

文章编号: 1004 - 7271(2008)05 - 0525 - 05

对虾 Taura 综合征病毒 RT-PCR 检测方法的改进及应用

黎小正, 韦信贤, 吴祥庆, 黄国秋, 黄玉柳

(广西渔业病害防治环境监测和质量检验中心, 广西南宁 530021)

摘要: Taura 综合征病毒(TSV)是世界动物卫生组织(OIE)目录规定的水生动物二类疫病病原体。本研究在 RT-PCR 方法检测 TSV 行业标准的基础上, 优化建立了能更准确检测 TSV 的套式 RT-PCR。敏感性试验结果表明, 所建立的套式 RT-PCR 的灵敏度大约为常规 RT-PCR 的 10^3 倍, 最低可检测到 10fg 的 TSV RNA。分别应用两种 RT-PCR 方法对 180 份来自广西沿海不同对虾养殖场的对虾临床样品进行检测, 其中套式 RT-PCR 共有 52 份检出 TSV, 而常规 RT-PCR 仅有 23 份检出 TSV。表明所建立的套式 RT-PCR 提高了 TSV 的阳性检出率, 较常规 RT-PCR 有更大的应用价值和意义。

关键词: Taura 综合征病毒; 套式 RT-PCR; 灵敏度; 阳性检出率

中图分类号: S 917

文献标识码: A

Improvement and application of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the detection of taura syndrome virus in *Penaeus vannamei*

LI Xiao-zheng, WEI Xin-xian, WU Xiang-qing, HUANG Guo-qiu, HUANG Yu-liu

(Center of Disease Prevention and Cure, Environmental Monitoring and Quality Monitoring of Guangxi Fishery, Nanning 530021, China)

Abstract: Taura syndrome virus (TSV) was defined as List B Diseases pathogen of aquatic animals by Office International des Epizooties (OIE). A nested RT-PCR was developed and optimized for the detection of TSV, founding on the industry standard for RT-PCR of TSV. By sensitivity analysis, the nested RT-PCR developed was 3-log more sensitive than that of conventional RT-PCR for the detection of TSV, and a minimum of 10fg RNA was detected. Using the two RT-PCR techniques, TSV was detected in 52 of 180 clinical cultivated penaeid shrimps in Guangxi by nested RT-PCR, while 23 of 180 by conventional RT-PCR. Results demonstrated that the nested RT-PCR developed can boost positive detection rate of TSV, and be a more effective diagnostic tool in detecting TSV.

Key words: Taura syndrome virus; nested RT-PCR; sensitivity; positive detection rate

对虾 Taura 综合征(Taura syndrome, TS)是由 Taura 综合征病毒(Taura syndrome virus, TSV)引起的一种对虾传染病,近年来严重制约对虾养殖业的健康发展,被世界动物卫生组织(OIE)列为必须申报的

收稿日期: 2008-02-28

作者简介: 黎小正(1962-),男,广东阳春人,高级工程师,硕士,主要从事水产品的检验检疫和渔业环境保护方面的研究。

Tel: 0771-5301119, E-mail: lixz@tom.com

疾病^[1]。TSV 在全球范围内广泛流行,虾感染 TSV 后病死率高达 60%~90%。由于对 TSV 的防治至今尚无有效措施,近年来该病毒逐渐波及到泰国、马来西亚、印度尼西亚、中国等东亚和东南亚国家^[2-4]。目前国内外诊断 TSV 的方法,包括在健康虾中接种病毒观察其典型的临床体征、组织病理学检查、核酸点杂交和原位杂交、免疫组化及 RT-PCR 检测等。国家质检总局也已颁布利用 RT-PCR 方法检测 TSV 的行业标准。与传统方法相比,逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)具有灵敏度高、特异性强、操作简便和快速等特点,是诊断病原体的一种有效的现代分子生物学技术。套式 RT-PCR 则是以常规 RT-PCR 为基础,在特异性和灵敏度方面又有质的提高,因此在对虾病毒学领域具有更广阔的应用前景。结合检疫工作实际,本研究在 RT-PCR 方法检测 TSV 行业标准的基础上,根据已发表的 TSV 基因序列,利用 Oligo6.1 软件自行设计一对套式 TSV 外引物,优化建立了检测 TSV 的套式 RT-PCR,以期提高 TSV 的阳性检出率。同时对套式 RT-PCR 的敏感性及其在临床检测上的应用价值进行了探讨。

