

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00667

白斑综合征病毒(WSSV)3种PCR检测方法的灵敏度比较

肖广侠^{1,2}, 李战军^{1,3}, 孟宪红¹, 张庆文¹, 罗坤¹, 孔杰¹

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 200090;
3. 大连海洋大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 为了探讨不同PCR检测方法的灵敏度, 分别利用TaqMan实时定量PCR、世界动物卫生组织(OIE)公布的巢式PCR引物(简称OIE)、黄海水产研究所种质资源与工程育种研究室(GB)设计的引物(简称GB)及2种巢式PCR对应的一步法PCR, 对具有不同白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)含量的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)样品进行检测。结果显示, 当使用已知病毒含量的标准品进行检测时, TaqMan实时定量PCR方法可以检测到10个WSSV拷贝; OIE巢式PCR与GB巢式PCR方法分别可检测到 10^4 和 10^3 个WSSV拷贝; 单独使用OIE巢式PCR的外引物和内引物扩增时, 分别可检测到 5×10^4 和 2.5×10^4 个WSSV拷贝; 单独使用GB巢式PCR的外引物和内引物进行一步法PCR扩增时, 分别可检测到 10^4 和 5×10^3 个WSSV拷贝。使用上述PCR方法分别对44份未知WSSV含量的样品进行验证, 定量PCR方法检测阳性率为84.09%, OIE巢式PCR与GB巢式PCR方法检测的阳性率分别为18.18%和27.27%; 单独使用OIE巢式PCR的外引物和内引物扩增检测的阳性率均为15.91%; 单独使用GB巢式PCR的外引物和内引物扩增检测的阳性率分别为18.18%和20.45%。根据以上结果, PCR方法检测WSSV的灵敏度由高到低依次为: 定量PCR、巢式PCR、一步法PCR。

关键词: PCR检测法; 白斑综合征病毒(WSSV); 灵敏度

中图分类号: S945

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0667-07

白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)是1993年世界范围内对虾暴发性流行病的主要病原, 迄今仍然没有能有效控制WSSV疫情的技术措施。国内外学者普遍认为, 综合预防是相对有效的方法, 即尽早发现疾病并采取诸多措施阻止病毒传播。因此, 建立灵敏、准确、快捷、方便的WSSV病原检测方法是减少白斑综合征发生和危害的重要途径。目前WSSV病原的检测方法主要有目视观察法、组织学方法、电子显微技术、生化检验法、免疫学方法和分子生物学方法等^[1]。其中分子生物学方法中的PCR检测方法与传统诊断方法相比, 具有敏感性和特异性

高、简单、快速等优点, 已广泛应用于多种病原的诊断^[2-7]。由于PCR引物及检测手段众多, 各种方法检测的结果差别很大。针对这种情况, 本研究比较了3种常用的PCR方法(TaqMan定量PCR、巢式PCR和一步法PCR)在检测WSSV中的灵敏度, 以期对对虾WSSV的早期诊断提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为经口感染WSSV 10 d后依然存活的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*), 共计

收稿日期: 2010-08-26; 修订日期: 2010-10-31.

基金项目: 国家863计划项目(2010AA10A401); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2009DQ002); 农业部公益性行业科研专项(200803012); 中央级公益性科研院所基本科研业务费2009年专项资金项目(2009-chb-04).

作者简介: 肖广侠(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种工作. E-mail: gxixiao@163.com

通信作者: 孔杰, 研究员, 博士生导师. Tel: 0532-85823291-801; E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

44 尾(体长 3~5 cm, 体质量 3 g 左右), 剪取附肢于-80 °C 冰箱中保存, 待检测。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 利用全血/组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒(Biomed 博迈德生物, 北京)提取上述 44 尾未知 WSSV 含量的中国明对虾样品的基因组 DNA, 使用 Amersham Bioscience Gene Quant pro 紫外分光光度计测定 DNA 浓度。

