

超分支滚环扩增试纸检测对虾黄头病毒*

赵玉然¹ 尹伟力² 谭乐义¹ 李 诺³
岳志芹¹ 房保海¹ 王官璞¹

(1. 山东出入境检验检疫局 青岛 266000;
2. 烟台出入境检验检疫局 烟台 264000; 3. 东南大学 南京 210000)

摘要 依据对虾黄头病毒(Yellow head virus, YHV)的非结构蛋白 N 基因序列,设计特异的锁式探针(Padlock probe, PLP)、检测探针及引物,建立 YHV 超分支滚环扩增(Hyper-branched rolling circle amplification, HRCA)检测试纸。灵敏度实验显示, YHV HRCA 检测试纸能检测出的最低模板量为 10^1 拷贝,是 RT-PCR 灵敏度的 100 倍。特异性实验结果表明,该试纸能够特异性地对 YHV 进行检测。利用该检测试纸对进出口 80 批次虾样本进行检测,并将检测结果与常规 RT-PCR 相比较,结果显示, YHV HRCA 检测试纸灵敏度方面优于常规 RT-PCR 方法,且操作简便、结果直观易读。

关键词 对虾黄头病毒;超分支滚环扩增法;锁式探针;检测试纸

中图分类号 S945.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)05-0100-08

黄头病(Yellow head disease, YHD)是由黄头病毒(Yellow head virus, YHV)引起的一种对虾疾病,该病与对虾白斑病(White spot syndrome virus, WSSV)、桃拉综合征(Taura syndrome virus, TSV)并称为“影响世界对虾养殖业的三大病害”(OIE, 2015)。黄头病毒属于黄头症候群病毒(Yellow head complex of viruses)基因 I 型,是黄头病的唯一病原(Lightner, 1996),为单正链 RNA 病毒,毒力较强,对虾被感染后 3-5 d 内可全军覆灭(OIE, 2015),世界动物卫生组织(International Epizootic Office, OIE)将黄头病列为必须进行疫情上报的疫病,我国农业部也将黄头病列为水生动物二类疫病。OIE 水生动物疫病诊断手册(OIE, 2015)认为,在虾生活周期全过程中适用于 YHD 检测、诊断和确诊的分子生物学方法仅有 PCR 方法(RT-PCR 或巢式 RT-PCR)与核酸测序,但这两种方法操作复杂繁琐、测序确证周期较长、成本较高,需要昂贵仪器和熟练的操作人员,检测场所也局限于有条件的实验室中,不能满足现场快速检测的需要。

超分支滚环扩增(Hyper-branched rolling circle amplification, HRCA)技术是 Lizardi 等(1998)在线性

滚环扩增的基础上建立起来的,该方法需要设计特异性的锁式探针(Padlock probe, PLP)(Nilsson *et al*, 1994)及 1 对通用引物,通用引物可识别锁式探针并与锁式探针的滚环扩增产物相结合,当 DNA 聚合酶存在且发挥作用时,实现对锁式探针的 HRCA,扩增效率高,在 1 h 内扩增效率可达到 10^9 拷贝(Prins *et al*, 2008; Zhou *et al*, 2004),从而实现检测信号的放大。由于其高敏感性、特异性,HRCA 技术已开始应用于单核苷酸多态性研究(Pickering *et al*, 2002; Cheng *et al*, 2008)、细胞原位检测(Christian *et al*, 2001)、DNA 芯片检测(Nallur *et al*, 2001; Prins *et al*, 2008)和免疫芯片检测(Zhou *et al*, 2004)等方面。HRCA 检测试纸技术是在 HRCA 检测技术的基础上增加了一个生物素标记的检测探针,从而将 HRCA 技术与试纸显色技术相结合,从而实现 HRCA 检测结果的直观、可视化处理。

本研究旨在依据 YHV 基因保守核苷酸序列,设计特异的锁式探针及引物,通过优化 HRCA 条件,构建特异、准确的黄头病毒 HRCA 检测技术体系,并在此基础上制备 YHV HRCA 检测试纸,可望为对

* 国家科技支撑计划(2012BAK11B04)和国家质检总局科研项目(2015IK195)共同资助。赵玉然, E-mail: ran-007@163.com
收稿日期: 2015-09-16, 收修改稿日期: 2015-11-11

虾黄头病毒病害的动态检测和控制提供一种新的分子检测技术。

1 材料与方法

1.1 核酸来源

YHV 及其用于特异性分析的 WSSV、TSV、传染性皮下及造血器官坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)均为山东出入境检验检疫局技术中心实验室保存样本。

