

用生物素标记寡核苷酸 DNA 探针快速 检测鱼传染性胰脏坏死病病毒 IPNV

周建玲 童裳亮

(青岛海洋大学, 266003)

官云浩

(农业部动物检疫所, 青岛 266032)

摘要 研究了用生物素标记的寡核苷酸 DNA 探针快速检测鱼传染性胰脏坏死病病毒 IPNV, 取得了较好的结果。对探针的灵敏度、特异性进行了测定, 并与其它快速检测技术作了比较。

关键词 寡核苷酸 DNA 探针, 快速检测, 传染性胰脏坏死病病毒

鱼类传染性胰脏坏死病(IPN)是严重的病毒性传染病。它主要危害鲑科鱼类的仔鱼和稚鱼, 死亡率可达90%以上[Hetrick, 1994], 因此它是各国进出口鱼的检疫对象。近几年来, 我国从美、日等国引进虹鳟鱼养殖, 取得了很好的经济效益。但是因缺乏检疫技术, 使此病带进我国, 并已在山东[童裳亮等, 1989, 1990]、山西[Jiang 等, 1987]、黑龙江[牛鲁祺等, 1988]等省流行, 造成严重的经济损失。其病原体为鱼传染性胰脏坏死病病毒(IPNV), 属双股RNA病毒科(*Birnaviridae*), 直径约60nm。目前对此病无特殊防治方法。在放养前从鱼卵或鱼苗中检出此病毒, 彻底销毁带毒鱼卵或鱼苗是唯一有效的控制方法。迄今, 流行的检测方法是用细胞培养法分离此病毒, 然后用血清学方法进行鉴定。此法的缺点是检测速度慢, 通常需2周才能看出结果。近几年来正在研究的快速诊断方法是免疫诊断技术, 如协同凝集试验[Kimura 等, 1984], 补体结合试验[Finlay 等, 1975], 荧光抗体试验[MacDonald, 1980; Nicholson 等, 1978; Swanson 等, 1981]和酶联免疫吸附技术[Chen 等, 1985; Nicholson 等, 1982; Rodak 等, 1988; 江育林等, 1990]。

核酸探针是继免疫学诊断技术之后发展起来的新技术。国外曾研究用³²P 标记的寡核苷酸 DNA 探针[Rimstad 等, 1990]和多核苷酸 cDNA 探针[Dopazo 等, 1994] 来快速检测 IPNV。但放射性同位素标记的探针不稳定, 对人体有危害, 需特殊的实验室条件和污物处理技术等原因, 在我国较难推广。笔者旨在用生物素标记的寡核苷酸 DNA 探针来快速检测 IPNV, 取得较好的结果。

1 材料与方法

1.1 探针制备与最低显色浓度

探针是以病毒 RNA 长片断 A 中第 1914 至 1938 碱基对之间的一个 24bp 特异性序列为模板,人工合成的 DNA 片段。其序列为 GAAGGAGATGACATGTGTCTACACC[Rimstad 等,1990]。用 3' 末端酶促法标记生物素。标记好的探针按 10 倍梯度稀释。将每一稀释度的探针溶液 1 μ l 点在硝酸纤维素或尼龙膜上。晾干后,前者在 80 $^{\circ}$ C 烤 2 小时;后者用 15W 紫外光灯照射 15 分。将膜放在杂交袋内进行显色反应[Habili 等,1987]。出现蓝色斑点的最高稀释度为探针的最低显色浓度。

1.2 病毒样品的制备

所用的 IPNV 是 1988 年从山东省虹鳟鱼育苗场分离。经用血清学方法鉴定,已确认该病毒为鱼传染性胰脏坏死病病毒 VR299 毒株[童裳亮等,1990]。此病毒用鱼细胞系 CHSE-214 在 15 $^{\circ}$ C 繁殖。检测前,在病毒悬液中加入 1% SDS,0.2mg/ml 蛋白酶 K,37 $^{\circ}$ C 下消化病毒壳蛋白 1 小时。然后用酚、氯仿、异戊已醇混合液(25:25:1)粗提病毒 RNA。无水乙醇沉淀的 RNA 再用 13000rpm 离心分离。在真空干燥机中干燥备用。

