



美洲鳎腺瘤病毒 (AEAdoV) 普通 PCR 和 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

孔文迪, 陈曦, 杨金先, 葛均青*
(福建省农业科学院生物技术研究所, 福建福州 350003)

摘要: 为建立美洲鳎腺瘤病毒 (AEAdoV) 的检测方法, 根据 AEAdoV 福建株 (AEAdoV-FJ) 的 superfamily 3 helicases (S3H) 序列, 设计引物, 建立了 AEAdoV 的普通 PCR 和 qPCR 检测方法; 进一步评价检测方法的灵敏性、特异性及重复性, 利用 2 种方法对美洲鳎“出血性烂鳃”病料进行了检测, 并对美洲鳎体内不同组织的病毒含量进行分析。结果显示, 普通 PCR 扩增的目的片段长度约 300 bp, 利用其构建的 qPCR 质粒标准品, 其拷贝数与 qPCR 阈值循环数 (C_t) 线性关系良好, 线性范围广, 标准曲线相关系数 (R^2) 达到 0.999, 扩增效率为 105.067%。建立的普通 PCR 法和 qPCR 的最低检测 AEAdoV 拷贝数分别为 100 个和 10 个。2 种方法均可特异性检测 AEAdoV, 而对蛙虹彩病毒 (RGV)、鳎疱疹病毒 (AngHV)、鲤疱疹病毒 (KHV)、对虾白斑综合征病毒 (WSSV)、日本鳎内皮细胞坏死病毒 (JEAdoV) 和花鳎腺瘤病毒 (MEAdoV) 均无扩增反应。qPCR 法的组内和组间变异系数均小于 2%, 表明其重复性良好。临床应用结果显示, 35 份美洲鳎“出血性烂鳃”病料, 采用普通 PCR 法的 AEAdoV 检出率为 82.8%, 而 qPCR 法的 AEAdoV 检出率为 97%。对美洲鳎不同组织的病毒含量分析结果显示, 心脏、肝脏、鳃、鳍的 AEAdoV 相对含量较高, 而黏液、皮肤和脾脏的病毒含量相对较低。研究表明, 建立的 AEAdoV 的灵敏度高、特异性强的普通 PCR 和 qPCR 检测方法, 证实 AEAdoV 与美洲鳎“出血性烂鳃”病密切相关, 且在感染鳎主要组织中都存在。实验结果对于研究 AEAdoV 的致病性, 开展其流行情况和病原学情况分析具有重要意义。

关键词: 美洲鳎腺瘤病毒 (AEAdoV); 普通 PCR; 荧光定量 PCR; SYBR Green I; 检测方法
中图分类号: S 941.41 文献标志码: A

中国具有世界上规模最大的鳎养殖产业, 养殖区集中在福建省和广东省, 主要的养殖品种为日本鳎 (*Anguilla japonica*) 和美洲鳎 (*A. rostrata*) 等^[1]。自 2015 年以来, 美洲鳎已成为福建省主要的鳎养殖品种。近年来, 养殖的美洲鳎陆续出现一种持续时间长 (3~6 个月), 累

计死亡率高 (20%~50%) 的传染性疾病。患病鳎的主要发病特征为鳃丝密布针尖大小出血点, 因此命名为“出血性烂鳃”^[2]。在前期研究中, 利用鳎卵巢巢细胞 (eel ovary cell line, EO), 从患“出血性烂鳃”美洲鳎体内分离鉴定出一种新的病毒, 命名为美洲鳎腺瘤病毒 (American eel adenovirus,

收稿日期: 2023-07-17 修回日期: 2023-10-18

资助项目: 福建省公益类科研院所基本科研专项 (2021R1027007); 福建省农业科学院“5511”协同创新工程建设项目 (XTCXGC2021013)

第一作者: 孔文迪, 从事水产保护学研究, E-mail: 915666426@qq.com;
陈曦 (照片), 从事水生病毒学研究, E-mail: kobeid@163.com

通信作者: 葛均青, 从事水产健康养殖研究, E-mail: jqge@163.com



AEAdoV)^[2]。为进一步研究 AEAdoV 的致病性及其流行状况, 需要建立灵敏、特异的 AEAdoV 检测方法。

AEAdoV 病毒粒子为二十面体结构, 直径 75~85 nm, 为无囊膜 dsDNA 病毒, 隶属于罗韦病毒目 (Rowavirales) 瘤病毒科 (Adomaviridae) β 腺瘤病毒亚科 (Beta-adomaviruses)^[3]。AEAdoV 与 β 腺瘤病毒亚科的其他成员都编码 superfamily 3 helicases (S3H) 复制酶, 与花鳃腺瘤病毒 (marbled eel adenovirus, MEAdoV) 的 S3H 基因具有同源性^[4]。基于普通 PCR 和 qPCR 的分子生物学检测方法具有特异性强和灵敏度高等优点, 广泛应用于水产病毒的检测^[5-7]。为建立 AEAdoV 的分子生物学检测方法, 根据 AEAdoV 的 S3H 基因序列, 通过对比分析, 获得了与 MEAdoV 序列同源率低且与 β 腺瘤病毒亚科中的其他病毒成员无同源性的片段, 根据该片段设计引物, 构建了 AEAdoV 的普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 检测方法, 并对上述方法的灵敏性、特异性及重复性进行了评价。利用建立的普通 PCR 和 qPCR 检测方法对收集的美洲鳗鲡“出血性烂鳃”病料进行了检测, 明确了 AEAdoV 在鳗鲡体内的分布情况, 为深入开展该病毒的流行病学和致病机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系与病毒株

