

Establishment and Application of Rapid Detection Technology of Infectious Pancreatic Necrosis Virus by Isothermal Amplification

Huijun Zhao^{1*}, Qiang Hu¹, Yanhua Pang¹, Ling Yu¹, Bin Wu²

¹Dalian Customs Technical Center, DaLian Liaoning

²China Inspection and Certification Group Liaoning Co., Ltd., DaLian Liaoning

Email: *zhaohuijun1215@126.com

Received: Jun. 2nd, 2020; accepted: Jun. 21st, 2020; published: Jun. 28th, 2020

Abstract

In order to supplement the lack of molecular biological detection methods of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), the nucleotide sequence encoding A-fragment polypeptide in GenBank IPNV genome was used as the target sequence in this study. A pair of RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) inner primers and a pair of RT-LAMP outer primers were designed for six regions of the target sequence. The IPNV RT-LAMP detection technology was established by optimizing the reaction conditions of RT-LAMP, such as annealing temperature and reaction time, and sensitivity test and specificity test were carried out. The test results showed that the best reaction conditions of IPNV RT-LAMP were annealing temperature 62°C and reaction time 45 min by optimizing the reaction conditions. The specificity test showed that this method only had amplification reaction with IPNV and no cross reaction with other aquatic animal pathogens, which indicated that this method had good specificity. The sensitivity test showed that this method can detect IPNV RNA with a low limit of 0.01 pg RNA, and its detection sensitivity is 100 times higher than that of the conventional PCR method, indicating that this technology has high sensitivity. The results show that the IPNV RT-LAMP technology established in this study has strong specificity, high sensitivity, simple operation and fast response, and can be judged by the naked eye. This method is particularly suitable for the field and field detection and diagnosis of infectious pancreatic necrosis disease, and provides an important technical means for the detection and monitoring of infectious pancreatic necrosis disease.

Keywords

Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), Isothermal Amplification, Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP), Detection

*通讯作者。

传染性胰脏坏死病毒等温扩增快速检测技术的建立与应用

肇慧君^{1*}, 胡强¹, 庞艳华¹, 于灵¹, 吴斌²

¹大连海关技术中心, 辽宁 大连

²中国检验认证集团辽宁有限公司, 辽宁 大连

Email: zhaohuijun1215@126.com

收稿日期: 2020年6月2日; 录用日期: 2020年6月21日; 发布日期: 2020年6月28日

摘要

为补充现有传染性胰脏坏死病毒(Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)分子生物学检测手段的不足, 本研究以Genbank IPNV基因组中编码A片段多聚蛋白的核苷酸序列为靶序列, 针对目标序列的6个区域设计了1对RT-LAMP内引物及1对RT-LAMP外引物。通过优化RT-LAMP方法的退火温度、反应时间等反应条件, 同时进行了灵敏度试验及特异性试验, 建立了IPNV RT-LAMP检测技术。试验结果为: 通过优化各反应条件, 结果退火温度为62℃、反应时间为45 min时为IPNV RT-LAMP最佳反应条件; 特异性试验显示该方法只与目标病原IPNV有扩增反应, 与其他水生动物病原无交叉反应, 说明该方法具有良好的特异性; 灵敏性试验显示该方法能够检测IPNV RNA的低限为0.01 pg RNA, 其检测灵敏度是常规PCR方法的100倍, 表明本技术具备较高的灵敏度。试验结果表明, 本研究建立的IPNV RT-LAMP技术特异性强、敏感性高、操作简便、反应快速, 可通过肉眼判定结果, 该方法特别适用于传染性胰脏坏死病的现场及野外检测与诊断, 为传染性胰脏坏死病的检测及监测提供了重要的技术手段。

关键词

传染性胰脏坏死病毒, 等温扩增, RT-LAMP, 检测

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

传染性胰脏坏死病毒(Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)是一种经济上非常重要的鱼病病原体, 在鲑科鱼类中能够引起严重的感染, 导致高的死亡率[1]。最初只在北美及欧洲的一些国家流行[2], 近年来随着水生动物进口贸易的增加, 传染性胰脏坏死病(infectious pancreatic necrosis, IPN)已传入我国, 并在一些地区流行, 对我国水产养殖业造成了严重的经济损失。目前, 国内外对该病原 IPNV 的检测方法虽已达到准确的诊断[3], 但是很多方法耗时长、成本高[4]。因此, 需要建立一种针对 IPNV 的快速、有效、准确且适合野外现场操作的方法, 以达到及早发现该病并进行隔离或扑杀, 达到抑制疫病大规模暴流行的目的。

2. 材料与方法

2.1. 毒株与试剂

IPNV (传染性胰脏坏死病毒)、IHNV (传染性造血器官坏死病毒)、SVCV (鲤春病毒血症病毒)、VHSV (病毒性出血性败血症病毒)和 ISA (传染性鲑鱼贫血病毒)由本实验室分离保存; 通用型 RT-LAMP 反应液试剂盒购自深圳博睿祥生物技术有限公司。

2.2. LAMP 引物的设计

根据 Genbank IPNV 基因组中编码 A 片段多聚蛋白的核苷酸序列, 使用 Primer Explore V3 和 Primer Premier 5.0 软件针对目标序列的 6 个区域设计 2 对引物, 即 1 对外引物, 1 对内引物。引物由大连宝生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

Table 1. Primers used for RT-LAMP detection IPNV

表 1. IPNV RT-LAMP 检测引物

引物 Primer	序列 Sequence 5'-3'	退火温度
IPNV F3	CGCAGGACCTGAAGAAAGC	60°C~65°C
IPNV B3	TGTGACTCCTTTGGTCACCA	
IPNV FIP	GAGCATAGAGACCGCCGGTACTTCAACTACGGGAGGCTGA	
IPNV BIP	CGCCACCTTCGAAGGCAGTCCTGGGGTTCGTTGTTAGG	

2.3. LAMP 反应条件的优化

IPNV RT-LAMP 检测采用深圳博睿祥生物技术有限公司的通用型 RT-LAMP 反应液试剂盒, 按照试剂盒操作, 反应体系为 25 μ L, 加入的组分剂量如表 2:

Table 2. Reaction system of IPNV RT-LAMP

表 2. IPNV RT-LAMP 反应体系

反应组分	体积
RT-LAMP 反应液	15 μ L
IPNV F3 (5 pmol/ μ L)	0.8 μ L
IPNV B3 (5 pmol/ μ L)	0.8 μ L
IPNV FIP (50 pmol/ μ L)	1.2 μ L
IPNV BIP (50 pmol/ μ L)	1.2 μ L
BstDNA 聚合酶	1 μ L
RNA 模板	2 μ L
反转录酶	0.4 μ L
无核酸酶 H ₂ O	2.6 μ L
Total	25 μ L

按照上述反应体系对 IPNV RT-LAMP 的扩增条件进行优化, 采用相同模板、相同的组份配置, 分别在不同的温度下(60°C、61°C、62°C、63°C、64°C和 65°C)恒温反应 60 min, 以确定最佳反应温度; 采用

相同模板、相同的组份配置，在优化的温度下分别恒温反应 30 min、45 min、60 min、75 min 和 90 min，以确定最佳反应时间。

2.4. LAMP 结果判定

扩增结果使用 3 种方法进行观察。

方法 1：通过琼脂糖凝胶电泳判读结果。

方法 2：通过观察荧光颜色变化判读结果(荧光显色法)。

方法 3：通过检测浊度变化判读结果。

2.5. LAMP 的特异性试验

参照商品化核酸提取试剂盒方法(Takara MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 5.0)，提取 IPNV (传染性胰脏坏死病毒)、IHNV (传染性造血器官坏死病毒)、SVCV (鲤春病毒血症病毒)、VHSV (病毒性出血性败血症病毒)和 ISA (传染性鲑鱼贫血病毒)的 RNA 作为模板进行 RT-LAMP 反应，验证 RT-LAMP 引物的特异性。

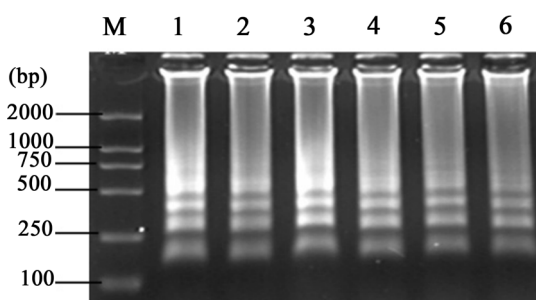
2.6. LAMP 的灵敏度试验

取 IPNV 病毒悬液 200 μL ，提取病毒 RNA，作十倍系列稀释，取每个梯度稀释液 1 μL 作为模板进行 RT-LAMP，确定建立 RT-LAMP 检测方法的灵敏度。

3. 结果与讨论

3.1. LAMP 方法反应温度的确定

对 IPNV RT-LAMP 反应温度进行优化，从反应完成的反应管中取 8 μL 进行凝胶电泳，电泳结果表明，在 60 $^{\circ}\text{C}$ ~65 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内，特征电泳条带在 62 $^{\circ}\text{C}$ 时最亮(图 1)。因而可以确定 62 $^{\circ}\text{C}$ 是 IPNV RT-LAMP 的最适反应温度。



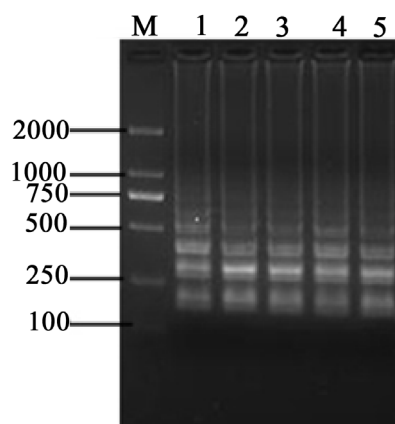
M: DL2000 Marker; 1: 60 $^{\circ}\text{C}$; 2: 61 $^{\circ}\text{C}$; 3: 62 $^{\circ}\text{C}$; 4: 63 $^{\circ}\text{C}$; 5: 64 $^{\circ}\text{C}$; 6: 65 $^{\circ}\text{C}$ 。

Figure 1. Electrophoresis map for the IPNV RT-LAMP product for 60 min

图 1. IPNV RT-LAMP 各温度扩增 60 min 凝胶电泳结果

3.2. LAMP 方法反应时间的确定

在 62 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下，分别进行不同反应时间的 IPNV RT-LAMP 试验，反应结束后，将各扩增产物进行凝胶电泳分析，结果如图 2 所示，在 45~90 min 时间范围内，均能看见梯状特征条带，但 IPNV RT-LAMP 反应条带最亮的为 45 min 时所产生的。因此确定 IPNV RT-LAMP 反应的最佳条件为 62 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应 45 min。



M: DL2000 Marker; 1: 30 min; 2: 45 min; 3: 60 min; 4: 75 min; 5: 90 min.

Figure 2. Determination of the optimal time for the RT-LAMP

图 2. IPNV RT-LAMP 反应时间的优化

3.3. RT-LAMP 反应结果判定方法

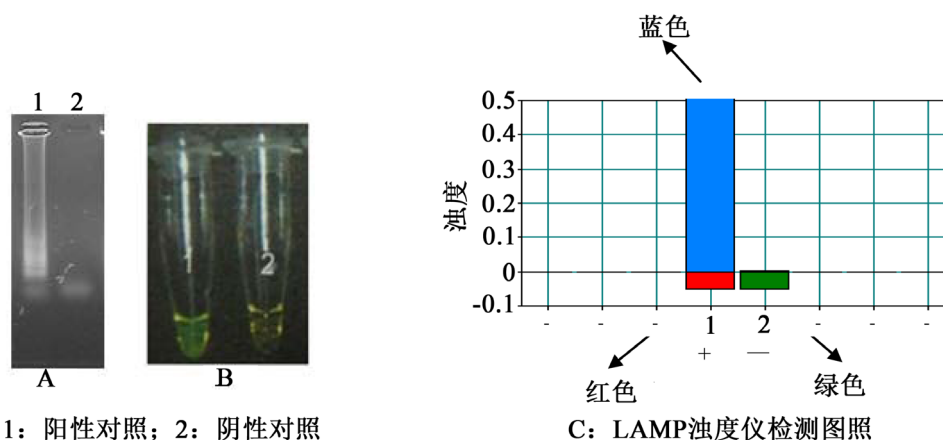
方法 1: 通过琼脂糖凝胶电泳判读结果: 取扩增产物 8 μ L 进行凝胶电泳, 紫外投影下观察, 靠近点样孔出现拖尾, 远离点样孔出现梯度条带的样品判为阳性, 阴性对照中, 反应后反应液未显示有扩增条带。

方法 2: 通过观察荧光颜色变化判读结果(荧光显色法): 在反应管中加入双链 DNA (dsDNA)染料 Pico Green, 阳性样品中, 反应后的反应液显示绿色荧光, 阴性对照中, 反应后的反应液显示浅橙色荧光。

方法 3: 通过检测浊度变化判读结果: 反应温度为 65 $^{\circ}$ C, 从反应开始时刻即通过 Loopamp 浊度仪 (厂家: 日本荣研化学株式会社; 型号: LA-320C; 参数: 光源为 ED (波长 650 nm), 检出器为光电二极管, 温度调节范围为区域(55 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C)、光罩(65 $^{\circ}$ C~90 $^{\circ}$ C), 测定间隔为 6 秒)检测反应液, 实时检测 60 分钟。

LAMP 浊度仪检测图见图 3(C) (横坐标 1 为阳性反应管; 横坐标 2 为阴性对照管; 当反应为阳性扩增时候模块的颜色转变为红色, 如果未发生扩增, 则模块的颜色仍旧为绿色)。

将 1 个阳性样品和一个阴性样品按优化后的 RT-LAMP 反应程序进行反应, 通过以上三种方法来判定 RT-LAMP 反应结果(结果如图 3)。结果表明, 用这三种方法判定 RT-LAMP 的扩增产物, 其结果是一致的, 阳性和阴性之间的区别十分明显, 可以把这三种方法作为 RT-LAMP 扩增结果判定的方法。



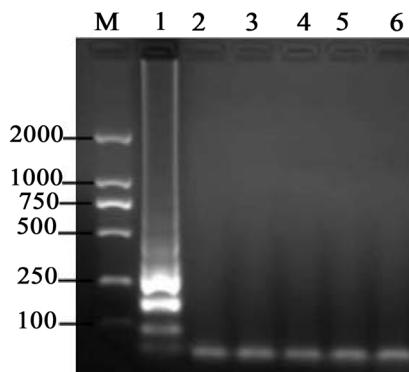
1: 阳性对照; 2: 阴性对照

Figure 3. Result determination of IPNV RT-LAMP

图 3. IPNV RT-LAMP 结果判定

3.4. LAMP 引物组合物的特异性试验

提取 IPNV (传染性胰脏坏死病毒)、IHNV (传染性造血器官坏死病毒)、SVCV (鲤春病毒)、VHSV (病毒性出血性败血症病毒)和 ISA (传染性鲑鱼贫血症病毒)的 RNA 作为模板进行 RT-LAMP 反应, 进行 RT-LAMP 特异性试验, 结果表明, 该 LAMP 引物组合物只对 IPNV 进行了特异性的扩增, 与其他病毒无交叉反应, 结果见图 4。



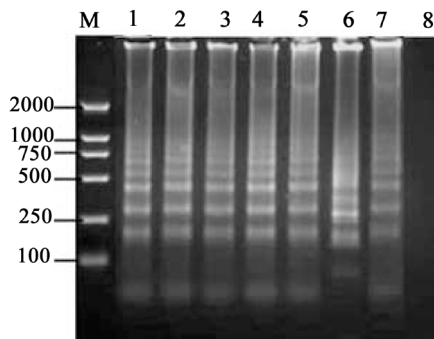
M: Marker DL2000; 1: IPNV; 2: IHNV; 3: SVCV; 4: VHSV; 5: ISA; 6: Negative control.

Figure 4. Specificity for detection of IPNV by RT-LAMP

图 4. IPNV RT-LAMP 检测的特异性试验

3.5. LAMP 引物组合物的灵敏度试验

利用本研究得到的最佳反应条件对人工感染带有典型病症的病鱼样品提取的 RNA 进行扩增, 10 倍稀释 RNA 进行 RT-LAMP 灵敏性试验, 检测结果如图 5 所示, 随着模板 RNA 浓度的降低, 特征性条带的亮度也减弱, 检测结果为阳性的最大稀释度为 10^{-8} , 相应的灵敏度为 0.01 pg RNA。



M: Marker DL2000; 1: 10^0 ; 2: 10^{-1} ; 3: 10^{-2} ; 4: 10^{-3} ; 5: 10^{-4} ; 6: 10^{-5} ; 7: 10^{-8} ; 8: 10^{-9} .

Figure 5. Sensitivity for detection of IPNV by RT-LAMP

图 5. IPNV RT-LAMP 的灵敏度试验

3.6. 样本检测

收集沈阳、本溪、丹东、朝阳、葫芦岛、东港等地区的 60 份样品, 同时采用 RT-LAMP 方法和常规的 PCR 方法进行检测。检测结果见表 3。结果表明: 11 份样品采用 RT-LAMP 方法和 PCR 方法检测均为阳性; 47 份样品均为阴性; 1 份样品 PCR 检测为阳性, RT-LAMP 检测为阴性; 1 份样品经 PCR 检测为阴性, 经 RT-LAMP 方法检测为阳性。由此可计算出: 本研究建立的 RT-LAMP 方法灵敏度为: $11/(11 + 1) \times 100\% =$

91.67%，特异性为： $47/(47 + 1) \times 100\% = 97.92\%$ ，与常规 PCR 方法的符合率为： $(11 + 47)/60 \times 100\% = 96.67\%$ 。这些数据表明，IPNV RT-LAMP 方法具备良好的特异性和敏感性，适用于传染性胰脏坏死病毒的检测及疫病诊断。

Table 3. Results of clinical samples

表 3. 临床样本检测结果

		RT-PCR 方法		总数
		阳性	阴性	
RT-LAMP 方法	阳性	11	1	12
	阴性	1	47	48
	总数	12	48	60

4. 讨论与结论

本研究建立的针对 IPNV 的 RT-LAMP 检测技术，经试验结果显示，IPNV RT-LAMP 特异性良好，与 IHNV (传染性造血器官坏死病毒)、SVCV (鲤春病毒)、VHSV (病毒性出血性败血症病毒)和 ISA (传染性鲑鱼贫血症病毒)均无交叉反应，只与目标病原 IPNV (传染性胰脏坏死病毒)有扩增反应；灵敏度试验显示，IPNV RT-LAMP 技术检出低限为 0.01 pg IPNV RNA，具备较高的灵敏性，适用于水生动物疫病传染性胰脏坏死病的检测与监测。

在 LAMP 反应体系中，包括模板在内的各反应组分浓度都应该维持在一定合理范围内，进而保持整个反应体系的平衡。如果模板浓度过高，其 LAMP 反应的其他原料(包括 Bst DNA 聚合酶，反转录酶，2× 反应缓冲液(RM)，正向外引物 F3，反向外引物 B3，正向内引物 FIP 及反向内引物 BIP)分配于每块模板 (RNA 模板)的量相对就低很多，有时候甚至要很多模板去竞争一份原料。当进行 LAMP 反应时，就会很容易出现非特异性扩增，从而出现假阳性结果。灵敏性试验表明，应用 LAMP 技术可检测出 IPNV RNA 在 1.0 μg 的模板含量。由于水生动物疫病病原感染特点，水生动物病毒在宿主中的含量不会很高，本研究建立的 RT-LAMP 方法的 1.0 μg IPNV RNA 模板含量已经超出了实际样品中 IPNV 的感染量，所以，利用本 LAMP 方法，无需对待检样品的 RNA 浓度进行调整，样品 RNA 提取后，直接进行 LAMP 反应即可，既提高了反应效率，又加快了反应速度，更适合现场及野外样品的检测，符合了 LAMP 技术本身具备的反应快速简便的特点，检测结果可通过颜色变化即可做出判断，本研究建立的 IPNV RT-LAMP 方法具有特异性强、灵敏度高、快速简便、易于判断的特点，适用于基层单位及野外现场快速检测，为传染性胰脏坏死病毒的检测与诊断增添了重要的技术手段。

基金项目

辽宁省自然科学基金项目(20180551285)、原国家质检总局科研项目(2015IK165)、(2016IK156)。

参考文献

- [1] 王旭, 颜其贵, 雷燕. 鱼类传染性胰腺坏死病的病毒学特征、诊断及防治研究[J]. 水产科学, 2010, 29(9), 559-562.
- [2] 赵永欣, 刘巍巍, 刘敏. 传染性胰腺坏死病的诊断与防治[J]. 科学养鱼, 2011(2): 51-53.
- [3] Alonso, M., Rodriguez, S. and Prieto, S.I.P. (1999) Nested PCR Improves Detection of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Cells Coinfected with Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Journal of Virological Methods*, **81**, 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00048-8](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00048-8)
- [4] Cutrin, J.M., Lopez-Vazquez, C., Oliveira, J.G., et al. (2005) Isolation in Cell Culture and Detection by PCR-Based Technology of IPNV-Like Virus from Leucocytes of Carrier Turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **28**, 713-722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00675.x>