

对虾病毒 DNA/RNA 的实时荧光定量 RT-PCR 同步检测方法研究

沈 颢¹, 王忠发², 胡兴娟¹, 顾松叶²

(1. 舟山出入境检验检疫局, 浙江 舟山 316000; 2. 舟山市疾病预防控制中心, 浙江 舟山 316021)

摘要: 为建立同步检测对虾 DNA/RNA 病毒的实时荧光定量反转录 PCR(RT-PCR)方法, 提高检验检疫工作效率, 探索了一种新的实时荧光定量 PCR 扩增反应程序。结果显示, 应用优化的实时荧光定量 RT-PCR 检测 4 种对虾病毒(白斑综合症病毒、传染性皮下及造血器官坏死病毒、桃拉综合症病毒、黄头病毒)DNA/RNA, 扩增曲线形态典型, 扩增效率理想(E 值分别为 1.06、1.07、0.92、0.92), 标准曲线线性良好($r=1$), 重复性一致(标准差 0.05~0.46, 变异系数 0.26%~1.62%), 灵敏度高, 且与实时荧光定量 PCR 相比差异不显著(平均 C_t 值误差 0.04~0.40, t 值 0.53~2.50, $P>0.05$), 检测时间约 1 h。优化的荧光定量 RT-PCR 可以用于 4 种对虾病毒 DNA/RNA 的快速定量检测。

关键词: 荧光定量 RT-PCR; 对虾病毒; 同步扩增 DNA/RNA

中图分类号: S945.4 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)10-0146-03

Study on a Real-time RT-PCR for Detection of DNA/RNA Viruses of Shrimp

SHEN Biao¹, WANG Zhong-fa², HU Xing-juan¹, GU Song-ye²

(1. Zhoushan entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan 316000, China;

2. Zhoushan Centers for Disease Control and Prevention, Zhoushan 316021, China)

Abstract: To increase the inspection and quarantine efficiency of DNA/RNA viruses of shrimp, a real-time RT-PCR assay was established and optimized for simultaneously detecting four viruses (WSSV, IHNV, TSV, YHV) of shrimp. The optimized real-time RT-PCR generates typical amplification curves, ideal amplification efficiencies ($E=1.06, 1.07, 0.92, 0.92$), well linear standard curve ($r=1$), uniform repeatability (Standard deviation distribution between 0.05 and 0.46, variation coefficient distribution at 0.26%–1.62%), and high sensitivity, with no significant difference compared with the real-time PCR. The total detection time is about 1 h. The optimized real-time RT-PCR assay can be used for the rapid detection of 4 kinds of shrimp viruses.

Key words: real-time RT-PCR; shrimp virus; synchronous amplification of DNA/RNA

白斑综合症病毒(WSSV)、传染性皮下及造血器官坏死病毒(IHNV)、桃拉综合症病毒(TSV)和黄头病毒(YHV)极大地危害对虾养殖,其跨国、跨地区传播已受到国际兽疫局(International office of Epizootic Disease, OIE)与国家质检总局的高度重视,并被列为检验检疫项目^[1]。其中, WSSV、IHNV 为 DNA 病毒, TSV、YHV 为 RNA 病毒。按

照国家质检总局的行业标准,检测 WSSV 用套式 PCR(SN/T 1151.2-2002)、IHNV 用 PCR(SN/T 1673-2005)、TSV 和 YHV 则用反转录 PCR(RT-PCR)来检测(SN/T 1151.1-2002、SN/T 1151.4-2003)。由于 PCR 扩增反应程序不同,1 份检验样本需做 3 次普通 PCR 和 2 次 RT-PCR 才能完成对 4 种对虾病毒的检测,检测时间需 3~7 d,严重影响了

收稿日期: 2013-04-26

作者简介: 沈颢(1967-),男,浙江舟山人,高级工程师,本科,主要从事食品安全方面的研究。E-mail: sb@zs.ziq.gov.cn

检验检疫的时效性。本研究探索了一种新的实时荧光定量 RT-PCR 同步检测 4 种对虾病毒 DNA/RNA 的方法,以期为今后虾产品及卤虫等生物饵料进出口检验检疫及养殖对虾疫病的快速诊断控制、健康亲虾筛选提供一种快速简单、定量准确、实用高效的核酸定量检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试对虾病毒 WSSV、IHHNV 由浙江省海洋水产研究所提供;TSV、YHV 分别由舟山出入境检验检疫局、舟山市水产养殖病害防治院提供。

1.1.2 试剂 实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒、实

时荧光定量 PCR 试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;病毒核酸提取试剂盒购自 QIAGEN 公司。

1.1.3 仪器 实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士罗氏公司;台式高速离心机为上海医用分析仪器厂生产。

1.2 引物

WSSV、IHHNV 实时荧光定量 PCR 引物、探针序列分别参照文献[2-3],TSV、YHV 实时荧光定量 RT-PCR 引物、探针序列分别参照文献[4-5]。WSSV、IHHNV、TSV、YHV 普通 PCR 和普通 RT-PCR 的引物序列参照国家质检总局的行业标准(SN/T 1151.2-2002、SN/T 1673-2005、SN/T 1151.1-2002、SN/T 1151.4-2003)。

