

DOI: 10.12264/JFSC2024-0306

基于 *vp19* 基因检测克氏原螯虾 WSSV 高灵敏度一步式 PCR 方法的建立

陈楠^{1,3,4,5}, 罗小红^{1,2,3,4,5}, 廖明聪^{1,2,3,4,5}, 胡瑞雪^{1,2,3,4,5}, 李丹^{1,3,4,5}, 顾泽茂^{1,2,3,4,5*}

1. 华中农业大学水产学院/双水双绿研究院, 湖北 武汉 430070;
2. 湖北洪山实验室, 湖北 武汉 430070;
3. 农业农村部水生动物疫病专业实验室(华中农业大学), 湖北 武汉 430070;
4. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070;
5. 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 湖北 武汉 430070;

摘要: 白斑综合征病毒(WSSV)是危害克氏原螯虾养殖的重要病原。本研究旨在针对该病毒早期检测和诊断速度慢、灵敏度不高、不便捷等问题, 建立新的 WSSV 一步式 PCR 检测方法。该方法基于 WSSV 主要囊膜蛋白 VP19 的基因保守序列设计引物, 建立方法并针对分析特异性、分析灵敏度、诊断特异性、诊断灵敏度开展了与 WOA 巢式 PCR 方法的比较评估。结果表明, 本方法对 WSSV 具有高分析特异性, 仅在阳性样本中扩增出 196 bp 条带, 与传染性皮下和造血器官坏死病毒等其他常见水产病原无交叉反应。分析灵敏度测试显示, 以 WSSV 标准质粒为模板时, 本方法理论检出限低至 1.83 copies/μL; 以田间样品混合 DNA 为模板时, 最低检出限达 0.82 fg/μL, 均优于 WOA 巢式 PCR 方法。同时, 本研究以 WOA Taqman qPCR 方法为标准, 比较了本方法和巢式 PCR 对 317 份田间样品的检测结果, 本方法的诊断特异性为 97.01%, 诊断灵敏度为 95.08%, 均优于巢式 PCR。综上所述, 本研究建立的一步式 PCR 检测方法具有高特异性和高灵敏度的优点, 适用于克氏原螯虾 WSSV 周年监测和快速诊断, 能够为有效防控 WSSV 相关流行病提供重要的技术支持。

关键词: 克氏原螯虾; 白斑综合征病毒; 囊膜蛋白 VP19; 一步式 PCR; 特异性; 灵敏性

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)05-0689-11

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)原产于美国南部和墨西哥北部, 1929 年经日本传入我国后, 迅速适应并广泛分布于长江流域^[1]。20 世纪初, 湖北省率先发展稻田养殖克氏原螯虾, 随后该模式在全国适宜养殖区域快速推广, 在农民增收、农业增效和农村增绿中发挥了重要作用。根据《2024 中国渔业统计年鉴》统计, 截至 2023 年, 我国克氏原螯虾产量达到 316.10 万 t, 已发展成

为我国水产养殖业的重要组成部分^[2]。在养殖业快速发展的过程中, 细菌、病毒和寄生虫等病原引起的疾病已经逐渐成为该产业发展的瓶颈^[3-8]。流行病学调查显示白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)阳性率近五年来持续高于 50%^[9], 是引发克氏原螯虾高死亡率爆发性流行病的重要病原^[10]。

WSSV 宿主范围广, 主要感染克氏原螯虾、

收稿日期: 2024-10-07; 修订日期: 2025-03-18.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400700); 湖北省重点研发计划项目(2023BBB169); 湖北洪山实验室重大项目(2021HSZD002); 湖北省农业科技创新中心项目(2024-620-000-001-33); 中央高校基本科研业务费专项基金项目(2662023SCPY003, 20062023SCYJ004); 湖北省支持种业高质量资金项目(HBZY2023B009).

作者简介: 陈楠(1980-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为克氏原螯虾病害防控. E-mail: chennan@mail.hzau.edu.cn

通信作者: 顾泽茂, 教授, 研究方向为水产动物病害防控与绿色健康养殖. E-mail: guzema@mail.hzau.edu.cn

凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)等多种经济甲壳动物,是迄今为止危害最为严重的一种甲壳动物病毒^[11]。自1992年以来,WSSV感染每年给全球甲壳类养殖业造成的经济损失高达十亿美元^[12],并因此被列入世界动物卫生组织(WOAH)发布的《水生动物卫生法典》中。而2021—2023年间我国克氏原螯虾养殖中WSSV阳性率持续超过60%^[9, 13-14],防控形势尤为严峻。研究表明该病毒传播途径复杂,包括种内水平传播、种内垂直传播和种间传播^[11]。同时WSSV在宿主体内存在潜伏感染期,一旦环境变化导致病毒增殖达到感染阈值,便会迅速暴发^[15-16]。这些感染特征和发病特点使得其难以治疗,加上目前对其致病机制等方面的深入研究仍然不足,阻碍了有效治疗方法的发展。因此,预防成为了当前控制克氏原螯虾养殖中WSSV相关流行病爆发的关键措施之一,而建立快速、便捷且灵敏的检测方法也成为了研究的重点。

现有的WSSV检测方法主要包括组织病理学诊断、电子显微镜观察、核酸探针法、免疫学检测和核酸分子检测等。核酸分子检测是目前最常用的WSSV检测方法,具有高灵敏度、强特异性和操作简便等优点^[17-20]。1996年开发的巢式PCR检测方法已于2009年被纳入WOAH的WSSV检测标准并沿用至今^[21]。然而,该方法需要进行两轮PCR反应,操作繁琐且耗时。此外,低退火温度易导致非特异性扩增;在批量样本检测中,开盖转移和凝胶电泳步骤也增加了交叉污染的风险^[19]。这些缺点都严重影响了大规模样本检测的效率和准确性。而且该方法检测下限仅为 $10^3 \sim 10^4$ 个病毒拷贝数,在冬春和高温季节检测潜伏感染样本时易出现假阴性,可能导致疫情的漏检和扩散,制约了WSSV的有效监控和及时预防。荧光定量PCR具有高通量密封检测能力,污染风险低,诊断灵敏度优于常规方法,WOAH推荐方法最低可检测单个病毒拷贝^[22]。然而,该方法需使用特定荧光探针和专用预混液以确保精度和灵敏度,成本相对较高且操作复杂,难以满足基层检测单位和养殖场的常态化需求。相比之下,一步式常规PCR法操作简便、成本低廉、仪器普及率高,但

