

二温式 RT-PCR 检测对虾 Taura 综合征病毒的研究

庞耀珊¹, 谢芝勋¹, 何竞铭¹, 邓显文¹, 莫友群²

(1. 广西兽医研究所, 广西 南宁 530001; 2. 广西海洋研究所, 广西 北海 536000)

摘要: 设计了一对能扩增大小为 231 bp 对虾 Taura 综合征病毒(TSV)某段基因的特异性引物, 优化建立了能快速检测 TSV 的二温式 RT-PCR。特异性和敏感性试验结果表明, 二温式 RT-PCR 能对 3 个试验用 TSV 毒株的 RNA 进行扩增, 并得到与预期大小一致的 231 bp 的扩增产物, 而其它 3 种对虾病原体无相同大小的特异性扩增产物出现; RT-PCR 最低能检测到 1 pg 的 TSV RNA。应用 RT-PCR 对 320 份分别来自广西沿海不同对虾养殖场的对虾样品进行检测, 结果一共有 85 份检出 TSV。这说明了 TSV 在广西沿海地区养殖对虾中已呈现出区域性流行趋势, 同时也显示了 RT-PCR 在 TSV 临床检测中具有较高的实用性。

关键词: 南美白对虾(*Penaeus vannamei*), Taura 综合征病毒, 二温式, RT-PCR

中图分类号: Q78 S941.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)02-0054-04

Taura 综合征病毒(TSV)是近年来严重危害对虾养殖业的几种病毒性疾病之一。其主要感染西半球对虾养殖品种, 如: 太平洋白对虾、大西洋白对虾、褐对虾和桃红对虾, 其中太平洋白对虾特别敏感。该病常表现如下 3 种类型: 一是急性爆发型, 病程短, 病虾全身淡红色, 很快死亡, 死虾肢体柔软; 二是亚急性型, 亚急性发作, 病程长, 角质或角质下层常出现坏死灶; 三是潜伏型, 感染对虾外观正常, 不表现症状, 但可终身带毒^[1]。该病最早在 1992 年乌拉圭 Taura River 附近的太平洋白对虾(*Penaeus vannamei*)体内发现^[2], 现世

界许多国家和地区均有报道^[3]。广西沿海地区是对虾养殖业较为发达的地区, 近年来随着对虾种苗和水产

收稿日期: 2003-07-02, 修回日期: 2003-11-05

基金项目: 广西壮族自治区科技攻关项目和水产畜牧局科研基金资助项目

作者简介: 庞耀珊(1967-), 女, 广西玉林人, 副研究员, 学士, 主要从事动物病毒分子生物学技术研究, 电话: 0771-3120371, E-mail: pys6246@hotmail.com, 谢芝勋 通讯作者, E-mail: zhixunx@yahoo.com.cn

品国际贸易交流增多, TSV 在该地区也呈现出流行趋势, 给对虾养殖业造成了严重的经济损失。

目前对虾疾病的诊断手段主要包括病理学和生物学诊断、免疫学方法、分子杂交方法及 PCR 诊断方法等^[3-10]。其中 PCR 方法又是目前这些方法中特异性最强、敏感最高的病原检测手段, 已被广泛应用于对虾疾病的诊断^[3-5], 但至今未见有二温式 PCR 检测 TSV 的报道。

本试验研究建立了 TSV 的二温式 RT-PCR, 并对广西沿海地区对虾养殖业 TSV 感染状况进行了初步调查。

1 材料和方法

1.1 试验用毒株

3 个 TSV 广西地方毒株, 由本实验室收集鉴定并保存。

1.2 对照样品

10 份 SPF 南美白对虾样品, 从美国夏威夷海洋研究所 SPF 种虾场引进, 本实验室保存; 对虾白斑综合征病毒 (WSSV)、传染性皮下和造血器官坏死病毒 (IHHNV)、弧菌等, 均由本实验室收集鉴定并保存。

