

草鱼呼肠孤病毒 *TaqMan* real-time PCR 检测方法的建立

周勇¹, 曾令兵^{1,2*}, 范玉顶¹, 徐进¹, 马杰², 罗晓松¹, 肖艺¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 荆州 434000;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430071)

摘要: 利用 RT-PCR 技术扩增出草鱼呼肠孤病毒(GCRV) VP6 蛋白编码区长度为 1 250 bp 的片段, 克隆到 pEGFP-N1 载体上, 构建重组质粒 pEGFP-N1-VP6。经 PCR 鉴定确认正确后, 以 10 倍梯度稀释 pEGFP-N1-VP6 重组质粒, 作为标准模板进行 *TaqMan* real-time PCR 扩增, 制作标准曲线, 建立了草鱼呼肠孤病毒的荧光定量 PCR 检测方法。检测结果显示, 标准曲线的相关系数 (R^2) 达到 0.998 09, 斜率为 -3.373; 对初始模板定量检测的范围为 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ copies/ μL ; 特异性试验结果表明, 该方法可特异性地检测出草鱼呼肠孤病毒, 而对鲤春病毒血症病毒(SVCV)、传染性造血器官坏死症病毒(IHNV)无检测信号。本研究建立的草鱼呼肠孤病毒 *TaqMan* real-time PCR 方法灵敏度高、特异性强, 可进行定量分析, 对草鱼出血病快速诊断与病毒病原定量检测有重要意义。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒; VP6 蛋白编码基因; *TaqMan* real-time PCR; 检测

中图分类号: S 941.41

文献标识码: A

草鱼出血病 (grass carp hemorrhage) 是草鱼的一种严重病毒性疾病, 主要危害 1 龄草鱼和 2 龄草鱼种, 其流行范围广, 发病率高, 死亡率可达 90% 以上, 易造成重大经济损失^[1]。草鱼出血病的病原为草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV), 是呼肠孤病毒科水生呼肠孤病毒属中毒力最强的病毒株^[2-3]。GCRV 基因组由 11 条分节段 dsRNA 组成, 总分子量约为 15.46×10^6 u; 其基因组编码 12 条多肽, 基因组各节段 dsRNA 分子量大小与其编码的多肽分子量大体上一一对应^[4]。长期以来, 草鱼出血病的诊断主要依赖肉眼观察体表的出血症状与解剖检查内脏器官的充血发炎症状, 缺乏灵敏准确的疾病早期诊断与病原检测方法, 严重影响了草鱼出血病的预防与控制技术的研究。

随着草鱼出血病流行病学、病原学以及诊断技术等研究的不断深入, 基于免疫学与分子生物学基础的草鱼出血病诊断与病原检测技术逐渐建

立起来。杨广智等^[5]建立了葡萄球菌 A 蛋白协同凝集试验法 (SPA-CoA), 通过 GCRV 抗原蛋白与兔抗 GCRV 抗体结合来检测病毒; 江育林等^[6]建立了检测草鱼出血病病毒的荧光抗体技术 (FA) 和酶联免疫吸附试验法 (ELISA); 邵健忠等^[7]建立了斑点酶联免疫吸附试验法 (Dot-ELISA), 王铁辉等^[8]建立了逆转录聚合酶链式反应检测法 (RT-PCR), 最小检测量可达 0.1 pg 病毒核酸。这些方法为草鱼出血病的诊断与病原检测提供了较为有效的技术手段, 但有些方法操作繁复, 检测周期长, 特别是缺乏定量检测数据, 迫切需要建立更加灵敏、特异性强并可定量分析的草鱼出血病诊断与呼肠孤病毒检测技术。最近发展起来的荧光定量 PCR 技术, 以其灵敏度高、特异性好、快速准确等优点在水产病原生物的定性和定量检测等方面已经得到广泛应用^[9-10]。本研究建立了 GCRV 的实时荧光定量 PCR 检测方法, 为定量检测 GCRV 提供了一种新的检测手段。

