

真鲷虹彩病毒 LAMP 检测方法的建立

袁向芬, 石素婷, 吕继洲, 吴绍强

(中国检验检疫科学研究院动物检疫研究所, 北京 100176)

摘要: 为建立一种检测真鲷虹彩病毒的环介导等温扩增 (LAMP) 方法, 满足口岸、养殖场对该病的快速监测的需求, 本研究对比分析了 GenBank 中公布的真鲷虹彩病毒基因组序列, 筛选其主要衣壳蛋白 MCP 基因保守区序列, 进行 LAMP 引物设计, 建立了真鲷虹彩病毒 LAMP 检测方法。对扩增条件进行优化, 确定最佳反应条件为 62 °C, 45 min。灵敏度试验结果显示, 该方法最低检测限为 100 拷贝/μL 目的基因。特异性试验结果显示, 该方法不与流行性造血器官坏死病毒 (EHNV)、蛙病毒 3 型 (FV3)、甲鱼虹彩病毒 (STIV) 发生交叉反应。结果表明, 本研究建立的 LAMP 方法具有良好的敏感性和特异性。对 5 份疑似真鲷虹彩病毒感染的临床样品进行检测, 发现检测结果与世界动物卫生组织 (OIE) 推荐的 PCR 方法检测结果符合率为 100%。研究表明, 本方法具有灵敏度高、特异性强, 以及仪器设备简单、操作便捷、结果直观等优点, 非常适合作为初筛手段, 应用于养殖场、口岸等一线的疫病监测。

关键词: 水生动物疫病; 真鲷虹彩病毒; 环介导等温扩增; 快速检测

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2018) 01-0095-05

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.01.026

Establishment of LAMP for Detection of Red Sea Bream Iridovirus

Yuan Xiangfen, Shi Suting, Lü Jizhou, Wu Shaoqiang

(Institute of Animal Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

Abstract: To develop a Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method of Red sea bream iridovirus (RSIV) for rapid monitoring of the disease at port of entry and fishery, the RSIV genome sequence published in GenBank was compared and analyzed. The conservative region sequence of the main capsid protein MCP gene was screened out, the LAMP primers were designed, and LAMP for detection of RSIV was established. The conditions of amplification were optimized, and the best reaction condition was 62 °C, 45 min. Sensitivity test results showed that the minimum detection limit for this method was 100 copies/μL. Specific test results showed that this method did not cross reaction with EHNV, FV3 and STIV, with good sensitivity and specificity. By detection of 5 clinical samples, results showed that the coincidence rate of the test results with that of the PCR method recommended by OIE was 100%. This method was a rapid, simple, specific and sensitive assay with simple instruments and visualization results, which was suitable for being used as a screening method for monitoring diseases at ports and fish farms.

Key words: aquatic animal diseases; Red sea bream iridovirus; Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); rapid detection

真鲷虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus, RSIV) 属于虹彩病毒科 (*Iridoviridae*)、细胞肿大病病毒属 (*Megalocyttivirus*)^[1-2]。该病毒于 1990

年首次在日本四国岛的人工养殖患病真鲷中被发现^[3], 主要感染真鲷、花鲈、条石鲷等 30 余种海水鱼类^[4-5]。患病鱼类主要表现为昏睡、严重贫血、鳃上游瘀斑、脾肿大等症状。该病大多在自然界突然暴发, 难以治疗, 致死率高, 是目前对各国海水养殖危害最为严重的疾病之一^[6-8]。为此, 该病

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0501100); 国家科技支撑计划课题 (2013BAD12B01); 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目 (2015JK003)

通信作者: 吴绍强

被世界动物卫生组织（OIE）列入必检疫病名录，被我国列为二类疫病。韩国在实施的《水生动物疫病管理法》中要求入境的真鲷、牙鲆、大黄鱼、花鲈、条纹鲈等 35 种鱼类必须进行 RSIV 检验检疫^[9]。

