

应用巢式逆转录聚合酶链反应检测鱼类 病毒性出血性败血症病毒(VHSV)*

倪穗¹ 余晓巍¹ 王建平^{3①} 雷爱莹² 曾地刚² 吴雄飞³

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 2. 广西水产研究所 南宁 530021;

3. 宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315012)

提要 参照鱼类病毒性出血性败血症病毒序列,根据PCR引物设计的原则,设计巢式PCR引物,采用巢式逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法,对如何快速检测鱼类病毒性出血性败血症病的方法进行了较为系统的研究,并对RT-PCR的反应条件进行了优化。结果表明,巢式RT-PCR扩增获得279bp的特异性片断,阴性对照无扩增条带。巢式RT-PCR扩增出的特异性片段经测序分析,结果证实与报道的序列完全一致。该方法最低可检测出0.1pg的鱼类病毒性出血性败血症病毒RNA。初步建立了VHSV的巢式RT-PCR检测方法,该方法灵敏、特异,可为VHSV的检测提供一个快速、有效的手段。

关键词 病毒性出血性败血症病毒,巢式逆转录聚合酶链反应,检测

中图分类号 Q789

病毒性出血性败血症(viral hemorrhagic septicaemia, VHS)是感染鲑鳟鱼类的一种严重的致死性传染性疾病。VHS的病原是病毒性出血性败血症病毒(VHSV),属于弹状病毒科 *Novirhabdovirus* 属。病毒基因组为一段单链负链RNA,其线性基因组编码5个蛋白,包括:核衣壳蛋白(N蛋白),两个结构蛋白(M1和M2蛋白),糖蛋白(G蛋白)和RNA聚合酶(L蛋白)。VHSV粒子长约180nm,宽约70nm。其基因组长度约12k个碱基(史成银等,2003)。

VHSV可以感染大菱鲂、鲈鱼、漠斑牙鲆、虹鳟、褐鳟、茴鱼、白鲑和大西洋鲑等多种鱼类,死亡率可达90%—100%,其危害性很大,2006年5月,研究人员与纽约环保局(DEC)合作,于圣劳伦斯河流和爱恩得库特海湾大量死亡的刺鲃虎鱼身上成功分离了该病毒。在国际动物卫生组织(OIE)和我国进境动物一、二类传染病名录中均被列为必报疫病(世界动物卫生组织,2000)。国际组织通常对VHSV国家处以一些限制措施,从而避免鱼类流动到其他地区和国

家,过去VHS主要流行于北美洲和欧洲一些国家(de Kinkelin *et al*, 1995)。近年来,随着水生动物及其产品进出口贸易的急剧增加,VHS已经传入我国,并在我国局部地区流行(牛鲁祺等,1988)。

传统的病毒细胞培养法和血清学法均受限于各自的特点,检测费时费力,难于满足快速检测的需要(Verstrepen *et al*, 2001)。因此,探讨其快速诊断方法,对病毒性出血性败血症病毒的疫情监控及流行病学调查,从而采取相应的防治措施具有重要意义。为此,本文在病毒性出血性败血症病毒糖蛋白基因序列两端设计两对引物,建立巢式逆转录聚合酶链反应检测该病毒,并对其反应条件进行优化,证实了该方法快速,灵敏,具有良好的特异性。

1 材料与方法

1.1 材料

VHSV由本实验室保存。VHSV注射感染大菱鲂(*Scophthalmus maximus*),出现典型病毒性出血性败

* 宁波市重大科技攻关项目,2008C10022号;国家科技支撑计划项目,2007BAD43B05号;广西科技攻关项目,桂科攻0718003-3号。倪穗,教授,E-mail: nisui@nbu.edu.cn

① 通讯作者:王建平,研究员,E-mail: wjping805@126.com

收稿日期:2008-11-12,收修改稿日期:2009-03-12

血症后, 将病鱼保存于 - 80℃ 备用。RT-PCR 一步法试剂盒购自 Promega 公司, Trizol RNA 抽提试剂, pMD18-T 载体、*Taq* 酶、dNTP 购自上海生物工程公司, 其他常规试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计

