

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201124002

http://www.yykxjz.cn/

彭军辉, 安伟, 张明辉. 鲤疱疹病毒 2 型和 3 型三重 PCR 检测方法的建立与应用. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 158-164  
PENG J H, AN W, ZHANG M H. Establishment and application of the triplex PCR method for simultaneous detection of Cyprinid herpesvirus 2 and Cyprinid herpesvirus 3. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 158-164

## 鲤疱疹病毒 2 型和 3 型 三重 PCR 检测方法的建立与应用\*

彭军辉 安 伟 张明辉<sup>①</sup>

(上海市水产研究所 上海市水产技术推广站 上海 200433)

**摘要** 鲤疱疹病毒 2 型和 3 型主要感染鲫(金)鱼(*Carassius auratus*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和锦鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*)及其杂交种, 具有高度的传染性和致病性, 对养殖鲤科鱼类危害严重。为了建立快捷、高效且能同时检测这 2 种类型鲤疱疹病毒的检测技术, 本研究根据鲤疱疹病毒的 DNA 聚合酶基因(2、3 型)、解旋酶基因(2 型)和胸苷激酶基因(3 型)的保守序列, 设计了 3 对特异性引物, 通过对三重 PCR 的反应条件进行优化, 建立起鲤疱疹病毒 2 型和 3 型三重 PCR 检测方法, 并运用该方法对实验室保存的鲫鱼和鲤鱼组织样品进行检测。结果显示, 该三重 PCR 检测方法仅在鲤疱疹病毒阳性样品中扩增出 3 条特异性条带, 表现出良好的特异性; 以克隆的目的基因质粒为模板, 进行 10 倍梯度稀释, 该检测方法能检出的极限值为  $2.85 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ , 表现出较高的灵敏性; 运用该方法检测 122 份鲫鱼和 60 份鲤鱼样品, 其结果与运用国家标准(GB/T 36194-2018)和行业标准(SC/T 7212.1-2011)方法检测的结果一致。本研究表明, 构建的三重 PCR 检测方法不仅具有较高的准确性和灵敏度, 还能同时检测 2 种类型的鲤疱疹病毒, 有效提高检测效率。

**关键词** 鲤疱疹病毒; 三重 PCR; 鲫(金)鱼; 鲤鱼

中图分类号 S941.41 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)06-0158-07

鲤疱疹病毒 2 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2) 又称金鱼造血器官坏死病毒(goldfish haematopoietic necrosis virus, GFHNV), 主要引起鲫(金)鱼(*Carassius auratus*)的造血器官坏死病。自 1992 年首次于日本报道后, 该病毒迅速在全球范围内蔓延, 1995 年首次在我国台湾的东北地区被报道(Jung *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1999), 2012 年江苏省养殖的异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)大规模感染该病毒并大量死亡, 之后其在全国其他鲫(金)鱼主养区蔓延并广泛存在, 对鲫(金)鱼养殖业造成了严重的经济损失(袁锐

等, 2019)。鲤疱疹病毒 3 型(CyHV-3)又称锦鲤疱疹病毒(koi herpesvirus, KHV), 其主要感染鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和锦鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*), 引发高传染性和致死性的锦鲤疱疹病毒病(koi herpesvirus disease), 该病是世界动物卫生组织(OIE)必须申报的疾病, 我国将其列为二类动物疫病。2002 年以来, CyHV-3 先后引起我国东北地区和海南、广东、天津、江苏等省市养殖的鲤鱼和锦鲤发病死亡, 对各地的鲤鱼和锦鲤养殖业构成严重威胁(曲木等, 2020)。

目前, 已有多种关于 CyHV-2 和 CyHV-3 的 PCR

\* 上海市农业系统标准预研制(2018-026)资助 [This work was supported by Pre-Development of Shanghai Agricultural System Standard (2018-026)]. 彭军辉, E-mail: pengjhpeng@163.com

