

## 鲤疱疹病毒 II 型 *TaqMan* real-time PCR 检测方法的建立及应用

周 勇, 曾令兵\*, 张 辉, 范玉顶, 徐 进

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223)

**摘要:** 针对鲤疱疹病毒 II 型 (Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2) DNA 解旋酶基因编码区序列设计特异性引物, 利用 PCR 技术扩增出长度为 1 446 bp 的基因编码区片段, 克隆到 pMD19T 载体上, 构建重组质粒。经 PCR 鉴定与测序分析确认正确后, 以 10 倍梯度稀释重组质粒, 作为标准模板进行 *TaqMan* real-time PCR 扩增, 制作标准曲线, 建立了鲤疱疹病毒 II 型的荧光定量 PCR 检测方法。检测结果显示, 标准曲线的相关系数 ( $R^2$ ) 达到 0.999 1, 斜率为 -3.412; 对初始模板定量检测的范围为  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 特异性试验结果表明, 该方法可特异性地检测出鲤疱疹病毒 II 型, 而对大鲵虹彩病毒 (GSIV)、锦鲤疱疹病毒 (KHV) 以及空白对照无检测信号。取江苏射阳和宝应两地疑似患病鲫组织核酸作为模板进行荧光定量 PCR, 结果表明反应体系中的病毒量分别为  $6.89 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  和  $3.02 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ 。本研究建立的鲤疱疹病毒 II 型 *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 方法灵敏度高、特异性强, 对因鲤疱疹病毒 II 感染引起的养殖鲫造血器官坏死症的诊断与病毒病原定量检测有重要意义。

**关键词:** 鲫; 造血器官坏死症; 鲤疱疹病毒 II 型; *TaqMan* real-time PCR; 检测方法

**中图分类号:** S 943

**文献标志码:** A

鲫是我国淡水养殖鱼类重要品种之一, 其年总产量现已超过 200 万 t, 在淡水养殖中占据十分重要的地位<sup>[1]</sup>。江苏省是我国鲫的主要养殖地区, 鲫精养面积达  $5 \times 10^4$  ha 以上, 2011 年产量达 54.80 万 t, 产值约 80 多亿元, 位居全国首位, 且商品鱼远销全国各地, 并出口到韩国、日本等国家。然而, 自 2009 年以来, 在江苏省鲫主养区域连年发生导致养殖鲫暴发性死亡的出血性疾病, 造成重大经济损失。患病鲫肾脏和脾脏组织的超薄切片电镜观察结果表明, 有大量典型疱疹病毒样颗粒存在, 经过进一步的人工感染试验、细胞培养试验、组织病理学观察以及分子检测与基因序列分析等研究, 确认引起江苏养殖鲫暴发性死亡的出血病为鲫造血组织坏死症 (Crucian Carp Hematopoietic Necrosis), 其病原为鲤疱疹病毒 II 型 (Cyprinid herpesvirus II, CyHV-2)。

CyHV-2 核衣壳呈六边形, 直径为 100 ~ 110 nm<sup>[2]</sup>, 完整的病毒颗粒有囊膜, 呈椭圆形, 直径为 175 ~ 200 nm。CyHV-2 与另外两种分离自鲤科鱼类的病毒鲤痘疮病毒 (Carp pox herpesvirus, Cyprinid herpesvirus 1, CyHV-1) 和锦鲤疱疹病毒 (Koi herpesvirus, Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3) 关系接近, 与斑点叉尾鲷病毒 (Channel catfish virus, Ictalurid herpesvirus 1, IcHV-1) 关系相对较远<sup>[3]</sup>。对于 CyHV-2 病毒的检测方法有电子显微镜观察和分子生物学诊断方法。电镜观察是最直接的方法, Jung 等<sup>[4]</sup>通过电镜技术首次观察到了患病金鱼脾和肾组织细胞中感染的疱疹病毒粒子, Groff 等<sup>[2]</sup>采用电镜观察濒死金鱼稚鱼的鳃和肾组织的超薄切片, 证实了感染细胞内疱疹病毒粒子的存在, Chang 等<sup>[5]</sup>也是通过电镜技术观察到了濒死的金鱼组织细胞内的疱疹样病毒粒子。

收稿日期: 2012-11-19 修回日期: 2013-01-11

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46-11); 中国水产科学研究院基本科研业务费 (2013A0606)

