

检测克氏原螯虾白斑综合征病毒 (WSSV) 的巢式 PCR 方法的建立与初步应用

李文杰, 周国勤, 朱菲莉, 王卫东, 周国平

(南京市水生动物疫病预防控制中心, 南京市水产科学研究所, 江苏 南京 210036)

[摘要] 根据 GenBank 中已发表的 3 株 WSSV 的 VP28 基因序列, 设计了 4 条特异性引物. 通过筛选最佳反应条件和试剂工作浓度, 建立了检测克氏原螯虾 WSSV 的巢式 PCR 方法. 该方法第一轮扩增的敏感性是 36 ng, 第二轮扩增的敏感性是 36 pg. 在对 9 份克氏原螯虾临床病料的巢式 PCR 检测中, 用引物 W_1 和 W_2 做第一轮扩增, 未检测到阳性病例; 用引物 S_1 和 S_2 做第二轮扩增, 检测到一例 WSSV 阳性病例. 以上结果表明: 对于检测克氏原螯虾 WSSV, 巢式 PCR 较一步 PCR 具有更高的检测灵敏度和应用前景.

[关键词] 白斑综合征病毒, 巢式 PCR, 克氏原螯虾

[中图分类号] S945.4 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)02-0098-05

Development and Potential Application of a Nested PCR for the Detection of White Spot Syndrome Virus in *Procambarus Clarkii*

Li Wenjie, Zhou Guoqin, Zhu Feili, Wang Weidong, Zhou Guoping

(Nanjing Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Diseases,
Nanjing Aquatic Sciences Institute, Nanjing 210036, China)

Abstract Four specific primer W_1 , W_2 , S_1 and S_2 , were designed according to the VP28 gene sequences of 3 white spot syndrome virus (WSSV) strains deposited in the GenBank. PCR detecting the VP28 gene of WSSV from *Procambarus clarkii* was established after selection of the optimal reaction conditions. Sensitivity of the first and second amplifications by the nested PCR was 36 ng and 36 pg respectively. Among 9 clinical *Procambarus clarkii* samples to be tested by nested PCR, there was no positive case detected by the first PCR amplifications with primers W_1 and W_2 , and one WSSV positive case detected by the second PCR amplifications with primers S_1 and S_2 . The results showed that the nested PCR established by this study was much more suitable than the one step PCR for the detection of WSSV in *Procambarus clarkii*.

Key words white spot syndrome virus, nested PCR, *Procambarus clarkii*

白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 病是引起养殖对虾大批量死亡的暴发性传染病, 其主要特征是以感染对虾甲壳内侧出现白色斑点, 曾对全球对虾养殖业产生重大打击^[1-3]. 克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 是 WSSV 的易感宿主之一, 国内外学者常将其用作对虾病毒增殖、药物筛选和免疫反应等方面的实验动物模型^[4, 5]. 2007 年 5 月, 美国国家兽医局实验室 (NVSL) 报道了在路易斯安那州养殖克氏原螯虾与天然克氏原螯虾中检测到 WSSV^[6]. 以上证据表明, 随着我们大力发展克氏原螯虾养殖的同时, 必须及时防范来自 WSSV 的威胁, 避免重蹈对虾养殖业的覆辙. 鉴于迄今为止还没有能够控制 WSSV 疫情的有效措施, 国内外学者普遍认为只能进行综合预防, 其中最重要的措施是尽早发现和消灭传染源, 切断传播途径, 因此, 需要建立灵敏、准确、快捷、方便的检测方法.

目前对 WSSV 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^[7-10]. 其中 PCR 方法具有灵敏度高、特异性强、操作简便和快速等特点, 已广泛应用于 WSSV 的检测.

收稿日期: 2008-11-19

基金项目: 南京市水产专项资金 (2008) 资助项目.

