

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00419

草鱼呼肠孤病毒三重 PCR 检测方法的建立及其应用

曾伟伟, 王庆, 王英英, 张乐生, 刘宝芹, 石存斌, 吴淑勤

中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 广东 广州 510380

摘要: 针对草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)各类型毒株的保守区域分别设计 3 对引物, 优化反应条件和体系, 建立了草鱼呼肠孤病毒三重 RT-PCR 检测方法, 通过 PCR 扩增分别获得大小约为 530 bp、297 bp 和 196 bp 的 DNA 片段。进一步分析表明, 该检测方法具有良好的敏感性、特异性和稳定性, 可以检测 I、II、III 型核酸最低量分别约为 260、190 与 230 拷贝的病毒量, 且某一类型的引物只能检测到同一类型的 GCRV。用建立的多重 RT-PCR 方法对 2008—2011 年采集自江西、广东、湖北、浙江、重庆、四川、福建等地的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)主养区的 86 份草鱼出血病样品进行检测和初步流行病学分析。结果表明, I 型阳性率为 9.3%, II 型阳性率为 45.3%, III 型阳性率为 2.3%, I 型和 II 型混合感染阳性率为 5.8%, II 型和 III 型混合感染阳性率为 2.3%, 其他类型的混合感染未检测到。表明目前主要流行的草鱼呼肠孤病毒为 II 型。本研究建立的 GCRV 三重 PCR 检测方法可以特异性的检测各种类型的草鱼呼肠孤病毒, 且具有较高的敏感性; 利用该方法进行草鱼出血病初步的流行病学分析表明, 目前主要流行的草鱼呼肠孤病毒为 II 型, 不同毒株类型混合感染的现象也普遍存在。本方法的建立旨在对草鱼出血病的快速诊断和分子流行病学调查提供实用的可操作手段。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒; 草鱼出血病; 三重 PCR; 基因型; 流行病学调查; 快速诊断

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0419-08

草鱼出血病是由草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)引起的、具有高度传染性与致死性的病毒性疾病^[1]。近年来经常可见因草鱼出血病暴发而导致大批草鱼死亡, 给养殖户和当地政府造成巨大经济损失的报道。据不完全统计, 每年由于草鱼出血病导致的经济损失至少达 10 亿元^[2-3], 严重影响了广大草鱼养殖者的积极性和中国淡水养殖业的健康发展, 该病病原及其防治技术的研究多次被列为国家科技攻关项目^[4]。

目前, 对于草鱼出血病的防治, 还没有特异有效的治疗药物和方法, 最为有效的办法仍然是免疫预防^[2,5-6]。细胞灭活疫苗与细胞弱毒疫苗的应用, 对减少草鱼出血病的发生起到了一定的效果^[5-6]。但是, 在疫苗应用过程中, 发现由同一地

区分离的毒株制备的草鱼出血病疫苗对本地区有效, 免疫其他地区常常引起失败或效果欠佳, 甚至免疫同一地区的草鱼也常导致免疫失败^[2,5-6]。草鱼出血病的广泛、持续流行以及经常性的疫苗免疫失败, 与其复杂多变的病原有关。草鱼呼肠孤病毒为分节段的 dsRNA 病毒, 不同分离株的各基因节段存在重配和抗原漂移现象, 导致草鱼呼肠孤病毒的毒株类型众多, 不仅各地域的流行毒株有差异, 而且同一地域也存在多种毒株共存的现象^[7]。因此, 采用合适的检测方法, 进行分子流行病学调查, 摸清草鱼呼肠孤病毒流行本底, 开发有针对性的疫苗等防控产品, 进行精准免疫预防是控制草鱼出血病频发和暴发的可行途径。

草鱼呼肠孤病毒的诊断方法有多种, 各具优

收稿日期: 2012-04-25; 修订日期: 2012-06-06.

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46); 中国水产科学研究院基础科研业务经费项目(2012A05026).

作者简介: 曾伟伟(1981-), 男, 助理研究员, 从事分子病毒研究. E-mail: xww8810303@163.com

通信作者: 吴淑勤, 研究员. E-mail: wushuqin001@21cn.com

势和缺陷,病毒分离、电镜观察^[8]、核酸带型分析至今仍是检测草鱼呼肠孤病毒普遍采用的方法,但这些方法费时费力、操作比较复杂,不能对病毒进行快速诊断,不利于草鱼出血病的流行病学调查工作^[2,9]。聚合酶链式反应(PCR)可以在数小时内对某片段基因进行扩大数百万倍。该技术特异性强,敏感性高、检测快速,已被广泛用于医学、微生物学、兽医学等学科的各领域。草鱼呼肠孤病毒不同毒株的 RT-PCR 检测方法已经广泛建立起来^[6,10-12],但这些常规 PCR 反应一次只能检测一种类型的草鱼呼肠孤病毒,而导致草鱼出血病的毒株类型较多,而且经常出现多种毒株混合感染的现象,症状表现也多种多样,这就可能需要多次检测和测序才能确定毒株类型,使得检测时间延长,检测费用增加,延误草鱼出血病的防控。多重 PCR 可以同时检测多种类型的病毒,方便快捷,适合进行快速检测和流行病学调查。