1.2 主要试剂

1.2.1 商业化试剂 本实验所采用的所有引物、探针均由 Invitrogen 公司合成; 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、*ExTaq* DNA 聚合酶混液、Triton X-100、 T_4 DNA 连接酶(含 $10\times$ 缓冲液)、one-step RT-PCR 试剂盒、DL2000 分子标记均购自 TaKaRa 公司; *Bst* DNA 聚合酶大片段(含 $10\times$ 缓冲液)购自 New England Biolabs 公司, Qiagen 快速凝胶提取试剂盒购于 Qiagen 公司; 辣根过氧化物酶(Horse radish peroxidase, HRP), 四甲基联苯胺(Tetramethylbenzidine, TMB)购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2.2 实验室配制的试剂 变性液: 0.4 mol/L NaOH 溶液, 25 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液; 杂交缓冲液: $1\times$ 柠檬酸钠缓冲液(SSC), 0.1% 十二烷基硫酸钠溶液(SDS); 洗液: $0.5\times$ SSC、 0.1% SDS; 缓冲液 A: 磷酸盐缓冲液(PBS)、 137 mmol/L NaCl 溶液、 2.7 mmol/L KCl 溶液、 1.4 mmol/L KH_2PO_4 溶液、 4.3 mmol/L Na_2HPO_4 溶液、体积分数 0.3% Triton X-100 溶液, $\text{pH}=7.4$; 缓冲液 B: 缓冲液 A、 1 mol/L 尿素溶液、 $1\text{ g}/100\text{ ml}$ 硫酸葡聚糖溶液; 缓冲液 C: 100 mmol/L 柠檬酸钠, $\text{pH}=5.0$ 。

1.3 实验方法

1.3.1 锁式探针和引物的设计 根据 YHV 非结构蛋白 N 基因序列(GenBank Access No. FJ848674)设计锁式探针两端的特异识别序列(表 1 锁式探针大写字母序列), 使两端的特异识别序列与单链模板结合后

紧密相邻, 两端特异性识别序列中间的连接部分为 pNAK1 质粒中的一段核酸序列(表 1 锁式探针小写字母序列), 连接部分序列根据特异识别序列进行适当修改。锁式探针与模板的结合见图 1。

YHV 基因 RT-PCR 特异扩增引物对为上游引物 YNS1F 和下游引物 YNS1R, 特异性检测引物对为上游引物 YHV-F 和下游引物 YHV-R, WF1、WF2 为经生物标记的检测通用引物, 检测探针序列为锁式探针 2 个特异性末端与模板相结合的衔接区域, 各序列详见表 1。

1.3.2 标准品的制备 用引物 YNS1F/YNS1R 对 YHV 基因组 RNA 进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 1.5% (m/V)琼脂糖凝胶电泳分离后, 目的扩增条带用 Qiagen 快速凝胶提取试剂盒纯化, 回收后连接改造后的 pGEM-T 载体(肖性龙等, 2011)制备重组质粒, 转化大肠杆菌进行克隆增殖。利用 T7 体外转录试剂盒转录该重组质粒, 并获得大量 RNA 核酸标准物质, 测定 OD 值, 计算拷贝数, 梯度稀释后作为标准品。

1.3.3 锁式探针连接反应条件的优化 最佳探针浓度的确定: 分别设置 4 个浓度梯度的锁式探针即 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 100 nmol/L 、 10 nmol/L 、 1 nmol/L , 连接体系为锁式探针 $1\text{ }\mu\text{l}$, T_4 DNA 连接酶 $1\text{ U}/\mu\text{l}$, $10\times T_4$ DNA 连接酶缓冲液 $1\text{ }\mu\text{l}$, 10^5 拷贝/ μl 模板 RNA $2\text{ }\mu\text{l}$, 加去离子水至反应总体积 $10\text{ }\mu\text{l}$ 。反应条件为: 94°C 5 min

表 1 引物及序列探针
Tab.1 Primers and probe sequences

名称 Name	序列 Sequence (5'-3')
YNS1F	TGAACCGCCGTACACGCATCGCAAC
YNS1R	TTATGATTGTGTTTCCATGGGTTTCG
YHV-F	TACACGCATCGCAACTCC
YHV-R	TGAACGCTTTGGCAGAAT
PLP	TTGAGGAATCTCGATGAGCCtgactgctga atccgttagccagcagccgctcgacgaattt ctgccattcacccttattatcacttattcaggcgtagcaccag CGCGTTCGACTGCGAAGGA
YHV Probe	TTTTTTTTTCTCAATCCCTTCGCAGTCG
WF1	BAS-CTGGTGCTACGCCTGAATAAGTG A
WF2	BAS-GCTGAATCCGTTAGCCAGCAG

