

大口黑鲈溃疡综合征病毒 *TaqMan*-MGB 探针 荧光定量 PCR 检测方法的建立

马冬梅, 白俊杰, 邓国成, 李胜杰, 张莉莉

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380)

摘要:根据大口黑鲈溃疡综合征病毒(Largemouth bass ulcerative syndrome virus, LBUSV)的甲基转移酶(MTase)基因核苷酸序列设计引物及 *TaqMan*-MGB 探针, 优化荧光定量 PCR 反应条件和反应体系, 建立了 LBUSV 的 *TaqMan*-MGB 探针荧光定量 PCR 检测方法. 用含有 MTase 基因的质粒 pDNA-MT 系列稀释作为标准品模板, 在荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应, 绘制标准曲线, 斜率为 -3.24 , $R^2 = 0.999$, 呈现很好的线性关系, 扩增效率 1.04 . 灵敏度检测结果表明, PCR 反应 24 个循环时可以检测到的质粒最小浓度是 10^2 拷贝数/ μL . 选用 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 拷贝数/ μL 4 个浓度梯度质粒做模板, 变异系数在 $1.1\% \sim 3.4\%$ 范围内, 说明该方法具有良好的重复性和稳定性. 利用该方法可以准确地检测出感染 LBUSV 的病鱼, 特异性强.

关键词:大口黑鲈溃疡综合征病毒; *TaqMan*-MGB 探针; 定量 PCR; 病毒检测

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)02-0099-04

Development of a *TaqMan*-MGB Real Time PCR Assay for Largemouth Bass Ulcerative Syndrome Virus Detection

MA Dong-mei, BAI Jun-jie, DENG Guo-cheng, LI Sheng-jie, ZHANG Li-li

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Based on the nucleic sequence of DNA methyltransferase (MTase) gene from largemouth bass ulcerative syndrome virus (LBUSV), primers and *TaqMan*-MGB probe were designed and synthesized to use for the detection of virus by real time PCR. After optimizing PCR annealing temperature and probe concentration, the fluorescence quantitative real time PCR method for LBUSV detection was developed. Series dilution of linear plasmid pDNA-MT as standard templates, PCR was performed on ABI 7300 PCR System. The standard curve was drawn, and the slope was -3.24 ($R^2 = 0.999$), with a good linearity. The amplification efficiency of PCR reaction was calculated as 1.04 . Sensitive assay showed that the method could detect 10^2 copies/ μL plasmid templates within 24 PCR cycles. It is good repeatability and stability that the variation coefficient of the PCR ranged $1.1\% \sim 3.4\%$, for 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 copies/ μL plasmid as PCR templates. The method showed good specialty and detected naturally LBUSV-infected largemouth bass, with precision.

Key words: largemouth bass ulcerative syndrome virus; *TaqMan*-MGB probe; real time PCR; virus detection

收稿日期: 2010-07-25

作者简介: 马冬梅(1978—), 女, 博士, 助理研究员; 通信作者: 白俊杰(1957—), 男, 研究员, E-mail: baijj2005@21cn.com

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD01A1209); 广东省科技计划项目(2007B020708008); 农业部公益性行业科研专项(200903045)

大口黑鲈溃疡综合征病毒(Largemouth bass ulcerative syndrome virus, LBUSV)为虹彩病毒科蛙病毒属的一种,是具有二十面体结构的DNA病毒。2006年以来由该病毒引起的溃疡综合征在广东省大口黑鲈养殖场频繁发生,感染该病毒的大口黑鲈皮肤和肌肉溃烂,脾脏和肾脏变大,病鱼死亡率高达60%,给大口黑鲈养殖业造成了严重的损失^[1]。2008年从病鱼体内成功分离得到LBUSV,并对LBUSV进行了初步的研究,其主要衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP)与DFV(Doctor fish virus)和LMBV(Largemouth bass virus)的主要衣壳蛋白氨基酸序列的相似性最高,分别为100%和98%,而与其他虹彩病毒MCP的氨基酸的相似性小于82%^[1-2]。目前该病毒病还没有有效的治疗方法,因此早期、快速、准确的诊断对该病的防治尤为重要。荧光定量PCR用于病毒检测具有操作简单、检测速度快、结果直观准确等优点,得到了越来越广泛的应用。DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNA MTase)是催化病毒基因组甲基化的活性蛋白,病毒基因组的甲基化对于DNA的包装过程非常重要,还可保护病毒DNA不受内切酶降解^[3-4]。本研究根据MTase基因特异序列设计引物和探针,建立了一种利用荧光定量PCR检测LBUSV的方法,以便用于大批量临床样品的快速诊断及对该病毒的流行病学调查研究。

