

臭氧对赤点石斑鱼神经坏死病毒 RNA 破坏效果的评价方法的建立与应用*

李 晋^{1,2} 史成银^{1①} 王胜强^{1,2} 栗子丹^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 本研究依据赤点石斑鱼神经坏死病毒(Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV) RNA2 的序列, 在其 3'端设计反转录引物, 在 5'端设计 PCR 扩增引物, 构建了一种可以评价 RNA 链相对完整性的 RT-PCR 方法, 命名为 LR RT-PCR(Left reverse transcript Right amplify RT-PCR), 并对该方法的引物浓度、Mg²⁺浓度、dNTPs 浓度、退火温度 4 个重要参数进行了优化。结果显示, 优化后的 LR RT-PCR 反应体系为: 引物浓度 0.2 μmol/L、Mg²⁺浓度 4 mmol/L、dNTPs 浓度 0.5 nmol、退火温度 60℃。本研究建立的 LR RT-PCR 方法灵敏度高, 可以检出 1 pg 的 RGNNV RNA2 标准品; 该方法特异性强, 与 RSIV 等鱼类常见病毒、鳃弧菌等常见水产病原菌以及石斑鱼 RNA 均不产生交叉反应。应用建立的 LR RT-PCR 方法对臭氧破坏 RGNNV RNA2 的效果进行评价, 发现当臭氧浓度由 0.3 mg/L 依次增加为 0.5、1.0、2.0 mg/L 时, LR RT-PCR 的扩增产物逐渐减少, 直至消失。结果表明, 建立的 LR RT-PCR 方法可以快速、准确地评价臭氧对 RGNNV RNA2 的破坏效果, 适用于养殖场评估臭氧对 RGNNV 的消毒效果, 并对 RGNNV 进行检测和监控。

关键词 赤点石斑鱼神经坏死病毒; RT-PCR; 检测; 臭氧; 消毒

中图分类号 S943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0018-08

臭氧作为一种强氧化剂, 主要通过破坏病毒核酸并使其断裂, 从而达到杀灭病毒的作用(Roy *et al*, 1981; Shin *et al*, 2003; Thurston-Enriquez *et al*, 2005)。但是臭氧对病毒的杀灭效果, 除了细胞培养和动物感染法之外, 还没有合适的方法可以进行评价。对于单链 RNA 病毒, 国内外通常使用 RT-PCR 方法进行病毒检测, 即采用随机引物或反向特异性引物对病毒反转录, 然后选取部分反转录片段进行 PCR 扩增(Dalla *et al*, 2000; Grotmol *et al*, 2000; Mu *et al*, 2013)。但是, 被臭氧处理后断裂的病毒 RNA, 虽然已失去感染活性, 随机引物仍可与之结合并启动反转录, 然后通过 PCR 获得扩增产物, 产生假阳性结果。利用反向特异

性引物进行反转录则更为局限, 只要断裂的病毒 RNA 上还存在 RT-PCR 目标扩增区域, 就可以被反向引物反转录成 cDNA 并继而进行 PCR 扩增。上述两类常规 RT-PCR 方法均不能区分完整和断裂的病毒核酸, 对于核酸链已断裂从而失活的病毒仍可扩增出阳性结果, 因此不能用于评价臭氧对病毒的杀灭效果(Rodriguez *et al*, 2009)。

赤点石斑鱼神经坏死病毒(Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)是一种单链 RNA 病毒, 隶属于野田村病毒科(Nodaviridae)、乙型野田村病毒属(*Betanodavirus*), 是海水养殖鱼类主要的病毒性病原之一(Thiéry *et al*, 2012)。该病毒呈世界性分

* 国家科技支撑计划课题(2012BAD17B01)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022012009)共同资助。

李 晋, E-mail: lj311@126.com

① 通讯作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-04-02, 收修改稿日期: 2014-06-17

布, 主要流行于东亚、东南亚等地区, 对我国福建、广东、海南以及台湾地区的养殖石斑鱼苗危害尤其严重, 患病鱼苗死亡率达 60%–100% (陈信忠等, 2004; 龚艳清等, 2006)。到目前为止, 由于缺乏有效的疫苗, 在赤点石斑鱼神经坏死病毒的防治方面, 主要利用臭氧对鱼卵进行消毒来阻断病毒的垂直传播 (Grotmol *et al*, 2000), 同时利用臭氧对养殖池以及工具的消毒来阻断水平传播。因此, 臭氧处理成为目前最常用且最有效的控制神经坏死病毒病的方法。