鳗鲡卵巢细胞系 (EO)、鲤上皮瘤细胞系 (Epithelioma papilloma cyprinid cell line, EPC) 由本实验室保存, 美洲鳗鲡腺瘤病毒福建株 (AEAdoV-FJ)、蛙虹彩病毒 (*Rana grylio virus*, RGV)^[8]、鳗鲡疱疹病毒 (*Anguillid herpesvirus*, AngHV) 和鲤疱疹病毒 (*Koi herpes virus*, KHV)^[9] 由本实验室分离或保存, 对虾白斑综合征病毒 (White spot syndrome virus, WSSV)、日本鳗鲡内皮细胞坏死病毒 (*Japanese eel adenovirus*, JEAdoV) 和花鳗鲡腺瘤病毒 (*Marbled eel adenovirus*, MEAdoV) 基因组 DNA 均由本实验室提取并保存。

1.2 主要仪器及试剂

2 × Taq Master Mix (Dye Plus)、DNA Marker、Taq Pro SYBR qPCR Master Mix 试剂盒和 pCE2-TA/Blunt 载体购自诺唯赞 (南京) 生物科技股份有限公司; 限制性核酸内切酶 *Eco* RI 购自宝日生物技术 (北京) 有限公司。病毒基因组 DNA/RNA

提取试剂盒和血液/细胞/组织 DNA 提取试剂盒均购自天根生化科技 (北京) 有限公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自广州美基生物科技有限公司。引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。主要仪器包括 PCR 仪 (Applied Biosystems Veriti PCR, Thermo Fisher Scientific)、qPCR 仪 (QuantStudio 3, Thermo Fisher Scientific)、超微量紫外可见分光光度计 (DA-11, DeNovix)、凝胶成像分析系统 (WD-9413C, 北京六一生物科技有限公司) 等。

1.3 引物的设计与优化

根据 AEAdoV-FJ 的 S3H 序列, 分别设计用于普通 PCR 和 qPCR 特异性扩增 S3H 序列的引物对 AEAdoV-FW/AEAdoV-RW 和 AEAdoV-qF/AEAdoV-qR, 其序列和目的片段长度见表 1。

表 1 普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for routine PCR and SYBR Green I qPCR detection

名称 names	序列(5'-3') sequences	扩增目的 片段长度/bp amplification target length
AEAdoV-FW	CACGCCTTCTCACAGATCCA	295
AEAdoV-RW	TGGCGTACTCTATCGAGCCT	
AEAdoV-qF	GCACTGATGCAGTTGACGCAC	122
AEAdoV-qR	CTGGCGTACTCTATCGAGCCT	

1.4 普通 PCR 检测方法的建立

将 AEAdoV-FJ 接种 EO 细胞系, 待细胞产生典型病变后, 收集细胞, 离心取上清液, 用病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒提取总 DNA, 用引物对 AEAdoV-FW/AEAdoV-RW 对提取的 DNA 进行普通 PCR 扩增, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 割胶回收并纯化目的片段, 并将目的片段克隆至 pCE2-TA/Blunt 载体, 用质粒提取试剂盒提取质粒后再进行酶切、测序鉴定。反应体系: AEAdoV-FJ 基因组 DNA 1 μ L, 2 × Taq Master Mix 12.5 μ L, AEAdoV-FW 和 AEAdoV-RW (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 加 ddH₂O 补液至 25 μ L; 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

1.5 qPCR 检测方法的建立

取构建的 pCE2-TA/Blunt-S3H 质粒 DNA, 用

超微量紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 用 DNA/RNA Copy Number Calculator (<http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>) 计算单位体积 (μL) DNA 样品中质粒的拷贝数, 作为标准品, 分装后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。以提取的 AEAdoV-FJ 基因组为模板, 用引物对 AEAdoV-qF/AEAdoV-qR 使用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 qPCR 扩增, 每个浓度设 3 个重复, 阴性对照用 ddH_2O 代替模板, 制作 qPCR 标准曲线。反应体系: AEAdoV-FJ 基因组 DNA $1\ \mu\text{L}$, $2\times$ qPCR Master Mix $10\ \mu\text{L}$, AEAdoV-qF 和 AEAdoV-qR ($10\ \mu\text{mol/L}$) 各 $0.4\ \mu\text{L}$, ddH_2O $8.2\ \mu\text{L}$; 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 $30\ \text{s}$; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ $5\ \text{s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ $34\ \text{s}$, 40 个循环。

1.6 普通 PCR 和 qPCR 检测方法的特异性评价

灵敏性检测 以梯度稀释的 pCE2-TA/Blunt-S3H 为模板, 利用设计的引物对 AEAdoV-FW/AEAdoV-RW 和 AEAdoV-qF/AEAdoV-qR 分别进行普通 PCR 和 qPCR 扩增, 分析比较 2 种方法所能检测的最低 AEAdoV-FJ 拷贝数。

特异性检测 取 AEAdoV-FJ、AngHV、RGV 和 KHV 细胞培养上清液, 利用病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒提取 DNA, 以上述病毒 DNA 及实验室保存的 WSSV、JEAdoV 和 MEAdoV 基因组 DNA 作为模板, 用建立的普通 PCR 和 qPCR 方法进行扩增, 评价 2 种检测方法的特异性。

重复性检测 分别取 10^5 和 10^4 拷贝/ μL 的 pCE2-TA/Blunt-S3H 作为模板, 进行 qPCR 扩增, 每个浓度设 3 个重复, 根据阈值循环数 (cycle threshold value, C_t) 的变异系数分析该方法的组内重复性。重复实验 3 次, 分析组间重复性。

1.7 普通 PCR 和 qPCR 检测方法的应用

取实验室收集的 35 份疑似美洲鳗鲡“出血性烂鳃”病料, 取肝脏、脾脏、肾脏等内脏组织, 用血液/细胞/组织 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 用超微量紫外分光光度计测定其纯度和浓度, 分别用建立的普通 PCR 和 qPCR 检测方法对样品进行检测, 统计 2 种检测方法的 AEAdoV-FJ 检出率。取 AEAdoV 阳性的黑仔期美洲鳗鲡, 取鳍、鳃、表皮黏液、皮肤、肌肉、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑和肠道等部位组织, 分别用血液/细胞/组织 DNA 提取试剂盒提取的 DNA 作为模板, 用建立的 qPCR 方法检测各部位的病毒载量, 分析病毒的分布情况, 重复 3 次。采用 SPSS 19.0 软件对所

得数据进行单因素方差分析, Duncan 氏法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时差异显著, 数据用“平均值 \pm 标准差”表示。实验期间, 操作者严格遵守实验动物福利伦理规范。

2 结果

2.1 AEAdoV S3H 基因片段的普通 PCR 扩增和克隆

取提取的 AEAdoV-FJ 基因组 DNA, 用引物对 AEAdoV-FW/AEAdoV-RW 进行普通 PCR 扩增, 获得与预期大小一致的约 $300\ \text{bp}$ 的特异性条带 (图 1-a)。进一步回收该片段, 克隆至 pCE2-TA/Blunt 载体, 经单酶切及测序鉴定, 获得质粒 pCE2-TA/Blunt-S3H (图 1-b)。

2.2 AEAdoV SYBR Green I qPCR 标准曲线的建立

以 $10^8\sim 10^1$ 拷贝/ μL 10 倍比稀释的质粒 pCE2-TA/Blunt-S3H 作为模板, 用引物对 AEAdoV-qF/AEAdoV-qR 进行 qPCR 扩增, 用质粒拷贝数与 C_t 值绘制标准曲线, 质粒拷贝数与 C_t 值的线性关系为 $y = -3.206x + 38.140$, 相关系数 R^2 为 0.999, 扩增效率为 105.067%, 线性关系较好。溶解曲线图显示, 不同拷贝数质粒的溶解曲线均只有 1 个溶解峰, T_m 值为 $85.33\sim 85.78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 表明反应均为特异性扩增, 无非特异性扩增或引物二聚体产生 (图 2)。

2.3 AEAdoV 普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 检测方法的特性评价

以 $10^8\sim 10^0$ 拷贝/ μL 10 倍比稀释的质粒 pCE2-TA/Blunt-S3H DNA 作为模板, 分别进行普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 扩增。结果显示, 普通 PCR 的最低检出的病毒拷贝数为 100 个 (图 3-a), 而 SYBR Green I qPCR 的最低检出为 10 个 (图 3-b), 表明 SYBR Green I qPCR 法比 PCR 法的灵敏性高 10 倍。

以 AEAdoV-FJ、AngHV、RGV、KHV、WSSV、JEAdoV 和 MEAdoV 的基因组 DNA 和 pCE2-TA/Blunt-S3H 重组质粒为模板, 进行普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 扩增的特异性检测。普通 PCR 结果显示, AEAdoV-FJ 和 pCE2-TA/Blunt-S3H 均扩增出特异性目的条带, AngHV、RGV、KHV、WSSV、JEAdoV 和 MEAdoV 则均呈阴性 (图 4-a, b)。qPCR 结果显示, AEAdoV-

