

文章编号: 1000-0615(2017)09-1464-09

DOI: 10.11964/jfc.20160810514

## 基于病毒mRNA监测的传染性脾肾坏死病毒灭活快速检验方法建立及其应用

张醴溪<sup>1</sup>, 杨圆圆<sup>2</sup>, 方伟<sup>2</sup>, 付小哲<sup>3,4</sup>, 林强<sup>3,4</sup>, 李趁<sup>3,4</sup>,  
刘礼辉<sup>3,4</sup>, 梁红茹<sup>3,4</sup>, 黄志斌<sup>3</sup>, 吴志新<sup>1,4</sup>, 李宁求<sup>3,4\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 广东省水生动物疫病预防控制中心, 广东 广州 510222;

3. 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;

4. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 为建立传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)灭活快速检验方法, 从ISKNV感染CPB细胞系转录谱筛选并经qRT-PCR验证表达量最高的病毒ORF099基因作为快速检测靶基因。以质粒pMDORF099为标准品, 采用qPCR方法绘制了C<sub>T</sub>值与质粒拷贝数的标准曲线, 其线性方程为C<sub>T</sub> = -3.42lgx + 39.455, 最低检测限为3拷贝/μL, 结果显示组间和组内变异系数均小于2%, 表明该方法具有较高的灵敏度和较好的重复性。将ISKNV病毒悬液10倍稀释成10<sup>0</sup>~10<sup>3</sup> 拷贝/mL, 分别取1 mL病毒稀释液接种CPB细胞, 在第7、9和11天提取细胞总RNA, 经基因组DNA去除试剂盒去除残留DNA后采用qRT-PCR方法检测ORF099基因转录本, 结果显示在第7天即可从接种1个拷贝病毒的细胞中检测出ISKNV ORF099转录本。将3个浓度梯度(0.05%、0.1%、0.2%)的甲醛灭活ISKNV制备的模拟样品以及实验室制备的3批次ISKNV细胞灭活疫苗样品接种CPB细胞9 d, 采用上述快速检验方法进行检测。0.05%、0.1%甲醛灭活模拟样品可检测到ISKNV ORF099基因转录本, 其他样品均未检测到。而细胞盲传实验显示, 0.1%终浓度甲醛灭活ISKNV接种细胞盲传3代未出现CPE, 鱼体安全实验显示接种鱼体后无临床发病症状和实验鱼死亡, 表明本研究建立的病毒灭活快速检验方法比细胞盲传法和鱼体安全实验具有更高的灵敏度, 与传统检测方法相比具有灵敏度高、耗时短、检测效率高等优点, 对提高ISKNV灭活疫苗生产效率具有重要意义。

**关键词:** 传染性脾肾坏死病毒; 灭活疫苗; 灭活检验; mRNA; 荧光定量RT-PCR

**中图分类号:** S 941.4

**文献标志码:** A

鳊(*Siniperca chuatsi*)是我国重要的淡水名优养殖鱼类, 因其味道鲜美、蛋白质含量高而深受广大消费者的喜爱。然而自1997年以来, 鳊暴发性传染病对鳊养殖业带来巨大的经济损失, 已成为限制鳊养殖业发展的主要瓶颈。吴淑勤等<sup>[1]</sup>首次确认了一种截面呈六角形, 直径约150 nm的大型球状病毒颗粒为鳊暴发性传染病的主要

病原。由于该病毒主要感染鳊的脾脏和肾脏, 何建国等<sup>[2]</sup>将其命名为传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV), 隶属于虹彩病毒科(Iridoviridae)肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*), 并测定了其全基因组<sup>[3]</sup>。由于传染性脾肾坏死病毒病发病率高、致死率高、造成经济损失大<sup>[4]</sup>, 其防控技术研究成为鱼病研

收稿日期: 2016-08-25 修回日期: 2017-01-11

资助项目: 国家科技支撑计划(2012BAD25B02); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201501B12)

通信作者: 李宁求, E-mail: liningq@126.com

究者重要课题之一。

疫苗接种是预防鱼类病毒病最主要的技术措施, 针对鳃传染性脾肾坏死病毒, 已有细胞灭活疫苗<sup>[5]</sup>、重组亚单位疫苗<sup>[6]</sup>、DNA疫苗<sup>[7]</sup>的报道。而细胞灭活疫苗因具有制备简便、免疫效果稳定、研发周期短等优势而成为最具产业前景的疫苗之一。Dong等<sup>[5]</sup>报道了以MFF (mandarin fish fry)细胞系为扩增体系的ISKNV细胞培养灭活疫苗, 其免疫保护率达到95%; Fu等<sup>[8]</sup>建立了对ISKNV高度敏感的CPB细胞系, 为ISKNV疫苗的制备提供了新的扩增体系; 付小哲等<sup>[9]</sup>建立了检测ISKNV滴度的荧光定量PCR方法, 为疫苗制备中病毒的定量提供了方便; 罗霞等<sup>[10]</sup>优化了ISKNV同步接种培养条件, 为细胞灭活疫苗规模化制备打下基础。病毒灭活检验是ISKNV细胞灭活疫苗制备中重要的一环, 但传统病毒灭活检测方法是通过细胞盲传3代, 同时通过接种鱼体验证病毒是否灭活完全, 整个过程约需30 d的时间, 大大延长了疫苗生产周期, 降低了疫苗的生产效率, 因此急需建立一种ISKNV灭活快速检验方法。

