

传染性鲑鱼贫血症病毒实时荧光环介导等温 扩增检测方法的建立*

史秀杰 于 力 王津津 何俊强 郑晓聪
贾 鹏 兰文升 杨锦舜 刘 荭

(深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心 深圳 518045)

摘要 根据 ISAV 的基因保守序列,利用 LAMP Designer 软件设计了 6 条引物,采用新型的环介导等温扩增设备进行扩增和检测,优化了反应条件,分析了所建立方法的特异性和灵敏度,并与 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 进行比较。研究表明,该方法最适反应温度为 64℃,反应 10 min 就可以观察到明显的扩增。该方法灵敏度高,检测限为 78.4 fg RNA,比常规 RT-PCR 灵敏度高 100 倍,与实时荧光定量 RT-PCR 灵敏度相当;特异性好,与传染性胰腺坏死病毒(IPNV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)、出血性败血症病毒(VHSV)、鱼类病毒性神经坏死病毒(VNNV)、鲈鱼腹水病毒(YAV)等 14 种主要鱼类病毒没有交叉反应。结果表明,本研究建立了 ISAV 的实时荧光环介导等温扩增检测方法,实验能对整个扩增过程进行实时监测,提高检测灵敏度的同时,防止由于开盖跑电泳或加染料而导致的污染。

关键词 传染性鲑鱼贫血症病毒;实时荧光环介导等温扩增;检测

中图分类号 S943 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0051-08

传染性鲑鱼贫血症病毒(Infectious salmon anaemia virus, ISAV)是一种正粘病毒,直径 100–130 nm,由 8 条负链 RNA 片段组成,该病毒具有凝血、受体破坏和融合的活性(Falk *et al.*, 1997),主要感染大西洋鲑鱼(*Salmo salar*),可引起大西洋鲑鱼全身性和致死性的传染病——传染性鲑鱼贫血症(Infectious salmon anaemia, ISA) (Thorud *et al.*, 1988)。该病的显著特征是严重贫血、程度不同的出血和多组织坏死。20 世纪 80 年代中期,首次在挪威报道该病,随后 1996 年加拿大的新布罗温斯维克省、1998 年苏格兰、2000 年法罗群岛、2001 年智利和美国的缅因州等地相继暴发该病(Rimstad *et al.*, 2002)。ISA 自然感染仅在养殖大西洋鲑鱼中有记录,但在 2002 年,爱尔兰虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和智利银鳟(*Oncorhynchus*

kisutch)也有分离到 ISAV 的报道(Kibenge *et al.*, 2004)。近年来的资料显示,北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)、虹鳟、褐鳟(*Salmo trutta*)、大西洋鲑鱼(*Gadus morhua*)等均可以感染 ISAV,而且目前宿主有扩大的迹象(Olsen *et al.*, 2012)。

我国是渔业生产大国,2007 年水产养殖面积 563.321 万 hm^2 ,产量 3278.3 万 t,均位居世界第一,近年来水产养殖病害普遍加重(张家松等, 2010;盖春蕾等, 2013;蔡林婷等, 2013)。虽然目前我国尚未有 ISA 发病的报道,但随着我国鲑鳟鱼类养殖业的发展,进口大量的水生动物苗种,水生动物及其产品的进口贸易也急剧增加,特别是冰鲜大西洋鲑鱼大量进口到国内市场,ISA 随时会传入我国。

诊断 ISAV 的方法是细胞分离病毒后,用 RT-

*国家质量监督检验检疫总局科研项目(2011HK014)资助。史秀杰, E-mail: sxiujie74@gmail.com

通讯作者: 刘 荭, 研究员, E-mail: liuh@szciq.gov.cn

收稿日期: 2013-10-21, 收修改稿日期: 2014-03-07

PCR、实时荧光定量 RT-PCR 等分子生物学方法检测。环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是日本荣研化学株式会社学者建立的一种新型核酸扩增方法(Notomi *et al*, 2000)。LAMP 技术具有高效、快速等特点,广泛应用于动植物、人类病原体的检测,近年来在水生动物病原检测方面也有一定的应用。本研究建立了 ISAV 的实时荧光 LAMP 检测技术,为 ISAV 的诊断提供了另一种快速、敏感、特异的检测方法。

1 材料与方法

1.1 病毒株

试验中所用到的病毒株共 16 株(表 1)。ISAV 采

用 ASK 细胞系进行扩增,其他病毒用相应敏感细胞系扩增。将出现病变的细胞反复冻融 3 次,分装于 -80℃ 冻存储用。

1.2 仪器、设备及试剂

LAMP 反应使用 Isothermal Master Mix 试剂,购自英国 OptiGene 公司;核酸抽提使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit、DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒,购自 QIAGEN 公司;AMV 逆转录酶、One Step RNA PCR Kit(AMV)、One Step PrimeScript RT-PCR Kit 等,购自 TaKaRa 公司。

