

大鲵虹彩病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

周 勇¹, 曾令兵^{1*}, 孟 彦¹, 周群兰², 张 辉¹, 高正勇³, 肖 艺¹, 孙建滨³

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

3. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430071)

摘要: 利用 PCR 技术扩增出大鲵虹彩病毒(giant salamander iridovirus, GSIV)主要衣壳蛋白(MCP)编码区长度为 1 392 bp 的片段, 克隆到 pMD19-T 载体上, 构建重组质粒 pMD19-T-MCP。经 PCR 鉴定确认正确后, 以 10 倍梯度稀释 pMD19-T-MCP 重组质粒, 作为标准模板进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 扩增, 制作标准曲线, 建立了大鲵虹彩病毒的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法。制作的标准曲线有极好的线性关系, 且线性范围宽, 相关系数为 0.990 19。组内重复试验的 C_T 值标准偏差为 0.52%。检测结果显示, 该方法对大鲵虹彩病毒的检测有高度的特异性, 与锦鲤疱疹病毒、弗氏柠檬酸杆菌、嗜水气单胞菌以及鲤上皮瘤细胞基因组 DNA 之间均无交叉反应, 特异性好, 检测总 DNA 灵敏度为 10 个病毒核酸分子拷贝数, 约 1.1×10^{-3} pg/ μ L 病毒核酸, 较之常规 PCR 的敏感度高出约 1 000 倍。研究建立的大鲵虹彩病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法灵敏度高、特异性强, 对大鲵虹彩病毒病的快速诊断与病毒病原定量检测有重要意义。

关键词: 大鲵; 虹彩病毒; 主要衣壳蛋白; TaqMan 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S 941

文献标志码: A

大鲵(*Andrias davidianus*)俗称娃娃鱼, 是国家二级保护动物, 并且被列入 CITES 公约, 即濒危野生动植物种国际贸易公约种类目录中, 是现存个体最大的两栖类动物, 有很重要的科研价值及药用和营养价值。但是, 由于人为捕猎和自然环境的改变等原因, 野生大鲵数量急剧下降^[1]。基于保护和开发利用的目的, 目前大鲵的人工养殖业发展十分迅速。由于人工养殖难以完全模仿自然状态下大鲵的生活环境, 加之对大鲵的一些生活习性尚不清楚, 所以在饲养过程中出现了诸多问题, 其中病害是影响大鲵养殖业发展的重要因素之一。

已往在大规模养殖过程中发现的主要疾病多是由细菌引起^[2]。从患病鱼体内分离的病毒感染细胞培养物, 细胞可发生典型的细胞病变效应, 病毒

可通过连续传代进行培养; 人工感染试验可复制出与自然发病相同的症状。参考 Mao 等^[3]与 Greer 等^[4]的方法, 设计合成一对特异性扩增蛙虹彩病毒主要衣壳蛋白(MCP)基因的引物, 病毒核酸特异性 PCR 反应得到与预期大小一致的 DNA 片段, 对扩增产物进行测序与比对分析, 其序列与蛙虹彩病毒序列的同源性达到了 99%, 确认为大鲵虹彩病毒(giant salamander iridovirus, GSIV)。

虹彩病毒(iridovirus) 是一类感染低等脊椎动物和无脊椎动物的二十面体状、大型细胞质 DNA 病毒, 是水产养殖动物重要的病毒性病原^[5], 我国已有虹彩病毒感染牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)^[6]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[7]、鳊(*Siniperca chuatsi*)^[8]、眼斑拟球以石首鱼(*Sciaenops ocella-*

收稿日期: 2012-01-04 修回日期: 2012-02-15

资助项目: 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费(2011JBFZ01); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助(2012A0505); 公益性行业(农业)科研专项经费(201203086)

