



蛙病毒 PCR 检测方法的建立与比较分析

李亚男¹, 刘春¹, 林华剑², 秦真东¹, 林鑫^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东 广州 510225;

2. 广东省动物疫病预防控制中心, 广东 广州 510230)

摘要: 为了进一步丰富蛙虹彩病毒检测方法, 实验针对蛙病毒 3 型 (frog virus 3, FV3) 核衣壳蛋白 (major capsid protein, MCP) 基因保守区设计一对特异性引物, 并选取另外 2 种蛙病毒 PCR 检测方法进行对比实验, 通过反应体系的优化、反应特异性和敏感性实验, 建立了一种针对 FV3 的 PCR 检测方法。结果显示, 该方法最低检测限可达 1.2 个拷贝数的病毒粒子, 与神经坏死病毒、虾血细胞虹彩病毒、大口黑鲈虹彩病毒、锦鲤疱疹病毒、鲤浮肿病毒、传染性脾肾坏死病毒、加州鲈弹状病毒等常见水产动物致病毒株无交叉反应。临床样品检测表明, 该方法所获得的检测结果与另外 2 种方法一致, 结果可靠。本研究所建立的 FV3 PCR 检测方法, 具有简便、快速、敏感度好、特异性高、低成本等特点, 可用于 FV3 蛙病毒的快速诊断和分子流行病学调研。

关键词: 蛙病毒; 虹彩病毒; 蛙病毒 3 型 (FV3); PCR

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

国内蛙类养殖由来已久。目前我国引进的蛙类主要有 3 种, 均来自于北美洲。20 世纪 80 年代末, 牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 养殖在中国得到大规模发展, 涉及湖南、湖北、安徽、福建、四川、河南等省。随后广东省引进的沼泽绿牛蛙 (*R. grylio*) 和河蛙 (*R. heckscheri*) (南方统称美国青蛙) 由于具有较高的产值效益, 已成为我国最主要的养殖蛙类之一^[1-2]。1995 年, 四川省养殖户对中国土著种黑斑侧褶蛙 (*Pelophylax nigromaculatus*) 进行驯养, 至今有二十多年的历史, 近年来由于技术进步加之国家政策支持, 黑斑侧褶蛙养殖品种于 2019 年市场容量达 6 万 t, 涉及产值达 100 多亿元^[3]。此外, 中国林蛙 (*R. chensinensis*)、棘胸蛙 (*Quasipaa spinosa*)、虎纹蛙 (*R. tigrina rugulosa*)、金线蛙 (*R. plancyi*) 等中国土著蛙类养殖也得到了

空前发展。

由于持续的高密度养殖环境, 蛙类的排泄物易破坏水质, 滋生疾病, 危害养殖业与生态环境。我国第 1 株蛙病毒 3 型 (frog virus 3, FV3) 由中国科学院水生生物研究所于 1996 年分离自养殖患病的沼泽绿牛蛙^[4], 随后陆续从虎纹蛙、中国大鲵 (*Andrias davidianus*) 中分离鉴定出蛙病毒^[5-6]。蛙病毒属 (*Ranavirus*) 隶属于虹彩病毒科 (*Iridoviridae*), 含有线状双链 DNA 分子, 为裸露或有囊膜包被的二十面体病毒粒子。该属还包括流行性造血器官坏死病毒 (epizootic hematopoietic necrosis virus, EHNV)、饰纹汀蛙虹彩病毒 (boheliridovirus, BIV)、欧洲鲟鱼病毒 (European catfish iridovirus, ECV)、虎纹钝口螈病毒 (*Ambystoma tigrinum* virus, ATV)、大口黑鲈虹彩病毒 (large-

收稿日期: 2021-06-03 修回日期: 2021-07-28

资助项目: 广东省农业农村厅乡村振兴战略专项 (KB2010002, KB2010005); 中国-东盟海上合作基金 (CAMC-2018F); 广东省农业农村厅水产疫病监测与综合防控共性关键技术研发创新团队项目; 牛蛙病害调查及检测技术研发 (D120222B0)

第一作者: 李亚男 (照片), 从事水产病害检测与防控, E-mail: liyanan@zhku.edu.cn

通信作者: 林鑫, 从事水产病害检测与防控研究, E-mail: linli@zhku.edu.cn



mouth bass ranavirus, LMBV)、虹鳉蛙病毒 (*Oncorhynchus mykiss* ranavirus)、裂唇鱼病毒 (doctor fish virus, DFV) 虎纹蛙病毒 (tiger frog virus, TFV)、中华鳖虹彩病毒 (soft-shelled turtle iridovirus, STIV)^[7-8], FV3 为蛙病毒属模式株。蛙病毒被称为冷血动物杀手, 宿主范围广泛, 可感染鱼类、两栖类、爬行类等近百种水生生物, 给水产养殖业造成重大经济损失^[9]。2009 年, 世界动物卫生组织 (OIE) 正式将蛙病毒感染列入必须报告的水生动物疫病之一^[10]。我国每年由蛙病毒所致的水产病害损失就高达数十亿元^[11]。蛙病毒已经成为危害我国蛙类养殖的流行性致病因素之一。

