

栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒巢式 PCR 检测方法的建立

李 晨¹, 王崇明^{1*}, 曲 朋^{1,2}, 黄 健¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为更好地实现对养殖海区栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒 (acute viral necrosis virus, AVNV) 的快速诊断和分子流行病学的调查, 以及 AVNV 的疫情监测, 选择 AVNV 全基因组序列中的保守区段, 应用 Accelrys gene 2.5 软件设计一对巢式引物, 用于 AVNV 的检测。结果显示, 引物的扩增片段分别为 979 和 548 bp。实验优化了 PCR 体系中 Mg^{2+} 和 dNTPs 浓度及扩增程序中的退火温度, 并建立了完善的 AVNV 巢式 PCR 检测技术。研究表明, 该 PCR 检测技术具有较高的敏感性, 可稳定检测出 5 pg 扇贝样品组织总核酸中 5×10 copies 的病毒粒子。

关键词: 栉孔扇贝; 急性病毒性坏死病毒; 巢式 PCR

中图分类号: S 944

文献标志码: A

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*), 俗名干贝蛤 (其闭壳肌制成)、海扇, 属软体动物门 (Mollusca)、瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、珍珠贝目 (Pterioida)、扇贝科 (Pectinidae)、扇贝属。生活于低潮线以下, 自然分布于我国辽宁的大连及山东半岛一带沿海。20 世纪 70 年代末 80 年代初, 人工育苗关键技术的突破和半人工采苗技术的日臻成熟, 使栉孔扇贝养殖迅速成为我国北方沿海贝类养殖主导产业之一。但是, 随着产业规模的迅速扩大以及养殖期的延长, 加之沿海经济的快速发展和城市化进程加快, 造成近岸海水养殖水域环境日益恶化, 病害问题时有发生。1997 年以来, 我国北方沿海养殖栉孔扇贝夏季连年暴发大规模死亡 (累积死亡率高达 90% 以上), 给扇贝养殖业造成了巨大的经济损失^[1-2]。导致该现象发生的病征名为栉孔扇贝急性病毒性坏死症 (acute viral necrosis disease, AVND)^[3-5], 其病原病毒粒子具有囊膜, 完整的病毒粒子直径为 130 ~ 170 nm, 核衣壳直径为 90 ~ 140 nm, 基因组全长 210 993 bp, GenBank 登陆号为 GQ153938^[6]。研究发现, 急性病毒性坏死病毒 (acute viral necrosis virus, AVNV) 感染宿主范围比较广泛, 除栉孔扇贝外, 还包括虾夷扇贝

(*Patinopecten gessoensis*)、华贵栉孔扇贝、杂色蛤 (*Ruditapes variegata*)、紫贻贝 (*Mytilus deulis*)、翡翠贻贝 (*M. smaragdinus*)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、香港巨牡蛎 (*C. hongkongensis*) 和方斑东风螺 (*Babylonia areolata*) 等^[7]。

目前, 用于检测 AVNV 的传统检测技术有组织病理切片、电镜病理切片、免疫学方法; 还有分子检测技术如环介导等温扩增法 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 和实时荧光定量 PCR 等。传统的检测技术存在着操作繁琐、耗时长、灵敏度和特异性不够理想、不能定量等缺点; 分子检测技术虽然灵敏度较高, 但极易污染, 给检测带来困扰。巢式 PCR 检测技术 (nested PCR) 是针对某一特定基因, 设计外侧、内侧两对引物进行两步 PCR 扩增反应, 实现一种基因的扩增及鉴定^[8]。巢式 PCR 降低了扩增多个靶位点的可能性, 增加了检测的特异性和可靠性, 多应用于微生物病原方面的检测。由于其具有较高的特异性及灵敏度, 在物种鉴定、基因检测等方面得到了充分应用^[9-12], 如病毒、梅毒螺旋体、HIV、肿瘤基因等的鉴定和检测, 也可用于基因芯片上探针的制备, 被认为是效果较好的 PCR 检测技术^[13-17], 尤其针对病原载量

收稿日期: 2012-06-18 修回日期: 2012-09-18

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-48); 科技部国际合作项目 (2010DFA31720)

通信作者: 王崇明, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

较低的样品,该技术具有较高的检测灵敏度。目前尚未有利用该检测技术检测 AVNV 的报道,因此,建立栉孔扇贝 AVNV 巢式 PCR 检测技术不仅可以有效地检测出病毒载量较低的样品,还有助于监测 AVND 的流行,对栉孔扇贝的健康养殖及 AVND 的有效控制提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

