

杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)弹状病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

刘春, 曾伟伟, 王庆, 李凯彬, 王芳, 常藕琴, 梁慧丽, 吴淑勤*

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部渔药创制重点实验室,
广东省水产动物免疫技术重点实验室,广东广州 510380)

摘要: 为了建立一种能在临床上快速、准确检测杂交鳢弹状病毒(HSHRV)的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法,利用 PCR 技术扩增 HSHRV-C1207 G 蛋白的全长序列,构建重组质粒,作为荧光定量 PCR 的标准品,根据 HSHRV-C1207 G 蛋白的保守序列,设计合成了一对能特异性扩增 143 bp 片段的引物和 TaqMan 探针,以标准品为模板建立 HSHRV 的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法,并对该方法的灵敏度、可重复性和特异性进行评价。结果显示:建立的荧光定量 PCR 检测方法标准曲线有较好的线性关系,相关系数(R^2)为 0.999,斜率为 -3.290;荧光定量 PCR 最低可以检测到 10 个病毒核酸分子拷贝,而传统 PCR 方法最低可检测到 1×10^3 个拷贝;38 个平行样品重复性实验组内变异系数为 0.84%;对其他 6 种水产养殖常见病毒均无扩增反应。应用该方法对采集的 21 份患病鳢样品进行检测,其中 18 份为阳性,与细胞分离和电镜观察结果相同;以传统 PCR 方法检测同样的样品,仅 13 份为阳性。本研究建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法灵敏度高、特异性强,能较好的用于临床 HSHRV 的检测,对病毒病原定量检测与杂交鳢弹状病毒病的快速诊断具有重要意义。

关键词: 杂交鳢; 弹状病毒; G 蛋白; TaqMan real-time PCR; 检测方法

中图分类号: S 941

文献标志码: A

杂交鳢(*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂) 是以斑鳢(*Channa maculata*)为母本,乌鳢(*Channa argus*)为父本,通过杂交获得的子一代,杂交鳢综合了亲本的优点,在实际生产过程中具有生长速度快、抗逆性强、成活率高、耐运输、易驯食人工配合饲料等优点^[1-3]。由于杂交鳢的养殖经济效益明显,近年在全国范围内养殖规模不断扩大,已逐步替代乌鳢、斑鳢等鳢科鱼类成为主要的养殖品种^[4-5]。自然条件下,鳢科鱼类抗病能力极强,极少发病,但是近几年随着国内鳢科鱼类养殖业的发展,养殖密度不断增加,养殖水体水质也越来越差,不断有关于鳢科鱼类患病的报道,主要为诺卡氏菌^[6-8]、舒伯特气单胞菌(*Aeromonas schubertii*)^[9-11]等引起的细菌性疾病。2012年7

月以来,广东省的广州、佛山、中山、清远等多个地方养殖场暴发杂交鳢大规模死亡的流行性疾病,造成巨大的经济损失。本研究室从细菌学和病毒学 2 方面对患病鱼进行分析,确认引起养殖鱼暴发性死亡的疾病为弹状病毒病,其病原为杂交鳢弹状病毒(hybrid snakehead rhabdovirus, HSHRV)^[12]。

弹状病毒为线性负链单链 RNA 病毒,病毒粒子大小为(100~430)nm × (45~100)nm,形态似棒状或子弹状,通常具有 5 种主要结构蛋白(L, G, N, P, M)。弹状病毒科包括 175 种以上的成员,可感染脊椎动物、无脊椎动物及植物^[13]。鱼类弹状病毒因感染宿主广、毒株种类多、毒力强,严重危害各种淡水和海水鱼。迄今报道感染鱼类

收稿日期:2013-06-18 修回日期:2013-11-06

资助项目:国家科技支撑计划(2012BAD25B02);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)