表 1 4 种对虾病毒实时荧光定量 RT-PCR 引物

病毒	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')	扩增长度/bp	GenBank 登录号
TSV	CAAACAACGCGCATTGCTTC	TAATGTTCTCGCATGTCA	73	AF277675.1
YHV	GTCCCGGCAATTGTGAT	GGTTCCTCCGCTGGTCTCTC	82	EU487200.1
WSSV	CCAGAGATGGGAGTAACAC	GAAGTATTTCGCAACAGAGGAG	84	AF332093.1
IHHNV	ACATAGAGCTACAATCCT	CTGAAGCGACTACGGTACTTG	77	GQ475529.1

1.3 4 种对虾病毒 DNA 和 RNA 提取及反转录

DNA 提取:取 1.5 mL EP 管 1 支,加入待检样本悬浮液 100 μ L,再加 DNA 提取剂 100 μ L 混匀,100 $^{\circ}$ C 反应 2 min,15 000 r/min 离心 2 min,上清即为模板 DNA^[6]。RNA 提取按试剂盒说明书进行,于 42 $^{\circ}$ C 反转录 5 min 获得 cDNA。

1.4 对虾病毒 cDNA 和 DNA 的扩增反应体系

cDNA 扩增反应体系:2 \times One step RT-PCR Buffer III 10 μ L, Ex Taq 0.4 μ L; PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μ L, 上、下游引物(20 μ mol/L)及 TaqMan 探针(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, RNase Free ddH₂O 6.0 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L, 反应总体积 20 μ L。DNA 扩增反应体系:2 \times Premix Ex Taq 10 μ L, 上、下游引物(20 μ mol/L)及 TaqMan 探针(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, 无菌 ddH₂O 6.8 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, 反应总体积 20 μ L。

1.5 对虾病毒 RNA 和 DNA 的扩增反应程序

42 $^{\circ}$ C 反转录 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 25 s,共 40 个循环。

1.6 4 种对虾病毒定量标准品制备

根据 4 种对虾病毒实时荧光定量 PCR 扩增产物序列,委托 TaKaRa 公司构建阳性质粒,把每种质粒质量浓度(ng/ μ L)换算成拷贝数量/ μ L,用核酸稀释剂连续 10 倍稀释成梯度浓度,取 4~6 个合适的

梯度浓度作为定量标准品。

2 结果与分析

2.1 4 种对虾病毒同步检测所需时间

对虾病毒 DNA 与 RNA 提取所需时间分别为 5 min 和 20 min,实时荧光定量 RT-PCR 所需时间为 35 min。从核酸提取到检测完成共需时间为 1 h。按照国家质检总局的行业标准方法检测 WSSV、IHHNV、TSV 和 YHV,需要做 3 次普通 PCR 与 2 次 RT-PCR 扩增,而本方法利用实时荧光定量 RT-PCR 把 4 种病毒的不同核酸同步扩增 1 次完成,从而使检测时间从 3~7 d 缩短至 1 h 左右。

2.2 实时荧光定量 RT-PCR 同步检测 4 种对虾病毒的扩增效率与标准曲线

对 TSV、YHV、IHHNV 与 WSSV 的 E 值测定结果分别为 1.06、1.07、0.92、0.92,均处于理想值范围。上述 4 种病毒的 r 值均达到 1。表明用 RT-PCR 检测 4 种对虾病毒的扩增效率与标准曲线线性均良好。

2.3 实时荧光定量 RT-PCR 与实时荧光定量 PCR 检测 IHHNV、SSV 的灵敏度与重复性结果

分别用实时荧光定量 RT-PCR 与实时荧光定量 PCR 对 5 个梯度浓度的 IHHNV 和 WSSV 检测结果的 C_t 值作比较。从表 2、表 3 可以看出,2 种 PCR 方法的检测灵敏度与重复性无差异。

表 2 2 种实时荧光定量 PCR 检测 IHNV DNA 灵敏度与重复性比较 ($n=3$)

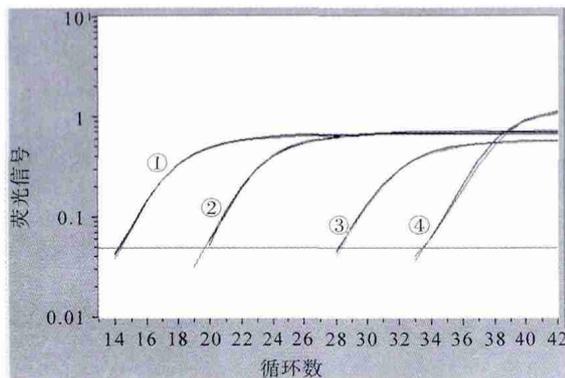
病毒含量 (拷贝/ μL)	实时荧光定量 PCR C_t 值		实时荧光定量 RT-PCR C_t 值		t	P
	$\bar{x} \pm s$	CV/%	$\bar{x} \pm s$	CV/%		
10^7	18.03 ± 0.28	1.55	17.63 ± 0.27	1.53	1.78	>0.05
10^6	21.14 ± 0.11	0.52	21.10 ± 0.06	0.28	0.56	>0.05
10^5	24.93 ± 0.19	0.76	24.76 ± 0.16	0.65	1.18	>0.05
10^4	28.13 ± 0.12	0.43	28.39 ± 0.46	1.62	0.96	>0.05
10^3	31.42 ± 0.30	0.96	31.76 ± 0.24	0.76	1.53	>0.05

