

文章编号: 1674 - 5566(2012)06 - 0996 - 07

罗氏沼虾野田村病毒和双顺反子病毒双重 RT-PCR 检测方法与序列分析

潘晓艺¹, 刘杜鹃^{1,2}, 沈锦玉¹, 张宇飞¹, 蔺凌云¹, 王军毅¹, 郝贵杰¹,
姚嘉赞¹, 徐洋¹, 袁雪梅¹

(1. 浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001; 2. 温州医学院 生命科学学院, 浙江 温州 325035)

摘要: 罗氏沼虾野田村病毒 (*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, MrNV) 和双顺反子病毒 (*M. rosenbergii* dicistrovirus, MrDV) 是已报道对罗氏沼虾易感的主要致病性病毒, 该研究通过建立双重 RT-PCR 方法对 MrDV 和 MrNV 两种病毒同时进行检测。根据 MrDV 和 MrNV 基因组序列的保守区分别设计特异性引物, 并对双重 PCR 的退火温度和引物浓度进行优化, 在获得优化反应体系和反应条件后, 对罗氏沼虾样品进行检测。结果表明, 双重 PCR 最佳退火温度为 60 °C, 反应体系最佳引物终浓度 MrNV384 为 0.1 μmol/L, MrDV472 为 0.05 μmol/L, 对病样总 RNA 的最低检测限为 360 fg。引物的特异性检测表明, 该检测方法对 TSV、WSSV、IHHNV 和嗜水气单胞菌 TPS-30 基因组无交叉反应。对阳性样品的病毒扩增序列分析表明, MrDV RNA 依赖性 RNA 聚合酶编码区序列无变异, MrNV-RNA2 序列存在较多变异, 进化树结果表明 2011 年长三角的 MrNV 病毒主要来自于中国基因型和东南亚基因型。该方法的建立为罗氏沼虾病毒性疾病的预防和种苗的繁育奠定了基础。

研究亮点: 该研究建立的双重 RT-PCR 能特异检测罗氏沼虾野田村病毒和罗氏沼虾双顺反子病毒, 阳性样品总 RNA 最低检测限为 360 fg, 其中罗氏沼虾双顺反子病毒检测方法未见文献报道, 阐述了 MrNV 两种可能来源。该方法的建立可用于罗氏沼虾种虾筛选和苗种健康管理中的病毒检测。

关键词: 罗氏沼虾; 双顺反子病毒; 野田村病毒; 双重 RT-PCR

中图分类号: S 945.4

文献标志码: A

20 世纪 80 年代以来, 养虾业已成为海水养殖业中举足轻重的支柱产业。疾病是限制虾类生存、生长和养殖的主要原因之一。传染性的病毒病和细菌病是造成世界不同地方养殖损失的主要因素^[1]。近年来的对虾白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV)^[2]、桃拉综合征病毒 (taura syndrome virus, TSV)^[3] 和罗氏沼虾野田村病毒 (*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, MrNV)^[4] 等病毒性传染病在世界各地广泛流行, 除给虾类养殖产业带来严重经济损失之外, 还对海洋资源的可持续发展造成巨大威胁, 因此, 虾类病毒性疾病的研究已成为当前世界虾病研究领域的焦点之一^[5]。罗氏沼虾野田村病毒作为

罗氏沼虾白尾病病原, 已给中国罗氏沼虾育苗和养殖产业造成了重大影响^[6]。从发病情况及流行病学分析, 该病由亲虾传播的可能性极大, 带病毒苗种的跨地区运输和带病毒种虾的使用, 是造成该病迅速传播扩散的重要原因^[4]。该病毒已经被列为 OIE 检测名录, 对于该病毒的各种检测方法, 如 TAS-ELISA 检测法^[7]、RT-PCR 检测法^[8] 等也已被建立和使用。

2010 年我国也报道了另外一种引起罗氏沼虾疾病的罗氏沼虾双顺反子病毒 (*M. rosenbergii* dicistrovirus, MrDV), 其造成罗氏沼虾幼体死亡率达到 80% ~ 90%, 严重时达到 95% 以上, 给许多育苗场造成毁灭性打击^[9]。因此建立同时能