1.3 临床样品

320 份患病对虾分别来自广西沿海各地对虾养殖场。

1.4 生化试剂

Trizol RNA 抽提试剂, 购自美国 GIBCOBRL 公司; RT-PCR 试剂盒, 购自大连宝生物工程有限公司。

1.5 引物设计

参考文献 [4], 根据 TSV 某段基因序列, 设计了一对可以扩增 231 bp 的特异性引物。引物由大连宝生物工程有限公司合成。引物寡核苷酸序列如下:

XZ 305 5' - TCA ATG AGA GCT TGG TCC - 3'

XZ 306 5' - AAG TAG ACA GCC GCG CTT - 3'

1.6 总 RNA 提取

取待检对虾肝胰腺、鳃、肌肉组织等共约 100 mg, 加入 250 μ L DEPC H₂O, 匀浆, 再加入 750 μ L Trizol, 按该试剂使用说明操作, 最后用适量的 DEPC H₂O 重新溶解总 RNA 沉淀。参照 Sambrook 方法^[11], 测定总 RNA 纯度及浓度。保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.7 二温式 RT-PCR

1.7.1 cDNA 合成

采用 20 μ L 反转录反应体系。该体系含: 10 \times PCR

buffer 2 μ L, 25 mmol MgCl₂ 4 μ L, 2.5 mmol dNTPs 2 μ L, 5 单位/ μ L AMV Reverse transcriptase 1 μ L, 40 单位/ μ L Rnasing inhibitor 0.5 μ L, 25 pmol 引物 (XZ 305) 1 μ L, RNA 模板适量, DEPC H₂O 补足体积至 20 μ L。在 PE9600 PCR 仪 (美国 Perkin Elmer 公司) 上, 按一定程序进行 cDNA 合成。

1.7.2 PCR 扩增

cDNA 合成结束后, 在 cDNA 反应管中继续加入以下 PCR 试剂: 10 \times PCR buffer 8 μ L, 25 mmol MgCl₂ 6 μ L, 25 pmol 引物 (XZ 306) 1 μ L, 5 单位/ μ L AmpliTaq A 0.5 μ L, dH₂O 补足体积至 100 μ L。在 PCR 仪上, 按二温式 PCR 反应模式, 对其反应参数, 即变性、退火延伸条件及循环次数进行优化。

1.8 二温式 RT-PCR 特异性试验

对 3 个 TSV 广西地方毒株和 10 份 SPF 南美白对虾组织, 以及 WSSV、IHHNV、弧菌等其它对虾疾病病原核酸进行 RT-PCR, 检测其特异性。

1.9 二温式 RT-PCR 敏感性试验

将 TSV RNA 定量, 按 10 倍递进稀释法稀释后, 分别取各滴度适量的 RNA 模板进行 RT-PCR, 测定其敏感性。

1.10 RT-PCR 产物分析

取 10 μ L RT-PCR 产物, 在 1% 的琼脂糖 (美国 GIBCOBRL 公司) 凝胶中以 5 V/cm 电压电泳。凝胶用溴化乙锭染色, 在紫外光检测仪上观察, 并用凝胶成像系统拍照。以 DNA 标准分子量为参照, 分析扩增结果。

1.11 二温式 RT-PCR 的临床检测试验

用该二温式 RT-PCR 对 320 份临床样品进行检测, 以检验其临床实用性。

2 结果

2.1 TSV 二温式 RT-PCR 的建立

通过对不同反应条件下 RNA 反转录及 cDNA 扩增结果的比较, 最后确定的 RNA 反转录程序为: 25 $^{\circ}$ C 5 min, 42 $^{\circ}$ C 15 min, 97 $^{\circ}$ C 4 min, 4 $^{\circ}$ C 结束反应。PCR 优化程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 随后进入 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s 循环, 共循环 35 次; 循环结束后, 60 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 最后在 4 $^{\circ}$ C 结束反应。

2.2 二温式 RT-PCR 特异性试验结果

该二温式 RT-PCR 可以对 3 个 TSV 广西地方毒株进行扩增, 并得到与预期大小一致的 231bp 的特异性扩增产物, 而 SPF 南美白对虾样品及 WSSV、IHHNV、弧菌等其它对虾病原体则无相同大小的特异性扩增产物出现, 结果为阴性 (-), 见图 1。

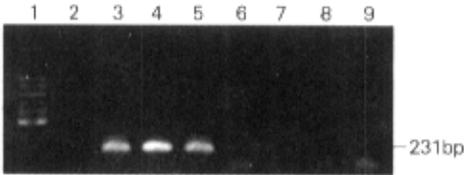


图1 TSV 二温式 PCR 特异性试验

Fig. 1 Specificity of two-temperature PCR for TSV

1. 100 bp DNA ladder marker; 2. 阴性对照; 3~5. 感染 TSV 的临床样品; 6. SPF 南美白对虾样品; 7. WSSV; 8. IHNV; 9. 弧菌

1. 100bp DNA ladder marker; 2. negative control; 3~5. TSV - infected clinical samples; 6. SPF *Penaeus vannamei*; 7. WSSV; 8. IHNV; 9. *Vibrio*

2.3 二温式 RT-PCR 敏感性试验结果

经测定, 该二温式 RT-PCR 最低能检测到 1pg 的 TSV 总 RNA 模板, 结果见图 2。

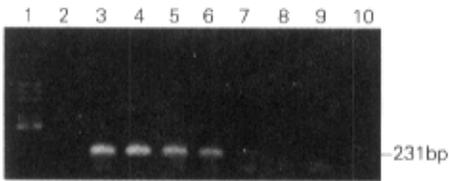


图2 TSV 二温式 RT-PCR 敏感性试验

Fig. 2 Sensitivity of two-temperature PCR for TSV

1. 100 bp DNA ladder marker; 2. 阴性对照; 3. 10 ng; 4. 1 ng; 5. 100 pg; 6. 10 pg; 7. 1 pg; 8. 100 fg; 9. 10 fg; 10. 1 fg

1. 100 bp DNA ladder marker; 2. negative control; 3. 10 ng; 4. 1 ng; 5. 100 pg; 6. 10 pg; 7. 1 pg; 8. 100 fg; 9. 10 fg; 10. 1 fg

2.4 二温式 RT-PCR 的临床检测试验

在所检测的 320 份临床样品中, 一共有 85 份检出 TSV 感染。

3 讨论

3.1 现代分子生物学检测技术在 TSV 防治上的意义

TSV 是当前引起广西沿海地区养殖对虾大量死亡的流行性病毒病之一。TSV 除了可以水平传播引起感染对虾直接死亡, 导致巨大的经济损失外, 还可以通过隐性感染亲虾垂直传播给下一代^[5]。该病目前尚未有有效药物治疗和预防。因此, 借助现代分子生物学检测技术对成虾和留种亲虾进行严格检疫, 这无论是对杜绝 TSV 水平传播, 还是对切断 TSV 垂直传播

途径, 建立无 TSV SPF 亲虾群, 无疑都具有很高的实用价值。

3.2 二温式 RT-PCR 的技术优势

二温式 RT-PCR 是根据现代分子生物学的 PCR 技术原理, 对常规三温式 RT-PCR 进行改进。常规三温式 RT-PCR 的循环参数包括变性、退火、延伸三个步骤; 在作者建立的二温式 RT-PCR 中, 退火和延伸在同一条件下进行, 其最佳温度为 60 °C, 比常规三温式 RT-PCR 的退火温度高, 由此相对提高了该二温式 RT-PCR 的特异性, 而且二温式 RT-PCR 耗时比常规三温式 RT-PCR 更短, 这也有利于提高疾病的诊断速度。