1 材料与方法

1.1 试验动物

自然感染LBUSV的大口黑鲈是2008年采集的样品,5月龄,平均体长17 cm,平均体质量约为68 g,已经过电镜观察和检测,确定病原为LBUSV^[1]。自然感染传染性脾肾坏死病毒(Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)样病毒的大口黑鲈是2009年采集的样品,5月龄,平均体长18 cm,平均体质量76 g,病鱼经电镜观察,脾脏组织DNA PCR扩增、测序检测,确定感染的病毒与ISKNV具有很近的亲缘关系。健康大口黑鲈取自珠江水产研究所良种基地,4月龄,平均体长15 cm,平均体质量45 g。

1.2 引物和探针的设计与合成

根据LBUSV MTase基因编码区序列(GU256634)设计1对引物MTEF(5'-CGGAATTCAAAAATG-GCAAAAACGGTGTGGAC-3')和MTER(5'-CGC-CTCGAGTCAACAGTCTTGACATAAATT-3'),扩增片段大小683 bp,用于插入载体pcDNA3.1(Invitrogen公司),再以其中的一段特异序列设计引物MTSF(5'-TGCTGGAAGGCGCTAGAT-3')、MTSR(5'-

ATCTTTCATGCGCCCAGTCT-3')和探针MTP(5'-FAMTAGACTACCTCAAACCCAMGB-3'),预期扩增DNA片段86 bp,委托上海基康生物技术有限公司合成。

1.3 病毒DNA的提取

用天根(TIANGEN)离心柱型基因组DNA提取试剂盒提取感染LBUSV的EPC细胞、感染LBUSV的大口黑鲈脾脏、健康大口黑鲈脾脏及感染ISKNV样病毒大口黑鲈脾脏组织的总DNA。

1.4 PCR反应条件的优化

以50 ng病鱼脾脏组织DNA为模板,MTSF和MTSR为引物,分别以54、57、60、63和66℃作为退火温度在PCR仪(东胜创新EDC-810)上进行26个循环反应,选择合适的引物退火温度。在合适退火温度条件下,采用矩阵法优化引物和探针的最佳浓度。

1.5 阳性标准品的制备

以MTEF和MTER为引物,病毒基因组DNA为模板PCR扩增DNA MTase基因目的片段,将纯化后的目的片段用EcoRI和XhoI酶切,与经过相同酶切的pcDNA3.1载体16℃连接过夜,转化感受态细胞,筛选阳性克隆,按质粒小量提取试剂盒(TIANGEN)说明书提取重组质粒。用分光光度计检测重组质粒的 $D_{260\text{ nm}}$ 和 $D_{280\text{ nm}}$,计算出质粒的浓度和拷贝数,1个 $D_{260\text{ nm}}$ 相当于50 $\mu\text{g/mL}$ 双链DNA,拷贝数/ mL = 质量浓度(g/mL) $\times$ 阿伏加德罗常数(即 6.02×10^{23} 拷贝数/ mol)/1个碱基对的平均相对分子质量 $\times$ 碱基对数。