通讯联系人: 周国勤, 高级工程师, 研究方向: 水生动物疫病防治. E-mail: xlfish@vip.sina.com

1 材料与方 法

1.1 毒株及临床样品

克氏原螯虾 WSSV 阳性病料由江苏省淡水水产研究所薛辉博士馈赠,9 份临床样品采自南京地区不同克氏原螯虾养殖场,采集后置于 -40°C 保存备用。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶(含 $10\times$ Buffer)、dNTPs、蛋白酶 K 购自大连宝生物(TaKaRa)公司,100 bp DNA Marker 购自 GenScript 公司,Agarose 为 ENGLAND 产品,SDS 购自 Sigma 公司,GoldView Ⅰ 型核酸电泳染料购自北京博大泰克公司,其他化学试剂如酚、氯仿、异戊醇、乙醇、NaCl 等,均为国产分析纯产品。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 发表的 3 株 WSSV 全基因序列(中国厦门株:AF332093 中国台湾株:AF440570 泰国株:AF369029),应用 DNASTar 软件比较其 VP28 基因的同源性,发现其同源性为 100%,表明这段基因是保守的。应用 Primer premier 5.0 软件在 VP28 基因上设计 2 对巢式 PCR 引物,其中外引物 W_1 、 W_2 扩增片段为 602 bp 内引物 S_1 、 S_2 扩增片段为 379 bp 引物序列如下:

外引物: W_1 : 5'-TTTCTTTCACCTCTTTGGTTCG-3'
 W_2 : 5'-GGTCTCAGTGCCAGAGTAGGT-3'
 内引物: S_1 : 5'-GTGACCAAGACCATCGAAACC-3'
 S_2 : 5'-TGAAGGAGGAGGTGTTGAG-3'

引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成,用灭菌超纯水配成 $25\text{ }\mu\text{mol}/\mu\text{L}$, -20°C 保存备用。

1.4 样品 DNA 提取

取虾头部的鳃丝、肝、胰腺等组织,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 1:5(g/mL)研磨匀浆,反复冻融 3 次,离心取上清液 $500\text{ }\mu\text{L}$,按终浓度为 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 胃蛋白酶 K、1% SDS 58°C 消化 30 min 再用等体积的酚:氯仿(1:1)抽提组织中的总 DNA,最后用 2 倍体积的冷无水乙醇沉淀 DNA,并将 DNA 溶解在 $20\text{ }\mu\text{L}$ pH 7.5 TE (Tris-Cl 10 mmol/L , EDTA 1 mmol/L)缓冲液中, -20°C 保存备用。

1.5 巢式 PCR 反应体系的优化和建立

巢式 PCR 的两轮 PCR 反应都是 $25\text{ }\mu\text{L}$ 体系,分别对引物浓度 (1.0 1.5 2.0 $2.5\text{ }\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)、 Mg^{2+} 浓度 (2.0 2.5 3.0 3.5 mmol/L)、dNTPs 浓度 (0.10 0.15 0.20 0.25 mmol/L)、退火温度 (54°C 、 55°C 、 55.9°C 、 57.1°C 、 58°C 、 59°C)等反应条件进行摸索,建立稳定的巢式 PCR 反应体系,并对此反应体系进行了 4 个重复,检测其稳定性。

1.6 第一轮 PCR 的反应产物的最佳稀释度

在巢式 PCR 中,第一轮 PCR 反应的产物为第二轮 PCR 的模板,由于第一轮 PCR 反应的产物中有残留的外引物,如果直接取第一轮 PCR 的反应产物,可能会产生非特异性的杂条带,影响第二轮 PCR 反应体系条件优化的判断。为了顺利进行第二轮 PCR 反应体系条件的优化,本研究对第一轮 PCR 的反应产物进行了 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍的梯度稀释,为第二轮 PCR 反应条件优化选择合适的 DNA 模板浓度。

