.
- [12] Sappat A, Jaroenram W, Puthawibool T, et al. Detection of shrimp Taura syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification using a designed portable multichannel turbidimeter[J]. J Virol Methods, 2011, 175: 141–148.
- [13] Mekata T, Kono T, Svan R, et al. Detection of yellow head virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. J Virol Methods, 2006, 135(2): 151–156.
- [14] 孙颖杰, 岳志芹, 刘芸, 等. 牙鲆弹头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, 2010, 29(2): 203–207.
- [15] Xu H D, Feng J, Guo Z X, et al. Detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods, 2010, 163: 123–128.
- [16] Chen J G, Xiong J, Cui B J, et al. Rapid and sensitive detection of mud crab Scylla serrata reovirus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Virol Methods, 2011, 178: 153–160.
- [17] 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾脏组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性[J]. 水产学报, 1986, 10(1): 11–17.
- [18] 曾令兵, 李晓莉, 张林, 等. 斑点叉尾鮰肾脏组织细胞第的建立及其生物学特性[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 75–81.
- [19] Chen Z Y, Liu H, Li Z Q, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies to spring viraemia of carp virus [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2008, 123(3–4): 266–276.
- [20] 何琳, 徐海圣, 王美珍, 等. 白斑综合征病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 598–603.
- [21] Fang Q, Shan S, Liang Y Y, et al. 3D reconstruction and capsid protein characterization of grass carp reovirus[J]. Sci China Ser C:Life Sci, 2005, 48(6): 593–600.
- [22] Arun K D, Michelle M, Kurt R K, et al. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and whit spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry [J]. J Clin Microbiol, 2001, 8(1): 2836–2845.
- [23] 王炜, 蔡宜权, 方勤, 等. 草鱼出血病病毒基因的定位 [J]. 中国病毒学, 1994, 9(4): 356–361.
- [24] Qiu T, Zhang J. Genome segment S8 of grass carp hemorrhage virus encodes a vorom protein[J]. Intervirology, 2001, 44(5): 317–320.
- [25] 李明云, 丁文超, 陈炯, 等. 环介导恒温扩增技术快速检测对虾白斑综合征病毒方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(1): 186–190.
- [26] 赵飞, 邹为民. LAMP 法在水产动物病原快速检测中的应用[J]. 南方水产, 2007, 3(2): 71–75.
- [27] 冯华, 张改平, 郭军庆, 等. 对虾白斑综合征病毒 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(07): 707–711.
- [28] Baud O, Emilie D, Pelletier E, et al. Amniotic fluid concentrations of interleukin-1 beta, interleukin-6 and TNF-alpha in

- chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1999; 106(1): 72–77.
- [29] 张浩, 李晓霞, 张军权, 等. 蛋白质芯片的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2001, 29(4): 69–72.
- [30] Zhang C X, Mei Q. Protein microarray-a new tool for detection of TORCH infection[J]. Adv Nanomat Nanodev, 2002; 7: 397–407.

## Development of a reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of grass carp reovirus

ZHANG Jinfeng<sup>1</sup>, ZENG Lingbing<sup>1,2</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, ZHOU Yong<sup>2</sup>, XIAO Yi<sup>2</sup>, SU Lan<sup>1</sup>, GAO Zhengyong<sup>1</sup>

1. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

**Abstract:** Two pairs of specific primers were designed based on the grass carp reovirus (GCRV) VP6 coding gene sequence. Using GCRV genomic total RNA as a template, we developed a reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay. After optimizing the reaction conditions, we were able to successfully amplify the targeted GCRV VP6 coding gene at 63°C in 1 h. Analysis of the amplified products by agarose electrophoresis revealed that the band pattern resembled that of the ladder diagram in a gel. After adding SYBR Green I fluorescent dye to the reaction system, the green positive amplification could be viewed by eye. Our assay was highly sensitive to grass carp reovirus with a lower detection limit of 33 pg, which was 10-fold higher than that of traditional RT-PCR for GCRV. Moreover, the assay was specific for the detection of GCRV and was not susceptible to cross reaction with other viruses, including Channel catfish reovirus (CCRV), Spring viremia of carp virus (SVCV), Koi herpesvirus (KHV), and giant salamander iridovirus (GSIV). In conclusion, the RT-LAMP assay is convenient, rapid, sensitive, and specific for GCRV detection. Our assay provides a novel approach for the detection of GCRV and the diagnosis of grass carp hemorrhage.

**Key words:** Grass carp hemorrhage; reovirus; reverse transcription; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); detection;

**Corresponding author:** ZENG Lingbing. E-mail: zenglingbing@gmail.com