



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113637797 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 12

(21) 申请号 202110787330.X

C12Q 1/6851 (2018.01)

(22) 申请日 2021.07.13

C12R 1/93 (2006.01)

(71) 申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路135号

申请人 珠海市现代农业发展中心(珠海市金湾区台湾农民创业园管理委员会、珠海市农渔业科研与推广中心)

(72) 发明人 贾坤同 李勇 卢小兵 黄聪灵 易梅生 古群红

(74) 专利代理机构 深圳市创富知识产权代理有限公司 44367

代理人 高冰

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

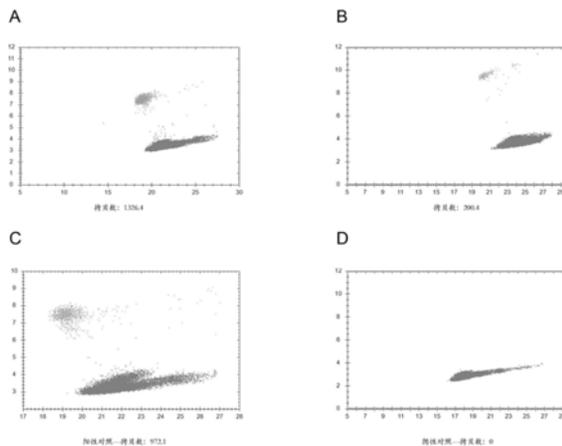
权利要求书1页 说明书5页  
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法及相应的试剂盒

(57) 摘要

本发明属于鱼类神经坏死病毒的检测技术领域,具体涉及用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法及相应的试剂盒,为开发一种灵敏度较高的神经坏死病毒检测方法,本发明建立了一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法,即采集待测鱼类的血液样本后,提取血液样本的总RNA,并合成cDNA;然后以cDNA为模板采用微滴式数字PCR即可准确检测出待测鱼类是否感染或携带NNV,本发明的微滴式数字PCR检测方法灵敏度高,在养殖鱼类优质亲本选育或选择中具有较好的应用前景。



1. 用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、采集待测鱼类的血液样本;

S2、以步骤S1的血液样本为模板提取总RNA,并合成cDNA;

S3、以步骤S2的cDNA为模板采用微滴式数字PCR检测是否感染或携带NNV。

2. 根据权利要求1所述的用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法,其特征在于,微滴式数字PCR所用的引物如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示,所用的探针如SEQ ID NO:3所示。

3. 一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR试剂盒,其特征在于,包括检测鱼类神经坏死病毒基因组的特异引物和探针。

4. 根据权利要求3所述的一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR试剂盒,其特征在于,所述特异引物如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示,所用探针如SEQ ID NO:3所示。

5. 根据权利要求3所述的一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR试剂盒,其特征在于,所述鱼类包括但不限于养殖鱼类和进出口冷冻鱼类。

6. 根据权利要求3所述的一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR试剂盒,其特征在于,微滴式数字PCR试剂盒的反应体系为:15 $\mu$ L Mix (2 $\times$ )、2.4 $\mu$ L上游引物、2.4 $\mu$ L下游引物、0.75 $\mu$ L探针、1 $\mu$ L cDNA模板,加8.45 $\mu$ L水补足至30 $\mu$ L。

7. 根据权利要求6所述的一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR试剂盒,其特征在于,上游引物和下游引物的浓度均为10 $\mu$ M,探针的浓度为250nmol/L,cDNA模板的浓度小于50ng/ $\mu$ L。

8. 根据权利要求3所述的一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR试剂盒,其特征在于,微滴式数字PCR试剂盒的扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性10min;39个循环:95 $^{\circ}$ C变性30s,60 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸15s,爬坡速度为1.5 $^{\circ}$ C/s。

9. 根据权利要求3所述的一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR试剂盒,其特征在于,所述微滴式数字PCR试剂盒还包括总RNA提取试剂或试剂盒,反转录试剂或试剂盒。