1 材料与方 法

1.1 材 料

TSV 阳性病料来自广西合浦某对虾养殖场,由本中心实验室鉴定并保存。疑似 Taura 综合征的病虾采自广西沿海各地对虾养殖场。无特定病原(specific pathogen free, SPF)南美白对虾采自广西水产研究所 SPF 南美白对虾良种场。

1.2 生 化 试 剂

UNIQ-10 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒购自上海 Sangon 生物工程有限公司;M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶、RNase Inhibitor、dNTPs、Agarose Gel DNA Purification Kit、随机引物均购自大连宝生物工程有限公司。其它试剂均为分析纯。

1.3 引 物 设 计

根据已发表的 TSV 基因序列,利用 Oligo6.1 软件设计一对作为基础 PCR 扩增的 TSV 外引物。扩增片段大小为 524 bp,引物寡核苷酸序列如下:

LXZ 1:5'-GAT AGC GAG TTC CTA AGT CAG C -3'

LXZ 2:5'-CTG TTC CTG CGT CAT AGT TGT G -3'

同时合成与行业标准^[5]报道相一致的引物作为内引物,扩增片段大小为 231 bp。引物序列如下:

TSVF:5'-TCA ATG AGA GCT TGG TCC -3'

TSVF:5'-AAG TAG ACA GCC GCG CTT -3'

1.4 RNA 的提取

取待检对虾鳃、肝胰腺、肌肉组织等,使用 UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,最后用适量无 RNA 酶的双蒸水溶解 RNA,用核酸蛋白仪测定总 RNA 纯度及浓度,保存于 -20℃ 备用。

1.5 cDNA 合成

取抽提的 RNA 样品 10 μL,加入随机引物 1 μL (25 μmol/L),加灭菌三蒸水至 15 μL,70℃ 作用 5 min,冰浴 5 min,然后加入 5×RT Buffer 5 μL、10 mmol/L dNTPs 2 μL、40 U/μL RNase Inhibitor 0.5 μL、200 U/μL M-MLV 逆转录酶 1 μL,混匀,置 42℃ 反转录 1 h,96℃ 灭活反转录酶 5 min,即得 cDNA。

1.6 PCR 扩 增

常规 RT-PCR 参考中华人民共和国出入境检验检疫局行业标准 SN/T1151.1-2002^[5],但对 RNA 抽提方法及 PCR 反应条件进行优化。

基础 PCR 采用 25 μL 反应体系:10×PCR buffer (无 Mg²⁺) 2.5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL、10 mmol/L dNTPs 0.5 μL、25 μmol/L LXZ1 和 LXZ2 引物各 0.5 μL、Taq 酶 1.5 U、cDNA 2.5 μL,加灭菌

三蒸水至 25 μL 。循环参数为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,共 35 次循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。将第一次 PCR 扩增产物 10 倍稀释后作模板,以内引物 TSVF 和 TSVR 代替原来的外引物,用检测 TSV 的 PCR 优化程序进行第二次 PCR 扩增,即为套式 RT-PCR。

1.7 琼脂糖凝胶电泳分析扩增的结果

取 6 μL PCR 扩增产物与 2 μL 6 \times Loading Dye Solution 混合,在加入含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上以 5 V/cm 电压电泳 50 ~ 60 min,在凝胶成像系统下观察结果并拍照记录。

1.8 PCR 产物测序

将 PCR 产物回收、克隆并送至大连 Takara 公司进行测序,测序结果在 NCBI 进行 Blast 搜索比对,同时利用生物软件进行序列分析。

1.9 套式 RT-PCR 与常规 RT-PCR 敏感性比较试验

提取 TSV 的总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,按 10 倍递进稀释法稀释后,分别取各滴度适量的 RNA 模板同时进行套式 RT-PCR 与常规 RT-PCR,比较它们的敏感性。