栉孔扇贝样品于 2009 年 8 月从青岛流清河海区采集,其中典型病状的样品为 AVNV 阳性。皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hanai*) 于 2010 年 9 月从福建宁德霞浦乌泥湾采集;香港巨牡蛎于 2010 年 10 月从广西钦州三娘湾采集;中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 均为实验室养殖试验材料,购买自青岛某养殖场,初检均为健康个体;鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 由实验室保种并鉴定;待检测样品为于 2010 年 5 月至 2011 年 4 月在山东荣成桑沟湾海区采集的养殖栉孔扇贝。

1.2 引物设计

以 AVNV 基因组全序列为基础,选取保守序列,利用 Accelrys gene 2.5 生物学软件,设计 AVNV 巢式 PCR 特异性引物序列。外引物(命名为 W)序列为 w-f:-TGG TTC ACG GGA GTG TAT CCA G-3',下游引物为 w-r:-TGC GGC GCT ATG GAT TTA ACG-3',扩增片段大小为 979 bp;内引物(命名为 N)序列为 n-f:-TAC CGG CAA TGA TGC TGA GC-3',下游引物为 n-r:-TGC CCG ACC ACA AAC CTA ATG-3',扩增片段大小为 548 bp。W、N 引物均委托生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.3 组织 DNA 的提取及病毒拷贝数的确定

按照天根生化科技有限公司生产的海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Marine Animals DNA Kit)提取栉孔扇贝等海水养殖动物组织基因组 DNA,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)提取鳃弧菌等微生物基因组 DNA。利用任伟成^[6]建立的 AVNV 实时荧光定量检测技术确定 2009 年 8 月自青岛流清河采集栉孔扇贝样品为 AVNV 阳性,样品组织核酸浓度 5 ng/ μ L,对应病毒载量为 10^4 copies。

1.4 巢式 PCR 扩增程序与反应体系的优化

外引物引导第一步 PCR 扩增程序及反应体系的优化 采用常规的 25 μ L PCR 体系:以 AVNV 阳性样品的基因组 DNA 为模板(病毒载量为 10^4 copies) 1.0 μ L, 10 \times PCR buffer (TaKaRa) 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 2.0 μ L, 外引物 W 终浓度至 0.4 μ mol/L,加水补齐体系;设置扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s,退火温度设置梯度分别为 50、52、54、56、58 和 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳查看结果,以选择最合适的退火温度。然后利用摸索好的扩增程序依次优化 Mg^{2+} 浓度(设置浓度梯度:0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mmol/L)、dNTPs 浓度(设置浓度梯度:0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 和 0.30 mmol/L)。

内引物引导第二步 PCR 扩增程序及反应体系的优化 采用常规的 25 μ L PCR 体系,以 1.0 μ L 第一步 PCR 产物的 10 倍稀释物为模板,利用内引物 N 进行二次 PCR 扩增。扩增程序设为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s,退火温度设置梯度分别为 50、52、54、56、58 和 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳查看结果,然后利用摸索好的扩增程序依次进行 Mg^{2+} 浓度(设置浓度梯度:0.1、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mmol/L)、dNTPs 浓度(设置浓度梯度:0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 和 0.30 mmol/L)的优化。

1.5 巢式 PCR 技术特异性的验证及灵敏度的测定

利用“巢式 PCR 扩增程序与反应体系的优化”中优化好的两步 PCR 反应体系及扩增程序,分别以 2 份青岛流清河采集的栉孔扇贝(AVNV 阳性)、广西钦州三娘湾采集的香港巨牡蛎、福建宁德霞浦乌泥湾采集的皱纹盘鲍、养殖中国明对虾、斑马鱼、大菱鲆及保种活化的鳃弧菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌的核酸提取物为模板,以流清河栉孔扇贝(AVNV 阴性)为阴性对照、水为空白对照进行 PCR 扩增,以验证该巢式 PCR 技术的特异性。

同样,利用“巢式 PCR 扩增程序与反应体系的优化”中优化好的两步 PCR 反应体系及扩增程序测定巢式 PCR 技术的灵敏性,第一步 PCR 反应中模板分别为 5 ng/ μ L AVNV 阳性病料核酸 10 ~ 10^6 倍梯度稀释物,二次 PCR 反应中模板则为第一步