目前对于蛙病毒感染尚缺乏有效治疗手段, 主要以早期诊断预防为主。因此, 建立快速、灵敏、高效的蛙病毒检测方法, 及时发现病原体并进行早期防控是重要手段。本研究建立了一种针对 FV3 的 PCR 检测新方法, 并开展相关检测方法的比较研究, 以期对蛙病毒的快速诊断和分子流行病学调查提供有效技术手段。

1 材料与方法

1.1 毒株来源

FV3 购买自美国标准生物物品收藏中心 (ATCC)。神经坏死病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 来源于本实验室。虾血细胞虹彩病毒 (shrimp hemocyte iridovirus, SHIV)、锦鲤疱疹病毒 (koi herpesvirus, KHV)、鲤浮肿病毒 (carp edema virus, CEV)、LMBV、传染性脾肾坏死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 等核酸由中国水产科学院珠江水产所提供。对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒 (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHNV) 核酸、对虾白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 核酸、罗非鱼罗湖病毒 (tilapia lake virus, TiLV) cDNA、加州鲈弹状病毒 (*Micropterus salmoides* rhabdovirus, MSRV) cDNA 及罗氏沼虾野田村病毒 (*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, MrNV)cDNA 由广东省动物疫病预防控制中心提供。

1.2 仪器与试剂

2×Taq Master PCR Mix、pMD19-T 载体、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 感受态细胞、DNA DL2000 marker 购自 TaKaRa 公司。质粒抽提试剂

盒、胶回收试剂盒等购自天根生化科技 (北京) 有限公司。琼脂糖凝胶等其他试剂购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。PCR 扩增仪 (S1000)、核酸定量仪 (ND2000) 均由本实验室提供。

1.3 引物合成

根据 GenBank 中登记的 FV3 的主要衣壳蛋白 (MCP) 基因序列 (MT578298.1), 使用 Primer premier 5.0 软件设计 1 对新的特异性引物 FV3-1。根据前期对文献中蛙病毒检测方法的初步筛选结果, 选取另外 2 对扩增效果稳定的引物进行方法比较分析, FV3-2 引物来自中华人民共和国水产行业标准蛙病毒病检测方法^[12], FV3-3 引物参见 MAO 等^[13] 的研究。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.4 PCR 反应体系

使用 20 μL PCR 扩增体系进行目的片段扩增: 2×Taq PCR Master Mix 10 μL、模板 1 μL、10 mmol/L 上下游引物各 0.5 μL, 灭菌水 8 μL。反应参数设置为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 50 °C 35 s (FV3-2 和 FV3-3 采用 55 °C 退火), 72 °C 50 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测并送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 确认扩增片段是否正确。

1.5 阳性质粒构建

PCR 扩增后, 阳性目的条带经胶回收纯化, 与 pMD19-T 载体进行连接后转化至 DH5α 感受态细胞。将感受态细胞涂布在含氨苄青霉素的培养板上。37 °C 过夜培养, 挑取单克隆菌落进行菌液 PCR 分析, 进一步选取阳性菌株送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序验证。测序正确的菌株经扩大培养后提取质粒, 可作为标准品用于后续实验。使用核酸分析仪测定重组质粒 DNA 的质量浓度, 并换算成质粒拷贝浓度: 质粒浓度 (拷贝/μL) = 6.02×10²³ (拷贝/mol) × 质粒质量浓度 (g/μL) / 质粒分子数。

1.6 PCR 反应体系条件优化

FV3-1 引物实验中, 阳性质粒模板浓度为 1.2×10⁶ 拷贝/μL, FV3-2 引物实验中, 阳性质粒模板浓度为 1.3×10⁵ 拷贝/μL, FV3-3 实验中, 阳性质粒模板浓度为 2.7×10⁵ 拷贝/μL。扩增反应使用

TaKaRa 公司 2×Taq Master PCR Mix 20 μL 体系进行, Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度、酶浓度等指标对实验结果影响不大^[14], 因此反应体系仅优化引物浓度、模板浓度和退火温度。10 mmol/L 上下游引物添加量分别 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0 μL, PCR 后电泳确定引物浓度。模板添加量分别为 0.3、0.4、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 μL, PCR 后电泳确定最优浓度。