① 通讯作者: 张明辉, 高级工程师, E-mail: mhzhang0907@163.com

收稿日期: 2020-11-24, 收修改稿日期: 2021-01-07

检测方法被研究报道。Waltzek 等(2009)建立 CyHV-2 普通 PCR 检测方法, 以其目的基因构建的质粒为模板, 最低能检测到 78 copies/ $\mu\text{g}$  DNA, 且对鲤疱疹病毒 1 型(Cyprinid herpesvirus 1, CyHV-1)和 CyHV-3 等病毒基因无扩增, 具有较高的灵敏度和特异性。张旻等(2017)根据 CyHV-2 的衣壳蛋白基因设计引物和 TaqMan 探针, 建立了 CyHV-2 的实时荧光定量 PCR 检测方法, 该方法最低能检测到 10 copies 的目的基因, 且对 CyHV-3、流行性造血器官坏死病毒(epizootic haematopoietic necrosis, EHNV)等水生动物病原无交叉反应。赵欣等(2017)建立了 CyHV-2 的微滴式数字 PCR 检测方法, 可准确定量 CyHV-2, 表现出高度的灵敏性和稳定性。谢亚君等(2019)针对 CyHV-2 的普通 PCR、双重 PCR 和荧光定量 PCR 等不同检测方法之间的优劣进行了比较。对于 CyHV-3 的研究报道则涵盖了普通 PCR、巢式 PCR、双重 PCR 和荧光定量 PCR 等各种 PCR 检测方法(Gilad *et al.*, 2002; 刘荭等, 2002; 郑树城等, 2016)。但是, 同时对这 2 种类型鲤疱疹病毒进行检测的 PCR 方法尚未有报道。

本研究建立的鲤疱疹病毒 2 型和 3 型三重 PCR 检测方法, 能在 1 次反应中同时检测 2 种类型的鲤疱疹病毒, 具有精准、快捷和高效的特点, 该方法不仅能丰富和完善鲤疱疹病毒 2 型和 3 型的检测方法, 还可为其预警监测工作提供新的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验毒株及样品

CyHV-2、CyHV-3、草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)、鲤春病毒血症病毒(spring viraemia of carp virus, SVCV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHNV)、白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)和虾虹彩病毒(shrimp hemocyte iridescent

virus, SHIV)等水生动物病毒病料及检测所用鲫鱼和鲤鱼样品均由实验室鉴定并保存(其中, CyHV-3 阳性样本由中国水产科学研究院珠江水产研究所馈赠)。CyHV-2 的鉴定方法参照国家标准(GB/T 36194-2018)《金鱼造血器官坏死病毒检测方法》, CyHV-3 的鉴定方法参照水产行业标准(SC/T 7212.1-2011)《鲤疱疹病毒检测方法第 1 部分: 锦鲤疱疹病毒》。

### 1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中鲤疱疹病毒的基因序列, 选取 DNA 聚合酶基因(CyHV-2、CyHV-3 型, *Pol*)、解旋酶基因(CyHV-2 型, *Hel*)和胸苷激酶基因(CyHV-3 型, *TK*)的保守序列设计 3 对特异性引物(表 1), 并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.3 DNA 模板和标准品的制备

**1.3.1 DNA 模板的制备** 研究所用 CyHV-2、CyHV-3 和其他水生动物病毒 DNA 及检测样品 DNA 均按照 DNA 提取试剂盒(TaKaRa, 大连)说明书进行提取, 并于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.3.2 标准品的制备** 分别以 CyHV-2 和 CyHV-3 的 DNA 为模板, 按照 DNA 扩增试剂盒(TaKaRa, 大连)的方法进行单重 PCR 扩增, 其反应体系和条件见表 2, 然后, 将反应所得 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并按照 DNA 凝胶回收试剂盒(Axy Prep)的方法对目的条带进行胶回收, 之后将其分别连接到 pMD19-T 载体上, 从而构建 *Pol*、*Hel* 和 *TK* 的标准质粒, 并根据以下公式计算其拷贝数:

拷贝数(copies/ $\mu\text{L}$ )= $6.02 \times 10^{23}$ (copies/mol)  $\times$  质粒浓度(ng/ $\mu\text{L}$ )  $\times 10^{-9}$ /质粒分子量(g/mol)。

### 1.4 三重 PCR 检测方法的建立与优化

将 *Pol*、*Hel* 和 *TK* 的质粒拷贝数换算到同一数量级后按比例混合, 以混合后的质粒为 DNA 模板, 在

表 1 引物序列和扩增基因  
Tab.1 Primer sequences and amplified genes

引物名称 Primer name	序列 Sequence	片段长度 Fragment length /bp	扩增基因 Gene	GenBank Accession No.
CyHV-F1	TCGATGAGAGTCTGGGCGTG	900	<i>Pol</i> (CyHV-2,3)	AFJ 20509
CyHV-R1	CGGGACCACACCTGGCATAA			
CyHV-F2	CTACCCATCATCCGAGCCGT	600	<i>Hel</i> (CyHV-2)	AFJ 20501
CyHV-R2	AGCTCGTCTGTGTTGAAACC			
CyHV-F3	GAGGTGATGCAGCGTCTGGA	300	<i>TK</i> (CyHV-3)	QAU 54941
CyHV-R3	GTAAGACTCGGCGCCTCAA			