通信作者:吴淑勤. E-mail: wushuqin001@21cn.com

的弹状病毒已有 20 多种,其中危害较大的有鲤春病毒血症病毒(SVCV)、病毒性出血性败血症病毒(VHSV)、传染性造血器官坏死病毒(IHNV)、牙鲆弹状病毒(HRV)和鳊鱼弹状病毒(SCRV)等^[14-18]。弹状病毒科分为 6 个属,即水泡性病毒属(*Vesiculovirus*)、狂犬病毒属(*Lyssavirus*)、短暂热病毒属(*Ephemerovirus*)、诺拉弹状病毒属(*Novirhabdovirus*)、质型弹状病毒属(*Cytorhabdovirus*)和细胞核弹状病毒属(*Nucleorhabdovirus*)^[19]。早在 20 世纪 80、90 年代,东南亚一带研究者就从野生和养殖鳢科鱼类体表溃疡病综合征(epizootic ulcerative syndrome, EUS)中分离到乌鳢弹状病毒(SHRV),并先后完成了其病原学特性研究和基因组序列分析^[20-22],国内还没有该病毒感染病例的相关报道。SHRV 全基因序列与本研究中的 HSHRV 同源性为 45.3%,亲缘关系较远,分类地位上 SHRV 属于诺拉弹状病毒属, HSHRV 则属于水泡性病毒属。研究发现引起广东省杂交鳢死亡的 HSHRV 主要流行株为 C1207 株,该毒株能在多种鱼类细胞中复制,人工感染杂交鳢死亡率高达 90%^[12]。为了及早发现养殖鱼类是否被 HSHRV 感染,有必要建立一种快速、准确、灵敏的检测方法。G 蛋白是弹状病毒中唯一糖基化的结构蛋白,其所有糖基化位点都位于膜外区,蛋白在病毒表面呈三聚体突起,是病毒与宿主细胞结合的配体,介导病毒的内吞作用并与毒力密切相关^[23-24],G 蛋白还是弹状病毒的主要保护性抗原,能刺激机体产生中和抗体,帮助机体抵抗病毒的感染^[25]。本研究根据 HSHRV-C1207 G 蛋白基因保守序列设计引物和探针,建立 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法,旨在为 HSHRV 定性和定量检测、致病机理研究和杂交鳢病毒病的防控提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

鲤鱼上皮细胞系(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)购自武汉大学细胞典藏中心;HSHRV-C1207、SCRV、SVCV、草鱼呼肠孤病毒(GCRV)、大口黑鲈虹彩病毒(LMBV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、尖塘鳢虹彩病毒(MSGIV)、IHNV 均由本实验室分离保存。

1.2 主要试剂

大肠杆菌 DH5 α 由本室保存;Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、PrimeScriptTM RT reagent Kit (TaKaRa) 试剂盒、DNA Taq 酶、dNTP、限制性内切酶、pMD18-T 载体、T4 连接酶、DNA 分子 Marker、Premix Ex TaqTM (Probe qPCR) 购自宝生物工程(大连)有限公司;Plasmid Mini Kit I 购自 Omega 公司;M199 培养基、犊牛血清、胰酶为 Gibco 公司产品;Trizol Reagent 购于 Invitrogen 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中 HSHRV G 蛋白基因序列(KC519324),应用 Primer5 软件设计特异性引物和探针,第一对引物(P1、P2)扩增 HSHRV G 蛋白全长序列,扩增产物长度为 1 560 bp,用于构建重组质粒,为制作标准曲线提供模板;第二对引物(HSHRV-2F、HSHRV-2R)和探针(HSHRV-2 probe)用于荧光定量 PCR 扩增,扩增产物长度为 143 bp。引物和探针由广州吉格生物科技有限公司合成。引物和探针序列为:

P1: 5'-CGCGGATCCATCATGAAATCAATCA-TTGCCT-3'

P2: 5'-CATCTGCAGAATTGATACTGCTGCA-AAGGG-3'

HSHRV-2F:5'-CACCAGTCATATCAATCC-3'

HSHRV-2R:5'-CGGACTTAAACCTCATTC-3'

HSHRV-2 probe: 5'-ACCTCTCCGCACATTGACATCT-3'

1.4 标准品模板制备

用 HSHRV 感染 EPC,待细胞出现病变后收集细胞病毒材料,按 Trizol Reagent 说明书提取病毒总 RNA,经 DNase I RNase-free (Fermentas) 处理后,分别测量 RNA 样品在 260 和 280 nm 波长下的吸光度值,计算 RNA 样品的浓度和纯度。利用 PrimeScriptTM RT reagent Kit (TaKaRa) 试剂盒进行反转录得到 cDNA。以获得的 cDNA 为模板,P1、P2 为引物进行 PCR 扩增。反应参数为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。同时设立无模板的阴性对照。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增产物经胶回收纯化后与 pMD-18T 载体 (TaKaRa) 连接,转化到大肠杆菌 DH5 α 中,PCR 检测阳性克隆后送生工生物工程

