

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.19066

鲤浮肿病病毒环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立

翟立文^{1,2}, 刘文枝², 许晨², 范玉顶², 江南², 周勇², 曾令兵^{1,2}

1. 水产科学国家级实验教学示范中心(上海海洋大学), 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223

摘要: 本研究针对鲤浮肿病病毒(carp edema virus, CEV)基因组核蛋白编码基因 *P4a* 的序列, 设计 2 对特异性引物, 以克隆构建的重组质粒为标准模板, 通过优化反应体系中引物浓度组合、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、反应温度和扩增时间等参数, 建立了 CEV 环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法。结果表明, CEV-LAMP 方法的最佳反应温度为 62℃, 引物浓度组合为引物 F3/B3 0.2 μmol/L, 引物 FIP/BIP 1.2 μmol/L, Betaine 0.7 mol/L, Mg^{2+} 8.0 mmol/L, dNTPs 1.2 mmol/L, 反应时间 60 min。反应产物经凝胶电泳呈现梯型条带, 添加 SYBR Green I 荧光染料后, 呈现明显的绿色阳性反应。CEV-LAMP 法灵敏度高, 最低检测限为 10 copies/μL, 较常规 PCR 法灵敏度高 100 倍; CEV-LAMP 法特异性强, 与锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)、鳃传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)及鲤春病毒血症病毒(SVCV)无交叉反应。CEV-LAMP 应用于患病鲤样本检测结果准确, 简便快速, 可为鲤浮肿病的现场诊断与防控提供技术支撑。

关键词: 鲤浮肿病病毒; 核蛋白编码基因 *P4a*; 环介导等温扩增; 检测; 优化

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)05-1004-10

鲤(*Cyprinus carpio*)是中国重要的淡水养殖鱼类之一。2016年, 中国鲤养殖产量达 349.8 万 t, 约占淡水养殖总产量的 11%^[1], 在中国水产养殖业中具有重要地位。近年来, 中国鲤主养区域新发生一种严重传染性疾病——鲤浮肿病, 主要危害养殖鲤和观赏锦鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*), 造成了重大经济损失^[2]。鲤浮肿病于 20 世纪 70 年代初期首次在日本发现, 死亡率高达 80%以上, 当时, Murakami 等^[3]、Oyamatsu 等^[4]和 Ono 等^[5]初步确定其病原为一种痘病毒样病毒。2013年, Way 等^[6]报道了英国池塘养殖锦鲤发生鲤浮肿病并引起大量死亡的病例。随后, 德国、荷兰、印度等国也相继报道了鲤浮肿病^[7-9]。中国于 2017 年首次报道 CEV 感染锦鲤的病例, 致死率高达 85%~90%^[10]。同年, 本实验室也从河南、

湖南、天津等地患病锦鲤体内检测到 CEV。鲤浮肿病的临床症状主要表现为患病鱼游动迟缓, 食欲不振, 鳃丝肿胀, 出血, 眼球凹陷, 体表有大量的黏液, 其临床症状和流行特征与锦鲤疱疹病毒病(KHV)相似^[11]。

由于目前缺乏对 CEV 敏感的细胞系, 采用细胞培养方法检测 CEV 的技术受到限制。电子显微镜观察是检测 CEV 最直观的方法, 但依赖昂贵设备, 且需专业技术人员的操作, 耗时长。随着分子生物学技术的发展, 1997年 Oyamatsu 等^[12]建立了检测 CEV 的 PCR 方法。2016年, 在 PCR 方法的基础上, Adamek 等^[13]建立了检测 CEV 的实时荧光定量 PCR 技术。这些方法均依赖 PCR 仪, 不能满足现场快速诊断的需求。因此, 建立一种简单、准确、快速的诊断方法, 对鲤浮肿病的诊断与防

收稿日期: 2019-02-05; 修订日期: 2019-03-10.

基金项目: 国家大宗淡水鱼产业技术体系专项资金项目(CARS-45-16); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZD1005); 湖北省科技支撑计划项目(2015BBA234).

作者简介: 翟立文(1993-), 女, 硕士研究生, 从事水产养殖病害研究. E-mail: 540486209@qq.com

通信作者: 曾令兵(1962-), 研究员, 从事水生动物病害研究及应用. E-mail: zlb@yfi.ac.cn

控具有重要的意义。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种不需高温即可启动链置换 DNA 合成,并在 1 h 左右时间内完成 DNA 大量扩增的方法^[14]。通过肉眼观察沉淀浊度或在反应结束后添加 SYBR Green I 后观察反应体系颜色变化可直接判断反应结果。目前,环介导等温扩增技术在医学、动物医学以及食品安全等检测中均发挥了重要的作用,并已逐渐步入了产业化、商品化的时代^[15-16]。2004 年, Kono 等^[17]首次将 LAMP 方法应用于对虾白斑综合征病毒(WSSV)的检测,随后该技术也逐渐成为水生动物病原的重要检测方法^[18-20],发展十分迅速。

本研究针对鲤浮肿病病毒核蛋白编码基因 *P4a* 的序列(GenBank, MH645915),设计了两对特异性引物,通过对反应温度、引物浓度及比例、dNTPs 浓度等多个参数进行优化,建立了 CEV 环介导等温扩增检测方法,为鲤浮肿病的现场快速诊断与防治奠定了技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验鱼 患病鲤样本采集自河南南阳市、湖南岳阳市、天津宝坻区的锦鲤养殖场,规格 5~10 cm;健康锦鲤购于湖北武汉木兰天池锦鲤养殖场,体长 5~10 cm,PCR 检测 CEV 结果为阴性。健康试验锦鲤于实验室水族箱内暂养 1 周,水温 25℃,连续增氧,投喂商品饲料。

1.1.2 试剂与耗材 病毒 DNA 提取试剂盒(Viral DNA Kit)、质粒提取试剂盒 I (Plasmid Mini Kit I)均购自 Omega 公司;琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒(Wizard SV Gel and PCR Clean-up System)、无核酸酶水(nuclease-free water)为 Promega 公司产品;感受态细胞 DH5 α 购自北京博迈德公司; *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*)DNA 聚合酶、10 \times Thermo Pol Reaction Buffer 及 MgSO₄ 均为 NEW ENGLAND 公司产品; SYBR Green I 购自 Invitrogen 公司; dNTPs 和 Betaine 为 Sigma 公司产品。