收稿日期: 2011-01-23

修回日期: 2011-02-08

资助项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (nycyt-49-16); 农业部公益性行业科研专项 (200803013)

通讯作者: 曾令兵, Tel/Fax: 0716-8115716, E-mail: zenglingbing@gmail.com

1 材料与方 法

1.1 细胞与病毒

草鱼肾脏组织细胞系(CIK)由本实验室建立并保存^[11]。草鱼呼肠孤病毒 GCRV-104 株由本实验室分离(HM234682)。鲤春病毒血症病毒(SVCoV)、传染性造血器官坏死症病毒(IHNV)、鲤上皮瘤细胞(EPC)、大鳞大马哈鱼胚胎细胞(CHSE-214)由美国夏威夷大学公共卫生与健康系 Yuanan Lu 教授惠赠。SVCoV 在 EPC 细胞上增殖培养^[12], IHNV 在 CHSE-214 细胞增殖培养^[13]。

1.2 主要试剂与仪器

iScript One Step RT-PCR Kit for Probes 为 Bio-Rad 公司产品;逆转录 cDNA 合成试剂盒 Improm-IITM Reverse Transcription System、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于 Promega 公司;pEGFP-N1 载体为 Clontech 公司产品。主要仪器包括:荧光定量 PCR 仪(Rotor-Gene 6000, Qiagen)、分光光度计(RS 232 C, Eppendorf)、凝胶成像仪(Chemdoc XRS+, Bio-Rad)、超速离心机(Optima L-80XP, Beckman-Coulter)。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中 GCRV-104 VP6 蛋白编码基因序列(HM234682),应用 Primer5 软件设计特异性引物 P1/P2 和 GCRV-104F/GCRV-104 probe/GCRV-104R,第一对引物(P1/P2)扩增 GCRV VP6 基因编码区,长度为 1 250 bp,用于构建重组质粒,为制作标准曲线提供模板;第二对引物(GCRV-104F/GCRV-104 probe/GCRV-104R)用于荧光定量 PCR 扩增,长度为 135bp。引物 P1/P2 由上海生工生物技术有限公司合成。探针引物 GCRV-104F/GCRV-104 probe/GCRV-104R 由上海闪晶分子生物科技有限公司合成。引物序列:

P1: 5'-CCCAAGCTTATGGCACGTGTGGTT-TATG-3'

P2: 5'-CGCGGATCCGTGGTTACGCGGGT-CAG-3'

GCRV-104F: 5'-GGCTACCCTCTTTGTCT-CGC-3'

GCRV-104R: 5'-CCTCCGACAGGTACCACT-GC-3'

GCRV-104 probe: 5'-AACGCGCGCTCGTG-GCACTAA-3'

1.4 模板制备

待 GCRV-104 感染的 CIK 细胞出现病变后收集细胞毒材料,于 -80 °C 至室温条件反复冻融 3 次,4 000 r/min 离心 30 min,取上清转移至 35 mL 超速离心管中,20 000 r/min 离心 2 h(SW28, Beckman-Coulter),悬浮病毒沉淀,经 Trizol 试剂裂解后,采用氯仿、异丙醇抽提病毒总 RNA,分光光度计(Eppendorf biophotometer)测定 RNA 浓度。取 1 μg 病毒总 RNA,加入 20 pmol 引物 P1,按照 Improm-IITM Reverse Transcription System 说明书进行逆转录反应。取 8 μL 逆转录产物 cDNA,加入 10 × Taq 反应缓冲液 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL、50 μmol/L 浓度的 P1、P2 引物各 1 μL、超纯水 30.5 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,将上述反应体系混匀后进行 PCR 扩增。反应参数为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 15 s,50 °C 15 s,72 °C 20 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。同时设立无模板的阴性对照。反应结束后,取 5 μL PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)进行电泳检测。

