

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00329

## 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 FQ-PCR 检测方法的建立及应用

刘宝芹<sup>1,2</sup>, 曾伟伟<sup>1</sup>, 王庆<sup>1</sup>, 张乐生<sup>1</sup>, 王英英<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, 广东 广州 510380;
2. 大连海洋大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023

**摘要:** 草鱼出血病是危害中国淡水养殖最为重要的病害之一, 其病原为草鱼呼肠孤病毒(grass carp hemorrhage virus, GCRV), 其中, HZ08 株是当前引起草鱼出血病的主要流行毒株。为建立一种快速、灵敏、特异的草鱼呼肠孤病毒主要流行株检测方法, 本研究利用草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 S7 基因保守区, 设计了一对能特异性扩增 154 bp 片段的引物和 TaqMan 探针, 用含有 S7 基因全长的重组质粒 PAVX1-S7 作为标准品, 构建质粒拷贝数与  $C_T$  值的标准曲线, 并对该方法的特异性、可重复性、敏感度进行评价。结果显示: 标准曲线在  $6.0 \times 10^{10} \sim 6.0$  拷贝数之间有很好的线性关系( $r=0.999$ ); 实时荧光定量 PCR 最少可检测到 6 个阳性质粒, 有较高的敏感性; 试验内及试验间变异系数分别为 0.82% 与 0.41%~0.52%, 重复性强; 对水生动物其他病毒均无扩增反应, 具有很好的特异性。应用该方法对采集的 32 份草鱼出血病样品进行检测, 其中 28 份为阳性, 而以常规 RT-PCR 检测同样的样品, 仅 23 份为阳性。本研究建立的草鱼呼肠孤病毒流行株实时荧光定量 PCR 检测方法在特异性、灵敏度、重复性方面具有较好的测试结果, 在 GCRV 的快速检测和病毒初步定量中应用前景乐观。

**关键词:** 草鱼呼肠孤病毒; HZ08 株; FQ-PCR; 检测方法

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)02-0329-07

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是一种草食性鱼类, 饲养成本低, 养殖地域广, 是中国淡水养鱼的主要种类, 其产量占淡水养殖总产量的 20%以上<sup>[1-2]</sup>。但草鱼病毒性出血病的频频发生大大降低了其成活率, 对全国主要养鱼地区的草鱼养殖造成重大威胁。据不完全统计, 每年由于草鱼出血病导致的经济损失达 21.26 亿元<sup>[1]</sup>, 该病已被中国农业部列入二类动物疫病病种名录。由于草鱼呼肠孤病毒为分节段的双链 RNA (dsRNA) 病毒, 各节段之间的基因较易发生替换和重组, 从而产生新的毒株<sup>[3-5]</sup>, 使草鱼出血病的防治和检测变得更为复杂和困难。

建立快速、准确的检测方法及病原的定量检测技术, 是对该病原进行流行病学调查、基础研

究及疫苗等防控产品开发的基础和关键。目前建立的草鱼出血病诊断与呼肠孤病毒检测方法多为针对 873 株的免疫学检测方法和 RT-PCR 检测方法<sup>[5-8]</sup>, 周勇等<sup>[9]</sup>根据 GCRV-104 株建立的草鱼呼肠孤病毒 TaqMan real-time PCR 检测方法, 有较高的灵敏度高和较强的特异性, 并可进行定量分析。但是, 由于该病毒至今仍无血清型和基因型分类, 各毒株间基因组也存在较大的差异<sup>[3-4,10-16]</sup>。目前已经报道了 20 多个分离株<sup>[3-4,10-16]</sup>, 其中多数在基因组序列上与 873 株和 104 株存在较大差异。因此, 现有草鱼出血病检测方法有一定的局限性, 无法对目前主要流行的草鱼呼肠孤病毒进行检测和监测。

GCRV HZ08 株是中国水产科学研究院珠江

收稿日期: 2011-09-02; 修订日期: 2011-10-14.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(200803013).

作者简介: 刘宝芹(1987-), 女, 硕士, 从事水产养殖病害研究. E-mail: 596517590@qq.com

通信作者: 吴淑勤, 研究员, 博士生导师. E-mail: wushuqin001@21cn.com

水产研究所鱼病室 2008 年从浙江湖州患出血病草鱼体内分离到的一个新毒株, 已完成该毒株的全基因组序列分析和部分分子生物特性研究<sup>[4, 17-18]</sup>。根据我们前期的流行病学研究和分析表明, 目前导致草鱼出血病流行的草鱼呼肠孤病毒, 多数和 HZ08 株相似, 即 GCRV HZ08 株是目前草鱼呼肠孤病毒的主要流行株代表。本研究根据草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 S7 基因保守序列设计特异性引物和 TaqMan 探针, 建立了实时荧光定量 PCR 检测方法, 并可对病毒进行初步定量, 旨在为 GCRV 的快速检测提供一种新手段, 并为该病毒致病机理研究、抗病毒药物筛选及病毒含量的确定奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与病毒

草鱼肾细胞系(CIK)、鲤鱼上皮细胞系(EPC)购自武汉大学细胞典藏中心, 鳊鱼脑细胞系(SCC)由本实验室建立并保存; 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株(GCRV HZ08)、黄腹水病毒(YTAV)草鱼呼肠孤病毒 JX09-01(GCRVJX09-01 株)、传染性造血器官坏死病病毒 (IHNV)、传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)均由本实验室分离并保存, 蛙虹彩病毒(FV3)、GSRV (golden shiner 呼肠孤病毒)购自 ATCC, 经细胞培养后, 提取 RNA 或 DNA。

### 1.2 主要试剂和仪器

Premix Ex TaqTM(Perfect Real Time); Mini-BEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0; PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time, 均购自大连宝生物公司; E.Z.N.A.TM Total RNA Kit II 购自 Omega 公司; ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国应用系统公司 ABI); WH-810 型漩涡混合器(太仓市科教器材厂); I-14 型离心机(德国 Sigma 公司)。

### 1.3 cDNA 模板的制备

取 YTAV、IHNV、ISKNV、FV3、KHV、GSRV、JX09-01 及 GCRV-HZ08 病毒 1 $\mu$ g 和 32 种疑似病样的组织匀浆液 1 g, 运用 E.Z.N.A.TM Total RNA Kit II 提取 RNA, PrimeScript RT reagent Kit Perfect

Real Time, 试剂盒进行反转录, 获得 cDNA。

### 1.4 引物与探针的设计与合成

根据 GenBank 中草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 S7 的基因(检索号: GU350744)序列, 由大连宝生物公司设计并合成了一对 realtime PCR 的引物和 1 条 TaqMan 探针。其中, 上游引物 P1: 5'-ccaggaatca atagcaatc-3'及下游引物 P2: 5'-cctgatataatcgctcttc-3', 扩增出草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 S7 部分序列 154 bp 的片段。TaqMan 探针 5'-cgataaccaccactacggctg-3'长 21 bp, 位于上下游引物之间, 5'由 FAM 标记, 3'由 Eclipse 标记。

### 1.5 标准品的制备

质粒标准品 PVAX1-S7 重组载体为本实验室构建并保存。将保存好的重组质粒转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 并涂布于卡那抗性的 LB 培养板中, 培养 12 h 后挑取单菌落于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养过夜, 用 MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0 试剂盒提取高纯度质粒, 用核酸紫外分析仪测出标准品质粒纯度及浓度, 按如下公式计算质粒拷贝数:

质粒拷贝数( $\text{copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) =  $6.02\times 10^{23}$  ( $\text{copies}\cdot\text{mol}^{-1}$ )  $\times$  质粒浓度( $\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) / 质粒分子量( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )。用 EASY Dilution(for Real Time PCR)对标准品进行 10 倍比稀释, 用于构建标准曲线。

### 1.6 荧光定量反应体系的建立及反应条件优化

采用 TaqMan 探针技术, 参照 Premix Ex TaqTM(DRR039A, Takara)说明书, 将上、下游引物、探针、Premix(Takara) Ex TaqTM 和 ROX Reference Dye (50 $\times$ )加入到反应体系中, 用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。对荧光定量 PCR 反应体系中引物、探针浓度和退火温度进行优化, 以获得最低的  $C_t$  值和较高的荧光强度增加值。选 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8  $\mu\text{mol/L}$  的引物终浓度和 0.03、0.06、0.12、0.24、0.48  $\mu\text{mol/L}$  的探针终浓度, 对同一 cDNA 样品进行扩增, 筛选引物和探针的最佳浓度。选不同的退火温度 56 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C, 对同一 cDNA 样品进行扩增, 筛选出最佳退火温度。以最小的  $C_t$  值和最高的荧光值为标准, 分别对退火温度、引物

浓度及探针浓度进行优化。

### 1.7 标准品的扩增及标准曲线的绘制

以 10 倍倍比稀释的重组质粒为模板进行荧光定量 PCR 扩增反应, 每个稀释度设 4 个平行组。采用 TaqMan 探针技术, 在 ABI7500 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。

### 1.8 敏感性试验

将质粒标准品 10 倍倍比梯度稀释, 每个梯度作 4 个重复, 用优化的反应体系和条件进行荧光定量 PCR 反应, 根据样品拷贝数与 C<sub>t</sub> 值之间的线性关系和相关系数确定最小检测量。

### 1.9 特异性试验

分别提取 YTAV、IHNV、ISKNV、FV3、KHV、GSRV、JX09-01 及 GCRV-HZ08 病毒的核酸, 反转录成 cDNA, 通过建立的实时荧光定量 PCR 检测方法, 进行特异性试验。

#### 1.10 重复性试验

批内重复试验: 取草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 cDNA 在一次实验中重复 30 次进行检测, 观察其 C<sub>t</sub> 值变异系数。

批间重复试验: 取等量的病毒细胞培养物分 4 次提取 RNA, 反转录后在同一反应条件下每份样品做 4 个重复, 进行 4 次独立的荧光定量 PCR 检测, 观测其 C<sub>t</sub> 值变异系数。

#### 1.11 荧光定量 PCR 检测方法的应用

对本实验室采集并保存的 32 份草鱼出血病疑似样品用已建立的实时荧光定量 PCR 检测方法进行检测。同时用普通的 RT-PCR 进行检测作为对比, 并辅以细胞培养和电镜观察加以确认和验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

病毒核酸采用特异性引物 P1、P2 进行 PCR 扩增后, 产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 扩增片段长度约为 150 bp, 与预期片段长度(152 bp)基本一致(图 1), 表明扩增成功。

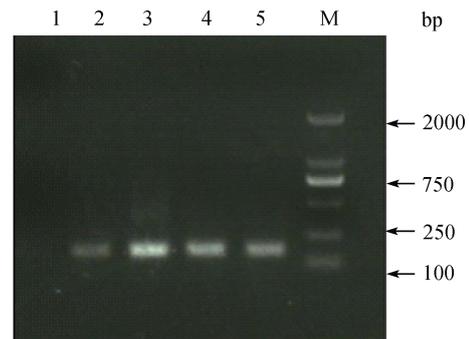


图 1 荧光定量特异性引物 P1、P2 PCR 扩增结果  
泳道 1 为空白对照; 泳道 2-5 为 GCRV HZ08 株 cDNA 模板;  
M 为 DNA 2 000 bp marker.

Fig.1 Amplification result of real-time PCR assay for the specificity of primers P1 and P2  
Lane 1: blank control; Lanes 2-5: cDNA of GCRV HZ08 strain;  
M: DNA 2 000 bp marker.

### 2.2 优化后的荧光定量反应体系

Premix(Takara) Ex Taq<sup>TM</sup> 12.5 μL, ROX Reference Dye (50×) 0.5 μL, PCR Forward Primer 和 PCR Reverse Primer 各 0.5 μL(终浓度均为 0.2 μmol/L), TaqMan 探针 1 μL(终浓度为 0.12 μmol), DNA 模板 1 μL, dH<sub>2</sub>O 8 μL, 总体系为 25 μL。两步法 PCR 扩增标准程序: 预变性 1 个循环, 95 30 s; PCR 反应, 45 个循环, 95 5 s, 60 34 s。

### 2.3 标准曲线的建立

重组质粒标准品经 10 倍倍比稀释后选取 10<sup>10</sup>~10<sup>0</sup> 个稀释度进行 TaqMan 荧光定量 PCR 扩增, 得到扩增曲线, 以质粒拷贝数的对数为 X 轴, 以 C<sub>t</sub> 值为 Y 轴, 得到一条标准曲线 ( $Y = -3.351X + 38.116$ ), 如图 2 所示。其相关系数为 0.999, 扩增效率为 98.785%, 可见实时荧光定量 PCR 在 10<sup>10</sup>~10<sup>0</sup> 范围内有较好的线性关系。

### 2.4 敏感性检测

将重组质粒标准品作 10 倍倍比稀释, 使质粒浓度达 6×10<sup>10</sup>~6×10<sup>-2</sup> 拷贝/μL, 进行 TaqMan 荧光定量 PCR, 得到扩增曲线, 如图 3 所示, 结果表明, 该方法可以最少检测到 6 个阳性质粒检测范围广。图 4 为相同浓度质粒的常规 RT-PCR 扩增图。

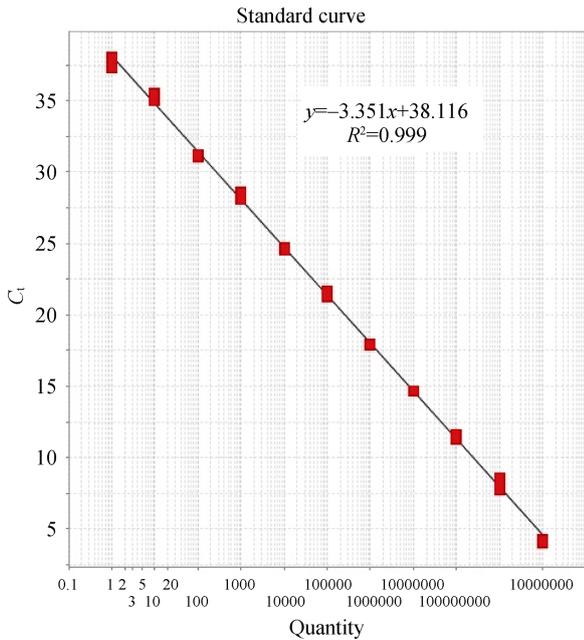


图 2 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株实时定量 PCR 标准曲线图  
Fig.2 Standard curve of real-time PCR assay for the detection of GCRV HZ08 plasmid

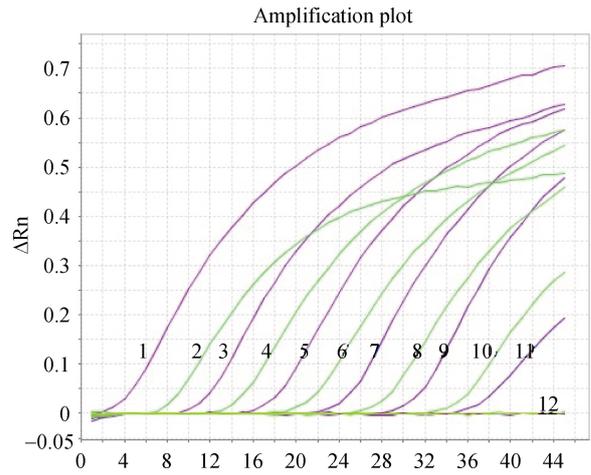


图 3 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株实时定量 PCR 灵敏度检测的扩增曲线图  
曲线 1-11: 质粒浓度分别为  $6 \times 10^{10} \sim 6 \times 10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ; 曲线 12: 质粒的浓度为  $6 \times 10^{-2} \sim 6 \times 10^{-1}$  拷贝/ $\mu\text{L}$  和空白对照。  
Fig.3 Amplification plot of real-time PCR assay for the detection of GCRV HZ08 plasmid  
Curves 1-11: concentrations of plasmid are  $6 \times 10^{10} \sim 6 \times 10^0$  copy/ $\mu\text{L}$ ; 12: concentration of plasmid  $6 \times 10^{-2} \sim 6 \times 10^{-1}$  copy/ $\mu\text{L}$  and blank.

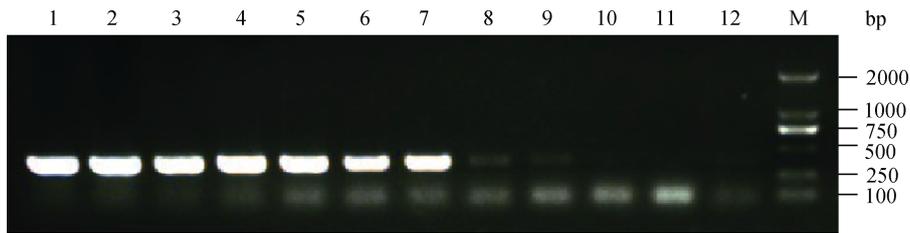


图 4 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株常规 RT-PCR 灵敏度检测的扩增曲线图  
泳道 1-12: 质粒的浓度分别为  $6 \times 10^{10} \sim 6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  和空白对照。  
Fig.4 Amplification plot of RT-PCR assay for the detection of GCRV HZ08 plasmid  
Lanes 1-12: concentration of plasmid  $6 \times 10^{10} \sim 6$  copy/ $\mu\text{L}$  and blank.

2.5 特异性检测

提取 GCRV-HZ08 株、YTAV、ISKNV、IHNV、FV3、GSRV、JX09-01 及 KHV 的核酸, 进行荧光定量 PCR 检测, 结果显示, 仅 GCRV-HZ08 株扩增曲线呈“S”型, 而其余病毒的核酸无“S”型扩增曲线(图 5), 表明未发生扩增反应, 证实所建立的实时荧光定量 PCR 检测方法特异性很好。

2.6 重复性和稳定性检测

对同一样品在同一次实验和不同实验间获得的  $C_t$  值进行统计, 结果表明, 同一次实验内的 30 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本上重合,

如图 6 所示,  $C_t$  值平均读数为 22.3, 标准差为 0.18, 变异系数为 0.82%。同时, 对同一样品进行 4 次单独的提取 RNA 及 TaqMan 荧光定量 PCR, 其变异系数小于 2%(表 1), 表明重复性较好。

2.7 荧光定量 PCR 检测方法的应用

从 2010 年 6 月到 2011 年 6 月在山东、江苏、湖南、湖北、广东、江西、福建 7 个省采集的 32 份病鱼样品, 同时采用荧光定量 PCR 检测方法和常规的 RT-PCR 进行检测, 结果显示, 所有常规 PCR 检测呈阳性的样品, 荧光定量 PCR 检测也都能检测到; 而荧光定量 PCR 检测到阳性样品 28

份, 常规 RT-PCR 检测到的阳性样品为 23 份。对于荧光定量 PCR 检测为阳性而常规 RT-PCR 检测为阴性的样品进行了细胞分离和电镜观察确认为阳性, 结果见表 2。

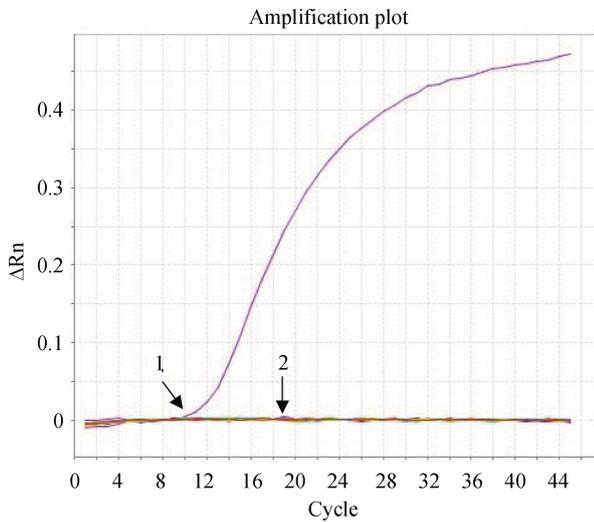


图 5 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株实时定量 PCR 特异性检测的扩增曲线图

1. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株; 2. 未产生荧光信号的毒株, 包括 YTAV、ISKNV、IHNV、FV3、GSRV、JX-09、KHV 及空白对照。

Fig.5 Specificity plot of real-time PCR assay for the detection of GCRV HZ08

1. GCRV HZ08 strain; 2. Strains with no positive signal including YTAV, ISKNV, IHNV, FV3, GSRV, JX09-01, KHV and blank.

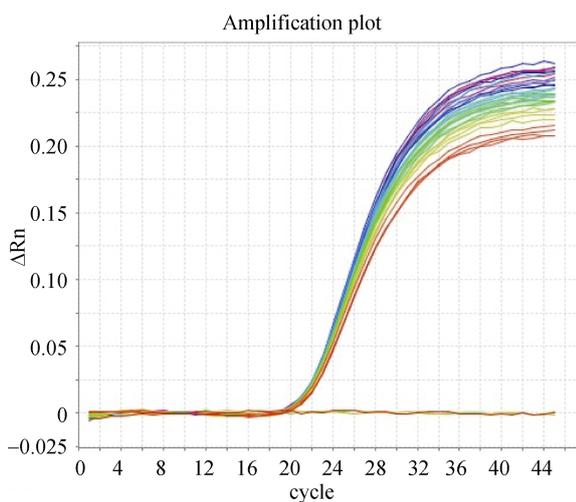


图 6 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株实时定量 PCR 30 次重复试验的扩增曲线图

Fig.6 Thirty repetitions of real-time PCR assay for the detection of GCRV HZ08

表 1 用实时荧光定量 PCR 检测 3 份不同病毒含量的样品(A/B/C)的检测结果

Tab.1 Reproducibility of fluorescent quantitative RT-PCR for 3 viral sample

项目 item	病毒样品 sample of viral		
	A	B	C
重复 1 rep.1	26.42	29.48	34.05
重复 2 rep.2	26.22	29.49	33.97
重复 3 rep.3	26.30	29.49	33.67
重复 4 rep.4	26.25	29.53	33.92
平均值 mean	26.45	29.53	33.92
标准差 SD	0.14	0.12	0.17
变异系数 CV/%	0.52	0.41	0.51

### 3 讨论

在中国淡水养殖业中经常可见因感染 GCRV 而导致草鱼大批死亡的实例, 对淡水养殖业造成了严重的危害<sup>[1-2,13]</sup>。草鱼出血病的快速准确诊断以及病毒病原的定量检测对于疫病的预警预报与防控技术研究具有十分重要的意义。目前, 草鱼出血病的确诊均需进行病毒分离, GCRV HZ08 株在现有的细胞系上不产生细胞病变, 且需将 GCRV HZ08 盲传多代后才能使病毒有效增殖<sup>[4,12]</sup>, 因此病毒分离费力、耗时, 不适合快速诊断。目前针对此流行株的检测方法多用普通的 RT-PCR, 但该方法只定性, 不利于 GCRV 的早期诊断。而荧光定量 PCR 操作简单、快速, 检测线性范围较宽, 不易出现假阳性, 在整个反应过程中可自动记录读数, 随时对扩增产物进行精确定量分析<sup>[19]</sup>。

本研究根据草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 S7 基因序列设计了一对特异性引物及 TaqMan 探针, 通过对其反应条件和反应体系进行优化, 建立了一种检测草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的荧光定量 RT-PCR 方法。在本研究建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度试验中, 质粒在  $6 \times 10^{10} \sim 6 \times 10^{-1}$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时扩增曲线呈典型的“S”型, 指数增长期曲线平行, 且不同稀释度之间的  $C_t$  值相差均匀, 在定量 PCR 反应中,  $C_t$  值指的是荧光信号由本底进入指数增长期拐点所对应的 PCR 循环次数, 其与模板 DNA 的起始拷贝数成反比, 由此可知灵敏性检测扩增图符合定量 PCR 的  $C_t$

表 2 用荧光定量 PCR 和常规 RT-PCR 检测疑似病样结果  
 Tab. 2 Results of detection by FQ-PCR and RT-PCR for suspected Grass carp hemorrhage specimens

样品来源 sample location	荧光定量 PCR FQ-PCR	普通 PCR RT-PCR	样品来源 sample location	荧光定量 PCR FQ-PCR	普通 PCR RT-PCR
广东番禺 Panyu	+	+	广东江门 Jiangmen	+	-
广东珠海 Zhuhai	+	+	广东中山 Zhongshan	+	+
广东大学城 Daxuecheng	-	-	广东肇庆 Zaoqing	+	+
江苏常州 Changzhou	+	+	江苏溧阳 Liyang	+	+
江苏武进 Wujin	+	-	江苏金坛 Jintan	+	+
江苏连云港 Lianyungang	-	-	江苏宜兴 Yixing	+	+
湖北仙桃 Xiantao	+	+	湖北荆门 Jinmen	+	+
湖北团风 Tuanfeng	+	-	湖北鄂州 Ezhou	+	+
湖北黄石 Huangshi	+	+	山东高青 Gaoqing	+	+
山东微山 Weishan	+	+	山东德州 Dezhou	-	-
江西赣州 Ganzhou	+	+	江西南昌 Nanchang	+	+
江西上犹 Shangyou	-	-	江西吉安 Jian	+	+
江西遂川 Suichuan	+	-	江西向塘 Xiangtan	+	+
福建三明 Sanming	+	+	福建宁德 Ningde	+	-
湖南沅江 Yuanjiang	+	+	湖南衡阳 Hengyang	+	+
湖南祁东 Qidong	+	+	湖南常德 Changde	+	+

注：“+”表示检测结果阳性，“-”表示检测结果阴性。

Note: “+” means positive result; “-” means negative result.

值与起始拷贝数间的对数关系，灵敏度最高可达 6 个拷贝。

为了验证本研究建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 技术检测草鱼呼肠孤病毒(GCRV)的特异性,本研究选择了 YTAV、IHNV、ISKNV、FV3、KHV、GSRV、JX09-01 病毒作为对照。检测结果表明,仅 GCRV 病毒核酸有典型扩增曲线,而 YTAV、IHNV、ISKNV、FV3、KHV、GSRV、JX09-01 均没有扩增曲线,与阴性对照的结果一致,表明所建立的方法具有较强的特异性。另外, RNA 病毒存在检测样品 RNA 提取和反转录效率的问题, Hayward 等的研究表明,尽管对不同目的片段的反转录效率相差较大,但是对于同一个目的片段来说,其反转录效率是稳定的<sup>[20-21]</sup>。本研究中也通过对同一样品进行 4 次独立 RNA 提取和反转录及对同一样品进行 30 次重复试验,结果表明,组间及组内变异系数均小于 2%,该方法具有较好的重复性。

同时对临床采集的 32 份疑似草鱼出血病样品进行常规 PCR 和荧光 PCR 检测,荧光定量 PCR 检测,结果 28 份为阳性,常规 PCR 检测结果 24 份为阳性,其中荧光定量 PCR 检测结果与病毒分

离和电镜结果一致,证实该方法在临床应用中的可靠性和敏感性均较高。

本研究建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法,具有特异性好、灵敏度高、能够对病原准确定量的特点,可对不同来源的草鱼呼肠孤病毒毒株进行分子流行病学研究,这对于草鱼出血病的早期诊断、病毒定量检测、致病机理研究以及防控技术研究等具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 戈贤平. 我国大宗淡水鱼养殖现状及产业技术体系建设[J]. 中国水产, 2010(5): 5-9.
- [2] 王方华, 李安兴. 草鱼病毒性出血病研究进展[J]. 南方水产, 2006, 2(3): 66-71.
- [3] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 草鱼出血病[J]. 中国水产, 2010, 11(2): 34-35.
- [4] 张超. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离鉴定与全基因组分子特征分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- [5] Zhang QY, Ruan HM, Li ZQ, et al. Detection of grass carp hemorrhage virus (GCHV) from Vietnam and Comparison with GCHV strain from China[J]. High Technology Letters, 2003, 9(2): 7-13.
- [6] 邵健忠, 项黎新, 李亚南, 等. 应用 Dot-ELISA 技术检测草鱼出血病病毒的研究[J]. 水产学报, 1996, 20(1): 6-11.
- [7] Lanlan Zhanga, Qing Luob, Qin Fang, et al. An improved RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of grass carp

- reovirus[J]. *J Virol Meth*, 2010, 169: 28–33.
- [8] Li J, Wang T H, Chen H X. A detection method for grass carp hemorrhagic virus (GCHV) based on a reverse transcription polymerase chain reaction [J]. *Dis Aquat Org*, 1997, 29: 7–12.
- [9] 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[J]. *水产学报*, 2011, 35(5): 774–778.
- [10] 方勤, 肖调义, 李旅, 等. 草鱼呼肠孤病毒新分离株 (GCRV991) 的病毒学特性分析[J]. *中国病毒学*, 2002, 17(2): 178–181.
- [11] 徐洋, 郝贵杰, 沈锦玉, 等. 两株江西分离株草鱼呼肠孤病毒分离及鉴定[J]. *淡水渔业*, 2010, 40(1): 36–47.
- [12] Zhang Chao, Wang Qing, Shi Cunbin, et al. Molecular analysis of grass carp reovirus HZ08 genome segments 1–3 and 5–6[J]. *Virus Genes*, 2010, 41(1): 102–104.
- [13] 肖波. 草鱼呼肠孤病毒及其免疫防治研究进展[J]. *鲁东大学学报: 自然科学版*, 2010, 26(10): 48–53.
- [14] 马贵华, 陈道印, 刘六英, 等. 草鱼出血病的免疫学研究进展[J]. *渔业现代化*, 2008, 35(1): 45–48.
- [15] 李军, 王铁辉, 周立冉, 等. 两株草鱼出血病病毒分离株的比较研究[J]. *中国水产科学*, 1998, 5(3): 115–118.
- [16] 方勤, 张作言. 水生呼肠孤病毒研究进展. *中国病毒学*[J]. 2003, 18(1): 82–86.
- [17] Zhang Chao, Wang Qing, Shi Cunbin, et al. Molecular analysis of grass carp reovirus HZ08 genome segments 1–3 and 5–6[J]. *Virus Genes*, 2010, 41(1): 102–104.
- [18] 曾伟伟, 王庆, 张超, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株 S4 全基因序列分析[J]. *生物学杂志*, (待发表).
- [19] 宋修庆, 高宏雷, 王晓艳, 等. 鸡贫血病毒 Taq Man 探针荧光 PCR 检测方法的建[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(1): 56–59.
- [20] 陈玉栋, 张楚瑜, 邹俊焯, 等. 建立快速定量检测猪瘟疫病毒免化弱毒苗的荧光定量 PCR 技术[J]. *中国病毒学*, 2003, 18(2): 124–128.
- [21] Hayward A L, Oefner P J, Sabatini S, et al. Modeling and analysis of competitive RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(11): 2511–2518.

## Development of a fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique for detection of grass carp reovirus HZ08 strain

LIU Baoqin<sup>1,2</sup>, ZENG Weiwei<sup>1</sup>, WANG Qing<sup>1</sup>, ZHANG Lesheng<sup>1</sup>, WANG Yingying<sup>1</sup>, SHI Cunbin<sup>1</sup>, WU Shuqin<sup>1</sup>

1. Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

**Abstract:** Outbreaks of grass carp hemorrhage have caused widespread economic loss to the freshwater aquaculture industry in China. The disease is caused by grass carp reovirus (GCRV). Currently, strain HZ08 is responsible for the majority of outbreaks of grass carp hemorrhage. We developed a rapid, efficient, and specific method for detection of GCRV epidemic causing strains. We designed a pair of specific primers and TaqMan probes targeting the HZ08 strain S7 gene. The standard curve was established using the standard template plasmid PVAX1-S7, which exhibited a corresponding relationship between the  $C_t$  and the copies of plasmid. We then evaluated the specificity, sensitivity, and repeatability of this approach. The linear relationship of copies was excellent within the range  $6.0 \times 10^{10}$ –6.0 ( $r=0.9999$ ). Using FQ-PCR we were able to detect at least 6.0 copies of the S7 gene in the plasmid suggesting this method has high sensitivity. The coefficients of variation were 0.82 and 0.41%–0.52% for intragroup and intergroup, respectively, indicating that this method had high repeatability. Furthermore, the method had high specificity, based on the lack of amplification of other aquatic viruses. We tested 32 suspected grass carp hemorrhage specimens and returned 28 positive samples using FQ-PCR but just 23 positive samples using conventional RT-PCR. In summary, we developed a FQ-PCR method for the detection of HZ08 strain GCRV that has high specificity, sensitivity, and repeatability. Our method may also be applied to GCRV rapid detection and preliminary quantification.

**Key words:** GCRV HZ08; FQ-PCR; detection

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