

3 种 DNA 提取方法对 WSSV 检测结果的影响

李战军^{1,2} 孔 杰^{2*} 孟宪红² 张庆文² 罗 坤² 栾 生² 肖广侠^{2,3}

(¹ 大连海洋大学生命科学与技术学院, 116023)

(² 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(³ 上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘 要 比较了酚-氯仿法、煮沸法、试剂盒法 3 种基因组 DNA 提取方法对 WSSV DNA 提取效率、纯度及病毒检测结果的影响。结果表明, 3 种方法的 DNA 提取效率平均值分别为 101.5、372.6、21.5 ng/ μ l; OD₂₆₀/OD₂₈₀ 范围分别是 1.979~2.175 (平均值为 2.070)、1.699~1.932 (平均值为 1.796)、1.784~2.075 (平均值为 1.951); OIE 巢式 PCR 阳性率分别为 60%、50%、70%; TaqMan 定量 PCR 检测的病毒阳性率均为 100%, 病毒拷贝含量分别为 916.0~2.23 \times 10⁶、63.3~1.78 \times 10⁶、479.7~2.70 \times 10⁶ Copies/ μ l DNA。

关键词 DNA 提取方法 PCR WSSV

中图分类号 S962.32 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2011)03-0092-06

The comparison of DNA extraction methods in White Spot Syndrome Virus detection

LI Zhan-jun^{1,2} KONG Jie^{2*} MENG Xian-hong² ZHANG Qing-wen²
LUO Kun² LUAN Sheng² XIAO Guang-xia^{2,3}

(¹ College of Life Sciences and Biotechnology, Dalian Ocean University, 116023)

(² Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(³ College of Fisheries and Life Technology, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT In this study, three genomic DNA extraction methods including phenol-chloroform extraction, boiling lysis and reagent kit methods were compared in terms of extraction efficiency, DNA quantity, as well as the results of White Spot Syndrome Virus (WSSV) detection. The DNA extraction efficiency of three methods, was 101.5, 372.6 and 21.5 ng/ μ l, respectively. The ratios of OD₂₆₀/OD₂₈₀ were in the range of 1.979~2.175 (mean 2.070), 1.699~1.932 (mean 1.796) and 1.784~2.075 (mean 1.951), respectively. The positive rate of WSSV by OIE (Office International Des Epizooties) nested-PCR was 60% (DNA from phenol-chloroform extraction method), 50% (DNA from boiling lysis method) and 70% (DNA from kit method), while it was 100% by quantitative PCR (all DNA from three methods). The DNA copy number

国家 863 计划项目(2010AA10A401)、山东省自然科学基金项目(ZR2009DQ002)、公益性事业(农业)科研专项(200803012)和中央级公益性科研院所基本科研业务费 2009 年专项资金项目共同资助

* 通讯作者。E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823291-801

收稿日期:2010-09-20;接受日期:2010-11-17

作者简介:李战军(1985-),男,硕士研究生,主要从事水产养殖学研究。E-mail:zhanjunli98766@163.com, Tel:15315540267

of WSSV detected by quantitative PCR ranged from 916.0 to 2.23×10^6 , 63.3 to 1.78×10^6 and 479.7 to 2.70×10^6 copies/ μl , respectively. The results would provide some reference for standardizing the detection of WSSV.

KEY WORDS DNA extraction methods PCR WSSV

自 1993 年对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)暴发以来,我国养虾业遭受了巨大损失,至今仍未完全恢复。鉴于尚没有有效的治疗方法,建立灵敏、准确、快速的早期诊断技术,及时切断病毒传播途径等有效的预防手段显得尤为重要。检测 WSSV 的方法很多,其中 PCR 方法特异性强、敏感性高,已被广泛应用于对虾白斑综合征的诊断(Lo *et al.* 1998; 邓 灯等 2005; 史成银等 2003; Tang *et al.* 2000; 刘 萍等 2000)。不同方法提取的 DNA,其质量不尽相同,适使的分析技术也有所不同,模板 DNA 的质量直接影响 PCR 的结果(王晓丹等 2004)。本研究使用了 3 种有代表性的基因组 DNA 提取方法,分别为:酚-氯仿法、煮沸法和试剂盒法,比较了 DNA 提取效率、纯度以及巢式 PCR 和 TaqMan 荧光定量 PCR 法的检测结果,以期 WSSV 诊断工作的标准化提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为 20 尾经人工口饲感染 WSSV 的中国对虾个体,取附肢提取基因组 DNA。

1.2 DNA 提取方法

将附肢均匀分为 3 份,分别用于 3 种方法的基因组 DNA 提取。每种方法提取的基因组 DNA 均溶解于 100 μl 灭菌双蒸水中备用。

1.2.1 酚-氯仿法

参照《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克等 2003)提取基因组 DNA。

1.2.2 试剂盒法

使用 Biomed 博迈德生物全血/组织/细胞基因组 DNA 试剂盒,方法按照其“快速提取说明”进行。

1.2.3 煮沸法

参照王 旭等(2000)快速提取 DNA 方法中的煮沸乙醇沉淀法,并略加改动。

1.3 DNA 提取效率和质量的检测方法

采用 NanoVue™ 紫外分光光度计检测 DNA 纯度(即吸光度比值: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$)和 DNA 含量。

1.4 TaqMan 实时定量 PCR 检测病毒含量

WSSV 定量检测方法参考 Durand 等(2004)的 TaqMan 荧光定量方法,目标片段长度为 69 bp。PCR 反应体系包括 1 \times 体积的 Perfect Real Time Premix(RR039A, TaKaRa)、正反向引物各 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、探针 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 、病毒 DNA 2 μl (30 ng)、由灭菌双蒸水补足 20 μl 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环。标准品为含有目的片段的重组质粒 PUCm-T/WSSV69, 用作阳性对照及标准曲线的构建。引物及探针由大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)合成。反应在 Applied Biosystems 7500 实时定量 PCR 仪中进行,每个样品平行检测 3 次,取其平均值作为该样品的病毒含量值。反应结束后,利用 SDS(Sequence Detection System) 1.2 软件进行数据分析。

1.5 巢式 PCR 检测

将提取模板 DNA 全部稀释至 15 ng/ μl 并进行巢式 PCR 检测,检测方法参照世界卫生组织(Office Inter-

national Des Epizooties, OIE)检测 WSSV 的方法,引物序列及 PCR 反应体系、反应程序参照 Lo 等(1996)。OIE 法第 1 步扩增 WSSV 基因的目的片段为 1441 bp,第二步为 941 bp。采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测目的片段。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, *Taq* DNA 聚合酶购自伯锐公司。

1.6 数据分析

用 SPSS(Version 17.0)中的多个相关样本检验对本实验数据进行分析。

2 结果

2.1 DNA 提取效率和质量

3 种方法提取 DNA 的吸光度比值(OD_{260} / OD_{280})分别是:酚-氯仿法为 1.979~2.175(平均值 2.070)、试剂盒法为 1.784~2.075(平均值 1.951)、煮沸法为 1.699~1.932(平均值 1.796)。经多个相关样本检验,3 种方法提取的 DNA 纯度差异显著($P < 0.05$)。

3 种方法提取的 DNA 平均浓度由高到低依次是:煮沸法(372.6 ng/ μ l)、酚-氯仿法(101.5 ng/ μ l)和试剂盒法(21.5 ng/ μ l)。经多个相关样本检验,3 种方法提取的 DNA 平均浓度差异显著($P < 0.05$)。

2.2 巢式 PCR 扩增效果

采用 OIE 巢式 PCR 对 3 种方法提取的 DNA 进行 WSSV 检测,发现 3 种方法检测的阳性结果不尽相同(部分电泳图谱参见图 1,统计结果详见表 1)。其中样品 11~20 利用 3 种方法提取的 DNA 检测结果均为阳性,而样品 9 在利用酚-氯仿法和试剂盒法提取的 DNA 检测结果中为阳性,在煮沸法提取的 DNA 检测结果中为阴性,样品 5 只在利用酚-氯仿法提取的 DNA 检测结果中为阳性,样品 4、6、10 只在利用试剂盒法提取的 DNA 检测结果中为阳性。整体而言,本实验 OIE 巢式 PCR 对酚-氯仿法、煮沸法和试剂盒法提取的 DNA 阳性检出率分别为 60%、50%和 70%。

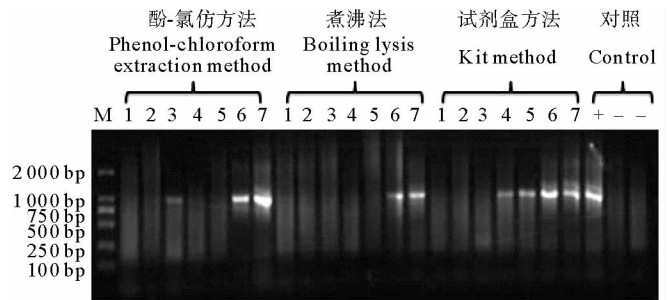


图 1 OIE 巢式 PCR 电泳(第 2 步扩增)

Fig. 1 The products of the OIE nested-PCR(the second step)

表 1 3 种方法的 OIE 巢式 PCR 检测结果比较

Table 1 The WSSV detection result by OIE nested-PCR of three DNA extraction methods

样本 Sample	酚-氯仿法 Phenol-chloroform extraction method	煮沸法 Boiling lysis method	试剂盒法 Kit method	样本 Sample	酚-氯仿法 Phenol-chloroform extraction method	煮沸法 Boiling lysis method	试剂盒法 Kit method
1	—	—	—	11	+	+	+
2	—	—	—	12	+	+	+
3	—	—	—	13	+	+	+
4	—	—	+	14	+	+	+
5	+	—	—	15	+	+	+
6	—	—	+	16	+	+	+
7	—	—	—	17	+	+	+
8	—	—	—	18	+	+	+
9	+	—	+	19	+	+	+
10	—	—	+	20	+	+	+
				阳性率 Positive rate	60%	50%	70%

注:‘+’表示阳性,‘—’代表阴性

Note: +; positive result, —; negative result

2.3 TaqMan 实时定量 PCR 检测结果

采用 TaqMan 实时定量 PCR 对 3 种方法提取的 DNA 进行病毒检测,所有样品检测结果均为阳性,病毒含量分别是:酚-氯仿法 916.0~2 231 725.0 Copies/ μ l DNA、煮沸法 63.3~1 781 849.8 Copies/ μ l DNA、试剂盒法 479.7~2 698 509.3 Copies/ μ l DNA(表 2)。与传统的酚-氯仿法相比较,煮沸法检测结果中,除样品 10、11、12 外,其余样品病毒含量值均低于酚-氯仿法;试剂盒法中,除样品 9、10、13、15、16、20 外,其余样品数值也低于酚-氯仿法。经多个相关样本检验,3 种方法提取的 DNA 病毒含量差异显著($P < 0.05$)。

表 2 3 种方法提取 DNA 病毒含量检测结果

Table 2 Comparison of WSSV copy number of 3 methods detected by quantitative PCR

样本 Sample	酚-氯仿法病毒含量 WSSV copies of phenol-chloroform extraction method (Copies/ μ l DNA)	煮沸法病毒含量 WSSV copies of boiling lysis method (Copies/ μ l DNA)	试剂盒法病毒含量 WSSV copies of kit method (Copies/ μ l DNA)	样本 Sample	酚-氯仿法病毒含量 WSSV copies of phenol-chloroform extraction method (Copies/ μ l DNA)	煮沸法病毒含量 WSSV copies of boiling lysis method (Copies/ μ l DNA)	试剂盒法病毒含量 WSSV copies of kit method (Copies/ μ l DNA)
1	1 831.5	100.9	903.1	11	50 439.5	82 964.3	32 741.6
2	2 003.1	63.3	1 121.4	12	264 068.5	287 520.9	12 2861.1
3	1 713.8	87.4	903.2	13	621 210.0	483 334.4	735 089.8
4	2 042.3	389.4	1 465.4	14	949 585.0	615 926.9	743 911.0
5	3 480.5	357.8	767.4	15	1 902 485.0	1 131 048.7	2 698 509.3
6	1 404.3	629.6	1 310.9	16	1 685 335.0	1 192 416.2	1 732 418.9
7	1 129.3	619.4	550.3	17	2 231 725.0	1 584 787.5	1 454 052.1
8	916.0	154.5	479.7	18	2 213 210.0	1 646 108.6	1 419 402.9
9	4 184.3	2 240.6	6 110.0	19	1 972 325.0	1 653 338.1	1 506 551.3
10	2 161.5	3 896.6	4 293.3	20	2 204 500.0	1 781 849.8	2 405 896.2

3 讨论

3.1 PCR 检测结果的比较

由 PCR 检测结果可以看出,同种 PCR 方法对不同方法提取的 DNA 扩增阳性率不同(表 1)。这说明模板 DNA 的质量直接影响 PCR 的扩增结果(王晓丹等 2004)。本实验 3 种 DNA 提取方法得到的 DNA 质量不同($P < 0.05$),其中试剂盒方法提取的 DNA 纯度在 1.8~2.0 之间,煮沸法 DNA 纯度值略小于 1.8,而酚-氯仿法 DNA 纯度略大于 2.0。纯度较高 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值一般在 1.8~2.0 之间,大于 2.0 说明 DNA 中有 RNA 干扰,小于 1.8 说明提取的 DNA 中蛋白质杂质较多。这些数据表明,试剂盒提取的 DNA 质量最优,煮沸法提取的 DNA 中蛋白质等杂质较多,而酚-氯仿法提取的 DNA 存在少量的 RNA 干扰。煮沸法提取的 DNA 与其他两种方法相比,蛋白质等杂质较多、质量较差,而且高温可能使部分 DNA 链断裂成小片段(朱军民等 2002)。另外,煮沸法没有酚-氯仿法、试剂盒法中蛋白酶 K 消化的步骤,基因组 DNA 与组蛋白可能没有完全分离(程金华等 2006),因而会影响 PCR 的结果,降低 PCR 灵敏程度。传统的酚-氯仿法虽然对蛋白质抽提较彻底,但是其操作过程复杂,在反复的抽提震荡过程中对 DNA 链有一定的机械损伤,使其发生降解(陈 贲等 2007),其使用的酚为商品酚,易被氧化产生酚的氧化物如醌、二酸等,可破坏核酸的二酯键,并引起 DNA 链的交联,进而影响 PCR 反应,且在 DNA 溶液中残留的酚类等有机物对 DNA 聚合酶有抑制作用,抑制 PCR 扩增反应,降低扩增效率(王龙武等 2002)。相比之下,试剂盒法不仅有蛋白酶消化的步骤而且减少了酚-氯仿抽提过程中造成的机械损伤,较彻底地去除了蛋白质杂质,提取的 DNA 效果相对较好,所以

其 PCR 的阳性率最高,而酚-氯仿次之,煮沸法最低。

由此可见,检测 WSSV 时,酚-氯仿法和试剂盒法提取的 DNA 要优于煮沸法。尽管如此,煮沸法对于白斑综合症的诊断仍有较高的应用价值,尤其是对于较大样本量的现场诊断而言,其步骤简单、耗时短、数据反馈迅速等优点是其他方法无法比拟的。

3.2 OIE 巢式 PCR 与 TaqMan 实时定量 PCR 的灵敏度比较

3 种方法提取的 DNA 经 OIE 巢式 PCR 阳性率分别为 60%(酚-氯仿法)、50%(煮沸法)、70%(试剂盒法)(表 1),而 3 种方法提取的 DNA 都可以经 TaqMan 荧光实时定量 PCR 检测到病毒(表 2),因此 OIE 巢式 PCR 灵敏度低于 TaqMan 实时定量 PCR。这与 Sritunyalucksan 等(2006)和毕道荣等(2009)定量 PCR 比巢式 PCR 灵敏度高的结论相一致。其原因可能为:第一,两种 PCR 使用的引物和扩增的目的片段大小不同。OIE 巢式 PCR 扩增的目的片段较大,第 1 步扩增产物为 1 447 bp,第 2 步扩增产物为 941 bp;而 TaqMan 实时定量 PCR 的扩增目的片段仅为 69 bp,远小于巢式 PCR 扩增的目的片段。这与 Hossain 等(2004)的各种 PCR 方法检测的灵敏度与使用的引物和扩增的目的片段大小有关的结论相一致。第二,TaqMan 实时定量 PCR 与巢式 PCR 的技术原理不同。TaqMan 实时定量 PCR 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析(欧阳松应等 2004;张 蓓等 2003),TaqMan 实时定量 PCR 把探针、荧光标记、PCR 和计算机 4 种技术融为一体,从而保证了该方法的高度特异性和高度敏感(王忠发等 2005),而巢式 PCR 是通过两次普通的 PCR 扩增,进而用琼脂糖凝胶电泳检测其扩增效果,核酸染色最后观察目的片断产物的有无,所以前者比后者要灵敏。

本实验中 OIE 巢式 PCR 最低可以检测到 1 310.9 个病毒拷贝,与 Sritunyalucksana 等(2006)得出 OIE 巢式 PCR 可以检测出 1 000 个病毒拷贝的结论相一致,而毕道荣等(2009)实验得出,OIE 巢式 PCR 方法可以检测出 15 000 个病毒拷贝。使用的 DNA 模板不同是造成这种差异的可能原因,本实验中的几种方法提取的 DNA 经 PCR,效果不完全相同也正好验证了此问题。另外,DNA 模板的量不同也是可能原因之一,PCR 与所加入的模板 DNA 量也有一定关系。萨姆布鲁克等(2003)和闫冬春等(2007)得出结论,用于 PCR 扩增的起始 DNA 模板的量既影响产出也影响 PCR 的特异性。如果数量太低,合成物形成很少,会因信号水平低而检测不到。相反,过量的模板数量会使扩增特异性降低或无法扩增出产物。

3.3 结论与建议

综上所述,模板 DNA 是 PCR 反应的前提,它将影响 PCR 的稳定性和灵敏度。不同方法对同一个样本提取的 DNA 使用相同 PCR 检测的结果不相同,而同一个 DNA 样品使用不同的 PCR 检测方法其检测结果也是不同的。3 种提取 DNA 的方法各有利弊,煮沸法是一种耗时短、操作简单的 DNA 提取方法,且整个过程不涉及有机溶剂的使用,不会对操作者及环境产生毒害,但是其提取质量相对较差。酚-氯仿法是最经典的 DNA 提取方法,最常用,适用范围广,但是其步骤复杂,耗时多;在 DNA 溶液中残留的酚类等有机物对 DNA 聚合酶有抑制作用,抑制 PCR 扩增反应,降低扩增效率;酚、氯仿、异戊醇等有机溶剂易造成环境污染(陈 贇等 2007)。试剂盒法提取 DNA 比较省时且提取质量较高,但是其价格昂贵,而且产量也不高。

鉴于几种 DNA 的提取方法各有利弊以及 TaqMan 实时定量 PCR 的灵敏度高于 OIE 巢式 PCR,在生产实践中若灵敏度要求较高时,例如当培育 SPF 对虾、虾内病毒含量与疾病发生的相关性研究、虾病毒预防措施与药物治疗效果评价与筛选、养殖环境中 WSSV 的监测以及养殖水温与 WSSV 复制效率的相互关系、传播媒介体内 WSSV 的含量分析等研究时,可以使用酚-氯仿法和试剂盒法提取 DNA 并进行 TaqMan 实时定量 PCR 检测,可获得准确定量的数据。但是当样本量比较大时,需及时反馈数据时,可以采用简单、快速、环保的煮沸法提取 DNA 并进行 TaqMan 实时定量 PCR 检测。但是在仪器设备不允许、灵敏度要求不高的情况下,也可以采用煮沸法提取 DNA 并进行 OIE 巢式 PCR 检测。煮沸法对于白斑综合症的诊断有较高的应用价值,尤其是对于较大样本量的现场诊断而言,其步骤简单、耗时短、数据反馈迅速等优点是其他方法无法比拟的。

参 考 文 献

- 邓 灯, 张庆文, 王伟继, 刘 萍, 孟宪红, 孔 杰, 孔晓瑜. 2005. 中国对虾几个产卵场群体携带白斑综合征病毒状况调查. 水产学报, 29(1): 74~78
- 王 旭, 史成银, 黄 捷. 2000. 用于PCR检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)的一种快速提取DNA方法. 海洋水产研究, 21(1): 8~12
- 王龙武, 徐克前, 罗识奇. 2002. 基因组DNA提取方法及进展. 上海医学检验杂志, 17(6): 379~381
- 王晓丹, 吕慧颖, 张 敬, 朱保葛. 2004. 以PCR为目的的大豆叶片DNA提取方法的比较研究. 分子植物育种, 2(6): 891~894
- 王忠发, 邵俊斌, 沃健儿, 王虹玲, 蒋文雅, 何伟贤. 2005. TaqMan实时荧光定量PCR快速检测白斑综合征病毒的方法研究. 中国卫生检验杂志, 15(6): 663~665
- 史成银, 黄 捷, 杨 冰, 宋晓玲, 徐怀恕. 2003. 应用PCR和RT-PCR技术对4种对虾病毒的检测. 海洋水产研究, 24(1): 1~5
- 刘 萍, 孔 杰, 孟宪红, 刘志鸿, 李 健. 2000. 白斑综合征病毒(WSSV)在对虾养殖过程中传播途径的调查. 海洋水产研究, 21(3): 9~12
- 闫冬春, 董双林, 黄 捷. 2007. PCR检测对虾白斑综合征病毒(WSSV)中假阴性的探讨. 海洋与湖沼, 38(2): 146~150
- 朱军民, 饶贤才, 胡福泉. 2002. 高温变性对双链DNA分子的损害. 第三军医大学学报, 24(4): 491~492
- 毕道荣, 岳志芹, 梁成珠, 凌宗帅, 赵 巍, 张 健, 邓明俊, 刘 荃, 徐 彪, 郑小龙, 何俊强. 2009. 实时定量PCR快速检测对虾白斑综合征病毒. 山东农业大学学报(自然科学版), 40(1): 54~58
- 张 蓓, 沈立松. 2003. 实时荧光定量PCR的研究进展及其应用. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 24(6): 327~329
- 陈 贲, 汪之和. 2007. 鱼糜制品中基因组DNA提取方法的比较. 湖北农业科学, 46(4): 520~522
- 欧阳松应, 杨 冬, 欧阳红生, 马鹤雯. 2004. 实时荧光定量PCR技术及其应用. 生命的化学, 24(1): 74~76
- 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W 著. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础译. 2003. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 483~485, 605~607, 610
- 程金华, 朱化彬, 王 栋, 郝海生, 杨 波. 2006. 牛基因组DNA两种提取方法的比较. 畜牧兽医学报, 37(9): 874~877
- Durand, S. V., and Lightner, D. V. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. J. Fish Dis. 25(7): 381~389
- Hossain, M. S., Otta, S. K., Chakraborty, A., Kumar, H. S., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. 2004. Detection of WSSV in cultured shrimps, captured brooders, shrimp postlarvae and water samples in Bangladesh by PCR using different primers. Aquaculture, 237(1-4): 59~71
- Lo, C. F., Ho, C. H., Peng, S. E., Chen, C. H., Hsu, H. C., Chiu, Y. L., Chang, V. F., Liu, K. F., Su, M. S., Wang, C. H., and Kou, G. H. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimps, crabs and other arthropods. Dis. Aquat. Org. 27: 215~225
- Lo, C. F., and Kou, G. H. 1998. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. Fish Pathol. 33(4): 365~371
- Sritunyalucksana, K., Srisala, J., McColl, K., Nielsen, L., and Flegel, T. W. 2006. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. 95~104
- Tang, K. F. J., and Lightner, D. V. 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. Aquaculture, 189(1-2): 11~21