

研究简报

二温式多重PCR检测对虾白斑综合征病毒和桃拉病毒的研究

谢芝勋 庞耀珊 邓显文 唐小飞 刘加波

(广西壮族自治区兽医研究所, 南宁 530001)

STUDY ON THE DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS AND TAURA SYNDROME VIRUS BY MULTIPLEX PCR

XIE Zhi-Xun, PANG Yao-Shan, DENG Xian-Wen, TANG Xiao-Fei and LIU Jia-Bo
(Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001)

关键词: 多重聚合酶链式反应; 检测; 对虾; 白斑综合征病毒(WSSV); 桃拉病毒(TSV)

Key words: Multiplex Polymerase Chain Reaction; Detection; White Spot Syndrome Virus; Taura Syndrome Virus

中图分类号: Q78; S941.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)05-0595-03

对虾白斑综合征(WSS)和桃拉病(TS)是两种严重危害当前对虾养殖业的对虾病毒性疾病。目前对虾病毒病的诊断手段主要包括病理学和生物学方法、免疫学方法、分子杂交方法及PCR方法等^[1-4]。其中PCR方法是这些方法中特异性最强、敏感最高的病原检测手段,在国外已被广泛应用于对虾病毒病的检测和诊断。多重PCR是一种特殊PCR形式,其最突出特点,即一次PCR反应,就可同时检测、鉴别出多种病原体,在临床混合感染的鉴别诊断上具有其独特优势和很高的实用价值^[5,6]。

本试验建立了二温式多重PCR同时检测鉴别WSSV和TSV的方法,并用该多重PCR方法对广西沿海地区对虾养殖业WSSV和TSV感染状况进行了初步调查。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验用毒株 WSSV和TSV广西地方毒株、传染性皮下和造血器官坏死病毒(IHHNV)、溶血弧菌和链球菌、从美国夏威夷海洋研究所SPF种虾场引起的SPF亲虾样品、320份来自广西沿海各地对虾养殖场的对虾病料,均由本实验室收集鉴定、保存^[5]。

1.2 试剂和仪器 RNA Trizol抽提试剂盒,购自美国GIBCO公司;RT-PCR试剂盒,购自TaKaRa公司;裂解液;含2%CTAB(hexadecyl trimethyl ammonium bromide), 1.4mmol/L NaCl, 20

mmol/L EDTA, 20mmol/L Tris-HCl(pH=7.5), 使用前加巯基乙醇到终浓度为0.25%,本实验室配制;PE9600 PCR仪,购自美国Perkin Elmer Cetus公司。

1.3 DNA和RNA提取 取待检对虾肝胰腺、鳃、肌肉组织等共约100mg,参照谢芝勋方法分别提取病原DNA^[5]和RNA^[6],参照Sambrook方法^[7],测定DNA和RNA纯度及浓度,置于-70℃备用。

1.4 引物设计与合成 参照文献^[3,4],设计了两对引物。引物寡核苷酸序列及扩增产物大小见表1。引物由大连宝生物工程有限公司合成,用时用适量灭菌DEPC水溶解,保存于-20℃。

1.5 实验设计 本研究要在同一PCR反应体系中同时扩增两种不同的病毒核酸,其中WSSV的核酸是DNA,而TSV则是RNA。由于RNA只有先反转录成cDNA后才能进行PCR,所以本实验设计分两步。第一步反转录:先将TSV RNA反转录成cDNA;第二步多重PCR:TSV RNA反转录成cDNA后再与WSSV DNA一起进行多重PCR。

反转录 采用20μL反转录体系将TSV RNA合成cDNA,其中含25mmol/μL MgCl₂ 4μL, 10×RNA PCR buffer 2μL, 2.5mmol/μL dNTPs 2μL, 40 units/μL RNase Inhibitor 1μL, 5 units/μL AMV Reverse Transcriptase 1μL, 25 pmol/μL TSV上游引物1μL, TSV RNA模板1μL, DEPC H₂O补足体积至20μL,置于PCR仪中,按下列程序进行反转录:42℃ 30min, 99℃ 4min, 4℃ 5min, 进行一个循环,cDNA合成完毕。

收稿日期:2004-12-11; 修订日期:2005-05-22

基金项目:广西科技攻关项目资助(桂科攻0322006-3A)

作者简介:谢芝勋(1963—),男,研究员;主要从事动物传染病分子生物学及分子免疫学研究

表 1 WSSV 和 TSV 引物

Tab. 1 WSSV and TSV primers

名称 Primers	引物寡核苷酸序列 Oligonucleotide sequences	扩增产物大小 Amplified size
WSSV	上游引物 Forward primer: 5'-CATGAGACACCCCAAGTTGTTAAC-3'	306bp
	下游引物 Reverse primer: 5'-CGAAATTCCATCACTGTAATTGCTTG-3'	
TSV	上游引物 Forward primer: 5'-TCAATGAGAGCTTGGTCC-3'	231bp
	下游引物 Reverse primer: 5'-AACTAGACAGCCCGCGCTT-3'	

多重 PCR TSV RNA 反转录成 cDNA 后, 在 cDNA 反应管中继续加入下列试剂, 多重 PCR 总反应体积为 50 μ L, 其中 25 mmol/L MgCl₂ 1 μ L, 10 \times PCR buffer 3 μ L, 5 units/ μ L Taq 聚合酶 0.5 μ L, 25 pmol/ μ L TSV 下游引物、25 pmol/ μ L WSSV 上游引物和下游引物各 1 μ L, WSSV DNA 模板 1 μ L, 超纯水补足总量至 50 μ L。在 PCR 仪上设定程序进行多重 PCR 反应。

1.6 多重 PCR 条件优化 分别测定 TSV 和 WSSV 核酸模板浓度, 稀释成含相同浓度模板, 然后对多重 PCR 反应的各参数(温度、时间、循环次数)进行优化, 以筛选出多重 PCR 反应体系中最佳的反应模式。

1.7 特异性试验 把含有 TSV 和 WSSV 核酸模板的样品与含有其他对照的对虾病原核酸样品, 分别加入到多重 PCR 反应体系中进行扩增, 以检测其特异性。

1.8 敏感性试验 分别测定 WSSV DNA 和 TSV RNA 含量, 10 倍递进稀释后, 进行多重 PCR 扩增以检测其敏感性。

1.9 PCR 产物的分析 取 10 μ L 多重 PCR 产物和 2 μ L 加样缓冲液混合, 在 1% 琼脂糖凝胶上, 以 80V 电压进行电泳, 用溴化乙锭染色后, 置紫外线台上观察拍照, 以标准分子量作参考, 分析记录结果。

1.10 临床检测试验 应用本研究所建立的多重 PCR 对 320 份来自广西沿海各地对虾养殖场对虾病料进行检测。

2 结果

2.1 多重 PCR 条件的优化

通过对多重 PCR 扩增的温度、时间和循环次数等的优化, 最后确定多重 PCR 的最佳反应模式为 94℃ 5min, 然后进入 94℃ 45s, 60℃ 2min 的循环, 共循环 35 次; 最后经 60℃ 延伸 10min 后于 4℃ 结束反应。

2.2 特异性试验

将 WSSV DNA、TSV RNA 和其他对照病原的核酸分别进行多重 PCR 扩增, 结果所有含有 WSSV 和 TSV 核酸的样品均能扩增出与试验设计大小相符的 306bp 和 231bp 的两条明亮条带, 而对照病原的核酸却扩增不出任何条带。结果见图 1。

2.3 敏感性试验

该多重 PCR 最低能同时检测到 1pg 的 WSSV 和 100fg 的 TSV 核酸模板。结果见图 2。

2.4 临床检测试验

该多重 PCR 对 320 份临床样品进行检测, 结果一共有

193 (193/320, 60.3%) 份样品为 WSSV 阳性和 85 (85/320, 26.6%) 份为 TSV 阳性, 其中 32 (32/320, 10%) 份为这两种病毒混合感染。结果见图 3。

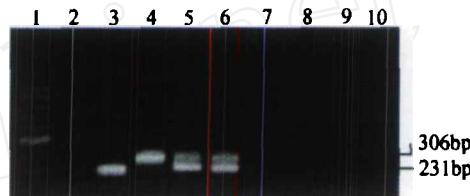


图 1 二温式多重 PCR 特异性试验

1. 100bp DNA ladder marker; 2. 阴性对照; 3. TSV 阳性对照;
4. WSSV 阳性对照; 5—6. 临床样品; 7. SPF 南美白对虾样品;
8. IHHNV; 9. 溶血弧菌; 10. 链球菌

Fig. 1 Specificity of two-temperature multi-PCR for WSSV and TSV
1. 100bp DNA ladder marker; 2. Negative control; 3. TSV; 4. WSSV;
5—6. Clinical samples; 7. SPF *P. Vannamei*; 8. IHHNV; 9. *Vibrio*;
10. *Streptococcus*

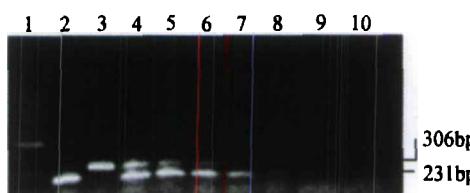


图 2 二温式多重 PCR 敏感性试验

1. 100bp DNA ladder marker; 2. TSV 阳性对照; 3. WSSV 阳性对照;
 4. 1ng; 5. 100pg; 6. 10pg; 7. 1pg; 8. 100fg; 9. 10fg; 10. 1fg
- Fig. 2 Sensitivity of two-temperature multi-PCR for WSSV and TSV
1. 100bp DNA ladder marker; 2. TSV; 3. WSSV; 4. 1ng; 5. 100pg;
6. 10pg; 7. 1pg; 8. 100fg; 9. 10fg; 10. 1fg