1.10 套式 RT-PCR 的临床检测试验

用所建立的套式 RT-PCR 与常规 RT-PCR 同时对 180 份临床样品进行检测,以检验套式 RT-PCR 较常规 RT-PCR 的优越性及其临床实用性。

2 结果

2.1 TSV 常规 RT-PCR 的优化

通过对不同反应条件下 cDNA 扩增结果比较,最终确定的 PCR 体系为:10 \times PCR buffer (无 Mg^{2+}) 2.5 μL 、25 mmol/L MgCl_2 2.5 μL 、10 mmol/L dNTPs 0.5 μL 、25 $\mu\text{mol/L}$ TSVF 和 TSVR 引物各 0.5 μL 、*Taq* 酶 1.5 U、cDNA 2.5 μL ,加灭菌三蒸水至 25 μL 。PCR 优化程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 35 次循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

2.2 TSV 套式 RT-PCR 的建立

基础 PCR 采用 25 μL 反应体系:10 \times PCR buffer (无 Mg^{2+}) 2.5 μL 、25 mmol/L MgCl_2 1.5 μL 、10 mmol/L dNTPs 0.5 μL 、25 $\mu\text{mol/L}$ LXZ1 和 LXZ2 引物各 0.5 μL 、*Taq* 酶 1.5 U、cDNA 2.5 μL ,加灭菌三蒸水至 25 μL 。循环参数为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,共 35 次循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

将第一次 PCR 扩增产物 10 倍稀释后作模板,以内引物 TSVF 和 TSVR 代替原来的外引物,用检测 TSV 的 PCR 优化程序进行第二次 PCR 扩增。取第二次 PCR 扩增产物电泳分析并回收测序。

电泳分析结果(图 1)显示,套式 RT-PCR 能特异高效地扩增出目的片段;PCR 产物经 DNA 测序,得到一条 231 bp 的核苷酸序列。序列分析发现,所得核苷酸序列与引物设计模板序列对应片段同源性为 99% (GenBank 登录号为 EU543262)。

2.3 TSV 套式 RT-PCR 检测法的敏感性

对不同稀释度的 TSV RNA 模板按上述 PCR 反应的最佳反应条件同时进行常规 RT-PCR 与套式

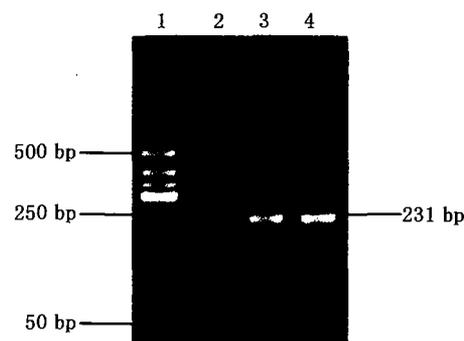


图 1 套式 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Nested RT-PCR for TSV using RNA prepared from TSV-infected clinical samples

1. 50 bp DNA ladder marker; 2. 阴性对照;
3~4. 感染 TSV 的阳性样品

RT-PCR, 比较两种方法的敏感性。结果(图2、图3)显示, 当RNA模板稀释100倍后所制备的模板, 常规RT-PCR的检测结果为阳性; 当稀释 1×10^3 倍以上时, 检测结果均为阴性。而套式RT-PCR在RNA模板稀释 1×10^5 倍后所制备的模板, 检测结果仍为阳性。可见在检测TSV时, 套式RT-PCR明显比常规RT-PCR更敏感, 其灵敏度大约为常规RT-PCR的 10^3 倍。紫外分光光度计测得提取的TSV总RNA的浓度约为 $1.03 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 说明该套式RT-PCR最低可检测到每个反应约 10 fg 的TSV RNA。

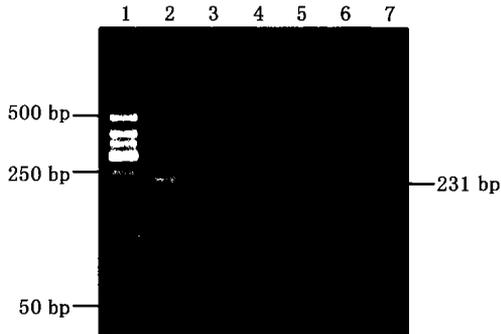


图2 常规RT-PCR检测倍比稀释的TSV-RNA
Fig. 2 Conventional RT-PCR for the detection of diluted TSV-RNA

