

不同试剂盒检测锦鲤疱疹病毒 效果比较

李 敏 黄炳炽 彭家杰 胡健声 洪伟彬 莫钻兰 黄洁莹

广东省东莞市动物疫病预防控制中心, 广东东莞 523000

摘要 为提升实验室对锦鲤疱疹病毒病(koi herpes virus disease, KHVD)病原检测的能力,加强水生动物防疫系统实验室能力建设,本实验室参加了2020年由全国水产技术推广总站组织的锦鲤疱疹病毒病原检测能力测试。按照中国检验检疫科学研究院下发的《能力测试作业指导书》,结合水产行业标准《鲤疱疹病毒检测方法第1部分:锦鲤疱疹病毒》(SC/T 7212.1-2011)对样品进行鉴定,检测结果为满意。另外,本实验室选用3种商品化的锦鲤疱疹病毒实时荧光定量PCR检测试剂盒(A、B、C),以本次参测盲样为样品进行了试剂比对,试验结果表明:只有A与作业指导书要求的《SC/T 7212.1-2011》检测结果完全相同,B和C均未检测出阳性盲样。

关键词 锦鲤疱疹病毒;检测;能力测试;试剂盒

锦鲤疱疹病毒病,是由锦鲤疱疹病毒(*Koi herpesvirus*, KHV)所引起的致死率80%~100%的流行性疾病,仅感染锦鲤、鲤及其变种^[1-4]。该病被我国列在《一、二、三类动物疫病病种名录》中的二类疫病,世界动物卫生组织(OIE)将其列为必须申报的疫病^[5]。1998年,该病首次由德国和以色列学者发现,中国香港于2001年发生首例,随后在印度尼西亚、日本等东南亚国家相继发生,现已流行于世界各地^[6-7]。

水产行标《SC/T 7212.1-2011》作为此次锦鲤疱疹病毒病原检测能力测试的依据和实验室检测的主要方法,属于传统聚合酶链式反应(PCR),具有灵敏度高、准确率高等优点,但在实际应用中,需要TK、Sph基因PCR、电泳和产物测序,存在检测时间长、操作繁琐且易污染、不能准确定量等问题。荧光定量PCR检测耗时短、操作简便、能定量等优点被广泛应用于病原体检测^[8-10],越来越多商品化的荧光定量PCR试剂盒被研发出来。因此,本试验拟通过此次病原检测能力测试的样本来验证不同厂家生产的试剂盒的性能。

1 材料与方法

1.1 材 料

1) 样品。样品编号为K34-1、K34-2、K34-3、K34-4,由中国检验检疫科学研究院提供,4份样品均为鱼内脏组织匀浆上清样品,采用冻存管包装。本次试验使用的阳性标准物质由中国检验检疫科学研究院提供。

2) 试剂。海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(批号:S8107)、PCR MasterMix(批号:KT201-02)购自天根公司;引物(批号:211044344)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;DL1000 DNA Marker(批号:ATG1607A)购自TaKaRa;50×TAE(批号:690674223)、gelred核酸染料(批号:BS354B)购自biosharp;琼脂糖(批号:E24567B127)购自biofroxx;3种商品化的锦鲤疱疹病毒实时荧光PCR检测试剂盒分别来自不同生产厂家,用A(批号:200603)、B(批号:67052)、C(批号:JC0069202006)来代替。

3) 仪器设备。生物安全柜、梯度PCR仪、水平电泳系统、凝胶成像仪、荧光PCR仪、实时荧光定量PCR仪。

收稿日期:2021-03-05

李 敏,女,1982年生,硕士,工程师。

1.2 方法

1) 采用本次能力测试要求的方法检测。按照中国检验检疫科学研究院下发的《能力测试作业指导书》，结合水产行业标准《鲤疱疹病毒检测方法第 1 部分：锦鲤疱疹病毒》(SC/T 7212.1-2011) 进行试验及鉴定。

①核酸提取。参照天根 DNA 提取试剂盒的说明书提取 KHV 核酸。

②PCR 反应。试验所需的 KHV TK 基因、Sph 基因所需的特异性引物，由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，根据实际用灭菌水稀释成 10 mmol/L 储藏液，-20 °C 保存备用，引物序列和反应程序见表 1。按 PCR MasterMix 说明书标示的反应体系配制

反应液，分装到 0.2 mL PCR 管，分别加入相应体积的阴性对照、待检样品和阳性对照，做好记录。混匀后离心，进行 PCR 扩增反应，阳性标准物质由中国检验检疫科学研究院提供。