表 3 2 种荧光定量 PCR 检测 WSSV DNA 灵敏度与重复性比较 ($n=3$)

病毒含量 (拷贝/ μL)	实时荧光定量 PCR C_t 值		实时荧光定量 RT-PCR C_t 值		t	P
	$\bar{x} \pm s$	CV/%	$\bar{x} \pm s$	CV/%		
10^7	19.56 ± 0.05	0.26	19.51 ± 0.06	0.31	1.11	>0.05
10^6	23.52 ± 0.15	0.65	23.77 ± 0.08	0.34	2.50	>0.05
10^5	26.53 ± 0.18	0.68	26.61 ± 0.19	0.71	0.53	>0.05
10^4	30.43 ± 0.15	0.49	30.18 ± 0.34	1.13	1.17	>0.05
10^3	34.13 ± 0.23	0.67	33.88 ± 0.20	0.59	1.42	>0.05

2.5 4 种对虾病毒实时荧光定量 RT-PCR 同步检测效果

用实时荧光定量 RT-PCR 同步检测不同浓度的 TSV 和 YHV 的 RNA 以及 WSSV 和 IHNV 的 DNA, 不同核酸类型的 4 种病毒样本扩增效率均比较理想 ($E=1.00$), 并呈现出典型的扩增曲线。2 种 DNA 病毒 (WSSV、IHNV) 在实时荧光定量 RT-PCR 反应程序上的重复性良好, 与 2 种 RNA 病毒扩增效果相同 (图 1)。



①. $4.2 \times 10^9 / \mu\text{L}$ TSV; ②. $1.8 \times 10^7 / \mu\text{L}$ YHV;
③. $3.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$ WSSV; ④. $1.7 \times 10^2 / \mu\text{L}$ IHNV

图 1 荧光定量 RT-PCR 同步检测 4 种对虾病毒效果

3 结论与讨论

本研究结果表明, 用实时荧光定量 PCR 和实时荧光定量 RT-PCR 平行检测 IHNV、SSV 重复性一致, 灵敏度无差异, 标准曲线线性良好, 定量检测准确性高。建立的实时荧光定量 RT-PCR 反应程序用于 WSSV 和 IHNV 等 DNA 病毒的检测, 可获得与实时荧光定量 PCR 相同的效果。另外, 本试验验证了利用该实时荧光定量 RT-PCR 反应程序

同步检测 TSV、YHV、WSSV、IHNV 的可行性, 验证结果按 4 种对虾病毒的核酸含量高低有规律地显示出典型的扩增曲线及良好的重复性和较高的灵敏度。

一直以来, PCR 检测 DNA、RT-PCR 检测 RNA, 因此, 对不同核酸类型的病毒不能进行同步检测, 检测时间明显延长。本研究创建的实时荧光定量 RT-PCR 反应程序可以同步检测 TSV、YHV、WSSV、IHNV 4 种对虾病毒的 RNA/DNA。其对 WSSV 和 IHNV 等 DNA 病毒的检测效果与实时荧光定量 PCR 完全相同。检测时间与行业标准方法相比, 从原来的 3~7 d 缩短到 1 h 左右, 明显提高了检验检疫的工作效率。

参考文献:

- [1] 熊炜, 邱璐, 李健, 等. 上海检验检疫局从泰国进境草虾中检出虾黄头病毒[J]. 检验检疫科学, 2006, 16(6): 61-62.
- [2] 王忠发, 邵俊斌, 沃健儿, 等. TaqMan 荧光定量 PCR 快速检测白斑综合症病毒的方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(6): 663-665.
- [3] 王忠发, 何伟贤, 许文军, 等. 实时荧光定量 PCR 快速检测对虾 IHNV 载量方法的建立和应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(9): 1591-1593.
- [4] 顾松叶, 王忠发, 施慧, 等. 快速荧光定量 RT-PCR 检测对虾 Taura 综合征病毒 (TSV) 的方法建立与应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(9): 2213-2216.
- [5] 王忠发, 沈飙, 王海, 等. YHV 的荧光 RT-PCR 定量检测试剂盒及检测方法: 中国, 201110181999. 0[P]. 2011-11-02.
- [6] 王忠发. 实时荧光定量 PCR 模板 DNA 快速制备的方法建立与应用[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 43(3): 248-250.