3 讨论

3.1 TSV 和 WSSV 是近年来严重危害对虾养殖业的两种病害, TSV 是单链 RNA 病毒, WSSV 是双链 DNA 病毒, 在实际生产中这两种病毒混合感染的现象常有发生。在本研究中, 根据多重 PCR 技术原理, 在反转录酶的作用下先将 TSV RNA 反转录成 cDNA, 然后再在同一 PCR 反应体系中与 WSSV DNA 进行多重 PCR。通过对 PCR 反应条件的优化, 成

功建立了 TSV 和 WSSV 的多重 PCR。

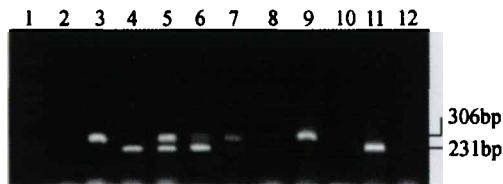


图 3 二温式多重 PCR 临床检测试验

1. DL2000bp DNA marker; 2. 阴性对照;3. WSSV 阳性对照;4. TSV 阳性对照;5. WSSV、TSV 多重 PCR 阳性对照;6—7. WSSV、TSV 均阳性的临床样品;8—9. WSSV 阳性的临床样品;10. WSSV、TSV 均阴性的临床样品;11. TSV 阳性的临床样品;12. WSSV、TSV 均阴性的临床样品

Fig.3 Results of two-temperature multi-PCR for the detection of clinical samples

1. DL2000 bp DNA marker; 2. Negative control; 3. WSSV; 4. TSV; 5. WSSV + TSV; 6—7. clinical samples contained WSSV and TSV; 8—9. clinical samples only contained WSSV; 10. clinical samples contained neither WSSV nor TSV; 11. clinical samples contained TSV; 12. clinical samples contained neither WSSV nor TSV

3.2 本研究所建立的多重 PCR 对不同 WSSV 和 TSV 毒株进行了多重 PCR 检测,结果均同时得到了与实验设计大小相符的 2 条分别为 306 bp(WSSV) 和 231 bp(TSV) 的扩增带,而对其他对照病原的扩增结果均为阴性,另外,敏感性试验结果显示,该多重 PCR 最低能检测到 1 pg 的 WSSV DNA 模板和 100 fg 的 TSV RNA 模板,说明该多重 PCR 具有很高特异性和敏感性。

3.3 该多重 PCR 对 320 份临床样品的检测结果表明,WSSV 和 TSV 阳性检出率分别为 60.3% 和 26.6%,WSSV 和 TSV 同时阳性检出率为 10%。说明 WSSV 和 TSV 不仅在广西沿海地区养殖对虾中呈现出区域性流行趋势,并且两种病毒混合

感染现象也十分普遍。在对虾病毒还不能在传代细胞系中大量增殖培养,并做进一步检测、分析的情况下,该研究建立具高度特异性和敏感性的 WSSV 和 TSV 多重 PCR 检测技术,在这两种病原体混合感染的鉴别诊断和有关防治,将具有十分重要的实用价值。

参考文献:

- [1] Wongteerasupaya A C, Vickers J E, Sriuairatana S, et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. *Dis. Aquat. Org.* 1995, 21:69—71
- [2] Nunan L M, Poulos B T, Lightner D V. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp [J]. *Dis Aquat Org.* 1998, 34:87—91
- [3] Nadala E J, Tapay L M, Cao S. Detection of yellow head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the western blot technique [J]. *J Virol Methods*, 1997, 69:39—44
- [4] Pang Y, Wang H, Girshick T, Xie Z, et al. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents[J]. *Avian Dis.* 2002, 46(3):691—699
- [5] Xie Z X, Pang Y S, He J M, et al. Detection of white spot syndrome virus and Taura syndrome virus of Penaeid shrimp by multiplex PCR [J]. *Chin J Vet Sci.* 2005, 25(1):13—15 [谢芝勋,庞耀珊,何建铭,等.应用多重 PCR 检测对虾白斑综合征病毒和桃拉病毒.中国兽医学报,2005,25(1):13—15]
- [6] Xie Zhixun, Avian A F, Theodore G, et al. Amplification of avian reovirus RNA using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. *Avian Disease*, 1997, 41:645—660
- [7] Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* [M], 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 9880—9898