

二温式多重 PCR 检测鉴别对虾白斑综合征病毒(WSSV)和传染性皮下及造血器官坏死病毒(IHHNV)的研究与应用

谢芝勋, 庞耀珊, 刘加波, 邓显文, 唐小飞

(广西壮族自治区兽医研究所, 广西 南宁 530001)

摘要: 建立了1种同时检测对虾白斑综合征病毒(WSSV)、传染性皮下和造血器官坏死病毒(IHHNV)的二温式多重 PCR 技术。根据基因库中 WSSV (AF369029) 和 IHHNV (NC002190) 基因序列, 设计了两对分别与 WSSV 和 IHHNV 某段保守基因序列互补的引物, 用这两对引物对同1样品中的 WSSV 和 IHHNV DNA 模板进行多重 PCR 扩增, 结果均同时得到了两条大小与实验设计相符的 593 bp (WSSV) 和 356 bp (IHHNV) 特异性多重 PCR 扩增条带, 而对其他对虾疾病病原的 PCR 扩增结果均为阴性; 敏感性测定结果表明, 该多重 PCR 技术最低能检测到 WSSV 和 IHHNV DNA 各 100 pg。用该多重 PCR 对 400 份临床病料进行检测, 结果 230 份检出 WSSV, 阳性率 57.5%; 96 份检出 IHHNV, 阳性率 24%; 56 份同时检出 WSSV 和 IHHNV, 阳性率 14%。18 份为阴性, 阴性率为 4.5%。结果提示了 WSSV 和 IHHNV 广泛存在于中国南方的养殖对虾中, 作者建立的二温式多重 PCR 可以用于这两种病毒的临床快速检测和鉴别诊断。

关键词: 多重聚合酶链式反应; 检测; 对虾; 白斑综合征病毒(WSSV); 传染性皮下和造血器官坏死病毒(IHHNV)

中图分类号: S945.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)12-0009-04

对虾白斑综合征病毒(WSSV)、传染性皮下和造血器官坏死病毒(IHHNV)是两种严重危害当前对虾养殖业的对虾病毒。WSSV 主要引起对虾甲壳内侧白斑病变, 资料表明, 有 40 多种对虾和非对虾甲壳动物以及一些水生昆虫幼虫携带 WSSV^[1]。IHHNV 可引起红额角对虾急性感染并呈现高死亡率(90%), 还可以引起凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei* Boone) 出现慢性“矮小残缺综合症”, 导致患病对虾生长缓慢, 表皮畸形^[2]。感染了 WSSV 和 IHHNV 的对虾可终身带毒, 通过垂直传播把病毒传给下一代和水平传播传给其它种群。广西沿海地区对虾养殖达 200 00 多公顷, 是国内对虾养殖较为发达的地区之一。近年来随着对虾种苗和水产品国际贸易交流增多, WSSV 和 IHHNV 在该地区也呈流行趋势, 对虾养殖中多种病毒混合感染也常有发生, 不但给它们之间的鉴别诊断和有效防治增加困难, 也给对虾养殖业造成了严重的经济损失。

目前对虾病毒病的诊断手段主要包括病理学和生物学方法、免疫学方法、分子杂交方法及 PCR 方法等。其中 PCR 方法是这些方法中特异性最强、敏感性最高的病原检测手段, 在国外已被广泛应用于对

虾病毒病的检测和诊断^[3-7]。多重 PCR 是一种特殊 PCR 形式, 其最突出特点, 即一次 PCR 反应, 可同时检测、鉴别出多种病原体, 在临床多种病原混合感染的鉴别诊断上具有其独特优势和很高的实用价值^[3,4]。

作者建立了二温式多重 PCR 同时检测鉴别 WSSV 和 IHHNV 的方法, 并用该多重 PCR 方法对广西沿海地区对虾养殖业 WSSV 和 IHHNV 感染状况进行了初步调查。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验用毒株

3 个 WSSV 和 3 个 IHHNV 广西地方毒株, 本实

收稿日期: 2004-08-26; 修回日期: 2005-03-20

基金项目: 广西科技攻关资助项目(桂科攻 0322006-3A)