通信作者: 曾令兵, E-mail: zenglingbing@gmail.com

分子生物学方法,特别是 PCR 法是目前较为精确检测 CyHV-2 感染的方法,因为它可以检测到组织中极微量的病毒 DNA。Goodwin 等<sup>[6]</sup>基于 CyHV-2 聚合酶基因建立的兼并 PCR 方法从来源于美国中部及东、西海岸中该病的金鱼病变组织抽提的 DNA 中均扩增出目的片段,且目的基因序列完全一致,与 Waltzek 等<sup>[3]</sup>报道的 CyHV-2 基因序列(GenBank:AY939863.1)也有 99% 以上的一致性。但该方法对大多数疾病诊断和研究工作来说,耗时而且技术要求高。随后 Goodwin 等<sup>[7]</sup>再次基于该病毒的聚合酶基因设计引物和探针,建立了实时定量 TaqMan PCR,该方法设计的引物与 CyHV-2 发生特异性反应,与 CyHV-1 和 CyHV-3 不发生特异性反应,该方法不仅能从表现出临床症状的鱼中检出 CyHV-2,而且能对看似健康的 1 龄金鱼鱼种甚至 3~5 龄的亲鱼做出检测诊断。Waltzek 等<sup>[8]</sup>基于 CyHV-2 解旋酶编码基因建立了常规 PCR,该方法具有较高的特异性,对 CyHV-1, CyHV-3 和 IcHV-1 的基因组 DNA 无扩增,且较为敏感。目前的分子检测技术都是基于金鱼体内分离出的 CyHV-2 病毒,没有针对鲫体内分离的 CyHV-2 病毒进行检测技术研究。鉴于金鱼和鲫组织 DNA 序列不同,Goodwin 等<sup>[7]</sup>基于金鱼体内分离出的病毒聚合酶基因建立的荧光定量方法扩增鲫组织 DNA 时出现非特异性扩增,所以需要建立新的实时荧光定量 PCR 检测方法检测鲫体内分离的 CyHV-2。

荧光定量 PCR 技术,以其灵敏度高、特异性好、快速准确等优点在水产病原微生物的定性和定量检测等方面已经得到广泛应用<sup>[9-10]</sup>。本实验建立了针对 CyHV-2 解旋酶基因的实时荧光定量 PCR 检测方法,为定量检测鲫体内的 CyHV-2 病毒提供了一种新的检测手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与病毒

鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)、大鲵虹彩病毒(GSIV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)由本实验室分离。锦鲤鳍条细胞(Koi-fin)由本实验室建立。鲤上皮瘤细胞(EPC)由美国夏威夷大学公共卫生与健康系 Yuanan Lu 教授惠赠。GSIV 在 EPC 细胞上增殖培养,KHV 在 Koi-fin 细胞增殖培养<sup>[11]</sup>。

### 1.2 主要试剂与仪器

Viral DNA Kit 和 Endo-Free Plasmid Midiprep Kit II 购于 Omega 公司;胶回收试剂盒购于 Promega 公司;10 × Taq 反应缓冲液、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、pMD19-T 载体购于 TaKaRa 公司。主要仪器包括:荧光定量 PCR 仪(Rotor-Gene 6000, Qiagen);分光光度计(RS 232 C, Eppendorf);凝胶成像仪(Chemdoc XRS +, Bio-Rad);超速离心机(Optima L-80XP, Beckman-Coulter)。

### 1.3 引物设计

根据 GenBank 中 CyHV-2 解旋酶编码基因序列(EU349287),应用 Primer5 软件设计特异性引物 P1/P2 和 CyHV-2F/CyHV-2 probe/CyHV-2R,第一对引物(P1/P2)扩增 CyHV-2 解旋酶基因编码区,长度为 1 446 bp,用于构建重组质粒,为制作标准曲线提供模板;第二对引物(CyHV-2F/CyHV-2 probe/CyHV-2R)用于荧光定量 PCR 扩增,长度为 110 bp。引物 P1/P2 由上海生工生物技术有限公司合成。探针引物 CyHV-2F/CyHV-2 probe/CyHV-2R 由上海闪晶分子生物科技有限公司合成。引物序列为:

P1:5'-ATGTGCAACGTGACGGCGAGT-3'

P2:5'-CTACCGTCTTTTAGGG-3'

CyHV-2F: 5'-AGTGTGTTGAAGGCTGTCTGGG-3'

CyHV-2R: 5'-ACACATTAACCATAGTCAC-CATCG-3'

CyHV-2 probe: 5'-TCAGTACAACCCGTCA-TGGTACGCC-3'

### 1.4 模板制备

取患典型出血病的鲫脾脏和肾脏组织匀浆研磨后,于 -80 °C 至室温条件反复冻融三次,4 000 r/min 离心 30 min,取上清液转移至 35 mL 超速离心管中,20 000 r/min 离心 2 h (SW28, Beckman-Coulter),DPBS 悬浮病毒沉淀,按照病毒 DNA 提取试剂盒步骤提取病毒核酸。取 8 μL 病毒核酸,加入 10 × Taq 反应缓冲液 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL、50 μmol/L 浓度的 P1、P2 引物各 1 μL、超纯水 30.5 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,将上述反应体系混匀后进行 PCR 扩增。反应参数为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 45 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。同时设立无模板的阴性对照。反应