考虑到 RSIV 的危害性，建立一种快速、高效、灵敏的现场检疫检测方法，对于该病的及时发现、防治手段的有效实施、疫情的迅速控制而言意义重大。然而目前，RSIV 的确诊方法，如病毒分离、免疫荧光等^[10-11]，由于缺乏合适的细胞培养系，以及免疫学检测范围窄且存在交叉反应现象，无法被广泛应用。常规 PCR、荧光 PCR 等分子检测方法^[12-14]，因需要昂贵仪器或电泳分析等后续操作，无法有效应用于口岸快速检测。鉴于以上不足，本研究以 RSIV MCP 基因保守区为模板，建立了一种环介导等温扩增方法（Loop-mediated isothermal amplification, LAMP），用于 RSIV 的检测。该方法快速、灵敏、特异，在简单的水浴恒温环境下，即可完成对靶基因的大量扩增，借助染料即可进行结果的可视化判定。本方法作为一种初筛手段，可大大增加口岸、养殖场的 RSIV 检疫效率，降低检疫工作中人员、时间等成本的投入。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒及样品 真鲷虹彩病毒（RSIV）、流行性造血器官坏死病毒（EHNV）、蛙病毒 3 型（FV3）、甲鱼虹彩病毒（STIV）：深圳出入境检验检疫局刘蕊研究员馈赠；真鲷虹彩病毒 MCP 基因阳性克隆质粒、5 份疑似 RSIV 阳性样品（鲈鱼）：本实验室保存。

1.1.2 试剂和仪器 DNeasy Blood & Tissue Kit DNA 提取试剂盒：购自凯杰（QIAGEN）生物工程有限公司；环介导等温扩增法 DNA 扩增试剂盒及环介导等温扩增实时浊度仪（LA-320c）：购自北京蓝谱生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品 对 RSIV、EHNV、FV3、STIV 等 4

种病毒细胞培养液及 5 份疑似 RSIV 阳性样品（鲈鱼），均按照 DNeasy Blood & Tissue Kit DNA 提取试剂盒操作手册，进行样品基因组 DNA 的提取，完成后置于 -20 °C 冰箱备用。将实验室保存的 RSIV MCP 基因阳性质粒进行浓度测定后，10 倍比稀释为 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、……、 1×10^1 copies/ μ L，然后将其作为标准样品置于 -20 °C 冰箱备用。

1.2.2 LAMP 引物设计 根据 Genbank 中 RSIV MCP 基因的保守区序列，进行 LAMP 引物设计；利用 Primer Explorer version 4.0 在线引物设计软件，设计多套 LAMP 引物。由英潍捷基（上海）贸易有限公司进行引物合成，并通过预实验进行比较筛选，最终确定 1 套 LAMP 引物（表 1）：外引物（RSIV-F3/RSIV-B3）、内引物（RSIV-FIP/RSIV-BIP）、环引物（RSIV-LF/RSIV-LB）。

表 1 RSIV-LAMP 引物设计

引物	种类	引物序列 (5'-3')
RSIV-F3	上游外引物	CAAGAATGTCACCTCACC CGCA
RSIV-B3	下游外引物	CACCATCCATCTCAGGCATG
RSIV-FIP	上游内引物	GCCAGCAAAGGCAGATTCACCTACGT-GCAAAGCAATTACACC
RSIV-BIP	下游内引物	TTACGAGAACCCTCGGCTAGGGG-TCGACAGATGTGA
RSIV-LF	上游环引物	CCACCAGATGGGAGTAGACTAC
RSIV-LB	下游环引物	TGTTGACATACACGGGACTGG

