

PCR 检测对虾白斑综合征病毒(WSSV)中 假阴性的探讨*

闫冬春^{1,2} 董双林¹ 黄 捷³

(1. 中国海洋大学水产学院 教育部水产养殖重点实验室 青岛 266003; 2. 鲁东大学生命科学学院 烟台 264025;
3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 采用 PCR、核酸探针斑点杂交、组织切片等方法研究了 PCR 检测白斑综合征病毒(WSSV)中的假阴性问题。设计了一对引物用于 PCR 检测 WSSV, PCR 扩增的产物长度为 235bp, 检出极限为 0.1pg WSSV DNA。结果表明, PCR 检测 15 例攻毒螯虾鳃样品时出现一例阴性, 而经 10—10⁶ 倍稀释后的样品却呈现阳性, 推断 PCR 出现了假阴性。核酸探针斑点杂交及组织切片结果表明注射 WSSV 的螯虾鳃组织确已被严重感染, 进一步证实了 PCR 假阴性。根据 PCR 的检出极限及模板稀释梯度, 推算出该 PCR 能成功扩增的引物与模板浓度的比例范围约为 2.4 × 10⁵—2.4 × 10¹⁰。

关键词 PCR, 假阴性, 白斑综合征病毒
中图分类号 Q789

由白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)引起的对虾暴发性流行病于 1992—1993 年首次发现于亚洲东部, 蔓延非常迅速, 1995 年在西半球的一些国家开始流行(Lightner, 1999)。WSSV 毒力极强, 被感染虾池虾的死亡率在 3—10 天可达到 100%(黄捷等, 1995)。WSSV 每年给世界对虾养殖业带来巨大经济损失, 成为对虾养殖业可持续发展的主要障碍。目前, 组织病理学、免疫学及分子生物学的方法已应用于 WSSV 的检测, 其中聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)因能从微量 DNA 中合成大量的扩增产物而得到广泛应用(Kim *et al*, 1998; Kasornchandra *et al*, 1998; 夏春等, 1999)。

PCR 中较普遍遇到的问题是假阳性问题, 即由于外源 DNA 的污染, 在缺少模板 DNA 的样品中也能扩增出产物。PCR 假阳性问题早已引起人们的高度重视并采取了相应的防范措施, 如严格

划分 PCR 操作实验区、经常更换手套、紫外线照射、加入 UNG 酶防遗留污染等(萨姆布鲁克等, 2003)。PCR 的假阴性即在含有模板 DNA 的样品中不能扩增出预期产物, 在检验工作中也时常发生, 但常常被人们忽略, 严重影响了 PCR 的使用。作者在应用 PCR 方法检测白斑综合征病毒(WSSV)时多次遇到假阴性问题, 本文作者以一次 WSSV 攻毒实验中出现的 PCR 假阴性为例, 探讨模板引起的 PCR 假阴性问题及解决办法, 以期减少此问题的发生。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为 15 只克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*, 市场上称小龙虾), 于 2003 年 8 月 7 日购于青岛市南山市场, 暂养 1 周后于 8 月 14 日注射 WSSV 粗提液攻毒。虾死亡后, 取虾的一侧鳃用 SEMP 固定液固定后用于提取 DNA 做 PCR 及核

* 国家自然科学基金资助项目, 30371111 号; 国家 973 项目资助, G1999012011 号; 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题(2004); 烟台师范学院博士基金资助, 043301 号。闫冬春, 博士, 副教授, 现工作单位: 鲁东大学生命科学学院, 邮编: 264025, E-mail: yandch@tom.com

通讯作者: 黄 捷, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2004-10-25, 收修改稿日期: 2005-05-30

酸探针斑点杂交检测;对 PCR 检测中呈阴性的虾样,取另一侧鳃用 Davidson's 固定液固定后用于常规石蜡组织切片。

1.2 PCR 引物的设计

根据 WSSV DNA 全序列(Yang *et al*, 2001; van Hulten *et al*, 2001), 利用软件 Primer Premier 5.0 设计 PCR 引物。设计的引物序列为 5'-CCAA-GACATACTAGCGGATA-3'(O₁)和 5'-GACGACC-CTGACAGAATTAC-3'(O₂), 产物长度为 235bp。在 GenBank 上经 BLAST 比较, 与网上的 WSSV 碱基序列 100% 配对, 与其他物种的基因序列同源性很低。

