

WSSV 和 IHNV 二重实时荧光 PCR 检测方法的建立

谢芝勋¹ 谢丽基¹ 庞耀珊¹ 卢兆发² 谢志勤¹ 孙建华¹
邓显文¹ 刘加波¹ 唐小飞¹

(1. 广西兽医研究所, 南宁 530001; 2. 广西水产畜牧局, 南宁 530022)

摘要:根据基因库中对虾白斑综合征病毒 WSSV (AF369029) 和传染性皮下及造血器官坏死病毒 IHNV (AF218226) 基因序列, 设计了 WSSV 和 IHNV 的两对特异性引物和两条用不同荧光基团标记的 TaqMan 探针。对反应条件和试剂浓度进行优化, 建立了能够同时检测 WSSV 和 IHNV 的二重实时荧光 PCR 方法。该方法特异性好, 对 WSSV 和 IHNV 的检测敏感性分别达到 2 和 20 个模板拷贝数; 此外抗干扰能力强, 对 WSSV 和 IHNV 不同模板浓度进行组合, 仍可有效地同时检测这二个病毒。对保存的 30 份经常规 PCR 检测仅为 WSSV 或 IHNV 阳性的样品进行二重实时荧光 PCR 检测, 结果都为阳性, 其中 1 份为 WSSV 和 IHNV 混合感染。本研究建立的二重实时荧光 PCR 方法用于 WSSV 和 IHNV 的检测具有特异、敏感、快速、定量等优点。

关键词: 白斑综合征病毒; 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒; 多重实时荧光 PCR

中图分类号: S945.4⁺6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)01-

对虾白斑综合征病毒 (WSSV)、传染性皮下及造血器官坏死病毒 (IHNV) 是当前严重危害对虾养殖业的两种病毒。WSSV 主要引起对虾甲壳内侧白斑病变, 自 1990 年开始在亚洲地区养殖对虾中不断爆发流行, 死亡率高达 100%^[1]。IHNV 可引起红额角对虾急性感染并呈现高死亡率 (90%), 还可以引起南美白对虾出现慢性“矮小残缺综合症”, 导致患病对虾生长缓慢, 表皮畸形^[2]。感染了 WSSV 和 IHNV 的对虾可终身带毒, 通过垂直传播把病毒传给下一代和水平传播传给其他种群。近年来随着对虾种苗和水产品国际贸易交流增多, 对虾养殖中 WSSV 和 IHNV 混合感染常有发生, 不但给它们之间的鉴别诊断和有效防治增加困难, 也给对虾养殖业造成了严重的经济损失^[3]。

实时荧光 PCR 将 PCR 与荧光检测方法相结合, 具有操作简便、结果直观、敏感性高、特异性强、重复性好等优点, 已成为动物病原检测的重要方法。目前, 国内还没有应用实时荧光 PCR 同时检测对虾 WSSV 和 IHNV 的研究报道。为了提高检测准确性和检测效率, 缩短检测周期, 本研究采用了二重实

时荧光 PCR 技术, 建立同时检测对虾 WSSV 和 IHNV 的二重实时荧光 PCR 技术, 现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂 Lightcycler2.0 荧光定量 PCR 仪 (Roche)。荧光定量 PCR 试剂盒 Premix Ex TaqTM 购自 TaKaRa 公司 (大连)。质粒小量提取试剂盒购自北京 BioDev 公司。

1.2 质粒与阳性病料 pMD-WSSV 和 pMD-IHNV 阳性重组质粒由本室构建保存^[3]。WSSV、IHNV、对虾桃拉病毒 (TSV)、溶血弧菌和链球菌, 均由本实验室保存^[4,5], 参照文献 [3] 的方法进行 DNA 抽提。

1.3 标准阳性模板的制备 参照质粒提取试剂盒说明, 提取 pMD-WSSV 和 pMD-IHNV 质粒, 经紫外分光光度计测定 D260 值, 确定质粒 DNA 的浓度, 将两个质粒 DNA 混合稀释成终浓度都为 1×10^{10} 拷贝/ μL , 并 10 倍系统稀释成 1×10^1 — 1×10^{10} 拷贝/ μL 等 10 个稀释度, -20°C 保存备用。

