

# 对虾 6 种病毒多重 PCR 检测方法的建立

刘 飞<sup>1,2</sup> 张宝存<sup>2</sup> 张晓华<sup>1</sup> 黄 捷<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

(<sup>2</sup> 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 本研究针对养殖对虾 6 种病毒, 包括白斑综合征病毒(WSSV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)、肝胰腺细小病毒(HPV)、桃拉综合征病毒(TSV)、对虾杆状病毒(BP)和传染性肌肉坏死病毒(IMNV), 选择各自的基因分别设计特异性引物和探针, 首先进行了单一病毒的 PCR 验证, 在此基础上建立了同时特异性检测 6 种对虾病毒的多重 PCR 检测体系。对反应条件进行优化并进行特异性和灵敏度的验证。50  $\mu\text{l}$  反应体系,  $\text{Mg}^{2+}$  的最佳浓度为 5mmol/L, ExTaq 酶最佳用量为 3.75U, 反应程序中最佳退火温度为 55.5 $^{\circ}\text{C}$ 。6 种病毒之间以及与对虾基因组都存在很好的特异性。最终经试验验证, 该系统的检测灵敏度对 WSSV 可达  $10^4$  拷贝, IHHNV 可达  $10^2$  拷贝, HPV 可达  $10^4$  拷贝, TSV 可达  $10^3$  拷贝, BP 可达  $10^5$  拷贝, IMNV 可达  $10^5$  拷贝。虽然该多重 PCR 方法灵敏度不如单一的 PCR 检测高, 但是通过实际样品检测验证了该方法省时、消耗较少, 又不失准确性, 在实际应用中具有可靠性和应用价值。

**关键词** WSSV; IHHNV; HPV; TSV; BP; IMNV; 多重 PCR

**中图分类号** S917.1      **文献标志码** A      **文章编号** 1000-7075(2014)01-0060-08

## Multiplex PCR assay for simultaneous detection of six viruses in shrimp

LIU Fei<sup>1,2</sup> ZHANG Bao-cun<sup>2</sup> ZHANG Xiao-hua<sup>1</sup> HUANG Jie<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** In this study, we developed a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous detection of six major shrimp viruses including white spot syndrome virus (WSSV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), hepatopancreatic parvo virus (HPV), Taura syndrome virus (TSV), *Baculovirus penaei* (BP) and infectious myonecrosis virus (IMNV). The reaction condition was optimized, and the specificity and sensitivity of this method were tested. In 50  $\mu\text{l}$  reaction system, the optimum concentration of  $\text{Mg}^{2+}$  was 5mmol/L, the optimum dosage of ExTaq enzyme was 3.75U, and the optimal annealing temperature was 55.5 $^{\circ}\text{C}$ . There was good specificity between the six viruses and shrimp ge-

公益性行业(农业)科研专项经费(201103034)、现代农业产业技术体系(CARS-47)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2012A05)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823062

收稿日期: 2013-02-28; 接受日期: 2013-04-02

作者简介: 刘 飞(1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物疾病防控工作。E-mail: feifei11062006@163.com

nome. The detection limits were  $10^4$  copies for the detection of WSSV,  $10^2$  copies for IHHNV,  $10^4$  copies for HPV,  $10^3$  copies for TSV,  $10^5$  copies for BP, and  $10^5$  copies for IMNV. Although the multiplex PCR detection is not as sensitive as a single PCR, the actual sample testing validated that the method is time-saving and less reagent consuming.

**KEY WORDS** WSSV; IHHNV; HPV; TSV; BP; IMNV; Multiplex PCR

病毒病给对虾养殖业造成了重大损失,目前已经发现并报道的对虾病毒病多达数十种,其中 WSSV、IHHNV、TSV 等因其对全球对虾养殖业的威胁被世界动物卫生组织(World Organisation for Animal Health, OIE)《水生动物卫生法典》收录(Chang *et al.* 1993; Wongteerasupaya *et al.* 1997, 1995a, b; Kanchanaphum *et al.* 1998; Robles-Sikisaka *et al.* 2001; Dhar *et al.* 2001; Sukhumsirichart *et al.* 2006)。在对虾养殖中,对虾可能感染的是某种单一病原,也可能是多种病原混合感染。组织病理学观察等传统诊断方法无法准确地确诊感染病原。因此,对多种病原快速准确的检测技术可为对虾健康养殖和产业生物安全监控提供高效的技术手段。

在对虾病原检测中已建立的 PCR 检测方法主要包括常规 PCR 检测技术、RT-PCR 检测技术(Chang *et al.* 1993; Wongteerasupaya *et al.* 1995b; Kanchanaphum *et al.* 1998; Robles-Sikisaka *et al.* 2001; Umesha *et al.* 2003; 杨 冰等 2005)、PCR-ELISA 技术(Hu *et al.* 2000; Sukhumsirichart *et al.* 2002)以及 Real-time PCR 检测技术(Tang *et al.* 2001, 2004; La *et al.* 2007)。然而这些方法往往只能对特定的一种病毒感染情况进行检测。

但是在复杂的养殖环境中也时常会遇到一尾对虾同时感染数种病毒的情况(Manivannan *et al.* 2002),常规 PCR 和单重 RT-PCR 技术虽然较传统检测方法缩短了检测所需时间,提高了准确性,这时就会需要大量的重复工作,同时又会消耗大量的检测试剂。Real-time PCR 虽然检测灵敏度较高,但其不菲的费用大大限制了其在常规实验室的应用。因此,近年来多重 PCR 或双重 RT-PCR 的对虾病原检测技术得到愈来愈多的关注(Paisarn *et al.* 2008; 许 拉等 2008)。

本研究在前人基础上,经过详细的实验摸索首次实现了单管中同时检测 WSSV、IHHNV、HPV、TSV、BP 和 IMNV 6 种常见对虾病毒的六重 RT-PCR 技术,适于大批量样品的快速诊断,这在对虾病原检测中具有重要的意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病毒核酸及其重组质粒

实验所用 WSSV、IHHNV、HPV 的核酸由近年来中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室从全国范围采集的发病对虾样品中获得;桃拉综合征病毒(TSV)、传染性肌肉坏死病毒(IMNV)、对虾杆状病毒(BP)的核酸为选取 GenBank 所报道的相关序列(基因编号分别如表 1 所示),片段采用人工基因合成的方法制备(TaKaRa, 大连)。将上述核酸克隆到 pMD18-T 质粒上,分别构建 pMD18-WSSV、pMD18-IHHNV、pMD18-HPV、pMD18-TSV、pMD18-IMNV 和 pMD18-BP 6 种重组质粒,所构建质粒送上海生工生物工程技术有限公司(上海生工)测序确定为阳性克隆。

### 1.2 引物设计与合成

由 GenBank 获得病毒核酸序列信息,通过 Oligo 6.0 进行同批次引物设计(表 1),设计结果经 Blast 进行序列比对验证。引物由上海生工合成。

### 1.3 核酸制备

样品检测所用 DNA 模板采用酚-氯仿抽提法提取:取 100mg 对虾组织,放入 1.5ml 离心管中,加入  $400\mu\text{l}$

裂解液(10mmol/L Tris-HCl, 15mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 1% SDS, pH 8.0)研磨均匀;加入蛋白酶 K 使终浓度达到 100 $\mu$ g/ml,振荡混匀,55 $^{\circ}$ C 水浴 2~3h;再加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混匀,10 000r/min 离心 10min,收集上清液,重复酚抽提 1 次。取上清液加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),混匀,10 000r/min 离心 10min。转移上层水相,加入 1/10 体积 3mol/L 乙酸钠(pH 5.2),再加入两倍体积无水乙醇混匀,12 000r/min 离心 5min,所得沉淀用 75%冷乙醇洗涤两次,室温晾干后,加入 50 $\mu$ l TE, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。RNA 模板按照 TRIzol RNA 提取试剂(Invitrogen)说明书进行提取,提取后的 RNA 使用全式金两步法反转录试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)及其随机引物反转录为 cDNA。将所得核酸样品于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

表 1 WSSV, IHHNV, HPV, TSV, BP 和 IMNV 引物的核苷酸序列

Table 1 Primers of WSSV, IHHNV, HPV, TSV, BP and IMNV

病毒名称 Virus	引物序列 Sequence(5'-3')	产物长度 Product size (bp)	基因编号 Accession NO.
WSSV	F: ACC TTC TTC CAC TTC CTC TTC C	252	AY864665
	R: TTC TCA TCC TTC AGG GCT ACG		
IHHNV	F: TCT ACC GTG GTG CTT CAT AGG	212	AF218266
	R: AGT TTC GTT CGT GCG TTC TC		
HPV	F: CGG CGG AAG ATA CGA TGA AC	453	DQ002873
	R: CCT CGC TCT TGG ATA TGT TGT C		
TSV	F: GCC TGA AGG ATT GGA TGA GAT G	278	AF406789
	R: ATT GAT GGT ACT GCG TCT TAG C		
BP	F: TGA GGA GCG AGT AAG ACC ATC	498	DQ496179
	R: TCT CCG ACA TTG CTG TTT GC		
IMNV	F: GTA TCC TGG GCA ACC GAT TTC	311	AY570982
	R: CGA TTG TGG GCT GTG ATG TC		

#### 1.4 单一 PCR 反应体系

以 6 种病毒的引物分别进行单一 PCR 扩增验证。体系为 25 $\mu$ l, 包括 1 $\times$  ExTaq Buffer, 0.2mmol/L 每种 dNTP 混合物, 各 0.4 $\mu$ mol/L 单一病毒的特异性上游和下游引物, 0.05U ExTaq DNA 聚合酶(TaKaRa, 大连), DNA 模板为单一病毒重组质粒, 分别加入 10<sup>8</sup>~10<sup>1</sup> copies, 以 10 倍递减。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55.5 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。取 PCR 扩增产物 3 $\mu$ l 于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定。

#### 1.5 多重 PCR 方法的建立

##### 1.5.1 多重 PCR 的 Mg<sup>2+</sup> 浓度优化

以 6 种病毒核酸片段的重组质粒各 5ng 作为模板, 50 $\mu$ l 反应体系含 1 $\times$  PCR ExTaq Buffer(无 Mg<sup>2+</sup>), 0.2mmol/L 每种 dNTP 混合物, 2.5U ExTaq 酶, 各 0.2 $\mu$ mol/L 的 6 种病毒的上游引物混合物和下游引物混合物, 各组 MgCl<sub>2</sub> 浓度分别为(1.0~6.0)mmol/L 6 个梯度。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55.5 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。取 PCR 扩增产物 6 $\mu$ l 于 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定。

##### 1.5.2 Taq 酶浓度优化

按 1.5.1 的方法比较 ExTaq 酶浓度对反应的影响, 其中 MgCl<sub>2</sub> 浓度为 5mmol/L, 各组 ExTaq 酶用量分别为(1.25~6.25)U 5 个梯度。

### 1.5.3 退火温度优化

按1.5.1的方法比较退火温度对反应的影响,其中  $MgCl_2$  浓度为  $5\text{mmol/L}$ ,各组反应程序的退火温度分别为  $51.5^\circ\text{C}$ 、 $53.5^\circ\text{C}$ 、 $55.5^\circ\text{C}$ 、 $57.5^\circ\text{C}$  和  $60.5^\circ\text{C}$ 。

## 1.6 多重PCR的特异性分析

### 1.6.1 各病毒引物对对虾基因组扩增的特异性

参照1.4的方法,以对虾基因组DNA为模板,引物分别为凡纳滨对虾18S rDNA引物PV-18S以及6种病毒的上下游引物,分析每种病毒的引物对对虾基因组扩增的特异性。

### 1.6.2 多重PCR各病毒间的特异性

参照1.5.1的方法,分别以6种病毒中的每种单一病毒的核酸为模板,在已优化好的多重PCR反应体系中进行扩增,分析多重PCR的各病毒之间的特异性,将所得PCR产物进行基因芯片杂交验证特异性。

## 1.7 多重PCR的灵敏度测定

将  $10^8$  copies/ $\mu\text{l}$  的6种病毒核酸片段重组质粒按10倍系列梯度稀释为模板,反应体系和反应程序同上,琼脂糖凝胶中进行电泳,确定在多重体系中每种病毒检出的灵敏度。

## 1.8 样品检测

取2009年4~10月采自山东、辽宁、河北、天津、江苏、浙江、福建、广东、广西和海南10个省市地区的对虾共计46尾,分别采用酚-氯仿抽提法和TRIzol方法获取DNA和RNA,DNA直接作为模板,RNA反转录为cDNA,以cDNA为模板,进行多重PCR检测,同时与常规PCR方法所得检测结果进行比较对照。

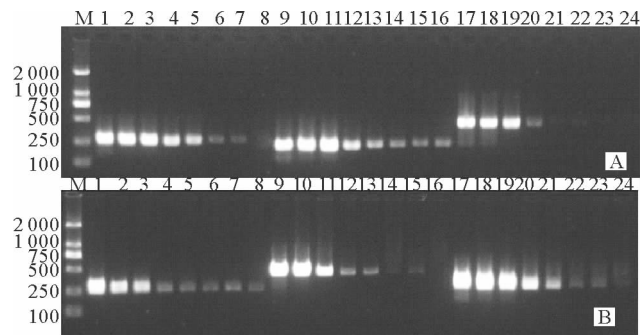
## 2 结果

### 2.1 单一PCR体系验证

经过单一病毒的PCR扩增体系验证,各病毒均可获得大小正确、清晰的条带,且灵敏度较高,其中IHHNV、TSV、BP和IMNV可以检测到10个拷贝(图1)。因此,可以说明6种病毒所设计的引物,在单一的PCR体系中均可有较好的扩增效果,在此基础上再进行多重PCR试验。

### 2.2 多重PCR条件的优化

经过多次反复优化试验,多重PCR  $50\mu\text{l}$  反应体系中, $Mg^{2+}$  浓度在大于  $3\text{mmol/L}$  以后,6种病毒条带均可出现,且在  $5\text{mmol/L}$  时各病毒条带亮度均达到最大值,因此  $Mg^{2+}$  最适浓度选择  $5\text{mmol/L}$ ; *ExTaq* 酶用量在  $3.75\text{U}$  时各病毒条带亮度达到最大,且不随酶的添加量增加而增加,酶的价格又相对较高,故选取 *ExTaq* 酶的



A:1~8泳道 WSSV 模板量依次由  $10^8 \sim 10^1$  copies 递减,9~16泳道 IHHNV 模板量依次由  $10^8 \sim 10^1$  copies 递减,17~24泳道 HPV 模板量依次由  $10^8 \sim 10^1$  copies 递减;  
B:1~8泳道 TSV 模板量依次由  $10^8 \sim 10^1$  copies 递减,9~16泳道 BP 模板量依次由  $10^8 \sim 10^1$  copies 递减,17~24泳道 IMNV 模板浓度依次由  $10^8 \sim 10^1$  copies 递减

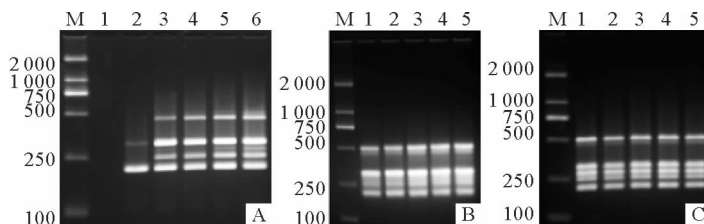
A: Lane 1-8, amount of WSSV template decreasing from  $10^8$  to  $10^1$  copies in turn; lane 9-16, amount of IHHNV template decreasing from  $10^8$  to  $10^1$  copies in turn; lane 17-24, amount of HPV template decreasing from  $10^8$  to  $10^1$  copies in turn;

B: lane 1-8, amount of TSV template decreasing from  $10^8$  to  $10^1$  copies in turn; Lane 9-16, amount of BP template decreasing from  $10^8$  to  $10^1$  copies in turn; lane 17-24, amount of IMNV template decreasing from  $10^8$  to  $10^1$  copies in turn

图1 6种病毒单重PCR灵敏度

Fig. 1 Sensitivity of single PCR for each of the six shrimp viruses

用量为 3.75U;反应程序中退火温度,在 55.5℃时各病毒条带亮度效果达到最佳,选取最佳退火温度为 55.5℃(图 2)。



注:A为多重PCR检测体系  $MgCl_2$  浓度优化。M:DL 2 000DNA marker;1~6泳道  $MgCl_2$  浓度依次为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 和 6.0mmol/L;B为多重PCR检测体系 ExTaq 酶用量优化 M:DL 2 000DNA marker;1~5泳道分别使用 ExTaq 酶用量依次为 1.25、2.5、3.75、5.0 和 6.25U;C为多重PCR检测体系退火温度优化 M:DL 2 000DNA marker;1~5泳道退火温度依次为 51.5、53.5、55.5、57.5 和 61.5℃

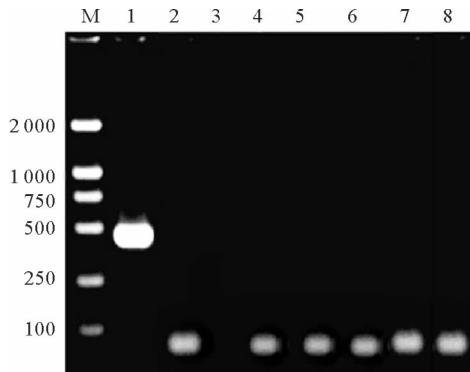
Note: A. Optimization of  $MgCl_2$  concentration for the multiplex PCR detection system. M: DL 2 000DNA marker; lane 1-6: Different  $MgCl_2$  concentration as 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, and 6.0mmol/L; B. Optimization of the amount of the ExTaq enzyme for the multiplex PCR detection system. M:DL 2 000 DNA marker; lane 1-5: Amount of the ExTaq enzyme is 1.25, 2.5, 3.75, 5.0, and 6.25U; C. Optimization of annealing temperature for the multiplex PCR detection system. M: DL 2 000 DNA marker; lane 1-5: different annealing temperature as 51.5, 53.5, 55.5, 57.5 and 61.5℃

图 2 多重 PCR 体系优化

Fig. 2 Optimization of the multiplex PCR detection system

### 2.3 多重 PCR 扩增的特异性

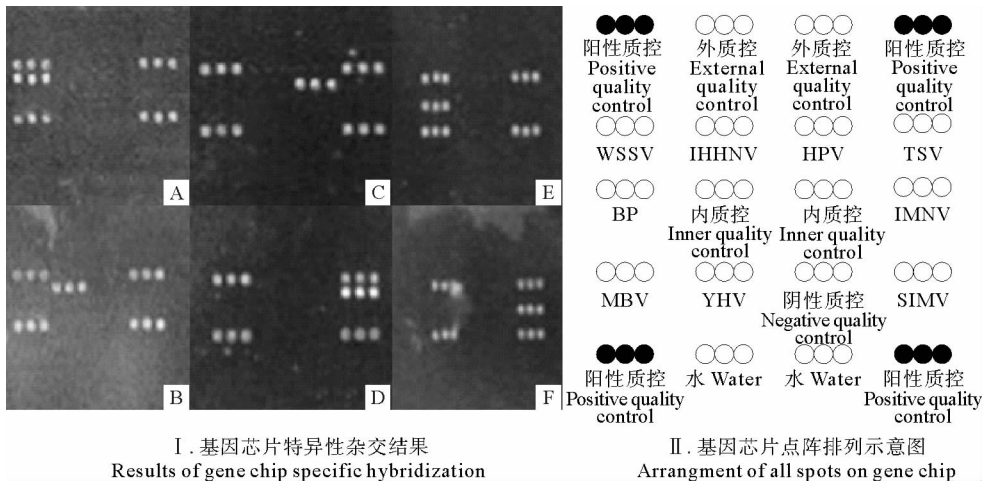
本研究建立的单管多重 PCR 检测方法可以将目的基因片段成功地扩增且有着很好的特异性。以对虾基因组为模板扩增时,不论用各病毒的单一病毒特异性引物还是用 6 种病毒的混合特异性引物均不产生任何非特异性条带,只有凡纳滨对虾 18S rDNA 引物产生特异性扩增产物,说明 6 种病毒的特异性引物对对虾基因组有较好的特异性(图 3)。将 6 种病毒分别扩增的产物在对虾检测型基因芯片(由本实验室设计优化)上进行验证,该芯片点制有 WSSV、IHHNV、HPV、TSV、BP、IMNV、MBV(斑节对虾杆状病毒)、YHV(黄头病毒)和 SIMV(产卵虾死亡病毒)的核酸探针,其中本研究涉及到的 6 种病毒探针序列均位于本实验 PCR 产物序列内部以及阳性、阴性、空白等质控对照,结果显示,各病毒的 PCR 产物在阳性、阴性、空白等质控正常的情况下,分别只与特异性探针存在阳性杂交反应,证实各病毒的产物均不与其他病毒或质控对照产生交叉反应(图 4)。



注:M:DL 2 000 DNA marker;1~7泳道核酸模板均为凡纳滨对虾全基因组 DNA,泳道 1 为凡纳滨对虾 18S rDNA 特异性引物;泳道 2~7 依次使用 WSSV、IHHNV、HPV、TSV、BP 和 IMNV 的特异性引物;泳道 8 为含有 6 种病毒引物

Note: M: DL 2 000 DNA marker; lane 1-7: The template of PCR mixture was *Litopenaeus vannamei* genomic DNA; Lane 1: primers for *L. vannamei* 18S rDNA were used; lane 2-7: specific primers for WSSV, IHHNV, HPV, TSV, BP, and IMNV were used respectively; lane 8 contains six virus primers

图 3 多重 PCR 体系对凡纳滨对虾基因组模板的特异性验证  
Fig. 3 Validation of the specificity of multiplex PCR using the genome of *L. vannamei* as the template



注: I 中引物扩增产物的杂交、A. WSSV, B. IHNV, C. HPV, D. TSV, E. BP, F. IMNV

Note: I. The hybridization on the gene chip with the amplicon from the primers. A. WSSV; B. IHNV; C. HPV; D. TSV; E. BP; F. IMNV

图 4 基因芯片对 6 种对虾病毒的 PCR 扩增的特异性验证

Fig. 4 Validation of specificity of PCR amplification for six shrimp viruses using the gene chip

### 2.4 六重 PCR 的灵敏度

采用梯度稀释的已知拷贝模板对六重 PCR 进行灵敏度分析(图 5)。结果表明,在六重 PCR 反应体系中 WSSV 的检测灵敏度为  $10^4$  拷贝, IHNV 的检测灵敏度为  $10^2$  拷贝, HPV 检测灵敏度为  $10^4$  拷贝, TSV 检测灵敏度为  $10^3$  拷贝, BP 检测灵敏度为  $10^5$  拷贝, IMNV 检测灵敏度为  $10^5$  拷贝。

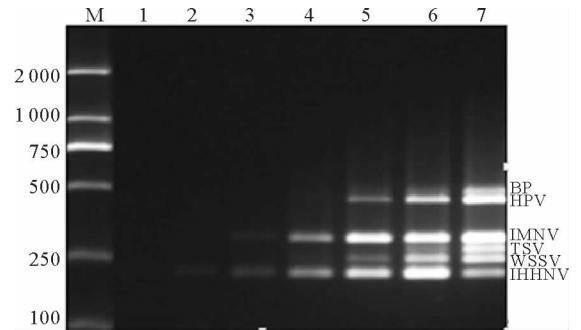
### 2.5 对虾样品检测

对 46 尾对虾样品利用多重 PCR 进行检测, 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 6)结果显示, 有 11 尾 WSSV 显阳性, 6 尾 IHNV 显阳性, 两尾 HPV 显阳性, 六重 PCR 检测结果与按照国标常规 PCR 检测结果的阳性检出率完全一致。其中, IHNV 的条带相对较明亮, WSSV 的亮度较弱, 这一现象可能与 WSSV 病毒基因组较大, IHNV 较小且体系中两种病毒的扩增效率有所差异有关。

### 3 讨论

多重 PCR(Multiplex PCR), 又称多重引物 PCR 或复合 PCR, 它是在同一 PCR 反应体系里加入多对引物, 同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应, 其反应原理、反应试剂和操作过程与普通 PCR 相同。这一概念最早由 Chamberlian 等(1988)年首次提出, 目前已被广泛应用于医学及生物领域, 包括基因敲除分析、突变、多态性分析、定量分析、RNA 检测及微生物耐药检测等, 不仅是科研的主要手段, 也具有很高的实用价值(赵红庆等 2007)。

影响多重 PCR 的因素主要包括引物、 $Mg^{2+}$  浓度、退火温度、酶, 进行对多重 PCR 体系中各条件的摸索, 尤其是  $Mg^{2+}$  浓度的优化, 是建立高效、准确的多重 PCR 检测体系的必然过程(李 晨等 2010)。在多重 PCR 体系的建立过程中, 说明引物特异性和  $Mg^{2+}$  浓度是制约多重 PCR 扩增最重要的两个因素。在引物设计方面,



M: DL 2 000 DNA marker; 1~7 泳道各病毒质粒拷贝数依次为  $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$  和  $10^7$  拷贝

M: DL 2 000 DNA marker; Lane 1-7; copy number of the template of the six virus was  $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ , and  $10^7$  copies respectively

图 5 多重 PCR 体系灵敏度检测

Fig. 5 Sensitivity of the multiplex PCR

首先应该考虑到引物须为同批次设计并且相互之间应不存在干扰,引物间的配对和引物与模板的竞争性结合会影响扩增结果。当  $Mg^{2+}$  浓度低于  $3mmol/L$  时就不能得到全部的目的条带, $Mg^{2+}$  浓度影响到了整个反应体系的扩增效率。

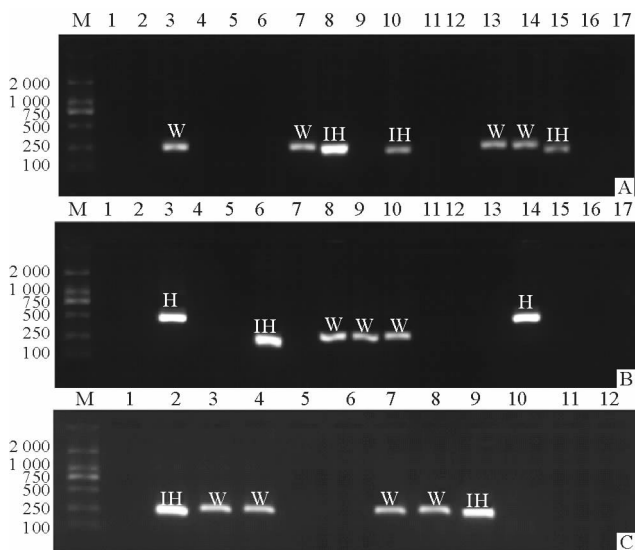
本研究建立的多重 PCR 反应体系可有效地同时扩增 6 种常见对虾病毒,扩增结果仅通过琼脂糖凝胶电泳便可以清晰地分辨出来,且对健康对虾组织 DNA 及各病毒之间不存在交叉扩增,具有较高的特异性。在实际养殖中,对虾同时感染 6 种病毒的可能性不大,但是要确定对虾的感染病原,常规病原检测是必须的;因此能够一次检测 6 种病毒的携带情况,会大大降低工作量,节约时间和节省检测成本。该系统对 WSSV 和 HPV 的检测灵敏度均达  $10^4$  拷贝, IHHNV 达  $10^2$  拷贝, TSV 达  $10^3$  拷贝, BP 和 IMNV 达  $10^5$  拷贝。通常多重 PCR 比单一 PCR 的检测灵敏度低  $10\sim 100$  倍 (Tsai *et al.* 1994; Jackson *et al.* 1996), 本研究建立的多重 PCR 方法在同时检测 6 种病毒的情况下比常规单一 PCR 灵敏度低  $100\sim 1\ 000$  倍 (图 6)。

虽然该方法灵敏度有所下降,但是该系统所达到的灵敏度完全可以达到应用的要求。在此基础上可应用套式多重 PCR 技术来提高检测灵敏度及特异性,从而提高阳性检出率。Cowley 等 (2004) 已应用套式多重 PCR 从约  $10fg$  的淋巴器官组织 RNA 中检出 YHV 和 GAV, 乌日琴等 (2011) 建立的四重 PCR 对虾病毒检测体系中对 IHHNV、TSV、WSSV 和 YHV 的检测下限分别为  $0.1$ 、 $1.0$ 、 $0.02$  和  $0.2pg$ , 根据他们所用的商业载体 pGEM-T(3 000bp) 的大小及目的片段长度分别为  $301$ 、 $508$ 、 $435$ 、 $614bp$ , 换算成拷贝数分别为  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^3$  和  $10^4$  拷贝, 灵敏度与本研究建立的多重 PCR 检测方法的灵敏度相近, 除 WSSV 外, IHHNV、TSV 均低于本试验的灵敏度两个数量级, 说明本方法达到六重 PCR, 但仍具有较高的灵敏度。

本研究所建立的多重 RT-PCR 技术, 可以快速有效地检测 6 种引起对虾死亡或者影响对虾生长的病毒。然而多重 PCR 产物仅通过琼脂糖凝胶电泳来实现病原阳性结果的判读时, 非特异性扩增会导致假阳性结果; 而且当扩增片段接近时也很难通过琼脂糖电泳区分开来, 从而又会导致检测结果的模糊或者假阴性。当前基因芯片作为一种新兴的生物技术, 已经在水产病害检测中取得了发展和应用 (许拉等 2008), 可以将多重 PCR 技术与基因芯片技术有机结合 (Gurralla *et al.* 2009), 一方面克服 PCR 非特异性扩增的干扰, 另一方面多重 PCR 在基因芯片上的应用也实现了病原高通量的检测, 为本方法的后续研究和应用提供了广阔的发展空间。

## 参 考 文 献

- 乌日琴, 但学明, 刘中勇, 林志雄, 陈芳, 刘芸莉, 张艺宜. 2011. 多重 RT-PCR 体系检测 4 种虾病毒的方法. 水产学报, 35(3): 438-445
- 许拉, 黄健, 杨冰. 2008. 病原检测基因芯片应用及在水产病害检测的前景. 海洋水产研究, 29(1): 109-114
- 许拉, 黄健, 戈蕾, 杨冰. 2008. 同时检测两种对虾病毒和 4 种弧菌的同步 PCR 方法的建立. 海洋水产研究, 29(4): 39-45
- 杨冰, 宋晓玲, 黄健, 史成银, 宋微波. 2005. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)PCR 检测方法的建立. 海洋水产研究, 26(2): 1-5
- 李晨, 王秀华, 黄健. 2010. 3 种主要水产病原菌多重 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 31(3): 100-106
- 赵红庆, 苑锡铜, 黄留玉. 2007. 多重 PCR 技术在病原检测中的应用. 生物技术通讯, 18(5): 863-865
- Chang PS, Lo CF, Kou GH and 2 others. 1993. Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). Invertebr Pathol 62(2): 116-120



注: W. WSSV; IH. IHHNV; H. HPV

图 6 多重 PCR 对对虾样品的检测

Fig. 6 Detection of viral infection in actual samples using multiplex PCR

- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE and 2 others. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16(23): 11141-11156
- Cowley JA, Cadogan LC, Wongteerasupaya C and 3 others. 2004. Multiplex polymerase RT-Nested PCR differentiation of gill-associated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of *Penaeus monodon*. *J Virol Methods* 117(1): 49-59
- Dhar AK, Roux MM, Klimpel KR. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR Green chemistry. *J Clin Microbiol* 39(8): 2835-2845
- Gurralla R, Dastjerdi A, Johnson N and 4 others. 2009. Development of a DNA microarray for simultaneous detection and genotyping of lyssaviruses. *Virus Res* 144(1-2): 202-208
- Hu YL, Wang KH, Yang YH and 3 others. 2000. Diagnosis of *Penaeus monodon*-type baculovirus by PCR and by ELISA of occlusion bodies. *Dis Aquat Organ* 40(2): 93-99
- Jackson R, Morris DJ, Cooper RJ and 4 others. 1996. Multiplex polymerase chain reaction for adenovirus and herpes simplex virus in eye swabs. *J Virol Methods* 56(1):41-48
- Kanchanaphum P, Wongteerasupaya C, Sitidilokratana N and 3 others. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Organ* 34(1):1-7
- Khawsak P, Deesukon W, Chaivisuthangkura P and 1 other. 2008. Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of six viruses of penaeid shrimp. *Mol Cell Probes* 22(3): 177-183
- La-Fauce KA, Layton R, Owens L. 2007. TaqMan real-time PCR for detection of hepatopancreatic parvovirus from Australia. *J of Virol Methods* 140(1-2): 10-16
- Manivannan S, Otta SK, Karunasagar I and 1 other. 2002. Multiple viral infection in *Penaeus monodon* shrimp postlarvae in an Indian hatchery. *Dis Aquat Organ* 48(3): 233-236
- Robles-Sikisaka R, Garcia DK, Klimpel KR and 1 other. 2001. Nucleotide sequence of 30-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Arch Virol* 146(5): 941-952
- Sukhumsirichart W, Attasart P, Boonsaeng V and 1 other. 2006. Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon*. *Virol* 346(2): 266-277
- Sukhumsirichart W, Kiatpathomchai W, Wongteerasupaya C and 3 others. 2002. Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Mol Cell Probe* 16(6): 409-413
- Tang KFJ, Wang J, Lightner DV. 2004. Quantitation of Taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *J of Virol Methods* 115(1): 109-114
- Tang KFJ, Lightner DV. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis Aquat Organ* 44(2): 79-85
- Tsai YL, Tran B, Sangermano LR and 1 other. 1994. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl Env Microbiol* 60(7): 2400-2407
- Umesha RK, Uma A, Otta SK and 2 others. 2003. Detection by PCR of hepatopancreatic parvovirus a (HPV) and other viruses in hatchery reared *Penaeus monodon* post larvae. *Dis Aquat Organ* 57 (1-2): 141-145
- Wongteerasupaya C, Sriurairatana S, Vickers JE and 4 others. 1995a. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis Aquat Organ* 22(1): 45-50
- Wongteerasupaya C, Tongchuea W, Boonsaeng V and 4 others. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR Amplification. *Dis Aquat Organ* 31: 181-186
- Wongteerasupaya C, Vicker JE, Sriurairatana S and 3 others. 1995b. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Organ* 21(1): 69-77