1.6 标准曲线的建立及灵敏度检测

将含有DNA MTase基因的质粒pcDNA-MT按 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 拷贝数/ μL 系列稀释,各取1 μL 作为模板,以MTSF和MTSR为引物,无质粒的水作阴性对照,按优化PCR条件,在荧光定量PCR仪上(ABI 7300)分别进行40个PCR循环扩增,每个浓度做2个重复,绘制标准曲线。按上述标准曲线的扩增结果,斜率用 S 表示,扩增效率(E)用公式 $E = 10^{1/-S} - 1$ 计算^[5]。

1.7 重复性和稳定性试验

选用 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 拷贝数/ μL 的标准品进行5次重复试验,通过对CT值进行统计学比较分析,计算它们的变异系数,用来评价该方法的重复性和稳定性。

1.8 特异性检测

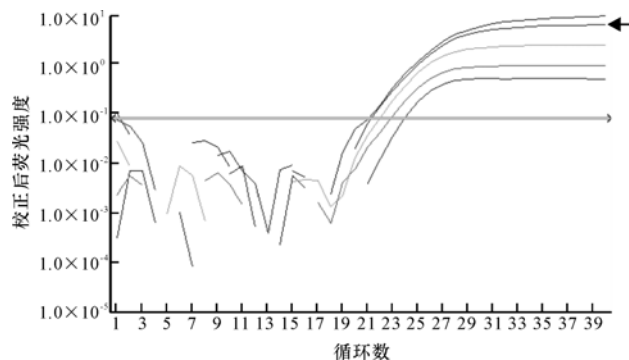
分别以健康大口黑鲈、感染ISKNV样病毒的大口黑鲈和感染LBUSV的大口黑鲈的脾脏组织DNA作为模板,进行PCR扩增以检测引物的特异性。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 检测方法的建立

经过 PCR 反应条件的优化,5 个退火温度下都有相似产量的、约 80 bp 的 PCR 产物,在退火温度为 54 和 57 °C,PCR 产物中有明显的引物二聚体,所以本方法拟采用 60 °C 为退火温度. 荧光定量 PCR 反应条件为:95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 1 min,40 个循环.

当上、下游引物终浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 探针终浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时能够获得较小的 CT 值和较大的 Delta Rn 平台期值,扩增曲线明显,既能节约试剂又可得到较好的扩增效果(图 1). 优化后的 20 μL PCR 反应体系为:2 $\times$ Premix Ex *Taq* (TaKaRa) 10 μL , 引物 MTSF 和 MTSR (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , *TaqMan*-MGB 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Rox 染料 0.4 μL , 待检测鱼脾脏组织模板 DNA 0.2 μg , 加水补足 20 μL 体积.



箭头所指为引物终浓度 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 探针终浓度 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时 PCR 扩增曲线.

图 1 PCR 反应引物和探针浓度优化

Fig. 1 Optimization of the concentrations of primer and probe in PCR

2.2 标准曲线的绘制

将重组质粒线性化酶切、纯化后,用分光光度计检测质粒的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.82,表明该线性化质粒纯度较好. 用该质粒制备标准品作模板,PCR 反应绘制标准曲线(图 2),该曲线具有良好的线性范围,每个梯度扩增曲线的指数期明显,重复性较好,标准曲线的斜率为 -3.24,相关系数为 0.999,相关性较好. PCR 反应的扩增效率为 1.04,具有良好的扩增效率.

2.3 重复性和稳定性检测

选用 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 拷贝数/ μL 的标准品进行 5 次重复试验,变异系数为 1.1% ~ 3.4%,试验具有较好的重复性和稳定性(表 1).

