

用 RT-PCR 法快速检测鲤春病毒血症病毒基因

高隆英 史秀杰 刘 茜 江育林

(深圳出入境检验检疫局, 深圳 518010)

摘要: 用逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR)方法快速、灵敏、特异地检测鲤春病毒血症病毒(SVCV), 根据SVCV病毒糖蛋白基因序列设计的引物经过RT-PCR和半嵌套PCR(semi-nested PCR)可扩增出SVCV病毒核酸中的714bp和606bp片段。与其他弹状病毒IHNV、VHSV、PFRV没有交叉, 具有特异性。灵敏度检测, 表明不小于1 000个病毒就可检测出阳性结果。本文还对复性温度、引物、Mg²⁺、Tag酶以及反转录酶的浓度对检测结果的影响进行了探讨。

关键词: 鱼病; 病毒病; 鲤春病毒血症病毒; RT-PCR; 快速检测方法

中图分类号: S941.41⁺6 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)05-0452-05

鲤春病毒血症病毒(Spring Viremia of Carp Virus, 简称SVCV)是一种有囊膜的弹状病毒, 为单链RNA病毒。常在水温10—15℃时感染鲤科鱼类, 并导致很高的死亡率, 因此在国际兽疫局(OIE)和我国进境动物一、二类传染病名录中均被列为必报疫病。

传统诊断鲤春病毒的方法是先利用细胞将病毒分离培养, 再通过中和试验或ELISA的方法进行鉴定, 这些方法均需较长时间(2周以上)。另外, 由于SVCV是弹状病毒, 有囊膜, 并且囊膜来自宿主细胞, 容易产生非特异性抗体, 因而也难制备高效价抗血清。一般制备抗SVCV血清的效价只有1:2000左右, 可以用来做中和试验, 但做ELISA时可与其它鱼类弹状病毒如IHNV(传染性造血器官坏死病毒), VHSV(病毒性出血性败血症病毒)等有交叉反应, 影响了鉴定的可靠性。随着分子生物学技术的发展, PCR(多聚酶链式反应)为检测病毒核酸提供了一种快速、灵敏和特异的检测方法^[1—5], 本文报道了用RT-PCR技术扩增SVCV糖蛋白基因(Glycoprotein gene)的片段, 从而达到检测和鉴定SVCV目的的诊断方法。

1 材料和方法

1.1 材料 SVCV, IHNV, VHSV, PFRV(狗鱼幼鱼弹状病毒)分别来自英国Weymouth的OIE参考实验室和德国慕尼黑大学水生动物研究所。细胞系: EPC(鲤鱼上皮瘤细胞), CO(草鱼卵巢细胞), FHM(鲤鱼上皮细胞)。PCR引物: 该试验选用SVCV病毒的糖蛋白基因(G基因)作为PCR的模板, 所选用的引物有3条。F1: 5'-GATTTGAGCTATTGGA

收稿日期: 2001-10-21; 修订日期: 2002-11-30

基金项目: 国家出入境检验检疫局科研项目(K049-1999); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金资助项目(2001PB12)

作者简介: 高隆英(1971—), 女, 河南省巩义市人; 兽医师; 现从事检验检疫工作

CTCCAAGA-3' ; R2: 5'-AGATGGTATGGACCCAAATACATCACCCAC-3' ; R4: 5'-CTGGGGTTTC-CCCTCAAAGTGE-3'。其中 F1 和 R2 扩增 714bp 片段, 而 F1 和 R4 则从中再扩增 606bp 的片段(图 1)。