草鱼呼肠孤病毒至今还没在血清学或者基因型上对其进行系统分类。目前已报道的 20 多个分离株^[6,14-17]中,完成全基因组序列分析的有 GCRV-873 株^[1,18]、GCRV-HZ08^[6,19]和 GCRV-GD10^[20],其他毒株则完成部分节段或者部分序列的测序工作。根据现有的分离株序列信息,进行核苷酸序列与氨基酸序列比对以及构建系统进化树分析,所有毒株总体上可以分为 3 大类,即草鱼呼肠孤病毒至少应该存在 3 个基因型。在相关的报道中已有提到将其进行基因分型的探讨,即分别把这 3 类毒株按照基因序列差异分为型(代表株为 GCRV-873 与 GCRV-873-JX09-01)、

型(代表株为 GCRV-HZ08 与 GCRV-GD10)和型(GCRV-104, GCRV-HB-1007)^[17,20]。不同类型的毒株其核苷酸和氨基酸序列的同源性都小于 30%,而同一类型的毒株其核苷酸和氨基酸序列的同源性都大于 95%。当前,全国各地分离到的流行株中,三类亚型均有报道,有的单独感染,也有混合感染。本研究根据同一亚型不同毒株之间共有的保守序列分别设计引物,建立针对目前已知流行的所有草鱼呼肠孤病毒均能同时作诊断,并且可以鉴定其亚型的三重 PCR 检测技术。利用建立

的三重 PCR 方法对 2009—2011 年期间从全国各地收集的草鱼出血病病料进行检测和初步流行病学分析,验证该方法对临床样品检测的可靠性。总之,草鱼呼肠孤病毒三重 PCR 建立,将为 GCRV 感染的分子流行病学调查和相关基础研究提供一种可靠的检测工具。

1 材料与方法

1.1 细胞和毒株

草鱼肾细胞系(CIK)、鲤鱼上皮细胞系(EPC)购自武汉大学细胞典藏中心、鳊脑细胞系(SCC)由本实验室建立并保存;锦鲤疱疹病毒 3 型(KHV)、传染性造血器官坏死病毒(IHNV)、大口黑鲈虹彩病毒(LMBV)、传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)、GCRV-HZ08、GCRV-JX09-01、GCRV-JX10-01、GCRV-JX09-02、GCRV-HB-1007 株由本实验分离并保存,蛙病毒(FV3)、GSRV(golden shiner 呼肠孤病毒)购自 ATCC。

1.2 核酸提取

使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) 来提取 RNA,具体操作步骤和方法根据该试剂盒的说明书进行,提取的 RNA 最后用无 Rnase 的去离子水溶解,保存于 -80°C 冰箱备用。使用 Dneasy Blood & Tissue kit (Qiagen, USA)来提取 DNA,具体操作步骤和方法根据该试剂盒的说明书进行,提取的 DNA 最后用去离子水溶解,保存于 -20°C 冰箱备用。

1.3 引物设计和合成

分析了 GENBANK 中已有和我们目前完成测序的 GCRV 基因序列,分别选取 I 型 GCRV 的 S6 基因一段 532 bp 保守序列、II 型 GCRV 的 S6 基因一段 196 bp 的保守序列和 III 型 GCRV 的 S8 基因一段 297 bp 的保守序列作为扩增目标,设计合成了 3 对引物。引物由上海 Invitrogen 公司合成,引物信息见表 1。

1.4 多重 PCR 扩增条件优化

反转录引物使用 random 6 mers 0.5 μL (50 μm),病毒 RNA 1 μL ,使用 TAKARA 公司的 AMV 反转录试剂盒(TAKARA,大连),共 10 体系,

表 1 3 种不同亚型草鱼呼肠孤病毒的特异性引物
Tab.1 Three pairs of primers used in multiplex PCR for three genotypes of GCRV

毒株类型 type	引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')	扩增产物大小/bp PCR product
I	P01-F	5' GCC ACC TTT GAG CGC GAG AC 3'	532
	P01-R	5' GTT AGG GCG GAA AGC ATA CCA GA 3'	
II	P02-F	5' GCT GAT GCT GCA GAC GGC TAA AC 3'	196
	P02-R	5' TAA TTG CCT GCT GCG CTG ACT 3'	
III	P03-F	5' GGC GGC ATG AAT ATG TAT CGA CT 3'	297
	P03-R	5' TAT GTG ATT ACG CGG GTC AG 3'	

