



## 一株新型大口黑鲈双 RNA 病毒巢式 RT-PCR 检测方法的建立及应用

罗明菊<sup>1,2</sup>, 李宁求<sup>2</sup>, 林强<sup>2</sup>, 牛银杰<sup>2</sup>, 刘礼辉<sup>2</sup>,  
梁红茹<sup>2</sup>, 罗霞<sup>2</sup>, 付小哲<sup>2\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村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)

**摘要:** 为有效预防大口黑鲈双 RNA 病毒 (largemouth bass birnavirus, LBBV), 实验针对 LBBV 保守基因 VP1 设计特异性引物, 构建重组质粒 pMD-LBBV-VP1, 通过优化 PCR 反应条件, 提高检测方法的灵敏度和特异性, 建立了大口黑鲈双 RNA 病毒的巢式 RT-PCR 检测方法, 并采用该方法对实验室 2017—2020 年收集的 304 株样本进行检测。结果显示, 巢氏引物 F1/R1、F2/R2 最佳工作浓度均为  $4 \times 10^{-12}$  mol, 最佳退火温度分别为 64.1 °C 和 61.5 °C, 当巢氏 RT-PCR 扩增 35 个循环时, 可以检测质粒最低浓度为 4.15 个/μL 拷贝数, 最低模拟样品浓度为  $10^2$  PFU/mL, 与第 1 轮 PCR 相比, 灵敏度均提高了 10 000 倍, 同时检测 9 种不同病毒, 仅 LBBV 出现明亮特异性条带, 在 304 个样品中, 第 1 轮 PCR 检出阳性样品 14 株, 检出率为 4.60%, 巢式 RT-PCR 检出阳性样品 28 株, 检出率为 9.21%; 本实验建立的巢式 RT-PCR 检测方法灵敏度高且特异性好, 可用于 LBBV 的早期检测及防控。

**关键词:** 大口黑鲈; 双 RNA 病毒; 巢式 RT-PCR; 检测方法

**中图分类号:** S 941.4

**文献标志码:** A

双 RNA 病毒科 (*Birnaviridae*) 包括禽双 RNA 病毒属 (*Avibirnavirus*)、昆虫双 RNA 病毒属 (*Entomobirnavirus*)、水生双 RNA 病毒属 (*Aquabirnavirus*) 及黑鱼斑点病毒属 (*Blosnavirus*), 其中感染水生动物的为水生双 RNA 病毒属与黑鱼斑点病毒属。双 RNA 病毒科代表种为传染性胰腺坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 与传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV)<sup>[1]</sup>。病毒呈正二十面体结构, 直径 55~65 nm, 无囊

膜、有壳粒, 耐酸碱、耐高温, 对脂溶剂不敏感<sup>[2]</sup>。基因组由双节段双链 RNA 构成, A 节段包含 2 个开放阅读框 (ORF), 大 ORF 编码一个 105~120 ku 的聚合蛋白 (NH<sub>2</sub>-pVP2-VP4-VP3-COOH), 小 ORF 编码一个 15~27 ku 的蛋白 (VP5)<sup>[3]</sup>。B 节段仅有一个 ORF, 编码一个 94 ku 的 VP1 蛋白, 即依赖 RNA 的 RNA 聚合酶, 是病毒复制的必要蛋白, 基因序列保守, 不同毒株之间序列同源性高<sup>[4]</sup>。20 世纪以来, 水产动物双 RNA 病毒病频

收稿日期: 2020-11-05 修回日期: 2020-12-22

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YDF0900105, 2018YFD0900501); 国家自然科学基金 (31872589); 广东省农业产业技术体系创新团队 (2019KJ140, 2019KJ141)

第一作者: 罗明菊 (照片), 从事水产动物疾病研究, E-mail: 1833576211@qq.com

通信作者: 付小哲, E-mail: fuxiaozhe-1998@163.com



繁暴发。1960 年国外首次从发病溪红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*) 中分离出 IPNV, 随后发现其在世界各地流行, 成为全球性的水产动物病原体<sup>[5]</sup>。1986 年, 山西某虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 养殖场暴发了我国首例传染性胰腺坏死病<sup>[6]</sup>, 随后在辽宁<sup>[7]</sup>、四川<sup>[8]</sup>等地流行, 患病鱼死亡率高达 95%。