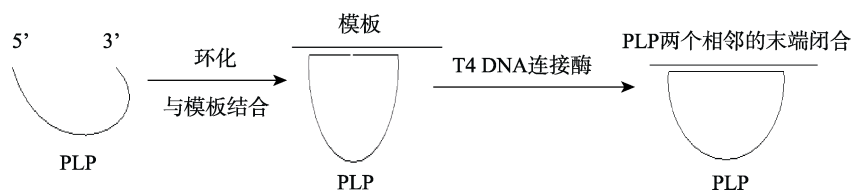


图 1 锁式探针与靶序列的连接(刘青杰等, 2007; Tsui *et al*, 2010)

Fig.1 The connection of PLP and target

后迅速置于冰上, 2 min 后加 T₄ DNA 连接酶, 37℃ 连接 1 h, 最后 65℃ 10 min 终止连接反应。

最佳连接时间的确定: 参照上述反应体系和反应条件, 在最佳探针浓度条件下, 37℃ 下分别连接 10、20、30、40、50、60 min 以确定最佳的连接反应时间。

1.3.4 HRCA 反应条件的优化 HRCA 反应体系: dNTPs 0.4 mmol/L, WF1 0.4 μmol/L, WF2 0.4 μmol/L, Tris-HCl (pH=8.8) 20 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO₄ 6.5 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 10 mmol/L, 0.1% Triton X-100, 2 μl 连接产物与 8 U *Bst* DNA 聚合酶大片段, 加 dH₂O 使反应体系总体积为 25 μl。61℃ 分别扩增 10、20、30、40、50、60、70、80 min, 以确定最佳扩增时间, 95℃ 10 min 终止反应。反应产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 若条带呈阶梯状, 则表示该样品为 YHV 阳性, 反之为阴性。

1.3.5 检测试纸的制备及检测 将 3 μl 检测探针与 17 μl 变性液室温下混匀 5 min, 取 5 μl 点于硝酸纤维素膜上, 室温下自然晾干, 每个点样点可重复多样 2-3 次, 每个点设置 3 个平行对照; UV 光源下(波长 254 nm, 强度 60-120 mJ/cm²)照射使 DNA 固定在膜上; 37℃ 条件下, 用脱脂奶粉(5 g/100 ml)封闭 1.5 h, 备用。

检测试纸按如下流程进行操作: 将试纸放入 5 ml 预热的杂交缓冲液与扩增产物的混合溶液中, 60℃ 温浴 2 h; 将试纸转移至 50 ml 预热洗液中, 60℃ 震荡 15 min; 取出试纸, 室温下放入缓冲液 A 中, 加入 1:2000 稀释的 HRP-标记链霉亲和素, 反应 10 min; 试纸转移至缓冲液 B 中, 室温下漂洗 5 min; 试纸转移至缓冲液 C 中, 室温下浸泡 5 min; 加入 TMB 显色 1-20 min, 而后终止反应并观察结果。试纸检测结果也采用 Gelpro 图像分析软件进行 dot 值分析。

1.3.6 检测试纸的特异性与灵敏度分析 取 YHV、TSV、IHHNV 和 WSSV 的核酸, 用建立的检测试纸分别对 4 种病毒进行检测, 验证其特异性。取标准品 10⁰-10⁵ 拷贝/μl 浓度梯度的核酸分别作为模板, 进行连接和扩增反应, 产物经试纸检测, 显色后采用 Gelpro 图像分析软件进行 dot 分析, 检测试纸的灵敏度。将该检测试纸灵敏度与常规 RT-PCR 方法进行比较, 常规 RT-PCR 采用 one-step RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa), 反应条件为: 扩增反应为 25 μl 体系, 包含 10 mmol/L 引物 YHV-F、YHV-R 各 1 μl, PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 1 μl, 2×1 step buffer 12.5 μl, dH₂O 7.5 μl, YHV 病毒基因组 RNA 2 μl, 反应经 50℃ 30 min 后, 94℃ 1 min, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 反应 2 min, 反应 30 个循环, 而后 72℃ 延伸 10 min, 扩增产物经 2%(m/v) 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.7 试纸检测方法的实际应用 利用建立的 YHV 超分支环试纸对 80 批次采集的虾样本进行检测(按照表 3 中各种虾的明细进行修改), 其中, 中国对虾样本(*Fenneropenaeus chinensis*) 30 批次、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 16 批次、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 4 批次, 泰国与越南进口斑节对虾、凡纳滨对虾共 20 批次, 澳大利亚进口斑节对虾、墨吉尔虾(*Penaeus merguensis*) 共 10 批次。将 HRCA 试纸的检测方法与常规 RT-PCR 方法的结果对比, 比较 2 种检测方法的优越性。