1.2.2 TaqMan 实时定量 PCR 检测方法 WSSV 定量检测参考 Durand 等^[8]的 TaqMan 荧光定量方法, 目的片段长度为 69 bp。定量 PCR 反应体系: 1 倍体积的 Perfect Real Time premix (RR039A, TaKaRa), 正反向引物各 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 探针 0.125 $\mu\text{mol/L}$, 病毒 DNA 50~100 ng, 加灭菌双蒸水至 20 μL 。标准品为含有目的片段的重组质粒 PUCm-T/WSSV69, 用作阳性对照及标准曲线的构建。反应程序: 94 °C 10 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。引物及探针由大连宝生物(TaKaRa)合成。反应在 Applied Biosystems 7500 实时定量 PCR 仪进行, 每个样品平行检测 3 次。

1.2.3 标准模板的制备 选取 3 个由 TaqMan 定量 PCR 确定 WSSV 拷贝数的 DNA 样品, 分别使用灭菌双蒸水逐级稀释制作成 3 个系列的标准模板, 即系列标准模板 1 ng DNA 中含有 10^6 、 10^5 、 7.5×10^4 、 5×10^4 、 2.5×10^4 、 10^4 、 5×10^3 、 10^3 、500、100、50、10、5 个 WSSV 拷贝, -80 °C 冰箱中保存, 待检测。

1.2.4 巢式 PCR 检测方法 分别参照世界动物卫生组织(Office International Des Epizooties, OIE)巢式 PCR 方法^[2]和黄海水产研究所种质资源与工程育种研究室(Genetic Resource and Breeding Lab, GB)设计的巢式 PCR 方法^[5]进行标准模板和未知样品的 PCR 检测, 每个样品平行检测 2 次。OIE 巢式 PCR 外引物目的片段为 1 447 bp, 内引物目的片段为 941 bp; GB 巢式 PCR 外引物目的片段为 1 221 bp, 内引物目的片段为 982 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成, DNA 聚合酶由伯锐公司生产, 扩增在 PTC-200 型 PCR 仪进行(M J Research Inc, Waltham, MA, USA)。

1.2.5 一步法 PCR 检测方法 分别使用 OIE 巢式 PCR 和 GB 巢式 PCR 的外引物和内引物进行标准模板和未知样品的 PCR 检测, PCR 反应体系及反应程序同上。

1.2.6 PCR 反应产物检测方法 定量 PCR 反应结束后, 利用 SDS(Sequence Detection System) version 1.4 软件对每个样品的 3 个平行数据进行分析, 取其平均值作为 WSSV 含量值。巢式 PCR 和一步法 PCR 反应产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测: 取 5 μL PCR 反应产物, 在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 电压 3 V/cm 左右, 时间 40 min, 用 DL2000 作为 DNA 分子量标记, 在 BIO-RAD POWER PAC 300 紫外透射仪上观察并照像。

2 结果与分析

2.1 标准模板检测结果

2.1.1 TaqMan 定量 PCR 检测结果 利用含 69 bp 目的片段的质粒标准品构建 TaqMan 实时定量 PCR 的标准曲线, 当 $C_t < 35$ 时具有标准 S 型扩增曲线(相关系数 r 为 0.993 9, 斜率为-3.755 2), 可以检测到荧光信号的范围为 $10 \sim 10^6$ 个 WSSV 拷贝。

2.1.2 巢式 PCR 检测结果 利用 OIE 巢式 PCR 方法对标准模板进行扩增, 在含有 $10^6 \sim 10^4$ 个 WSSV 模板拷贝数的 PCR 反应体系中(图 1A, 泳道 1-8), 都出现明显的大小为 941 bp 的目的片段, 在 $5 \times 10^3 \sim 5$ 个 WSSV 模板拷贝范围内(图 1A, 泳道 9-22)未出现目的片段, 表明 OIE 巢式 PCR 的最低检测极限为 10^4 个 WSSV 拷贝。利用 GB 巢式 PCR 方法对标准模板进行扩增, 在 $10^6 \sim 10^3$ 个 WSSV 模板拷贝范围内(图 1B, 泳道 1-12)出现明显大小为 982 bp 的目的片段; 在 500~5 个 WSSV 模板拷贝范围(图 1B, 泳道 13-22)未出现目的片段, 表明 GB 巢式 PCR 的最低检测极限为 10^3 个 WSSV 拷贝。3 个系列的标准模板重复检测结果一致。

