

## 多重 RT-PCR 体系检测 4 种虾病毒的方法

乌日琴<sup>1\*</sup>, 但学明<sup>2</sup>, 刘中勇<sup>1</sup>, 林志雄<sup>1</sup>, 陈芳<sup>1</sup>, 刘芸莉<sup>2</sup>, 张艺宜<sup>2</sup>

(1. 广东出入境检验检疫局技术中心, 广东 广州 510623;

2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510623)

**摘要:** 根据多重 RT-PCR 的技术原理, 利用对虾传染性表皮与造血组织坏死症病毒、白斑综合征病毒、黄头病毒和桃拉综合征病毒的基因序列分别设计了 4 对特异引物, 建立多重 RT-PCR 体系用于虾 4 种病毒的检测。多重 RT-PCR 体系能特异地扩增出 IHNV、WSSV、YHV 和 TSV 的目的片段: TSV 特异性扩增片段 508 bp, WSSV 特异性扩增片段 435 bp, IHNV 特异性扩增片段 301 bp 和 YHV 特异性扩增片段 614 bp。结果表明, 多重 PCR 虾病毒检测系统具有较高的特异性和敏感性, 并对其它对虾病原呈阴性。IHNV、TSV、WSSV 和 YHV 模板在多重 PCR 虾病毒检测体系中的检测下限分别为 0.1, 1, 0.02 和 0.2 pg。病毒感染病料检测试验中, 该检测体系的检测结果与单纯 PCR 的检测结果呈现出较好的吻合度。

**关键词:** 传染性表皮与造血组织坏死症病毒; 桃拉综合征病毒; 白斑综合征病毒; 黄头病毒; 多重 RT-PCR

**中图分类号:** S 945.4+6

**文献标识码:** A

近年来, 随着水产养殖规模不断扩大和集约化程度的不断提高, 各种病害频发, 给水产养殖生产造成了重大经济损失, 这还不包括因为病害威胁导致的生产收缩和产品质量安全下降所带来的损失。此外在国际贸易中, 水产疫病检测和因疫病防治带来的药物残留问题, 已多次成为欧洲、日本、美国等发达国家对我国水产品出口制造障碍的技术壁垒, 我国也在利用水生动物疫病快速检测等技术手段保护国家水产养殖安全。2009 版 OIE 的《水生动物健康法典》中列出了 26 种必须申报的水生动物疫病, 《水生动物疫病诊断手册》中则包括了 36 种鱼类、甲壳类和贝类疫病。其中对虾白斑综合征为农业部发布的动物疫病名录一类病。目前, 分子生物学的核酸探针、斑点杂交和 PCR 技术已普遍在海水养殖动物疾病检测中开发, 使人们能在极广范围内对病原核酸进行精确定量, 对水产动物病原的感染机理及病毒生态学研究都有极大的推动作用。国际趋势和国内产业

发展都对水产病害诊断技术提出了高通量的迫切要求。近年来, 海水养殖动物的诊断技术已向着同时检测多种病原方向发展, 例如同时检测白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV), 和对虾传染性表皮与造血组织坏死症病毒 (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHNV) 的 PCR 技术<sup>[1]</sup>, 同时检测桃拉综合征病毒 (Taura syndrome virus, TSV)、WSSV 和 IHNV 的 (RT) PCR 技术<sup>[2]</sup>, 这些技术的发展使人们看到了提高检测通量所带来的方便, 也为进一步进行液相基因芯片技术的研究提供了可靠的基础数据支持。

养殖过程中对虾很容易感染多种病原和病毒, 包括危害比较大的 IHNV、WSSV、TSV 和黄头病毒 (yellow head baculovirus, YHV)。随着对虾种苗和水产品国家贸易活动的不断增多, 上述 4 种病毒在全世界范围内的传播风险也不断增大, 病毒既可以通过垂直传播传给下一代, 也可以

收稿日期: 2010-10-23

修回日期: 2010-12-18

资助项目: 国家质量监督检验检疫总局科技项目 (国检科 2007IK014)

通讯作者: 乌日琴, E-mail: erininner@gmail.com

通过水平传播传给其他种群,而且这些病毒的混合感染情况也越来越多,IHHNV 和 WSSV<sup>[3]</sup>, TSV 和 WSSV<sup>[4]</sup>以及 TSV 和 YHV<sup>[5]</sup>混合感染的病例都曾有报道。

YHV 和 TSV 都是单链 RNA 病毒<sup>[6-8]</sup>,YHV 最早是在泰国发现的,在感染黄头病毒的对虾身上常会发现头胸部黄化的病征及全身肌肉白化的现象,在感病初期 2~4 d 之内虾只会出现不正常的大量进食的现象,而后几乎完全停止进食,接下来便会有大量垂死的虾只会聚集在养殖池的池水表面或池塘周围。黄头病毒对草虾的致死率是最高的,黄头病毒严重发病时可使全池的草虾在 3 d 之内达到 100% 致死率。另外,在澳洲曾经发现一种病毒——鳃病毒(GAV),此种病毒跟在泰国发现的黄头病毒核酸序列与病毒结构皆极为相似,而且只会感染澳洲地区的草虾,虽亦会造成草虾的高致死率(约 80%),但却与黄头病毒的病征不甚相同。TSV 是对虾桃拉病(红体病)的病原,也是主要危害凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)的一种严重传染性病毒。TSV 除了主要感染凡纳滨对虾外,还可危害红额角对虾和斑节对虾等对虾品种<sup>[8]</sup>。TSV 属于单链 RNA 病毒,呈现 20 面体结构,直径大约 30 nm,无包涵体,无囊膜,被 TSV 感染过的凡纳滨对虾死亡率达 60%~90%<sup>[9]</sup>,而幸存下来的对虾将会作为 TSV 的隐形感染者继续传播,从而导致更大的损失。

WSSV 分子量较大、结构特异,是已知对虾病毒乃至动物病毒中最大的病毒,属于双链 DNA 病毒<sup>[10]</sup>,完整的病毒形态呈线团状,有囊膜但无包涵体,一末端有尾状结构。其宿主范围较广,除了感染对虾外,还可感染蟹类和一些桡足类生物等<sup>[11]</sup>,危害严重。以病死虾体外壳内侧呈现白色斑点而得名。

IHHNV 是传染性造血器官坏死病的病原,属单链 DNA 病毒,是目前已知的对虾病毒中体型最小的一种<sup>[1]</sup>。IHHNV 感染蓝虾(*Penaeus stylirostris*)后会引起接近 90% 的致死率,其中又以蓝虾的幼虾时期最容易受到感染。IHHNV 亦会感染白虾,虽然不易引起白虾死亡,但会导致虾只产生慢性的畸形症(runt-deformity syndrome, RDS),除了成长参差缓慢,体型变小,也有可能触角、头胸甲等外骨骼处发生变形的现象,进而影

响虾只的经济效益。白虾的种虾感染 IHHNV 之后,则会通过垂直感染的途径传给子代,感染 IHHNV 的卵则不易发育成功。IHHNV 虽然也会感染草虾,但不会出现明显的病征,只会让染病虾只终身携带病原,带病的虾苗混入养殖池中引起疾病的爆发<sup>[12]</sup>。

本研究建立多重 PCR 应用于诊断对虾病害中常见的 4 种病毒病,目的在于为实验室的日常检测工作建立一种高通量,低成本和高效率的方法来应对大量的检测样品。采用多对引物扩增多个模板的多重 PCR,有效地克服了常规单重 PCR 的不足,能特异扩增出试验样本和野生样本中 IHHNV, WSSV, YHV 和 TSV 目的片段,而对其它对虾病原呈阴性,具有较高的特异性和敏感性,为同步进行的上述 4 种病毒的液相芯片检测研究提供可靠的数据基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和试剂

本实验所用样品采集于海南省、广东省湛江地区部分养殖场的发病凡纳滨对虾病料。实验所用 Taq DNA 聚合酶、dNTP 购买于 TaKaRa 公司; TRIzol 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 反转录试剂盒, DNA 提取试剂盒购于美国 Promega 公司; 扩增引物由上海生物工程有限公司合成; 质粒 DNA 抽提试剂盒购于 TIANGEN 公司。

### 1.2 质粒和阳性病料

WSSV、IHHNV、TSV 和 YHV 感染病料由本室保存, pGEMT-WSSV、pGEMT-IHHNV、pGEMT-TSV、pGEMT-YHV 阳性重组质粒由本室构建,用于建立多重 PCR 检测方法模板的核酸来源、提取方法、用于灵敏性和特异性实验的核酸种类以及确证方法如表 1 所示。

### 1.3 实验方法

**TSV RNA 提取及 cDNA 的合成** 对虾总 RNA 的提取:取病虾的部分肝胰腺、胃、肠、肌肉和鳃,用剪刀剪碎,取约 100 mg 组织样品放入经高温烘烤过的研钵中。同时不断加入液氮进行研磨,充分研磨匀浆后加入 1 mL TRIzol, 15~30 °C 下放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离,将匀浆样品置入 1.5 mL 的离心管, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,取上清,加 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡

15 s, 室温放置 3 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min。位于上层的水相, 加入 0.5 mL 异丙醇, 混匀, 室温放置 10 min。4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 去除上清, 保留沉淀。加 1 mL 75% 乙醇洗

涤, 4 °C 7 500 r/min 离心 5 min, 去除上清, 室温凉干, 加 30 μL 经 DEPC 处理过的水溶解沉淀, 即为所提取的对虾总 RNA 样品。

表 1 多重 RT-PCR 的模板核酸来源、提取方法、用于灵敏性和特异性实验的核酸种类以及确证方法  
Tab. 1 The sources of nucleic acids, extraction methods, and nucleic acids used for testing sensitivity and specificity of mRT-PCR

病毒 virus	病料来源 sources	病毒核酸提取方法 extraction methods	用于特异性和灵敏性检测的核酸 nucleic acids used for testing sensitivity and specificity	确证方法 confirmation methods
IHHNV	感染组织 tissue	DNA 提取试剂盒	质粒 DNA plasmid DNA	PCR, 测序 PCR, sequencing
WSSV	感染组织 tissue	DNA 提取试剂盒	质粒 DNA plasmid DNA	PCR, 测序 PCR, sequencing
TSV	感染组织 tissue	TRIzol RNA 提取	cDNA	PCR, 测序 PCR, sequencing
YHV	重组质粒 plasmid	质粒 DNA 抽提试剂盒	质粒 DNA plasmid DNA	PCR, 测序 PCR, sequencing

IHHNV, WSSV DNA 提取 取病虾的部分肝胰腺、胃、肠和肌肉, 用剪刀剪碎, 混匀后取约 100 mg 样品。按照试剂盒说明书的操作方法提取核酸 DNA 作为 PCR 反应模板。

质粒 DNA 提取 按照质粒 DNA 抽提试剂盒说明书进行质粒 DNA 抽提。

cDNA 合成 在 PCR 反应管中, 加入新提取感染 TSV RNA 样品 3 μL、Nuclease-free Water 1 μL、随机引物 1 μL。置入 70 °C 的水浴中加热保温 5 min, 然后立即置于冰水浴中冷却 5 min, 并用微量离心机短暂离心, 置于冰水中。继续加入 Nuclease-free Water 8.5 μL、5 × RT Buffer 4 μL、dNTP Mixture 1 μL、RNasin Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL、M-MLV RTase H 1 μL, 将反应管转入

25 °C 保温 5 min, 使得模板和引物退火。42 °C 保温 1 h, 引导 cDNA 链的合成, 70 °C 保温 15 min, 灭活反转录酶, 终止反应, 反应液即可作为 PCR 反应中的 cDNA 模板。

常规 PCR 扩增 25 μL 的 PCR 反应体系, 10 × Taq DNA 聚合酶缓冲液 1 μL、dNTP 0.2 mmol/L Taq DNA 聚合酶 0.2 μL、分别以 IHHNV、WSSV DNA、TSV cDNA 和 YHV 的质粒 DNA 2 μL 作为模板, 上下游引物分别为 0.5 μmol/L, 引物和扩增片段情况如表 2 所示, 其中设副溶血弧菌的核酸作为阴性对照。按照下列程序分别进行扩增: 94 °C 45 s, 1 个循环; 94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。

表 2 用于检测 4 种病毒多重 PCR 反应所扩增的基因序列和产物长度以及对应引物  
Tab. 2 Nucleotide sequence of primer pairs for individual virus

引物名称 primers name	引物 5'-3' 序列 5'-3' sequences	退火温度(°C) $T_m$	序列长度(bp) length	GenBank 序列号 GenBank accession number
IHHNV S	ATTTCTCCAAGCCTTCTCACC	62	301	NC_002190
IHHNV A	TGATGTAAGTAATTCCTCTCTGT	62		
WSSV S	CGGTCGTGTCCGCCATCCT	64	435	AJ551447
WSSV A	GGAGCTACCGACAAAGGCCCT	64		
TSV S	TGTTGCCACCGAGCCTTCTA	63	508	NC_003005
TSV A	CTTGAAGACGTCTGCATATCCTG	63		
YHV S	TCCCGGCAATTGTGATCCCAT	64	614	AF148846
YHV A	AGTTAAGATGGTCACAGTCACG	64		

多重 PCR 扩增 25 μL 的 PCR 反应体系, 包括 10 × Taq DNA 聚合酶缓冲液、dNTP、Taq DNA 聚合酶, 常规 PCR 下 IHHNV、WSSV 阳性扩

增产物 DNA 样品、常规 PCR 下 TSV 阳性扩增产物 cDNA 样品、常规 PCR 下 YHV 阳性扩增产物的质粒 DNA、IHHNV、YHV、WSSV 和 TSV 多重

PCR 特异性扩增上下游引物、双蒸水。设立副溶血弧菌基因组 DNA 作为空白对照,根据 PCR 反应模式优化 PCR 扩增反应参数,包括变性温度和时间、退火延伸温度和时间等。

**琼脂糖凝胶电泳** TAE 电泳缓冲液配置 1% 的琼脂糖凝胶,在 TAE 电泳槽中进行水平电泳,90 V/85 mA 电泳 30 min,通过紫外光检测仪观察电泳结果,并用凝胶成像系统拍照。

**多重 PCR 敏感性实验** pGEMT-WSSV、pGEMT-IHHNV、pGEMT-TSV、pGEMT-YHV 阳性重组质粒 DNA 混合并 10 倍系统稀释,分别取适量模板进行扩增(图 1-A, B),用于确定 IHHNV、WSSV、YHV、TSV 4 种病毒基因片段质粒 DNA 的检测下限,检测多重 PCR 的敏感性。

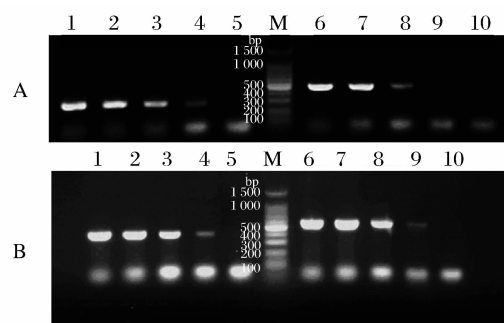


图 1 多重 PCR 的灵敏性检测

A. IHHNV 质粒 DNA (lane 1 ~ 5: 1 ng ~ 0.01 pg), TSV 质粒 DNA (lane 6 ~ 10: 1 ng ~ 0.1 pg) and lane M: 100 bp ladder; B. WSSV 质粒 DNA (lane 1 ~ 5: 20 pg ~ 0.002 pg), YHV 质粒 DNA (lane 6 ~ 10: 2 ng ~ 0.02 pg) and lane M: 100 bp ladder.

Fig. 1 Sensitivity of multiplex RT-PCR for detection of IHHNV, TSV, WSSV and YHV

Ten-fold serial dilution of purified: A. IHHNV plasmid DNA (lane 1 ~ 5: 1 ng ~ 0.01 pg), TSV plasmid DNA (lane 6 ~ 10: 1 ng ~ 0.1 pg) and lane M: 100 bp ladder; B. WSSV plasmid DNA (lane 1 ~ 5: 20 pg ~ 0.002 pg), YHV plasmid DNA (lane 6 ~ 10: 2 ng ~ 0.02 pg) and lane M: 100 bp ladder.

**临床检测实验** 应用建立的多重 PCR 对 49 份来自广东湛江,海南地区若干凡纳滨对虾养殖场的对虾病料进行检测,用常规 PCR 检测进一步验证对比。

## 2 结果

### 2.1 多重 PCR 的建立通过不同反应条件下 PCR 扩增结果的比较

多重 PCR 反应体系的反应程序优化如下:

dNTP 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L, IHHNV、WSSV DNA 样品、TSV 反转录产物 cDNA 样品、YHV 质粒 DNA 作为模板 2  $\mu$ L, IHHNV、YHV、WSSV 和 TSV 上下游引物分别为 0.8  $\mu$ mol/L, 然后用双蒸水补足体积到 25  $\mu$ L, 扩增程序为 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。

### 2.2 常规 PCR 检测结果利用常规 PCR 扩增

分别对疑似感染 IHHNV、WSSV 和 TSV 的对虾样品和 YHV 阳性进行常规核酸提取, 扩增检测, 分别扩增出 301、435、508 和 614 bp, 测序结果和目的片段一致。

### 2.3 多重 PCR 特异性实验结果

利用优化后的多重 PCR 体系, 对 IHHNV、WSSV、TSV 和 YHV 的阳性质粒 DNA, 分别进行单一病毒阳性模板, 以及 2, 3 和 4 种病毒阳性质粒模板随机混合物的扩增实验, 副溶血弧菌基因组 DNA 作为阴性对照, 检测结果如图 2 ~ 图 5。

### 2.4 多重 PCR 敏感性实验结果经敏感性实验测定

该多重 PCR 最低能同时检测到 10 pg, IHHNV、YHV、WSSV 和 TSV 模板的混合物(图 4), 分别能单独检出 IHHNV, WSSV, TSV 和 YHV 的检测下限为 0.1, 0.02, 1 和 0.2 pg。灵敏度比较参见表 3。

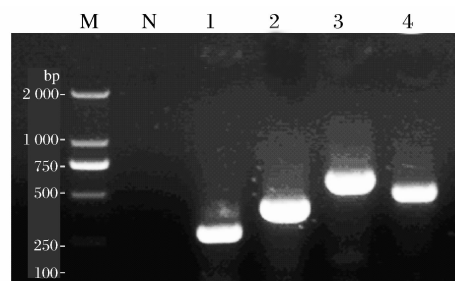


图 2 含 4 种病毒上下游引物的多重 PCR 检测体系检测单一病毒

Lane M. 2 000 bp ladder; lane N. 阴性对照; lane 1. IHHNV; lane 2. WSSV; lane 3. YHV; lane 4. TSV。

Fig. 2 Specificity of multiplex RT-PCR nucleic acids of individual virus were amplified in PCR reaction containing 4 primer sets

Lane M. 2 000 bp ladder; lane N. negative control; lane 1. IHHNV; lane 2. WSSV; lane 3. YHV; lane 4. TSV.

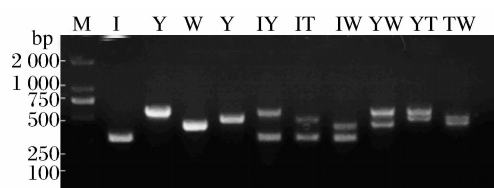


图3 含4种病毒上下游引物的多重PCR检测体系检测 IHHNV(I)及WSSV(W)DNA样本和 TSV(T)及YHV(Y)cDNA样本中2种模板的随机混合物

Lane M. 2 000 bp ladder; lane I. IHHNV; lane Y. YHV; lane W. WSSV; lane T. TSV; lane IY. IHHNV 和 YHV; lane IT. IHHNV 和 TSV; lane IW. IHHNV 和 WSSV; lane YW. YHV 和 WSSV; lane YT. YHV 和 TSV.

Fig.3 Multiplex RT-PCR for detection of two viruses.

The 2 pairs of corresponding DNA samples of IHHNV(I) and WSSV(W) and cDNA of TSV(T) and YHV(Y) were randomly mixed and amplified using four primer sets

Lane M. 2 000 bp ladder; lane I. IHHNV; lane Y. YHV; lane W. WSSV; lane T. TSV; lane IY. IHHNV and YHV; lane IT. IHHNV and TSV; lane IW. IHHNV and WSSV; lane YW. YHV and WSSV; lane YT. YHV and TSV.

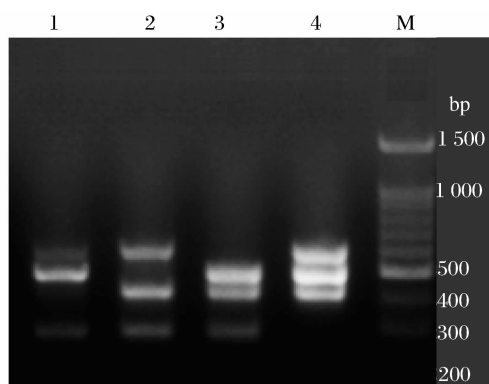


图4 含4种病毒上下游引物的多重PCR检测体系检测 IHHNV(I)及WSSV(W)DNA样本和 TSV(T)及YHV(Y)cDNA样本中含3种不同模板的随机混合物

Lane 1. IHHNV, YHV 和 TSV; lane 2. YHV, TSV 和 IHHNV; lane 3. WSSV, TSV 和 IHHNV; lane 4. YHV, TSV 和 WSSV; lane M. 2 000 bp ladder.

Fig.4 Multiplex RT-PCR for detection of three viruses.

The 3 types of corresponding DNA samples of IHHNV(I) and WSSV(W) and cDNA of TSV(T) and YHV(Y) were randomly mixed and amplified using four primer sets

Lane 1. IHHNV, YHV 和 TSV; lane 2. YHV, TSV 和 IHHNV; lane 3. WSSV, TSV 和 IHHNV; lane 4. YHV, 和 WSSV; lane M. 2 000 bp ladder.

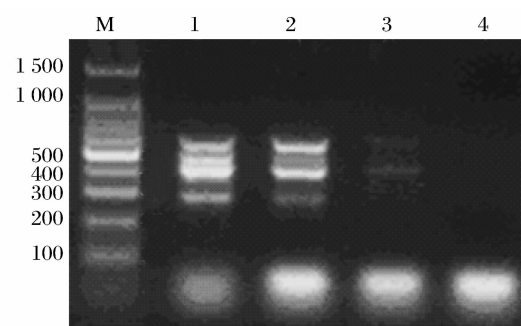


图5 含4种病毒上下游引物的多重PCR检测体系检测 IHHNV(I)及WSSV(W)DNA样本和 TSV(T)及YHV(Y)cDNA 4种模板的混合物

Lane M. 2 000 bp marker; lane 1. IWYT 100 pg 混合液扩增产物; lane 2. IWYT; 10 pg 混合液扩增产物; lane 3. IWYT 1 pg 混合液扩增产物; lane 4. IWYT 0.1 pg 混合液扩增产物.

Fig.5 Multiplex RT-PCR for detection of four viruses.

The DNA samples of IHHNV(I) and WSSV(W) and cDNA of TSV(T) and YHV(Y) were mixed and amplified using four primer sets

Lane M. 2 000 bp marker; lane 1. amplify product of Mixture of IWYT mixed of 100 pg of each virus; lane 2. amplify product of mixture of IWYT mixed of 10 pg of each virus; lane 3. amplify product of mixture of IWYT mixed of 1 pg of each virus, only Y and W left; lane 4. amplify product of mixture of IWYT mixed of 0.1 pg of each virus.

表3 多重PCR虾病毒检测体系和其他已报道的单纯PCR、巢式PCR和多重PCR的灵敏度比较

Tab.3 The sensitivity comparison of the developed multiplex RT-PCR with other single PCR, nested PCR and m RT-PCR

病毒 virus	多重PCR虾病毒检测系统灵敏度(pg) sensitivity of the developed m RT-PCR	其他已报道虾病毒检测系统的灵敏度(pg) sensitivity of the developed m RT-PCR
IHHNV	0.1	0.15(m RT-PCR) <sup>[12]</sup>
TSV	1	0.15(m RT-PCR) <sup>[12]</sup>
WSSV	0.02	0.1(RT-PCR) <sup>[13]</sup> 5(单纯PCR) <sup>[14]</sup> 0.005~0.01(nested PCR) <sup>[14]</sup>
YHV	0.2	0.01(RT-PCR) <sup>[7]</sup>

## 2.5 临床检测实验结果

对49份经过常规PCR方法检测的疑似感染白斑综合征(12份)、对虾传染性表皮与造血组织坏死症病毒(15份)、桃拉综合征(20份)和黄头病(2份)的临床病料进行多重PCR检测,结果有12份检测出WSSV,15份检测出IHHNV,20份检测出TSV,2份检测出YHV,在49份疑似病毒感

染的对虾中,没有检测到 2 种、3 种和 4 种病毒共存的情况。显示本多重 PCR 体系检测野生样本也有很好的特异性。

### 3 讨论

多重 PCR 检测技术已广泛应用于水产生物疾病的研究及病原体检测,它们用于对虾病害病原的检测在国内已有报道,如将多重 PCR 应用于对虾皮下和造血器官坏死杆状病毒的检测<sup>[2-3,15]</sup>。本实验所建立的多重 PCR 检测体系,筛选最佳引物浓度和反应体系,使得操作更加简便,能同时检测 IHNV、YHV、WSSV 和 TSV,节省时间,实验证明具有较高的特异性和敏感性,可用于 IHNV、YHV、WSSV 和 TSV 的早期同时诊断,并对对虾的其它病原检测有一定的参考价值。

在多重 PCR 反应体系中,目的片段的选择至关重要,扩增片段的大小要有一定的差别,以便在凝胶电泳中区分出 4 种病毒各自的扩增条带,同时片段大小不能相差太大,以防止在 PCR 扩增过程中,形成不公平的竞争,使得扩增倾向于单种病毒基因片段进行,影响多重 PCR 检测的效果。引物的设计和 PCR 程序中温度的设置很重要,既要能扩增出 4 种病毒各自的特异的基因片段,又要使引物间不会形成二聚体。本实验所设计的引物分别能扩增 IHNV 的特异基因片段大小为 302 bp,TSV 的基因片段大小为 231 bp,WSSV 的基因片段大小为 451 bp,YHV 的特异基因片段大小 624 bp,能够获得较好的扩增结果。

另外,从本实验的结果可以看出,在同等条件下,扩增反应对 IHNV、YHV、WSSV 的检测最低浓度均小于对 TSV 的检测最低浓度,进一步的实验结果表明,在二者同时扩增的时候,只有在 PCR 体系中加大 TSV 的模板浓度(TSV:WSSV:IHNV:YHV=2:1:1:1)才能取得和 WSSV 相近的扩增结果(条带亮度一致),这与 TSAIET 等<sup>[16]</sup>的实验结果相一致。这样的结果和反应体系中模板之间相互干扰有很大的关系,有关这 4 种病毒阳性模板的干扰性实验,我们将在另文中论述。本文论述的多重 PCR 虾病毒检测体系显示了较高的灵敏性,在与其他的多重 PCR 检测最低检出浓度的比较中,IHNV 和 WSSV 都有很好的灵敏度,和单纯 PCR 或者巢式 PCR 相比,多重 PCR 的灵敏度要差一些,这些问题可望在进一步的研

究如液相芯片的检测体系中得到解决。谢芝勋等<sup>[2]</sup>报道,在多重 PCR 扩增反应中,总是会遵循片段较小的产物优先扩增的原则,但在本研究中显示,优先扩增的不是 TSV 的基因片段,而是较大的 WSSV 的基因片段,其原因有待于进一步研究。IHNV、YHV、WSSV 和 TSV 作为对虾养殖生产中 4 种主要病毒病原,不仅能够单独感染对虾,而且能够混合感染对虾,虽然在本次实验中没有检测到混合感染的情况,但是在广西地区已有相关报道<sup>[3]</sup>,混合感染进一步加大对对虾养殖的威胁,加重了对对虾病害防治的难度,尤其在目前没有治疗药物的情况下,只有建立快速、经济的检测技术,及时对对虾养殖过程的病害进行防治,控制病害的暴发流行,才能最大限度的减少生产中的经济损失,本研究所建立的多重 PCR 技术能够同时有效地快速检测对虾 IHNV、YHV、WSSV 和 TSV 4 种病毒,这对对虾传染性表皮与造血组织坏死症病毒,黄头病毒,白斑综合征和桃拉综合征的有效防控、流行病学调查研究和快速鉴定 4 种病毒提供了有效的技术手段,对其它病原的鉴别诊断也有着一定的参考价值。

### 参考文献:

- [1] DHAR A K, ROUX M M, KLIMPEL K R, *et al.* Detection and quantification of infectious hypodermal and heretopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(8): 2835-2845.
- [2] 谢芝勋, 庞耀珊, 邓显文, 等. 多重 RT-PCR 同时检测鉴别 3 种对虾病毒的研究与应用 [J]. *病毒学报*, 2005, 21(5): 393-396.
- [3] 谢芝勋, 庞耀珊, 邓显文, 等. 二温式多重 PCR 检测鉴别对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 和传染性皮下及造血器官坏死病毒 (IHNV) 的研究和应用 [J]. *海洋科学*, 2005, 29(12): 9-12.
- [4] MANIVANNAN S, OTTA S K, KARUNASAGAR I, *et al.* Multiple viral infection in *Penaeus monodon* shrimp postlarvae in an Indian hatchery [J]. *Dis Aquat Organ*, 2002, 48(3): 79-85.
- [5] MOUILLESSEAU K P, KLIMPEL K R, DHAR A K. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR [J]. *J Virol Methods*, 2003, 111(2): 121-127.

- [ 6 ] WONGTEERASUPAYA C, SRIURAIRATANA S, VICKER J E, *et al.* Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus [ J ]. *Dis Aquat Organ*, 1995, 22(1) :45 – 50.
- [ 7 ] WONGTEERASUPAYA C, TONGCHUEA W, BOONSEANG V, *et al.* Detection of yellow-head virus ( YHV ) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification [ J ]. *Dis Aquat Organ*, 1997, 31 : 181 – 186.
- [ 8 ] ROBLES-SIKISAKA R, GARCIA D K, KLIMPEL K R, *et al.* Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses [ J ]. *Arch Virol*, 2001, 146(5) :941 – 952.
- [ 9 ] WONGTEERASUPAYA C, VICKERS J E, SRIURAIRATANA S, *et al.* 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* [ J ]. *Dis Aquat Organ*, 1995, 21(1) :69 – 77.
- [ 10 ] KANCHANAPHUM P, WONGTEERASUPAYA C, SITIDILOKRATANA N, *et al.* Experimental transmission of white spot syndrome virus ( WSSV ) from crabs to shrimp *Penaeus monodon* [ J ]. *Dis Aquat Organ*, 1998, 34(1) :1 – 7.
- [ 11 ] TANG K F, LIGHTNER D V. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus ( IHNV )-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia [ J ]. *Virus Res*, 2006, 118 ( 1 – 2 ) : 185 – 191.
- [ 12 ] KHAWSAK P, DEESUKON W, CHAIVISUTHANGKURA P, *et al.* Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of six viruses of penaeid shrimp [ J ]. *Mol Cell Probes*, 2008, 22 ( 3 ) : 177 – 183.
- [ 13 ] XIE Z, PANG Y, DENG X, *et al.* A multiplex RT-PCR for simultaneous differentiation of three viral pathogens of penaeid shrimp [ J ]. *Dis Aquat Organ*, 2007, 76(1) :77 – 80.
- [ 14 ] KIATPATHOMCHAI W, BOONSAENG V, TASSANAKAJON A, *et al.* A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon* [ J ]. *Dis Aquat Organ*, 2001, 47 ( 3 ) : 235 – 239.
- [ 15 ] XIA C, LIU J, HUANG J. Detection of hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus of penaeid shrimp by one-tube multi PCR method [ J ]. *Chinese Journal of Virology*, 2006, 16(3) :262 – 264.
- [ 16 ] TSAI J M, SHIAU L J, LEE H H, *et al.* Simultaneous differentiation of white spot syndrome virus ( WSSV ) and taura syndrome virus ( TSV ) by multiple reverse transcription polymerase chain reaction ( RT-PCR ) in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* [ J ]. *Dis Aquat Organ*, 2002, 50 ( 1 ) : 9 – 12.

## A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four viruses of shrimp

WU Ri-qin<sup>1\*</sup>, DAN Xue-ming<sup>2</sup>, LIU Zhong-yong<sup>1</sup>,  
LIN Zhi-xiong<sup>1</sup>, CHEN Fang<sup>1</sup>, LIU Yun-li<sup>2</sup>, ZHANG Yi-yi<sup>2</sup>

(1. *Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510642, China;*  
2. *College of Animal Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*)

**Abstract:** Viral infection is one of the major causes for the huge economic losses in shrimp farming. A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (mRT-PCR) was developed for simultaneous detection of 4 major shrimp viruses including infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), Taura syndrome virus (TSV), white spot syndrome virus (WSSV) and yellow-head virus (YHV) in this research. Four sets of specifically designed oligonucleotide primers were used in the assay and each of them could amplify viral nucleic acids by PCR products with different sizes, such as: 508 bp for TSV, 435 bp for WSSV, 301 bp for IHHNV and 614 bp for YHV. Specificity of multiplex RT-PCR nucleic acids of individual virus amplified in PCR reaction containing 4 primer sets were performed and they were highly specific and no specific bands were amplified from other penaeid shrimp pathogenic bacteria. Multiplex RT-PCR for detection of two, three or four types of different viruses in a single reaction system, the corresponding DNA samples of IHHNV (I) and WSSV (W) and cDNA of TSV (T) and YHV (Y) were randomly mixed and amplified using four primer sets. The sensitivity of the multiplex RT-PCR was 0.1 pg for IHHNV, 1 pg for TSV, 0.02 pg for WSSV and 0.2 pg for YHV. In the field application, 49 samples were examined by multiplex RT-PCR. The results were consistent with those results of the single PCR detection. It indicated that this multi-PCR method is superior in terms of sensitivity, specificity rapidity and simplicity, and is potentially a valuable diagnostic tool for shrimp viral infections.

**Key words:** infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus; Taura syndrome virus; white spot syndrome virus; yellow-head virus; multiple RT-PCR and detection

**Corresponding author:** WU Ri-qin. E-mail: erinner@gmail.com