收稿日期: 2012-04-18 修回日期: 2012-05-24

基金项目: 浙江省科技厅重大科技专项 (2010C02007); 浙江省自然科学基金 (Y12C190024); 农业部公益性行业科研专项 (20111103034); 湖州市重大科技专项 (2011ZD2005); 湖州市水产养殖创新团队科研项目 (2010KC02 - 1)

作者简介: 潘晓艺 (1979—), 男, 硕士, 研究方向为水产动物病原致病机理。E-mail: panxiaoyi@163.com

通讯作者: 沈锦玉, E-mail: sjinyu@126.com

检测 MrNV 和 MrDV 的特异、灵敏的双重 RT-PCR 检测方法具有重要意义。该方法的建立可为罗氏沼虾病毒性病原检测提供一种简便途径,为罗氏沼虾疾病预防奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

从浙江省多个罗氏沼虾育苗场分别采集罗氏沼虾 15 日龄幼体 1 000 尾左右,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,并各取少量样品用于罗氏沼虾野田村病毒和双顺反子病毒检测,罗氏沼虾野田村病毒和双顺反子病毒阳性样品为本实验室的保存样品。RNAiso Plus、M-MLV 逆转录酶、RNase 抑制剂、dNTP Mixture、*Taq* DNA 聚合酶为宝生物工程公司产品,100 bp DNA Maker 购自杭州爱思进生物技术有限公司。

1.2 病毒 RNA 提取

分别称取罗氏沼虾野田村病毒和双顺反子病毒阳性样品 0.05 g 于 RNase-free 离心管中,加 1 mL RNAiso Plus 充分研磨,漩涡震荡 30 s,室温放置 5 min,加 0.2 mL 氯仿剧烈摇动 15 s 后室温放置 3 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min,取水相于新的 RNase free 离心管中,加 0.5 mL 的异丙醇混匀,室温放置 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min,用体积分数为 70% 的乙醇洗涤沉淀 2 次,室温干燥后以 50 μL RNase-free 水溶解。通过测定 $\text{OD}_{260\text{ nm}}$ 和 $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$ 评估 RNA 浓度和纯度,用 RNase-free 水配置成 360 ng/ μL 作为起始浓度,并进行 10^{-1} 倍比稀释成 10^{-1} 至 10^{-8} 。保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.3 引物设计

根据罗氏沼虾野田村病毒的衣壳蛋白编码区(GeneBank 登录号为 AY222840)和罗氏沼虾双顺反子病毒的 RNA 依赖性聚合酶基因编码区(GeneBank 登录号为 HQ186297)分别设计特异性引物,并使得两对引物具有比较接近的 TM 值,引物之间不互补和不形成发夹,分别命名两对引物为 MrNV384F /MrNV384R 和 MrDV472F /MrDV472R,目的扩增片段大小分别为 384 bp 和 472 bp。引物合成由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of primers

引物组名	引物名	序列(5'-3')	产物大小/bp
MrNV384	MrNV384F	ACCCCATTCGCGAAAGCC	384
	MrNV384R	CTTGTGACGTAGCCTGCCT	
MrDV472	MrDV472F	TGCTTCTATTTCGGCTCG	472
	MrDV472R	CAACGAATTAGGGAGAGG	

1.4 RT-PCR

反转录的反应体系为 20 μL ,依次加入下列成分:RNA 5 μL ,10 mmol/L 的 MrDV472R 和 MrNV384R 各 0.5 μL ,加 DEPC 水 7.5 μL , $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min 后立即冰浴 5 min。接着加入 $5\times$ MLV Buffer 4 μL ,RNase 抑制剂 0.5 μL ,10 mmol/L dNTP Mixture 1 μL ,M-MLV 逆转录酶 1 μL ,随后进行反转录。反转录的反应程序为: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h, $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。所得 cDNA 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。PCR 反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35 个循环,循环结束后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳紫外观察,并对扩增片段 384 bp 和 472 bp 的条带进行胶回收纯化,纯化的 PCR 产物送南京金斯瑞生物科技有限公司测序,序列通过 NCBI 的 BLASTN 进行比对,验证 PCR 产物的准确性。