PCR 反应产物的 10 倍稀释物,水为阴性对照。

1.6 巢式 PCR 技术在实际样品中的应用

于 2010 年 5 月至 2011 年 4 月在山东荣成桑沟湾海区采集养殖栉孔扇贝,每月随机抽检 10 份样品,并提取其外套膜组织基因组 DNA。利用建立的巢式 PCR 技术对样品进行 AVNV 病毒性检测。

2 结果

2.1 巢式 PCR 反应体系及扩增程序的优化结果

经过多次试验,由外引物引导第一步 PCR 反

应中退火温度在 50 ~ 60 °C 均可扩增出目的片段,但在低温退火下有非特异性扩增,故选择最佳退火温度为 58 °C;同样,为降低非特异性扩增,25 μL PCR 反应体系里 Mg²⁺ 最佳终浓度选择 2.0 mmol/L、dNTPs 最佳终浓度选择 0.25 mmol/L(图 1)。由内引物引导第二步 PCR 反应中退火温度在 50 ~ 60 °C 均可扩增出目的片段,为降低非特异性扩增,选择较高的 58 °C 为退火温度;25 μL PCR 反应体系里,当 Mg²⁺ 终浓度大于 0.1 mmol/L 后即可得到扩增结果,选择 1.0 mmol/L 为最佳终浓度;选择 dNTPs 最佳终浓度为 0.15 mmol/L(图 2)。

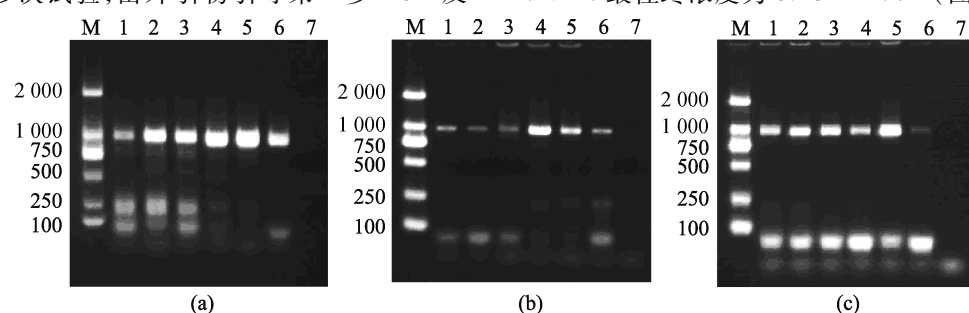


图 1 外引物 W 引导第一步 PCR 反应体系及扩增程序的优化结果

M:DL 2000 DNA marker; (a)1~7 泳道退火温度分别为 50,52,54,56,58,60 °C,阴性对照; (b)1~7 泳道 Mg²⁺ 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L,阴性对照; (c)1~7 泳道 dNTPs 浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L,阴性对照。

Fig.1 Optimization of PCR detection system amplified by primer W

M:DL 2000 DNA marker; (a)six temperature gradients were set as 50,52,54,56,58,60 °C and negative control in the lane 1 to 7; (b) different Mg²⁺ concentration were set as 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mmol/L and negative control in the lane 1 to 7; (c) different dNTPs concentration were set as 0.05,0.10,0.15,0.20,0.25,0.30 mmol/L and negative control in the lane 1 to 7.

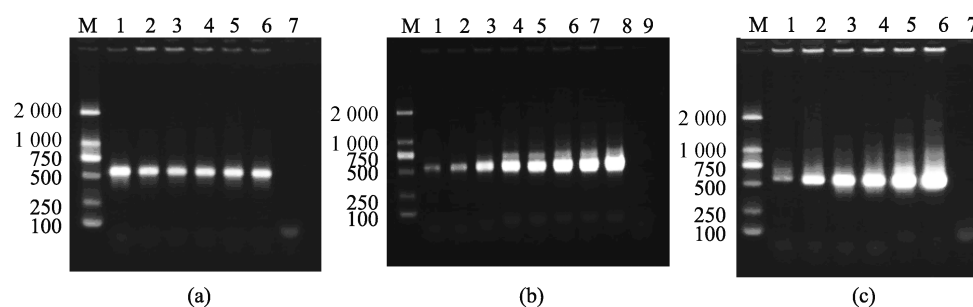


图 2 内引物 N 引导第二步 PCR 反应体系及扩增程序的优化结果

M:DL 2000 DNA marker; (a)1~7 泳道退火温度分别为 50,52,54,56,58,60 °C,阴性对照; (b)1~7 泳道 Mg²⁺ 浓度分别为 0.1、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L,阴性对照; (c)1~7 泳道 dNTPs 浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L,阴性对照。

