

王芳,康超,李永霞,等.大鲵虹彩病毒套式 PCR 诊断方法的建立及应用[J].江苏农业科学,2016,44(8):291-293.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.084

大鲵虹彩病毒套式 PCR 诊断方法的建立及应用

王芳¹,康超¹,李永霞¹,余波²,周思旋²

(1. 贵州省生物研究所,贵州贵阳 550009; 2. 贵州省畜牧兽医研究所,贵州贵阳 550005)

摘要:根据 GenBank 中大鲵虹彩病毒主要衣壳蛋白 MCP 基因序列,设计 2 对特异性的引物,通过对第 1 步和第 2 步 PCR 反应条件进行优化,建立大鲵虹彩病毒主要衣壳蛋白套式 PCR 诊断方法。结果表明,该方法重复性好,第 1 次 PCR 扩增敏感性达 10 pg/mL,第 2 次 PCR 敏感性是 1 fg/mL,对锦鲤疱疹病毒、斑点叉尾鲷病毒、嗜水气单胞菌、柠檬酸杆菌、黄杆菌 DNA 扩增结果均为阴性。表明建立的套式 PCR 方法适合于大鲵虹彩病毒临床样品的快速诊断。

关键词:大鲵虹彩病毒;套式 PCR;临床样品

中图分类号: S852.65⁺9.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0291-03

近年来,大鲵人工养殖发展迅速,工厂化水平较高,苗种之间流通比较多,加之今年大鲵价格下降,养殖户大量采购苗种,忽视引种检疫,造成疾病大量暴发。其中,大鲵虹彩暴发最为严重,在陕西、四川、贵州等地报道较多,该病毒可引起大鲵大面积死亡^[1-3]。目前,大鲵虹彩病毒的疫苗还处于研究阶段,市面上还没有商品化的疫苗^[4-6]。因此,对大鲵虹彩病

毒病的早期诊断及防治尤为重要。本研究根据 GenBank 中大鲵虹彩病毒主要衣壳蛋白 MCP 基因序列,设计 2 对特异性的引物,根据 PCR 反应条件优化,建立大鲵虹彩病毒主要衣壳蛋白套式 PCR 诊断方法,以期临床样品的快速诊断、防治大鲵虹彩病毒病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

毒株、菌株和细胞:大鲵虹彩病毒、锦鲤疱疹病毒、斑点叉尾鲷病毒、嗜水气单胞菌、柠檬酸杆菌、黄杆菌均由贵州重大疫病监测防治重点实验室保存。鲤上皮瘤细胞购自上海拜力生物科技有限公司。

主要试剂:MIX PCR 酶、核酸染料、1×TAE 电泳缓冲液、DL2000 购自北京天根生物科技有限公司。细菌基因组 DNA

收稿日期:2016-02-29

基金项目:贵州省科学技术基金项目(编号:黔科合 J 字[2014]2115 号);贵州省科技厅农业攻关项目(编号:黔科合 NZ 字[2012]3023 号);2014 年省级财政渔业发展(大鲵产业)专项资金。

作者简介:王芳(1983—),女,贵州贵阳人,硕士,助理研究员,主要从事应用生物技术研究。E-mail:59825927@qq.com。

通信作者:余波,硕士,副研究员,主要从事预防兽医研究。E-mail:yubonky@163.com。

经草炭层积处理后需 28 d 左右开始生根,35 d 后生根率达到 74.0%,比 CK 草炭层积种子提前 9 d 生根,且 CK 57 d 后生根率仅 15.0%;500 mg/L GA₃ 浸泡 48 h 处理并经湿沙层积处理后需 28 d 左右开始生根,39 d 后生根率达到 46.0%,比 CK 湿沙层积种子提前 15 d 生根,且 CK 68 d 后发根率仅 10.0%。可推测在紫斑牡丹种子萌发生根过程中,内部发生一系列生理生化变化,大分子物质要降解为易被胚吸收的物质,为萌发生根提供营养,而用 GA₃ 浸泡处理后,可促进这一代谢过程。GA₃ 可激发异柠檬酸裂解酶活性,促使胚中脂类物质裂解为可溶性糖,同时也可促进蛋白酶的活性,使贮藏蛋白水解,从而为胚提供充足的营养物质,解除种子休眠,促胚生根。因而 GA₃ 浸泡处理可打破紫斑牡丹种子上胚轴的休眠。

