

实用 WSSV 定量检测方法的建立及其应用于脊尾白虾病毒感染规律的研究

李新苍¹, 周俊芳¹, 房文红^{1*}, 董建波², 朱磊¹, 王元¹

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所,农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室,上海 200090;

2. 江苏省海洋渔业指挥部,江苏南通 226006)

摘要:为优化当前白斑综合征病毒(WSSV)定量检测方法,实验结合当前WSSV诊断与定量方法应用的实际,试图通过设计两对普通PCR引物来建立一种实用的WSSV绝对定量方法,并利用此方法进一步探明WSSV在脊尾白虾体内的增殖规律及致病性。首先根据WSSV的囊膜蛋白VP28基因序列设计了两对特异引物(F1,R1)和(RF2,RR2),分别用于标准品质粒的构建和扩增子的扩增,以开展SYBR Green染料法定量检测WSSV的研究;随后利用该定量检测方法分析了WSSV在脊尾白虾体内的组织分布及感染规律。研究结果显示:(1)以定量引物RF2和RR2建立的SYBR Green绝对定量检测方法具有敏感度高、特异性强、定量范围广且准确等特点;(2)WSSV能感染脊尾白虾鳃、肝胰腺、肌肉、头胸甲下结缔组织、胃及肠等组织,其中头胸甲下结缔组织病毒含量最高(1.1×10^7 copies/ μg),其次是鳃组织(4.1×10^6 copies/ μg);正常脊尾白虾感染WSSV,首先经过一个约48 h潜伏期,而后开始大量增殖并造成部分虾死亡,死亡率约为20%。

关键词:脊尾白虾;白斑综合征病毒;检测与定量;感染规律

中图分类号:Q 175; S 945.1

文献标志码:A

目前,实时荧光定量PCR技术因具有灵敏度高、特异性强、检测准确可靠等诸多特点,已广泛应用于基因表达水平检测及病毒诊断与定量等研究^[1-3]。根据实时荧光定量PCR反应过程中所检测化学发光物质的不同,可分为SYBR Green染料法、Taqman探针法、分子信标法及LUX引物法等^[2]。其中,以SYBR Green染料为基础建立的荧光定量方法,以其引物设计相对简单、价格相对低廉且具有确保实验正确性的独特的熔解曲线分析程序,已成为目前应用最为广泛的实时荧光定量检测技术之一^[4]。

白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是一种大型的双链DNA病毒,可以感染多种水生甲壳动物及昆虫,是当前引起甲壳动物爆发性流行病的主要病原之一^[5]。为开展WSSV

的诊断工作并探明其在不同宿主物体内感染规律,多个实验室以Taqman探针技术为基础,建立了该病毒的荧光定量检测方法^[6-8]。虽然Taqman探针法检测灵敏度相对较高,但该检测方法的引物及探针设计相对复杂,且合成探针价格较高,在一定程度上限制了该类检测方法的推广应用。而以SYBR Green染料为基础建立WSSV荧光定量方法,只需设计一对特异引物,而不需要合成特异的探针即可用于病毒检测,从而简化了实验设计与操作,节约了实验成本,易于推广与应用。目前,从文献中获得SYBR Green法检测WSSV的灵敏度相对不高^[9]。因此,本研究拟通过重新设计引物并优化传统反应程序,以获得检测灵敏度高并能绝对定量WSSV的方法。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)又名白

收稿日期:2012-05-20 修回日期:2012-07-16

资助项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2011M07);国家自然科学基金青年基金项目(31101920)

通讯作者:房文红,E-mail:whfang06@yahoo.com.cn

虾,属甲壳纲,十足目,长臂虾科,长臂虾属,是我国重要的海洋经济虾类。近年来随着该虾养殖规模迅速扩大,有关疾病的报道逐渐增多^[10-11],但因 WSSV 感染而造成养殖脊尾白虾发病的病例却鲜有报道,仅在实验室证明脊尾白虾亦可能是 WSSV 宿主^[12-13]。2010 年 10 月份,江苏省启东市某养殖场出现疑似 WSSV 感染的发病脊尾白虾,部分发病脊尾白虾出现典型 WSSV 感染症状,后经 PCR 检测、组织切片电镜观察及组织样品回毒感染实验,确定该养殖场脊尾白虾发病因 WSSV 感染而发生。为进一步探讨 WSSV 在脊尾白虾体内的分布、增殖规律及致病性,本研究利用上述已建立的病毒诊断与定量方法进行了相关研究,获得了较好的实验结果。

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器

实验用虾及病原 健康脊尾白虾取自上海崇明县某养殖场;疑似 WSSV 感染发病脊尾白虾取自江苏启东市某养殖场;WSSV 和哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 为本实验室保存;传染性皮下和造血器官坏死病毒 (hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV) 及肝胰腺细小病毒 (hepatopancreatic parvovirus, HPV) DNA 样品由中国水产科学研究院黄海水产研究所病研室提供。