RNA 浓度测定使用 Eppendorf BioPhotometer; LAMP 扩增使用英国 OptiGene 公司 GENIE 便携式基因荧光扩增仪;PCR 扩增使用德国 Biometra T3000

表 1 试验中使用的病毒、编号及来源
Tab.1 Viruses used in the study

缩写 Abbreviation	全称 Full name	编号及来源 Number and Source
ISAV	传染性鲑鱼贫血病病毒 Infectious salmon anaemia virus	Glesvaer/2/90, 挪威 ISAV 参考实验室赠送
ISAV	传染性鲑鱼贫血病病毒 Infectious salmon anaemia virus	VR1554, 购自 ATCC
BIV	饰纹汀蛙虹彩病毒 Bohle iridovirus	澳大利亚 Dr. Mark Crane 赠送
CCV	斑点叉尾鲷病毒 Channel catfish virus	CCV12665, 购自 ATCC
EHNV	流行性造血器官坏死病毒 Epizootic haematopoietic necrosis virus	86/8874, 澳大利亚 Dr. Mark Crane 赠送
GCRV	草鱼出血病病毒 Grass carp haemorrhagic virus	873, 中国科学院水生生物研究所赠送
HRV	牙鲆弹状病毒 Hirame rhabdovirus	20080113, 实验室分离
IHNV	传染性造血器官坏死病毒 Infectious haematopoietic necrosis virus	HV-90, 英国 CEFAS 赠送
IPNV	传染性胰脏坏死病毒 Infectious pancreatic necrosis virus	Sp, 德国慕尼黑大学
KHV	锦鲤疱疹病毒 Koi herpesvirus	vp1592, 购自 ATCC
PFRV	狗鱼幼鱼弹状病毒 Pike fry rhabdovirus	德国慕尼黑大学赠送
STIV	甲鱼虹彩病毒 Soft-shelled turtle iridovirus	9701, 实验室分离
SVCV	鲤春病毒血症病毒 Spring viraemia of carp virus	10/3, 英国 CEFAS 赠送
VERV	病毒性脑病和视网膜病病毒 Viral encephalopathy and retinopathy virus	参考株, 意大利 Dr. Bovo 赠送
VHSV	病毒性出血性败血症病毒 Viral haemorrhagic septicaemia virus	J167, 英国 CEFAS 实验室赠送
YAV	鲫鱼腹水病毒 Yellowtail ascites virus	Y6, 浙江大学张传溪教授赠送

表 2 引物序列
Tab.2 Nucleotide sequences of the primers

引物名称 Primers	序列 Nucleotide sequences (5'-3')
F3	GAA GAG TCA GGA TGC CAA
B3	CCG GAA GTC GAT GAA CTG
FIP(F1c+F2)	CTT CAG GTC CTT CAA CAT CGT CGT GGG CAA TGG TGT ATG G
BIP(B1c+B2)	CAA TGC TAC ACA GCA GGA TGC AAG TTT CCA GGG CTT TCG
LoopF	TTC TCC TCC GCC ATG TCT
LoopB	TGT ATG CCC TAG GAG CGA

PCR 仪 荧光 PCR 扩增使用德国 ABI 7500 荧光 PCR 仪。

1.3 引物设计

根据 GenBank 上的传染性鲑鱼贫血症病毒的基因序列(GenBank 登录号: GU830902.1), 分析比较后选取 ISAV 基因组中第 8 个基因片段的保守区域, 使用 LAMP Designer 软件(<http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>), 设计 6 条引物: 正向内引物(FIP)、反向内引物(BIP)、正向外引物(F3)、反向外引物(B3)、正向环引物(LoopF)及反向环引物(LoopB), 引物序列见表 2, 由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.4 方法

1.4.1 病毒核酸的提取 病毒核酸的提取使用 QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit、DNeasy Blood & Tissue Kit, 按照试剂盒使用说明书操作, 核酸浓度使用 Eppendorf BioPhotometer 测定。

1.4.2 LAMP 反应体系的优化及扩增产物的检测

LAMP 使用 Isothermal Master Mix 反应试剂盒, 25 μ l 反应体系: 1 $\times$ 的 Isothermal Master Mix 15 μ l, 2.5 U 的 AMV 逆转录酶 0.5 μ l, 5 μ mol/L F3 和 B3 引物各 1 μ l, 40 μ mol/L FIP 和 BIP 引物各 1 μ l, 20 μ mol/L LF 和 LB 引物各 1 μ l, RNA 模板 3.5 μ l。利用 GENIE 便携式基因荧光扩增仪进行扩增, 设置 7 个反应温度(59–65 $^{\circ}$ C), 反应 1 h, 最后反应温度升高至 98 $^{\circ}$ C, 以 0.05 $^{\circ}$ C/s 的速度降温至 80 $^{\circ}$ C 作熔解曲线, 反应约 6 min 终止反应。

观察荧光信号的收集情况, 分析荧光扩增曲线, 确定最佳反应条件, 同时观察熔解曲线峰值图, 确认其特异性。最后取 5 μ l LAMP 反应产物, 用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进一步确认。