其检测WSSV感染的灵敏度通常比巢式PCR和荧光定量PCR低2~3个数量级^[20,22-23],限制了其在早期诊断和流行病学调查中的应用。为了克服现有方法的局限性,本研究基于WSSV主要囊膜蛋白VP19的基因保守序列设计特异性引物,开发出一种针对克氏原螯虾WSSV检测的一步式常规PCR方法。该方法保留了一步式PCR操作简便、检测快速的优势,同时具备高分析特异性和高分析灵敏度,检测灵敏度(diagnostic sensitivity, DSe)和检测特异性(diagnostic specificity, DSp)均超过WOAH巢式PCR。本研究将为克氏原螯虾WSSV的流行病学调查和快速诊断提供高效技术支持,提升早期病原筛查与疫情监测效率,实现“早发现、早预防”,促进绿色健康养殖。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 病毒株和菌株 WSSV、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、布氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter braakii*)和琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*)来源于本实验室。传染性皮下及造血器官坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV) DNA、偷死野田村病毒(covert mortality nodavirus, CMNV) cDNA由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供。蛙虹彩病毒(rana grylio virus, RGV) DNA、鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV) cDNA由华中农业大学水产学院水生动物病毒组提供。

1.1.2 田间检测样品 克氏原螯虾田间检测样品均随机采集自湖北省潜江市、监利市、石首市和武汉市蔡甸区养殖场,共计317尾,样本覆盖主要养殖区。阳性和阴性样品通过WOAH推荐的TaqMan探针荧光定量方法(TaqMan-qPCR)^[22]检测确定,用于后续WSSV常规PCR方法的诊断灵敏度和诊断特异性测试。

1.1.3 试剂和主要仪器设备 2×Taq Master PCR Mix、RNase Free ddH₂O、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α感受态细胞、琼脂糖、动物组织基因组

DNA 提取试剂盒、细菌基因组 DNA 试剂盒与质粒抽提试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司; DL 2000 DNA Marker、6×Loading Buffer 和载体 pMD19-T 购自宝生物工程有限公司; 脑心浸液培养基(BHI)购自青岛高科园海博生物技术公司; DNA 胶回收试剂盒购自 Omega 公司。

主要仪器包括实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad); 梯度 PCR 仪(Eppendorf); 冷冻离心机(Eppendorf); 电泳仪(Bio-Rad); 凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 病毒模板制备 WSSV DNA 模板制备采用改良的 SDS 方法提取 DNA, 具体步骤如下: 取 0.1 g 实验室前期研究-80 °C 保存患病虾鳃组织(经荧光定量 PCR 检测), 加入 600 μL 细胞裂解液(Tris-HCl 100 mmol/L; EDTA 20 mmol/L; NaCl 100 mmol/L; SDS 2%(W/V); PVP 3%; 偏重亚硫酸钠 0.1%)和 10 μL 50 mg/mL 蛋白酶 K, 混匀后 65 °C 消化完全; 再加入 300 μL 7.5 mol/L 醋酸铵, 混匀后室温静置 5 min; 4 °C, 12000 r/min, 离心 10 min; 取上清, 加入等体积异丙醇, 混匀后室温静置 5 min; 4 °C, 12000 r/min, 离心 10 min; 弃上清, 加入 1 mL 70% 乙醇, 混匀后 4 °C, 12000 r/min, 离心 10 min; 弃上清, 加入 1 mL 100% 乙醇, 混匀, 4 °C, 12000 r/min, 离心 5 min, 重复 1 次; 弃上清, 干燥 5~10 min, 加 20 μL 无菌水溶解, 测浓度, -20 °C 保存。

CMNV 和 SVCV 为 RNA 病毒。cDNA 模板制备参照 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)说明书采用 20 μL 体系进行。最终所得反应产物 cDNA 保存于-20 °C。

1.2.2 引物设计及合成 本研究参照中国大陆 WSSV 病毒株基因组序列(GenBank 登录号: AF332093.3)^[24]中 VP19 囊膜蛋白基因序列, 利用 Oligo 7 软件设计了一对特异性引物 V1, 其目标扩增片段大小为 196 bp。同时基于 WOA 手册推荐的 WSSV 检测标准方法^[21], 分别合成了一套巢式 PCR 引物, 以及 TaqMan qPCR 方法的荧光探针和对应引物。巢式 PCR 引物包括外引物对 P1 和内引物对 P2, 预期扩增片段大小分别为 1,447 bp

和 941 bp。荧光探针序列为 6FAM-CGC-TTC-AGC-CAT-GCC-AGC-CG-TAMRA。所有探针及引物由北京擎科生物科技有限公司合成, 详细引物序列信息见表 1。

1.2.3 质粒标准模板的制备 利用 V1 和 P1 引物分别对 WSSV DNA 模板进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 目标条带被切胶回收并与 pMD19-T 载体连接。连接产物随后被转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中。转化细胞被涂布在含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 以筛选阳性克隆。通过菌落 PCR 确认阳性克隆后, 将其扩大培养并提取质粒 DNA。经测序验证后的正确质粒分别被命名为 pMD19T-V1 和 pMD19T-P1, -20 °C 保存备用。

使用核酸分析仪 NanoDrop 2000 测定重组质粒的 DNA 浓度, 并换算成质粒拷贝浓度: 质粒浓度(copies/μL)=6.02×10²³(copies/mol)×质粒质量浓度(g/μL)/质粒分子数。10 倍系列稀释质粒 DNA, 用 1 μL 各浓度梯度的质粒 DNA 作为模板进行荧光定量 PCR(qPCR), 具体步骤参考文献^[22]。以质粒浓度为横坐标, Ct 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 对稀释后浓度进行验证。

1.2.4 一步式 PCR 检测方法的建立及退火温度的确定 一步式 PCR 反应体系: 总体积为 20 μL, 其中模板 DNA 1 μL, V1-F/R 各 1 μL, 2×Taq MasterMix 10 μL, ddH₂O 7 μL。

引物 V1 扩增程序设定: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 30 s; 53~64 °C 退火 30 s; 设置 72 °C 延伸 30 s; 30 个循环; 72 °C 再次延伸 5 min, 4 °C 保存。设定退火温度梯度为 53 °C、54 °C、55 °C、57 °C、60 °C、62 °C、63.5 °C、64 °C。扩增结束后, 取 5 μL 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用 1×TAE 作为电泳缓冲液, 130V 下电泳 22 min, 使用凝胶成像系统观察电泳结果, 以确定最适退火温度。

1.2.5 分析特异性检测实验 以 WSSV 基因组 DNA 作为阳性对照, ddH₂O 作为阴性对照, 选取 4 种重要水生动物病毒(IHHNV、CMNV、RGV、SVCV)和 5 种病原细菌(*Aeromonas veronii*、*Citrobacter freundii*、*Citrobacter braakii*、