检测病鱼体内的 IPNV 时,取濒死前仔鱼的全部内脏,称重后匀浆,按上法制备病毒 RNA 样品。

为了确定探针的特异性,采用与 IPNV 同科的传染性法氏囊炎病毒(IBDV)和呼肠孤病毒科的蓝舌病病毒(BTV)同时进行检测和比较。

1.3 分子杂交

将含有不同滴度或不同种病毒的样品膜置于杂交袋内,按 Habili[1987]的方法与 DNA 探针杂交和显色。

2 结果与讨论

2.1 探针的最低显色浓度

不同浓度探针的显色情况如表 1 所示。表中“+”表示阳性。有肉眼可见的蓝紫色斑点。“++”为强阳性,斑点颜色较深。“-”为阴性,无颜色变化。由表可见,探针浓度低至 1ng/ μ l 时仍能显色。此为探针的最低显色浓度。在检测病毒时,以出现强阳性反应的 100ng/ μ l 作为探针的工作浓度。

表 1 探针的浓度与显色反应之关系

Table 1 Relationship between probe concentration and colour development

探针浓度(ng/ μ l)	1000	100	10	1	0.1
显色反应	++	++	++	+	-

膜的质地对显色清晰度有影响。硝酸纤维素膜的斑点较清晰。尼龙膜的本底较深,斑点的对比度较小。但硝酸纤维素膜在点样后需 2 小时的烤膜时间,而尼龙膜只需用紫外线照射 15 分钟。

2.2 探针检测病毒的灵敏度

用 100ng/ μ l(工作浓度)的探针与不同滴度的 IPNV 杂交,结果如表 2 所示。表中“+”表示阳性,有肉眼可见的显色反应。“++”表示强阳性,显色较深。“-”表示阴性,无颜色变化。由表可见,用此探针能检测的最低病毒滴度为 $10^{4.2}$ TCID₅₀/0.1ml。

表 2 用探针检测不同滴度的 IPNV
Table 2 Probe titration for IPNV detection

病毒滴度(TCID ₅₀ /0.1ml)	5.2	4.2	3.2	2.2	1.2
显色反应	++	+	-	-	-

用此探针检测 IPNV 的灵敏度略低于免疫诊断技术。用酶联免疫吸附技术(ELISA)检测 IPNV 的灵敏度因研究者而异。最高的达到 10^2 TCID₅₀/0.1ml[Rodak 等,1988]。多数在 10^3 — 10^5 TCID₅₀/0.1ml 之间[江育林等,1990;Dixon 等,1983;Nicholson 等,1982;Hattori 等,1984],这说明核酸探针技术还有待改进。核酸探针的制备要比抗体(特别是单克隆抗体)的生产技术简单,成本也较低,这是它的优点。

2.3 探针的特异性

用此探针检测 IPNV—VR299、IBDV 和 BTV 的结果如表 3 所示。表中还列入 Rimstad [1990]³²P 标记的寡核苷酸 DNA 探针检测 IPNV 另外两个毒株(Ab,Sp)以及果蝇×-病毒的结果。“+”表示阳性;“-”表示阴性。由表可见,此探针不与 IPNV 同科的传染性法氏囊炎病毒(IBDV)和果蝇×-病毒以及呼肠弧病毒科的蓝舌病病毒(BTV)发生交叉反应,故有较强的种间特异性。但此探针不能鉴别 IPNV 中的不同血清型,如 VR299、Ab、Sp 等毒株[Rimstad 等,1990]。这是因为所用的探针 DNA 片段为不同血清型 IPNV 的共有序列。这固然是缺点,但用一种探针能检出所有血清型的 IPNV,无疑又为检测人员节省了时间和精力。迄今所知,所有血清型的 IPNV 都是致病的,都是检测对象。

表 3 探针对不同病毒的敏感性
Table 3 Sensitivity of the probe to different viruses

病毒种类	IPNV			IBDV	BTV	X-病毒*
	VR299	Ab*	Sp*			
显色反应	+	+	+	-	-	-

注: * 引自 Rimstad[1990]。

为了克服寡核苷酸 DNA 探针不能鉴别 IPNV 不同血清型的缺点,Dopazo 等[1994]分别以该病毒 RNA 的片段 A 和 B 为模板,合成 812 和 596 bp 的多核苷酸 cDNA 探针 WB₁ 和 A₄。这两种探针能鉴别 IPNV 的几种血清型,但灵敏度下降至 10^7 TCID₅₀/0.1ml。

2.4 用探针检测病鱼组织中 IPNV 的灵敏度

用此探针能测出病鱼内脏中 IPNV 的最小组织量为 0.1g(鲜重)。

Rimstad [1990]与 Dopazo[1994]等均指出,用非放射性物质来标记核酸探针将更为实用和易于推广。笔者首次作了这种尝试。从实验结果看,它确有成本低、方法简便、检测速度快、对人体无危害等优点。用放射性探针检测鱼病毒,需 2 天以上的放射自显影时间。而生物素标记的探针,检测工作可在 10 小时内完成。目前存在的主要问题是灵敏度较差。但这与标记物的关系不大[Habili 等,1987],主要靠杂交与显色技术的改进加以解决。

