

## 基因 I 型草鱼呼肠孤病毒 TaqMan Real-Time PCR 检测方法的建立及应用

殷亮<sup>1,2</sup>, 王庆<sup>1</sup>, 曾伟伟<sup>1</sup>, 李永刚<sup>1,2</sup>, 王英英<sup>1</sup>,  
刘春<sup>1</sup>, 梁红茹<sup>1</sup>, 石存斌<sup>1</sup>, 吴淑勤<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部渔药创制重点实验室,  
广东省水产动物免疫技术重点实验室,广东 广州 510380;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

**摘要:** 为了建立和应用可检测基因 I 型草鱼呼肠孤病毒(GCRV)的荧光定量检测方法,实验根据基因 I 型 GCRV 的 S6 保守序列,分别设计扩增目的条带 661 bp 普通引物(P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>)、扩增目的条带 159 bp 荧光定量引物(F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>)和一条探针;同时构建含有目的片段的 PVAX1-S6 作为标准质粒,10 倍梯度稀释构建质粒拷贝数与 C<sub>t</sub> 值的标准曲线( $Y = -3.389X + 38.076$ )。结果表明,此方法在  $3.9 \times 10^7 \sim 3.9 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$  之间相关性较好, $R^2$  为 0.992,最小检测量为 4 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;且与基因 II 型、III 型 GCRV 以及其他病原核酸无交叉反应。运用该方法检测 16 份草鱼出血病疑似样品,阳性结果为 4 份;而普通 PCR 检测仅 2 份显示阳性。本研究建立了针对基因 I 型 GCRV 的荧光定量检测方法,具有高效、特异、灵敏、可重复性强的优点,适合于目前基因 I 型 GCRV 的临床快速检测和病毒定量分析。

**关键词:** 草鱼呼肠孤病毒; 基因 I 型; TaqMan Real-Time PCR; 定量分析

**中图分类号:** S 941.41

**文献标志码:** A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国淡水养殖的四大家鱼之一,因其生长速度快、饲料来源广、养殖成本低等优点,养殖量在淡水养殖中比例较高。2012 年草鱼产量 478.17 万 t,约占全部淡水鱼产量的 20%。但每年草鱼由于各种病害问题,导致减产约 30%,其中由草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 引起的草鱼出血病危害最大<sup>[1]</sup>。GCRV 主要引起草鱼在鱼种阶段暴发出血病,流行范围较广、发病流行季节较长、死亡率可高达 90%<sup>[2-3]</sup>。目前采取疫苗预防是控制草鱼出血病最为有效的方式,但由于病原为基因组分节段的 RNA 病毒,变异较强,免疫失败的情况也时有发生。自 1983 年首次分离并鉴定出草鱼呼肠孤病毒以来,已有 20 余分离株被相继报道<sup>[4-5]</sup>。不同分离株在病毒基因组带型、感染细

胞特性和致病性方面均有一定差异性。曾伟伟等<sup>[6]</sup>根据不同分离株间的带型差异和目前已有基因序列比较,提出 GCRV 分离株至少存在 3 种基因型,并建立了可鉴别诊断 3 种基因型的 RT-PCR 检测方法。RT-PCR 检测是目前运用最为广泛的方法,针对 GCRV 不同片段和不同分离株已经建立了多种 RT-PCR 检测方法,但该方法仅局限于定性检测<sup>[7-9]</sup>。因此建立一种早期快速诊断、高效检测、定量分析和研究病原的方法是当前所需。随着越来越多的 GCRV 完成全基因组和部分片段序列测定,研究发现在所有已分离的 GCRV 中,S6 节段推测编码的外衣壳蛋白是普遍存在的,是病毒重要的结构蛋白,具有相对保守性<sup>[1,10]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup>根据目前已发表的 GCRV 序列分析得出,同一个基因型内结构蛋白的同源性

收稿日期:2013-10-26 修回日期:2014-01-26

资助项目:国家科技支撑计划(2012BAD25B02);国家自然科学基金(31202026);水科院基本科研业务费(2014A06XK09)

通信作者:吴淑勤,E-mail:wushuqin001@21cn.com

较高,序列保守性强。本研究针对基因 I 型 GCRV S6 片段保守区域设计引物,建立 GCRV 的 TaqMan Real-Time PCR 检测方法,并检测了本实验室保存的不同基因型毒株,结果证明该方法可以特异性检测基因 I 型 GCRV 毒株。该方法的建立和应用为 GCRV 的毒株鉴定、定量分析和疫苗研制提供了重要方法和依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病原