通讯作者: 曾令兵, E-mail: zenglingbing@gmail.com

tus)^[9]、中华鳖 (*Trionyx sinensis*)^[10] 和虎皮蛙 (*Ranatigerina rugulosa*)^[11] 并引起大量死亡的报道。虹彩病毒科 (iridoviridae) 下分 5 个病毒属, 即虹彩病毒属 (*iridovirus*)、绿虹彩病毒属 (*chloriridovirus*)、淋巴囊肿病毒属 (*lymphocystivirus*)、蛙病毒属 (*ranavirus*) 和肿大细胞病毒属 (*megalocytivirus*)^[12]。近年来, 应用多重 PCR、套式 PCR、荧光实时定量 PCR、原位杂交以及环介导的等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等技术检测真鲷虹彩病毒、台湾石斑鱼虹彩病毒、大黄鱼虹彩病毒和蛙虹彩病毒也有相关报道^[13-17]。大鲵虹彩病毒是虹彩病毒科, 蛙病毒属的成员, 可感染各种规格的大鲵, 死亡率高, 传播速度快, 造成严重经济损失。因此, 为了及早发现和确诊大鲵是否被虹彩病毒感染, 有必要建立一种准确、快速、灵敏的检测方法, 这对于大鲵虹彩病毒引起的出血病的防控有重要意义, 可为大鲵养殖业的健康发展提供技术保障。实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR) 以其特异性高、灵敏度高、可定量、有效解决 PCR 污染问题及自动化程度高等优点, 在医学领域、微生物和动植物疾病检测方面得到了广泛应用^[18-20]。本研究建立了检测大鲵虹彩病毒的实时荧光定量 PCR 检测方法, 旨在对大鲵虹彩病毒进行定性和定量检测, 为大鲵病毒病的诊断与防控提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

大鲵虹彩病毒由本实验室分离与保藏; 锦鲤鳍条组织细胞 (Koi-Fin) 由本实验室建立并保藏。鲤 (*Cyprinus carpio*) 上皮瘤细胞系 (EPC) 来源于武汉大学中国典型培养物保藏中心 (CCTCC); 斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 卵巢组织细胞系 (CCO) 由美国夏威夷大学医学院公共卫生与健康系 Yuanan Lu 教授惠赠。锦鲤疱疹病毒 (KHV) 由美国 Clear Spring Food, Inc 公司研究发展部 Scott LaPatra 博士惠赠。KHV 在 Koi-Fin 细胞系中增殖培养。嗜水气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌由本实验室从患细菌感染症大鲵体内分离与培养。

1.2 主要试剂与仪器

Viral DNA Kit 和 Endo-Free Plasmid Midiprep Kit II 购于 Omega 公司; 胶回收试剂盒购于 Promega

公司; 10×Taq 反应缓冲液、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、pMD19-T 载体购于 TaKaRa 公司。主要仪器包括: 荧光定量 PCR 仪 (Rotor-Gene 6000, Qiagen); 分光光度计 (RS 232 C, Eppendorf); 凝胶成像仪 (Chemdoc XRS+, Bio-Rad); 超速离心机 (Optima L-80XP, Beckman-Coulter)。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中蛙虹彩病毒 MCP 蛋白编码基因序列 (FJ358611), 应用 Primer 5.0 软件设计特异性引物 P1/P2 和 GSIV FP/ GSIV probe/ GSIV RP。第一对引物 (P1/P2) 扩增 GSIV MCP 基因编码区, 长度为 1 392 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 (GSIV FP/ GSIV probe/ GSIV RP) 用于荧光定量 PCR 扩增, 长度为 93 bp。引物 P1/P2 由生工生物技术 (上海) 有限公司合成。引物 GSIV FP/ GSIV RP 及探针 GSIV probe 由上海闪晶分子生物科技有限公司合成。引物序列为
P1: 5'-CCAAGCTT ATGTCTTCTGTAACCG-3'
P2: 5'-CGGAATTC CCAAGATTGGGAATC-3'
GSIV FP: 5'-GCGGTTCTCACACGCAGTC-3'
GSIV RP: 5'-ACGGGAGTGACGCAGGTGT-3'
GSIV probe: 5'-fam+AGCCGACGGAAGGGTGTGTGAC+tamara-3'