病毒在细胞增殖过程中其相关基因持续转录, 因此可通过对病毒mRNA进行监测而检验病毒是否灭活。针对RNA病毒, 刘令九等<sup>[11]</sup>采用细胞培养/链特异性RT-PCR方法建立了甲型肝炎(Hepatitis A)灭活疫苗灭活验证方法; 余芬等<sup>[12]</sup>采用链特异性RT-PCR建立了一种脊髓灰质炎病毒(poliovirus)灭活快速验证方法; Kim等<sup>[13]</sup>以黄瓜绿斑花叶病毒(cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)基因组热敏感区为靶标建立了该病的热灭活RT-PCR快速检测方法; 针对DNA病毒, Yuasa等<sup>[14]</sup>通过RT-PCR监测锦鲤疱疹病毒(koi herpesvirus, KHV) mRNA来检测复制中的病毒。而针对鳃传染性脾肾坏死病毒灭活快速检测方法尚未见报道。本研究从ISKNV感染CPB细胞系转录谱结果中挑选表达量最高的病毒早期基因为靶标基因, 以监测该基因mRNA有无作为病毒是否灭活完全的指标, 建立ISKNV灭活快速检测荧光定量RT-PCR方法, 旨在缩短ISKNV细胞灭活疫苗生产过程中灭活检验周期, 提高疫苗生产效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系与病毒株

鳃组织细胞系(Chinese perch brain cell line,

CPB)由本实验室建立并保藏<sup>[8]</sup>; 鳃传染性脾肾坏死病毒QY株(ISKNV-QY)由本实验室分离保存。

### 1.2 主要试剂

胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于普洛麦格公司; TRIzol Reagent购自Invitrogen公司; pMD18-T载体、Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Probe qPCR)、*E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)均购自TaKaRa公司; 2 $\times$ Taq Plus PCR MasterMix购自TIANGEN公司; 细胞培养瓶、胰酶、胎牛血清等均购自Gibco公司;

### 1.3 靶标基因筛选

根据本实验室已有的ISKNV感染CPB细胞转录谱结果, 选取表达量最高的5个病毒ORF, 应用Primer 5.0软件设计特异性引物和探针(表1)。将ISKNV梯度稀释成1、10、100、1000拷贝/mL, 分别接种于长满CPB细胞的T25细胞培养瓶, 接种7 d后提取细胞总RNA用随机引物反转录制备cDNA模板。采用Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Probe qPCR)试剂盒检测这些基因的表达量。反应体系: 依次加入Mix 10  $\mu$ L、ROX 0.4  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L引物ISKNV FP/ ISKNV RP各0.4  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L探针ISKNV probe 0.4  $\mu$ L、2  $\mu$ L模板、补水至20  $\mu$ L。阴性对照组以去离子水代替待测样品。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s、60  $^{\circ}$ C 34 s, 40个循环, 于60  $^{\circ}$ C时采集荧光信号。结合转录组结果筛选出一个表达量较高的基因作为灭活检验靶标基因。

### 1.4 靶标基因拷贝数荧光定量PCR检测方法的建立

**标准品的制备** 以ISKNV基因组DNA为模板, 使用q-099F、q-099R引物(表1)扩增ORF099; 反应体系: 12.5  $\mu$ L 2 $\times$ Easy Taq<sup>®</sup> PCR SuperMix、1  $\mu$ L Forward Primer (10  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L Reverse Primer (10  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L DNA、19.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O; 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 57.8  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min, 产物经2%琼脂糖电泳检测。胶回收后与pMD18-T载体连接, 转化*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 涂板过夜培养后, 挑取单菌落送生工生物工程(上海)有限公司测序。用分光光度计测定阳性重组质粒pMD099在260和280 nm处的吸光度, 计算重

表1 用于ISKNV灭活快速检验靶标基因筛选的荧光定量PCR引物和探针

基因名称 gene name	引物及探针名称 primers and probes	序列(5'-3') sequences(5'-3')
ORF023	q-023F	TTGTACATGGCGAGGTGGTA
	q-023R	ACGCCTACACAAGGCTGACT
	q-023probe	FAM+CTGTCATCAAGCTGAAACCTCACCTG+TAMRA
ORF099	q-099F	ACTTGGCTTCCACACAATCC
	q-099R	ATGCTGTGCTGTCATCTTGC
	q-099probe	FAM+ATTGGCATCCAAGCCAATATACATGGC+TAMRA
ORF100	q-100F	ATCTTGTGTTGGCCTCCAC
	q-100R	GGTCGGCTGGTCAACTATGT
	q-100probe	FAM+TCTTGTGCAAGTTGGTGATCACAATGG+TAMRA
ORF032	q-032F	CCATGGTTCAGCAATGTGAC
	q-032R	CTGCCGTCTTACAGTGTCCA
	q-032probe	FAM+CCTACACACGCAATGGGAGGCTAGAGT+TAMRA
ORF008	q-008F	CTGGCAACTGTGACTCTGGA
	q-008R	GTCCACCTGTCATCATCACG
	q-008probe	FAM+TAGTGTGTGAGTATGGCGCTTTCAGC+TAMRA

组质粒的拷贝数。

**标准曲线的建立** 将 $3 \times 10^{10}$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 重组质粒进行10倍梯度稀释,使其浓度依次为 $3 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^0$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,作为标准品模板,参照“靶标基因筛选”中反应体系和条件进行荧光定量PCR扩增,反应结束后绘制标准曲线。