1.3 样品的 PCR 扩增及检出灵敏度

每 25 μ l 反应体系中加灭菌水 14.25 μ l, 10 \times Buffer 2.5 μ l, 25mmol/L MgCl₂ 2.0 μ l, 用 dUTP 取代 dTTP 的 dNTP 混合物 2.5 μ l (其中 dATP、dCTP 和 dGTP 各 2mmol/L, dUTP 4mmol/L), 10 μ mol/L 引物混合物 2.5 μ l, 5U/ μ l *Taq* 酶 0.25 μ l, 模板 1 μ l。

PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 2min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 30s, 54 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5min, 1 个循环。扩增结束后, 经 1.5% 琼脂糖电泳检查结果。

PCR 检测灵敏度的确定采用模板 10 倍梯度稀释法。以 WSSV DNA 为模板, 按 10 倍稀释设 10ng/ μ l—0.1fg/ μ l 九个梯度(10、1、0.1、0.01ng/ μ l; 1、0.1、0.01pg/ μ l; 1、0.1fg/ μ l), 每 25 μ l 反应体系中加 1 μ l 模板, 以灭菌水为阴性对照。扩增产物经 1.5% 琼脂糖电泳, 能出现电泳条带的最低模板量定为 PCR 检测的最低检出限。

1.4 WSSV DNA 的提取

用于确定灵敏度的 DNA 为从提纯的 WSSV 中通过经典方法提取的 WSSV DNA(萨姆布鲁克等, 2003)。实验中的螯虾样品, 采用 SEMP 核酸采样液保存, 然后用煮沸-乙醇沉淀法快速提取 DNA(王旭等, 2000)。

1.5 组织切片的制备

按常规组织切片的步骤在程控组织脱水机上脱水、透明、浸蜡, 然后在石蜡包埋机上进行包埋, 切片后在程控切片染色机上脱蜡、H-E 染色, 在光学显微镜下观察照相。

1.6 用核酸探针斑点杂交分析法检测样品 DNA

经梯度稀释的样品 DNA 煮沸变性 10min, 每样取 1 μ l 点样于硝酸纤维素膜上, 80 $^{\circ}$ C 交联 2h 后, 在预杂交液中 65 $^{\circ}$ C 孵育 0.5—2h, 加入变性的

DIG 标记探针, 于 65 $^{\circ}$ C 孵育 6—16h; 2 \times SSC/0.1% SDS、0.1 \times SSC/0.1% SDS 洗膜; 膜在碱性磷酸酶标记的 DIG 抗体缓冲液中振荡 30min, 以 NBT/BCIP 为底物显色。探针的制备见闫冬春等(2004)。

2 结果

2.1 PCR 的检出灵敏度

由图 1 可知, 100—0.1pg 的模板在 235bp 处可明显看到扩增的条带, 0.01pg—0.1fg 模板量的扩增结果无条带出现, 说明 PCR-电泳检测 WSSV DNA 的检出极限为 0.1pg。

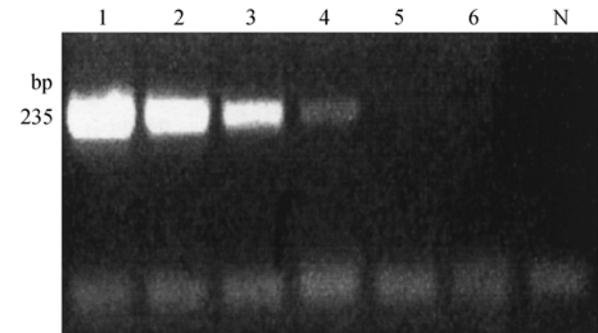


图 1 PCR 扩增可检测到的 WSSV DNA 的最低量

Fig. 1 Detection limit of WSSV DNA by PCR amplification

1—6: 100pg—1fg 连续 10 倍稀释的 WSSV DNA 模板; N: 阴性对照

2.2 螯虾攻毒实验情况

螯虾经注射 WSSV 粗提液, 两天后出现死亡, 第 7 天达死亡高峰, 第 10 天 15 只虾全部死亡。经核酸探针斑点杂交检测, 15 只虾均为 WSSV 阳性, 而在 PCR 检测中却出现了一例阴性。因为 PCR 检测的灵敏度要高于核酸探针斑点杂交检测, 作者推测 PCR 检测中出现的阴性可能为假阴性, 随后结合其他检测方法证实了攻毒实验中 PCR 假阴性的存在。