RGNNV 的基因组由两条正义单链 RNA 组成 (RNA1 和 RNA2), 其中 RNA2 全长为 1433 nt (Thiéry *et al*, 2012)。本研究设计了一种特殊的 RT-PCR 方法, 命名为 LR RT-PCR (Left reverse transcript Right amplify RT-PCR)。即在 RGNNV RNA2 的 3' 末端设计反转录引物, 在 5' 末端设计 PCR 引物, 通过 LR RT-PCR 可以将完整的和断裂的 RGNNV RNA2 进行区分。该方法的原理是, RNA 病毒核酸链 3' 端断裂则不能启动反转录, 5' 端或中间断裂虽能启动反转录但不能进行 PCR 扩增。因此, 断裂的 RNA 病毒核酸片段不能被扩增, 只有完整的 RNA 病毒核酸链才能得到扩增产物。本研究应用建立的 LR RT-PCR 方法对臭氧破坏 RGNNV RNA 的效果成功进行了评估。

1 材料与方法

1.1 实验用毒株和菌株

2012 年 8 月, 自某育苗场采集患神经坏死病的半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 鱼苗, 使用世界动物卫生组织 (OIE) 推荐的 RT-PCR 检测方法确认病原为 RGNNV 基因型, 命名为 RGNNV CsCN128 分离株。取患病鱼苗头部组织冻存于 -80°C 冰箱中备用。

用于测试本方法的灵敏度和特异性的青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 采集于育苗场中, 并通过 RT-PCR 检测方法确定其为 RGNNV 阴性。鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) (保藏编号: CGMCC7198)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) (保藏编号: CGMCC7197) 均为本实验室分离、鉴定和保存。流行性造血器官坏死病毒 (EHNV) 和真鲷虹彩病毒 (RSIV) 为本实验室保存。

1.2 引物设计

依据已测定的 RGNNV CsCN128 分离株 RNA2 核酸序列 (GenBank 检索号: KJ541748), 并参考已报道的 RGNNV 中国株 RNA2 核酸序列 (GenBank 检索

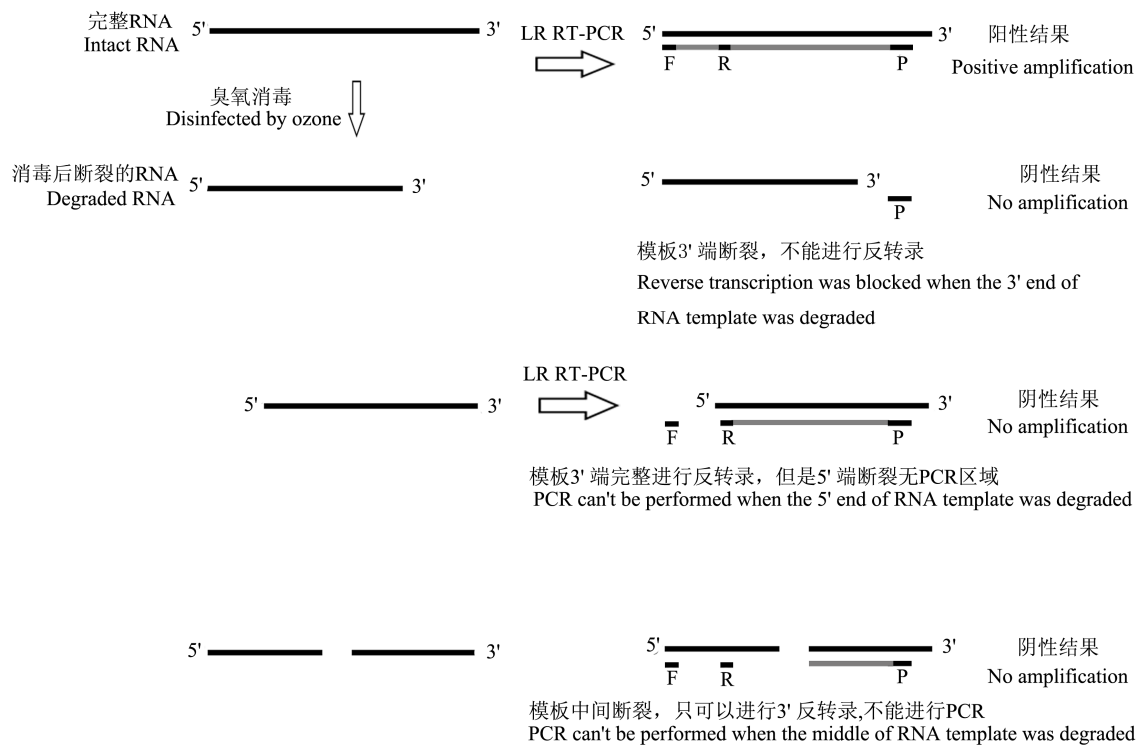


图 1 LR RT-PCR 方法的检测原理

Fig.1 The schematic diagram of LR RT-PCR

表1 实验所用引物及其序列
Tab.1 Primers used in this study

名称 Name	序列 Sequence (5'-3')	位置 Location	用途 Application
FL	TACGCAAAGGTGAGAAGAA	31-49	制备 RNA2 标准品
RL	CCAACAAGCCCAAAGAG	1345-1361	制备 RNA2 标准品
P	CGAGTCAACCTGGTGCAGACAG	1012-1034	LR RT-PCR 中 3'端反转录
F	CGACTGTGACTGGATTTGGAC	154-174	LR RT-PCR 中 5'端 PCR
R	GGTCGGACTGTTCTGCTTTC	486-505	LR RT-PCR 中 5'端 PCR
P1	CGAGTCAACACGGGTGAAGACAG	1012-1034	常规 RT-PCR 的反转录
P2	ACCGCTCCCATCATGACAAA	681-701	常规 RT-PCR 的 PCR
P3	AACAGGCAGCAGAATTTGACG	987-1007	常规 RT-PCR 的 PCR

号: EF558369), 在序列比对后, 选择保守区进行 LR RT-PCR 引物设计。共设计了 5 条引物 FL、RL、P、F、R, 其中 FL 和 RL 用于制作 RGNNV RNA2 标准品, P 用于从 RNA2 3'端启动反转录, F 和 R 用于 RNA2 cDNA 5'端的 PCR 扩增, 目标产物大小为 352 bp(图 1)。依据 Mu 等(2013)合成了检测 RGNNV 的常规 RT-PCR 引物, 包括反转录引物 P1、PCR 引物 P2 和 P3, 常规 RT-PCR 的目标产物大小为 327 bp。上述引物的序列及其在 RGNNV RNA2 上的位置见表 1。

1.3 RGNNV RNA2 标准品的制备

为保证检测方法的可靠性及稳定性, 本研究采用 RNA 体外转录技术制备了 RGNNV RNA2 标准品。具体方法: 取 1.1 中保存的病鱼头部组织 50 mg, 依据 RNAiso Plus 试剂(TaKaRa 公司)说明书提取总 RNA, 用 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen 公司)合成 cDNA 模板; 使用引物对 FL/RL 通过 PCR 扩增 RGNNV RNA2 并纯化、克隆入含 SP6 Promoter 的转录载体 T-Vector pMD20(TaKaRa 公司)中, 然后将阳性重组质粒转入 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆扩大培养, 提取重组质粒, 并使用 *EcoR* I (TaKaRa 公司)进行单酶切, 使质粒线性化, 然后使用 SP6 RNA Polymerase (TaKaRa 公司)进行体外转录, 转录产物经 DNase I 处理、酚/氯仿抽提后, 溶解于 DEPC 水中, 定量并保存于 -80℃ 冰箱中备用。

1.4 LR RT-PCR 方法反应体系的建立及参数优化

取 1.3 中制备的 RGNNV RNA2 标准品, 使用引物 P 反转录成 cDNA, 然后以引物对 F/R 进行 PCR 扩增。20 μ l 的反转录体系: 0.05-5 μ g RGNNV RNA2 标准品, 10 pmol 引物 P, TransScript RT/RI Enzyme Mix (TransGen 公司) 1 μ l, 2 \times TS Reaction Mix 10 μ l; 反转录程序为: 42℃ 保温 30 min, 85℃ 灭活 5min。

25 μ l 的 PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μ l、10 pmol 引物对 F/R、5 nmol dNTPs Mixture、25 pmol Mg²⁺、0.5 U *Ex Taq*、10 \times *Ex Taq* Buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μ l (TaKaRa 公司)。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果并拍照。

针对上述 LR RT-PCR, 分别进行了 PCR 扩增体系的引物浓度、退火温度、Mg²⁺浓度、dNTPs 浓度等 4 个参数的优化。其中引物终浓度分别为 0.80、0.60、0.40、0.20、0.10、0.05 μ mol/L, 退火温度分别为 62、60、58、56、54、52℃, Mg²⁺终浓度分别为 6、5、4、3、2、1 mmol/L, dNTPs 终浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L。通过比较扩增结果, 确定最佳反应参数。

1.5 LR RT-PCR 方法的灵敏度和特异性

取 1.3 中制备的 RGNNV RNA2 标准品, 10 倍梯度稀释为 10 ng/ μ l、1 ng/ μ l、100 pg/ μ l、10 pg/ μ l、1 pg/ μ l、100 fg/ μ l。各取上述稀释液 1 μ l, 依照 1.4 中优化得到的反应参数, 分别进行 LR RT-PCR 扩增, 测试该方法的检测灵敏度。

取 1.3 中制备的 RGNNV RNA2 标准品、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)基因组 RNA 以及鳃弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华氏菌、流行性造血器官坏死病毒、真鲷虹彩病毒等 6 种 DNA 样品, 依照 1.4 中优化得到的反应参数, 分别进行 LR RT-PCR 扩增, 测试该方法的特异性。