以 3 对引物 (表 1) 合成公司推荐的退火温度为中心, 上下进行扩展, 设定退火温度梯度, 产物电泳后确定最佳退火温度。

表 1 引物信息表

Tab. 1 Primer information

引物名称 primers name	引物序列 sequences	片段大小/bp size
FV3-1-5'	CCTCCATCCCAGTCAGCA	346
FV3-1-3'	CAGCAAACGGACACTTCAT	
FV3-2-5'	CGCAGTCAAGGCCTTGATGT	585
FV3-2-3'	AAAGACCCGTTTTGCAGCAAAC	
FV3-3-5'	GACTTGGCCACTTATGAC	531
FV3-3-3'	GTCTCTGGAGAAGAAGAA	

1.7 特异性实验

应用各对引物分别对“毒株来源”部分的毒株进行扩增, 验证每种方法的特异性。PCR 扩增采用优化后条件进行, 各毒株模板添加量为 3 μL, 灭菌水作为阴性对照。

1.8 敏感性实验

利用构建的阳性质粒作为标准品, 将测定的质粒质量浓度换算成拷贝浓度后, 依次进行 10 倍

梯度稀释, 以各浓度梯度的质粒为模板, 取 1 μL 进行 PCR 检测, 验证每种方法的敏感性并进行比较研究。

1.9 临床样品检测

应用本研究建立的 FV3 病毒 PCR 扩增方法对采自广东省和江西省的各大蛙类养殖场样品进行检测, 检出的阳性样本扩增产物进一步进行测序分析, 并与另外种方法进行结果比对, 进一步验证本研究所提出的 PCR 扩增方法的有效性和准确性。实验过程中操作人员严格遵守仲恺农业工程学院动物保护和使用委员会动物伦理规范, 本实验操作符合相关规章制度。

2 结果

2.1 PCR 检测方法的建立

以 FV3 毒株 DNA 为模板, 利用设计的引物可以从 FV3 毒株中扩增得到预期目的片段 (图 1)。扩增片段经回收纯化后与 pMD19-T 载体连接构建重组质粒, 阳性克隆子经测序后, 与 GenBank 中登记的 FV3 序列进行比对, 同源性分别为 100.0%、99.7% 和 100.0%(图 1)。

2.2 PCR 反应条件的优化

FV3-1 引物。不同的引物用量、不同的模板用量以及不同的退火温度条件下, FV3-1 引物 PCR 扩增效果如图 2 所示。引物添加量在 0.3~1.0 μL 范围内均能扩增出目的条带, 使用 0.9 和 1.0 μL 引物时, 扩增条带最亮 (图 2-a)。模板添加量达到 1.0 μL 时, 扩增条带明显变亮, 3.0 μL 时,

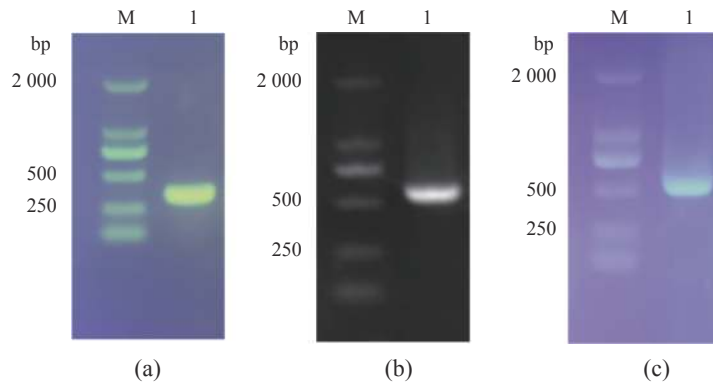


图 1 FV3 PCR 检测

(a) FV3-1, (b) FV3-2, (c) FV3-3; M. DNA Marker, I. 扩增产物; 下同。

Fig. 1 Electrophoresis of PCR detection of FV3

(a) FV3-1, (b) FV3-2, (c) FV3-3; M. DNA Marker, I. amplified product; the same below.

扩增条带最亮(图 2-b)。 T_m 值在 42~60 °C 均能进行有效扩增, 48 °C 时条带明显变亮, 但在 58 °C 以后, 条带变暗, 50 °C 和 52 °C 扩增条带最亮(图 2-c)。因此, FV3-1 引物的 PCR 反应体系优化:

2×*Taq* PCR Master Mix 10 μL, 上下游引物各 1 μL, DNA 模板 3 μL, 灭菌水 5 μL; ; 反应程序为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 50 °C 35 s, 72 °C 40 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。