Fig.2 Optimization of PCR detection system amplified by primer N

M:DL 2000 DNA marker; (a)six temperature gradients were set as 50,52,54,56,58,60 °C and negative control in the lane 1 to 7; (b) different Mg²⁺ concentration were set as 0.1,0.3,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mmol/L and negative control in the lane 1 to 7; (c) different dNTPs concentration were set as 0.05,0.10,0.15,0.20,0.25,0.30 mmol/L and negative control in the lane 1 to 7.

2.2 巢式 PCR 检测技术特异性的验证结果

由外引物引导的第一步 PCR 反应可扩增出 AVNV 核酸目的产物(图 3-a,1~2 泳道);与其他

海水养殖动物、微生物核酸及水没有交叉反应(图 3-a,3~12 泳道)。同样,由内引物引导二次 PCR 扩增结果显示,该巢式 PCR 检测技术具有较

高特异性(图 3-b)。

2.3 巢式 PCR 检测技术灵敏度的测定

图 4-a 显示外引物与 7 个梯度模板的第一步 PCR 扩增结果,由图可知,当样品总核酸被稀释 10 倍,有微弱目的条带被扩增出,对应 0.5 ng 总样品核酸,预计病毒载量在 10^3 copies;图 4-b 显示内引物与第一步 PCR 产物的二次扩增结果,当

样品总核酸被稀释 1 000 倍,依然有目的条带被扩增出,对应 5 pg 总样品核酸,预计病毒载量 5×10^1 copies。本实验结果表明,由两对引物组成的巢式 PCR 技术具有很高的灵敏度,检测最高限可以达到 10^1 copies 病毒载量,比单独使用外引物引导的 PCR 检测技术灵敏了至少 100 倍。

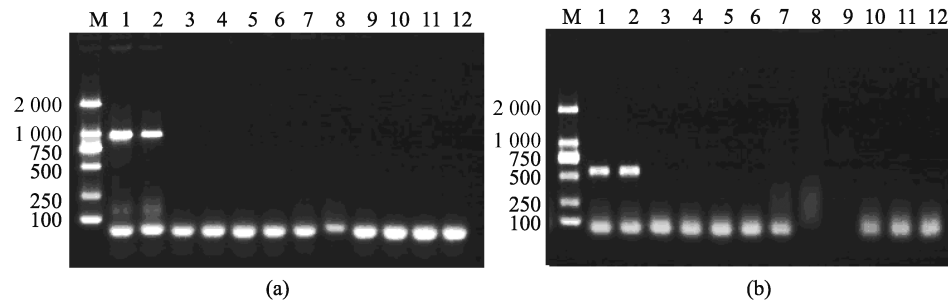


图 3 AVNV 巢式 PCR 技术特异性验证试验

M;DL 2000 DNA marker; (a)由外引物引导 PCR 反应的扩增结果,1~11 泳道扩增物使用的模板分别为 2 份栉孔扇贝 (AVNV 阳性)、香港巨牡蛎、皱纹盘鲍、中国对虾、斑马鱼、大菱鲆、鳃弧菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、栉孔扇贝 (AVNV 阴性)的核酸,12 泳道为空白对照; (b)由内引物引导二次 PCR 反应的扩增结果;1~12 泳道对应模板分别为 a 图中 12 种产物的 10 倍稀释物。

Fig. 3 Experimental validation the specificity of nested PCR for AVNV

M;DL 2000 DNA marker; (a) show the result of the first amplification guided by primer W, the production amplified against various DNA templates show in the lane 1 to 11, such as two AVNV positive *Chlamys farreri* samples, *Crassostrea hongkongensis*, *Haliotis discus hanai*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Danio rerio*, *Scophthalmus maximus*, *V. anguillarum*, *A. hydrophila*, *E. tarda*, AVNV negative *Chlamys farreri* sample, water as blank control in the lane 12; (b) show the result of the second amplification guided by primer N, different production amplified with 12 production which diluted 10 times in (a) the lane 1 to 12.