**荧光定量PCR方法的敏感性和重复性实验** 将 $3 \times 10^{10}$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 重组质粒进行10倍梯度稀释,使其浓度依次为 $3 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^0$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,以此作为标准品模板用于qPCR反应进行敏感性测试,每个样品设置3个重复。取不同稀释梯度的重组质粒DNA 2  $\mu\text{L}$ 用于qPCR反应,反应体系和条件同上。根据实验结果计算出所能检测出的最低模板浓度。取 $3 \times 10^5$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 的重组质粒在1次实验中重复30次,重复实验3次,通过组内和组间的 $C_T$ 值变异系数(标准偏差/重复值平均数)来评估该方法的重复性。

### 1.5 靶标基因转录本荧光定量RT-PCR检测方法建立

**cDNA模板的制备** 用ISKNV感染CPB细胞,在出现明显病变后用TRIzol Reagent提取细胞总RNA,提取步骤:每 $1 \times 10^5$ 细胞数量加入1 mL

TRIzol裂解5 min,吹打混匀;加入200  $\mu\text{L}$ 氯仿,剧烈振荡15 s,室温放置10 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 r/min离心15 min;取上清液加入等体积的异丙醇,室温放置10 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 r/min离心10 min;弃上清液,加入1 mL 75%乙醇,涡旋混合,4  $^{\circ}\text{C}$ 下7500 r/min离心5 min;弃上清液,室温自然干燥数分钟,加入适量DEPC水溶解,立即进行反转录。反转录使用TaKaRa PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒,第一步去除基因组DNA反应体系:依次加入5  $\times$ gDNA Eraser Buffer 2  $\mu\text{L}$ 、gDNA Eraser 1  $\mu\text{L}$ 、Total RNA 2  $\mu\text{L}$ 、RNase Free dH<sub>2</sub>O 5  $\mu\text{L}$ ,反应条件42  $^{\circ}\text{C}$  2 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 保存;第二步反转录使用20  $\mu\text{L}$ 体系:依次加入第一步反应液10  $\mu\text{L}$ 、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1  $\mu\text{L}$ 、RT Primer Mix 4  $\mu\text{L}$ 、5  $\times$ PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) 4  $\mu\text{L}$ 、Rnase Free H<sub>2</sub>O 1  $\mu\text{L}$ ,反应条件37  $^{\circ}\text{C}$  15 min、85  $^{\circ}\text{C}$ 失活5 s、4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

**去除效率验证** 采用TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒,对提取的RNA样品进行基因组DNA去除,分别以未去除DNA的RNA、去除DNA后的RNA为模板,荧光定量PCR检测基因组DNA的去除效率,每个样品分别设置3个重复。

### 检测病毒mRNA的灵敏度和重复性实验

将ISKNV病毒液梯度稀释至 $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 拷贝/mL, 取1 mL病毒液接种于长满CPB细胞的T25细胞培养瓶, 分别于接种后7、9和11 d收集细胞, 按照上述方法制备cDNA模板, 采用建立的荧光定量RT-PCR方法进行检测, 确定该方法检测ISKNV mRNA的灵敏度和最低检测限, 同时设置未接种病毒的细胞作为阴性对照。取ISKNV的cDNA在1次实验中重复30次, 重复实验3次, 通过组内和组间的 $C_T$ 值变异系数来评估该方法的重复性。

### 1.6 检测方法验证与应用

采用3个浓度梯度(0.05%、0.1%、0.2%)的甲醛在30 °C下灭活ISKNV 72 h后制备模拟样品以及从实验室制备3批次ISKNV细胞灭活疫苗样品, 对本研究建立的ISKNV灭活快速检验方法进行验证。取以上疫苗原液1 mL分别接种CPB细胞后9 d, 按照本研究的方法“靶标基因转录本荧光定量RT-PCR检测方法建立”中所示制备模板进行荧光定量RT-PCR反应检测病毒mRNA, 同时进行细胞盲传检测和鱼体安全试验。细胞盲传法参考世界动物卫生组织(OIE)方法: 接种细胞10 d盲传1代, 第2代开始接种7 d后盲传, 盲传3代观察是否产生CPE; 鱼体安全试验: 每批次样品腹腔注射鳊(体质量约50 g)30尾(3个平行, 每个10尾), 每尾0.2 mL, 同时设置佐剂组和PBS组作为对照; 试验期间水温25~28 °C, 持续观察21 d, 记录鱼体的活动和摄食情况。

## 2 结果

### 2.1 目标基因的筛选

ISKNV感染CPB细胞24 h的转录谱结果显示, 相对表达量前5位的病毒基因依次为ORF023、ORF099、ORF100、ORF032、ORF008(表2)。荧光定量RT-PCR检测结果显示, 在接种1、10、100、1000 拷贝/mL ISKNV细胞培养液中, ORF099转录本扩增的 $C_T$ 值均较低, 其中1和1000 拷贝/mL浓度接种后的ORF099转录本 $C_T$ 值在5个病毒早期基因中最低, 表明ISKNV ORF099基因转录水平较高, 可认为其作为灭活检验的靶标基因具有较高的灵敏度, 因此选择ORF099基因作为灭活快速检验靶基因。

表2 ISKNV感染CPB细胞后5个病毒早期基因转录谱及荧光定量RT-PCR验证结果

Tab. 2 The transcription profile of 5 viral early genes and the results of qRT-PCR after ISKNV infection in CPB cells

基因名称 gene name	转录谱分析 24 h-ISKNV- RPKM transcript result of 24 h- ISKNV- RPKM	qRT-PCR $C_T$ 值 $C_T$ value of qRT-PCR			
		1 拷贝/ $\mu$ L	10 拷贝/ $\mu$ L	100 拷贝/ $\mu$ L	1000 拷贝/ $\mu$ L
ORF023	31.164	31.247	29.794	24.041*	20.116
ORF099	24.243	30.211*	28.902	24.279	19.043*
ORF100	20.662	31.692	28.694*	24.261	19.671
ORF032	15.946	34.569	36.307	31.119	24.118
ORF008	3.256	35.628	33.304	27.567	24.500

注: RPKM是将map到基因的read数除以map到genome的所有read数(以million为单位)与RNA的长度(以kb为单位); “\*”表示在同一病毒稀释度中灵敏度最高( $C_T$ 值越低, 灵敏度越高)

Notes: RPKM: reads per kb per million reads; “\*” expressed as the highest sensitivity in the same virus dilution (the lower the  $C_T$  value, the higher the sensitivity)

### 2.2 基于荧光定量PCR检测重组质粒拷贝数

标准曲线的建立与标准品的制备 PCR扩增得到大小为191 bp的ISKNV ORF099基因片段, 将该基因片段重组到pMD18-T中, 构建包含目标片段的阳性质粒pMD099, 测序结果显示目标片段与ORF099基因序列一致。以重组质粒pMD099作为标准品, qPCR反应绘制标准曲线, 在质粒浓度为 $3 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^0$  拷贝/ $\mu$ L时, 拷贝数(x)与 $C_T$ 的函数为 $C_T = -3.421gx + 39.455$ ,  $R^2 = 0.998$ , 表明相关性较好。

荧光定量PCR的敏感性和重复性实验 通过对重组质粒pMD099各稀释度样品进行荧光定量PCR检测, 结果显示, 最低可检测到3个病毒核酸分子拷贝数(图1-a), 重复性实验结果显示, 同一次实验内30个平行样品扩增曲线在阈值线附近基本重合(图1-b), 表明其重复性好; 组间及组内变异系数均小于2%(表3), 表明具有较高的稳定性, 可用于ORF099基因的定量分析。

### 2.3 基于病毒mRNA荧光定量PCR检测方法

去除效率验证 分别取1、10、100、1000 拷贝/mL ISKNV接种细胞后第7和11天以及灭活ISKNV病毒接种细胞后第9天的细胞总RNA进行gDNA的去除, 分别以去除前的总RNA和去除后的总RNA为模板进行qPCR, 结果显示未进行



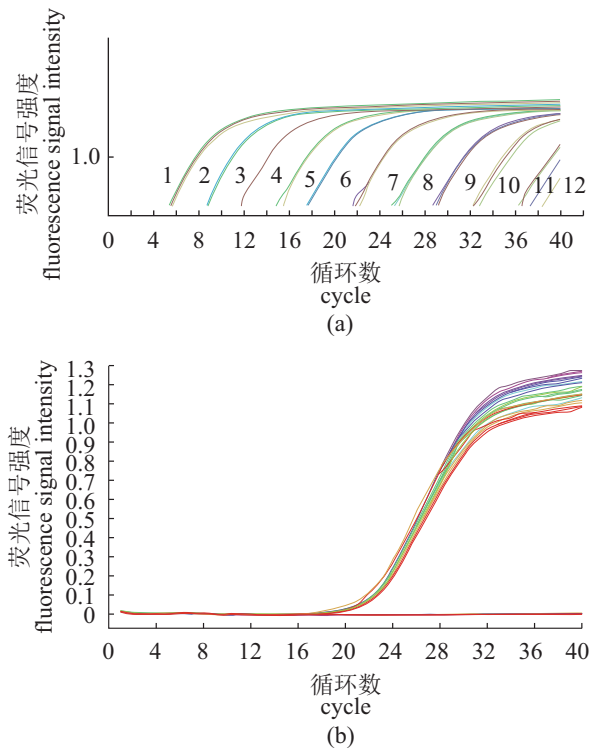


图1 基于 $ORF099$ 基因的ISKNV荧光定量PCR检测方法的敏感性和重复性

(a) 1~11. 质粒拷贝数分别为 $3 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^2$ 、 $3 \times 10^1$ 、 $3 \times 10^0$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ , 12. 阴性对照; (b) 荧光定量PCR检测pMDORF099重组质粒拷贝数同一次实验内30个平行样品扩增曲线

Fig. 1 Sensitivity and reproducibility of real-time PCR based on ISKNV  $ORF099$  gene

(a) 1-11. number of plasmid copies:  $3 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^2$ 、 $3 \times 10^1$ 、 $3 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ , 12: negative control; (b) detection of 30 parallel samples copy number of pMDORF099 recombinant plasmid by real-time PCR in the same experiment

gDNA去除的样品可检测出ISKNV  $ORF099$ 基因, 去除后的样品检测不出 $ORF099$ 基因(图2), 表明经gDNA去除后总RNA中无DNA残留。

