

锦鲤疱疹病毒潜伏感染实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

陈俊杰, 李媛媛, 阳瑞雪, 古晶晶, 汪开毓, 耿毅, 欧阳萍*

(四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130)

摘要: 为建立一种特异和敏感的检测锦鲤疱疹病毒(koi herpesvirus, KHV)潜伏感染的方法, 以 KHV *Sph* 基因为靶序列设计特异性引物, 通过条件优化建立 Real-Time PCR 检测方法, 并且对该方法进行特异性和敏感性评估及临床样品应用研究。结果显示: 建立的方法与鲤痘疱疹病毒、金鱼造血器官坏死病毒和鳃鲑疱疹病毒均无交叉反应, 特异性强; 最低检出率为 42 拷贝/ μL , 灵敏度高。用本方法对 63 份临床样品进行检测, 有锦鲤疱疹病毒病(KHVD)病史的 18 份样品的检测结果全为阳性, 阳性率为 100%; 从有临床症状的鱼中得到的 15 份样品的检测结果全为阳性, 阳性率为 100%; 30 份无任何临床症状鱼中的 6 份被检测为阳性, 阳性率为 20%。本试验中建立的水生动物疱疹病毒潜伏感染快速检测方法, 可为潜伏感染 KHV 的临床检测提供一种快速、敏感和特异的检测手段, 可为 KHVD 的分子流行病学调查和预防提供参考。

关键词: 锦鲤疱疹病毒(KHV); 潜伏感染; 实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR)

中图分类号: S941.41

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2017)03-0310-05

Method of Real-Time PCR for the detecting latent infection of koi herpesvirus

CHEN Junjie, LI Yuanyuan, YANG Ruixue, GU Jingjing, WANG Kaiyu, GENG Yi, OUYANG Ping*

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: To establish a rapid, sensitive and specific approach for detecting the latent infection of koi Herpesvirus (KHV), a Real-Time PCR test was designed through specific primers designed to target KHV *Sph* gene. Under the optimized reaction conditions, the results showed that this method was specific for latent detection of KHV without cross reaction to other fish pathogenic viruses, including carp pox herpes virus (CyHV-1), goldfish herpes virus (CyHV-2) and eel herpes virus (AngHV-1). The lowest limitation of detection concentration by Real-Time PCR was 42 copies per 1 μL . A total of 63 clinical samples were detected by Real-Time PCR. The result showed that 18 samples out of which had koi herpesvirus disease (KHVD) history, all samples were positive; 15 samples out of which had in clinical signs and the positive rate was 100%; 30 samples out of which had no any clinical symptoms, and 6 out of the 30 samples were positive, the positive rate was 20%. In conclusion, the approach provides a rapid, sensitive and reliable molecular tool for detecting latent infection of koi Herpesvirus.

Keywords: koi herpesvirus (KHV); latent infection; Real-Time PCR (RT-PCR)

锦鲤疱疹病毒病(koi herpesvirus disease, KHVD)是由锦鲤疱疹病毒(koi herpesvirus, KHV)感染引起的一种高致病性、高传染性和高死亡率的疾病。该病特异性高, 主要感染鲤鱼和锦鲤, 引起

的主要病理变化为鳃坏死和间质性肾炎。该病发病率高, 流行范围广, 致死率高达 80%~100%^[1-4]。世界动物卫生组织(OIE)和中国都将 KHVD 列为必须申报的疾病, 中国农业部将其列为 类动物疫病^[5]。

收稿日期: 2016-10-09

修回日期: 2017-01-13

基金项目: 中国博士后科学基金(2015M582563); 教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[2015]311 号)

作者简介: 陈俊杰(1990—), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事兽医病原微生物及病理学研究; *通信作者, 欧阳萍, 讲师, 博士, 主要从事家畜病理学研究, ouyang.ping@live.cn