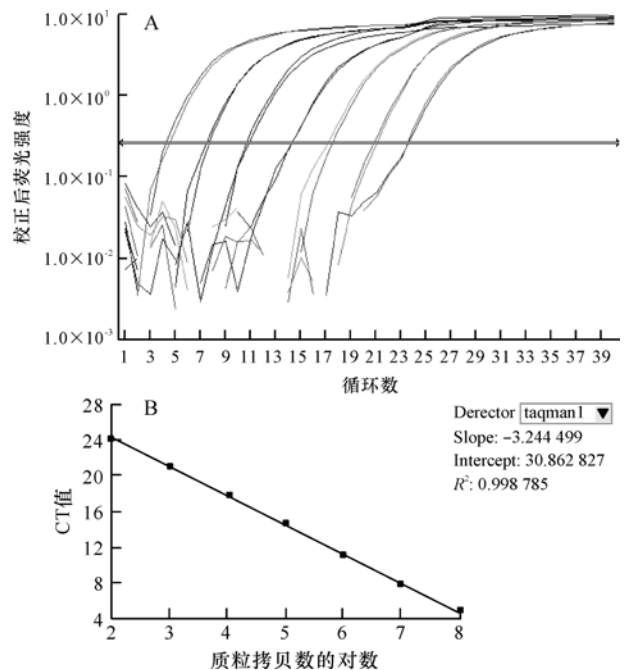


图 2 标准品的扩增曲线(A)和标准曲线(B)

Fig. 2 Amplification curve (A) and standard curve (B) of the standard samples

表 1 标准品 CT 值的变异系数

Tab. 1 The variation coefficient of the standard samples CT values

浓度/ (拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	5 次重复的 CT 值					变异 系数/%
	1	2	3	4	5	
1.0×10^7	7.516 1	7.356 6	7.372 5	7.362 1	7.610 8	1.5
1.0×10^6	10.894 2	10.924 2	10.565 8	10.669 5	10.661 1	1.5
1.0×10^5	13.719 4	14.005 4	14.003 7	14.050 1	14.119 1	1.1
1.0×10^4	16.863 2	17.158 7	17.284 1	17.205 8	18.384 5	3.4

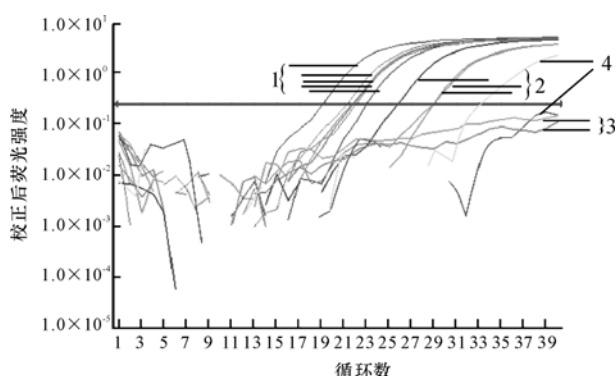
2.4 灵敏度检测

本检测方法非常灵敏,仅 24 个循环就可以检测到 100 个拷贝的样品. 本方法对待测样品的判断标准为:当待测样品的 CT 值小于或等于 24,判断为阳性,认为有病毒感染;当 CT 值在 24 和 28 之间需重新做 PCR 检测,若再次 PCR 检测结果的 CT 值小于或等于 24,判断为阳性,若大于 25,则判断为阴性;当待测样品的 CT 值大于或等于 28,判断为阴性.

2.5 特异性检测

特异性试验结果表明,只有感染 LBUSV 的鱼脾脏样品 PCR 检测呈阳性,而健康大口黑鲈、感染 ISKNV 样病毒的大口黑鲈脾脏组织 DNA 的扩增曲线为阴性(图 3),表明该方法特异性较好.

应用本方法已检测了 5 批次共 50 尾天然患病大口黑鲈样品,其中有 3 批次共 30 尾鱼检测到有 LBUSV,而另外 2 批共 20 尾鱼检测结果呈阴性,经进



1:感染大口黑鲈溃疡综合征病毒的大口黑鲈扩增曲线;2:感染传染性脾肾坏死病毒样病毒的大口黑鲈扩增曲线;3:健康大口黑鲈扩增曲线;4:以水为模板的空白对照扩增曲线。

图3 特异性试验

Fig. 3 Specificity assay

一步研究表明,这20尾病鱼感染了另一种 ISKNV 样病毒。为了加快对病鱼的检测进程,在本研究的基础上,进一步建立这两种病毒的二重定量 PCR 检测方法十分必要。