1.1.3 主要仪器设备 超速离心机(Beckman-Coulter);紫外分光光度计(Eppendorf);PCR 扩增

仪(Biometra);ChemiDoc XRS+凝胶成像系统(BIO-RAD);电泳仪(国产);II 级生物安全柜(ESCO)。

1.2 方法

1.2.1 CEV-LAMP 引物设计与合成 根据鲤浮肿病病毒核蛋白编码基因 *P4a* ORF 序列(MH645915),利用 Primer Explorer 5.0 在线软件设计 2 对特异性引物,分别为 1 对内引物 FIP、BIP 和 1 对外引物 F3、B3 (表 1),引物由武汉擎科生物科技有限公司合成。

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Nucleotide sequences of the primers used in the study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence(5'-3')
F3	CAATGTTGAAGCTGCTGAT
B3	TCTGTAAGTAGTAGTCTTGGAT
FIP	GCTTTGTTGCACTAGGATATGAAATAATCAAC AACTGCGAACC
BIP	ATTGCTGGAGCTGGAAAAGGGAATTGGATCAT TTTCTACTGACA

1.2.2 核蛋白编码基因 *P4a* 标准质粒的构建 取 300 mg 患病锦鲤脾肾组织,匀浆后,按照病毒 DNA 提取试剂盒提取病毒核酸。以提取的 CEV 病毒核酸为模板,常规 PCR 法(引物未公布)扩增 CEV 基因组核蛋白编码基因 *P4a* 片段,产物大小为 1248 bp,将阳性样品参照 DNA 纯化回收试剂盒说明书进行切胶回收。纯化后的 PCR 产物经连接克隆到 T 载体 pMD19-T 上,再转化至 DH5 α 感受态细胞,于含氨苄青霉素(Amp)的 LB 琼脂固体培养基涂布均匀,37℃ 培养过夜培养,挑取白色单菌落,筛选出的阳性菌,送至武汉擎科生物科技有限公司进行测序。测序结果经序列比对确认为阳性菌后进行扩大培养,再用质粒 DNA 提取试剂盒提取重组质粒。重组质粒 DNA 用紫外分光光度计测定浓度,计算重组质粒拷贝数即病毒拷贝数并调整浓度,保存于-20℃ 冰箱备用。

1.2.3 CEV-LAMP 检测方法的建立及反应体系的优化 采用控制变量法,分别对反应温度、内外引物浓度比例、dNTPs 浓度、Mg²⁺浓度、Betaine 浓度和扩增时间等参数进行优化。其中反应温度为 60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃;固定

外引物为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 内引物分别为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、1.2 $\mu\text{mol/L}$ 、1.6 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.4 $\mu\text{mol/L}$; dNTPs 浓度分别为 0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.2 mmol/L、1.4 mmol/L、1.6 mmol/L、1.8 mmol/L; Mg^{2+} 浓度分别为 0、2.0 mmol/L、4.0 mmol/L、6.0 mmol/L、8.0 mmol/L、10.0 mmol/L; Betaine 浓度分别为 0、0.5 mol/L、0.7 mol/L、0.9 mol/L、1.1 mol/L、1.5 mol/L, 反应时间分别为 20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、70 min, 用无核酸酶水作为阴性对照。反应完成后取 5 μL 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并确定各成分最佳反应浓度。

1.2.4 CEV-LAMP 扩增产物的检测 电泳分析鉴定 LAMP 反应完成后取 5 μL 扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 置于凝胶成像系统中成像, 若产物呈现典型的 LAMP 梯型条带, 结果为阳性; 若无任何条带, 结果为阴性。

可视化鉴定 反应结束后向反应管中加入 1000 \times SYBR Green I 2 μL , 静置 1~5 min 后观察结果, 若反应混合物变绿则为阳性; 反之, 若反应混合物保持橙色不变则为阴性。

1.2.5 CEV-LAMP 的特异性 用 Viral DNA Kit 提取锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)、鳃传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)及健康锦鲤的 DNA, Trizol 法提取鲤春病毒血症病毒(SVCV)的 RNA 并进行逆转录。将上述病毒 DNA 及 cDNA 作为模板, 以健康锦鲤样本作为阴性对照, 用建立的 CEV-LAMP 方法进行特异性检测。

1.2.6 CEV-LAMP 与 LAMP 的灵敏度 将提取的重组质粒 CEV 核蛋白编码基因 *P4a* 用无核酸酶水进行 10 倍梯度稀释, 调整浓度到 10^0 copies/ μL 、 10^1 copies/ μL 、 10^2 copies/ μL 、 10^3 copies/ μL 、 10^4 copies/ μL 、 10^5 copies/ μL 、 10^6 copies/ μL 、 10^7 copies/ μL 、 10^8 copies/ μL 、 10^9 copies/ μL 、 10^{10} copies/ μL 。分别取 1 μL 质粒标准品 DNA 作为模板进行 CEV-LAMP 和常规 PCR (以 F3、B3 作为 PCR 引物) 扩增检测, 比较两种检测方法的灵敏度。

1.2.7 CEV-LAMP 在快速检测鲤浮肿病毒中的应用 用 CEV-LAMP 法和常规 PCR 法对从河南

南阳市、湖南岳阳市和天津宝坻区 3 个锦鲤养殖场采集的疑似感染 CEV 的患病鲤样本进行检测。PCR 引物^[21]由武汉擎科生物科技有限公司合成, 正向引物序列: 5'-GCTGTTGCAACCATTTGAGA-3', 反向引物序列: 5'-TGCAGGTTGCTCCTAA TCCT-3'。

2 结果与分析

2.1 CEV 核蛋白编码基因 *P4a* 标准质粒的构建与测序分析

对 CEV 核蛋白编码基因 *P4a* 重组质粒进行蓝白斑筛选, 使用引物进行菌落 PCR 扩增, 结果显示 PCR 扩增产物大小为 1248 bp。测序结果表明, 扩增序列与目的序列完全一致。紫外分光光度计测得提取的质粒浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$, 经计算, 质粒浓度为 8.7×10^{10} copies/ μL 。

2.2 CEV-LAMP 扩增反应体系的优化

2.2.1 反应温度的优化 设置反应温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 、61 $^{\circ}\text{C}$ 、62 $^{\circ}\text{C}$ 、63 $^{\circ}\text{C}$ 、64 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$, 选择 Betaine 0.7 mol/L, *Bst* DNA 聚合酶 8 U, 引物 F3/B3 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 引物 FIP/BIP 1.2 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 8.0 mmol/L, dNTPs 1.2 mmol/L, 进行不同的温度梯度扩增。扩增产物电泳分析结果表明 60~65 $^{\circ}\text{C}$ 均有扩增, 62 $^{\circ}\text{C}$ 时扩增产物条带清晰, 为最佳扩增温度(图 1)。