在解除上胚轴休眠研究中,用 300 mg/L GA₃ 浸泡 1 h 后 25℃ 湿沙层积处理根长为 3 cm 以上(包括 3 cm)的紫斑牡丹种子效果最好,13 d 后第 1 粒种子发芽,32 d 后发芽率达到 93.1%。而关于紫斑牡丹上胚轴休眠的机制有待于进一步研究。为提高紫斑牡丹生产育苗的产量,建议用 500 mg/L GA₃ 浸泡 48 h 并于 25℃ 恒温条件下椰糠层积进行催根处理,并

于种子根长≥3 cm 后用 300 mg/L 赤霉素浸泡 1 h 后于 25℃ 恒温条件下湿沙层积进行催芽处理,可使种子生根速度加快和出苗率提高,从播种到发芽仅需 97 d 左右,与播种于自然条件下的种子相比显著缩短了出苗时间。

因紫斑牡丹油用价值的发现和推广,目前国内对油用牡丹方面的研究有所增加,但主要集中于油用牡丹栽培技术方面的研究,而对油用牡丹种子发芽特性方面的研究报道甚少。本研究对紫斑牡丹种子萌发试验进行了系统研究,虽可对生产育种提供一定的技术支撑,但针对紫斑牡丹种子休眠机制和育苗方法有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 成仿云,李嘉钰,陈德忠,等.中国紫斑牡丹[M].北京:中国林业出版社,2005:1-52.
- [2] 李育材.牡丹籽油,一种有益健康的高端食用油[N].中国绿色时报,2013-03-07(02).
- [3] 倪圣武,王莲英.紫牡丹种子特性及其发芽试验初探[C].中国园艺学会观赏园艺专业委员会学术年会,2008:189-192.
- [4] 刘秀贤,张艳丽,马宏,等.滇牡丹种子休眠解除效应研究[J].种子,2013,32(2):9-12.

提取试剂盒,病毒基因组 DNA 提取试剂盒,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中大鲈虹彩病毒主要衣壳蛋白 MCP 基因序列,设计 2 对引物。

F1:5′-ATGGACGCCTGGAGCGAGTACAC-3′;F2:5′-GAGTAGTACTCGACTCCCATGT-3′。

R1:5′-ACTATAACATGATAGGCAACACC-3′;R2:5′-GTAGACGTTGGCCTCGACGGTGT-3′。

1.2.2 病毒和细菌核酸的提取 (1)病毒细菌核酸。将大鲈虹彩病毒液接种于鲤上皮瘤细胞,待细胞出现病变后收集细胞毒液,将其放入-70℃冰箱反复冻融3次,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液 200 μL 用病毒基因组 DNA 试剂盒提取基因组。(2)细菌核酸。细菌核酸 DNA 提取参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行。(3)组织样品。取患病大鲈肝脏组织约 1.0 g,加入 0.1 mol/L PBS 缓冲液 2 mL 进行研磨,然后置于-70℃反复冻融3次,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液 490 μL 加入 10% SDS 5 μL,蛋白酶 K 5 μL (20 mg/mL),55℃孵育 30 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液 200 μL 用病毒基因组 DNA 试剂盒提取基因组。

1.2.3 套式 PCR 扩增条件优化 对套式 PCR 的退火温度(50、55、60℃)和引物浓度(5、10、20 μmol/L)进行优化。第 1 次和第 2 次 PCR 反应体系和反应程序相同:在 25 μL 体系中加上下游引物各 1 μL(5、10、20 μmol/L)、MIX PCR 酶 12.5 μL、模板 2 μL,ddH₂O 加至 25 μL。反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,50℃(55℃、60℃)1 min,72℃ 1 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。取 10 μL PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳。