1.4 模板制备

用 GSIV 感染鲤上皮瘤细胞系, 待细胞出现病变后收集细胞毒材料, 于 -80 °C 至室温条件反复冻融 3 次, 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清转移至 35 mL 超速离心管中, 20 000 r/min 离心 2 h (SW28, Beckman-Coulter), 悬浮病毒沉淀, 按 Viral DNA Kit 操作说明提取病毒总 DNA, 分光光度计 (Eppendorf) 测定 DNA 浓度。取 1 μg 病毒总 DNA, 加入 10×Taq 反应缓冲液 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL、50 μmol/L P1、P2 引物各 1 μL、超 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 补水至 50 μL, 将上述反应体系混匀后进行 PCR 扩增。反应参数为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 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。反应结束后, 取 5 μL PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL EB) 进行电泳检测。

GSIV MCP 蛋白编码基因扩增产物经胶回收纯化后于 16 °C 与 pMD19-T 载体连接 1 h, 用连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。从 LB 琼脂平板上挑取

菌落接种于 5 mL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素(Amp⁺)的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 12~14 h, 使用 Endo-Free Plasmid Midiprep Kit II 提取质粒。对重组质粒用 P1/P2 引物进行 PCR 鉴定。重组质粒 pMD19-T-MCP 送生工生物工程(上海)有限公司测序。用分光光度计测定阳性重组质粒在 260 和 280 nm 处的吸光度, 并根据以下方法计算重组质粒的 DNA 拷贝数。

分子拷贝数(拷贝/ μL)=DNA 质量浓度 / DNA 分子量, 其中: DNA 质量浓度=260 nm 吸光度 \times 稀释倍数 $\times 6.02 \times 10^{23}$; DNA 分子量=DNA 碱基数 $\times 324.5$ 。

1.5 荧光定量 PCR 的建立和条件优化

将荧光定量 PCR 上游引物、下游引物和探针同时加入反应体系中, 于实时荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 扩增。对实时荧光定量 PCR 反应体系中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 值和较高的荧光强度增加值。选用 50、25、10 nmol/mL 的引物浓度和 25、12.5、5 nmol/mL 的探针浓度, 筛选引物和探针的最佳浓度。

1.6 标准曲线建立

将 1×10^9 拷贝/ μL 重组质粒进行 10 倍梯度稀释, 使其浓度依次为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^2$ 拷贝/ μL 作为标准品模板, 在最佳反应条件下同时扩增, 反应结束后绘制标准曲线。

1.7 荧光定量 PCR 的敏感性、特异性和重复性试验

将 1×10^9 拷贝/ μL 重组质粒进行 10 倍梯度稀释, 使其浓度依次为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL 作为标准品模板, 用于进行敏感性测试。分别取不同稀释梯度的重组质粒 2 μL , 依次加入 10 \times Taq 反应缓冲液 2 μL 、2.5 mmol/L dNTPs 0.4 μL 、50 $\mu\text{mol/L}$ 引物 GSIV FP/ GSIV RP 各 0.4 μL 、25 $\mu\text{mol/L}$ 探针 GSIV probe 0.4 μL 、5 U/ μL Taq DNA 聚合酶 0.4 μL 补水至 20 μL , 将上述反应体系混匀后进行 PCR 扩增, 反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 40 个循环每个稀释度设 2 个重复。同时进行实时荧光定量 PCR 反应和普通 PCR 反应, 计算出 2 种方法所能检测出的最低模板浓度, 比较两种方法的敏感性。

对同一样品进行实时荧光定量 PCR 检测, 通过组内的 C_t 值变异系数(标准偏差/重复值平均数)来初步评估该方法的重复性。

采用商品试剂盒(Omega)分别提取大鲵虹彩病毒、锦鲤疱疹病毒、嗜水气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌、鲤上皮瘤细胞的基因组核酸, 以其为模板(每体系 2 μL), 用建立的 GSIV 实时荧光定量 PCR 方法进行特异性检测, 同时设无离子水为阴性对照。