## 用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法及相应的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于鱼类神经坏死病毒的检测技术领域,具体涉及用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法及相应的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 鱼类神经坏死病毒(Nervous necrosis virus,NNV)是一种能感染海鲈、大菱鲆和石斑鱼等40多种重要海淡水经济鱼类的病毒性病原体。NNV感染可引发鱼类流行性病毒脑病和视网膜病变,对仔鱼和幼鱼的致死率高达100%,国际兽疫组织(OIE)已将该病列为重要的鱼类疾病。

[0003] NNV病毒分类上属于诺达病毒科(Nodaviridae)β诺达病毒属(Betanodaviruses),为非包膜单股正链二十面体RNA病毒,直径为23-25nm。基因组中包含两个RNA分子,即RNA1和RNA2。其中RNA1编码的RNA依赖性RNA聚合酶,负责病毒的复制;RNA2则编码病毒衣壳蛋白CP,组装形成病毒外壳。NNV依据其RNA2可变序列的差异区域可被分为四种基因型:红鳍东方鲀神经坏死病毒(Tiger puffer nervous necrosis virus,TPNNV)、拟鲆神经坏死病毒(Striped jack nervous necrosis virus,SJNNV)、条斑星鲈神经坏死病毒(Barfin flounder nervous necrosis virus,BFNNV)以及赤点石斑鱼神经坏死病毒(red-spotted grouper nervous necrosis virus,RGNNV)。

[0004] 尽管NNV有不同的基因型,但NNV感染后的病鱼一般都会呈现出肤色变暗、食欲不振、嗜睡、倒置在水面上或躺在底部、动作迟缓、游动改变、水平旋转、漂浮水面或螺旋状游泳等症状,组织学诊断表现为中枢神经系统的广泛坏死,病变神经细胞的胞浆中存在大量病毒颗粒,中脑、后脑和视网膜出现广泛空泡化和神经元变性等情况。NNV引起的鱼类传染病致病性强,给国内外水产业造成了巨大的经济损失。

[0005] 目前关于NNV的检测主要集中在荧光定量PCR,但该方法的灵敏度有限,在NNV拷贝数较少的情况下很难被检测到,容易出现假阴性。因此,有必要开发一种灵敏度高的NNV检测方法。

[0006] 本研究从广东省患病海鲈幼鱼中分离得到NNV,并对其进行全基因测序获得完整的NNV核酸序列,通过设计NNV特异性扩增的探针,建立了基于微滴式数字PCR对NNV的检测方法。该方法对养殖鱼类尤其是亲本创伤较小,灵敏度较高,且该方法在NNV检测中还未见报道。

### 发明内容

[0007] 为了克服上述现有技术的不足,本发明提供了检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法,该方法可通过鱼类静脉采血样品准确检测出其是否感染或携带神经坏死病毒,灵敏度高,在养殖鱼类亲本选育或选择中具有较好的应用前景。

[0008] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0009] 本发明提供了一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法,该方法包括以下步骤:

[0010] S1、采集待测鱼类的血液样本;

[0011] S2、以步骤S1的血液样本为模板提取总RNA,并合成cDNA;

[0012] S3、以步骤S2的cDNA为模板采用微滴式数字PCR检测是否感染或携带NNV。

[0013] 本发明通过实验发现,微滴式数字PCR在NNV检测中较RT-PCR具有更高的灵敏度,通过数字PCR和RT-PCR在低浓度NNV检测中发现,当NNV拷贝数较低时,RT-PCR便不能有效检测样品中的NNV。同时发现,微滴式数字PCR可有效检测攻毒后海鲈鱼种血液中NNV的含量,通过不同浓度滴度的NNV ( $2 \times 10^3$ 和 $2 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>) 腹腔注射健康海鲈鱼种,攻毒三天后尾静脉采血,发现海鲈血液中均能检测到NNV,且不同浓度滴度组中NNV的拷贝数并非呈线性趋势变化。此外还发现,微滴式数字PCR可有效检测野外养殖海鲈亲本是否携带病毒以及其拷贝数,通过野外养殖海鲈亲本尾静脉采血,并将其提取RNA并进行反转录,微滴式数字PCR检测发现不同的亲本携带不同拷贝数的NNV。

[0014] 优选地,微滴式数字PCR所用的引物如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示,所用的探针如SEQ ID NO:3所示。

[0015] 优选地,微滴式数字PCR的反应体系为:15 $\mu$ L Mix (2 $\times$ )、2.4 $\mu$ L上游引物、2.4 $\mu$ L下游引物、0.75 $\mu$ L探针、1 $\mu$ L cDNA模板,加8.45 $\mu$ L水补足至30 $\mu$ L。

[0016] 进一步地,上游引物和下游引物的浓度均为10 $\mu$ M,探针的浓度为250nmol/L,cDNA模板的浓度小于50ng/ $\mu$ L。

[0017] 优选地,微滴式数字PCR的扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性10min;39个循环:95 $^{\circ}$ C变性30s,60 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸15s,爬坡速度为1.5 $^{\circ}$ C/s。

[0018] 优选地,所述鱼类包括但不限于养殖鱼类和进出口冷冻鱼类。

[0019] 本发明还提供了一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR试剂盒,该试剂盒包括检测鱼类神经坏死病毒基因组的特异引物和探针。

[0020] 优选地,所述特异引物如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示,所用探针如SEQ ID NO:3所示。

[0021] 优选地,所述鱼类包括但不限于养殖鱼类和进出口冷冻鱼类。

[0022] 优选地,微滴式数字PCR试剂盒的反应体系为:15 $\mu$ L Mix (2 $\times$ )、2.4 $\mu$ L上游引物、2.4 $\mu$ L下游引物、0.75 $\mu$ L探针、1 $\mu$ L cDNA模板,加8.45 $\mu$ L水补足至30 $\mu$ L。

[0023] 进一步地,上游引物和下游引物的浓度均为10 $\mu$ M,探针的浓度为250nmol/L,cDNA模板的浓度小于50ng/ $\mu$ L。

[0024] 优选地,微滴式数字PCR试剂盒的扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性10min;39个循环:95 $^{\circ}$ C变性30s,60 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸15s,爬坡速度为1.5 $^{\circ}$ C/s。

[0025] 优选地,所述微滴式数字PCR试剂盒还包括总RNA提取试剂或试剂盒,反转录试剂或试剂盒。

[0026] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0027] 为开发一种灵敏度较高的神经坏死病毒检测方法,用于检测鱼类亲本是否携带神经坏死病毒,为鱼类优质亲本选育或选择提供参考。本发明建立了一种用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法,即采集待测鱼类的血液样本后,提取血液样本的总RNA,并

合成cDNA;然后以cDNA为模板采用微滴式数字PCR即可准确检测出待测鱼类是否感染或携带NNV,本发明的微滴式数字PCR检测方法灵敏度高,在养殖鱼类优质亲本选育或选择中具有较好的应用前景。

### 附图说明

[0028] 图1为微滴式数字PCR与荧光定量PCR的准确性和灵敏度比较;

[0029] 图1中,A、B和C为数字定量PCR检测NNV模板不同倍比稀释后(10倍稀释)的拷贝数;D、E和F为荧光定量PCR检测NNV模板不同倍比稀释后(10倍稀释)的 $C_t$ 值。

[0030] 图2为微滴式数字PCR对NNV攻毒后海鲈血液样品的检测。

[0031] 图2中,A和B分别为 $2 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>和 $2 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>攻毒后于血液样品中检测到的NNV拷贝数;C和D分别为阳性对照和阴性对照。

### 具体实施方式

[0032] 下面对本发明的具体实施方式作进一步说明。在此需要说明的是,对于这些实施方式的说明用于帮助理解本发明,但并不构成对本发明的限定。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0033] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为可通过常规的商业途径购买得到的。

[0034] 实施例1微滴式数字PCR与RT-PCR在NNV检测中灵敏度和准确性比较

[0035] (1)微滴式数字PCR引物和探针设计及其特异性验证

[0036] 实验过程中所用的引物通过Primer 5.0设计并进行优化,探针5'和3'端分别携带发光基团和淬灭基团。首先下载海鲈基因组数据(NCBI登录号:PRJNA408177),建立海鲈基因组数据库,通过本地BLAST分析所设计的NNV引物序列在海鲈基因组中不存在互补序列。实验室从广东省珠江口养殖区患病海鲈幼鱼中分离得到NNV病毒,通过NNV病毒感染海鲈脑细胞后提取RNA,并经反转录后获得NNV模板,通过PCR扩增后将NNV的基因组片段插入到pcDNA3.1(Invitrogen)载体中获得pc-RDRP;从广东省珠海市斗门区养殖户处购买海鲈鱼苗,于实验室暂养两周,待其完全稳定后腹腔注射NNV病毒(MOI=100),感染三天后,取不同的组织提取RNA,通过反转录后作为检测模板。以pc-RDRP质粒和感染NNV后的海鲈组织RNA反转录样品为模板,首先以上游引物F(NNV-ddPCR-F)和下游引物R(NNV-ddPCR-R)进行扩增(反应体系:1 $\mu$ L NNV-ddPCR-F/R,0.25 $\mu$ L HS Taq酶(Takara),2.5 $\mu$ L Buffer,2 $\mu$ L dNTP,1 $\mu$ L模板,17.25 $\mu$ L H<sub>2</sub>O);然后以探针及下游引物R进行扩增(反应体系:1 $\mu$ L探针和1 $\mu$ L NNV-ddPCR-R,0.25 $\mu$ L HS Taq酶,2.5 $\mu$ L Buffer,2 $\mu$ L dNTP,1 $\mu$ L模板,17.25 $\mu$ L H<sub>2</sub>O),两次扩增得到的均为单一条带,证明所筛选得到的上游引物F、下游引物R以及探针特异性好。检测所用的特异性引物和探针序列如下:

[0037] 上游引物F---NNV-ddPCR-F:TGTGGCTACGAGCCATATGTC(SEQ ID NO:1);

[0038] 下游引物R---NNV-ddPCR-R:ATCAACTCATGCATGTCCACGT(SEQ ID NO:2);

[0039] 探针:5'-FAM-TTGATACCACGGGTCACGTCAGT-3'-TAMRA(SEQ ID NO:3),其中,FAM(羧基荧光素)为发光基团,TAMRA(6-羧基四甲基若丹明)为淬灭基团。

[0040] (2)微滴式数字PCR检测条件的优化

[0041] 数字PCR体系优化从温度,引物及探针浓度进行优化。通过对退火温度(62℃,60℃,58℃,56℃)和引物浓度(1000nmol/L,800nmol/L,600nmol/L)等条件进行优化,探针浓度为250nmol/L(试剂盒推荐),我们发现退火温度为60℃,引物浓度为800nmol/L是最佳的实验条件。反应体系如下:15μl Mix(2×)、2.4μl上游引物F(10μM,序列见实施例1)、2.4μl下游引物R(10μM,序列见实施例1)、0.75μl探针(序列见实施例1)、1μl cDNA模板(模板<50ng/μl),加8.45μl水补足至30μl。扩增反应条件为:95℃预变性10min;39个循环:95℃变性30s,60℃退火1min,72℃延伸15s,爬坡速度为1.5℃/s。微液滴检测通用试剂盒购自于新弈制造科技(北京)有限公司,产品目录号(10002)。

[0042] (3) 微滴式数字PCR和RT-PCR对不同稀释倍数NNV基因组质粒的检测。

[0043] 将NNV基因组片段的质粒10,100,1000和10000倍稀释后,通过数字PCR和RT-PCR检测其拷贝数或扩增曲线。当稀释10倍时,发现数字PCR检测结果为全阳性,说明质粒浓度太高,已超过其检测的最大阈值;当质粒稀释100倍时,微滴式数字PCR和荧光定量PCR均能准确检测NNV模板(图1A和D所示);而当质粒稀释至1000倍或10000以上,RT-PCR扩增循环数已超过35,RT-PCR不能有效检测样品中的NNV,而数字PCR仍可准确检测到样本中NNV的拷贝数(图1B、C、E和F所示)。

[0044] 可见,通过数字PCR和RT-PCR对低浓度NNV进行检测,当NNV拷贝数较低时,RT-PCR便不能有效检测样品中的NNV,说明微滴式数字PCR在NNV检测中较RT-PCR具有较高的灵敏度。

[0045] 实施例2微滴式数字PCR对NNV攻毒海鲈血液样本以及野外养殖海鲈亲本血液样本的检测

[0046] (1) 实验室海鲈攻毒

[0047] NNV从广东省珠江口养殖区患病海鲈幼鱼中分离得到,将NNV感染海鲈脑细胞后,于-80℃反复冻融三次,离心后通过0.22μm滤膜过滤后获得NNV悬液,制备的NNV悬液置于-80℃保存备用。于珠海斗门区购入海鲈鱼种100尾,体重约40g,首先检测其不携带NNV病毒。用实验室循环水养殖两周,期间正常饲喂,每天两次喂食。两周后用丁香酚将海鲈麻醉,将准备好的NNV悬液于海鲈胸鳍处注入海鲈胸腔。设置两个实验组和一个对照组,实验组分别注射 $2 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>和 $2 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> NNV病毒悬液,对照组注射PBS,每组注射10尾鱼。注射后正常饲喂养殖。

[0048] (2) 野外养殖海鲈采样

[0049] 野外海鲈亲本养殖于广东省珠海市斗门河口渔业研究所基地的池塘中,已养殖培育2~3年,养殖期间每日饲喂两次,池塘中设置有充氧机,养殖条件良好。于养殖池塘中捕获海鲈亲本12尾,置于暂养池中,用丁香酚将其麻醉。

[0050] (3) 血液样本采集和样品总RNA提取

[0051] 用丁香酚麻醉海鲈后,以酒精棉球擦拭海鲈尾部进行体表消毒,通过30号针头斜45°尾静脉采血,采血后用无菌棉球按住抽血位置约20s。抽取5~8滴血于800μL Trizol中剧烈震荡裂解,加入150μL氯仿,震荡混匀,室温放置3min,12000rpm下4℃离心15min;取300μL上清于无RNA酶的离心管中,加入等量的异丙醇,轻轻混匀,室温放置10min,12000rpm下4℃离心15min;去上清,加入700μL EDTA水配置的75%乙醇,7500rpm下4℃离心5min;去上清,室温晾干RNA并沉淀10min;用8μL无核酸水溶解RNA沉淀,即得细胞总RNA,并测定所得总

RNA的浓度。

[0052] (4) cDNA合成

[0053] 采用GoScript™反转录试剂盒进行RNA反转录。反应体系如下：制备含4μL Reaction Buffer和2μL Enzyme Mix的预混液，根据不同血液样本RNA的浓度，加入总量为1 μg的RNA模板，用无核酸水补齐至20μL。逆转录反应程序如下：20μL反应体系先在42℃反应50min；然后在85℃反应5min，4℃保存，即得cDNA。

[0054] (5) 实时荧光定量PCR

[0055] 采用Promega GoTaq™ qPCR试剂盒进行实时荧光定量PCR。反应体系如下：5μL qPCR Mix (2×)、0.25μL NNV-ddPCR-F上游引物(10μM)、0.25μL NNV-ddPCR-R下游引物(10μM)、1μL cDNA模板，加3.5μL水补足至10μL。扩增反应条件为：95℃预变性3min；42个循环：95℃变性10s，60℃退火15s，72℃延伸15s。

[0056] (6) 微滴式数字PCR

[0057] 采用样本制备通用试剂盒和微液滴检测通用试剂盒(新弈制造科技有限公司)进行微滴式数字PCR。反应体系如下：15μL Mix (2×)、2.4μL上游引物(10μM)、2.4μL下游引物(10μM)、0.75μL探针、1μL cDNA模板(模板<50ng/uL)，加8.45μL水补足至30μL。扩增反应条件为：95℃预变性10min；39个循环：95℃变性30s，60℃退火1min，72℃延伸15s，爬坡速度为1.5℃/s。

[0058] (7) 微滴式数字PCR检测攻毒海鲈和野外养殖海鲈亲本NNV

[0059] 采用不同倍比稀释的NNV攻毒后，通过微滴式数字PCR在攻毒海鲈中均可有效检测到血液中的NNV含量，且血液样品中NNV的拷贝数并不呈比例变化，可能是NNV进入海鲈机体后也在不停增殖(如图2所示)。

[0060] 在野外海鲈亲本检测中，发现检测的12尾亲本中，仅有一尾亲本不携带NNV病毒，其余亲本携带NNV病毒的拷贝数也不一致(如表1所示)。

[0061] 上述结果说明，微滴式数字PCR可有效检测海鲈鱼血液中的NNV含量。

[0062] 表1微滴式数字PCR检测野外养殖海鲈亲本是否携带NNV

亲本 编号	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号	8 号	9 号	10 号	11 号	12 号
[0063] 阳性												
液滴数	82	76	49	74	46	53	51	29	17	0	77	27
[0064] 拷贝数	98.7	82.5	59.1	81.2	57.9	65.4	65.8	33.9	19.3	0.0	85.0	31.9

[0065] 以上对本发明的实施方式作了详细说明，但本发明不限于所描述的实施方式。对于本领域的技术人员而言，在不脱离本发明原理和精神的情况下，对这些实施方式进行多种变化、修改、替换和变型，仍落入本发明的保护范围内。

## 序列表

<110> 中山大学;珠海市现代农业发展中心(珠海市金湾区台湾农民创业园管理委员会、珠海市农渔业科研与推广中心)

<120> 用于检测鱼类神经坏死病毒的微滴式数字PCR方法及相应的试剂盒

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 上游引物F(Artificial Sequence)

<400> 1

tgtggctacg agccatatgt c 21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 下游引物R(Artificial Sequence)

<400> 2

atcaactcat gcatgtccac gt 22

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 探针(Artificial Sequence)

<220>

<223> 5'- FAM- TTGGATACCACGGGTCACGTCAGT-3'- TAMRA

<400> 3

ttggatacca cgggtcacgt cagt 24

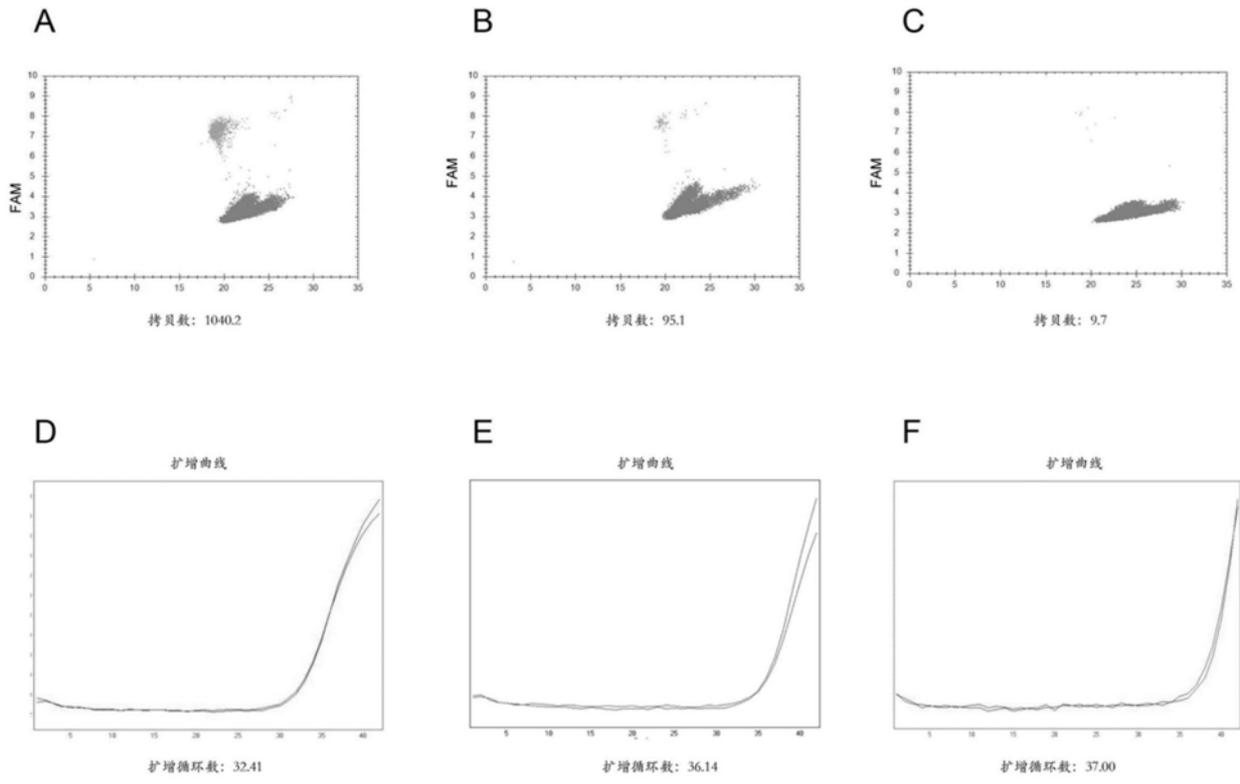
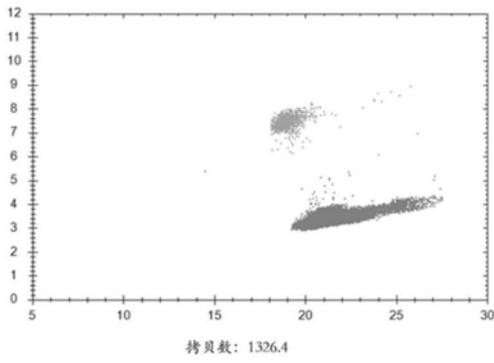
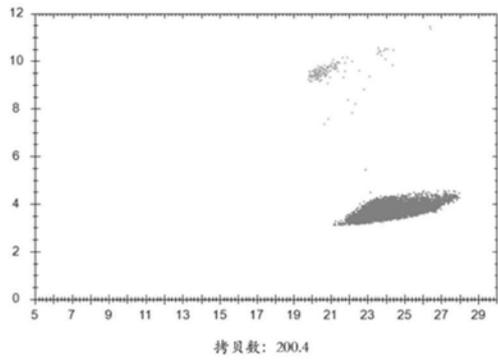


图1

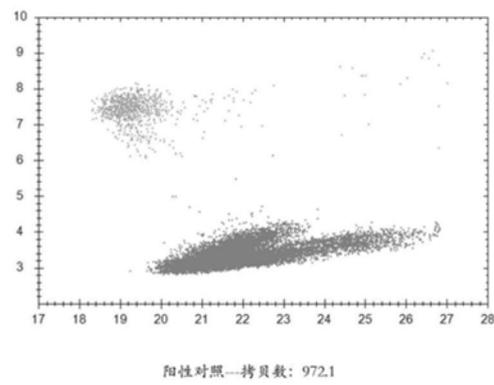
A



B



C



D

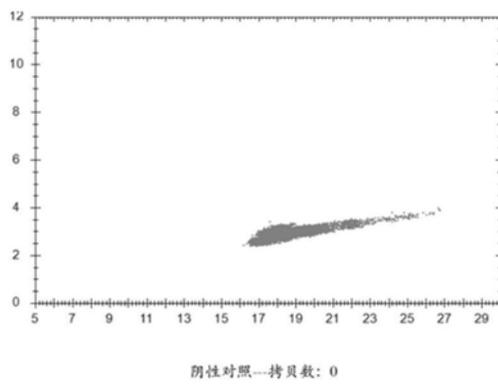


图2