1.2.3 RSIV-LAMP 检测方法的建立 为实时监测不同反应条件下 LAMP 的进展情况，借助环介导等温扩增实时浊度仪 LA-320c，进行反应条件优化；在 Loopamp DNA Amplification Kit(RT-LAMP) 试剂盒（Eiken Chemical Co., Ltd, Tokyo, Japan）基础上，主要对反应的引物浓度、退火温度（60~65 °C）和反应时间进行优化。经过一系列优化，确定 RSIV-LAMP 方法的反应体系（25 μ L）为：RSIV-FIP 和 RSIV-BIP 各 40 pmol，RSIV-F3 和 RSIV-B3 各 5 pmol，RSIV-LF 和 RSIV-LP 各 20 pmol，2×Reaction Mix 12.5 μ L（Tris-HCl (pH 8.8) 40 mmol/L、KCl 20 mmol/L、MgSO₄ 16 mmol/L、(NH₄)₂SO₄ 20 mmol/L、Tween 20 0.2%、Betaine 1.6 mol/L、dNTPs 2.8 mmol/L），Enzyme 1.0 μ L，

核酸 DNA 2 μL 。另外，在反应液中加入 1 μL 荧光试剂 FDR (Eiken Chemical Co., Ltd, Tokyo, Japan)，进行反应结果的可视化判定。反应程序为：62 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下扩增 40 min；80 $^{\circ}\text{C}$ 酶灭活 5 min。既可在恒温水浴锅中进行，也可在金属浴及各种核酸扩增仪等仪器中进行。反应完成后，通过肉眼观察颜色变化即可判定反应阴阳性。

1.2.4 特异性及敏感性试验 用优化好的 LAMP 方法，对提取的 RSIV、EHNV、FV3、STIV DNA 进行检测，以验证所建方法的特异性；对 10 倍系列稀释的 RSIV 阳性质粒进行扩增，以验证所建方法的最低检测限。

1.2.5 样品检测 以提取的 5 份疑似 RSIV 阳性样品（鲈鱼）DNA 为模板，用所建 RSIV-LAMP 检测方法与 OIE 推荐的 PCR 检测方法^[15] 同时进行检测，并对检测结果进行比较。

2 结果

2.1 特异性试验

以提取的 RSIV、EHNV、FV3、STIV DNA 为模板，用优化好的方法进行 LAMP 扩增反应。结果显示，仅 RSIV 的扩增结果为阳性，其它 3 种病毒均未扩增，说明该方法具有良好的特异性，不与其它相似或同属病毒发生交叉反应（图 1）。

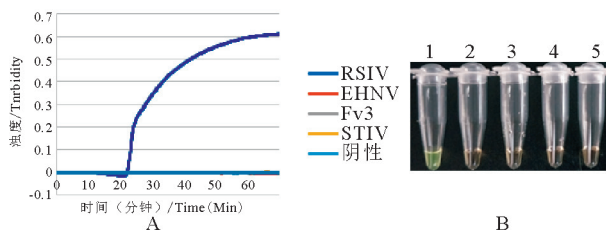


图 1 RSIV-LAMP 方法特异性试验
A: LAMP 实时浊度曲线; B: LAMP 可视化结果
1~4. 扩增模板分别为 RSIV、EHNV、FV3、STIV 基因组 DNA;
5. 阴性对照

2.2 敏感性试验

以 10 倍系列稀释的 RSIV MCP 基因阳性克隆质粒为模板，用优化好的方法进行 LAMP 扩增反应。结果显示，本方法的最低检测限为 1×10^2 copies/ μL ，可以满足临床样品检测的需要（图 2）。

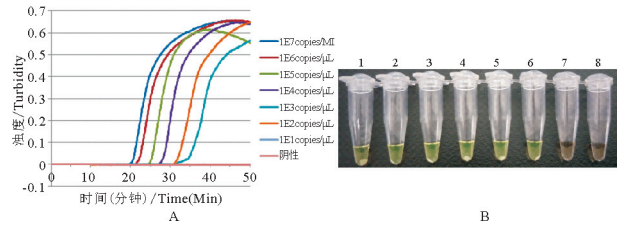


图 2 RSIV-LAMP 方法敏感性试验
A: LAMP 实时浊度曲线图; B: LAMP 可视化结果
1~7. 扩增模板浓度分别为 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、...、 1×10^1 copies/ μL 的阳性质粒; 8. 阴性对照