结束后,取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶(含 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EB)进行电泳检测。

CyHV-2 解旋酶编码基因扩增产物经胶回收纯化后于 16  $^{\circ}\text{C}$  与 pMD19T 载体连接 1 h,用连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。从 LB 琼脂平板上挑取菌落接种于 5 mL 含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素(Amp<sup>+</sup>)的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  震荡培养 12~14 h,使用质粒 DNA 小量提取试剂盒提取质粒。对重组质粒用 P1/P2 引物进行 PCR 鉴定。重组质粒送上海生工生物工程技术有限公司测序。用分光光度计分别测定阳性重组质粒在 260 和 280 nm 处的吸光度,并根据以下方法计算重组质粒的 DNA 拷贝数。

分子拷贝数(个/mL) = DNA 质量浓度 / DNA 分子量,其中:DNA 质量浓度 = 260 nm 吸光度  $\times$  稀释倍数  $\times 6.02 \times 10^{23}$ ; DNA 分子量 = DNA 碱基数  $\times 324.5$ 。

### 1.5 标准曲线建立

将  $1 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  重组质粒进行 10 倍梯度稀释,使其浓度依次为  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  作为标准品模板。分别取不同稀释梯度的重组质粒 2  $\mu\text{L}$ ,依次加入  $10 \times$  Taq 反应缓冲液 2  $\mu\text{L}$ 、2.5 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  引物 CyHV-2F/CyHV-2FR 各 0.4  $\mu\text{L}$ 、25  $\mu\text{mol}/\text{L}$  探针 CyHV-probe 0.4  $\mu\text{L}$ 、5 U/ $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ ,补水至 20  $\mu\text{L}$ ,将上述反应体系混匀后进行 PCR 扩增,反应参数:95  $^{\circ}\text{C}$  10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,64  $^{\circ}\text{C}$  10 s,72  $^{\circ}\text{C}$  10 s,共 40 个循环,每个稀释度设 3 个重复。

### 1.6 荧光定量 PCR 的灵敏度、特异性和重复性试验

将  $1 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  重组质粒进行 10 倍梯度稀释,使其浓度依次为  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  作为标准品模板,用于进行灵敏度测试。分别取不同稀释梯度的重组质粒 2  $\mu\text{L}$ ,依次加入  $10 \times$  Taq 反应缓冲液 2  $\mu\text{L}$ 、2.5 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{mol}/\text{L}$  引物 CyHV-2F/CyHV-2FR 各 0.4  $\mu\text{L}$ 、25  $\mu\text{mol}/\text{L}$  探针 CyHV-probe 0.4  $\mu\text{L}$ 、5 U/ $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ ,补水至 20  $\mu\text{L}$ ,将上述反应体系混匀后进行 PCR 扩增,反应参数:95  $^{\circ}\text{C}$  10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,64  $^{\circ}\text{C}$  10 s,72  $^{\circ}\text{C}$  10 s,共 40 个循环每个稀释度设 3 个重复。

对同一样品进行实时荧光定量 PCR 检测,通

过组内的  $C_t$  值变异系数(标准偏差/重复值平均数)来初步评估该方法的重复性。

采用商品试剂盒(Omega)分别提取大鲵虹彩病毒(GSIV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲫组织的基因组核酸,以其为模板(每体系 2  $\mu\text{L}$ ),用建立的 CyHV-2 实时荧光定量 PCR 方法进行特异性检测,同时设去离子水为阴性对照。

### 1.7 临床样品检测

利用建立的 CyHV-2 实时荧光定量 PCR 方法对江苏射阳和宝应两地收集的疑似患鲫造血组织坏死症的鲫样品进行 CyHV-2 病原检测。

### 1.8 数据分析

荧光定量 PCR 反应过程中仪器自动收集荧光信号。反应结束后,利用 SDS (Sequence Detection System) 2.1 软件进行数据分析,查看扩增曲线、 $C_t$  值等,根据标准模板拷贝数与  $C_t$  值的相关性,计算得到标准曲线,用于未知样品的定量分析。