1.4.3 特异性分析 抽提表 1 中的病毒核酸作为模板, 使用优化后的反应体系进行 LAMP 反应, 利用 GENIE 便携式基因荧光扩增仪进行扩增和检测, 最后取 5 μ l LAMP 反应产物, 用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进一步确认。

1.4.4 灵敏度分析 抽提 ISAV(Glesvaer/2/90 株)的 RNA, 用 Eppendorf BioPhotometer 测定其浓度为 22.4 ng/ μ l, 10 倍梯度系列稀释后, 使用优化后的反应体系进行 LAMP 反应, 确定方法的检测灵敏度。利用 1.5%琼脂糖凝胶电泳对扩增结果进一步确认。取相同系列稀释后的核酸进行 RT-PCR、实时荧光定量 RT-PCR 反应, 比较 3 种方法的检测灵敏度。

RT-PCR、实时荧光定量 RT-PCR 反应体系和反应条件参照相关文献(Devold *et al*, 2000; Snow *et al*, 2006)。

1.4.5 人工感染大西洋鲑鱼样品中 ISAV 的检测

将 TCID₅₀=10^{5.17}/100 μ l 的 ISAV (Glesvaer/2/90 株)病毒悬液, 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液。无菌条件下取正常的大西洋鲑鱼肾、鳃等组织共 5 g, 加入 500 μ l 离心后的 ISAV 病毒悬液, 剪碎匀浆后, 1) 直接抽提核酸, 使用优化后的反应体系进行 RT-LAMP 扩增; 2) 加组织抚育液到 50 ml, 4 $^{\circ}$ C 过夜后, 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液抽提核酸, 使用优化后的反应体系进行 RT-LAMP 扩增。抽提 ISAV 病毒悬液核酸作为阳性对照, 用未加病毒悬液的 5 g 鲑鱼组织, 剪碎匀浆抽提核酸作为阴性对照。

2 结果

2.1 反应体系的优化

利用 GENIE 扩增仪检测 LAMP 反应, 结果显示, LAMP 反应体系在 59 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、61 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C、63 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C 7 个温度下均有扩增(图 1), 出峰时间略有差异, 熔解温度为 86.64–86.79 $^{\circ}$ C, 表明扩增的特异性好。64 $^{\circ}$ C 时出峰时间最早, 为 9 min 25 s。经琼脂糖凝胶电泳后(图 2), 在 64 $^{\circ}$ C 时产生的梯形条带量最多, 两种方法结果一致, 因此, 确定 64 $^{\circ}$ C 作为最佳反应温度。从扩增曲线(图 1)可以看出, 反应在 10 min 左右就可见明显的扩增。为保证样品中低浓度模板也能被检出, 选择 60 min 作为优化后的 LAMP 反应时间。

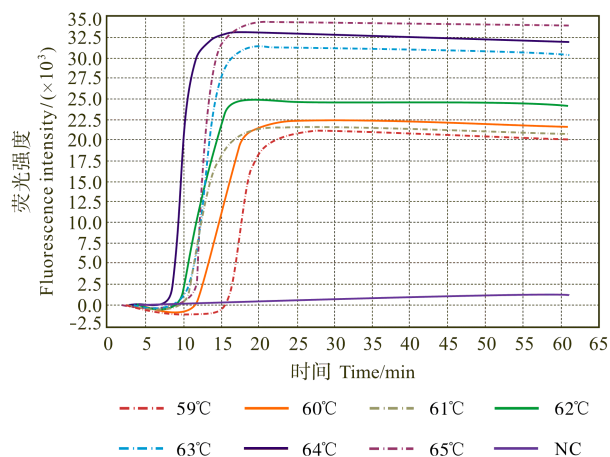


图 1 ISAV LAMP 不同反应温度的扩增曲线

Fig.1 Amplification plot of ISAV LAMP at different reaction temperatures

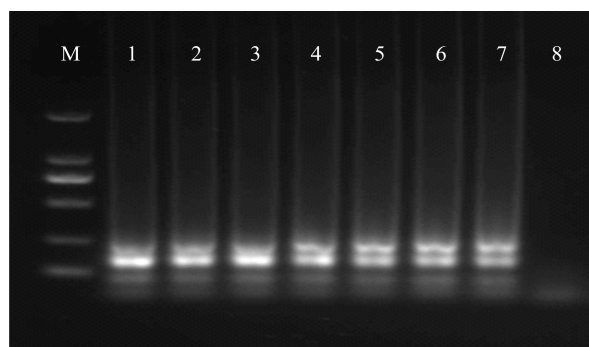


图 2 ISAV LAMP 不同反应温度扩增产物的电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of ISAV LAMP products at different reaction temperatures

M: DNA Ladder, from top to bottom: 2000, 1500, 750, 500, 250, and 100 bp; 1-7: 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, and 65°C; 8: 阴性对照 Negative control