(上海)有限公司测序。测序正确的重组质粒经测定在 260 和 280 nm 处的吸光度后,根据以下方法计算重组质粒的 DNA 拷贝数。

分子拷贝数(个/ μL) = 6.02×10^{23} (个/mol) \times 质粒浓度(g/ μL)/质粒分子量(g/mol),用 EASY Dilution(for Real Time PCR)对标准品进行 10 倍比稀释,用于构建标准曲线。

1.5 荧光定量 PCR 的建立和条件优化

采用 TaqMan 探针技术,参照 Premix Ex TaqTM(Probe qPCR)说明书,将上、下游引物、探针、Premix (TaKaRa) Ex TaqTM和 ROX Reference Dye II (50 \times)加入到反应体系中,用 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)进行 PCR 扩增。对各组分浓度和反应程序进行优化,对引物和探针浓度进行筛选,以获得最低的 C_t 值和最高的荧光强度增加值标准。选用 0.2、0.4、0.6、0.8 $\mu\text{mol/L}$ 的引物浓度和 0.06、0.12、0.24、0.48 $\mu\text{mol/L}$ 的探针浓度,筛选引物和探针的最佳浓度。分别选取 53、55、57 和 59 $^{\circ}\text{C}$ 为退火温度,筛选最佳退火温度。

1.6 标准曲线建立

将重组质粒进行 10 倍梯度稀释,使其浓度依次为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$ 个/ μL 作为标准品模板,每个稀释度设 3 个平行。在优化的反应体系和条件下进行实时荧光定量 PCR 扩增,反应结束后绘制标准曲线。

1.7 荧光定量 PCR 的敏感性、重复性和特异性检测

将重组质粒进行 10 倍梯度稀释,使其浓度依次为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^0$ 个/ μL 作为标准品模板,以灭菌的 ddH₂O 代替模板作为阴性对照,用优化的反应体系和条件进行荧光定量 PCR 反应,根据样品拷贝数与 C_t 值之间的线性关系和相关系数确定最小检测量。同时用引物 HSHRV-2F、HSHRV-2R 进行普通 PCR 反应,计算出 2 种方法所能检测出的最低模板浓度,比较 2 种方法的敏感性。

对同一样品在 1 次实验中重复 38 次进行实时荧光定量 PCR 检测,通过组内的 C_t 值变异系数来初步评估该方法的重复性。

采用 Trizol Reagent 分别提取 GCRV、LMBV、KHV、MSGIV、IHNV、HSHRV 的总 RNA,分别用 PrimeScriptTM RT reagent Kit(TaKaRa)试

剂盒进行反转录获得 cDNA。以获得的 cDNA 为模板,用建立的 HSHRV 实时荧光定量 PCR 方法进行特异性扩增,同时设灭菌的 ddH₂O 为阴性对照。

1.8 荧光定量 PCR 检测方法的应用

利用建立的 HSHRV 实时荧光定量 PCR 方法对本实验室采集并保存的 21 份杂交鳢病毒病疑似样品进行检测。同时用传统的 PCR 检测方法作为对比,并辅以细胞培养和电镜观察进行验证。

2 结果与分析

2.1 HSHRV G 蛋白编码基因的 PCR 扩增和克隆

病毒核酸反转录后采用引物 P1、P2 进行 PCR 扩增,获得 1 500 bp 左右的片段,该片段克隆到载体 pMD18-T 后,经测序证实与预期插入片段相同。重组质粒提取后经分光光度计测定浓度为 185 $\mu\text{g/mL}$, A260/A280 值为 1.91。