3 讨论

LBUSV 是2008年从患病大口黑鲈体内分离出的一种致病病毒,具有正二十面体结构,直径约为145.5 nm,分析主要衣壳蛋白基因(MCP)序列发现,它与已知的蛙病毒属的DFV亲缘关系最近,进而确定LBUSV的分类地位是虹彩病毒科蛙病毒属的一种病毒^[1,6]。为了对感染LBUSV的病鱼进行早期诊断,建立一个快速有效的检测方法,我们选择了TaqMan-MGB探针法。

TaqMan 探针实时定量 PCR 检测方法传统的 PCR 方法相比具有快速、特异、精确、灵敏等优点,被广泛应用于生物检测、分子生物学研究和遗传学分析。TaqMan-MGB 探针是在 TaqMan 探针基础上发展起来的,其3'端的 Quencher 基团为不发光的荧光基团,并且与 Report 基团在空间的位置更接近,使杂交的稳定性大大提高,试验的结果更为精确,分辨率更高^[7-8]。

本研究根据 LBUSV 的 DNA 甲基转移酶基因序列设计引物和探针,建立了检测 LBUSV 的荧光定量 PCR 方法,10² 拷贝/μL 的标准品质粒的 CT 值约为24,也就是说仅24个循环就可以检测到100个拷贝的标准品质粒,而许多研究表明要30个循环以上才

可以检测到100个拷贝的标准品质粒^[9-11],以LBUSV的MCP基因为靶基因建立了普通PCR检测方法,也是需要30个PCR循环反应才能检测到100个拷贝的标准品质粒^[6],说明该方法的灵敏度很高,更加适合快速检测病毒的含量。

参考文献:

- [1] 邓国成,谢骏,李胜杰,等.大口黑鲈病毒性溃疡病的病原分离和鉴定初步研究[J].水产学报,2009,33(5):871-877.
- [2] MAO Jing-he, WANG Jun, CHINCHAR G D, et al. Molecular characterization of a ranavirus isolated from large-mouth bass *Micropterus salmoides* [J]. Dis Aquat Organ, 1999, 37(2), 107-114.
- [3] GOORHA R, GRANOFF A, WILLIS D B, et al. The role of DNA methylation in virus replication: Inhibition of FV3 replication by 5-azacytidine [J]. Virol, 1984, 138: 94-102.
- [4] KAUR K, ROHOZINSKI J, GOORHA R. Identification and characterization of the frog virus 3 DNA methyltransferase gene [J]. J Gen Virol, 1995, 76: 1937-1943.
- [5] GETCHELL R G, GROOCKOCK G H, SCHUMACHER V L, et al. Quantitative polymerase chain reaction assay for largemouth bass virus [J]. J Aquat Anim Health, 2007, 19: 226-233.
- [6] 马冬梅,白俊杰,邓国成,等.大口黑鲈溃疡综合征病毒MCP基因序列分析及PCR快速检测方法的建立[J].中国水产科学,2010,17(6):1149-1156.
- [7] 张振冬,邹亚男,王淑芬,等. Real Time PCR 研究进展及其在海洋病原生物检测中的应用[J].海洋环境科学,2008,27(增刊2):145-150.
- [8] 任广陆,刘季,王英元.实时荧光定量PCR技术应用于核酸定量检测的研究进展及展望[J].山西医科大学学报,2006,37(9):973-976.
- [9] 高建忠,魏雪,童琰,等. MGB 探针实时定量 PCR 检测致病性嗜水气单胞菌 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(19): 8911-8913.
- [10] 谭翰清,郭赐颢,谭海芳,等. 诺如病毒遗传组 I 型 TaqMan-MGB 探针实时荧光 RT-PCR 的研究 [J]. 热带医学杂志, 2008, 8(10): 1030-1033.
- [11] 赵海玲,刘慧芳,杜艳芬,等. 胎儿弯杆菌病 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(11): 874-877.

【责任编辑 柴 焰】