1.8 临床样品检测

利用建立的 GSIV 实时荧光定量 PCR 方法对湖北荆州和浙江温州两地收集的疑似患大鲵出血病的大鲵样品进行虹彩病毒病原检测。

2 结果

2.1 GSIV MCP 蛋白编码基因的 PCR 扩增和克隆

将通过 PCR 反应扩增的 GSIV MCP 蛋白编码基因克隆到质粒 pMD19-T 中, 构建重组质粒 pMD19-T-MCP。重组质粒的 PCR 检测结果显示, PCR 扩增产物的大小为 1 392 bp, 与预期大小一致, 这表明 GSIV MCP 蛋白编码基因片段已正确插入载体 pMD19-T 中。测序结果进一步证实, 扩增得到的 GSIV MCP 蛋白编码基因与 GenBank 公布的蛙虹彩病毒 MCP 蛋白编码基因序列(FJ358611)参考序列相似性达 99%。将转化了 pMD19-T-MCP 质粒的大肠杆菌扩大培养, 按 Endo-Free Plasmid Midiprep Kit II 操作说明提取质粒, 经分光光度计测定浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$, A_{260}/A_{280} 值为 1.86。

2.2 实时荧光定量 PCR 的建立和条件优化

实时荧光定量 PCR 反应条件的优化引物和探针浓度筛选试验结果表明, 3 组引物获得的 C_t 值都相似(16.69 \pm 0.25), 但采用 50 nmol/mL 的引物浓度和 25 nmol/mL 的探针浓度进行检测, 获得的荧光强度增加值较大, 确定引物和探针的最佳浓度分别为 50 和 25 nmol/mL。对实时荧光定量 PCR 反应程序进行优化, 最终确定优化后的反应程序是: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 以 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s (收集 FAM 荧光信号)扩增 40 个循环。

2.3 标准曲线图的建立

以 10 倍梯度稀释的 pMD19-T-MCP 为模板扩增, 得到相应的动力学曲线, 该方法在 pMD19-T-MCP 浓度为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^2$ 拷贝/ μL 检测的 R^2 值达到 0.990 19。利用统计软件 STATISTICA 6.0, 对实验中的 C_t 值进行统计分析。分析结果表明, 8 个不同稀释梯度标准质粒 DNA 的 C_t 值变异系数(CV)为 0.24%~ 6.48% (表 1)。

根据质粒拷贝数与 C_T 值的相关性, 由 SDS (Sequence Detection System)2.1 软件得到标准曲线(图 1)。横坐标代表质粒模板拷贝数(X), 纵坐标为 C_T 值, 拷贝数(X)与 C_T 的关系为 $C_T = -3.2181 \lg X + 37.766$ 。

2.4 GSIV 荧光定量 PCR 的敏感性、重复性和特异性试验结果

通过对重组质粒 pMD19-T-MCP 各稀释度核样品进行荧光定量 PCR 检测。结果显示, 本方法对重组质粒进行扩增最低可检测到 10 个病毒核酸分子拷贝数(图 2), 即可以检测到约 1.1×10^{-3} pg/ μ L 病毒核酸, 而常规 PCR 法在稀释度为 1.0×10^4 / μ L

时只能勉强观察到 93 bp 的目的条带(图 3), 结果表明, 本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度比普通 PCR 高出约 1 000 倍。

对同一阳性样品在同一次试验间获得的 C_T 值进行分析, 以检验建立的实时荧光定量 PCR 法稳定性和重复性。实验结果表明, 同一次试验内 72 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本重合(图 4), C_T 值读数范围为 18.82~19.22, 标准偏差为 0.1, 变异系数为 0.52%; 统计结果表明, 本研究所建立的 GSIV 实时荧光定量 PCR 检测方法重复性好, 可进行稳定、可靠的检测。

表1 以pMD19-T-MCP重组质粒为标准模板的实时荧光定量PCR重复试验
Tab. 1 Reproducibility of pMD19-T-MCP standard template in TaqMan real-time PCR assay

	C_T for the following number of input copies							
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
1	9.29	12.09	14.96	18.03	21.19	24.99	28.2	33.59
2	9.29	12.16	14.92	18.18	20.99	25.61	27.82	29.58
3	9.2	12.09	14.89	17.81	21.07	25.87	28.74	30.98
mean \pm SD	9.26 \pm 0.05	12.11 \pm 0.04	14.92 \pm 0.04	18.01 \pm 0.19	21.08 \pm 0.10	25.49 \pm 0.45	28.25 \pm 0.46	31.38 \pm 2.04
CV/%	0.56	0.33	0.24	1.03	0.48	1.77	1.64	6.48

