

基于荧光定量 PCR 的鳊传染性脾肾 坏死病毒滴度检测方法

付小哲^{1,2}, 李宁求^{1,2*}, 林 强^{1,2}, 石存斌^{1,2}, 吴淑勤^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部渔用药物创制重点实验室,
广东省水产动物免疫技术重点实验室,广东 广州 510380;
2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心,湖北 武汉 430070)

摘要: 针对传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) 的 *ORF007* 基因,设计特异性引物及 TaqMan 探针,建立了 ISKNV 的实时荧光定量 PCR 方法。采用 CPE 法对连续 10 倍稀释的 ISKNV 培养液的滴度进行了测定,同时采用荧光定量 PCR 法测定病毒拷贝数。结果显示,荧光定量 PCR 测定的病毒拷贝数与 CPE 法测定的病毒滴度具有良好的线性关系,其线性方程为 $y = 1.076x + 0.545$ ($R^2 = 0.9986$),其中 y 为基因组拷贝数浓度的对数, x 为病毒滴度 $TCID_{50}$ 的对数。研究表明,荧光定量 PCR 法可替代 CPE 法应用于 ISKNV 疫苗抗原的定量,大大缩短了疫苗制备的时间,为疫苗生产提供了方便。

关键词: 鳊; 传染性脾肾坏死病毒; 疫苗; 滴度; 定量 PCR

中图分类号: S 943

文献标志码: A

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是中国重要的名优养殖品种,随着养殖密度的提高,养殖病害愈发严重,其中由传染性脾肾坏死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 引起的鳊虹彩病毒病是鳊养殖的主要疫病^[1-2]。根据国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 第八次报告^[3], ISKNV 是虹彩病毒科肿大细胞病毒属的代表种,其传染力强,发病率高达 30%,致死率高达 90% 以上,可以感染近 60 种淡水和海水鱼^[4],给鳊、加洲鲈 (*Micropterus salmoides*)、乌鳢 (*Channa argus*)、美国红鱼 (*Sciaenops ocellatus*) 等海淡水鱼类养殖业造成了巨大威胁。自 1994 年以来, ISKNV 给中国鳊养殖业造成的平均年经济损失高达 2 亿元^[5],是制约鳊养殖业健康发展的主要瓶颈。

免疫接种是预防传染病发生的主要手段,本实验室建立了 ISKNV 敏感的鳊脑组织细胞系

CPB,研制出细胞培养灭活疫苗。但是在病毒疫苗制备过程中,一个关键步骤是测定病毒抗原含量。测定病毒滴度的方法有多种,如细胞病变 (CPE) 法、空斑法、 OD_{260} 法、荧光定量 PCR 法等。目前 ISKNV 病毒滴度检测方法只有 CPE 法,但是 CPE 法主要依靠显微镜下观察细胞感染病毒后的形态学上的改变作为判定病变的依据,故造成了该法测定结果的稳定性和可重复性较差,且耗时长,延长疫苗制备的周期。因此,建立一种快速、简便、准确的 ISKNV 病毒滴度检测方法成为当务之急。荧光定量 PCR 法是通过测定病毒基因组拷贝数较精确地反映细胞培养液中病毒数量^[6]。目前,鳊传染性脾肾坏死病毒荧光定量 PCR 检测方法未见报道。传染性脾肾坏死病毒基因组由 111 362 个碱基组成,包括 125 个预测开放读码框 ORF (open reading frames)^[7],其中 ORF007 预测编码膜蛋白,可与鳊感染 ISKNV 后的血清产生免疫印迹反应^[8],可能是 ISKNV 的保

收稿日期:2014-03-31 修回日期:2014-05-23

资助项目:国家科技支撑计划(2012BAD25B02);国家自然科学基金(31202032);广东省教育部产学研结合项目(2012B091100164)

通信作者:李宁求,E-mail:liningq@126.com;吴淑勤,E-mail:gzwushuqin@163.com

护性抗原之一。本研究以 ISKNV ORF007 为靶基因,建立鳊传染性脾肾坏死病毒荧光定量 PCR 检测方法,采用该方法对不同滴度的病毒进行检测,同时与 CPE 法测定病毒滴度进行比较分析,探讨荧光定量 PCR 检测鳊传染性脾肾坏死病毒滴度的可行性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

