

林 锋,郝贵杰,盛鹏程,等. 罗氏沼虾野田村病毒 3 种检测方法比较[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):214-216.

罗氏沼虾野田村病毒 3 种检测方法比较

林 锋,郝贵杰,盛鹏程,曹 铮,吴颖蕾,刘 莉

(浙江省淡水水产研究所/农业部淡水健康养殖重点实验室,浙江湖州 313001)

摘要:胶体金免疫层析技术、RT-PCR、RT-LAMP 采用的抗体和特异性引物均针对罗氏沼虾野田村病毒的衣壳蛋白和编码基因 RNA2。采用这 3 种方法分别检测罗氏沼虾野田村病毒 (*Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus, MrNV), 结果表明,免疫胶体金检测试纸能快速检测感染罗氏沼虾野田村病毒的幼虾,但灵敏度较低,能用来检测具有疑似病症的样品;RT-PCR 和 RT-LAMP 检测灵敏度都优于免疫胶体金检测试纸,但 RT-PCR 方法操作步骤繁琐,所耗时间较长,而 RT-LAMP 方法操作简便、用时短、不需要特殊仪器,在产物中加入核酸染料后检测结果可用肉眼直接判定。因此,RT-LAMP 方法更适合基层和现场检测,其相关试剂盒的研发更具有应用前景。

关键词:罗氏沼虾野田村病毒;免疫胶体金技术;RT-PCR;RT-LAMP;检测

中图分类号: S945.4⁺19 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0214-03

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 是一种生长快、病害较少、易养殖的淡水养殖虾,目前已经成为我国淡水养殖的主要品种之一,江浙一带是主要产地。罗氏沼虾野田村病毒 (*Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus, MrNV) 是危害罗氏沼虾淡化苗的主要病毒,会导致病虾肌肉出现白斑、白浊或全身发白,通常被称为罗氏沼虾白尾病 (white tail disease, WTD),严重时死亡率高达 90% 以上^[1],对罗氏沼虾养殖业造成极大的危害,已被列为 OIE 申报疫病和我国水生动物二类疫病。2011 年至今,广东、浙江、江苏、上海等地连续几年在罗氏沼虾幼苗抽检中均检测到该病毒,对该病毒的防控工作还有待加强。目前,罗氏沼虾野田村病毒的检测方法有电泳法、病毒核酸鉴定法、RT-PCR 检测法、TAS-ELISA 检测法等^[2-6],其中,RT-PCR 是现今最为常用、也是最为经典的检测方法。环介导等温扩增法 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是近年发展起来的一种新颖的核酸扩增技术,在恒温条件下高效扩增核酸,具有高特异性、快速灵敏、高效、操作简

便等特点^[7],已被广泛用于人、动植物病毒和细菌检测。本试验在前人研究基础上,结合实际应用需要,采用胶体金免疫层析技术、RT-PCR、RT-LAMP 3 种方法分别检测人工感染 MrNV 的罗氏沼虾幼苗和成虾,对 3 种检测方法的优劣进行比较和分析,以期罗氏沼虾病毒病的实际诊断提供必要的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

MrNV 病样由浙江省淡水水产研究所实验室人工攻毒制备,MrNV 单克隆和多克隆抗体自行制备^[8];RNA 提取试剂盒 (viral RNA mini kit) 购自 Qiagen 公司;Taq DNA 聚合酶、M-MLV 逆转录试剂盒、DL2000 Marker、100 bp DNA Ladder Marker 购自 TaKaRa 公司;Bst DNA 聚合酶大片购自 New England Biolabs 公司;AMV 酶、dNTP 购自 Promega 公司;甜菜碱、硫酸镁等购自 Sigma 公司。

1.2 引物和探针的设计与合成

RT-PCR 引物采用世界动物卫生组织 (OIE) 推荐的 MrNV 特异性引物^[9];RT-LAMP 反应所用引物和探针根据 GenBank 公布的 MrNV 编码衣壳蛋白基因 RNA2 序列,由在线软件 PrimerExplorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>) 设计和手工修改后获得,利用不同引物的反应结果进行筛选,从中选出特异性和灵敏度较佳的 2 对引物,其中包括 2 条外引物 (F3、B3) 和 2 条内引物 (FIP、BIP) (表 1)。引物由上海生工生物公司合成。

(4):685-687.

[46] Liu Z Z, Zeng Z, Pan L D, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for the endangered roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*) [J]. Conservation Genetics Resources, 2012, 4(4): 837-840.