2.2 实时荧光定量 PCR 的建立和条件优化

重组质粒采用荧光定量 PCR 引物 HSHRV-2F、HSHRV-2R 进行普通 PCR 扩增后,产物经琼脂糖凝胶电泳分析,在 150 bp 左右有一条特异性条带,与预期片段长度(143 bp)基本一致,表明该引物可用于荧光定量 PCR 反应。经过荧光定量 PCR 反应条件的优化,最终确定反应体系为:Premix Ex TaqTM 10 μL , ROX Reference Dye II(50 \times)0.4 μL , PCR Forward Primer 和 PCR Reverse Primer 各 0.4 μL (终浓度均为 0.3 $\mu\text{mol/L}$),探针 HSHRV-2 probe 0.8 μL (终浓度为 0.24 $\mu\text{mol/L}$),DNA 模板 1 μL , ddH₂O 7 μL ,总体系为 20 μL 。三步法 PCR 扩增程序:第一步,94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;第二步,5 个循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s;第三步,40 个循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 35 s(收集 FAM 荧光信号)。

2.3 标准曲线图的建立

以 10 倍梯度稀释重组质粒后选取 $10^8 \sim 10^2$ 个稀释度进行荧光定量 PCR 扩增,获得扩增曲线,以重组质粒拷贝数为 X 轴、 C_t 值为 Y 轴作图,得到一条标准曲线($Y = -3.290x + 38.292$),其相关系数为 0.999,扩增效率为 98.578%,说明实时荧光定量 PCR 在 $10^8 \sim 10^2$ 范围内有较好的线性关系(图 1)。

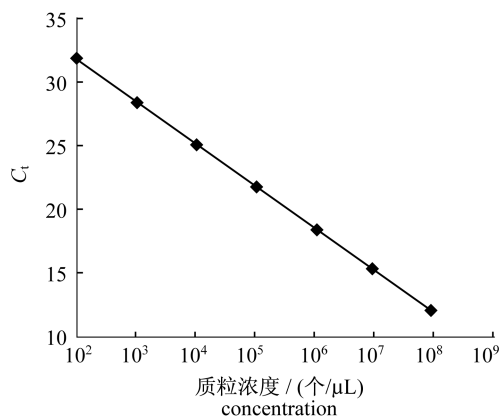


图1 HSHRV 实时荧光定量 PCR 检测标准曲线
Fig.1 Standard plot for quantification of HSHRV in real-time PCR assay

2.4 荧光定量 PCR 的灵敏度、重复性和特异性

通过对重组质粒标准品 10 倍梯度稀释后,得到浓度依次为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^0$ 个/ μL 标准品样品,对样品分别进行传统 PCR 和 TaqMan 荧光定量 PCR 扩增。结果显示,传统 PCR 方法最低在 1×10^3 处能检测到条带(图 2);荧光定量 PCR 对重组质粒进行扩增,最低可检测 10 个病毒核酸分子拷贝数(图 3)。2 种方法阴性对照均检测不到。

对同一阳性样品在同一次实验内获得的 C_t 值进行统计分析,结果表明,同一次实验内的 38 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本上重合(图 4), C_t 值读数范围为 15.04 ~ 15.58,标准偏差为 0.13,变异系数为 0.84%。

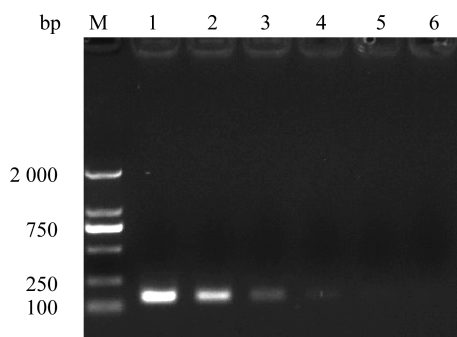


图2 荧光定量特异性引物 HSHRV-2F、HSHRV-2R PCR 扩增结果

M. 标准 DNA DL2000; 1~5. 质粒浓度分别为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^2$ 个/ μL ; 6. 空白对照

Fig.2 Amplification result of real-time PCR assay for the specificity of primers HSHRV-2F and HSHRV-2R
M. DNA 2 000 bp marker; Lanes 1-5: concentration of plasmid $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^2$ copies/ μL ; Lane 6: negative control