鳊脑组织细胞系 (CPB) 由本实验室建立并保藏;鳊传染性脾肾坏死病毒 QY 株 (ISKNV-QY) 由本实验室分离保存。

1.2 实验试剂

DNeasy Blood & Tissue Kit 购于 Qiagen 公司;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于 Omega 公司;10 × Taq 反应缓冲液、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、Premix Ex Taq™ 购于 TaKaRa 公司;M199 细胞培养基、胎牛血清、胰酶购于 Invitrogen 公司。

1.3 荧光定量 PCR 法测定病毒滴度

引物和探针的设计与合成 根据 GenBank 中鳊传染性脾肾坏死病毒 ORF007 基因序列 (NC_003494),应用 Primer 5.0 软件设计引物和探针 ISKNV FP/ISKNV probe/ISKNV RP。引物及探针由生工生物技术(上海)有限公司合成。序列如下:

ISKNV FP:5'-CGAGGCCACATCCAACATC-3'

ISKNV RP: 5'-CGCCTTTAACGTGGGATAT-ATTG-3'

ISKNV probe: 5'-FAM-CACCAAAGTACC-GCGGACTCGT-Eclipse-3'

标准曲线的建立及灵敏度检测 将实验室保存的含有 ISKNV ORF007 基因的质粒 pcDNA007 按 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^0 拷贝/ μL 梯度稀释,在荧光定量 PCR 仪上 (ABI 7500) 分别进行循环扩增,每个浓度做 2 个重复,绘制标准曲线。反应体系: Premix Ex Taq™ ($2 \times$) $10 \mu\text{L}$, ISKNV FP、ISKNV RP ($10 \mu\text{mol/L}$) 各 $0.4 \mu\text{L}$, ISKNV probe ($10 \mu\text{mol/L}$) $0.5 \mu\text{L}$, ROX™ Reference Dye II ($50 \times$) $0.4 \mu\text{L}$, DNA 模板 $1 \mu\text{L}$, 去离子水 $7.3 \mu\text{L}$, 总体系 $20 \mu\text{L}$ 。阴性对照组以去离子水代替待测样品。反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s , 1 个循环; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s , 40 个循环,于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 时采集荧光信号。

特异性和重复性实验 分别以鳊传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV)、锦鲤疱疹病毒 3 型 (KHV-3)、传染性造血器官坏死病毒 (IHNV)、大口黑鲈虹彩病毒 (LMBV)、淋巴囊肿病毒 (LCDV)、大鲵虹彩病毒 (STIV) 组织 DNA 或 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增以检测引物的特异性。取 ISKNV 的 DNA 在 1 次实验中重复 30 次,评价该方法的重复性。

感染细胞病毒核酸的提取 ISKNV-QY 株感染鳊脑组织细胞系 (CPB),待细胞出现病变后收集细胞病毒材料,以 DNA 酶灭活裸露的 DNA, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 消化 1 h , $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min 灭活 DNA 酶。然后取消化后的病毒原液连续 10 倍梯度稀释至 10^{-6} ,取 $500 \mu\text{L}$ 不同稀释度病毒液按照 Qiagen 公司 DNeasy Blood & Tissue 试剂盒说明书提取病毒核酸,最后以 $100 \mu\text{L}$ 去离子水洗脱病毒核酸。

荧光定量 PCR 检测病毒滴度 对“感染细胞病毒核酸的提取”中提取的每个稀释度的病毒核酸随机抽取 3 份,每份 $2 \mu\text{L}$,按照“标准曲线的建立及灵敏度检测”中的方法进行定量 PCR,每个样品设 2 个复孔。将样品 C_T 值与标准曲线进行比对,所得结果即为对应病毒液中完整病毒基因组的拷贝数。

1.4 CPE 测定病毒滴度

将 ISKNV-QY 病毒原液连续 10 倍梯度稀释至 10^{-6} ,共获得 7 个样品,每个样品进行滴度测定,重复 3 次。取对数生长期 CPB 细胞接种 96 孔板 (每孔 10^5 个), $5\% \text{ CO}_2$ 、 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 16 h ,细胞贴壁并形成均匀单层。梯度稀释 ISKNV 病毒样品至 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 10 个梯度,每孔加 $100 \mu\text{L}$,每列 1 个稀释度,共 10 列。其余 2 列加入培养液,作空白对照。 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养。每天显微镜下观察细胞病变情况。记录每一列病变情况,连续记录 14 d ,依 Karber 法计算病毒滴度,结果以 $\text{LgTCID}_{50}/\text{mL}$ 表示。

2 结果

2.1 定量 PCR 检测方法的建立

以重组质粒制备的标准品作模板,PCR 反应绘制标准曲线 (图 1),该曲线有效范围为 $8.75 \times 10^1 \sim 8.75 \times 10^8$ 拷贝/ μL 。每个梯度扩增曲线的指数期明显,重复性较好,标准曲线的斜率为 -3.314 ,相关系数为 0.999 ,相关性较好。质粒

拷贝数 (X) 与 C_T 值之间的线性方程: $C_T = -3.314 \lg X + 41.48$ 。敏感性结果显示,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,检测方法非常灵敏。特异性结果显示只有 ISKNV 基因组模板有典型扩增(图 2),说明本方法的引物特异。重复性结果显示同一次实验内 30 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本重合(图 3),说明该方法重复性好,可进行稳定、可靠的检测。

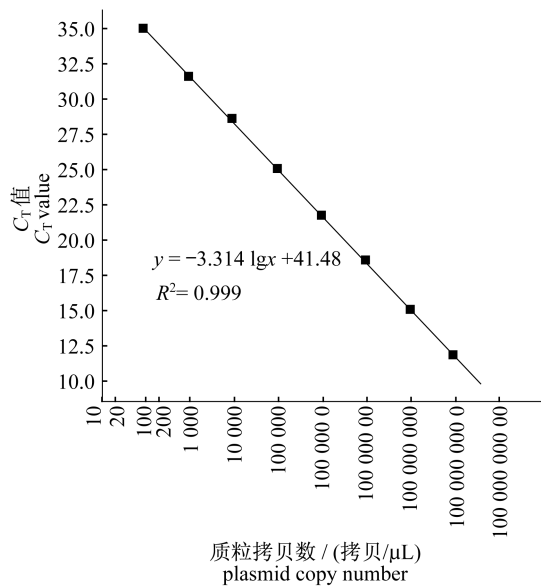


图 1 ISKNV 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.1 Standard plot for quantification of ISKNV in real-time PCR assay

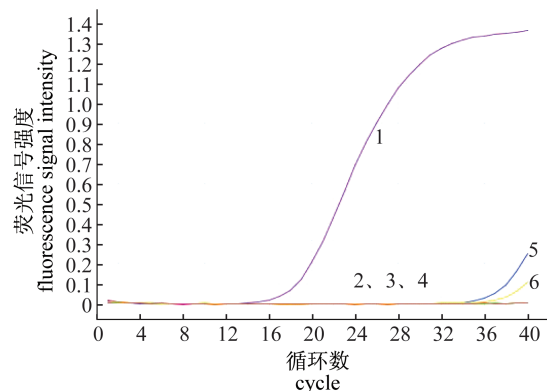


图 2 ISKNV 荧光定量 PCR 特异性实验扩增曲线

1. 鳃传染性脾肾坏死病毒; 2. 锦鲤疱疹病毒 3 型; 3. 传染性造血器官坏死病毒; 4. 大口黑鲈虹彩病毒; 5. 淋巴囊肿病毒; 6. 大鲵虹彩病毒

Fig.2 Amplification curve of specificity experiment of real-time PCR for ISKNV

1. ISKNV; 2. KHV-3; 3. IHNV; 4. LMBV; 5. LCDV; 6. STIV

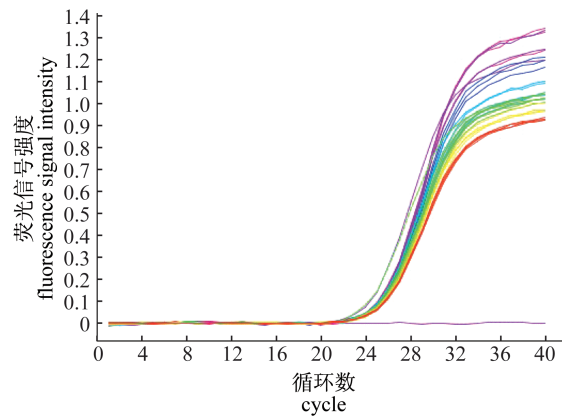


图 3 ISKNV 荧光定量 PCR 30 次重复性实验扩增曲线

Fig.3 Amplification curve of 30 repeat experiments of real-time PCR for ISKNV

2.2 定量 PCR 法检测不同滴度病毒含量

病毒原液梯度稀释后,提取处理样品中的病毒 DNA,经实时定量 PCR 确定病毒 DNA 的浓度,结果如图 4 所示,随稀释倍数的增加,病毒核酸 DNA 拷贝数逐渐降低, 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 病毒液的拷贝数依次为 1.82×10^8 、 1.82×10^7 、 1.86×10^6 、 1.87×10^5 、 9.80×10^3 、 8.89×10^2 和 6.88×10 拷贝/mL。

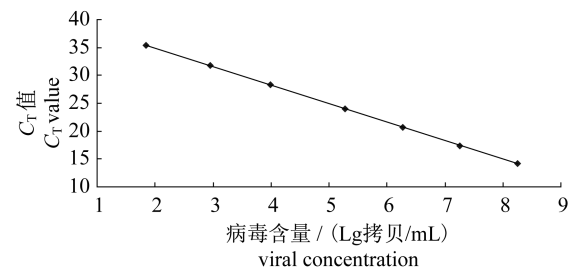


图 4 ISKNV 病毒含量与荧光定量 PCR 检测 C_T 值之间的关系

Fig.4 The relative relationship between ISKNV DNA concentration and C_T value of real-time PCR

2.3 CPE 法测得病毒滴度

结合前期接毒实验结果,通过观察细胞形态变化,取第 14 天记录结果确定病毒滴度。依 Karber 法计算得 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 病毒液的滴度分别为 $10^{7.25}$ 、 $10^{6.25}$ 、 $10^{5.25}$ 、 $10^{4.25}$ 、 $10^{3.25}$ 、 $10^{2.25}$ 、 $10^{1.25}$ 。

2.4 2 种方法测得病毒滴度的比较

将 ISKNV 不同稀释度的病毒滴度对数与病毒拷贝数对数进行线性相关回归分析,由图 5 可

见,定量 PCR 测得的病毒拷贝数的对数与 CPE 法测得的病毒滴度 $TCID_{50}$ 的对数呈显著的线性回归关系,病毒拷贝数对数 (y) 与病毒滴度对数 (x) 线性回归方程为: $y = 1.076x + 0.545$, 相关系数为 0.998 6, 说明两者间存在较好的相关性。

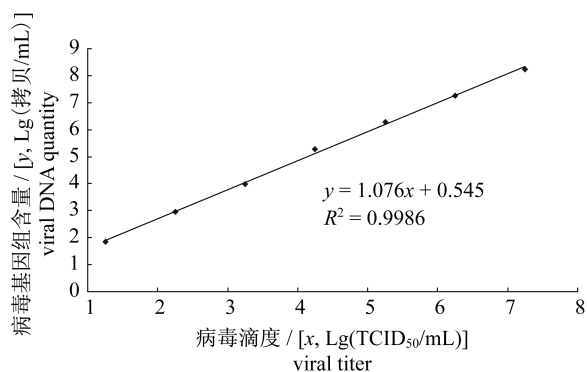


图5 CPE法检测 ISKNV 滴度与荧光定量 PCR 法测得基因组拷贝数之间线性关系

Fig. 5 The relative relationship between ISKNV titer by CPE and viral DNA concentration by real-time PCR

3 讨论

近年来,随着人们对虹彩病毒对水产养殖业危害认识的加深,已建立了多种虹彩病毒定量 PCR 方法,包括淋巴囊肿病毒^[9]、蛙虹彩病毒^[10]、真鲷虹彩病毒^[11]、大鲵虹彩病毒^[12]、大口黑鲈虹彩病毒^[13]、大黄鱼虹彩病毒^[14]等,但至今尚未建立鳊虹彩病毒定量 PCR 检测方法。本研究针对鳊传染性脾肾坏死病毒建立了 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法,该方法最低可检测到 10 个病毒核酸分子拷贝数。通过对淋巴囊肿病毒、大口黑鲈虹彩病毒等多种病毒进行特异性检测,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。重复性实验显示,本方法重复性好,可进行稳定、可靠的检测。同时采用该方法对梯度稀释的 ISKNV 进行定量检测,测定的病毒拷贝数与 CPE 方法检测的病毒滴度有较好的相关性。

研究发现,PCR 扩增产物的量与被测样品中原始靶基因的含量有很好的对应关系,因而可以通过对扩增产物的含量分析来反映被测病毒的实际含量^[15]。荧光定量 PCR 检测病毒滴度已在多种病毒研究中应用,如腺病毒^[16],慢病毒^[17],杆状病毒^[18]等。本研究针对鳊传染性脾肾坏死病

毒建立了实时定量 PCR 检测病毒滴度的方法,由于荧光定量 PCR 法是通过荧光定量的方法对模板拷贝数进行精确的定量,为了避免未包装病毒 DNA 的影响,本研究在提取病毒核酸之前先对病毒进行了灭活 DNA 的处理,除去了裸露的 DNA,以保证所测得的病毒核酸拷贝数能较精确地反映病毒保存液中的完整病毒颗粒数。CPE 法测定的病毒滴度为感染性滴度,本研究对 CPE 法及定量 PCR 法检测 ISKNV 滴度的相关性进行了线性回归分析,相关系数为 0.9986,说明两者间存在较好的相关性,可以通过分析病毒拷贝数确定病毒的感染滴度。另外,在耗费时间方面,定量 PCR 方法在实际应用中,每个样品从提取到检测大概需要 4 h,而 CPE 法则需要 10~14 d,相对于 CPE 法,定量 PCR 大大节省了时间。在成本方面,定量 PCR 的成本相对较高,大概是 CPE 法的 10 倍。但是病毒经反复冻融、自身半衰期等诸多因素的影响,其感染性病毒数要低于总病毒颗粒数,因此,综合考虑各因素,荧光定量 PCR 法检测 ISKNV 疫苗滴度更实用可靠。

总之,本研究建立了鳊传染性脾肾坏死病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法,并与细胞病变法测定病毒滴度进行比较,显示 qPCR 测定的病毒拷贝数与 CPE 法检测病毒滴度具有良好的线性关系,说明建立的荧光定量 PCR 法可代替细胞病变法应用于 ISKNV 疫苗抗原的定量检测。同时本研究涉及的靶标基因为 ISKNV 的 ORF007 基因,该基因编码蛋白可与鳊感染 ISKNV 后的血清产生免疫反应,推测可能是 ISKNV 的保护性抗原。本研究建立的定量 PCR 方法,为研究 ORF007 核酸疫苗在体内的组织分布、持续存在时间提供方法。

参考文献:

- [1] Wu S Q, Li X H, Pan H J, et al. Research on the pathogen of the outbreak infective disease of *Siniperca chuatsi* [J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(1): 56-60. [吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊暴发性传染病病原研究. 水产学报, 1997, 21(1): 56-60.]
- [2] He J G, Weng S P, Huang Z J, et al. Identification of outbreak and infectious diseases pathogen of *Siniperca chuatsi* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni: Natural Science, 1998, 37

- (5):74-77. [何建国,翁少萍,黄志坚,等. 鳊暴发性流行病病毒性病原研究. 中山大学学报:自然科学版,1998,37(5):74-77.]
- [3] Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, *et al.* Virus taxonomy: VIIIth report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. New York: Academic Press,2005:145-162.
- [4] Wang Y Q, Lü L, Weng S P, *et al.* Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus[J]. Archives of Virology,2007,152(4):763-773.
- [5] Wu S Q, Wang Y J, Pan H J, *et al.* The new technology of prevention and cure against chinese perch disease[J]. Scientific Fish Farming,2007,8:12-13. [吴淑勤,王亚军,潘厚军,等. 鳊鱼病害防治新技术(一). 科学养鱼,2007,8:12-13.]
- [6] Atkinson E M, Debelak D J, Hart L A, *et al.* A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors [J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26 (11): 2821-2823.
- [7] He J G, Deng M, Weng S P, *et al.* Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus [J]. Virology, 2001, 291 (1):126-139.
- [8] Xiong X P, Dong C F, Weng S P, *et al.* Antigenic identification of virion structural proteins from infectious spleen and kidney necrosis virus[J]. Fish & Shellfish Immunology,2011,31(6):919-924.
- [9] Sun Y J, Zhou Y, Yue Z Q, *et al.* Detection of Lymphocystis disease virus using SYBR green real time quantitative PCR assay[J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science,2009,39(2):253-258. [孙颖杰,周优,岳志芹,等. 淋巴囊肿病毒实时定量 PCR 检测方法的建立和应用. 中国海洋大学学报:自然科学版,2009,39(2):253-258.]
- [10] Li H F, Lv J Q, Yue Z Q, *et al.* Development of real-time PCR assay detecting Ranavirus, Family Iridoviridae [J]. Journal of Huazhong Agricultural University,2008,27(2):172-176. [李惠芳,吕建强,岳志芹,等. 虹彩病毒蛙病毒属病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立. 华中农业大学学报,2008,27(2):172-176.]
- [11] Zhao Y R, Tan L Y, Liu H, *et al.* Development and application of a real time PCR assay for the detection of red-sea bream iridovirus [J]. Progress in Fishery Sciences,2011,32(2):111-116. [赵玉然,谭乐义,刘荻,等. 真鲷虹彩病毒实时定量 PCR 检测方法的建立与应用. 渔业科学进展,2011,32(2):111-116.]
- [12] Zhou Y, Zeng L B, Meng Y, *et al.* Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the giant salamander iridovirus [J]. Journal of Fisheries of China,2012,36(5):772-778. [周勇,曾令兵,孟彦,等. 大鲵虹彩病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. 水产学报,2012,36(5):772-778.]
- [13] Ma D M, Bai J J, Deng G C, *et al.* Development of a TaqMan-MGB real time PCR assay for largemouth bass ulcerative syndrome virus detection [J]. Journal of South China Agricultural University, 2011, 32 (2):99-102. [马冬梅,白俊杰,邓国成,等. 大口黑鲈溃疡综合征病毒 TaqMan-MGB 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立. 华南农业大学学报,2011,32(2):99-102.]
- [14] 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.
- [15] Mantero G, Zonaro A, Albertini A, *et al.* DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction [J]. Clinical Chemistry,1991,37(3):422-429.
- [16] Thomas M A, Lichtenstein D L, Krajcsi P, *et al.* A real-time PCR method to rapidly titer adenovirus stocks [J]. Methods in Molecular Medicine,2007,130:185-192.
- [17] Ma H Y, Fang Y D, Zhang J Z. A novel method for the determination of recombinant lentiviral titer and infectivity by qRT-PCR [J]. Life Science Research, 2009,13(5):394-398. [马海燕,方彧聃,张敬之. 应用荧光实时定量 PCR 方法检测重组慢病毒滴度及其感染效率. 生命科学研究,2009,13(5):394-398.]
- [18] Lo H R, Chao T C. Rapid titer determination of baculovirus by quantitative real time polymerase chain reaction [J]. Biotechnology Progress,2004,20(1):354-360.

qPCR method for virus titer testing of infectious spleen and kidney necrosis virus

FU Xiaozhe^{1,2}, LI Ningqiu^{1,2*}, LIN Qiang^{1,2}, SHI Cunbin^{1,2}, WU Shuqin^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

Abstract: Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) is the causative agent causing high mortality and significant economic losses to Chinese perch and it is listed by OIE. Now an effective virus inactivated vaccine has been developed and it is necessary to determine virus titer in vaccine development process. Because the traditional cytopathic effect (CPE) method is time-consuming and laborious, it is essential to establish a rapid, accurate method for testing ISKNV titer. The development and validation of a TaqMan qPCR assay for determination of ISKNV titers were reported in the present study. This method used specific primers and probe designed to amplify a small genomic fragment of ISKNV 007 gene. The method was specific and reproducible as well as sensitive with the minimum detectable limit of 10 viral copies. At the same time cytopathic effect (CPE) method was compared and analyzed to qPCR. The results showed that the titers obtained by qPCR correlated well with TCID₅₀ as indicated by linear regression and linear equation was $y = 1.076x + 0.545$ ($R^2 = 0.9986$). Y stands for Log gene copies concentration and X stands for Log TCID₅₀ of virus. The results showed that the real-time PCR method can replace the CPE method in evaluating the titer of ISKNV vaccine, which will shorten vaccine producing cycle and provide convenience for vaccine production.

Key words: *Siniperca chuatsi*; infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV); vaccine; titer; qPCR

Corresponding author: LI Ningqiu. E-mail: liningq@126.com;

WU Shuqin. E-mail: gzwshuqin@163.com