GCRV JX0901 (I 型<sup>[6]</sup>)、GCRV 030 (I 型)、GCRV HZ08 (II 型<sup>[6]</sup>)、锦鲤 (*Cyprinus carpio*) 疱疹病毒 (KHV)、云斑尖塘鳢 (*Oxyeleotris marmorata*) 虹彩病毒 (MSGIV)、弹状病毒 (HSBV)、类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*)、柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*) 均由本实验室分离并保存。美洲金体鳊 (*Notemigonus crysoleucas*) 呼肠孤病毒

(GSRV) 由美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 购得, GCRV 104 株 (III 型<sup>[6]</sup>) 由中国水产科学院长江水产研究所曾令兵馈赠。

### 1.2 试剂与仪器

Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Perfect Real Time)、Plasmid Purification Kit Ver. 2.0、Prime Script RT reagent Kit Perfect Real Time 均购自大连宝生物公司; Trizol Reagent 购于 Invitrogen 公司; ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为美国应用生物系统公司产品。

### 1.3 引物的设计与合成

从 GenBank 上搜索基因 I 型 GCRV 不同毒株的 S6 节段序列 (GCRV 873、096 的登录号分别为 AF403392、JN206664), 并结合本实验室 030 和 JX0901 S6 节段序列结果, 根据基因 I 型 GCRV S6 保守序列, 由铂尚生物公司合成一对普通引物、一对荧光定量引物和一条探针。探针 5' 端由 FAM 标记, 3' 端由 BHQ1 标记。引物和探针序列见表 1。

表 1 基因 I 型 GCRV 引物和探针  
Tab. 1 Primer and TaqMan sequences used of GCRV genotype I

引物 primer		序列 (5'-3') sequence	位置 position	预测片段/bp predicted size
普通 PCR 引物 primer for normal PCR	上游 P <sub>1</sub> 下游 P <sub>2</sub>	5'-GACCGATTGTACTCTCCTCTTC-3' 5'-CCCAGTAGGTAAGAGTCTTACG-3'	341 ~ 1 001	661
荧光定量引物 PCR primer for Real Time PCR	上游 F <sub>1</sub> 下游 F <sub>2</sub>	5'-CTCTCTGGCAGAAACACTTAGAC-3' 5'-CCCAGTAGGTAAGAGTCTTACG-3'	500 ~ 658	159
探针 probe		5'-CCGCCATGACCATGTAAACACCTGACAB-3'	524	-

### 1.4 cDNA 和标准质粒制备

运用 Trizol Reagent 说明书的方法提取样品 RNA, Prime Script RT reagent Kit Perfect Real Time 反转录试剂盒获得 cDNA。取 1.5  $\mu$ L 逆转录产物 cDNA, 加入 Mix 12.5  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 浓度的引物 (P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>) 各 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 9  $\mu$ L, 将上述 25  $\mu$ L 反应体系混匀后进行 PCR 扩增。反应参数为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 50 s, 共 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。并设置 ddH<sub>2</sub>O 代 为模板的阴性对照。PCR 反应结束后, 取 5  $\mu$ L PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。以 GCRV JX0901 株 cDNA 作为模板, 采用引物 (P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>) 扩增序列, 胶回收产物克隆到 PMD-18T 载体中, 成功转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 用质粒试剂盒提取质粒, 并做 PCR 验证后用 BamHI 和 PstI 双酶切鉴定, 切胶回收相应片段, 克隆到 PVAX1 载体中,

成功转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 提取质粒酶切及测序鉴定正确后, 质粒用 EASY Dilution 10 倍梯度稀释分别做荧光定量 PCR 和常规 PCR 检测。用紫外分光光度计测定提取质粒纯度, 其浓度按以下公式计算重组质粒拷贝数:

质粒拷贝数 (拷贝/ $\mu$ L) =  $6.02 \times 10^{23}$  (拷贝/mol)  $\times$  质粒浓度 (g/ $\mu$ L) / 质粒分子量 (g/mol)。

### 1.5 标准曲线构建与灵敏度实验

将 PVAX1-S6 重组标准质粒用 EASY Dilution 10 倍梯度稀释为模板进行荧光定量 PCR 反应, 每个梯度设置 3 个平行。在荧光定量 PCR 仪上进行扩增和数据分析, 以灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 代替模板作为阴性对照。20  $\mu$ L 体系: Premix (TaKaRa) Ex Taq<sup>TM</sup> 10  $\mu$ L, ROX Reference Dye II (50  $\times$ ) 0.4  $\mu$ L, PCR Forward Primer 和 PCR Reverse Primer 各 0.4  $\mu$ L (终浓度均为 0.2  $\mu$ mol/L),

TaqMan 探针  $0.8 \mu\text{L}$  (终浓度为  $0.4 \mu\text{mol/L}$ ), cDNA 模板  $2 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $6 \mu\text{L}$ 。采用 2 步法 PCR 扩增程序: 预变性 1 个循环,  $95^\circ\text{C}$  30 s; PCR 反应, 40 个循环,  $95^\circ\text{C}$  5 s,  $60^\circ\text{C}$  34 s。

### 1.6 特异性与重复性实验

分别取 GCRV JX0901、HZ08、104、030 和 GSRV、KHV、MSGIV、HSBV、*P. shigelloides*、*F. cloumnae* 核酸 ( $2 \mu\text{L}$ ) 为模板, 以灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 代替模板作为阴性对照。用建立的 I 型 GCRV TaqMan Real-Time PCR 方法进行特异性检测。取 I 型 GCRV cDNA 在 1 次实验中重复 40 次进行检测, 以灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 代替模板作为阴性对照, 计算其变异系数。

### 1.7 临床样品的检测

对本实验室保存的在 2012 年 4—10 月份广东佛山、清远、河源等地区采集的 16 份草鱼出血病疑似样品, 采用已建立的方法进行检测。比较与普通 PCR 检测的结果, 并运用细胞培养和电镜观察验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因 I 型 GCRV 标准质粒的制备

将基因 I 型 GCRV S6 节段克隆到 PVAX1 中构建 PVAX1-S6 重组质粒, 经过 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切鉴定, 电泳显示得到与预期相符的目的条带 (图 1), 提取质粒经引物 ( $F_1$ 、 $F_2$ ) PCR 扩增, 电泳得到与目的基因大小一致的条带, 说明成功构建了标准重组质粒 (图 2)。

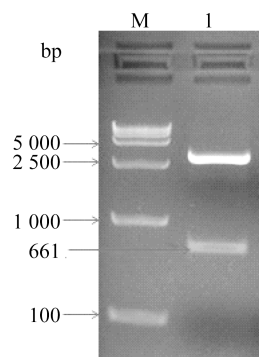


图 1 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切重组质粒 PVAX1-S6 结果

M. 标准 DNA 15 000; 1. 双酶切重组质粒

Fig. 1 Result of double digestion of recombinant plasmid PVAX1-S6 by *Bam*H I and *Pst* I

M. DNA 15 000 bp marker; 1. Double digestion of recombinant plasmid

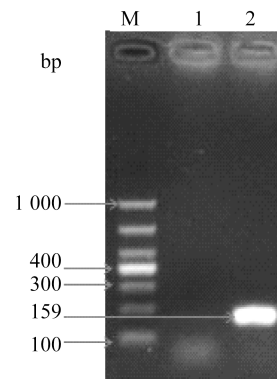


图 2 实时荧光定量特异性引物  $F_1$ 、 $F_2$  PCR

扩增结果

M. 标准 DNA 1000; 1. 阴性对照; 2. 引物  $F_1$ / $F_2$  扩增产物

Fig. 2 Amplification result of Real-Time PCR assay for the specificity of primers  $F_1$  and  $F_2$

M. DNA 1000 bp marker; 1. negative control; 2. PCR product with primers  $F_1$ / $F_2$

### 2.2 标准曲线与灵敏度检测

基因 I 型 GCRV 的标准质粒 10 倍梯度稀释:  $3.9 \times 10^7 \sim 3.9 \times 10^{-2}$  拷贝/ $\mu\text{L}$  进行 TaqMan Real-Time PCR 扩增, 得到 1 条以标准质粒拷贝数对数为 X 轴和  $C_t$  值为 Y 轴的扩增曲线 ( $Y = -3.389X + 38.076$ ) (图 3)。在  $3.9 \times 10^7 \sim 3.9 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$  之间相关性较好,  $R^2$  为 0.992; 扩增效率为 97.267%。重组标准质粒不同稀释度荧光定量 PCR 扩增曲线的最低检测限为  $3.9 \times 10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (图 4), 灵敏度范围广, 可达 8 个数量级。而常规 PCR 仅检测到  $3.9 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  (图 5)。