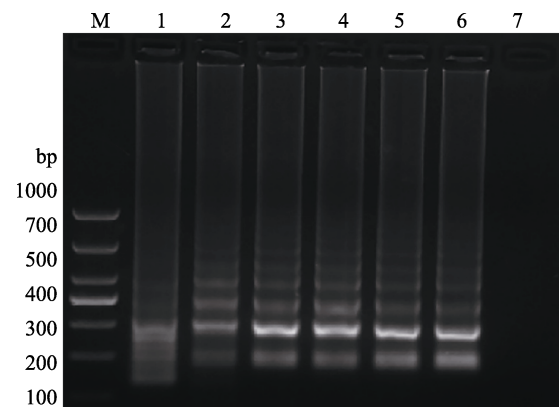


图 1 温度对 CEV-LAMP 扩增效果的影响

M: DL1000 DNA 分子质量标准; 1: 60 $^{\circ}\text{C}$; 2: 61 $^{\circ}\text{C}$; 3: 62 $^{\circ}\text{C}$;
4: 63 $^{\circ}\text{C}$; 5: 64 $^{\circ}\text{C}$; 6: 65 $^{\circ}\text{C}$; 7: 阴性对照。

Fig.1 Effect of different temperatures on CEV-LAMP amplification
M: DL1000 DNA marker; 1: 60 $^{\circ}\text{C}$; 2: 61 $^{\circ}\text{C}$; 3: 62 $^{\circ}\text{C}$;
4: 63 $^{\circ}\text{C}$; 5: 64 $^{\circ}\text{C}$; 6: 65 $^{\circ}\text{C}$; 7: negative control.

2.2.2 引物浓度优化 固定外引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 设置内引物浓度分别为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、1.2 $\mu\text{mol/L}$ 、1.6 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.4 $\mu\text{mol/L}$, 选择反应温度为 62 $^{\circ}\text{C}$, Betaine 0.7 mol/L, *Bst* DNA 聚合酶 8 U, Mg^{2+} 8.0 mmol/L, dNTPs 1.2 mmol/L 进行扩增。扩增产物电泳结果显示, 2~4 泳道均有较为清晰的梯形条带产生, 选取梯型条带最清晰明亮的第 3 泳道的浓度作为最佳反应浓度, 即引物 F3/B3 0.2 $\mu\text{mol/L}$, FIP/BIP 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 为最佳浓度组合(图 2)。

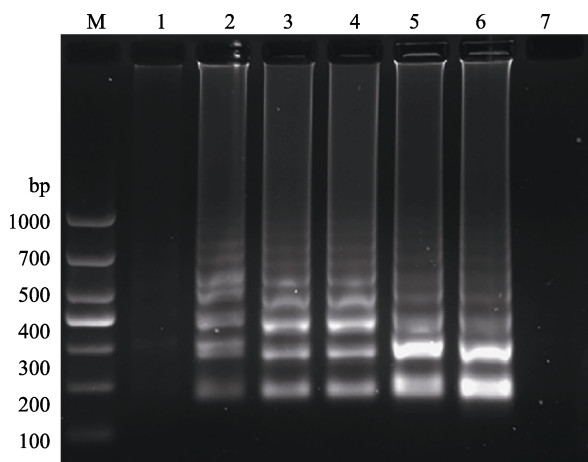


图 2 内外引物的浓度比对 CEV-LAMP 扩增效果的影响

M: DL1000 DNA 分子质量标准; 1: 0.4 $\mu\text{mol/L}$;
2: 0.8 $\mu\text{mol/L}$; 3: 1.2 $\mu\text{mol/L}$; 4: 1.6 $\mu\text{mol/L}$;
5: 2.0 $\mu\text{mol/L}$; 6: 2.4 $\mu\text{mol/L}$; 7: 阴性对照。

Fig. 2 Effect of primer concentration and ratios on CEV-LAMP amplification

M: DL1000 DNA marker; 1: 0.4 $\mu\text{mol/L}$; 2: 0.8 $\mu\text{mol/L}$;
3: 1.2 $\mu\text{mol/L}$; 4: 1.6 $\mu\text{mol/L}$; 5: 2.0 $\mu\text{mol/L}$;
6: 2.4 $\mu\text{mol/L}$; 7: negative control.

2.2.3 Mg^{2+} 浓度的优化 设置 Mg^{2+} 浓度分别为 0 mmol/L、2.0 mmol/L、4.0 mmol/L、6.0 mmol/L、8.0 mmol/L、10.0 mmol/L, 选择反应温度为 62 $^{\circ}\text{C}$, Betaine 0.7 mol/L, *Bst* DNA 聚合酶 8 U, 引物 F3/B3 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 引物 FIP/BIP 1.2 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 1.2 mmol/L 进行扩增。扩增产物电泳结果如图 3 所示, 浓度范围为 2.0~10.0 mmol/L 时有梯形条带产生, 其中 Mg^{2+} 为 8.0 mmol/L 时扩增效果最理想, 因此 Mg^{2+} 的最适浓度为 8.0 mmol/L。

2.2.4 dNTPs 浓度的优化 设置 dNTPs 浓度分别为 0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.2 mmol/L、

1.4 mmol/L、1.6 mmol/L、1.8 mmol/L, 选择扩增温度为 62 $^{\circ}\text{C}$, Betaine 0.7 mol/L, *Bst* DNA 聚合酶 8 U, 引物 F3/B3 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 引物 FIP/BIP 1.2 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 8.0 mmol/L 进行扩增, 扩增产物电泳结果表明, dNTPs 浓度较低时, 扩增效果不佳, 随着 dNTPs 浓度的升高, 扩增产物亮度明显增加, 综合考虑扩增体系中 dNTPs 成本较高的问题, 因此, 选取第 3 泳道浓度为 1.2 mmol/L 为 dNTPs 的最适浓度(图 4)。

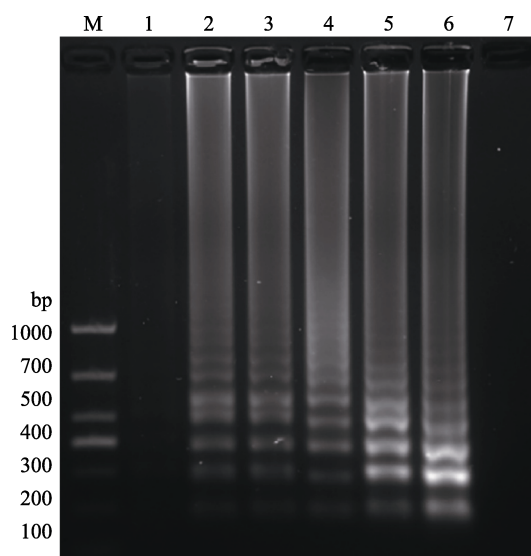


图 3 Mg^{2+} 浓度对 CEV-LAMP 扩增效果的影响

M: DL1000 DNA 分子质量标准; 1: 0 mmol/L;
2: 2.0 mmol/L; 3: 4.0 mmol/L; 4: 6.0 mmol/L;
5: 8.0 mmol/L; 6: 10.0 mmol/L; 7: 阴性对照。

Fig. 3 Effects of Mg^{2+} concentration on CEV-LAMP amplification

M: DL1000 DNA marker; 1: 0 mmol/L; 2: 2.0 mmol/L;
3: 4.0 mmol/L; 4: 6.0 mmol/L; 5: 8.0 mmol/L;
6: 10.0 mmol/L; 7: negative control.