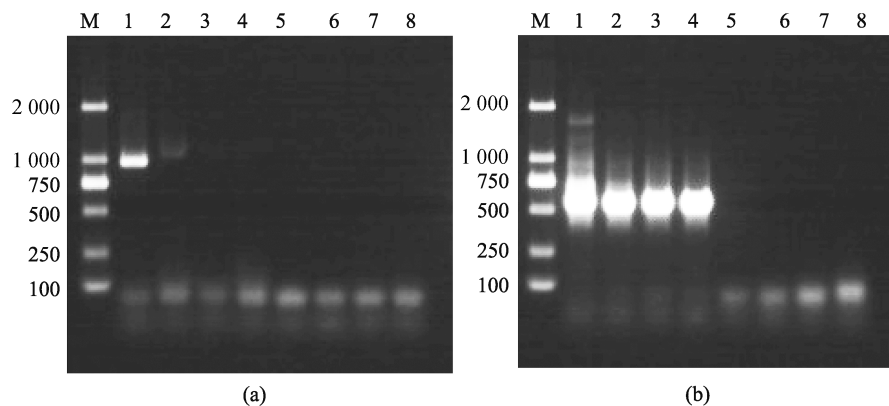


图 4 AVNV 巢式 PCR 技术灵敏性的验证试验

M;DL 2000 DNA marker; (a)外引物与不同浓度模板的第一步 PCR 扩增结果,1~7 泳道对应模板浓度分别为 $5, 5 \times 10^{-1}, 5 \times 10^{-2}, 5 \times 10^{-3}, 5 \times 10^{-4}, 5 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-6}$ ng/ μ L,8 泳道是阴性对照; (b)内引物与 8 种第一步 PCR 扩增产物的二次扩增结果。

Fig. 4 Sensitivity experiments of nested PCR for AVNV

M;DL 2000 DNA marker; (a) show the result of the first amplification against various templates with concentration gradient as $5, 5 \times 10^{-1}, 5 \times 10^{-2}, 5 \times 10^{-3}, 5 \times 10^{-4}, 5 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-6}$ ng/ μ L from the lane 1 to 7, and the negative control was on the lane 8; (b) show the result of the second amplification guided by primer N against 12 production which diluted 10 times in (a) the lane 1 to 12.

2.4 巢式 PCR 技术对实际样品的检测应用

将该技术应用于 2010 年 5 月至 2011 年 4 月间自山东荣成桑沟湾海区采集到的养殖栉孔扇贝

样品的病毒性检测中。检测结果中微弱条带按照 50% 可疑性进行考虑,统计发现 8 月份采集样品中 AVNV 携带率最高(表 1)。

表 1 AVNV 巢式 PCR 技术针对一年内采集于桑沟湾栉孔扇贝样品的检测结果
Tab.1 The testing result of nested PCR for AVNV against *C. farreri*
collected from Sanggou Bay in one year

海区	2010 年								2011 年				%
	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月	4 月	
	May	June	July	Aug.	Sep.	Oct.	Dec.	Nov.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	
桑沟湾 SanggouBay	10	10	10	50	0	0	10	0	0	0	0	0	0

3 讨论

巢式 PCR 技术通过两对引物的扩增反应,可以将微量模板的目的基因信号放大,以得到普通 PCR 所检测不出的结果,具有较高的灵敏性。另外,它较实时荧光定量 PCR 技术成本低,且能克服单次扩增“平台期效应”的限制,使扩增倍数提高,从而保证了较高的 PCR 敏感性;由于两次 PCR 扩增反应里模板和引物的改变,降低了非特异性反应连续放大进行的可能性,保证了反应的特异性;另外,内侧引物扩增的模板是外侧引物扩增的产物,第二阶段反应能否进行,也是对第一阶段反应正确性的鉴定,因此可以保证整个反应的准确性及可行性。

近年来,利用该技术进行海水养殖动物病原性检测或疾病诊断的报道越来越多。例如,劳海华等^[18]建立巢式 PCR 技术检测鳊 (*Siniperca chuatsi*) 传染性脾肾坏死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV), 可灵敏检测出 5 fg 含有目的基因的质粒;李文杰等^[10]建立巢式 PCR 方法检测克氏原螯虾 (*Procambrus clarkii*) 白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV), 灵敏度是 36 pg; 谢数涛^[19]等建立巢式 PCR 方法检测斑节对虾 WSSV; 张旻等^[20]建立巢式 PCR 方法可以检测 10^2 copies 的蛙虹彩病毒粒子等。