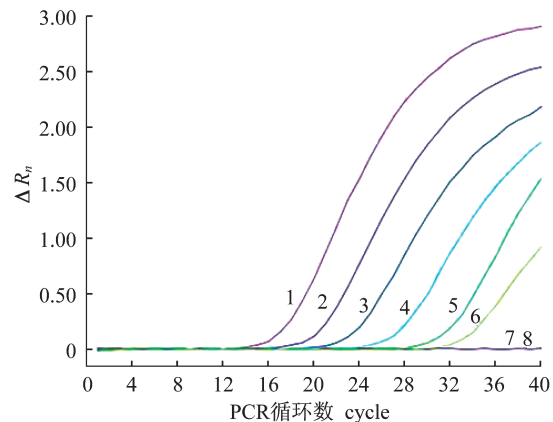


图3 杂交鳢弹状病毒 C1207 株实时定量 PCR 灵敏度检测结果的扩增曲线图

1~7. 质粒浓度分别为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^0$ 个/ μL ; 8. 空白对照

Fig.3 Sensitive plot of real-time PCR assay for the detection of HSHRV-C1207

Plot 1 to 7 represent recombinant plasmid ranging from 1×10^6 to 1×10^0 copies/ μL , respectively; 8. negative control

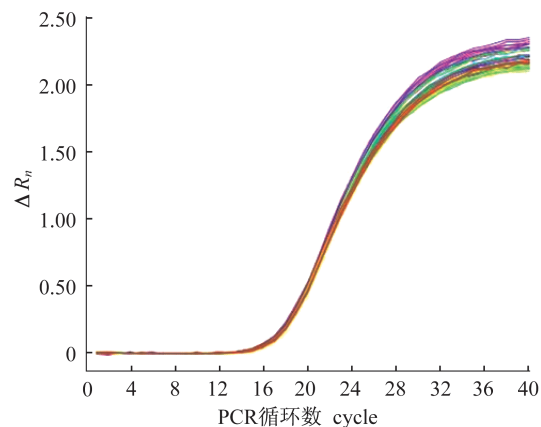


图4 杂交鳢弹状病毒 C1207 株实时定量 PCR 38 次重复实验结果的扩增曲线图

Fig.4 Thirty-eight repetitions of real-time PCR assay for the detection of HSHRV-C1207

以重组质粒、SCRV、SVCV、HSHRV-C1207、GCRV、LMBV、KHV、MSGIV、IHNV 总 RNA 反转录 cDNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR 特异性检测,结果表明,重组质粒、HSHRV-C1207 样品和 SCRV 有典型扩增曲线,荧光信号值高,检测结果为阳性,而其余病毒和阴性对照无扩增曲线(图 5),未发生扩增反应。

2.5 荧光定量 PCR 检测方法的应用

从 2012 年 7 月—2013 年 6 月在广东省各地采集的 21 份病鱼样品,同时采用建立的荧光定量 PCR 检测方法和传统 PCR 方法进行检测。结果

显示,传统 PCR 方法检测到 13 份阳性样品,阳性检出率为 61.9%;荧光定量 PCR 方法检测到 18 份阳性样品,阳性检出率为 85.7% (表 1)。对所有样品进行了细胞分离和电镜观察,确认的阳性样品与荧光定量 PCR 方法检测到的阳性样品相同。

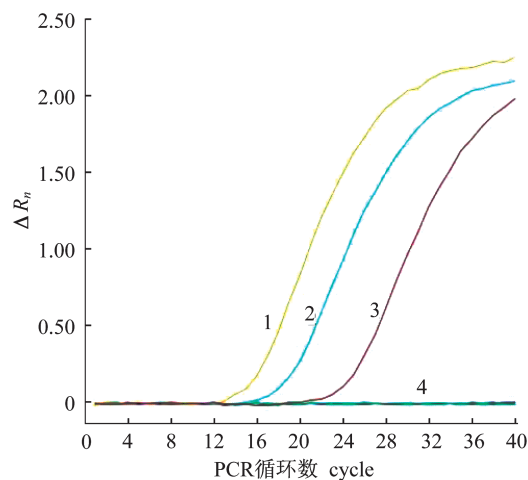


图 5 杂交鳢弹状病毒 C1207 株实时定量 PCR 特异性检测结果的扩增曲线图

1. 重组质粒; 2. SCR.V; 3. HSHRV-C1207 株; 4. GCRV、SVCV、LMBV、KHV、MSGIV、IHN.V 和空白对照

Fig. 5 Specificity plot of real-time PCR assay for the detection of HSHRV-C1207

1. recombinant plasmid; 2. SCR.V; 3. HSHRV-C1207 strain; 4. strains with no positive signal including GCRV, SVCV, LMBV, KHV, MSGIV, IHN.V and negative control