本文为国家自然科学基金(39370549)资助项目。

参 考 文 献

- [1] 牛鲁祺等,1988. 东北地区虹鳟鱼 IHN 和 IPN 流行病学的初步研究. 水产学报,12(4): 327—332.
- [2] 江育林等,1990. 用酶联免疫吸附试验快速检测虹鳟的传染性胰脏坏死病毒. 水生生物学报,14(3): 276—279.
- [3] 童裘亮等,1989. 山东虹鳟暴发传染性胰脏坏死病(IPN). 海洋通报,18(1): 116—117.
- [4] ——,1990. 虹鳟传染性胰脏坏死病的研究. 青岛海洋大学学报,20(1): 119—122.
- [5] Chen, S-N, *et al.*, 1985. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and eel virus european (EVE) in tissue cultures and infected fish. COA. Fisheries series, No. 4. *Fish Dis. Res.*, VII: 1—8.
- [6] Dixon, P. F. *et al.*, 1983. Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virology.*, 64: 321—330.
- [7] Dopazo, C. P. *et al.*, 1994. Use of cloned cDNA probes for diagnosis of infectious pancreatic necrosis virus infection. *J. Fish Dis.*, 17: 1—16.
- [8] Finlay, J. *et al.*, 1975. The use of the complement fixation test for the rapid typing of infectious pancreatic necrosis virus. *Aquac.*, 5: 305—310.
- [9] Habili, N. *et al.*, 1987. Nonradioactive photobiotin-labelled DNA probes for the routine diagnosis of barley yellow dwarf virus. *J. Virol. Meth.*, 16: 225—237.
- [10] Hattori, M. *et al.*, 1984. In vitro and in vivo detection of infectious pancreatic necrosis virus in fish by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Veteri. Res.*, 45: 1876—1879.
- [11] Hetrick, F. M., 1994. Viral diseases of fish and their relation to public health. CRC Press Inc. pp. 545—547.
- [12] Jiang, Y-L. *et al.*, 1987. Isolation of IPN virus from imported rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in the P. R. China. *J. Appl. Ichthyol.*, 3: 191—192.
- [13] Kimura, T. *et al.*, 1984. Rapid simple serological diagnosis of infectious pancreatic necrosis by a coagglutination test using antibody-sensitized staphylococci. *Fish Pathol.*, 19: 25—33.
- [14] MacDonald, R. D., 1980. Immunofluorescent detection of double stranded RNA in cells infected with reovirus, infectious pancreatic necrosis virus and infectious bursal disease virus. *Can. J. Microbio.*, 26: 256—261.
- [15] Nicholson, B. L. *et al.*, 1978. Rapid identification of the infectious pancreatic necrosis virus in the infected cell cultures by immunoperoxidase techniques. *J. Wildlife Dis.*, 14: 465—469.
- [16] ——, *et al.*, 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Clin. Micro.*, 16: 469—471.
- [17] Rimstad, E. *et al.*, 1990. Detection of infectious pancreatic necrosis virus RNA by hybridization with an oligonucleotide DNA probe. *Veteri. Microbiol.*, 23: 211—219.
- [18] Rodak, L. *et al.*, 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of infectious pancreatic necrosis virus in culture fluids and tissue homogenates of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 11:

225-235.

- [19] Swanson, R. N. *et al.*, 1981. An indirect fluorescent antibody test for the rapid detection of the infectious pancreatic necrosis virus in tissues. *J. Fish Dis.*, 4: 309-315.

RAPID DETECTION OF IPN VIRUS WITH BIOTIN-LABELLED OLIGONUCLEOTIDE DNA PROBE

Zhou Jianling and Tong Shangliang

(*Ocean University of Qingdao*, 266003)

Gong Yunhao

(*Animal Quarantine Institute, Ministry of Agriculture, Qingdao* 266032)

ABSTRACT Infectious pancreatic necrosis (IPN) of fish is a serious viral disease affecting rainbow trout in China. A biotin-labelled oligonucleotide DNA probe has been developed for rapid detection of IPNV. The minimum probe concentration for colour development is 1ng/ μ l. However, a concentration of 100ng/ μ l is used as a working solution. The sensitivity of the probe for IPNV detection is $10^{4.2}$ TCID₅₀/0.1ml. There is no cross reaction with IBDV and BTV of the probe.

KEYWORDS oligonucleotide DNA probe, rapid diagnosis, IPNV