病毒检测方法主要包括免疫荧光法 (immunofluorescence assay, IFA)、酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 以及基于 PCR 的检测方法, 如逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)、逆转录环介导等温扩增 (reverse tranion loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)。其中 IFA、ELISA 相对于 PCR 方法检测灵敏度较低, 更多用于病毒学研究。RT-LAMP 由于不需要特殊仪器, 更适合现场检测, 但是高假阳性是其瓶颈问题。RT-PCR、qPCR 则更适合实验室检测, 其中 qPCR 检测速度快、用时短、灵敏度高, 但由于其检测需要特殊的仪器, 且试剂耗材费用较高, 因此 RT-PCR 使用更为广泛。巢氏 RT-PCR 是在 RT-PCR 的基础上, 增加一对引物进行 2 次扩增, 可避免第 1 对引物的非特异性扩增, 是一种低成本、高特异性、高灵敏度的检测方法。目前, 针对 IPNV 已经建立了 RT-PCR<sup>[9]</sup>、巢氏 RT-PCR<sup>[10]</sup>、RT-qPCR<sup>[11]</sup>、RT-LAMP<sup>[12]</sup>、RT-PCR-ELISA<sup>[13]</sup> 及 ELISA<sup>[14]</sup> 等检测方法。

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*), 隶属于鲈形目 (Perciformes) 棘臀鱼科 (Centrarchidae) 黑鲈属 (*Micropterus*)。肉质鲜美细嫩, 无肌间刺, 营养丰富, 是一种优质淡水鱼类。本实验室前期从发病大口黑鲈组织中分离得到 1 株新型无囊膜二十面体结构病毒, 基因组为双节段双链 RNA, 鱼体攻毒实验发现, 其主要病理征状为体色发黑、肝脏淤血、肠道充满黄色黏液, 因此暂命名为大口黑鲈双 RNA 病毒 (largemouth bass birna-

virus, LBBV)。目前, 尚未有关于 LBBV 的检测方法报道。因此, 本实验针对 LBBV, 以其 VP1 保守序列为靶标, 建立巢式 RT-PCR 检测方法, 以期为该病毒的早期预警及有效防控提供特异、灵敏的检测手段。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 脑组织细胞系 (Chinese perch brain cell line, CPB) 由本实验室建立保存<sup>[15]</sup>。石斑鱼 (*Epinephelus* sp.) 神经坏死病毒 (nervous necrosis virus, NNV)、鳊弹状病毒 (*Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCRV)、罗湖病毒 (tilapia lake virus, TiLV)、大口黑鲈双 RNA 病毒均由本实验室分离保存。动物组织总 RNA 提取试剂盒购自于天根生化科技(北京)有限公司; TRIzol 试剂购于美国 Invitrogen 公司; Evo *M-MLV* RT for PCR Kit 反转录试剂盒购自于湖南艾科瑞生物工程有限公司; Green *Taq* Mix 购自于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 细胞培养所用的磷酸盐缓冲溶液 (PBS)、L-15 培养基、血清、胰蛋白酶和 Hanks 液购自于美国 Gibco 公司, PCR 仪、凝胶电泳成像仪购自美国 BIO-RAD 公司。

### 1.2 引物设计与合成

根据 LBBV 的 B 节段保守序列, 利用 Primer premier 5.0 软件, 设计 VP1 引物 (用于质粒构建) 与巢式 RT-PCR 引物 (表 1)。将引物序列上传至 GeneBank 进行 blastn 比对分析, 初步检测引物特异性, 送至广州艾基生物技术有限公司合成。

### 1.3 RNA 提取与反转录

取 LBBV 病毒悬液 500  $\mu$ L, 使用 TRIzol 法提取病毒 RNA, Nanodrop 2000 分光光度计测 RNA 浓度, 调整 RNA 总量为 500 ng, 使用 Evo

表 1 巢式 RT-PCR 所用到的引物

Tab. 1 Primers used in nested RT-PCR

引物名称 primers name	用途 usage	引物序列(5'→3') sequence(5'→3')	扩增片段大小/bp product size
VP1-F	质粒构建	TACGACCTACCACTACTCA	1 419
VP1-R	plasmids construction	CTCGTTTCTGACAATGGTG	
F1	1扩	CAGAAGGACCGATTCAACTACT	418
R1	the first amplification	CTCTGGTGAGGAGGTAGTAGGCAA	
F2	2扩	CCTGTCGTGCGGGCTCCTATT	339
R2	the second amplification	CTCTTTGTGGCGTTGGCTTCG	

*M-MLV* RT for PCR Kit 试剂盒反转录成 cDNA。

#### 1.4 质粒标准品的构建与鉴定

使用引物 VP1-F/VP1-R(退火温度 50 °C, 延伸 2 min) 扩增 VP1, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 使用胶回收试剂盒回收目的片段 (1 419 bp), 并与 pMD-18T 克隆载体连接, 构建重组质粒 pMD-LBBV-VP1。采用氯化钙法转化 DH5a 感受态细胞, 涂板、挑菌, 进行菌液 PCR 鉴定, PCR 产物送至广州艾基生物技术有限公司进行核酸序列测定, 测序正确后于 -80 °C 保存。