2.1.3 一步法 PCR 检测结果 单独使用 OIE 外引物对标准模板进行扩增, 在 $10^6 \sim 5 \times 10^4$ 个 WSSV 拷贝范围内(图 2A, 泳道 1-6)出现明显的大小为

1 447 bp 的目的片段, 并且目的片段的亮度越来越弱, 亮暗梯度比较明显; 在 $10^4 \sim 5$ 个 WSSV 拷贝范围内(图 2A, 泳道 7-22)未出现目的片段。单独使用 GB 外引物对标准模板进行扩增, 在 $10^6 \sim 10^4$ 个 WSSV 拷贝范围内(图 2B, 泳道 1-8)都出现明显的大小为 1 221 bp 的目的片段, 随着标准模

板 DNA 浓度的降低, 目的片段的亮度越来越弱; 在 $5 \times 10^3 \sim 5$ 个 WSSV 拷贝范围内(图 2B, 泳道 9-22)未出现目的片段。以上结果表明 OIE 外引物扩增的最低检测极限为 5×10^4 个 WSSV 拷贝, GB 外引物扩增最低检测极限为 10^4 个 WSSV 拷贝。

单独使用 OIE 内引物对标准模板进行扩增,

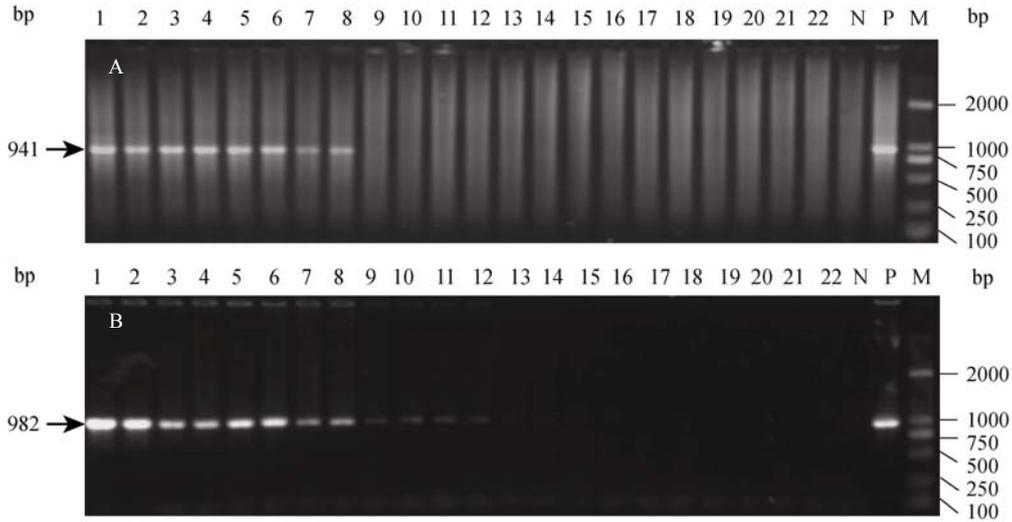


图 1 OIE 巢式 PCR (A)和 GB 巢式 PCR (B) 扩增不同拷贝数 WSSV 模板的电泳图

1-2: 10^6 ; 3-4: 10^5 ; 5-6: 5×10^4 ; 7-8: 10^4 ; 9-10: 5×10^3 ; 11-12: 10^3 ; 13-14: 500; 15-16: 100; 17-18: 50; 19-20: 10; 21-22: 5; N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: DL2000.