GCRV VP6 蛋白编码基因扩增产物经胶回收纯化后于 16 °C 与 pEGFP-N1 载体连接 12 ~ 14 h,用连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。从 LB 琼脂平板上挑取菌落接种于 5 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素(Kan⁺)的 LB 液体培养基中,37 °C 震荡培养 12 ~ 14 h,使用质粒 DNA 小量提取试剂盒提取质粒。对重组质粒用 P1/P2 引物进行 PCR 鉴定。重组质粒 pEGFP-N1-VP6 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。用分光光度计分别测定阳性重组质粒在 260 和 280 nm 处的吸光度,并根据以下方法计算重组质粒的 DNA 拷贝数。

分子拷贝数(个/mL) = DNA 质量浓度 / DNA 分子量,其中:DNA 质量浓度 = 260 nm 吸光度 × 稀释倍数 × 6.02 × 10²³;DNA 分子量 = DNA 碱基数 × 324.5。

1.5 灵敏度试验与标准曲线

将重组质粒进行 10 倍梯度稀释,以 1 × 10⁶、1 × 10⁵、1 × 10⁴、1 × 10³、1 × 10²、1 × 10¹ copies/μL 作为标准品模板,建立标准曲线。按照 iScript One Step RT-PCR Kit for Probes 说明书,分别取不同

稀释梯度的重组质粒 0.5 μL , 依次加入 20 pmol 引物 GCRV-104F/GCRV-104 probe/GCRV-104R, 2 \times RT-PCR Reaction Mix for probes 12.5 μL , iScript reverse transcriptase for one-step RT-PCR 0.5 μL , 补水至 25 μL , 将上述反应体系混匀后进行 PCR 扩增, 反应参数: cDNA 合成 50 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 灭活 iScript 逆转录酶 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 40 个循环每个稀释度设 3 个重复。

1.6 特异性试验

分别提取草鱼呼肠孤病毒 (GCRV-104)、鲤鱼春季病毒血症病毒 (SVCV)、传染性造血器官坏死症病毒 (IHNV) 的核酸, 以其为模板 (每体系 0.5 μL), 用建立的 GCRV real-time PCR 方法进行特异性检测。同时设阴性对照。

1.7 数据分析

荧光定量 PCR 反应过程中仪器自动收集荧光信号。反应结束后, 利用 SDS (sequence detection system) 2.1 软件进行数据分析, 查看扩增曲线、 C_t 值等, 根据标准模板拷贝数与 C_t 值的相关性, 计算得到标准曲线, 用于未知样品的定量分析。

2 结果

2.1 GCRV VP6 蛋白编码基因的 RT-PCR 扩增

将通过 RT-PCR 反应扩增的 GCRV VP6 蛋白编码基因克隆到质粒 pEGFP-N1 中, 构建重组质粒 pEGFP-N1-VP6。重组质粒的 PCR 检测结果显示, RT-PCR 扩增产物的大小为 1 250 bp, 与预期大小一致 (图 1), 这表明 GCRV VP6 蛋白编码基因片段已正确插入载体 pEGFP-N1 中。测序结果进一步证实, 扩增得到的 GCRV VP6 蛋白编码基因与 Genebank 公布的参考序列一致。

2.2 灵敏度试验与标准曲线

图 2 为不同稀释度的 pEGFP-N1-VP6 重组质粒荧光定量 PCR 扩增反应图。从图中可以看出, 质粒浓度范围为 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ 个拷贝时, 6 个数量级的荧光定量 PCR 反应均有“S”型扩增曲线, 且指数增长期的曲线平行, PCR 反应的扩增效率相近, 检测灵敏度为 1×10^1 个病毒核酸分子拷贝数。利用统计软件 STATISTICA 6.0, 对实验中的 C_t 值进行统计分析。分析结果

表明, 6 个不同稀释梯度标准质粒 DNA 的 C_t 值变异系数 (CV) 在 0.2% ~ 0.91% (表 1), 相同稀释度标准质粒 C_t 值之间差异均不显著 ($P < 0.05$)。

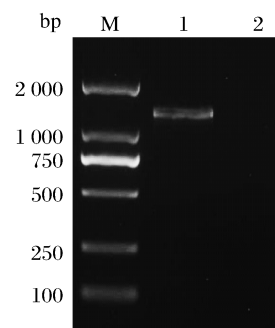


图 1 pEGFP-N1-VP6 重组质粒 PCR 扩增检测结果电泳图

M. 标准 DNA DL2000; 1. 引物 P1/P2 扩增产物; 2. 阴性对照。

Fig. 1 Identification of pEGFP-N1-VP6 recombinant plasmid by PCR

M. DNA Marker DL2000; 1. PCR product with primers P1/P2 (1 250 bp); 2. Negative control.

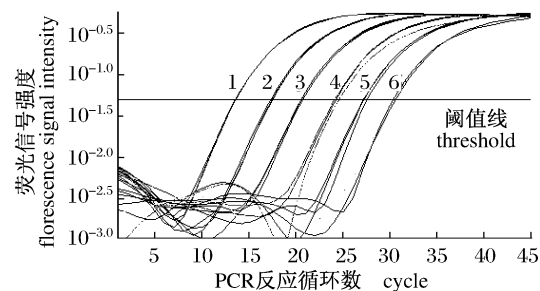


图 2 pEGFP-N1-VP6 重组质粒荧光定量 PCR 反应扩增图

1~6. 质粒拷贝数分别为 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 。

Fig. 2 Amplification plot of real-time PCR assay for the detection of pEGFP-N1-VP6 recombinant plasmid Plot 1 to 6 represent pEGFP-N1-VP6 recombinant plasmid ranging from 1×10^6 to 1×10^1 copies, respectively.

根据质粒拷贝数与 C_t 值的相关性, 由 SDS 2.1 软件得到标准曲线 (图 3)。横坐标代表质粒模板拷贝数 (x), 纵坐标为 C_t 值, 拷贝数 (x) 与 C_t 的关系为 $C_t = -3.373 \lg X + 34.051$; 相关系数 $R^2 = 0.99809$ 。

表 1 以 pEGFP-N1-VP6 重组质粒为标准模板的荧光定量 PCR 重复试验
Tab.1 Reproducibility of pEGFP-N1-VP6 standard template in real-time PCR assay

	C_t for the following number of input copies					
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1
1	13.51	17.39	20.59	24.52	27.19	30.34
2	13.56	17.24	20.54	24.21	27.58	30.32
3	13.52	17.41	20.51	24.09	27.26	30.56
$\bar{X} \pm SD$	13.530 0 \pm 0.026 4	17.346 6 \pm 0.092 9	20.580 0 \pm 0.096 4	24.273 3 \pm 0.221 8	27.343 3 \pm 0.207 9	30.406 6 \pm 0.133 1
CV%	0.20%	0.54%	0.47%	0.91%	0.76%	0.43%

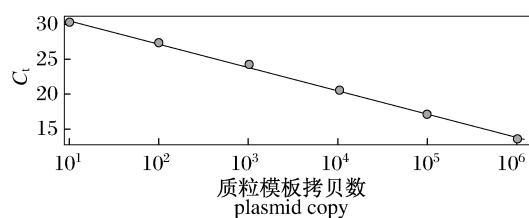


图 3 GCRV 荧光定量 PCR 检测标准曲线
Fig.3 Standard plot for quantification of GCRV in real-time PCR assay

2.3 特异性试验

以草鱼呼肠孤病毒(GCRV-104)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)、传染性造血器官坏死症病毒(IHNV)的总 RNA 为模板,进行 real-time PCR 特异性检测,结果表明,GCRV 总 RNA 模板有典型扩增曲线,荧光信号值高(图 4),检测结果为阳性, C_t 值为 13.59,根据标准曲线计算出样品中病毒核酸量约为 1.16×10^6 copies/ μ L RNA。该样品的对照组 SVCV、IHNV 和空白对照无特异性扩增信号。