2.2 特异性试验

使用优化后的 LAMP 检测方法对 15 种主要鱼类病毒进行检测, 结果发现只有两株 ISAV 有扩增, 其他 14 种病毒均无扩增。LAMP 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 只有两株 ISAV 出现梯形扩增条带, 而其他 14 种病毒没有出现梯形扩增条带。说明设计的 LAMP 引物特异性好。

ISAV LAMP 特异性试验的扩增曲线见图 3, LAMP 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 4。

2.3 灵敏度试验

利用 GENIE 扩增仪检测不同稀释度的 ISAV LAMP 反应, 结果见图 5。从图 5 可以看出, 从 10^0 – 10^{-6} 稀释度, 出峰时间依次延后, 从 6 min 38 s–30 min 8 s,

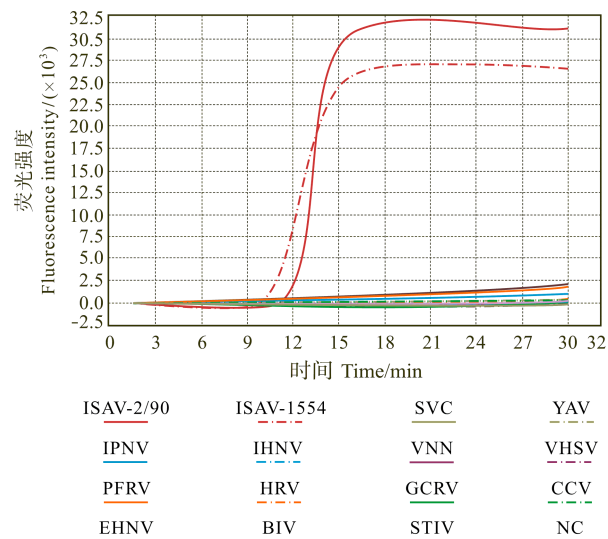


图 3 ISAV LAMP 特异性试验扩增曲线

Fig.3 Amplification plot of ISAV LAMP specificity test

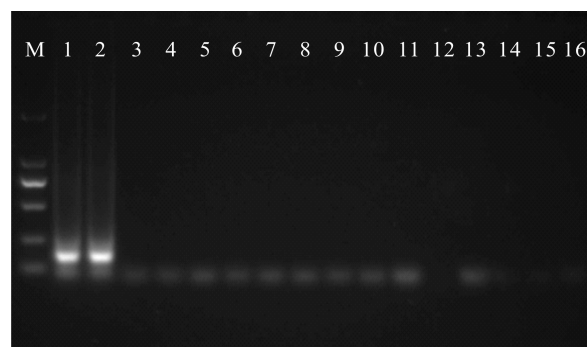


图 4 ISAV LAMP 特异性试验扩增产物电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of products for ISAV LAMP specificity test

M: DNA Ladder, from top to bottom: 2000, 1500, 750, 500, 250, and 100 bp; 1: ISAV-2/90; 2: ISAV-1554; 3-15: SVCV, YAV, IPNV, IHN, VNN, VHSV, PFRV, HRV, GCRV, CCV, EHN, BIV, and STIV; 16: 阴性对照 Negative control

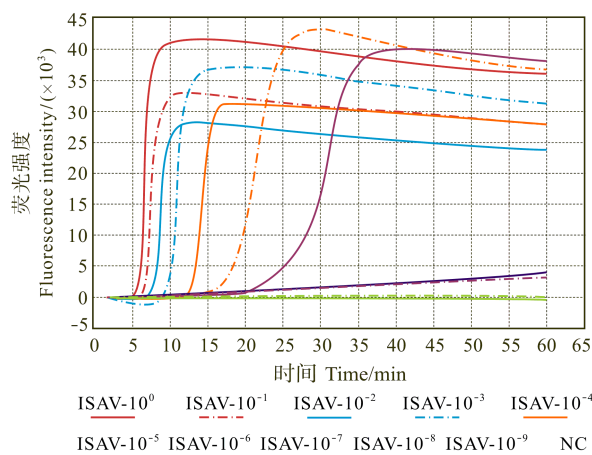


图 5 ISAV LAMP 灵敏度试验扩增曲线

Fig.5 Amplification plot of ISAV LAMP sensitivity test

10^{-7} – 10^{-9} 稀释度与阴性对照没有出现扩增曲线,说明 LAMP 能检测到 10^{-6} 稀释度,即 22.4×10^{-6} ng/ μ l ISAV RNA,与琼脂糖凝胶电泳结果(图 6)一致。利用文献中的试验条件进行 ISAV 的 RT-PCR 和实时荧光定量 RT-PCR 灵敏度试验,检测结果分别见图 7、图 8。结果显示,RT-PCR 能检测到 10^{-4} 稀释度,即 22.4×10^{-4} ng/ μ l ISAV RNA,实时荧光定量 RT-PCR 能检测到 10^{-6} 稀释度,即 22.4×10^{-6} ng/ μ l ISAV RNA,表明 LAMP 检测灵敏度与实时荧光定量 RT-PCR 的灵敏度相当,比 RT-PCR 高 100 倍。计算其检测限约为 78.4 fg ISAV RNA。