2.2.5 Betaine 浓度的优化 设置 Betaine 浓度分别为 0 mol/L、0.5 mol/L、0.7 mol/L、0.9 mol/L、1.1 mol/L、1.5 mol/L, 选择扩增温度 62 $^{\circ}\text{C}$, *Bst* DNA 聚合酶 8 U, 引物 F3/B3 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 引物 FIP/BIP 1.2 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 8.0 mmol/L, dNTPs 1.2 mmol/L 进行扩增。扩增产物电泳结果发现, 浓度范围在 0~1.5 mol/L 时均有明显的条带产生, 而 Betaine 浓度为 0.7 mol/L 时扩增产物梯度条带最理想, 即 0.7 mol/L 为反应体系中 Betaine 的最佳浓度(图 5)。

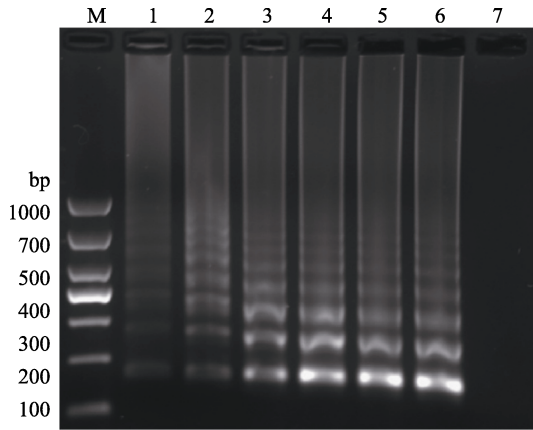


图 4 dNTPs 浓度对 CEV-LAMP 扩增效果的影响

M: DL1000 DNA 分子质量标准; 1: 0.8 mmol/L;
2: 1.0 mmol/L; 3: 1.2 mmol/L; 4: 1.4 mmol/L;
5: 1.6 mmol/L; 6: 1.8 mmol/L; 7: 阴性对照.

Fig. 4 Effect of dNTP concentration on
CEV-LAMP amplification

M: DL1000 DNA marker; 1: 0.8 mmol/L; 2: 1.0 mmol/L;
3: 1.2 mmol/L; 4: 1.4 mmol/L; 5: 1.6 mmol/L;
6: 1.8 mmol/L; 7: negative control.

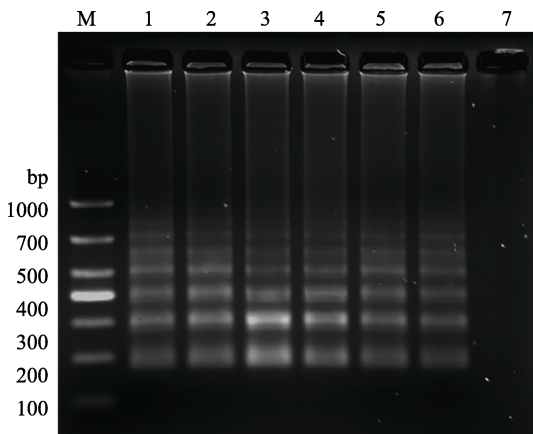


图 5 Betaine 浓度对 CEV-LAMP 扩增效果的影响

M: DL1000 DNA 分子质量标准; 1: 0 mol/L;
2: 0.5 mol/L; 3: 0.7 mol/L; 4: 0.9 mol/L/L;
5: 1.1 mol/L; 6: 1.5 mol/L; 7: 阴性对照.

Fig. 5 Effects of Betaine concentration on
CEV-LAMP amplification

M: DL1000 DNA marker; 1: 0 mol/L; 2: 0.5 mol/L;
3: 0.7 mol/L; 4: 0.9 mol/L; 5: 1.1 mol/L;
6: 1.5 mol/L; 7: negative control.

2.2.6 反应时间的优化 设置扩增时间分别为 20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、70 min, 选择扩增温度 62℃, Betaine 0.7 mol/L, *Bst* DNA 聚合酶 8 U, 引物 F3/B3 0.2 μmol/L, 引物 FIP/BIP 1.2 μmol/L, Mg²⁺ 8.0 mmol/L, dNTPs 1.2 mmol/L 进行扩增。扩增产物电泳结果发现, 反应时间低

于 30 min 时未见扩增产物, 此后梯型条带逐渐变亮, 60~70 min 条带最亮, 但差异不明显, 故确定 60 min 为 CEV-LAMP 反应的最佳扩增时间(图 6)。

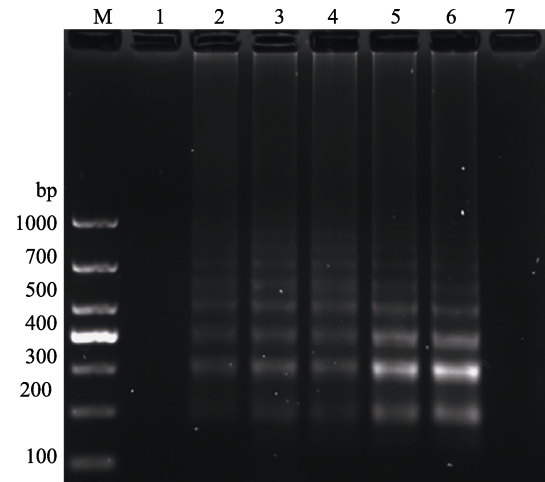


图 6 时间对 CEV-LAMP 扩增效果的影响

M: DL1000 DNA 分子质量标准; 1: 20 min; 2: 30 min;
3: 40 min; 4: 50 min; 5: 60 min; 6: 70 min; 7: 阴性对照.

Fig. 6 Effects of time on CEV-LAMP amplification

M: DL1000 DNA marker; 1: 20 min; 2: 30 min; 3: 40 min;
4: 50 min; 5: 60 min; 6: 70 min; 7: negative control.

综合以上的实验结果, 确定 CEV-LAMP 最佳反应体系为: 10×ThermoPol Reaction Buffer 2.5 μL, Betaine 0.7 mol/L, *Bst* DNA 聚合酶 8 U, 引物 F3/B3 0.2 μmol/L, 引物 FIP/BIP 1.2 μmol/L, Mg²⁺ 8.0 mmol/L, dNTPs 1.2 mmol/L, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 7 μL。混匀后, 于 62℃ 恒温扩增 60 min, 然后 80℃ 灭活 5 min 终止反应。

2.3 CEV-LAMP 的特异性

以 CyHV-2、KHV、ISKNV、SVCV、CEV 的阳性样品以及健康锦鲤 DNA 样本和阴性对照样本为模板, 用已经优化好的 LAMP 反应体系进行扩增。电泳检测结果表明, CEV 出现典型的梯型条带, CyHV-2、KHV、ISKNV、SVCV 这 4 种病毒、健康锦鲤样本与阴性对照均未出现扩增条带, 加入 SYBR Green I 染色后也仅有 CEV 扩增产物呈现绿色荧光反应, 说明设计的 LAMP 引物与其他相似病毒无交叉反应, 对 CEV 具有良好的特异性(图 7)。

2.4 CEV-LAMP 的灵敏度

以经过 10 倍梯度稀释的 CEV 核蛋白编码基

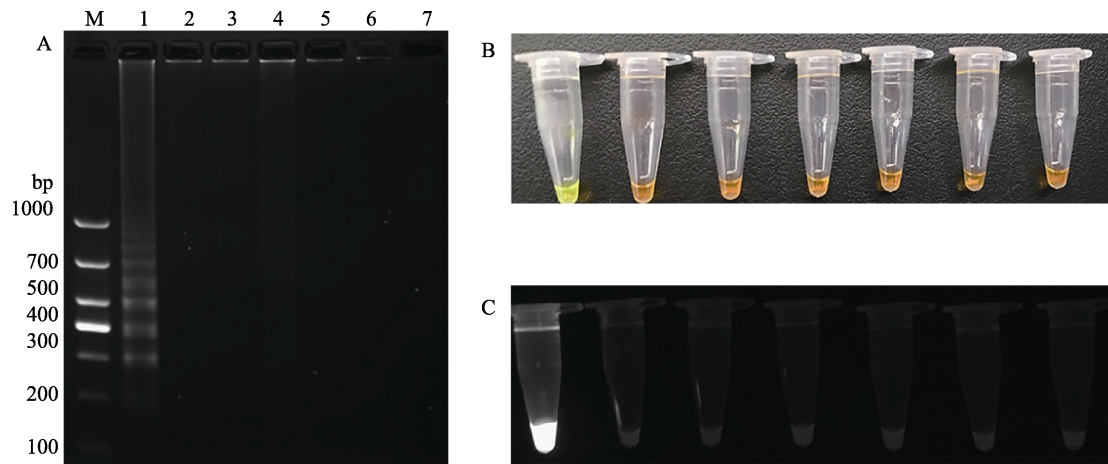


图 7 CEV-LAMP 特异性检测

A. 凝胶电泳结果; M: DL1000 DNA 分子质量标准; 1: CEV; 2: KHV; 3: CyHV-2; 4: ISKNV; 5: SVCV; 6: 健康锦鲤样本; 7: 阴性对照. B. 自然光下检测结果; C. 紫外光下检测结果.

Fig. 7 The specificity of CEV-LAMP detection

A. Gel electrophoresis results; M: DL1000 DNA marker; 1: CEV; 2: KHV; 3: CyHV-2; 4: ISKNV; 5: SVCV; 6: healthy koi sample; 7: negative control. B. natural light detection results; C. UV detection results.

因 *P4a* 的重组质粒为模板, 用已经优化好的 LAMP 体系进行扩增。结果显示, 质粒模板拷贝数为 $10^5 \sim 10^{10}$ copies/ μL 时, 可扩增出大量产物, 质粒模板拷贝数为 10^4 copies/ μL 时, 扩增产物开始减少, 质粒模板拷贝数为 10^1 copies/ μL 时仅有微量扩增, 扩增产物经 SYBR Green I 染色后呈现绿色荧光; 质粒模板拷贝数为 10^0 copies/ μL 时以及空白对照均无扩增条带, SYBR Green I 染色后仍为橙色, 无荧光反应产生。因此, CEV-LAMP 方法最低检测浓度为 10 copies/ μL (图 8)。

2.5 与常规 PCR 法比较

用 F3/B3 引物对不同拷贝数的重组质粒进行常规 PCR 扩增, 其最低检测浓度为 10^3 copies/ μL , 与 CEV-LAMP 法的灵敏度(10 copies/ μL)相比较, 常规 PCR 法扩增模板质粒拷贝数高出 2 个数量级, 表明采用 CEV-LAMP 法检测 CEV 的灵敏度是常规 PCR 的 100 倍(图 9)。

2.6 CEV-LAMP 检测患病鲤样本

采用 CEV-LAMP 法和常规 PCR 法, 对采集自河南南阳市、湖南岳阳市、天津宝坻区的锦鲤养殖场疑似感染 CEV 的患病鲤样本进行检测。结果显示, 河南南阳市、湖南岳阳市和天津宝坻区患病鲤样本均为 CEV 阳性(图 10A), 与常规 PCR 法

结果一致(图 10B)。因此, CEV-LAMP 法适用于鲤浮肿病的现场诊断。

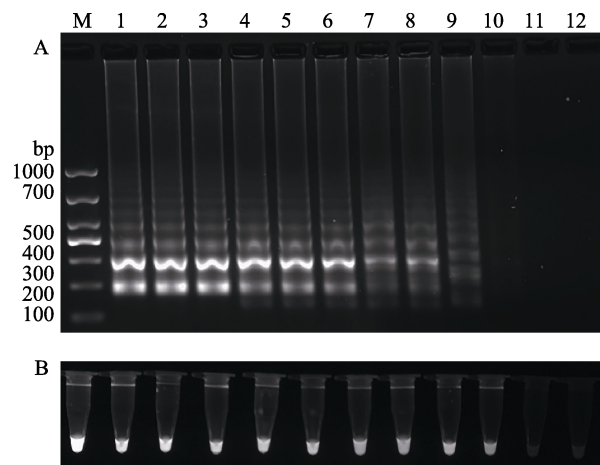


图 8 CEV-LAMP 灵敏度检测

A. 凝胶电泳结果; M: DL1000 DNA 分子质量标准; 1: 10^{10} copies/ μL ; 2: 10^9 copies/ μL ; 3: 10^8 copies/ μL ; 4: 10^7 copies/ μL ; 5: 10^6 copies/ μL ; 6: 10^5 copies/ μL ; 7: 10^4 copies/ μL ; 8: 10^3 copies/ μL ; 9: 10^2 copies/ μL ; 10: 10^1 copies/ μL ; 11: 10^0 copies/ μL ; 12: 阴性对照. B. 紫外光下检测结果.

Fig. 8 The sensitivity of CEV-LAMP detection

A. Gel electrophoresis results; M: DL1000 DNA marker; 1: 10^{10} copies/ μL ; 2: 10^9 copies/ μL ; 3: 10^8 copies/ μL ; 4: 10^7 copies/ μL ; 5: 10^6 copies/ μL ; 6: 10^5 copies/ μL ; 7: 10^4 copies/ μL ; 8: 10^3 copies/ μL ; 9: 10^2 copies/ μL ; 10: 10^1 copies/ μL ; 11: 10^0 copies/ μL ; 12: negative control. B. UV detection results.

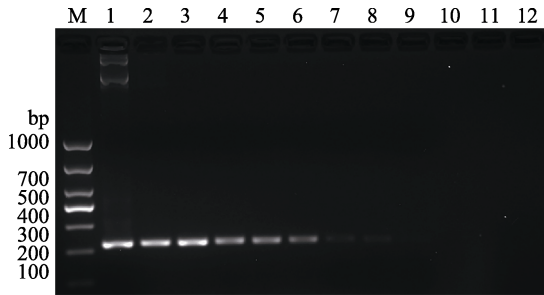


图 9 常规 PCR 检测方法的灵敏度

M: DL1000 DNA 分子质量标准; 1: 10^{10} copies/ μL ;
2: 10^9 copies/ μL ; 3: 10^8 copies/ μL ; 4: 10^7 copies/ μL ;
5: 10^6 copies/ μL ; 6: 10^5 copies/ μL ; 7: 10^4 copies/ μL ;
8: 10^3 copies/ μL ; 9: 10^2 copies/ μL ; 10: 10^1 copies/ μL ;
11: 10^0 copies/ μL ; 12: 阴性对照.

Fig. 9 The sensitivity of traditional PCR detection

M: DL1000 DNA marker; 1: 10^{10} copies/ μL ; 2: 10^9 copies/ μL ;
3: 10^8 copies/ μL ; 4: 10^7 copies/ μL ; 5: 10^6 copies/ μL ;
6: 10^5 copies/ μL ; 7: 10^4 copies/ μL ; 8: 10^3 copies/ μL ;
9: 10^2 copies/ μL ; 10: 10^1 copies/ μL ;
11: 10^0 copies/ μL ; 12: negative control.

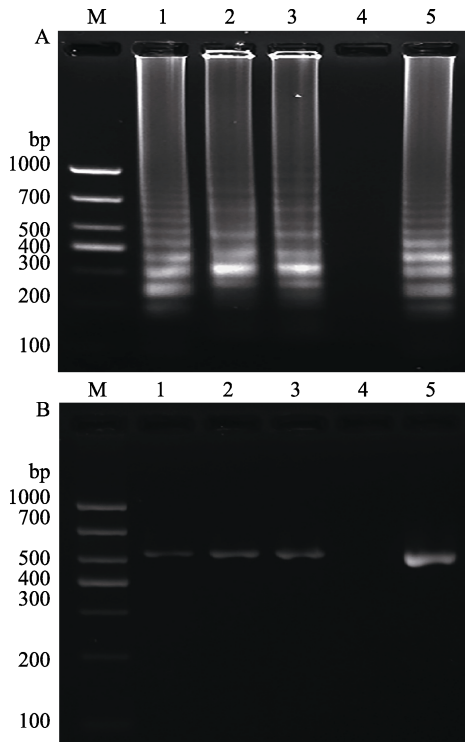


图 10 CEV-LAMP (A)和常规 PCR (B)对病鱼样品的检测结果

M: DL1000 DNA 分子质量标准; 1: 天津市患病锦鲤样本;
2: 河南省患病锦鲤样本; 3: 湖南省患病锦鲤样本;
4: 阴性对照; 5: 阳性对照.

Fig. 10 Results of CEV-LAMP (A) and traditional PCR (B) with diseased koi samples

M: DL1000 DNA maker; 1: diseased koi samples from Tianjin;
2: diseased koi sample from Henan; 3: diseased koi sample from Hunan; 4: negative control; 5: positive control.

3 讨论

CEV 基因组编码的 *P4a* 核蛋白是鲤浮肿病病毒含量最多的一种结构蛋白, 在病毒成熟及形态发生过程中起十分重要的作用^[22]。国内外已报道的几种 CEV 分子检测方法均以核蛋白编码基因 *P4a* 为检测靶标^[21]。生物信息学分析发现, 该蛋白基因位于痘病毒基因组的中间区域, 为高度保守基因^[23-24]。目前, 根据不同病毒株的 CEV 基因组编码的部分 *P4a* 核蛋白分析, 可将 CEV 分为 I 型、IIa 型和 IIb 型^[25]。本实验室通过对采集到的病鱼样本与国内已公布的病毒株进行序列比较分析, 发现 CEV IIa 型毒株分布较为广泛。但是, 由于 LAMP 技术扩增产物片段大小的多样性, 不适合进行序列分析, 故本研究根据 CEV 核蛋白编码基因 *P4a* 序列设计引物而建立的 CEV-LAMP 快速检测方法不适用于病毒株型分析。

反应体系中的各成分浓度是影响 LAMP 反应结果的重要因素。本研究分别对内外引物的浓度比例、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度和 Betaine 浓度进行了优化。内外引物的浓度比例是影响 LAMP 扩增的关键, 反应的起始阶段, 内外引物均参与了 LAMP 反应, 但在循环阶段只有内引物参与反应。因此, 内引物浓度过低会导致反应扩增效率降低, 但过量的内引物浓度又会引起非特异性条带的扩增。有研究表明, 适中的内外引物浓度比, 即内外引物浓度比为 4:1~8:1 之间时, 扩增效果最佳^[26-27]。本研究通过对内外引物浓度比进行优化, 确定内引物浓度为 1.2 $\mu\text{mol/L}$, 外引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。dNTPs 作为扩增反应的原材料, 终浓度一般为 1~2 mmol/L, 是普通 PCR 中 dNTPs 浓度的 5 倍。本研究中 dNTPs 最适浓度为 1.2 mmol/L, 与李聪慧等^[28] 研究结果相符。对 LAMP 反应结果影响较大的还有反应体系中 Mg^{2+} 的浓度。LAMP 反应过程中, Mg^{2+} 首先与 dNTP 结合, 降低了参与反应的 Mg^{2+} 浓度, 最终影响 *Bst* 聚合酶的活性。本研究中, 当 Mg^{2+} 浓度低于 2.0 mmol/L 时, 无扩增反应条带出现, 表明参与反应 Mg^{2+} 浓度过低, 导致反应中 *Bst* 酶的活性过低, 影响了反应效率。Betaine 并非 LAMP 反应中

必需的试剂,在反应过程中主要起维持体系稳定的作用,本实验 Betaine 最适浓度为 0.7 mol/L。

目前国内外最常用的鉴定 LAMP 反应产物的方法为染料法、浊度法和凝胶电泳法^[29-30]。尽管浊度法利用浊度仪对反应产物进行实时监测,不会造成不必要的污染,但其成本较高,限制了该方法在实际应用方面的推广。本研究同时运用琼脂糖凝胶电泳及染料法进行分析鉴定,两种方法反应结果完全一致,表明运用染料法分析鉴定 LAMP 反应产物可信度较高。该方法方便快捷、可信度高,结果简单直观,且应用于实际患病样本检测时,结果稳定准确,适用于养殖一线的快速检测。

灵敏度实验结果显示,CEV-LAMP 法最低检测浓度为 10 copies/ μ L,而常规 PCR 最低检测浓度为 10^3 copies/ μ L,检测限为 CEV-LAMP 法的 100 倍,表明 LAMP 法的灵敏度远高于常规 PCR 的灵敏度,这与已报道的其他研究结果相似^[31-32]。另外,LAMP 方法在恒温条件下进行,不需要复杂的温度循环过程,与 PCR 法相比节省了大量的时间。尽管 LAMP 方法在反应时间、灵敏度方面较 PCR 法均有较大提高,但也存在一些不足。由于扩增产量大,扩增产物可能会扩散到实验环境中造成气溶胶污染。降低污染风险的有效措施除需规范的操作过程外,还包括在 dNTP 中混入适量的 dUTP^[33],消除气溶胶遗留的污染。

重组酶聚合酶等温扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)是近年来发展迅速的另一种新型等温扩增技术^[34],与 LAMP 检测方法一样,摆脱了传统检测方法对昂贵仪器设备的依赖,可应用于现场快速检测。Soliman 等^[35]于 2018 年将该技术应用于 CEV 的检测,并与横向流体试纸条(LFD)结合,使检测结果更为直观。但该方法设计过程相比于 LAMP 法更加繁琐,尚无专门软件适用于 RPA 引物的设计,相比较而言,LAMP 方法在实验设计方面更为成熟,可广泛应用于水生动物病原的检测。

本研究将环介导等温扩增技术应用于鲤浮肿病病毒的检测,通过各参数优化建立了 CEV-LAMP 检测方法。该方法操作简便,在恒温水浴

锅孵育 60 min 便能完成反应,结果直观,加入 SYBR Green I 后显绿色为阳性样品,检测灵敏度是普通 PCR 的 100 倍,具有极好的特异性,适用于 CEV 的现场快速检测,为鲤浮肿病的诊断与防控提供了技术支撑。

参考文献:

- [1] Fishery Bureau of Ministry of Agriculture. China Fishery Statistics Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 6. [农业部渔业局编制. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 6.]
- [2] Bekefi E, Varadi L. Multifunctional pond fish farms in Hungary[J]. Aquaculture International, 2007, 15(3-4): 227-233.
- [3] Murakami Y, Shitanaka M, Toshida S, et al. Studies on mass mortality of juvenile carp: About mass mortality showing edema[J]. Additional Publication of Bulletin Hiroshima Fresh Water Fisheries Experimental Station, 1976: 19-33.
- [4] Oyamatsu T, Hata N, Yamada K, et al. An etiological study on mass mortality of cultured colorcarp juveniles showing edema[J]. Fish Pathology, 1997, 32(2): 81-88.
- [5] Ono S I, Nagai A, Sugai N. A histopathological study on juvenile colorcarp, *Cyprinus carpio*, showing edema[J]. Fish Pathology, 1986, 21(3): 167-175.
- [6] Way K, Stone D. Emergence of carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK[J]. CEFAS Finfish News, 2013, 15: 32-34.
- [7] Lewisch E, Gorgoglione B, Way K, et al. Carp edema virus/koi sleepy disease: An emerging disease in Central-East Europe[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2015, 62(1): 6-12.
- [8] Jung-Schroers V, Adamek M, Teitge F, et al. Another potential carp killer?: Carp edema virus disease in Germany[J]. BMC Veterinary Research, 2015, 11: 114.
- [9] Swaminathan T R, Kumar R, Dharmaratnam A, et al. Emergence of carp edema virus in cultured ornamental koi carp, *Cyprinus carpio koi*, in India[J]. Journal of General Virology, 2016, 97(12): 3392-3399.
- [10] Xu L P, Wang X L, Zhang W, et al. Testing and Identification of carp edema virus disease in cultured koi[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(2): 613-618. [徐立蒲, 王小亮, 张文, 等. 养殖锦鲤鱼浮肿病的检测与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(2): 613-618.]
- [11] Adamek M, Syakuri H, Harris S, et al. Cyprinid herpesvirus 3 infection disrupts the skin barrier of common carp (*Cyprinus carpio L.*)[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(2-4): 456-470.
- [12] Oyamatsu T, Matoyama H, Yamada K, et al. A trial for the

- detection of carp edema virus by using polymerase chain reaction[J]. *Aquaculture Science*, 1997, 45(2): 247-251.
- [13] Adamek M, Jung-Schroers V, Hellmann J, et al. Concentration of carp edema virus (CEV) DNA in koi tissues affected by koi sleepy disease (KSD)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 119(3): 245-251.
- [14] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16(3): 223-229.
- [15] Xin L, Cui Y H, Zhang L W. Advance of loop-mediated isothermal amplification application in rapid detecting food-borne pathogenic microorganism[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(3): 211-220. [辛亮, 崔艳华, 张兰威. 环介导等温扩增技术快速检测食源性致病菌的研究进展[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(3): 211-220.]
- [16] Zhou H Y, Chen C, Li X N, et al. Loop-mediated isothermal amplification technique in the diagnosis of hepatitis B virus infection: a Meta-analysis[J]. *National Medical Journal of China*, 2017, 51(6): 562-567. [周航宇, 陈晨, 李鑫娜, 等. 环介导等温扩增技术诊断乙型肝炎病毒感染的 Meta 分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2017, 51(6): 562-567.]
- [17] Kono T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 115(1): 59-65.
- [18] Yu L P, Hu Y H, Zhang X H, et al. Development of a triplex loop-mediated isothermal amplification method for rapid on-site detection of three *Vibrio* species associated with fish diseases[J]. *Aquaculture*, 2013, 414-415: 267-273.
- [19] Hao G J, Lin F, Chen Z H, et al. Rapid detection of grass carp reovirus by a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick method[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(1): 183-191. [郝贵杰, 林锋, 陈智慧, 等. 逆转录环介导等温扩增联合横向流动试纸条快速检测草鱼呼肠孤病毒(GCRV)的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49(1): 183-191.]
- [20] Zhang X J, Bai X S, Bi K R, et al. Virulence genes and duplex PCR and the LAMP methods for the detection of pathogenic *Edwardsiella tarda*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(7): 1087-1094. [张晓君, 白雪松, 毕可然, 等. 病原迟钝爱德华菌毒力基因及双重 PCR 与 LAMP 检测方法的建立[J]. *水产学报*, 2013, 37(7): 1087-1094.]
- [21] Adamek M, Matras M, Jung-Schroers V, et al. Comparison of PCR methods for the detection of genetic variants of carp edema virus[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2017, 126(1): 75-81.
- [22] Oliveira G, Rodrigues R, Lima M, et al. Poxvirus host range genes and virus-host spectrum: A critical review[J]. *Viruses*, 2017, 9(11): 1-17.
- [23] Gubser C, Hué S, Kellam P, et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis[J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85: 105-117.
- [24] Heljasvaara R, Rodríguez D, Risco C, et al. The major core protein P4a (A10L gene) of vaccinia virus is essential for correct assembly of viral DNA into the nucleoprotein complex to form immature viral particles[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(13): 5778-5795.
- [25] Matras M, Borzym E, Stone D, et al. Carp edema virus in Polish aquaculture - evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(3): 319-325.
- [26] Abbasi I, King C H, Muchiri E M, et al. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: Identification of infected snails from early prepatency[J]. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2010, 83(2): 427-432.
- [27] Thekisoe O M, Rambritch N E, Nakao R, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Theileria parva* infections targeting the PIM and p150 genes[J]. *International Journal for Parasitology*, 2010, 40(1): 55-61.
- [28] Li C H, Xu J, Liu W Z, et al. Establishment of single cross priming isothermal amplification for koi herpesvirus detection[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(9): 1422-1431. [李聪慧, 徐进, 刘文枝, 等. 锦鲤疱疹病毒单交叉引物等温扩增检测方法的建立[J]. *水产学报*, 2015, 39(9): 1422-1431.]
- [29] Lu C, Zhang H, Wang Y, et al. Rapid diagnosis of Fusarium root rot in soybean caused by *Fusarium equiseti*, or *Fusarium graminearum*, using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2015, 44(4): 437-443.
- [30] Sriworarat C, Phumee A, Mungthin M, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of *Leishmania* infection[J]. *Parasites & Vectors*, 2015, 8: 591.
- [31] Sun Z F, Hu C Q, Ren C H, et al. Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 131(1): 41-46.
- [32] Zhang J F, Zeng L B, Zhang H, et al. Development of a reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of grass carp reovirus[J].

- Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 129-136. [张金凤, 曾令兵, 张辉, 等. 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[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 129-136.]
- [33] He L, Xu H S, Wang M Z, et al. Development of rapid detection for white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 598-603. [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.]
- [34] Shalaby M A, El-Deeb A, El-Tholoth M, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of lumpy skin disease virus[J]. BMC Veterinary Research, 2016, 12: 244.
- [35] Soliman H, El-Matbouli M. Rapid detection and differentiation of carp oedema virus and cyprinid herpes virus-3 in koi and common carp[J]. Journal of Fish Diseases, 2018, 41(5): 761-772.

Establishment of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of carp edema virus

ZHAI Liwen^{1,2}, LIU Wenzhi², XU Chen², FAN Yuding², JIANG Nan², ZHOU Yong², ZENG Lingbing^{1,2}

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306, China;

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

Abstract: Common carp (*Cyprinus carpio*), the earliest farmed fish in the world, is one of the most important and economically significant species in freshwater aquaculture in China. In recent years, carp edema virus (CEV) disease, a newly emerged infectious disease in common carp, has been discovered in many countries, threatening the healthy development of common carp farming. Due to a lack of CEV-sensitive cell lines, detection of CEV relies on methods that use electron microscopy and polymerase chain reaction (PCR); however, these methods are not used universally for clinical diagnosis because they require expensive equipment and a long response time. Therefore, there is an urgent need to establish a simple, accurate, and rapid diagnostic method to detect CEV. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel amplification technique used to produce DNA copies within 1 h. Furthermore, the results can be judged based on turbidity or by the addition of SYBR Green I to the reaction products and observation of color change within the reaction system. LAMP technology has played an important role in human medicine, animal medicine, and food safety, and has gradually been developed for industrialization and commercialization. In this study, two pairs of specific primers were designed based on the conserved sequence of the gene encoding the CEV nucleus protein, *P4a*, and a recombinant plasmid was constructed for use as a standard template for amplification. Then, a LAMP detection method for CEV was established after optimizing the reaction conditions. The optimal LAMP reaction system for CEV detection included F3/B3 0.2 μmol/L, FIP/BIP 1.2 μmol/L, betaine 0.7 mol/L, Mg²⁺ 8.0 mmol/L, and dNTPs 1.2 mmol/L and was performed at 62°C for 60 min. The amplified products included a ladder band on agarose electrophoresis and green products, which were observed directly by the addition of SYBR Green I. The sensitivity of the detection method for CEV was 10 copies/μL, which is 100-fold higher than the traditional PCR method. Moreover, CEV-LAMP was specific for detecting CEV without cross reaction with other viral genomes, including spring viremia of carp virus, koi herpesvirus, cyprinid herpesvirus 2, and infection spleen and kidney necrosis virus. This method has been used for the rapid detection of CEV in diseased koi carp. The results were accurate and reliable, providing an effective and useful method for the on-site diagnosis of CEV.

Key words: carp edema virus; nucleus protein encoding gene *P4a*; loop-mediated isothermal amplification; detection; optimization

Corresponding author: ZENG Lingbing. E-mail: zlb@yfi.ac.cn