1.2.4 敏感性试验 将提取的病毒和细菌核酸用核酸蛋白仪检测后,进行 10 倍稀释用于套式 PCR 反应。从每个稀释度中取 2 μL 作为模板进行第 1 次 PCR 扩增,如第 1 次 PCR 扩增为阴性,再将第 1 次 PCR 产物取出 2 μL 作为模板,进行第 2 次 PCR 扩增,以确定建立的套式 PCR 敏感性。

1.2.5 特异性试验 以大鲈虹彩病毒、锦鲤疱疹病毒、斑点叉尾鲷病毒、嗜水气单胞菌、柠檬酸杆菌、黄杆菌 DNA 为模板分别进行第 1 次和第 2 次 PCR 反应,以确定建立的套式 PCR 特异性。

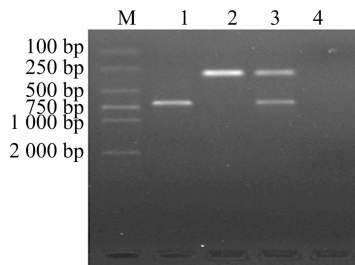
1.2.6 建立的套式 PCR 对临床样品的检测 应用建立的套式 PCR 对贵州省 20 个大鲈养殖场采集的 46 份大鲈肝脏(其中,21 份为有临床症状的病鲈,25 份为无临床症状但感染虹彩病毒的养殖场采集的样品),44 份大鲈饵料鱼病料,20 份大鲈养殖场水样(其中 9 个养殖场以前发生过虹彩病毒),20 份引种的鲈苗进行检测,同时参照 Mao 等建立的普通 PCR 方法^[7]进行对比。

2 结果与分析

2.1 套式 PCR 反应条件优化

25 μL 反应体系中最佳反应条件为退火温度 55℃,引物浓度 10 μmol/L,第 1 次和第 2 次 PCR 能有效扩增出目的片段,分别为 700、300 bp,引物间无非特异性片段产生(图 1)。序列送生工生物工程(上海)有限公司测序,结果与 GenBank

中大鲈虹彩病毒 MCP 基因相似性为 99.9%。

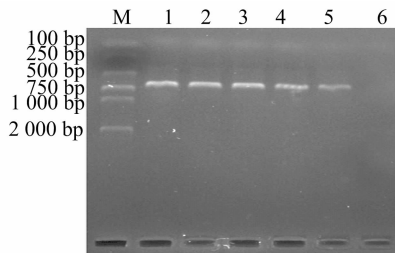


M—DL2000; 1—第 1 步 PCR 产物; 2—第 2 步 PCR 产物; 3—第 1 步和第 2 步 PCR 产物; 4—阴性对照

图1 CGSV 套式PCR电泳图

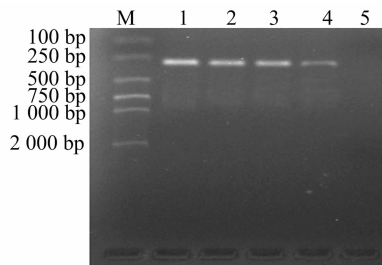
2.2 敏感性试验

大鲈虹彩病毒 DNA 经蛋白质核酸仪测定浓度为 1 μg/mL,经 10 倍稀释的病毒核酸进行套式 PCR,以检测方法的敏感性。结果(图 2)表明,第 1 次 PCR 扩增产物大小约 700 bp,大鲈虹彩病毒 DNA 最低检测量为 10 pg/mL。在第 1 次 PCR 扩增未见 DNA 亮带,取第 1 次 PCR 产物 2 μL 进行第 2 次 PCR 扩增,扩增产物大小约 300 bp。第 2 次 PCR 敏感性为 1 fg/mL(图 3)。