1.6 应用 LR RT-PCR 方法评价臭氧对 RGNNV RNA2 的破坏效果

1.6.1 不同浓度臭氧处理的 RGNNV RNA2 标准品

取 1.3 中制备的 RGNNV RNA2 标准品, 用 DEPC 水稀释成 10 ng/ μ l 的溶液, 然后用臭氧发生器(国林

公司)产生的臭氧进行处理 10 min。共设置 4 个实验组和 1 个对照组, 每组设两个平行。通过碘量法标定出各实验组的臭氧浓度分别为 0.3、0.5、1.0、2.0 mg/L, 对照组不用臭氧处理, 臭氧浓度为 0 mg/L。

1.6.2 LR RT-PCR 和常规 RT-PCR 的对比分析

使用本研究建立的 LR RT-PCR 及 Mu 等(2013)报道的检测 RGNNV 的常规 RT-PCR, 对上述臭氧处理的 RGNNV RNA2 标准品进行扩增, 使用 2% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果并进行比较分析。

2 结果

2.1 LR RT-PCR 反应体系和参数的优化

当退火温度分别为 62、60、58、56、54、52℃ 时, LR RT-PCR 的扩增结果见图 2-A。结果显示, 当退火温度为 60℃ 时, 目标扩增产物量最高。因此, 60℃ 是最佳退火温度。当 dNTPs 终浓度分别为 0.30、0.25、0.20、0.15、0.10、0.05 mmol/L 时, PCR 的扩

增结果见图 2-B, 结果显示, dNTPs 终浓度的变化对扩增结果影响不大。当 Mg^{2+} 终浓度分别为 6、5、4、3、2、1 mmol/L 时, PCR 扩增结果见图 2-C。可以看出, 目标扩增产物的量随着 Mg^{2+} 终浓度的减少呈现先上升后下降的趋势; 当 Mg^{2+} 终浓度为 4 mmol/L 时, 目标产物扩增量达到最大; 当 Mg^{2+} 终浓度在 1 mmol/L 时, 目标产物完全没有扩增。因此最佳的 Mg^{2+} 终浓度为 4 mmol/L。当 PCR 的引物终浓度为 0.80、0.60、0.40、0.20、0.10、0.05 μ mol/L 时, PCR 扩增结果见图 2-D。在引物浓度大于 0.2 μ mol/L 时, 目标扩增产物的量变化不明显; 但当引物浓度低于 0.2 μ mol/L 时, 扩增产物随着引物浓度的下降而明显减少。因此选择 0.2 μ mol/L 作为 PCR 反应的最佳引物浓度。

综合以上实验结果, 优化后的 PCR 反应体系: 在 25 μ l 的反应体积中, dNTPs 各 0.5 nmol, Mg^{2+} 终浓度 4 mmol/L, 引物终浓度为 0.2 μ mol/L, *Ex Taq* 0.5 U, DNA 模板 1 μ l。反应的退火温度为 60℃。

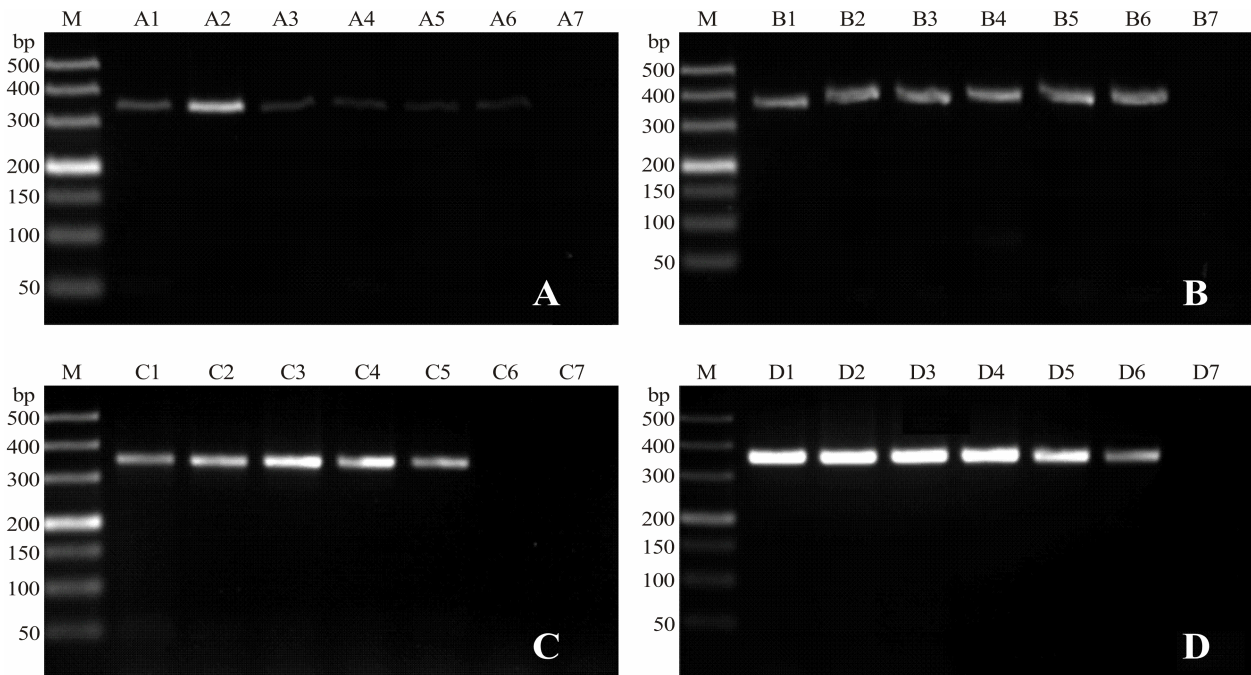


图 2 LR RT-PCR 中 PCR 各反应参数的优化

Fig.2 Amplification results in different PCR parameters of the LR RT-PCR

A. 退火温度; B. dNTPs 浓度; C. Mg^{2+} 浓度; D. 引物浓度

M: DL 500TM DNA Marker; A1-A6: 退火温度分别为 62、60、58、56、54、52℃; B1-B6: dNTPs 分别为 0.30、0.25、0.20、0.15、0.10、0.05 mmol/L; C1-C6: Mg^{2+} 终浓度分别为 6、5、4、3、2、1 mmol/L; D1-D6: 引物终浓度分别为 0.80、0.60、0.40、0.20、0.10、0.05 μ mol/L; A7、B7、C7、D7: 阴性对照

A. Annealing temperature; B. Concentration of dNTPs; C. Concentration of Mg^{2+} ; D. Concentration of primers

Lane M: DL 500TM DNA marker. A1-A6: the annealing temperature was 62, 60, 58, 56, 54, and 52℃, respectively; B1-B6: the concentration of dNTPs was 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, 0.10, and 0.05 mmol/L, respectively; C1-C6: the concentration of Mg^{2+} was 6, 5, 4, 3, 2, and 1 mmol/L, respectively; D1-D6: the concentration of primer was 0.80, 0.60, 0.40, 0.20, 0.10, and 0.05 μ mol/L, respectively. A7, B7, C7, and D7: Negative control

2.2 LR RT-PCR 检测方法的灵敏度及特异性

用梯度稀释的 RGNNV RNA2 标准品作为模板,测试 LR RT-PCR 方法的灵敏度,实验结果如图 3 所示。结果显示,随着标准品浓度的降低,LR RT-PCR 的扩增产物量逐渐减少。当标准品浓度为 10 ng/ μ l、1 ng/ μ l、100 pg/ μ l、10 pg/ μ l、1 pg/ μ l 时,均可以扩增出 352 bp 的目标片段。但当标准品浓度为 100 fg/ μ l 时,扩增结果为阴性(图3)。因此,该方法对 RGNNV RNA2 标准品的检测灵敏度为 1 pg/ μ l,相当于 8×10^3 个单链 RNA 模板可以被检出。

应用本研究建立的 LR RT-PCR 方法,对鳗弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华氏菌等常见水

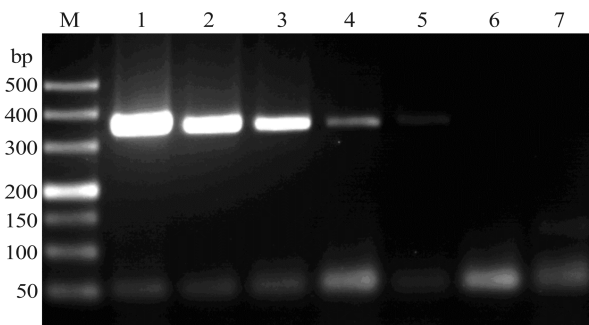


图3 LR RT-PCR 检测方法的灵敏度
Fig.3 The sensitivity of LR RT-PCR

M: DL 500TM DNA Marker; 1-6: 浓度分别为 10 ng/ μ l、1 ng/ μ l、100 pg/ μ l、10 pg/ μ l、1 pg/ μ l、100 fg/ μ l 的 RGNNV RNA2 标准品; 7: 阴性对照

Lane M: DL 500TM DNA marker; 1-6: the concentration of RGNNV RNA2 standard sample was 10 ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 100 pg/ μ l, 10 pg/ μ l, 1 pg/ μ l, and 100 fg/ μ l, respectively; 7: Negative control

产病原菌, EHNV、RSIV 等鱼类病毒, 以及健康青石斑鱼基因组 RNA、RGNNV RNA2 标准品等进行检测, 扩增结果见图 4。结果显示, 该检测方法可以从 RGNNV RNA2 标准品中扩增出目标产物, 不能从上述细菌、病毒及健康青石斑鱼基因组中扩增出产物。由此证明, 该 LR RT-PCR 方法对 RGNNV 具有特异性。

2.3 LR RT-PCR 和常规 RT-PCR 对臭氧破坏 RGNNV RNA 效果的对比分析

RGNNV RNA2 标准品经各浓度的臭氧处理后, 分别使用本研究建立的 LR RT-PCR 方法和文献报道的检测 RGNNV 的常规 RT-PCR 进行扩增, 电泳结果见图 5。结果显示, 对于未经臭氧处理的对照组(0 mg/L 组), 常规 RT-PCR 和 LR RT-PCR 的扩增产物量基本一致, 证明两种检测方法的扩增效率相差不大。臭氧浓度较低的两个实验组(0.3 mg/L 组和 0.5 mg/L 组)中, 常规 RT-PCR 扩增产物虽略有减少, 但与对照组相比均无显著性差异; 而这两组的 LR RT-PCR 扩增产物却比对照组显著减少。由此证明常规 RT-PCR 扩增产物量与臭氧处理相关性不明显, 不适用于评价臭氧对 RGNNV RNA 的破坏效果; LR RT-PCR 扩增产物量与臭氧处理的相关性高, 能更准确地判断臭氧对 RGNNV RNA 的破坏效果。此外, 随着臭氧浓度的升高, 即断裂 RNA 逐渐增加, 完整的 RNA 逐渐减少时, 两种 RT-PCR 的扩增产物虽然都逐渐减少, 但各实验组常规 RT-PCR 的扩增产物量均明显高于同组的 LR RT-PCR 的扩增产物量; 当臭氧浓度达到 2.0 mg/L 时, 常规 RT-PCR 方法仍有少量扩增产物, 而 LR RT-PCR 方法不能得到扩增产物。上述结果证明, LR RT-PCR 比常规 RT-PCR 能更灵敏地反映臭氧对 RNA 的破坏

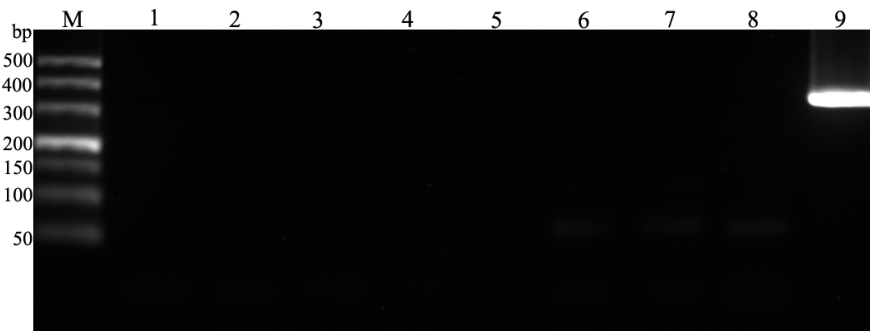


图4 LR RT-PCR 检测方法的特异性
Fig.4 The specificity of LR RT-PCR

M: DL 500TM DNA Marker; 1-9: 空白对照、鳗弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华氏菌、EHNV、RSIV、青石斑鱼基因组 RNA、RGNNV RNA2 标准品
Lane M: DL 500TM DNA marker; 1: Negative control; 2: *V. anguillarum*; 3: *V. harveyi*; 4: *V. parahaemolyticus*; 5: *E. tarda*; 6: EHNV; 7: RSIV; 8: *Epinephelus awoara* genomic RNA; 9: RGNNV RNA2 standard sample

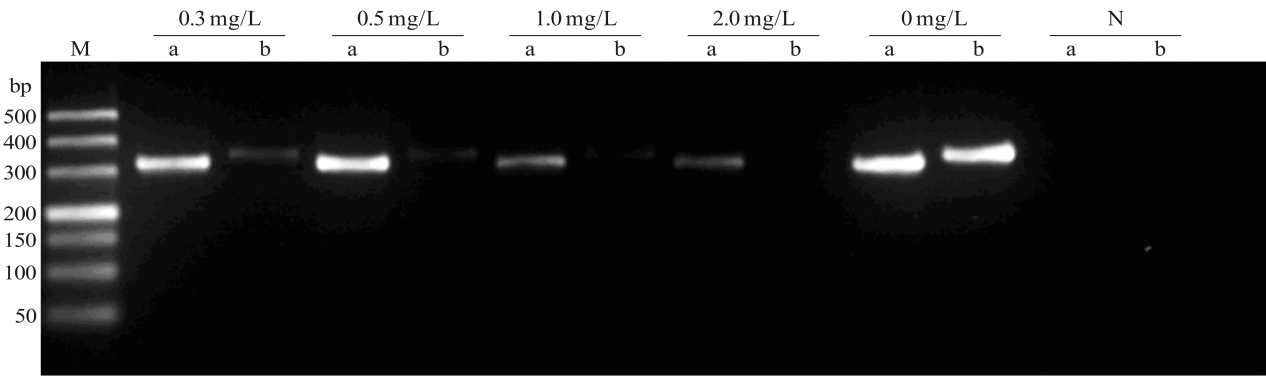


图 5 LR RT-PCR 和常规 RT-PCR 对臭氧破坏 RGNNV RNA 效果的对比分析

Fig.5 The comparison of LR RT-PCR and routine RT-PCR detecting the RGNNV RNA damage caused by ozone

a. 常规 RT-PCR; b. LR RT-PCR; N. 阴性对照
a. Routine RT-PCR; b. LR RT-PCR; N. Negative control

效果。

3 讨论

病毒性神经坏死病作为一种严重危害我国养殖石斑鱼仔鱼和幼鱼的流行性传染病,对其进行有效的防控是目前亟需解决的难题。我国广泛的水产苗种交易及引种育种升级(李巍等, 2006),更为该病的传播提供了良好的条件。由于刚孵化的仔鱼和幼鱼免疫系统未发育完全,无法使用疫苗对该病进行防控。因此,对鱼卵和育苗设施进行臭氧消毒,已成为降低该病发生率的重要手段。然而在育苗生产中,通常只能依靠统计鱼苗的孵化率及死亡率来判定臭氧对病毒的杀灭效果(Grotmol *et al*, 2000),费时费力且不够准确。总之,缺乏快速、有效的评估臭氧消毒效果的方法。

林克冰等(2011)用神经坏死病毒 RT-PCR 检测试剂盒测试了聚维酮碘、盐酸吗啉胍等化学药物对石斑鱼卵、轮虫、桡足类携带的病毒杀灭效果,但其未对试剂盒的灵敏度和准确性进行分析。

本研究设计的 LR RT-PCR 方法,从 RGNNV RNA2 的 3'末端进行反转录,对包含 RGNNV RNA2 5'末端序列的 cDNA 才进行 PCR 扩增,从而可以排除断裂的病毒 RNA 的干扰,仅对相对完整的病毒 RNA 进行 RT-PCR 扩增。实验结果证实,与未经臭氧处理的对照组(0 mg/L 组)相比, RGNNV RNA2 标准品被臭氧处理 10 min 后, 0.3 mg/L 和 0.5 mg/L 臭氧处理组的常规 RT-PCR 扩增产物量基本上没有变化,而各实验组的 LR RT-PCR 扩增产物量均大幅度减少甚至消失。考虑到 LR RT-PCR 和常规 RT-PCR 的扩增效率相差不大,上述结果表明因臭氧处理而断裂的 RNA 仍然能被常规 RT-PCR 扩增,即常规 RT-PCR 不

能有效区分完整的和断裂的病毒 RNA,不能用于评价臭氧对 RGNNV 的杀灭效果。相反, LR RT-PCR 不能扩增断裂的病毒 RNA,从而能可靠地判断 RGNNV RNA2 核酸链的完整性,可以用于评估臭氧对病毒 RNA 的破坏效果。

虽然在理论上可以设计 RT-PCR 引物对病毒 RNA 全长进行扩增,以此判断病毒 RNA 链的完整性。但在实际操作中,一方面由于病毒 RNA 序列的限制,多数情况下难以设计出合适的可扩增病毒 RNA 全长的 RT-PCR 引物;另一方面,即使勉强设计出这样的引物,扩增长序列的 RT-PCR 也存在扩增效率明显偏低,容易产生假阴性。本课题组实验研究也证实,对于有感染活性的样品,使用可扩增 RGNNV RNA2 全长的引物进行 RT-PCR,扩增结果全部为阴性(结果未展示),而 LR RT-PCR 检测结果为阳性。因此,扩增病毒 RNA 全长的 RT-PCR 方法并不适合用于评估臭氧对病毒 RNA 的破坏效果。

Thurston-Enriquez 等(2005)报道,使用臭氧对肠道腺病毒和猫杯状病毒进行消毒时, 0.3 mg/L 的臭氧即可有效灭活肠道腺病毒, 0.06 mg/L 的臭氧即可有效灭活猫杯状病毒。本研究显示,与未用臭氧处理相比,当臭氧浓度为 0.3 mg/L 时, LR RT-PCR 的扩增产物量明显减少;当臭氧浓度为 2 mg/L 时,观察不到扩增产物。这说明臭氧可以有效破坏单链 RNA, 2 mg/L 臭氧处理 10 min 即可对 RGNNV 有效灭活。

本研究建立的 LR RT-PCR 与常规 RT-PCR 相比,能有效地判断病毒核酸链的完整性,灵敏度高、可靠性强,可以用于评估臭氧对 RGNNV RNA 的破坏效果,并对 RGNNV 进行检测和监控。而且,通过设计特异性的 3'端反转录引物和 5'端 PCR 引物,该 LR

RT-PCR 方法还可以用于评估其他单链 RNA 病毒核酸链的完整性, 具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 林克冰, 方琼珊, 吴建绍, 等. 石斑鱼神经坏死病毒传播途径阻断的初步研究. 福建水产, 2011, 33(5): 15-19
- 陈信忠, 龚艳清, 苏永全, 等. 闽南地区紫石斑(*Epinephelus lanceolatus*)幼鱼爆发性传染病的病原学研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(4): 557-562
- 李巍, 胡红浪. 分析我国水产苗种产业发展规律预测未来发展趋势. 中国水产, 2006, 373(12): 66-70
- 龚艳清, 陈信忠, 王军, 等. 福建南部养殖石斑鱼暴发性疾病流行调查. 福建农林大学学报(自然科学版), 2006, 35(5): 532-537
- Dalla VL, Zanella L, Patarnello P, *et al.* Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. J Fish Dis, 2000, 23(5): 321-327
- Grotmol S, Totland GK. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. Dis Aquat Organ, 2000, 39(2): 89-96
- Grotmol S, Nerland AH, Biering E, *et al.* Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. Dis Aquat Organ, 2000, 39(2): 79-88
- Mu Y, Lin K, Chen X, *et al.* Diagnosis of nervous necrosis virus in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, by a rapid and convenient RT-PCR method. Acta Oceanologica Sinica, 2013, 32(10): 88-92
- Rodriguez RA, Pepper IL, Gerba CP. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(2): 297-307
- Roy D, Wong PK, Engelbrecht RS, *et al.* Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. Appl Environ Microbiol, 1981, 41(3): 718-723
- Shin GA, Sobsey MD. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(7): 3975-3978
- Thiéry R., Johnson KL, Nakai T, *et al.* Family Nodaviridae. In: Virus taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012, 1061-1066
- Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, *et al.* Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. Water Res, 2005, 39(15): 3650-3656

(编辑 冯小花)

Development and Application of the LR RT-PCR Method for Evaluating Destructive Effects of Ozone on Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus

LI Jin^{1,2}, SHI Chengyin¹①, WANG Shengqiang^{1,2}, SU Zidan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) is one major pathogen of aquaculture. It mainly affects the larvae and juveniles of groupers. RGNNV is composed of two single stranded RNA (RNA1 and RNA2). Ozone can inactivate RNA virus by degradation of viral genome. So treatment by ozone is a common measure to disinfect RGNNV in farms. But it has no efficient methods to evaluate the disinfection effect of ozone up to now. In this report, a special RT-PCR named as LR RT-PCR (Left reverse transcript Right amplify RT-PCR) was developed and optimized to evaluate degradation effects of RGNNV RNA2 by ozone. Based on the 3' end and 5' end of RGNNV RNA2, a special reverse transcription primer and a set of PCR primers were designed respectively. The concentration of primers, Mg²⁺, dNTPs as well as annealing temperature of LR RT-PCR was optimized in this study. The sensitivity and specificity of LR RT-PCR also were confirmed. Finally the LR RT-PCR method was used to evaluate degradation effects of RGNNV RNA2 by ozone. With summarizing the results of the experiment, in 25 μ l of reaction volume, the optimized parameters of LR RT-PCR were primers 0.2 μ mol/L, Mg²⁺ 4 mmol/L, dNTPs 0.5 nmol, *Ex Taq* 0.5 U and cDNA template 1 μ l. The annealing temperature was 60°C. The sensitivity of LR RT-PCR was 1 pg to RGNNV RNA2 and there were no cross reactions with genomic RNA from healthy groupers, DNA from common bacteria and viruses of aquaculture. Comparative analysis of LR RT-PCR and routine RT-PCR was carried out to evaluate the destructive effects by ozone. As the concentration of ozone increased from 0.3 mg/L to 2 mg/L in solution of RGNNV RNA2, the amplified product of LR RT-PCR decreased and finally was undetected. Former reported routine RT-PCR method for RGNNV detection did not reflect above tendency. This report demonstrated that the LR RT-PCR can quickly and accurately evaluate disinfection effects of RGNNV by ozone and can be widely used in hatcheries of groupers.

Key words Red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV); RT-PCR; Detection; Ozone; Disinfection

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn