

栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒荧光定量PCR检测方法的建立和应用

任伟成^{1,2}, 王崇明², 孙世春¹, 蔡玉勇^{1,2}, 李赞¹, 于佐安³

(1. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 根据栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 急性病毒性坏死病毒 (Acute viral necrobiotic virus, AVNV) 的基因序列, 选择保守区段, 应用 Beacon Designer 7.0 软件设计了一对能特异性扩增 90 bp 片段的引物和 *Taq* Man 探针, 建立并完善了 AVNV 荧光定量聚合酶链式反应 (Fluorescent quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR) 诊断方法。该方法在 $10^8 \sim 10^2$ 病毒拷贝范围内有较好的线性关系, AVNV 拷贝数 (X) 和循环数 (C_t) 的相关关系为: $\lg X = -0.29 C_t + 13.28$ (相关系数 $R^2 = 0.998$); 检测 AVNV 的灵敏度为 10^2 拷贝; 特异性实验表明只对 AVNV 基因组呈阳性反应。应用 FQ-PCR 对 76 份采自夏季发病期前后的栉孔扇贝样品进行检测, 结果发现 68 份样品检测结果为阳性, 阳性检出率为 89.47%, 高于普通 PCR 的阳性检出率 (80.26%)。研究表明, 该方法快速、灵敏、特异、重复性良好且能实现 AVNV 的定量检测, 对 AVNV 的快速诊断和分子流行病学的调查以及 AVNV 疫情监测具有重要意义。[中国水产科学, 2009, 16 (4): 564–571]

关键词: 栉孔扇贝; AVNV; AVND; 荧光定量聚合酶链式反应 (FQ-PCR); *Taq* Man 探针

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)04-0564-08

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 急性病毒性坏死症病毒 (Acute viral necrobiotic virus, AVNV), 为有囊膜的二十面体结构, 直径为 130 ~ 170 nm, 是引起中国北方沿海养殖栉孔扇贝夏季大规模死亡 (Acute viral necrobiotic disease, AVND) 的病原^[1-5]。栉孔扇贝形成规模化养殖已有 20 多年的历史, 经济效益显著, 在中国海水养殖业中占有重要的地位。但自 1997 年以来, AVNV 病害在夏季连年暴发 (累积死亡率高达 90% 以上), 已给栉孔扇贝养殖业造成了巨大的经济损失, 并严重阻碍了该产业的持续发展, 甚至威胁到现有产业的生存^[6-8]。为有效控制该疾病的暴发流行, 应在栉孔扇贝养殖的各个环节对 AVNV 进行监测, 实现 AVND 的早期诊断, 及时采取有效防控措施, 而选用简单快速、特异、敏感、能准确定量的检测方法是保证有效监测的关键。

近几年, 国内报道了一些 AVNV 疾病的检测方法, 主要包括电子显微镜观察、免疫组化、酶联免疫吸附实验 (ELISA) 等^[4-5, 9-10]。这些方法能特异地检测 AVNV, 但是存在明显的操作繁琐、耗时长、灵敏度和特异性不够理想以及定量不准确等缺点。PCR 技术虽然能提高 AVNV 检测的灵敏度, 但是该方法在操作过程中易导致污染, 出现假阳性的现象。FQ-PCR 作为一种新的核酸定量检测技术, 以其快速、特异性好、灵敏度高、可定量、能避免 PCR 产物污染及自动化程度高等优点, 在人类和牲畜病毒性疾病检疫领域得到了广泛的应用, 并日益显示出其优越性^[11-13]。目前, 在水生生物病毒病的诊断方面的应用也越来越多^[14-16]。本实验根据 AVNV 的基因序列, 设计特异的引物和 *Taq* Man 探针, 建立了 AVNV 的 FQ-PCR 检测方法, 并对该方法的反应条件、特异性、敏感性和重复性等进

收稿日期: 2008-11-12; 修订日期: 2009-02-25.

基金项目: 国家 863 计划项目资助课题 (2006AA100307); 公益性行业 (农业) 科研专项 (nyhyzx07-047); 山东省科技攻关项目 (2004GG2205115).

作者简介: 任伟成 (1981-), 男, 博士研究生, 主要从事水产动物病害学研究. E-mail: renweicheng1981@126.com

通讯作者: 王崇明. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn; Tel: (0532) 85823062

行了研究,以期探讨该方法临床检测应用的可行性,为AVNV的快速诊断和分子流行病学研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集和DNA提取

于2007年7-9月在山东青岛沙子口、山东荣成、山东长岛和辽宁大连大窑湾采集具典型发病症状的栉孔扇贝。AVNV纯化参考Le Deuff^[17]的方法进行。栉孔扇贝组织DNA以及病毒DNA的提取按照天根生化科技有限公司生产的DNA提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit)的方法进行。对虾白斑综合征病毒(WSSV)、对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)、大菱鲆虹彩病毒(TRBIV)和锦鲤疱疹病毒(KHV)样品为本实验室保存、提供。

1.2 DNA片段的克隆及质粒标准品的制备

以AVNV基因组全序列(另文发表)¹⁾为模板,选取保守序列,利用Primer Premier 5.0软件设计普通PCR引物C2(4906~4884): 5'-TCT TTA CCA TGA AGA TAC CCA CC-3'和C6(4192~4211): 5'-GTG CAC GGC TTA CCA TTT TT-3',扩增AVNV,预计片段大小为693 bp。PCR扩增后,纯化阳性PCR产物并将其插入到PGEM-T (Promega)质粒载体中构建重组质粒。将该重组质粒转化到DH5 α 工程菌内增殖,然后提取并进行EcoR I酶切鉴定。

1.3 FQ-PCR引物和Taq Man探针设计

以上述PCR产物的基因序列为模板,利用Beacon Designer 7.0软件设计FQ-PCR特异性引物和Taq Man探针。上游引物序列c-f(4521~4497): 5'-AGC CTT TTA CAG AAT TTT GCA CCT T-3',下游引物序列c-r(4408~4429): 5'-TGT CGC ATG TTA ACC TCG TCT G-3',预计扩增片段大小为90 bp。Taq Man探针序列(4467~4442): 5'-FAM-AGC CAT CAC ATC AGC CAG CAA CGA CT-TAMRA-3',引物和Taq Man探针均委托大连TaKaRa生物工程有限公司合成。

1.4 FQ-PCR反应条件的优化

FQ-PCR反应体系按照荧光定量PCR快速反应试剂盒(大连TaKaRa生物工程有限公司)的说明书配制。以质粒标准品DNA为模板,采用25 μ L体系进行反应条件的优化,其中Taq Man探针主要反应混合液12.5 μ L、质粒DNA 1 μ L。将引物浓度和探针浓度从0.1 μ mol/L至1.0 μ mol/L作倍比连续稀释,互相组合后进行FQ-PCR反应,通过实验结果的分析比较,确定FQ-PCR反应的最佳引物和探针浓度。

FQ-PCR反应在Rotor-Gene 3000扩增仪(澳洲Corbett Research公司)上进行。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C, 4 min预变性; 95 $^{\circ}$ C, 10 s变性; 60 $^{\circ}$ C, 30 s退火延伸,共45个循环。单点荧光检测在60 $^{\circ}$ C进行。

1.5 FQ-PCR的灵敏度实验及标准曲线的建立

质粒标准品DNA用紫外分光光度计测定浓度,10倍系列稀释成 $10^8 \sim 10^1$ 质粒核酸拷贝数进行FQ-PCR,测试检测灵敏度。并根据质粒核酸拷贝数(X)以及对应的 C_t (Cycle threshold)值,利用分析软件得到标准曲线,用于定量分析。质粒核酸拷贝数的计算公式为: 质粒核酸拷贝数=质粒核酸的浓度/(质粒分子碱基数 $\times 10^{-15}$ μ g),其中1对碱基的质量大约为 10^{-15} μ g,质粒核酸拷贝数的单位体积为1 μ L,质粒核酸的浓度单位为 μ g/ μ L。

1.6 FQ-PCR引物和Taq Man探针的特异性实验

按1.1方法提取WSSV、IHHNV、TRBIV和KHV病毒核酸作为模板,以质粒DNA、感染AVNV的扇贝组织DNA、未感染AVNV的扇贝组织DNA和去离子水为对照,进行FQ-PCR,通过观察FQ-PCR扩增曲线和PCR产物凝胶电泳验证FQ-PCR检测AVNV核酸的特异性。

1.7 FQ-PCR的重复性实验

于2007年8月份从山东省青岛、荣成、长岛采集具有典型发病症状的栉孔扇贝样品,取1份AVNV阳性样品,稀释成5个浓度,每个浓度的样品经本方法进行定量分析,然后每个浓度样品分成4份进行同时检测,进行批内重复性测试;选取4份AVNV阳性样品,每份样品分装成4管,-80 $^{\circ}$ C保存。在不同的日期

1) Complete genome sequence analysis of acute viral necrobiotic virus isolated from scallop *Chlamys farreri* in China

分别取每份样品的1管进行检测,进行批间重复性测试。批内和批间重复性通过计算 C_t 值的标准差(SD)和变异系数(CV)进行评价。

1.8 FQ-PCR的检测应用

于2007年7-9月份在山东青岛(070805)、山东荣成(070902)、山东长岛(070823)和辽宁大连(070706)采集4个批次栉孔扇贝样品。每批次样品取19份,共计76份样品进行检测和分析。每个样品取50 mg外套膜组织,按1.1方法提取样品总DNA,并用分光光度计进行定量分析,−80℃保存备用。以纯化AVNV基因组DNA为阳性对照,无菌去离子水为阴性对照,进行FQ-PCR扩增;作为对比实验,同时以1.2方法的C2/C6引物对上述样品DNA进行常规PCR检测。

2 结果与分析

2.1 质粒标准品的克隆和鉴定

以C2/C6引物扩增AVNV基因,产物大小为693 bp,该扩增产物连接到PGEM-T构成重组质粒,重组质粒经EcoR I酶切鉴定,电泳结果出现3 018 bp+693 bp大小的片段,与预期结果相符(图1)。

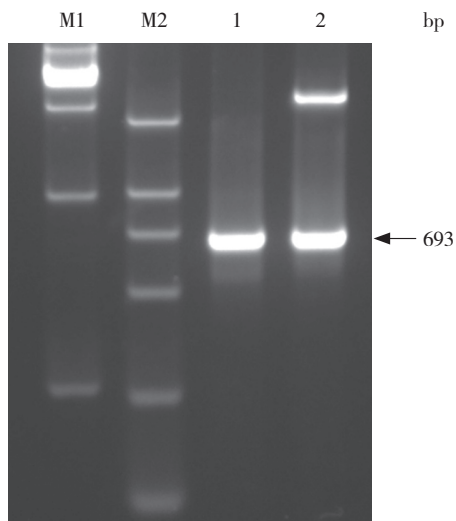


图1 PCR扩增结果和质粒标准品的鉴定结果

M1: DL 15000; M2: DL 2000; 1: PCR产物; 2: 酶切重组质粒

Fig. 1 Products of PCR and standard plasmids by enzyme cutting
M1: DL15000; M2: DL2000; 1: Products of PCR; 2: standard plasmids
byenzyme cutting

2.2 FQ-PCR的反应条件优化

条件优化实验表明,25 μL反应体系中加入Taq Man探针终浓度为0.12 μmol/L,引物c-f和c-r终浓度为0.25 μmol/L时,FQ-PCR能得到比较好的扩增曲线。

2.3 FQ-PCR的检测灵敏度及标准曲线的建立

将AVNV质粒标准品进行10倍系列稀释,共8个梯度,浓度为 $10^8 \sim 10^1$ 质粒核酸拷贝,进行FQ-PCR,其扩增曲线见图2。由图3可以看出,质粒核酸拷贝数在 $10^8 \sim 10^2$ 范围内,共7个数量级的范围内有典型的“S”型扩增曲线。质粒核酸拷贝在 10^8 时, C_t 值最小,约为16.75;质粒核酸拷贝在 10^2 时,对应AVNV的数量为 10^2 拷贝,经过扩增仍有荧光信号,其 C_t 值约为37.14。质粒核酸拷贝在 $10^8 \sim 10^2$ 范围内,根据质粒核酸拷贝数(X)的对数值与其对应 C_t 值的相关性,利用软件分析得到FQ-PCR的标准曲线: $\lg X = -0.29 C_t + 13.28$,相关系数 $R^2 = 0.998$ (图3)。在实际检测中,认为质粒核酸拷贝数等于病毒拷贝数。因此,以 C_t 值37.14为界限,FQ-PCR检测AVNV的灵敏度为 10^2 拷贝。

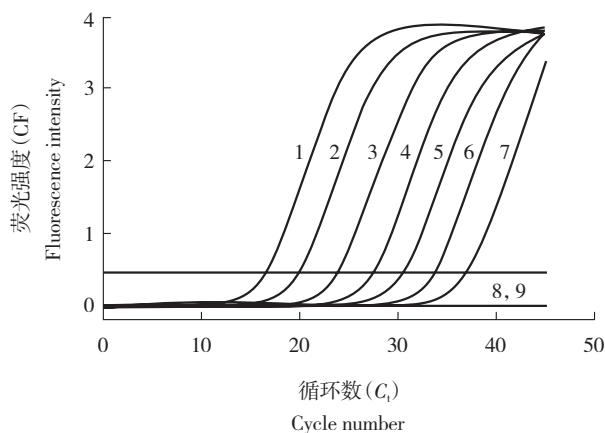


图2 质粒标准品DNA 10倍稀释的FQ-PCR结果

1-8: 质粒浓度分别为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 核酸拷贝数;
9: 阴性对照

Fig. 2 Results of the mean quantity of the serial 10-fold concentrations of standard plasmids

1-8: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 copies of standard plasmids;
9: Negative control

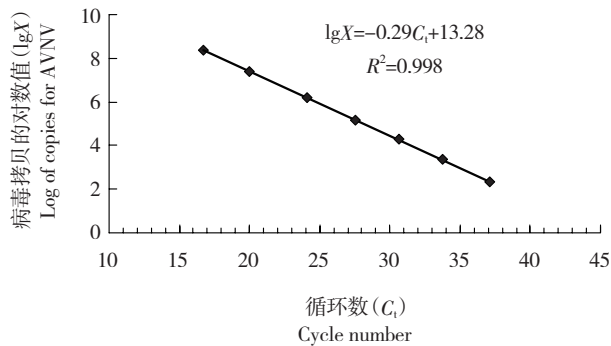


图3 FQ-PCR方法对10倍系列稀释质粒标准品DNA的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of FQ-PCR for 10-fold concentrations of standard plasmids

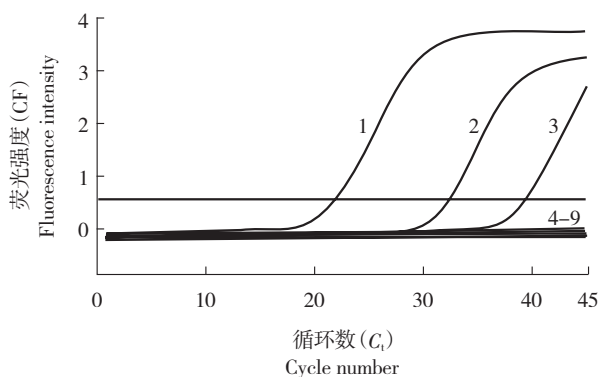
2.4 FQ-PCR检测AVNV的特异性

检测结果表明,以AVNV核酸为模板的扩增反应都出现了“S”型扩增曲线(图4A)和90 bp的特异

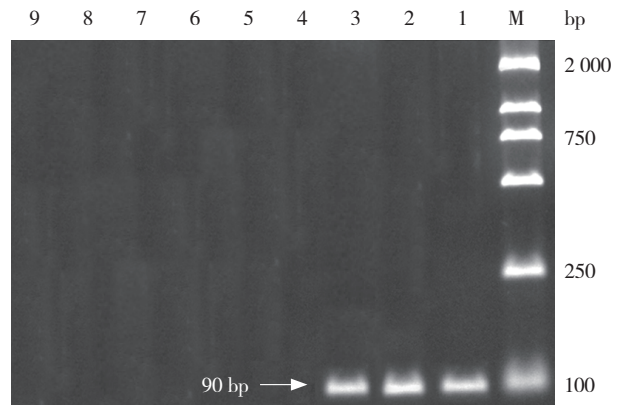
性条带(图4B),而以其他病毒核酸和未感染AVNV的扇贝组织DNA为模板时,没有出现“S”型扩增曲线(图4A)和非特异性扩增(图4B),表明设计的引物和TaqMan探针特异性好,与其他病毒核酸和扇贝组织DNA无交叉反应。

2.5 FQ-PCR检测的重复性

2.5.1 FQ-PCR的批内重复性 AVNV阳性样品稀释成5个浓度梯度,经荧光定量PCR定量分析,结果病毒含量分别为 2×10^7 Copies/ μ L、 2×10^6 Copies/ μ L、 2×10^5 Copies/ μ L、 2×10^4 Copies/ μ L和 1×10^2 Copies/ μ L,每个浓度的样品取1 μ L同时检测4次的结果见表1。 C_t 值的标准差(SD)和变异系数(CV)分别在0.17~0.64和0.61%~2.03%之间。由表1看出,该方法在不同病毒数量下的检测重复性均较好,表明该方法的批内重复性良好。而且当以较低拷贝(1×10^2)的病毒进行重复检测时,仍有较好的重复性。



A



B

图4 FQ-PCR检测AVNV的特异性实验

A: FQ-PCR扩增曲线; B: FQ-PCR扩增产物电泳结果

1-4: 为克隆质粒、纯化AVNV的DNA、感染AVNV的扇贝组织DNA、未感染AVNV的扇贝组织DNA;

5-8: 分别为感染WSSV、IHHNV、TRBIV和KHV样品的DNA; 9: 为阴性对照; M: DL2000

Fig. 4 Specificity of detecting AVNV by FQ-PCR

A: Results of FQ-PCR; B: Products of FQ-PCR

1-4: Standard plasmids, genomic DNA from AVNV, genomic DNA from AVNV infected *C. farreri*, genomic DNA from AVNV uninfected *C. farreri*;

5-8: Nucleic acid from the virus of WSSV, IHHNV, TRBIV and KHV; 9: Negative control; M: DL2000

表1 FQ-PCR的批内重复性 (C_i)
Tab. 1 Repeatability (C_i) of FQ-PCR for intra-assay tests

病毒拷贝 Copy	重复组 Replicate group				SD	变异系数/% Variation coefficient
	1	2	3	4		
2×10^7	20.54	20.61	20.02	20.89	0.36	1.75
2×10^6	24.13	23.96	24.02	24.50	0.24	0.99
2×10^5	27.82	27.91	27.62	28.01	0.17	0.61
2×10^4	31.56	31.41	30.78	32.34	0.64	2.03
1×10^2	37.01	37.54	36.85	37.18	0.21	0.99

2.5.2 FQ-PCR的批间重复性 4份 AVNV 阳性样品 和变异系数(CV)分别在0.34~0.55和0.92%~2.88%
在不同日期的4次检测结果见表2。 C_i 值的标准差(SD) 之间,表明该方法的批间重复性良好、可靠。

表2 FQ-PCR的批间重复性 (C_i)
Tab. 2 Repeatability (C_i) of FQ-PCR for inter-assay tests

采样地点(日期) Sampling spot (Date)	重复组 Replicate group				SD	变异系数/% Variation coefficient
	1	2	3	4		
青岛沙子口(070820) Shazikou, Qingdao (070820)	19.54	19.11	18.67	18.87	0.55	2.88
青岛太平角(070805) Taipingjiao, Qingdao (070805)	26.34	25.67	26.12	26.44	0.34	1.33
山东荣成(070902) Rongcheng, Shandong (070902)	24.23	23.82	24.89	23.76	0.52	2.15
山东长岛(070823) Changdao, Shandong (070823)	30.11	30.21	29.67	30.31	0.28	0.92

2.6 FQ-PCR的检测应用 对采自山东青岛、山东 贝样品分别进行FQ-PCR和普通PCR检测,结果见
荣成、山东长岛和辽宁大连4个批次的76份栉孔扇 表3。

表3 栉孔扇贝样品检测结果
Tab. 3 Results of samples tested by FQ-PCR and PCR

采样地点(日期) Sampling spot (Date)	检测样品数量 Number of samples	FQ-PCR 检测结果 ^b Positive (negative) samples tested by FQ-PCR	病毒载量 ^a Copies of AVNV	PCR 检测结果 ^b Positive (negative) samples tested by PCR
山东青岛(070805) Qingdao, Shandong (070820)	19	17(2)	8.6×10^4	14(5)
山东长岛(070823) Changdao, Shandong (070823)	19	19(0)	1.3×10^7	19(0)
山东荣成(070902) Rongcheng, Shandong (070902)	19	19(0)	2.5×10^6	18(1)
辽宁大连(070706) Dalian, Liaoning (070805)	19	13(6)	8.9×10^2	10(9)

注: a-各批次阳性样品病毒载量的平均值,单位为拷贝/ μ g组织DNA; b-括号外为检测阳性样品的数目,括号内为检测阴性样品的数目。

Note: a-The average value of viral number in each batch of positive samples; copy/ μ g tissue DNA; b-the number outside the brackets means positive sample number, while inside the brackets means negative sample number.

以C2/C6为引物的普通PCR方法共检测出61份阳性样品,15份阴性样品(表3);利用本研究建立的FQ-PCR方法共检测出68份阳性样品和8份阴性样品(表3)。其中普通PCR检测为阳性的61份样品,利用FQ-PCR检测的结果均为阳性,病毒拷贝数在 $1.8 \times 10^8 \sim 2.5 \times 10^4$ 拷贝/ μg 组织DNA之间;在15份PCR检测为阴性的样品中,利用FQ-PCR方法又检测出7份阳性样品,病毒拷贝数在 $1.2 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^2$ 拷贝/ μg 组织DNA之间。全部样品未出现FQ-PCR检测阴性而普通PCR检测阳性的结果。FQ-PCR检测样品的数据均在本实验建立的FQ-PCR方法的定量检测范围内。

在定量数据分析方面(表3),该4批次样品中,山东长岛采集的样品的病毒载量平均值最高,达到 1.3×10^7 拷贝/ μg 组织DNA;山东荣成的样品次之;辽宁大连采集的样品病毒载量最少,仅为 8.9×10^2 拷贝/ μg 组织DNA。

3 讨论

栉孔扇贝是中国北方的主要养殖贝类之一,至今已有20多年的养殖历史。北方沿海自1997年已连年暴发栉孔扇贝大规模死亡,病发期间栉孔扇贝累积死亡率达90%以上,给扇贝养殖业造成了巨大的损失。因此,建立栉孔扇贝AVNV的快速诊断技术,无论对该流行病的深入研究,还是用于指导生产,及时采取相应的防控措施,都十分迫切。目前,已经建立的AVNV检测方法,主要包括电镜观察^[4-5]和免疫学诊断方法^[9-10]等。这些方法能从形态学和血清学方面对宿主感染AVNV的状况进行诊断,但是明显存在费时、费力和费用高等缺点。而且较低的灵敏度和特异性使得这些传统方法存在较大的局限性,通常只有在疾病发生时才能检测到病原,不能对AVNV的早期感染进行有效诊断。PCR方法操作简单且能实现快速诊断,可以提高AVNV的检测灵敏度,但该方法不能定量,而且操作过程中更易造成PCR产物的气溶胶污染,出现假阳性现象^[18]。而作为疾病的诊断依据,当一定数量的病原体存在时才

具有临床意义^[19]。因此,在疾病的临床诊断方面,定量检测方法的应用与其他检测方法相比具有较大的优越性。以单克隆抗体和多克隆抗体为基础的免疫学检测方法可以对AVNV进行定量分析,但是操作复杂,定量不够准确,而且需要高度纯化的病毒作为该方法定量的基础。

本研究建立了AVNV *TaqMan*探针FQ-PCR检测方法,成功构建了适合FQ-PCR的重组质粒标准品,实现了对AVNV的定性和定量检测,定量准确,范围在 $10^8 \sim 10^2$ 病毒拷贝。而且本方法具有较短的检测时间和较高的灵敏度,在1 h内检测AVNV的最低量为 10^2 拷贝,达到快速、灵敏和定量的检测目的。本实验还对该方法检测样品的重复性进行了探讨,计算出批内和批间重复检测样品的 C_t 值的变异系数范围分别在0.61%~2.03%和0.92%~2.88%之间,结果表明,该方法检测样品的批内和批间重复性良好、稳定,具有较好的实用性,完全可以满足实际生产中对AVNV定量研究的需要。而且FQ-PCR无需电泳检测、不使用溴化乙锭,保障了实验人员的安全,同时避免了普通PCR电泳开管时出现的气溶胶污染,是当前快速检测AVNV的最好方法之一。

FQ-PCR方法经实际检测76份栉孔扇贝样品后,各项数据令人满意,AVNV的检测结果显示与普通PCR相比呈现较好的一致性,FQ-PCR对AVNV检测具有较好的特异度,而且检测AVNV的阳性率为89.47%,高于普通PCR。由于FQ-PCR具有较高的灵敏度,对于组织中较低拷贝数目的病毒仍可以进行检测,这样就实现了疾病的早期诊断,为指导实际生产预防疾病的暴发奠定了技术基础。就本实验而言,病毒在 $1.2 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^2$ 拷贝/ μg 组织DNA范围内,FQ-PCR可以对AVNV进行有效检测,但是普通PCR却检测不到AVNV病毒核酸的存在。实验对各批次的样品进行了定量分析,结果显示,不同地区采集的样品的病毒载量有很大的差别,以2007年8月23日在山东青岛采集的样品病毒载量最高,达到 1.3×10^7 拷贝/ μg 组织DNA,而以2007年7月6日辽宁大连的样品最少,仅为 8.9×10^2 拷贝/ μg 组织DNA。这可能与

该病毒在不同温度下复制效率的差异有关。

本研究建立的FQ-PCR检测方法为今后AVNV的进一步研究提供了一项先进的技术。由于该方法可以检测到组织中极微量AVNV核酸,且可以进行定量分析,这将为健康苗种的培育、监测AVNV的动态变化、病毒载量与AVND暴发的相关性、AVND暴发前病毒的危险临界值、AVNV传播途径调查以及病毒致病机理等方面的研究提供有力的工具。

参考文献:

- [1] 宋微波,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展[J]. 海洋科学, 2002, 25(12): 23-26.
- [2] 王秀华,王崇明,李 筠,等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 149-152.
- [3] 艾海新,王崇明,王秀华. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究[J]. 中国水产科学, 2003, 10(5): 386-391.
- [4] 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, 2004, 26(2): 180-184.
- [5] 王崇明,王秀华,艾海新,等. 栉孔扇贝大规模死亡致病病原的研究[J]. 水产学报, 2004, 28(5): 547-553.
- [6] 王秀华,贺桂珍,李赟,等. 栉孔扇贝的急性病毒性坏死症(AVND)病毒多克隆抗体的制备及ELISA分析[J]. 高技术通讯, 2003, 13(9): 84-88.
- [7] 付崇罗,宋微波,李赟,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒单克隆抗体的制备及ELISA检测[J]. 微生物学报, 2005, 45(1): 116-120.
- [8] 张福绥,杨红生. 山东沿海夏季栉孔扇贝大规模死亡原因分析[J]. 海洋科学, 1999, (1): 44-47.
- [9] 相海建. 海水养殖生物病害发生与控制[M]. 北京: 海洋出版社, 2001: 176.
- [10] 王运涛,相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 770-774.
- [11] Regis S, Grossi S, Laldi S, et al. Diagnosis of *Pelizaeus-Merzbacher* disease: detection of proteolipid protein gene copy number by real-time PCR [J]. Neurogenetics, 2005, 6(2): 73-78.
- [12] Elia G, Tarsitano E, Camero M, et al. Development of a real-time PCR for the detection and quantitation of caprine herpesvirus 1 in goats [J]. J Virol Methods, 2008, 148(1-2): 155-160.
- [13] Bessaud M, Autret A, Jegouic S, et al. Development of a TaqMan RT-PCR assay for the detection and quantification of negatively stranded RNA of human enteroviruses: Evidence for false-priming and improvement by tagged RT-PCR [J]. J Virol Methods, 2008, 153(2): 182-189.
- [14] 罗卫,李惠芳,刘荭,等. 鱼类神经坏死病毒实时荧光RT-PCR检测方法的建立和应用[J]. 中国水产科学, 2008, 15(3): 506-510.
- [15] Andrade T P D, Srisuvan T, Tang K F J, et al. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using *Taq* Man probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV) [J]. Aquaculture, 2007, 264(1): 9-15.
- [16] Rajendran K V, Cowley J A, McCulloch R J, et al. A *Taq* Man real-time RT-PCR for quantifying Mourilyan virus infection levels in penaeid shrimp tissues [J]. J Virol Methods, 2006, 137(2): 265-271.
- [17] Le Deuff R M, Renault T. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* [J]. J Gen Virol, 1999, 80(5): 1 317-1 322.
- [18] Gomez D K, Sato J, M ushiake K, et al. PCR based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs [J]. J Fish Dis, 2004, 27(10): 603-608.
- [19] 陈朝霞,闽保华,陈延平. 影响HCV-RNA荧光定量PCR检测的因素及其对策[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(2): 175-176.

Development and application of a FQ-PCR assay for detection of *Chlamys farreri* acute viral necrobiotic virus

REN Wei-cheng^{1,2}, WANG Chong-ming², SUN Shi-chun¹, CAI Yu-yong^{1,2}, LI Yun², YU Zuo-an³

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Liaoning Marine Fisheries Research Institute, Dalian 116023, China)

Abstract: Acute viral necrobiotic virus (AVNV) is an enveloped, spherical virus (130 nm to 170 nm in diameter), with spike-like surface protrusions. This pathogen has been causing acute viral necrobiotic disease (AVND) in scallop *Chlamys farreri* in China during summer time. Acute mortality of infected scallop can be as high as 90% within 5 to 8 days. Successful therapeutics for scallop against this virus is not available thus far, to the best of our knowledge. Therefore, development of preventive strategies, especially rapid and early detecting assay for this viral pathogen, is of special urgency in disease management of scallop farming. Several methods such as ultrastructural examination and ELISA have been developed for ANAV detection. However, these assays are generally time-consuming, laborious and insensitive. In this paper, based on the DNA sequences of AVNV, a pair of specific primers which can specifically amplify a 90bp fragment, and a fluorescent *Taq*Man probe were designed. Then, a specific, fluorescence based quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) assay for real-time detection of AVNV was developed and optimized initially. It could obtain excellent linearity when the AVNV concentration is between 10^8 and 10^2 copies, $\lg X = -0.29 C_t + 13.28$ (correlation coefficient $R^2 = 0.998$). After the procedure of fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) assay for acute viral necrobiotic virus was optimized, the specificity, sensitivity and reproducibility of the method were estimated. The detection limit of this assay was 10^2 copies for AVNV. It was also found that the specificity of this assay was high without any cross-reactions with DNA from AVNV uninfected *C. farreri* and other viruses such as WSSV, IHNV, TRBV and KHV found commonly in China. The coefficients of variance (CV) of cycle threshold were 0.61%–2.03% and 0.92%–2.88% for the intra-assay and inter-assay tests respectively, which indicated good reproducibility. Seventy-six samples of *C. farreri* collected from Qingdao, Rongcheng, Changdao in Shandong province and Dalian in Liaoning province during July to September in 2007 were tested by using FQ-PCR and conventional PCR assays. The results showed that the detection rate of FQ-PCR was 89.47%, higher than that of conventional PCR (80.26%). The FQ-PCR assay demonstrated exceptionally higher sensitivity compared to that of traditional PCR by picking up 7 additional positive cases. None of the positive samples by PCR assay were missed by FQ-PCR assay, thereby showing superior sensitivity of FQ-PCR method. This increased sensitivity makes FQ-PCR a better choice than the traditional PCR for the detection of AVNV in cases when lower concentrations of virus are expected in asymptomatic samples. Thus, virus-carrying *C. farreri* can be found during early infection stages and effectively controlled before the infection becomes epizootic. Therefore, it is confirmed that the FQ-PCR assay is a powerful tool for the detection of AVNV with rapidity, sensitivity, specificity, accuracy and quantification. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(4): 564–571]

Key words: *Chlamys farreri*; AVNV; AVND; FQ-PCR; *Taq*Man probe

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