2 结果与分析

2.1 最适锁式探针浓度的确定

按照 1.3.3 所述的锁式探针连接反应体系和条件, 其中, 设置 4 个磷酸化锁式探针浓度进行连接反应, 反应 1 h 后, 以 1.3.4 中所述体系进行 HRCA 反应。结果显示, 锁式探针浓度 ≥ 100 nmol/L 时, HRCA 反应产物电泳结果条带亮度相近且清晰可见, 低于这个浓度扩增带模糊不清, 确定该浓度为最佳探针浓度(图 2)。

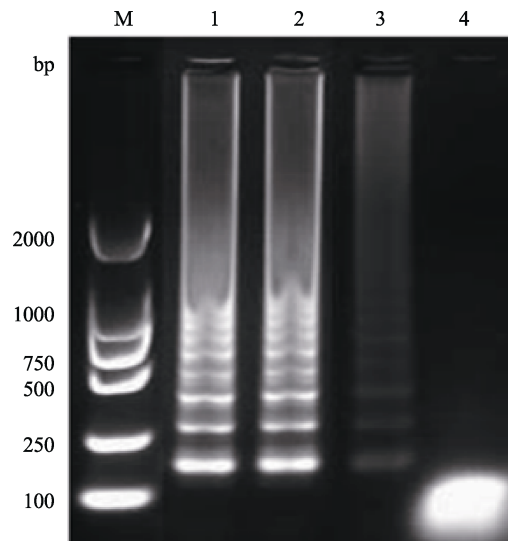


图 2 YHV 最优锁式探针浓度的确定

Fig.2 Optimization of the PLP concentration for YHV

M: DL2000 分子标记 Molecular Marker; 1: 10 μmol/L; 2: 100 nmol/L; 3: 1 nmol/L; 4: 10 pmol/L

2.2 锁式探针连接时间的确定

按照 1.3.3 所述的锁式探针连接反应体系和条件, 进行连接反应以确定最优连接时间, 锁式探针的浓度为 100 nmol/L, 并设置 6 个连接反应时间, 反应结束后, 以 1.3.4 中所述体系进行 HRCA 反应。结果

显示,当探针连接时间 ≥ 30 min 时,HRCA 反应产物电泳结果条带亮度相近且清晰可辨,确定最佳连接时间为 30 min(图 3)。

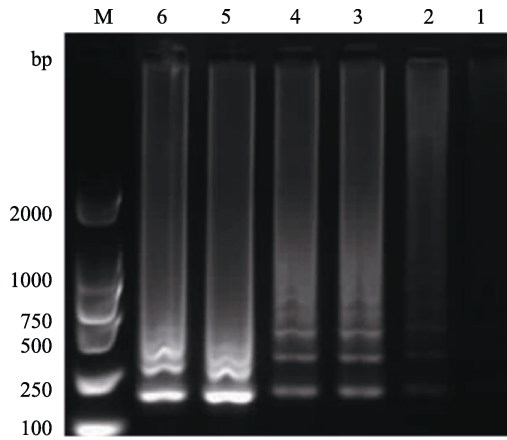


图 3 锁式探针最适连接时间的确定
Fig.3 Optimization of the PLP connection time for YHV
M: DL2000 分子标记 Molecular Marker; 1-5: 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min respectively

2.3 HRCA 最优反应条件的确定

当模板浓度为 10^5 copies/ μ l、锁式探针浓度为 100 nmol/L 时,锁式探针连接 30 min, 61 $^{\circ}$ C 条件下,在 8 个不同反应时间进行 HRCA,产物经电泳观察,当时间 ≥ 30 min 时,条带亮度相当且清晰可见(图 4)。因此,确定 30 min 为 HRCA 的最优反应时间。

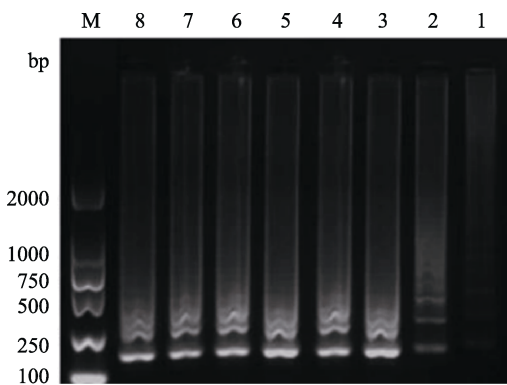


图 4 HRCA 反应条件的优化
Fig.4 The optimization of reaction conditions of HRCA
M: DL2000 分子标记 Molecular Marker; 1-8: time of the HRCA 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 min respectively

2.4 特异性验证

YHV HRCA 试纸特异性检测结果显示,该试纸仅对 YHV 有检出,并且与其他 3 种病毒无交叉反应,说明本方法能够保证 YHV 病毒的特异性检测(图 5)。

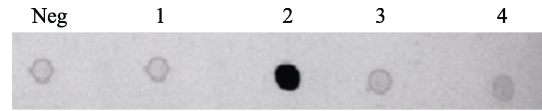


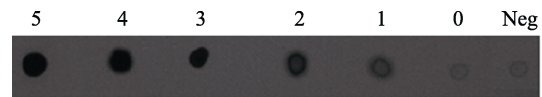
图 5 YHV HRCA 试纸的特异性检测
Fig.5 The specificity test for YHV HRCA test strip
1-4: IHHNV, YHV, TSV, and WSSV respectively;
Neg: 阴性对照 Negative control

2.5 灵敏度验证

通过对检测试纸斑点的颜色变化和斑点值的分析得出,当样本浓度为 10 copies/ μ l 时,试纸仍可检出与阴性对照有明显差异的着色斑点,而 RT-PCR 方法的结果则无明显扩增带;当样本浓度为 1 copy/ μ l 时,试纸虽肉眼可见微弱着色斑,但与阴性对照差异不大,通过核酸样本的斑点扫描结果(表 2),可判定为阴性。因此,本检测方法的灵敏度为 10 copies/ μ l,而常规 RT-PCR 方法的检测限为 1000 copies/ μ l,HRCA 试纸法比常规 PCR 方法高 2 个数量级(图 6)。

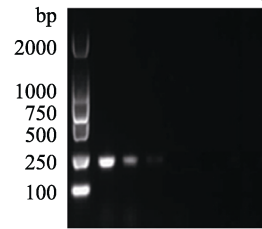
表 2 试纸检测 YHV 梯度核酸样本斑点的结果
Tab.2 The dot value of HRCA test strip for YHV

项目 Item	模板浓度 Concentration of template (Copies/ μ l)						Neg
	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	
Neg 斑点值 Dot value	107.33	76.34	42.19	26.42	7.97	0.62	0.59



(a)

M 5 4 3 2 1 0 Neg



(b)

图 6 YHV HRCA 试纸灵敏度验证
Fig.6 The sensitivity test for the HRCA test strip

(a)HRCA 检测试纸;(b)常规 RT-PCR; M: DL2000; 0-5 的模板浓度依次为 10^0 - 10^5 copies/ μ l
(a) HRCA test strip for YHV; (b) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR; M: DL 2000; 0-5: 10^0 - 10^5 copies/ μ l

2.6 实际应用

通过对 2014 年国内与进口共计 80 批次虾样本的

YHV 检测, 结果显示, 50 批次国内虾样本中 HRCA 试纸与 RT-PCR 检测结果一致, 均为 YHV 阴性; 30 批次进口虾中 2 批次呈 YHV 阳性, 阳性样本为越南进口斑节对虾, HRCA 试纸检测结果与 RT-PCR 结果一致, 见表 3。但其中 1 批次 YHV RT-PCR 阳性样品因扩增条带太弱, 不能进行测序确证, 另 1 组 YHV 阳性 RT-PCR 结果经测序确证无误。

3 讨论

本研究建立了灵敏度高、特异性好的 YHV HRCA 试纸检测方法, HRCA 的特异性是由锁式探针两端的特异、保守核酸序列所决定的, 该序列能够特异性地与目的病毒核酸序列相结合; 由于 HRCA 是在滚环扩增的基础上进一步进行双引物多分支扩增, 从而大大提高了扩增效率, 因此, 可以实现短时间内对检测信号的逐级放大, 从而提高了检测灵敏度, 通过对本实验建立的 YHV HRCA 试纸灵敏度、特异性的研究, 结果显示, 该方法灵敏度可以达到 10 个拷贝, 可以满足 YHV 常规检测的要求。在特异性实验中, 本研究选用 OIE 列出的 WSSV、TSV、IHHNV 虾类病毒, 这 3 种虾类病毒也是我国国家海域监控的主要虾类病害, 本研究结果表明, 3 种病毒与 YHV 检测方法均无交叉反应。

对于 HRCA 方法, 锁式探针的设计至关重要, 两端特异识别序列决定了反应的特异性, 并与假阳性和假阴性的产生密切相关, 锁式探针必须与模板正确结合、连接且形成闭合环状结构, 当锁式探针不能正常连接时, 会出现假阴性; 而当锁式探针在无特异模板存在的体系中完成连接, 则产生假阳性, 所以, 锁式探针能否与目的核酸序列正确连接决定了检测结果的成败(孔铖将等, 2011)。目前, 已报道的锁式探针的最适长度为 140 nt (Antson *et al*, 2000), 而本研究所设计的长度为 127 nt (由 88 nt 的连接序列和 39 nt 的两端特异识别序列组成), 二者长度接近。已有研究表明, HRCA 对锁式探针 5' 末端无严格特异性要求, 只需 3' 末端与目的核酸序列完全互补(Szemes *et al*, 2005), 本研究所设计的锁式探针的 5' 末端与 3' 末端 DNA 熔解温度(T_m)一致, 因而探针两端可以同时与模板结合, 具有一致性, 有利于提高检测的准确率。锁式探针的有效浓度范围一般为 4 pmol/L–1 μ mol/L (Lizardi *et al*, 1998; 黄冠军等, 2008; Thomas *et al*, 1999; Szemes *et al*, 2005; Tong *et al*, 2007), 本研究确立的锁式探针最适浓度为 100 nmol/L, 低于这个浓度的锁式探针扩增无明显条带, 也有文献报道或呈弥散状

(Szemes *et al*, 2005), 这可能是由于本底在 *Bst* DNA 聚合酶大片段的作用下扩增而干扰了环化探针扩增的结果, 有相关文献(Szemes *et al*, 2005; Tong *et al*, 2007; 郝振明等, 2010)采用核酸外切酶 IV 对未环化的锁式探针进行消化处理, 但本研究经前期条件摸索验证, 核酸酶处理前后效果差别不大, 且该方法会大大延长反应时间, 因此, 本研究未采用此方法。

本研究设计的锁式探针是由两端特异的保守序列和中间的链接区域组成, 链接区域选自一段 pNAK1 质粒的核苷酸序列, 该链接区域的优点是对多种不同的病毒进行检测时, 只需要设计两端的特异性核酸序列, 即可以利用 1 对通用引物, 实现对多种疫病的同时检测(刘青杰等, 2007), 为后续多病毒检测 HRCA 检测试纸的建立奠定了基础。

对于整个 HRCA 的反应, 反应温度是由 T4 DNA 连接酶和 *Bst* DNA 聚合酶决定, 这 2 种酶均为恒温反应酶, 与以 *Taq* 酶为基础的热循环反应方式相比, 不需要昂贵的热循环反应装置, 从而使得疫病检测更加经济化(彭姣等, 2013)。由于 T4 DNA 连接酶和 *Bst* DNA 聚合酶均为商业化的酶, T4 DNA 连接酶有其特定的最佳反应温度, 因此, 对于疫病检测反应条件的摸索相对比较简单, 而 *Bst* DNA 聚合酶的反应温度范围较广, 其中, 61–65℃ 的温度区间可能影响引物与环化探针的结合(Tsui *et al*, 2010)。本研究结果表明, *Bst* DNA 聚合酶在 3 个反应温度梯度(61℃、63℃、65℃)反应产物均无明显差异, 因而, 选用 61℃ 为最适 HRCA 反应温度。

HRCA 检测试纸是在 HRCA 反应的基础上, 设计检测探针, 利用检测探针与锁式探针的互补关系, 特异性识别并与目的 HRCA 产物相结合, 这样保证了 HRCA 试纸检测方法的特异性, 而后利用生物素标记的通用引物, 对检测结果进行了可视化处理。HRCA 检测试纸在保持 HRCA 方法高灵敏度、高特异性的基础上, 实现了检测结果的直接判读, 适合水生动物疫病的田间检测。

常规 RT-PCR 的检测是水生动物疫病 YHV 检测的金标方法, 该方法是针对靶标区域设计特异性引物进行序列扩增, 扩增范围内可能存在关键点突变(Wang *et al*, 2005), 因此, 在 OIE 水生动物疫病诊断手册中(OIE, 2015), 单纯的 RT-PCR 反应不能作为疫病确诊的依据, 必须与序列测定相结合使用, 大大延长了检测时间, 并增加了检测成本。与常规 RT-PCR 检测方法相比, YHV HRCA 检测试纸是利用探针与模板的互补关系来保证检测方法的特异性, 这一过程类似荧光定量 PCR 方法的探针与模板的结合过程,

表 3 两种方法的样品检测结果
Tab.3 The test results of the 80 YHV samples by two methods

编号 No.	来源 Source	种类 Species	HRCA RT-PCR	编号 No.	来源 Source	种类 Species	HRCA RT-PCR
1	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	41	福建 Fujian	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
2	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	42	福建 Fujian	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
3	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	43	福建 Fujian	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
4	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	44	福建 Fujian	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
5	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	45	福建 Fujian	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
6	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	46	福建 Fujian	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
7	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	47	福建 Fujian	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
8	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	48	福建 Fujian	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
9	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	49	福建 Fujian	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
10	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	50	福建 Fujian	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
11	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	51	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
12	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	52	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
13	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	53	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
14	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	54	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
15	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	55	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
16	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	56	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
17	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	57	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
18	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	58	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
19	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	59	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
20	烟台 Yantai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	60	泰国 Thailand	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
21	威海 Weihai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	61	越南 Vietnam	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
22	威海 Weihai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	62	越南 Vietnam	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
23	威海 Weihai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	63	越南 Vietnam	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
24	威海 Weihai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	64	越南 Vietnam	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
25	威海 Weihai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	65	越南 Vietnam	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	- -
26	威海 Weihai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	66	越南 Vietnam	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
27	威海 Weihai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	67	越南 Vietnam	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	42.44 +*
28	威海 Weihai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	68	越南 Vietnam	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	64.85 +
29	威海 Weihai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	69	越南 Vietnam	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
30	威海 Weihai	中国对虾 <i>F. chinensis</i>	- -	70	越南 Vietnam	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
31	广州 Guangzhou	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -	71	澳大利亚 Australia	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
32	广州 Guangzhou	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -	72	澳大利亚 Australia	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
33	广州 Guangzhou	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -	73	澳大利亚 Australia	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
34	广州 Guangzhou	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -	74	澳大利亚 Australia	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
35	广州 Guangzhou	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -	75	澳大利亚 Australia	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -
36	广州 Guangzhou	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -	76	澳大利亚 Australia	墨吉尔虾 <i>P. merguensis</i>	- -
37	广州 Guangzhou	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -	77	澳大利亚 Australia	墨吉尔虾 <i>P. merguensis</i>	- -
38	广州 Guangzhou	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -	78	澳大利亚 Australia	墨吉尔虾 <i>P. merguensis</i>	- -
39	广州 Guangzhou	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -	79	澳大利亚 Australia	墨吉尔虾 <i>P. merguensis</i>	- -
40	广州 Guangzhou	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	- -	80	澳大利亚 Australia	墨吉尔虾 <i>P. merguensis</i>	- -

+ : 阳性; - : 阴性; * : 弱阳性
+ : positive; - : negative; * : weak positive

具有高度特异性, 该特异性可以识别一个碱基的差异, 其特异性可以应用于单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)的分析(Prins *et al.*, 2008)。因此, 无需进行序列测定, 大大缩短了检测周期。

与 OIE 认可的基于核酸扩增的检测方法——常规 RT-PCR 方法和荧光定量 RT-PCR 方法相比, 本研究所建立的 YHV HRCA 方法及检测试纸无需逆转录过程, 反应检测周期短, 肉眼直接判读结果, 成本低廉, 在一定程度上满足了 YHV 田间检测的需要, 为对虾黄头病毒的早期诊断及鉴定提供了一种新的特异、可靠、快速的检测技术。

参 考 文 献

- 孔铖将, 史雨红, 黎昊雁, 等. 超分支滚环扩增法检测传染性脾肾坏死病毒. 2011, 30(9): 575-579
- 刘青杰, 陈德清. 滚环 DNA 扩增技术及其应用. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, 25(1): 5-9
- 肖性龙, 余以刚, 翟建新, 等. 含组氨酸纯化标签的假病毒表达载体的构建与应用. 中国生物化学与分子生物学报, 2011(7): 687-692
- 郝振明, 赵鑫, 吴孝槐. 超分支滚环扩增技术结合试纸法检测食品中多种转基因组分. 食品科学, 2010, 31(6): 263-266
- 黄冠军, 殷幼平, 张仑, 等. 柑桔溃疡病菌滚环扩增检测体系的建立. 微生物学报, 2008, 8(3): 375-379
- 彭姣, 王洪强, 李登峰, 等. HRCA 技术检测中华鳖虹彩病毒. 微生物学通报, 2013, 40(2): 341-349
- Antson DO, Isaksson A, Landegren U, *et al.* PCR generated padlock probes detect single nucleotide variation in genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): 596-604
- Cheng YQ, Li ZP, Zhang X, *et al.* Homogeneous and label-free fluorescence detection of single-nucleotide polymorphism using target-primed branched rolling circle amplification. *Anal Biochem*, 2008, 378(2): 123-126
- Christian AT, Pattee MS, Attix CM, *et al.* Detection of DNA point mutations and mRNA expression levels by rolling circle amplification in individual cells. *PNAS*, 2001, 98(25): 14238-14243
- Lightner DV. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1996
- Lizardi PM, Huang XH, Zhu ZR, *et al.* Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 225-232
- Nallur G, Luo CH, Fang LH, *et al.* Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(23): e118
- Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, *et al.* Padlock Probes: Circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science*, 1994, 265(5181): 2085-2088
- Office International Des Epizooties. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. [2015-7-20] <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>
- Pickering J, Bamford A, Godbole V, *et al.* Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, end-point detection of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12): 205-220
- Prins TW, Dijk JP, Beenen HG, *et al.* Optimized padlock probe ligation and microarray detection of multiple (non-authorized) GMOs in a single reaction. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 584
- Szemes M, Bonants P, Weerd MD, *et al.* Diagnostic application of padlock probes-multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(8): e70
- Thomas DC, Nardone GA, Randall SK, *et al.* Amplification of padlock probes for DNA diagnostics by cascade rolling circle amplification or the polymerase chain reaction. *Archives Pathology & Laboratory Medicine*, 1999, 123(12): 1170-1176
- Tong ZS, Kong FR, Wang B, *et al.* A practical method for subtyping of *Streptococcus agalactiae* serotype III, of human origin, using rolling circle amplification. *J Microbiol Methods*, 2007, 70(1): 39-44
- Tsui CK, Wang B, Khadempour L, *et al.* Rapid identification and detection of pine pathogenic fungi associated with mountain pine beetles by padlock probes. *J Microbiol Methods*, 2010, 83(1): 26-33
- Wang B, Potter SJ, Lin YG, *et al.* Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. *J Clinical Microbiol*, 2005, 43(5): 2339-2344
- Zhou HP, Bouwman K, Schotanus M, *et al.* Two-color, rolling-circle amplification on antibody microarrays for sensitive, multiplexed serum-protein measurements. *Genome Biol*, 2004, 5(4): R28

(编辑 冯小花)

The Detection of Yellow Head Virus by Hyper-Branched Rolling Circle Amplification Test Strip

ZHAO Yuran¹Ⓐ, YIN Weili², TAN Leyi¹, LI Nuo³, YUE Zhiqin¹, FANG Baohai¹, WANG Gongpu¹

(1. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266000;
2. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000; 3. Southeast University, Nanjing 210000)

Abstract In this study we aimed to develop an economical, visual-friendly, and portable test to detect yellow head virus (YHV) in field. Based on sequence of nonstructural protein N of YHV, a padlock probe (PLP), detection probe, and universal primers were designed. Subsequently the hyper-branched rolling circle amplification (HRCA) assay and the corresponding test strip were developed. The reaction time and temperature were optimized. Padlock probes were linked to the target sequence by T₄ DNA ligase at 37°C for 30 min, and reacted by *Bst* DNA polymerase large fragments at 61°C for 30 min. The test strip was then made using the detection probe. The serials diluted reference materials were used to examine the sensitivity of the YHV HRCA test strip, and the result was compared with that of the conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Three primary shrimp viruses including white spot syndrome virus, infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, and taura syndrome virus were used for the specificity test of the YHV HRCA test strip. Furthermore, the efficiency of the test strip was verified with 80 patches of 4 shrimp species collected in China and abroad, and the results were also compared with RT-PCR. The test results showed that the detection limit of the HRCA test strip was close to 10 copies/μl, which was 100-fold higher than RT-PCR. It was also shown that the test strip had a satisfying specificity for YHV, and there were no cross-reaction with white spot syndrome virus, infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, or taura syndrome virus. The overall YHV test results using the HRCA test strip were identical with RT-PCR, but the former was more convenient, sensitive, and easier to interpret in the field.

Key words Yellow head virus; HRCA; Padlock probe; Test strip

Ⓐ Corresponding author: ZHAO Yuran, E-mail: ran-007@163.com