2.3 样品检测

用建立的 RSIV-LAMP 检测方法，对实验室保存的 5 份疑似 RSIV 阳性样品 DNA 进行检测，同时用 OIE 推荐的 RSIV-PCR 方法，对 5 份样品进行检测。检测结果显示，两种方法检测结果的符合率为 100%，均检测到 2 份阳性样品、3 份阴性样品（图 3）。

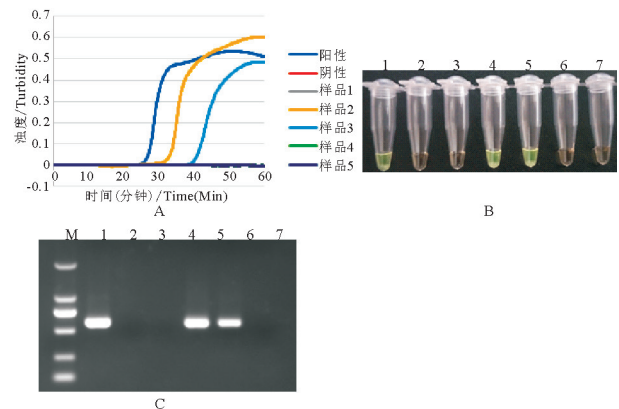


图 3 样品检测结果
A: LAMP 实时浊度曲线; B: LAMP 可视化结果;
C: OIE 推荐 PCR 方法检测结果
M. DL2000 DNA 分子量标准; 1. 阳性对照;
2. 阴性对照; 3~7. 样品 1~5 基因组

3 讨论

鉴于 RSIV 的高致病性、高致死率及分布的广泛性，世界各地在相关动物及产品的检疫中，对其检疫均较为严格。目前，口岸、养殖场等一线对该病的检测主要依赖 PCR 方法。原因在于 RSIV 血清学方法所需材料不易获得，存在交叉反应且操作较为冗长繁琐。而 PCR 方法仅需提取基因组后直接进行扩增，并运用琼脂糖凝胶电泳法即可进行结果判定。这大大减少了样品检测周期。然而，PCR 方法并不能完全满足在环境简单、缺乏专业人员条

件下大量临床样品的快检需求。

LAMP 方法自 2000 年被首次报道后, 因其具有灵敏度和特异性高、快速、便捷、易于操作等优点, 被广泛应用于动物疫病检疫工作中^[16-19]。该技术依赖于能够识别靶序列上 6 个特异性区域的引物和 1 种具有链置换特性的 DNA 聚合酶, 在简单的等温条件下即可实现靶序列的高效扩增^[20-21], 整个过程中, 对环境、仪器等条件的要求均较为简单, 特别适用于动物疫病的现场检疫。

本研究借助 LAMP 技术, 以 RSIV 高度保守的主要衣壳蛋白 (MCP) 基因为模板, 设计 LAMP 引物, 并通过一系列试验验证了本方法的敏感性、特异性及准确性。本方法可在简单的恒温水浴锅中 (62 °C) 进行反应, 反应时间仅需 45 min; 反应前向反应液中加入染料, 即可直接用肉眼对结果进行快速判定。用 OIE 推荐的 PCR 方法同时对样品进行检测, 发现检测结果与其一致。综上, 运用本方法可在 75 min 内完成对样品的 RSIV 检测 (包括核酸提取、LAMP 扩增、结果同步判定), 相比较 PCR 方法 (包括核酸提取、PCR 扩增、电泳) 可节约时间近 3 h。验证结果说明, 本方法在满足 RSIV 临床检测的同时, 还具备与 PCR 无法比拟的时间优势, 更适用于大量临床样品的快速初筛。综上, 运用本方法可在 75 min 内完成对样品的 RSIV 检测 (包括核酸提取、LAMP 扩增、结果同步判定), 相比较 PCR 方法 (包括核酸提取、PCR 扩增、电泳) 可节约时间近 3 h。验证结果说明, 本方法在满足 RSIV 临床检测的同时, 还具备与 PCR 无法比拟的时间优势, 更适用于大量临床样品的快速初筛。

4 结论

本研究通过一系列优化, 建立了基于 RSIV MCP 基因的 LAMP 技术。该技术具有良好的敏感性和特异性, 最低检测限可达 10^2 copies/ μ L, 且不与其它同属常见水生动物病毒发生交叉反应, 在临床样品快速初筛方面具有很大优势, 可为口岸、养殖场等一线的动物疫病检测, 提供有效的技术支持。

参考文献:

- [1] HOSSAIN M, SONG J Y, KITAMURA S I, et al. Phylogenetic analysis of Lymphocystis disease virus from tropical ornamental fish species based on a major capsid protein gene[J]. Journal of fish diseases, 2003, 31: 473-479.
- [2] NAKAJIMA K, KURITA J. Red sea bream iridoviral disease[J]. Uirusu, 2005, 55 (1): 115-126.
- [3] INOUE K, YOMANO K, MAENO Y, et al. Iridovirus infection of culture red sea bream, Pagrus major[J]. Fish pathology, 1992, 27 (1): 19-27.
- [4] NAKAJIMA K, INOUE K. Viral diseases in cultured Marine Fish in Japan[J]. Fish pathology, 1998, 33 (4): 181-188.
- [5] JUNG S J, OH M J. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, Oplegnathus fasciatus (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula[J]. Journal of fish diseases, 2000, 23 (3): 223-226.
- [6] 孟庆显, 俞开康. 海水养殖动物病害学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 54-55.
- [7] Office International Des Epizooties. Manual of diagnostic tests for aquatic animals[M]. 6th ed. Paris: OIE, 2009: 251-261.
- [8] KAWAKAMI H, NAKAJIMA K. Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1996 to 2000[J]. Fish pathology, 2002, 37 (1): 45-47.
- [9] 赵玉然, 谭乐义, 刘荭, 等. 真鲷虹彩病毒实时定量 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 渔业科学进展, 2011, 32 (2): 111-116.
- [10] OSEKO N, CHUAH T T, PALAMISAMY V, et al. Iridovirus isolated from diseased sea bass Lates calcarifer and red drum Sciaenops ocellatus causing mass mortality in Malaysia[R]. Penang: 7th Asian Fisheries Forum, 2004.
- [11] CHOU H Y, HSU C C, PENG T Y. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus sp.*) in Taiwan[J]. Fish pathology, 1998, 33 (4): 201-206.
- [12] KURITA J, NAKAJIMA K, HIRONO I, et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of Red sea bream iridovirus (RSIV) [J]. Fish

- pathology, 1998, 33 (1) : 17-23.
- [13] JEONG J B, PARK K H, KIM H Y, et al. Multiplex PCR for the diagnosis of Red sea bream iridoviruses isolated in Korea[J]. *Aquaculture*, 2004, 235 (1/2/3/4) : 139-152.
- [14] KIM Y J, JUNG S J, CHOI T J, et al. PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea[J]. *Journal of fish diseases*, 2002, 25 (2) : 121-124.
- [15] 赵玉然, 岳志芹, 谭乐义, 等. 山东沿海部分地区真鲷虹彩病毒病初步调查与分析[J]. *渔业科学进展*, 2011, 32 (6) : 31-36.
- [16] 鑫婷, 侯绍华, 贾红, 等. 猪呼吸与繁殖综合症病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2010, 43 (1) : 185-191.
- [17] TOMITA N, MORI Y, KANDA H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nature protocols*, 2008, 3 (5) : 877-882.
- [18] YIN S, SHANG Y, ZHOU G, et al. Development and evaluation of rapid detection of classical swine fever virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. *Journal of biotechnology*, 2010, 146 (4) : 147-150.
- [19] REDDY V, RAVI V, DESAI A, et al. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever[J]. *Journal of medical virology*, 2012, 84 (11) : 1771-1778.
- [20] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated-isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic acids research*, 2000, 28: e63.
- [21] 罗力涵, 张波. 环介导等温扩增技术及其在传染性疾病预防中的应用[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2014, 37 (1) : 68-71.

(责任编辑: 朱迪国)