表 1 用荧光定量 PCR 和传统 PCR 检测临床疑似病样结果

Tab. 1 Results of detection by TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method and conventional PCR for suspected hybrid snakehead rhabdovirus

样品来源 sample source	数量 amount	阳性样品数量 amount of positive sample	
		传统 PCR conventional PCR	TaqMan 荧光定量 PCR FQ PCR
		佛山顺德 Shunde	7
佛山南海 Nanhai	5	3	5
中山 Zhongshan	4	3	3
广州 Guangzhou	5	3	3

3 讨论

杂交鳢弹状病毒病是近年新发的流行性疾病,该病发病迅速、死亡率高,给鳢科鱼类养殖业造成了重大的经济损失,目前还没有该病的致病机理和

流行病学研究相关的报道。由于发病初期鱼体没有明显的表现症状,快速准确地诊断以及病毒病原的定量检测对于该病的预警与防控技术研究十分重要。目前,传统病毒病诊断需进行病毒分离,细胞转染、电镜观察以及普通 PCR 检测等方法,缺乏可对病毒进行快速、准确、定量分析的检测预警方法。荧光定量 PCR 方法具有操作简单、快速,不易出现假阳性,随时对扩增产物进行精确定量分析等优点^[26],正逐渐应用于病原微生物的检测与研究中。本研究建立的 HSHRV 荧光定量 PCR 方法,最低可检测到 10 个拷贝,比普通 PCR 方法灵敏 100 倍,易于在疾病发生的早期发现病毒感染,及时做出预警预测,为该病的防控赢取时间。

研究发现,不同弹状病毒 G 蛋白间的同源性相差较大^[27],因而根据 G 蛋白基因设计病毒的检测引物具有一定的优势。本研究根据 HSHRV 的 G 蛋白基因序列设计特异性引物及 TaqMan 探针,建立荧光定量 PCR 检测方法,对 HSHRV 和 SCR.V 有典型的扩增曲线;与同属水泡病毒属的 SVCV、弹状病毒科诺拉病毒属的 IHN.V、呼肠孤病毒科的 GCRV、虹彩病毒科的 LMBV 和 MSGIV、疱疹病毒科 KHV 均无交叉反应,与阴性对照结果一致,表明所建立的方法具有特异性。曾伟伟等^[12]研究发现 HSHRV 与 SCR.V 全基因和 G 蛋白核苷酸序列同源性高达 95% 和 94%,但二者在病毒特性方面存在差异,HSHRV 是否为 SCR.V 的变异株,还是一株新的鱼类弹状病毒还有待进一步验证。所以本实验所建立的方法也可以用于 SCR.V 的检测。几种方法同时对疑似杂交鳢病毒病临床样品的检测结果也表明,荧光定量 PCR 方法阳性检出率为 85.7%,比普通 PCR 检测方法高 23.8%,且荧光定量 PCR 检测方法符合率为 100%,证实建立的荧光定量 PCR 方法在临床检测应用中的可靠性和敏感性均较高。

本研究建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法,具有灵敏度高、重复性强、特异性好的特点,能够快速、准确地对病原定量,对于杂交鳢病毒病的早期诊断和分子流行病学研究以及防控技术研究等具有重要意义。

参考文献:

[1] Liu S, Zhu X P, Chen K C, et al. Karyotype analysis of the hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂) and its inbred progeny (F2) [J]. Chinese