KHVD 已经在世界多个国家和地区流行,给鲤鱼养殖业造成了重大的经济损失。

目前已经建立的锦鲤疱疹病毒病的检测方法已达 10 多种,如细胞培养分离技术、分子生物学检测技术、环介导等温扩增技术、免疫学检测技术、电镜观察和原位杂交技术^[6]等。临床检测试验已证明这些检测技术适用于处于急性感染状态的鱼,对于临床症状不明显的处于 KHV 潜伏感染状态下的鱼,相关的检测方法还有待完善。

疱疹病毒有 100 多种,能够感染多种动物和人类。疱疹病毒感染的表现形式可以分为急性感染和潜伏感染。目前感染哺乳动物的所有疱疹病毒都已被证实存在潜伏感染。潜伏感染时,病毒以非整合状态的基因组形态游离在宿主细胞核内,一定条件下病毒可被重新激活,引起宿主临床症状并导致死亡。潜伏感染的机制目前尚不清楚^[7]。2011 年, Kathleen 等^[8]发现 KHV 存在潜伏感染,病毒主要潜伏于外周血白细胞中。2013 年, Reed 等^[9]发现 KHV 主要潜伏于 B 淋巴细胞中。

在潜伏感染时,只有部分基因发生表达,并且表达量会出现下调,因此,常规的检查方法很难检测到病毒存在。目前,用于锦鲤疱疹病毒潜伏感染检测的方法只有重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)检测方法^[10]。当前用于 KHVD 急性感染期的检测方法还不能确切检出处于潜伏感染状态的宿主,容易出现假阴性。在一定条件下,潜伏感染可以转变为急性感染,造成宿主死亡和疾病暴发^[11-14]。为了实现对 KHV 潜伏感染的检测,笔者以 KHV *Sph* 基因为靶序列设计特异性引物建立了 Real-Time PCR 检测方法。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品和菌株及质粒载体

锦鲤疱疹病毒(KHV)、鳃鲈疱疹病毒(AngHV)、鲤疱疹型病毒(CyHV-1)和鲤疱疹型病毒(CyHV-2)的 DNA 样品、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞均由四川农业大学动物医学院鱼病研究中心实验室提供。pMD19-T 克隆载体购自 Invitrogen 公司。锦鲤和鲤鱼共 63 条,10 条体质量(55 $\pm$ 3) g 的存在潜伏感染的鲤鱼(A 组)来自于暴发 KHVD 4 个

月后的池塘。8 条体质量(40 $\pm$ 3) g 存在潜伏感染的锦鲤(B 组)为 KHV 感染试验后存活下来的锦鲤。15 条体质量(100 $\pm$ 20)g 的鲤鱼(C 组)来自于带有 KHVD 临床症状的经 PCR 检测为正暴发 KHVD 的池塘。30 条体质量(100 $\pm$ 20)g 的鲤鱼(D 组)为四川地区 3 个鲤鱼养殖场随机采集的样品。

1.1.2 主要试剂

组织 DNA 提取试剂盒、小剂量质粒抽提试剂盒、T₄DNA 连接酶、胶回收试剂盒和 SYBR® Premix EX Taq 荧光定量 PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 公布的 KHV 美国株(KHV-U, ID 为 DQ657948.1)、以色列株(KHV-I, ID 为 DQ177346.1)和欧洲株(KHV-GZ11, ID 为 KJ627438.1)*Sph* 基因编码区(ORF54)的共有序列,采用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 设计特异性引物,上游引物编号为 F1,下游引物编号为 R1,预期片段大小为 235 bp。临床样品检测中以普通 PCR(OIE 推荐 TK 引物)^[6]为对照,上游引物编号为 F2,下游引物编号为 R2,预期片段大小为 409 bp。引物序列见表 1。所有引物均由擎科生物(成都)有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Information of primers used in the test	
引物名称	序列
F1	5'-GCTGTGGTAGGTGTTGCTGA-3'
R1	5'-CTCGGAGGACCTGATAACCA-3'
F2	5'-GGGTTACCTGTACGAG-3'
R2	5'-CACCCAGTAGATTATGC-3'