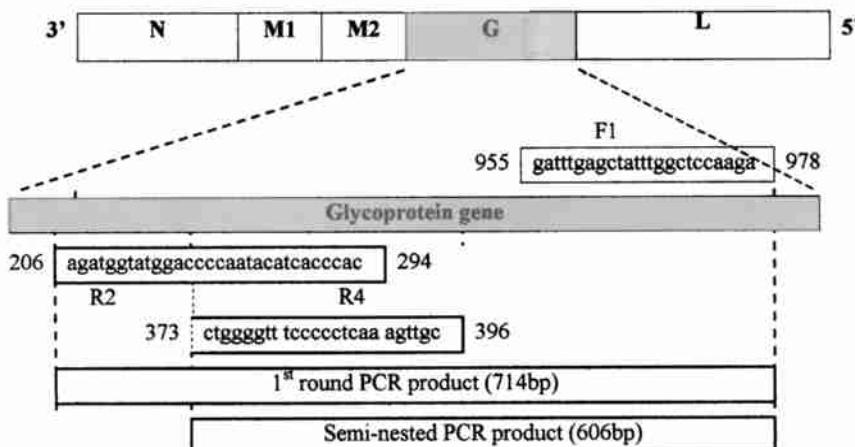


图 1 SVC 病毒基因结构及 PCR 示意图

Fig. 1 Sketch map of SVCV gene and fragments in PCR

1.2 PCR 试剂 逆转录酶(AMV)、RNA 抑制剂(RNasin)、Tag 酶、dNTP、MgCl₂ 及 PCR 缓冲液均购自上海 Sangon 公司。

1.3 病毒分离培养 取感染鱼肾、脾、脑等组织按常规方法匀浆, 加含 10% FCS 的 199 培养液 10 倍稀释, 4℃过夜以释放病毒。12 000r/ min 离心取上清, 稀释 10 倍和 100 倍后接种 CO 或 EPC 细胞单层, 20℃培养。待 CPE 完全后收集病毒悬液, 并测定 TCID₅₀。- 20℃保存备用。

1.4 病毒 RNA 抽提 在 450μL 含有 SVCV 的细胞悬液中加入 450μL 的 CTAB 溶液(2% CTAB, 1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA, 100mmol/L Tris-HCl, pH = 7.5, 用前加 0.25% 的 α -巯基乙醇)。混匀后 25℃作用 1.5—2h, 再加 600μL 酚/氯仿/异戊醇(25: 24: 1)用力混合至少 30s, 12 000 r/ min 离心 5min, 取上层水相。再加 650μL 氯仿/异戊醇(24: 1)混合至少 30s, 12 000r/ min 离心 5min, 取上层水相, 加 1.5 倍体积的冷无水乙醇混匀后, - 20℃过夜以沉淀 RNA。次日经 15 000r/ min 离心 30min 后, 小心弃去上清液, 37℃干燥后加 12μL 水放入- 80℃超低温冰箱中冻融一次, 吹打使沉淀充分溶解做为 PCR 模板。

1.5 RT-PCR (1) 解二级结构: 在 PCR 管中加入模板 RNA10μL, 引物(R2) 1.5μL, 水 3.5μL, 总体积 15μL。70℃加热 5min 后立即冰浴, 稍离心。(2)合成 cDNA: 在上述 PCR 管中继续加入 AMV 的 5 × buffer 5μL、d NTP (各 10mmol/L) 2μL, RNasin 1μL(20u), 水 1μL, AMV 酶 1μL, 共 25μL。41℃ 60min 反应后稍离心。(3)扩增 DNA: 继续在 PCR 管中加入 Tag 酶的 10 × buffer 8μL, MgCl₂ 8μL, 引物(R2, F1)各 2μL, dNTP 2μL, Tag 酶 1μL, 水 52μL, 总体积 100μL。加 50μL 矿物油覆盖, 稍离心。先 93℃, 4min, 再按 93℃ 1min, - 55℃ 1min-71℃ 1.5min 作 32 个循环; 最后 71℃ 8min 延伸, 4℃保温。(4) Semi-nested PCR: 取新的 PCR

管。依次加入模板(上述扩增的产物)10 μ L, Tag 酶的 10 \times buffer 10 μ L, MgCl₂ 10 μ L, 引物(R4, F1)各 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, Tag 酶 1 μ L, 水 62 μ L, 总体积 100 μ L。加 50 μ L 矿物油覆盖后, 先 93℃, 4min, 再按 93℃ 1min – 55℃ 1min – 71℃ 1.5min 作 32 个循环; 最后 71℃ 8min 延伸, 4℃ 保温。

1.6 PCR 产物的检测 用含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭(EB)的 1 \times TBE 的电泳缓冲液配制 1.5% 的琼脂糖凝胶。将凝胶板放入水平电泳槽, 使电泳缓冲液刚好淹及胶面, 将 6 μ L 样品和 2 μ L 样品缓冲液混匀后加入样品孔, 5V/cm 电泳约 0.5h, 在紫外透射仪下观察核酸带。