M—DL2000; 1~6—1 μg/mL×10⁻¹~10⁻⁶ 稀释的病毒DNA PCR结果

图2 第 1 次 PCR 扩增的敏感性试验



M—DL2000; 1~5—1 μg/mL×10⁻⁶~10⁻¹⁰ 稀释的病毒 DNA PCR 结果

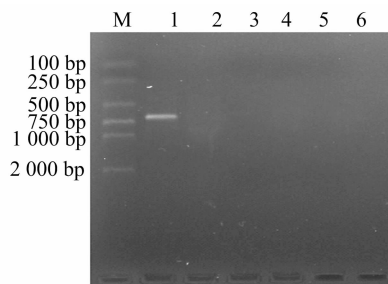
图3 第 2 次 PCR 扩增的敏感性试验

2.3 特异性试验

以大鲈虹彩病毒、锦鲤疱疹病毒、斑点叉尾鲷病毒、嗜水气单胞菌、柠檬酸杆菌、黄杆菌 DNA 为模板用 2 对引物进行 PCR 反应。结果(图 3、图 4)显示,大鲈虹彩病毒 DNA 第 1 次和第 2 次扩增均为阳性,而锦鲤疱疹病毒、斑点叉尾鲷病毒、嗜水气单胞菌、柠檬酸杆菌、黄杆菌 DNA 第 1 次和第 2 次扩增均为阴性。

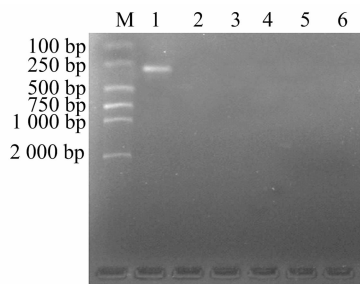
2.4 建立的套式 PCR 对临床样品的检测

应用建立的套式 PCR 检测 46 份大鲈肝脏样品阳性率为 36.9% (17/46),普通 PCR 方法阳性率为 19.5% (9/46)。套式 PCR 检测 44 份大鲈饵料鱼病料阳性率为 0%,普通 PCR



M—DL2000; 1—大鲈虹彩病毒 PCR 产物; 2—锦鲤疱疹病毒 PCR 产物; 3—斑点叉尾鲷病毒 PCR 产物; 4—嗜水气单胞菌 PCR 产物; 5—柠檬酸杆菌 PCR 产物; 6—黄杆菌 PCR 产物

图4 第 1 次 PCR 扩增的特异性试验



M—DL2000; 1—大鲈虹彩病毒 PCR 产物; 2—锦鲤疱疹病毒 PCR 产物; 3—斑点叉尾鲷病毒 PCR 产物; 4—嗜水气单胞菌 PCR 产物; 5—柠檬酸杆菌 PCR 产物; 6—黄杆菌 PCR 产物

图5 第 2 次 PCR 扩增的特异性试验

方法阳性率为 0%。套式 PCR 检测 20 份大鲈养殖场水样阳性率为 10% (2/20), 普通 PCR 方法阳性率为 0%。套式 PCR 检测 20 份引种的鲈苗阳性率为 20% (4/20), 普通 PCR 方法阳性率为 15% (3/20)。

46 份大鲈肝脏样品中 21 份为有临床症状的病鲈套式 PCR 检测阳性率为 42.8% (9/21), 普通 PCR 方法阳性率为 42.8% (9/21)。25 份为无临床症状但感染过虹彩病毒的养殖场采集的样品阳性率为 32% (8/25), 普通 PCR 方法阳性率为 4.7% (1/21)。9 个养殖场以前发生过虹彩病毒水样阳性率 22.2% (2/9), 普通 PCR 方法阳性率为 0%。

3 讨论

近 2 年,随着大鲈市场的走低,养殖户对大鲈疫病防控的重视度下降。大鲈虹彩病毒是目前养殖大鲈最大的威胁,感染虹彩病毒可导致养殖场出现大规模大鲈死亡,而虹彩病毒的暴发多是引种所致。因此,建立快速简便经济适用的引种检疫方法对大鲈虹彩病毒病的防治尤为重要。

目前,研究者主要依据大鲈虹彩病毒主要衣壳蛋白设计引物建立快速的诊断方法。周勇等根据大鲈虹彩病毒主要衣壳蛋白设计引物,建立大鲈虹彩病毒 *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 检测方法,敏感性约 1.1×10^{-3} pg/ μ L 病毒核酸,较之常规 PCR 的敏感度高出约 1 000 倍^[8]。李惠芳等依据虹彩病毒蛙病毒属主衣壳蛋白基因,建立虹彩病毒蛙病毒属病毒实时

荧光 PCR 检测方法,该方法对虹彩病毒蛙病毒属成员(新加坡石斑鱼虹彩病毒除外)的检测有高度的特异性,敏感性达到 4.5×10^{-3} pg/ μ L,比传统 PCR 的敏感度高出 100 倍^[9]。这些荧光定量 PCR 检测方法对人员和设备的要求较高,在基层水产技术推广站推广多只配备了普通 PCR 仪器,该方法推广较难。刘星星等据大鲈蛙病毒主要核衣壳蛋白 MCP 设计合成 4 条特异性引物建立环介导等温扩增检测方法,最低检测限为 5 copies/ μ L,而巢氏 PCR 和常规 PCR 的检测限为 50 copies/ μ L 和 5×10^3 copies/ μ L,该 LAMP 方法检测时间较快,但成本较高^[10]。

套式 PCR 成本较低,敏感性较普通 PCR 高 100 倍左右,敏感性略低于荧光定量 PCR,适合基层水产技术推广站推广应用。贾坤同等依据大菱鲈红体病虹彩病毒的腺苷三磷酸酶基因序列,设计了特异性的引物,建立了一种检测大菱鲈红体病虹彩病毒的套式 PCR 方法,该方法比普通 PCR 敏感性 100 倍^[11]。本研究建立的诊断方法敏感性达到 1 fg/mL,比普通 PCR 敏感性 1 000 倍。对感染过虹彩病毒的养殖场进行大鲈样品和养殖用水样品检测发现该养殖场还存在阳性样本,说明该养殖场可能还存在隐性感染。因此,建立的诊断方法可应用于大鲈虹彩病毒引种检疫和隐性感染检测,有利于大鲈养殖场虹彩病毒的净化。

参考文献:

- [1] 耿毅,汪开毓,李成伟,等. 蛙病毒感染致养殖大鲈大规模死亡的电镜观察及 PCR 检测[J]. 中国兽医科学,2010,40(8):817-821.
- [2] 余波,王芳,杨莉,等. 一例人工养殖大鲈感染虹彩病毒和嗜水气单胞菌的诊治[J]. 广东农业科学,2013,40(12):134-135.
- [3] 周小愿,张星朗,吉红,等. 大鲈虹彩病毒的形态结构及其包涵体特征[J]. 淡水渔业,2015(1):62-66.
- [4] 孙建滨,曾令兵,张辉,等. 大鲈虹彩病毒 β -丙内酯灭活方法的研究[J]. 淡水渔业,2013(3):66-71.
- [5] 周小愿,张星朗,韩亚慧,等. 大鲈虹彩病毒转瓶规模化培养条件研究[J]. 山地农业生物学报,2015(1):32-35.
- [6] 曾宪辉,曾令兵,周勇,等. 大鲈虹彩病毒主衣壳蛋白 MCP 基因 DNA 疫苗的构建及其免疫效果[J]. 中国水产科学,2015,22(5):1055-1067.
- [7] Mao J, Hedrick R P, Chinchar V G. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses[J]. Virology, 1997, 229(1):212-220.
- [8] 周勇,曾令兵,孟彦,等. 大鲈虹彩病毒 *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 水产学报,2012,36(5):772-778.
- [9] 李惠芳,吕建强,岳志芹,等. 虹彩病毒蛙病毒属病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 华中农业大学学报,2008,37(2):172-176.
- [10] 刘星星,耿毅,汪开毓,等. 大鲈蛙病毒 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学,2015,35(4):558-564.
- [11] 贾坤同,梁玉波,宋晓玲,等. 海水养殖鱼类中虹彩病毒无症状感染的套式 PCR 分析[J]. 中国水产科学,2009,16(5):758-764.