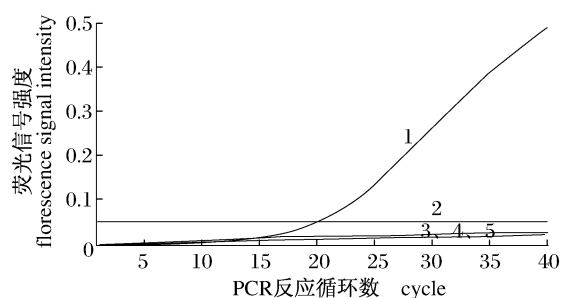


图 4 感染 GCRV 的检测样品的实时定量 RT-PCR 扩增曲线

1. 检测样品; 2. 阈值线; 3. SVCV; 4. IHNV; 5. 空白对照。

Fig.4 Amplification plot of real-time RT-PCR samples with GCRV

1. Samples; 2. threshold; 3. SVCV; 4. IHNV; 5. Blank.

3 讨论

草鱼出血病的快速准确诊断以及病毒病原的

定量检测对于疫病的预警预报与防控技术研究十分重要。目前,建立的草鱼出血病诊断与呼肠孤病毒检测的方法多为免疫学检测方法和 RT-PCR 检测方法^[5-8],缺乏可对草鱼出血病呼肠孤病毒进行快速、准确、定性定量分析的检测方法。本研究建立的 *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 方法,6 个数量级 GCRV 扩增模板($1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ 个拷贝)的荧光定量 PCR 反应均有“S”型扩增曲线,反映出 PCR 扩增反应的指数增长期,线性增长期和平台期 3 个阶段,且指数增长期的曲线平行,PCR 反应的扩增效率相近,不同稀释度之间的 C_t 值相差均匀,符合定量 PCR 的 C_t 值与起始拷贝数之间严格的线性关系,表明检测反应的灵敏度高可达 10 个拷贝,高于逆转录聚合酶链反应最低检测量 0.1 pg 病毒核酸^[8]。

特异性是荧光定量 PCR 检测技术的重要指标之一。为了验证本研究建立的 *TaqMan* 荧光定量 PCR 技术检测草鱼呼肠孤病毒(GCRV)的特异性,本研究选择了鲤春病毒血症病毒(SVCV)、鲢鳙传染性造血器官坏死症病毒(IHNV)的 RNA 病毒作为对照。检测结果表明,仅 GCRV 病毒核酸有典型扩增曲线,而 SVCV 病毒、IPNV 病毒没有扩增线,与阴性对照的结果一致,表明所建立的方法具有特异性。

GCRV-VP6 蛋白是草鱼呼肠孤病毒的核衣壳蛋白^[14],该蛋白与哺乳动物的 S2 蛋白有密切的联系^[15]。通过对草鱼呼肠孤病毒的病毒粒子进行三维结构重建、衣壳蛋白结构及特性研究后发现,其 VP6 蛋白与哺乳动物正呼肠孤病毒 $\delta 2$ 蛋白相似,均在内核和外壳的连接中起着重要作用^[16-17]。应用本研究建立的 *TaqMan* 荧光定量 PCR 检测方法检测,可对不同来源的草鱼呼肠孤病毒毒株进行分子流行病学研究和 VP6 蛋白编码基因的功能研究,这对于草鱼出血病的早期诊

断、病毒定量检测、致病机理研究以及防控技术研究等有重要意义。

参考文献:

- [1] 李军,王铁辉,陆仁后,等. 草鱼出血病病毒的研究进展[J]. 海洋与湖沼,1999,30(4):445-453.
- [2] ANGEL A A, ROCKEMANN D D, HETRICK F M. Identification of grass carp hemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus [J]. J Gen Virol, 1999,80:2399-2402.
- [3] AHNE W. Viral infectious of aquatic animals with special reference to Asian aquaculture[J]. Ann Rev Fish Dis,1994,4:75-388.
- [4] QIU T, LU R H, ZHANG J, *et al.* Molecular Characterization and expression of the M6 gene of grass carp hemorrhage virus (GCHV), an aquareovirus [J]. Arch Virol, 2002, 146 (7): 1391-1397.
- [5] 杨广志,罗毅志,叶雪平. 葡萄球菌 A 蛋白协同凝集试验快速检测草鱼出血病病毒研究[J]. 水产学报,1991,15(1):27-33.
- [6] 江育林,李正秋. 病毒感染的草鱼细胞产生类干扰素物资的研究[J]. 病毒学报,1991,7:30-35.
- [7] 邵建忠,项黎新,李亚南,等. 应用 Dot-ELISA 技术检测草鱼出血病病毒研究[J]. 水产学报,1996,20(1):6-11.
- [8] 王铁辉,李军,易永兰,等. 用逆转录酶链式反应监测草鱼出血病病毒的研究[J]. 海洋与湖沼,1997,28(1):1-6.
- [9] CUTRIN J M, OLVEIRA J G, BANDIN I, *et al.* Validation of real time RT-PCR applied to cell culture for diagnosis of any known genotype of viral haemorrhagic septicaemia virus [J]. J Virol Methods,2009,162(1-2):155-162.
- [10] ZHOU S, HOU Z, LI N, *et al.* Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood[J]. J Appl Microbiol,2007,103(5):1897-906.
- [11] 左文功,钱华鑫,许映芳,等. 草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性[J]. 水产学报,1983,10(1):11-17.
- [12] CHEN Z Y, LIU H, LI Z Q, *et al.* Development and characterization of monoclonal antibodies to spring viraemia of carp virus [J]. Vet Immunol Immunopathol,2008,123(3-4):266-276.
- [13] CAMPBELL C E, LAANE M M, HAUGARVOLL E, *et al.* Monitoring viral-induced cell death using electric cell-substrate impedance sensing[J]. Biosens Bioelectron,2007,23(4):536-542.
- [14] FANG Q, SHAH S, LIANG Y Y, *et al.* 3D reconstruction and capsid protein characterization of grass carp reovirus [J]. Sci China Ser C: Life Sci, 2005,48(6):593-600.
- [15] 肖雪,颜其贵,欧洋,等. 草鱼呼肠孤病毒的研究进展[J]. 水利渔业,2006,26(5):106-109.
- [16] ARUN K D, MICHELLE M, KURT R K, *et al.* Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry [J]. J Clin Microbiol,2001,8(1):2836-2845.
- [17] 王伟,蔡宜权,方勤. 草鱼出血病病毒多肽的基因定位[J]. 中国病毒学,1994,9(4):356-361.

Establishment of a *TaqMan* real-time PCR assay for detecting the grass carp reovirus

ZHOU Yong¹, ZENG Ling-bing^{1,2*}, FAN Yu-ding¹,
XU Jin¹, MA Jie², LUO Xiao-song¹, XIAO Yi¹

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430071, China)

Abstract: A 1 250 bp coding region of grass carp reovirus (GCRV) VP6 protein was amplified by RT-PCR and cloned into pEGFP-N1 vector for the construction of recombinant plasmid pEGFP-N1-VP6. After being identified and confirmed by PCR reaction with specific primer pairs, 10-fold serial dilutions of plasmid pEGFP-N1-VP6 were used as standard templates for *TaqMan* real time PCR to quantify the virus genomic copy number and generate standard curve. Herein, a *TaqMan* real-time PCR of detecting GCRV was developed. It had a good linear relationship between the initial templates and C_t values with a detection range from 1×10^1 copies/ μL to 1×10^6 copies/ μL , the correlation coefficient (R^2) was 0.998 09 and the slope value of standard curve was -3.373 . The assay for specificity of the method established revealed that the *TaqMan* real-time PCR had a specific detection of GCRV, but had no detection signals to spring viremia carp virus (SVCV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). The *TaqMan* real-time RT-PCR assay described here with high sensitivity and accuracy is considered to be a powerful tool for the rapid detection and quantification of GCRV both *in vivo* and *in vitro*.

Key words: grass carp reovirus (GCRV); VP6 protein coding gene; *TaqMan* real-time PCR; detection

Corresponding author: ZENG Ling-bing. E-mail: zenglingbing@gmail.com