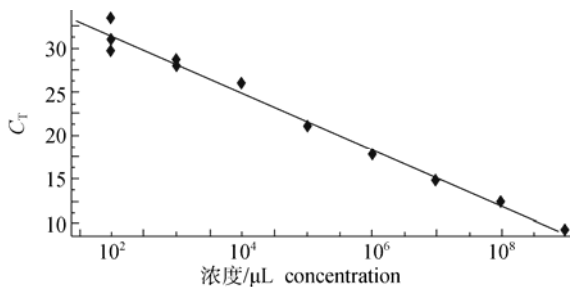


图 1 GSIV实时荧光定量PCR检测标准曲线
Fig.1 Standard plot for quantification of GSIV in real-time PCR assay

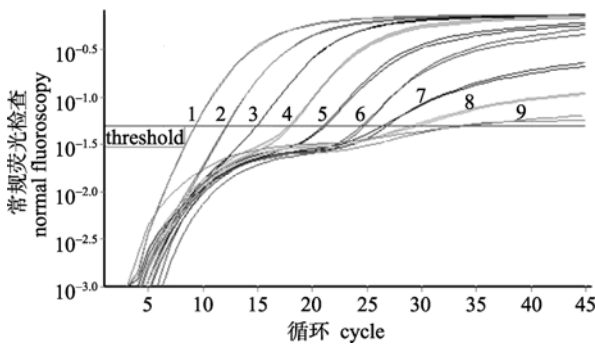


图 2 荧光定量PCR检测灵敏度试验
1~9. 质粒拷贝数分别为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$ / μ L。
Fig.2 Sensitivity test of real-time PCR with serial dilution samples

Plot 1 to 9 represent pMD19- T-MCP recombinant plasmid ranging from 1×10^9 to 1×10^1 / μ L, respectively.

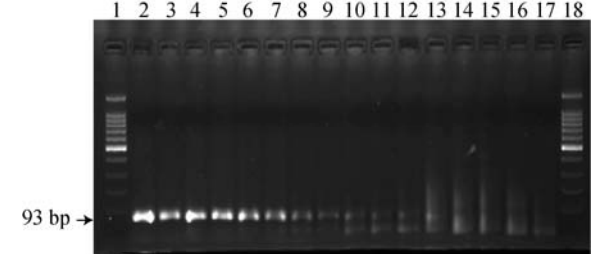


图 3 常规PCR检测GSIV敏感性试验结果
Fig. 3 Sensitivity of conventional PCR for the detection of GSIV
1. DL5 000 marker; 2-3. 1×10^9 / μ L; 4-5. 1×10^8 / μ L; 6-7. 1×10^7 / μ L; 8-9. 1×10^6 / μ L; 10-11. 1×10^5 / μ L; 12-13. 1×10^4 / μ L; 14-15. 1×10^3 / μ L; 16-17. 1×10^2 / μ L; 18. DL5 000 marker.

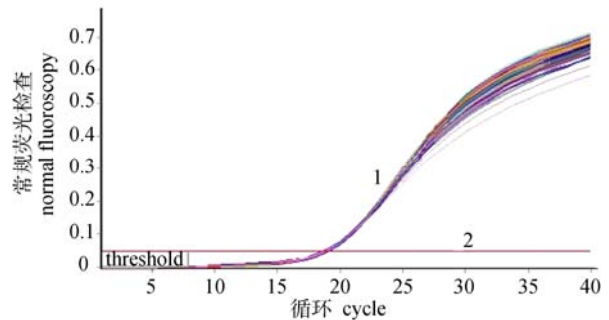


图 4 72次重复性试验结果

1. 72次重复; 2. 阈值。

Fig. 4 Results of 72 repetitious detections

1. 72 repetitious detections; 2. threshold.

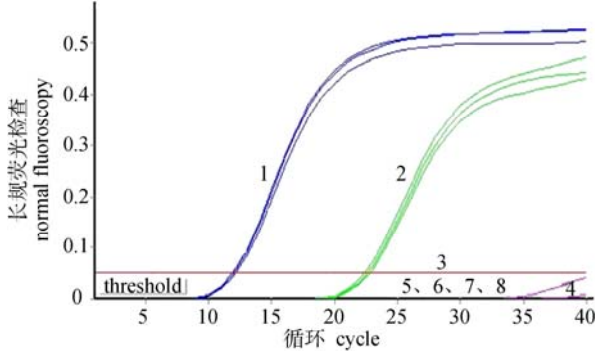


图 5 特异性试验

1. 1×10^8 / μ L pMD19-T-MCP; 2. 大鲵虹彩病毒; 3. 阈值; 4. 鲤上皮瘤细胞系; 5. 锦鲤疱疹病毒; 6. 嗜水气单胞菌; 7. 弗氏柠檬酸杆菌; 8. 水。

Fig. 5 Specificity of real-time PCR

1. 1×10^8 / μ L pMD19-T-MCP; 2. GSIV; 3. threshold; 4. EPC; 5. KHV, 6. *Aeromonas hydrophila*; 7. *Citrobacter freundii*; 8. water.

以大鲵虹彩病毒(GSIV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、嗜水气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌、鲤鱼上皮瘤细胞(EPC)的基因组总DNA和 1×10^8 拷贝/ μ L质粒为模板,进行实时荧光定量PCR特异性检测,结果表明,GSIV总DNA模板有典型扩增曲线,荧光信号值高(图5),检测结果为阳性, C_T 值为26,根据标准曲线计算出样品中病毒核酸量约为 4.5×10^3 / μ L DNA。该样品的对照组KHV、嗜水气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌和EPC细胞的基因组DNA无特异性扩增信号。

2.5 疑似患病大鲵实时荧光定量检测结果

取2010年收集的湖北荆州疑似患病大鲵(1份)和2011年收集的浙江温州疑似患病大鲵(两份),通过超速离心提取病毒粒子。以离心纯化的病毒作为被检测材料、以GSIV感染EPC后的细胞毒材料和无离子水分别作为阳性对照和空白对照,进行疑似患病大鲵的虹彩病毒病原的荧光定量PCR检测。结果发现,3份患病样品经过扩增,有“S”型扩增曲线(图6)。湖北荆州疑似患病大鲵的 C_T 值为19.50,浙江温州疑似患病大鲵的 C_T 值分别为22和27。根据标准曲线计算出反应体系中湖北荆州疑似患病大鲵的病毒量为 4.8×10^5 / μ L;浙江温州疑似患病大鲵的病毒量分别为 8×10^4 / μ L和 2.2×10^3 / μ L。

3 讨论

目前,对大鲵虹彩病毒感染引起的出血病的诊断与大鲵虹彩病毒的检测主要依赖组织切片、细

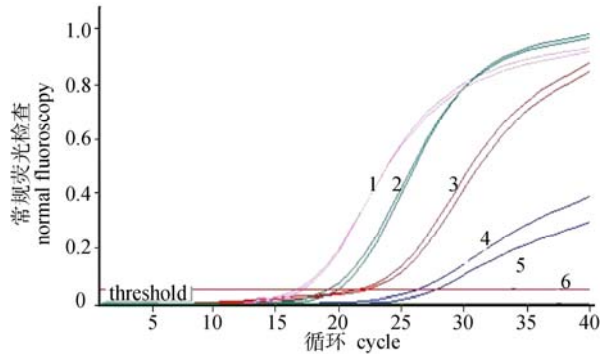


图 6 感染GSIV的检测样品的实时荧光定量PCR扩增曲线

1. 1×10^7 / μ L pMD19-T-MCP; 2. 荆州患病大鲵; 3. 温州患病大鲵1; 4. 温州患病大鲵2; 5. 阈值; 6. 水。

Fig. 6 Amplification plot of real-time PCR of GSIV infected samples

1. 1×10^7 / μ L pMD19-T-MCP; 2. sick giant salamander from Jingzhou, Hubei Province; 3. sick giant salamander sample 1 from Wenzhou, Zhejiang Province; 4. sick giant salamander sample 2 from Wenzhou, Zhejiang Province; 5. threshold; 6. water