1.2 外周淋巴细胞的分离和标准阳性模板的制备

1.2.1 外周淋巴细胞的分离与总 DNA 提取

将鱼浸入含有 MS222 麻醉剂(100 mg/L)的水中,约 5 min 后完成麻醉。用含有肝素的 1 mL 注射器以尾静脉穿刺法抽血:将已经麻醉处理的鱼置于解剖盘上,在臀鳍后缘与鱼体脊柱垂直的部位进针,直接刺到 2 个椎体之间凹处的静脉,采取 0.3 ~ 0.5 mL 鱼全血,轻轻倒置摇匀 3 ~ 5 次,置于 4 ℃ 冰箱保存,备用。

采用红细胞裂解法分离外周全血淋巴细胞。将抗凝的鱼血和红细胞裂解液按体积比 1 : 4(0.3 mL 新鲜抗凝血与 1.2 mL 红细胞裂解液混合)加入到 1.5 mL EP 管中,轻轻倒置摇匀 3 ~ 5 次。室温静置 2 min,

1 000 r/min 离心 3 ~ 5 min, 弃掉上层红色液体, 收集沉淀部分。使用红细胞裂解液重复裂解 3 次, 然后用生理盐水洗涤 2 ~ 3 次。将得到的细胞沉淀用 200 μ L 生理盐水重悬, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 备用。取适量的外周淋巴细胞悬液, 用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA(具体操作按说明书进行), 将提取的总 DNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

1.2.2 标准品的制备

将 KHV 接种到 KF 细胞(koi fin ,KF)中培养, 收集病变超过 75% 的 KF 细胞反复冻融 3 次, 离心后吸取上清液, 用 DNA 试剂盒提取 KHV 基因组作为 PCR 扩增模板。PCR 扩增体系: 2 $\times$ PCR Master Mix 12.5 μ L, 10 μ mol/L 的上下游引物(F1、R1)各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 用 ddH₂O 补充到 25 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。将凝胶回收试剂盒回收目的基因片段克隆到 pMD19-T 载体上, 转化到 DH5 α 感受态细胞中, 并将 PCR 和序列测序鉴定为含有目的基因的重组质粒按文献[11]的方法命名(pMD19-T-Sph)。

1.3 条件的优化与标准曲线的绘制

1.3.1 实时荧光定量 PCR 反应条件的优化

实时荧光定量 PCR 扩增体系 20 μ L: 2 $\times$ Real Master Mix/20 $\times$ SYBR Solution 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 用 ddH₂O 补至 20 μ L。在 ABI7500 型荧光 PCR 仪上进行扩增, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 40 个循环。对系统自动生成的数据进行统计学分析。在其他变量相同的条件下, 于 56 ~ 61 $^{\circ}$ C 对退火温度进行优化, 以确定最适反应条件。

1.3.2 标准曲线的绘制

将 pMD19-T-Sph 标准质粒稀释到 1×10^9 拷贝/ μ L 后再进行 10 倍系列稀释, 获得 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , ..., 1×10^6 拷贝/ μ L 共 5 个浓度, 制作标准曲线。每个浓度 3 个重复。以 ddH₂O 为空白对照进行 SYBR 实时荧光定量扩增。用 StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪(ABI)自带的 Step One Software v2.1 软

件进行分析, 用 Excel 2013 绘出标准曲线(横坐标为模板质粒 DNA 起始浓度的对数值, 纵坐标为相应的 Ct 值)。

1.4 敏感性和特异性试验

1.4.1 敏感性试验

将 pMD19-T-Sph 标准质粒进行 10 倍系列稀释(4.2×10^0 , 4.2×10^1 , 4.2×10^2 , ..., 4.2×10^9 拷贝/ μ L)。每个浓度取 1 μ L 作为模板。以 ddH₂O 为阴性对照。以优化的最佳反应条件进行荧光定量 PCR 试验, 分别确定所建立方法能检测出的 pMD19-T-Sph 标准质粒最低拷贝数。