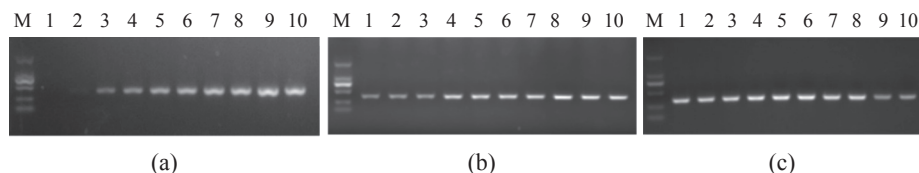


图 2 不同引物 (a)、模板 (b)、退火温度 (c) 条件下 FV3-1 引物 PCR 扩增效果

(a) 1~10 引物用量依次为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 μL, (b) 1~10 模板用量依次为 0.3、0.4、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 μL, (c) 1~10 T_m 设定依次为 42、44、46、48、50、52、54、56、58、60 °C; 下同。

Fig. 2 PCR amplification of FV3-1 primer under different conditions of primer (a), template DNA (b) and T_m value (c)

(a) primer doses of 1-10 are 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 and 1.0 μL, respectively, (b) template DNA doses of 1-10 are 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4.0 μL, respectively, (c) T_m values of 1-10 are 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 and 60 °C, respectively; the same below.

引物 FV3-2。引物 PCR 优化结果显示, 引物添加量在 0.2~1.0 μL 范围内均能扩增出目的条带, 使用 0.6 μL 引物时, 扩增条带最亮(图 3-a)。模板添加量为 3.5 μL 时, 扩增条带明显最亮(图 3-b)。 T_m 值在 47 °C 时扩增条带最亮(图 3-c)。因此,

FV3-2 引物优化后的 PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix 10 μL, 上下游引物各 0.6 μL, DNA 模板 3.5 μL, 灭菌水 5.3 μL; 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 47 °C 35 s, 72 °C 40 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。

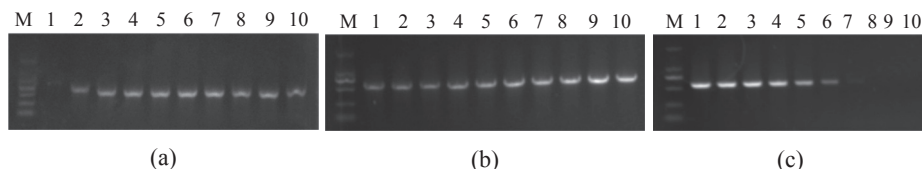


图 3 不同引物 (a)、模板 (b)、退火温度 (c) 条件下 FV3-2 引物 PCR 扩增效果

(c) 1~10. T_m 设定依次为 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65 °C。

Fig. 3 PCR amplification of FV3-2 primer under different conditions of primer (a), template DNA (b) and T_m value (c)

(c) T_m value of 1-10 are 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 and 65 °C.

FV3-3 引物。FV3-3 引物 PCR 优化结果显示, 引物添加量在 0.3~1.0 μL 范围内均能扩增出目的条带, 使用 0.9 μL 引物时, 扩增条带最亮(图 4-a)。模板添加量在 0.5~4.0 μL 范围内均能进行有效扩

增, 其中 3.0 μL 时, 扩增条带最亮(图 4-b)。 T_m 值在 45 °C~55 °C 范围内能够进行有效扩增, 其中 45 °C 和 49 °C 时扩增条带较亮(图 4-c)。因此, FV3-3 引物优化后的 PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR

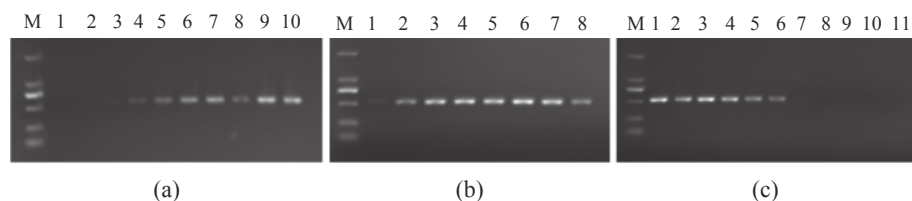


图 4 不同引物 (a)、模板 (b)、退火温度 (c) 条件下 FV3-3 引物 PCR 扩增效果

(b) 1~8 模板用量依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 μL, (c) 1~11 T_m 设定依次为 45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65 °C。

Fig. 4 PCR amplification of FV3-3 primer under different conditions of primer (a), template DNA (b) and T_m value (c)

(b) template DNA doses of 1-10 are 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4.0 μL, respectively, (c) T_m values of 1-11 are 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 and 65 °C, respectively.

Master Mix 10 μL , 上下游引物各 0.9 μL , 模板 3.0 μL , 灭菌水 5.2 μL ; 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 $^{\circ}\text{C}$ 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

2.3 特异性检测结果

在优化的最佳 PCR 扩增条件下, 检测 FV3-1 新方法扩增特异性, 结果显示, FV3-1 只对目的条带进行扩增, 以 WSSV、CEV、SHIV、虾肝胞虫 (EHP)、TiLV、NNV、ISKNV、KHV、IHHNV、MSRV、MrNV 和 LMBV 基因组为模板时, 该引物均未扩增出条带, 表明该引物特异性良好 (图 5-a)。

同时, 使用上述病原基因组为模板, 对 FV3-2 和 FV3-3 两种方法的特异性进行检测, 结果显示, FV3-2 和 FV3-3 引物使用阳性样品为模板进行扩增时, 目的条带处有条带, FV3-3 方法虽出现少许杂带 (未在目的条带处), 但不影响结果 (图 5-b, c)。3 种方法的比较研究结果表明, 本研

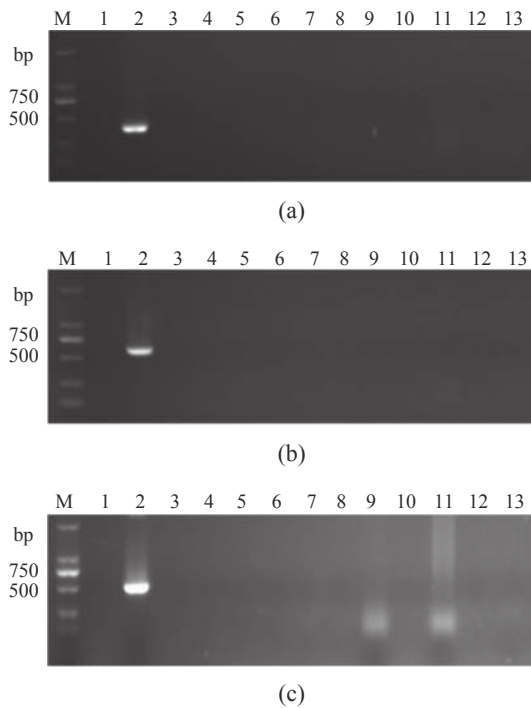


图 5 FV3-1(a)、FV3-2(b)、FV3-3(c) 引物扩增特异性检测

M. DNA Marker, 1. 阴性对照, 2. 阳性对照, 3. WSSV, 4. CEV, 5. SHIV, 6. TiLV, 7. NNV, 8. ISKNV, 9. KHV, 10. IHHNV, 11. MSRV, 12. MrNV, 13. LMBV。

Fig. 5 Specificity detection of FV3-1 (a), FV3-2 (b), FV3-3 (c)

M. DNA Marker, 1. negative control, 2. positive control, 3. WSSV, 4. CEV, 5. SHIV, 6. TiLV, 7. NNV, 8. ISKNV, 9. KHV, 10. IHHNV, 11. MSRV, 12. MrNV, 13. LMBV.

究所探索的 FV3-1 PCR 新方法特异性好, 结果可靠。

2.4 敏感性检测结果

当模板加入量为 1.2 拷贝时, FV3-1 引物仍能扩增出清晰的目的条带 (图 6-a, 10 泳道), 因此, FV3-1 方法最低可检出 1.2 个拷贝数的 FV3 质粒模板。FV3-2 引物最低可检出 1.3 个拷贝数的 FV3 质粒模板 (图 6-b)。当模板加入量为 2.7×10^2 拷贝时, 扩增条带变的很难分辨 (图 6-c), 因此, FV3-3 引物最低可检出 2.7×10^3 个拷贝数的 FV3 质粒模板。

2.5 临床样品检测

应用本研究建立的 FV3-1 PCR 检测方法对采集的 153 份临床蛙类养殖样品进行检测, 共检出 FV3 阳性样本 12 份 (表 2)。与常规的 FV3-2 和 FV3-3 PCR 法相比, 阳性样品数检出情况一致, 进一步测序比对表明, 检出片段序列为 FV3。该结果进一步证实了当前 FV3-1 PCR 检测方法的准确性与可靠性。

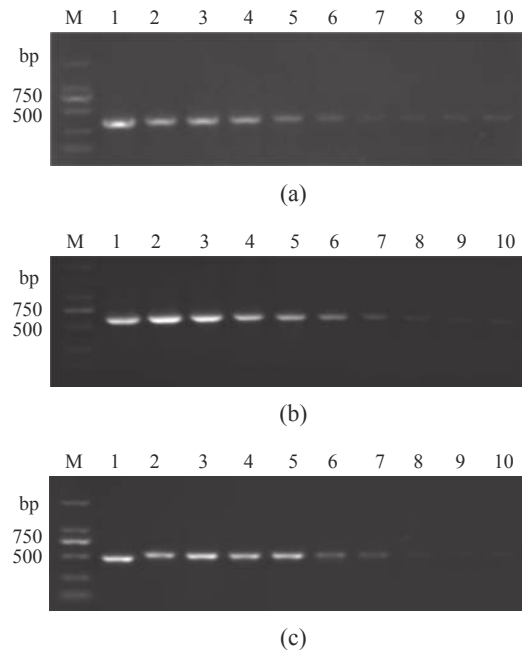


图 6 FV3-1(a)、FV3-2(b)、FV3-3(c) 引物敏感性检测

(a) 1~10 依次为 $1.2 \times 10^9 \sim 1.2 \times 10^0$ 个拷贝/ μL 梯度稀释的 FV3-1 模板, (b) 1~10 依次为 $1.3 \times 10^9 \sim 1.3 \times 10^0$ 个拷贝/ μL 梯度稀释的 FV3-2 模板, (c) 1~10 依次为 $2.7 \times 10^9 \sim 2.7 \times 10^0$ 个拷贝/ μL 梯度稀释的 FV3-3 模板。

Fig. 6 Primer sensitivity detection of FV3-1 (a), FV3-2 (b), FV3-3 (c)

(a) 1-10. are gradient dilution template of $1.2 \times 10^9 \sim 1.2 \times 10^0$ copy/ μL of FV3-1, (b) 1-10. are gradient dilution template of $1.3 \times 10^9 \sim 1.3 \times 10^0$ copy/ μL of FV3-2, (c) 1-10. gradient dilution template of $2.7 \times 10^9 \sim 2.7 \times 10^0$ copy/ μL of FV3-3.

表 2 临床蛙类样品 FV3 病毒 PCR 检测结果

Tab. 2 Detection results of FV3

样品来源 sample source	样品数/份 no. of samples	阳性样品数/份 no. of positive samples			阳性率/% positive rate
		FV3-1 PCR	FV3-2 PCR	FV3-3 PCR	
广东 Guangdong	30	0	0	0	0
	12	1	1	1	8.3
	43	0	0	0	0
	17	3	3	3	17.6
	26	0	0	0	0
	13	0	0	0	0
江西 Jiangxi	2	2	2	2	100.0
	7	6	6	6	85.7
	3	0	0	0	0

3 讨论

虹彩病毒是目前已经报道的水生动物病毒中危害较为普遍的一类病毒, 给世界范围内的水产养殖业带来了重大经济损失, 该科病毒包括绿虹彩病毒属 (*Chloriridovirus*)、蛙病毒属、虹彩病毒属 (*Iridovirus*)、淋巴囊肿病毒属 (*Lymphocystivirus*) 和肿大细胞病毒属 (*Megalocytivirus*) 5 个属^[15-16]。其中, 蛙病毒属由于宿主广泛, 危害最为严重, 可在鱼类、两栖类和爬行类中大规模暴发, 并相互传播, 一旦发病, 很难控制^[17]。20 世纪 60 年代, 从北豹蛙 (*Lithobates pipiens*) 中分离获得世界上第一株蛙病毒, 随后, 关于蛙病毒感染的报道屡见不鲜, 仅蛙科就有 22 个属感染蛙病毒^[18]。我国自 1996 年分离获得蛙病毒属模式株 FV3 以来^[4], 蛙病毒在各地陆续被发现和报道。2013 年, 湖北宜昌某石蛙养殖场曾发生暴发性疾病, 主要临床症状表现为体表出血、后肢溃疡、活动无力、发病 7 d 后达到死亡高峰, 累积死亡率最高可到 80%。经鉴定, 此次病原为 FV3^[19]。随后, 2016 年四川某黑斑蛙养殖场暴发 FV3 感染, 死亡率高达 90%^[20]。蛙病毒已经成为危害我国蛙类养殖的流行性致病因素。

MCP 是虹彩病毒的主要组成部分, 约占整个病毒多肽的 40%~45%, 并且在虹彩病毒科中高度保守, 可利用其同源性的差异进行病毒进化与检测方面的研究, 当前许多关于蛙病毒的检测方法都是基于 MCP 序列设计引物^[21]。王庆等^[22]根据 MCP 中的保守序列设计特异性引物, 利用双重 PCR 方法特异性扩增 LMBV, 而对 FV3 不进行扩

增, 最低检测限达 6.5×10^{-9} g。李江宇等^[23]通过对蛙病毒属 MCP 进行分析, 建立了一种可用于检测蛙病毒属 13 种病毒成员并能进行初步分类的三重荧光 PCR 方法, 该方法对各种蛙病毒的检测限均达到了 10^2 个拷贝。另有学者建立了实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 方法检测蛙病毒属病毒, 检测限达到了 4.5×10^{-9} g/ μ L^[24]。张旻等^[25]利用 STIV 的 MCP 设计特异性引物, 建立了特异性检测 EHNV 和 TFV 的巢式 PCR 方法, 可检测 10^2 个拷贝数的病毒粒子。以上方法虽灵敏性、特异性好, 极大地推动了蛙病毒检测研究, 但双重 PCR、三重 PCR 操作较为繁琐, 易发生气溶胶污染产生假阳性, 且检测耗时久; RT-PCR 方法又对仪器设备要求高, 引物成本也相对较高, 在蛙病毒的检测应用中有一定的局限性。本研究中针对蛙病毒属 FV3 病毒 MCP 序列设计特异性引物, 仅使用一般的 PCR 方法就能达到较好的检测效果, 对设备要求低, 反应时间短, 操作方便, 与 Mao 等^[13]建立的 PCR 扩增法相比, 灵敏度高, 检测限可达 1.2 个拷贝数, 特异性较好, 对 TiLV、NNV、ISKNV、KHV、IHHNV、MSRV、MrNV、LMBV 等其他毒株无交叉反应。

目前, 我国蛙病毒防治尚无特效药, 也无相关商品化疫苗, 因此蛙病毒的早期监测和诊断尤为重要。本研究所建立的 FV3 PCR 检测方法具有简便、快速、灵敏性高、特异性好的特点, 可为蛙病毒的快速诊断和监测调查提供技术支持。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 陈素芝, 傅金钟, 肖茂达. 我国引进蛙类的初步研究[J]. 动物学杂志, 1993, 28(2): 12-14.
Chen S Z, Fu J Z, Xiao M D. Preliminary study on the frogs in China[J]. Chinese Journal of Zoology, 1993, 28(2): 12-14 (in Chinese).
- [2] 樊连春, 杨仲安. 沼泽绿牛蛙的核型及银染研究[J]. 水生生物学报, 1996, 20(4): 387-389.
Fan L C, Yang Z A. An investigation of the karyotype and Ag-NORs of *Rana grylio*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1996, 20(4): 387-389 (in Chinese).
- [3] 冯兴浪. 销路受阻, 超100亿产值“蛙类养殖”损失严重! 业内人士呼吁: 禁售须谨慎[J]. 当代水产, 2020, 45(3): 49.
Feng X L. Sales are blocked, and "frog breeding" with an output value of more than 10 billion has suffered serious losses! Industry insiders call for caution: ban on sales[J]. Current Fisheries, 2020, 45(3): 49 (in Chinese).
- [4] 张奇亚, 李正秋, 江育林, 等. 沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的初步研究[J]. 水生生物学报, 1996, 20(4): 390-392.
Zhang Q Y, Li Q Z, Jiang Y L, et al. Preliminary studies on virus isolation and cell infection from diseased frog *Rana grylio*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1996, 20(4): 390-392 (in Chinese).
- [5] 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.
- [6] Weng S P, He J G, Wang X H, et al. Outbreaks of an iridovirus disease in cultured tiger frog, *Rana tigrina rugulosa*, in southern China[J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(7): 423-427.
- [7] 张奇亚, 桂建芳. 水生病毒学[M]. 北京: 中国高等教育出版社, 2008.
Zhang Q Y, Gui J F. Aquatic virology[M]. Beijing: China Higher Education Press, 2008.
- [8] Langdon J S, Humphrey J D. Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia[J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 10(4): 289-297.
- [9] Rojas S, Richards K, Jancovich J K, et al. Influence of temperature on *Ranavirus* infection in larval salamanders *Ambystoma tigrinum*[J]. 2005, 63(2-3): 95-100.
- [10] 苗素英, 何建国, 张利红, 等. 虎纹蛙病毒主要衣壳蛋白基因的克隆及其序列[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 559-563.
Miao S Y, He J G, Zhang L H, et al. Cloning, sequence analysis of the major capsid protein gene of newly isolated *Iridovirus* from *Rana tigrina* [J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(6): 559-563 (in Chinese).
- [11] 林端, 董燕红, 袁茵, 等. 鱼类虹彩病毒PCR快速检测试剂盒的准确度评价及其应用[J]. 海洋环境科学, 2007, 26(2): 190-193.
Lin D, Dong Y H, Yuan Y, et al. Application of PCR technique in molecular biology study and detection of *Iridovirus*[J]. Marine Environmental Science, 2007, 26(2): 190-193 (in Chinese).
- [12] 中华人民共和国农业部. SC/T 7221-2016 蛙病毒病检测方法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. SC/T 7221-2016 Detection method of *Ranavirus*[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2017.
- [13] Mao J H, 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.
- [14] 雷燕, 肖洋, 赵振峰, 等. 罗非鱼罗湖病毒RT-PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 广东海洋大学学报, 2019, 39(3): 1-5.
Lei Y, Xiao Y, Zhao Z F, et al. Development and application of a RT-PCR assay of Tilapia Lake virus[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2019, 39(3): 1-5 (in Chinese).
- [15] Chinchar V G, Waltzek T B, Subramaniam K. Ranaviruses and other members of the family *Iridoviridae*: their place in the virosphere[J]. Virology, 2017, 511: 259-271.
- [16] Chinchar V G, Hick P, Ince I A, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Iridoviridae*[J]. The Journal of General Virology, 2017, 98(5): 890-891.
- [17] Hegde A, Teh H C, Lam T J, et al. Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*-comparative characterization and pathogenicity studies[J]. Archives of Virology, 2003, 148(3): 575-586.
- [18] Granoff A, Came P E, Breeze D C. Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. I. The isolation and properties of virus from normal and tumor tissue[J]. Virology,