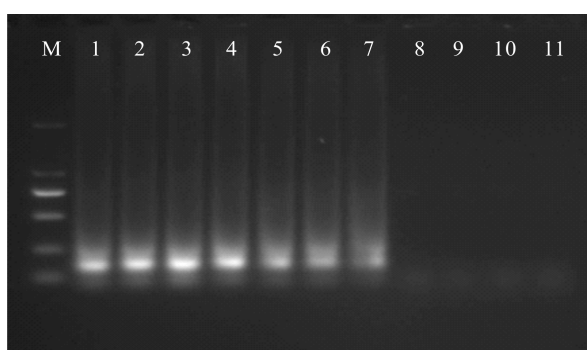


图 6 ISAV LAMP 灵敏度试验扩增产物电泳

Fig.6 Agarose gel electrophoresis of sensitivity test of ISAV LAMP products

M: 2000 bp DNA Ladder, 从上至下分别为 2000、1500、750、500、250、100 bp; 1–10: 10 倍系列稀释; 11: 阴性对照
M: 2000 bp DNA Ladder, from top to bottom: 2000, 1500, 750, 500, 250, and 100 bp; 1–10: Serial 10-fold dilutions 10^0 – 10^{-9} ; 11: Negative control

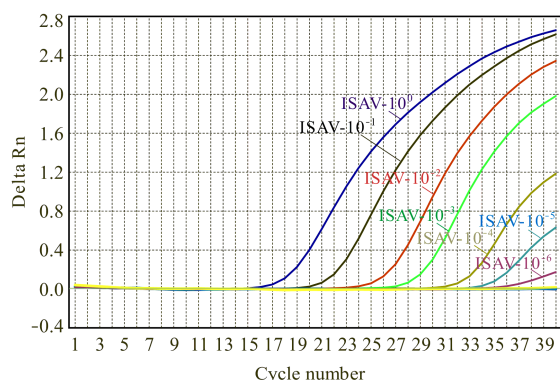


图 7 ISAV 实时荧光定量 RT-PCR 灵敏度试验扩增曲线

Fig.7 Amplification plot of ISAV real-time RT-PCR sensitivity test

2.4 人工感染大西洋鲑鱼样品中 ISAV 的检测

用混有 ISAV 病毒悬液的大西洋鲑鱼肾、鳃组织,剪碎匀浆后,直接抽提核酸,或加组织抚育液过夜后

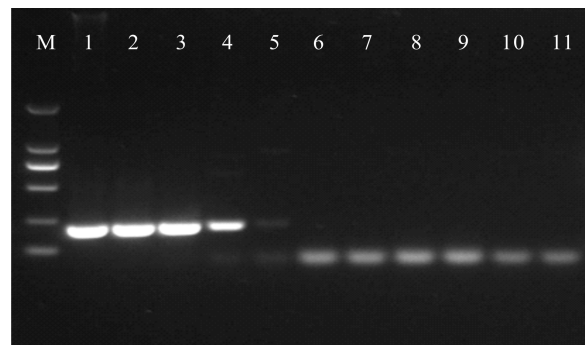


图 8 ISAV RT-PCR 灵敏度试验扩增产物电泳

Fig.8 Agarose gel electrophoresis of products for ISAV RT-PCR sensitivity test

M: 2000 bp DNA Ladder, 从上至下分别为 2000、1500、750、500、250、100 bp; 1–10: 10 倍系列稀释; 11: 阴性对照
M: 2000 bp DNA Ladder, from top to bottom: 2000, 1500, 750, 500, 250, and 100 bp; 1–10: Serial 10-fold dilutions 10^0 – 10^{-9} ; 11: Negative control

取上清液抽提核酸,经 RT-LAMP 扩增,均有特征性的扩增曲线出现(图 9),LAMP 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 10。

3 讨论

传染性鲑鱼贫血症是世界动物卫生组织(OIE)水

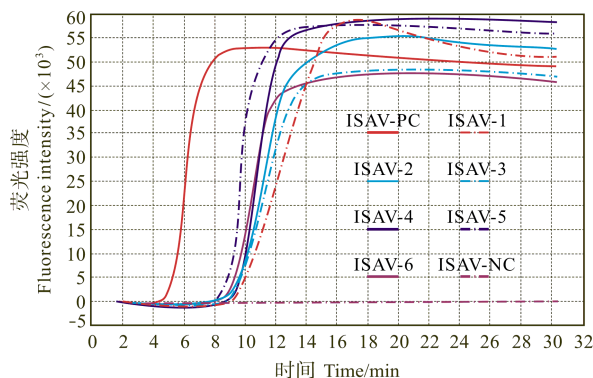


图 9 人工污染样品中 ISAV 的 LAMP 扩增曲线

Fig.9 Amplification plot of ISAV LAMP for fish tissue mixed with the suspension of ISAV

ISAV-PC: 阳性对照; ISAV-1–3: 混有 ISAV 的鱼组织抽提核酸经 LAMP 扩增的结果; ISAV-4–6: 混有 ISAV 的鱼组织抚育液过夜后的上清液抽提核酸经 LAMP 扩增的结果; ISAV-NC: 阴性对照

ISAV-PC: Positive control; ISAV-1–3: Amplification of LAMP for fish tissue mixed with the suspension of ISAV; ISAV-4–6: Amplification of LAMP for supernatant of fish tissue mixed with the suspension of ISAV incubated overnight; ISAV-NC: Negative control

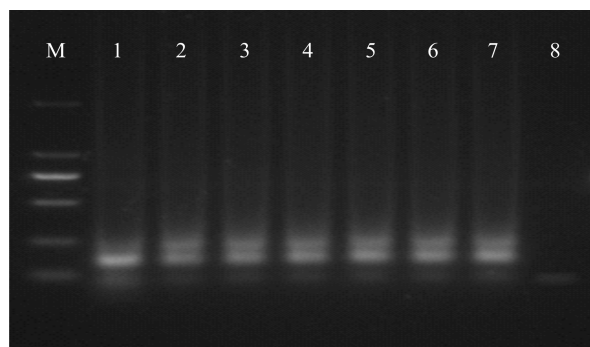


图 10 人工污染样品中 ISAV 的 LAMP 试验扩增产物电泳

Fig.10 Agarose gel electrophoresis of LAMP products for fish tissue mixed with the suspension of ISAV

M: 2000 bp DNA Ladder, 从上至下分别为 2000、1500、750、500、250、100 bp; 1: 阳性对照; 2-4: 混有 ISAV 的鱼组织抽提核酸经 LAMP 扩增的结果; 5-7: 混有 ISAV 的鱼组织抚育液过夜后的上清液抽提核酸经 LAMP 扩增的结果; 8: 阴性对照

M: 2000 bp DNA Ladder, from top to bottom: 2000, 1500, 750, 500, 250, and 100 bp; 1: Positive control; 2-4: Amplification of LAMP for fish tissue mixed with the suspension of ISAV; 5-7: Amplification of LAMP for supernatant of fish tissue mixed with the suspension of ISAV incubated overnight; 8: Negative control

生动物疫病名录中的重要疫病之一, 主要在欧洲、北美广泛流行, 被列入欧共体鱼类健康指令防治的重要病害之一(杜雄伟等, 2013)。2007 年该病在智利大规模暴发, 湖大区(Los Lagos)沿海地区 5 处半开放式海水养殖场发生 ISA(Martin *et al*, 2012)。2013 年, 挪威大西洋鲑鱼养殖场暴发 ISA 疫情, 我国国家质检总局发出预警通报, 要求对来自挪威, 尤其是对来自诺尔兰郡、特罗姆斯区域养殖场的冰鲜或冰冻大西洋鲑鱼加强 ISA 的检疫。因此建立快速而准确的 ISAV 检测方法, 对保护我国的水产养殖业具有重要的意义。

目前报道的应用 LAMP 技术检测水生动物病原体的有迟钝爱德华氏菌病(Savan *et al*, 2004)、白斑综合征病毒(WSSV) (Kono *et al*, 2004)、虾黄头病毒(YHV) (Mekata *et al*, 2006)、锦鲤疱疹病毒(KHV) (Gunimaladevi *et al*, 2004)、真鲷虹彩病毒(RSIV) (Caipang *et al*, 2004)、传染性造血器官坏死症病毒(IHNV) (Gunimaladevi *et al*, 2005)、鲤春病毒血症病毒(SVCV) (Shivappa *et al*, 2008)、病毒性出血性败血症病毒(VHSV) (Soliman, 2006)等, 水生动物寄生虫的检测也有应用 LAMP 技术的报道。近年来, 国内学者也逐渐将 LAMP 检测方法应用于水生动物病原体的检测中。孙颖杰等(2010)采用 LAMP 技术建立了检

测牙鲈弹状病毒的方法, 该方法的检测限为 30 fg RNA, 比常规 RT-PCR 灵敏度高 100 倍。陈进会等(2013)采用实时荧光 LAMP 方法检测病毒性出血性败血症病毒(VHSV), 63℃下反应 30 min 可得出结果, 其检测限可达到 4.5 pg/反应, 与几种重要的病原 RNA 均无交叉反应。

本研究根据传染性鲑鱼贫血症病毒的基因保守序列设计引物, 建立了 ISAV LAMP 检测方法。试验结果表明, 该方法灵敏度高, 检测限为 78.4 fg RNA, 与实时荧光定量 RT-PCR 灵敏度相当, 比常规 RT-PCR 灵敏度高 100 倍; 与传染性胰腺坏死病毒(IPNV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)、出血性败血症病毒(VHSV)、鱼类病毒性神经坏死病病毒(VNNV)、鲈鱼腹水病毒(YAV)等 14 种主要鱼类病毒没有交叉反应。用建立的方法检测人工污染的样品, 也有特异性的扩增, 而未添加 ISAV 病毒的组织没有扩增, 说明建立的方法特异性好, 适用于无症状鱼的 ISA 监测, 或者是对可疑病鱼组织的检测。同时该方法操作简便、所需设备简单, 只要将样品和试剂一起放入 64℃环境中, 反应 10 min, 就可以观察到明显的扩增, 反应高效快速。根据血凝素基因 HE 基因 5' 端差异, ISAV 被分为欧洲群和北美群两个主要群, 本研究建立的方法, 可以特异性地扩增两株 ISAV: Glesvaer/2/90/和 VR1554, 分别属于欧洲株和北美株, 试验结果初步说明建立的方法适用于 ISAV 的检测。由于国内目前还没有该病的报道, 本实验室保存的毒株也仅有两株, 因此建立的方法有待于用更多的毒株做进一步的验证。

常用的检测 LAMP 扩增产物的方法有: 直接向扩增产物中加入嵌入剂 SYBR Green I, 无扩增反应的为橙色, 有扩增反应的为绿色; 琼脂糖凝胶电泳, LAMP 反应扩增产物为不同片段长度的茎环结构, 若有扩增, 则在电泳图谱中显示为从点样孔处开始的 smear 和梯形扩增条带。但这两种方法都需要开盖加染料或电泳, 容易造成气溶胶污染, 影响后续的试验。同时由于电泳时, LAMP 扩增的阳性结果表现为梯形扩增条带, 不能分辨是否发生了非特异性扩增。Mori 等(2001)发现, LAMP 反应的副产物焦磷酸离子和反应体系中的镁离子可以发生反应, 生成焦磷酸镁沉淀。这一反应结果不需开盖, 可以通过肉眼直接判断: 如果管内液体浑浊, 或者离心、静置后在管底有白色沉淀的为阳性, 或者利用浊度仪检测其在 400 nm 处的沉淀浊度, 判断是否有扩增(黄火清等, 2012)。有学者对 3 种判定方法进行了比较, 发现琼脂糖电泳和 SYBR Green I 的检测限相近, 直接沉淀观察法灵敏度

低10倍(Maeda *et al.*, 2005)。另一种不开盖检测LAMP扩增结果的方法是检查染料颜色的变化。常用的有钙黄绿素、HNB等,两者均可以在反应前加入体系,避免了开盖污染,HNB与SYBR Green I的检测灵敏度相当,是钙黄绿素的10倍(Goto *et al.*, 2009)。

本研究采用英国OptiGene公司研发的等温扩增荧光检测试剂及检测仪器GENIE 便携式基因荧光扩增仪,进行LAMP反应及检测。该检测试剂中预先加入了荧光染料,扩增仪使用488 nm激发光源、520 nm发射热循环荧光监测,实时收集记录LAMP反应扩增的荧光信号,自动生成扩增曲线,对扩增进行实时报告。该方法不需要开盖加染料或者电泳,防止了气溶胶的形成,避免了因污染环境而造成的假阳性。分析软件通过计算可以得出相当于荧光PCR“ C_T 值”的出峰时间,灵敏度更高,避免了肉眼观察带来的人为误差,结果判定更为客观。通过对软件派生的溶解曲线的分析,可以进一步确认扩增的特异性,有效区分了因非特异性扩增而引起的假阳性。另外,便携式基因荧光扩增仪具有体积小、易携带、操作简单、具内置电池等特点,非常适合现场使用。利用该设备建立的ISAV LAMP检测方法,不仅适用于科研机构的检测研究,更适用于基层养殖场的现场快速检测,以及进出口口岸检疫部门的疫病监测,为ISAV的检测提供了一种新的方法。