收稿日期: 2007-02-05; 修订日期: 2008-01-02

基金项目: 广西科技攻关项目的部分内容 (桂科攻 0322006-3A) 资助

作者简介: 谢芝勋 (1963—), 男, 广西博白人; 研究员; 主要从事动物传染病防治技术的研究。E-mail: Xiezhixun@126.com

1.4 荧光定量 PCR 方法的建立

1.4.1 引物与 Taqman 探针的设计与合成 根据 GenBank 中 WSSV 基因序列 (AF369029) 和 IHNV 基因序列 (AF218226) 中的保守片段, 采用 Primer Express 2.0 软件, 设计两对特异性引物和两条 Taqman 探针, 由 TaKaRa 公司合成。

wssv. seq-415:5-GCCAGCCCCGTGAACTG-3

wssv. seq-492:5-ACGTCCAACCTCCGTTATCATTTTC-3

Ihlnv (mod) 53F:5-AGGAGACTCAAACACCT-TCCATCT-3

Ihlnv (mod) 130R:5-TGACTGATTCTGGGTTCT-TCGA-3

Taqman 探针序列: Wssv. seq-439T: 5-ROX-TCAGTGTCTTATCCCAACAAGTCCGA-ECLIPSE-3

Ihlnv (mod) 78T: 5-FAM-CAAAACCTCATCG-GAA AGTCCTACGCTC TC-TAMRA-3

1.4.2 引物、探针以及试剂浓度的筛选 应用质粒 pMD-WSSV 和 pMD-IHNV 作为检测样品, 将 WSSV 和 IHNV 的引物和探针在终浓度为 0.2—0.8 $\mu\text{mol/L}$ 之间, 进行不同浓度的配比, 筛选出能够同时检测对虾 WSSV 和 IHNV, 且对 C_t 值和扩增效率影响不大的引物和探针配比浓度; 在使用的荧光定量 PCR 试剂盒中, 添加不同浓度的 MgCl_2 、dNTP 和 Taq 聚合酶, 筛选出对实验结果较好的添加浓度, 建立二重实时荧光 PCR 方法。

1.4.4 二重实时荧光 PCR 扩增反应总体积为 20 μL , 其中 Real time PCR Premix 10 μL , 25 mmol/L MgCl_2 0.25 μL , 2.5 mmol/L dNTP 0.5 μL , 5U/ μL Taq 聚合酶 0.125 μL , WSSV 上、下游引物及探针终浓度都为 0.6 $\mu\text{mol/L}$, IHNV 上、下游引物及探针终浓度都为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 模板 2 μL , 余下用灭菌 DEPC 水补足, 均匀混合, 置 Lightcycler 荧光定量 PCR 仪上进行自动化扩增反应。温度转换率为 20 $^\circ\text{C}/\text{s}$, 在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。反应程序为: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 20s; 然后按 95 $^\circ\text{C}$ 变性 10s、60 $^\circ\text{C}$ 退火延伸 30s 进行 40 个循环, 最后于 40 $^\circ\text{C}$ 结束反应。

1.5 二重实时荧光 PCR 的敏感性试验与标准曲线的建立 将质粒 pMD-WSSV 和 pMD-IHNV 混合并 10 倍系统稀释成 1×10^1 — 1×10^7 拷贝/ μL 的标准品, 进行二重荧光定量 PCR, 重复试验 6 次, 并与本实验室已建立的普通 PCR^[3] 及单重单检的荧光定量 PCR 进行比较。PCR 结束后, 取 PCR 反应液用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定产物。

1.6 二重实时荧光 PCR 的特异性试验 加入对虾 WSSV 的基因组 DNA 作模板, 同时加入针对 WSSV 和 IHNV 的引物、探针进行实时荧光 PCR 检测, 对仪器中的每个检测孔同时收集 FAM 和 ROX 两种荧光信号, 确定该方法的引物与探针在 WSSV 和 IHNV 之间的特异性。用同样的方法进行 IHNV 的二重单检特异性试验。利用本研究建立的二重荧光定量检测方法, 对实验室保存的其他对虾病毒如链球菌、TSV 和溶血弧菌进行检测, 进一步确定对虾 WSSV 和 IHNV 二重实时荧光 PCR 方法的特异性。

1.7 重复性试验 用 1×10^6 拷贝/ μL 的 WSSV 和 IHNV 混合的阳性样品, 分 3 个标本同时检测。通过计算 C_t 值的标准差 (S) 和变异系数 (CV) 来验证荧光定量 PCR 的批内重复性。3d 后重复检测保存于 -20 $^\circ\text{C}$ 的模板 DNA, 来验证模板的稳定性及荧光定量 PCR 的批间重复性。

1.8 二重实时荧光 PCR 的干扰性试验 将对虾 WSSV 和 IHNV 标准样品按不同的浓度进行组合 (10^3 和 10^8 , 10^8 和 10^3 , 10^0 和 10^8 , 10^8 和 10^1), 分别进行二重实时荧光 PCR 和单重实时荧光 PCR 检测, 确定浓度相差较大时 WSSV 和 IHNV 之间的检测是否存在相互干扰现象。

1.9 二重实时荧光 PCR 检测临床病料 利用建立的对虾 WSSV 和 IHNV 二重实时荧光 PCR 方法, 检测实验室保存的各 15 份的 WSSV 和 IHNV 病料 (经常规 PCR 检测为单独 WSSV 或 IHNV 阳性) 的 DNA, 检测经常规 PCR 检测为单一感染的病料是否存在混合感染, 评价其临床实用性。

2 结果

2.1 pMD-IHNV 质粒 DNA 浓度的测定

提取的质粒 DNA 经核酸蛋白仪测定, pMD-WSSV 质量浓度为 30.36 $\mu\text{g/mL}$, 可换算为 1.7×10^{10} 拷贝/ μL ; pMD-IHNV 质量浓度为 49.5 $\mu\text{g/mL}$, 可换算为 3×10^{10} 拷贝/ μL 。

2.2 引物、探针浓度

不同的引物和探针终浓度配比试验结果显示, 不同的引物和探针终浓度对试验结果影响比较大, WSSV 上、下游引物及探针终浓度分别为 0.6 $\mu\text{mol/L}$, IHNV 上、下游引物及探针终浓度分别为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 对质粒标准品的检测可获得较小的 C_t 值, 但获得的曲线并不表现典型的 S 状^[6]。在 20 μL 的反应体系中添加 25 mmol/L MgCl_2 0.25 μL ,

2.5mmol/L dNTP 0.5 μ L, 5U/ μ L *Taq* 聚合酶 0.125 μ L, 可使检测获得较高的扩增效率, 实时扩增曲线光滑, 呈典型的 S 状。

2.3 二重实时荧光 PCR 的标准曲线及灵敏度

以 10 倍系列稀释的 WSSV 和 IHNV 质粒混合液 ($1 \times 10^7 - 1 \times 10^0$ 拷贝/ μ L) 为模板进行扩增, 扩增效率分别为 96.25% 和 97.7%, 标准误差分别为 0.0254 和 0.0879。荧光定量 PCR 的敏感性结果 (图 1、图 2 和表 1)。从图中的荧光曲线可见, 对 WSSV 的检测 1×10^0 拷贝/ μ L 仍有荧光曲线, 对 IHNV 的检测 1×10^1 拷贝/ μ L 仍有荧光曲线, 表明该检测方法对 WSSV 的灵敏度为 2 拷贝, 对 IHNV 的灵敏度为 20 拷贝, 比常规 PCR 敏感性高 100—1000 倍, 重复检测的结果一致。图中低浓度检测时, 其荧光曲线梯度间隔并不明显, 但其 *Ct* 值与具有良好梯度间隔的单重单检的 WSSV 或 IHNV 荧光定量 PCR *Ct* 值的变异系数并不大, 都在 3% 以内。

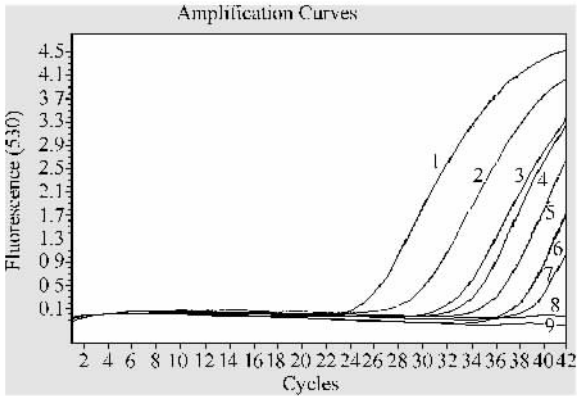


图 1 IHNV 的敏感性试验

Fig. 1 Sensitivity of the multiplex real-time PCR for IHNV

- 1. 10^7 拷贝/ μ L; 2. 10^6 拷贝/ μ L; 3. 10^5 拷贝/ μ L; 4. 10^4 拷贝/ μ L;
- 5. 10^3 拷贝/ μ L; 6. 10^2 拷贝/ μ L; 7. 10^1 拷贝/ μ L; 8. 10^0 拷贝/ μ L;
- 9. 空白对照
- 1. 10^7 copies/ μ L; 2. 10^6 copies/ μ L; 3. 10^5 copies/ μ L; 4. 10^4 copies/ μ L;
- 5. 10^3 copies/ μ L; 6. 10^2 copies/ μ L; 7. 10^1 copies/ μ L; 8. 10^0 copies/ μ L; 9. Negative control

2.4 二重实时荧光 PCR 的特异性

在反应体系中, 只加入 WSSV 或 IHNV 的 DNA 作为模板, 同时加入针对 WSSV 和 IHNV 的引物、探针进行实时荧光 PCR 检测, 结果只得到相应病毒的特异性荧光曲线, 证实所设计的引物探针具有特异性。通过对感染对虾的其他病毒如链球菌、TSV 和溶血弧菌的检测 (图 3 和图 4), 结果证

实, 该方法特异性强, 与其他检测对象无交叉反应。

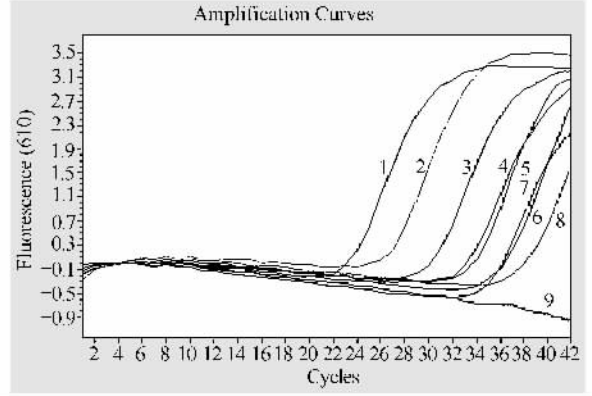


图 2 WSSV 的敏感性试验

Fig. 2 Sensitivity of the multiplex real-time PCR for WSSV

- 1. 10^7 拷贝/ μ L; 2. 10^6 拷贝/ μ L; 3. 10^5 拷贝/ μ L; 4. 10^4 拷贝/ μ L;
- 5. 10^3 拷贝/ μ L; 6. 10^2 拷贝/ μ L; 7. 10^1 拷贝/ μ L; 8. 10^0 拷贝/ μ L;
- 9. 空白对照
- 1. 10^7 copies/ μ L; 2. 10^6 copies/ μ L; 3. 10^5 copies/ μ L; 4. 10^4 copies/ μ L;
- 5. 10^3 copies/ μ L; 6. 10^2 copies/ μ L; 7. 10^1 copies/ μ L; 8. 10^0 copies/ μ L; 9. Negative control

表 1 WSSV 和 IHNV 不同浓度的 *Ct* 值

Tab. 1 The *Ct* value of different concentration of WSSV and IHNV

| 样品 | 浓度 Concentration (copies/ μ L) | | | | | | | |
|------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 10^7 | 10^6 | 10^5 | 10^4 | 10^3 | 10^2 | 10^1 | 10^0 |
| WSSV | 22.04 | 25.66 | 28.91 | 31.60 | 32.27 | 33.82 | 35.69 | 36.74 |
| IHNV | 24.61 | 28.54 | 31.60 | 32.88 | 33.98 | 35.34 | 36.45 | >42 |

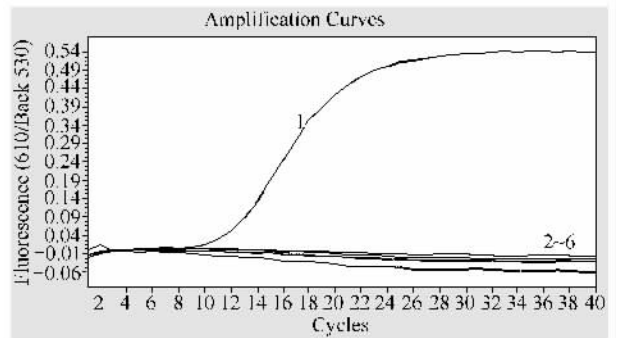


图 3 WSSV 的特异性试验

Fig. 3 The specificity of WSSV

- 1. WSSV; 2. IHNV; 3. TSV; 4. 链球菌; 5. 弧菌; 6. 阴性
- 1. WSSV; 2. IHNV; 3. TSV; 4. Streptococcus; 5. Vibrio; 6. Negative

2.5 重复性试验

用 1×10^6 拷贝/ μ L 的 WSSV 和 IHNV 混合的阳性样品, 分为 3 个标本同时检测, *Ct* 值的标准差 (*S*) 分别为 0.189 和 0.323, 变异系数 (*CV*) 分别为 0.70% 和 1.10%, 3d 后重复检测保存于 -20°C 的模

板 DNA(表 2)。结果说明此方法具有良好的准确性和重复性。

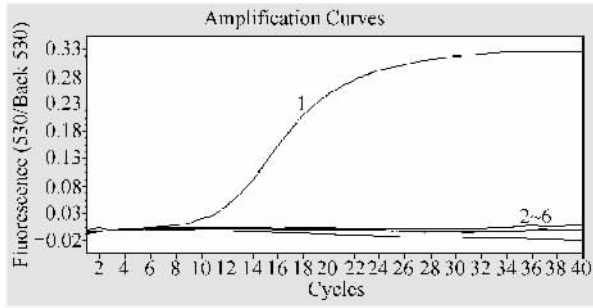


图 4 IHHNV 的特异性试验

Fig. 4 The specificity of IHHNV

1. IHHNV; 2. WSSV; 3. TSV; 4. 链球菌; 5. 弧菌; 6. 阴性

1. IHHNV; 2. WSSV; 3. TSV; 4. Streptococcus; 5. Vibrio; 6. Negative

表 2 Real-time PCR 的批间重复性

Tab. 2 The Real-time PCR results of 3 repetitious detections

| 样品 Sample | 同一模板不同检测时间的 C_t The C_t value of the same sample in different time | | | | | CV% |
|--------------|---|-------|-------|------|-------|-----|
| | 时间 Time(d) | 1 | 4 | 7 | S | |
| WSSV | 25.34 | 26.84 | 26.23 | 0.53 | 2.03% | |
| IHHNV | 27.62 | 27.11 | 28.54 | 0.07 | 2.13% | |

2.6 二重实时荧光 PCR 的干扰性试验

将 WSSV 或 IHHNV 的标准品按不同的浓度进行组合,发现当一个模板浓度较高而另一个模板浓度较低时,所建立的方法依然可以同时检测到 WSSV 或 IHHNV,并且与 WSSV 单重荧光定量 PCR 比较,检测的 C_t 值的变异并不大(表 3),对 IHHNV 的检测结果类似。

表 3 不同浓度的 WSSV 与 IHHNV 的定量 PCR 的 C_t 值

Tab. 3 The C_t value of real-time PCR for different concentrations of WSSV and IHHNV

| | WSSV 和 IHHNV 不同浓度组合 Different concentrations of WSSV and IHHNV (copies/ μ L) | | | |
|--|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 10^3 and 10^8 | 10^8 and 10^3 | 10^0 and 10^8 | 10^8 and 10^1 |
| WSSV 单重荧光 PCR C_t 值 The C_t value of WSSV real-time PCR | 33.19 | 18.69 | 35.74 | 19.59 |
| 多重荧光 PCR C_t 值 The C_t value of multiplex real-time PCR | 33.89 | 19.46 | 36.68 | 19.36 |
| CV (%) | 1.04 | 2.02 | 2.04 | 0.59 |

2.7 二重实时荧光 PCR 检测临床病料

对各 15 份经普通 PCR 检测为单一 WSSV 阳性或单一 IHHNV 阳性的病料进行荧光定量 PCR。结果 15 份经普通 PCR 检测为单一 WSSV 阳性的病料检测的拷贝数在 3.34×10^3 — 1.82×10^7 拷贝/ μ L 之间,未见有 WSSV 和 IHHNV 混合感染,15 份经普通 PCR 检测为单一 IHHNV 阳性的病料检测的拷贝数在 5.49×10^4 — 1.16×10^7 拷贝/ μ L 之间,其中一份为 IHHNV 和 WSSV 混合感染,拷贝数分别为 6.78×10^6 和 3.34×10^3 拷贝/ μ L。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出,它是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时检测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术不仅实现了对 DNA 模板的定量,而且具有灵敏度高、特异性强、准确可靠、能实现多重反应、自动化程度高、无污染、实时性好等特

点^[7]。在实验室检测中,当样品量非常大时,单重荧光 PCR 在成本和时间方面就存在一定的劣势,迫切需要一种高通量、低成本、高效率的方法来进行批量的快速检测。采用多对引物扩增检测多个模板的多重荧光 PCR,克服了单重荧光 PCR 的不足。但是建立一个多重荧光 PCR 方法比单重的要复杂得多:第一,对引物的要求更高。需要保证各个引物之间没有干扰,有相近的退火温度,不会产生非特异性扩增。第二,对试剂的要求更高。由于多重荧光 PCR 多对引物对试剂的竞争,进行多重荧光 PCR 时,试剂反应浓度的合适范围更窄,需要对试剂浓度的配比进行更仔细的探索。第三,需要保证不同探针所标记的荧光基团间无相互干扰,使用的荧光 PCR 仪有相应的多个检测通道^[8]。

本研究通过进行 WSSV 和 IHHNV 的二重实时荧光 PCR 检测,筛选出了 WSSV 和 IHHNV 的最佳引物和探针的浓度组合,但获得的曲线并不表现典型的 S 状,通过在反应体系中添加 $MgCl_2$ 、dNTP 和 *Taq* 聚合酶适量,可使检测获得较高的扩增效率,实

时扩增曲线光滑呈典型的 S 状,说明 $MgCl_2$ 、dNTP 和 *Taq* 聚合酶的浓度对扩增效率的影响非常重要。

本研究采用具有多个激光通道的 LightCycler2.0 荧光 PCR 仪,在同一反应管内,由两对 PCR 特异性引物对 WSSV 和 IHNV 进行扩增检测反应,同时收集代表 WSSV 和 IHNV 的荧光信号,从而建立了能够同时检测 WSSV 和 IHNV 的多重实时荧光 PCR 方法,实现了一管二检的目的,并且 PCR 反应只需要约 30min 的时间,大大提高了检测速度。另外,根据特异性荧光曲线的域值,可以估算样品中相应病毒的含量。

低浓度检测时,所建立的二重实时荧光 PCR 的荧光曲线梯度间隔并不明显,本试验对试剂及引物浓度进行优化也未能消除这个现象,推测其可能原因是由于两个模板对试剂的竞争而相互影响造成的。但所建立的二重实时荧光 PCR 的 *Ct* 值,与具有良好梯度间隔的单重单检的 WSSV 或 IHNV 荧光定量 PCR *Ct* 值的变异系数并不大(3% 以内),因此并不影响对 WSSV 和 IHNV 的检测。

WSSV 和 IHNV 在临床上经常出现混合感染^[3],两种病毒的含量可能会相差较大。因此,本研究将 WSSV 和 IHNV 的模板浓度进行调整、组合,从而探讨高浓度模板对低浓度模板是否存在干扰现象。结果发现,一个模板浓度较高而另一个模板浓度较低时,所建立的方法依然可以同时检测到 WSSV 或 IHNV,并且与单重的荧光定量 PCR 比较,*Ct* 值的变异系数并不大,表明高浓度的模板对低浓度模板的扩增检测干扰不明显。在对虾的 30 份临床样品的检测中,有一份为 WSSV 和 IHNV 的混合感染,而常规 PCR 并未能检出,说明二重实时荧光 PCR 能检测以潜伏感染的形式存在、病毒量很低的病毒,因此二重实时荧光 PCR 方法的建立,对于 WSSV 和 IHNV 的有效防治和培育出具有自主知识产权的 SPF 亲虾群具有很高的实用价值。

参考文献:

- [1] Lei Z W, Huang J, Kou Y T, *et al.* Review on research of molecular epidemiology of white spot syndrome (WSS) in prawn [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, **9**(3):260—2641 [雷质文, 黄健, 寇运同, 等. 对虾白斑综合症(WSS)的分子流行病学研究进展. 中国水产科学, 2002, **9**(3):260—2641]
- [2] Bell T A, Lightner D V. IHNV virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 1984, **38**:185—194
- [3] Xie Z X, Pang Y S, Liu J B, *et al.* Studies on development of two-temperature multiplex PCR for WSSV and IHNV [J]. *Marine Science*, 2005, **29**(12):9—12 [谢芝勋, 庞耀珊, 刘加波, 等. 二温式多重 PCR 检测鉴别对虾白斑综合征病毒(WSSV)和传染性皮下及造血器官坏死病毒(IHNV)的研究与应用. 海洋科学, 2005, **29**(12):9—12]
- [4] Pang Y S, Xie Z X, Xie Z Q, *et al.* Development and application of two-temperature PCR for the detection of white spot syndrome virus in penaeid shrimp [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2003, **4**:43—45 [庞耀珊, 谢芝勋, 谢志勤, 等. 二温式 PCR 检测对虾白斑综合征病毒. 中国兽医杂志, 2003, **4**:43—45]
- [5] Pang Y S, Xie Z X, He J M. Two-temperature reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for the detection of taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* [J]. *Marine Sciences*, 2004, **2**:54—57 [庞耀珊, 谢芝勋, 何竞铭, 等. 二温式 RT-PCR 检测对虾 Taura 综合征病毒的研究. 海洋科学, 2004, **2**:54—57]
- [6] Palladino S, Kay I D, Flexman J P, *et al.* Rapid detection of vanA and vanB genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**(6):2483—2486
- [7] Zhang H, Li B, Zhou X, *et al.* Progress and application of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, **27**(Suppl.):5—12 [张贺, 李波, 周虚, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及应用. 动物医学进展, 2006, **27**(增):5—12]
- [8] Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, *et al.* Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(20):122—122

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX REAL-TIME PCR ASSAY FOR DETECTION OF WSSV AND IHNV

XIE Zhi-Xun¹, XIE Li-Ji¹, PANG Yao-Shan¹, LU Zhao-Fa², XIE Zhi-Qin¹, SUN Jian-Hua¹,
DENG Xian-Wen¹, LIU Jia-Bo¹ and TANG Xiao-Fei¹

(1. Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001; 2. Guangxi Bureau of Fishery and Animal Husbandry, Nanning 530022)

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) and Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHNV) are responsible for significant economic loss in the shrimp industry. In order to simultaneously and massively identify WSSV and IHNV, two pairs of primers and two TaqMan probes were designed and synthesized according to the conserved gene sequences of WSSV (AF369029) and IHNV (AF218226) in GenBank. The reaction parameters such as the concentration of two pair of primers, two TaqMan probes and the reaction buffer were optimized to develop a multiplex real-time PCR assay for the rapid detection of WSSV and IHNV. The multiplex real-time PCR assay was found to be specific and be able to detect and differentiate WSSV and IHNV, and no positive results were observed when nucleic acid from *Vibrio*, Taura Syndrome Virus and Streptococcus were used as multiplex real-time PCR templates. The developed multiplex real-time PCR assay was compared with that of routine PCR. The sensitivity of multiplex real-time PCR assay was 2 and 20 template copies for WSSV and IHNV respectively, and its sensitivity was 10^3 and 10^2 times higher than that of the routine PCR. The samples were examined using the multiplex real-time PCR repeatedly and the results indicated that the multiplex real-time PCR was reproducible. Different concentrations of WSSV and IHNV could be identified when mixed together, which implied the assay could be applied to clinical confirmation for simultaneous infection of WSSV and IHNV. The multiplex real-time PCR results of 30 routine PCR positive samples showed that one specific amplified curve was displayed when shrimp was infected by only one of these two viral pathogens, whereas two specific amplified curves were displayed when shrimp was infected by two viral pathogens. The result indicated that multiplex real-time PCR was able to detect and differentiate the presence of each pathogen in infected clinical shrimp. This multiplex real-time PCR assay is a quick, sensitive, specific and quantitative tool for detection of WSSV and IHNV, and it will be useful for the control of WSS and IHNV in shrimp.

Key words: WSSV; IHNV; Multiplex real-time PCR