表2 单重 PCR 反应体系和条件  
Tab.2 Reaction system and conditions of single PCR

反应体系 Reaction system		反应条件 Reaction conditions		
试剂 Reagents	体积 Volume / $\mu\text{L}$			
2 $\times$ Pre Mix	12.5			
Primer-F (10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0	94 $^{\circ}\text{C}$	5 min	} 34 cycles
Primer-R (10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0	94 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
DNA 模板	2.0	55 $^{\circ}\text{C}/60^{\circ}\text{C}/51^{\circ}\text{C}$	30 s	
ddH <sub>2</sub> O	8.5	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min	
总计 Total	25.0	72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	

单重 PCR 的基础上进行三重 PCR 扩增。3 对引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 的添加量均设为 0.2~0.6  $\mu\text{L}$  5 个梯度, 退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$  6 个梯度, 其他反应条件不变, 根据扩增结果选择最佳引物量和退火温度, 并将扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.5 敏感性实验

将 *Pol*、*Hel* 和 *TK* 的混合质粒进行 10 倍梯度稀释, 浓度范围为  $2.85 \times 10^8 \sim 2.85 \times 10$  copies/ $\mu\text{L}$ , 以各梯度浓度的混合质粒为 DNA 模板, 采用优化后的三重 PCR 检测方法进行 PCR 扩增, 测试该方法的灵敏性。

### 1.6 特异性实验

分别以 CyHV-2、CyHV-3、GCRV、SVCV、IHHNV、WSSV 和 SHIV 等水生动物病毒的 DNA 或 cDNA 为模板, 采用优化后的三重 PCR 检测方法进行扩增, 同时还以 CyHV-2 和 CyHV-3 的混合 DNA 为模板, 分别进行只添加单对引物的单重 PCR 反应, 以检测该方法的特异性。

### 1.7 养殖生产中样品检测的应用

根据 1.1 的方法分别对实验室自 2018—2020 年鉴定保存的 122 份鲫鱼和 60 份鲤鱼样品进行鲤疱疹病毒检测。其中, 鲫鱼样品进行 CyHV-2 检测, 鲤鱼样品进行 CyHV-3 检测, 并从鲫鱼样品中选取 15 份 CyHV-2 阳性样品和 15 份阴性样品进行 CyHV-3 检测; 另外, 再选取 15 份 CyHV-2 和 CyHV-3 的 DNA 混合样(其中, 阳性 DNA 混合样为 8 份)进行 CyHV-2 和 CyHV-3 检测。同时, 采用本研究建立的三重 PCR 方法对以上样品进行检测, 以评估该方法的稳定性和可靠性。

### 1.8 三重 PCR 检测方法评价

根据 OIE《水生动物疫病诊断手册》(2019)所规定的原则, 在 95%以上的置信区间、允许误差 5%的

范围内对 122 份鲫鱼和 60 份鲤鱼样品进行鲤疱疹病毒检测, 以 1.1 推荐的检测方法为标准, 计算该三重 PCR 检测方法的诊断敏感性(Dse)和诊断特异性(Dsp), 计算公式如下:

$$\text{诊断敏感性 Dse} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN}) \times 100\%$$

$$\text{诊断特异性 Dsp} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP}) \times 100\%$$

## 2 结果

### 2.1 三重 PCR 检测方法的建立与优化

构建的三重 PCR 检测方法的最佳退火温度为 57 $^{\circ}\text{C}$ , 在此温度下, 添加不同引物量的各 PCR 反应均扩增出 3 条目的条带, 其中, 当各引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 添加量为 0.2  $\mu\text{L}$  时, 3 条目的条带最清晰且均一(图 1), 将送检测序的结果与 GenBank 中的 CyHV-2 和 CyHV-3 基因序列进行比对, 匹配度均达到 99%以上。优化后的三重 PCR 最佳反应体系和条件见表 3。