3.3 二温式 RT-PCR 在 TSV 防治和 SPF 亲虾群建立上具有重要意义

特异性试验结果表明, 作者所建立的二温式 RT-PCR 能对本实验室鉴定保存的 3 个 TSV 毒株进行特异性扩增, 而对对照的 SPF 南美白对虾组织样品及其它对虾病原体的扩增结果为阴性, 这说明了该 RT-PCR 技术在 TSV 的检测上具有高度的特异性, 可以用于对表面健康的带毒亲虾的 TSV 检疫。敏感性试验结果也显示, 该二温式 RT-PCR 最低可检测到 1pg 的 TSV RNA。如此高度的敏感性, 提示着该技术可用于 TSV 感染初期或潜伏期的亲虾、虾苗的检测和环境监测。因此, 本研究二温式 TSV RT-PCR 检测技术的建立, 对 TSV 的有效防治和培育出具有自主知识产权的 SPF 亲虾群都将具有重要意义。

3.4 二温式 RT-PCR 具有很高的临床实用性

作者对 320 份分别来自广西沿海不同对虾养殖场的对虾样品进行了检测, 结果其中有 85 份呈现 TSV 感染, 说明 TSV 在广西沿海地区养殖对虾中已呈现出区域性流行趋势, 另一方面也显示了在对虾病毒还无法像其它动物性病毒那样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, 建立具高度特异性和敏感性的二温式 TSV RT-PCR 检测技术, 在 TSV 的防治上已显得十分迫切与必要。

参考文献:

- [1] Lightner D V, Redman R M, Poulos B T, *et al.* Taura syndrome: etiology, pathology, hosts and geographic distribution, and detection methods[A]. NRA International Workshop. New Approaches to Viral Diseases of Aquatic Animals. Kyoto, Japan: National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Watarai, Mie 516-01, 1997. 190-

- 205.
- [2] Jimenez R. Sindrome de Taura (Resumen)[J]. **Acuaquil – tura Ecuador**, 1992(1): 1 – 16.
- [3] Lightner D V, Redman R M, Poulos B T, *et al.* Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp[J]. **Rev Sci Tech**, 1997, **16**(1): 146 – 160.
- [4] 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.
- [5] Rajendran K V, Vijayan K K, Santiago T C. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawn, crabs and lobsters from India[J]. **Journal of Fish Diseases**, 1999, **22**: 183 – 191.
- [6] 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.
- [7] 黄健, 杨丛海, 于佳. T – E 染色法用于对虾爆发性流行病的现场快速诊断[J]. **海洋科学**, 1995, **1**: 29 – 34.
- [8] 黄灿华, 张建红, 高玮, 等. 应用光镜和电镜对病虾组织细胞病理变化的观察与分析[J]. **中国病毒学**, 1997, **12**(4): 364 – 369.
- [9] 黄健, 蔡生力, 宋晓玲, 等. 对虾爆发性流行病病原的人工感染研究[J]. **海洋水产研究**, 1995, **16**(1): 1 – 10.
- [10] 涂小林, 钟江, 高双诚, 等. 中国对虾一种杆状病毒的 ELISA 检测方法[J]. **水产学报**, 1995, **19**: 315 – 321.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**[M], 2nd Ed. New York, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Two – temperature reverse transcription polymerase chain reaction (RT – PCR) for the detection of taura syndrome virus in *Penaeus vannamei*

PANG Yao – shan¹, XIE Zhi – xun¹, HE Jing – ming¹, DENG Xian – wen¹, MO You – qun²

(1. Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China; 2. Guangxi Ocean Research Institute, Beihai 536000, China)

Received: Jul., 2, 2003

Key words: *Penaeus vannamei*; Taura syndrome virus; two – temperature; RT – PCR

Abstract: A two – temperature RT – PCR was developed and optimized for the detection of Taura syndrome virus (TSV). Primers originated from the gene sequence of TSV. A TSV specific 231 – base pair (bp) cDNA product was amplified using primers from 3 field strains of TSV not from 3 other shrimp pathogenic virus and bacteria. Using the RT – PCR technique, TSV was detected in 85 of 320 clinical cultivated penaeid shrimps in Guangxi. Results demonstrated that this two – temperature RT – PCR could be used as a rapid and sensitive clinical detection method for the diagnosis of TSV.

(本文编辑:刘珊珊)