

对虾肝胰腺细小病毒滚环扩增检测方法的建立*

王勤涛^{1,2} 张庆利¹ 杨昊霖^{1,2} 刘天齐^{1,2}
刘 笋¹ 杨 冰¹ 黄 捷¹

(1. 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;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 根据对虾肝胰腺细小病毒(HPV)保守基因序列,设计特异性的锁式探针及其扩增引物,优化反应条件,建立了肝胰腺细小病毒超分支滚环扩增检测方法。实验中采用一步法连接,探针在 *Taq* DNA 连接酶作用下,58℃连接 40 min、62℃扩增 30 min 便可以扩增出明显条带。反应特异性验证实验表明,该体系能够特异性地检测出 HPV,而不与供试的其他对虾病原发生交叉反应;灵敏度分析结果显示该方法的检测极限为 10^5 copies/ μ l,与 PCR 检测方法相比,一步法连接的滚环扩增的灵敏度低两个数量级。该方法反应过程中温度变化次数少,基本都在等温条件下进行,不需要 PCR 仪,可发展成为在简便实验条件下使用的简易检测方法。

关键词 对虾;肝胰腺细小病毒;检测;滚环扩增

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0059-07

对虾肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus, HPV)是一种无囊膜的二十面体的单链 DNA 病毒,平均直径为 22–23 nm (Phromjai *et al*, 2001),隶属于细小病毒科(Parvoviridae)、细小病毒亚科(Parvirinae)、细小病毒属(*Paevovirus*) (薛清刚等, 1996)。Chong 等(1984)从新加坡地区野生的墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)和印度明对虾(*F. indicus*)中首先发现了 HPV。感染该病毒使对虾厌食、行动不活泼、生长缓慢,鳃和体表有附着的共栖生物,偶尔发现腹部肌肉变白,严重时可导致幼虾死亡,死亡率高达 100% (Flegel *et al*, 1995; Lightner *et al*, 1985),造成较大的经济损失(Flegel, 1997)。因此,建立一种快速、特异、使用方便的检测技术对 HPV 的防治非常重要。检测 HPV 的 PCR 技术已经建立,但 PCR 技术需要 PCR 仪,不适合现场检测。

滚环扩增技术(Rolling Circle Amplification, RCA)是通过模拟自然界中某些病毒和质粒的滚环复制过

程实现的(Fire *et al*, 1995)。环形 DNA 模板在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下,通过一条引物便可以实现环状 DNA 模板的体外扩增,这种方法被称为“单引物 RCA”。以此为基础,根据环状 DNA 模板部分合适序列设计另一条引物,便可以实现环状 DNA 模板的指数扩增,称为“指数 RCA”(Nilsson *et al*, 1994)。RCA 的指数扩增和线性扩增可对线性模板分别实现 10^9 倍(Lage *et al*, 2003)和 10^5 倍(Gusev *et al*, 2001)的信号放大。Nilsson 等(1994)首次报道了基于锁式探针(Padlock probe)的线性 RCA 技术及其应用。其基本原理是连接酶在只有锁式探针与检测靶 DNA 完全互补配对时,才能将锁式探针有效连接成环,而在没有靶序列时,锁式探针无法成环,以此来确定反应的特异性。对成环的探针进行扩增,短时间内可以扩增出大量产物,通过对扩增产物分析,可以判断是否有目的基因存在。RCA 有高特异性,可以进行单核苷酸多态性(SNPs)的检测(Qi *et al*, 2001)。此

* 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。王勤涛, E-mail: qintwang@126.com

通讯作者: 黄 捷, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-04-28, 收修改稿日期: 2013-06-19

外,由于探针中间无关序列可以自己设计,因此可以在实现多重检测的同时,降低引物和扩增产物之间的相互干扰(Szemes *et al.*, 2005)。RCA 技术因其高特异性、高灵敏度、快速简便等优点,已经被广泛应用于检测和近缘种的鉴定(黄冠军等, 2008; 孔铖将等, 2011; Wu *et al.*, 2010; Macera *et al.*, 2011),但目前 RCA 技术很少用于水产动物病原的检测。

本研究依据肝胰腺细小病毒的保守基因序列,设计了特异的锁式探针及其扩增引物,优化超分支 RCA 条件,建立了特异、准确、高灵敏度的 HPV 超分支 RCA 检测方法,为对虾 HPV 的检测和控制提供了又一新的分子技术,同时为水产病害的多重滚环检测奠定了良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料

分别带有肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus, HPV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)、白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)的对虾组织样品和斑节对虾杆状病毒(Monodon baculovirus, MBV),以及培养的哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)菌株,均由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收集并保藏。20 份 HPV 感染状况未知的中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)样品于 2012 年 7 月采集自山东省青岛市即墨。对上述组织样品和菌株,用 TIANamp Marine Animals DNA Kit(天根生化科技有限公司,北京)试剂盒,按照说明书方法提取核酸。

1.2 探针及其扩增引物设计

根据中国对虾 HPV 基因序列(GenBank: JN082231.1)保守区,设计锁式探针两端特异识别序列。根据使探针形成的二级结构尽量小的原则,设计探针序列以及相应的引物(引物 P1/引物 P2),同时在探针上设计了

EcoR V 酶切位点。探针和引物由上海生工生物技术公司合成,具体序列见表 1,其中探针的 5'端磷酸化。

1.3 HPV-RCA 反应体系优化

检测 HPV 的滚环扩增检测方法(HPV-RCA)分两步进行,第一步是锁式探针的环化,第二步是环化探针的扩增反应。滚环扩增连接体系 10 μ l,含 1 \times Taq DNA 连接酶缓冲液、4 pmol/L 的锁式探针、0.6 U/ μ l Taq DNA 连接酶(New England Biolabs, 北京)、模板 1 μ l。连接反应条件:94 $^{\circ}$ C 4 min, 58 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 15 min,冰上保温 5 min。取连接反应产物为模板,作为 RCA 的扩增反应模板,扩增反应体系 25 μ l,含 1 \times Bst DNA 聚合酶缓冲液(New England BioLabs)、引物 P1 和 P2 各 0.4 μ mol/L、0.3 μ mol/L dNTPs、0.16 U/ μ l Bst DNA 聚合酶、连接反应产物 4 μ l。扩增反应条件为 62 $^{\circ}$ C 1 h,反应结束后,用由 GeneFinder(百维信,厦门)染色的 2%琼脂糖凝胶电泳进行分析。实验中对探针浓度(0.004–400 pmol/L)、扩增反应温度(53–66 $^{\circ}$ C,其中扩增反应时间 22 min)、连接反应温度(53–65 $^{\circ}$ C)、扩增反应时间(10–60 min)和连接反应时间(5–60 min,其中扩增反应 30 min)进行了优化。

1.4 HPV-RCA 灵敏度

用荧光定量 PCR 方法(另文报道)检测 HPV 阳性的对虾肝胰腺 DNA 中 HPV 的拷贝数为 1 \times 10⁶ copies/ μ l,用 ddH₂O 进行连续 10 倍梯度稀释后(10⁶–10⁰ copies/ μ l)作为模板,用上述优化好的反应体系进行灵敏度检测。

1.5 HPV-RCA 与 HPV-PCR 灵敏度比较

用 ddH₂O 将 HPV 阳性的对虾肝胰腺 DNA 的浓度调整到 200 ng/ μ l,并进行连续 10 倍梯度稀释后分别作为模板,用 RCA 和常规 PCR 方法检测 HPV DNA(HPV-RCA),同时按《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第 1 部分:PCR 检测法》(中华人民共和国水产行业标准,2007),用 PCR 方法检测 HPV DNA

表 1 肝胰腺细小病毒滚环扩增引物及探针序列
Tab.1 The padlock probe and primers used for HPV-RCA

引物和探针 Primers and probe	序列 Sequence (5'-3')
锁式探针 Padlock probe	pAGAGAATGTAACAATGCCTATGAAGTA <u>AGTCAGATGTCCGAAGCAGGTGCA</u> <i>GATATC</i> TCGACACATTCGCTTACTGGGAC GGAAGGGATTATGTGGAGG
P1	CACCTGCTTCGGACATCTGACT
P2	CGACACATTCGCTTACTGGGAC

注:序列中下划线为锁式探针的病原无关序列,斜体部分为 *EcoR* V 酶切位点

Note: The sequence underlined is unrelated sequence with HPV, and the italic sequence is the site of restriction endonuclease *EcoR* V

(HPV-PCR)。

1.6 HPV-RCA 的特异性

为确定 HPV-RCA 的特异性,对扩增产物用 *EcoR* V (TaKaRa, 大连)进行酶切(20 μ l 反应体系含 *EcoR* V 8–20 U、1 \times H Buffer、1 μ l 扩增产物)。37 $^{\circ}$ C 保温 4 h, 用 GeneFinder 染色的 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

用 1.1 中提取的 IHNV、WSSV、MBV 和哈维氏弧菌的阳性核酸样品,检测 HPV-RCA 的特异性,健康对虾组织的核酸为模板作阴性对照,以水作空白对照,HPV 阳性的对虾肝胰腺核酸作阳性对照。扩增产物用 GeneFinder 染色的 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.7 对虾样品的 HPV-RCA 检测

用优化好的 HPV-RCA 方法,对 20 份 HPV 感染状况未知的中国对虾组织核酸样品进行检测,同时用 HPV-PCR 方法对上述核酸样品检测。

2 结果

2.1 HPV-RCA 反应体系的优化

首先对 HPV-RCA 的锁式探针浓度进行了优化,在连接反应中使用的锁式探针浓度为 0.004–400 pmol/L。

结果显示(图 1a),随探针浓度降低,反应效率逐渐下降,探针浓度为 0.4 pmol/L 时,反应有微弱扩增,当探针浓度降低到 0.04 pmol/L 时,无明显的扩增条带产生。在保证扩增效率的前提下,从节约探针用量考虑,选择 4 pmol/L 作为锁式探针的使用浓度。

扩增反应温度梯度优化使用的反应温度为 53–66 $^{\circ}$ C,扩增反应时间为 22 min,反应在 59–64 $^{\circ}$ C 条件下都可扩增出明显条带,62 $^{\circ}$ C 效果最好,选择 62 $^{\circ}$ C 为扩增温度(图 1b)。

连接反应温度梯度优化使用的反应温度为 53–65 $^{\circ}$ C,反应在 53–65 $^{\circ}$ C 之间都有扩增条带产生,连接反应温度对 RCA 影响不是很大,选择 58 $^{\circ}$ C 进行连接(图 1c)。

扩增反应时间设置了 10–60 min 共 6 个时间梯度。扩增反应 10 min 时,没有条带产生;但当扩增反应 20 min 时,有明显条带产生;当扩增 30 min 之后,扩增条带亮度基本不变,反应进入平台期。选择扩增 30 min 作为扩增反应时间(图 1d)。

连接反应时间设置了 5–60 min 共 6 个时间梯度。62 $^{\circ}$ C 扩增 30 min,从扩增结果看,连接反应 5 min 时,就有明显扩增,连接 15–45 min,连接反应效率有微弱上升。为实现连接效率,最终选择连接 40 min(图 1e)。

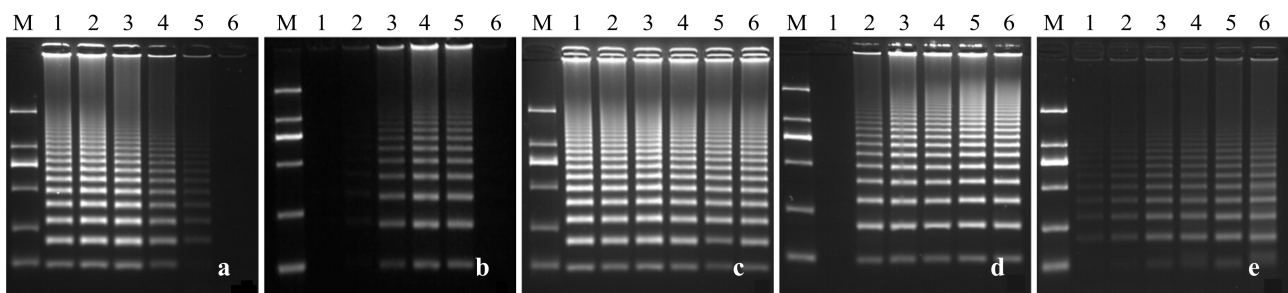


图 1 HPV-RCA 反应体系优化

Fig.1 Condition optimization for HPV-RCA

扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, GeneFinder 染色。泳道 M: DL 2000 DNA marker (2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp, 下同)。(a)泳道 1–6: 锁式探针浓度梯度分别为 400、40、4、0.4、0.04 和 0.004 pmol/L; (b)泳道 1–6: 扩增反应温度梯度分别为 53、56、59、62、64 和 66 $^{\circ}$ C, 扩增时间 22 min; (c)泳道 1–6: 连接反应温度梯度分别为 53、56、58、60、62 和 65 $^{\circ}$ C; (d)泳道 1–6: 扩增反应时间梯度分别为 10、20、30、40、50 和 60 min; (e)泳道 1–6: 连接反应时间梯度分别为 5、10、15、30、45 和 60 min, 62 $^{\circ}$ C 扩增 30 min

All the products were electrophoresed on 2% agarose gels and stained with GeneFinder. Lane M: DL2000 DNA marker (2000, 1000, 750, 500, 250, and 100 bp, same in the following figures). (a) Lane 1–6: The concentration of padlock probe in the reaction mixture was 400, 40, 4, 0.4, 0.04 and 0.004 pmol/L, respectively; (b) Lane 1–6: The amplification temperature was 53, 56, 59, 62, 64, and 66 $^{\circ}$ C, respectively; (c) Lane 1–6: The ligation temperature was 53, 56, 58, 60, 62 and 65 $^{\circ}$ C, respectively; (d) Lane 1–6: The amplification time was 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min, respectively; (e) Lane 1–6: The ligation time was 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min, respectively

2.2 HPV-RCA 灵敏度

将含有 10^6 copies/ μl HPV DNA 的中国对虾组织 DNA 样品经 10 倍梯度稀释作为模板,进行灵敏度检测。结果显示,HPV-RCA 灵敏度检测限为 10^5 copies/ μl (图2)。

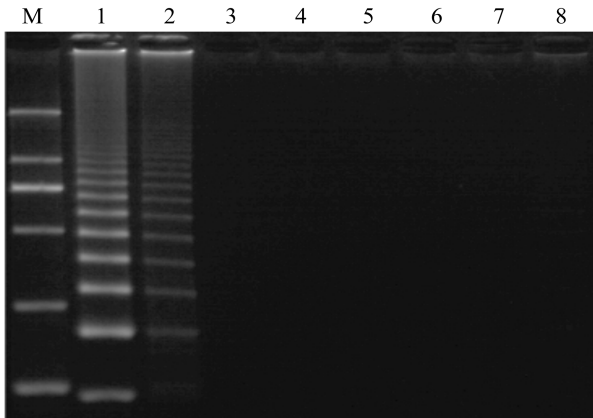


图2 HPV-RCA 灵敏度分析

Fig.2 The sensitivity analysis of HPV-RCA

提取感染 HPV 对虾肝胰腺核酸(10^6 copies/ μl)作为模板,进行 10 倍梯度稀释。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳分析, GeneFinder 染色。泳道 M: DL2000; 泳道 1-7: 反应体系中病毒拷贝数分别为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 和 10^0 copies/ μl ; 泳道 8: 阴性对照

The template was 10-fold diluted DNA (10^6 copies/ μl) extracted from shrimp infected HPV. Products were electrophoresed on a 2% agarose gel and stained with GeneFinder. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1-7: the template was 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , and 10^0 copies/ μl respectively; Lane 8: Negative control

2.3 HPV-RCA 与 HPV-PCR 灵敏度比较

感染 HPV 中国对虾肝胰腺 DNA(200 ng/ μl)经 10 倍梯度稀释后作为模板,分别进行 HPV-RCA 和 HPV-PCR(图 3)。当模板稀释至 2 ng/ μl 时, HPV-RCA 产物还有条带,但当模板稀释至 0.2 ng/ μl 时,无扩增产物产生(图 3a)。而 HPV-PCR 可以对 20 pg/ μl 的核酸样品进行检测(图 3b), HPV-RCA 比 HPV-PCR 的灵敏度低两个数量级。

2.4 HPV-RCA 特异性

选取了 IHNV、WSSV、MBV 和哈维氏弧菌等 4 种对虾常见病原阳性的核酸样品进行 HPV-RCA 的特异性验证,并以健康对虾组织提取的 DNA 作阴性对照,水作为空白对照。结果显示(图 4a),只有感染 HPV 的对虾肝胰腺核酸样品显阳性,其他均为阴性,

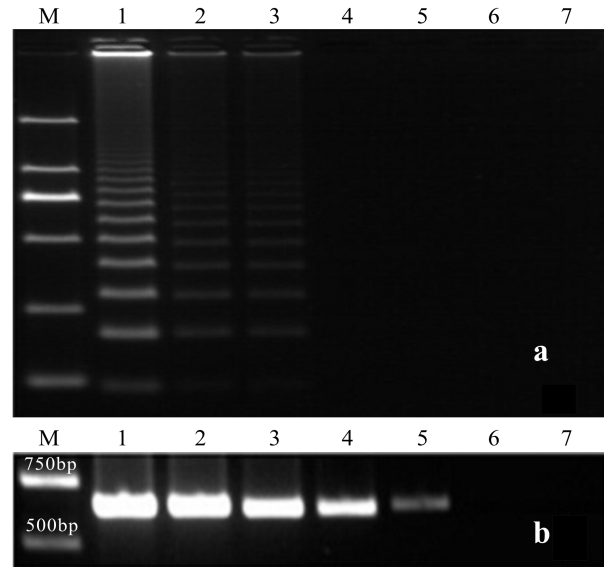


图3 HPV-RCA 与 HPV-PCR 灵敏度比较

Fig.3 Comparison of the sensitivity of HPV-RCA and HPV-PCR

提取感染 HPV 对虾肝胰腺核酸(200 ng/ μl)作为模板,进行 10 倍梯度稀释。泳道 M: DL2000 DNA marker。(a) HPV-RCA 检测方法灵敏度分析,扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳分析, GeneFinder 染色。泳道 1-6: 反应体系中将模板分别进行 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 倍稀释,泳道 7: 阴性对照。(b) HPV-PCR 检测方法灵敏度分析,扩增产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳分析, GeneFinder 染色。泳道 1-6: 反应体系中将模板分别进行 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 倍稀释,泳道 7: 阴性对照

The template was 10-fold diluted DNA (200 ng/ μl) extracted from shrimp infected HPV. Lane M: DL2000 DNA marker; (a) Sensitivity of HPV- RCA. Products were electrophoresed on a 2% agarose gel and stained with GeneFinder. Lane 1-6: the template was 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 and 10^5 -fold dilution, respectively; Lane 7: Negative control; (b) Sensitivity of HPV-PCR. Products were electrophoresed on a 1.2% agarose gel and stained with GeneFinder. Lane 1-6: the template was 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , and 10^5 -fold dilution, respectively; Lane 7: Negative control

说明 HPV-RCA 可以保证对 HPV 病毒的特异性检测。

设计的 HPV-RCA 锁式探针上包含有 *EcoR* V 酶切位点,预测 HPV-RCA 产物经 *EcoR* V 酶切将产生大小为 99 bp 的条带,酶切结果经琼脂糖电泳(图 4b)计算,其分子量约为 99 bp,与预测结果相符。

2.5 HPV-RCA 检测方法样品检测

将采集的 20 份中国对虾样品分别用 HPV-RCA 和 HPV-PCR 方法进行检测。HPV-RCA 对 20 份样品检测结果为 6 份阳性、14 份阴性, HPV-PCR 方法检

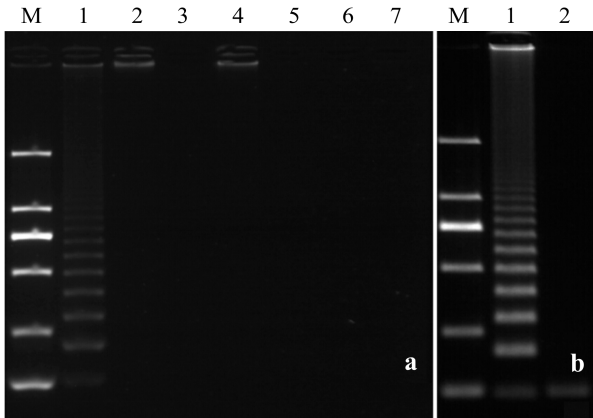


图 4 HPV-RCA 检测方法分析特异性检测结果
Fig.4 The specificity analysis of the HPV-RCA

产物用 2%琼脂糖凝胶电泳分析, GeneFinder 染色。泳道 M: DL2000 DNA marker, (a)用于 HPV-RCA 特异性检测病原及对照, 泳道 1-7: HPV、IHNV、WSSV、*V. harveyi*、MBV、对虾组织、水; (b)泳道 1: 未酶切的 HPV-RCA 扩增产物; 泳道 2: HPV-RCA 扩增产物被 *EcoR* V 酶切后产物

Products were electrophoresed on 2% agarose gels and stained with GeneFinder. Lane M: DL2000 DNA marker. (a) Lane 1-7: The template used in the HPV-RCA was HPV, IHNV, WSSV, *V. harveyi*, MBV, penaeid shrimp, and H₂O, respectively. (b) Lane 1: Undigested products of the HPV-RCA; Lane 2: The *EcoR* V digested products of the HPV-RCA

表 2 HPV-RCA 和 HPV-PCR 对 20 份 HPV 感染情况未知样品的检测结果
Tab.2 The comparison of detection results of HPV-RCA and HPV-PCR

两种方法的比较 Comparison of two methods	PCR 阳性 PCR positive	PCR 阴性 PCR negative	总计 Total
HPV-RCA 阳性 HPV-RCA positive	6	0	6
HPV-RCA 阴性 HPV-RCA negative	13	1	14
总计 Total	19	1	20

测结果为 19 份阳性、1 份阴性(表 2)。

3 讨论

肝胰腺细小病毒感染在中国对虾养殖中较为常见, 危害育苗期或幼虾, 但难以通过外观症状判断该病毒的感染, 快速准确的检测方法对 HPV 病害的预警和防治必不可少。现有的 PCR 技术由于需要热循环仪, 不适合用于现场检测, 而 RCA 检测方法可以在等温条件下进行连接和扩增, 作为近年来新兴的一种病原检测技术, 具有高灵敏度、高特异性、多重性

等优点, 因此有潜力发展为一种现场检测技术。

考虑到 HPV-RCA 的实用性, 连接反应只采用了一步法连接, 而不是热循环连接方法(黄冠军等, 2008)。黄冠军等(2008)建立的柑桔溃疡病菌 RCA 检测方法对质粒的灵敏度检测极限为 10^2 copies/ μ l。本研究中反应灵敏度检测极限为 10^5 copies/ μ l 病毒 DNA, 灵敏度比 PCR 方法低两个数量级。本研究的检测方法灵敏度较低可能是由于采用一步法连接, 连接效率相对较低。此外, 由于模板为提取的感染 HPV 的中国对虾肝胰腺核酸, 因此, 在进行连接反应的时候, 会有大量的中国对虾核酸影响连接反应进行, 也可能在一定程度上降低了灵敏度。因此, HPV-RCA 比较适合于发病中后期的样品检测。

从特异性检测结果看, 该检测方法具有良好特异性。HPV-RCA 特异性扩增产物为梯状条带, 第一条条带大小为 93 bp, 相邻条带分子间差量为探针大小 (99 bp)。实验结果中出现过弥散结果现象, 弥散结果由于不知道其序列, 无法判断是否为特异性扩增产物。另外, 实验中对弥散扩增结果进行酶切后, 发现弥散结果没有被降解, 所以建议将弥散结果认为是阴性结果。作者认为其原因可能是探针和引物相互作用引起。此外, 弥散结果也有可能是由于 *Bst* DNA 聚合酶具有模板转换功能(Large *et al.*, 2003), 当扩增到模板末端之后, 会使用其他链作为模板继续进行扩增, 由此引发非特异性扩增产生的弥散结果。实验中发现, 当扩增体系中不加模板而是添加高浓度探针进行扩增时, 有时也可能出现弥散结果, Hafner 等(2001)将这种情况称为线性靶序列恒温多聚扩增, 其形成机制还未完全阐明。有的文献中建议在连接反应结束后进行酶切, 但经试验表明, 即使是酶切后的体系依然会有背景扩增, 且酶切时间较长, 不适合快速检测。

本研究根据 HPV 特异性序列设计探针, 进行反应体系优化, 成功建立了肝胰腺细小病毒滚环扩增检测方法, 最终确定探针浓度为 4 pmol/L, 58 $^{\circ}$ C 连接 40 min, 62 $^{\circ}$ C 扩增 30 min, 为肝胰腺细小病毒的检测提供了一种新的分子检测方法, 为今后水产病害滚环扩增多重检测方法奠定了基础。

参 考 文 献

中华人民共和国水产行业标准. 《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第 1 部分: PCR 检测法》(起草人: 黄捷, 杨冰, 陈爱平, 等). 中国农业出版社, 2007, SC/T 7203.1-2007
孔铖将, 史雨红, 黎昊雁, 等. 超分支滚环扩增法检测传染

- 性脾肾坏死病毒. 水产科学, 2011, 30(9): 575-579
- 黄冠军, 殷幼平, 张仑, 等. 柑橘溃疡病菌滚环扩增检测体系的建立. 微生物学报, 2008, 48(3): 375-379
- 薛清刚, 宫云浩. 中国对虾肝胰腺细小病毒的纯化与鉴定. 海洋与湖沼, 1996, 27 (3): 308-313
- Chong YC, Loh H. Hepatopancreas chlamydial and parvoviral infections of farmed marine prawns in Singapore. Singapore Veterinary Journal, 1984, 9: 51-56
- Fire A, Xu SQ. Rolling replication of short DNA circles. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(10): 4641-4645
- Flegel TW, Sriurairatana S, Wongteerasupaya C, *et al.* Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. In: Browdy ECL, Hopkins JS. Swimming through troubled water, proceedings of the special session on shrimp farming. LA, USA: World Aquaculture SocBaton Rouge, 1995, 76-83
- Flegel TW. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microbiol Biotechnol, 1997, 13(4): 433-442
- Gusev Y, Sparkowski J, Raghunathan A, *et al.* Rolling circle amplification: a new approach to increase sensitivity for immunohistochemistry and flow cytometry. Am J Pathol, 2001, 159(1): 63-69
- Hafner GJ, Yang IC, Wolter LC, *et al.* Isothermal amplification and multimerization of DNA by *Bst* DNA polymerase. BioTechniques, 2001, 30(4): 852-867
- Lage JM, Leamon JH, Pejovic T, *et al.* Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. Gen Res, 2003, 13(2): 294-307
- Lightner DV, Redman RM. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. J Invert Pathol, 1985, 45(1): 47-53
- Macera L, Cortey M, Maggi F, *et al.* A novel rolling circle amplification assay to detect members of the family Anelloviridae in pig and human. Virus Res, 2011, 160(1-2): 424-427
- Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, *et al.* Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. Science, 1994, 265(5181): 2085-2088
- Phromjai J, Sukhumsirichart W, Pantoja C, *et al.* Different reactions obtained using the same DNA detection reagents for Thai and Korean hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Dis Aquat Organ, 2001, 46(2): 153-158
- Qi X, Bakht S, Devos KM, *et al.* L-RCA (ligation-rolling circle amplification): a general method for genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs). Nucleic Acids Res, 2001, 29(22): e116-e116
- Szemes M, Bonants P, de Weerd M, *et al.* Diagnostic application of padlock probes—multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. Nucleic Acids Res, 2005, 33(8): e70-e70
- Wu L, Liu Q, Wu Z, *et al.* Detection of HIV cDNA point mutations with rolling-circle amplification arrays. Molecules, 2010, 15(2): 619-626

(编辑 冯小花)

《渔业科学进展》动态

(1) DOI 注册 《渔业科学进展》已加入“中文 DOI”服务, 获得出版机构会员资格。本刊可为 2013 年第 6 期以来已出版的论文注册 DOI。

(2) 版式改动 《渔业科学进展》的版式从 2014 年第 4 期开始, 由通栏改为双栏。

《渔业科学进展》编辑部

Development and Evaluation of Rolling Circle Amplification Assay for the Detection of the Hepatopancreatic Parvovirus

WANG Qintao^{1,2}, ZHANG Qingli¹, YANG Haolin^{1,2}, LIU Tianqi^{1,2},
LIU Sun¹, YANG Bing¹, HUANG Jie¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Hepatopancreatic parvovirus (HPV), first isolated from *Fenneropenaeus merguensis*, is a single-stranded DNA virus that belongs to the Parvoviridae family. It has a spherical shape with an average diameter of 18–22 nm. HPV infects major aquacultured shrimp species, causes slow growth in penaeid shrimp, and consequently seriously threatens the penaeid shrimp farming. Therefore, rapid and cost-effective detection of HPV should help prevent or control disease outbreaks in penaeid shrimp. In this study we established the rolling circle amplification (RCA) assay for the detection of HPV in penaeid shrimp. We used a conservative sequence of a unique gene of HPV to design a padlock probe based on the genomes of all HPVs, and used an unrelated sequence as the primers of HPV-RCA. Using one-step ligation method, we obtained the best results at 4 pmol/L probe with 40 min ligation followed by 30 min amplification at 62°C. The detection limit of HPV-RCA assay was 10⁵ copies/μl. HPV-RCA could detect HPV at the lowest concentration of 2 ng/μl in the hepatopancreas DNA in the shrimp samples, whereas the detection limit of HPV-RCA for PHV was 20 pg/μl. Compared to the conventional PCR, the sensitivity of HPV-RCA was 10² lower. However the HPV-RCA probe exhibited very high specificity to the HPV sequence, and showed no cross-reaction with either shrimp genomic DNA or the most common pathogens of shrimp (including infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, white spot syndrome virus, *Monodon baculovirus* disease, and *Vibrio harveyi*). Thus HPV-RCA could be established for the diagnosis of HPV infection under a practically isothermal condition. This is a simplified diagnosis method under farm-based experiment conditions, and thus has great potentials for the detection of HPV in both laboratories and the fields.

Key words Penaeid shrimp; HPV; Detection; RCA