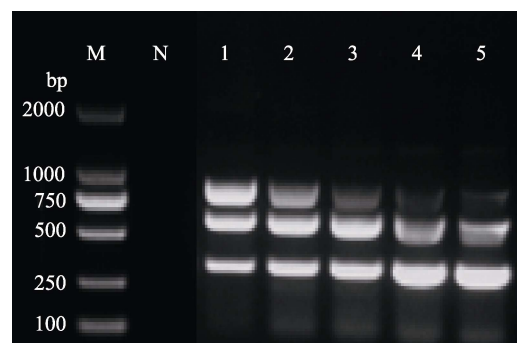


图1 最佳退火温度下的三重 PCR 扩增结果  
Fig.1 The amplification results of triple PCR at the optimum annealing temperature

M: DL2000 bp marker; N: 阴性对照;

1~5 分别表示 3 对引物的添加量分别为

0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6  $\mu\text{L}$

M: DL2000 bp marker; N: Negative control; 1~5: Addition amount of 3 pairs of primers was 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 0.6  $\mu\text{L}$ , respectively

表 3 三重 PCR 反应体系和条件  
Tab.3 Reaction system and conditions of triplex PCR

反应体系 Reaction system		反应条件 Reaction conditions		
试剂 Reagents	体积 Volume / $\mu$ L			
2 $\times$ Pre Mix	12.5			
CyHV-F1 (10 $\mu$ mol/L)	0.2			
CyHV-R1 (10 $\mu$ mol/L)	0.2			
CyHV-F2 (10 $\mu$ mol/L)	0.2	94 $^{\circ}$ C	5 min	} 34 cycles
CyHV-R2 (10 $\mu$ mol/L)	0.2	94 $^{\circ}$ C	30 s	
CyHV-F3 (10 $\mu$ mol/L)	0.2	57 $^{\circ}$ C	30 s	
CyHV-R3 (10 $\mu$ mol/L)	0.2	72 $^{\circ}$ C	1 min	
DNA 模板	2.0	72 $^{\circ}$ C	10 min	
ddH <sub>2</sub> O	9.3			
总计 Total	25.0			

2.2 敏感性实验结果

分别以  $2.85 \times 10^8 \sim 2.85 \times 10$  copies/ $\mu$ L 的混合质粒为模板进行三重 PCR 扩增, 结果显示, 随着模板浓度的降低, 3 条目的条带的亮度也逐渐降低, 该方法能检测到的质粒最低极限为  $2.85 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L (图 2)。

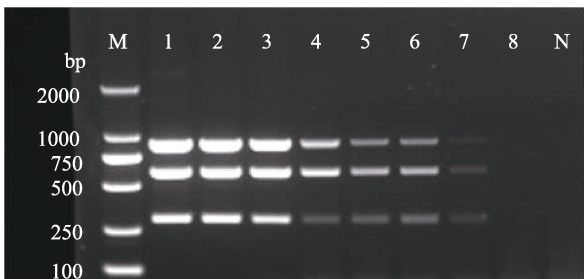


图 2 三重 PCR 敏感性实验结果

Fig.2 The results of sensitivity experiments of triplex PCR

M: DL2000 bp marker; N: 阴性对照; 1~8 分别表示质粒模板浓度为  $2.85 \times 10^8$ 、 $2.85 \times 10^7$ 、 $2.85 \times 10^6$ 、 $2.85 \times 10^5$ 、 $2.85 \times 10^4$ 、 $2.85 \times 10^3$ 、 $2.85 \times 10^2$  和  $2.85 \times 10$  copies/ $\mu$ L  
M: DL2000 bp marker; N: Negative control;  
1~8: Concentration of plasmid was  $2.85 \times 10^8$ ,  $2.85 \times 10^7$ ,  $2.85 \times 10^6$ ,  $2.85 \times 10^5$ ,  $2.85 \times 10^4$ ,  $2.85 \times 10^3$ ,  $2.85 \times 10^2$ , and  $2.85 \times 10$  copies/ $\mu$ L, respectively

2.3 特异性实验结果

以 CyHV-2 和 CyHV-3 为模板的三重 PCR 反应和分别添加单对引物进行的单重 PCR 反应均只扩增出相应的目的条带, 无交叉反应; 以 GCRV、SVCV、IHHNV、WSSV 和 SHIV 为模板的三重 PCR 反应均未扩增出任何条带, 结果见图 3。