参照 GenBank 内 VHSV 的糖蛋白基因序列 (GenBank 登录号: DQ401193), 用 Primer premier 5.0 软件设计了内、外两对引物, 由上海生物工程公司合成。

外引物序列为:

VHS1 5'- ATAAACAAGGGCTTGGTCTC -3'

VHS2 5'- AGAAGTCGTCTGTGGCTCCC -3'

内引物序列为:

VHS3 5'- TGGCAAGGAGTCTACTGGAT -3'

VHS4 5'- CCTCATCTGAATGTCGGTGT -3'

其中 VHS1 和 VHS2 扩增 688bp 片段, VHS3 和 VHS4 扩增 279bp 片段(图 1)。

1.3 病毒 RNA 提取

取待检鱼的肝脏组织约 100mg 放入 1.5ml 离心管中, 加入 450μl 的 CTAB 溶液(2% CTAB, 1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA, 100mmol/L Tris-HCl, pH = 7.5, 在用以前加 0.25%的α-巯基乙醇), 用试管匀浆器匀浆 1—2min, 然后室温作用 1—2h, 再加 600μl 酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1), 在旋涡混合器上高速混合 30s, 12000r/min 离心 15min, 取上层水相。再加 650μl 氯仿/异戊醇(24 : 1)混合 30s, 12000r/min 离心 15min, 取上层水相, 加等体积的冷无水乙醇混匀后, 12000 r/min 离心 20min。沉淀即所需的总 RNA。倒掉上清, 加入 200μl 75%乙醇, 晃动洗涤一次并小心倒掉乙

醇。室温干燥。然后加入 20μl DEPC 处理过的水溶解沉淀, 贮存于 - 20℃ 待用。

1.4 巢式 RT-PCR

外引物的扩增采用一步法的 RT-PCR 试剂盒进行。用 TaKaRa 产的 one step RT-PCR 试剂盒及外引物将总 RNA 的逆转录及第一轮 PCR 扩增在同一管中进行。反应体系为 50μl, 其中包含: AMV/Tf15 × Reaction Buffer 10μl, dNTPs Mix (10mmol/L each dNTP) 1μl, 25nmol/L MgSO₄ 2μl, AMV Reverse Transcriptase (5U/μl) 1μl, TfiDNA Polymerase (5 U/μl) 1μl, RNA sample 3μl, VHS1 50 pmol, VHS2 50 pmol, 最后补足无 RNA 酶水至总体积 50μl。

反应程序为: 48℃ 45min; 94℃ 2min 进行逆转录; 然后进行第一轮 PCR, 即 94℃ 45s, 55℃ 30s, 72℃ 90s 循环 35 次; 72℃ 7min; 4℃ 结束。

反应结束后, 取扩增产物 1μl, 用内引物 VHS3、VHS4 进行第二轮 PCR 扩增。反应体系为 50μl, 其中包含: 1μl 模板 DNA, 10 × PCR bufer 4μl, 10mmol/L dNTPs 1μl, 25nmol/L MgSO₄ 2μl, *Taq* 酶 5U, VHS3 50pmol, VHS4 50pmol, 最后补足 ddH₂O 至总体积 50μl。反应程序为: 94℃ 3min; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1min 循环 35 次; 72℃ 5min; 4℃ 结束。

1.5 琼脂糖电泳

PCR 扩增产物加入 GeneFinder 核酸染料后, 用 2%琼脂糖凝胶电泳(5V/cm), 电泳缓冲液为 1 × TAE, 100V 电泳约 30min, 电泳结束后在凝胶成像系统中拍照。

1.6 PCR 产物的纯化、克隆、测序

PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳分离, 用胶回收试剂盒回收纯化后, 连接到 PMD18-T 载体, 连接产物按常规方法转化宿主菌 TOP10, 然后涂布含氨苄青霉素的 LB 培养基平板, 挑选白色阳性菌落, 用质粒抽提试剂盒提取质粒 DNA, 酶切鉴定后, 送北京三博远志生物技术公司测序。

1.7 巢式 RT-PCR 的特异性试验

以同属于弹状病毒科的鲤春病毒血症病毒(SVCV)病毒为对照, 采用 CTAB、酚/氯仿抽提后作模板, 在相同的条件进行经 RT-PCR 和 semi-nested PCR 扩增, 验证巢式 PCR 的特异性。

1.8 巢式 RT-PCR 敏感性试验

用紫外分光光度法测量提取的模板 RNA 的浓度, 按 10 倍递进稀释法稀释后, 分

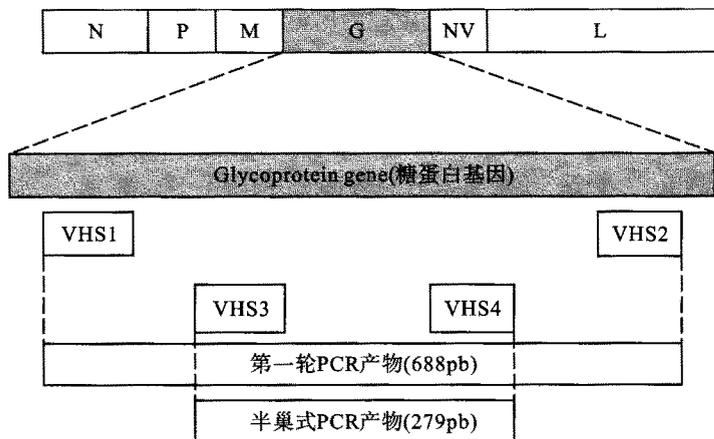


图 1 VHSV 病毒基因结构及 PCR 示意图

Fig.1 Sketch of VHSV gene and fragments in PCR

N: 核蛋白; P: 磷酸化蛋白; M: 基质蛋白; G: 糖蛋白; NV: 非病毒粒子蛋白; L: 大蛋白

别取各浓度适量的 RNA 作为模板进行巢式 RT-PCR, 测定其敏感性。

2 结果

2.1 VHSV 的巢式 RT-PCR 检测结果

从 VHSV 感染的大菱鲆的肝脏组织中, 提取总 RNA, 进行巢式 RT-PCR。扩增产物经过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 250—300bp 之间出现明显条带, 与原设计的片段大小 279bp 完全一致(图 2)。

2.2 特异性检验

以同属于弹状病毒科的鲤春病毒血症病毒(SVCV)为对照, 在相同条件下进行巢式 RT-PCR, 扩增结果显示, 不能形成特异性条带(图 2), 说明所设计的引物具有很强的特异性。

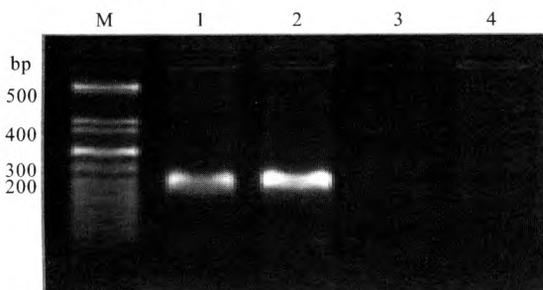


图 2 巢式 RT-PCR 的特异性分析

Fig.2 Specificity analysis of the nested RT-PCR

M: 50bp DNA Ladder Marker; 1—2. VHSV 巢式 RT-PCR 扩增产物; 3—4. SVCV 巢式 RT-PCR 扩增产物

2.3 测序结果

将巢式 RT-PCR 产物克隆到 PMD18-T 载体上测

```
TGGCAAGGAGTCTACTGGATCGGCGCCACACCTCAGGCCATTGCCCCACCTCAGAAACGCTTGAGGG
GCATCTGTTACCAGGACACATGATCACAGGGTTGTCAAGGCAATCGTAGCGGGTCACCACCCCTGGG
GACTACAATGGCATGCACGGTGACATTTTGTGGGGCAGAATGGATCAAGACCGACCTGGGGGACCTT
ATTAAGGTGACAGGACAGGGGGGGCGAAGAACTGTCTCCAAGGAAGTGTGTCAACCCGACATTC
AGATGAGG
```

图 3 测序结果

Fig.3 The result of sequencing

毒)等有交叉反应, 影响了鉴定的可靠性(高隆英等, 2002)。因此, 血清学方法在检测 VHSV 的应用上存在诸多限制。

随着分子生物学技术的发展, PCR(多聚酶链式反应)为检测病毒核酸提供了一种快速, 灵敏和特异的检测方法(Oreshkova *et al.*, 1999)。传统的 RT-PCR 方法很难检出标本中拷贝数较低的病毒核酸, 从而产生一定的假阴性率(温韬等, 2004)。利用巢式逆转录聚合酶链反应检测 RNA 病毒具有更高的特异性和

敏感性, 而实践证明, 从组织中抽提的总 RNA 逆转录为 cDNA 这一步对于巢式 RT-PCR 是非常关键的, 操作繁琐且费时, 而总 RNA 又极易降解, 稍有不慎就会导致逆转录效率降低, 从而导致 PCR 模板质量低进而影响到 PCR 的扩增效果, 甚至是扩增失败出现假阴性结果, 此外, 频繁的操作也容易发生样品之间的交叉污染而出现假阴性结果。而常规的巢式逆转录聚合酶链反应方法检测病毒一般分为以下几个步骤: 首先将总 RNA 逆转录为 cDNA, 然后用第一对

2.4 巢式 RT-PCR 扩增 VHSV 的敏感性试验结果

提取的模板 RNA 的浓度, 按 10 倍递进稀释法稀释后, 分别取各浓度适量的 RNA 作为模板进行巢式 RT-PCR, 结果用巢式 RT-PCR 最低可检出 0.1pg 的 VHSV RNA(图 4)。

3 讨论

病毒性出血性败血症病毒能感染各种年龄的鲑鳟鱼类, 通常在水温 8—10℃ 时流行。该病主要流行于整个欧洲大陆、北美和日本, 传染性极强, 近年来, 随着水生动物及其产品进出口贸易的急剧增加, VHSV 已经传入我国, 并在我国局部地区流行。

传统诊断 VHSV 的方法是先利用细胞将病毒分离培养, 再通过中和试验(Neutralization Test)或 ELISA 的方法进行鉴定(世界动物卫生组织, 2000), 这些血清学方法由于受到自身一些因素的限制, 均需较长时间(2 周以上)才能达到检出水平, 不利于快速诊断。此外, 许多血清型抗体间有交叉反应, 特异性差(张寿斌等, 2006)。由于 VHSV 是弹状病毒, 有囊膜, 并且囊膜来自宿主细胞, 容易产生非特异性抗体, 因而做 ELISA 时可与其它鱼类弹状病毒如 IHNV(传染性造血器官坏死病毒), SVCV(鲤春病毒出血症病

敏感性, 而实践证明, 从组织中抽提的总 RNA 逆转录为 cDNA 这一步对于巢式 RT-PCR 是非常关键的, 操作繁琐且费时, 而总 RNA 又极易降解, 稍有不慎就会导致逆转录效率降低, 从而导致 PCR 模板质量低进而影响到 PCR 的扩增效果, 甚至是扩增失败出现假阴性结果, 此外, 频繁的操作也容易发生样品之间的交叉污染而出现假阴性结果。而常规的巢式逆转录聚合酶链反应方法检测病毒一般分为以下几个步骤: 首先将总 RNA 逆转录为 cDNA, 然后用第一对

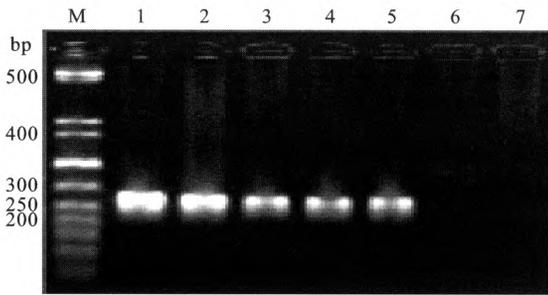


图4 巢式 RT-PCR 的敏感性测定

Fig.4 Sensitivity analysis of the nested RT-PCR amplification
M: 50bp DNA Ladder Marker; 1: 1ng; 2: 100pg; 3: 10pg;
4: 1pg; 5: 0.1pg; 6: 0.01pg; 7: 0.001pg

外引物进行第一轮扩增,再用第二对内引物进行第二轮扩增,最后分析扩增结果(胡庆宏等,2005),整个过程操作复杂且繁琐,耗时长,且无论在实验过程中如何细致认真,总不可避免的出现由于总 RNA 降解,模板质量差导致的假阴性结果和由于样品交叉污染导致的假阳性结果。

本研究中建立的改良后的巢式 RT-PCR,对 VHSV 能够扩增出 279bp 的特异性片段,而同属于弹状病毒科的 SVCV 的扩增结果为阴性,表明该方法具有良好的特异性;敏感性试验结果表明用巢式 RT-PCR 最低可检出 0.1pg 的 VHSV RNA,说明该方法的敏感性很高。由于在巢式逆转录聚合酶链反应过程中,利用 Promega 公司的 RT-PCR 一步法试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA 和第一轮 PCR 反应合为一步,在同一 PCR 管中进行,减少了操作步骤,缩短了对总 RNA 操作的时间,不仅有效地防止了由于总 RNA 降解,模板质量差导致的假阴性结果和由于样品交叉污染导致的假阳性结果,而且有效地节省了时间,而

实验证明这种改良的巢式 RT-PCR 具有和常规 RT-PCR 一样甚至更高的特异性和敏感性,在 VHSV 的快速检测中更具实效性,可以在水产动物体内极微量 VHSV 的快速检测中大力推广。

参 考 文 献

- 牛鲁祺,赵志壮,1988. 东北地区虹鳟 IHN 和 IPN 流行病学的初步研究. 水产学报, 12: 327—332
- 世界动物卫生组织(OIE), 2000. 国家质量监督检验检疫总局译, 2001. 水生动物疾病诊断手册 3 版. 北京: 中国农业出版社, 45—46
- 史成银,王印庚,黄捷等,2003. 大菱鲆病毒性疾病研究进展. 高技术通讯, 13(9): 99—105
- 张寿斌,廖华,黄呈辉等,2006. 应用通用引物建立巢式逆转录聚合酶链反应检测肠道病毒. 中国医师杂志, 8(7): 179—379
- 胡庆宏,刘明圭,栾树清等,2005. 介绍一种改良的巢式逆转录聚合酶链反应技术. 实用临床医学, 6(11): 94—95
- 高隆英,史秀杰,刘荻等,2002. 用 RT-PCR 法快速检测鲤春病毒血症病毒基因. 水生生物学报, 26(5): 452—456
- 温韬,邱道明,黄德庄等,2004. 巢式逆转录聚合酶链反应检测冠状病毒的研究. 中华检验医学杂志, 27(7): 443—445
- de Kinkelin P, Béarzotti M, Castric J *et al*, 1995. Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicaemia in France. *Veterinary Research*, 26(5): 379—387
- Oreshkova S F, Shchelkunov I S, Tikunova N V *et al*, 1999. Detection of spring viremia of carp virus isolates by hybridization with non-radioactive probes and amplification by polymerase chain reaction. *Virus Research*, 63: 3—10
- Verstrepen W A, Kuhn S, Kockx M M *et al*, 2001. Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol*, 39(11): 4093—4096

DETECTION OF FISH VIRAL HEMORRHAGIC SEPTICEMIA VIRUS (VHSV) BY NESTED REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

NI Sui¹, YU Xiao-Wei¹, WANG Jian-Ping³, LEI Ai-Ying², ZENG Di-Gang², WU Xiong-Fei³

(1. *Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University Ningbo, 315211*; 2. *Guangxi Institute of Fisheries, Nanning, 530021*;
3. *Ningbo Academy of Ocean and Fishery, Ningbo, 315012*)

Abstract Fish viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) is a rhabdovirus in fish causing serious fish mortality. With the results of genomes sequence analysis on VHSV, two pairs of primers were designed. Under optimized RT-PCR conditions, target regions of VHSV glycoprotein gene were amplified using VHS1-2 and VHS3-4 primers. Products of 279bp segment were shown after the nested RT-PCR reaction. Negative control showed no amplification. The RT-PCR product was proved identical to previously reported VHSV sequence. The detection limit of the nested RT-PCR assay is 0.1pg. Therefore, the nested RT-PCR assay, a sensitive, specific, and quick tool for VHSV detection is established.

Key words Viral hemorrhagic septicemia virus, Nested reverse transcription polymerase chain reaction, Detection