荧光定量PCR检测病毒mRNA的灵敏度和重

复性实验 分别将1、10、100、1000拷贝/mL ISKNV接种细胞后7、9和11 d, 提取细胞总RNA进行荧光定量RT-PCR检测。如图3所示, 随着病毒接种量的增加和接种时间的延长, 检测到的ISKNV mRNA越多, 其中1拷贝/mL病毒接种7 d后即可检测到1~2个拷贝/ $\mu\text{L}$ 的ISKNV mRNA, 表明该方法具有极高的灵敏度。通过对ISKNV cDNA样品进行荧光定量RT-PCR检测, 结果显示组间及组内变异系数均小于2%(表3), 重复性好, 可稳定检测 $ORF099$ 基因转录本。

## 2.4 方法的验证与应用

将3个浓度梯度(0.05%、0.1%、0.2%)的甲醛在30 °C条件下灭活ISKNV 72 h后制备的模拟样品以及实验室制备的3批次ISKNV细胞灭活疫苗样品接种CPB细胞9 d, 经上述病毒灭活快速检验方法检测。0.2%甲醛灭活ISKNV 72 h后的模拟样品和3批次疫苗样品接种CPB细胞检测不出病毒基因mRNA, 细胞盲传3代均未出现CPE, 将上述样品接种鱼体后无实验鱼死亡, 说明ISKNV在此条件下被完全灭活; 0.05%终浓度甲醛灭活ISKNV 72 h后的模拟样品接种CPB细胞可检测出病毒基因mRNA, 细胞盲传至第3代时出现CPE, 样品接种鱼体导致60%的死亡率, 表明此样品未灭活完全; 0.1%终浓度甲醛灭活ISKNV 72 h后的模拟样品接种CPB细胞也可检测出病毒基因mRNA, 但细胞盲传3代未出现CPE, 鱼体安全实验显示接种鱼体后无临床发病症状和实验鱼死亡, 表明本研究建立的病毒灭活快速检验方法比细胞盲传法和鱼体安全实验具有更高的灵敏度(表4), 且根据“基于荧光定量PCR检测重组质粒拷贝数”中建立的标准曲线方程以及所有的细胞阴性实验结果认为 $C_T > 36$ 时为阴性。以上结果表明, 本研究建立的基于ISKNV mRNA检测的病毒灭活快速检验方法是可靠的。

表3 ISKNV荧光定量PCR检测方法和荧光定量RT-PCR检测方法重复性实验结果

Tab. 3 Reproducibility results of ISKNV real-time PCR and qRT-PCR detection methods

组内实验 intra-assay	荧光定量PCR检测方法(pMDORF099)			荧光定量RT-PCR检测方法(ISKNV阳性cDNA)		
	平均 $C_T$ 值 meant $C_T$	标准差 S D	变异系数/% CV	平均 $C_T$ 值 meant $C_T$	标准差 S D	变异系数/% CV
1	23.538	0.185	0.786	23.098	0.284	1.230
2	21.061	0.383	1.819	23.319	0.358	1.535
3	23.058	0.215	0.932	21.864	0.383	1.752
组间实验 inter-assay	22.522	0.261	1.159	22.760	0.342	1.501

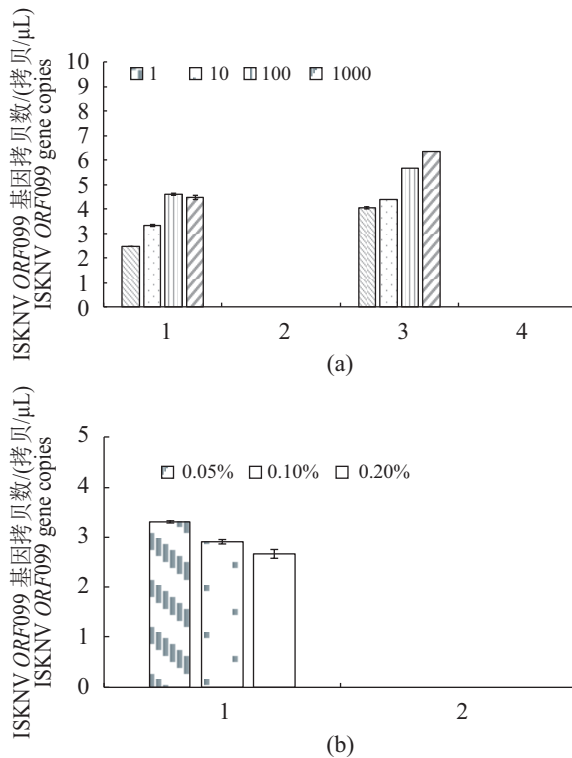


图2 ISKNV感染CPB细胞总RNA中gDNA去除验证

(a) 稀释病毒液接种CPB细胞7d (1、2)和11d (3、4)后提取的RNA样品; 1、3表示未去除gDNA的RNA, 2、4表示去除gDNA后的RNA; (b) 0.05%、0.1%和0.2%终浓度甲醛灭活ISKNV 72 h后接种CPB细胞9 d获得的RNA样品, 1表示未去除gDNA的RNA, 2表示去除gDNA后的RNA

Fig. 2 Removal of gDNA from total RNA from CPB cells infected with ISKNV

(a) represent the RNA samples extracted from CPB cells which the different virus dilutions had incubated for seven days(1, 2) or eleven days(3, 4); 1, 3 represented the RNA was not removed by gDNA; 2, 4 represented the RNA was removed by gDNA; (b) represented the RNA samples extracted from CPB cells which ISKNV inactivated with 0.05%, 0.1% and 0.2% final concentration of formaldehyde for 72 h had incubated for nine days, 1 represented the RNA was not removed by gDNA, 2 represented the RNA was removed by gDNA

### 3 讨论

目前对ISKNV细胞灭活疫苗的检测方法仅限于传统的细胞盲传法和鱼体安全实验评价方法, 这些方法耗时长、过程繁琐, 增加了疫苗生产周期。本研究针对病毒灭活不完全接种细胞后病毒基因进行转录的特点, 结合荧光定量PCR的快速、准确等优点, 从ISKNV感染CPB细胞转录谱中筛选出1个病毒早期基因ORF099, 采用qRT-PCR方法建立了一种基于病毒mRNA监测的ISKNV灭活快速检测方法, 具有简便、快速、

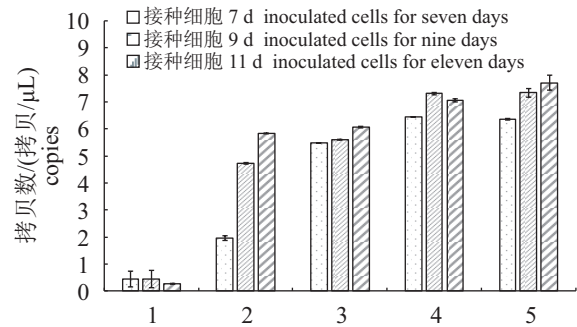


图3 荧光定量RT-PCR检测ISKNV感染CPB细胞后病毒基因转录数量

1~5. 细胞均接种1 mL病毒悬液; 1. 阴性对照; 2. 病毒接种量为1 拷贝/mL; 3. 病毒接种量为10 拷贝/mL; 4. 病毒接种量为100 拷贝/mL; 5. 病毒接种量为1000 拷贝/mL

Fig. 3 qRT-PCR detection of ISKNV transcripts after ISKNV infected CPB cells

1-5. cells all inoculated 1 mL virus suspension; 1. negative control; 2. inoculated one copy ISKNV; 3. inoculated ten copies ISKNV; 4. inoculated one hundred copies ISKNV; 5. inoculated a thousand copies ISKNV

稳定等优点, 可用于ISKNV细胞灭活疫苗生产中的病毒灭活快速检验。

虹彩病毒基因按照时序表达可以分成三大类: 极早期(IE)基因、早期(E)基因和晚期(L)基因。本研究从病毒感染细胞转录谱中选取的5个基因中, 除了ORF008是极早期(IE)基因外, 另外4个基因在早期和晚期(E/L)都有表达<sup>[15]</sup>。ISKNV转录谱结果和荧光定量RT-PCR验证结果显示病毒感染细胞后ORF099基因转录本最多, 且其mRNA动力学结果显示在其感染后7、9和11 d呈现递增趋势, 适合作为灭活快速检验目标基因。ISKNV ORF099编码C3HC4型锌指蛋白<sup>[3]</sup>, 而锌指蛋白是生物体内数量最多的转录调控因子, ORF099基因可能在劫持细胞周期、调控细胞代谢以利于自身复制增殖等方面发挥重要作用, 这对ISKNV通过感染实现自身增殖是非常重要的环节, 因此以ORF099 mRNA作为靶标对病毒是否增殖进行判定是可行的。

灭活检验的灵敏度对保证疫苗的安全性至关重要, 本研究结果表明1个拷贝的ISKNV接种CPB细胞后7 d即可检测到病毒mRNA, 表明该方法的检测灵敏度可达1 拷贝/mL。而采用0.1%终浓度甲醛灭活ISKNV 72 h后制备的模拟样品, 接种CPB细胞盲传3代未出现细胞病变, 鱼体安全实验也未见发病症状和鱼体死亡, 但接种细胞后9 d即可检测出病毒mRNA, 表明该方法灵敏度

表 4 不同灭活检测方法对3批次ISKNV细胞灭活疫苗灭活检验的比较

Tab. 4 Inactivated detection of 3 batches of ISKNV cells inactivated vaccine using different inactivated detection methods

组别 groups	批次或甲醛浓度/% batches or concentration of formaldehyde	细胞盲传法结果 results of virus blind passage method by cell	实验鱼数量/尾 experimental fish numbers	供试鱼死亡率/% mortality rate	荧光定量RT-PCR检测结果 qRT-PCR results
灭活ISKNV模拟样品 simulated samples of inactivated ISKNV	0.05	+++	30	60	+
	0.1	-	30	0	+
	0.2	-	30	0	-
ISKNV灭活疫苗 inactivated ISKNV vaccines	1	-	30	0	-
	2	-	30	0	-
	3	-	30	0	-
佐剂组 adjuvant group			30	0	
PBS组 PBS group			30	0	

注：“+++”表示细胞盲传至第3代出现CPE，“+”表示检出结果为阳性，即病毒未灭活完全，“-”表示检出结果为阴性，即没有检出活病毒

Notes: “+++” represented CPE appeared in the third generations of blind passage method by cell, “+” represented the positive result that virus was not completely inactivated, “-” represented the negative results that can not detect live virus

超过细胞盲传法和鱼体安全实验方法。本实验室前期研究中0.2%终浓度甲醛灭活ISKNV 72 h接种细胞盲传3代均未出现细胞病变，鱼体安全实验也未见发病症状和鱼体死亡，应用本研究的方法接种细胞后9 d也检测不出病毒mRNA，说明ISKNV在此条件下完全灭活。3批次的ISKNV细胞灭活疫苗样品验证结果表明，该方法与细胞盲传法、鱼体安全实验法结果一致，表明本研究建立的基于病毒mRNA的qRT-PCR监测的病毒灭活快速检测方法可以替代传统的细胞盲传法和鱼体安全实验方法，实现ISKNV灭活的快速检测。灭活检验周期长短对疫苗生产周期起决定性作用，本研究建立的ISKNV灭活快速检验方法只需要7 d即可判断病毒是否灭活完全，而传统的细胞盲传法和鱼体安全实验周期至少需要24和21 d，因此，该方法可大大缩短ISKNV灭活疫苗生产周期，提高疫苗的生产效率。

虽然未完全灭活疫苗接种细胞后未灭活病毒粒子也会复制增殖，但是由于灭活疫苗接种细胞后细胞中残留大量灭活病毒DNA，将会影响qPCR直接检测病毒基因组增殖量结果的可信度。本研究发现灭活的ISKNV接种细胞后提取的总RNA未经DNA去除直接进行荧光定量PCR可扩增到目标基因，表明灭活病毒中的确存在病毒基因组DNA片段，因此，采用针对mRNA的RT-PCR方法进行DNA病毒的灭活检验是严谨可信的，它能区分感染性病毒和失活病毒，避免假阳性结果。qRT-PCR是一种检测低丰度mRNA的

可选方法，但提取总RNA中容易残留基因组DNA，而PCR扩增往往难以区分cDNA和gDNA<sup>[16]</sup>，常常导致检测结果不可靠<sup>[14]</sup>，因此在检测DNA病毒mRNA的过程中，对基因组DNA进行有效去除是非常必要的。本研究结果显示，ISKNV感染CPB细胞后，未去除gDNA的细胞总RNA不经过反转录也能检测到ORF099基因，表明提取的总RNA中存在DNA残留，而采用gDNA去除试剂盒处理提取的总RNA后，不能扩增到ORF099基因增殖曲线，表明基因组DNA已成功去除，反转录后得到的增殖曲线来自cDNA模板。但去除gDNA残留的同时不可避免造成mRNA损失和降解<sup>[17]</sup>，因此有学者通过设计一个带独特标签序列的引物进行反转录，而后以此标签序列设计PCR引物，也可避免残留DNA对结果的干扰，如Folz等<sup>[18]</sup>设计了靶向mRNA poly(A)尾并添加一个6~8 bp的独特标签序列的反转录引物，然后使用可识别反转录引物的特异上下游引物进行PCR反应，因残留基因组DNA不包含插入标签序列，因此也可排除基因组DNA干扰，但此方法存在降低PCR扩增特异性的弊端，在使用中应引起注意。

综上所述，本研究以ISKNV早期基因ORF-099为靶标基因，设计特异性引物和探针，建立了ISKNV灭活快速检验的qRT-PCR方法，该方法具有检测灵敏度高、检测周期短、稳定性好等优点，可替代传统的细胞盲传法和鱼体安全实验法用于ISKNV细胞灭活疫苗生产过程中病毒的灭活检验。

## 参考文献:

- [1] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊暴发性传染病病原研究[J]. 水产学报, 1997, 21(S): 56-60.  
Wu S Q, Li X H, Pan H J, *et al.* Research on the pathogen of the outbreak infective disease in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(S): 56-60(in Chinese).
- [2] 何建国, 翁少萍, 黄志坚, 等. 鳊暴发流行病病毒性病原研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(5): 74-77.  
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, 1998, 37(5): 74-77(in Chinese).
- [3] 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.
- [4] 吴淑勤, 王亚军, 潘厚军, 等. 鳊鱼病害防治新技术(一)[J]. 科学养鱼, 2007(8): 12-13.  
Wu S Q, Wang Y J, Pan H J, *et al.* New technique for disease control of *Siniperca chuatsi*[J]. Scientific Fish Farming, 2007(8): 12-13(in Chinese).
- [5] Dong C F, Xu X P, Luo Y W, *et al.* Efficacy of a formalin-killed cell vaccine against infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) and immunoproteomic analysis of its major immunogenic proteins[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(2-4): 419-428.
- [6] Fu X Z, Li N Q, Lai Y T, *et al.* Protective immunity against iridovirus disease in mandarin fish induced by recombinant major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(4): 880-885.
- [7] Fu X Z, Li N Q, Lin Q, *et al.* Protective immunity against infectious spleen and kidney necrosis virus induced by immunization with DNA plasmid containing *mcp* gene in Chinese perch *Siniperca chuatsi*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(1): 259-266.
- [8] Fu X Z, Li N Q, Lai Y T, *et al.* A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization[J]. Journal of Fish Biology, 2015, 86(1): 32-45.
- [9] 付小哲, 李宁求, 林强, 等. 基于荧光定量PCR的鳊传染性脾肾坏死病毒滴度检测方法[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1573-1578.  
Fu X Z, Li N Q, Lin Q, *et al.* qPCR method for virus titer testing of infectious spleen and kidney necrosis virus[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1573-1578(in Chinese).
- [10] 罗霞, 付小哲, 李宁求, 等. 同步接毒条件下鳊传染性脾肾坏死病毒在CPB细胞中的最适增殖条件[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1712-1720.  
Luo X, Fu X Z, Li N Q, *et al.* Study on optimal proliferation conditions of infectious spleen and kidney necrosis virus of *Siniperca chuatsi* in CPB cells with synchronous inoculation[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(11): 1712-1720(in Chinese).
- [11] 刘令九, 徐晓霞, 王桂荣, 等. 一种甲型肝炎灭活疫苗灭活验证试验方法的建立[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(4): 26-30.  
Liu L J, Xu X X, Wang G R, *et al.* Effective inactivation test of inactivated hepatitis A vaccine[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2015, 43(4): 26-30(in Chinese).
- [12] 余芬, 孙明波, 周健, 等. 运用链特异性RT-PCR法进行脊髓灰质炎灭活疫苗的灭活验证[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2010, 32(4): 488-492.  
Yu F, Sun M B, Zhou J, *et al.* Detection of inactivated polio virus vaccines by strand specific RT-PCR[J]. Journal of Yunnan University, 2010, 32(4): 488-492(in Chinese).
- [13] Kim S M, Nam S H, Lee J M, *et al.* Destruction of cucumber green mottle mosaic virus by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR[J]. Molecules and Cells, 2003, 16(3): 338-342.
- [14] Yuasa K, Kurita J, Kawana M, *et al.* Development of mRNA-specific RT-PCR for the detection of koi herpesvirus (KHV) replication stage[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2012, 100(1): 11-18.
- [15] Hu X Q, Fu X Z, Li N Q, *et al.* Transcriptomic analysis of Mandarin fish brain cells infected with infectious spleen and kidney necrosis virus with an emphasis on retinoic acid-inducible gene 1-like receptors and apoptosis pathways[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 619-629.
- [16] Smith R D, Ogden C W, Penny M A. Exclusive amplification of cDNA template (EXACT) RT-PCR to avoid amplifying contaminating genomic pseudo-



- genes[J]. *BioTechniques*, 2001, 31(4): 776-778, 780, 782.
- [17] Harper L V, Hilton A C, Jones A F. RT-PCR for the pseudogene-free amplification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapd*)[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2003, 17(5): 261-265.
- [18] Folz R J, Nepluev I. Poly(A) cDNA-specific (PACS) RT-PCR: a quantitative method for the measurement of any poly(A)-containing mRNA not affected by contaminating genomic DNA[J]. *BioTechniques*, 2000, 29(4): 762-768.

## Establishment and application of a rapid assay for inactivated infectious spleen and kidney necrosis virus based on viral mRNA

ZHANG Lixi<sup>1</sup>, YANG Yuanyuan<sup>2</sup>, FANG Wei<sup>2</sup>, FU Xiaozhe<sup>3,4</sup>, LIN Qiang<sup>3,4</sup>, LI Chen<sup>3,4</sup>,  
LIU Lihui<sup>3,4</sup>, LIANG Hongru<sup>3,4</sup>, HUANG Zhibin<sup>3</sup>, WU Zhixin<sup>1,4</sup>, LI Ningqiu<sup>3,4\*</sup>

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, China;

2. Guangdong Provincial Aquatic Animal Epidemic Disease Prevention and Control Center, Guangzhou, 510222, China;

3. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Pearl Piver Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, 510380, China;

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

**Abstract:** In order to establish a rapid assay for inactivated infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), ISKNV ORF099 was selected as a promising target gene based on the results of transcriptomic profiles of Mandarin fish brain cells (CPB) infected with ISKNV and qRT-PCR. Standard curve of  $C_T$  value and plasmid copy number was drawn with standard plasmid pMD099, and the linear equation was:  $C_T = -3.421\lg x + 39.455$ , and the minimum detection limit was 3 copies/ $\mu\text{L}$ . Results of repeated trials showed variation coefficients of intra-and-inter groups were less than 2%, indicating the method has high sensitivity and repeatability. The ISKNV suspension was diluted into  $10^0$ – $10^3$  copies/mL, and each T25 cell culture flask was inoculated with 1 mL virus diluted solution. Thereafter, total RNAs were extracted at 7, 9 and 11 d post inoculation. The mRNA of ORF099 gene was detected using routine qRT-PCR method. The results showed that the mRNAs of ISKNV could be detected from cells inoculated with one copy ISKNV virus at 7 days post inoculation. CPB cells have been inoculated with three batches of ISKNV inactivated by different concentrations (0.05%, 0.1%, 0.2%) of formaldehyde for 9 days. Results showed that ISKNV ORF099 mRNA was only detected from cells inoculated with 0.05% and 0.1% formaldehyde inactivated ISKNV at 7 days post inoculation by qRT-PCR. However, after blind passaging three generations, cells inoculated with ISKNV inactivated by 0.1% final concentration of formaldehyde did not exhibit CPE. The inactivated ISKNV did not cause clinical symptoms and death of fish, indicating this rapid virus inactivation test has higher sensitivity than cell blind passage trial and the fish safety test. The established method will be important for improving the ISKNV inactivated vaccine production.

**Key words:** infectious spleen and kidney necrosis virus; inactivated vaccine; inactivation test; mRNA; Real-time RT-PCR

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

**Funding projects:** National Key Technology R&D Program (2012BAD25B02); the Special Funds for Marine Fishery Science & Technology Promotion Project of Guangdong Provinces (A201501B12)