1. 50 bp DNA ladder marker; 2. 10^{-1} ; 3. 10^{-2} ; 4. 10^{-3} ;
5. 10^{-4} ; 6. 10^{-5} ; 7. 10^{-6}

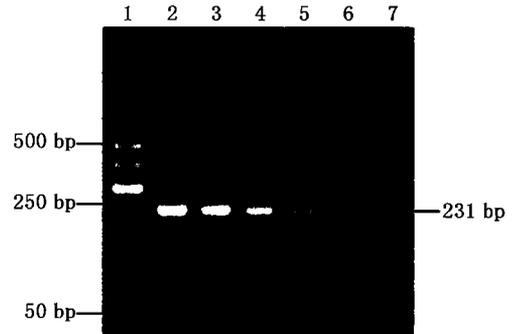


图3 套式RT-PCR检测倍比稀释的TSV-RNA
Fig. 3 Nested RT-PCR for the detection of diluted TSV-RNA

1. 50 bp DNA ladder marker; 2. 10^{-1} ; 3. 10^{-2} ; 4. 10^{-3} ;
5. 10^{-4} ; 6. 10^{-5} ; 7. 10^{-6}

2.4 临床检测结果

用所建立的套式RT-PCR与常规RT-PCR同时对180份来自广西沿海不同对虾养殖场疑似感染TSV的对虾临床样品进行检测, 其中常规RT-PCR仅有23份检出TSV, 而套式RT-PCR共有52份检出TSV。表明所建立的套式RT-PCR提高了TSV的阳性检出率, 较常规RT-PCR有更大的应用价值和意义。此外, 检测临床样品的电泳分析图(图4、图5)显示, 套式RT-PCR的目的片段条带明显比常规RT-PCR的亮, 说明套式RT-PCR比常规RT-PCR能更高效地扩增目的片段。

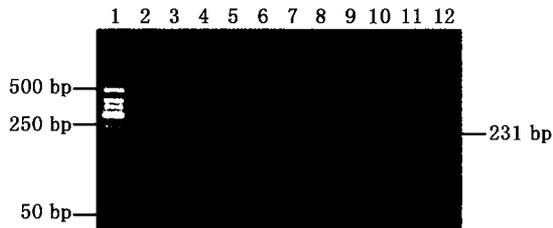


图4 常规RT-PCR检测临床样品
Fig. 4 Conventional RT-PCR for TSV using RNA prepared from clinical samples

1. 50 bp DNA ladder marker; 2. 阴性对照;
3~12. 感染TSV的临床样品

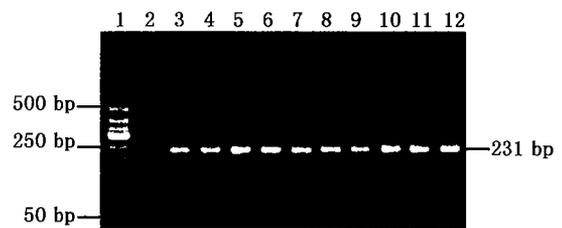


图5 套式RT-PCR检测临床样品
Fig. 5 Nested RT-PCR for TSV using RNA prepared from clinical samples

1. 50 bp DNA ladder marker; 2. 阴性对照;
3~12. 感染TSV的临床样品

3 讨论与分析

在对虾TSV检测的研究中, 特别是在进行病毒的临床潜伏感染及进出口检疫等方面的检测时, 建立一种灵敏、可靠的检测方法是十分重要的。由于RT-PCR不仅具有灵敏度高、特异性强等优点, 而且易于掌握、操作简便、成本较低, 因此自RT-PCR技术出现之后, 很快被广泛应用于各种病原体的检测,

国内外水产病害研究者也相继建立了其所在地区 TSV 的 RT-PCR 检测方法^[6-7]。从理论上讲,RT-PCR(常规 RT-PCR)比免疫学及核酸探针检测等方法灵敏度更高,而套式 RT-PCR 则是以常规 RT-PCR 的产物为模板,以外引物预期扩增片段之内的部分短核苷酸序列为内引物,这样出现假阳性的几率大大减少,因此套式 RT-PCR 检测病原体的特异性和灵敏度相对于常规 RT-PCR 而言无疑又有质的提高^[8]。本文实验结果也表明,所建立的套式 RT-PCR 检测 TSV 的灵敏度大约为常规 RT-PCR 的 10^3 倍。可见与其它方法相比,用套式 RT-PCR 检测 TSV 有更为广阔的应用前景。

与行业标准推荐的方法不同,本研究采用 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒替代 Tris 酚-氯仿-异戊醇方法提取样品 RNA,从而大大缩短了 RNA 抽提的时间,提高了逆转录 cDNA 模板的质量,并使 RT-PCR 后的电泳条带更清晰。采用 Tris 酚-氯仿-异戊醇方法抽提 RNA,Tris 酚的质量对抽提 RNA 的质量有着显著影响,由于 Tris 酚易被氧化(其有效期通常为半年),因此获取的 RNA 质量不如 Trizol 抽提方法可靠。另外,有文献^[9]报道采用 Tris 酚-氯仿-异戊醇方法抽提的 RNA,经 RT-PCR 扩增得到的阳性基因片段测序时常因样品不纯得不到结果。本研究采用 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒抽提 RNA 及采用套式 RT-PCR,提高了 TSV 检测的可靠性及阳性检出率。

从 2006 年 7 月到 2007 年 12 月,用所建立的套式 RT-PCR 与常规 RT-PCR 同时对 180 份来自广西沿海不同对虾养殖场疑似感染 TSV 的对虾临床样品进行检测,其中常规 RT-PCR 仅有 23 份检出 TSV,阳性检出率为 12.8%;而套式 RT-PCR 共有 52 份检出 TSV,阳性检出率为 28.9%;表明所建立的套式 RT-PCR 明显提高了 TSV 的阳性检出率。同时说明 TSV 近年来在广西沿海地区养殖对虾中呈现出区域性流行趋势。由于目前针对 TSV 的防治手段缺乏,切断传播途径阻止 TSV 感染病虾由一个地区向另一个地区扩散是目前控制 TSV 流行的主要措施。因此,提高 TSV 阳性检出率对保护我国的对虾养殖业具有重要意义。另外,在对临床样品的检测过程中我们发现,常规 RT-PCR 可检测出已表现外观症状后的对虾(即红体),但对无外观症状的感染对虾很难检测出阳性结果,而套式 RT-PCR 则能检测出毫无外观症状的潜伏感染 TSV 的对虾样品。因此,在进行对虾 TSV 感染初期或潜伏期的亲虾、虾苗的检测及检疫时,使用套式 RT-PCR 更为合适。

显然,无论是在生产实践中检测 TSV,或是在 TSV 的进出口检疫,灵敏度极高而特异性也强的套式 RT-PCR 有更大的应用价值和意义。

参考文献:

- [1] 世界动物卫生组织(OIE). 水生动物疾病诊断手册第三版[M]. 国家质量监督检验检疫总局译. 北京:中国农业出版社,2000:165-171.
- [2] Lightner D V, Redman R M, Poulos B T, *et al.* Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp[J]. *Rev Sci Tech*, 1996, 16: 146-160.
- [3] Overstreet R M, Lightner D V, Hasson K W, *et al.* Susceptibility to Taura syndrome virus of some penaeid shrimp species native to the Gulf of Mexico and southeastern United States[J]. *J Invert Pathol*, 1997, 69: 165-176.
- [4] 雷质文,黄捷,梁成株,等. 对虾桃拉综合征传入我国的初步风险分析[J]. *中国动物检疫*, 2002, 19(3): 43-45.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国出入境检验检疫局行业标准 SN/T1151[S]. 2002.
- [6] 江育林,高隆英,史秀杰,等. 用 RT-PCR 快速检测 Taura 综合症病毒[J]. *检验检疫科学*, 2004, 14(2): 8-9.
- [7] Nunan L M, Poulos B T, Lightner D V. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp[J]. *Dis Aquat Org*, 1998, 34: 87-91.
- [8] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京:人民军医出版社,1995:304-305.
- [9] 熊炜,邱璐,李健,等. RT-PCR 检测 Taura 综合症病毒方法改进及应用[J]. *中国动物检疫*, 2005, 22(12): 29-31.