试剂与仪器 SYBR Premix Ex TaqTM、DNA Marker 等主要分子试剂均为 TaKaRa 公司产品;基因组 DNA 提取试剂盒 (MagExtractor genome) 购自日本 TOYOBO 公司;实时荧光定量 PCR 仪 (型号: StepOne Plus) 购自 ABI 公司。

1.2 WSSV 模板 DNA 的提取

以感染 WSSV 的凡纳滨白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的鳃组织为实验材料,参照 TOYOBO 公司病毒基因组提取试剂盒说明书要求,取 10 mg 组织提取 WSSV 基因组 DNA,然后溶解于 100 μ L 灭菌双蒸水中,最后取 2 μ L 用于进行 PCR 扩增的模板,制备标准品质粒目的片段;待检测样品模板提取方法相同。

1.3 引物设计

根据 WSSV 中国大陆株 (AF332093) 基因序列并参照中国台湾株及泰国株病毒基因组序列,在 WSSV 结构蛋白基因 VP28 的保守区域内设计了一对特异引物 F1: 5'-CGT CAT GGA TCT TTC

TTT CAC TC-3' 和 R1: 5'-TTA CTC GGT CTC AGT GCC AGA-3' 用于扩增制作标准品质粒核酸片段;随后,在引物 F1 与 R1 所扩增片段序列之内设计引物 (RF2, RR2) 用于定量扩增子的扩增,其引物序列分别为 RF2: 5'-AGC TCC AAC ACC TCC TCC TTC A-3' 和 RR2: 5'-TTA CTC GGT CTC AGT GCC AGA-3'。上述引物均上海由生工生物工程有限公司合成。

1.4 标准品质粒的制备

目标核酸片段扩增 以抽提的 WSSV 基因组 DNA 为模板,利用引物 F1 和 R1 进行 PCR 扩增,反应体系: 10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μ L, 浓度为 10 pmol/ μ L 上下游引物 (F1, R1) 各 2 μ L, 模板 DNA (1 μ g/ μ L) 1 μ L, Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.3 μ L, 双蒸水 36.7 μ L, 总体积 50 μ L; PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min。

目标片段克隆载体构建及鉴定 PCR 产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析,对目的片段按照胶回收试剂盒步骤进行胶回收;经 T₄ 连接酶将回收片段连接到 pBluescript-SK II 载体中;随后转化制备的感受大肠杆菌态细胞 DH5 α , 经 PCR 筛选阳性菌株进行增殖培养,取一部分样品使用碱裂解法提取质粒,双酶切对质粒进一步鉴定,另外送部分菌液样品到上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 标准品质粒定量及稀释

取标准品质粒稀释到一定浓度后,用紫外分光光度计测其 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 值 (吸光值范围 0.1 ~ 1.5 A, 1 OD 吸光值相当于 50 μ g/mL 的 dsDNA), 从而确定质粒纯度并计算出总质量,然后依据下述公式计算每微升样品中质粒拷贝数: 每微升质粒拷贝数 (copies/ μ L) = 质粒总质量 (μ g/ μ L) / 质粒分子量; 质粒分子量 = 2 \times 330 \times nt (其中 nt 为质粒的碱基数)。将标准品质粒适当调整浓度后进行 10 倍系列稀释: 吸取 20 μ L 质粒加入 180 μ L 双蒸水,振荡混匀,依次类推,共稀释 8 个梯度,直到 N \times 10¹ copies/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6 荧光定量 PCR 反应体系相关参数确定

通过普通 PCR 及荧光定量 PCR 熔解曲线分

析验证后,将引物 RF2 和 RR2 作为扩增子引物用于定量 PCR 反应。在此基础上,以提高反应特异性、敏感性为目的(获得最小 C_T 值),反复试验以建立最佳反应条件,即是通过正交试验确定各引物浓度并最终确定反应参数。

1.7 标准曲线的制作及引物扩增效率的计算

将上述系列稀释的标准品质粒作为反应模板,每个梯度设置 5 个重复,按照建立的荧光定量 PCR 反应体系及参数在荧光定量 PCR 仪上反应,仪器自动绘制标准曲线并生成线性方程及相关系数 R^2 ,根据线性方程的斜率计算出引物的扩增效率;另外,运用统计学方法计算每个梯度 C_T 值变异系数(CV),分析其重复性和稳定性。

1.8 实时荧光定量 PCR 的敏感性检测

根据 Taqman 探针法敏感性实验的前期研究结果^[7],本研究选取 10 copies/ μL 标准品质粒作为模板进行实时荧光定量分析,观察扩增效果,运用统计学方法分析其 C_T 值变异系数,验证该检测方法可能达到的检测限。

1.9 实时荧光定量 PCR 的特异性检测

采用 2×10^6 copies/ μL 的标准品质粒作阳性对照,健康凡纳滨对虾鳃组织 DNA 样品阴性对照,对甲壳动物常见病原如 IHNV、HPV 和哈维氏弧菌基因组核酸样品进行检测;同时,对来自 WSSV 感染克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)及拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)鳃组织的 DNA 样品进行检测,分析该检测方法的特异性。

1.10 发病脊尾白虾体内 WSSV 的组织分布

对来自江苏省启东市某养殖场的发病脊尾白虾,经 PCR 检测呈 WSSV 阳性。随后随机挑选 5 条脊尾白虾,按 DNA 提取试剂盒要求,将 5 只脊尾白虾的各组织分别混合,提取鳃、肝胰腺、头胸甲下结缔组织、胃、肠及肌肉等组织混合物的 DNA 样品。将不同组织的 DNA 样品稀释后取 1 μL 加入实时定量 PCR 反应体系,同时各取 1 μL 标准品加入相应的反应体系,反应结束后系统自动计算出各组织病毒的含量。

1.11 WSSV 在脊尾白虾体内的增殖规律

从上海崇明县某养殖场取生长健康的脊尾白虾 160 尾(体质量约 4 g)经暂养后,随机分为两组(每组 80 尾),任选一组为实验组,利用微量注射器将 10 μL 病毒悬液(取 WSSV 感染的凡纳滨对虾鳃组织匀浆,离心后取上清,约含

1×10^5 病毒粒子)从腹肢基部注入体内,另一组为对照组,注射等量的灭菌 PBS。病毒感染 2、4、8、16、32、48、72、96 及 120 h 时各随机取出活虾 5 尾,立即冻存于 -40°C 冰箱。待取样完成后,按上述方法提取各样品鳃组织的 DNA,最后利用上述建立的绝对定量方法检测脊尾白虾鳃组织内 WSSV 量并统计实验组与对照组死亡数据,以实验组死亡数减去对照组死亡数作为病毒感染致死实际死亡数。

2 结果

2.1 标准品质粒目标片段的 PCR 扩增

以提取的 WSSV 基因组 DNA 为模板,使用引物 F1 和 R1 进行 PCR 扩增,获得的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析,获得大小约为 619 bp 单一条带,该条带与目的片段大小一致(图 1)。

2.2 标准品质粒的 PCR 筛选、双酶切鉴定及测序

将目标片段与载体连接产物转化大肠杆菌后,挑选单克隆菌落进行 PCR 筛选并对提取的质粒进行双酶切,均获得了与目标片段大小一致的条带,表明该菌株可能含有所需的标准品质粒(图 1);生物公司测序结果显示:测序序列与目标片段的相似性为 100%,表明该载体为成功构建的标准品质粒。

2.3 标准品质粒浓度

用紫外分光光度计测得 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值为 1.83,进一步测定标准品的浓度为 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;标准品质粒全长为 3 580 bp,由公式换算出标准品拷贝数为 3.83×10^{10} copies/ μL ;随后加灭菌双蒸水将标准品质粒浓度调整为 2.0×10^{10} copies/ μL 。

2.4 反应体系的优化

最佳引物浓度确定和熔解曲线分析 正交试验表明当引物 RF2 和 RR2 终浓度均为 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,对样品的检测能获得较小的 C_T 值(cycle threshold, C_T)和较强的荧光信号强度;同时,对扩增产物进行熔解曲线分析,只获得一个单峰,说明该对引物为特异性扩增(图 2)。

荧光定量 PCR 反应体系和反应参数 经过一系列优化后确定荧光定量 PCR 反应体系: $2 \times \text{SYBR premix Ex Taq}^{\text{TM}}$ 10 μL ; 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ RF2 引物 4 μL ; 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ RR2 引物 4 μL ; DNA 模板 2

μL ;反应参数:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,82 °C 停留 2 s,读板一次;共 40 个循环;最后由 60 °C 升温到

95 °C,期间每升高 0.5 °C 检测一次荧光值,进行熔解曲线分析。

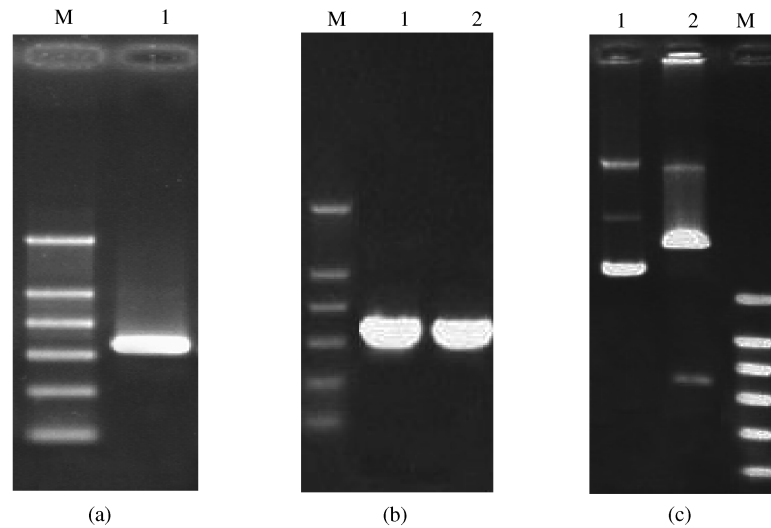


图 1 目标片段的扩增及鉴定

M. marker; (a) 1. 目的片段 PCR 扩增结果; (b) 1, 2. 重组质粒 PCR 结果; (c) 3, 4. 重组质粒酶切前与酶切后。

Fig. 1 The results of target fragment obtained from PCR and digested by enzymes

M. marker; (a) 1. target fragment; (b) 1 and 2. the target fragment 1 produced from PCR amplification from plasmid; (c) 3 and 4. the recombinant plasmid before and after digestion using enzymes.

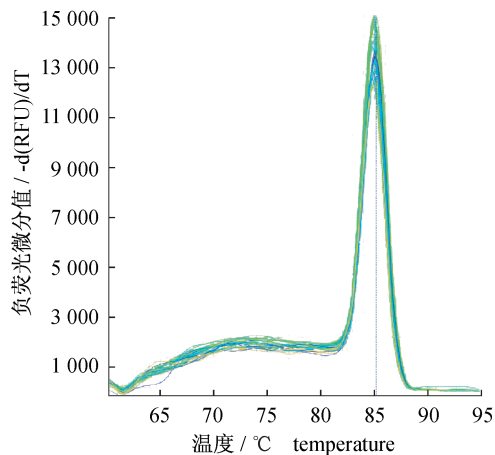


图 2 荧光定量 PCR 扩增产物的熔解曲线

PCR 产物熔解温度为 85 °C。

Fig. 2 Melting curves analysis of PCR amplified target dsDNA fragments

The value of melting temperature was 85 °C.

2.5 标准曲线的生成

使用浓度为 2×10^8 、 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 copies/ μL 的质粒模板进行标准曲线制作,实验结果见图 3:其线性方程为 $C_T = -3.216X + 36.228$ (X 为质粒拷贝数的对数),相关系数 $R^2 = 0.999$,表明标准曲线线性关

系良好;由标准曲线斜率计算出反应扩增效率为 105%,介于最优值范围内(95%~105%);运用统计学方法分析得到的 C_T 值变异系数(CV)范围介于 0.34%~1.1%,说明该检测方法重复性好、稳定性高(表 1)。

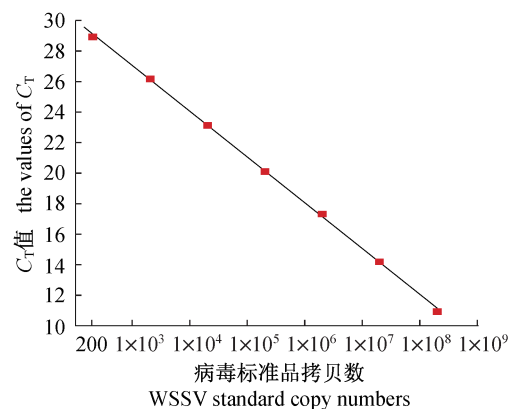


图 3 系统自动生成的标准曲线

横坐标为样品的拷贝数,纵坐标为 C_T 值。

Fig. 3 Standard curve generated automatically by the equipment

The values of horizontal ordinate: the template copy number, the value of vertical ordinate: PCR cycle number.

表 1 WSSV 标准品质粒实时定量实验结果

Tab.1 The C_T values of WSSV standards with 10-fold series dilution

质粒数/(copies/ μ L) C_T values	标准品质粒荧光定量 PCR 检测结果 C_T values of parallel tests detected by real-time quantitative PCR					平均值 mean	标准偏差 SD	变异系数 CV%
	1	2	3	4	5			
2×10^8	10.96	10.87	10.79	10.86	10.85	10.87	0.061	0.56
2×10^7	14.09	14.07	14.08	14.12	14.19	14.11	0.048	0.34
2×10^6	17.27	16.92	16.91	17.22	17.25	17.14	0.183	1.07
2×10^5	20.45	20.02	20.22	20.42	20.32	20.29	0.174	0.86
2×10^4	23.16	23.19	22.79	23.48	23.32	23.19	0.256	1.1
2×10^3	26.2	26.47	26.04	25.88	26.34	26.18	0.23	0.89
2×10^2	29.12	28.81	28.86	28.98	29.23	29.01	0.176	0.61

2.6 敏感性检测

从图 4-b 可以看出,使用 10 copies/ μ L 标准品质粒做模板时,本反应体系仍可以有效扩增,并得到良好的“S”型扩增曲线,表明该检测方法灵敏度很高,至少可检测到样品浓度 10 copies/ μ L

的模板。但其 C_T 值平均值只比 2×10^2 copies/ μ L 为模板时 C_T 值大 1.4,表明此时的检测值已不处于标准曲线的线性范围内;另外,其变异系数较大(3.8%),表明该该浓度模板时,只适合于病毒的定性检测,不适合病毒的定量分析。

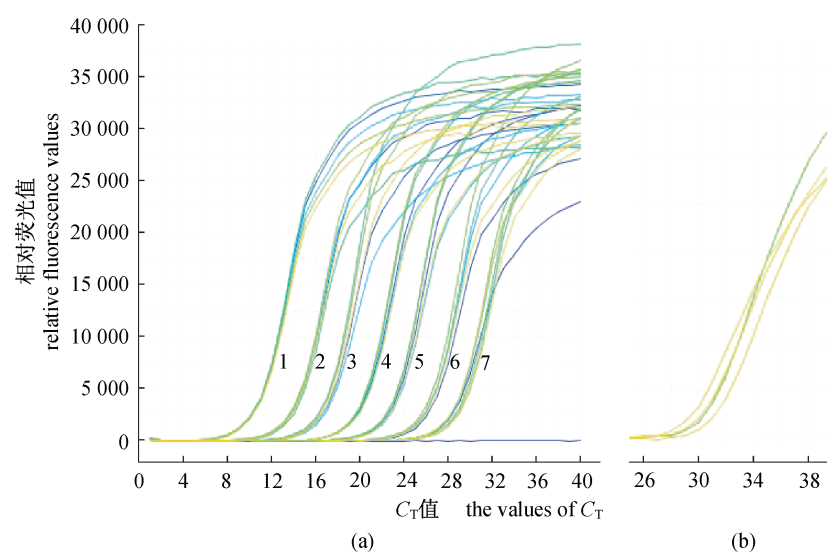


图 4 重组质粒标准品 10 倍梯度稀释时荧光定量 PCR 扩增曲线

(a)图中 1~7 号标准品质粒浓度依次为 2×10^8 、 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 copies/ μ L; (b)图中使用标准品质粒浓度为 10 copies/ μ L。

Fig.4 The quantitative graph of 10-fold dilution WSSV standards

In panel (a), the numbers of WSSV standard plasmids in samples 1-7 are 2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 and 2×10^2 copies, respectively; In panel (b), the numbers of the template was 10 copies/ μ L.

2.7 特异性检测

本研究建立的定量 PCR 反应体系对 WSSV 阳性对照具有良好的扩增效果,并且对 WSSV 感染的克氏原螯虾和拟穴青蟹鳃组织基因组核酸样品的检测也呈现良好的“S”扩增曲线;而其它甲

壳动物常见病原 IHNV、HPV、哈维氏弧菌及健康凡纳滨对虾鳃组织基因组核酸样品均未出现明显的扩增曲线(图 5),表明此方法能特异性检测 WSSV,也可用于克氏原螯虾及拟穴青蟹样品内 WSSV 的检测。

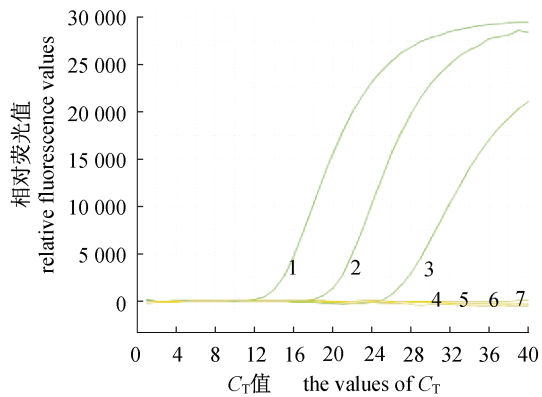


图5 WSSV 样品检测及阴性对照结果

1~3. 核酸样品分别来源于 WSSV 感染的凡纳滨对虾、克氏原螯虾及拟穴青蟹鳃组织;4~7. 核酸样品来自 IHNV、HPV、哈维氏弧菌及正常对虾鳃组织。

Fig. 5 The quantitative graph of WSSV-infected samples and WSSV-negative samples

The DNA samples 1-3 are extracted from WSSV-infected gills of shrimp, freshwater crayfish gills, and mud crab, respectively; The DNA samples 4-7 are extracted from IHNV, HPV, *V. harveyi* and healthy shrimp gills, respectively.

2.8 WSSV 在脊尾白虾体内的分布及增殖规律

对 WSSV 感染阳性发病脊尾白虾不同组织进行病毒定量检测,发现该病毒存在于鳃、肝胰腺、头胸甲下结缔组织、胃、肠及肌肉等组织中,其中头胸甲下结缔组织病毒含量最高,其它组织病毒含量依次为鳃组织、肠组织、胃组织、肝胰腺及肌肉组织(图6)。正常脊尾白虾感染 WSSV 后,早期呈隐性感染状态,病毒增殖不明显,48 h 后病毒大量增殖,120 h 时病毒含量达最高(图7),期

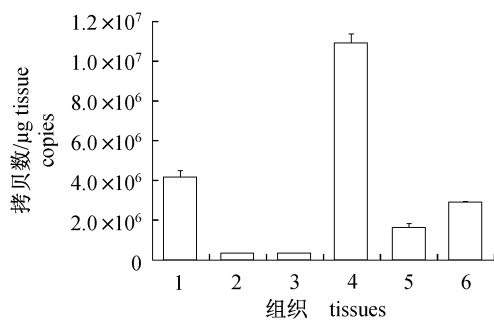


图6 WSSV 在脊尾白虾体内的组织分布 (n=5)

1. 鳃;2. 肝胰腺;3. 肌肉;4. 结缔组织;5. 胃;6. 肠。

Fig. 6 The numbers of WSSV in different tissues in WSSV-infected prawns (n=5)

1. gills; 2. hepatopancreas; 3. muscle; 4. connective tissues; 5. stomach; 6. intestine.

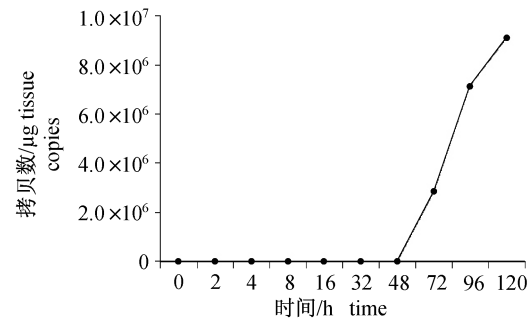


图7 WSSV 在脊尾白虾鳃组织内的增殖规律 (n=5)

Fig. 7 The replication of WSSV in gills of ridgetail white prawns (n=5)

间有部分虾死亡(实验组死亡 22 尾,对照组死亡 6 尾),死亡率为 20%。进一步分析发现,死亡高峰发生在病毒快速增殖期,超过 81% 的死亡虾(13 尾/16 尾)鳃组织病毒含量超过 2×10^6 copies/ μg 组织。

3 讨论

3.1 实用 WSSV 实时定量 PCR 检测方法的建立

目前,虽然已建立了基于 SYBR Green 染料的病毒检测与定量方法^[9],但未能将该技术的检测灵敏度发挥到极致,仍有较大的技术提升空间。为提高以 SYBR Green 荧光定量检测技术的特异性及敏感性,本研究选择在 WSSV 感染过程中具有重要作用 VP28 蛋白基因序列作为该病毒的特征序列^[15],设计特异性引物,从而在理论上保证该检测方法的特异性。随后,进一步优化设计扩增子引物质量并改变传统反应参数,来提高检测方法的敏感性。前期研究表明,SYBR Green 是一种结合双链 DNA 的染料,其结合双链 DNA 后出现很强荧光信号,但游离 SYBR Green 只产生背景荧光信号^[4]。因此,随着荧光定量 PCR 循环数的增加,由特异性引物扩增产生的双链 DNA 也随之增加,此时反应体系内 SYBR Green 与双链 DNA 的进一步结合,将使反应体系荧光信号逐步增强。通过检测反应过程中每一个循环的荧光信号强度,即可换算出目的基因或病原的数量。由此不难发现,要实现准确定量,所检测的荧光信号增强量理论上应完全由扩增子数量增加而产生,非特异扩增(如引物二聚体)将严重影响定量的准确性,因此能否通过设计高质量引物或改变反

应参数消除引物二聚体的影响决定了 SYBR Green 检测与定量方法的生命力。

高质量引物能尽可能地避免反应过程中引物二聚体的生成,从而提高检测的准确性。研究显示,引物二聚体是 PCR 非特异扩增的产物,大部分引物在进行 PCR 扩增时会产生引物二聚体^[16]。因此,设计多对引物同时进行必要的筛选是获得高质量引物的有效途径。本课题组在前期研究中,曾以白斑病毒 VP28 蛋白基因为基础设计了 5 对引物,通过对普通 PCR 产物进行凝胶电泳及成像结果分析,进行了引物的初步筛选;本研究对定量 PCR 产物的熔解曲线进行分析,通过峰的数目及峰值所对应的温度(T_m 值)进一步验证所选择引物的优劣:一般情况下,如果熔解曲线只出现单峰且 T_m 值大于 75 °C (经验值),推定为引物的特异扩增;如果出现多个峰,则存在引物的非特异扩增,会严重降低定量的准确性及灵敏性。通过上述实验过程,本研究筛选出一对高质量的扩增子引物(RF2, RR2),熔解曲线分析显示单峰, T_m 值为 85 °C,表明该对引物不存在非特异扩增,初步满足了该定量 PCR 检测方法对引物的要求。

除了通过设计高质量引物外,改变传统反应参数也是提高荧光定量 PCR 检测灵敏性和准确性的方法。通常 PCR 反应采用三步法,包括变性、复性和延伸三步。而定量 PCR 通常推荐采用二步法,将复性和延伸合并为一个步骤,以利于荧光探针定量 PCR 反应。但当采用二步法和三步法进行 SYBR Green I 实时定量反应时,存在的少量引物二聚体的干扰将无法避免。鉴于引物二聚体的 T_m 值大小通常大于 72 °C,相关研究人员提出建立四步法 SYBR Green I 实时定量 PCR^[4]。该方法是在每个循环结束检测荧光信号之前,增加一个 2 s 的高温等待时间。由于扩增子的 T_m 值与引物二聚体的 T_m 通常有一个温度差,在这两个 T_m 值之间选择一个合适的温度,这个温度既不影响扩增子产生荧光的荧光信号,又能使可能存在的引物二聚体熔解。由此,本研究以四步法为基础建立了 SYBR Green 实时定量 PCR 应用于 WSSV 的定量。该检测方法,在传统反应程序的基础上,增加了一个 82 °C 的等待温度。熔解曲线分析显示,该温度不影响特异扩增产物的荧光值,同时又足以消除可能存在的少量引物二聚体,从而保证检测的准确度。

实验结果显示,以上述引物及反应参数建立的 SYBR Green 实时定量 PCR 检测与定量方法,能特异性的检测 WSSV 病毒,而对甲壳动物组织及其它常见病原基因组核酸样品不产生特异扩增,表明该检测方法具有很强的特异性;当样品浓度为 10 copies/ μ L 模板,本反应体系仍可以有效扩增且呈现良好的“S”扩增曲线,表明该检测方法灵敏性很高,已达到或接近目前利用探针技术建立的 WSSV 检测方法的灵敏度^[7-8];本研究建立的标准曲线线性关系良好,定量范围的下限达到了 2×10^2 copies/ μ L,与目前已建立的 SYBR Green 实时定量 PCR 定量方法^[9]相比,定量下限由 10^4 copies/ μ L 上升到 2×10^2 copies/ μ L,定量范围增加了 2 个数量级,已接近目前探针技术定量的下限(10^2 copies/ μ L)^[8],表明该定量方法能完成低拷贝病毒样品的定量,可以用于探索病毒增殖规律的研究。

3.2 WSSV 在脊尾白虾体内的组织分布及感染规律

目前,已通过多种检测方法从对虾、蟹、龙虾、小龙虾及其他水生昆虫中发现了 WSSV,但能检测到 WSSV 并不意味着该病毒可以导致机体发病^[5,17]。早在上世纪 90 年代 WSSV 在养殖对虾大流行时^[18-19],吴友吕等^[12]在脊尾白虾体内观察到与当时引起对虾暴发病类同的 C 亚群杆状病毒。后来,雷质文等^[13]使用核酸探针技术从对虾发病池中的脊尾白虾体内检测到了 WSSV,明确了脊尾白虾亦是 WSSV 的天然宿主。本研究在已初步明确 WSSV 可以造成一定规模的脊尾白虾季节性发病的基础上,进一步探索了 WSSV 在发病脊尾白虾体内的分布及含量和病毒在脊尾白虾体内的增殖规律。从病毒的组织分布来看,该病毒主要分布于头胸甲下结缔组织与鳃组织中,与该病毒在凡纳滨对虾体内的分布基本一致^[20]。从病毒含量来看,脊尾白虾头胸甲下结缔组织、鳃、肝胰腺与肌肉 4 个组织的病毒含量比例为 34.5:13.1:1.1:1,而凡纳滨对虾血淋巴、鳃、肝胰腺与肌肉 4 个组织的病毒含量比例为 13.4:6.3:0.5:1^[20],由于头胸甲下结缔组织包括了分散的造血组织,其内含有大量的血淋巴,比较上述结果,不难发现甲壳动物中含有大量血淋巴的组织,如头胸甲下结缔组织、血淋巴和鳃是病毒含量较高的组织;相比较而言,肌肉组织和肝胰腺

组织病毒的含量相对较低,这也是常取鳃组织用于纯化病毒或检测样品是否感染 WSSV 的一个原因。另外,发病脊尾白虾头胸甲下结缔组织病毒数量达到了 1×10^{10} copies/g 组织,接近凡纳滨对虾肌肉组织病毒含量^[21]。从病毒的增殖规律来看,注射剂量为 1×10^5 copies 的病毒,在注射后有一个大约 48 h 的潜伏期,随后开始大量繁殖,并伴有少量虾死亡,而凡纳滨对虾注射同样量的病毒潜伏期相对较短,约为 30 h,表明该病毒对凡纳滨对虾更为敏感^[20,22],但亦可以造成脊尾白虾一定程度的死亡,亦是脊尾白虾的重要病原。

总之,本研究提供了两对普通 PCR 引物,利用这两对引物完成了 WSSV 病毒的检测与定量,该方法检测病毒特异性强、灵敏度高,定量准确且使用节约、方便;随后,利用该检测与定量方法初步探明了 WSSV 在脊尾白虾体内的感染规律,证明 WSSV 也是养殖脊尾白虾的重要病原。

参考文献:

- [1] 庄强,钱程,刘立,等. SYBR Green 实时定量 PCR 检测外源基因拷贝数[J]. 浙江理工大学学报, 2010,27(1):125-129.
- [2] 朱捷,杨成君,王军. 荧光定量 PCR 技术及其在科研中的应用[J]. 生物技术通报,2009,2:73-76.
- [3] Li X C, Du Z Q, Lan J F, *et al.* A novel pathogen-binding gC1qR homologue, *FcgC1qR*, in the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 36(2):400-407.
- [4] 张驰宇,张高红,杨敏,等. 四步法消除 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 中引物二聚体的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(3):387-392.
- [5] Liu H P, Soderhall, Jiravanichpaisal P. Antiviral immunity in crustaceans [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2):79-88.
- [6] 谢芝勋,谢丽基,庞耀珊,等. WSSV 和 IHNV 二重实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 水生生物学报, 2009, 33(1):22-27.
- [7] 陈信忠,任聪,龚艳清,等. 实时荧光定量 PCR 法检测对虾白斑综合征病毒[J]. 检验检疫学刊, 2009, 19(2):7-11.
- [8] 毕道荣,岳志芹,梁成珠,等. 实时定量 PCR 快速检测对虾白斑综合征病毒[J]. 山东农业大学学报:自然科学版, 2009, 40(1):54-58.
- [9] 程晓艳,刘庆慧,黄健. 实时荧光定量 PCR 检测对虾白斑综合征病毒方法的建立[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(26):14265-14267.
- [10] 董建波,程建新,何健. 脊尾白虾和三疣梭子蟹健康养殖技术探讨[J]. 海洋开发与管理, 2008, 25(2):65-70.
- [11] Xu W J, Xie J J, Shi H, *et al.* Hematodinium infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China [J]. *Aquaculture*, 2010, 300(1-4):25-31.
- [12] 吴友吕,陈全震. 脊尾白虾杆状病毒病研究[J]. 水产科技情报, 1995, 22(1):8-13.
- [13] 雷质文,黄健,梁艳,等. 用核酸探针技术检测脊尾白虾体内的白斑综合征病毒[J]. 安徽农业大学学报, 2003, 30(1):82-85.
- [14] 王艳,徐小元,何为,等. SYBR Green I 实时定量 PCR 检测乙型肝炎病毒 DNA 的探索[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2002, 16(2):160-161.
- [15] Xie X, Xu L, Yang F. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(21):10615-10623.
- [16] Halford W P, Falco V C, Gebhardt B M, *et al.* The inherent quantitative capacity of the reverse transcription polymerase chain reaction [J]. *Analysis Biochemistry*, 1999, 266(2):181-191.
- [17] Escobedo-bonilla C M, Alday-sanz V, Wille M, *et al.* A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(1):1-18.
- [18] 蔡生力,黄健,王崇明,等. 1993-1994 年对虾爆发病的流行病学研究[J]. 水产学报, 1995, 19(2):112-117.
- [19] Flegel T W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus mondon*) in Thailand [J]. *Microbiology Biotechnology*, 1997, 13(4):433-42.
- [20] Durand S V, Lightner D V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(7):381-389.
- [21] Oidtmann B, Stentiford G D. White spot syndrome virus (WSSV) concentrations in crustacean tissues-a review of data relevant to assess the risk associated with commodity trade [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2011, 58(6):469-482.
- [22] 姚泊,何建国,莫福. 白斑综合征杆状病毒对对虾和罗氏沼虾致病性的研究[J]. 广州大学学报:自然科学版, 2002, 1(1):35-38.

Development and application of an economical real-time PCR for WSSV detection and quantification in ridgetail white prawns (*Exopalaemon carinicauda*)

LI Xin-cang¹, ZHOU Jun-fang¹, FANG Wen-hong^{1*}, DONG Jian-bo², ZHU Lei¹, WANG Yuan¹

(1. Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. The Headquarters of Oceanic Fishery of Jiangsu Province, Nantong 226006, China)

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) can infect many kinds of crustaceans and thus has caused huge economic losses to the crustacean farming. In order to detect WSSV precisely and sensitively, quantify WSSV conveniently, and further investigate the WSSV multiplication patterns in crustaceans, a practical real-time PCR for the quantification and diagnosis of WSSV is required to be developed. However, currently, the harvested quantitative real-time PCR for WSSV was either costly for those which were developed based on the *Taqman* probe technology, or insensitive for a latest method which was set up with the SYBR green dye. In this study, a practical, sensitive, and specific quantitative real-time PCR for WSSV based on SYBR Green was developed, and the tissue distributions and the profiles of WSSV proliferation in ridgetail white prawns (*Exopalaemon carinicauda*) were examined with this method. The details were as follows. First, a pair of primers (F1, R1) was designed to amplify the target fragment, which would be used to construct WSSV standard plasmid, and then another pair of primers (RF2, RR2) located inside the above target fragment was synthesized to produce amplicons in real-time PCR reaction, thereby developing a new diagnostic and quantitative real-time PCR for WSSV with SYBR Green dye. The results demonstrated that this quantitative method for WSSV was specific, sensitive, and precise. Subsequently, we further investigated WSSV distribution and proliferation pattern in ridgetail white prawns. The results of WSSV distribution showed that WSSV infected all detected tissues, among which, the connective tissues under the carapace possessed the highest virus load (1.1×10^7 copies/ μg tissue), and the second highest tissue were gills with the virus load of 4.1×10^6 copies/ μg tissue; The data of WSSV proliferation pattern illustrated that the copies of WSSV began to increase dramatically at 48 h after challenge, but before that there was no obvious change for virus copies. With the increase of infection time, the copies of WSSV increased more and reached the highest numbers at 120h post infection. In addition, we found that during this process the mortality of ridgetail white prawns caused by WSSV was approximately 20%. All these results suggest that WSSV is a deadly pathogen to ridgetail white prawns, and the new quantitative real-time PCR for WSSV is practical.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; white spot syndrome virus (WSSV); absolute quantification; virus distribution and proliferation pattern

Corresponding author: FANG Wen-hong. E-mail: whfang06@yahoo.com.cn