2.3 PCR 阴性样品经梯度稀释后的 PCR 检测

将攻毒实验中出现 PCR 阴性的螯虾鳃组织 DNA 进行 10—10⁹ 倍的连续 10 倍梯度稀释。PCR 检测结果显示, 未稀释的样品 DNA 在 PCR 检测中未出现预期的扩增片段(图 2 中 1), 而经 10—10⁶ 倍稀释后均可扩增出预期产物(图 2 中 2—7), 经 10⁷—10⁹ 倍(图 2 中 8—10)稀释后的样品 DNA 因模板量太低不能观察到扩增出的预期片段, 实验中的阳性对照(图 2 中 P)和阴性对照(图 2 中 N、N)均正常, 可以判断未稀释的攻毒螯虾鳃组织 DNA 在 PCR 检测中出现了假阴性。由图 1 可以

看出, 该 PCR 的检出极限为 0.1pg WSSV DNA, 图 2 中的检出极限为 10^6 倍稀释后的螯虾鳃组织 DNA, 因此可推断经 10^6 倍稀释后的螯虾鳃组织 DNA 中含有约 0.1pg/ μ l 的 WSSV DNA, 那么未稀释的螯虾鳃组织 DNA 中 WSSV DNA 的含量为 $0.1\text{pg}/\mu\text{l} \times 10^6 = 100\text{ng}/\mu\text{l}$, 即 100ng WSSV DNA 在 PCR 检测中出现了假阴性。大致推算一下此时模板与引物的摩尔数比: WSSV 全序列约为 $3 \times 10^5\text{bp}$, 每个 DNA 碱基的平均分子量近似为 324.5, 那么 WSSV DNA 的分子量 = $324.5 \times 3 \times 10^5 = 973.5 \times 10^5$, 100ng WSSV DNA 的摩尔数 = $100\text{ng} / (973.5 \times 10^5) = 1.027 \times 10^{-6}\text{nmol}$; 每管 PCR 反应体系中引物的量 = $10\mu\text{mol}/\text{L} \times 2.5\mu\text{l} = 2.5 \times 10^{-2}\text{nmol}$; 引物与模板的摩尔数比 = $2.5 \times 10^{-2} / (1.027 \times 10^{-6}) = 2.43 \times 10^4$, 即引物与模板的摩尔数比低于 2.4×10^4 时 PCR 已不能成功扩增。可进一步推算出图 2 中能成功扩增的引物与模板的比例范围约为 $2.4 \times 10^5 - 2.4 \times 10^{10}$, 低于此比例范围或高于此比例范围均不能成功扩增。

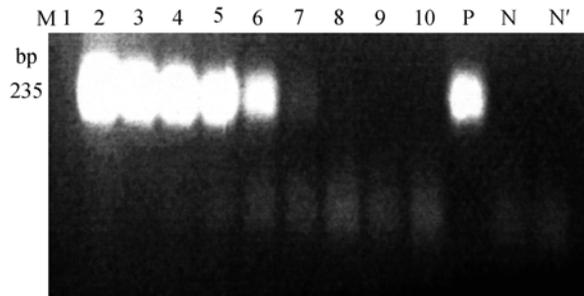


图 2 攻毒螯虾样品的 PCR 检测

Fig. 2 PCR Detection of WSSV-injected *P. clarkii* sample
M: Marker; 1—10: 连续 10 倍稀释的螯虾样品 DNA;
P: 阳性对照; N、N': 阴性对照