1.7 巢式 PCR 扩增的灵敏性测定和特异性试验

根据生物分光光度计测定模板 DNA 的浓度,将所提取的 DNA 依次做 10 倍梯度稀释,每个稀释度取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 为模板,用外引物 W_1 和 W_2 进行第一轮 PCR 扩增,反应结束后进行凝胶电泳检测。以第一轮 PCR 反应为模板,以 S_1 和 S_2 为内引物进行第二轮 PCR 扩增,反应结束后进行凝胶电泳检测。在特异性试验方面,在巢式 PCR 反应过程中设置空白对照、阳性对照、健康虾对照,检测其特异性。

1.8 临床样品检测

应用巢式 PCR 方法对 9 份采自南京地区不同养殖场的克氏原螯虾样品进行检测。

2 结果与分析

2.1 巢式 PCR 反应体系条件的优化

通过对引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度和退火温度等几个单因子试验,确立了巢式 PCR 反应的各个

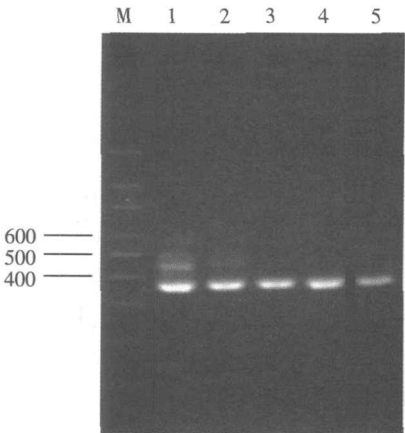
参数, 第一轮和第二轮 PCR 反应体系均为 25 μ L 体系, 其中 10 \times R eaction buffer 2. 5 μ L, M gCl₂ (25mm ol/L) 2. 5 μ L, dNTPs (2. 5mm ol/L) 2 μ L, 上游引物和下游引物 (25 μ mol/ μ L) 各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 0. 5 μ L, 灭菌超纯水加至 25 μ L 反应程序如下: 先在 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 m in 之后在 94 $^{\circ}$ C 30 s 55 $^{\circ}$ C 30 s 72 $^{\circ}$ C 50 s 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 m in 取 3 μ L 产物在 1. 2% 的琼脂糖凝胶上电泳, GoldV iew na I 型核酸电泳染料染色, 用凝胶成像系统观察拍照. 通过 4 次重复性试验, 都取得一致结果, 表明该反应体系很稳定.

2. 2 第一轮 PCR 的反应产物的最佳稀释度

对第一轮 PCR 的反应产物进行 10¹、10²、10³、10⁴ 倍的梯度稀释, 然后各取 1 μ L, 进行第二轮 PCR 反应, 扩增结果见图 1 未稀释和作 10 倍稀释均出现了非特异性杂条带, 以 10² 和 10³ 倍稀释为最佳稀释倍数, 本研究选择以第一轮 PCR 产物的 10² 倍稀释液为第二轮 PCR 反应体系条件优化的 DNA 模板.

2. 3 巢式 PCR 扩增的灵敏性测定和特异性试验

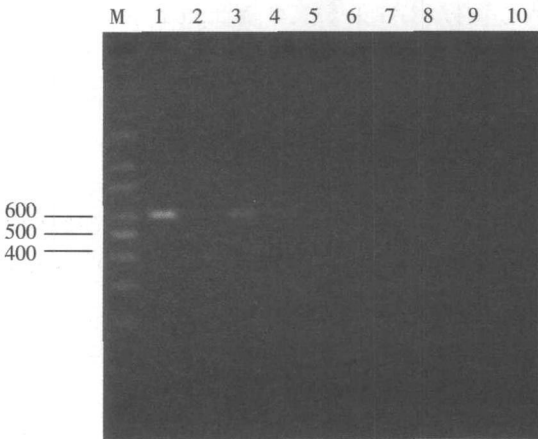
根据分光光度计测定模板 DNA 的浓度为 3. 6 μ g/ μ L, 将所提取的 DNA 依次作 10 倍梯度稀释, 然后每个稀释度取 1 μ L 为模板, 用外引物 W₁ 和 W₂ 进行第一轮 PCR 扩增, 反应结束后进行凝胶电泳检测 (图 2), 从图 2 可以看出第一轮 PCR 扩增的敏感性为 36 ng 对泳道 1、3、4 等出现目的条带的 PCR 反应产物作 10² 倍稀释, 作为第二轮 PCR 反应的模板; 其余没有出现目的条带的 PCR 反应产物直接作为第二轮 PCR 反应的模板. 以 S₁ 和 S₂ 为内引物进行扩增, 反应结束后进行凝胶电泳检测 (图 3). 从图 3 可以看出, 泳道 1、3、4 的第二轮 PCR 扩增无非特异性杂条带出现, 且目的条带正常; 同时显示第二轮 PCR 扩增的敏感性为 36 pg 其扩增的敏感性提高了 1 000 倍.



M:100 bp DNA Marker, 1: 10⁰-fold dilution, 2: 10¹-fold dilution, 3: 10²-fold dilution, 4: 10³-fold dilution, 5: 10⁴-fold dilution

图 1 第一轮 PCR 产物 10 倍梯度稀释

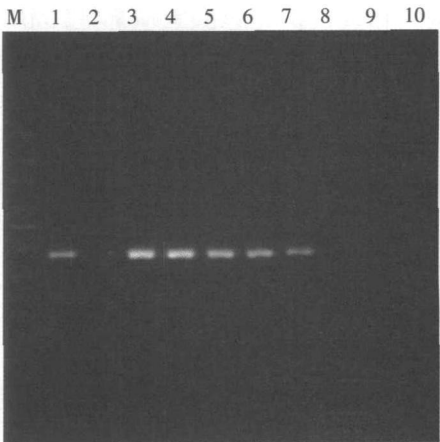
Fig.1 10-fold series dilutions of the first PCR production



M:100 bp DNA Marker, 1: 3.6 μ g, 2: Blank control, 3: 0.36 μ g, 4: 36 ng, 5: 3.6 ng, 6: 0.36 ng, 7: 36 pg, 8: 3.6 pg, 9: 0.36 pg, 10: 36 fg

图 2 第一轮 PCR 扩增的敏感性检测

Fig.2 Sensitivity analysis of the first PCR assay

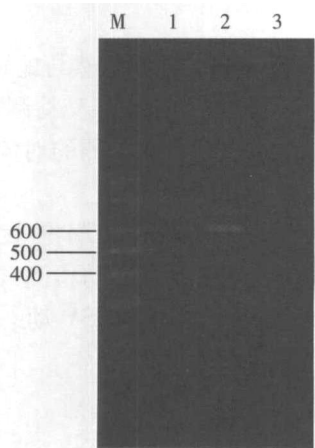


M:100 bp DNA Marker, 1: 3.6 μ g, 2: Blank control, 3: 0.36 μ g, 4: 36 ng, 5: 3.6 ng, 6: 0.36 ng, 7: 36 pg, 8: 3.6 pg, 9: 0.36 pg, 10: 36 fg

图 3 第二轮 PCR 扩增的敏感性检测

Fig.3 Sensitivity analysis of the second PCR assay

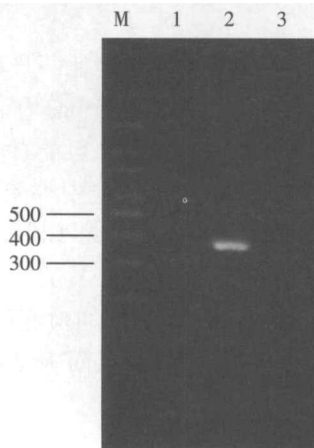
在特异性试验方面, 设置空白对照、阳性对照、健康虾对照进行巢式 PCR 反应, 结果见图 4 图 5 试验结果表明: 本方法设计的两对引物不能和虾组织的 DNA 反应, 但和虾类其它病毒是否有非特异性反应, 还需进一步证实.



M: 100 bp DNA Marker,
1: Blank control, 2: Positive control, 3: Negative control

图 4 第一轮 PCR 扩增的特异性检测

Fig.4 Specific analysis of the first PCR assay



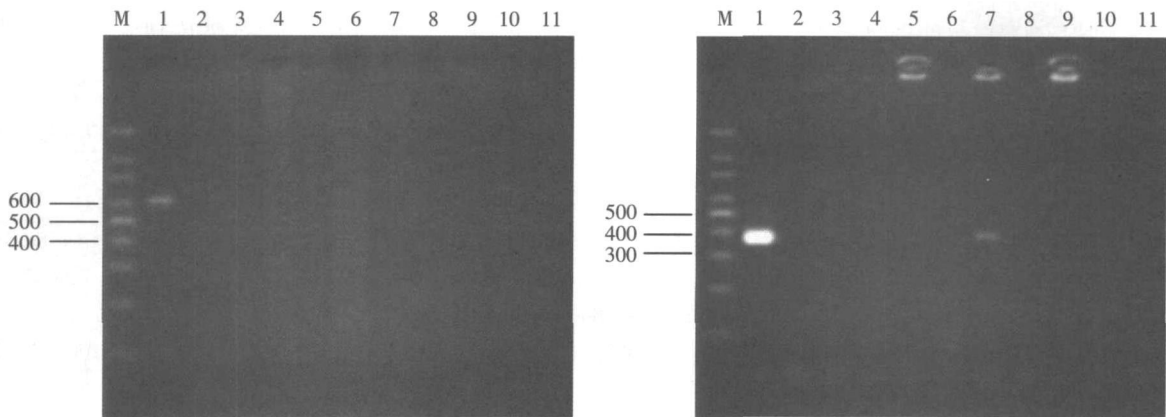
M: 100 bp DNA Marker,
1: Blank control, 2: Positive control, 3: Negative control

图 5 第二轮 PCR 扩增的特异性检测

Fig.5 Specific analysis of the second PCR assay

2. 4 临床样品检测

应用巢式 PCR 方法, 对南京地区采集的 9 份克氏原螯虾样品进行检测, 在第一轮 PCR 反应中未检测到 WSSV 阳性病例, 在第二轮 PCR 反应中检测出 1 例 WSSV 阳性病例. 具体结果见图 6



M: 100 bp DNA Marker, 1: Positive control, 2: Negative control, 3~11: the clinical samples

图 6 临床样品的巢式 PCR 检测结果

Fig.6 Detection of the clinical samples by nested PCR assay

3 讨论

巢式 PCR 技术已广泛应用于 WSSV 的检测. 谢数涛等^[11]应用巢式 PCR, 对纯化的 WSSV 及患白斑症的对虾均能扩增出预期大小的 DNA 片段, 而对健康斑节对虾的扩增结果为阴性. Hossain 等^[12]用巢式 PCR 在淡水罗氏沼虾体内检测到了 WSSV. 本文通过对已发表的 3 株 WSSV 的 VP28 基因同源性比较, 设计两对特异性引物, 建立了新的巢式 PCR 方法, 并且在养殖的克氏原螯虾体内检测到了 WSSV, 显示出良好的检测效果.

第一轮 PCR 反应产物如何作为第二轮 PCR 的模板, 笔者在巢式 PCR 条件摸索过程中曾经直接用第一轮 PCR 反应产物作为模板, 结果第二轮 PCR 有非特异性条带, 究其原因, 是因为第一轮 PCR 产物中有残留的外引物 W_1 、 W_2 , 因其还有一定的浓度, 具有一定的竞争性, W_1 、 W_2 会继续扩增 602 bp 大小的条带, 同时以 W_1 、 S_2 、 S_1 、 W_2 间出现错配, W_1 、 S_2 扩增的条带预测为 448 bp, S_1 、 W_2 扩增的条带预测为 492 bp. 从图 1 的泳道 1、2 看, 结果与预测一致. 因此, 只有对第一轮 PCR 产物进行稀释, 降低 W_1 、 W_2 竞争性. 当然, 在实际检测样品中, 如第一轮 PCR 显示阳性, 就没必要进行第二轮 PCR, 但是在建立巢式 PCR 的过程中, 为了第二轮 PCR 条件的摸索提供合适的 DNA 模板, 需要预先做个 10 倍梯度稀释试验, 以确定最佳稀

释度.

本次建立的巢式 PCR 的灵敏度比一步 PCR 提高了 1 000 倍, 检测限达到 36 pg 虽然与庞耀珊^[13]等的建立二温式 PCR 检测方法的极限 (1 pg) 有一定差距, 但是与朱建中^[14]等建立的斑点杂交检测方法的极限 (10 pg) 在同一个数量级, 究其原因, 可能有两个, 一是检测方法本身存在差异; 二是检测的对象不一样, 庞耀珊等检测对象是南美白对虾, 朱建中等和本次研究检测的对象是克氏原螯虾.

从临床样品的检测结果看, 一步 PCR 检测方法由于受到灵敏度的限制, 极易造成漏检. 因此, 本研究建立的巢式 PCR 方法更适宜于 WSSV 的检测, 特别是对克氏原螯虾感染早期和中期的检测. 同时该方法可以应用于克氏原螯虾亲本、苗种的检测筛选, 以及在克氏原螯虾养殖过程中的 WSSV 动态监测, 减少 WSSV 对克氏原螯虾的感染几率, 从而确保克氏原螯虾养殖业的健康发展.

[参考文献]

- [1] 蔡生力, 黄健, 王崇明, 等. 1993~1994 年对虾暴发病的流行病学研究 [J]. 水产学报, 1995, 13(2): 112-117.
- [2] Inouye K, Miwa S, Oseko N, et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus [J]. Fish Pathology, 1994, 29(2): 149-158.
- [3] Lightner D V, Redman R M, Pouls 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): 146-60.
- [4] 朱建中, 陆承平. 对虾白斑综合征病毒在螯虾动物模型的感染特性 [J]. 水产学报, 2001, 10(1): 47-51.
- [5] 朱建中, 陆承平. 用动物模型检验消毒剂对对虾白斑综合征病毒的灭活效果 [J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(2): 6-7.
- [6] Veterinary Services Centers for Epidemiology and Animal Health. CEI Impact Worksheet White Spot Disease Louisiana USA [OL/R]. [2007-03-16]. http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/taf/w_2007_files/WSDUS_LA2007/wsd_us_la_05_17_07.pdf
- [7] 黄捷, 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学 [J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 1-10.
- [8] 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(4): 315-321.
- [9] 吕玲, 何建国, 邓敏, 等. 核酸探针原位杂交检测白斑综合症病毒的组织特异性 [J]. 热带海洋, 2000, 19(4): 86-91.
- [10] Otta S K, Karunasagar I. Detection of monodon baculovirus and white spot syndrome virus in apparently healthy *Penaeus monodon* postlarvae from India by polymerase chain reaction [J]. Aquaculture, 2003, 220(1/4): 59-67.
- [11] 谢树涛, 何建国, 杨晓明, 等. 套式 PCR 检测斑节对虾白斑症病毒 (WSSV) [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(3): 220-224.
- [12] Hossain M S, Chakraborty A, Joseph B, et al. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction [J]. Aquaculture, 2001, 198(1/2): 1-11.
- [13] 庞耀珊, 谢芝勋, 谢志勤, 等. 二温式 PCR 检测对虾白斑综合征病毒 [J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(4): 43-45.
- [14] 朱建中, 夏晓勤, 陆承平, 等. 斑点杂交检测对虾白斑综合征病毒青岛株在螯虾体内的动态分布 [J]. 中国病毒学, 2001, 16(1): 92-95.

[责任编辑: 孙德泉]