作者简介: 谢芝勋(1963), 男, 广西博白人, 研究员, 主要从事动物传染病分子生物学及分子免疫学研究, 电话: 0771-3120371, E-mail: xiezhexun@126.com

实验室收集、鉴定并保存^[5,6]。

1.1.2 对照样品

无特殊病原体 (specific pathogen free, 以下简称 SPF) 亲虾样品, 从美国夏威夷海洋研究所 SPF 种虾场引进, 本实验室保存。对虾桃拉病毒 (TSV)、黄头病毒 (YHD)、弧菌和链球菌等, 均由本实验室保存^[6,7]。

1.1.3 病虾样品

400 份患病凡纳滨对虾, 取自广西沿海各地对虾养殖场。

1.1.4 生化试剂

PCR 试剂, 购自 TaKaRa 公司。

1.1.5 PCR 反应仪

PE9600 PCR 仪, 购自美国 Perkin Elmer Cetus 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

参照文献^[6], 取待检对虾肝胰腺、鳃、肌肉组织等共约 100 mg, 加入 900 μ L 2% 的 CTAB 裂解液 [含 2% CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide), 1.4 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl, pH=7.5。使用前加巯基乙醇到终质量分数为 0.25%], 匀浆。室温作用 2 h 后, 加入 600 μ L 平衡酚: 氯仿 (1:1), 震荡混合, 室温作用 5 min, 在 10 000 r/min 离心 10 min, 抽取上清液至另一新离心管, 加入等量的平衡酚: 氯仿 (1:1) 重复抽提 1 次。抽取上清液, 加入等量的异丙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 然后再 13 000 r/min 离心 15 min, 收集 DNA 沉淀, 再用 75% 乙醇 1 000 μ L 离心洗涤 1 次, 倒去乙醇, 将沉淀的 DNA 颗粒用适量的 TE 缓冲液溶解, 参照 Sambrook 方法^[10], 测定 DNA 纯度及浓度, 并置于 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 引物设计与合成

利用 Genbank 和 Dnastar 引物设计软件, 设计了两对分别与 WSSV (AF369029) 和 IHNV (NC002190) 某段基因序列互补的引物。其中 WSSV 引物扩增产物大小为 593 bp, IHNV 为 356 bp。引物由大连宝生物工程股份有限公司合成, 经薄层色谱法纯化, 为冻干品, 用时用适量灭菌超纯水溶解, 按 Sambrook 方法^[10] 测其质量浓度, 并分成 20 μ L/管, 保存于 -20 $^{\circ}$ C。引物寡核苷酸序列如下:

WSSV XZ301: 5' - GATGAGACAGCCCAAGTT-GTTAAAC - 3', WSSV XZ302: 5' - GCATCAACT-CCACAGCTTTATC - 3', IHNV XZ149: 5' - ATCGGTGCACTACTCGA - 3', IHNV XZ150: 5' -

T CGTACTGGCTGTT CATC - 3'。

1.2.3 二温式多重 PCR 条件的优化

实验采用 50 μ L 多重 PCR 反应体系, 其中 25 mmol/L MgCl₂ 5 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 0.5 μ L, 5 U/ μ L Taq 聚合酶 0.5 μ L, 25 pmol/ μ L WSSV 和 IHNV 上、下游引物各 1 μ L, WSSV 和 IHNV DNA 适量, 最后用 dH₂O 补足体积至 50 μ L。置 PCR 仪上, 按预先设定的程序对二温式多重 PCR 条件进行优化。

1.2.4 二温式多重 PCR 的特异性试验

把含有 WSSV 和 IHNV 核酸模板的样品与含有其他对照的对虾病原核酸样品, 分别加入到多重 PCR 反应体系中进行扩增, 以检测其特异性。

1.2.5 二温式多重 PCR 的敏感性试验

将抽提的 WSSV 和 IHNV DNA 作为模板分别测其含量后, 将核酸作 10 倍递进稀释, 并对上述模板进行多重 PCR 扩增以检测其敏感性。

1.2.6 二温式多重 PCR 产物的分析及目的片段的回收

取 10 μ L 多重 PCR 产物, 用 1% 琼脂糖凝胶以 5 V/cm 电压进行电泳, 溴化乙锭染色后, 在紫外光检测仪上观察, 并用凝胶成像系统拍照。以 DNA 标准分子量为参照, 分析扩增结果, 并回收 593 bp 的 WSSV 和 356 bp 的 IHNV 目的片段。

1.2.7 多重 PCR 产物的克隆测序

将 WSSV 和 IHNV 多重 PCR DNA 片段回收、纯化, 克隆到 PMD-18T 载体上, 送大连宝生物技术责任有限公司完成测序。

1.2.8 检测试验

应用本研究所建立的二温式多重 PCR, 对 400 份取自广西沿海各地对虾养殖场患病凡纳滨对虾进行检测。

2 结果

2.1 二温式多重 PCR 条件优化结果

通过对二温式多重 PCR 扩增的温度、时间和循环次数等的优化, 最后确定二温式多重 PCR 的最佳反应模式为 94 $^{\circ}$ C 5 min, 然后进入 94 $^{\circ}$ C 45 s, 61.5 $^{\circ}$ C 2 min 的循环, 共循环 35 次; 最后经 61.5 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 后于 4 $^{\circ}$ C 结束反应。

2.2 多重 PCR 的特异性扩增结果

将 WSSV 和 IHNV DNA 及其他对照病原的核酸分别进行多重 PCR 扩增, 结果所有含有 WSSV 和 IHNV DNA 的样品均能扩增出与试验设计大小相符的 593 bp 和 356 bp 的两条明亮条带, 而 SPF 亲

虾组织及对照病原的核酸却扩增不出任何条带。结果见图 1。

2.3 二温式多重 PCR 敏感性扩增结果

该二温式多重 PCR 最低能检测到 WSSV 和 IH-HNV DNA 各 100 pg。结果见图 2。

2.4 检测试验结果

该二温式多重 PCR 对 400 份病虾样品进行检测, 结果有 230 份样品为 WSSV 阳性和 96 份为 IH-HNV 阳性, 其中有 56 份为 WSSV 和 IH-HNV 都为阳性, 表明有两种病毒同时混合感染。结果见图 3。

2.5 二温式多重 PCR 产物克隆测序结果

回收纯化的 WSSV 和 IH-HNV 扩增片段所测得的序列全长分别为 593 bp 和 356 bp。

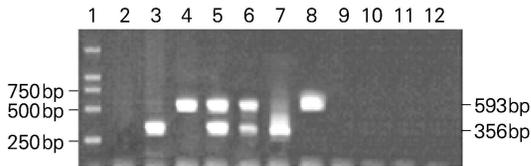


图 1 二温式多重 PCR 特异性试验

Fig. 1 Specificity of two-temperature multi-PCR for WSSV and IH-HNV

1. DL 2 000 bp DNA marker; 2. SPF 凡纳滨对虾样品阴性对照; 3. IH-HNV 阳性对照; 4. WSSV 阳性对照; 5, 6. WSSV+ IH-HNV; 7. IH-HNV; 8. WSSV; 9. TSV; 10. YHD; 11. 溶血弧菌; 12. 链球菌

1. DL 2 000 bp DNA marker; 2. SPF *Litopenaeus vannamei* negative control; 3. IH-HNV positive control; 4. WSSV positive control; 5, 6. WSSV + IH-HNV; 7. IH-HNV; 8. WSSV; 9. TSV; 10. YHD; 11. *Vibrio*; 12. *Streptococcus*

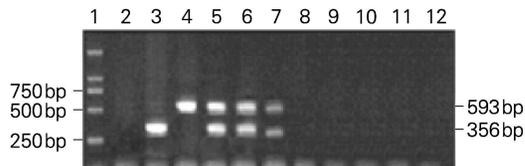


图 2 二温式多重 PCR 敏感性试验

Fig. 2 Sensitivity of two-temperature multi-PCR for WSSV and IH-HNV

1. DL 2 000 bp DNA marker; 2. SPF 凡纳滨对虾样品阴性对照; 3. IH-HNV; 4. WSSV; 5. 10 000 pg; 6. 1 000 pg; 7. 100 pg; 8. 10 pg; 9. 1 pg; 10. 0.1 pg; 11. 0.01 pg; 12. 0.001 pg

1. DL 2 000 bp DNA marker; 2. SPF *Litopenaeus vannamei* negative control; 3. IH-HNV; 4. WSSV; 5. 10 000 pg; 6. 1 000 pg; 7. 100 pg; 8. 10 pg; 9. 1 pg; 10. 0.1 pg; 11. 0.01 pg; 12. 0.001 pg

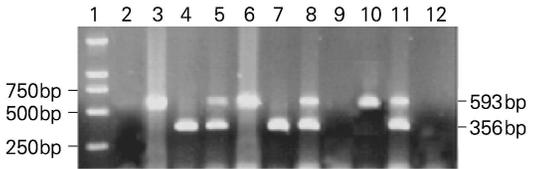


图 3 二温式多重 PCR 临床检测试验

Fig. 3 Results of two-temperature multi-PCR for the detection of clinical samples

1. DL 2 000 bp DNA marker; 2. SPF 凡纳滨对虾样品阴性对照; 3. WSSV; 4. IH-HNV; 5, 8, 11. WSSV、IH-HNV 均阳性病虾样品; 6, 10. WSSV 阳性病虾样品; 7. IH-HNV 阳性病虾样品; 9, 12. WSSV, IH-HNV 均阳性病虾样品

1. DL 2 000 bp DNA marker; 2. negative control; 3. WSSV; 4. IH-HNV; 5, 8, 11. clinical samples contained WSSV and IH-HNV; 6, 10. clinical samples contained WSSV; 7. clinical sample contained IH-HNV; 9, 12. clinical samples contained neither WSSV nor IH-HNV

3 讨论

PCR 技术是由 Saiki 等人 1985 年建立的一种 DNA 体外扩增克隆技术, 能在 2~3 h 内将靶 DNA 特异性放大(扩增)数百万倍, 极大提高了对靶 DNA 的检测和分析能力。由于其具有快速、简便、敏感、特异性强和易于自动化等特点, 近年来 PCR 技术在传染性疾病的检测和诊断上已得到广泛应用, 并显示出巨大应用发展的潜力。多重 PCR 是一种特殊的 PCR 形式, 通常是指在同一个反应体系中加入多对引物, 扩增同一模板的几个区域。作者根据多重 PCR 引物设计原则, 参考基因库中 WSSV (AF369029) 和 IH-HNV (NC002190) 高度保守的基因序列, 设计了两对引物分别扩增不同的对虾病毒模板, 从而达到 1 次 PCR 扩增, 就可以检测鉴别不同对虾病原核酸的目的。由于多重 PCR 反应总是有利于较小片段扩增的原则, 因此, 作者在设计多重 PCR 引物时尽量让不同扩增片段大小差别不要太大, 该二温式多重 PCR 的两个扩增片段分别为 593 bp 和 356 bp, 两片段之间的大小差别既不是很大, 又有一定差异, 能在凝胶电泳中区别开来。从试验结果可以看出, 只要多重 PCR 引物设计合理, 反应条件选择得当, 可以获得最佳的多重 PCR 扩增效果, 即同时扩增两个特异的 WSSV 和 IH-HNV 条带。

本研究所建立的二温式多重 PCR 技术对 3 个 WSSV 和 3 个 IH-HNV 毒株的 DNA 进行了多重 PCR 检测, 结果均同时得到了与实验设计大小相符的 2 条分别为 593 bp (WSSV) 和 356 bp (IH-HNV) 的

扩增带,而对 SPF 健康对虾组织及其他对照病原体核酸的扩增结果均为阴性,说明该二温式多重 PCR 具有良好的特异性。由于该二温式多重 PCR 不需要进行 2 次 PCR,在几小时内就可完成对 WSSV 和 IHNV 的快速鉴定,这在对虾生产中 WSSV 和 IHNV 病害的防制上有重要意义。

敏感性试验结果表明,该二温式多重 PCR 最低能同时检测到 100 pg 的 WSSV 和 IHNV DNA 模板,检测出如此微量的病原 DNA,说明该方法可直接用于病虾的检测,也表明了该二温式多重 PCR 为一种高灵敏度的病原鉴别检测方法。

应用所建立的二温式多重 PCR 技术对取自广西对虾养殖场的 400 份病虾样品进行检测,其中 WSSV 阳性样品 230(230/400, 57.5%) 份和 IHNV 阳性样品 96(96/400, 24%) 份,有 56(56/400, 14%) 份为这两种病毒混合感染。表明 WSSV 和 IHNV 不仅在广西沿海地区养殖对虾中已呈现出区域性流行趋势,并且两种病毒混合感染现象也十分普遍。在对虾病毒还不能在传代细胞系中大量增殖培养及做进一步检测、分析的情况下,该研究建立的具高度特异性和敏感性的 WSSV 和 IHNV 二温式多重 PCR 检测技术,对这两种病原体混合感染的鉴别诊断和有关防治,将具有十分重要的实用价值。

参考文献:

[1] Lo C F, Ho C H, Peng S E, *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimps, crabs and other arthropods[J]. *Dis Aquat Org*, 1996, 27: 215-225.

- [2] Bell T A, Lightner D V. IHNV virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 1984, 38: 185-194.
- [3] 黄捷,杨丛海,于佳. T-E 染色法用于对虾暴发性流行病的现场快速诊断[J]. *海洋科学*, 1995, 1: 29-34.
- [4] 黄灿华,张建红,高玮,等. 应用光镜和电镜对病虾组织细胞病理变化的观察与分析[J]. *中国病毒学*, 1997, 12(4): 364-369.
- [5] 涂小林,钟江,高双诚,等. 中国对虾一种杆状病毒的 ELISA 检测方法[J]. *水产学报*, 1995, 19: 315-321.
- [6] 庞耀珊,谢芝勋,谢志勤,等. 二温式 PCR 检测对虾白斑综合征病毒[J]. *中国兽医杂志*, 2003, 4: 43-45.
- [7] 庞耀珊,谢芝勋,何竞铭,等. 二温式 RT-PCR 检测对虾 Taura 综合征病毒的研究[J]. *海洋科学*, 2004, 2: 54-57.
- [8] Pang Y, Wang H, Girshick T, *et al.* Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents[J]. *Avian Dis*, 2002, 46(3): 691-699.
- [9] 谢芝勋,谢志勤,庞耀珊,等. 应用多重聚合酶链反应同时检测鉴别鸡新城疫病毒、鸡传染性支气管炎病毒、鸡传染性喉气管炎病毒和鸡毒支原体的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 6: 443-446.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd Ed. [M]. New York: Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Studies on development of two-temperature multiplex PCR for WSSV and IHNV

XIE Zhixun, PANG Yaoshan, LIU Jiabo, DENG Xianwen, TANG Xiaofei

(Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

Received: Aug., 26, 2004

Key words: multiplex PCR; detection; shrimp; WSSV; IHNV

Abstract: A two-temperature multiplex polymerase chain reaction was optimized to simultaneously detect two pathogens including white spot syndrome virus (WSSV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in this article. Two sets of specific primers were designed according to the sequences of (下转第 24 页)

(上接第 12 页)

WSSV(AF369029) and IHNV(NC002190) in Genbank. It was shown that the all samples, which contained WSSV and IHNV, could be amplified by the multiplex PCR using these two sets of primers, yielding two specific bands of WSSV 593 bp and IHNV 356 bp, but no specific bands were amplified from other penaeid shrimp pathogenic virus and bacteria. As little as 100 pg of WSSV and 100 pg of IHNV DNA were detected respectively using gel electrophoresis in this multiplex PCR. We used this multiplex PCR to detect 400 samples from some farms in south China. Results showed that WSSV could be detected in 230 samples, IHNV could be detected in 96 samples and both WSSV and IHNV could be simultaneously detected in 56 samples. The other 18 samples were negative to these two pathogens. It suggested that WSSV and IHNV existed in the cultivated penaeid shrimps in south China and this multiplex PCR could be used as a sensitive tool to detect WSSV and IHNV in clinical samples, simultaneously.

(本文编辑:谭雪静)