1.7 特异性的检查 分别将 SVCV, IHNV, VHSV, PFRV 的病毒悬液用 CTAB, 酚/氯仿抽提后作模板, 均用 SVCV 引物经 RT-PCR 和 nested-PCR 扩增后检测其扩增产物。

1.8 灵敏度的检测 将 10⁵TCID₅₀/0.1ml 的 SVC 病毒悬液经 CTAB, 酚/氯仿抽提后, 将提纯的 RNA 二倍稀释, 用不同的稀释度做模板进行扩增, 检测其反应灵敏度。

2 结 果

2.1 以 SVC 病毒悬液所抽提的 RNA 作模板, 用 R2 和 F1 引物经 RT-PCR 可扩增出 714bp 的 DNA 片段, 用 R4 和 F1 引物经 semi-nested PCR 可扩增出 606bp 的 DNA 片段(图 2), 和原设计完全一致。

2.2 特异性检验 分别以 SVC 病毒悬液所抽提的核酸和 IHNV、PFRV、VHS 等弹状病毒的病毒悬液所抽提的核酸为模板, 用 SVCV 的引物经 RT-PCR 和 semi-nested PCR 扩增, 只有 SVC 病毒悬液所抽提的核酸可扩增出 DNA 带, 其余均不能在相应位置形成特异带。说明所设计的 SVCV 的引物有较强的特异性。(图 3)

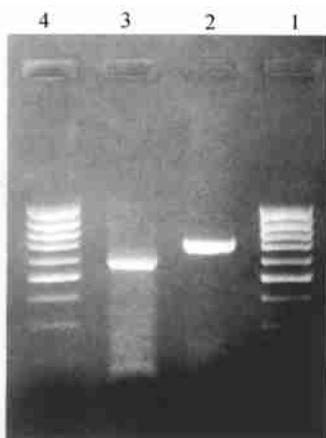


图 2 PCR 产物电泳结果. 1. Marker(100bp DNA ladder). 2 RT-PCR 后的 714bp 片断. 3. nested PCR 后的 606bp 片断. 4. Marker (100bp DNA ladder)

Fig. 2 PCR products of SVCV RNA 1 Marker (100bp DNA ladder) 2 RT-PCR production (714bp) 3 nested PCR production (606bp) 4Marker (100bp DNA ladder)

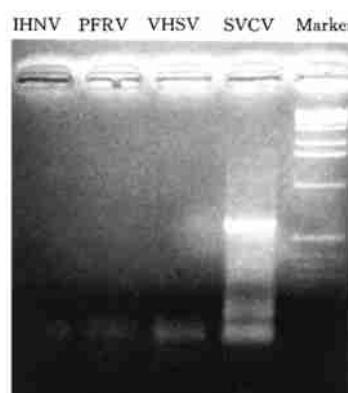


图 3 不同弹状病毒特异性比较 PCR 产物的电泳结果. 1. IHNV, 2. PFRV, 3. VHSV, 4. SVCV, 5. Marker

Fig. 3 Comparing PCR products of several rhabdoviruses

2.3 灵敏度 将 0.45mL 感染了病毒的细胞悬液(滴度约 10^5 TCID₅₀/0.1mL), 按上述提纯方法抽提后二倍系列稀释, 取不同的稀释度做模板。RT-PCR 结果显示: 1: 256 倍稀释后仍有可见的核酸带, 再经 Semi-nested PCR, 灵敏度还可以提高 10—100 倍。据此计算病毒悬液中只要有 1 000 个病毒用 RT-PCR 法就可检出。

3 讨 论

在试验中比较了四种抽提病毒 RNA 的方法: CTAB 法(本文)、硫氰酸胍法(将 400 μ L SVCV 病毒悬液+ 400 μ L 4mol/L 硫氰酸胍+ 80 μ L 3mol/L NaAc, pH= 5.0 作用 2h 后用酚/氯仿抽提)、Trizol 法(300 μ L 样品+ 700 μ L Trizol 混合 20s, 再作用 5min 后离心弃沉淀, 上清液加 200 μ L 氯仿混合 20s, 作用 10min 再离心取上层水相, 加等体积冷异丙醇沉淀 RNA)以及用蛋白酶 K 消化后用酚抽提的方法。分别以四种方法提纯的 SVC 病毒 RNA 为模板做 RT-PCR, 结果表明: 用 CTAB-酚/氯仿法抽提的效果最好。Trizol 法和蛋白酶 K 消化法次之, 硫氰酸胍法较差。