表 1 本研究所用引物信息
Tab. 1 Primer information used in this study

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	片段大小/bp fragment size	用途 usage
V1-F	CACCATGGAAGATCTTGAAGGCTC	196	一步式 PCR One step PCR
V1-R	TTTGTCTCATCATCGTTATCGTT		
P1-F	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	1447	WOAH 巢式 PCR WOAH nested PCR
P1-R	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA		
P2-F	GTAAC TGCCCTTCCATCTCCA	941	
P2-R	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT		
CSIRO-F	CCGACGCCAAGGGAAC T	/	WOAH TaqMan 荧光定量 PCR WOAH TaqMan qPCR
CSIRO-R	TTCAGATTCGTTACCGTTTCCA		

Aeromonas caviae、*Acinetobacter junii* 的基因组 DNA 作为模板。用 1.2.4 节中优化的反应体系及条件进行 PCR 扩增,使用 WOA H 手册推荐的巢式 PCR 方法^[21]作为对照。巢式 PCR 的第一轮 PCR 产物稀释 100 倍作为第二轮 PCR 模板^[17,21]。比较不同模板 DNA 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果,评估一步式 PCR 检测 WSSV 的分析特异性。

1.2.6 一步式方法的分析灵敏度评估及比较 用 ddH₂O 对重组质粒 pMD19T-V1 和 pMD19T-P1 进行 10 倍梯度稀释,得到 11 个浓度梯度,拷贝数范围分别为 1.83×10⁰~1.83×10¹⁰copies/μL (V1)和 2.38×10⁰~2.38×10¹⁰ copies/μL (P1)。以梯度稀释的 DNA 为模板,以 ddH₂O 作为阴性对照,一步式 PCR 检测 pMD19T-V1,巢式 PCR 检测 pMD19T-P1 质粒。产物经 2%凝胶电泳检测后,比较两种方法的最低检出限。

提取患病虾鳃部组织总 DNA,荧光定量 PCR 方法验证病毒拷贝数,微量分光光度计 Nano-300 测定混合 DNA 模板的浓度和纯度。10 倍梯度稀释总 DNA,获得浓度梯度: 82 ng/μL、8.2 ng/μL、0.82 ng/μL、82 pg/μL、8.2 pg/μL、0.82 pg/μL、82 fg/μL、8.2 fg/μL、0.82 fg/μL、82 ag/μL。以梯度稀释的 DNA 作为模板,ddH₂O 作为阴性对照,分别进行一步式 PCR 和巢式 PCR 检测。产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测后,结合质粒检测和 DNA 检测限,评估一步式 PCR 方法的分析灵敏度。

1.2.7 诊断特异性(DSp)、诊断灵敏度(DSe)测试及田间样品阳性检出率的比较 为比较一步式 PCR 与巢式 PCR 的诊断特异性(DSp)、诊断灵敏

度(DSe)及田间样品阳性检出率,根据 WOA H 《水生动物诊断手册》要求,采用 TaqMan-qPCR 方法^[22]作为参比方法进行测试。从 317 尾田间样品中采集鳃组织并提取总 DNA,利用该方法确认阳性和阴性样本数量。

分别通过一步式 PCR 方法和巢式 PCR 方法对 317 份田间样品进行测试。对结果不一致的阳性样本,重复原始检测后送至北京擎科生物科技有限公司进行测序确认。DSp 和 DSe 按以下公式进行计算: DSp=PCR 阴性数/(PCR 阴性数+PCR 假阳性数)×100%; DSe=PCR 阳性数/(PCR 阳性数+PCR 假阴性数)×100%。通过比较两种 PCR 方法的 DSp 和 DSe,评估其诊断性能。

田间样品的阳性检出率按以下公式进行计算: 总阳性检出率(%)=检测阳性个体数/样本总数×100%; 真实阳性检出率(%)=真实阳性个体数/样本总数×100%。比较两种方法的上述指标,验证一步式 PCR 和 WOA H 巢式 PCR 在田间样品中的检测效果。所有实验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 一步式 PCR 的最适退火温度

琼脂糖凝胶电泳结果显示,一步式 PCR 在 53~64 ℃范围内均能成功扩增出 196 bp 的目的条带,54~55 ℃、60~64 ℃时产物条带清晰。综合考虑引物理论 T_m 值,退火效率、扩增效率和反应特异性,将 60 ℃确定为最适退火温度(图 1)。

2.2 标准质粒构建

PCR 结果显示,使用 V1 和 P1 引物分别扩增出对应 196 bp(图 2a)和 1447 bp(图 2b)的清晰条

带。测序和比对分析表明, 扩增产物及其对应的质粒插入序列分别与 WSSV 参考序列 100%同源, 证实了标准质粒的成功构建。

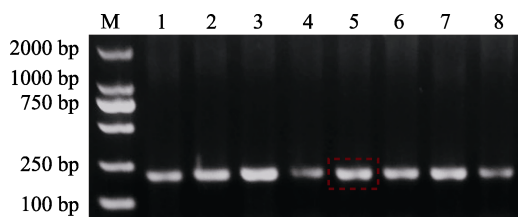


图 1 温度对一步式 PCR 扩增效果的影响

M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: 53 °C; 2: 54 °C;

3: 55 °C; 4: 57 °C; 5: 60 °C; 6: 62 °C; 7: 63.5 °C; 8: 64 °C.

Fig. 1 Effect of different temperatures on one step PCR amplification

M: DL1000 DNA marker; 1: 53 °C; 2: 54 °C; 3: 55 °C;

4: 57 °C; 5: 60 °C; 6: 62 °C; 7: 63.5 °C; 8: 64 °C.

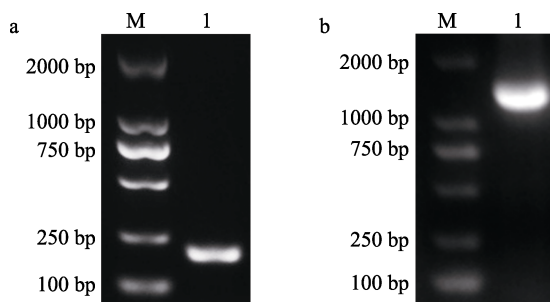


图 2 目的片段的 PCR 扩增结果

a. 引物 V1; b. 引物 P1. M: DL2000 分子质量标准,

1: WSSV-DNA, 2: 阴性对照.

Fig. 2 PCR amplification of target fragment

a. Primer V1; b. Primer P1. M: DL2000 Marker,

1: WSSV-DNA, 2: negative control.