2.4 PCR 阴性样品的核酸探针斑点杂交检测

由图 3 可知, 未经稀释的螯虾鳃样品 DNA 及经 10 倍、 10^2 倍稀释的样品 DNA 在核酸探针斑点杂交中均能显色(图 3 中 1—3), 浓度低于 10^2 倍稀释的样品 DNA 均未显色。闫冬春等(2004)报道该探针检测到的 WSSV DNA 的最低极限为

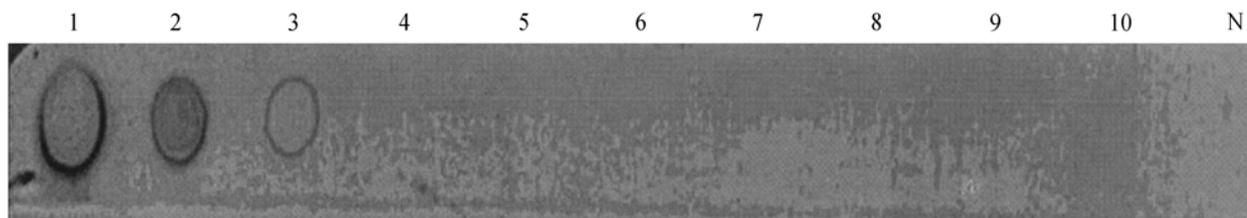


图 3 攻毒螯虾鳃组织 DNA 的核酸探针斑点杂交

Fig. 3 Dot-blot hybridization of WSSV-injected *P. clarkii* gill DNA
1—10: 连续 10 倍稀释的螯虾样品 DNA; N: 阴性对照

1ng, 图 3 中的检出极限为 10^2 倍稀释后的螯虾鳃组织 DNA, 因此可推断经 10^2 倍稀释后的螯虾鳃组织 DNA 中含有约 1ng/ μ l 的 WSSV DNA, 那么未稀释的螯虾鳃组织 DNA 中的 WSSV DNA 含量为 $1\text{ng}/\mu\text{l} \times 10^2 = 100\text{ng}/\mu\text{l}$, 这与图 2 中推算的浓度刚好吻合。

2.5 PCR 阴性螯虾鳃的组织形态观察

螯虾鳃的组织切片中, 部分细胞核明显肿大, 细胞膜、细胞形态模糊不清, 组织结构残缺松散, 呈现出组织坏死状态(图 4)。这与黄等(1995)报道的感染 WSSV 的病虾组织形态变化相同, 表明注射 WSSV 的螯虾鳃组织确已被严重感染, 从而也可以推断, 灵敏度高于组织切片的 PCR 检测更应该出现阳性结果, 阴性结果的出现是一种假象。

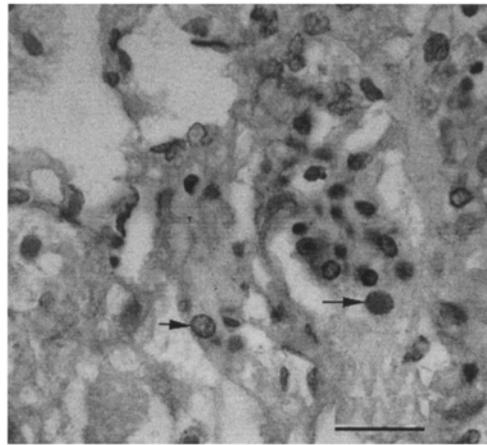


图 4 攻毒螯虾鳃组织切片观察

Fig. 4 Histological morphology of WSSV-injected *P. clarkii* gill
箭头示肿胀的细胞核, 核内结构消失。比例尺 = 20 μ m

3 讨论

造成 PCR 假阴性的原因很复杂, 主要有:
(1) 仪器因素: PCR 实验对仪器的依赖性是很高的, 如在提模板的过程中, 离心速度和离心时间不当都有可能造成模板未被成功分离的后果, 而这是很容易被忽视的。(2) 试剂质量问题: 试剂的质量问题涉及多个方面, 细胞的裂解、模板的