过程参考说明书进行。PCR 使用 25 μ L 反应体系, 包括: 10 μ L 反转录产物, 3 μ L P01、P02 和 P03 引物的混合物((引物总浓度为 25 pmol/L, 各引物比例为 P01-F P01-R P02-F P02-R P03-F P03-R=2 2 1.3 1.3 1.7 1.7), 0.25 μ L LA *Taq* 酶(TAKARA, 大连), 2.5 μ L 缓冲液(TAKARA, 大连), 2 μ L dNTP(TAKARA, 大连), 用水补齐体积。设计常规 PCR 反应条件, 分别使用 47.8 $^{\circ}$ C、51.6 $^{\circ}$ C、53.2 $^{\circ}$ C、54.6 $^{\circ}$ C、55.8 $^{\circ}$ C 试验最佳退火温度, 分别使用 25 次、30 次、35 次试验最佳循环次数。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定, 确定最佳 PCR 条件。

1.5 敏感性试验

按照试剂盒说明书的操作步骤提取病毒 RNA, 使用荧光定量方法测定^[16-18]的 RNA 反转录产物 cDNA 的浓度, 10 倍系列稀释后使用前面研究获得最佳 RT-PCR 条件进行扩增, 探讨该方法可检测 RNA 的最低量。

1.6 特异性试验

用本方法检测 KHV、IHNV、LMBV、ISKNV、GCRV-HZ08 株、GCRV-JX09-02、GCRV-JX10-01 株、GCRV-JX09-01 株、GCRV-HB-1007 株、GSRV 株及分离和检测到但未命名的草鱼呼肠孤病毒, 分析本方法对鱼类其他常见病毒和草鱼呼肠孤病毒检测情况。

1.7 多重 PCR 检测方法的初步应用

对本实验室于 2009—2011 年从江西、湖北、广东、浙江、江苏、重庆等草鱼主养区 16 个省市采集并保存的 86 份草鱼出血病疑似样品, 用建立的三重 PCR 方法进行检测, 对于检测为阳性的样

品通过测序分析来进一步确定。

2 结果与分析

2.1 反应条件优化结果

对不同 PCR 退火温度和循环数进行试验, 试验的 5 个退火温度、3 种循环数均能扩增得到目的片段, 53.2 $^{\circ}$ C 为最佳退火温度, 30 次循环和 35 次循环的扩增效果相差不大。因此, 本研究建立的草鱼呼肠孤病毒三重 RT-PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53.2 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 以 GCRV-JX09-01 株 (I 型) 为模板可以扩增得到 532 bp 的目的片段; 以 GCRV-HZ08 株 (II 型) 为模板可以扩增得到 196 bp 的目的片段; 以 GCRV-HB-1007 株 (III 型) 为模板可以扩增得到 297 bp 的目的片段; 以 HZ08 株、HB-1007 株和 JX09-01 株中的两种或 3 种 GCRV 作为模板可以扩增得到 196 bp、297 bp 和 532 bp 中的两条或 3 条目的片段 (图 1)。

2.2 敏感性检测结果

取各毒株细胞液各 100 μ L, 使用 Qiagen 公司的 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 用荧光定量方法确定其反转录产物 cDNA 的终浓度, GCRV-JX09-01 (I 型)、GCRV-HZ08 (II 型) 与 GCRV-HB-1007 (III 型) 的 cDNA 终浓度分别为 2.6×10^6 拷贝/ μ L、 1.9×10^6 拷贝/ μ L 与 2.3×10^6 拷贝/ μ L。10 倍梯度稀释后, 每个 PCR 反应使用 1 μ L 模板, GCRV-JX09-01 (I 型)、GCRV-HZ08 (II 型) 与 GCRV-HB-1007 (III 型) 分别可以检测到 2.6×10^2 、 1.9×10^2 、 2.3×10^2 拷贝/ μ L 稀释度样品。即本试验可以检测 I、II、III 型核酸最低量分别约为 260、190 与 230 拷贝的

病毒量(图 2)。

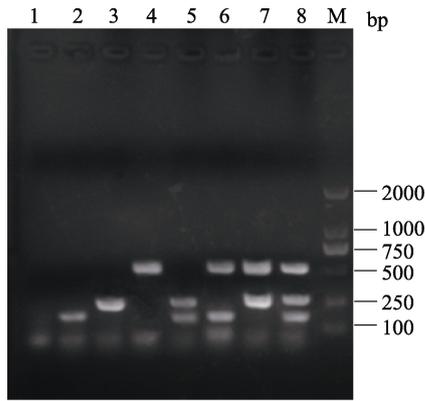


图 1 GCRV 三重 RT-PCR 扩增电泳图

泳道 1: 未加模板的阴性对照; 泳道 2~8 分别以不同的草鱼呼肠孤病毒株 RNA 的反转录 cDNA 为模板。其中, 泳道 2: HZ08 株; 泳道 3: HB-1007 株; 泳道 4: JX09-01 株; 泳道 5: HZ08 株和 HB-1007 株; 泳道 6: HZ08 株和 JX09-01 株; 泳道 7: HB-1007 株和 JX09-01 株; 泳道 8: GCRV HZ08 株、HB-1007 株和 JX09-01 株; M: DL2 000 bp marker.

Fig.1 Amplification result of GCRV multiplex PCR assay
Lane 1: negative control; Lane 2: cDNA of GCRV-HZ08 strain; Lane 3: cDNA of HB-1007 strain; Lane 4: cDNA of JX09-01 strain; Lane 5: cDNAs of HZ08 and HB-1007 strain; Lane 6: cDNAs of HZ08 and JX09-01 strain; Lane 7: cDNAs of HB-1007 and JX09-01 strain; Lane 8: cDNAs of HZ08, HB-1007 and JX09-01 strain; M: DNA DL2 000 bp marker.

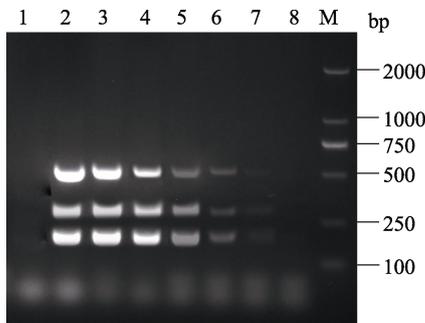


图 2 GCRV 三重 RT-PCR 敏感性试验电泳图

泳道 1: 未加模板的阴性对照; 泳道 2~8: 以 GCRV-HZ08 株、GCRV-HB-1007 株和 GCRV-JX09-01 株 RNA 反转录产物 cDNA 浓度分别为 $2.6 \times 10^6 \sim 2.6 \times 10^0$ 拷贝/ μL 、 $1.9 \times 10^6 \sim 1.9 \times 10^0$ 拷贝/ μL 及 $2.3 \times 10^6 \sim 2.3 \times 10^0$ 拷贝/ μL 为模板的扩增产物; M: DL2 000 bp marker.

Fig. 2 Sensitivity test of GCRV multiplex PCR assay
lane 1: negative control; lane 2—8: diluted cDNA of HZ08 ($2.6 \times 10^6 \sim 2.6 \times 10^0$ copies/ μL), HB-1007 ($1.9 \times 10^6 \sim 1.9 \times 10^0$ copies/ μL) and JX09-01 ($2.3 \times 10^6 \sim 2.3 \times 10^0$ copies/ μL) respectively; M: DL2 000 bp marker.

2.3 特异性检测结果

使用 95°C 5 min 预变性, 94°C 30 s, 53.2°C 40 s, 72°C 40 s, 30 个循环, 72°C 延伸 10 min 的 PCR 条件; 以不同亚型的草鱼呼肠孤病毒核酸反转录产物为模板均可以扩展得到相应大小的目的片段, 而以其他鱼类常见病毒核酸为模板不能扩增得到任何片段(图 3)。

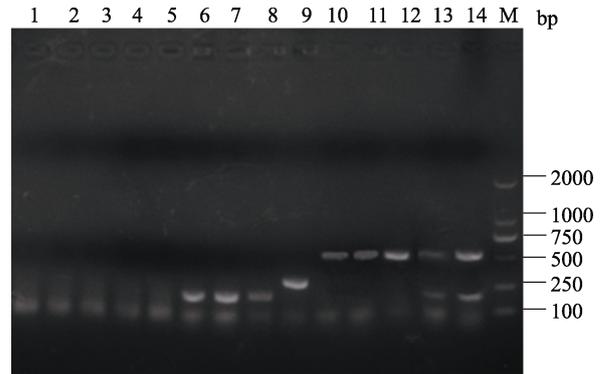


图 3 GCRV 三重 PCR 特异性试验

泳道 1: 未加模板的阴性对照; 泳道 2~5: 分别以 KHV、IHNV、LMBV 和 ISKNV 的核酸或反转录产物为模板; 泳道 6~8: 分别以 GCRV-HZ08、GCRV JX09-02 和 GCRV-JX10-01 株 RNA 反转录产物 cDNA 为模板; 泳道 9: GCRV-HB-1007 RNA 反转录产物 cDNA 为模板; 泳道 10~12: 分别以 GCRV-JX09-01、GSRV 和一株从广西分离到的草鱼呼肠孤病毒 RNA 反转录产物 cDNA 为模板; 泳道 13~14: 分别从湖北和江西分离到混合感染的草鱼呼肠孤病毒 RNA 反转录产物 cDNA 为模板; M: DL2 000 bp marker.

Fig.3 Specificity test of GCRV multiplex PCR assay
Lane 1, negative control; lanes 2—5: template with DNA or cDNA from KHV, IHNV, LMBV and ISKNV respectively; lanes 6—14: template with cDNA from HZ08, JX09-02, JX10-01, HB-1007, JX09-01, GSRV and a new strain was isolated from Guangxi Province respectively; M: DL2 000 bp marker.

2.4 多重 PCR 对临床样品检测结果

初步应用建立的方法对 2008—2011 年采集自江西、广东、湖北、浙江、重庆、四川、福建等草鱼主养区 16 个省市的 86 份草鱼出血病样品进行检测。结果表明, 型阳性为 8 份, 阳性率为 9.3%; 型检测阳性为 39 份, 阳性率为 45.3%; 型阳性为 2 份, 阳性率为 2.3%; 型和型混合感染阳性为 5 份, 阳性率为 5.8%; 型和型混合感染阳性为 2 份, 阳性率为 2.3%; 其他类型的混合感染未检测到。见图 4(部分检测结果)和表 2。

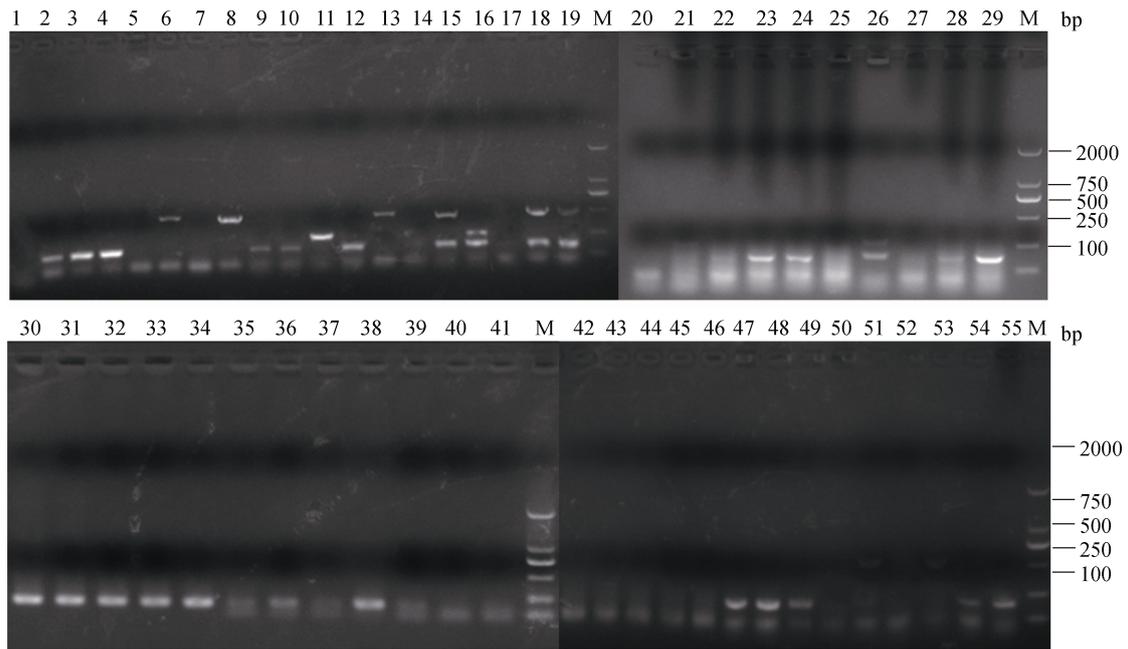


图 4 部分临床样品三重 PCR 检测结果

泳道 1: 未加模板的阴性对照; 泳道 2~55: 分别从江西、湖北、广西、广东、浙江、山东、湖南采集的 55 份草鱼出血病样品 RNA 反转录产物 cDNA 为模板; M: DL2 000 bp marker.

Fig. 4 Results of detection by multiplex PCR for partial suspected Grass carp hemorrhage specimens
Lane 1: negative control; Lanes 2-55: template with cDNA from 54 suspected Grass carp hemorrhage specimens;
M: DL2 000 bp marker.

表 2 86 份草鱼出血病临床样品三重 PCR 检测结果

Tab. 2 Results of detection by multiplex PCR for 86 suspected grass carp hemorrhage specimens

检测项目 item	类型 type						
	I	II	III	I + II	I + III	II + III	I + II + III
阳性份数 positive samples	8	39	2	5	0	2	0
阳性率/% positive rate	9.3	45.3	2.3	5.8	0	2.3	0

3 讨论

草鱼呼肠孤病毒是目前已知毒力最强的水生呼肠孤病毒, 在中国淡水养殖业中经常可见因感染 GCRV 而导致草鱼大批死亡报道, 给中国淡水养殖业造成了严重的危害^[2-3,6]。对草鱼出血病最为有效的办法是接种疫苗, 进行免疫预防^[3, 6, 16]。但由于该病毒毒株类型众多, 且没有血清学和基因学分型, 给草鱼出血病流行病学调查工作造成了巨大麻烦和困境, 无法系统了解草鱼呼肠孤病毒的流行本底, 使草鱼出血病的防控难度加大。本研究根据目前已报道的草鱼呼肠孤病毒基因序列信息, 建立了能区分 GCRV 3 种基因型的三重 PCR 检测技术, 该技术在草鱼出血病的病原诊

断、流行病学调查、基因分型研究以及针对性疫苗或多价疫苗的研制和开发等方面可以发挥重要的作用。

多重 PCR 是一种特殊形式的 PCR, 就是在同一反应体系中加入多对引物, 同时扩增多个目的基因片段的分子生物学技术。引物设计是影响多重 PCR 扩展效果最为关键的因素^[21-22]。本研究分别根据 I 型、II 型和 III 型 GCRV 的一段保守序列, 综合考虑每对引物的特异性、扩增效率和引物对之间可能形成的二聚体等因素, 获得了一组共 3 对较为理想的引物组。该引物组有较高的特异性和敏感性, 而且 3 对引物对 GCRV 3 个基因型的核酸扩增片段的长度分别为 532 bp、197 bp

和 298 bp, 目的片段之间具有明显的大小差异, 能够在琼脂糖凝胶电泳中明显区分。引物的浓度和各引物之间的比例也是影响多重 PCR 扩增效率的重要因素。本研究经过条件优化, I 型、II 型和 III 型的引物终浓度分别为: 0.75 pmol/L、0.39 pmol/L 和 5.1 pmol/L, 其比例为 2 : 1.3 : 1.7 时, 扩增效果较好。可见引物的用量和扩增的片段大小呈正相关, 即扩增片段越大的引物, 其需要的引物量也越多。这与 Das 等^[23]认为在多重 PCR 体系中存在小片段优先原则相吻合。

三重 PCR 在不同退火温度和循环数的试验中, 5 个退火温度、3 个循环数均能扩增得到目的片段, 53.2℃ 为最佳退火温度, 30 次循环和 35 次循环的扩增效果相差不大。多重 PCR 需要优化的条件之一就是尽量提高退火温度和减少扩增循环次数, 以减少非特异性带的产生^[22], 尽量缩短的反应时间是快速检测技术的特点之一。因此, 本研究建立的草鱼呼肠孤病毒三重 PCR 的最佳退火温度和循环次数分别是 53.2℃ 和 30 次循环。优化的三重 PCR 反应体系和条件可以明显区分不同基因型的特异性片段和不同基因型混合的模板, 说明反应条件得当。

多重 PCR 敏感性试验中, 对 GCRV-JX09-01 (I 型)、GCRV-HZ08 (II 型) 与 GCRV-HB-1007 (III 型) 分别可以检测到 1.6×10^2 、 1.2×10^2 、 1.3×10^2 拷贝/ μL 稀释度样品。即本研究建立的三重 PCR 方法可以检测 I、II、III 型 GCRV 核酸最低量分别约为 260、190 与 230 拷贝的病毒量。说明该方法具有较高的敏感性, 临床上采集的草鱼出血病样品, 其病毒含量一般都在 500 拷贝/ μL 以上, 因此, 该方法的灵敏度能够满足临床样品检测的要求。但是其灵敏度低于 real-time PCR 和常规的 RT-PCR 检测方法, 刘宝芹等^[20,24]建立的 GCRV-HZ08 株和 GCRV-JX09-01 株的 FQ-PCR 检测方法, 分别可以检测到 6 拷贝/ μL 和 10 拷贝/ μL 的病毒量, 而周勇等^[25]建立的 GCRV-104 株 TaqMan real-time PCR 检测方法, 最低可以检测到 60 拷贝/ μL 的病毒量, 而针对 HZ08 株、JX09-01 株, 873 株建立的常规 RT-PCR 检测方法, 最低可以检测

到的病毒量在 60 ~ 100 拷贝/ μL ^[10,20,24,26]。而临床上也可能有病毒处在感染的潜伏期, 病毒粒子浓度较低的情况, 因此, 对一些三重 PCR 检测为阴性疑似草鱼呼肠孤病毒感染样品, 可能需要再配合更灵敏的荧光定量方法或常规的 RT-PCR 来进一步确认。进一步提高该三重 PCR 检测方法的灵敏度也是可行的选择, 乌日琴等^[27]建立的锦鲤疱疹病毒多重 PCR 检测方法, 其检测下限为 10 ~ 100 fg, 相当于 5 ~ 50 拷贝/ μL 的病毒量。

多重 PCR 特异性试验中, 该体系能够扩增 GCRV-HZ08 株、GCRV-JX09-02 株、GCRV-JX10-01、GCRV-HB-1007、GCRV-JX09-01 株、GSRV 株和一株从广西分离到的草鱼呼肠孤病毒等不同类型的草鱼呼肠孤病毒, 且条带单一, 并且能区分不同类型毒株的混合感染, 但不能扩增 KHV、IHNV、LMBV、ISKNV 等其他常见的水生病毒, 表明该方法特异性良好, 而且对于不同类型草鱼呼肠孤病毒的单独感染和混合感染, 都能进行准确诊断和区分。

利用建立的三重 PCR 对采集自全国草鱼主养区的 86 份草鱼出血病样品进行初步检测和流行病学分析结果显示: GCRV I 型检出 11 份, 阳性率为 9.3%, GCRV II 型检测 39 份, 阳性率为 45.3%, GCRV III 型检出 2 份, 阳性率为 2.3%, I 型和 II 型混合感染检测 5 份, 阳性率为 5.8%, II 型和 III 型混合感染检出 2 份, 阳性率为 2.3%, 其他类型的混合感染未检测到。初步的流行病学分析可以得出: 目前主要流行的草鱼呼肠孤病毒为 II 型; 草鱼呼肠孤病毒多种类型毒株混合感染的现象比较普遍; 同一地域有不同类型毒株共同流行的现象。因此, 针对 II 型草鱼呼肠孤病毒的疫苗等防控产品将在草鱼出血病的防治中起到主要作用; 针对不同地域的存在不同流行株或同一地域不同类型毒株混合感染现象, 研制有针对性的特异性疫苗和多价疫苗, 将能发挥更好和更广泛的作用。本实验的三重 PCR 从 86 份草鱼出血病样品中检测出 II 型 GCRV 共 46 份, 而在我们前期针对 HZ08 株 (II 型) 建立的 RT-LAMP 和常规 RT-PCR 检测技术^[26], 分别从这 86 份草鱼出血病

样品中检测出 54 份和 47 份阳性样品, 三者结果的差异可能与不同检测方法的灵敏度有关, 其中 RT-PAMP 的灵敏度最高, 其次是常规 RT-PCR, 而三重 PCR 的灵敏度相对较低, 可能是由于引物之间的相互影响所致。

总之, 本研究建立的 GCRV 三重 PCR 检测方法可以特异性的检测各种类型的草鱼呼肠孤病毒, 且具有较高的敏感性, 不需要多次进行 PCR 就可以在 2~3 h 内一次性完成鉴定工作, 因此非常有利于 GCRV 的快速诊断和草鱼出血病分子流行病学的调查。利用该方法进行草鱼出血病初步的流行病学分析表明, 目前主要流行的草鱼呼肠孤病毒为 II 型, 不同毒株类型混合感染的现象也普遍存在。

参考文献:

- [1] Mahy B W J, van Regenmortel M H V. Aquareoviruses [J]. *Encyclopedia Virol: Third Edition*, 2008, 14(3): 163-169.
- [2] 王方华, 李安兴. 草鱼病毒性出血病研究进展[J]. *南方水产*, 2006, 2(3): 66-71.
- [3] 肖波. 草鱼呼肠孤病毒及其免疫防治研究进展[J]. *鲁东大学学报: 自然科学版*, 2010, 26 (1): 48-53.
- [4] 倪达书, 汪建国. 草鱼生物学与疾病[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [5] 马贵华, 陈道印, 刘六英, 等. 草鱼出血病的免疫学研究进展[J]. *渔业现代化*, 2008, 35(1): 45-49.
- [6] 张超. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离鉴定与全基因组分子特征分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- [7] Jiang Y. Hemorrhagic disease of grass carp: Status of outbreaks, diagnosis, surveillance, and research[J]. *Isr J Aqu*, 2009, 61(3): 188-197.
- [8] Winton J R, Lannan C N, Fryer J L, et al. Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals[J]. *J Gen Virol*, 1987, 68: 353-364.
- [9] Zhang Q Y, Ruan H M, Li Z Q, et al. Detection of grass carp hemorrhage virus (GCHV) from vietnam and comparison with GCHV strain from China[J]. *High Technol Lett*, 2003, 9(2): 7-13.
- [10] Seng E K, Fang Q, Sin Y M, et al. Development of a rapid, sensitive and specific diagnostic assay for fish aquareovirus based on RT-PCR[J]. *J Virol Methods*, 2004, 118: 111-122.
- [11] Li J, Wang T H, Chen H X, et al. A detection method for grass carp hemorrhagic virus (GCHV) based on a reverse transcription polymerase chain reaction[J]. *Dis Aquat Org*, 1997, 29: 7-12.
- [12] Zhang L, Luo Q, Fang Q, et al. An improved RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of grass carp reovirus[J]. *J Virol Methods*, 2010, 169: 28-33.
- [13] 郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓艺, 等. 草鱼呼肠孤病毒湖州分离株的分离及鉴定[J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 47-51.
- [14] 徐洋, 郝贵杰, 沈锦玉, 等. 两株江西分离株草鱼呼肠孤病毒分离及鉴定[J]. *淡水渔业*, 2010, 40(1): 36-47.
- [15] 张超, 王庆, 石存斌, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离与鉴定[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(6): 1257-1263.
- [16] Ye X, Tian Y, Deng G, et al. Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China[J]. *Virus Res*, 2012, 163(1): 275-283.
- [17] 曾伟伟, 王庆, 刘永奎, 等. 一株草鱼呼肠孤病毒弱毒株的分离、鉴定及免疫原性初步分析[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(5): 790-795.
- [18] 邱涛. 草鱼出血病病毒基因组研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2001.
- [19] Zhang C, Wang Q, Shi C, et al. Molecular analysis of grass carp reovirus HZ08 genome segments 1-3 and 5-6[J]. *Virus Genes*, 2010, 41(1): 102-104.
- [20] 刘宝芹, 曾伟伟, 王庆, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 FQ-PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(2): 360-369.
- [21] Hua Q H, Tu J, Han X G, et al. development of multiplex PCR assay for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica* simultaneously from ducks[J]. *J Microbiol Methods*, 2011, 87: 64-69.
- [22] Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses [J]. *J Virol Methods*, 2005, 126: 53-63.
- [23] Das A, Spackman E, Senne D, et al. Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents Suatez [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9): 3065-3073.
- [24] 刘宝芹, 曾伟伟, 王庆, 等. 草鱼呼肠孤病毒 JX-0901 株 FQ-PCR 检测方法的建立及生物学特性分析[J]. *广东农业科学*, 2012, 39(1): 139-143
- [25] 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): 775-778.

- [26] Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, et al. Rapid and sensitive detection of grass carp reovirus HZ08 strain by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. *J Virol Methods*, 2012, 180(1–2): 7–10
- [27] 乌日琴, 陈芳, 张艺宜, 等. 多重 PCR 方法检测锦鲤疱疹病毒基因[J]. *中国动物检疫*, 2011, 28 (11): 39–43.

Establishment of multiplex PCR for detection of grass carp reovirus and its application

ZENG Weiwei, WANG Qing, WANG Yingying, ZHANG Lesheng, LIU Baoqin, SHI Cunbin, WU Shuqin
Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380

Abstract: Three specific primer pairs were designed based on the conserved sequences of different genotypes of the grass carp reovirus (GCRV). 530 bp, 297 bp, and 196 bp DNA fragments were amplified and through optimizing the reaction conditions and system, a multiplex-PCR was established to detect the three genotypes simultaneously. Further studies indicate that the multiplex-PCR has good amplification efficiency, specificity, and sensitivity. The detection limit was 260 copies/ μL , 190 copies/ μL , and 230 copies/ μL for types I, II, and III, respectively. The specificity experiment indicated that the primers were strictly genotype-specific. This method provides a significant improvement in the detection, genotyping, and molecular epidemiological study of GCRV. The detection results of 86 samples collected from 16 cities in the main grass carp breeding area in China using the established multiplex-PCR method revealed that the positive rates of genotypes I, II, and III were 9.3%, 45.3%, and 2.3%, respectively. The positive co-infection rate of types I and II was 5.8%, that of types II and III was 2.3%, while co-infection of types I and III was not detected. The multiplex PCR for the three genotypes of GCRV were highly specific for the corresponding virus genotypes, with high sensitivity. Preliminary epidemiological data analysis by multiplex PCR indicates that type II is the most common genotype, and the phenomenon of combined infection of different genotypes are in general population of grass carp.

Key words: grass carp reovirus; grass carp hemorrhage disease; multiplex PCR; genotype; epidemiological survey; rapid diagnosis

Corresponding author: WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com