Fig.1 Amplification of WSSV plates of different copies with OIE nested PCR(A) and GB nested PCR(B) method
1-2: 10^6 ; 3-4: 10^5 ; 5-6: 5×10^4 ; 7-8: 10^4 ; 9-10: 5×10^3 ; 11-12: 10^3 ; 13-14: 500; 15-16: 100; 17-18: 50; 19-20: 10; 21-22: 5; N: negative control; P: positive control; M: DL2000.

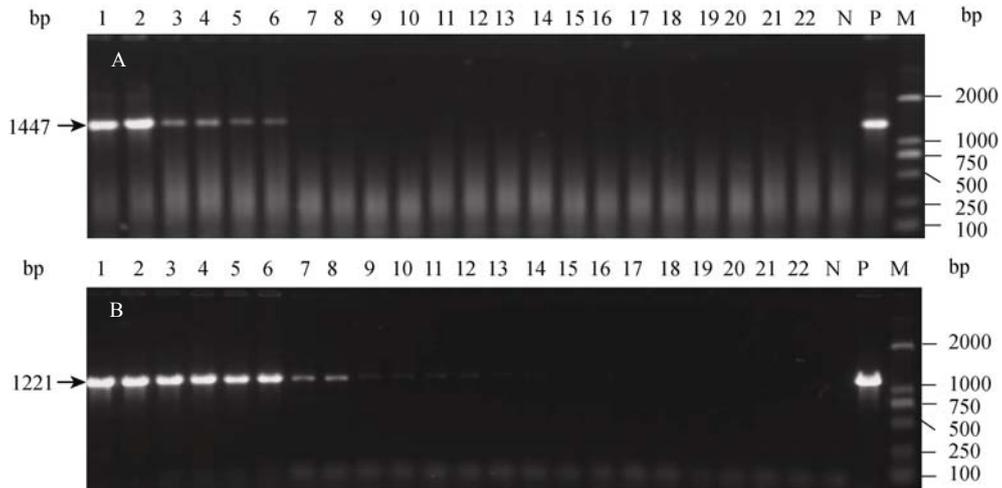


图 2 OIE 巢式 PCR 外引物(A)和 GB 巢式 PCR 外引物(B)扩增不同拷贝数 WSSV 模板的电泳图

1-2: 10^6 ; 3-4: 10^5 ; 5-6: 5×10^4 ; 7-8: 10^4 ; 9-10: 5×10^3 ; 11-12: 10^3 ; 13-14: 500; 15-16: 100; 17-18: 50; 19-20: 10; 21-22: 5; N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: DL2000.

Fig.2 Amplification of WSSV plates of different copies with OIE nested PCR (A) and GB nested PCR(B) outer primers
1-2: 10^6 copies; 3-4: 10^5 copies; 5-6: 5×10^4 copies; 7-8: 10^4 copies; 9-10: 5×10^3 copies; 11-12: 10^3 copies; 13-14: 500 copies; 15-16: 100 copies; 17-18: 50 copies; 19-20: 10 copies; 21-22: 5 copies; N: negative control; P: positive control; M: DL2000.

在 $10^6 \sim 2.5 \times 10^4$ 个 WSSV 拷贝范围内(图 3A, 泳道 1-8)都出现明显的大小为 941 bp 的目的片段, 在 $5 \times 10^3 \sim 5$ 个 WSSV 拷贝范围内(图 3A, 泳道 9-22)未出现目的片段。单独使用 GB 内引物对标准模板进行扩增, 在 $10^6 \sim 5 \times 10^3$ 个 WSSV 拷贝范围内(图 3B 泳道 1-10)都出现明显的大小为 982 bp 的目的片段, 并且目的片段的亮度越来越弱, 亮暗梯度比较明显, 在 $10^3 \sim 5$ 个 WSSV 拷贝

范围内(图 3B, 泳道 11-22)未出现目的片段。以上结果表明 OIE 内引物扩增的最低检测极限为 2.5×10^4 个 WSSV 拷贝, GB 内引物扩增的最低检测极限为 5×10^3 个 WSSV 拷贝。