2.3 一步式 PCR 的分析特异性测试

以 10 种病原体的 DNA、cDNA 或菌液作为模板进行一步式 PCR 和巢式 PCR 检测。结果显示, 仅 WSSV 组出现对应大小目的条带: V1 引物组 PCR 产物为 196 bp, P1 引物组 PCR 产物为 1447 bp, P2 引物组 PCR 产物为 941 bp。其他 9 种非 WSSV 模板对应泳道均未出现扩增条带, 说明设计的引物与其他常见病原无交叉反应, 对 WSSV 具有良好特异性(图 3)。

2.4 分析灵敏度实验结果

电泳结果显示, 使用一步式 PCR 方法能够检测到模板浓度为 $1.83 \times 10^0 \sim 1.83 \times 10^{10}$ copies/ μ L 的重组质粒浓度范围的目标序列, 获得大小为 196 bp 的条带(图 4a), 最低理论检出限能够达到

1.83×10^0 copies/ μ L。巢式 PCR 方法检测结果显示第一轮扩增(外引物 P1)能够检测到 $2.38 \times 10^4 \sim 2.38 \times 10^{10}$ copies/ μ L 范围中的目标序列, 条带大小为 1447 bp (图 4b), 而第二轮扩增进一步提高了灵敏度, 可检测浓度低至 $2.38 \times 10^2 \sim 2.38 \times 10^{10}$ copies/ μ L 范围的目标序列, 条带大小为 941 bp (图 4c)。因此, 巢式 PCR 方法的最低理论检出限为 2.38×10^2 copies/ μ L。比较两种方法的检出限时发现, 本研究中一步式 PCR 法的检出限比巢式 PCR 低 2 个数量级, 其理论分析灵敏度是巢式 PCR 的 100 倍。

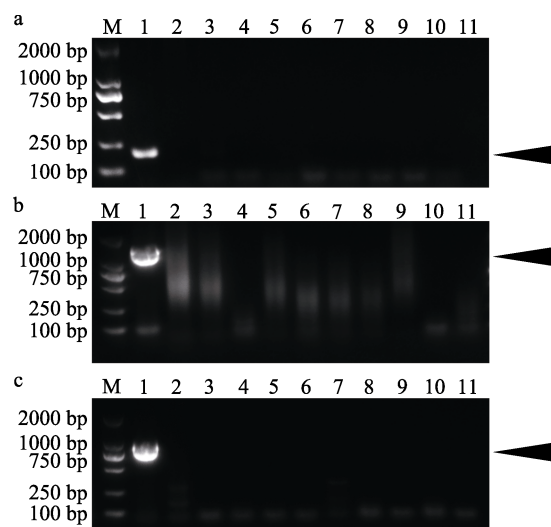


图 3 一步式 PCR 分析特异性测试

a. 引物 V1; b. 引物 P1; c. 引物 P2. M: DL2000 Marker;

1: 白斑综合症病毒; 2: 传染性皮下及造血器官坏死病毒;

3: 偷死野田村病毒; 4: 蛙虹彩病毒; 5: 鲤春病毒血症病毒;

6: 维氏气单胞菌; 7: 豚鼠气单胞菌; 8: 弗氏柠檬酸杆菌;

9: 布氏柠檬酸杆菌; 10: 琼氏不动杆菌; 11: 阴性对照.

Fig. 3 Analytical specificity test of one-step PCR

a. Primer V1; b. Primer P1 c. Primer P2. M: DL2000 Marker;

1: WSSV; 2: IHNV; 3: CMNV; 4: RGV; 5: SVCV;

6: *A. veronii*; 7: *A. caviae*; 8: *C. freundii*; 9: *C. braakii*;

10: *A. junii*; 11: negative control.

本研究进一步评估了一步式 PCR 方法检测克氏原螯虾的 WSSV 阳性样品鳃部提取 DNA 模板的灵敏度。实验结果显示, 混合模板浓度为 82 ng/ μ L~8.2 pg/ μ L 范围时, 可扩增到大量产物。浓度为 0.82 pg/ μ L 时, 扩增产物开始明显减少。但 0.82 pg/ μ L~0.82 fg/ μ L 范围内仍有扩增。因此, 一步式 PCR 方法的最低诊断检出限达 0.82 fg/ μ L (图 5a)。相比之下, 巢式 PCR 方法的第一轮扩增诊断检出限为 82 pg/ μ L (图 5b), 第二轮扩增后提

高到 0.82 pg/ μ L (图 5c)。这表明本方法能够检测到样本中更低浓度的病毒 DNA, 在实际样品分析灵敏度上达到传统巢式 PCR 的 1000 倍。

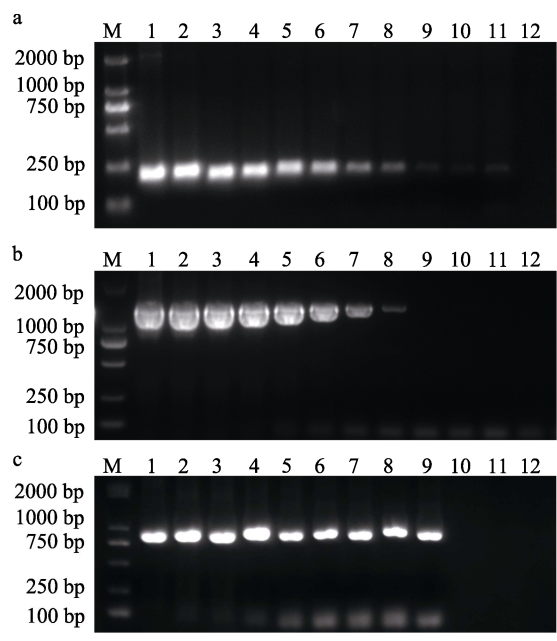


图 4 一步式 PCR 理论分析灵敏度测试
a. 引物 V1; b. 引物 P1; c. 引物 P2; M: DL2000 分子质量标准; 1: $1.83/2.83\times10^{10}$ copies/ μ L; 2: $1.83/2.83\times10^9$ copies/ μ L; 3: $1.83/2.83\times10^8$ copies/ μ L; 4: $1.83/2.83\times10^7$ copies/ μ L; 5: $1.83/2.83\times10^6$ copies/ μ L; 6: $1.83/2.83\times10^5$ copies/ μ L; 7: $1.83/2.83\times10^4$ copies/ μ L; 8: $1.83/2.83\times10^3$ copies/ μ L; 9: $1.83/2.83\times10^2$ copies/ μ L; 10: $1.83/2.83\times10^1$ copies/ μ L; 11: $1.83/2.83\times10^0$ copies/ μ L; 12: 阴性对照。
Fig. 4 Theoretical analytical sensitivity test of one-step PCR
a. Primer V1; b. Primer P1 c. Primer P2. M: DL2000 Marker; 1: $1.83/2.83\times10^{10}$ copies/ μ L; 2: $1.83/2.83\times10^9$ copies/ μ L; 3: $1.83/2.83\times10^8$ copies/ μ L; 4: $1.83/2.83\times10^7$ copies/ μ L; 5: $1.83/2.83\times10^6$ copies/ μ L; 6: $1.83/2.83\times10^5$ copies/ μ L; 7: $1.83/2.83\times10^4$ copies/ μ L; 8: $1.83/2.83\times10^3$ copies/ μ L; 9: $1.83/2.83\times10^2$ copies/ μ L; 10: $1.83/2.83\times10^1$ copies/ μ L; 11: $1.83/2.83\times10^0$ copies/ μ L; 12: negative control.

