



鲍疱疹病毒原位 LAMP 检测方法的建立与初步应用

谷 莉^{1,2}, 郑玉东^{2,3}, 张 翔^{1,2}, 白昌明², 刘金兰^{1*},
辛鲁生², 李 晨², 王崇明^{2*}

(1. 天津农学院水产学院, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室, 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 中国海洋大学, 水产动物病害与免疫学实验室, 山东 青岛 266000)

摘要: 为精确定位鲍疱疹病毒 (HaHV-1) 在宿主不同组织器官中的分布, 明确 HaHV-1 的组织亲嗜性和侵染进程, 实验基于环介导等温扩增技术 (LAMP) 和原位杂交技术建立了 HaHV-1 的原位 LAMP 检测方法。利用该方法研究了 HaHV-1 人工感染实验不同时间节点, 病毒在杂色鲍主要器官的分布规律和组织亲嗜性。并对已报道的 HaHV-1 LAMP 扩增引物进行优化, 实现对载玻片上原位固定靶组织内病毒 DNA 的稳定、特异扩增, 筛选最佳显色时间等原位杂交反应条件, 最后通过免疫酶标技术分析 HaHV-1 在组织样本内的分布情况。结果显示, HaHV-1 原位 LAMP 检测方法最适显色时间为 60 min。利用该方法对攻毒后 24、36、48、60 和 72 h, HaHV-1 在杂色鲍外套膜、鳃、肝胰腺和腹足神经节 4 种样本的组织分布情况进行检测和分析。病毒阳性信号最早于 36 h 出现在腹足神经节, 48 h 在部分外套膜样本中观察到病毒阳性信号, 分布局限于外周神经中。在感染实验后期, 病毒阳性信号出现在肝胰腺结缔组织中。病毒阳性信号出现的部位常有大量细胞渗出和浸润, 渗出的细胞中可见被病毒感染的血淋巴细胞。本研究建立的 HaHV-1 原位 LAMP 检测方法, 同步实现了高灵敏度和精确定位的功能。该检测方法适用于病毒感染的确证、不同组织器官的亲嗜性、病毒侵染途径和致病机理等相关研究。

关键词: 杂色鲍; 鲍疱疹病毒; 原位 LAMP; 检测方法

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

鲍是一种高价值海产贝类, 经过养殖、育种技术的突破与创新, 现已成为我国水产养殖的重要组成部分。我国的鲍养殖产业起源于 20 世纪 60 年代末, 从 20 世纪 80 年代以来, 我国鲍产量保持着总体稳定增长的趋势^[1]。鲍产量从 1983 年的 23 t, 增长到 1999 年的 6 000 多 t。杂色鲍 (*Haliotis diversicolor aquatilis*) 曾是我国福建、广东、台湾、海南等省鲍养殖业主要养殖品种, 年

产量最多时达到约 5 000 t, 占全国鲍养殖总产量约 65%^[2-3]。1999 年及随后几年, 首发于福建、东山地区的鲍低温病毒病疫情席卷我国南方各杂色鲍养殖区^[4]。由于杂色鲍主要采用工厂化养殖模式, 从出现症状到大规模死亡仅 3~5 d, 致死率往往在 95% 以上, 导致杂色鲍养殖产业一蹶不振, 2010 年产量约为 1 500 t, 仅占全国鲍产量的 2.6%^[5]。经过系统流行病学调查和感染实验验证,

收稿日期: 2021-10-10 修回日期: 2021-12-02

资助项目: 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室开放课题 (2019-BH-A02); 国家自然科学基金 (32073014); 国家现代农业产业技术体系专项

第一作者: 谷莉 (照片), 从事贝类病害病原检测研究, E-mail: gl1784116657@163.com

通信作者: 刘金兰, 从事水产动物病害与免疫学研究, E-mail: ljlan1115@163.com;

王崇明, 从事贝类健康养殖与病害防控研究, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn



鲍低温病毒病病原被确认为鲍疱疹病毒 1 (*Haliotid herpesvirus* 1, HaHV-1)^[6-7]。我国农业农村部新修订的动物疫病名录将 HaHV-1 感染引起的鲍低温病毒病列为二类动物疫病管理。2005 年起, 澳大利亚的棕唇鲍 (*H. conicopora*)、黑唇鲍 (*H. rubra*)、绿唇鲍 (*H. laevisgata*) 及其杂交种的养殖和野生种群, 相继发生类似急性病毒性感染引起的大规模死亡案例^[8-9]。发病鲍最显著的病理变化发生在脑、腹足和口头部神经节, 出现严重的炎症反应和细胞浸润, 因此该病在当地又被称为鲍病毒性神经炎 (abalone viral ganglioneuritis, AVG)^[8,10]。HaHV-1 感染也是世界上首例引起腹足贝类急性死亡的病毒性病原, 鉴于该病毒对养殖和野生鲍种群造成的严重危害及高传染性, HaHV-1 被世界动物卫生组织 (OIE) 列入必须通报的水生动物疫病名录。

HaHV-1 是疱疹病毒目 (*Herpesvirales*) 软体动物疱疹病毒科 (*Malacoherpesviridae*) 鲍疱疹病毒属 (*Aurivirus*) 下的唯一一种, 与感染双壳贝类的另一种软体动物疱疹病毒, 即牡蛎疱疹病毒 (*Ostreid herpesvirus* 1, OsHV-1) 的亲缘关系最近^[11]。HaHV-1 病毒粒子具有疱疹病毒典型的正二十面体结构, 核衣壳内是以双链 DNA 为核心的遗传物质^[12]。核衣壳直径约 100 nm, 装配好的病毒颗粒直径约为 160 nm^[7,13-14]。温度是影响 HaHV-1 感染强度和危害程度的关键环境因子。鲍疱疹病毒病只发生在我国南方水温较低的季节, 因此被称为鲍低温病毒病^[15]。感染实验结果显示, HaHV-1 在水温降低到 21 °C 及以下时才能感染成功。病鲍主要表现为摄食量减少、活力下降、黏液分泌增多和脱板等非典型症状, 出现症状 3~7 d 后即发生大规模死亡。病鲍表现的主要病理特征是腹足神经节、中枢神经与外周神经组织炎症和细胞浸润^[6-8,10]。渗出的细胞中有大量被病毒感染的血淋巴细胞; 感染后期的外套膜、肝胰腺等器官的结缔组织也被病毒感染^[13]。

HaHV-1 感染的临床症状和病理特征仅能作为 HaHV-1 感染诊断的辅助手段, 其确诊需要使用分子生物学技术^[9,16-17]。Corbeil 等^[18] 基于 *Taq-Man*[®] qPCR 技术, 针对病毒开放阅读框 ORF48 设计特异性引物, 建立了 HaHV-1 特异性的实时定量 PCR (qPCR) 检测方法。Crane 等^[19] 基于地高辛 (DIG) 标记技术, 针对 ORF66 设计探针, 建立了 HaHV-1 的原位杂交检测技术。Gao 等^[20] 基于重

组酶聚合酶扩增 (RPA) 技术, 针对 ORF38 设计引物和探针, 建立了 HaHV-1 的 qRPA 快速定量检测技术。Corbeil 等^[14] 的研究结果显示, 绿唇鲍和黑唇鲍杂交种人工感染 HaHV-1 后 36 h, 使用 qPCR 可以从病鲍神经组织中检测到病毒 DNA, 而使用原位杂交方法在攻毒感染 48 h 后, 可以在鲍腹足神经节中检测到 HaHV-1 信号的存在。上述结果说明原位杂交检测方法的灵敏度较实时定量 PCR 方法低。

本研究旨在建立一种同时具备高灵敏度与精确组织定位优点的原位环介导等温扩增 (LAMP) 检测方法。该方法对病毒感染早期, HaHV-1 在重要器官的分布规律和组织亲嗜性、病毒侵袭途径、感染早期病例的确诊等研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验方法

实验动物与养殖 原位 LAMP 检测方法开发阶段, 使用 2019 年采集的 HaHV-1 感染杂色鲍样本蜡块和 DNA。为了对原位 LAMP 检测方法在不同感染阶段使用效果进行评估, 于 2021 年 4 月从厦门大学实验基地空运回实验用杂色鲍 200 只, 于青岛市黄海水产研究所的水实验室进行养殖实验。实验用海水为天然海水, 实验期间海水盐度为 30~32, 水温为 16.4~19.3 °C, 海水经砂滤及黑暗沉淀后备用, 实验用水箱容积为 40 L, 24 h 充气, 每天换水 1 次, 换水量为 50%, 换水后投喂海带。暂养 15 d 后, 随机选择 30 只个体, 测量壳长 [(6.2±1.1) cm], 体质量 [(42.8±2.6) g], 使用 qPCR 方法确认这批杂色鲍未感染 HaHV-1。

感染实验 剪取 HaHV-1 感染的杂色鲍腹足 3.0 g, 加入 27 mL 灭菌海水, 冰浴条件下匀浆 3 min, 4 °C 下 1 000×g 离心 15 min, 取上清液并稀释 4 倍, 依次经孔径为 5、2、0.45 和 0.22 μm 的滤膜过滤, 过滤后液体即为病毒悬液。取健康杂色鲍组织按相同流程处理, 得到阴性对照组织悬液。将上述健康杂色鲍分为处理组 (90 只) 和对照组 (30 只), 每组设 3 个平行, 分别注射病毒悬液和阴性对照组织悬液。注射前用 MgCl₂ (10 g/L, 质量体积比) 浸泡 2 h 进行麻醉处理, 调整病毒悬液病毒载量至 1×10⁴ 拷贝/μL, 注射剂量为 100 μL。注射攻毒后每 12 小时查验 1 次, 记录相关异常现象, 发现死亡个体及时移出。实验根据已报道的

HaHV-1 的侵染和增殖动力学模型, 分别在注射攻毒后 24、36、48、72、96 和 120 h, 从攻毒组 and 对照组采集 3 只杂色鲍。取样时优先选择附着力较弱的发病个体, 避免选择脱板死亡的个体。

样本采集 剪取杂色鲍腹足神经与肌肉、外套膜、鳃和肝胰腺组织, 使用手术刀切取约 5 mm 厚组织块, 使用 Davidson 氏 AFA 固定液固定约 24 h 后, 使用常规方法进行组织脱水和石蜡包埋, 5 μm 连续切片。所得切片分别进行苏木精-伊红 (H.E) 染色法和原位 LAMP 检测。同时, 取每个杂色鲍样本外套膜约 30 mg, 使用海洋动物总 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 提取 DNA。

1.2 LAMP 反应引物优化与验证

LAMP 内、外引物参考 Chen 等^[17] 的报道, 该引物的特异性已得到充分验证。同时, 为了增加 LAMP 反应速率和稳定性, 根据本团队测定完成的 HaHV-1 大陆株全基因组序列 (GenBank 序列号: MF509813), 使用 LAMP 引物设计软件 Primer-Explorer (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) 设计了 LAMP 环引物 (LE 和 LB), 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成引物。

以提取的总 DNA 为模板, 用 Bst 2.0 DNA 聚合酶 (New England Biolabs, 美国) 进行 LAMP 扩增。反应体系: 10 $\times$ Thermopol Buffer 2.5 μL , MgSO_4 (100 mmol/L) 3.5 μL , 引物 FIP、BIP (20 μM) 各 2 μL , LF : LB (20 μM) 各 1 μL 、F3 : B3 (10 μM) 各 0.5 μL 、d NTPs (10 mmol/L) 3.5 μL , 甜菜碱 (1.2 mol/L) 6 μL , 8 U Bst DNA 聚合酶, 以及上述已提取的 DNA 模板 2 μL 。反应在 PCR 仪上进行, 反应温度为 65 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间为 60 min, 然后 85 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min。为了避免气溶胶污染风险, 通过核酸检测试纸条和一次性检测装置, 在 LAMP 扩增结束后, 不开盖的情况下直接检测能否成功扩增。

1.3 HaHV-1 原位 LAMP 方法的建立

常规方法进行切片、展片后, 使用黏附载玻片捞片, 随后置于烤片机 (Leica HI1220) 上烘烤约 12 h, 使组织牢固地黏附在切片上, 防止缓冲液浸洗等原位 LAMP 复杂操作引起的组织脱片。

脱蜡与水化 首先将充分烘烤黏附的切片浸泡在杂交缸中, 常温下进行常规脱蜡水化: 二甲苯 5 min (3 次), 无水乙醇 5 min (2 次), 95% 乙醇

5 min, 85% 乙醇 5 min, 70% 乙醇 5 min, 50% 乙醇 5 min。

消化与变性 0.2 mol/L HCl 室温浸浴 20 min; 蛋白酶 K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 5 min。

原位 LAMP 扩增 将切片置于湿盒中, 按照“LAMP 反应引物优化与验证”所述配制 LAMP 反应体系 [dNTP 使用带有地高辛标记的 dNTP (Roche)], 每张切片滴加 LAMP 反应体系 150 μL , 盖上盖玻片, 在杂交炉中 65 $^{\circ}\text{C}$ 扩增 60 min。杂交完成后移去盖玻片, 依次使用 SSC (柠檬酸钠缓冲液) 梯度缓冲液浸洗: 2 $\times$ SSC 室温 5 min (2 次), 1 $\times$ SSC 37 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (2 次), 0.5 $\times$ SSC 42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 0.1 $\times$ SSC 42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 清除非特异性信号。

抗体孵育 向每张切片滴加封闭剂 (MAB : 10% BMB : 山羊血清原液 = 7 : 2 : 1, 体积比) 1 mL, 室温下封闭 1 h。吸去预杂交液, 滴加 500 μL 抗体孵育液 [碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体 (Roche) : 封闭剂 = 1 : 1 000] 孵育 90 min。孵育完成后将切片转移到杂交缸中, 首先使用 Buffer I (Tris-HCL 100 mmol/L、NaCl 150 mmol/L) 浸洗 10 min (2 次), 随后使用 Buffer II (Tris-HCL 100 mmol/L、NaCl 100 mmol/L、 MgCl_2 250 mmol/L) 浸洗 5 min。

显色与复染 吸取配制好的碱性磷酸酶底物显色剂 (40 μL 25 $\times$ NBT 加入到 1 mL 1 $\times$ AP 反应缓冲液) 200 μL 滴加在切片组织样本上, 湿盒内室温显色 (显色时间优化: 45、60、75 min), 苯胺棕复染 2 min。复染完成后用 Buffer III (Tris-HCL 100 mmol/L、EDTA 10 mmol/L) 浸洗 30 min 终止反应并清洗切片。

脱水与封片 将切片浸泡在杂交缸中, 常温下进行酒精梯度脱水: 50% 乙醇 5 min, 70% 乙醇 5 min, 85% 乙醇 5 min, 95% 乙醇 5 min, 无水乙醇 5 min (2 次) 二甲苯 5 min (3 次), 二甲苯透明, 树脂封片。显微镜 (Nikon Eclipse E80i) 下观察组织切片的杂交信号并拍照。

1.4 原位 LAMP 检测方法的验证和初步应用

利用已优化的原位 LAMP 检测方法, 对上述感染实验不同时间点采集的杂色鲍 4 种组织 (腹足神经与肌肉、外套膜、肝胰腺和鳃) 样本, 分别进行消化、原位 LAMP 扩增和抗体孵育, 最后使用碱性磷酸酶显色剂显色后, 光镜下观察蓝紫色阳性信号在不同组织中的分布情况并拍照。

为验证所开发 HaHV-1 原位 LAMP 检测方法的稳定性和特异性, 每批原位 LAMP 操作过程中均使用已知感染和未感染 HaHV-1 的杂色鲍组织切片作为阳性和阴性对照。

2 结果

2.1 杂色鲍感染实验

用于本研究的杂色鲍在暂养期间有 4 只死亡, 推测与运输过程中产生的应激有关。处理组 3 个重复在注射攻毒后 36 h 时, 水体出现浑浊、起泡等异常现象。虽然每天换水 1 次, 但是随着时间推移, 起泡量越来越大。死亡首次发生在攻毒后 48 h, 发病和死亡个体迅速增加, 攻毒 132 h 后攻毒组全部死亡。感染实验期间阴性对照组未发现水体浑浊、起泡, 鲍活力不足和死亡等异常现象。

2.2 LAMP 引物设计和反应

Chen 等^[17]根据 HaHV-1 台湾株设计了该病毒的 LAMP 扩增引物, 实现对 HaHV-1 感染杂色鲍的特异性检测。在借鉴 Chen 等^[17]内、外引物信息的基础上, 为了提高 LAMP 反应的稳定性和速率, 实验使用 LAMP 引物专业设计软件设计了环引物 LF: 5'-CGAACAGCTTGTCGATCACGT-3' 和 LB: 5'-CTTGGTAGACGGGAAAACGG-3', 以便适应在切片上进行 LAMP 扩增时, 面临的更加复杂、不稳定的扩增环境。为适应核酸试纸条检测需求, 分别使用 Biotin 和 6-FAM 标记 FIP 和 LF 的 5'端; FIP: 5'-Biotin-GGAGCGAAGGAAGCCACTTCTTTTTTCTTTCAAAGCGGAGTGCG-3', BIP: 5'-ATTCCGGGCAAGTCTGCAGTTTTTGCTTGTCGTCCTGATGAAC-3', F3: 5'-6-FAM-CGAACAGCTTGTCGATCACGT-3'和 B3: 5'-CTTGGTAGACGGGAAAACGG-3'。核酸试纸条检测结果显示, 感染 HaHV-1 的杂色鲍检测结果为阳性(图 1-b), 而未感染 HaHV-1 的杂色鲍, 反应结果均为阴性(图 1-a), 表明该 LAMP 体系可应用于后续原位 LAMP 测试。

2.3 原位 LAMP 反应及条件优化

在建立 HaHV-1 原位 LAMP 检测方法过程中, 发现在当前实验条件下, 孵育时间是信号强弱和检测结果的关键。为此, 实验测试了 45、60 和 75 min 这 3 种孵育时间, 对杂色鲍足神经节及肌肉组织样本病毒信号显色效果的影响。结果显示,

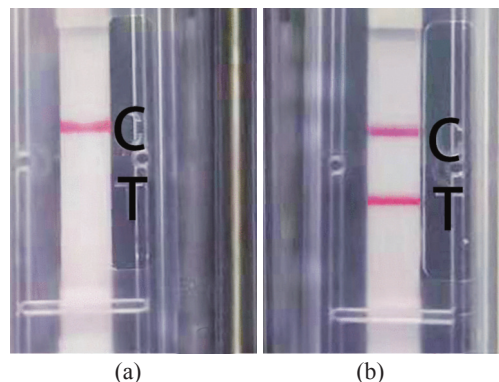


图 1 核酸试纸条测试 LAMP 扩增结果

(a) 阴性, (b) 阳性; C. 质控线, T. 检测线

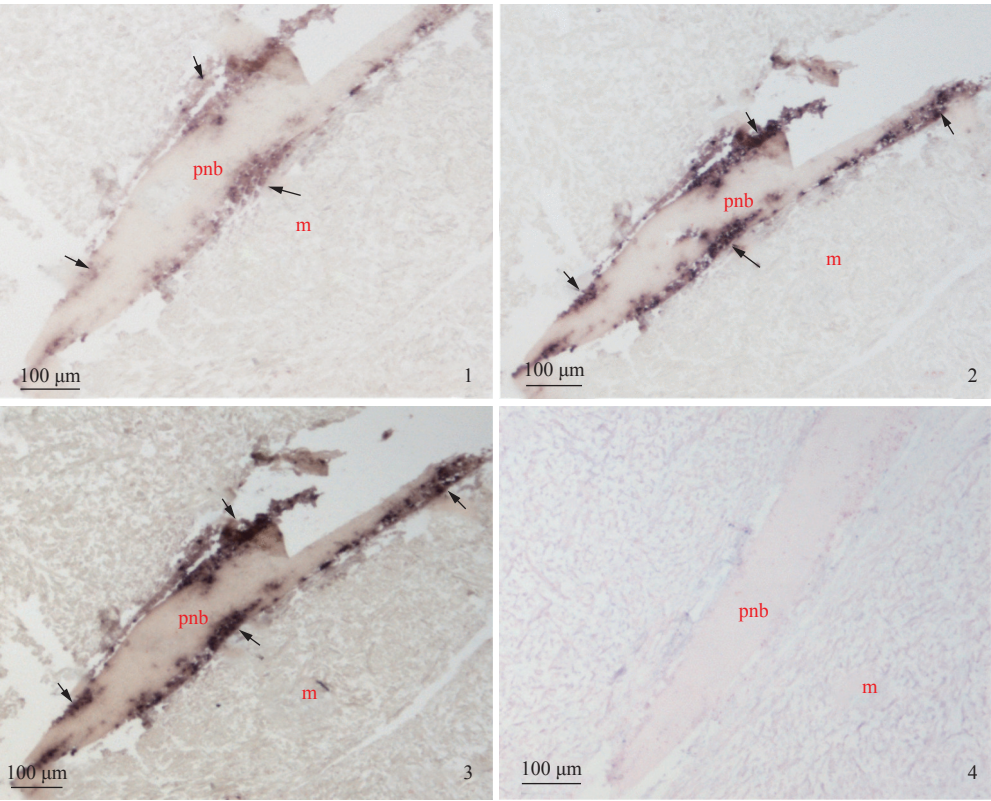
Fig. 1 Nucleic acid strip test result of LAMP amplification

(a) negative, (b) positive; C. quality control line, T. test line

孵育时间为 45 min 时, 有杂交信号但显色不明显(图版 I-1); 孵育时间为 75 min 时, 病毒信号区域着色过重, 导致与周边组织界限模糊(图版 I-3); 孵育时间为 60 min 时, 病毒信号显色清晰、易分辨(图版 I-2)。不加抗体的阴性对照未出现病毒信号(图版 I-4)。

2.4 原位 LAMP 检测方法的应用

为了验证本研究所开发原位 LAMP 检测方法的稳定性, 应用该方法对感染实验不同时间点采集的杂色鲍样本进行检测。结果显示, 攻毒组杂色鲍足神经束边缘最先发生病变, 神经纤维出现坏死并伴随着细胞浸润现象, 渗出的细胞中有血淋巴样细胞。同时, 病毒信号最早出现在感染 36 h 的病变组织样本中, 随着感染进程, 神经束病变程度和病毒感染强度逐步、稳定增加(图版 II, 表 1)。足神经束边缘的肌肉组织未出现明显病理变化, 也未检测到病毒信号。外套膜中含有丰富的肌肉和结缔组织, 原位杂交信号多出现在结缔组织中, 疑似感染成纤维细胞(图版 III), 偶尔会在切片中观察到外周神经。外套膜外周神经虽然较早出现类似足神经束的病变和病毒信号(36 h), 但不同个体外周神经病变差异比较大, 即使在感染实验中晚期, 亦有外周神经未表现出明显病理变化和病毒信号(表 1)。在感染实验晚期, 部分样本肝胰腺和外套膜结缔组织出现病变和血细胞浸润(图版 IV)。鳃丝样本中也能经常观察到病毒阳性信号, 杂交信号多聚集在鳃部结缔组织, 偶见于鳃丝中, 推测为鳃丝中的血淋巴细胞(图版 V)。

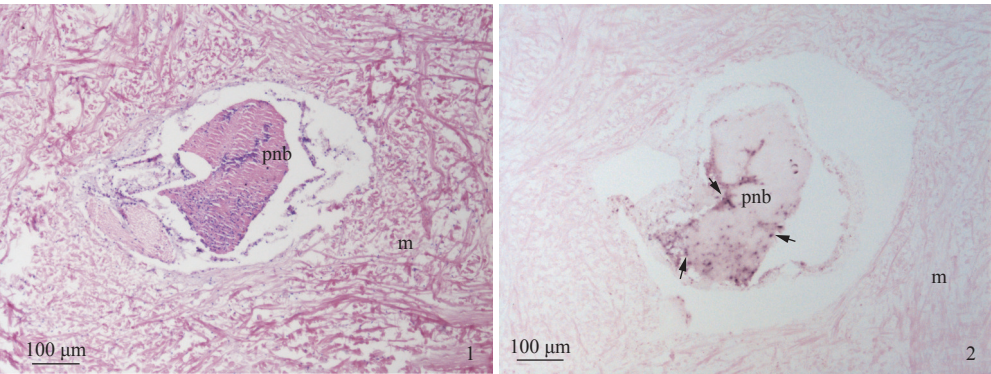


图版 I 不同显色时间的显色效果

1~3 分别为显色 45、60 和 75 min, 4. 不加抗体阴性对照; pnb. 足神经束, m. 肌肉; 黑色箭头示病毒杂交信号, 下同

Plate I Color effect of different durations

1-3. color for 45, 60 and 75 min, respectively, 4. negative control without antibody; pnb. pedal nerve branches, m. muscle; black arrow shows the virus hybridization signal, the same below



图版 II 腹足神经束病理切片

1. H.E 染色, 2. 原位 LAMP 检测结果

Plate II Gastropod nerve tracts

1. H.E staining, 2. *in situ* LAMP detection

3 讨论

HaHV-1 是首例引起鲍急性死亡的病毒性病原^[21], 病程短 (约 3 d)、死亡率高 (几乎 100%), 所有规格的个体均易感, 给我国南方 (包括台湾省) 杂色鲍养殖产业造成毁灭性打击^[22]。台湾省水

产养殖业界称为“九孔 SARS” (杂色鲍在台湾习惯称为九孔鲍), HaHV-1 使台湾省杂色鲍养殖产量从 2001—2007 年巅峰期的 2 500 余 t 锐减至不足 200 t^[22]。由于 HaHV-1 对杂色鲍养殖产业的巨大危害, 进入 21 世纪后, 我国皱纹盘鲍 (*H. discus hannii*) 品种大规模推广, 并成为我国的主养物种^[2],

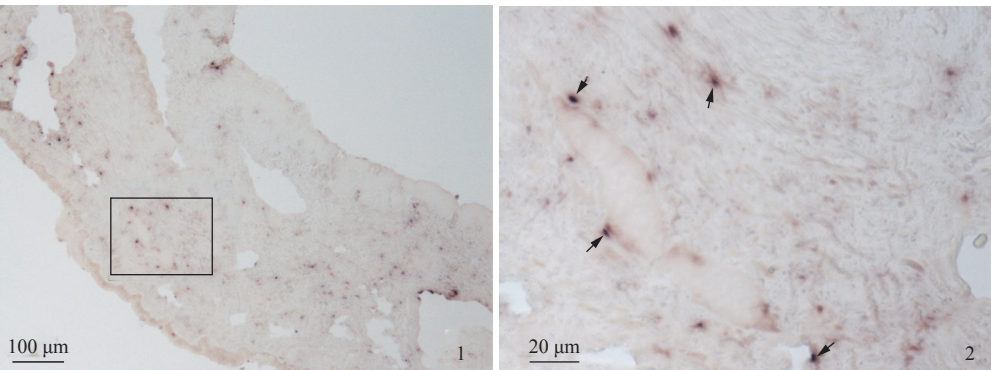
表 1 攻毒组杂色鲍不同组织器官检测到病毒信号的样本数

组织类型 tissues type		感染时间/h infection time					
		24	36	48	72	96	120
足神经束	gastropodal nerve tracts	0	2	3	3	3	3
外套膜	mantle	0	1	0	2	3	2
肝胰腺	hepatopancreas	0	0	0	2	1	0
鳃	gills	0	2	3	3	2	3

同时也带动我国鲍养殖产业的快速增长。2001 年我国鲍养殖年产量仅有 7 705 t, 2019 和 2020 年我国鲍产量分别达 18.03 万和 20.35 万 t。同一时期, 世界鲍产量 (除中国外) 表现出稳定、平缓增长的趋势, 从 2001 年约 3 000 t 增长到 2019 年 1.99 万 t (联合国粮食及农业组织渔业统计年鉴)。我国鲍产量在世界鲍总产量中所占比例呈稳定增加的趋势, 2001 年产量占 72.0%, 2019 年占比上升到

90.3%。2018 年皱纹盘鲍产量约占全国鲍产量的 85%, 其中绿盘鲍和西氏鲍 (*H. sieboldii*) 与皱纹盘鲍等新品种约占总产量的 12%^[23]。目前我国主养物种皱纹盘鲍对 HaHV-1 的易感性尚有争议, 绿盘鲍和西盘鲍对 HaHV-1 的易感性尚未评估过。有研究表明, 2012—2013 年从福建东山和广东汕头皱纹盘鲍养殖群体中检测出 HaHV-1 感染, 涉及人工池塘和海区围式 2 种主要的养殖模式。在发病高峰期的 11 和 12 月, 部分养殖场的病毒核酸阳性率高达 100%^[24]。PCR 方法对 HaHV-1 病毒核酸的筛查, 不能视为 HaHV-1 感染的确证病例。Bai 等^[7]使用注射、浸泡和共浴 3 种方法开展的人工感染实验结果显示, 皱纹盘鲍对 HaHV-1 不敏感, 但该研究仅使用了一个群体, 结果缺乏代表性。这些结果说明目前对 HaHV-1 的宿主范围和流行情况等致病特征缺乏基本了解。

原位 LAMP 技术是结合原位杂交可定位与 LAMP 高敏感性和方便快捷的优势, 从而实现对特定核酸在组织与细胞中的分布而进行检测的。

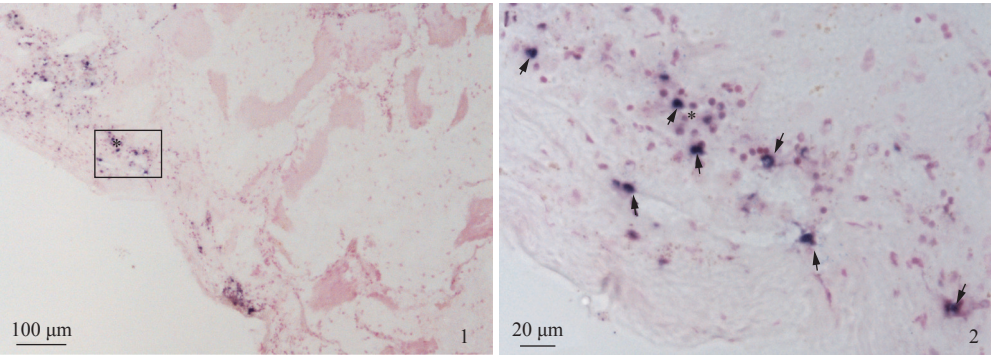


图版 III 外套膜原位 LAMP 检测结果

图 2 为图 1 黑色方框区域放大视图, 下同

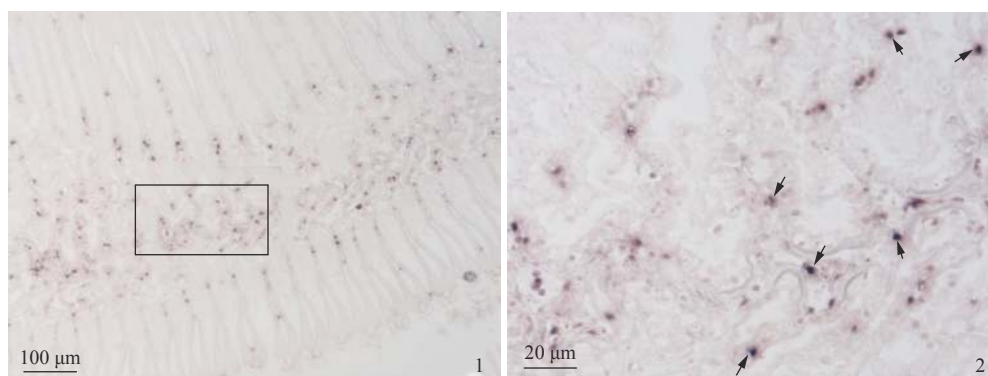
Plate III *In situ* LAMP detection results of mantle

Fig. 2 is an enlarged view of the black box area in Fig. 1, the same below



图版 IV 肝胰腺原位 LAMP 检测结果

Plate IV *In situ* LAMP detection results of hepatopancreas



图版 V 鲍 LAMP 检测结果

Plate V *In situ* LAMP detection results of gill

原位 LAMP 技术最早被应用于细菌携带 *stx*₂ 的检测^[25], 随后被应用于食品中沙门氏菌属 (*Salmonella*)^[26]、疟原虫属 (*Plasmodium*)^[27]、日本脑炎病毒 (*Japanese encephalitis virus*, JEV)^[28] 等病原检测, 以及 RNA 表达情况^[29] 和 DNA 序列的染色体定位^[30] 等研究。Jitrakorn 等^[31] 和 Chen 等^[32] 分别基于原位 LAMP 技术开发了传染性皮下及造血组织坏死病毒 (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV) 和十足目虹彩病毒 1 (*Decapod iridescent virus 1*, DIV1) 原位 LAMP 检测方法。由于 LAMP 是由链置换活性的 DNA 聚合酶 (Bst DNA polymerase) 介导的, 在恒温条件下 (约 65 °C) 进行的核酸扩增反应^[33]; 原位 LAMP 与原位 PCR 相比, 表现出优势: ①相对低和恒定的扩增温度对组织的破坏性较小; ②不需要配备特殊的仪器设备, 如玻片 PCR 扩增仪; ③核酸扩增时间更短, 减少反应缓冲液的蒸发量^[25, 34]。本研究基于原位 LAMP 技术原理建立的 HaHV-1 检测方法, 兼具方便、快捷与能够确诊的技术优势, 为未来开展更多流行病学调查和病例确诊奠定了基础。

对 HaHV-1 台湾株的研究表明, 其主要侵染神经节和神经干, 不侵染肝胰腺等器官的结缔组织^[10], HaHV-1 澳大利亚株表现出类似的组织亲嗜性^[35]。最近对 HaHV-1 大陆株的研究表明, 虽然神经干和足神经束是该病毒株的主要侵染器官, 但血淋巴细胞对该变异株同样易感, 并推测是该病毒迅速在体内传播引起急性发病和死亡的主要推手^[7]。同时该研究还表明, 部分外周神经在感染早期即被病毒侵袭, 肝胰腺和外套膜等器官结缔组织在晚期被感染。本研究利用新开发的原位 LAMP 方法对感染实验不同时间点杂色鲍进行的分析发现, 足神经束等中枢神经组织是 HaHV-1

大陆株的主要靶组织, 在整个感染时期持续被检出, 且感染强度随着感染进程的推进而加强。这一结果与之前的研究相一致, 说明 HaHV-1 与很多脊椎动物疱疹病毒相似, 是一种嗜神经的病毒。由于足神经束相对外周神经有相对固定的解剖位置, 且肉眼可见, 因此是进行 HaHV-1 感染诊断的首选组织器官。本研究首次在鳃组织发现大量病毒杂交信号。推测鳃丝部位的杂交信号主要来自渗出的血淋巴细胞, 而鳃丝基部结缔组织中也发现大量杂交信号。病毒杂交信号在整个感染周期的多数样本中都存在, 这说明鳃也是 HaHV-1 大陆株的主要靶器官之一。

综上所述, HaHV-1 不同变异株的组织亲嗜性存在一定差异, 这可能是病毒在传播过程中发生的株系分化和变异所致。但由于缺乏不同杂色鲍种群的数据, 不排除不同种群对病毒易感性和亲嗜性方面存在差异的可能性。本研究开发的 HaHV-1 原位 LAMP 检测方法适用于不同鲍宿主和种群感染的确诊, 可为该病毒组织亲嗜性、病毒侵染途径和流行病学调查提供技术支撑。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Zhang G F, Que H Y, Liu X, *et al.* Abalone mariculture in China[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 23(4): 947-950.
- [2] Wu F C, Zhang G F. Pacific abalone farming in China: recent innovations and challenges[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2016, 35(3): 703-710.
- [3] Nie Z Q, Wang S P. The status of abalone culture in China[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 23(4): 941-

- 945.
- [4] 张朝霞, 王军, 苏永全, 等. 九孔鲍暴发性流行病的病原及病理[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(4): 949-956.
- Zhang Z X, Wang J, Su Y Q, *et al.* Pathogeny and histopathology of the epidemic disease in *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science Edition), 2001, 40(4): 949-956 (in Chinese).
- [5] 毛振鹏. 中国鲍养殖产业结构与特征研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Mao Z P. Research on structure and characteristics of the abalone aquaculture industry in China[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [6] Wang J Y, Guo Z X, Feng J S, *et al.* Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong Province, China[J]. Journal of Shellfish Research, 2004, 23(4): 1163-1168.
- [7] Bai C M, Li Y N, Chang P H, *et al.* Susceptibility of two abalone species, *Haliotis diversicolor supertexta* and *Haliotis discus hannai*, to *Haliotid herpesvirus 1* infection[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2019, 160: 26-32.
- [8] Hooper C, Hardy-Smith P, Handler J. Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*)[J]. Australian Veterinary Journal, 2007, 85(5): 188-193.
- [9] Corbeil S. Abalone viral ganglioneuritis[J]. Pathogens, 2020, 9(9): 720.
- [10] Chang P H, Kuo S T, Lai S H, *et al.* Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2005, 65(1): 23-27.
- [11] Savin K W, Cocks B G, Wong F, *et al.* A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome[J]. Virology Journal, 2010, 7(1): 308.
- [12] Tan J M, Lancaster M, Hyatt A, *et al.* Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 149(2): 338-341.
- [13] Bai C M, Li Y N, Chang P H, *et al.* *In situ* hybridization revealed wide distribution of *Haliotid herpesvirus 1* in infected small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2020, 173: 107356.
- [14] Corbeil S, McColl K A, Williams L M, *et al.* Abalone viral ganglioneuritis: establishment and use of an experimental immersion challenge system for the study of abalone herpes virus infections in Australian abalone[J]. Virus Research, 2012, 165(2): 207-213.
- [15] 宋振荣, 纪荣兴, 颜素芬, 等. 引起九孔鲍大量死亡的一种球状病毒[J]. 水产学报, 2000, 24(5): 463-467.
- Song Z R, Ji R X, Yan S F, *et al.* A sphereovirus resulted in mass mortality of *Haliotis diversicolor aquatilis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(5): 463-467 (in Chinese).
- [16] 白昌明, 辛鲁生, 王崇明. 软体动物疱疹病毒及其对贝类养殖产业的危害[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 214-226.
- Bai C M, Xin L S, Wang C M. Malacoherpesviruses and their associated damages to mollusk aquaculture industry[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 214-226 (in Chinese).
- [17] Chen M H, Kuo S T, Renault T, *et al.* The development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of abalone herpesvirus DNA[J]. Journal of Virological Methods, 2014, 196: 199-203.
- [18] Corbeil S, Colling A, Williams L M, *et al.* Development and validation of a TaqMan® PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2010, 92(1): 1-10.
- [19] Crane M J, Corbeil S, Williams L M, *et al.* Evaluation of abalone viral ganglioneuritis resistance among wild abalone populations along the victorian coast of Australia[J]. Journal of Shellfish Research, 2013, 32(1): 67-72.
- [20] Gao F, Jiang J Z, Wang J Y, *et al.* Real-time isothermal detection of abalone herpes-like virus and red-spotted grouper nervous necrosis virus using recombinase polymerase amplification[J]. Journal of Virological Methods, 2018, 251: 92-98.
- [21] OIE *ad hoc* Group. Report of the meeting of the OIE *ad hoc* group on the OIE list of aquatic animal diseases - mollusc team - for the OIE aquatic animal health

- code[R]. Paris, 2008: 1-29.
- [22] 郭金泉. 东亚养殖鲍鱼病毒疾病史分析[J]. [海洋与渔业·水产前沿](#), 2018(8): 77-79.
- GUO J Q. Analysis of viral disease history of abalone in East Asia[J]. [Ocean and Fishery](#), 2018(8): 77-79 (in Chinese).
- [23] 林位琅, 林光文, 欧洪来, 等. 2019年秋季鲍鱼生产形势调研分析[J]. [中国水产](#), 2019(11): 51-53.
- Lin W L, Lin G W, OU H L, *et al.* Investigation and analysis of abalone production situation in autumn 2019[J]. [China Fisheries](#), 2019(11): 51-53 (in Chinese).
- [24] Gu L, Qi R J, Yang R, *et al.* The prevalence of abalone herpesvirus in two *Haliotis* species in South China during 2002–2013[J]. [Aquaculture](#), 2019, 505: 18-26.
- [25] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, *et al.* Detection of bacteria carrying the *stx*₂ gene by in situ loop-mediated isothermal amplification[J]. [Applied and Environmental Microbiology](#), 2003, 69(8): 5023-5028.
- [26] Ye Y X, Wang B, Huang F, *et al.* Application of *in situ* loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* in foods[J]. [Food Control](#), 2011, 22(3-4): 438-444.
- [27] Hashimoto M, Sakamoto H, Ido Y, *et al.* *In situ* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for identification of *Plasmodium* species in wide-range thin blood smears[J]. [Malaria Journal](#), 2018, 17(1): 235.
- [28] Liu Y, Chuang C K, Chen W J. *In situ* reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (*in situ* RT-LAMP) for detection of Japanese encephalitis viral RNA in host cells[J]. [Journal of Clinical Virology](#), 2009, 46(1): 49-54.
- [29] Podushkina D, West N W, Golenberg E M. Utilizing multiplex fluor LAMPs to illuminate multiple gene expressions *in situ*[J]. [PLoS One](#), 2019, 14(10): e0223333.
- [30] Meng Q L, Wang S, Zhang L L, *et al.* Development of an in situ loop-mediated isothermal amplification technique for chromosomal localization of DNA sequences[J]. [Chinese Journal of Oceanology and Limnology](#), 2013, 31(1): 128-133.
- [31] Jitrakorn S, Arunrut N, Sanguanrut P, *et al.* *In situ* DIG-labeling, loop-mediated DNA amplification (ISDL) for highly sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)[J]. [Aquaculture](#), 2016, 456: 36-43.
- [32] Chen X, Qiu L, Wang H L, *et al.* Susceptibility of *Exopalaemon carinicauda* to the infection with shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV 20141215), a strain of decapod iridescent virus 1 (DIV1)[J]. [Viruses](#), 2019, 11(4): 387.
- [33] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. [Nucleic Acids Research](#), 2000, 28(12): E63.
- [34] Ikeda S, Takabe K, Inagaki M, *et al.* Detection of gene point mutation in paraffin sections using *in situ* loop-mediated isothermal amplification[J]. [Pathology International](#), 2007, 57(9): 594-599.
- [35] Hooper C, Slocombe R, Day R, *et al.* Leucopenia associated with abalone viral ganglioneuritis[J]. [Australian Veterinary Journal](#), 2012, 90(1-2): 24-28.

Establishment and application of *in situ* LAMP for detection of *Haliotid herpesvirus 1* (HaHV-1)

GU Li^{1,2}, ZHENG Yudong^{2,3}, ZHANG Xiang^{1,2}, BAI Changming², LIU Jinlan^{1*},
XIN Lusheng², LI Chen², WANG Chongming^{2*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture,

College of Fishery, Tianjin Agriculture University, Tianjin 300384, China;

2. Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute,

Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, Ocean University of China, Qingdao 266071, China)

Abstract: To elucidate the tissue tropism and spreading routes of *Haliotid herpesvirus 1* (HaHV-1) in susceptible *Haliotis diversicolor aquatilis* after infection, an *in situ* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for HaHV-1 was developed in this study based on LAMP and *in situ* hybridization techniques. The developed *in situ* LAMP method was then applied on pedal nerve branches, mantle, hepatopancreas and gill of specimens collected across the experimental infection process. For the establishment of the HaHV-1 *in situ* LAMP detection method, we firstly optimized LAMP primers for specific detection of HaHV-1, improving the specificity and stability of the LAMP reaction on slides. We then optimized the time for color development (about 60 min) on pedal nerve branches, which was identified as the most suitable target for pathological investigation and *in situ* LAMP detection. Finally, the HaHV-1 *in situ* LAMP method was established after color development with immunoenzymatic labeling technique. The results showed that the incorporation of the designed loop primers yielded stable results during LAMP amplification. The developed *in situ* LAMP detection method was applied on major tissue collected at 24, 36, 48, 60 and 72 h across the experimental infection process. The *in situ* LAMP signals were firstly detected at 36 h on pedal nerve branches, and at 48 h on mantles after infection. The viral signals detected at mantle were confined to the peripheral nerves scattered throughout the mantle. Finally, *in situ* LAMP signals were identified occasionally in connective tissue of hepatopancreas of samples collected at the end of the experimental infection. The viral infection signals were always accompanied by tissue lesions and infiltrated haemocytes infected with HaHV-1. The *in situ* LAMP method developed in this study achieved the goal of rapid detection and definite diagnosis of HaHV-1, and is helpful for investigating the tissue tropism and pathological characteristics in different susceptible species. The detection method constitutes a potentially valuable tool for the diagnosis of HaHV-1 infection, and studies associated with tissue tropism, invasion pathways and pathogenic mechanism of HaHV-1.

Key words: *Haliotis diversicolor aquatilis*; *Haliotid herpesvirus 1*; *in situ* LAMP; detection method

Corresponding authors: LIU Jinlan. E-mail: ljlan1115@163.com;

WANG Chongming. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

Funding projects: Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2019-BH-A02); National Natural Science Foundation of China (32073014); China Agriculture Research System of MOF and MARA