2.2 未知样品检测结果

表 1 为 TaqMan 实时定量 PCR、OIE 巢式 PCR、GB 巢式 PCR 及一步法 PCR 对 44 份未知样品的检测结果, 可见 TaqMan 实时定量 PCR 检测的阳



图 3 OIE 巢式 PCR 内引物(A)和 GB 巢式 PCR 内引物(B) 扩增不同拷贝数 WSSV 模板的电泳图

1-2: 10^6 ; 3-4: 2.5×10^5 ; 5-6: 7.5×10^4 ; 7-8: 2.5×10^4 ; 9-10: 5×10^3 ; 11-12: 10^3 ; 13-14: 500; 15-16: 100; 17-18: 50; 19-20: 10; 21-22: 5; N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: DL2000.

Fig.3 Amplification of WSSV plates of different copies with OIE nested PCR (A) and GB nested PCR(B) inner primer 1-2: 10^6 copies; 3-4: 2.5×10^5 copies; 5-6: 7.5×10^4 copies; 7-8: 2.5×10^4 copies; 9-10: 5×10^3 copies; 11-12: 10^3 copies; 13-14: 500 copies; 15-16: 100 copies; 17-18: 50 copies; 19-20: 10 copies; 21-22: 5 copies; N: negative control; P: positive control; M: DL2000.

表 1 3 种 PCR 方法灵敏度比较

Tab. 1 Sensitivity of three different PCR-based methods

PCR 方法 PCR-based methods	目的片段大小/bp target fragment copy	灵敏度/WSSV 拷贝 sensitivity	阳性率/% positive ratio	
TaqMan 实时定量 PCR TaqMan real-time quantitative PCR	69	10	84.09	
巢式 PCR nested PCR	OIE 巢式 PCR OIE nested PCR	941	10^4	18.18
	GB 巢式 PCR GB nested PCR	982	10^3	27.27
一步法 PCR one-step PCR	OIE 外引物扩增 outer primer amplification of OIE nested PCR	1 447	5×10^4	15.91
	OIE 内引物扩增 inner primer amplification of OIE nested PCR	941	2.5×10^4	15.91
	GB 外引物扩增 outer primer amplification of GB nested PCR	1 221	10^4	18.18
	GB 内引物扩增 inner primer amplification of GB nested PCR	982	5×10^3	20.45

性率为84.09%, OIE和GB巢式PCR检测的阳性率分别为18.18%和27.27%, 一步法PCR中, 单独使用OIE外引物、OIE内引物、GB外引物和GB内引物时, 其检出阳性率分别为15.91%、15.91%、18.18%和20.45%。

3 讨论

3.1 不同PCR检测方法灵敏度的差异分析

PCR以其特异性、有效性、忠实性而被应用于对虾病毒病的快速检测^[2-3, 9-10], 其中定量PCR法是一种检测病毒的新方法, 其灵敏度和特异性均高于一步法PCR方法, 而巢式PCR比一步法PCR的灵敏度、特异性更强^[4, 11-16]。本实验中TaqMan定量PCR检测WSSV的灵敏度是OIE巢式PCR的1000倍, 是GB巢式PCR的100倍, 检测阳性率由高到低依次为: Taqman定量PCR、GB巢式PCR、GB内引物PCR、OIE巢式PCR/GB外引物PCR以及OIE内引物/OIE外引物PCR。检测结果表明, 定量PCR方法灵敏度最高, 巢式PCR方法次之, 一步法PCR方法灵敏度最低。具体分析各种PCR方法灵敏度差异的原因, 主要有以下两点:

(1) 各种PCR方法使用的引物不同, 造成扩增的目的片段大小不同。由于动物组织的病毒在长期保存以及核酸提取过程中, 不可避免地会被分解或断裂成小片段, 因此扩增小片段的PCR方法具有更高的灵敏度。很多学者报道利用不同的引物可以检测出WSSV^[2, 4, 12-14, 17]。Hossain等^[13]利用5对WSSV引物对斑节对虾(*Penaeus monodon*)各期幼体进行WSSV检测, 扩增目的片段大小在310~2310bp范围内。检测结果表明, 目的片段为310bp时检测的阳性率为100%, 而扩增目的片段为486bp、775bp、1441bp以及2310bp时检测出的阳性率仅为20%。Lo等^[4]和谢数涛等^[11]分别采用巢式PCR对WSSV进行检测, 结果显示其灵敏度大约为一步法PCR的 10^4 倍。李文杰等^[12]在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)中建立了检测WSSV的巢式PCR方法, 其灵敏度比一步法PCR提高了 10^3 倍。Sritunyalucksanaa等^[14]对几种PCR

方法在检测对虾WSSV中的灵敏度进行了比较, 得出OIE巢式PCR可以检测出 10^2 个WSSV拷贝, 当地普通巢式PCR可以检测出 10^3 个WSSV拷贝, 定量PCR可以检测到5个WSSV拷贝。毕道荣等^[16]利用TaqMan定量PCR方法与OIE巢式PCR方法对对虾WSSV进行检测, 结果显示定量PCR可以检测出15个WSSV拷贝, OIE巢式PCR方法可以检测出 1.5×10^4 个WSSV拷贝。以上研究均表明, 目的片段小的PCR方法比目的片段大的PCR方法具有更高的灵敏度。本研究结果表明, 定量PCR灵敏度最高, 可以检测到10个WSSV拷贝, 而OIE巢式PCR和GB巢式PCR灵敏度较低, 仅仅能检测到 10^4 、 10^3 个WSSV拷贝(表1), 与毕道荣等^[16]的检测结果基本一致, 符合以上分析结果。

(2) 各种PCR方法检测扩增目的片段的技术不同。巢式PCR及一步法PCR是通过琼脂糖凝胶电泳及染色观察目的扩增片段, 而定量PCR是通过特定的仪器探测荧光染料的荧光信号, 后者的灵敏度比前者要高。此外, 由于未建立一套标准的模板DNA提取程序, 造成各种PCR方法中使用的模板质量不同, 进而出现不同的检测结果; 实验过程中使用不同公司的试剂与仪器, 也可能对检测结果造成影响, 即便使用同种PCR方法, 得到的检测范围也有可能存在差异。由于以上两点原因, 造成不同PCR方法灵敏度的不同。

3.2 WSSV检测方法的选择

在对虾的各个培育环节尤其是苗种培育阶段进行病原检测, 可以预防对虾疾病发生。对同一个样品, 由于检测方法的不同, 得到的结果可能也不同, 在生产中会起到不同的指导作用。所以在生产或者实验过程中, 必须根据检测WSSV的目的, 选择灵敏度与之相对应的检测方法。

众多研究结果表明, 开展无特定性病原(Specific Pathogen Free, SPF)对虾的研究, 是解决对虾疾病的一种比较好的方法。美国于1989年用凡纳滨对虾开展SPF的生产技术研究, 1991年建立凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)SPF群体并在养殖生产中取得明显效果, SPF虾苗养殖产量比

非 SPF 虾苗高出 30% 以上^[18]。继而法国、澳大利亚、哥伦比亚等国家也相继进行了诸如抗病品种的选育等工作,取得了良好的效果^[2]。国内黄海水产研究所和日照水产研究所合作从 1997 年开始率先进行 SPF 中国明对虾种群选育的研究,连续 6 年的养殖结果也证明了 SPF 对养殖生产具有重要意义^[19]。美国 SPF 对虾培育使用的检测方法是 OIE 巢式 PCR 方法,根据本研究的检测结果,OIE 巢式 PCR 方法检测 WSSV 的灵敏度比 TaqMan 实时定量 PCR 方法低 10^3 倍,如果在培育过程中使用定量 PCR 方法,则很可能出现不同的检测结果。在 SPF 培育过程中使用的检测方法灵敏度越高,则培育成的 SPF 对虾也越具有可信度,因此在培育 SPF 对虾或者其他对检测 WSSV 灵敏度要求高的生产或者实验中,使用定量 PCR 比较合适。