2.5 诊断灵敏度(DSe)和诊断特异性(DSp)测试和阳性检出率比较结果

利用 WSSV TaqMan qPCR 方法检测 317 份田间样品, 结果显示 183 份为 WSSV 阳性, 134 份为

阴性, 阳性检出率为 57.72%。分别采用一步式 PCR 和巢式 PCR 检测上述田间样品。一步式 PCR 在 183 份阳性样品中检出 174 份阳性、9 份阴性; 在 134 份阴性样品中检出 130 份阴性、4 份阳性。巢式 PCR 在 183 份阳性样品中检出 171 份阳性、12 份阴性; 在 134 份阴性样品中检出 123 份阴性、11 份阳性。根据公式计算, 与 TaqMan-qPCR 相比, 一步式 PCR 的 DSp 为 97.01%, DSe 为 95.08%, 总阳性检出率为 56.15%, 真实阳性检出率为 54.88%; 巢式 PCR 的 DSp 为 91.79%, DSe 为 93.44%, 总阳性检出率为 57.41%, 真实阳性检出率为 53.94% (表 2)。

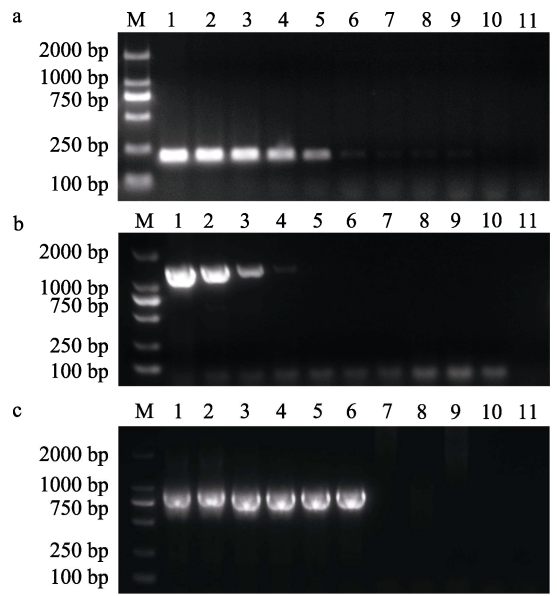


图 5 田间样品分析灵敏度测试
a. 引物 V1; b. 引物 P1 c. 引物 P2. M: DL2000 分子质量对照; 1: 82 ng/ μ L; 2: 8.2 ng/ μ L; 3: 0.82 ng/ μ L; 4: 82 pg/ μ L; 5: 8.2 pg/ μ L; 6: 0.82 pg/ μ L; 7: 82 fg/ μ L; 8: 8.2 fg/ μ L; 9: 0.82 fg/ μ L; 10: 82 ag/ μ L; 11: 阴性对照。
Fig. 5 Analytical sensitivity tests of field samples
a. Primer V1; b. Primer P1 c. Primer P2. M: DL2000 Marker; 1: 82 ng/ μ L; 2: 8.2 ng/ μ L; 3: 0.82 ng/ μ L; 4: 82 pg/ μ L; 5: 8.2 pg/ μ L; 6: 0.82 pg/ μ L; 7: 82 fg/ μ L; 8: 8.2 fg/ μ L; 9: 0.82 fg/ μ L; 10: 82 ag/ μ L; 11: negative control.

表 2 一步式 PCR 和巢式 PCR 检测田间样品的检测参数比较
Tab. 2 Comparison of one-step PCR and nested PCR detection parameter for field-collected samples

方法 method	假阴性 false negative	诊断灵敏度/% DSe	假阳性 false positive	诊断特异性/% DSp	总阳性检出率/% positive detection rate	真实阳性检出率/% true positive detection rate
一步式 PCR one-step PCR	9	95.08	4	97.01	56.15	54.88
巢式 PCR nested PCR	12	93.44	11	91.79	57.41	53.94

3 讨论

克氏原螯虾产业近年来持续快速发展, 但 WSSV 感染诱发的流行病仍是实现绿色健康养殖的主要制约因素之一。为应对 WSSV 的潜伏感染和现有常规 PCR 检测方法的局限性, 本研究开发了一种基于 *vp19* 基因短片段的一步式 PCR 方法。通过特异性引物设计和反应体系优化, 实现了快速、简便且高特异性、高灵敏度的 WSSV 检测, 为该病毒的流行病学调查和早期预警提供了高效工具。

选择合适的引物靶标是建立高效准确的 PCR 检测方法的核心, 它直接影响检测的特异性、灵敏度和可靠性。VP19 是 WSSV 的核心囊膜蛋白, 表达含量仅次于 VP28, 在病毒的组装和感染过程中扮演着关键的角色^[25-28]。比较基因组研究表明, VP19、VP26 和 VP28 是所有已知 WSSV 毒株中唯一全部保留且高度保守的 3 种结构蛋白^[29], 使 VP19 成为病毒检测和疫苗开发的理想靶标。本研究建立的一步式 PCR 方法理论检出限达到 1.83 copies/ μ L, 与先前基于 *vp19* 的 qPCR 方法(检出限 1 copies/ μ L)^[30]相当, 且优于 *vp28*^[31-33]等序列为靶标的 PCR 方法(表 3)。此外, 我们的方法还展现出优异的特异性, 能够准确识别 WSSV 而不与其他病原体产生交叉反应。这些特性使得基于 *vp19* 基因的一步式 PCR 在 WSSV 的快速、准确检测方面具有显著优势, 为疾病防控提供了更好的选择。

在 WSSV 检测领域, 灵敏度是评估检测方法效能的关键指标, 受检测方法、靶标序列信息、引物信息以及模板类型等多种因素影响^[34]。研究表明, 使用较短扩增片段的 PCR 方法在检测 WSSV 时表现出更高的灵敏度^[19,35-36], 可能与甲壳类动物组织中的病毒 DNA 容易在提取或长期冻存过程中降解为小片段有关^[36]。基于以上理论, 本研究对常规 PCR 方法进行了系统性优化, 以提高灵敏度。首先, 选择了高度保守且功能重要的 *vp19* 基因作为靶标, 引物设计基于对中国主要流行毒株基因组的综合考虑, 优化了关键参数以增强对目标核酸序列的识别和结合效率。其次, 采