[47] Onikura N, Takeshita N, Matsui S, et al. Spawning grounds and nests of *Trachidermus fasciatus* (Cottidae) in the Kashima and Shiota estuaries system facing Ariake Bay, Japan [J]. Ichthyological Research, 2002, 49(2): 198-201.

收稿日期:2013-12-19

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201103034);浙江省湖州市科技项目(编号:2012GN08、2011ZD2005);浙江省淡水养殖科技创新团队建设(编号:2012R10026-11)。

作者简介:林 锋(1980—),男,硕士,助理研究员,主要从事水产病原微生物研究。E-mail:wwlinfeng@163.com。

通信作者:刘 莉,副研究员,从事水产动物病害防治研究。E-mail:liuli6655@hotmail.com。

[43] 曾 珍,刘至治,潘连德,等. 松江鲈鱼野生群体遗传多样性的 RAPD 分析和 SCAR 标记的转化[J]. 动物学研究,2012,33(2):203-210.

[44] 张文学. 松江鲈 (*Trachidermus fasciatus*) 群体的形态学与遗传学差异及其 MHC I A 基因的克隆与原核表达[D]. 济南:山东大学,2011.

[45] Ren G J, Hu J J, Bao Z M, et al. Development and characterization of fourteen microsatellite loci in a threatened catadromous fish *Trachidermus fasciatus* [J]. Conservation Genetics Resources, 2011, 3

表 1 引物序列

检测方法	引物名称	序列(5'→3')
RT-PCR	MrNV-F	GCGTTATAGATGGCACAAAGG
	MrNV-R	AGCTGTGAAACTTCCACTGG
RT-LAMP	MrNV-F3	CGTTAATGCCATCACTGTT
	MrNV-B3	TGGGTAATGCAGGAACAT
	MrNV-FIP	GCTTAACCAAGATTCTAGACTTGGG- TTTTGCAGTGATTTTCTTACAACGT
	MrNV-BIP	CTGCGAGTTCTTTCTTGGTACCT- TTTCTGTGCCATCTATAACGCT

1.3 MrNV 胶体金诊断方法的建立

1.3.1 MrNV 胶体金检测试纸的制备 在实验室自行制备鼠抗 MrNV 单抗和兔抗 MrNV 多抗的基础上,与杭州某生物公司合作,以兔抗 MrNV 的多抗作为第一抗体吸附在结合垫上,再用鼠抗 MrNV 单抗与胶体金颗粒标记,制成 MrNV 病毒测定胶体金试纸条(图 1)。



C—Control line; T—Test line; S—Sample hole

图 1 MrNV 胶体金检测试纸

1.3.2 MrNV 胶体金检测试纸的应用 称取 50 mg 罗氏沼虾幼苗或成虾肌肉组织置于离心管中,加入 200 μ L PBS 缓冲液,研磨匀浆,5 000 r/min 离心 2 min;用吸管吸取上清液,滴 1~3 滴到图 1 所示样品 S 孔中,等待 2~5 min 观察结果。如分别在 C(质控线)和 T(检测线)处出现沉淀线,表明样品为 MrNV 阳性;如仅有 C 线出现沉淀线,表明样品为 MrNV 阴性;如没有条带出现,表明该胶体金检测试纸条为不合格品。

1.4 RT-PCR 和 RT-LAMP 反应

1.4.1 病毒 RNA 的提取 称取病毒样本 50~100 mg,用 Qiagen 公司的 RNA 提取试剂盒(viral RNA mini kit)提取样本病毒 RNA,操作步骤参照说明书进行,提取单个样品 RNA 约 10 min。提取的总 RNA 溶于 50 μ L 双蒸水中,利用超微量分光光度计(NanoDrop2000, USA)对核酸浓度进行定量分析。-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.2 RT-PCR 反应体系 取 4 μ L RNA 模板,利用 M-MLV 逆转录试剂盒得到 cDNA,进行 PCR 扩增,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,55 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 15 min;1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。

1.4.3 RT-LAMP 反应体系 1.6 mmol/L MrNV-FIP 和 MrNV-BIP、0.2 mmol/L MrNV-F3 和 MrNV-B3、0.05 μ mol/L MrNV-PROBE、20 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0)、10 mmol/L 氯化钾、15 mmol/L 硫酸铵、8 mmol/L 硫酸镁、0.1% Triton X-100、0.6 mol/L 甜菜碱、1.4 mmol/L

dNTP、1 U 逆转录酶 AMV、8 U Bst DNA 聚合酶大片段,终体积为 25 μ L;模板 4 μ L。反应条件为:63 $^{\circ}$ C 反应 45 min,85 $^{\circ}$ C 保温 5 min 终止反应。反应前,将封存于反应管盖的核酸染料快速振荡,与反应产物混合均匀,静置 5 min 后,通过颜色变化判定结果。

2 结果与分析

2.1 MrNV 胶体金检测试纸条的制备与应用

将阳性虾组织匀浆液上清进行 10^{-1} ~ 10^{-8} 梯度稀释,利用 MrNV 胶体金检测试纸条进行检测,结果表明,胶体金检测试纸条仅能检测到 10^{-2} 倍稀释度时的样品(图 2)。整个检测过程在 10 min 内可以完成。

从左到右依次为稀释度 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 样品的检测结果

图 2 MrNV 胶体金检测结果

2.2 MrNV RT-PCR 检测

将提取的 MrNV RNA 进行 10^{-1} ~ 10^{-8} 梯度稀释,经过 RT-PCR 反应,琼脂糖凝胶电泳,结果显示,对于稀释度大于 10^{-5} 的样品无法检出(图 3)。整个检测过程大概需 4~5 h。

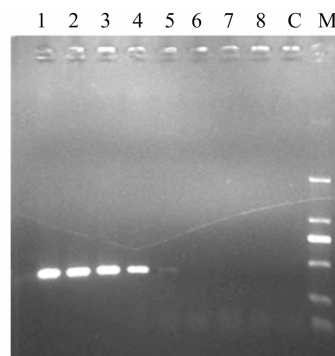
1~8—稀释梯度依次为 10^{-1} ~ 10^{-8} 的样品扩增结果; C—阴性对照; M—DL2000 Marker

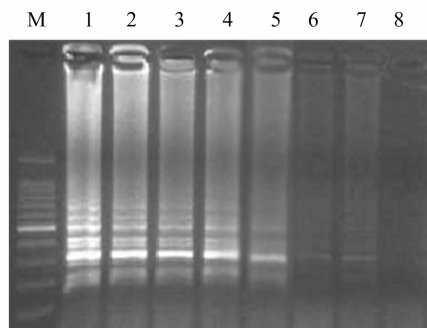
图 3 MrNV RT-PCR 电泳结果

2.3 MrNV RT-LAMP 检测

以 10^{-1} ~ 10^{-8} 逐步梯度稀释 MrNV RNA 为模板,进行环介导等温扩增,产物同时用琼脂糖凝胶电泳和核酸染料染色,结果表明,凝胶电泳 1~5 号泳道能清楚观察到阶梯状条带,泳道 6 和泳道 7 能勉强看到条带(图 4);核酸染料染色法检测,1~5 号管为绿色,7 和 8 号管为橙红色,而 6 号管处于 2 种颜色的过渡阶段,其中,绿色为阳性,橙红色为阴性(图 5)。

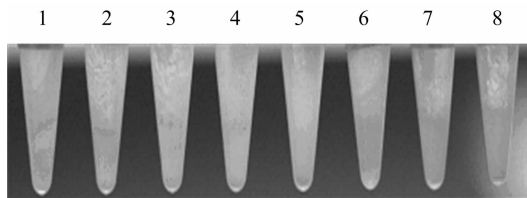
3 讨论

罗氏沼虾野田村病毒是引起罗氏沼虾幼体产生白体病的病原,发病高峰期死亡率达 100%。自 2004 年该病毒从罗氏沼虾白体病样品中被分离出来,其检测方法不断更新发展,



1~8—稀释梯度依次为 10^{-1} ~ 10^{-8} 的样品;
M—100 bp DNA Ladder Marker

图4 MrNV RT-LAMP 琼脂糖凝胶电泳检测结果



1~8—稀释梯度依次为 10^{-1} ~ 10^{-8} 的样品

图5 MrNV RT-LAMP 核酸染料染色检测结果

从电镜观察发展到分子生物学方法检测,使得罗氏沼虾白体病得到有效控制。但是,近年来,通过在广东、广西、浙江、江苏、上海等地苗场和养殖场抽样调查和采集病样,发现 MrNV 有死灰复燃迹象,加强该病的检测与预防显得十分重要。

本试验在实验室原有研究的基础上,选取了目前比较流行的 3 种病原检测方法对 MrNV 进行检测比较分析。胶体金检测技术已经被广泛用于医学、动植物病原和食品安全监督等领域^[10],环介导等温扩增技术自 2000 年开发以来,已被用于细菌、病毒、寄生虫和胚胎性别鉴定等检测^[11-18]。从试验结果可以看出,胶体金试纸条检测法速度快捷、操作方便,但灵敏度相对于 PCR 方法较低;RT-PCR 检测法作为比较经典的检测方法,灵敏度远高于胶体金检测法,但整个操作过程耗时比较长,比较繁琐;RT-LAMP 检测法相对于胶体金检测法而言,整个过程要长一些,全程大约要 45~60 min,但灵敏度上有显著优势,是 RT-PCR 的 100 倍左右。3 种方法相比较,各有优缺点。

在实际检测过程中,可以根据需要作适当选择,比如,针对已具有肌肉白浊特征的虾样,完全可以用胶体金检测法进行病原诊断;对一些抽检样品,时间和空间上允许的话,可以采用 RT-PCR 法;从操作简便、快捷且灵敏度高的角度出发,RT-LAMP 是三者中最好的选择,特别是近年来 RT-LAMP 反应产物检测方法的不断发展,由最初的比浊法到现在的比色法,减少了琼脂糖电泳的过程,而且检测结果的灵敏度也近似,这大大节约了时间,降低了成本。因此,相对而言,RT-LAMP 方法在水生病原检测工作中更具有应用前景,特别是反应产物检测方法的发展,LAMP 技术得到进一步完善,更有利于相关检测试剂盒的开发和应用。

参考文献:

[1] 钱冬,杨国梁,刘问,等. 罗氏沼虾肌肉白浊病病原的初步

研究[J]. 水生生物学报,2002,26(5):472-476.

- [2] Sri Widada J, Durand S, Cambournac I, et al. Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR[J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26(10):583-590.
- [3] 钱冬,刘问,潘晓艺,等. 罗氏沼虾诺达病毒 TAS-ELISA 检测法的建立及应用研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 2006,32(4):377-382.
- [4] Sri Widada J, Richard V, Shi Zhengli, et al. Dot-blot hybridization and RT-PCR detection of extra small virus (XSV) associated with white tail disease of prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004,58(1):83-87.
- [5] Romestand B, Bonami J R. A sandwich enzyme linked immunosorbent assay(S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)[J]. Journal of Fish Diseases, 2003,26(2):71-75.
- [6] 曾地刚,雷爱莹. 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测罗氏沼虾诺达病毒[J]. 广西农业科学,2006,37(6):735-737.
- [7] Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification[J]. Japanese Journal of Clinical Medicine, 2007,65(5):957-961.
- [8] 刘问,钱冬,吴建翔,等. 罗氏沼虾诺达病毒单克隆抗体的制备及应用[J]. 水产学报,2005,29(4):529-533.
- [9] Sahul H A S, Yoganandhan K, Sri Widada J, et al. Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus(MrNV) and its associated extra small virus(XSV)[J]. Dis Aquat Org, 2004,62(3):191-196.
- [10] 方莹. 免疫胶体金技术及其在微生物检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(11):1399-1401.
- [11] Aoi Y, Hosogai M, Tsuneda S. Real-time quantitative LAMP(loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria[J]. Journal of Biotechnology, 2006,125(4):484-491.
- [12] 张毅,王爱华,王贵春. EMA-LAMP 方法快速检测食源性副溶血弧菌活细胞[J]. 江苏农业科学,2012,40(10):290-292.
- [13] Cai T, Lou G Q, Yang J, et al. Development and evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification for hepatitis B virus DNA quantification; a new tool for HBV management[J]. Journal of Clinical Virology, 2008,41(4):270-276.
- [14] 张毅,胡定金,付云洁,等. PMA-LAMP 法对克氏螯虾样品中沙门氏菌的快速检测[J]. 湖北农业科学,2013,52(23):5854-5857.
- [15] Ikadai H, Tanaka H, Shibahara N, et al. Molecular evidence of infections with *Babesia gibsoni* parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004,42(6):2465-2469.
- [16] 刘宇卓,韩凯凯,李银,等. 鸡传染性支气管炎病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 江苏农业学报,2013,29(4):818-821.
- [17] Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, et al. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification[J]. Theriogenology, 2004,62(5):887-896.
- [18] 张雪寒,何孔旺,叶青,等. 快速检测志贺毒素 2 基因的 LAMP 方法的建立[J]. 江苏农业学报,2013,29(2):455-457.