目前有关贝类病毒病的诊断方式主要有:临床症状(如典型病症、死亡率等)观察、病理学变化、常规检测技术等传统方法,以及后续建立的栉孔扇贝 AVNV ELISA 诊断技术^[21]、Taqman 探针实时荧光定量 PCR 检测技术^[22]、LAMP 检测技术^[23]、牡蛎疱疹病毒 (ostreid herpesvirus 1, OsHV-1) 的 PCR 诊断技术^[24] 和核酸探针为基础的原位杂交诊断技术^[25-26] 等。其中,任伟成等^[22]建立的实时荧光定量 PCR 技术可检测 10^2 copies 病毒核酸、蔡玉勇等^[23]建立的 LAMP 技术可检测出 1 fg 的 AVNV 核酸,比普通 PCR 提高了 100 倍。这些技术特异性较高,甚至可以将 LAMP 应用在野外检测工作

中,但是存在着操作复杂、极易被污染、成本较高等不足。本研究建立的 AVNV 巢式 PCR 检测技术经实验比对和实际应用,可有效检测出 5 pg 样品总核酸中预计 10^1 copies 的病毒粒子,具有较高的特异性和灵敏度,且可大大降低试验成本。在某些检测情况下,采集样品组织中病毒含量较低,组织样品因含有大量的蛋白和脂类等成分可能会影响 PCR 扩增,而巢式 PCR 中首次反应产物的转移有助于稀释掉那些最初可能存在于样品中的抑制物,经过二次扩增后,可大大提高检测灵敏度,有效避免假阴性的出现^[27]。本研究建立的巢式 PCR 检测技术旨在完善扇贝养殖中病害防控体系、扩充病原检测方法、适时适当地用于监测 AVNV 的动态变化,为 AVNV 的早期诊断、及时切断其传播途径和提出预防措施奠定技术基础。

本研究运用巢式 PCR 技术检测了 2010 年 5 月至 2011 年 4 月采集自山东荣成桑沟湾的栉孔扇贝样品。每月随机抽检 10 份样品的 AVNV, 检测结果表明:2010 年 8 月份该海区养殖栉孔扇贝 AVNV 携带率最高,死亡现象也较 7 月和 9 月严重,但是较往年有所减轻;从 2010 年下半年开始,尤其进入 2011 年,该海区养殖扇贝中 AVNV 携带率较往年也有所降低。王秀华等^[4]、宋微波等^[5]、付崇罗等^[28]的研究发现:夏季栉孔扇贝 AVNV 携带率较高、死亡率较高,较高的水温也是栉孔扇贝病发的胁迫因子之一,与本研究结果相一致。另外,该海区实施的“贝藻混养”模式,一定程度上也消减了病原数量及感染率^[7]。疑似携带 AVNV 的扇贝个体在第一步 PCR 扩增后的电泳结果里均无条带,在第二步 PCR 扩增后有较为明显的目的条带出现,说明采集样品里的病毒载量有限,但具体病毒载量还需要利用实时荧光定量 PCR 技术等手段进行确定。

参考文献:

- [1] 张福绥,杨红生. 山东沿岸夏季栉孔扇贝大规模死亡原因分析[J]. 海洋科学,1999,22(1):44-47.

- [2] 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.
- [3] 王崇明,王秀华,宋微波. 国家973项目子课题“扇贝大规模死亡的流行病学研究”取得重要进展[J]. 海洋科学,2001,25(4):24-30.
- [4] 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):149-156.
- [5] 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,2001,25(12):23-26.
- [6] 任伟成. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒基因组全序列的测定与分析 and 核酸诊断技术研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.
- [7] 蔡玉勇. 应用急性病毒性坏死病毒(AVNV)分子检测技术对其主要宿主的检测与分析[D]. 青岛:中国海洋大学,2010.
- [8] 安凤秋,吴云锋,顾沛雯. 巢式PCR(Nested-PCR)在植原体检测中的应用[J]. 陕西农业科学,2008,54(3):50-52.
- [9] Mendes C L, Abath F G, Leal N C. Development of a multiplex single-tube nested PCR(MSTNPCR) assay for *Vibrio cholerae* O1 detection [J]. Journal of Microbiological Methods,2008,72(2):191-196.
- [10] 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]. 南京师范大学学报:自然科学版,2009,32(2):98-102.
- [11] 庄洪涛,张学文,张增艳. 巢式PCR检测转基因小麦的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(19):9972,9992.
- [12] Huang Y W, Dryman B A, Harrall K K, et al. Development of SYBR green-based real-time PCR and duplex nested PCR assays for quantitation and differential detection of species-or type-specific porcine Torque teno viruses [J]. Journal of Virological Methods,2010,170(1-2):140-146.
- [13] 黄海,马文丽,王洪敏,等. 用巢式PCR方法制备基因芯片的探针[J]. 生命科学研究,2003,7(3):271-274.
- [14] 姚李四,王振国,徐宝梁,等. 一管巢式聚合酶链反应用于禽流感病毒核酸检测[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(4):447.
- [15] 普冬,赵勤,汪亚玲,等. 巢式PCR方法检测艾滋病病毒载量结果评估[J]. 实用临床医学(江西),2008,9(12):25-26.
- [16] 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(6):52-54,62.
- [17] 李河,宋光桃,何末军. 巢式PCR检测油茶根腐病菌的研究[J]. 浙江林学院学报,2009,26(6):849-853.
- [18] 劳海华,叶星,邹为民,等. 巢式PCR检测鳃传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)[J]. 南方水产,2009,5(4):69-72.
- [19] 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):220-204.
- [20] 张旻,林祥梅,江育林. 蛙虹彩病毒巢式PCR检测方法的建立[J]. 中国水产科学,2011,18(3):661-666.
- [21] 李赟,贺桂珍,王秀华,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒感染的ELISA检测[J]. 高技术通讯,2003,13(7):90-92.
- [22] 任伟成,王崇明,孙世春,等. 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[J]. 中国水产科学,2009,16(4):564-571.
- [23] 蔡玉勇,王崇明,任伟成. 环介导等温扩增技术快速检测栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒方法的建立和应用[C]. 2008年中国水产学会学术年会论文摘要集,2008:55.
- [24] Barbosa-Solomieu V, Miossec L, Vazquez-Juarez R, et al. Diagnosis of ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridization [J]. Journal of Virological Methods,2004,119(2):65-72.
- [25] Renault T, Arzul I. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: Specific viral DNA detection by PCR [J]. Journal of Fish Diseases,2001,24(3):161-167.
- [26] Lipart C, Renault T. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labeled probes [J]. Journal of Virological Methods,2002,101(1-2):1-10.
- [27] 黄显明,张小飞,李春芬,等. I型鸭肝炎病毒逆转录套式PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医科学,2008,38(1):25-28.
- [28] 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.

Establishment of a nested PCR for rapid detection of *Chlamys farreri* acute viral necrosis virus

LI Chen¹, WANG Chongming^{1*}, QU Peng^{1,2}, HUANG Jie¹

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

2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The scallop *Chlamys farreri* is one of the major species cultured in North China, and its culture in commercial scale has been performed for more than 20 years. However, the great expansion and intensification have induced the occurrence of disease called “acute viral necrosis disease” (AVND) since 1990's, and the cumulative mortality could be higher than 90%. This disease is caused by a virus called “acute viral necrosis virus” (AVNV), which is a spherical enveloped virus (130 to 170 nm in diameter) with spike-like surface protrusions and has been becoming the major limiting factor in the development of the scallop industry. In order to establish a rapid diagnosis method of AVNV parasitizing on scallop (*C. farreri*), a pair of primers of nested-PCR were developed by Accelrys gene 2.5 based on the conserved region of the AVNV genome (GenBank accession number: GQ153938) in this study. The reactive conditions such as concentration of Mg^{2+} , dNTPs and annealing temperature were optimized for the PCR system, and the expected products of the external and internal primers were 979 and 548 bp respectively. The results showed that the primers were specific for AVNV and did not amplify marine aquaculture animals' s and bacteria' s genome DNA, and the method can be stably amplified 5×10 copies virus particles in 5 pg total nucleic acid of scallop tissue. Also this method was successfully applied to the Sanggou Bay scallop samples detected. Therefore, it is confirmed that the method will be very useful for sensitive and specific detection of AVNV in the laboratory, and has high specificity, good reproducibility, which will definitely facilitate the monitoring of the epidemic disease in the future.

Key words: *Chlamys farreri*; acute viral necrosis virus (AVNV); nested PCR

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