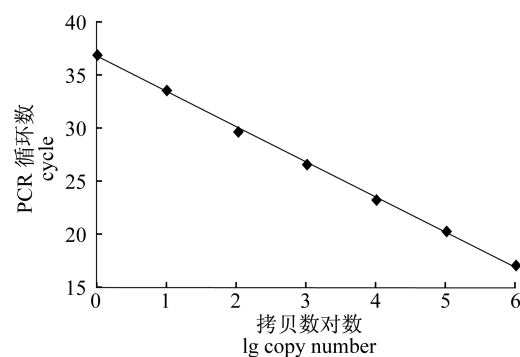


图 3 GCRV 实时荧光定量 PCR 标准曲线图

Fig. 3 Standard curve of Real-Time PCR assay for the detection of GCRV plasmid

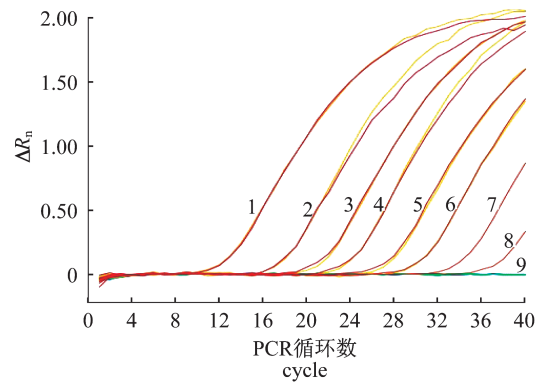


图 4 GCRV 实时荧光定量 PCR 灵敏度检测的扩增曲线图

1~8. 质粒的浓度为  $3.9 \times 10^7 \sim 3.9 \times 10^0$  (拷贝/ $\mu\text{L}$ ); 9. 质粒的浓度为  $3.9 \times 10^{-1} \sim 3.9 \times 10^{-2}$  (拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 和阴性对照

Fig. 4 Amplification plot of Real-Time PCR assay for the detection of GCRV

1~8. concentration of plasmid  $3.9 \times 10^7 \sim 3.9 \times 10^0$  (copies/ $\mu\text{L}$ ); 9. concentration of plasmid  $3.9 \times 10^{-1} \sim 3.9 \times 10^{-2}$  (copies/ $\mu\text{L}$ ) and negative control

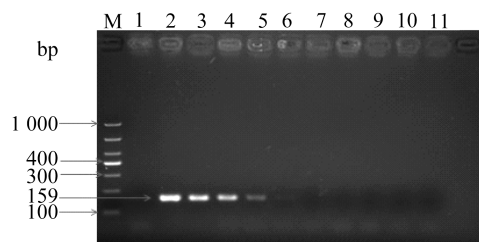


图 5 GCRV 常规 PCR 灵敏度检测的扩增曲线图

泳道 1. 阴性对照; 泳道 2~11 分别为质粒的浓度  $3.9 \times 10^7 \sim 3.9 \times 10^{-2}$  (拷贝/ $\mu\text{L}$ )

Fig. 5 Amplification plot of PCR assay for the detection of GCRV

Lanes 1. negative control; Lanes 2~11. concentration of plasmid  $3.9 \times 10^7 \sim 3.9 \times 10^{-2}$  (copies/ $\mu\text{L}$ )

### 2.3 特异性和重复性检测

利用建立的检测方法对 GCRV JX0901、030、HZ08、104、GSRV、KHV、MSGIV、HSBV、*P. shigelloides*、*F. cloumnare* 进行检测, 图 6 显示除 JX0901、030、GSRV 有扩增曲线外, 其他病毒均无扩增曲线, 说明具有较好的特异性。同一样品在同一次实验 40 次重复的  $C_t$  平均值、重复间的标准差和变异系数分别为 18.80、0.090 和 0.48% (图 7)。说明其具有很好的稳定性和极高的重现性。

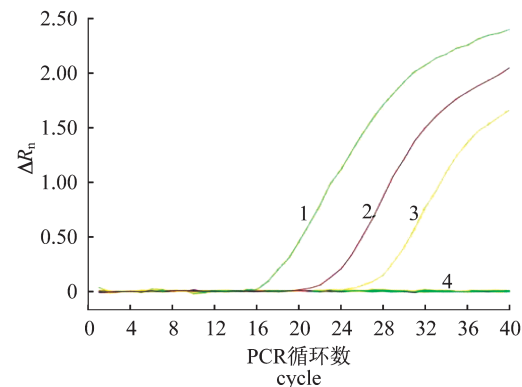


图 6 GCRV 实时荧光定量 PCR 特异性检测的扩增曲线图

1~3. GCRV JX 0901、030 和 GSRV 株; 4. 未产生荧光信号的毒株, 包括 GCRV 104、HZ08 和 MSGIV、HSBV、KHV、*P. shigelloides*、*F. cloumnare* 及阴性对照

Fig. 6 Specificity plot of Real-Time PCR assay for the detection of GCRV

1~3. GCRV JX 0901、030 strain and GSRV; 4. strains with no positive signal including GCRV 104, HZ08, MSGIV, HSBV, KHV, *P. shigelloides*, *F. cloumnare* and negative control

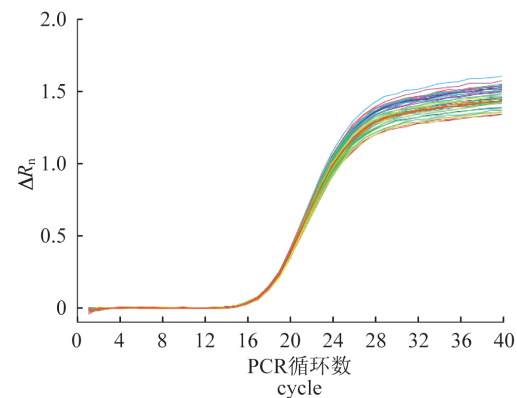


图 7 GCRV 实时荧光定量 PCR 40 次重复性实验的扩增曲线图

Fig. 7 Forty repetitions of Real-Time PCR assay for the detection of GCRV

### 2.4 临床样品的检测结果

采用已建立的检测方法和普通 PCR 法对疑似样品进行检测, 结果显示: 实时荧光定量 PCR 显示阳性样品为 4 份, 而常规 PCR 为 2 份。对常规 PCR 检测为阴性而实时荧光定量 PCR 检测显示阳性的 2 份样品进行细胞分离和电镜观察验证为阳性。

## 3 讨论

GCRV 是水生呼肠孤病毒属毒力最强的毒株

之一,是导致草鱼发病率、死亡率极高的一种传染性疾病的病原<sup>[12-13]</sup>。目前针对草鱼出血病预防和治疗尚未有高效的药物和措施,免疫预防仍然是最有效和最为广大养殖户所接受的方法<sup>[14]</sup>。随着不同分离株陆续被发现和报道,研究表明 GCRV 核酸分为 11 个片段,很容易发生变异和片段重组;从不同地区分离到的毒株有很大的差异,也存在混合感染致病的现象<sup>[15]</sup>,为草鱼出血病的防控和临床检测增加了难度。GCRV 自 1983 年被鉴定以来,针对 GCRV 的检测也建立了很多的方法,如传统的细胞培养、组织切片、电镜观察等经典的检测方法,但这些方法费时费力<sup>[16]</sup>。随着生物技术的快速发展,杨广智等<sup>[17]</sup>葡萄球菌 A 蛋白协同凝集实验法、江育林等<sup>[18]</sup>荧光抗体和酶联免疫吸附试验法、王晓丰等<sup>[19]</sup>实时荧光定量 PCR 检测方法、Zeng 等<sup>[14]</sup>和李玉平等<sup>[20]</sup>草鱼呼肠孤病毒 RT-LAMP 检测方法的建立可以有效地检测病原,但操作繁杂,特别是检测病原的周期较长。Seng 等<sup>[21]</sup>和郝贵杰等<sup>[22]</sup>均根据 S6 节段设计引物分别建立快速检测水生呼肠孤病毒与 GCRV 的 RT-PCR 方法。Zhang 等<sup>[23]</sup>建立了 GCRV 高效、快速的 RT-PCR 检测方法。RT-PCR 检测痕量样品,敏感性高、特异性强,是目前早期诊断和检测的主要技术,但只能进行病原定性分析。临床采集的组织样品的病毒含量偏低,灵敏度低的检测方法很容易在检测时造成漏检或者呈假阴性。

目前越来越多的 GCRV 被分离和报道,国内 GCRV 至少分为 3 个基因型,不同基因型的代表株分别是基因 I 型 873 株、基因 II 型 HZ08 株和基因 III 型 104 株。不同基因型毒株间的基因序列差别较大,但对于同一基因型内编码主要结构蛋白的基因序列同源性较高。为了建立针对基因 I 型 GCRV 的定量检测方法,本研究分析比较了基因 I 型 GCRV,包括 GenBank 中发表序列的 873 株、096 株,本实验室保存的 030 株、0901 株,以及 GSRV 的序列。GSRV 为 Aquareovirus C 型代表株,全基因组序列与基因 I 型 GCRV 代表株 873 同源性在 90% 以上,S6 全长序列同源性 95%,该毒株为本实验室从 ATCC 购得,本实验选择其作为对照。本研究建立的 TaqMan Real-Time PCR 检测方法,扩增曲线在  $3.9 \times 10^7 \sim 3.9 \times 10^0$  (拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 范围内呈“S”型增长,指数增长期扩增曲

线平行,表明此反应体系中不同样品间的扩增效率是相同的。标准质粒在  $3.9 \times 10^7 \sim 3.9 \times 10^1$  (拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 之间的  $C_t$  值与荧光定量 PCR 体系中起始模板量的对数有较好的线性关系 ( $Y = -3.389X + 38.076$ )。

特异性高是 TaqMan Real-Time PCR 技术的重要指标之一,为了验证本研究已建立的 TaqMan Real-Time PCR 检测基因 I 型 GCRV 方法的特异性,选择了 GCRV I 型、II 型、III 型和 GSRV 及其他病原进行检测,结果表明只有 GCRV I 型和 GSRV 有典型的“S”型扩增曲线,而 GCRV II 型、III 型及其他病原与阴性对照均无扩增曲线。实验表明此方法具有较强的特异性。周勇等<sup>[7]</sup>根据 GCRV 104 株编码核衣壳蛋白 VP6 序列和刘宝芹等<sup>[8-9]</sup>根据 GCRV HZ08 和 0901 株 S7 节段序列设计引物分别建立 TaqMan Real-Time PCR 检测方法,最低检测限分别为 10 个、6 个和 10 个拷贝,他们针对特定 GCRV 分离株的特定片段序列建立定量检测方法,检测的 GCRV 具有特异性和针对性。由于不同基因型 GCRV 编码的蛋白存在较大差异,而 GCRV S6 节段推测编码病毒主要外衣壳蛋白在目前已发现的 GCRV 中普遍存在,同一基因型内具有高度的保守性。本研究期望建立和应用可检测基因 I 型 GCRV 的定量检测方法,因此在分析比较了目前基因 I 型 GCRV 已有序列后,选择 S6 节段最为保守的序列设计引物和探针,本检测方法在灵敏度实验中表明最低检测量为 4 个拷贝,稍优于周勇等<sup>[7]</sup>、刘宝芹等<sup>[8-9]</sup>建立的方法,但无显著差异。对 16 份疑似草鱼出血病样品利用建立的基因 I 型 GCRV TaqMan Real-Time PCR 和常规 PCR 方法进行检测,该检测方法的临床应用显示出较好的敏感性与特异性。本方法的建立对基因 I 型 GCRV 的早期诊断和检测、病原的定量分析、草鱼出血病预防等有重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] Zhang C, Wang Q, Shi, C B, *et al.* Molecular analysis of grass carp reovirus HZ08 genome segments 1-3 and 5-6 [J]. *Virus Genes*, 2010, 41 (1): 102-104.
- [2] Kibenge F S B, Godoy M G, Fast M, *et al.* Countermeasures against viral diseases of farmed fish [J]. *Antiviral Research*, 2012, 95(3): 257-281.

- [ 3 ] Zhang C, Wang Q, Shi C B, *et al.* Isolation and identification of a grass carp reovirus isolate GCRV HZ08 [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17( 6 ): 1257 - 1263. [ 张超, 王庆, 石存斌, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离与鉴定. *中国水产科学*, 2010, 17( 6 ): 1257 - 1263. ]
- [ 4 ] Zeng W W, Wang Q, Liu Y K, *et al.* Isolation and identification of new GCRV strain and primary study on its immunogenicity [ J ]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35( 5 ): 790 - 795. [ 曾伟伟, 王庆, 刘永奎, 等. 一株草鱼呼肠孤病毒弱毒株的分离、鉴定及免疫原性初步分析. *水生生物学报*, 2011, 35( 5 ): 790 - 795. ]
- [ 5 ] Liu Y K, Wang Q, Zeng W W, *et al.* Pearl river fisheries research institute of Chinese academy of fishery sciences, Guangzhou, China. Isolation and identification of grass carp reovirus strain JX-0902 [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011( 5 ): 1077 - 1083. [ 刘永奎, 王庆, 曾伟伟, 等. 草鱼呼肠孤病毒 JX-0902 株的分离和鉴定. *中国水产科学*, 2011, 18( 5 ): 1077 - 1083. ]
- [ 6 ] Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* Establishment of multiplex PCR for detection of grass carp reovirus and its application [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013( 2 ): 419 - 426. [ 曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 草鱼呼肠孤病毒三重 PCR 检测方法的建立及其应用. *中国水产科学*, 2013, 20( 2 ): 419 - 426. ]
- [ 7 ] Zhou Y, Zeng L B, Xiang Y D, *et al.* Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the grass carp reovirus [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35( 5 ): 774 - 779. [ 周勇, 曾令兵, 范玉顶, 等. 草鱼呼肠孤病毒 TaqMan real-time PCR 检测方法的建立. *水产学报*, 2011, 35( 5 ): 774 - 779. ]
- [ 8 ] Liu B Q, Zeng W W, Wang Q, *et al.* Development of a fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique for detection of grass carp reovirus HZ08 strain [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19( 2 ): 329 - 335. [ 刘宝芹, 曾伟伟, 王庆, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 FQ-PCR 检测方法的建立及应用. *中国水产科学*, 2012, 19( 2 ): 329 - 335. ]
- [ 9 ] Liu B Q, Zeng W W, Wang Q, *et al.* Development of fluorescent quantitative polymerase chain reaction for detection of grass carp reovirus JX-0901 strain and its application on virus quantitative analysis [ J ]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39( 11 ): 139 - 143. [ 刘宝芹, 曾伟伟, 王庆, 等. 草鱼呼肠孤病毒 JX 0901 株 FQ-PCR 检测方法的建立及其在定量分析中的应用. *广东农业科学*, 2012, 39( 11 ): 139 - 143. ]
- [ 10 ] Ye X, Tian Y Y, Deng G C, *et al.* Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China [ J ]. *Virus Research*, 2012, 163( 1 ): 275 - 283.
- [ 11 ] Wang Q, Zeng W W, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from Grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China [ J ]. *Journal of Virology*, 2012, 86( 22 ): 12466.
- [ 12 ] Rangel A A C, Rockemann D D, Hetrick F M, *et al.* Identification of grass carp hemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus [ J ]. *Journal of General Virology*, 1999, 80( 9 ): 2399 - 2402.
- [ 13 ] Ahne W. Viral infectious of aquatic animals with special reference to Asian aquaculture [ J ]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1994, 4: 375 - 388.
- [ 14 ] Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* A one-step molecular biology method for simple and rapid detection of grass carp *Ctenopharyngodon idella* reovirus ( GCRV ) HZ08 strain [ J ]. *Journal of Fish Biology*, 2013, 82( 5 ): 1545 - 1555.
- [ 15 ] Wang T, Xu D, Lü L Q. Detection of the co infection of different grass carp reovirus strains using dsRNA sequencing technology [ J ]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21( 5 ): 756 - 762. [ 王土, 许丹, 吕利群. 应用 dsRNA 测序技术检测草鱼呼肠孤病毒的混合感染. *上海海洋大学学报*, 2012, 21( 5 ): 756 - 762. ]
- [ 16 ] Yin L, Wang Q, Zeng W W, *et al.* Progress on aquareovirus genome [ J ]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2013, 34( 1 ): 80 - 85. [ 殷亮, 王庆, 曾伟伟, 等. 水生呼肠孤病毒基因组研究进展. *动物医学进展*, 2013, 34( 1 ): 80 - 85. ]
- [ 17 ] Yang G Z, Luo Y Z, Ye X P. Rapid serological diagnosis of grass carp hemorrhagic virus by coagglutination test using antibody-sensitized staphylococci protein A [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 1991, 15( 1 ): 27 - 33. [ 杨广志, 罗毅志, 叶雪平. 葡萄球菌 A 蛋白协同凝集试验快速检测草鱼出血病病毒. *水产学报*, 1991, 15( 1 ): 27 - 33. ]
- [ 18 ] Jiang Y L, Li Z Q. Study on an interferon-link substance produced by virus-infected grass carp cell lines [ J ]. *Chinese Journal of Virology*, 1991, 7( 1 ): 30 - 35. [ 江育林, 李正秋. 病毒感染的草鱼细胞产生类干扰素物质的研究. *病毒学报*, 1991, 7( 1 ): 30 - 35. ]

- [19] Wang X F, Xue H, Ding Z F, *et al.* Development and clinical application of RT-PCR method for grass carp reovirus [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2012, 24(2): 213 - 216. [王晓丰, 薛晖, 丁正峰, 等. 草鱼呼肠孤病毒 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用. 浙江农业学报, 2012, 24(2): 213 - 216.]
- [20] Li Y P, Ren X G, Mao H S, *et al.* Establishment of detection method for grass carp MDRV [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Science and Technology Information*, 2012(1): 50. [李玉平, 任宪刚, 毛洪顺, 等. 草鱼呼肠孤病毒 RT-LAMP 检测方法的建立. 畜牧兽医科技信息, 2012(1): 50.]
- [21] Seng E K, Fang Q, Lam T J, *et al.* Development of a rapid, sensitive and specific diagnostic assay for fish aquareovirus based on RT-PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 118(2): 111 - 122.
- [22] Hao G J, Sheng P C, Lin F, *et al.* Development and application of RT-PCR technique for detecting grass carp Reovirus (GCRV) infection [J]. *The Editorial Board of Jimei University: Natural Science*, 2013(1): 8 - 13. [郝贵杰, 盛鹏程, 林峰, 等. RT-PCR 检测草鱼呼肠孤病毒的方法研究. 集美大学学报: 自然科学版, 2013, 18(1): 8 - 13.]
- [23] Zhang L L, Luo Q, Fang Q, *et al.* An improved RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of grass carp reovirus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 169(1): 28 - 33.

## Establishment and application of a TaqMan Real-Time PCR assay for detection of grass carp reovirus genotype I

YIN Liang<sup>1,2</sup>, WANG Qing<sup>1</sup>, ZENG Weiwei<sup>1</sup>, LI Yonggang<sup>1,2</sup>,  
WANG Yingying<sup>1</sup>, LIU Chun<sup>1</sup>, LIANG Hongru<sup>1</sup>, SHI Cunbin<sup>1</sup>, WU Shuqin<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Key Laboratory of Fishery Drug Development of Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to establish TaqMan Real-Time PCR for detection of GCRV genotype I, the primers were designed according to conservative region of S6 as follows: normal primers designed as P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> with predicted product size of 661 bp, real time primers designed as F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> with predicted product size of 159 bp, and a probe. Standard curve ( $Y = -3.389X + 38.076$ ) was generated between the cycle threshold ( $C_t$ ) and standard plasmid (PVAX1-S6) with 10-fold serial dilutions. The results showed that there was a good linear relationship between  $C_t$  value and template concentration with a detection range from  $3.9 \times 10^7$  to  $3.9 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L, and the correlation coefficient reached 0.992 while the detection limit of this method was 4 copies/ $\mu$ L for plasmid template. This assay had a specific detection of the GCRV genotype I, and had no detection signals to GCRV genotype II, III and other pathogens. 16 suspected grass carp hemorrhage specimens were tested, and 2 more positive samples were detected using this established assay than normal RT-PCR. The developed TaqMan Real-Time PCR detection method for the GCRV genotype I with high efficiency, specificity, sensitivity and repeatability is available for clinical rapid detection and quantitative analysis of the GCRV genotype I.

**Key words:** grass carp reovirus (GCRV); genotype I; TaqMan Real-Time PCR; quantitative analysis

**Corresponding author:** WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com