③琼脂糖凝胶电泳。凝胶用 1×TAE 电泳缓冲液配制 0.01% 的琼脂糖(含 10 000*superRed 核酸染料)平板，凝固后放入水平电泳槽，使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将上述 5 μL PCR 产物加入点样孔，使用 DNA 1 000 作对照。110 V 电泳约 25 min，放置凝胶成像仪中观察电泳片段的数量和位置。

④核酸测序。将 KHV TK 基因、Sph 基因 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

表 1 KHV PCR 检测所需的引物、反应程序

病毒	基因	引物	序列(5'→3')	反应程序	片段大小/bp
KHV	TK 基因	P1	5'-GGGTTACCTGTACGAG-3'	94 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 51 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 40 次循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保温	409
		P2	5'-CACCCAGTAGATTATGC-3'		
	Sph 基因	P3	5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3'	94 °C 预变性 30 s; 94 °C 变性 30 s, 63 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 次循环; 72 °C 延伸 7 min; 4 °C 保温	292
		P4	5'-GACACATGTTACAATGCTCGC-3'		

表 2 不同试剂盒的反应体系、反应时间、试验成立和结果判定标准

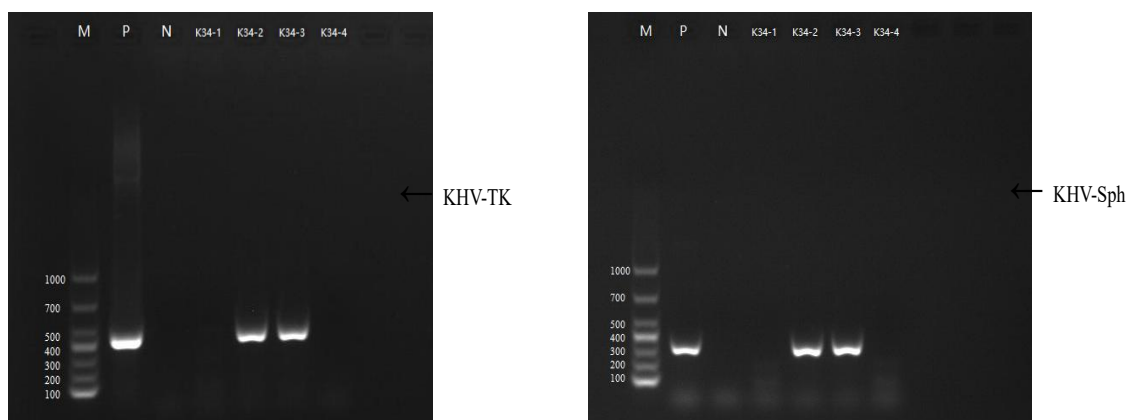
试剂	反应体系/μL	反应时间/min	质量控制	结果判定
A	20+5	65	阳性对照: Ct 值 ≤ 30 且在 FAM、HEX/VIC 均有典型扩增曲线; 阴性对照无扩增曲线或 Ct 值为 0	Ct 值 > 40 或在 FAM 或 HEX/VIC 通道无典型的扩增曲线, 阴性; Ct 值 ≤ 35 且在 FAM 通道有典型扩增曲线, 鲤疱疹病毒 II 型阳性; Ct 值 ≤ 35 且在 HEX/VIC 通道有典型扩增曲线, 锦鲤疱疹病毒(鲤疱疹病毒 III 型) 阳性; 35 < Ct 值 ≤ 40 且在 FAM 或 HEX/VIC 通道有扩增曲线为可疑, 重新检测后仍可疑, 则判定为对应通道的阳性
B	23+2	63	阳性对照: Ct 值 ≤ 30 且有扩增曲线; 阴性对照无典型 S 型扩增曲线或无 Ct 值	Ct 值 ≤ 35 且有扩增曲线, 阳性; 无 Ct 值且无扩增曲线, 阴性; 35 < Ct 值 < 37, 可疑, 重新检测后, 仍可疑为阳性
C	23+2	53	阳性对照: 有扩增曲线; 阴性对照为平滑直线	Ct 值 ≤ 32 且有扩增曲线, 阳性; 无 Ct 值且无扩增曲线, 阴性; 32 < Ct 值 < 40, 可疑, 重新检测后, 仍可疑, 为阳性; 否则为阴性

2) 商品化的锦鲤疱疹病毒实时荧光定量 PCR 检测。以本次参测盲样为样品，从市场上选取 3 家不同厂家生产的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒检测(由 A、B、C 代替)进行试验与分析，3 种试剂盒的试验成立标

准、结果判定标准各不相同(详见表 2)。按照各自试剂盒说明书配置荧光 PCR 反应体系，依次加入阴性对照、样品核酸和阳性对照，加样后及时盖紧管盖，做好标记，混匀后离心，按照各自的反应程序扩增。

表 3 PCR 产物的测序结果

样品	基因	测序结果	同源性/%	GenBank 登录的 KHV 基因
K34-2	TK 基因	TGGCCCGAAGGATCGACGCCGTGGCCGTCGACGAGGGACAGTTCTTCCCGACCTC TACGAGGGAGTCTGTCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTACGTGATCGTGCCGGCGCT GGACGGGGACTTTATGCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGCGTTGGTGCCCATGG CGGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGCAAGATGCGCGACGC ACCTTTCACCGTCAGAATCTCTCAGGGCAGGACCTGCTCCAGCTTGGAGGCGCCG AGTCTTACCAGGCGGTGTGTCTGCTCCCTGTCTCACGGGGTTCAGGATGGCCCAGTACC AGCTGTACGGTCCGCCGCTCCTCTCGCGATAATCTACTGGGTGA	99	
	Sph 基因	GATCTGCCGCTCGAGGGACATCTCAGCAACACCTACCACAGCACGTGCCCGCAGTG CAGGGACCCGAGCATCGTGGGTTCCAGACCATGGACCTCGCATACGCGCTCGAGG ACCGCTACAAGAGCCTCTTCAAGCTGACGCCGCAACAGTCCGAGTCGTTCAAGAAAG CACATACTGCGGTGAGACGACGGCGAGGCCGACGGCACGGGAAACCTCCGCA ACCTCCCAACATTGATGCGACCATTGTAACATGTGTC	99	
K34-3	TK 基因	GCGCTGAGGATCGACGCCGTGGCCGTCGACGAGGGACAGTTCTTCCCGACCTCT ACGAGGGAGTCTGTCAGCTGCTGACCGCGGGCAAGTACGTGATCGTGCCGGCGCTG GACGGGGACTTTATGCAGCAGCCCTTCAAGCAGGTGACGGCGTTGGTGCCCATGGC GGACAAGCTGGACAAGCTGACGGCGGTGTGCATGAAGTGCAAGATGCGCGACGCA CCCTTTCACCGTCAGAATCTCTCAGGGCAGGACCTGCTCCAGCTTGGAGGCGCCGA GTCTTACCAGGCGGTGTGTCTGCTCCCTGTCTCACGGGGTTCAGGATGGCCCAGTACGA GCTGTACGGTCCGCCGCTCCTCTCGCGATAATCTACTGGGTG	99	MG925491.1
	Sph 基因	CCGTTACCTGCCGCTCAGAGGGACATCTCAGCAACACCTACCACAGCACGTGCCCG CAGTGCAGGGACCCGAGCATCGTGGGTTCCAGACCATGGACCTCGCATACGCGCT CGAGGACCCGCTACAAGAGCCTCTTCAAGCTGACGCCGCAACAGTCCGAGTCGTTCA AGAAGCACATACTGCGGTGAGACGACGGCGAGGCCGACGGCACGGGAAACCT CCGCAACCTCCCAACATTGATGCGACCATTGTAACATGTGTC	99	



注: M 为 DL 1000 DNA Marker; P 为阳性对照; N 为阴性对照; K34-1~K34-4 为待测样本。

图 1 PCR 产物电泳图谱

2 结果与分析

按照中国检验检疫科学研究院下发的《能力测试作业指导书》,结合水产行业标准《鲤疱疹病毒检

测方法第 1 部分:锦鲤疱疹病毒》(SC/T 7212.1-2011)对样品进行检测。检测结果显示:样品 K34-2、K34-3 为 KHV 核酸阳性,样品 K34-1 和 K34-4 核酸阴性,检测结果为满意。

2.1 按本次能力测试要求的方法检测的结果

如图 1 所示:样品 K34-2、K34-3 的 *TK*、*Sph* 基因的 PCR 产物分别出现了 409 bp 片段和 292 bp 片段,并将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序同源性比对表明:该基因序列与 Genbank 登录的鲤疱疹病毒 3 型 T 链的全基因序列 MG925491.1 有 99% 的同源性(表 3)。样品 K34-1 和 K34-4 未出现 DNA 片段。样品 K34-1 和 K34-3 的 *TK* 基因和 *Sph* 基因根据《鲤疱疹病毒检测方法 SC/7212.1-2011》综合判定:测试样品 k34-2 和 k34-

3 均为 KHV 阳性。

2.2 商品化的锦鲤疱疹病毒实时荧光 qPCR 结果

各试验阴、阳对照符合说明书的试剂成立标准,试验均成立。试验发现:B、C 试剂未检出阳性样品;A 试剂的扩增曲线图中呈现 2 条阳性对照扩增曲线,其中,一条扩增曲线为 KHV 阳性对照,另一条扩增曲线为 CyHV-2(鲤疱疹病毒)阳性对照,A 试剂检测出 K34-2 和 K34-3 这两条扩增曲线,其 Ct 值分别为 19.84、19.57,因此可判 K34-2 和 K34-3 为 KHV 核酸阳性。A 试剂检测的结果与能力测试结果一致(图 2)。

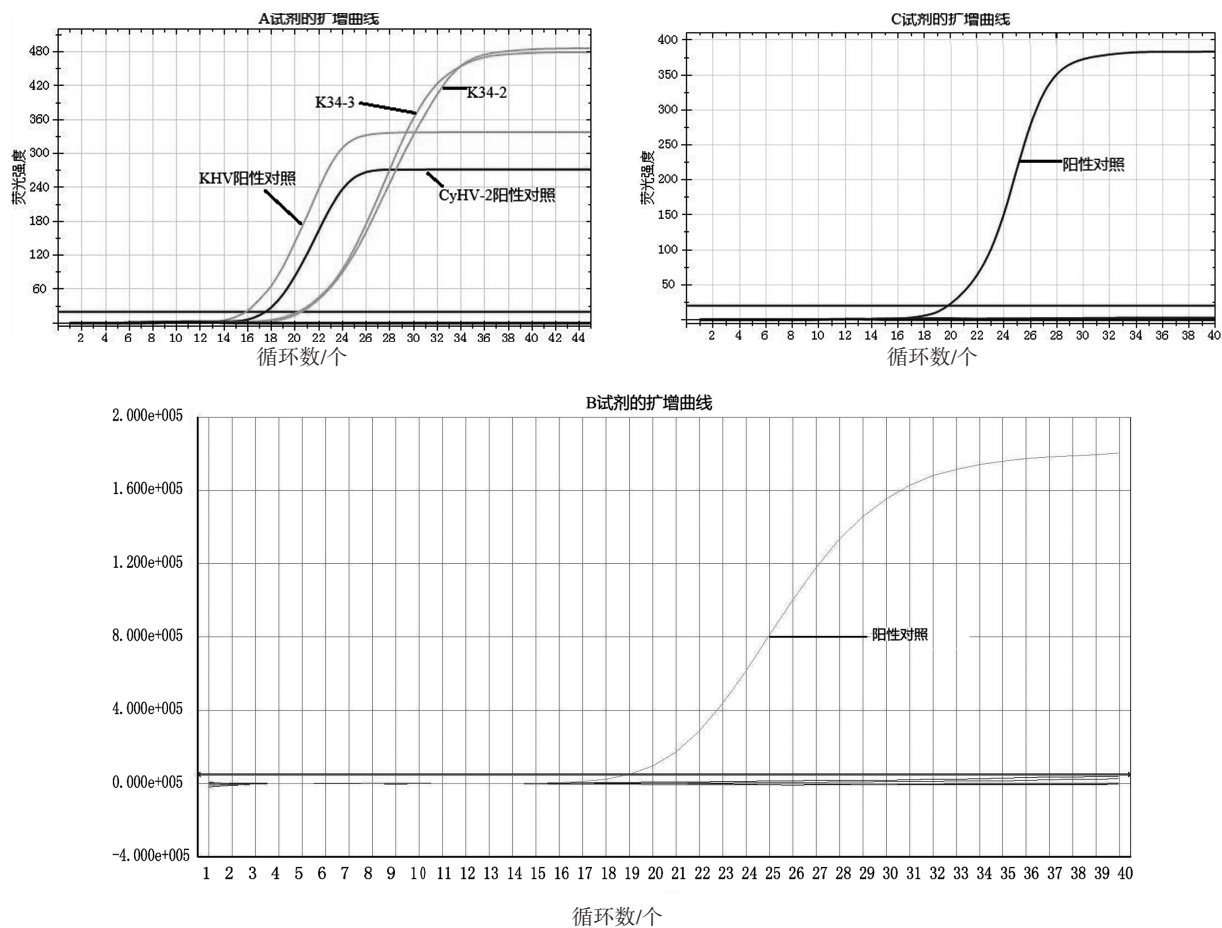


图 2 不同试剂的扩增曲线图

3 讨论

23~25 °C 是 KHV 发病的最适温度,但有研究发现:KHV 已具备在平均温度 3 °C 的冰下繁殖的能力^[1]且尿液是 KHV 的主要传播途径^[2]。KHV 潜伏期长、传染性强、致死率高,且缺乏对 KHV 有效的治疗方案和预防措施。为了加强水生动物防疫系统实验室能力建设,提升实验室对水生动物病原检测的能力,越来越多的实验室配备了荧光定量 PCR 仪,

具备开展荧光定量 PCR 检测的条件。实时荧光定量 PCR 技术由美国 Applied Biosystems 公司于 1996 年推出,具有特异性强、灵敏度高、准确可靠、无污染、实时性好且能实现多重反应等特点^[21]。随着检测技术的不断发展,许多商品化的锦鲤疱疹病毒实时荧光定量 PCR 检测试剂盒已被研发。本试验选取 3 种试剂盒,以此次病原检测能力测试的样本为检测对象进行试剂比对发现:3 种检测试剂的试验均成立,只有 A 与能力测试结果一致。因此,选用

商品化试剂盒时,试剂比对尤为重要。

参 考 文 献

- [1] 孙佳鑫,石连玉,贾智英. 鲤疱疹病毒(CyHV-3)及抗病选育研究现状与进展[J]. 水产学杂志,2019,32(6):69-74.
- [2] 李潇轩,朱天,杨志强,等. 锦鲤疱疹病毒研究进展[J]. 水产养殖,2019(8):41-44.
- [3] BOUTIER M, RONSMANS M, RAKUS K, et al. Cyprinid herpesvirus 3: an archetype of fish alloherpesviruses[J]. *Adv Virus Res*, 2015, 93:161-256.
- [4] 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.
- [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.
- [6] 朱霞,王好,李新伟,等. 锦鲤疱疹病毒病的研究进展[J]. 中国兽医科学,2011(1):106-110.
- [7] 朱日同. 鲤鱼疱疹病毒病的防控技术[J]. 河南水产,2018(1):14-15,17.
- [8] 陈俊杰,李媛媛,阳瑞雪,等. 锦鲤疱疹病毒潜伏感染实时荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2017,43(3):310-314.
- [9] 高鑫,朱武洋,卢学新. 实时荧光定量PCR在病毒检测中的应用[J]. 中国人兽共患病学报,2018,34(7):660-667.
- [10] 宋琼,任佐华,杨华,等. 应用实时荧光定量PCR技术检测土壤中根肿病菌休眠孢子[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2015,41(6):631-635.
- [11] MICHEL B, FOURNIER G, LIEFFRIG F, et al. Cyprinid herpesvirus[J]. *Emerg infect dis*, 2010, 16(12):1835-1843.
- [12] BERGMANN S M, MEIKE R, DIETER F, et al. Investigation on the diagnostic sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus[J]. *Journal of virological methods*, 2009, 163(2):229-233.
- [13] 范万红,刘荻,岳志芹,等. 锦鲤疱疹病毒实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J]. 中国海洋大学学报,2007,37(5):785-788.
- [14] YUASA K, KURITA J, KAWANA M, et al. Development of mRNA-specific RT-PCR for the detection of koi herpesvirus (KHV) replication stage[J]. *Dis Aquat Organ*, 2012, 100(1):11-18.
- [15] FUCHS W, FICHTNER D, BERGMANN S M, et al. Generation and characterization of koi herpesvirus recombinants lacking viral enzymes of nucleotide metabolism[J]. *Archives of virology*, 2011, 156(6):1059-1063.
- [16] DISHON A, PERELBERG A, BISHARA-SHIEBAN J, et al. Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11):7285-7291.
- [17] MONAGHAN S J, THOMPSON K D, ADAMS A, et al. Examination of the early infection stages of koi herpesvirus (KHV) in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. using in situ hybridization[J]. *J Fish Dis*, 2015, 38(5):477-489.
- [18] HEDRICKA R P, GILADA O, YUNA S, et al. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp[J]. *Journal of aquatic animal health*, 2000(1):44-57.
- [19] MIYAZAKI T, KUZUYA Y, YASUMOTO S, et al. Histopathological and ultrastructural features of koi herpesvirus (KHV) infected carp *Cyprinus carpio*, and the morphology and morphogenesis of KHV[J]. *Diseases of aquatic organisms*, 2008(1):1-11.
- [20] HUTORAN M, RONEN A, PERELBERG A, et al. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species[J]. *Journal of virology*, 2005, 79(4):1983-1991.
- [21] 张贺,李波,周虚,等. 实时荧光定量PCR技术研究进展及应用[J]. 动物医学进展,2006(S1):5-12.
- [22] 乌日琴,陈芳,张艺宜,等. 多重PCR方法检测锦鲤疱疹病毒基因[J]. 中国动物检疫,2011,28(11):39-43.

【责任编辑:胡 敏】