#### 1.5 巢式 RT-PCR 检测

第 1 轮 PCR。以反转录 cDNA 为模板, 使用 F1/R1 进行 PCR 扩增, 体系 (20  $\mu$ L): Green *Taq* Mix 10  $\mu$ L, F1/R1 各 0.4  $\mu$ L(浓度为 10  $\mu$ mol/L), DEPC 水 7.2  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L。反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 64.0 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。

第 2 轮 PCR。以第 1 轮 PCR 产物稀释物为模板, 使用 F2/R2 进行 PCR 扩增, 体系 (20  $\mu$ L): Green *Taq* Mix 10  $\mu$ L, F2/R2 各 0.4  $\mu$ L(浓度为 10  $\mu$ mol/L), DEPC 水 7.2  $\mu$ L, PCR 产物模板 2  $\mu$ L, 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

#### 1.6 巢式 RT-PCR 反应条件的优化

在 20  $\mu$ L PCR 反应体系中, 分别加  $2 \times 10^{-12}$ 、 $4 \times 10^{-12}$ 、 $6 \times 10^{-12}$ 、 $8 \times 10^{-12}$ 、 $10 \times 10^{-12}$ 、 $12 \times 10^{-12}$ 、 $14 \times 10^{-12}$ 、 $16 \times 10^{-12}$  和  $18 \times 10^{-12}$  mol 上下游引物进行 PCR 扩增, 筛选最佳引物用量。在 45 °C~70 °C 范围内梯度设置 12 个不同的退火温度, 使用“巢式 RT-PCR 检测”中 PCR 检测体系进行扩增, 根据核酸凝胶电泳结果挑选最佳退火温度。

#### 1.7 巢式 RT-PCR 灵敏度检测

使用质粒标准品和模拟样品 2 种方式来评价该方法灵敏度。质粒标准品: 以 10 倍梯度稀释质粒为模板, 进行巢式 PCR 检测, 分析该方法检测底限。模拟样品: 根据病毒已知 TCID<sub>50</sub> 值, 计算 PFU(PFU=0.7 TCID<sub>50</sub>) 并将病毒梯度稀释, 使得每毫升病毒液里含有  $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  和  $10^0$  PFU, 加至生长状态良好的 CPB 细胞中 ( $10^6$  个/孔), 对照组加等量无血清 L-15 培养基, 每个处理 3 个重复, 28 °C

无 CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 1 h 后吸走病毒液, PBS 清洗 2 次, 加 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 反转录成 cDNA, 巢式 PCR 检测评价其灵敏度。

#### 1.8 巢式 RT-PCR 特异性检测

使用病毒 RNA 提取试剂盒提取 NNV、CyHV-II、MRV、SGIV、ADIV、ISKNV、SCRV、TiLV 和 LBBV 等 9 种常见病毒核酸, 进行巢式 RT-PCR 检测, 验证方法的特异性。

#### 1.9 临床样品的检测

对实验室 2017—2020 年收集的来自不同地点、不同品种、不同季节、不同规格的 304 个病鱼样品中进行巢式 RT-PCR 检测, 以 DEPC 水作为阴性对照, 检测历年病毒样品是否存在 LBBV, 以及分析其流行性分布范围。

## 2 结果

### 2.1 引物浓度优化

引物浓度优化结果显示, 引物 F1/R1 和 F2/R2 添加量分别为  $4 \times 10^{-12}$  mol 时条带最亮且引物二聚体最少, 当引物量大于  $4 \times 10^{-12}$  mol 时, 引物二聚体随着引物量的增加而增加, 且目的条带亮度减弱, 因此得到最佳的巢氏引物添加量均为  $4 \times 10^{-12}$  mol (图 1)。

### 2.2 退火温度优化

退火温度优化结果显示, F1/R1 最佳退火温度为 64.1 °C, 高于或低于 64.1 °C 时扩增效率逐渐降低, 条带逐渐变暗, 当温度低于 50.4 °C 会引起非特异性扩增 (图 2-a); 引物 F2/R2 最佳退火温度为 61.5 °C, 高于或低于 61.5 °C 时扩增效率逐渐降低, 条带逐渐变暗, 当温度低于 56.0 °C 时会引起非特异性扩增 (图 2-b)。

### 2.3 灵敏度检测

将质粒 10 倍梯度稀释后进行 PCR 扩增, 第 1 轮 PCR 最低能检测至  $4.15 \times 10^4$  个/ $\mu$ L 拷贝数 (图 3-a), 巢式 RT-PCR 最低能检测至 4.15 个/ $\mu$ L 拷贝数 (图 3-b); 模拟样品结果显示, 第 1 轮 PCR 最低能检测至  $10^6$  PFU/mL (图 4-a), 巢式 RT-PCR 最低能检测至  $10^2$  PFU/mL (图 4-b), 表明本实验建立的检测方法具有很高的灵敏度。

### 2.4 特异性检测

采用建立的巢式 RT-PCR 对 NNV、CyHV-II、

MRV、SGIV、ADIV、ISKNV、SCRV、TiLV 和 LBBV 等 9 种常见病毒核酸进行检测, 仅 LBBV 出现明亮条带 (图 5), 表明建立的检测方法具有良好的特异性。

## 2.5 巢式 RT-PCR 对临床样品的检测

对本实验室收集于 2017—2020 年的 304 个病鱼样品进行检测。这些样品主要来自广东地区养殖的大口黑鲈、鳊、乌鳢 (*Channa argus*)、

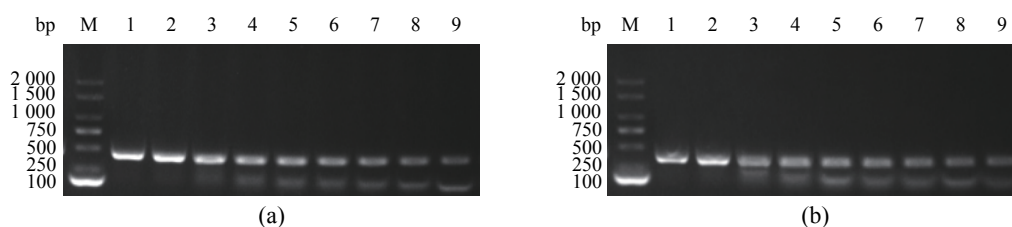


图 1 引物浓度优化

(a) 引物 F1/R1, (b) 引物 F2/R2; M. 标准物质 DL 2000, 1-9. 分别为  $2 \times 10^{-12}$ ~ $18 \times 10^{-12}$  mol; 下同

Fig. 1 Primer concentration optimization

(a) primer F1/R1, (b) primer F2/R2; M. marker DL 2000, 1-9.  $2 \times 10^{-12}$ ~ $18 \times 10^{-12}$  mol, respectively; the same below

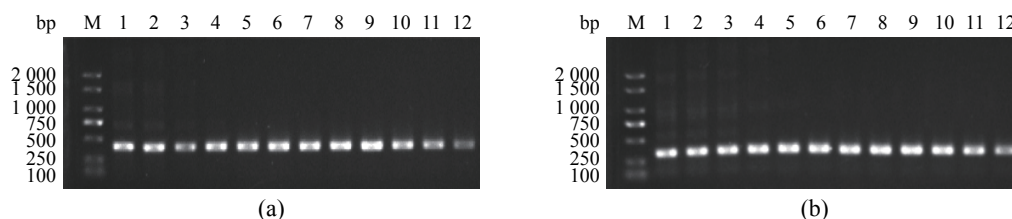


图 2 退火温度优化

Fig. 2 Annealing temperature optimization

1-12.  $45.0^\circ\text{C}$ ~ $70.0^\circ\text{C}$

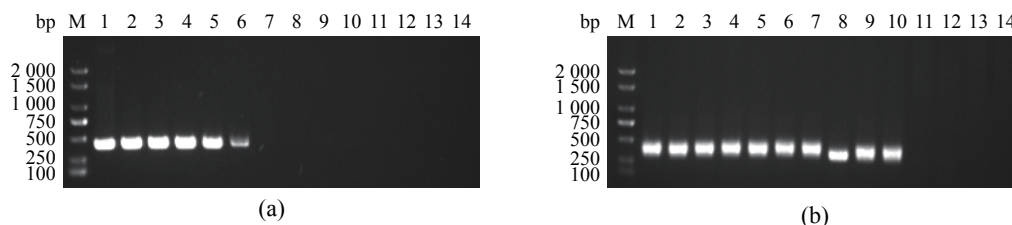


图 3 灵敏度检测 (质粒标准品)

1~13.  $4.15 \times 10^9$ ~ $4.15 \times 10^{-3}$  个/ $\mu\text{L}$  拷贝数, 14. 阴性对照

Fig. 3 Sensitivity detection (plasmid standard sample)

1-13.  $4.15 \times 10^9$ ~ $4.15 \times 10^{-3}$  copies/ $\mu\text{L}$ , 14. negative control

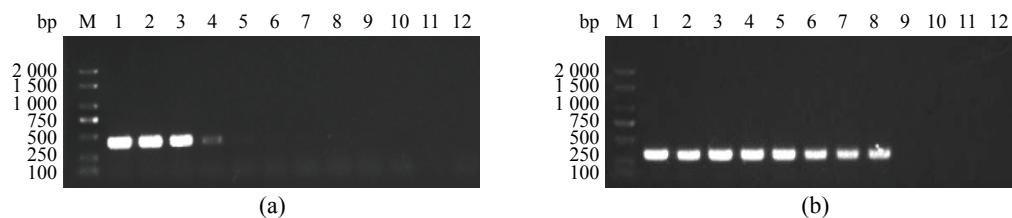


图 4 灵敏度检测 (模拟样品)

1~10.  $10^9$ ~ $10^0$  PFU/mL, 11. 未感染阴性细胞, 12. 阴性对照

Fig. 4 Sensitivity detection (simulated sample)

1-10.  $10^9$ ~ $10^0$  PFU/mL, 11. non-infected CPB cells, 12. negative control

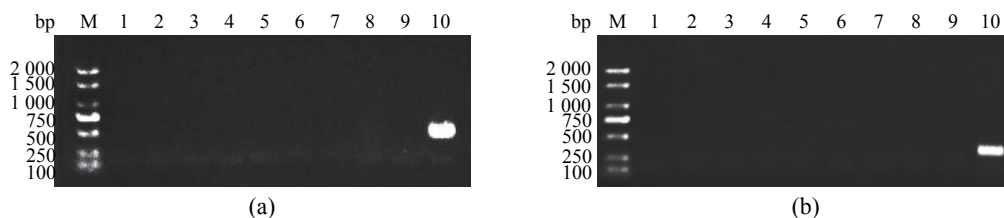


图5 特异性检测

1. NNV, 2. CyHV-II, 3. MRV, 4. SGIV, 5. ADIV, 6. ISKNV, 7. SCRIV, 8. TiLV, 9. 阴性对照, 10. LBBV

Fig. 5 Specificity detection

1. NNV, 2. CyHV-II, 3. MRV, 4. SGIV, 5. ADIV, 6. ISKNV, 7. SCRIV, 8. TiLV, 9. negative control, 10. LBBV

云斑尖塘鳢 (*Oxyeleotris marmorata*), 结果显示, 304 个病鱼样品中, 第 1 轮 PCR 检出阳性样品 14 株, 检出率为 4.60%, 巢式 RT-PCR 检出阳性样品 28 株, 检出率为 9.21%。对阳性样品的流行特性进行了初步的分析, 发现该病毒感染宿主包括大口黑鲈、鳊、乌鳢 (图 6-a); 主要在清远、佛山、顺德地区检出 (图 6-b); 主要在 6—9 月高温季节暴发流行 (图 6-c); 阳性样品不仅有小规格鱼, 在成鱼中也有检出 (图 6-d)。

### 3 讨论

以往研究发现, 水生动物双 RNA 病毒致死率高, 主要感染鲢鳙稚鱼及其他海淡水鱼, 给水产养殖产业造成巨大的经济损失。本实验研究对象为一种新型水生动物双 RNA 病毒, 建立此种病毒的快速检测方法对水产动物疫病防控具有重要意义。

目前, 国内外已建立多个基于 A 节段的 IPNV 快速 PCR 检测方法, 如吴斌等<sup>[9]</sup>建立 RT-PCR 法对虹鳟鱼进行 IPNV 检测; Suzuki 等<sup>[10]</sup>使用巢式 RT-PCR 检测水生动物双 RNA 病毒; 杨瑶<sup>[16]</sup>、Soliman 等<sup>[12]</sup>建立并验证了 IPNV 的 RT-LAMP 检测方法。但有研究发现, IPNV A 节段存在碱基序列高变区<sup>[17-18]</sup>, 且 IPNV 毒株基因型分型, 主要依赖于病毒 A 节段编码的 VP2 序列<sup>[19-20]</sup>。本实验研究对象为一种未知的新型水生动物双 RNA 病毒, 其高变序列位置未知, 如果基于 A 节段基因序列设计引物, 可能将引物设于序列未知高变区, 当毒株发生变异时, 可能导致假阴性结果的出现。而 VP1 蛋白是依赖 RNA 的 RNA 聚合酶, 其保守性好、不同毒株序列同源性高。因此, 本实验以 B 节段 VP1 保守序列为靶序列, 设计得到的引物更保守, 检测结果更准确。本

研究通过优化 PCR 引物浓度、退火温度来减少非特异性杂带的产生, 提高了特异性产物的产量, 使得检测结果更为准确, 减少了假阳性或假阴性结果的出现。而且在临床样品检测过程中常出现几种病毒共感染的情况, 因此, 本实验使用 9 种常见病毒进行巢式 RT-PCR 特异性验证, 结果仅 LBBV 出现特异性条带, 表明本实验建立的巢式 RT-PCR 检测方法特异性好。

本实验分别使用质粒标准品和模拟样品 2 种方式评价巢式 RT-PCR 灵敏度。质粒为常用的灵敏度衡量标准品, 直接作为模板进行检测, 缺少 RNA 提取、反转录过程, 检测结果与实际样品有误差。而使用病毒感染的细胞样品作为标准品的模拟样品, 则排除了临床样本检测中 RNA 提取、反转录效率对检测结果的影响, 可以获得更加真实的灵敏度检测结果。而且, 为确保提取的病毒 RNA 量与起始病毒量相对应, 我们使用病毒在细胞上达到最大吸附量的时间 (前期测定), 即在病毒孵育 1 h 后收取细胞样品, 使得吸附细胞的病毒粒子数最大程度上等于初始加入的病毒粒子数。此外, 在模拟样品实验中, 我们对每个病毒感染梯度均设置了 3 个重复孔, 3 个重复之间相互比较验证, 根据组间差异分析结果, 以此来确定及验证结果的准确性。徐晔等<sup>[11]</sup>针对 IPNV 建立的 RT-PCR 检测方法, 最低能检测到  $10^2$  个/ $\mu\text{L}$  拷贝数的 DNA, Milne 等<sup>[13]</sup>采用的 RT-PCR ELISA 法, 最低能检测出  $1.5 \times 10^4$  PFU/mL IPNV, 而本实验建立的巢式 RT-PCR 检测方法, 最低能检测至 4.15 个/ $\mu\text{L}$  拷贝数质粒标准品; 针对模拟样品, 巢式 RT-PCR 最低能检测至  $10^2$  PFU/mL, 灵敏度均高于第 1 轮 PCR 与上述检测方法, 能检测到更低拷贝数的病毒粒子, 是一种高灵敏度的检测方法。

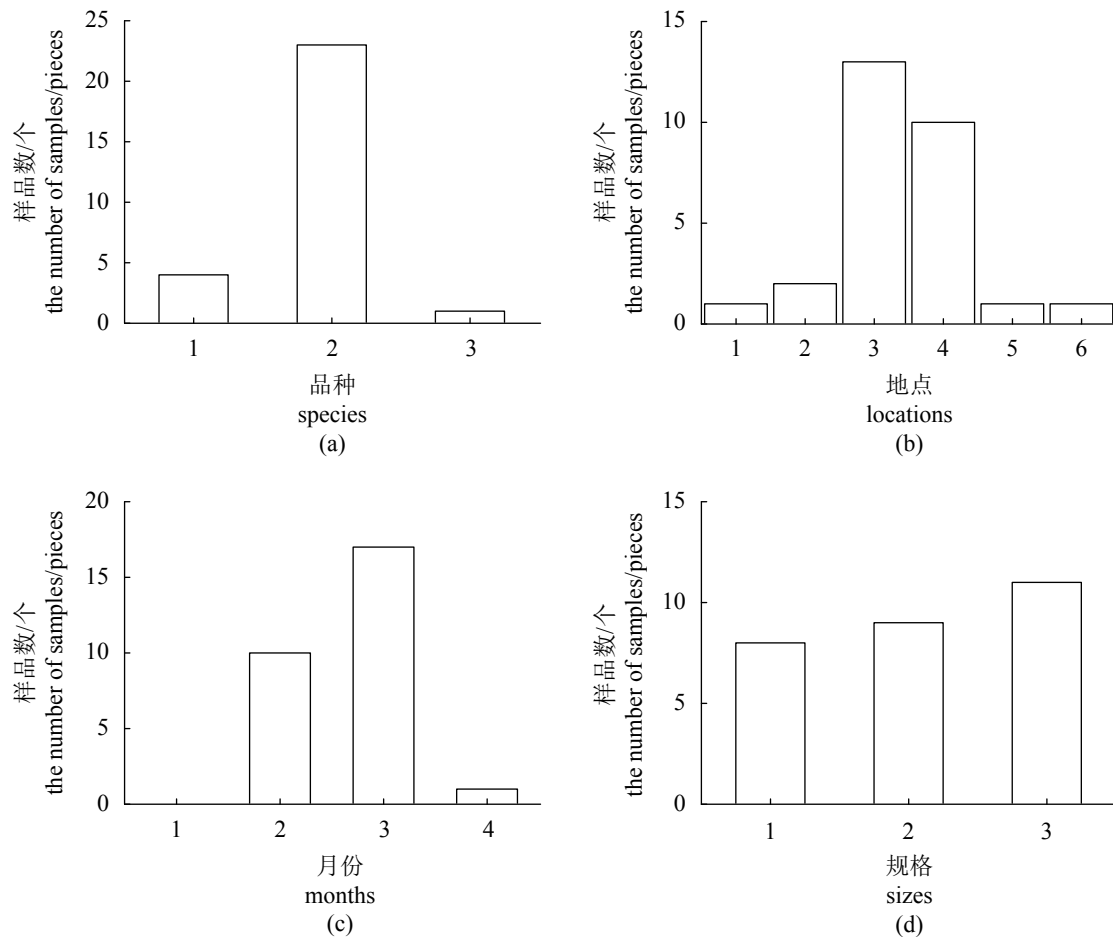


图 6 临床样品检测结果

(a) 宿主来源, 1. 鳊, 2. 大口黑鲈, 3. 乌鳢; (b) 地区分布, 1. 衡阳, 2. 清远, 3. 佛山, 4. 顺德, 5. 中山, 6. 肇庆; (c) 采样时间, 1. 1~3 月, 2. 4~6 月, 3. 7~9 月, 4. 10~12 月; (d) 宿主规格, 1. 1~10 cm, 2. 11~20 cm, 3. 21~30 cm

Fig. 6 The results of clinical sample detection

(a) host, 1. *S. chuatsi*, 2. *M. salmoides*, 3. *C. argus*; (b) locations; 1. Hengyang, 2. Qingyuan, 3. Foshan, 4. Shunde, 5. Zhongshan, 6. Zhaoqing; (c) sampling time, 1. January-march, 2. April-June, 3. July-September, 4. October-December; (d) host sizes; 1. 1-10 cm, 2. 11-20 cm, 3. 21-30 cm

对 2017—2020 年收集保存的 304 个病鱼样品进行检测, 巢式 RT-PCR 能检测出更低病毒含量的样本, 显著提高了阳性样品检出率。从目前的流调结果显示, LBBV 主要在清远、佛山、顺德地区的大口黑鲈、鳊、乌鳢等养殖鱼类中检出, 但是由于养殖水体纵横贯通, 很可能会扩散到更多的养殖区域及养殖品种。同时, 本研究发现, 2017—2018 年的阳性样品主要为小规格鱼, 而 2019—2020 年的阳性样品同时包含大、小规格鱼, 且 2019—2020 年阳性样品检出率高于 2017—2018 年, 可能由于前期样品收集总量少且冻存时间过长而导致的 RNA 降解导致, 因此, 我们需要对该病进行更加深入系统的流调研究, 为该病的有效预防提供重要数据。

一种新型病毒的出现会带来未知的危险与

经济损失, 水生双 RNA 病毒由于其耐高温、耐酸和碱、耐脂溶剂的特征<sup>[6-8]</sup>, 导致其成为一种高致病性病毒。至今为止, 国内外尚未有关于 LBBV 的其他研究, 因此, 除建立快速检测方法外, 为了更全面地研究此种病毒, 后续还可围绕此种新型水生双 RNA 病毒生物学特性、抗体制备以及疫苗的研发等展开相关研究。

#### 参考文献 (References):

- [1] Delmas B, Attoui H, Ghosh S, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: *Birnaviridae*[J]. *Journal of General Virology*, 2019, 100(1): 5-6.
- [2] Dobos P, Hallett R, Kells D T C, *et al.* Biophysical studies of infectious pancreatic necrosis virus[J]. *Journal of*

- Virology*, 1977, 22(1): 150-159.
- [ 3 ] Bayliss C D, Spies U, Shaw K, *et al.* A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2[J]. *Journal of General Virology*, 1990, 71(6): 1303-1312.
- [ 4 ] Duncan R, Mason C L, Nagy E, *et al.* Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif[J]. *Virology*, 1991, 181(2): 541-552.
- [ 5 ] Wolf K, Snieszko S F, Dunbar C E, *et al.* Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1960, 104(1): 105-108.
- [ 6 ] Jiang Y L, Li Z Q. Isolation of IPN virus from imported rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in the P. R. China[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 1987, 3(4): 191-192.
- [ 7 ] 孙颖杰, 陈文义, 夏德昌, 等. 虹鳟鱼传染性胰脏坏死病毒的分离与鉴定[J]. *中国进出境动植物检*, 1995(2): 32-34.
- Sun Y J, Chen W Y, Xia D C, *et al.* Isolation and identification of infectious pancreatic necrosis virus of rainbow trout[J]. *Import and Export Inspection in China*, 1995(2): 32-34(in Chinese).
- [ 8 ] 熊权鑫, 朱玲, 汪开毓, 等. 一株虹鳟源传染性胰腺坏死病毒病的分离与鉴定[J]. *水产学报*, 2018, 42(7): 1132-1139.
- Xiong Q X, Zhu L, Wang K Y, *et al.* Isolation and identification of infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(7): 1132-1139(in Chinese).
- [ 9 ] 吴斌, 肇慧君, 李叶, 等. 传染性胰脏坏死病毒逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)的研究[J]. *中国动物检疫*, 2012, 29(9): 46-48.
- Wu B, Zhao H J, Li Y, *et al.* Studies on reverse transcription PCR method for infectious pancreatic necrosis virus[J]. *China Journal of Animal Quarantine*, 2012, 29(9): 46-48(in Chinese).
- [ 10 ] Suzuki S, Hosono N, Kusuda R. Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription- and nested PCR[J]. *Journal of Marine Biotechnology*, 1997, 5(4): 205-209.
- [ 11 ] 徐晔, 段宏安, 周毅, 等. 实时荧光定量RT-PCR检测鱼类传染性胰脏坏死病毒方法的建立[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(31): 19224-19226.
- Xu Y, Duan H A, Zhou Y, *et al.* Establishment of real-time RT-PCR assay for detection of IPNV[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(31): 19224-19226(in Chinese).
- [ 12 ] Soliman H, Midtlyng P J, El-Matbouli M. Sensitive and rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplification[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 158(1-2): 77-83.
- [ 13 ] Milne S A, Gallacher S, Cash P, *et al.* A reliable RT-PCR-ELISA method for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 132(1-2): 92-96.
- [ 14 ] 张琳琳, 连科迅, 张英, 等. 传染性胰脏坏死病毒双抗体夹心ELISA检测方法的建立[J]. *淡水渔业*, 2014, 44(4): 57-62, 72.
- Zhang L L, Lian K X, Zhang Y, *et al.* Development of a double antibody sandwich ELISA for detection of infectious pancreatic necrosis virus[J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(4): 57-62, 72(in Chinese).
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] 杨瑶. 传染性胰脏坏死病毒 RT-LAMP 检测方法的建立及应用 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- Yang Y. Establishment and application of RT-LAMP for the detection of infectious pancreatic necrosis virus[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [ 17 ] Heppell J, Tarrab E, Lecomte J, *et al.* Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus[J]. *Virology*, 1995, 214(1): 40-49.
- [ 18 ] Song H C, Santi N, Evensen Ø, *et al.* Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(16): 10289-10299.
- [ 19 ] Blake S, Ma J Y, Caporale D A, *et al.* Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced

- amino acid sequences of genome segment A cDNA[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2001, 45(2): 89-102.
- [20] Nishizawa T, Kinoshita S, Yoshimizu M. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region[J]. Journal of General Virology, 2005, 86(7): 1973-1978.

## Establishment and application of the nested RT-PCR for the detection of a novel largemouth bass birnavirus (LBBV)

LUO Mingju<sup>1,2</sup>, LI Ningqiu<sup>2</sup>, LIN Qiang<sup>2</sup>, NIU Yinjie<sup>2</sup>, LIU Lihui<sup>2</sup>,  
LIANG Hongru<sup>2</sup>, LUO Xia<sup>2</sup>, FU Xiaozhe<sup>2\*</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

**Abstract:** Early detection of pathogen is particularly important for the early warning, prevention and control of diseases. In recent years, a new viral disease occurred in farmed *Micropterus salmoides* in Guangdong Province and its pathogen is largemouth bass birnavirus (LBBV); In order to prevent the virus effectively, specific primers were designed for the conserved gene VP1 of LBBV to construct the recombinant plasmid pMD-LBBV-VP1 in this study. And the sensitivity and specificity of the method were tested after the PCR reaction conditions were optimized. The nested RT-PCR method for detecting the LBBV was established and the 304 clinical samples of dead fish collected from 2017 to 2020 were tested using this method; The results show that the optimal concentration of primers F1/R1 and F2/R2 were  $4 \times 10^{-12}$  mol. And the optimal annealing temperatures were 64.1 °C and 61.5 °C, respectively. When PCR amplification was performed for 35 cycles, a minimum plasmid concentration of 4.15 copies/ $\mu$ L and a minimum simulated sample concentration of  $10^2$  PFU/mL could be detected. Compared with the first round PCR, the sensitivity was increased by 10 000 times. 9 different viruses were detected at the same time and only LBBV showed bright specific bands. Among the 304 diseased fish samples, 14 positive samples were detected in the first round PCR with a detection rate of 4.60% and 28 positive samples were detected in the nested RT-PCR with a detection rate of 9.21%. The nested RT-PCR assay established in this study has high sensitivity and good specificity, which can be used for the early detection and prevention of LBBV.

**Key words:** *Micropterus salmoides*; birnavirus; nested RT-PCR; detection method

**Corresponding author:** FU Xiaozhe. E-mail: fuxiaozhe-1998@163.com

**Funding projects:** National Key R&D Program of China (2019YDF0900105, 2018YFD0900501); National Natural Science Foundation of China (31872589); The Innovation Team of Guangdong Agricultural Industry Technology System (2019KJ140, 2019KJ141)