参 考 文 献

- 孙颖杰, 岳志芹, 刘荭, 等. 牙鲆弹状病毒环介导等温扩增检测方法的建立与应用. 华中农业大学学报, 2010, 29(2): 203-207
- 杜雄伟, 李叶, 庞艳华. ISAV 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立. 食品与发酵工业, 2013, 39 (6): 205-207
- 张家松, 王印庚, 陈义平, 等. 环介导等温扩增法(LAMP)在水生动物病害检测中的应用. 中国动物检疫, 2010, 27(2): 71-73
- 陈进会, 陈文, 黄伟, 等. 病毒性出血性败血症病毒(VHSV)实时荧光环介导等温扩增检测方法的建立. 中国动物检疫, 2013, 30(5): 42-45
- 黄火清, 郁昂. 环介导等温扩增技术的研究进展. 生物技术, 2012, 22 (3): 90-94
- 盖春蕾, 叶海斌, 许拉, 等. 鲍鱼常见病害初诊速查检索表. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 177-180
- 蔡林婷, 李思源, 葛明峰, 等. 3 种致病弧菌感染对大黄鱼血液生化指标的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 65-72
- Caipang CMA, Haraguchi I, Ohira T, *et al.* Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J Virol Methods, 2004, 121(2): 155-161
- Devold M, Krossoy B, Aspehaug V, *et al.* Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. Dis Aquat Org, 2000, 41(1): 9-18
- Falk K, Namork E, Rimstad E, *et al.* Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L). J Virol, 1997, 71(12): 9016-9023
- Goto M, Honda E, Ogura A. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl anaphthol blue. Biol Techniques, 2009, 46(3): 167-172
- Gunimaladevi I, Kono T, Lapatra SE, *et al.* A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch Virol, 2005, 150(5): 899-909
- Gunimaladevi I, Kono T, Venugopal MN, *et al.* Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification. J Fish Dis, 2004, 27(10): 583-589
- Kibenge FSB, Munir K, Kibenge MJT, *et al.* Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. Anim Health Res Rev, 2004, 5(1): 65-78
- Kono T, Savan R, Sakai M, *et al.* Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods, 2004, 115(1): 59-65
- Maeda H, Koikeguchi S, Fujimoto C. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005, 43(2): 233-239
- Martin CS, Rivas-Aravena A, Guajardo S. Simultaneous detection of the IPN and ISA viruses in outbreaks of clinical disease and mortality in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. J Fish Dis, 2012, 35(6): 461-465
- Mekata T, Koto T, Savan R. Detection of yellow head virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J Virol Methods, 2006, 135(2): 151-156
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(1): 150-154
- Notomi T, Okayama H, Masub-uchi H. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63
- Olsen CM, Braaen S, Falk K. Multiple passage of infectious salmon anaemia virus in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), did not induce increased virus load. J Fish Dis, 2012, 35(11): 827-838
- Rimstad E, Mjaaland S. Infectious salmon anaemia virus. An orthomyxovirus causing an emerging infection in Atlantic salmon. APMIS, acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 2002, 110(4): 273-282
- Savan R, Igarashi A, Matsuoka S. Sensitive and rapid detection of Edwardsielliosis in fish by a loop-mediated isothermal

- amplification method. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 621–624
- Shivappa RB, Savan R, Kono T. Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in koi carp, *Cyprinus carpio* L. *J Fish Dis*, 2008, 31(4): 249–258
- Snow M, McKay P, Mcbeatha JA, *et al.* Development, application and validation of a taqMan real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Vannier P & Espeseth D, eds. *New Diagnostic Technology: Applications in Animal Health and Biologics Controls*. 2006, Dev Biol, Basel, Karger, 126: 33–145
- Soliman H, El-Matbouli M. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS). *Vet Microbiol*, 2006, 114(3-4): 205–213
- Thorud KE, Djupvik HO. Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 1988, 8: 109–111

(编辑 冯小花)

The Detection of Infectious Salmon Anaemia Virus Using Real-Time Fluorescent Loop-Mediated Isothermal Amplification

SHI Xiujie, YU Li, WANG Jinjin, HE Junqiang, ZHENG Xiaocong, JIA Peng,
LAN Wensheng, YANG Jinshun, LIU Hong

(The Animal and Plant Inspection and Quarantine Technical Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045)

Abstract The infectious salmon anaemia virus (ISAV) is classified as an Orthomyxoviridae. Its genome consists of 8 single-stranded negative-sense RNA segments. ISAV is the pathogen of fatal ISA listed by the World Organization for Animal Health (OIE). It mainly affects salmon farming in Europe and Northern America, but there has been a high chance of its introduction into China due to the increased salmon importation. Therefore it is very important to establish a rapid and accurate method for ISAV detection. Conventional ISAV detection methods involve cell isolation followed by RT-PCR or real-time RT-PCR. Recently Japanese scientists have established a novel technique with high sensitivity and rapidity, namely Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. In this study, LAMP assay was developed for detecting infectious salmon anaemia virus (ISAV). Six specific primers were designed according to ISAV genes using LAMP Designer software. A novel LAMP instrument was applied for the amplification and detection. The reaction time and temperature were optimized, and the sensitivity and specificity of this method were analyzed and compared to those of RT-PCR and real-time RT-PCR. The results demonstrated that the optimal amplification temperature of LAMP assay was 64°C, and its detection limit for ISAV RNA was approximately 78.4 fg, which was 100-fold lower than that of traditional RT-PCR but similar to real-time RT-PCR. LAMP assay showed no cross reaction with 14 other fish viruses such as infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), spring viraemia of carp virus (SVCV), viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), viral nervous necrosis virus (VNNV), and yellowtail ascites virus (YAV). This indicated that the primers were highly specific for ISAV. In this study we developed a LAMP assay for ISAV detection. Using specific LAMP assay equipment we could improve the sensitivity and monitor the amplification process. Furthermore this assay does not involve lid opening, hence it greatly reduces the risk of cross contamination.

Key words Infectious salmon anaemia virus (ISAV); Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); Detection

Corresponding author: LIU Hong, E-mail: liuh@szciq.gov.cn