1.5 双重 PCR 条件优化

1.5.1 退火温度优化

根据引物 MrNV384F /MrNV384R 和 MrDV472F /MrDV472R 的退火温度,设置温度区域为 $56\sim 68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行退火温度优化,退火温度分别设置为: $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $56.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $57.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $58.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $59.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $61.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $62.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $64.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $65.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $66.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $67.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 个梯度。PCR 反应体系为 20 μL ,包括 $10\times$ PCR-Buffer(含 Mg^{2+}) 2 μL 、dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 0.5 μL 、*Taq* DNA 聚合酶 1 U、上下游引物终浓度分别为 0.2 $\mu\text{mol/L}$,cDNA 模板 1 μL ,最后用灭菌超纯水补足至 20 μL 。

1.5.2 引物浓度优化

PCR 体系中引物终浓度分别采用 0.20 $\mu\text{mol/L}$ 、0.15 $\mu\text{mol/L}$ 、0.10 $\mu\text{mol/L}$ 、0.05 $\mu\text{mol/L}$ 4 个稀释度进行优化,退火温度为 1.5.1 中筛选出的最佳退火温度,其它条件不变,筛选能扩增出清晰目的条带的最适引物浓度。

1.6 特异性检测

将未稀释的 RNA-MrNV 和 RNA-MrDV 以 1:1 混合作为反转录模板,分别以 MrNV、MrDV、TSV、IHHNV、WSSV 和嗜水气单胞菌 TPS-30 菌株的核酸为模板进行反转录,反转录中的引物采用随机引物 N9,并分别以各自反转录产物进行双重 PCR,检测建立的罗氏沼虾 MrNV 和 MrDV 双重 RT-PCR 的特异性。

1.7 灵敏性检测

以起始浓度为 360 pg/ μ L 的 MrNV 病毒 RNA 和 MrDV 病毒 RNA 1:1 混合作为两病毒混合感染样品模板,并以 10^{-1} 倍梯度系列稀释,每稀释度各取 10 μ L 进行反转录;MrNV 病毒 RNA 和 MrDV 病毒 RNA 分别以起始浓度 10^{-1} 倍系列稀释的 RNA 为模板,各取 5 μ L 进行反转录。按照优化的反应体系和反应条件进行反转录和双重 PCR 检测,并与单重 RT-PCR 检测方法进行比较,单重 RT-PCR 反应条件同双重 RT-PCR 条件。根据所能检测到的最大稀释度,确定双重 RT-PCR 的灵敏性。

1.8 临床样品检测

对临床采集的已通过 RT-PCR 确认的罗氏沼虾 RNA 样品进行双重 RT-PCR 检测,对两种方法的符合率进行检测,并对 MrNV 阳性样品采用引物 MrNV-R2F: CAAGATGGCTAGAGGTAACAAA 和 MrNV-R2R: CCTAATTATTGCCGACGATAGCT 进行 RT-PCR 扩增衣壳蛋白完整编码区和序列测定,进行系统进化树分析,核酸序列比对使用 ClustalW 进行,遗传进化树采用 MEGA 5 软件包中 Maximum Likelihood (ML) 法构建,bootstrap 重复 1 000 次。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增和产物验证

采用设计的检测引物分别对 MrNV 和 MrDV 进行 RT-PCR 检测,结果显示以 MrNV384 引物组扩增获得约 400 bp 的片段,MrDV472 引物组获得约 500 bp 的片段(图 1),对目的片段进行割胶纯化回收 DNA 片段,并进行序列测定发现两扩增片段大小分别为 384 bp 和 472 bp。通过 BLASTN 比对,测定的序列分别与 AY222840 和 HQ186297 序列一致。

2.2 退火温度和引物浓度优化

通过常规单对引物进行 RT-PCR 时,在退火温度为 55 $^{\circ}$ C 时,MrNV 和 MrDV 都能获得理想结果(图 1)。由于 PCR 反应过程中设置的退火温度会对 PCR 的特异性产生影响,为了提高 PCR 的特异性,通过梯度 PCR 的方法筛选最适退火温度,以确定双重 PCR 中的退火温度。在温度区域 56 ~ 68 $^{\circ}$ C 进行筛选,结果如图 2。MrNV384 引物组在整个温度区域 56 ~ 68 $^{\circ}$ C 都可以获得特异扩增,MrDV472 引物组在温度高于 62.7 $^{\circ}$ C 时不能成功获得扩增,在 61.3 $^{\circ}$ C 和 62.7 $^{\circ}$ C 时扩增产量和特异性不理想。综合两组引物梯度 PCR 结果,确定退火温度为 60 $^{\circ}$ C 时,符合两组引物的最佳退火条件。

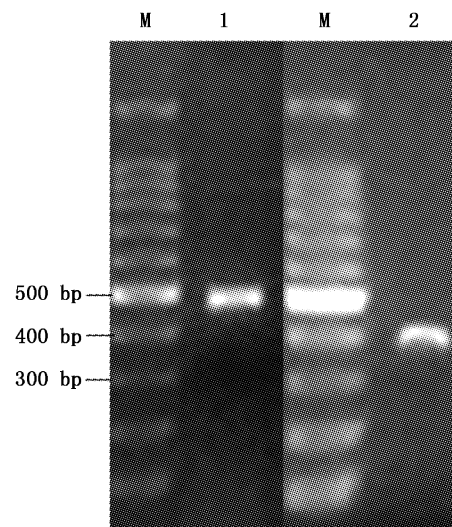


图 1 MrNV 和 MrDV RT-PCR 扩增结果
Fig. 1 RT-PCR detection of MrDV and MrNV respectively

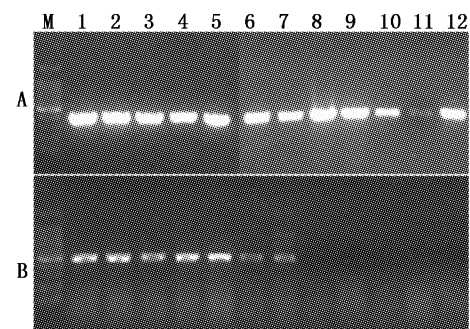


图 2 引物组 MrNV384 (A) 和 MrDV472 (B) 梯度 PCR 产物
Fig. 2 Gradient PCR products using primers MrNV384 (A) and MrDV472 (B)

M. 100 bp DNA maker; 1-12. 56 $^{\circ}$ C, 56.3 $^{\circ}$ C, 57.1 $^{\circ}$ C, 58.4 $^{\circ}$ C, 59.8 $^{\circ}$ C, 61.3 $^{\circ}$ C, 62.7 $^{\circ}$ C, 64.1 $^{\circ}$ C, 65.6 $^{\circ}$ C, 66.9 $^{\circ}$ C, 67.7 $^{\circ}$ C, 68 $^{\circ}$ C。

2.3 引物浓度的优化

分别采取引物终浓度 0.20 $\mu\text{mol/L}$ 、0.15 $\mu\text{mol/L}$ 、0.10 $\mu\text{mol/L}$ 、0.05 $\mu\text{mol/L}$ 4 个稀释度进行优化,退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,其它条件不变,筛选能扩增出清晰目的条带的最低引物浓度。结果如图 3 所示,选取终浓度 MrNV384 为 0.10 $\mu\text{mol/L}$,MrDV472 为 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 。

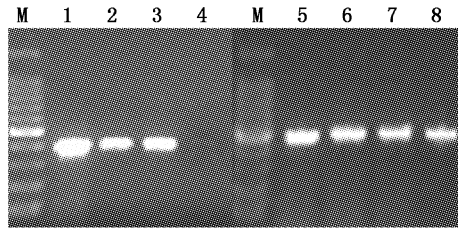


图 3 引物浓度优化

Fig. 3 PCR products using different concentration primers

M. 100 bp DNA maker; 1-4. 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.15 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.05 $\mu\text{mol/L}$ of primers MrNV384F/ MrNV384R; 5-8. 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.15 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.05 $\mu\text{mol/L}$ of primers MrDV472F/ MrDV472R。

2.4 特异性检测

通过优化的双重 RT-PCR 体系和反应条件对不同病毒的核酸进行检测,从结果(图 4)可以看出,本研究设计的引物和双重 RT-PCR 反应条件能特异针对罗氏沼虾野田村病毒和双顺反子病毒进行扩增,与其它虾类常见病毒的 RNA 和 DNA 无交叉扩增。

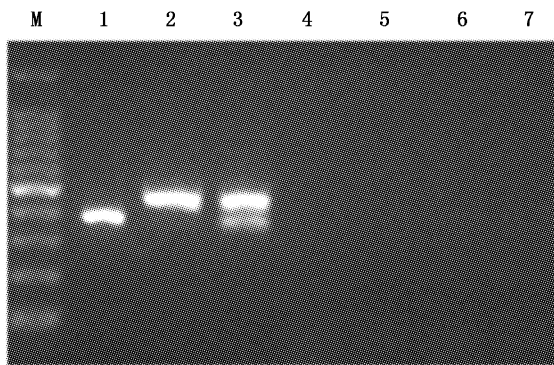


图 4 特异性检测

Fig. 4 Duplex RT-PCR analysis of specificity

M. 100 bp DNA maker; 1. MrNV; 2. MrDV; 3. MrNV/MrDV; 4. TSV; 5. WSSV; 6. IHNV; 7. *Aeromonas hydrophila* TPS-30。

2.5 灵敏度检测

根据优化的双重 RT-PCR 体系和反应条件对

不同稀释度的病毒 RNA 进行 RT-PCR 检测,发现双重 RT-PCR 与单重 RT-PCR 检测结果基本一致(图 5),最低检测限度为 360 fg 的总 RNA。

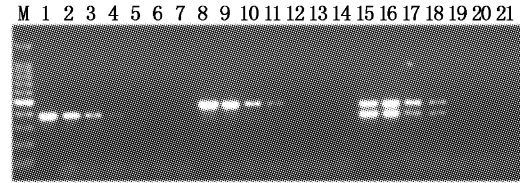


图 5 灵敏度检测

Fig. 5 Duplex RT-PCR analysis of sensitivity

M. 100 bp DNA maker; 1-7. 10^{-1} - 10^{-7} total RNA (360pg/ μL) of MrNV-infected tissue respectively; 8-14. 10^{-1} - 10^{-7} total RNA (360 pg/ μL) of MrDV-infected tissue respectively; 15-21. 10^{-1} - 10^{-7} mix of MrNV-infected tissue and MrDV-infected tissue total RNA (360pg/ μL)。

2.6 初步应用

以建立的罗氏沼虾野田村病毒和双顺反子病毒双重 RT-PCR 检测方法对采集的样品进行病毒检测。双重 RT-PCR 对不同来源病样的检测结果与单重 RT-PCR 检测结果一致(表 2)。对阳性样品扩增片段的序列分析发现,不同批次样品的 MrDV RNA 依赖性 RNA 聚合酶扩增区域序列一致,无变异,说明该编码区在 MrDV 中高度保守;而不同来源的 MrNV 衣壳蛋白扩增区域序列存在较多变异位点。通过对 MrNV 阳性样品的 MrNV 衣壳蛋白编码区构建 Maximum Parsimony 进化树发现,中国来源的 MrNV 主要分布在 b 和 c 分支,2011 年采集的样品主要分布在 a 和 c 中(图 6)。从进化树可以看出 c 分支可能为中国本地基因型,而 b 分支为混合基因型,a 分支为东南亚基因型。而 2011 年的样品中来自江苏吴江八都和浙江省嘉兴海宁的样品归在 a 分支,说明其病毒可能来源于东南亚;来自于浙江湖州的样品都被归为 c 分支,说明其病毒来源于国内。根据病毒基因型的差异,可以推测 2011 年重新暴发的罗氏沼虾白尾病病毒主要有两个来源,这可能与引种不当造成病原跨区传播有关。

3 讨论

罗氏沼虾野田村病毒和双顺反子病毒是已报道对罗氏沼虾敏感并引起疾病的重要病毒性病原,对此两种病毒的防控至关重要^[4,9]。由于无脊椎动物的病毒性疾病预防主要是通过切断病原的传播途径进行防控,而其中重要环节是对

病原的特异、灵敏检测。以往对多种病原进行检测通常都是逐个进行检测,随着分子生物学技术的发展和成熟,多病原快速同时检测已成为发展趋势。免疫学和基因学方法已经被广泛用于病毒检测,ELISA、斑点杂交、原位杂交、RT-PCR、套式 RT-PCR 和 RT-LAMP 等技术都被应用在了罗氏沼虾野田村病毒的检测^[1,7,10-12]。罗氏沼虾双顺反子病毒的 RT-PCR 和 RT-LAMP 检测方法也已被建立^[9,13]。罗氏沼虾野田村病毒和罗氏沼虾双顺反子病毒同为 RNA 病毒,罗氏沼虾野田村病毒基因组分为 RNA1 和 RNA2, RNA2 包含编码 43 kd 衣壳蛋白的编码区^[14];罗氏沼虾双顺反子病毒为无囊膜、大小 25 ~ 29 nm 的球形单正链 RNA 病毒,其基因组全长 10 303 bp,包含两个 ORF, ORF1 编码核酸酶、蛋白酶和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶, ORF2 编码结构蛋白^[9]。两种病毒分别导致了罗氏沼虾仔虾和幼体的重大疾病。

表 2 双重 RT-PCR 对病样检测结果

Tab. 2 Results of duplex RT-PCR for clinical samples

样品	来源	Duplex RT-PCR		RT-PCR		GeneBank 登录号
		MrNV	MrDV	MrNV	MrDV	
Mr100305	浙江湖州	-	-	-	-	/
Mr100327	浙江湖州	-	+	-	+	HQ186291
Mr100329	浙江湖州	-	+	-	+	HQ186297
Mr100401	浙江湖州	-	+	-	+	HQ186292
Mr100417	浙江湖州	-	+	-	+	HQ186293
Mr100508	浙江湖州	-	+	-	+	HQ186294
Mr100602	浙江湖州	-	+	-	+	HQ186295
Mr100609	浙江湖州	-	+	-	+	HQ186296
SF2003	浙江湖州	+	-	+	-	JQ965671
SF110311	浙江湖州	+	-	+	-	JQ965672
HN110314	浙江海宁	+	-	+	-	JQ965676
QF110425	浙江湖州	+	-	+	-	JQ965673
N110503	浙江湖州	-	+	-	+	/
BD110509	江苏吴江	+	-	+	-	JQ965674
XA110607	浙江湖州	+	-	+	-	JQ965675
N120115	浙江湖州	-	+	-	+	/
N120409	浙江湖州	-	+	-	+	/

注: + 表示阳性; - 表示阴性。

病毒快速检测方法可以用于罗氏沼虾育苗和养殖过程中的健康状况评估,也可以作为疾病早期诊断和研究病毒与宿主相互关系的手段,还可用于罗氏沼虾保种和流通过程中对病毒的筛查。本研究通过对罗氏沼虾野田村病毒和双顺反子病毒基因组序列分析,分别设计针对 MrNV 的衣壳蛋白编码区和 MrDV 的 RNA 依赖性 RNA

聚合酶编码区的引物,建立了 MrNV 和 MrDV 的双重 RT-PCR 方法。其中针对罗氏沼虾野田村病毒衣壳蛋白编码区基因序列设计的引物,通过 RT-PCR 可以从罗氏沼虾野田村病毒核酸中扩增获得 348 bp 的片段,针对罗氏沼虾双顺反子病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶基因序列设计的引物,可以扩增获得 472 bp 的片段。通过对临床样品的检测显示,该方法检测灵敏度为 360 fg 的阳性罗氏沼虾幼体样品总 RNA。SAHUL HAMEED 等建立罗氏沼虾野田村病毒 RT-PCR 方法最低检测限为 0.25 fg 的总 RNA^[11],若以病毒总 RNA 为模板,采用套式 RT-PCR,则检测灵敏度可达 0.01 fg,相当于 4 个病毒拷贝^[15],而以 RT-PCR 检测最低检测限为 3 000 个病毒拷贝^[10]。YOGANANDHAN 等通过单管多重 RT-PCR 检测罗氏沼虾野田村病毒和额外小病毒最低检测限为 25 fg 病样总 RNA^[16]。本研究虽以病样的总 RNA 来评估建立的双重 RT-PCR 的灵敏度,但实际检测对象仅与病毒的 RNA 有关系。通过本方法可同时检测 MrNV 和 MrDV,不仅节约时间和试剂,也为两病毒共感染研究提供手段。

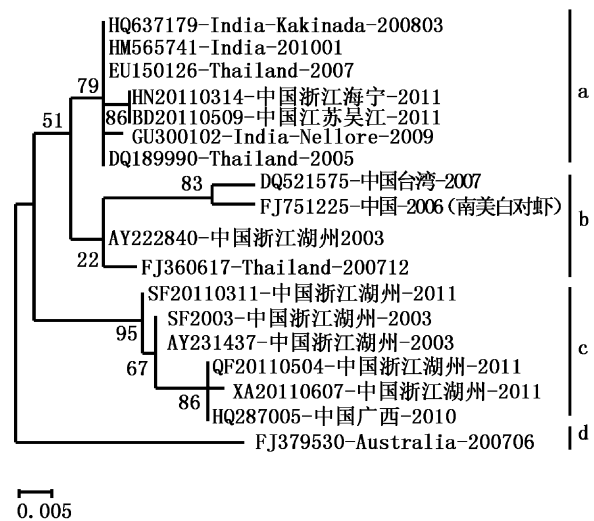


图 6 MrNV-RNA2 系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from MrNV-RNA2

通过对 MrNV 阳性样品 MrNV RNA2 序列的进化分析表明,2011 年流行的罗氏沼虾白尾病的病原主要为两种基因型,一种是分布在江苏吴江和嘉兴海宁的东南亚基因型,一种是中国本地基因型。由于罗氏沼虾白尾病在长三角地区已多

年未发病,对2011年重新流行该疾病的病原来源值得深入探讨。根据进化树表明,2011年在长三角流行的罗氏沼虾白尾病病原可能有两种来源,一种是来源于东南亚,一种是中国本地流行株。罗氏沼虾野田村病毒主要是通过带毒种虾和虾苗来传播,由于罗氏沼虾白尾病主要在仔虾阶段发病且具有典型的肌肉坏死症状,很容易淘汰带毒虾苗,因此没有任何症状、处于潜伏感染而带毒的种虾是传播罗氏沼虾野田村病毒的罪魁祸首。罗氏沼虾双顺反子病毒对幼体具有很强的致死性,带毒幼体很少会发育成仔虾被顺利出售。因此加强罗氏沼虾种虾的严格病毒检疫,严格控制不当引种是切断罗氏沼虾病毒性病原传播途径的主要手段。由于无脊椎动物没有完整的免疫系统,其病毒性疾病也无有效治疗手段,因此监控病原和切断病原传播途径已成为当前罗氏沼虾病毒性疾病预防首要手段。本研究设计针对罗氏沼虾野田村病毒和双顺反子病毒的引物而建立的双重 RT-PCR 检测方法正迎合了当前的需求。该方法可以作为临床对此两种病毒监控的有力手段,为罗氏沼虾病毒性疾病的预防奠定基础。

参考文献:

- [1] YOGANANDHAN K, SRI WIDADA J, BONAMI J R, et al. Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2005, 28(2): 65-69.
- [2] VAN HULTEN M C W, WITTEVELDT J, PETERS S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001, 286(1): 7-22.
- [3] MARI J, POULOS B T, LIGHTNER D V, et al. Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses [J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83(4): 915-926.
- [4] 钱冬,石正丽,曹铮,等.罗氏沼虾苗种肌肉白浊病诺达病毒的分离和特性研究[J].*中国水产科学*, 2003, 10(6): 457-461.
- [5] 雷质文,黄捷,杨冰,等.对虾病毒病的研究现状[J].*渔业科学进展*, 2000, 21(2): 77-85.
- [6] 钱冬,杨国梁,刘问,等.罗氏沼虾苗种肌肉白浊病病原的初步研究[J].*水生生物学报*, 2002, 26(5): 472-476.
- [7] 钱冬,刘问,潘晓艺,等.罗氏沼虾诺达病毒 TAS-ELISA 检测法的建立及应用研究[J].*浙江大学学报:农业与生命科学版*, 2006, 32(4): 377-382.
- [8] 曾地刚,雷爱莹.逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测罗氏沼虾诺达病毒[J].*广西农业科学*, 2006, 37(6): 735-737.
- [9] 潘晓艺,沈锦玉,石正丽,等.罗氏沼虾双顺反子病毒基因组全序列及其应用:中国, CN201110296487.9[P]. 2012-02-15.
- [10] SRI WIDADA J, DURAND S, CAMBOURNAC I, et al. Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(10): 583-590.
- [11] SAHUL HAMEED A S, YOGANANDHAN K, SRI WIDADA J, et al. Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection [J]. *Aquaculture*, 2004, 238: 127-133.
- [12] PUTHAWIBOOL T, SENAPIN S, FLEGEL T W, et al. Rapid and sensitive detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawns by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2010, 24(5): 244-249.
- [13] 潘晓艺,沈锦玉,郝贵杰,等.罗氏沼虾双顺反子病毒的 LAMP 检测试剂盒及检测方法:中国, CN201110239776.5[P]. 2011-12-14.
- [14] ROMESTAND B, BONAMI J R. A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(2): 71-75.
- [15] ANONYMOUS. RT-PCR based diagnostic for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus [N]// SARANGI N, MOHAPATRA B C, DHIR B L. CIFA News 11. Bhubaneswar: Central Institute of Freshwater Aquaculture. 2004: 3-4.
- [16] YOGANANDHAN K, SRI WIDADA J, BONAMI J R, et al. Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2005, 28: 65-69.

Duplex RT-PCR detection and sequences comparison of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and *Macrobrachium rosenbergii* dicistrovirus

PAN Xiao-yi¹, LIU Du-juan^{1,2}, SHEN Jin-yu¹, ZHANG Yu-fei¹, LIN Ling-yun¹, WANG Jun-yi¹, HAO Gui-jie¹, YAO Jia-yun¹, XU Yang¹, YUAN Xue-mei¹

(1. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, Zhejiang, China; 2. College of Life Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang, China)

Abstract: *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and *Macrobrachium rosenbergii* dicistrovirus (MrDV) are the main viral pathogens of *Macrobrachium rosenbergii*. In order to detect the two viruses, two pairs of primers targeted sequences located within the MrNV capsid protein gene and MrDV RNA-dependent RNA polymerase (RDRP) gene amplified amplicons of 384 bp and 472 bp, respectively. The reaction conditions of the duplex RT-PCR were optimized and PCR products were sequenced. Meanwhile, the specificity and sensitivity of duplex RT-PCR were studied. Results reveal that optimum annealing temperature of duplex RT-PCR is 60 °C and the minimum concentrations of primers are 0.1 μmol/L of MrNV384 and 0.05 μmol/L of MrDV472. The detection limit of duplex RT-PCR was determined to be 360 fg of tissue total RNA for both the viruses. The two pairs of primers were found to be specific to MrNV and MrDV respectively, and did not to react to either Taura syndrome virus (TSV), White spot syndrome virus (WSSV), Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), or *Aeromonas hydrophila* TPS-30. Sequence analysis of RDRP gene amplicons of MrDV revealed no variations. By contrast, sequence analysis of MrNV amplicons showed many variations in nucleotide sequences of the capsid protein gene. The phylogenetic tree shows that the stains of MrNV, collected from Yangtze River delta in 2011, are from two genotypes, Chinese and Southeast Asia genotypes. This new duplex RT-PCR method could be applied for routine health monitoring, early virus detection, and studying virus-host interaction, detection of carriers and screening of broodstock.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; dicistrovirus; nodavirus; duplex RT-PCR