

基于牡蛎疱疹病毒DNA聚合酶基因的 巢式PCR检测方法的建立及应用

高文辉^{1,2}, 白昌明^{2,3}, 蔡生力¹, 王崇明^{2,3*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为了建立适用于OsHV-1不同变异株的检测方法, 在牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)3个变异株全基因组序列比对的基础上, 筛选到牡蛎疱疹病毒基因组中高度保守的DNA聚合酶(DNA polymerase)基因, 据此设计巢式PCR引物, 优化PCR反应体系和条件, 建立了基于OsHV-1 DNA聚合酶基因的巢式PCR检测方法(P-nPCR检测方法), 利用P-nPCR与C-nPCR检测方法对不同年份和宿主来源的OsHV-1疑似感染样本进行检测。结果显示, P-nPCR检测方法能稳定地检出100拷贝/ μL 的病毒DNA; P-nPCR较C-nPCR检测方法具有更强的特异性和更高的检出率。研究表明, 本研究建立的P-nPCR检测方法适用于OsHV-1不同变异株的检测, 可为该病毒的检测和流行病学调查提供可靠的技术支持。

关键词: 牡蛎; 疱疹病毒; 巢式PCR; 分子变异; 特异性

中图分类号: S 944

文献标志码: A

20世纪90年代以来, 全球多个国家和地区养殖的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)以及我国养殖栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)等双壳贝类在夏季高温季节经常发生大规模死亡^[1-3]。流行病学调查和人工感染实验结果显示, 一种球形疱疹样病毒粒子与上述死亡案例紧密相关。电镜观察发现, 该病毒粒子的直径110~120 nm, 核衣壳直径80~90 nm, 为具囊膜的二十面体结构^[1]。全基因组测序和系统发育分析结果显示, 引起上述病害的疱疹样病毒粒子为同一个病毒种^[4]。在2012年国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Virus, ICTV)发布的病毒分类报告中, 该病毒被正式命名为牡蛎疱疹病毒(Ostreid herpesvirus 1, OsHV-1), 是软体动物疱疹病毒科(Malacoherpesviridae)、牡蛎疱疹病毒属(*Ostreavirus*)下唯一病毒种^[5]。鉴于牡蛎疱疹病毒

在全球范围内对养殖双壳贝类构成的严重威胁, 世界动物卫生组织(OIE)将牡蛎疱疹病毒作为新发病害, 列入2014年发布的OIE《水生动物健康法典》。

对于OsHV-1的检测, 实验室最常用的方法是聚合酶链式反应(PCR)。基于病毒基因组C区建立的PCR检测方法作为OIE推荐的牡蛎疱疹病毒PCR检测方法, 被多个国家和地区广泛采用^[6-7]。然而近年来的研究表明, C区是牡蛎疱疹病毒基因组中序列变异最大的几个基因片段之一^[8]。随着近年来OsHV-1在我国和世界其他国家和地区不断发生的株系分化, 基因组C区碱基组成或排列顺序发生变异的新变异株不断出现^[8-9], 从而导致基于该区核苷酸序列设计的OsHV-1检测引物无法与目标位点结合。Friedman等^[10]报道, 使用C2/C6引物无法检测到感染长牡蛎的部分

收稿日期: 2015-09-01 修回日期: 2015-12-24

资助项目: 国家自然科学基金(31502208); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划(2015ASKJ01)

通信作者: 王崇明, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

OsHV-1病毒株。由于病毒发生变异导致的检测失败案例在其他疱疹病毒上也有报道。Engelsma等^[11]报道, 由于鲤疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3)株系分化严重, 新的变异株不断出现, 导致利用OIE推荐的基于胸苷激酶基因(thymidine kinase, TK)建立的PCR检测方法无法检测到CyHV-3部分变异株; 而这些变异株可以被基于该病毒相对保守的DNA聚合酶基因建立的PCR检测方法成功检测到。

DNA聚合酶作为病毒复制过程中的关键酶, 是疱疹病毒目所有病毒及其他双链DNA病毒共同拥有的一种酶。由于DNA聚合酶在病毒复制过程中的重要作用, 其关键功能结构域(motifs)在选择压力的作用下, 在同一病毒种内高度保守, 因此成为包括鲍疱疹病毒在内的多种疱疹病毒PCR等分子检测方法的首选基因位点^[12-14]。本实验室对目前已完成的OsHV-1的3个变异株DNA聚合酶核苷酸序列进行比对, 发现三者DNA聚合酶核苷酸序列大小均为5637 bp, 核苷酸组成相似度

高达99.8%。通过基因同源性分析, 确定了牡蛎疱疹病毒DNA聚合酶关键功能结构域, 其核苷酸序列完全相同; 以关键功能结构域核苷酸序列为模板, 设计特异性引物, 建立了适用于检测OsHV-1不同变异株的巢式PCR检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

贝类病料 OsHV-1阳性病料样本为2009年8月采集于青岛流清河海区的栉孔扇贝, -40℃冻存。待检测样本为2012—2014年采集于山东、辽宁、福建等地的疑似感染OsHV-1的长牡蛎、栉孔扇贝和魁蚶(*Scapharca broughtonii*)等双壳贝类样本(表1)。

主要试剂 海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; Premix Ex Taq、dNTPs(10 mmol/L)、pMD18-T购自TaKaRa生物工程有限公司(大连); GeneFinderTM购自厦门百维信生物技术有限公司; 质粒小提

表 1 P-nPCR与C-nPCR 2种巢式PCR检测结果

Tab. 1 Detection results of P-nPCR and C-nPCR

采样时间 sampling time	采样地点 sampling site	宿主物种 host species	样本数/个 no. of samples	阳性数/个 no. of positive samples		阳性率/% prevalence	
				P-nPCR	C-nPCR	P-nPCR	C-nPCR
2013年	山东青岛 Qingdao	栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>	60	15	10	25.0	16.7
	山东长岛 Changdao	虾夷扇贝 <i>Patinopecten yessoensis</i>	10	2	0	10.0	0
	山东即墨 Jimo	长牡蛎 <i>C. gigas</i>	10	5	2	50.0	20.0
	山东日照 Rizhao	魁蚶 <i>S. broughtonii</i>	20	20	15	100.0	75.0
	辽宁大连 Dalian	虾夷扇贝 <i>P. yessoensis</i>	20	7	5	35.0	25.0
	福建厦门 Xiamen	福建牡蛎 <i>C. gigas angulata</i>	10	6	1	60.0	10.0
	广东湛江 Zhanjiang	方斑东风螺 <i>Babylonia areolata</i>	10	3	3	30.0	30.0
	广州市市场 Guangzhou	菲律宾蛤仔 <i>Venerupis philippinarum</i>	10	3	1	30.0	10.0
2014年	山东青岛 Qingdao	栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>	20	8	10	40.0	50.0
	山东潍坊 Weifang	四角蛤蜊 <i>Macra veneriformis</i>	20	10	10	50.0	50.0
	山东长岛 Changdao	魁蚶 <i>S. broughtonii</i>	20	9	4	45.0	20.0
	山东长岛 Changdao	虾夷扇贝 <i>P. yessoensis</i>	20	7	7	35.0	35.0
	广西大风江 Dafengjiang	香港牡蛎 <i>C. hongkongensis</i>	20	10	14	50.0	70.0
2015年	山东荣成 Rongcheng	魁蚶 <i>S. broughtonii</i>	34	18	3	52.9	8.8
	山东日照 Rizhao	魁蚶 <i>S. broughtonii</i>	17	17	17	100.0	100.0
	山东长岛 Changdao	魁蚶 <i>S. broughtonii</i>	11	10	5	90.9	45.5

试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

主要仪器 微量紫外分光光度计NanoDrop(赛默飞世尔科技有限公司); PCR仪(美国应用生物系统公司); 电泳仪(北京六一仪器厂DYY-16B型); Fuji Film(LAS3000)凝胶成像系统。

1.2 引物设计

以牡蛎疱疹病毒DNA聚合酶基因关键结构域核苷酸序列为模板, 利用Primer Premier 5.0引物设计软件, 设计OsHV-1特异性巢式PCR引物。引物序列: 外引物上游序列, Pol-F: 5'-GATTTCAACTCGCAATACC-3', 外引物下游序列, Pol-R: 5'-GGCAGACACAGATTCCACA-3', 扩增片段大小为573 bp; 内引物上游序列, nPol-F: 5'-GTGTTTCTACATTGCTGG-3', 内引物下游序列nPol-R: 5'-CTGTTGGCGTTGACCTTC-3', 扩增片段大小为386 bp。引物由上海桑尼生物工程有限公司合成。

1.3 组织DNA的提取及病毒质粒DNA的制备

取实验室保存OsHV-1呈阳性的栉孔扇贝濒死个体外套膜组织, 利用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA。利用合成的外引物(Pol-F/Pol-R), 采用引物设计软件推荐的退火温度, 对提取的基因组DNA进行PCR扩增。将扩增PCR产物的目的片段用DNA连接转化试剂盒回收并导入T5载体, 再将重组后的载体导入感受态大肠杆菌中培养增殖。使用质粒小提试剂盒从扩大培养的大肠杆菌中提取质粒, 测量所提质粒DNA的浓度为640 ng/ μ L, 换算成病毒拷贝数浓度约为 1.0×10^{11} 拷贝/ μ L, 将质粒用TE缓冲液以10倍浓度梯度分别稀释为 $10^{10} \sim 10^0$ 拷贝/ μ L备用。

1.4 P-nPCR扩增程序与反应条件的优化

P-nPCR第一步反应扩增程序及反应体系的优化 采用50 μ L反应体系, 以提取的OsHV-1阳性的栉孔扇贝基因组DNA 2 μ L作为阳性模板, Ex Taq DNA聚合酶(5 U/ μ L)0.4 μ L, 10 \times PCR buffer 5.0 μ L, dNTPs(0.25 mmol/L)4 μ L, Mg²⁺(2.5 mmol/L)4.0 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各2 μ L, 其余加超纯水补齐体系; 扩增程序为94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 退火温度设置梯度分别为49、51、53、55、57和59 $^{\circ}$ C各30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10

min。将扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检验结果, 选取最适退火温度。按照优化好的退火温度依次对反应体系中的dNTPs浓度(0.05、0.1、0.15、0.20、0.25和0.30 mmol/L)和Mg²⁺浓度(0.1、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L)进行优化。

P-nPCR第二步反应扩增程序及反应体系的优化 采用50 μ L反应体系, 以第一步反应产物10倍稀释液2 μ L作为阳性模板, 反应体系同P-nPCR第一步反应; 扩增程序为94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 退火温度设置梯度分别为47、49、51、53、55和57 $^{\circ}$ C各30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 25个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。将扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检验结果, 选取最适退火温度。按照优化好的退火温度依次对反应体系中的dNTPs浓度(0.05、0.1、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L)和Mg²⁺浓度(0.1、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L)进行优化。

1.5 P-nPCR灵敏度实验

用优化好的反应条件, 以浓度为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 和 10^1 拷贝/ μ L病毒质粒DNA为模板, 超纯水为阴性对照, 各浓度病毒质粒分别做10组平行, 进行巢式PCR扩增反应, 以检测P-nPCR方法的灵敏度。

1.6 P-nPCR特异性实验

以实验室保存的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、虾肝肠胞虫(enterocytozoon hepatopenaei, EHP)、白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)和派琴虫(*Perkinsus* sp.)核酸为模板, 以OsHV-1呈阳性的栉孔扇贝核酸为阳性对照, OsHV-1呈阴性的栉孔扇贝核酸作为阴性对照。采用优化好的巢式PCR反应程序和体系进行扩增反应, 检验该检测方法的特异性。

1.7 两种巢式PCR检测方法对牡蛎疱疹病毒检测结果的比较

将待检样品分别采用基于牡蛎疱疹病毒DNA聚合酶开发的巢式PCR检测方法(以下称P-nPCR)和目前研究中常用的基于病毒基因组C区设计的巢式PCR检测方法(以下称C-nPCR)进行检测。C-nPCR检测方法所使用的反应体系与P-nPCR相同, C-nPCR第一轮反应程序为94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 52.5 $^{\circ}$ C退火30 s,

72 °C延伸45 s, 35个循环; 72 °C延伸5 min; 第二轮为94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 50 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 25个循环; 72 °C延伸5 min。

2 结果

2.1 P-nPCR反应体系及扩增程序的优化

经多次实验, P-nPCR第一步反应退火温度为53 °C时(图1-a), 电泳显示的目的条带最为清晰明亮, 综合条带亮度和避免非特异性扩增原则, 第一步反应的最适退火温度为53 °C; 最适Mg²⁺浓度为2.0 mmol/L, 最适dNTPs浓度为0.2 mmol/L。第二步反应的最适退火温度为51 °C(图1-b), 最适dNTPs浓度为0.15 mmol/L, 最适Mg²⁺浓度为1.5 mmol/L。

2.2 P-nPCR灵敏度的测定

P-nPCR第一步反应中质粒模板浓度最低为10⁴ 拷贝/μL时, 仍然有可见条带(图2-a), 第二步反应中质粒模板浓度最低为10 拷贝/μL时, 电泳条带清晰可见(图2-b)。将浓度为10 拷贝/μL的质粒模板做10个平行实验时, 其中7个能成功扩增出目的条带。而将浓度为10²拷贝/μL及更大浓度的质粒模板做10个平行实验时, 10个均能成功扩增。根据检测灵敏度规定的10个平行标准品检测中有至少9个呈阳性的最小基因拷贝数的标准^[15], 得出P-nPCR检测法的灵敏度为10²拷贝/μL。

2.3 P-nPCR特异性的测定

经外引物的扩增, 只有被OsHV-1感染的栉孔扇贝基因组DNA可以扩增出目的条带, 其余

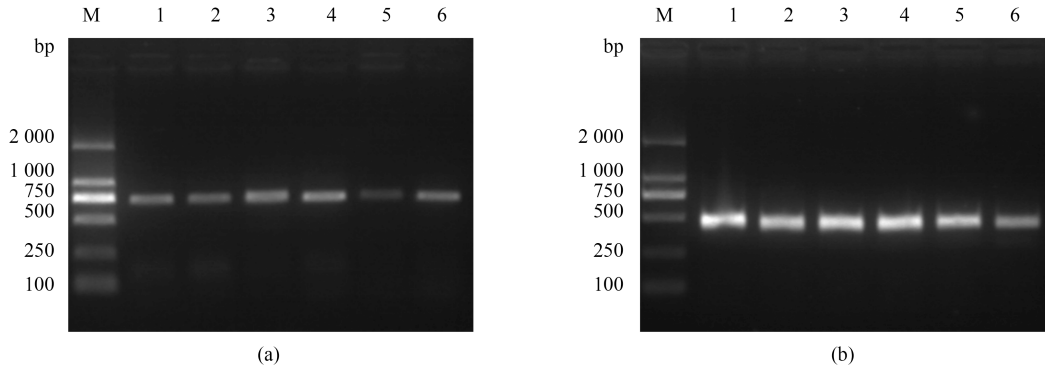


图 1 P-nPCR反应退火温度的优化

M. DL 2000™ DNA Marker; (a) 第一步扩增结果, 1~6泳道分别为49、51、53、55、57和59 °C; (b) 第二步扩增结果, 1~6泳道分别为47、49、51、53、55和57 °C

Fig. 1 Optimization of the annealing temperature of the nested PCR

M. DL 2000™ DNA Marker; (a) results of the 1st round amplification, lanes 1-6 are 49, 51, 53, 55, 57 and 59 °C respectively; (b) results of the 2nd round amplification, lanes 1-6 are 47, 49, 51, 53, 55 and 57 °C respectively

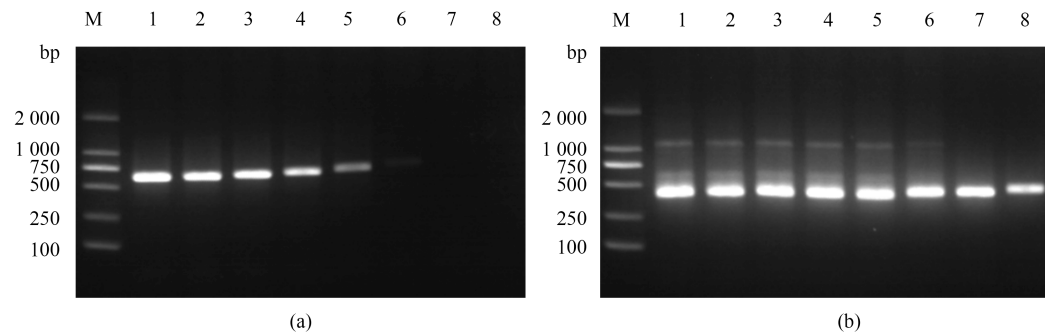


图 2 P-nPCR反应灵敏度的测定

M. DL 2000™ DNA Marker; (a) 第一步扩增结果, 1~8泳道分别为10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²和10¹ 拷贝/μL; (b) 第二步扩增结果, 1~8泳道分别为对应第一步反应的产物

Fig. 2 Detection of the reaction sensitivity of the nested PCR

M. DL 2000™ DNA Marker; (a) results of the 1st round amplification, lanes 1-8 are 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² and 10¹ copies/μL; (b) results of the 2nd round amplification, different production amplified with 8 production in the lanes 1 to 8

核酸样品均不能扩增出特异性条带(图3-a)。经第二轮扩增后,结果与第一轮扩增一致(图3-b),因此可以证明该巢式PCR检测方法具有高度特异性。

2.4 P-nPCR与C-nPCR检测结果比较

分别采用P-nPCR和C-nPCR 2种巢式PCR法对2013—2015年间,采集自我国5个不同省份,共计16个批次的扇贝、魁蚶、牡蛎、蛤仔等312份样品进行了检测(表1)。结果显示, P-nPCR法得到的OsHV-1感染率(150/312=48.1%)显著高于C-nPCR法得到的感染率(107/312=34.2%) ($X^2=4.78, df=1, P=0.029$)。16个不同批次的样本中,有10个批次使用P-nPCR法检测到的OsHV-1 DNA携带率高于C-nPCR法,有2个批次使用P-nPCR法检测到的携带率低于C-nPCR法,另外4个批次2种检测方法得到的携带率相等。

P-nPCR检测呈阳性的150个样本中,有72个

C-nPCR检测呈阴性; C-nPCR检测呈阳性的107个样本中有29个P-nPCR检测呈阴性(表2)。

3 讨论

在病毒大量且快速增殖的过程中,病毒的基因组会不断发生自主突变;如果相关突变发生在基因组的非关键功能基因上,这些突变对病毒是非致死性的,因此就有机会稳定地遗传给后代^[16]。若病毒的分子检测方法所选的分子标记位点是容易发生非致死性的突变位点,就会导致检测出现假阴性,给病毒的检测、监控及预防工作增加了难度。但在病毒关键功能基因上发生的突变对于病毒来说是致死性的,不会遗传给后代和固化到新的变异株中。之前的研究表明, DNA聚合酶和末端酶(terminase)ATPase亚基在疱疹病毒复制和组装过程中起关键作用,一旦出现变异,将会导致病毒无法继续生存,在疱疹病毒的进化过程

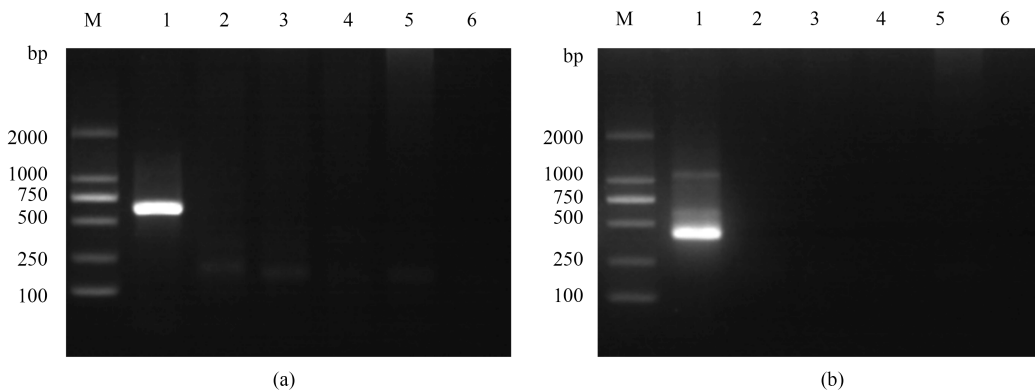


图3 P-nPCR反应特异性检测

M. DL 2000™ DNA Marker; (a)巢式PCR第一步扩增结果, 1. 牡蛎疱疹病毒; 2. 副溶血弧菌; 3. 对虾肝肠胞虫; 4. 白斑综合征; 5. 派琴虫; 6. 阴性对照; (b)巢式PCR第二步扩增结果, 1~6泳道分别为对应第一步反应的产物

Fig. 3 Detection of the reaction specificity of the nested PCR

M. DL 2000™ DNA marker; (a) results of the 1st round amplification, 1. OsHV-1; 2. *V. parahaemolyticus*; 3. EHP; 4. WSSV; 5. *Perkinsus* sp.; 6. negative control; (b) results of the 2nd round amplification, different production amplified with 6 production in the lanes 1 to 6

表2 P-nPCR与C-nPCR 2种巢式PCR检测法检测结果比较

Tab. 2 Comparison of detection results of P-nPCR and C-nPCR

C-nPCR检测结果 detection results of C-nPCR		P-nPCR检测结果 detection results of P-nPCR	
		阳性 positive	阴性 negative
阳性 positive		78	29
阴性 negative		72	133

中非常保守,因此这2个位点是疱疹病毒分类和系统发育关系分析中最常用的2个位点^[17]。DNA聚合酶基因中部分氨基酸序列组成的结构域与该酶的金属离子结合及DNA识别功能密切相关,是DNA聚合酶的关键功能结构域,编码这些结构域的核苷酸序列具有更强的保守性,且具有种特异性,被选作多种疱疹病毒检测的分子位点^[12-14]。

基于牡蛎疱疹病毒C区建立的PCR检测方法最早报道于2001年,在Davison等^[18]获取该病毒全基因组序列之前。C区核苷酸序列的获得是通过

对病毒基因组进行酶切后,从构建的质粒文库中随机获取的,因此其保守性未经过验证。随后的分子流行病学研究及监测数据表明,C区是目前研究较多的OsHV-1基因组3个分子标记位点中变异最快的区域,不适合选作OsHV-1检测的靶序列位点^[8-9]。

OsHV-1作为疱疹病毒目下的一个病毒种,其DNA聚合酶与其他疱疹病毒及部分大分子双链DNA病毒具有较高的同源性^[17]。通过对目前已知的3株全基因组序列中的牡蛎疱疹病毒DNA聚合酶基因进行比对,发现三者的序列完全一致^[4,18-19]。该病毒的DNA聚合酶基因大小为5637 bp,不存在较大的碱基重复区域以及碱基排列不规则等情况,适合作为用来检测引物设计的靶基因序列。本研究基于编码OsHV-1 DNA聚合酶基因关键功能结构域的核苷酸序列,设计巢式PCR引物,优化PCR反应体系和条件,使该PCR检测方法的灵敏度达到 10^3 拷贝/ μL ,且不与贝类和其他海水养殖动物常见病原发生交叉反应,建立了该病毒的巢式PCR检测方法。应用P-nPCR检测方法对多种宿主的基因组DNA进行PCR扩增,选取其中76个阳性样本的PCR产物进行测序,结果显示这些序列相似度达99.9%以上,高度保守。因此选取编码DNA聚合酶关键功能结构域的核苷酸序列作为牡蛎疱疹病毒不同变异株检测的分子位点是合适且可靠的。

150个P-nPCR检测呈阳性的样本中,有72个样本使用C-nPCR检测呈阴性;上述72个样本中,2013年采集自日照的魁蚶为发生大规模死亡期间采集的样本,经实时定量PCR检测,均携带较高载量的OsHV-1 DNA($10^3\sim 10^5$ 拷贝/mg组织)。然而这批样本中有5个样本经C-nPCR检测呈阴性,推测检测失败是由于感染这些样本的C2/C6引物结合区发生变异导致的。本研究尝试在C2/C6区的侧翼序列设计其他引物进行PCR扩增和测序,以便对上述推断进行验证,但均未能扩增出条带。推测不能扩增出条带的原因是该区域容易发生大片段的缺失和序列变异,Arzul等^[20]也发现C区不仅存在容易发生变异的微卫星位点,在部分变异株中还最高为2.8 kb的片段缺失。其他67个C-nPCR检测失败的样本来源于未发病的个体,推测检测失败的原因可能有3个:①P-nPCR法比C-nPCR法具有更高的检测灵敏度;②部分样本的C2/C6引物结合区发

生变异;③部分样本OsHV-1 DNA携带量太低,导致PCR扩增结果的偶然性较大,重复性较差。同时结果还显示,C-nPCR检测呈阳性的107个样本中,有29个样本使用P-nPCR检测呈阴性。出现这一结果是由于这些样本中OsHV-1 DNA的携带量比较低,导致使用两种不同巢式PCR方法进行检测时,得到的结果不一致。

根据牡蛎疱疹病毒DNA聚合酶基因高度保守的特点,本研究基于该位点设计引物,建立了适用于牡蛎疱疹病毒不同变异株的巢式PCR检测方法,为牡蛎疱疹病毒的检测、流行病学的监测及其株系分化研究提供技术支撑。由于PCR扩增技术自身特点的限制,本研究所建立的方法在检测病毒载量低(<100 拷贝/ μL)的样本时,存在重复性较差的缺点。因此,建议在对感染量较低的样本进行检测时,可根据项目需要对每个样本设置2~3个重复,根据具体结果对相关样本的感染情况进行综合判断。

参考文献:

- [1] Nicolas J L, Comps M, Cochenec N. Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas* [J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 1992, 12(1): 11-13.
- [2] Solomieu V B, Renault T, Travers M A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2015, 1312-10.
- [3] 王崇明, 王秀华, 宋晓玲, 等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 180-184.
Wang C M, Wang X H, Song X L, et al. Purification and ultrastructure of a spherical virus in cultured scallop *Chlamys farreri* [J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(2): 180-184 (in Chinese).
- [4] Ren W C, Chen H X, Renault T, et al. Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri* [J]. Virology Journal, 2013, 10(1): 110.
- [5] King A M Q, Adams M J, Carstens E B, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012.

- [6] Renault T, Arzul I. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2001, 24(3): 161–167.
- [7] 李晨, 王崇明, 曲朋, 等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒巢式PCR检测方法的建立[J]. *水产学报*, 2013, 37(2): 281–287.
- Li C, Wang C M, Qu P, *et al.* Establishment of a nested PCR for rapid detection of *Chlamys farreri* acute viral necrosis virus [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(2): 281–287 (in Chinese).
- [8] Renault T, Moreau P, Faury N, *et al.* Analysis of clinical *Ostreid herpesvirus 1* (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(10): 5942–5947.
- [9] Bai C M, Wang C M, Xia J Y, *et al.* Emerging and endemic types of *Ostreid herpesvirus 1* were detected in bivalves in China [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 124: 98–106.
- [10] Friedman C S, Estes R M, Stokes N A, *et al.* Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 63(1): 33–41.
- [11] Engelsma M Y, Way K, Dodge M J, *et al.* Detection of novel strains of cyprinid herpesvirus closely related to koi herpesvirus [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 107(2): 113–120.
- [12] Chen M H, Kuo S T, Renault T, *et al.* Development of a polymerase chain reaction for the detection of abalone herpesvirus infection based on the DNA polymerase gene [J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 185(1): 1–6.
- [13] Rijsewijk F, Pritz V S, Kerkhoff S, *et al.* Development of a polymerase chain reaction for the detection of *Anguillid herpesvirus* DNA in eels based on the herpesvirus DNA polymerase gene [J]. *Journal of Virological Methods*, 2005, 124(1–2): 87–94.
- [14] Sun Y J, Chan R K W, Tan S H, *et al.* Detection and genotyping of human herpes simplex viruses in cutaneous lesions of erythema multiforme by nested PCR [J]. *Journal of Medical Virology*, 2003, 71(3): 423–428.
- [15] Martenot C, Oden E, Travaillé E, *et al.* Comparison of two real-time PCR methods for detection of *Ostreid herpesvirus 1* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 170(1–2): 86–89.
- [16] Holland J, Domingo E. Origin and evolution of viruses [J]. *Virus Genes*, 1998, 16(1): 13–21.
- [17] Heringa J, Argos P. Evolution of viruses as recorded by their polymerase sequences [J]. 1994, 87–103.
- [18] Xia J Y, Bai C M, Wang C M, *et al.* Complete genome sequence of *Ostreid herpesvirus-1* associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks [J]. *Virology Journal*, 2015, 12(1): 759.
- [19] Davison A J, Trus B L, Cheng N Q, *et al.* A novel class of herpesvirus with bivalve hosts [J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(1): 41–53.
- [20] Arzul I, Renault T, Lipart C, *et al.* Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves [J]. *Journal of General Virology*, 2001, 82(4): 865–870.

The development and application of nested PCR detection method for Ostreid herpesvirus-1 based on DNA polymerase gene

GAO Wenhui^{1,2}, BAI Changming^{2,3}, CAI Shengli¹, WANG Chongming^{2,3*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to establish a detection method suitable for different strains of OsHV-1, the primers were designed based on the nucleic acid sequence of the conserved DNA polymerase of OsHV-1. A nested PCR detection method (P-nPCR) was established by optimization of the annealing temperatures of the primers and protocols of PCR. Then, both P-nPCR and C-nPCR were employed to test the infection status of the samples collected from different years and hosts. Our results indicated that the detection limits of the P-nPCR detection method was about 100 copies/ μ L of recombinant plasmid containing OsHV-1 genes. P-nPCR was more specific than C-nPCR in the detection of different variants of OsHV-1, and resulted in a higher prevalence of OsHV-1 for the same samples. In conclusion, a P-nPCR detection method was developed to detect different variants of OsHV-1 infection. The high specificity of P-nPCR to OsHV-1 ensured that different variants of OsHV-1 could be detected as early as possible, which will provide reliable technical support for the detection and epidemiology studies of OsHV-1.

Key words: oysters; herpes virus; Nested PCR; molecular differentiation; specificity

Corresponding author: WANG Chongming. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31502208); China Agriculture Research System (CARS-48); Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ01)