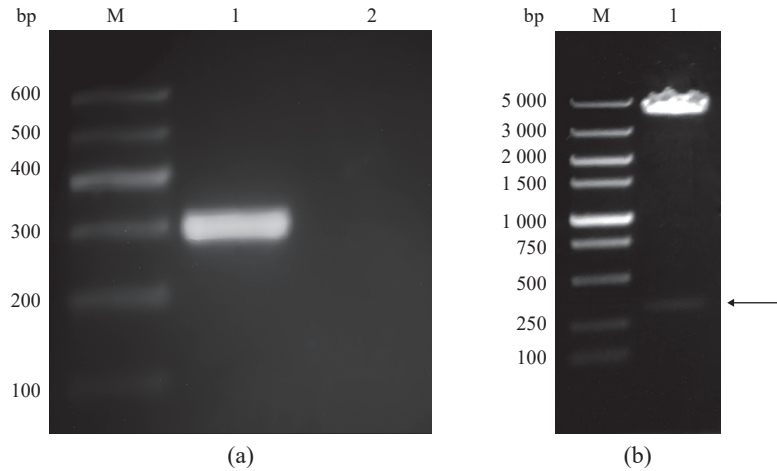


图 1 AEAdoV S3H 基因片段的 PCR 扩增和克隆

(a) AEAdoV S3H 基因片段的 PCR 扩增, M. DNA marker, 1. AEAdoV-FJ, 2. 阴性对照; (b) pCE2-TA/Blunt-S3H 的单酶切鉴定, M. DNA marker, 1. *Eco* R I 酶切, 箭头所示为目的片段。

Fig. 1 PCR amplification and cloning of AEAdoV S3H gene fragments

(a) PCR amplification partial of the AEAdoV S3H gene, M. DNA marker, 1. AEAdoV-FJ, 2. negative control; (b) restriction enzyme digestion of the plasmid pCE2-TA/Blunt-S3H, M. DNA marker, 1. single enzyme digestion by *Eco* R I, the arrow represents the target gene.

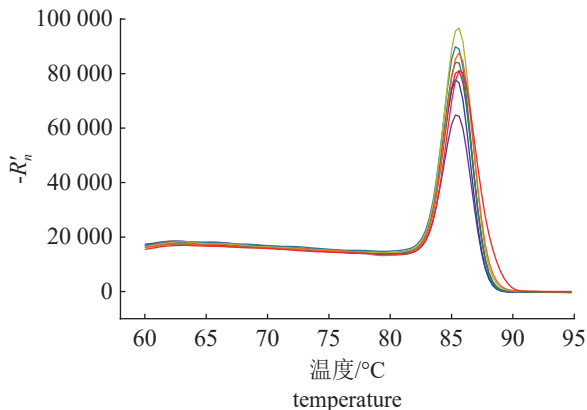


图 2 AEAdoV SYBR Green I qPCR 检测的溶解曲线

Fig. 2 Melting curve plot of the AEAdoV SYBR Green I qPCR assay

FJ 和 pCE2-TA/Blunt-S3H 均有扩增曲线产生, 而其他模板均无特异性扩增信号 (图 4-c, d)。上述结果表明, 建立的 AEAdoV 普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 检测方法特异性良好。

分别取 10^5 和 10^4 个拷贝的重组质粒进行 SYBR Green I qPCR 的重复性检测。结果显示, 组内变异系数均小于 1%, 分别为 0.08% 和 0.47%; 组间变异系数均小于 2%, 分别为 1.50% 和 0.22% (表 2), 表明 qPCR 方法的重复性好, 可保证检测结果的稳定性和可靠性。

2.4 AEAdoV 普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 方法的应用

分别用建立的普通 PCR 法和 SYBR Green I

qPCR 法对收集的 35 份疑似鳃“出血性烂鳃”病料进行检测。结果显示, 普通 PCR 法共检出 29 份阳性样品, 阳性检出率为 82.8%; 而 qPCR 法检出 34 份阳性样品, 阳性检出率为 97%, AEAdoV 检出率高于普通 PCR 法。

用建立的 AEAdoV SYBR Green I qPCR 方法检测 AEAdoV 感染鳃主要组织内的 AEAdoV 含量, 结果显示, 在检测的所有组织中均可检测到 AEAdoV, 其中心脏、肝脏、鳃和鳍的 AEAdoV 含量较高, 心脏中的含量可达 $10^{9.12 \pm 1.42}$ 拷贝, 与其他组织均差异极显著 ($P < 0.001$), 而体表 (黏液和皮肤) 以及脾脏含量相对较低 ($10^{2.61 \pm 0.38} \sim 10^{3.53 \pm 0.08}$), 显著低于其他组织 ($P < 0.05$) (图 5)。

3 讨论

近年来, 美洲鳃“出血性烂鳃”频发, 已经成为养殖美洲鳃的重要疾病^[10-11]。其临床病征, 与日本鳃内皮细胞坏死病毒 (JEAdoV) 和花鳃腺瘤病毒 (MEAdoV) 引起的内皮细胞坏死症 (VECNE) 类似^[12-14]。为研究 AEAdoV 的流行情况和病原学情况, 本研究建立了 AEAdoV 的普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 检测方法。结果显示, 普通 PCR 检测方法和 qPCR 检测方法对 AEAdoV 都具有良好的特异性, 与几种常见的水生动物 DNA 病毒 (AngHV、RGV、KHV、WSSV、JEAdoV、MEAdoV) 无交叉反应; qPCR 法重复性佳, 组间和组内变异系数均小于 2%; qPCR 检测方法可以

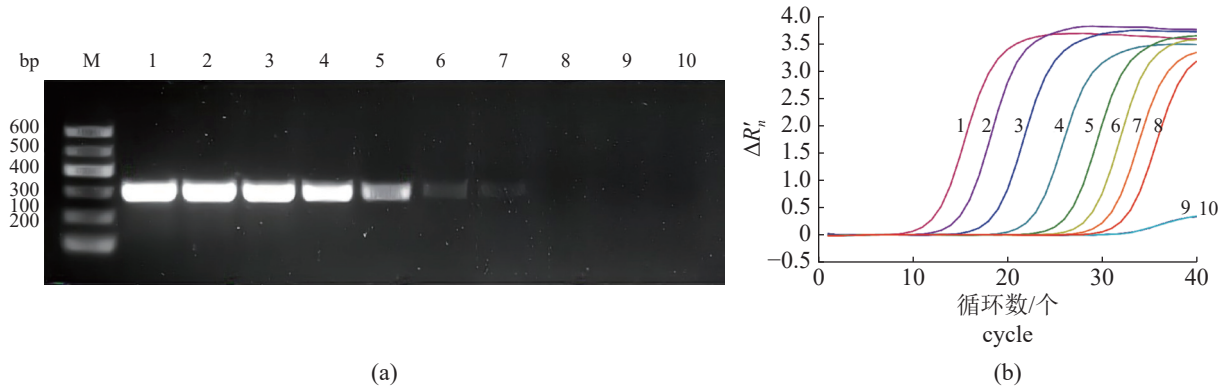


图3 AEAdoV 普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 检测的灵敏性

(a) AEAdoV 普通 PCR 检测的灵敏性, M. DNA marker, 1~9 依次为 10^8 ~ 10^0 个拷贝的重组质粒, 10 为阴性对照; (b) AEAdoV 的 SYBR Green I qPCR 检测灵敏性, 1~9 依次为 10^8 ~ 10^0 个拷贝的重组质粒, 10 为阴性对照。

Fig. 3 Sensitivity of routine PCR assay and SYBR Green I qPCR assay for the detection of AEAdoV

(a) AEAdoV routine PCR assay, M. DNA marker, lanes 1-9 represent recombinant plasmid ranging from 10^8 - 10^0 copies, lane 10. negative control; (b) detection sensitivity of the AEAdoV qPCR assay, plot 1-9 represent recombinant plasmid ranging from 10^8 - 10^0 copies, lane 10. negative control.

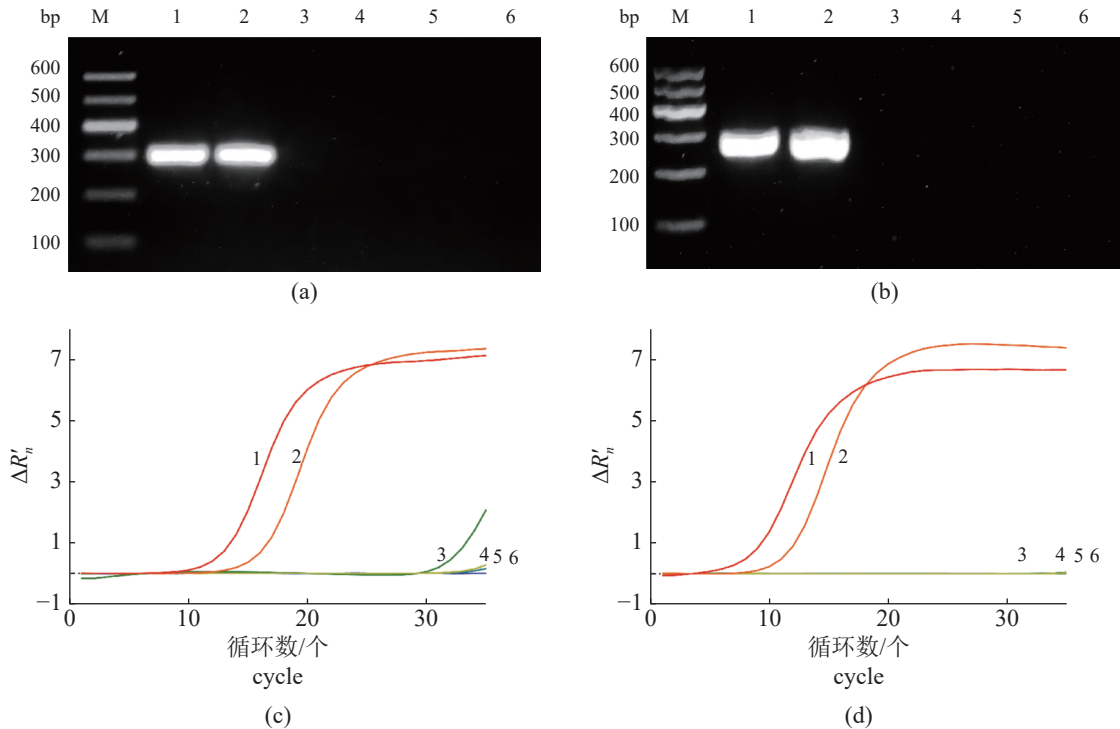


图4 AEAdoV 的普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 检测特异性

(a) 用细胞扩繁的病毒进行 AEAdoV 的普通 PCR 特异性检测, M. DNA marker, 1. AEAdoV-FJ, 2. pCE2-TA/Blunt-S3H, 3. AngHV, 4. RGV, 5. KHV, 6. 阴性对照; (b) 以组织提取的病毒 DNA 为模板进行 AEAdoV 的普通 PCR 特异性检测, M. DNA marker, 1. AEAdoV-FJ, 2. pCE2-TA/Blunt-S3H, 3. WSSV, 4. JEAdoV, 5. MEAdoV, 6. 阴性对照; (c) 以细胞扩繁的病毒 DNA 为模板进行 AEAdoV 的 qPCR 特异性检测, M. DNA marker, 1. AEAdoV-FJ, 2. pCE2-TA/Blunt-S3H, 3. AngHV, 4. RGV, 5. KHV, 6. 阴性对照; (d) 以组织提取的病毒 DNA 为模板进行 AEAdoV 的 qPCR 特异性检测, M. DNA marker, 1. AEAdoV-FJ, 2. pCE2-TA/Blunt-S3H, 3. WSSV, 4. JEAdoV, 5. MEAdoV, 6. 阴性对照。

Fig. 4 Detection specificity of the AEAdoV routine PCR assay and SYBR Green I qPCR assay

(a) detection specificity of the AEAdoV routine PCR assay using cell propagated viral DNA. M. DNA marker, 1. AEAdoV-FJ, 2. pCE2-TA/Blunt-S3H, 3. AngHV, 4. RGV, 5. KHV, 6. negative control; (b) detection specificity of the AEAdoV routine PCR assay using tissue extracted viral DNA. M. DNA marker, 1. AEAdoV-FJ, 2. pCE2-TA/Blunt-S3H, 3. WSSV, 4. JEAdoV, 5. MEAdoV, 6. negative control; (c) detection specificity of the AEAdoV qPCR assay using cell propagated viral DNA. M. DNA marker, 1. AEAdoV-FJ, 2. pCE2-TA/Blunt-S3H, 3. AngHV, 4. RGV, 5. KHV, 6. negative control; (d) detection specificity of the AEAdoV qPCR assay using tissue extracted viral DNA. M. DNA marker, 1. AEAdoV-FJ, 2. pCE2-TA/Blunt-S3H, 3. WSSV, 4. JEAdoV, 5. MEAdoV, 6. negative control.

表 2 AEAdoV SYBR Green I qPCR 检测的重复性

Tab. 2 Detection repeatability of the AEAdoV SYBR Green I qPCR assay

质粒拷贝数/个 plasmid copy number	组内变异系数 coefficient of variation in the groups		组间变异系数 coefficient of variation among the groups	
	组内 C_t 值 C_t value in the group	变异系数/% coefficient of variation	组间 C_t 值 C_t value among the groups	变异系数/% coefficient of variation
	10^5	22.41±0.02	0.08	21.90±0.33
10^4	25.21±0.12	0.47	25.17±0.06	0.22

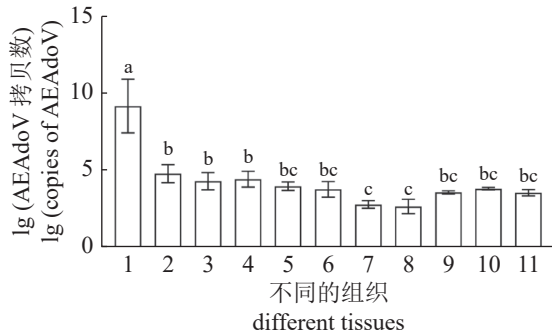


图 5 AEAdoV 在感染鳗鲡主要组织内的分布情况

1. 心脏, 2. 肝脏, 3. 鳃, 4. 鳍条, 5. 肾脏, 6. 肠道, 7. 脾脏, 8. 黏液, 9. 皮肤, 10. 脑, 11. 肌肉。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Distribution of AEAdoV in the main tissues of the infected eels

1. heart, 2. liver, 3. gill, 4. fin, 5. kidney, 6. intestine, 7. spleen, 8. mucus, 9. skin, 10. brain, 11. muscle; different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

检测到 10 个病毒拷贝数, 其检测灵敏度高于普通 PCR; 在临床样品的应用检测中, AEAdoV 的 qPCR 检测阳性检出率远高于普通 PCR 检测, 证明该方法更加灵敏、有效。AEAdoV 在“出血性烂鳃”病料中的高检出率表明, AEAdoV 在患“出血性烂鳃”的美洲鳗鲡中普遍存在, 与疾病的发生存在正相关关系。AEAdoV 对于鱼体的致病力, 以及是否存在其他病原共感染, 需要深入研究。

腺瘤病毒存在潜伏感染特性, 病毒在宿主体内长期存在而不致病, 如 MEAdoV^[15]、JEAdoV^[16] 等。前期研究显示, 美洲鳗鲡腹腔注射 AEAdoV 35 d 后, 可检测到病毒, 但鱼体无可见表现症状和病理变化^[2]。因此, 推断 AEAdoV 可潜伏感染, 难以通过体表病理变化判断鱼体的感染状况。建立 AEAdoV 的 qPCR 检测方法, 可在病毒潜伏期以及无临床症状的鱼体中准确检测 AEAdoV, 有利于尽早发现病毒感染, 从而采取积极的防控措施, 同时也有助于避免引入潜伏感染 AEAdoV 的苗种, 减少病毒的传播。

明确病毒在不同组织的分布情况, 对于研究病毒的致病机制和入侵规律具有重要意义^[17-20]。鳗鲡在感染 AngHV 后, 鳃和皮肤黏液内的病毒含量远高于其他组织, 表明上述器官可能是 AngHV 入侵和感染的主要靶器官^[5, 21]。本研究显示, 感染 AEAdoV 的美洲鳗鲡内脏组织中的 AEAdoV 相对含量较高, 特别是心脏中 AEAdoV 含量远高于其他组织, 而体表(黏液和皮肤)的病毒含量相对较低, 因此可以判断体表并非 AEAdoV 感染和增殖的主要组织。当病毒在某组织中含有较高时, 会引起相应组织发生病变, 如鱼呼肠孤病毒 (piscine reovirus, PRV), 主要分布在大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的心脏中, 可引起鱼体发生心肌炎症, 造成包括心脏苍白、心包出血、腹水等^[22-23] 等病变。但在感染了 AEAdoV 的美洲鳗鲡组织 (如心脏、肝脏) 中, 并未观察到类似病变, AEAdoV 的致病性还需要进一步的研究。此外, 了解 AEAdoV 在鱼体内的分布状况, 可指导疑似病例检测样品的采集; 采集心脏等内脏组织进行检测, 可以有效降低假阴性的概率, 提高检测的准确性。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 叶犲, 钟传明, 池宝兴. 福建鳗鲡产业发展形势分析[J]. 中国水产, 2019(4): 56-61.
Ye H, Zhong C M, Chi B X. Analysis on the development of eel industry in Fujian Province[J]. China Fisheries, 2019(4): 56-61 (in Chinese).
- [2] Yang J X, Chen X, Li Y Y, et al. Isolation of a novel adenovirus from cultured American eels, *Anguilla rostrata*, with haemorrhagic gill necrosis disease[J]. Journal of Fish Diseases, 2021, 44(11): 1811-1818.
- [3] Pao H Y, Wu C Y, Wen C M. Persistent development of adenovirus and aquareovirus in a novel cell line from marbled eel with petechial skin haemorrhage[J]. Journal of Fish Diseases, 2019, 42(3): 345-355.
- [4] Welch N L, Tisza M J, Starrett G J, et al. Identification
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- of adomavirus virion proteins[J]. bioRxiv 341131, 2020, 3: 1.
- [5] 李英英, 杨金先, 陈曦, 等. 鳗鲡疱疹病毒SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测方法的建立与应用[J]. 水产学报, 2021, 45(5): 769-777.
Li Y Y, Yang J X, Chen X, *et al.* Establishment and application of SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR for detection of *Anguillid herpesvirus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(5): 769-777 (in Chinese).
- [6] 刘春, 曾伟伟, 王庆, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)弹状病毒TaqMan实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J]. 水产学报, 2014, 38(1): 136-142.
Liu C, Zeng W W, Wang Q, *et al.* Establishment and application of TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR for detecting the hybrid snakehead rhabdovirus[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(1): 136-142 (in Chinese).
- [7] 周勇, 曾令兵, 张辉, 等. 鲤疱疹病毒II型TaqMan real-time PCR检测方法的建立及应用[J]. 水产学报, 2013, 37(4): 607-613.
Zhou Y, Zeng L B, Zhang H, *et al.* Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the Cyprinid herpesvirus II[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(4): 607-613 (in Chinese).
- [8] 张丽娟, 杨金先, 陈强, 等. 1株牛蛙虹彩病毒的分离鉴定及其致病性[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(10): 2001-2008.
Zhang L J, Yang J X, Chen Q, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of a *Rana grylio* virus[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2022, 42(10): 2001-2008 (in Chinese).
- [9] 李莹莹, 王庆, 曾伟伟, 等. 锦鲤疱疹病毒Gz1301株的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2014, 38(8): 1159-1166.
Li Y Y, Wang Q, Zeng W W, *et al.* Isolation and identification of koi herpesvirus (GZ1301) from diseased koi (*Cyprinus carpio*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(8): 1159-1166 (in Chinese).
- [10] 杨金先, 陈强, 李英英, 等. 美洲鳗鲡"出血性烂鳃病"及其综合防控[J]. 水产养殖, 2021, 42(2): 76-77.
Yang J X, Chen Q, Li Y Y, *et al.* "Haemorrhagic gill necrosis disease" on American eel, *Anguilla rostrata*, and its comprehensive control[J]. Journal of Aquaculture, 2021, 42(2): 76-77 (in Chinese).
- [11] 樊海平. 养殖美洲鳗鲡的主要疾病与防治[J]. 台湾海峡, 1998, 17(4): 477-481.
Fan H P. Diseases prevention and treatment of cultured American eel, *Anguilla rostrata*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 1998, 17(4): 477-481 (in Chinese).
- [12] Ono S I, Wakabayashi K, Nagai A. Isolation of the virus causing viral endothelial cell necrosis of eel from cultured Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. Fish Pathology, 2007, 42(4): 191-200.
- [13] Inouye K, Miwa S, Aoshima H, *et al.* A histopathological study on the etiology of intense congestion of the gills of Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. Fish Pathology, 1994, 29(1): 35-41.
- [14] Kusuda R, Isshiki T, Kawai K. Characteristics of a virus isolated from cultured eel showing congestion of central venous sinus in gill filaments[J]. Aquaculture Science, 1989, 37(1): 43-48.
- [15] Wen C M, Chen M M, Wang C S, *et al.* Isolation of a novel polyomavirus, related to Japanese eel endothelial cell-infecting virus, from marbled eels, *Anguilla marmorata* (Quoy & Gaimard)[J]. Journal of Fish Diseases, 2016, 39(7): 889-897.
- [16] Mizutani T, Sayama Y, Nakanishi A, *et al.* Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. Virology, 2011, 412(1): 179-187.
- [17] 何汶璐, 李根, 康慧敏, 等. 锦鲤疱疹病毒感染鲤鱼的动态病理损伤及病原组织分布[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2018, 33(5): 884-890.
He W L, Li G, Kang H M, *et al.* Dynamic distribution of cyprinid herpesvirus 3 in infected *Cyprinus carpio* and its hispathological changes[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science Edition), 2018, 33(5): 884-890 (in Chinese).
- [18] Fournier G, Boutier M, Stalin Raj V, *et al.* Feeding *Cyprinus carpio* with infectious materials mediates cyprinid herpesvirus 3 entry through infection of pharyngeal periodontal mucosa[J]. Veterinary Research, 2012, 43(1): 6.
- [19] Goodwin A E, Merry G E, Sadler J. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (*Cyprinid herpesvirus 2*) in moribund and healthy goldfish: Validation of a quantitative PCR diagnostic method[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 69(2-3): 137-143.
- [20] Hedrick R P, Gilad O, Yun S, *et al.* A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2000, 12(1): 44-57.
- [21] Hangalapura B N, Zwart R, Engelsma M Y, *et al.* Pathogenesis of *Herpesvirus anguillae* (HVA) in juvenile European eel *Anguilla anguilla* after infection by bath immersion[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2007,

- 78(1): 13-22. e0171471.
- [22] Di Cicco E, Ferguson H W, Schulze A D, *et al.* Heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) disease diagnosed on a British Columbia salmon farm through a longitudinal farm study[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2):
- [23] Palacios G, Lovoll M, Tengs T, *et al.* Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11487.

Establishment and application of routine PCR and SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR for detection of American eel adenovirus

KONG Wendi, CHEN Xi, YANG Jinxian, GE Junqing*

(Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Haemorrhagic gill necrosis disease (HGND) has become one of the important epidemic diseases of cultured American eels. In previous studies, American eel adenovirus (AEAdoV) was isolated from eel with HGND. In order to establish a PCR and real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) method for the detection of the virus, primers were designed according to the superfamily 3 helicases (S3H) sequence of AEAdoV-FJ. Further evaluations on the sensitivity, specificity, repeatability, and application effect of this method were conducted. The results showed that the established PCR method could specially amplify a 300 bp band, which was cloned and used to construct plasmid standards for qPCR; the cycle threshold value (C_t) of qPCR and the copy number of the standard sample had a consistent relationship with a wide range. The obtained correlation coefficient (R^2) of the standard curve reached 0.999, and the amplification efficiency was 105.067%. The qPCR method could detect a minimum of 10 viral copies with higher sensitivity than routine PCR method. Both methods could specifically detect AEAdoV with negative amplification reaction on Rana grylio virus (RGV), Anguillid herpesvirus (AngHV), Koi herpesvirus (KHV), White spot syndrome virus (WSSV), Japanese eel adenovirus (JEAdoV), and Marbled eel adenovirus (MEAdoV). The coefficient of variation within and between groups of this method were both less than 2%, suggesting good repeatability. Further application results showed that the detection rate of AEAdoV from 35 samples of American eels with HGND by routine PCR and qPCR was 82.8% and 97%, respectively, indicating that the virus is prevalent among the diseased eels. Analysis of the virus quantity of the eel tissues indicated that the level of AEAdoV was relatively higher in heart, liver, gill and fin, and lower in mucus, skin and spleen. These results indicate that routine PCR and qPCR assays with high sensitivity and specificity for detection of AEAdoV have been established, and confirm that AEAdoV is closely related to HGND and exists in the main organs of infected eels. This study will be valuable for further investigations of the correlation between AEAdoV and HGND, and helpful for understanding the epidemic and etiology of AEAdoV.

Key words: American eel adenovirus (AEAdoV); routine PCR; real-time fluorescence quantitative PCR; SYBR Green I; detection method

Corresponding author: GE Junqing. E-mail: jqge@163.com

Funding projects: Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund of Fujian Province (2021R1027007); "5511" Collaborative Innovation Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (XTCXGC2021013)