用扩增 196 bp 的目标片段的 PCR 方法, 相较于扩增 1447 和 941 bp 目标片段的巢式 PCR, 提高了引物与病毒 DNA 模板的结合几率, 提升了检测灵敏度。最后, 通过优化退火温度, 在提高特异性的同时保持了高灵敏度, 实现了引物-模板系统的最佳匹配。经优化, 本方法将分析灵敏度的检出限降低至 1.83 copies/ μ L, 对 DNA 样品检出限达到 0.82 fg/ μ L, 优于已报道的多种 PCR 方法, 包括巢式 PCR^[20,31,37]、二温式 PCR^[38]、LAMP+LFD^[39]、CRISPR-based SHERLOCK^[40] 和部分 qPCR^[20,32,41], 已经接近电容式生物传感器^[30]、TaqMan qPCR^[18,22]和酶重组酶扩增^[33]的超高灵敏度(表 3)。同时, 本方法相比巢式 PCR 操作简便、成本更低, 更适合于早期监测和大规模筛查, 在克氏原螯虾绿色健康养殖中具有广泛的应用前景。

在田间样品检测中, 一步式 PCR 和巢式 PCR 的总阳性检出率分别为 56.15%和 57.41%, 真实阳性检出率分别为 54.88%和 53.94%。这一差异源于巢式 PCR 较高的假阳性率(11 份 vs. 4 份)和较低的特异性(DSp = 91.79% vs. 97.01%)。虽然一步式 PCR 方法的阳性检出率略低于巢式 PCR, 但其 DSp 和 DSe 更高(97.01%和 95.08%), 表现出优秀的准确性与特异性, 因此在田间检测中更具优势。然而, 本方法存在开盖跑胶可能导致气溶胶污染的问题, 长期运行时可能影响结果准确性。为降低高灵敏度可能带来的假阳性风险^[42], 我们采用了多重策略, 包括样品单向流动、分区隔离操作、严格控制实验程序、重复测试, 并对检测结果不一致的样品进行测序验证, 保证了方法的可靠性和最终结果的准确性。未来可以通过进一步的比较实验、建立标准化流程和开发闭管检测方法来克服因污染产生检测假阳性的缺点。

WSSV 以潜伏感染和温度敏感性著称^[15]。水温低时 WSSV 可能以低拷贝数存在于宿主体内; 温度上升时迅速增殖并导致流行病爆发。相比 WOA 推荐的巢式 PCR, 本研究开发的高灵敏度方法能够在秋季和越冬期检测到潜伏感染个体, 为及时采取预防措施提供可能。此外, 随机采样检测结果显示克氏原螯虾 WSSV 阳性检出率超过

表 3 不同研究中 WSSV 检测方法的灵敏度比较
Tab. 3 Sensitivity comparison of different WSSV detection methods in studies

建立时间 year of development	检测技术 detection technology	模板类型 type of PCR template	灵敏度 sensitivity	靶标序列信息 target sequence and fragment size
2023*	一步式 PCR One step PCR	混合, 质粒 mixed, plasmid	0.82 fg/μL, 1.83 copies/μL	vp19, 196 bp
	WOAH 巢式 PCR WOAHP nested PCR		100 fg/μL, 283 copies/μL	vp28, 1447/941 bp
1996 ^[37]	WOAH 巢式 PCR WOAHP nested PCR	混合 mixed	—	vp28, 1447/941 bp
2003 ^[38]	二温式 PCR two-temperature PCR	混合 mixed	1 pg/μL	/, 306 bp
2004 ^[43]	环介导等温扩增 LAMP	WSSV	1 fg/μL	/
2008 ^[44]	六重实时荧光定量 PCR Six-plex qPCR	质粒 plasmid	5 pg/μL	vp28, 436 bp
2009 ^[18]	TaqMan 实时定量 PCR TaqMan qPCR	质粒 plasmid	5.9 copies/μL	vp24, 154 bp
2009 ^[39]	环介导等温扩增+侧流层析法 LAMP+LFD	混合, 质粒 mixed, plasmid	1 pg/μL, 100 copies/μL	ORF191, /
2011 ^[30]	电容式生物传感器 capacitive biosensor	质粒 plasmid	1 copy/μL	vp19, 390 bp
2011 ^[41]	四重实时荧光定量 PCR Four-plex qPCR	质粒 plasmid	20 fg/μL	vp28, 435 bp
2011 ^[20]	GB 巢式 PCR	质粒 plasmid	10 ³ copies/μL	1221, 982 bp
	WOAH 巢式 PCR		10 ⁴ copies/μL	1447/941 bp
	实时荧光定量 PCR		10 copies/μL	ie1, 69 bp
	GB nested PCR			
	WOAH nested PCR			
	qPCR			
2013 ^[32]	SYBR 实时荧光定量 PCR SYBR qPCR	质粒, 混合 plasmid, Mix	12 copies/sample	vp28, 141 bp
2019 ^[40]	基于 CRISPR 的 SHERLOCK 技术 CRISPR-based SHERLOCK	质粒 plasmid	10 copies/μL	vp108, 158 bp
2022 ^[22]	CSIRO TaqMan 荧光定量 PCR CSIRO TaqMan qPCR WOAH TaqMan 荧光定量 PCR WOAH TaqMan qPCR	混合 mixed	2 copies/μL	vp28, /
2023 ^[33]	酶重组酶扩增 RPA	质粒 plasmid	2.3 copies/μL	vp28, 202 bp

注: *表示本研究数据; 混合表示宿主组织提取的 DNA, 包含宿主 DNA 和病毒 DNA; 质粒表示 WSSV 靶标序列构建的标准载体; WSSV 表示病毒纯化后提取的 DNA.
Note: * indicates data in this study; mixed indicates DNA extracted from host tissue, containing both host DNA and viral DNA; plasmid indicates the standard vector constructed with the WSSV target sequence; WSSV indicates DNA extracted from purified virus.

50%, 与国家疫病监测^[9,14]、兰江风等^[13]和徐日俊等^[5]的研究结果一致。这不仅证实了湖北省主养区 WSSV 感染的普遍性, 也凸显了持续监测的必要性。未来, 我们期望进一步优化本方法, 将其应用于 WSSV 日常监测和疫情预警系统。通过及时发现低水平感染, 可实现 WSSV 相关疾病的“早发现, 早预防”, 减少经济损失, 降低对紧急治疗措施的依赖, 促进克氏原螯虾养殖的绿色健康发展。

4 结论

综上所述, 本研究建立的基于 vp19 基因的一

步式 PCR 方法具有高特异性、高灵敏度、操作简便和成本低廉的优点, 在各个方面都优于 WOAHP 推荐的巢式 PCR 方法。这一创新方法为 WSSV 的早期预警和动态监测提供了高效工具, 尤其适于潜伏感染样品检测。尽管在定量能力和病毒分型方面存在局限, 但该方法为 WSSV 检测提供了新思路。展望未来, 我们计划将此方法应用于更大范围的 WSSV 监测系统, 同时探索将其与定量技术相结合的可能性, 以进一步提升方法的应用价值和实用性。这些努力将有助于增强养殖业对 WSSV 的防控能力, 从而促进克氏原螯虾养殖业的长期健康发展。

参考文献:

- [1] Oficialdegui F J, Sanchez M, Clavero M. One century away from home: how the red swamp crayfish took over the world[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2020, 30(1): 121-135.
- [2] Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2024 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024: 24. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2024 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024: 24.]
- [3] Hu Q, Hu R X, Jin Y L, et al. Isolation, Identification and Pathohistological Observation of *Aeromonas veronii* From *Procambarus clarkii*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(4): 811-818. [胡骞, 胡瑞雪, 金玉立, 等. 克氏原螯虾源维氏气单胞菌的分离鉴定及组织病理学观察[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 811-818.]
- [4] Zhang X M, Wang X H, Yang B, et al. Screening of immunological, physiological and biochemical indices of *Procambarus clarkia* indicating disease caused by bacterial infection[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30(06): 786-798. [张雪梅, 王秀华, 杨冰, 等. 克氏原螯虾病原菌感染发病标志性免疫及生理生化指标的筛选[J]. 中国水产科学, 2023, 30(06): 786-798.]
- [5] Xu R J, Gu Z M, Li L J, et al. A comparative epidemiological study of WSSV infection in *Procambarus clarkii* cultured in pond and paddy field[J]. *China Fisheries*, 2020(06): 63-66. [徐日俊, 顾泽茂, 李莉娟, 等. 池塘与稻田养殖克氏原螯虾感染 WSSV 的流行病学比较研究[J]. 中国水产, 2020(06): 63-66.]
- [6] Zhou T, Wang Z, Yang H, et al. Two new colonial peritrich ciliates (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida) from China: With a note on taxonomic distinction between Epistylididae and Operculariidae[J]. *European Journal of Protistology*, 2019, 70: 17-31.
- [7] Shen G, Zhang X, Gong J, et al. Transcriptomic analysis of *Procambarus clarkii* affected by "Black May" disease[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 21225-21236.
- [8] Liu Z H, Wu T, Wang J J, et al. Isolation, identification and related characteristics analysis of pathogen isolated from red swamp crayfish *Procambarus clarkii* with tail-rotted disease[J]. *Fisheries Science*, 2022, 41(1): 102-109. [刘张淮, 吴霆, 王家军, 等. 克氏原螯虾烂尾病原的分离鉴定及其相关特性分析[J]. 水产科学, 2022, 41(1): 102-109.]
- [9] Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center. 2022 Analysis of major aquatic animal diseases in China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站. 2022 我国水生动物重要疫病状况分析[M]. 中国农业出版社, 2024.]
- [10] Chen Y M, Gu Z M, Li L J, et al. Effects of white spot syndrome virus (WSSV) infection on intestinal flora composition of *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2020, 39(2): 40-46. [陈一铭, 顾泽茂, 李莉娟, 等. 白斑综合征病毒感染对克氏原螯虾肠道菌群的影响[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 40-46.]
- [11] Desrina, Prayitno S B, Verdegem M C, et al. White spot syndrome virus host range and impact on transmission[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2022, 14(4): 1843-1860.
- [12] Millard R, Dong X. Chapter 15 - White spot syndrome virus and disease: Aquaculture Pathophysiology[M]. Academic Press, 2022: 103-115.
- [13] Lan J F, Dai Y J, Lin L. Quantitative analysis of white spot syndrome virus in the tissues of cultured red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 318-325. [兰江风, 代云佳, 林鑫. 养殖克氏原螯虾体内白斑综合征病毒的绝对定量分析[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 318-325.]
- [14] Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center. 2022 Analysis of major aquatic animal diseases in China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 308. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站. 2022 我国水生动物重要疫病状况分析[M]. 中国农业出版社, 2022: 308.]
- [15] Yin B, Yan X, Li S, et al. WSSV latency is maintained by a dynamic balance of host immune factors and disturbed by exposure to bacterial infection and low salinity[J]. *Aquaculture*, 2023, 575: 739747-739757.
- [16] Jiang N, Pan X, Gu Z, et al. Proliferation dynamics of WSSV in crayfish, *Procambarus clarkii*, and the host responses at different temperatures[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(4): 497-510.
- [17] Xu J, Fan Y D, Zhou Y, et al. Rapid detection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii* using conventional and nested PCR[J]. *Freshwater Fisheries*, 2008, 38(06): 52-54. [徐进, 范玉顶, 周勇, 等. 常规 PCR 与巢式 PCR 法快速检测克氏原螯虾白斑综合征病毒(WSSV)[J]. 淡水渔业, 2008, 38(06): 52-54.]
- [18] Jang I, Meng X, Seo H, et al. A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2): 40-45.
- [19] Nunan L M, Lightner D V. Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 171(1): 318-321.
- [20] Xiao G, Li Z, Meng X, et al. Sensitivity comparison of three PCR-based methods for white spot syndrome virus (WSSV) detection[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 667-673.
- [21] Office International Des Épidémiologies O I D É. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. eleventh edition 2024 [M]., 2024. chapter 2.2.8

- [22] Moody N, Mohr P G, Williams L M, et al. Performance characteristics of two real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for the detection of WSSV in clinically diseased and apparently healthy prawns[J]. *Dis Aquat Organ*, 2022, 150: 169-182.
- [23] Sritunyalucksana K, Srisala J, McColl K, et al. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp[J]. *Aquaculture*, 2006, 255(1-4): 95-104.
- [24] Yang F, He J, Lin X, et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(23): 11811-11820.
- [25] Jia R, Zhu C, Zhuang W M, et al. Review of research progress on white spot syndrome virus (WSSV) envelope protein VP19 and VP28[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(5): 870-880. [贾睿, 朱婵, 庄旻敏等. 白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP19 及 VP28 的研究进展[J]. *水产学报*, 2020, 44(5): 870-880.]
- [26] van Hulten M, Reijns M, Vermeesch A, et al. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins[J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83: 257-265.
- [27] Zhou Q, Xu L, Li H, et al. Four major envelope proteins of white spot syndrome virus bind to form a complex[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(9): 4709-4712.
- [28] Li Z, Xu L, Li F, et al. Analysis of white spot syndrome virus envelope protein complexome by two-dimensional blue native/SDS PAGE combined with mass spectrometry[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(7): 1125-1135.
- [29] Krishnan K, Katneni V K, Prabhudas S K, et al. MRF: a tool to overcome the barrier of inconsistent genome annotations and perform comparative genomics studies for the largest animal DNA virus[J]. *Virology Journal*, 2023, 20(1): 72-89.
- [30] Samanman S, Kanatharana P, Chotigeat W, et al. Highly sensitive capacitive biosensor for detecting white spot syndrome virus in shrimp pond water[J]. *Journal of Virology Methods*, 2011, 173(1): 75-84.
- [31] Li W J, Zhou G Q, Zhu F L, et al. Development and preliminary application of a nested PCR assay for the detection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2009, 32(02): 98-102. [李文杰, 周国勤, 朱菲莉, 等. 检测克氏原螯虾白斑综合征病毒 (WSSV) 的巢式 PCR 方法的建立与初步应用[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2009, 32(02): 98-102.]
- [32] Mendoza-Cano F, Sanchez-Paz A. Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the white spot syndrome virus in marine crustaceans[J]. *Virol J*, 2013, 10: 186.
- [33] Zhang L, Wang Y, Hu J, et al. Rapid detection of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei* based on real-time enzymatic recombinase amplification[J]. *Aquaculture*, 2023, 566: 739196-739202.
- [34] Pan X, Zhang Y, Sha X, et al. Highly sensitive detection of low-abundance white spot syndrome virus by a pre-amplification PCR method[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(3): 471-479.
- [35] Park J Y, Kim K I, Joh S J, et al. Development of a highly sensitive single-tube nested PCR protocol directed toward the sequence of virion envelope proteins for detection of white spot syndrome virus infection: Improvement of PCR methods for detection of WSSV[J]. *Aquaculture*, 2013, 410-411: 225-229.
- [36] Meng X, Zeng Y. Exploration and application of detection and genotyping standards for white spot syndrome virus[J]. *Aquaculture*, 2024, 579: 740256-740262.
- [37] Lo C F, Leu J, Ho C H, et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1996, 25(1-2): 133-141.
- [38] Pang Y, Xie Z, Xie Z. Development and amplification of two-temperature PCR for the detection of white spot syndrome virus in penaeid shrimp[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2003, 39(4): 43-45. [庞耀珊, 谢芝勋, 谢志勤, 等. 二温式 PCR 检测对虾白斑综合征病毒[J]. *中国兽医杂志*, 2003, 39(04): 43-45.]
- [39] Jaroenram W, Kiatpathomchai W, Flegel T W. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2009, 23(2): 65-70.
- [40] Sullivan T J, Dhar A K, Cruz-Flores R, et al. Rapid, CRISPR-based, field-deployable detection of white spot syndrome virus in shrimp[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 19702-19708.
- [41] Wu R Q, Dan X M, Liu Z Y, et al. A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four viruses of shrimp[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(3): 438-445. [乌日琴, 但学明, 刘中勇, 等. 多重 RT-PCR 体系检测 4 种虾病毒的方法[J]. *水产学报*, 2011, 35(3): 438-445.]
- [42] Claydon K, Cullen B, Owens L. OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 62(3): 265-268.
- [43] Kono T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 115(1): 59-65.
- [44] Khawsak P, Deesukon W, Chaivisuthangkura P, et al. Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of six viruses of penaeid shrimp[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2008, 22(3): 177-183.

Establishment of a highly sensitive one-step PCR assay for detecting white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii* based on the *vp19* gene

CHEN Nan^{1,3,4,5}, LUO Xiaohong^{1,2,3,4,5}, LIAO Mingcong^{1,2,3,4,5}, HU Ruixue^{1,2,3,4,5}, LI Dan^{1,3,4,5}, GU Zemao^{1,2,3,4,5*}

1. College of Fisheries, Shuangshui Shuanglu Institute, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China;

3. National Aquatic Animal Diseases Para-reference Laboratory (Huazhong Agricultural University), Wuhan 430070, China;

4. Hubei Engineering Technology Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China;

5. Engineering Research Center of Green development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) poses a significant threat to red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) aquaculture, a major crustacean industry in China. This virus' ability to remain latent in hosts and its complex transmission pathways make prevention and early detection crucial. However, current diagnostic methods, including the WOA-recommended nested PCR, have limitations in speed, sensitivity, and convenience. This study aimed to develop a rapid, sensitive, and specific one-step conventional PCR assay for WSSV detection in *P. clarkii*, addressing the need for improved surveillance and early intervention strategies. In our study, specific primers (V1) were designed to target a 196 bp region within the WSSV *vp19* gene. The assay's analytical specificity was rigorously evaluated using DNA/cDNA from 10 different pathogens in crayfish (5 viruses and 5 bacteria). To determine analytical sensitivity, serial dilutions of a recombinant plasmid (pMD19T-V1) containing the *vp19* target sequence were employed. WOA recommended TaqMan qPCR was used as the reference method in performance parameters evaluation. The assay's performances parameters including analytical specificity (ASp), analytical sensitivity (ASe), diagnostic specificity (DSp), diagnostic sensitivity (DSe), and positive rate between the one-step PCR and nested PCR were compared. Results showed that developed one-step PCR assay demonstrated high ASp for WSSV detection, no cross-reactivity was detected against other 9 common pathogen samples. ASe tests revealed impressive detection limits: using the WSSV standard plasmid as a template, the theoretical minimum detection limit was 1.83 copies/ μ L, while with mixed DNA from field samples, the limit reached 0.82 fg/ μ L. Notably, in both scenarios, this method outperformed the WOA-recommended nested PCR in terms of sensitivity. Comparison of diagnostic performance on 317 field samples showed that the one-step PCR achieved a DSp of 97.01% and a DSe of 95.08%, both superior to the WOA-recommended nested PCR. In conclusion, this study introduces an innovative one-step PCR method for WSSV detection in *P. clarkii*, based on the *vp19* gene, achieving a remarkable detection limit of 1.83 copies/ μ L while maintaining simplicity and cost-effectiveness. Outperforming the WOA-recommended nested PCR, this highly sensitive approach excels in identifying latent infections and facilitating epidemiological investigations. Its ability to detect low-level infections enhances its versatility for both routine screening and research, providing a powerful tool for year-round dynamic monitoring and early warning of WSSV. While acknowledging current limitations, this groundbreaking method lays a solid foundation for future advancements in aquatic pathogen detection. By combining accuracy, sensitivity, and practicality, this research represents a significant step forward in WSSV detection technology, with far-reaching implications for the sustainable development of crayfish aquaculture in both scientific and economic contexts.

Key words: *Procambarus clarkii*; white spot syndrome virus; VP19; one-step PCR; specificity; sensitivity.

Corresponding author: GU Zemao. E-mail: guzemao@mail-hzau.edu.cn