- 1966, 29(1): 133-148.
- [19] 李莉娟, 罗杨志, 顾泽茂, 等. 蛙病毒 3 介导棘胸蛙的暴发性死亡 [C]//2013 年中国水产学会鱼病专业委员会学术研讨会论文集. 海口: 海南大学海洋学院, 2013. Li L J, Luo Y Z, Gu Z M, *et al.* Frog virus 3 mediates the death of *Quasipaa spinosa*[C]//The 2013 Symposium of the Fish Disease Professional Committee of the Chinese Fisheries Society. Haikou: School of Oceanography, Hainan University, 2013 (in Chinese).
- [20] Mu W H, Geng Y, Yu Z H, *et al.* FV3-like *Ranavirus* infection outbreak in black-spotted pond frogs (*Rana nigromaculata*) in China[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 123: 111-114.
- [21] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, *et al.* Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution?[J]. *Virus Genes*, 1998, 16(1): 59-66.
- [22] 王庆, 曾伟伟, 刘春, 等. 大口黑鲈虹彩病毒双重PCR检测方法的建立[J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(4): 106-110. Wang Q, Zeng W W, Liu C, *et al.* A duplex PCR for detection of iridescent virus from largemouth bass, *Microporus salmoides*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32(4): 106-110 (in Chinese).
- [23] 李江宇, 王树云, 王姝, 等. 蛙病毒三重荧光PCR检测方法的建立[J]. *高技术通讯*, 2015, 25(7): 746-752. Li J Y, Wang S Y, Wang S, *et al.* Development of multiplex real-time PCR assay for detection of ranaviruses[J]. *Chinese High Technology Letters*, 2015, 25(7): 746-752 (in Chinese).
- [24] 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[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2): 172-176. 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 (in Chinese).
- [25] 张旻, 林祥梅, 江育林. 蛙虹彩病毒巢式PCR检测方法的建立[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(3): 661-666. Zhang M, Lin X M, Jiang Y L. Development of a nested PCR detection method for *Ranavirus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 661-666 (in Chinese).

Establishment and comparative analysis of PCR detection methods for frog virus

LI Yanan¹, LIU Chun¹, LIN Huajian², QIN Zhendong¹, LIN Li^{1*}

(1. Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, 510225, China;

2. Guangdong Provincial Animal Disease Prevention and Control Center, Guangzhou 510230, China)

Abstract: *Ranavirus* has a wide range of hosts, can infect reptiles, fish and amphibians, and lead to a high mortality. In order to further enrich its detection methods, in this study, a pair of specific primers was designed for the frog virus type 3 (FV3) based on its major capsid protein gene, and two other frog virus PCR detection methods were selected for comparison experiments. After the optimization of PCR reaction system, specificity and sensitivity test, a new PCR method for the detection of FV3 strain was established. This method has a minimum detection limit of 1.2 copies, has no cross-reaction with nervous necrosis virus, shrimp hemocyte iridovirus, largemouth bass *Ranavirus*, koi herpesvirus, carp edema virus, infectious spleen and kidney necrosis virus and *Micropterus salmoides* rhabdovirus. The present new method was used to detect the clinical samples, obtaining consistent results with the other two methods. The FV3 PCR detection method established in this research has the characteristics of simplicity, rapidity, good sensitivity, high specificity, and low cost. It can be used for rapid diagnosis and molecular epidemiological investigation of FV3 frog virus.

Key words: *Ranavirus*; *Iridovirus*; frog virus type 3 (FV3); PCR

Corresponding author: LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

Funding projects: Special Project for Rural Revitalization Strategy of Department of Agriculture and Rural Affairs of Guangdong Province (KB2010002, KB2010005); China-ASEAN Maritime Cooperation Fund (CAMC-2018F); Aquatic Disease Monitoring and Prevention Team Project of Department of Agriculture and Rural Affairs of Guangdong Province; Bullfrog Disease Investigation and Detection Project (D120222B0)