

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221216001

http://www.yyxxjz.cn/

连新宇, 王秀华, 李晨, 张庆利, 苟紫玥, 吕若萱, 杨冰. FTA卡保存对虾传染性皮下和造血组织坏死病毒DNA洗脱方法的优化. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 193-202

LIAN X Y, WANG X H, LI C, ZHANG Q L, GOU Z Y, LÜ R X, YANG B. Optimization of DNA elution method of infectious hypodermic and hematopoietic necrosis virus preserved by FTA card. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 193-202

# FTA卡保存对虾传染性皮下和造血组织坏死病毒DNA洗脱方法的优化\*

连新宇<sup>1,2</sup> 王秀华<sup>2</sup> 李晨<sup>2</sup> 张庆利<sup>2</sup>  
苟紫玥<sup>2</sup> 吕若萱<sup>2</sup> 杨冰<sup>2①</sup>

(1. 浙江海洋大学水产学院 浙江 舟山 316022; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所  
青岛海洋科技中心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)

**摘要** 传染性皮下和造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHNV)是危害虾类健康养殖的重要病原,为寻找一种快捷保存及分离IHNV DNA的方法,为后续研究提供完整的核酸材料,选用FTA (flinders technology associates)卡为保存介质,以FTA纯化试剂、TE (Tris-EDTA)缓冲液及去离子水为基础洗脱液,设计7种FTA卡黏附DNA洗脱方法,通过荧光定量PCR检测方法检验不同核酸洗脱分离效果及最低的点膜核酸量。结果显示,于4 mm<sup>2</sup>的FTA卡上,点样体积为2.5 μL,用洗脱液作为模板时,最低点膜核酸浓度需要1.47×10<sup>4</sup> copies/μL以上,可获得最佳的检测灵敏度和100%检出率的洗膜方法为50 μL TE缓冲液于95℃下浸洗5 min;用膜片做模板,点膜核酸浓度需要1.82×10<sup>3</sup> copies/μL以上,室温(20~25℃)条件下,用FTA纯化试剂洗脱3次,再用TE缓冲液洗脱2次,洗脱时间均为5 min,可获得最佳的检测灵敏度和100%的准确度。以FTA卡保存对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)、虾十足目虹彩病毒1 (Decapod iridescent virus 1, DIV1)、偷死野田村病毒(covert mortality nodavirus, CMNV)、致急性肝胰腺坏死副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, V<sub>pAHPND</sub>)核酸,测试所建洗脱方法的效果,证实了该方法对其他虾类病原核酸的洗脱具有通用性。该研究给出了FTA卡保存和洗脱IHNV DNA的适用性方案,为野外对虾样品采集、病毒核酸样品跨区域传递的保存和运输条件提供了科学数据。

**关键词** IHNV; FTA卡; 洗脱方法; 优化

**中图分类号** S949 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0193-10

对虾传染性皮下和造血组织坏死病(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis, IHNV)也称

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2022GH01)、中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费(20603022021012)、国家重点研发计划(2019YFD0900101)和国家现代农业产业技术体系(CARS48)共同资助。连新宇, E-mail: 1799833487@qq.com

① 通信作者: 杨冰, 副研究员, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-12-16, 收修改稿日期: 2023-02-01

慢性矮小畸形综合症(runt-deformity syndrome, RDS) (Kalagayan *et al*, 1991), 是虾类重要疾病之一, 严重危害世界对虾养殖业。被世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOA)列为须向其申报的甲壳类动物疫病(WOAH, 2023)。该病病原为对虾传染性皮下和造血组织坏死病毒(IHHNV), 1981 年在美国夏威夷地区首次被发现(Lightner *et al*, 1983), 随后传播至澳大利亚、新加坡、马来西亚、韩国、巴西和中国等全球多个国家和地区(Saksmerprome *et al*, 2010; Kim *et al*, 2011; Yang *et al*, 2007)。IHHNV 属于细小病毒科(Parvoviridae), 是目前发现对虾病毒中最小的病毒, 单链 DNA, 无囊膜, 病毒粒子大小约为 20~22 nm (Bonami *et al*, 1990)。细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)感染 IHHNV 后可导致其 90% 的死亡率(Lightner *et al*, 1983), 凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)感染该病原后不会导致较高死亡率, 但会引起幼虾生长缓慢、畸形, 造成较大的经济损失, 在缺乏有效的防治措施防控 IHHNV 感染的情况下, 早检测早预防显得尤为重要。

IHHNV 检测方法包括组织病理学、普通 PCR 方法、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测法、测序法、原位杂交法、环介导等温扩增技术(LAMP)和生物指示法等(Bell *et al*, 1988; Lightner, 1996; Tang *et al*, 2007; Arunrut *et al*, 2011; Sun *et al*, 2006; Tang *et al*, 2006; Mari, 1993; Tang, 2000)。目前, 较为广泛使用的分子生物学方法为 WOA 推荐的 IHHNV 普通 PCR 方法和 RT-qPCR 检测法。在分子生物学检测方法中, 病毒的核酸提取质量直接影响检测的准确度, 因此, 为提高样品质量, 通常选用冰冻、冰鲜、乙醇或其他核酸保存试剂保护病毒核酸(杜迎彬等, 2013; 陈大恭等, 2015)。但低温保存条件和保存溶液的成分限制了产业调研和生物样品的长途运输, 尤其给跨境跨区域传递带来一定困难, 为此探寻一种高效便捷的病毒核酸保存技术有助于水产养殖疾病病原的检测。

FTA (flinders technology associates)卡是一种用于快速收集、储存各种遗传物质的介质(Rajendram *et al*, 2006), 可以方便、快捷地保存核酸并达到远距离运输样品的目的。FTA 卡是英国 Whatman 公司的专利产品, 该卡片用于在室温条件下采集、储存和运输组织、核酸等样品, 并可直接提取核酸进行检测, FTA 卡通过邮寄方式常温寄送且无需作为危险及特殊物品处理。经化学处理的 FTA 卡作为核酸载体, 具有许多优点, FTA 卡不仅对核酸的吸附性好, 能使核酸紧密附着在卡片上, 还能使核酸免于紫外线的降解, 且抑制真菌的生长。研究发现, DNA 固定在卡片上, 可常温保存十几年, 因此, 应用 FTA 卡存储生物样

品 DNA 受到广泛重视(Corradini *et al*, 2019; Smith *et al*, 2004), 并在医学及微生物相关等多个领域进行了研究与应用(贾霄等, 2020; Shalaby *et al*, 2020; 毛乃颖等, 2015; 李伟昊等, 2009)。毛乃颖等(2015)研究显示, FTA 卡常温运输麻疹病毒(measlesvirus, MV)会导致病毒滴度降低, 但不影响病毒的检测效果。

FTA 卡已在人类和动物医学等领域得到广泛应用(赵兴春等, 2012; 陶晓岚等, 2014; 刘亚举等, 2012; 聂同钢等, 2009; 王新杰等, 2012; 刘建兴等, 2014), 并成功用于家畜病原及病毒核酸的存储运输(蔡颖等, 2008; Picard-Meyer *et al*, 2007; Perozo *et al*, 2006; Muthukrishnan *et al*, 2008; Maldonado *et al*, 2009; Inoue *et al*, 2007)。在水产动物方面, 已有研究者将 FTA 卡用于保存白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)、虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)等(Sudhakaran *et al*, 2010; Patil *et al*, 2013; Karthikeyan *et al*, 2020), 但尚未有对其所保存 DNA 洗脱效果的相关研究报道, 限制了 FTA 卡的应用。

FTA 卡用于保存感染病原的生物组织需要经过洗脱环节, 以便游离出病原的 DNA 成分, 为探讨 FTA 卡作为 IHHNV 核酸载体的应用效果, 本研究设计 7 种 FTA 卡的洗脱方案, 通过 RT-qPCR 方法检测其黏附 IHHNV 核酸的洗脱效果, 并选用对虾病原 WSSV、EHP、虾十足目虹彩病毒(Decapod iridescent virus 1, DIV1)、偷死野田村病毒(covert mortality noda virus, CMNV)、致急性肝胰腺坏死副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*,  $V_{PAHPND}$ )为实验材料, 测试本方法用于其他虾类病原保存及洗脱的效果, 以期建立一种简易的 DNA 保存方法提供技术支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样本来源及核酸提取

IHHNV DNA 样品制备: 阳性样品为本实验室保存, 采自山东省潍坊地区感染 IHHNV 的凡纳对虾; 阴性样品为采集于江苏赣榆地区的中国对虾(*Penaeus chinensis*)。分别取 IHHNV 阳性和阴性的对虾鳃组织 30 g, 使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取 DNA, 提取方法参考试剂盒说明书。

WSSV、 $V_{PAHPND}$ 、EHP、DIV1 和 CMNV 核酸样品均为本实验室提取保存。

FTA 卡购自 GE Healthcare UK Limited, TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH=8.0)购自天根生化科技有限公司, FTA 纯化试剂购自上海金畔生物科技有限公司。

## 1.2 IHNV DNA 浓度梯度液制备及最佳点膜浓度的确定

将 IHNV DNA 提取液进行  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  倍梯度稀释, 各稀释梯度用涡旋振荡充分混匀, 应用 RT-qPCR 方法测定病毒载量, 根据检测结果选择合适的梯度, 用作 FTA 卡膜片点样目标核酸。

## 1.3 点样

将 China FTA™ Card (Whatman™, 英国)剪成边长为 2 mm 的正方形膜片, 将膜片置于平皿中, 分别在各膜片上点各梯度浓度的 IHNV DNA, 每片点样 2.5  $\mu\text{L}$ , 设置阴性膜片(点阴性样品), 膜片点样后室温晾干 1 d。同时, 对虾类其他病原(WSSV、 $Vp_{\text{AHPND}}$ 、EHP、DIV1、CMNV)一并点样, 处理方法相同, 每个浓度设置 3 个平行。

## 1.4 洗脱方案

根据不同的洗脱液配方, 共设计 7 种洗脱方案, 具体方法如表 1 所示。方案 1: 室温条件下, 先用 FTA 纯化试剂洗脱 3 次, 再用 TE 缓冲液洗脱 2 次, 每次均为 5 min; 方案 2: 室温条件下, 先用 FTA 纯化试剂洗脱 1 次, 再用 TE 缓冲液洗脱 1 次, 每次均为 5 min; 方案 3 和方案 4 均只用 TE 缓冲液洗脱 1 次, 洗脱时间均为 5 min; 方案 5: 只用去离子水洗脱 2 次, 每次均为 5 min; 方案 6: 只用去离子水洗脱 1 次, 洗脱时间为 30 min; 方案 7: 只用 FTA 纯化试剂洗脱 1 次, 洗脱时间为 2 min。所有方案室温条件下洗脱均为浸泡, 95  $^{\circ}\text{C}$  洗脱方式为 PCR 仪加热, 其中方案 1、5 和 7 最后一次洗脱液洗脱后的膜片均在室温下干燥 1 h, 剩余方案洗脱后的膜片无需处理。IHNV DNA

的每种方案的洗脱液和膜片均留待检测, 并设置 1 组未经洗脱而直接用于各个稀释梯度的膜片进行 RT-qPCR 检测。

## 1.5 RT-qPCR 检测

RT-qPCR 检测 IHNV、WSSV、EHP、 $Vp_{\text{AHPND}}$ 、DIV1 和 CMNV 等 6 种病原的核酸, 引物探针、体系和程序等信息见表 2。

引物和 TaqMan 探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系: Luna Universal Probe qPCR Mix 10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  的上下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  的探针 0.4  $\mu\text{L}$ , 无核酸酶水 7  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 总体积 20  $\mu\text{L}$ 。IHNV 反应程序: 预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 变性 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 延伸 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环。EHP、 $Vp_{\text{AHPND}}$ 、DIV1 和 WSSV 反应程序: 预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 变性 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 延伸 60  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 共 40 个循环。CMNV 反应程序: 反转录 55  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 变性 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 延伸 60  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 共 40 个循环。

## 1.6 不同洗脱方案洗脱液中 IHNV DNA 溶出情况

RT-qPCR 检测 7 种方案洗脱过程中洗脱液中 IHNV DNA 的病毒载量, 观察不同洗脱方法洗脱过程中各洗脱阶段 IHNV DNA 的溶出情况。选择稀释梯度为  $10^{-1}$  的膜片用 7 种洗脱方案进行洗脱, 检测各个阶段洗脱液中 IHNV DNA 病毒载量, 验证不同洗脱方案各个洗脱阶段是否有核酸溶出。

## 1.7 FTA 卡保存 IHNV 最佳洗脱条件的确定

根据 RT-qPCR 检测 7 种方案最后一次洗脱液和最后一次洗脱后的膜片中 IHNV DNA 的病毒载量, 结合检出率等综合分析 FTA 卡保存 IHNV 最佳洗脱条件。

表 1 7 种洗脱方案

Tab.1 Seven elution programs

方案 Program	洗脱液 Eluent/ $\mu\text{L}$			洗脱条件 Elution conditions			参考文献 References
	FTA 纯化试剂 FTA purification reagent	TE 缓冲液 TE buffer	去离子水 Deionized water	温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	时间 Time/min	洗脱次数 Elution times	
1	200			室温 RT (20~25)	5	3	本研究 This study
2	100	200		室温 RT (20~25)	5	2	本研究 This study
		100		室温 RT (20~25)	5	1	本研究 This study
3		100		室温 RT (20~25)	5	1	本研究 This study
		50		95	5	1	本研究 This study
5			200	室温 RT (20~25)	5	2	匡金枝等(2008)
6			50	95	30	1	Karthikeyan 等(2020)
7	200			室温 RT (20~25)	2	1	Shalaby (2020)

表2 6种病原引物及探针信息  
Tab.2 Information of six pathogenic primers and probes

病原 Pathogens	引物及探针 <sup>a</sup> Primers and probe	序列 Sequence (5'~3')	标准/参考文献 Standards/references
IHHNV	1608F	TACTCCGGACACCCAACCA	WOAH
	1688R	GGCTCTGGCAGCAAAGGTAA	
	探针 Probe	ACCAGACATAGAGCTACAATCCTCGCCTATTTG	
WSSV	1011F	TGGTCCCGTCCCTCATCTCAG	WOAH
	1079R	GCTGCCTTGCCGAAATTA	
	探针 Probe	AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA	
EHP	157F	AGTAAACTATGCCGACAA	SC/T 7232-2020
	157R	AATTAAGCAGCACAATCC	
	探针 Probe	TCCTGGTAGTGTCCCTTCCGT	
<i>Vp<sub>AHPND</sub></i>	VpPirA-F	TTGGACTGTGAACCAAACG	SC/T 7233-2020
	VpPirA-R	GCACCCCATTTGGTATTGAATG	
	探针 Probe	AGACAGCAAACATACACCTATCATCCCGGA	
DIV1	142F	AATCCATGCAAGGTTCTCAGG	Qiu 等(2020)
	142R	CAATCAACATGTCGCGGTGAAC	
	探针 Probe	CCATACGTGCTCGCTCGGCTTCGG	
CMNV	CMN-CP-TaqIDT-F2	AACTACATCTGCACCCCATG	Wang 等(2022)
	CMN-CP-TaqIDT-R2	TTGATGGTGTGCTAGTCTTC	
	探针 Probe	ATCCCTGCCGCTTAATGTGAGATCG	

注: a: 探针 5'端加 FAM 标记, 3'端加 TAMRA 标记。

Note: a: Probe was labeled by FAM on the 5' end and TAMRA on the 3' end.

### 1.8 FTA 卡洗脱效果验证

根据 IHHNV FTA 卡洗脱方案结果, 选取最优的方案, 验证所建立方法在 WSSV、*Vp<sub>AHPND</sub>*、EHP、DIV1 和 CMNV 等 5 种病原上的应用效果。WSSV、*Vp<sub>AHPND</sub>*、EHP、DIV1 和 CMNV 在核酸未点膜前的 RT-qPCR 检测病毒载量分别为  $6.40 \times 10^7$ 、 $1.41 \times 10^6$ 、 $2.39 \times 10^5$ 、 $1.94 \times 10^6$  和  $4.22 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L。测试选择方案 1 和 4。方案 1 检测最后一次洗脱后的膜片, 方案 4 检测最后一次洗脱液。

## 2 结果

### 2.1 IHHNV DNA 最佳点膜浓度的确定

为确定最佳点膜浓度, 采用 RT-qPCR 方法检测不同稀释梯度的 IHHNV 含量, 结果显示, 原液病毒拷贝数为  $2.75 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L, 溶液每稀释 10 倍, 拷贝数降低 1 个数量级, 稀释到  $10^{-4}$  病毒拷贝数为  $1.78 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L, 稀释到  $10^{-5} \sim 10^{-7}$  数量级时检测不出病毒拷贝数。根据结果选择原液及稀释梯度  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  和  $10^{-4}$  用作 FTA 卡膜片点样核酸目标样品。

### 2.2 不同洗脱方案洗脱液中 IHHNV DNA 溶出情况

检测 7 种方案洗脱过程中洗脱液中的 IHHNV 核酸溶出情况, 结果见表 3。由表 3 可知, 每种方案洗脱过程中的洗脱液均检测出病毒拷贝数, 方案 1 中 FTA 纯化试剂 3 次洗脱病毒拷贝数相差不大, TE 缓冲液 2 次洗脱病毒拷贝数相差略大于 FTA 纯化试剂洗脱, 但二者洗脱后病毒拷贝数总体相差不大; 方案 2 中, TE 缓冲液洗脱后的病毒拷贝数略高于 FTA 卡纯化试剂洗脱后的病毒拷贝数; 方案 5 中, 灭菌去离子水 2 次洗脱后, 病毒拷贝数相差不大; 方案 4 和方案 6 洗脱后病毒拷贝数比其他 5 种方案洗脱后病毒拷贝数高 1 个数量级, 且方案 4 拷贝数略高于方案 6。表明, FTA 卡在不同的洗脱过程中均存在核酸的溶出。

### 2.3 FTA 卡保存 IHHNV 最佳洗脱条件的确定

将 7 种方案各稀释梯度膜片最后一次洗脱液和膜片中的 IHHNV DNA 进行 RT-qPCR 检测, 洗脱液检测结果如表 4 所示, 病毒原液经过  $10^4$  倍稀释后进行点膜, 各膜片组的洗脱液中检测不到病毒, 而  $10^{-3}$  稀释组中病毒核酸检出最高浓度组为洗脱方案 5,

表 3 7 种方案不同洗脱阶段洗脱液中核酸的溶出情况(DNA 浓度)/(copies/ $\mu$ L)

Tab.3 Lose of nucleic acid by eluate during the elution process of seven programs (DNA concentration)/(copies/ $\mu$ L)

方案 Program	3 次 FTA 纯化试剂洗涤 Eluted 3 times by FTA purification reagent			2 次 TE 缓冲液洗涤 Eluted twice by TE buffer		2 次去离子水洗涤 Eluted twice by eionized water	
	1	2	3	1	2	1	2
	1	$2.06 \times 10^3$	$2.02 \times 10^3$	$2.81 \times 10^3$	$1.91 \times 10^3$	$7.87 \times 10^2$	—
2	$5.38 \times 10^3$	—	—	$7.86 \times 10^3$	—	—	—
3	—	—	—	$4.98 \times 10^3$	—	—	—
4	—	—	—	$2.32 \times 10^4$	—	—	—
5	—	—	—	—	—	$2.70 \times 10^3$	$2.90 \times 10^3$
6	—	—	—	—	—	$2.05 \times 10^4$	—
7	$1.55 \times 10^3$	—	—	—	—	—	—

注：“—”表示检测不出病毒拷贝数，下同。

Note: “—”means no virus copies was detected, the same below.

表 4 不同点膜浓度膜片 7 种方案洗脱液中 IHNV DNA RT-qPCR 检测结果

Tab.4 The RT-qPCR results of eluents from 7 programs with different concentrations of virus

方案 Program	各稀释梯度组检测值 Serial dilution				
	$10^0/(\times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{L})$	$10^{-1}/(\times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L})$	$10^{-2}/(\times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L})$	$10^{-3}/(\times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L})$	$10^{-4}/(\text{copies}/\mu\text{L})$
1	$0.54 \pm 0.05$	$0.77 \pm 0.06$	$0.93 \pm 0.11$	$7.41 \pm 1.19$	—
2	$10.11 \pm 4.60$	$7.67 \pm 0.57$	$1.11 \pm 1.20$	$2.45 \pm 0.53$	—
3	$3.93 \pm 0.78$	$4.89 \pm 0.63$	$2.33 \pm 2.03$	$13.60 \pm 17.50$	—
4	$20.72 \pm 2.30$	$20.32 \pm 3.00$	$4.02 \pm 0.50$	$3.50 \pm 1.05$	—
5	$1.95 \pm 0.56$	$2.88 \pm 0.28$	$1.26 \pm 0.80$	$15.90 \pm 3.40$	—
6	$22.20 \pm 2.80$	$20.40 \pm 2.40$	$1.43 \pm 0.92$	$4.87 \pm 0.57$	—
7	$3.46 \pm 0.99$	$1.54 \pm 0.60$	$1.63 \pm 0.96$	$7.92 \pm 0.00$	—
对照 Control	—	—	—	—	—

检测值为 $(15.9 \pm 3.40) \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ，最接近初始点样液浓度，即灵敏度最高；最低组为洗脱方案 2，检测值为 $(2.45 \pm 0.53) \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ，即灵敏度最低。分析该稀释度下的洗脱组的病毒阳性检出率(表 5)，由表 5 可知，该稀释浓度条件下病毒阳性检出率最高的组为

方案 2、4、6，均为 55.56%，其他各洗脱方案的检出率均低于 45%，表明，点膜的核酸浓度在  $10^{-3}$  稀释组(浓度  $1.82 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$ )，各方案的准确度均较低。

病毒原液经过  $10^2$  倍稀释后，病毒核酸检出最高浓度组为洗脱方案 4，检测值为 $(4.02 \pm 0.50) \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ，最接近初始点样液浓度，即灵敏度最高；最低组为洗脱方案 1，检测值为 $(0.93 \pm 0.11) \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ，即灵敏度最低。分析该稀释度下的洗脱组的病毒阳性检出率(表 5)，由表 5 可知，该稀释浓度条件下病毒阳性检出率最高的组为洗脱方案 2 和 4，均为 100.00%，其他各洗脱方案的检出率均低于 88.89%。综上可知，按照洗脱方案 4 进行膜洗脱，采用洗脱液为模板进行检测，可获得较高的灵敏度和准确度。综上，采用 FTA 卡作为 IHNV DNA 载体，适宜的点膜浓度在  $1.47 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{L}$  以上。

若以膜片为模板，仅有洗脱方案 1 能获得检测结果，其他方案的膜片均无病毒数检出(见表 6)，且各稀释梯度组的检出率均为 100%。表明，若采用膜片为 IHNV 病毒检测模板，最佳的洗脱方案为方案 1。

表 5 不同点膜浓度膜片 7 种洗脱方案末次洗脱液

RT-qPCR 病毒阳性检出率

Tab.5 Detection rate of eluents from 7 programs with different concentrations of virus by the RT-qPCR

方案 Program	原液 Stock solution	各稀释梯度检出率 Detection rate/%			
		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1	100	100	33.33	33.33	0
2	100	100	100.00	55.56	0
3	100	100	88.89	44.44	0
4	100	100	100.00	55.56	0
5	100	100	88.89	22.22	0
6	100	100	77.78	55.56	0
7	100	100	44.44	11.11	0

该方案下, 点膜的 DNA 浓度达到  $1.82 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$  即可检出。

#### 2.4 FTA 卡用于其他核酸保存效果验证

根据 FTA 卡保存 IHHNV DNA 7 种洗脱方案的结果, 选择最佳的方案 1 和 4 来验证 WSSV、DIV1、CMNV、 $V_{\text{PAHPND}}$  和 EHP DNA 的保存效果。结果显

示, 5 种核酸均为方案 1 病毒拷贝数略高于方案 4, 核酸(除 EHP 外)均为洗脱后拷贝数比未点膜前原液拷贝数低 1 个数量级, EHP 为低 2 个数量级。由于 5 种核酸未点膜前的原液拷贝数数量级高于  $10^4$ , 因此, 结果与 IHHNV 洗脱结果一致, 则表明选出的最优方案适用于其他病毒。5 种核酸 2 种方案的洗脱结果见表 7。

表 6 不同点膜浓度膜片 7 种方案膜片中 IHHNV DNA RT-qPCR 检测结果

Tab.6 The RT-qPCR results of eluted diaphragm from 7 programs with different concentrations of virus

方案 Program	各液稀释梯度检测值 Serial dilution				
	$10^0/(\times 10^5 \text{ copies}/\mu\text{L})$	$10^{-1}/(\times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{L})$	$10^{-2}/(\times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{L})$	$10^{-3}/(\times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L})$	$10^{-4}/(\text{copies}/\mu\text{L})$
1	4.50±0.47	5.90±0.59	1.35±1.68	1.25±1.32	—
2	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—
对照 Control	—	—	—	—	—

表 7 5 种病原核酸洗脱结果

Tab.7 Elution results of nucleic acids of five pathogens

病原 Pathogens	病原核酸种类 Type of nucleic acid	方案 Program	点膜前病原载量 Load of pathogen nucleic acid in FTA/(copies/ $\mu\text{L}$ )	洗脱后载量 Load of pathogen after treatment/(copies/ $\mu\text{L}$ )
WSSV	DNA	1	$6.40 \times 10^7$	$5.93 \times 10^6$
		4		$3.44 \times 10^6$
DIV1	DNA	1	$1.94 \times 10^6$	$2.42 \times 10^5$
		4		$1.73 \times 10^5$
CMNV	RNA	1	$4.22 \times 10^6$	$4.58 \times 10^5$
		4		$4.52 \times 10^5$
$V_{\text{PAHPND}}$	DNA	1	$1.41 \times 10^6$	$2.64 \times 10^5$
		4		$1.79 \times 10^5$
EHP	DNA	1	$2.39 \times 10^5$	$5.20 \times 10^3$
		4		$2.86 \times 10^3$

### 3 讨论

FTA 卡固定核酸具有诸多优点, 在核酸回收方面也具有较大的优势。Karthikeyan 等(2020)比较了 FTA-DNA 的回收法、试剂盒法 DNA 提取方法(DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue)和盐酸胍法, 通过半定量 PCR 分析 DNA 提取率, 发现 FTA 卡 DNA 回收极限为  $10^{-4}$ , 试剂盒法为  $10^{-2}$ , 盐酸胍法为  $10^{-3}$ , 可以看出, FTA 卡提取法回收 DNA 效果最佳; Sudhakaran (2010)使用 FTA 卡从垂死虾血淋巴的 10 倍稀释液中制备 DNA 样品, 通过半定量和定量 PCR 分析, 获得

了良好的实验结果。本研究将 IHHNV DNA 吸附于 FTA 卡上, 利用 RT-qPCR 方法检测洗脱后的洗脱液及膜片, 同时进行其他 5 种虾类病原(DIV1、CMNV、WSSV、 $V_{\text{PAHPND}}$  和 EHP)核酸的实验验证, 证明了 FTA 卡在保存甲壳类病原方面具有广泛的应用空间。

目前, 对 FTA 卡的应用研究多见于其保存和运输组织样品的核酸效果, 对保存样品量、分离方法与检出效果的关系研究报道较少。本研究显示, 由方案 1 和 2 的各洗脱液体积及洗脱次数不同可得出, 洗脱液的体积和洗脱次数会影响检出结果; 由方案 3 和 4 的温度差异可得出, 洗脱的温度会影响检出结果; 由

方案 5 和 7 洗脱液的不同可得出, 洗脱液的种类也会影响检出结果。因此, FTA 卡用于虾病原核酸保存, 不仅对样品的核酸量有要求, 不同的膜片洗脱方法也直接影响样品的检出结果。本研究结果显示, 在膜面积及点样体积一定的条件下, 膜片上的核酸浓度高于  $10^4$  copies/ $\mu$ L, PCR 检测可获得理想的灵敏度及检测准确度; 在膜片的后处理中, 洗脱是重要的环节之一, 用未经洗脱的膜片做模板得不到理想的病原核酸扩增效果, 因为 FTA 卡上含有的蛋白变性剂及核酸吸附剂阻碍核酸的溶出, 而洗脱剂的种类、洗脱的温度和时间也直接影响检测结果。本研究还表明, 膜片经 FTA 纯化试剂、TE 缓冲液及去离子水洗脱, 各阶段均有目标核酸的溶出, 导致膜片中核酸载量的降低, 进而影响模板效果, 同时, 发现溶解有核酸的洗脱液可以作为模板进行 PCR 检测, 可以弥补 FTA 卡作为模板在检测中带来的不足。

常规保存运输病毒 DNA 的方法在跨区域跨境运输过程中因保存介质和运输条件的限制会对检测结果造成不同程度的影响, 且用于保存 DNA 的乙醇和甲醛等有机物作为保存溶液的成分在交通运输中是被严格禁止的, 制约了实验室间国内及国际生物样品传递和交流, FTA 卡保存 DNA 可以在常温下进行运输, 寄送方便, 是一种方便、快捷、可靠的保存运输方式。FTA 卡保存运输组织样品可以为野外采样提供更便利的途径, 具有更广泛的应用价值。FTA 卡保存感染 IHNV 生物组织样品的时效性及保存温度、湿度等条件对保存效果的影响有待后续的深入研究。

## 参 考 文 献

- ARUNRUT N, PROMBUN P, SAKSMERPROME V, *et al.* Rapid and sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods*, 2011, 171(1): 21–25
- BELL T A, LIGHTNER D V. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, 1988
- BONAMI J R, TRUMPER B, MARI J, *et al.* Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal of General Virology*, 1990, 71(11): 2657–2664
- CAI Y, LU C Y, XIANG D P, *et al.* Identification of *Listeria monocytogenes* by FTA card-16S rRNA sequencing method. *Chinese Journal of Public Health*, 2008, 24(10): 1276–1277 [蔡颖, 卢次勇, 相大鹏, 等. 李斯特菌 FTA 卡-16S rRNA 测序法鉴定. *中国公共卫生*, 2008, 24(10): 1276–1277]
- CHEN D T, HUANG J, WANG H L, *et al.* Selection and optimization of simple and convenient sample solutions for shrimp tissue preservation at normal temperature. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 71–80 [陈大恭, 黄健, 王海亮, 等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)组织样品常温保存液的筛选和优化. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 71–80]
- CORRADINI B, ALÙ, M, MAGNANINI E, *et al.* The importance of forensic storage support: DNA quality from 11-year-old saliva on FTA cards. *International Journal of Legal Medicine*, 2019, 133(6): 1743–1750
- DU Y B, WANG Z J, YANG B, *et al.* Ammonium preservation of shrimp tissue RNA at normal temperature and its effects. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 88–96 [杜迎彬, 王志杰, 杨冰, 等. 对虾组织样品中 RNA 的铵盐常温保存法及其效果. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 88–96]
- INOUE R, TSUKAHARA T, SUNABA C, *et al.* Simple and rapid detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus from pig whole blood using filter paper. *Journal of Virological Methods*, 2007, 141(1): 102–106
- JIA X, CAO D, WANG W W, *et al.* Collection and preservation of costicartilage tissue with FTA card at room temperature. *Forensic Science and Technology*, 2020, 45(5): 503–506 [贾霄, 曹丹, 王文雯, 等. FTA 卡采集和常温保存肋软骨组织的方法. *刑事技术*, 2020, 45(5): 503–506]
- KALAGAYAN H, GODIN D, KANNA R, *et al.* IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1991, 22(4): 235–243
- KARTHIKEYAN K, SARANYA R, BHARATH R, *et al.* A simple filter paper-based method for transporting and storing *Enterocytozoon hepatopenaei* DNA from infected *Litopenaeus vannamei* tissues. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2020, 169: 107305
- KIM J H, CHORESCA C H, SHIN S P, *et al.* Detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in *Litopenaeus vannamei* shrimp cultured in South Korea. *Aquaculture*, 2011, 313(1/2/3/4): 161–164
- KUANG J Z, NIE T G, YANG Z, *et al.* A simple and rapid modified-new method for DNA extraction of FTA bloodstains. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 2008, 23(2): 108–110 [匡金枝, 聂同钢, 杨智, 等. FTA-DNA 直接提取法的研究与应用. *中国法医学杂志*, 2008, 23(2): 108–110]
- LI W H, ZHANG H Y, LIU W H, *et al.* FTA filter paper-based template preparation for the PCR detection of *Salmonella* in meat. *Food Science*, 2009, 30(16): 254–257 [李伟昊, 张会彦, 刘卫华, 等. FTA 滤膜用于 PCR 检测肉中的沙门氏菌. *食品科学*, 2009, 30(16): 254–257]
- LIGHTNER D V, REDMAN R M, BELL T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1983, 42(1): 62–70
- LIGHTNER D V. A handbook of shrimp pathology and

- diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, 1996
- LIU J X, LIN T B, LIU J. Genetic polymorphisms of 15 STR loci in Fujian Han population. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2014, 29(5): 479–480 [刘建兴, 林天彬, 刘杰. 福建汉族人群 15 个 STR 基因座遗传多态性. 中国法医学杂志, 2014, 29(5): 479–480]
- LIU Y J, GUO L H, ZHANG B, *et al.* Genetic polymorphisms of Penta D and Penta E loci in Henan Han population. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2012, 27(3): 235 [刘亚举, 郭利红, 张博, 等. 河南汉族人群 Penta D 和 Penta E 基因座遗传多态性. 中国法医学杂志, 2012, 27(3): 235]
- MALDONADO J, VALLS L, RIERA P, *et al.* Method for rapid detection of swine influenza virus. Veterinary Record, 2009, 165(11): 328
- MAO N Y, WANG Y, LI F C, *et al.* Comparison of the room temperature transport by flinders technology associates cards and conventional refrigerated transport for measles isolates. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2015, 21(3): 260–262, 351 [毛乃颖, 王艳, 李芳彩, 等. FTA 卡常温运输和常规冷藏运输麻疹病毒分离株的比较. 中国疫苗和免疫, 2015, 21(3): 260–262, 351]
- MARI J, BONAMI J R, LIGHTNER D V. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. Journal of General Virology, 1993, 74(12): 2637–2643
- MUTHUKRISHNAN M, SINGANALLUR N B, RALLA K, *et al.* Evaluation of FTA cards as a laboratory and field sampling device for the detection of foot-and-mouth disease virus and serotyping by RT-PCR and real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods, 2008, 151(2): 311–316
- NIE T G, SUN R, KUANG J Z. Genetic polymorphisms of D12S391 and D6S1043 in Tianjin Han population. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2009, 24(5): 330–331 [聂同钢, 孙睿, 匡金枝. 天津汉族人群 D12S391 和 D6S1043 遗传多态性. 中国法医学杂志, 2009, 24(5): 330–331]
- PATIL R, SHANKAR K M, KUMAR B T N, *et al.* Development of a monoclonal antibody-based flow-through immunoassay (FTA) for detection of white spot syndrome virus (WSSV) in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Journal of Fish Diseases, 2013, 36(9): 753–762
- PEROZO F, VILLEGAS P, ESTEVEZ C, *et al.* Use of FTA<sup>®</sup> filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. Avian Pathology, 2006, 35(2): 93–98
- PICARD-MEYER E, BARRAT J, CLIQUET F. Use of filter paper (FTA<sup>®</sup>) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. Journal of Virological Methods, 2007, 140(1/2): 174–182
- QIU L, CHEN X, GUO X M, *et al.* A TaqMan probe based real-time PCR for the detection of Decapod iridescent virus 1. Journal of Invertebrate Pathology, 2020, 173: 107367
- RAJENDRAM D, AYENZA R, HOLDER F M, *et al.* Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(3): 582–592
- SAKSMERPROME V, PUIPROM O, NOONIN C, *et al.* Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing. Aquaculture, 2010, 298(3/4): 190–193
- SHALABY A G, BAKRY N R, MOHAMED A A E, *et al.* Evaluating flinders technology associates card for transporting bacterial isolates and retrieval of bacterial DNA after various storage conditions. Veterinary World, 2020, 13(10): 2243–2251
- SMITH L M, BURGOYNE L A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. BMC Ecology, 2004, 4(1): 4
- SUDHAKARAN R, MEKATA T, KONO T, *et al.* A simple non-enzymatic method for the preparation of white spot syndrome virus (WSSV) DNA from the haemolymph of *Marsupenaeus japonicus* using FTA matrix cards. Journal of Fish Diseases, 2010, 32(7): 611–617
- SUN Z F, HU C Q, REN C H, *et al.* Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. Journal of Virological Methods, 2006, 131(1): 41–46
- TANG K F J, DURAND S V, WHITE B L, *et al.* Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. Aquaculture, 2000, 190(3/4): 203–210
- TANG K F J, LIGHTNER D V. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. Virus Research, 2006, 118(1/2): 185–191
- TANG K F J, NAVARRO S A, LIGHTNER D V. PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms, 2007, 74(2): 165–170
- TAO X L, YAO H B, HAO S J. Genetic polymorphisms of 15 STR loci in the Dongxiang population of Gansu. Journal of Forensic Medicine, 2014, 30(2): 135–136 [陶晓岚, 姚宏兵, 郝思静. 甘肃东乡族人群 15 个 STR 基因座遗传多态性. 法医学杂志, 2014, 30(2): 135–136]
- WANG W, LIU S, YAO L, *et al.* Development of a novel RT-qPCR detecting method of covert mortality Nodavirus (CMNV) for the national proficiency test in molecular detection. Viruses, 2022, 14(7): 1475
- WANG X J, HUANG L, JU L, *et al.* 25 Y-STR genetic



polymorphisms in the Han population in Weifang area. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2012, 27(5): 400–402 [王新杰, 黄磊, 鞠兰, 等. 潍坊地区汉族人群 25 个 Y-STR 遗传多态性. 中国法医学杂志, 2012, 27(5): 400–402]

World Organization for Animal Health (WOAH). Diagnostic manual for aquatic animal diseases Paris France: 2023. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standard/s/aahm/current/2.2.04\\_IHHN.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standard/s/aahm/current/2.2.04_IHHN.pdf)

YANG B, SONG X L, HUANG J, *et al.* Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. Veterinary Microbiology, 2007, 120(1/2): 63–70

ZHAO X C, JIANG B W, YE J. Development of PCR enhancer for direct amplification of samples on FTA cards. Forensic Science and Technology, 2012(3): 13–15 [赵兴春, 姜伯玮, 叶健. FTA 卡直接扩增缓冲增强剂的研制. 刑事技术, 2012(3): 13–15]

(编辑 马璀璨)

## Optimization of DNA Elution Method of Infectious Hypodermic and Hematopoietic Necrosis Virus Preserved by FTA Card

LIAN Xinyu<sup>1,2</sup>, WANG Xiuhua<sup>2</sup>, LI Chen<sup>2</sup>, ZHANG Qingli<sup>2</sup>,  
GOU Ziyue<sup>2</sup>, LÜ Ruoxuan<sup>2</sup>, YANG Bing<sup>2①</sup>

(1. College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071, China)

**Abstract** Flinders technology associates (FTA) card (Whatman<sup>®</sup>) is a paper-based matrix designed to fix, purify, and store genetic material from various biological sources. It can conveniently and quickly preserve nucleic acids and may fulfil the requirements of long-distance and cross-border sample transportation. The FTA card can store and transport tissue, nucleic acid, and other sample types at room temperature (20–25 °C). Nucleic acid can be extracted directly for detection and be sent by express as an ordinary parcel without being treated as dangerous or as special goods, eliminating tedious processes, saving time, and ensuring sample quality. It is widely used in the human and animal medicine field. It has been successfully used for the storage and transportation of livestock pathogens and viral nucleic acids. In terms of aquatic animals, the FTA card has been used by researchers to store white spot syndrome virus (WSSV) and the shrimp *Enterovirus hepatopoeae* (EHP): However, there is no relevant research report on the elution effect of the nucleic acid stored in the FTA card, which affects the application of the FTA card. The infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is an important shrimp pathogen and severely impacts the shrimp culture industry. It was first found in Hawaii, United States, in 1981 and then spread to several countries, including to Australia, Singapore, Malaysia, South Korea, Brazil, and China. The IHHNV infecting *Penaeus vannamei* does not cause high mortality, but growth would become slow and deformed, resulting in great economic losses. Early detection and prevention management are particularly important in current situations, which lack effective control measures for the disease. Several IHHNV detection methods have been established that use molecular biological methods, including conventional polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (these are recommended in the aquatic animal disease diagnosis Manual of the World Organization for Animal Health). Nucleic acid extraction by the above methods meets the requirements for samples, usually frozen, ethanol, or other nucleic acid

① Corresponding author: YANG Bing, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn

preservation reagents. Low temperature preservation conditions and composition restrictions of preservation solutions present certain difficulties in disease investigation, surveillance, and monitoring of shrimp farming. It is particularly important to address this dilemma. To find a fast method for the preservation and separation of IHHNV DNA and provide complete nucleic acid materials for subsequent research, we selected FTA cards as the preservation medium, and designed seven kinds of FTA cards with attached DNA elution methods based on the FTA purification reagent, TE buffer, and deionized water. We evaluated the elution and separation effects of different nucleic acids and the minimum amount of dot FTA card nucleic acids through real-time PCR detection. The appropriate solution was spotted onto FTA cards according to the manufacturer's protocol, labeled, and air-dried for 1 day at room temperature. The result shows that on the 4 mm<sup>2</sup> FTA card, the sample volume was 2.5 μL. When the eluent is used as the template, the minimum FTA card nucleic acid concentration needs to be  $1.47 \times 10^4$  copies/μL above the best detection sensitivity, and 100% detection rate can be obtained by washing the FTA card with 50 μL TE buffer solution at 95 °C for 5 min. Using the FTA card as the template, the nucleic acid concentration of the dot FTA card needs to be above  $1.82 \times 10^3$  copies/μL, eluted with FTA purified reagent thrice at room temperature, and then eluted with TE buffer twice. Each elution time is 5 min as this can obtain the best detection sensitivity and demonstrates 100% accuracy. The elution effect of the above two schemes was better than that of the other five schemes. The nucleic acids of WSSV, EHP, decapod iridescent virus 1, covert mobility Noda virus, and *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis were preserved using FTA card to test the efficiency of the established elution method. It is assumed that this method is universal for the elution of other shrimp pathogenic nucleic acids. At present, research on the application of FTA card is mostly seen in the nucleic acid effect of its preservation and transportation of tissue samples. There are few reports on the relationship between the amount of preserved nucleic acid, separation methods, and detection effect. This study shows that FTA cards used to preserve pathogenic nucleic acid requires a specific amount of nucleic acid in the sample and directly affects the detection results of the sample with different FTA card elution methods. This study provides a feasible scheme for the preservation and elution of IHHNV DNA with FTA cards. The application of this technology has potential use as storage and transport strategy for surveillance programs and can enhance biosecurity in shrimp culture, which provides a scientific basis for the preservation and transportation conditions for the collection of wild shrimp samples and the regional transmission of viral nucleic acid samples.

**Key words** IHHNV; Flinders technology associates cards; Elution method; Optimization