<http://www.scxuebao.cn>

- Journal of Zoology, 2011, 46(1): 100 - 105. [刘苏, 朱新平, 陈昆慈, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)及其自交后代细胞核型初步分析. 动物学杂志, 2011, 46(1): 100 - 105.]
- [2] Liu W K, Fan Q X, Du H M, *et al.* Effect of stocking density on growth and survival of larval hybrid snakehead [J]. Freshwater Fisheries, 2007, 37 (4): 45 - 48. [刘文奎, 樊启学, 杜海明, 等. 养殖密度对杂交鳢仔鱼生长与存活的影响. 淡水渔业, 2007, 37 (4): 45 - 48.]
- [3] Yang J. Comparison of breeding benefit between *Channa maculate* and hybrid snakehead “Hui Nong No. 1” [J]. Ocean and Fishery, 2009(5): 42. [杨菁. 惠农 1 号杂交鳢与斑鳢养殖效益的比较. 海洋与渔业, 2009(5): 42.]
- [4] Zhang X C, Chen K C, Zhu X P. Present farming situation between *Channa argus*, *C. maculate* and hybrid snakehead [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(22): 132 - 134. [张新铨, 陈昆慈, 朱新平. 乌鳢、斑鳢及杂交种养殖研究现状. 广东农业科学, 2011, 38(22): 132 - 134.]
- [5] Liu W K, Fan Q X, Zhu B K, *et al.* Effects of prey density on the growth and survival of larval hybrid snakehead [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2007, 26(3): 367 - 370. [刘文奎, 樊启学, 朱邦科, 等. 饵料密度对杂交鳢仔鱼生长、存活的影响. 华中农业大学学报, 2007, 26(3): 367 - 370.]
- [6] Wang G L, Xu Y J, Jin S, *et al.* Research on the nocardiosis and pathogen in reared snakehead, *Ophiocephalus argus cantor* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 277 - 283. [王国良, 金珊, 徐益军, 等. 养殖乌鳢诺卡氏菌病及其病原研究. 水生生物学报, 2009, 33(2): 277 - 283.]
- [7] Cao Z, Shen J Y, Xie R L. Isolation and Identification of a strain of nocardia a pathogen of snakehead fish (*Ophicephalus argus-argus*) with tuberculosis [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 338 - 341. [曹铮, 沈锦玉, 谢荣林. 乌鳢结节病病原—诺卡氏菌的分离与鉴定. 水生生物学报, 2009, 33(2): 338 - 341.]
- [8] Chang O Q, Shi C B, Pan H J, *et al.* Histopathological study on nocardiosis of *Ophicephalus argus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(2): 209 - 216. [常藕琴, 石存斌, 潘厚军, 等. 乌鳢诺卡氏菌病的组织病理学. 水产学报, 2008, 32(2): 209 - 216.]
- [9] Chen Y F, Liang R S, Zhuo X L, *et al.* Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepede) [J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35 (6): 421 - 430.
- [10] Liu J Y, Li A H, 2012. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China [J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35 (5), 335 - 342.
- [11] Liu C, Li K B, Wang Q, *et al.* Isolation, identification and characterization of *Aeromonas schubertii* from hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(7): 1119 - 1125. [刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)内脏类结节病原菌的分离、鉴定与特性分析. 水产学报, 2012, 36(7): 1119 - 1125.]
- [12] Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* Isolation and characterization of a rhabdovirus from snakehead fish (*Ophicephalus striatus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(9): 1416 - 1424. [曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 一株鳢科鱼源弹状病毒的分离及鉴定. 水产学报, 2013, 37(9): 1416 - 1424.]
- [13] Ying Z, Liu J H. Animal Virology [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997. [殷震, 刘景华. 动物病毒学. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.]
- [14] Padhi A, Verghese B. Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of a highly pathogenic fish rhabdovirus, the spring viremia of carp virus (SVCV) [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 156 (1 - 2): 54 - 63.
- [15] Mortensen H F, Heuer O E, Lorenzen N, *et al.* Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea [J]. Virus Research, 1999, 63(1 - 2): 95 - 106.
- [16] Nichol S T, Rowe J E, Winton J R. Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus [J]. Virus Research, 1995, 38(2 - 3): 159 - 173.
- [17] Gui L, Li Z Q, Zhang Q Y. Isolation and characterization of a rhabdovirus from diseased flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(3): 345 - 353. [桂朗, 李正秋, 张奇亚. 牙鲆一株弹状病毒病原的分离与鉴定. 水生生物学报, 2007, 31(3): 345 - 353.]
- [18] Tao J J, Gui J F, Zhang Q Y, *et al.* Isolation and

- characterization of a rhabdovirus from co-infection of two viruses in mandarin fish[J]. *Aquaculture*, 2007, 262(1):1-9.
- [19] Chen Z, Sun L N, Liang M F. Advances in research of therapeutic human monoclonal antibodies against rabies virus[J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2010, 5(3):208-210. [陈哲, 孙丽娜, 梁米芳. 治疗性人源抗狂犬病毒抗体研究进展. *中国医药生物技术*, 2010, 5(3):208-210.]
- [20] Ksaornchandra J, Lannan C N, Rohovec J S, *et al.* Characterization of a rhabdovirus isolated from the snakehead fish (*Ophicephalus striatus*) [M] // *International symposium on viruses of lower vertebrates*. Corvallis: Oregon State University Press, 1991.
- [21] Wattanavijarn W, Tangtronpiros J, Wattanodorn K. Viruses of ulcerative diseased fish in Thailand, Burma, and Laos[C] // Jana B B, Webster C D. *First international conference on the impact of viral diseases on the development of Asian countries*. Thailand. *Aquaculture*, 2003:121.
- [22] Johnson M C, Maxwell J M, Loh P C, *et al.* Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp(RPS)/spring viremia of carp virus (SVCV) [J]. *Virus Research*, 1999, 64(2):95-106.
- [23] Fu F, Liu H, Huang J, *et al.* Study progress of spring viremia of carp virus[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2):328-334. [付峰, 刘荻, 黄健, 等. 鲤春病毒血症病毒(SVCV)的研究进展. *中国水产科学*, 2006, 13(2):328-334.]
- [24] Zhang N Z, Zhang L F, Xia C, *et al.* Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: A fatal aquatic viral disease that might spread in East Asia[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(7):1-9.
- [25] Li C, Lin H, Liu X J, *et al.* Construction and screening of human immunized phage-display antibody libraries against rabies virus [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing: Natural Science*, 2010, 30(5):575-578. [李琛, 林红, 刘新建, 等. 人源抗狂犬病毒免疫型抗体库的构建及特异性抗体筛选与鉴定. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2010, 30(5):575-578.]
- [26] Song X Q, Gao H L, Wang X Y, *et al.* Development of Taq Man fluorescence quantitative PCR assay for detection of chicken anemia virus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 31(1):56-59. [宋修庆, 高宏雷, 王晓艳, 等. 鸡贫血病毒 Taq Man 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(1):56-59.]
- [27] Zhang L, Ding Y L, Chen J M, *et al.* Subcloning, expression and purification of SVCV glycoprotein gene[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2011, 47(7):10-12. [张琳, 丁雅苓, 陈建民, 等. 中国鲤鱼春季病毒血症毒株糖蛋白基因的亚克隆表达与纯化. *中国兽医杂志*, 2011, 47(7):10-12.]

Establishment and application of TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR for detecting the hybrid snakehead rhabdovirus

LIU Chun, ZENG Weiwei, WANG Qing, LI Kaibin, WANG Fang,
CHANG Ouqin, LIANG Huili, WU Shuqin*

(Key Laboratory of Fishery Drug Development of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The purpose of this study is to establish a TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method which can be used to detect hybrid snakehead rhabdovirus (HSHRV). A coding region of HSHRV-C1207 strain G protein was amplified by PCR and cloned into pMD18-T vector for the construction of recombinant plasmid. After being identified and confirmed by sequencing, the recombinant plasmids were extracted and 10-fold serial dilutions of recombinant plasmid were used as standard plasmid. A pair of specific primers and TaqMan probes were designed targeting the C1207 strain G gene. The standard plasmid was used as a quantitative template to establish the TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method for HSHRV detection and the sensitivity, repeatability and specificity of the method were evaluated. The results showed that the TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method was established and the correlation coefficient (R^2) and the slope of the standard curve were 0.999 and -3.290 respectively, which showed a good linear relationship. Sensitivity tests showed that the detection limit was 10 copies, which indicated that the sensitivity of the real time PCR is about 100 times higher than that of the conventional PCR assay. Results of repeatability tests showed that the coefficient of variation was 0.84%, indicating that this method had high repeatability. Furthermore, the method had high specificity for HSHRV without cross reactions with templates from other aquatic viruses. In clinical samples tests, detection rate of established fluorescence PCR was higher than that of conventional PCR. The TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR established in this study has high sensitivity, repeatability and specificity for the rapid detection and quantification of HSHRV in fish.

Key words: hybrid snakehead; rhabdovirus; G protein; TaqMan real-time PCR; detection method

Corresponding author: WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com