1.4.2 特异性试验

用建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 对 CyHV-3 以及与该病毒基因组亲缘关系相近的 AngHV、CyHV-2 和 CyHV-1 进行扩增, 以 ddH₂O 和正常锦鲤基因组 DNA 为阴性对照, 检测建立方法的特异性。

1.5 临床样品的检测

对所采集的临床样品进行抽血、外周淋巴细胞分离与总 DNA 提取, 用建立的实时荧光定量 PCR 方法以及普通 PCR 方法进行检测。

2 结果与分析

2.1 实时荧光定量 PCR 反应条件的优化结果

通过退火温度为 56 ~ 61 $^{\circ}$ C 的筛选试验, 最终确定出实时荧光定量 PCR 的扩增条件: 在 20 μ L 反应体系中, SYBR Green Premix Ex Taq 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 用 ddH₂O 补至 20 μ L。反应参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 40 个循环。对系统自动生成的数据进行处理。

2.2 标准曲线

以 10 倍稀释的 pMD19-T-Sph 为模板, 以 2.1 项中的优化条件进行 RT-PCR 扩增。以模板质粒 DNA 起始浓度的对数值(x)为横坐标, 以 Ct 值(y)为纵坐标得到标准曲线 $y = -3.33x + 35.83$, 相关系数(R^2)为 0.998, 标准曲线的线性关系良好。

2.3 敏感性和特异性试验结果

2.3.1 敏感性试验结果

将构建好的重组质粒通过 ddH₂O 进行 10 倍系列

稀释,使用优化好的实时荧光定量 PCR 进行灵敏度检测。检测结果显示:实时荧光定量 PCR 的灵敏度为 42 拷贝/ μL (图 1)。阳性以 35 个循环出现条带为准,后面出现的条带可能与形成的引物二聚体有关。

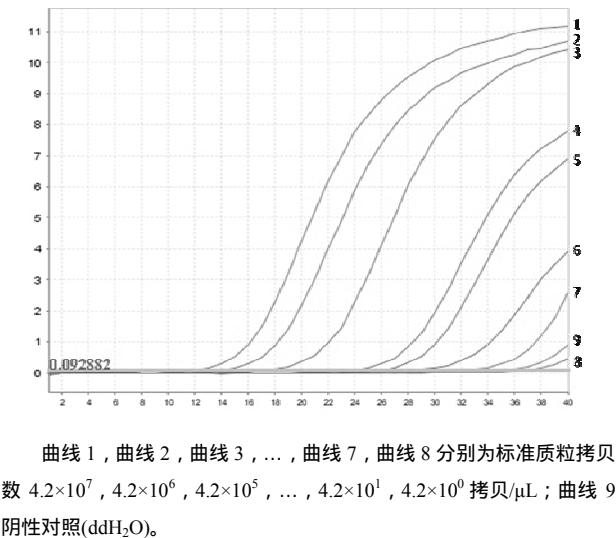


图 1 实时荧光定量 PCR 的敏感性试验结果
Fig.1 Sensitivity test results of Real-Time PCR

2.3.2 特异性试验结果

应用建立的实时荧光定量 PCR 方法对 CyHV-3 以及与该病毒亲缘关系相近的 AngHV、CyHV-2、CyHV-1 进行扩增,并以 ddH₂O 和健康锦鲤基因组 DNA 为阴性对照,结果显示只有 CyHV-3 有目的条带(图 2),说明本研究中建立的方法与 KHV 亲缘关系较近的病毒无交叉反应,具有良好的特异性。

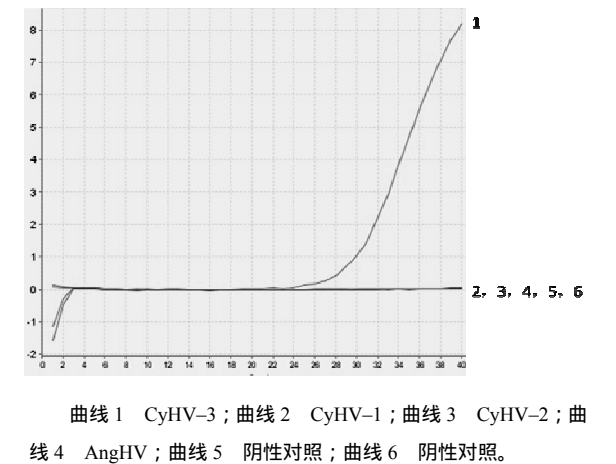


图 2 实时荧光定量 PCR 特异性试验结果
Fig.2 Specificity test of the Real-Time PCR

2.4 Real-Time PCR 重复性试验结果

对同一样品的 3 个不同浓度 4.2×10^7 、 4.2×10^6 和 4.2×10^5 拷贝/ μL 分别进行 3 个重复试验。 4.2×10^7 、 4.2×10^6 、 4.2×10^5 拷贝/ μL 试验组的组内变异

系数分别为 1.06%、1.79%和 1.36%,组间变异系数分别为 1.3%、1.55%和 1.5%。组内和组间重复性试验的变异系数都小于 2%,表明所建立的方法具有较好的重复性。

2.5 临床样品的检测结果

采用 1.2.1 中的方法分离外周血淋巴细胞并提取总 DNA,使用实时荧光定量 PCR 和普通 PCR 检测方法对 63 份样品的检测结果显示:有过 KHV 病史的鱼(A 组)的普通 PCR 检测阳性率为 0,实时荧光定量 PCR 阳性率为 100%;有烂鳃、腹部出血等临床症状的鱼(C 组)的普通 PCR 检测 KHV 阳性率为 80%,荧光定量 PCR 检测阳性率为 100%;表面健康的鱼(D 组)的普通 PCR 阳性检出率为 0,荧光定量 PCR 检出率为 20%(表 2)。

表 2 临床样品检测结果

Table 2 Detection results from clinical samples					
组别	总样品数/条	Real-Time PCR 阳性数	Real-Time PCR 阳性率/%	PCR 阳性数/条	PCR 阳性率/%
A	10	10	100	0	0.00
B	8	8	100	0	0.00
C	15	15	100	12	80.00
D	30	6	20.0	0	0.00
合计	63	39	61.9	12	19.05

3 结论与讨论

锦鲤疱疹病毒(KHV)从发现至今只有短短十几年时间。除了南美洲,世界各地都有 KHVD 爆发引起大面积鲤鱼死亡的报道^[12]。KHV 的快速传播与其存在潜伏感染有很大关系,病毒的潜伏期可以长达十几年甚至为宿主终生历经的时间^[8,13]。本研究中针对 KHV *Sph* 基因保守区设计特异性引物,通过优化反应条件建立的检测 KHV 潜伏感染的 Real-Time PCR 方法只对 KHV 进行扩增,不与 AngHV、CyHV-2、CyHV-1 和锦鲤组织 DNA 发生交叉反应,具有良好的特异性。使用荧光定量 PCR 对 pMD19-T-Sph 标准阳性质粒进行定量检测,在 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ 拷贝/ μL 具有良好的线性关系,最低检出率为 42 拷贝/ μL ,组内和组间变异系数均小于 2%。该方法具有很好的敏感性和重复性。

临床样品检测结果显示,有 KHVD 病史鱼的样品(A、B 组)的普通 PCR 检测为阴性,但实时荧光定量 PCR 检测为阳性,表明 KHV 潜伏状态下普通 PCR 检测方法难以检测到该病毒,只有高灵敏度检测方法

适用于对该病毒进行检测,否则容易出现假阴性。烂鳃、腹部出血等临床症状池塘中的鱼的普通 PCR 检测阳性率达 80% 荧光定量 PCR 检测阳性率为 100%,表明该池塘中的鱼正暴发 KHVD。表面健康的鱼的 PCR 检测结果全为阴性,但 Real-Time PCR 阳性率为 20%,说明这些样品中的部分鱼存在潜伏感染,其所在鱼塘具有暴发 KHVD 的可能。

参考文献:

- [1] BOUTIER M, RONSMANS M, RAKUS K, et al. Cyprinid herpesvirus 3: an archetype of fish alloverherpesviruses[J]. *Adv Virus Res*, 2015, 93: 161–256. DOI: 10.1016/bs.aivir.2015.03.001.
- [2] 王旭,谈自强,黄玲利,等. 兽用喹噁啉类遗传毒性研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2013, 47(5): 62–65.
- [3] ZHANG L, MA J, FAN Y, et al. Immune response and protection in gibel carp, *Carassius gibelio*, after vaccination with β -propiolactone inactivated cyprinid herpesvirus 2[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 49: 344–350. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.01.003.
- [4] 陈俊杰,汪开毓,周立新,等. 锦鲤疱疹病毒环介导等温扩增检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(5): 390–393. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0589.2016.05.11.
- [5] MA Y P, LIU Z X, HAO L, et al. Analysing codon usage bias of cyprinid herpesvirus 3 and adaptation of this virus to the hosts[J]. *J Fish Dis*, 2015, 38(7): 665–673. DOI: 10.1111/jfd.12316.
- [6] 郑树城,王庆,李莹莹,等. 鲤疱疹病毒 3 型研究进展[J]. *病毒学报*, 2016, 32(1): 108–120.
- [7] ROIZMAN B, PELLETT P E. The family Herpesviridae: a brief introduction[J]. *Fields Virology*, 2001, 2(11): 2381–2397.
- [8] EIDE K E, MILLER-MORGAN T, HEIDEL J R, et al. Investigation of koi herpesvirus latency in koi[J]. *J Virol*, 2011, 85(10): 4954–4962. DOI: 10.1128/JVI.01384-10.
- [9] REED A N, IZUME S, DOLAN B P, et al. Identification of B cells as a major site for cyprinid herpesvirus 3 latency[J]. *J Virol*, 2014, 88(16): 9297–9309. DOI: 10.1128/JVI.00990-14.
- [10] PRESCOTT M A, REED A N, JIN L, et al. Rapid detection of cyprinid herpesvirus 3 in latently infected koi by recombinase polymerase amplification[J]. *J Aquat Anim Health*, 2016, 28(3): 173–180. DOI: 10.1080/08997659.2016.1185048.
- [11] 陈红英,李新生,崔保安,等. 基于 TaqMan 探针的猪细小病毒实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2008, 34(6): 686–689.
- [12] RAKUS K, OUYANG P, BOUTIER M, et al. Cyprinid herpesvirus 3: an interesting virus for applied and fundamental research[J]. *Vet Res*, 2013, 44: 85. DOI: 10.1186/1297-9716-44-85.
- [13] FABIAN M, BAUMER A, ADAMEK M, et al. Transmission of cyprinid herpesvirus 3 by wild fish species—results from infection experiments[J]. *J Fish Dis*, 2016, 39(5): 625–628. DOI: 10.1111/jfd.12399.
- [14] PIAČKOVÁ V, FLAJŠHANS M, POKOROVÁ D, et al. Sensitivity of common carp, *Cyprinus carpio* L., strains and crossbreeds reared in the Czech Republic to infection by cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3; KHV)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 36(1): 75–80. DOI: 10.1111/jfd.12007.

责任编辑: 王赛群
英文编辑: 王 库