

鱼类神经坏死病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立和应用

罗卫^{1,2}, 李惠芳², 刘荭¹, 陈焕春², 范万红¹, 刘宗晓², 田飞焱², 王侃¹, 吕建强¹

(1. 深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518001; 2. 华中农业大学, 湖北 武汉 430070)

摘要: 根据 GenBank 中登录的鱼类神经坏死病毒 CP 基因序列, 选择高度保守区域设计引物和 TaqMan 荧光探针, 通过对实时荧光 RT-PCR 反应条件进行优化, 建立了用于检测鱼类神经坏死病毒的实时荧光 RT-PCR 方法。利用该方法检测鱼类神经坏死病毒及其他多种常见的水生动物 RNA 病毒, 结果只能检测到目的病毒, 表明其具有良好的特异性。灵敏性试验发现, 其最低检测限可达 1.2 pg/μL 的总 RNA。与 RT-PCR 的灵敏度对比试验表明, 其敏感度比 RT-PCR 高 100 倍。对同一样品进行检测, 在组内及组间的变异系数分别为 0.9% 以及 1.5%, 证实其重复性极好, 并且从抽提核酸到得出结果仅需 4 h。对临床 500 份样品进行鱼类神经坏死病毒检测, 结果发现有 40 份阳性样品。这些结果表明, 本研究建立的实时荧光 RT-PCR 能对鱼类神经坏死病毒进行准确、快速的检测, 具有特异性好、灵敏度高的优点, 是开展鱼类神经坏死病的临床检测和疫情监测工作的有力工具。[中国水产科学, 2008, 15(3): 506-510]

关键词: 鱼类神经坏死病毒; 实时荧光 RT-PCR; 检测方法

中图分类号: S941

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)03-0506-05

鱼类病毒性神经坏死病 (Viral nervous necrosis, VNN) 又称病毒性脑病和视网膜病, 是世界范围的一种鱼类流行性传染病, 对仔鱼和幼鱼危害很大, 严重者在一周内死亡率可达 100%, 对成鱼也有很高的致死率^[1]。由于其极高的传染性和危害性, 被国际兽疫组织 (OIE) 列为重要的鱼类病害^[2]。该病的病原属于 β 型诺达病毒, 是一类细小 RNA 病毒, 病毒基因组由两条单链正 RNAs 组成, 大小为 4.5 kb 左右^[3-4]。病毒粒子呈 20 面立体对称结构, 无囊膜, 直径 25~30 nm, 病毒粒子的大小常因感染鱼种类不同而不同^[5]。目前, 根据病毒衣壳蛋白基因核酸序列部分片段的同源性分析, 将 β 型诺达病毒分成红鳍东方鲀神经坏死病毒 (TPNNV)、拟鲐神经坏死病毒 (SJNNV)、条斑星鲷神经坏死病毒 (BFNNV) 和赤点石斑鱼神经坏死病毒 (RGNNV) 4 个基因型^[6]。

近几年, 国内外报道了一些该病的检测方法, 主要包括光学显微镜观察、间接荧光抗体试验、免疫组化、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 及细胞分离鉴定等^[7-9]。其

中 RT-PCR 提高了检测的灵敏度, 适合于养殖场对该病的鉴定及净化, 但是该检测方法存在易导致污染出现假阳性的现象^[10]。本研究采用 TaqMan 荧光探针技术, 建立检测鱼类病毒性神经坏死病毒的实时荧光 RT-PCR 方法, 对该方法的反应条件、特异性、敏感性等进行研究, 并与普通 RT-PCR 进行了对比试验, 以期探讨临床应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞 2 株鱼类病毒性神经坏死病毒 (Viral nervous necrosis virus, VNNV) 0602、0603 均由福建某养殖场石斑鱼鱼苗中分离获得, 由本室分离、鉴定、保存及提供; 3 株 VNNV Sd、Bovo、Bre 由意大利卫生部动物检疫研究所惠赠, 由本室保存、提供; 鲤春病毒血症病毒、传染性胰腺坏死病毒、病毒性出血性败血症病毒、草鱼呼肠孤病毒、传染性造血器官坏死病毒等水生动物 RNA 病毒均由本室分离、鉴定、保存及提供; 增殖 VNNV 的斑鳢细胞株 1 (SSN-1 细胞) 购自泰国 Kasetsart 大学水生动物

收稿日期: 2007-07-26; 修订日期: 2007-11-09.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2006AA100306); 深圳出入境检验检疫局科研项目 (SZK33-2005).

作者简介: 罗卫 (1968-), 男, 博士研究生, 主要从事动物检疫及动物病毒学研究. E-mail: luoweicq@163.com

通讯作者: 吕建强. Tel: 0755-25588685; E-mail: lvjq75@163.com

物健康研究所,由本室提供、保存。

1.1.2 引物、探针的设计与合成 根据已报道的鱼类神经坏死病毒 CP 基因核酸序列,经同源性分析比较后,选择高度保守的特异区段设计荧光 RT-PCR 的引物和 *TaqMan* 探针,并由上海基康生物技术有限公司合成、标记,具体序列是:上游引物: 5'-CGGGCGGTGGTTACGTT-3',下游引物: 5'-CGAAGGTGTGGTCGTTGTCA-3',荧光素标记 *TaqMan* 探针: 5'-HEX-CTGGCTTCCTGCCTGATCCAA-ECLIPSE-3'。

常规 RT-PCR 采用世界动物卫生组织 (OIE) 推荐的引物,上游引物是 5'-CGTGTCAAGTCATGTGTCGCT-3',下游引物是: 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成,用于扩增 VNNV 编码衣壳蛋白的基因 RNA2 的核酸片段,扩增产物大小为 421 bp。

1.1.3 仪器、试剂盒及其他试剂 ABI7500 实时荧光 PCR 仪; Genequant Pro 型核酸计数仪; L-15 细胞培养基为 HyClone 公司产品; 胎牛血清购自浙江杭州四季青生物工程材料有限公司; TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit、TaKaRa One Step RNA PCR Kit 均为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.1.4 临床送检样品 来自于国内送检的 500 尾活仔鱼,采集每尾鱼的脑、脾及眼,混合后(质量 0.1~0.5 g)研磨制备组织悬液(体积比 1:5)用于 VNNV 荧光 RT-PCR 检测,或置于 -70 °C 备用。

1.2 方法

1.2.1 病毒滴度的测定 将长成单层的细胞分散转移到 96 孔细胞培养板,细胞悬液的浓度为 10^6 个细胞/mL。用含 100 U/mL 双抗、10% 胎牛血清及 HEPES 的 L-15 细胞培养液将待测病毒样品作 10 倍系列稀释 ($10^1 \sim 10^7$),将各个稀释度的样品接种于 96 孔板,每个稀释度接种 3 孔,每孔 0.1 mL,在 5% 二氧化碳培养箱中培养,每天观察 CPE 直至对照细胞开始老化为止,然后按 Reed-Muench 氏法计算 TCID₅₀。

1.2.2 病毒核酸的提取 参照 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 的说明书进行操作。

1.2.3 常规 RT-PCR 参照刘荭等^[11]的方法进行。

1.2.4 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立和条件

优化 荧光 RT-PCR 的反应体系参照 TaKaRa One Step RNA PCR Kit 说明书配制,采用 50 μ L 反应体系,将上游、下游引物和荧光探针同时加入到反应体系中,于 ABI 7500 荧光 PCR 仪上进行反应。对荧光 RT-PCR 反应体系中引物和探针浓度进行筛选,以获得最低的 CT 值和较高的荧光强度增加值 (ΔR_n)。

1.2.5 实时荧光 RT-PCR 的特异性试验 取 6 种常见鱼类 RNA 病毒及 5 株 VNN 病毒,分别提取核酸作为模板进行 VNN 荧光 RT-PCR 检测,观察结果确定其特异性。

1.2.6 实时荧光 RT-PCR 与普通 RT-PCR 灵敏度比较 取 TCID₅₀ 为 10^4 的 VNN 病毒液 100 μ L,按 1.2.2 中的方法提取病毒 RNA,测定核酸浓度后,作 10 倍系列稀释,以每个稀释度的核酸作为模板同时进行 VNNV 的荧光 RT-PCR 与普通 RT-PCR 检测。

1.2.7 实时荧光 RT-PCR 的重复性试验 对同一样品进行荧光 RT-PCR 检测,通过组内和组间的 CT 值变异系数(标准偏差/重复值平均数)来初步评估该方法的重复性。

1.2.8 实时荧光 RT-PCR 的临床检测 利用本研究建立的 VNNV 荧光 RT-PCR 方法,对临床送检的 500 份样品进行检测。

2 结果与分析

2.1 实时荧光 RT-PCR 反应条件的优化

选用终浓度为 0.2 μ mol/L、0.4 μ mol/L、0.6 μ mol/L、0.8 μ mol/L、1 μ mol/L 的引物和 0.1 μ mol/L、0.2 μ mol/L、0.3 μ mol/L、0.4 μ mol/L、0.5 μ mol/L、0.6 μ mol/L 的探针,采用矩阵法优选引物和探针的最佳浓度。结果表明,采用 0.6 μ mol/L 的引物和 0.2 μ mol/L 的探针终浓度,检测获得的 CT 值最小而 ΔR_n 值较大,确定其为最佳引物和探针浓度。优化后的反应程序如下: 50 °C、30 min 反转录,94 °C、4 min 终止反转录; 94 °C、15 s,55 °C、40 s,72 °C、1 min,重复 40 个循环。

2.2 实时荧光 RT-PCR 方法的特异性

用建立的荧光 RT-PCR 对 6 种常见鱼类 RNA 病毒及 5 株 VNN 病毒进行检测,结果发现只有对 5 株 VNN 病毒的检测出现了阳性扩增曲线,而对其他病毒的检测为阴性(图 1),同时表明荧光 RT-PCR 与病毒分离鉴定的阳性符合率达 100%。

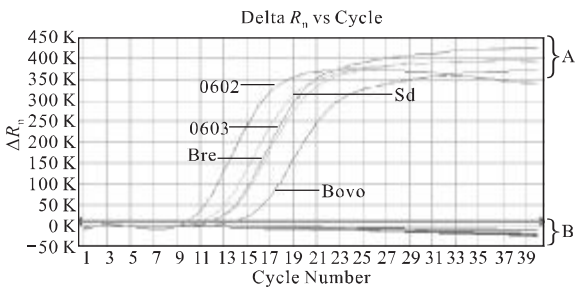


图1 VNNV 实时荧光 RT-PCR 方法的特异性检测
A: 阳性扩增曲线, 检测的病毒毒株分别为 0602、0603、Bre、Bovo、Sd; B: 阴性扩增曲线, 检测的病毒毒株分别为鲤春病毒血症病毒、传染性胰腺坏死病毒、病毒性出血性败血症病毒、草鱼呼肠孤病毒、传染性造血器官坏死病毒

Fig. 1 Specificity test for detection of VNNV by real-time RT-PCR
A: Positive amplification curves, in which the virus strains were 0602, 0603, Bre, Bovo and Sd respectively; B: Negative amplification curves, the virus strains were Spring Viremia of Carp Virus (SVC), Infectious Nancreatic Necrosis Virus (IPNV), Viral Hemorrhagic Septicemi Virus (VHSV), Grass Carp Reovirus (GCRV) and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV), respectively.

2.3 实时荧光RT-PCR与普通RT-PCR灵敏度比较

取 TCID₅₀ 为 10⁴ 的 VNN 病毒液 100 μL 抽取总 RNA, Genequant Pro 型核酸计数仪测定其核酸质量浓度为 120 ng/μL。将 RNA 进行 10 倍系列稀释 (10⁻¹~10⁻⁶), 分别同时进行荧光 RT-PCR 反应和普通 RT-PCR 反应, 结果荧光 RT-PCR 可以检测的最低稀释度为 10⁻⁵ (图 2), 相当于质量浓度为 1.2 pg/μL 的总 RNA, 而普通 RT-PCR 法在 10⁻³ 稀释度时勉强观察到 421 bp 的目的条带, 检测结果的对比情况见表 1。试验表明, 本研究建立的荧光 RT-PCR 方法检测 VNNV 的灵敏度比常规 RT-PCR 高出 100 倍。

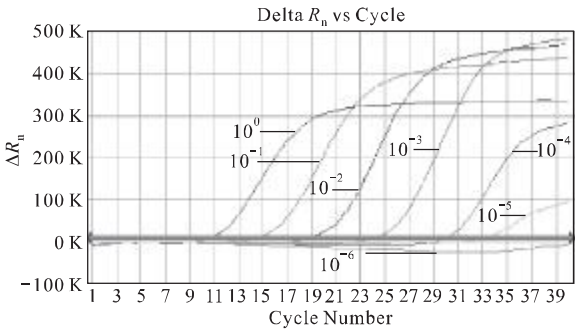


图2 VNNV 实时荧光 RT-PCR 检测方法的灵敏度试验
Fig.1 Sensitivity test for detection of VNNV by real-time RT-PCR

表 1 实时荧光 RT-PCR 与常规 RT-PCR 检测灵敏度的比较
Tab.1 Sensitivity comparison between real-time RT-PCR and routine RT-PCR

稀释度 Dilution	组织细胞半数感染量 TCID ₅₀	总 RNA 质量浓度 / (pg•μL ⁻¹) Total RNA concentration	实时荧光 RT-PCR 的 CT 值 CT value of Real-time RT-PCR	反转录聚合酶链式反应 RT-PCR
10 ⁰	10 ⁴	1.2×10 ³	10.85	+
10 ⁻¹	10 ³	1.2×10 ²	14.96	+
10 ⁻²	10 ²	1.2×10 ¹	19.01	+
10 ⁻³	10 ¹	1.2×10 ⁰	23.68	+
10 ⁻⁴	10 ⁰	1.2×10 ⁻¹	29.57	-
10 ⁻⁵	10 ⁻¹	1.2×10 ⁻²	33.78	-
10 ⁻⁶	10 ⁻²	1.2×10 ⁻³	Undet.	-

2.4 实时荧光RT-PCR稳定性和重复性实验

对同一阳性样品在同一次试验和不同次试验间获得的 CT 值进行分析, 结果表明, 同一次试验内 30 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本重合 (图 3), CT 值读数范围为 13.54~14.29, 标准偏差为

0.135, 变异系数为 0.9%; 同一样品在 30 次不同实验内所获的 CT 值也基本一致, 标准偏差为 0.215, 变异系数为 1.5%。统计结果表明, 本研究所建立的 VNNV 荧光 RT-PCR 检测方法重复性好, 可进行稳定、可靠的检测。

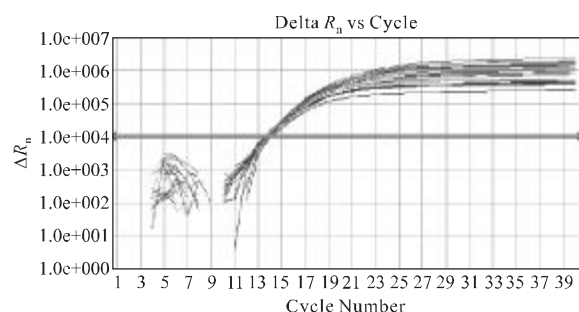


图3 VNNV 实时荧光 RT-PCR 的重复性试验

Fig.3 Repeatability test of VNNV real-time RT-PCR

2.5 实时荧光RT-PCR方法的临床检测

取临床送检的 500 份样品进行 VNNV 实时荧光 RT-PCR 检测,检测到 40 份样品出现阳性扩增曲线,CT 值均在 35 以下,表明有 VNNV 的感染,其余样品均为阴性,该检测结果与普通 RT-PCR 检测结果完全一致。对这些阳性鱼的组织切片进行观察,绝大多数病鱼脑部充血,脑组织和视网膜都能观察到空泡,具有鱼类神经坏死病毒病的病理变化特征。

3 讨论

VNNV 宿主范围广泛、感染后死亡率高,已经成为威胁世界鱼类养殖业的主要病害,目前除非洲之外的几大洲都曾大规模暴发^[12]。鉴于 VNNV 在世界范围内的广泛流行,应进一步建立和完善该病毒的快速检测方法,对进出口的海水鱼类做严格的检测和监测^[11],而 PCR 是目前较有应用前景的一种分子生物学检测方法。检测 VNNV 的 PCR 方法最早应用于日本的黄带褐鲈,其引物根据拟鲈神经坏死病毒 RNA2 核酸序列设计,扩增片段长 420~430 bp。陈信忠等^[13]应用该引物成功地从青石斑鱼、紫石斑鱼、马拉巴石斑鱼、赤点石斑鱼和云纹石斑鱼等 5 种养殖石斑鱼中检出 NNV,扩增片段长为 421bp。但是应用该方法检测不同的鱼类 VNNV 时,其灵敏度还有待进一步提高。虽然用巢式 RT-PCR 方法可以提高检测的灵敏度,但世界动物卫生组织 (OIE) 并不推荐使用,主要是由于巢式 RT-PCR 操作中更容易造成 PCR 产物的气溶胶污染,容易出现假阳性的现象。因此,研究者们根据病毒的不同型设计了不同的特异性引物,以提高检测该病毒的灵敏度和特异性,刘荭等^[11]设计了 4 对引物,采用 RT-PCR 来鉴别出 4 种不同基因型的神经坏死病毒。

本研究所用的引物和探针是根据 GenBank 中已报道的所有 VNNV 衣壳蛋白 (CP) 基因序列中保守区域设计的,比对分析发现能检测到包括红鳍东方鲈神经坏死病毒 (TPNNV)、拟鲈神经坏死病毒 (SJNNV)、条斑星鲈神经坏死病毒 (BFNNV) 和赤点石斑鱼神经坏死病毒 (RGNNV) 4 个基因型的鱼类神经坏死病毒。试验发现,所建立的实时荧光 RT-PCR 方法特异性强,只能检测到 VNNV,对 SVC、IPNV、VHSV、GCRV、IHNV 等水生动物 RNA 病毒没有扩增反应,其灵敏度可达到 1.2 pg/ μ L 的总 RNA (对应的病毒滴度是 0.1 TCID₅₀),比普通 RT-PCR 灵敏度高 100 倍。重复性试验表明,同一样品在组内及组间的 CT 值变异系数分别为 0.9% 以及 1.5%,具有良好的重复性及实用性。由于无需电泳检测、不使用溴化乙锭,保障了实验人员的安全,避免了电泳开盖时出现气溶胶污染,而且在检测周期上要比普通 RT-PCR 缩短 2~3 h,从核酸的提取到荧光 RT-PCR 反应完成只需要 4 h,大大提高了检测效率,特别适合大规模样品的快速检测。利用本方法及 RT-PCR、组织病理观察检测 500 份临床样品,结果有 40 份样品呈阳性结果,但是该批鱼没有明显的临床症状,可能是由于当时的环境条件不适合该病的发生。

本研究建立的实时荧光 RT-PCR 检测方法将为 VNNV 的流行病学调查提供有力的工具,非常适合于各口岸动植物检疫部门推广应用。此外,由于该方法可以检测到组织中极微量的病毒 RNA,且可以进行定量检测,这将为研究病毒的入侵途径、在宿主细胞内的增殖过程、在体内的动态分布以及潜伏和复发机制等提供有力工具,从而有利于进一步阐明 VNNV 的传播和致病机理。

参考文献:

- [1] Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, et al. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (4): 1 633-1 636.
- [2] 世界动物卫生组织 (OIE) 鱼病专家委员会组织编写. 水生动物疾病诊断手册: 第 4 版 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [3] Chi S C, Shieh J R, Lin S J. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan [J].

- Dis Aquat Organ, 2003, 55 (3): 221–228.
- [4] Johnson K N, Zeddam J L, Ball L A. Characterization and construction of functional cDNA clones of pariacoto virus, the first Aaphanodavirus isolated outside Australasia [J]. J Virol, 2000, 50: 5 123–5 132.
- [5] Chi S C, Wu Y C, Cheng T M. Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcarifer* [J]. Dis Aquat Organ, 2005, 65 (2): 91–98.
- [6] Munday B L, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infection of teleost fish: a review [J]. J Fish Dis, 2002, 25: 127–142.
- [7] Tanaka S, Takagi M, Miyazaki T. Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out stage [J]. J Fish Dis, 2004, 27 (7): 385–399.
- [8] Husgag S, Grotmol S, Hjeltne B K, et al. Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV [J]. Dis Aquat Organ, 2001, 45 (1): 33–44.
- [9] Chang S F, Ngho G H, Kueh S, et al. Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lates calcarifer*) for virus isolation [J]. Aquaculture, 2001, 192: 133–145.
- [10] Gomez D K, Sato J, Mushiaki K, et al. PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs [J]. J Fish Dis, 2004, 27 (10): 603–608.
- [11] 刘荭, 史秀杰, 高隆英, 等. 鱼病毒性神经坏死病病毒 (VNNV) 不同基因型鉴别方法的建立及在 VNN 检测和监测中的应用 [J]. 水产学报, 2004, 28 (06): 695–702.
- [12] 夏春. 水产动物疾病学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2004.
- [13] 陈信忠, 苏亚玲, 龚艳清, 等. 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 5 种养殖石斑鱼的神经坏死病毒 [J]. 中国水产科学, 2004, 11 (03): 202–207.

Development and application of a real-time RT-PCR assay for fish viral nervous necrosis virus

LUO Wei^{1,2}, LI Hui-fang², LIU Hong¹, CHEN Huan-chun², FAN Wan-hong¹, LIU Zong-xiao², TIAN Fei-yan², WANG Kan¹, LU Jian-qiang¹

(1. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518001, China; 2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Viral nervous necrosis (VNN) has already become an emerging problem in several farmed marine fish species in various geographic areas all over the world. The causative viral agents consisted of one major coat protein of approximately 42 kD and two single-strand positive-sense RNAs without poly (A) structure at the 3' -terminus. Recently, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) has been developed to detect viral nervous necrosis viruses, in which false positive may be resulted from contamination. In this study, a real-time RT-PCR assay for fish nervous necrosis virus was developed. The specific primers and *TaqMan* probes were designed according to the highly conservative sequence of capsid protein (CP) gene of viral nervous necrosis virus from GenBank. After the procedure of the real-time RT-PCR assay for fish nervous necrosis virus was optimized, the specificity, sensitivity, and reproducibility of the method was estimated. It was found that the specificity of this assay was high without any cross-reactions with SVC, IPN, VHSV, GCHV, IHNV, and so on. A minimum of 1.2 pg/μL total RNA could be detected by the assay, whose sensitivity was 100 times than that of RT-PCR. The coefficients of variance (CVs) were 0.9% and 1.5% for the intra-assay and inter-assay tests respectively, which indicated good reproducibility. It took only 4 h to complete the whole course of reaction including extraction of viral RNA and the real-time RT-PCR. Detected with real-time RT-PCR assay for fish nervous necrosis virus, it was found that forty specimen were positive among 500 clinical samples. Those results confirm that the real-time RT-PCR assay for VNNV is a rapid, sensitive and specific method for the detection of viral nervous necrosis virus. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (3): 506–510]

Key words: fish nervous necrosis virus; real-time RT-PCR; detection method

Corresponding author: LU Jian-qiang. E-mail: lvjq75@163.com