

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00661

蛙虹彩病毒巢式 PCR 检测方法的建立

张旻, 林祥梅, 江育林

中国检验检疫科学研究院 动植物检疫研究所, 北京 100029

摘要: 蛙虹彩病毒属(*Ranavirus*)病毒宿主广泛, 可以感染爬行类、鱼类和两栖类, 大部分病毒对宿主都有较强的致病性和致死性。为建立一种快速高效的蛙虹彩病毒的检测方法, 本研究利用中华鳖虹彩病毒(Soft-shelled Turtle Iridovirus, STIV)核衣壳蛋白(Major Capsid Protein, MCP) 基因保守区设计内引物和外引物, 建立了特异性检测流行性造血器官坏死病毒(Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus, EHNV)、中华鳖虹彩病毒和虎纹蛙虹彩病毒(Tiger Frog Virus, TFV)的巢式 PCR(巢式 PCR)检测方法, 并制备了重组质粒 pGem-T-S 作为阳性对照标准品。检测限试验结果显示, 该方法可以检测 10^2 拷贝的病毒粒子。而且与传染性造血器官坏死病毒、鲤春病毒、病毒性出血性败血症病毒、斑点叉尾鮰病毒、传染性胰脏坏死病毒、真鲷虹彩病毒、牙鲆弹状病毒以及锦鲤疱疹病毒等其他非蛙虹彩病毒无交叉反应。该体系具有简便、快速、敏感、特异性高、低成本等特点, 为诊断与预防蛙虹彩病毒提供了一项重要的技术手段。

关键词: 蛙虹彩病毒; 中华鳖虹彩病毒; 流行性造血器官坏死病毒; 虎纹蛙虹彩病毒; 巢式 PCR

中图分类号: S947

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0661-06

全世界已经发现的虹彩病毒科(Iridoviridae)病毒超过 60 种, 分属 5 个属: 虹彩病毒属(*Iridovirus*), 绿虹彩病毒属(*Chloriridovirus*), 淋巴囊肿病毒属(*Lymphocystivirus*), 蛙病毒属(*Ranavirus*)和肿大细胞病毒属(*Megalocytivirus*)^[1]。其中蛙虹彩病毒属的病毒宿主广泛, 可感染鱼类、两栖类和爬行类等低等脊椎动物^[2-3]。流行性造血器官坏死病毒(Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus, EHNV)、中华鳖虹彩病毒(Soft-shelled Turtle Iridovirus, STIV)和虎纹蛙病毒(Tiger Frog Virus, TFV)是蛙虹彩病毒属的重要病毒种类, 宿主的感染率和死亡率都很高, 对相应的水产养殖业构成重大威胁。

STIV 是从深圳中华鳖(*Trionyx sinensis*)养殖场患“红脖子病”的中华鳖体内分离的一种虹彩病毒。病毒直径 120~160 nm, 能在 CO、CK、BF-2、EPC 和 FHM 等细胞株上增殖。病毒全基因序列(GenBank access. no. EU627010) 105 890 bp, 包括 105 个开放读码框(Open Reading Frames, ORFs)^[4]。

人工感染试验证明, 染病中华鳖发病死亡率超过 40%^[5]。EHNV 是 20 世纪 80 年代中期从澳大利亚大量死亡的河鲈(*Perca fluviatilis*)中分离到的虹彩病毒^[6]。EHNV 引起的疾病对河鲈的致死率可达 100%, 其导致的流行性造血器官坏死病是需向世界动物卫生组织(OIE)申报的水生动物疾病之一^[7]。TFV 最初分离自被病毒感染濒死的虎纹蛙(*Rana tigrina*)蝌蚪^[8]。其基因组长度为 105 057 bp, 包括 105 个开放读码框^[9]。感染 TFV 的虎纹蛙蝌蚪死亡率在 95% 以上, 感染 TFV 的成蛙死亡率在 30% 左右^[10]。以上 3 种蛙虹彩病毒分别感染鱼类、爬行类和两栖类水生动物, 均有较高的致死率, 因此, 为了通过早期诊断来预防该病, 需要建立针对这 3 种病毒的快速、简便、准确的诊断技术。

组织培养法一直是蛙虹彩病毒检测的“金标准”方法^[7], 虽然其特异性较强, 但检测步骤复杂, 耗时较长, 且灵敏度偏低。近年来, 针对蛙虹彩病

收稿日期: 2010-07-11; 修订日期: 2010-10-26.

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技项目(2008IK010); 中国检验检疫科学研究院(CAIQ)基础科研业务经费项目(2008JK004).

作者简介: 张旻(1979-), 男, 助理研究员, 博士, 水生生物学专业. E-mail: zhmbiohunter@hotmail.com

毒的检测, 分别建立了 EHN 特异性的间接荧光抗体检测方法、ELISA 检测方法和普通 PCR 检测方法^[11-13], STIV 特异性的双抗夹心 ELISA 检测方法 (DAS-ELISA)^[14], 李惠芳等^[15]建立了一种实时荧光 PCR 检测方法, 同时对 STIV 和 TFV 有高度的特异性。然而这些方法也存在缺点, 如免疫学检测方法检测时间较长, 往往需要 5~6 h 才能出结果, 而且需要制备单克隆抗体, 技术成本较高; 荧光定量 PCR 检测方法所需设备昂贵。

为了建立一种简便、快速、特异、低成本的蛙虹彩病毒检测方法, 本研究建立了巢式 PCR 检测技术, 该检测方法为诊断与预防蛙虹彩病毒提供了一项重要的技术手段。

1 材料与方法

1.1 病毒基因组

TFV 基因组由中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室提供。EHN 和 STIV 病毒株由深圳出入境检验检疫局水生动物病重点实验室提供。其中 EHN 使用 EPC 细胞在 22℃ 扩增, STIV 用 CO 细胞在 25℃ 扩增。待感染 STIV 和 EHN 的细胞病变效应 (CPE) 完全后, 使用 TIANamp Genomic DNA Kit (TIANGEN, China) 提取基因组。传染性造血器官坏死病毒 (Infectious Haematopoietic Necrosis Virus, IHNV) 基因组、鲤春病毒 (Spring Viraemia of Carp Virus, SVCV) 基因组、病毒性出血性败血症病毒 (Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus, VHSV) 基因组、斑点叉尾鲷病毒 (Channel Catfish Virus, CCV) 基因组、传染性胰脏坏死病毒 (Infectious Pancreatic Necrosis Virus, IPNV) 基因组、真鲷虹彩病毒 (Red Sea Bream Iridovirus, RSIV) 基因组、牙鲆弹状病毒 (Hirame Rhabdovirus, HRV) 基因组、锦鲤疱疹病毒 (Koi Herpesvirus, KHV) 基因组均由深圳出入境检验检疫局水生动物病重点实验室提供。传染性脾肾坏死病毒 (Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV) 由中山大学生命科学学院提供。

1.2 引物的设计

利用生物信息学软件 DNASTar 和 Primer

primer5, 根据中华鳖虹彩病毒 (STIV) 核衣壳蛋白 (MCP) 基因的高度保守区设计并合成外引物 P1: 5'-CGCATGTCTTCTGTAACTGG-3' 和 P2: 5'-CGTTACAAGATTGGGAATCC-3', 目的基因大小为 1392 bp; 内引物 P3: 5'-CGCGATAGGCTACTATAACATGG-3' 和 P4: 5'-AGATGTGTGACGTTCTGCACC-3', 目的基因大小为 500 bp。

根据 OIE 水生动物疾病诊断手册^[7], 合成 EHN PCR 检测引物分别为 F: 5'-AAAGACCCGTTTTCAGCAAAC-3' 和 R: 5'-CGCAGTCAAGGCCTTGATGT-3', 目的基因大小 580 bp。所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 巢式 PCR 体系及反应条件

PCR 体系为 20 μL: DNA 模板 0.5 μL, Buffer (含 15 nmol/L Mg^{2+}) 2 μL, 2.5 nmol/L dNTP 各 0.5 μL, 引物 (50 pmol/μL) 各 0.3 μL, 5U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL。反应条件为: 94℃ 预处理 3 min, 进行 30 个循环, 每个循环反应包括 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环完成后, 72℃ 充分延伸 10 min。先使用外引物 P1/P2 进行一扩, 再将一扩产物作为模板, 使用内引物 P3/P4 进行巢式 PCR 扩增。取 5 μL 反应液在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳观察。

1.4 巢式 PCR 反应产物的克隆及阳性对照标准品制备

PCR 第一次扩增的产物, 用 TIANgel Midi Purification Kit (TIANGEN, China) 回收纯化后, 连接入 pGem-T-Easy 载体 (Novigen), 连接产物再转化入大肠杆菌 DH5α 中进行蓝白斑筛选。挑选白色菌落测序, 若目的基因正确连接入重组质粒, 则提取相应阳性质粒, 做为巢式 PCR 检测用阳性对照标准品。

1.5 巢式 PCR 检测方法的检测限测定

将重组质粒标准品以 10 倍倍比稀释至 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 拷贝数的模板, 分别进行巢式 PCR 扩增 (反应体系和条件同 1.3) 和普通 PCR 扩增 (按照文献^[7]的 EHN PCR 检测方法的反应体系和条件, 使用引物 F、R)。反应结束后取 5 μL 反应液进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.6 巢式 PCR 检测方法的交叉反应观测

以 STIV、EHNV、TFV、VHSV、SVCV、IPNV、HRV、IHN、CCV、KHV、RSIV 和 ISKNV 为模板, 分别使用引物 P1/P2, 引物 P3/P4 进行 PCR 扩增, 取 5 μ L 反应液进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 观测交叉反应。

2 结果与分析

2.1 巢式 PCR 扩增结果

分别以 STIV 为模板, 使用外引物 P1/P2 进行一扩, 再将一扩产物作为模板, 使用内引物 P3/P4 进行巢式 PCR 扩增。电泳观察, 病毒的一扩产物在 1400 bp 左右, 二扩产物在 500 bp 左右, 与预期的结果大小相符(图 1A、图 1B)。

2.2 巢式 PCR 检测方法的检测限

用不同稀释倍数的重组质粒标准品进行巢式 PCR 扩增, 经电泳检测, 结果如图 2 所示。随着模板稀释倍数递增, PCR 产物的量逐级递减, 模板稀释到 10^2 个拷贝数, PCR 扩增结果仍为阳性, 模板稀释到 10^1 拷贝数, PCR 扩增结果则为阴性。由此可得出巢式 PCR 扩增能检测出 100 个拷贝数的病毒粒子。

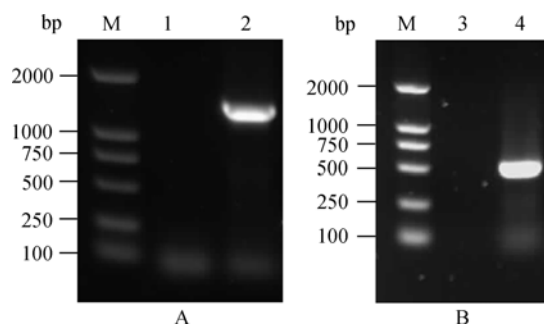


图 1 巢式 PCR 检测结果

A: 引物 P1/P2 的一扩结果. M: Marker DL2000; 1: 阴性对照; 2: STIV 模板扩增产物.

B: 引物 P3/P4 的二扩结果. M: Marker DL2000; 3: 1 号扩增产物为模板的扩增结果; 4: 2 号扩增产物为模板的扩增结果.

Fig. 1 Products of nested PCR

A: products of first PCR used primers of P1/P2. M: marker DL2000; 1: negative control; 2: products.

B: products of nested PCR used primers of P3/P4. M: marker DL2000; 3: products of nested PCR with 1 as template; 4: products of nested PCR with 2 as template.

相比之下, 普通 PCR 检测结果如图 3 所示, 根据文献[7]的 EHNV PCR 检测方法, 目的基因为 580 bp。数据显示最低可以检测到 10^4 拷贝数的病毒粒子, 当数量再降低 2 个数量级后, 则无法扩增出目的基因。因此巢式 PCR 反应的灵敏度是传统普通 PCR 反应的 100 倍左右。

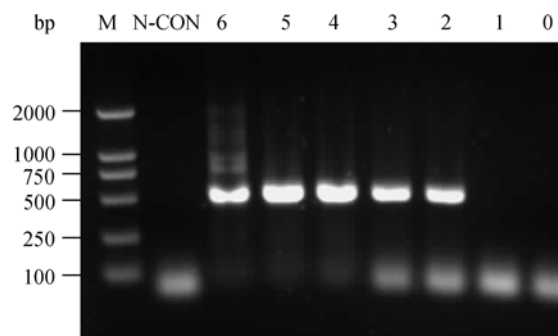


图 2 巢式 PCR 检测限

M: marker DL2000; N-CON: 阴性对照; 0-6: 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 拷贝数标准品模板.

Fig. 2 Detection limit of nested PCR

M: marker DL2000; N-CON: negative control; 0-6: 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 copies of standard recombinant plasmids.

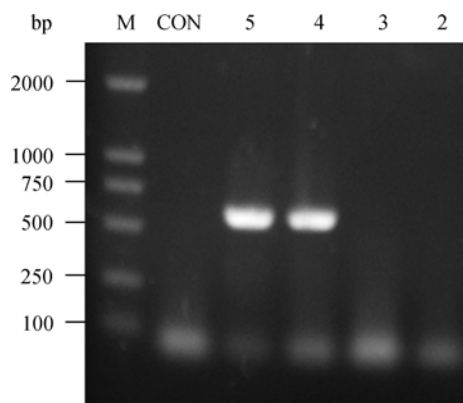


图 3 普通 PCR 检测限

M: marker DL2000; 2-5: 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 拷贝数标准品模板.

Fig. 3 Detection limit of conventional PCR

M: marker DL2000; CON: Negative control; 2-5: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 copies of standard recombinant plasmids.

2.3 巢式 PCR 检测方法的交叉反应

分别以 STIV、EHNV、TFV、VHSV、SVCV、IPNV、HRV、IHN、CCV、KHV、RSIV 和 ISKNV 为模板, 使用外引物 P1/P2, 内引物 P3/P4 进行巢式 PCR 扩增。电泳观察, STIV、EHNV 和 TFV 3 种蛙虹彩病毒一扩和二扩都扩增出与预计大小相

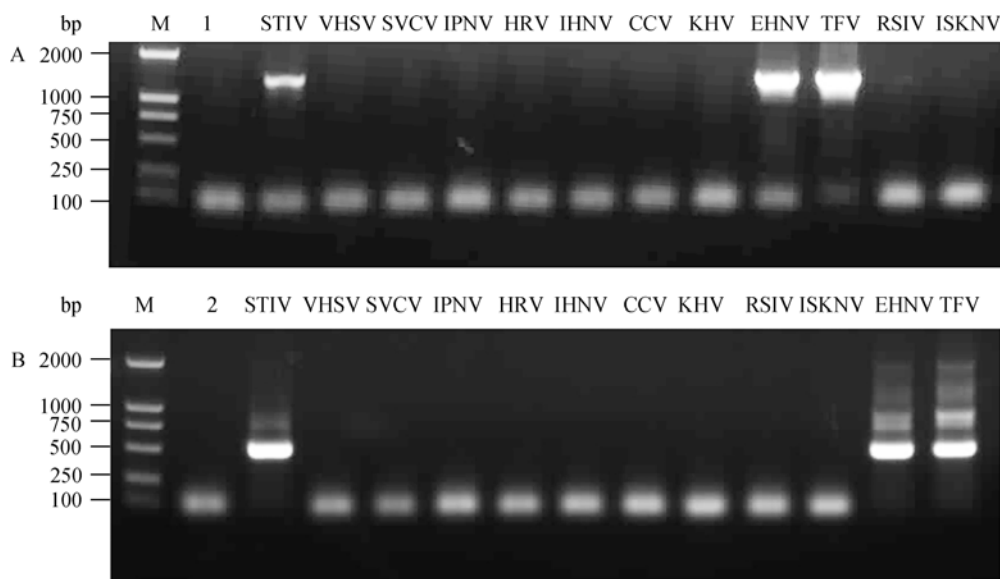


图 4 巢式 PCR 交叉反应检测结果

A: 一扩交叉反应结果. M: marker DL2000; 1: 阴性对照. B: 二扩交叉反应结果. M: marker DL2000; 2: 以 1 产物为模板的扩增结果. STIV: 中华鳖虹彩病毒; VHSV: 病毒性出血性败血症病毒; SVCV: 鲤春病毒; IPNV: 传染性胰脏坏死病毒; HRV: 牙鲆弹状病毒; IHNV: 传染性造血器官坏死病毒; CCV: 斑点叉尾鲷病毒; KHV: 锦鲤疱疹病毒; EHN: 流行性造血器官坏死病毒; TFV: 虎纹蛙病毒; RSIV: 真鲷虹彩病毒; ISKNV: 传染性脾肾坏死病毒.

Fig. 4 Cross reaction of nested PCR

A: results of first PCR. M: Marker DL2000; 1: negative control. B: results of nested PCR. M: Marker DL2000; 2: products of nested PCR with 1 as template. STIV: soft-shelled turtle Iridovirus; VHSV: viral haemorrhagic septicaemia virus; SVCV: spring viraemia of carp virus; IPNV: infectious pancreatic necrosis; HRV: hirame rhabdovirus; IHNV: infectious haematopoietic necrosis; CCV: channel catfish virus; KHV: koi herpesvirus; EHN: epizootic haematopoietic necrosis virus; TFV: tiger frog virus; RSIV: red sea bream iridovirus; ISKNV: infectious spleen and kidney necrosis virus.

符的核酸片段, 而其他病毒则无(图 4)。说明这种巢式 PCR 检测方法可以特异性检测 STIV、EHN 和 TFV 这 3 种蛙虹彩病毒。

3 讨论

本研究建立的巢式 PCR 检测方法主要针对 STIV、EHN 和 TFV 这 3 种蛙病毒属虹彩病毒。此 3 种蛙虹彩病毒分别感染爬行类、鱼类和两栖类, 对宿主都有较强的致病性和致死性^[16]。

EHN 作为必须向 OIE 申报的水产疾病病原, 对河鲈和虹鳟养殖业威胁巨大。TFV 为中国科学家从虎纹蛙中分离的虹彩病毒, 通过其形态结构、理化特性和 MCP 序列推断其为蛙虹彩病毒属的成员^[8,10,17]。STIV 为 1998 年发现的感染中华鳖的虹彩病毒, Chen 等^[5]对 STIV 生物学特性进行了研究, 认为其属于虹彩病毒。Zhao 等^[18]根据对 MCP 的分析, 认为 STIV 属于蛙虹彩病毒属, Huang

等^[4]测定了 STIV 的全基因序列(NC_012637), 与其他蛙虹彩病毒属成员 MCP 基因的序列同源性分析数据显示, STIV 与 TFV 和 EHN 的同源性分别为 98% 和 97%。因此, 根据 STIV MCP 设计的特异性引物理论上也可以特异性检测 TFV 和 EHN。

EHN 监测方法还有电镜观察法、中和试验和间接荧光抗体实验。诊断方法有病毒分离、间接荧光抗体实验、ELISA 检测方法和普通 PCR 扩增法^[14]。Pallister 等^[12]建立了 EHN 特异性的 RT-PCR 检测方法, 以 EHN MCP 保守序列为模板设计引物和探针。该方法最低可以检测到 250 pg 的病毒 DNA, 并与其他病毒没有交叉反应。

另外, 范万红等^[13]在 GenBank 中利用 EHN 的保守序列设计引物, 建立了聚合酶链式反应(PCR)的检测方法, 扩增蛙病毒属主衣壳蛋白(MCP)410 bp 的 DNA 片段。该方法主要用于从患

“红脖子病”的甲鱼中扩增特异性片段, 再进行基因克隆、测序和序列分析, 但并未对该方法的灵敏度和特异性进行测试。李惠芳等^[15]根据 GenBank 中虹彩病毒蛙病毒属 MCP 基因的保守序列, 设计引物和 Taqman 探针, 建立了虹彩病毒蛙病毒属实时荧光 PCR 检测方法。该方法对 STIV 和 TFV 有高度的特异性, 检测总 DNA 灵敏度为 4.5×10^{-3} pg/ μ L, 能否检测 EHNIV 未见报道。Zhang 等^[14]建立了 STIV 特异性的双抗夹心 ELISA 检测方法 (DAS-ELISA), 分别使用筛选的 STIV 单克隆抗体和多克隆抗体作为捕获抗体和检测抗体。此方法检测限最低 10^3 PFU/mL, 检测结果与 PCR 的一致性为 98.4%。

相比之下, 本研究建立的巢式 PCR 技术, 可以同时检测 EHNIV、STIV 和 TFV 3 种蛙虹彩病毒, 最低可以检测 10^2 拷贝数的病毒粒子, 是普通 PCR 的 100 倍。而且与其他非蛙虹彩病毒无交叉反应, 特异性良好。不仅如此, 该方法仅用 3~4 h 即可出检测结果, 耗时低于组织培养法和 ELISA 等方法, 且使用普通 PCR 仪即可完成全部检测, 不需要荧光定量 PCR 仪、电子显微镜等昂贵设备, 引物合成费用也远低于单克隆抗体制备。因此其技术成本大大低于免疫学检测方法和荧光定量 PCR 检测方法。加之该方法操作简便, 更适合大批量样品检测。本研究建立的巢式 PCR 技术为诊断蛙虹彩病毒提供了重要方法。病毒检测中可以作为重要的辅助方法配合文献^[7]的方法筛选感染蛙虹彩病毒的样品。

参考文献:

- [1] Chinchar V G, Essbauer S, He J G, et al. Iridoviridae[M]. Virus taxonomy, VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic Press, 2005: 163-175.
- [2] 萧枫, 张奇亚. 水生动物虹彩病毒的分子生物学[J]. 水生生物学报, 2004, 28(2): 202-206.
- [3] 洪健, 周雪平. ICTV 第八次报告的最新病毒分类系统[J]. 中国病毒学, 2006, 21(1): 84-96.
- [4] Huang Y H, Huang X H, Liu H, et al. Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae[J]. BMC Genom, 2009, 10: 224.
- [5] Chen Z X, Zheng J C, Jiang Y L. A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle [J]. Virus Res, 1999 Sep, 63(1-2): 147-151.
- [6] Langdon J S, Humphrey J D. Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L. in Australia [J]. J Fish Dis, 1987, 10: 289-297.
- [7] 世界动物卫生组织(OIE)鱼病专家委员会. 水生动物疾病诊断手册[M]. 第4版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 94-97.
- [8] Wang X H, Weng S P, He J G. *In vitro* culture and physico-chemical properties of a virus isolated from diseased *Rana tigrina* [J]. J Fish Chin, 2002, 26(4): 363-367.
- [9] He J G, Lü L, Deng M. et al. Sequence analysis of the complete genome of an Iridovirus isolated from the tiger frog [J]. Virology, 2002, 292 (2): 185-197.
- [10] Miao S Y, Wang X H, Ye Q Z, et al. Study on the morphology and pathogenicity of the virus isolated from tiger frog, *Rana tigrina* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2003, 42(4): 69-73.
- [11] Hyatt A D, Eaton B T, Hengstberger S, et al. Epizootic haematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy [J]. J Fish Dis, 1991, 14: 605-617.
- [12] Pallister J, Gould A, Harrison D, et al. Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses [J]. J Fish Dis, 2007, 30: 427-438.
- [13] 范万红, 刘荭, 吕建强, 等. 蛙病毒属 PCR 检测方法的建立及其在甲鱼“红脖子”病病原鉴定中的应用[J]. 检验检疫科学, 2007, 17 (1): 6-9.
- [14] Zhang M, Yang J X, Lin X M, et al. A double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of soft-shelled turtle iridovirus antigens [J]. J Virol Methods, 2010, 167: 193-198.
- [15] 李惠芳, 田飞焱, 吕建强, 等. 虹彩病毒蛙病毒属病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 172-176.
- [16] Chinchar V G. Ranaviruses(family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers[J]. Arch Virol, 2002, 147(3): 447-470.
- [17] Miao S Y, He J G, Zhang L H, et al. Cloning, sequence analysis of the major capsid protein gene of newly isolated iridovirus from *Rana tigrina* [J]. J Fish Chin, 2001, 25 (6): 559-563.
- [18] Zhao Z L, Teng Y, Liu H, et al. Characterization of a late gene encoding for MCP in soft-shelled turtle iridovirus (STIV) [J]. Virus Res, 2007, 129: 135-144.

Development of a nested PCR detection method for *Ranavirus*

ZHANG Min, LIN Xiangmei, JIANG Yuin

The Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029

Abstract: In this study, a nested PCR for detecting soft-shelled turtle iridovirus (STIV), Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) and Tiger frog virus (TFV) was developed. Two pairs of primers were designed based on the sequence of major capsid proteins (MCP) gene of STIV by bioinformatics software DNASTar and primer primer 5. The outer primers were P1 (5'-CGCATGTCTTCTGTAAAC TGG-3') and P2 (5'-CGTTACAAG ATTGGGAATCC-3'). The inner primers were P3 (5'-CGCGATAGGCTACTAT AACATGG -3') and P4 (5'- AGA TGTGTGACGTTCTGCACC -3'). The first round PCR was carried out using PCR Supermix with 40 ng template DNA, 0.6 μ L primers (P1/P2, 50 pmol/ μ L), 2 μ L PCR buffer with $MgCl_2$, 0.5 μ L Tag, and dH_2O was added to reach total volume of 20 μ L. The conditions of PCR were: 94°C for 3 min, then 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 1 min, 30 cycles, followed by an extension reaction at 72°C for 10 min. The nested PCR was carried out by using the same supermix except 0.5 μ L template DNA, the product of first round PCR, 0.6 μ L primers (P3/P4, 50 pmol/ μ L). The conditions were the same with the first round PCR. In this study, a standard recombinant plasmid was produced to in nested PCR assay. The DNA products of first round PCR were extracted, and then cloned into pGem-T Easy vector. After sequencing, the recombinant plasmids named pGem-T-S were used in ranavirus detection as the position control.

Specificity and sensitivity of the nested PCR method were estimated. Data showed that the detection limit of this assay was 10^2 copies for standard recombinant plasmid. It was also found that the specificity of this assay was high without any cross-reactions with DNA from Infectious haematopoietic necrosis (IHN), Spring viraemia of carp virus (SVCV), Viral Haemorrhagic Septicaemia virus (VHSV), Channel catfish virus (CCV), Infectious pancreatic necrosis (IPNV), Red sea bream iridovirus (RSIV), Hiram rhabdovirus (HRV), Koi Herpesvirus (KHV) and Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) provided by Shenzhen Exit-entry Inspection and Quarantine Bureau. Only STIV, EHNV and TFV DNA could result in the same pattern of curves with the two primers.

In summary, all data confirmed that the nested PCR assay is a powerful tool for the detection of ranavirus with high sensitivity and specificity. Moreover, the nested PCR is of low cost and time saving in contrast to ELISA assay, indirect fluorescent antibody tests and immunoelectron microscopy. So the Nest-PCR method could be used to detect these three kinds of ranavirus efficiently.

Key words: *Ranavirus*; soft-shelled turtle iridovirus; epizootic haematopoietic necrosis virus; tiger frog virus; nested PCR