2.4 检测结果

采用 1.1 推荐的方法检测的结果显示, 122 份鲫鱼样品中有 15 份为 CyHV-2 阳性, 107 份为 CyHV-2 阴性, 从中抽取的 30 份鲫鱼样品进行 CyHV-3 检测, 结果全部为阴性; 60 份鲤鱼样品中有 8 份为 CyHV-3 阳性, 52 份为 CyHV-3 阴性, 采用三重 PCR 方法检测的结果与以上结果一致。另外, 以 DNA 混合样为模板进行的三重 PCR 反应的结果显示, 8 份为阳性, 7 份为阴性, 具体结果见表 4。



图 3 三重 PCR 特异性实验结果

Fig.3 The results of specificity experiments of triplex PCR

M: DL2000 bp marker; N: 阴性对照 Negative control; P: 阳性对照 Positive control; 1: CyHV-2; 2: CyHV-3; 3: GCRV; 4: SVCV; 5: IHHNV; 6: WSSV; 7: SHIV; 8~10: CyHV-2 和 CyHV-3 混合 DNA(单对引物)Mixed DNA of CyHV-2 and CyHV-3 (single primer pair)

2.5 三重 PCR 检测方法评价

分别以国家标准(GB/T 36194-2018)和水产行业标准(SC/T 7212.1-2011)推荐的检测方法为标准, 根据计算公式求得本研究建立的三重 PCR 检测方法的诊

表4 样品检测结果  
Tab.4 The detecting results of samples

检测方法 Detection method		阳性样品数/样品总数 Positive samples/Total samples		
		鲫鱼 Crucian carp	鲤鱼 Carp	DNA 混合样
推荐方法 Recommended methods	CyHV-2	15/122	0/0	8/15
	CyHV-3	0/30	8/60	8/15
三重 PCR Triple PCR	CyHV-2	15/122	0/60	8/15
	CyHV-3	0/122	8/60	8/15

断敏感性(Dse)和诊断特异性(Dsp)均为 100%, 结果见表 5。

### 3 讨论

2018 年全国鲤鱼和鲫鱼的养殖总产量超过了 573 万 t, 占淡水鱼类养殖品种的比重达到 19.37% (农业农村部渔业渔政管理局等, 2019)。针对此类养殖占比较高的水产品种, 采用精准而高效的检测技术对其易感病原进行合理监测, 可有效提升对疫病发生的预警能力, 这对于水产养殖业的绿色健康发展具有重要意义。CyHV-2 主要引起鲫(金)鱼的造血器官坏死病, 该病的发病率和死亡率均较高, 属于新发疫病, 近几年本实验室对送样鲫鱼进行检测时, 也偶有检出 CyHV-2 阳性, 提示其对本地鲫鱼养殖业的健康发展可能存在潜在的威胁。此外, 本研究对鲫鱼进行 CyHV-3 的检测结果显示, 30 份鲫鱼样品(包括 15 份 CyHV-2 阳性样品)均为 CyHV-3 阴性。值得一提的是, CyHV-3 主要感染鲤鱼及其杂交种, 但最新研究表明, 鲫鱼也会感染 CyHV-3 (全国水产技术推广总站等, 2020), 这说明对鲫鱼进行 CyHV-3 检测具有一定的必要性。

PCR 检测方法作为生物实验研究中的常规技术

手段, 在水产养殖动物实验研究中应用广泛(宋增磊等, 2019; 周朝伟等, 2019)。与传统 PCR 相比, 多重 PCR 可在 1 次反应中检测多个目的基因, 也可用于多种病原的同时检测, 显得更加便捷和高效(张迪等, 2013; 刘婵等, 2018; 张文等, 2019)。本研究建立的重重 PCR 检测方法扩增的 *Pol* 基因属于 CyHV-2 和 CyHV-3 的同源序列, *Hel* 基因和 *TK* 基因分别为 CyHV-2 和 CyHV-3 的特有序列, 在引物设计时, 合理地控制 3 条目的条带的长度, 确保各扩增条带易于辨认, 从而有效区分相应的病原。3 对引物之间无交叉反应, 且对 GCRV、SVCV、IHHNV、WSSV 和 SHIV 5 种水生动物病毒的基因无扩增, 具有良好的特异性。通过对反应条件的优化, 该方法所能检测的混合质粒的最低极限为  $2.85 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L, 比谢亚君等(2019)建立的 CyHV-2 双重 PCR 检测方法灵敏度约 50 倍, 与张文等(2019)建立的鲤浮肿病毒(carp edema virus, CEV)和 CyHV-2 三重 PCR 检测方法的灵敏度接近。样品检测结果显示, 采用该方法与采用 1.1 推荐方法的检测结果较一致, 表明该方法的精确性和稳定性都较高, 并且该方法极大地缩短了样品检测的时间, 有效提高检测效率, 可在大量样品的实际检测中广泛应用。

表5 不同方法对样品的检测  
Tab.5 Detection of samples by different methods

检测方法 Detection method	检测结果 Result			
	鲫鱼 Crucian carp		鲤鱼 Carp	
国家标准 National standard	阳性 P (15)	阴性 N (107)	阳性 P (8)	阴性 N (52)
行业标准 Industry standard	真阳性 TP (15)	假阳性 FP (0)	真阳性 TP (8)	假阳性 FP (0)
三重 PCR Triple PCR	假阴性 FN (0)	真阴性 TN (107)	假阴性 FN (0)	真阴性 TN (52)
诊断敏感性/诊断特异 Dse/Dsp	100%		100%	

另外, 由于 CyHV-2 和 CyHV-3 的主要宿主存在一定差异, 在实际生产中很少会发生混合感染的情况, 截至目前, 作者并未见有这 2 种病毒混合感染的研究报道, 但鲫鱼也会感染 CyHV-3 的最新研究提示, 在未来的养殖生产中, 可能会发生鲫鱼混合感染 CyHV-2 和 CyHV-3 的情况, 而本研究建立的重重

PCR 检测方法亦可对此种特殊样品进行有效的检测与鉴定。

### 参 考 文 献

Bureau of Fisheries and Fishery Administration under Ministry

- of Agriculture and Rural Affairs, Nation Fishery Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook. Beijing: China Agriculture Press, 2019 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2019]
- CHANG P H, LEE S H, CHIANG H C, *et al.* Epizootic of herpes-like virus infection in goldfish, *Carassius auratus* in Taiwan. *Fish Pathology*, 1999, 34(4): 209–210
- GILAD O, YUN S, ANDREE K B, *et al.* Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 48(2): 101–108
- JUNG S J, MIYAZAKI T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18(3): 211–220
- LIU C, FENG J, XIE Y D, *et al.* The application and detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia with a triple PCR based on virulence genes. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 130–136 [刘婵, 冯娟, 谢云丹, 等. 基于毒力基因的罗非鱼无乳链球菌三重 PCR 检测方法的建立及应用. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 130–136]
- LIU H, SHI X J, GAO L Y, *et al.* Study on the aetiology of koi epizootic disease using the method of nested-polymerase chain reaction assay (nested-PCR). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2002, 21(5): 414–418 [刘荭, 史秀杰, 高隆英, 等. 进口锦鲤暴发病原的 nested-PCR 鉴定. *华中农业大学学报*, 2002, 21(5): 414–418]
- Nation Fishery Technology Extension Center, China Society of Fisheries. Standard compilation of aquatic animal disease prevention. Beijing: China Agriculture Press, 2020 [全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 水生动物防疫标准汇编. 北京: 中国农业出版社, 2020]
- QU M, ZHANG B L, ZHAO G Y, *et al.* Epidemic characteristics and control measures of koi herpesvirus disease. *Livestock and Poultry Industry*, 2020(6): 76–79 [曲木, 张宝龙, 赵国营, 等. 锦鲤疱疹病毒病的流行特征及防治措施. *畜禽业*, 2020(6): 76–79]
- SONG Z L, DONG X, ZHAO R H, *et al.* Evaluation on the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in pooled DNA samples of *Litopenaeus vannamei* based on TaqMan qPCR. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 122–132 [宋增磊, 董宣, 赵若恒, 等. 基于 TaqMan qPCR 检测凡纳滨对虾样品中虾肝肠胞虫并样检测方法的评价. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 122–132]
- WALTZEK T B, KUROBE T, GOODWIN A E, *et al.* Development of a polymerase chain reaction assay to detect Cyprinid herpesvirus 2 in goldfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2009, 21(1): 60–67
- XIE Y J, SHUI D Z, WU P, *et al.* Study on Cyprinid herpesvirus II (CyHV-2) detection techniques based on the different PCR methods. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(3): 1018–1025 [谢亚君, 税典章, 吴萍, 等. 基于不同 PCR 方法的 II 鲤疱疹病毒检测技术研究. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(3): 1018–1025]
- YUAN R, CHEN J, LIU X M, *et al.* A review: Research progress of Cyprinid herpesvirus 2. *Chinese Journal of Fisheries*, 2019, 32(1): 39–45 [袁锐, 陈静, 刘训猛, 等. 鲤疱疹病毒 2 型研究进展. *水产学杂志*, 2019, 32(1): 39–45]
- ZHANG D, YANG K, SU Y L, *et al.* A duplex nested-PCR assay for detection of mud crab reovirus and mud crab dicistrovirus-1. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 808–815 [张迪, 杨铿, 苏友禄, 等. 青蟹呼肠孤病毒和青蟹双顺反子病毒-1 双重巢式 PCR 检测方法的建立. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 808–815]
- ZHANG M, WANG S, WANG N, *et al.* Development of real-time PCR assay for the detection of goldfish haematopoietic necrosis virus (GFHN). *China Animal Health Inspection*, 2017, 34(11): 99–103 [张旻, 王姝, 王娜, 等. 金鱼造血器官坏死病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. *中国动物检疫*, 2017, 34(11): 99–103]
- ZHANG W, XU L P, LÜ X N, *et al.* Establishment and preliminary application of triplex PCR detection method for carp edema virus and koi herpesvirus. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2019, 29(1): 1–5 [张文, 徐立蒲, 吕晓楠, 等. 鲤浮肿病毒和锦鲤疱疹病毒三重 PCR 检测方法的建立及初步应用. *检验检疫学刊*, 2019, 29(1): 1–5]
- ZHAO X, JIA P, LIU Y, *et al.* Development and evaluation of droplet digital PCR assay for the detection of CyHV-2 and comparative analysis. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 126–133 [赵欣, 贾鹏, 刘莹, 等. 鲤疱疹病毒 2 型微滴式数字 PCR 检测方法的建立及比较分析. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 126–133]
- ZHENG S C, WANG Q, LI Y Y, *et al.* Research advances of Cyprinid herpesvirus 3. *Chinese Journal of Virology*, 2016, 32(1): 108–120 [郑树城, 王庆, 李莹莹, 等. 鲤疱疹病毒 3 型研究进展. *病毒学报*, 2016, 32(1): 108–120]
- ZHOU C W, LEI L, DENG X X, *et al.* Cloning, tissue expression profiling, functional characterization of corticotropin-releasing hormone (*crh*) on feeding in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 69–79 [周朝伟, 雷骆, 邓星星, 等. 银鲫 *crh* 基因的克隆、组织表达谱及其对摄食的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 69–79]

## Establishment and Application of the Triplex PCR Method for Simultaneous Detection of Cyprinid Herpesvirus 2 and Cyprinid Herpesvirus 3

PENG Junhui, AN Wei, ZHANG Minghui<sup>①</sup>

(Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai Fisheries Technical Extension Station, Shanghai 200433, China)

**Abstract** Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) and Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) mainly infect crucian carp (goldfish), common carp, koi, and their hybrids. They are highly infectious and pathogenic viruses and can seriously damage the culture of Cyprinid fishes. In order to establish a rapid, and efficient method for simultaneously detecting the two viruses, three pairs of specific primers were designed based on the conserved sequences of the genes encoding DNA polymerase (CyHV-2, 3), helicase (CyHV-2), and thymidine kinase (CyHV-3). By optimizing the reaction conditions and system for the triplex PCR, a detection method for identifying different types of carp herpesviruses was established and validated using the *Carassius auratus* and *Cyprinus carpio* tissue samples preserved in the laboratory. The results showed that the triplex PCR method amplified only three specific bands from the herpes virus positive carp samples, showing good specificity. Using the cloned plasmid as a template with 10-fold dilution, the detection limit of the method was  $2.85 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ , showing high sensitivity. A total of 122 samples of crucian carp and 60 samples of common carp were analyzed by this method and the detection results were consistent with those of the national standard (GB/T 36194-2018) and industry standard (SC/T 7212.1-2011). In conclusion, the newly established triplex PCR method is not only highly accurate and sensitive, but can also detect two types of carp herpesvirus simultaneously, thereby effectively improve the detection efficiency.

**Key words** Cyprinid herpesvirus; Triplex PCR; *Carassius auratus*; *Cyprinus carpio*

<sup>①</sup> Corresponding author: ZHANG Minghui, E-mail: mhzhang0907@163.com