从 PCR 方法检测的实际应用上考虑,定量 PCR 方法检测样品费用昂贵,并且 WSSV 携带量在一定的范围内,对虾是处于隐性感染状态,并不暴发白斑综合征病毒病^[20]。Durand 等^[8]研究表明,对虾注射 $10^3 \sim 10^4$ 个 WSSV 拷贝不能引起对虾的死亡,注射 $10^4 \sim 10^5$ 个 WSSV 拷贝引起对虾的急性死亡。徐丽美等^[21]收集了 6 批共 134 尾不同感染程度的对虾样品,检测结果初步确定了白斑综合征病毒病暴发的临界值为每毫克组织含 10^3 个 WSBV 粒子,而本实验中 GB 巢式 PCR 的检测灵敏度为 10^3 个 WSSV 拷贝,因此可以利用 GB 巢式 PCR 提前对对虾样品进行检测,预测白斑综合征病毒病的暴发。Withyachumnarnkul^[22]利用巢式 PCR 对泰国南部 188 个斑节对虾养殖池的苗种进行 WSSV 检测,结果显示检测阳性的苗种生长后期暴发 WSSV 疾病的概率是检测阴性苗种的 3 倍,因此剔除检测阳性的对虾苗种,可以使对虾获得更高的产量。所以一般在生产或者实验过程中,如果仅仅为了预测白斑综合征的暴发或者检测对虾感染 WSSV 的情况,则选用费用较低、仪器比较简单的巢式 PCR 方法比较合适。

从检测时间上考虑,巢式 PCR 方法需要 2 次扩增和 2 次电泳约 8 h,而定量 PCR 仅需要操作 2 个小时,1 次可以进行 96 个样品的检测,反应结

束后可立即观察结果。因此只有在需要准确定量出对虾所携带的 WSSV 含量或者短时间内检测出大批量样品 WSSV 含量的情况下,使用定量 PCR 方法比较合适,如进出口岸对虾的快速检验检疫。

4 结论

本研究比较了 3 种有代表性的检测 WSSV 的 PCR 方法的灵敏度,即 TaqMan 实时定量 PCR、巢式 PCR 及一步法 PCR,灵敏度由高到低依次为: TaqMan 定量 PCR、巢式 PCR、一步法 PCR。由于使用的引物与目的片段的检测手段不同,造成各种 PCR 方法灵敏度的差异。在生产或者实验中必须根据检测目的,选择灵敏度与之相对应的 WSSV 检测方法。因此,本实验为白斑综合征早期诊断和健康养殖提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 郑天伦,王国良. 对虾白斑综合征病毒的诊断和检测[J]. 海洋湖沼通报, 2002(3): 65-70.
- [2] Lo C F, Ho C H, Peng S E, et al. White spot syndrome baculovirus(WSBV)detected in cultured and captured shrimps, crabs and other arthropods[J]. Dis Aquat Org, 1996, 27: 215-225.
- [3] Takahashi Y, Itami T, Maeda M, et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus(SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius[J]. Fish Dis, 1996, 19: 399-403.
- [4] Lo C F, Ho C H, Peng S E, et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome(WSBV)in penaeid shrimps using polymerase chain reaction[J]. Dis Aquat Org, 1997, 32(2): 133-141.
- [5] 邓灯,张庆文,王伟继,等. 中国对虾几个产卵场群体携带白斑综合征病毒状况调查[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 74-78.
- [6] Tang K F J, Lightner D V. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction[J]. Aquaculture, 2000, 189: 11-21.
- [7] 吕玲,何建国,谢数涛,等. 白斑综合症杆状病毒(WSBV) PCR 检测方法的改进及应用[J]. 热带海洋, 2000, 19(2): 90-97.
- [8] Durand S V, Lightner D V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp[J]. Fish Dis, 2002, 25: 381-389.
- [9] 战文斌,邢婧,王远红,等. 聚合酶链反应(PCR)检测养殖