抽提、*Taq* 酶的活性等等, 其中任一环节出了问题都会引起结果的假阴性。(3) 核酸模板问题: DNA 模板的纯度和数量都会影响 PCR 扩增的效率。模板 DNA 的纯度应通过 260nm 和 280nm 处的光密度的测定来决定, 其比值应达 18 以上, 否则就需要进一步纯化。模板溶液中存在 PCR 抑制剂是导致扩增效率降低甚至扩增失败的原因, 如肝素能结合 DNA, 阻止 *Taq* 聚合酶的活性; 螯合剂 EDTA 能隔离酶活性所需的离子; 蛋白酶 K 能降解热稳定 DNA 聚合酶。核酸模板在扩增区出现断裂、蛋白粘附、空间位阻等模板质量问题都有可能引起扩增失败, 造成结果的假阴性或定量不准确。用于 PCR 扩增的 DNA 的量需在适当的范围内, 因为起始模板的量既影响产出也影响 PCR 特异性。如果数量太低, 合成物形成很少, 会因信号水平低而检测不到。相反, 过量的模板数量会使扩增特异性降低或无法扩增出产物(萨姆布鲁克等, 2003)。

在本文攻毒螯虾鳃的 PCR 检测中, 未经稀释的鳃组织 DNA 未能成功扩增, 斑点杂交及组织切片结果表明鳃组织已被严重感染, 显然, 未经稀释的鳃组织 DNA 在 PCR 检测中出现了假阴性。鉴于实验中的阳性对照和阴性对照正常, 可排除试剂质量问题及仪器因素。模板经 $10-10^6$ 倍稀释后能扩增出预期产物, 可以推测 PCR 假阴性是由于模板过量造成的。PCR 成功扩增需要引物与模板的比例在合适的范围内, 模板浓度过高使引物与模板量的比例下降, 这样就会导致引物量相对不足; 相反, 模板浓度过低会使引物与模板量的比例过高, 都将影响 PCR 成功扩增。在本文 PCR 反应条件下, 该比例范围约为 $2.4 \times 10^5-2.4 \times 10^{10}$, 低于此比例范围或高于此比例范围均不能成功扩增。该范围对于不同的引物序列、不同的反应条件(dNTP、 Mg^{2+} 浓度等)应有一定变化, 因为不同条件下 PCR 扩增的效率是有差异的, 如本文引物在不同 dNTP、 Mg^{2+} 浓度下的检测灵敏度及特异性是不同的(闫冬春等, 2003)。另外, 模板中杂质或抑制剂浓度过高可能也是导致本文假阴性的重要原因。稀释模板的过程中杂质或抑制剂同样得以稀释, 在较低的杂质或抑制剂浓度下 PCR 便能成功扩增。由模板过量造成的 PCR 假阴性问题很容易被忽视, 这种情况下可通过将模板稀释多个梯度来解决(图 2)。另外, 最可靠的办法是同时结合其他检测技术, 及时发现 PCR 检测

中的假阴性, 如本文中 PCR 与核酸探针斑点杂交、组织病理相结合等。

本实验中在经注射攻毒的 15 例螯虾样品中出现了一例假阴性, 假阴性率约为 6.6%。本文中作者是用简便方法(王旭等, 2000)从发病螯虾中提取螯虾与 WSSV 的总 DNA, 如果直接以提纯的 WSSV 或从提纯 WSSV 中提取的 DNA 为模板, 假阴性率会更高, 因此, PCR 假阴性是不容忽视的, 但也不能因此而否定 PCR 在检测 WSSV 中的应用。本文中所遇到的由模板浓度过大而引起的 PCR 假阴性问题一般只在攻毒实验、严重暴发白斑综合症的死虾样品等极端条件下才会出现, 对于 WSSV 含量相对较低的样品, 出现 PCR 假阴性的可能性很小。

参 考 文 献

- 王 旭, 史成银, 黄 捷, 2000. 用于 PCR 检测对虾皮下及造血组织坏死病毒(HHNBV)的一种快速提取 DNA 方法. 海洋水产研究, 21(1): 8—12
- 闫冬春, 黄 捷, 董双林等, 2003. PCR 检测对虾白斑综合征病毒(WSSV)中使用 UNG 防遗留污染. 海洋水产研究, 24(3): 29—33
- 闫冬春, 董双林, 黄 捷等, 2004. PCR-核酸探针斑点杂交法检测白斑综合征病毒(WSSV). 高技术通讯, 14(3): 33—36
- 夏 春, 黄 捷, 1999. PCR 法检测对虾皮下和造血器官坏死杆状病毒. 微生物学报, 39(2): 171—173
- 黄 捷, 宋晓玲, 于 佳等, 1995. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学. 海洋水产研究, 16(1): 1—10
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著, 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础等译, 2003. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 483—485, 605—607, 610
- Kasornchandra J, Boonyaratpalin S, Itami T, 1998. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction. Aquaculture, 164: 243—251
- Kim C K, Kim P K, Sohn S G *et al*, 1998. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSSV) in penaeid shrimp. Journal of Fish Diseases, 21: 11—17
- Lightner D V, 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHNV, WSSV and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. Journal of Applied Aquaculture, 9: 27—52
- van Hulten M C W, Witteveldt J, Peters S *et al*, 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology, 286(1): 7—22
- Yang F, He J, Lin X *et al*, 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. Journal of Virology, 75(23): 11811—11820

PCR FALSE NEGATIVE RESULT IN WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) DETECTION

YAN Dong-Chun^{1,2}, DONG Shuang-Lin¹, HUANG Jie³

(1. Aquaculture Research Laboratory, Department of Aquaculture, Ocean University of China, Qingdao, 266003; 2. Department of Life and Science, Ludong University, Yantai, 264025; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Based on whole DNA sequence of white spot syndrome virus (WSSV), a pair of primer was designed for the detection of WSSV with Primer Premier 5.0 program. The primer pair was 5'-CCAAGACATACTAGCGGATA-3' and 5'-GACGACCCTGACAGAATTAC-3' with a product fragment of 235bp, whose PCR detection limit was 0.1pg WSSV DNA. 15 *Procambarus clarkii* were injected with WSSV inoculum. One side gill of dead *P. clarkii* was fixed with SEMP to extract DNA for PCR and probe dot blot hybridization. For the samples with negative PCR detection result, the other side gill was fixed with Davidson's solution for routine paraffin section. A negative result occurred in all 15 WSSV inoculated *P. clarkii* in PCR detection. The DNA of the negative samples was then diluted 10-fold consecutively from 10 to 10⁹ times for PCR. The detection showed that positive results occurred when DNA sample of PCR negative was diluted to 10⁻⁶ times. No anticipated product appeared in the samples diluted to 10⁻⁷ - 10⁻⁹ times because the templates were too rare. Since all the positive and negative controls were normal, we believed that false PCR negative result occurred in undiluted sample DNA. In DNA probe dot blot hybridization detection, DNA of PCR-negative sample and its 10× and 10²×- time diluted solutions were all positive. Inflated nuclei, destructive and necrotic tissue were observed in *P. clarkii* gill tissue section. Results of DNA probe dot blot hybridization detection and histopathological section showed that *P. clarkii* gill tissue was seriously infected by WSSV, which proved again that the negative result of PCR was false. Since the templates that diluted 10⁻⁶ times was positive in PCR, the false negative result was probably resulted from too many templates that reduced the ratio of primer to template and lessened the PCR. Based on PCR detection limit and template dilution times, the best ratio of primer to template for successful amplification was 2.4×10⁵ - 2.4×10¹⁰. The false negative ratio was 6.6% for 1 false negative result in 15 WSSV injected *P. clarkii*. The ratio would be higher if the template was purified WSSV or WSSV DNA. So the PCR false negative result should not be ignored and the application of PCR technique in WSSV detection should be considered. PCR negative result arisen from excessive templates appeared only in extreme situation such as artificial infection or dead shrimp in explosive WSSV pond, which is very unlikely occur for the samples with low WSSV content. PCR false negative result arisen from excessive templates can be avoid by template dilution. A reliable way to check PCR false negative result was to use another detection method at a time.

Key words Polymerase chain reaction (PCR), False negative result, White spot syndrome virus (WSSV)