胞培养、电镜观察以及普通PCR检测等方法^[21-22],缺乏可对大鲵虹彩病毒进行快速、准确、定性定量分析的检测方法。本研究建立的TaqMan实时荧光定量PCR方法,检测反应的灵敏度高可达10个病毒核酸分子拷贝数,即可以检测到 1.1×10^{-3} pg/ μ L病毒核酸,高于李惠芳等^[23]建立的虹彩病毒蛙病毒属实时荧光定量PCR检测方法的灵敏度(4.5×10^{-3} pg/ μ L)。与普通PCR相比,其灵敏度高出常规PCR约1000倍。特异性是荧光定量PCR检测技术的重要指标之一。为了验证本研究建立的TaqMan荧光定量PCR技术检测大鲵虹彩病毒的特异性,本研究选择了锦鲤疱疹病毒,弗氏柠檬酸杆菌、嗜水气单胞菌两种细菌和鲤上皮瘤细胞作为对照。检测结果表明,仅GSIV病毒核酸有典型扩增曲线,而KHV病毒、弗氏柠檬酸杆菌、嗜水气单胞菌和鲤上皮瘤细胞的基因组DNA没有扩增线,与阴性对照的结果一致,表明所建立的方法具有特异性。鉴于本实验扩增的特异性片段在蛙病毒属中具有较高的保守性,经过BLAST序列比对后发现,该片段和其他40多个在GenBank登录的蛙病毒属MCP编码基因的相似性都在97%以上,所以本实验所建立的方法可以应用于其它蛙病毒毒株如国

内比较常见的蛙虹彩病毒(RGV)、虎纹蛙病毒(TFV)及中华鳖虹彩病毒(STIV)的鉴定,进一步的平行检测对比试验有待收集到相关病毒材料后进行。检测该方法的稳定性和重复性实验中对同一阳性样品72次重复在同一次试验间获得的 C_T 值进行分析,72个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本重合 C_T 值读数范围为18.82~19.22,标准偏差为0.1,变异系数为0.52%。建立标准曲线的8个不同稀释梯度标准质粒DNA分别做3次重复,其 C_T 值变异系数在0.24%~6.48%,表明该方法重复性好,稳定性强。

利用10倍稀释法对已知滴度的病毒DNA进行梯度稀释后制作标准曲线可对未知滴度的大鲵虹彩病毒进行相对定量。由于无需电泳检测、不使用溴化乙锭,保障了试验人员的安全,而且在检测时间上要比普通的PCR提前2~3 h出现结果,从核酸的提取到实时荧光定量PCR反应完成只需要3 h,大大提高了检测的效率,这对于大鲵虹彩病毒的早期诊断以及防控技术研究等有重要意义。

参考文献:

- [1] Wang X M, Zhang K J, Wang Z H, *et al.* The decline of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* and implications for its conservation [J]. *Cambridge Journal*, 2004, 38(2): 197-202.
- [2] 陈祥云, 陈新民. 大鲵病害研究综述[J]. *渔业现代化*, 2006 (5): 25-27.
- [3] Mao J, Hedrick R P, Chinchar V G. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses[J]. *Virology*, 1997, 229(1): 212-220.
- [4] Greer A L, Michael B, Wilson P J. Five amphibian mortality events associated with ranavirus infection in south central Ontario, Canada[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 67 (9):9-14.
- [5] Gibson-Kueh S, Netto P, Ngoh-Lim G H, *et al.* The pathology of systemic iridoviral disease in fish [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2003, 129 (2/3): 111-119.
- [6] 徐洪涛, 朴春爱, 姜忠良, 等. 养殖牙鲈淋巴囊肿病原的研究[J]. *病毒学报*, 2000, 16(3) : 223-226.
- [7] 史成银, 王印庚, 秦蕾, 等. 我国养殖大菱鲆病毒性红体病及其流行情况调查[J]. *海洋水产研究*, 2005, 26(1): 1-6.
- [8] 邓敏, 何建国, 左涛, 等. 鳊鱼传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV)PCR 检测方法的建立及虹彩病毒新证据[J]. *病毒学报*, 2000, 16(4): 365-369.
- [9] 李凯彬, 石存斌, 李新辉, 等. 眼斑拟石首鱼暴发性传染病病原初步研究[J]. *中国水产科学*, 2002, 9(1): 56-59.
- [10] 陈在贤, 郑坚川, 江育林. 从患病“红脖子病”甲鱼体分离到虹彩病毒 [J]. *中国兽医学报*, 1998, 18(2) : 135-139.
- [11] 苗素英, 王晓红, 叶巧真, 等. 虎纹蛙病毒的形态结构及其致病性研究[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2003, 42(4): 69-73.
- [12] Fauquet C M, Mayom A, Maniloff J. *Virus Taxonomys: 8th Report of ICTV*[M]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- [13] Chao C B, Yang S C, Tsai H Y, *et al.* A nested PCR for the detection of grouper iridovims in Taiwan(TGIV) in cultured hybrid grouper, giant seaperch, and largemouth bass[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2002, 14(2): 104-113.
- [14] Jeong J B, Park K H, Kim H Y, *et al.* Multiplex PCR for the diagnosis of red sea bream iridovirus isolated in Korea[J]. *Aquaculture*, 2004, 235(1-4): 139-152.
- [15] Chao C B, Chen C Y, Lai Y Y, *et al.* Histological, ultrastructural, and in situ hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus* hybrids infected by grouper iridovirus in Taiwan(TGIV) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 58(2-3): 127-142.
- [16] Caipang C M A, Haraguchi I, Ohira T, *et al.* Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 121(2): 155-161.
- [17] Wang X W, Ao J Q, Li Q G, *et al.* Quantitative detection of a marine fish iridovirus isolated from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, using a molecular beacon[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 133(1): 76-81.
- [18] Petersen E, Edvinsson B, Lundgren B, *et al.* Diagnosis of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2006, 25(6): 401-404.
- [19] Ovarnstrom Y, James C, Xayavong M, *et al.* Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(11): 5491-5497.
- [20] Machida U, Kami M, Fukui T, *et al.* Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(7): 2536-2542.
- [21] Geng Y, Wang K Y, Zhou Z Y, *et al.* First report of a ranavirus associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*) [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2011, 145(1): 95-102.

- [22] 江育林, 张旻, 景宏丽, 等. 患病中国大鲵中分离到一株虹彩病毒及其特性的研究[J]. 病毒学报, 2011, 27(3): 274–282.
- [23] 李惠芳, 吕建强, 岳志芹. 虹彩病毒蛙病毒属病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 172–176.

Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the giant salamander iridovirus

ZHOU Yong¹, ZENG Ling-bing^{1*}, MENG Yan¹, ZHOU Qun-lan², ZHANG Hui¹,
GAO Zheng-yong³, XIAO Yi¹, SUN Jian-bin³

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430071, China)

Abstract: A 1 392 bp coding region of giant salamander iridovirus(GSIV)MCP protein was amplified by PCR and cloned into pMD19-T vector for the construction of recombinant plasmid pMD19-T-MCP. After being identified and confirmed by PCR reaction, 10-fold serial dilutions of plasmid pMD19-T-MCP were used as standard templates for TaqMan real-time PCR to generate standard curve for quantifying the virus genomic copy number. A good linear correlation was demonstrated in the standard curve for the real-time PCR assay. The coefficients of variance (CV) were 0.52% for intra-assay tests, which indicated good reliability. The detection results showed that the specificity of this assay was high for giant salamander iridovirus without cross-reactions with DNA templates from KHV, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii* and EPC cells. A minimum of 10 copies of GSIV DNA (1.1×10^{-3} pg/ μ L total DNA) could be detected, which indicated that the sensitivity of real time PCR is about 1000 times higher than that of the conventional PCR assay. The TaqMan real-time PCR assay established in this study is considered to be a powerful tool for the rapid detection and quantification of GSIV in giant salamander.

Key words: *Andrias davidianus*; giant salamander iridovirus; MCP protein; TaqMan real-time PCR

Corresponding author: ZENG Ling-bing. E-mail: zenglingbing@gmail.com