用 RT-PCR 检测 RNA 的过程中, 不但 RNA 的抽提方法对结果有影响、所选择的复性温度、引物、 $MgCl_2$ 、Tag 酶以及反转录酶的浓度对其结果均有影响。1) PCR 循环参数的影响: 典型的 PCR 变性温度为 95℃ 或 94℃, 但 95℃ 下循环几次后 Tag 酶较易失活, 而温度较低时, 变性不够, 选 95℃, 94℃, 93℃, 92℃ 1min 的条件下扩增, 从电泳结果看, 95℃ 结果不稳定, 93℃ 结果稳定, 带强。延伸温度 70—72℃ 均可。复性温度选 50℃、53℃、55℃、60℃ 1min 的条件, 结果显示温度低时非特异性强, 有背景, 温度高时灵敏度减弱, 55℃ 效果最好。另外, 在温度确定的情况下, 选择循环次数为 30, 35, 40, 45 次, 结果 30 次循环的带最强, 背景最干净, 随循环次数的增加, 背景加强, 带反而减弱。可能是太多的循环次数增加了非特异性合成。2) $MgCl_2$ 浓度的影响: 在 100 μ L 反应体系中, 反转录酶用 AMV 时, 25mmol/L $MgCl_2$ 分别选用 4 μ L、6 μ L、7 μ L、8 μ L、9 μ L、10 μ L, 结果 4 μ L 时无带, 8 μ L 时带最强, 9 μ L、10 μ L 时背景强, 且带弱。 Mg^{2+} 浓度过低酶活性降低, 过高容易形成非特异性合成, 因而 $MgCl_2$ 用量也影响 RT-PCR 扩增的灵敏性和特异性。

实验室以及样品中均含大量可促使 RNA 降解的 RNA 酶, 因而 RT-PCR 所选用的试剂和容器一定要避免 RNA 酶的污染, 需 DEPC 处理。抽提干燥后的 RNA 很难溶解、易降解, 加水后将其-80℃ 冻融一次后吹打可使其充分快速溶解。

如果仅从灵敏度考虑, 该方法应当能直接从病鱼中检测病毒核酸, 但作为检疫系统, 要求准确地得出检测结果, 由于病鱼组织中的未知干扰因素太多, 要一一弄清还需要一段时间。因此目前的检疫采用把病料接种细胞, 出现病变后再用 PCR 进行鉴定的程序, 试验结果表明比中和试验和 ELISA 试验要快, 也更准确。用 PCR 法直接从鱼体组织中检测病毒是进一步的设想。这样用 PCR 法在 48h 内就能得到结果, 可进一步缩短检验周期, 该工作正在进行。

参考文献:

- [1] 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥. PCR 技术实验指南 [M]. 北京: 科学出版社. 2000
- [2] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社. 1998

- [3] 姜军平, 赵新礼. 实用 PCR 基因诊断技术. 北京: 世界图书出版公司. 1996
- [4] OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. International Aquatic Animal Health Code(Third edition) , Paris France: OIE. 2000
- [5] Svetlana F, Oreshkova, Shchelkunov. Igor S. , et al. . Detection of Spring Viremia of Carp Virus Isolates by Hybridization with Non radioactive Probes and Amplification by Polymerase Chain Reaction [J] . *Virus Research*. 1999, **63**: 3-10.

DETECTION OF SPRING VIREMIA OF CARP VIRUS (SVCV) GENE USING REVERSE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT PCR)

GAO Long-ying, SHI Xiu-jie, LIU Hong and JIANG Yu-lin

(Shenzhen Exit entry Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518010)

Abstract: Spring viremia of carp virus(SVCV) is a rhabdovirus of fish that causing serious mortalities of carp. A rapid, sensitive and specific detection method was being set up for diagnosis of SVCV used RT-PCR and semi-nested PCR by the authors. The target regions of the SVCV glycoprotein gene were amplified using R2-F1 and R2-F1 primers. The products were 714bp segment in RT-PCR and 606bp segment in semi-nested PCR, respectively. These primers could not amplified RNA of IHNV, VHSV and PFRV. The sensitivity has a detection limit of 1 000 TCID₅₀.

Key words: Fish diseases; Viral diseases; SVCV; RT-PCR; Rapid detection method