- 对虾的白斑病病毒(WSSV)感染[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 51-54.
- [10] 周优, 岳志芹, 梁成珠, 等. 常规 PCR、实时定量 PCR 检测传染性皮下及造血器官坏死病毒的效果分析[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(2): 90-96.
- [11] 谢数涛, 何建国, 杨晓明, 等. 套式 PCR 检测斑节对虾白斑症病毒(WSSV)[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 220-224.
- [12] 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(2): 98-102.
- [13] Hossain M S, Otta S K, Chakraborty A, et al. Detection of WSSV in cultured shrimps, captured brooders, shrimp post-larvae and water samples in Bangladesh by PCR using different primers[J]. Aquaculture, 2004, 237(1-4): 59-71.
- [14] Sritunyalucksana K, Srisalaa 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.
- [15] 夏春, 黄健. PCR 法检测对虾皮下和造血器官坏死杆状病毒[J]. 微生物学报, 1999, 39(2): 171-176.
- [16] 毕道荣, 岳志芹, 梁成珠, 等. 实时定量 PCR 快速检测对虾白斑综合征病毒[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2009, 40(1): 54-58.
- [17] 刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 暴发性流行性病原对中国对虾亲虾人工感染及对子代影响的 PCR 检测[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 139-144.
- [18] Wyban J A, Swingle J S, Sweeney J N, et al. Specific pathogen free *Penaeus vannamei* [J]. World Aquac, 1993, 24: 39-45.
- [19] 李健, 牟乃海, 孙修涛, 等. 无特定病原中国对虾种群选育的研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(12): 31-33.
- [20] 陈信忠, 任聪, 龚艳清, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测对虾白斑综合征病毒[J]. 检验检疫科学, 2009, 19(2): 7-11.
- [21] 徐丽美, 杨丰. 利用定量 PCR 方法研究对虾白斑杆状病毒感染与发病的关系[J]. 高技术通讯, 2001, 11(12): 9-11.
- [22] Withyachumnarnkul B. Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or-negative for white-spot syndrome virus (WSSV)[J]. Fish Dis, 1999, 39: 21-27.

Sensitivity comparison of three PCR-based methods for white spot syndrome virus (WSSV) detection

XIAO Guangxia^{1,2}, LI Zhanjun^{1,3}, MENG Xianhong¹, ZHANG Qingwen¹, LUO Kun¹, KONG Jie¹

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

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

Abstract: In order to explore the limitations of different PCR methods, we compared the sensitivity of three PCR methods, including TaqMan real-time PCR, Office International Des Epizooties-designed (OIE) and Genetic resource and Breeding Lab of Yellow Sea Fisheries Research Institute-designed nested PCR (GB) and one-step PCR methods, with standard *Fenneropenaeus chinensis* samples with serial known WSSV load. As a result, TaqMan real-time PCR could detect with certainty 10^1 WSSV copies per reaction, while 10^4 and 10^3 copies were needed for OIE and GB nested PCR; 5×10^4 and 2.5×10^4 copies were needed for the outer primer and inner primer amplification of OIE nested PCR; 10^4 and 5×10^3 copies were needed for that of GB nested PCR. Forty-four *F. chinensis* samples with unknown WSSV load were tested with these PCR methods to validate the sensitivity. The positive ratio of TaqMan real-time PCR was 84.09%, and those of OIE nested PCR and the GB nested PCR were 18.18% and 27.27%, respectively; the positive ratio of the outer primer and inner primer amplification of OIE nested PCR both were 15.91%; and those of GB nested PCR were 18.18% and 20.45%. According to the results, the sensitivity of PCR methods detecting WSSV from high to low are as follow: TaqMan real-time PCR, nested PCR, one-step PCR. This experiment also provided method-selection strategy and reference data in WSSV diagnose.

Key words: PCR testing method; white spot syndrome virus (WSSV); sensitivity

Corresponding author: KONG Jie. E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn