

海水养殖鱼类中虹彩病毒无症状感染的套式PCR分析

贾坤同^{1,3}, 梁玉波², 宋晓玲¹, 杨冰¹, 刘莉¹, 樊景凤², 孔晓瑜⁴, 史成银¹, 黄捷¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 国家海洋局海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023; 3. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 4. 中国科学院 南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

摘要: 大菱鲆红体病虹彩病毒(Turbot reddish body iridovirus, TRBIV)是中国和韩国养殖大菱鲆的主要病毒性病原。本研究依据TRBIV的腺苷三磷酸酶(Adenosine triphosphatase, ATPase)基因序列,设计了特异性的引物,建立了一种检测TRBIV的套式PCR方法,该方法检测TRBIV的灵敏度大约为一步PCR的 10^4 倍。应用该方法对6种中国常见海水养殖鱼类进行TRBIV感染情况调查,在无明显发病症状的黑鲷(*Sebastes fuscescens*)、宽体舌鲷(*Cynoglossus robustus*)、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)和非洲黑石斑鱼(*Alphesites afer*) 4种鱼类中,扩增出长度约为471 bp的特异性DNA片段。对这些来自于不同鱼类的DNA片段进行测序和序列比对后发现,它们之间完全相同,且与TRBIV的ATPase基因序列有100%的同源性。研究结果表明,在这4种海水养殖鱼类体内存在TRBIV的无症状感染,它们可能也是TRBIV的宿主。[中国水产科学, 2009, 16(5): 758-764]

关键词: 大菱鲆红体病虹彩病毒; 无症状感染; 套式PCR

中图分类号: S91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)05-0758-07

虹彩病毒(Iridovirus)是一类感染低等脊椎动物和无脊椎动物的二十面体状、大型细胞质DNA病毒,是水产养殖动物重要的病毒性病原^[1]。大菱鲆红体病虹彩病毒(Turbot reddish body iridovirus, TRBIV)是新发现的感染中国和韩国养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的鱼类虹彩病毒,隶属于虹彩病毒科(Iridoviridae)肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*),是工厂化养殖大菱鲆最主要的病毒性病原之一^[2]。在该病毒的形态、致病性、分类地位、分子生物学特征以及在养殖大菱鲆中的流行情况等方面已有相关的研究报道^[3-5]。关于TRBIV宿主范围的研究还很少。到目前为止,该病毒仅能从中国和韩国发病的养殖大菱鲆中分离到^[3,6],因此大菱鲆是该病毒的天然宿主。TRBIV是否还有其他天然宿主

列,设计了特异性引物,建立了TRBIV的套式PCR检测法,并应用该方法调查了大菱鲆、黑鲷(*Sebastes fuscescens*)、宽体舌鳎(*Cynoglossus robustus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)和非洲黑石斑鱼(*Alphistes afer*) 6种常见海水养殖鱼类中TRBIV的感染状况。

1 材料与方法

1.1 材料

2008年2–4月,自中国辽宁大连、广东深圳、福建漳州、福建东山等地的海水鱼类养殖场采集大菱鲆、黑鲷、宽体舌鳎、半滑舌鳎、青石斑鱼和非洲黑石斑鱼样本,各样本鱼外观无明显患病症状。

1.2 实验试剂

TaKaRa ExTaq DNA聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司。High Pure PCR Template Preparation Kit试剂盒为Roche Diagnostics GmbH公司产品,其余均为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 套式PCR外引物ATPaseA1和ATPaseA2的设计参考文献[4]。依据GenBank中登录号为AY608684.1的TRBIV腺苷三磷酸酶(Adenosine triphosphatase, ATPase)基因序列,在外引物的基础上设计了1对内引物ATPaseB1和ATPaseB2,引物序列和预期产物大小见表1。引物由北京英骏生物技术有限公司合成。

表1 套式PCR引物序列
Tab. 1 Primers of nested-PCR used in this study

引物 Primer	序列 Sequence	在基因中的位置 /bp Location in ATPase gene	产物长度 /bp Product size
ATPaseA1	5' CGCAGCAGTTGTACCAGGG 3'	1–19	1 286
ATPaseA2	5' AACTGATTACGGTGGCCTCC 3'	1267–1286	
ATPaseB1	5' ATCGGTGCTAATCAAATCTATC 3'	524–545	471
ATPaseB2	5' ACCTTCTCCATCAGCGTGT 3'	976–994	

1.3.2 实验鱼DNA的提取和PCR扩增 取病鱼的脾脏或肾脏组织各50 mg,按High Pure PCR Template Preparation Kit说明书制备PCR模板。第一次PCR扩增的反应体积为20 μL,包括TaKaRa ExTaq DNA聚合酶(5 U/μL)0.125 μL,4种dNTPs(250 μmol/L)各2 μL,10×ExTaq反应缓冲液(含Mg²⁺)2 μL,0.5 μL样品DNA,引物ATPaseA1和ATPaseA2(10 pmol/μL)各1 μL,最后补足灭菌双蒸水至20 μL。反应参数为:

1.6 DNA序列测定与分析

将阳性PCR产物用引物ATPaseB2测序,测序在北京英骏生物技术有限公司完成。DNA序列分析采用Blast软件进行。本研究中所用的参考序列取自GenBank。

2 结果与分析

2.1 套式PCR方法检测TRBIV的特异性

分别以TRBIV、淋巴囊肿病毒(Lymphocystis

disease virus, LCDV)、对虾传染性皮下和造血器官坏死病病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)、健康大菱鲆脾组织DNA为模板,进行一步PCR和套式PCR扩增,结果如图1所示。以TRBIV为模板做套式PCR可以分别扩增出1 286 bp(图1-A)和471 bp(图1-B)的DNA片段,而用LCDV、IHHNV和健康大菱鲆脾组织DNA不能扩增出任何条带,表明这2对引物具有TRBIV特异性。

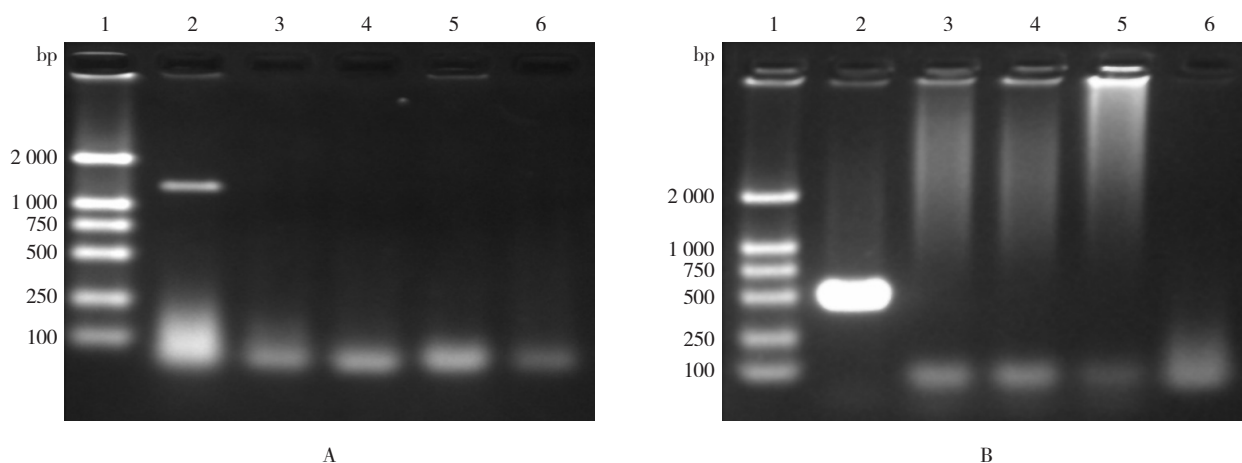


图1 应用一步PCR(A)和套式PCR(B)检测TRBIV的特异性

1. DNA 分子量标准DL2000(大连宝生物); 2. TRBIV; 3. LCDV; 4. IHHNV; 5. 健康大菱鲆脾组织DNA; 6. 空白对照。

Fig. 1 Specificity assay of one step PCR (A) and nested-PCR (B) for TRBIV detection

1. DNA ladder DL2000 (Takara); 2. TRBIV; 3. LCDV; 4. IHHNV; 5. DNA extracted from spleen of healthy turbot; 6. Blank control.

2.2 套式PCR方法检测TRBIV的灵敏度

把浓度为0.27 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的重组质粒pMD18-T/TRBIV ATPase样品按10倍梯度做系列稀释后,以ATPaseA1和ATPaseA2为引物进行PCR,结果显示一步PCR检测灵敏度仅达27 fg。以一步PCR扩增的产物作为模板,用ATPaseB1和ATPaseB2为引物,进行套式PCR,结果显示,检测灵敏度比一步PCR要提高 10^4 倍左右(图2)。

2.3 6种海水鱼类体内TRBIV的套式PCR检测

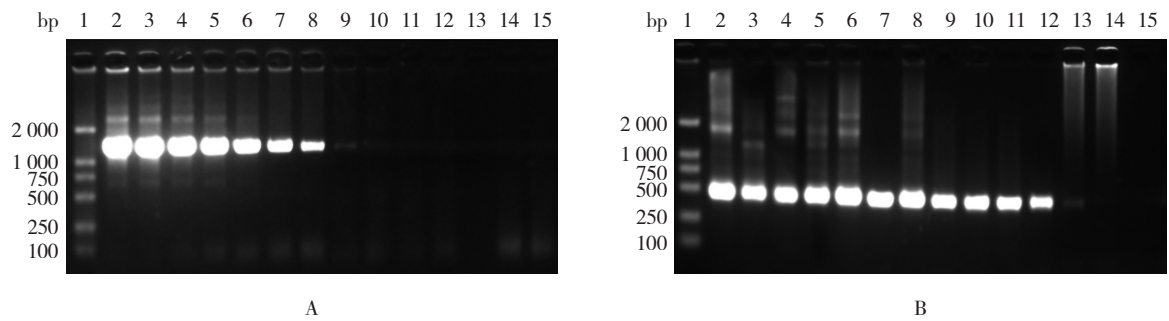


图2 应用一步PCR (A) 和套式PCR (B) 检测TRBIV 的灵敏度测试

1. DNA 分子量标准DL2000 (大连宝生物); 2–14. 梯度稀释的重组质粒, 质粒浓度分别为 2.7×10^8 fg/ μ L、 2.7×10^7 fg/ μ L、 2.7×10^6 fg/ μ L、 2.7×10^5 fg/ μ L、 2.7×10^4 fg/ μ L、 2.7×10^3 fg/ μ L、 2.7×10^2 fg/ μ L、 2.7×10 fg/ μ L、 2.7 fg/ μ L、 2.7×10^{-1} fg/ μ L、 2.7×10^{-2} fg/ μ L、 2.7×10^{-3} fg/ μ L 和 2.7×10^{-4} fg/ μ L; 15. 阴性对照。

Fig. 2 Sensitivity assay of one step PCR (A) and nested-PCR (B) for TRBIV detection

1; DNA ladder DL2000 (Takara); 2–14; recombinant plasmid containing ATPase gene of TRBIV, whose concentrations are 2.7×10^8 fg/ μ L, 2.7×10^7 fg/ μ L, 2.7×10^6 fg/ μ L, 2.7×10^5 fg/ μ L, 2.7×10^4 fg/ μ L, 2.7×10^3 fg/ μ L, 2.7×10^2 fg/ μ L, 2.7×10 fg/ μ L, 2.7 fg/ μ L, 2.7×10^{-1} fg/ μ L, 2.7×10^{-2} fg/ μ L, 2.7×10^{-3} fg/ μ L and 2.7×10^{-4} fg/ μ L, respectively; 15. Negative control

表2 6种海水鱼类体内TRBIV的套式PCR检测结果
Tab. 2 Detection results in six marine fishes

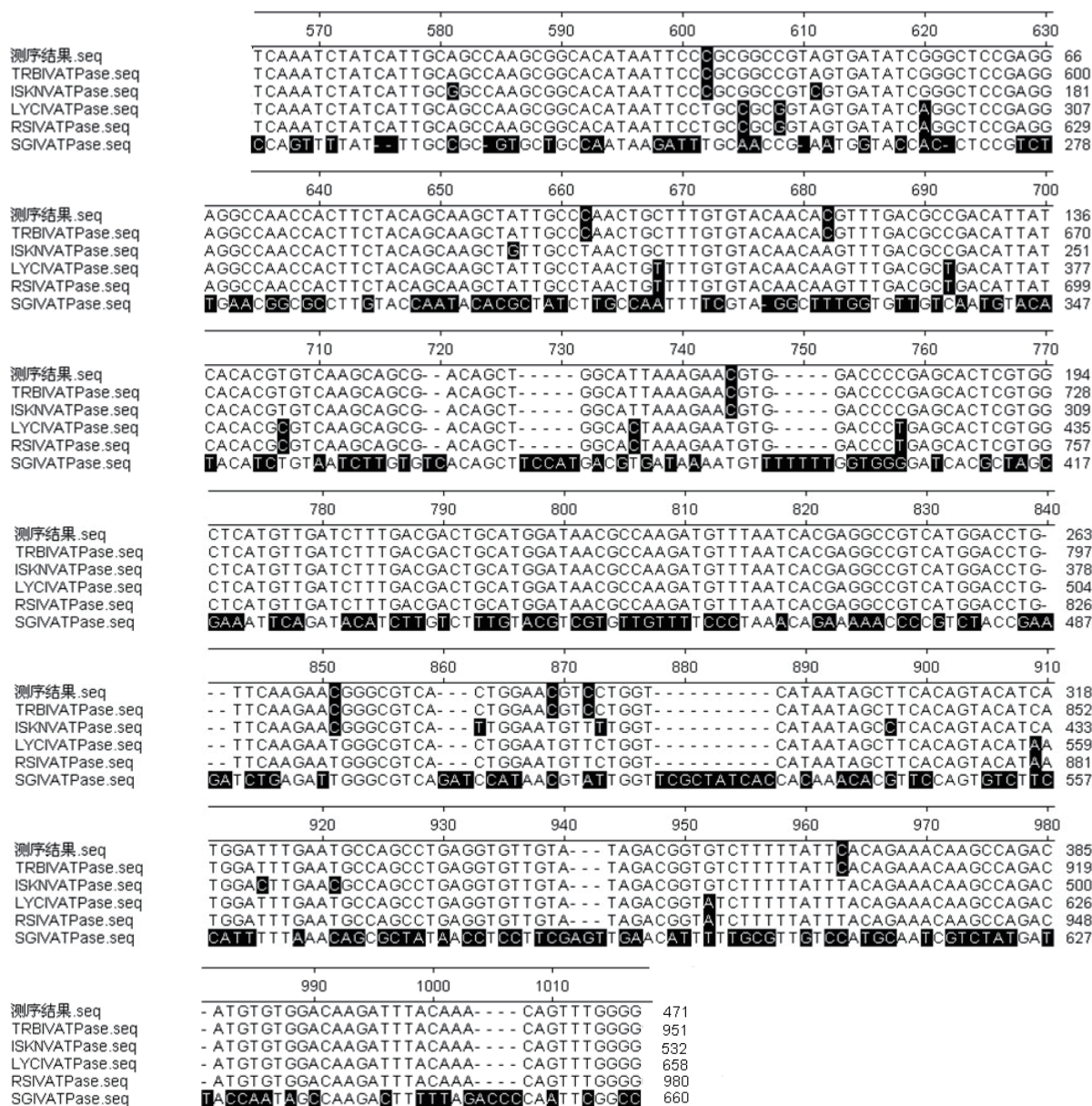


图3 4种海水鱼类体内检测到的TRBIV与部分鱼类虹彩病毒ATPase基因序列的比对

TRBIV: 大菱鲆红体病虹彩病毒(AY608684.1); ISKNV: 传染性脾肾坏死病毒(AY779031.1); RBIV: 条石鲷虹彩病毒(AY532606.1); LYCIV: 大黄鱼虹彩病毒(AY779031.1); RSIV: 真鲷虹彩病毒(AB007367.1); SGIV: 新加坡石斑鱼虹彩病毒(AY521625.1). 阴影部分表示有差异的碱基, “-”代表碱基的缺失。

Fig. 3 Alignment of partial sequences of ATPase genes from selected fish iridoviruses and four fish in this study
TRBIV: turbot reddish body iridovirus (AY608684.1); ISKNV: infectious spleen and kidney necrosis virus (AY779031.1); RBIV: rock bream iridovirus (AY532606.1); LYCIV: large yellow croaker iridovirus (AY779031.1); RSIV: red sea bream iridovirus (AB007367.1); SGIV: Singapore grouper iridovirus (AY521625.1). Different residues and gaps are represented as shadows and dashes, respectively.

crocea)^[14]、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[15]、非洲灯眼鲷(*Aplocheilichthys normani*)^[16]、小密鲈(*Dwarf gourami*)^[16]等。Jeong等^[17]报道真鲷、条石鲷和黑鲷体内存在肿大细胞病毒属虹彩病毒的无症状感染。Oh等^[7]曾使用分离自患病大菱鲆的虹彩病毒人工感染牙鲆和条石鲷,发现被感染鱼虽然不会发病死亡,但通过PCR方法可以在被感染鱼体内检测到病毒的存在。本研究应用套式PCR方法对中国6种海水养殖鱼类样品进行TRBIV感染情况调查,发现在黑鲷、宽体舌鲷、半滑舌鲷和非洲黑石斑鱼体内存在TRBIV的无症状感染。这些研究揭示,多种海水鱼类中都存在着肿大细胞虹彩病毒的无症状感染现象。

本研究结果表明,在天然状态下,TRBIV也能在其他海水鱼类体内存在。这说明除大菱鲆外,其他海水鱼类也可能是TRBIV的宿主;另一方面,虽然在黑鲷等4种海水鱼体内检测到了TRBIV,但病毒的含量很低,以至于通过一步PCR方法不能被检测到。因此,需要应用套式PCR方法,在更多的海水鱼类中开展更广泛的TRBIV感染情况调查与分析。这对于揭示该病毒的宿主范围、传播途径,保障中国海水养殖鱼类的健康都具有重要的意义。

致谢:本研究中的套式PCR检测工作一部分由山东理工大学高晓燕同学协助完成,特此致谢。

参考文献:

- [1] Gibson-Kueh S, Netto P, Ngho-Lim G H, et al. The Pathology of systemic Iridoviral disease in fish [J]. J Comp Pathol, 2003, 129: 111–119.
- [2] Shi C Y, Wang Y G, Yang S L, et al. The first report of an iridoviruslike agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China [J]. Aquaculture, 2004, 236: 11–25.
- [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: 1–6.
- [4] 史成银, 王印庚, 黄健, 等. 大菱鲆红体病虹彩病毒ATPase基因的克隆与序列分析[J]. 高技术通讯, 2005, 15(5): 91–95.
- [5] 吴成龙, 史成银, 黄健. Real-time PCR 技术用于大菱鲆红体病虹彩病毒的组织敏感性检测及病毒流行情况调查[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(5): 752–758.
- [6] 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 Organ, 2005, 64: 175–180.
- [7] Oh M J, Kitamura S I, Kim W S, et al. Susceptibility of marine fish species to a megalocytivirus, turbot iridovirus, isolated from turbot, *Psetta maximus* (L.) [J]. J Fish Dis, 2006, 29(7): 415–421.
- [8] 曾慷, 何建国, 翁少萍. 传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)感染途径、宿主范围及对温度敏感性的研究[J]. 中国病毒学, 1999, 14(4): 3

Analysis of asymptomatic iridovirus infection in marine fishes by nested-PCR method

JIA Kun-tong^{1,3}, LIANG Yu-bo², SONG Xiao-ling¹, YANG Bing¹, LIU Li¹, FAN Jing-feng², KONG Xiao-yu⁴, SHI Cheng-yin¹, HUANG Jie¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 3. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 4. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: Iridovirus is a major fish pathogen in marine aquaculture. Turbot reddish body iridovirus (TRBIV) was the causative agent of serious systemic diseases with high mortality in the cultured turbot, *Scophthalmus maximus* in China and Korea. Two specific nested pairs of primers were designed based on the sequence of adenosine triphosphatase (ATPase) gene of TRBIV and a nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) was developed for detection of TRBIV in marine fishes. Specificity and sensitivity of the nested-PCR method were evaluated. The results showed that sensitivity of nested-PCR was 10^4 times higher than that of one step PCR test. The molecular epidemic investigation of TRBIV was performed based on the developed nested-PCR in this study. From four fishes of black rockfish (*Sebastes fuscescens*), broad tonguefish (*Cynoglossus robustus*), half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and red nigger hamlet (*Alphistes afer*), which showed TRBIV negative by one step PCR, a specific fragment of TRBIV gene with the length of 471 bp was amplified by nested-PCR. The amplified products were sequenced and aligned with the ATPase genes of selected fish iridoviruses. The results show that these products have the homology of 100% with the ATPase gene of TRBIV. According to all above, asymptomatic infection of TRBIV exists in the four marine fish species of black rockfish, broad tonguefish, half-smooth tongue-sole and red nigger hamlet. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (5): 758–764]

Key words: turbot reddish body iridovirus; asymptomatic infection; nested-PCR

Corresponding author: SHI Cheng-yin. E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

欢迎订阅 2010 年《上海海洋大学学报》

《上海海洋大学学报》为上海海洋大学主办,面向全国的以海洋、水产科学技术为主的综合性学术刊物。前身为《上海水产大学学报》,2009 年起因学校更名而变更刊名。主要刊登研究论文,少量刊登综述、评述、简讯,并酌登学术动态和主要书刊评介等。目前学报是《中国科学引文数据库》来源期刊,《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊,万方数据-数字化期刊群全文收录期刊,中国科技论文统计源核心期刊,水产渔业类中文核心期刊。学报在 2008 版的中国科技期刊引证报告中的影响因子是 0.613。

本刊为双月刊,大 16 开,国内外公开发行。每期单价:10.00 元。国际标准刊号:ISSN 1674-5566,国内统一刊号:CN31-2024/S。国内邮发代号:4-604,国际发行代号:4822Q。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅,学生享半价