## 2 结果

### 2.1 CyHV-2 解旋酶编码基因的 PCR 扩增和克隆

将通过 PCR 反应扩增的 CyHV-2 解旋酶编码基因克隆到质粒 pMD19-T 中,构建重组质粒。重组质粒的 PCR 检测结果显示,PCR 扩增产物的大小为 1 446 bp,与预期大小一致,这表明 CyHV-2 解旋酶编码基因片段已正确插入载体 pMD19-T 中。测序结果进一步证实,扩增得到的 CyHV-2 解旋酶编码基因与 GeneBank 公布的 CyHV-2 解旋酶编码基因序列(EU349287)参考序列相似性达 99%。将转化了重组质粒的大肠杆菌扩大培养,按 Endo-Free Plasmid Miniprep Kit II 操作说明提取质粒,经分光光度计测定浓度为 310  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , $A_{260}/A_{280}$  值为 1.88。

### 2.2 标准曲线图的建立

以 10 倍梯度稀释的重组质粒为模板扩增,得到相应的动力学曲线,该方法在重组质粒浓度为  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  检测的  $R^2$  值达到 0.999 1。利用统计软件 STATISTICA 6.0,对实验中的  $C_t$  值进行统计分析。分析结果表明 6 个不同稀释梯度标准质粒 DNA 的  $C_t$  值变异系数(CV)在 0.23%~0.59% 之间(表 1)。

根据质粒拷贝数与  $C_t$  值的相关性,由 SDS

(Sequence Detection System) 2.1 软件得到标准曲线(图 1)。横坐标代表质粒模板拷贝数( $x$ ), 纵坐

标为  $C_t$  值, 拷贝数( $x$ ) 与  $C_t$  的关系为:  $C_t = -3.4121\lg x + 38.961$ 。

表 1 以重组质粒为标准模板的实时荧光定量 PCR 重复试验  
Tab. 1 Reproducibility of plasmid standard template in TaqMan real-time PCR assay

重复数 number of repeats	不同模板浓度 $C_t$ 值 $C_t$ for the following number of input copies					
	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$
1	15.15	18.17	21.92	25.29	28.79	31.88
2	15.02	18.26	21.96	25.44	28.95	32.11
3	15.23	18.30	21.83	25.49	29.09	31.89
4	15.28	18.27	21.93	25.39	29.03	32.04
5	15.19	18.30	21.94	25.46	28.72	31.89
$\bar{X} \pm s$	$15.17 \pm 0.09$	$18.26 \pm 0.05$	$21.92 \pm 0.05$	$25.41 \pm 0.07$	$28.92 \pm 0.14$	$31.96 \pm 0.09$
CV%	0.59	0.27	0.23	0.28	0.48	0.28

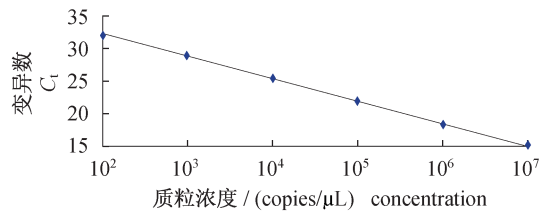


图 1 CyHV-2 实时荧光定量 PCR 检测标准曲线  
Fig. 1 Standard plot for quantification of CyHV-2 in real-time PCR assay

### 2.3 CyHV-2 荧光定量 PCR 的灵敏度、重复性和特异性试验结果

通过对重组质粒各稀释度核样品进行荧光定量 PCR 检测。结果显示, 本方法对重组质粒进行扩增最低可检测到 10 个病毒核酸分子拷贝数(图 2)。

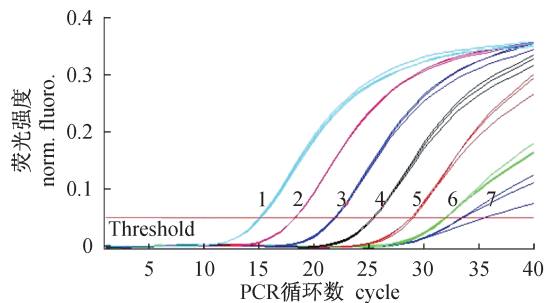


图 2 荧光定量 PCR 检测灵敏度试验  
1~7. 质粒拷贝数分别为  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ 。  
Fig. 2 Sensitive test of real-time PCR with serial dilution samples  
Plot 1 to 7 represent recombinant plasmid ranging from  $1 \times 10^7$  to  $1 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , respectively.

对同一阳性样品在同一次试验间获得的  $C_t$  值进行分析, 以检验建立的实时荧光定量 PCR 法稳定性和重复性, 实验结果表明, 同一次试验内 72 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本重合(图 3),  $C_t$  值读数范围为 21.31 ~ 22.55, 标准偏差为 0.20, 变异系数为 0.88%; 统计结果表明, 本研究所建立的 CyHV-2 实时荧光定量 PCR 检测方法重复性好, 可进行稳定、可靠的检测。

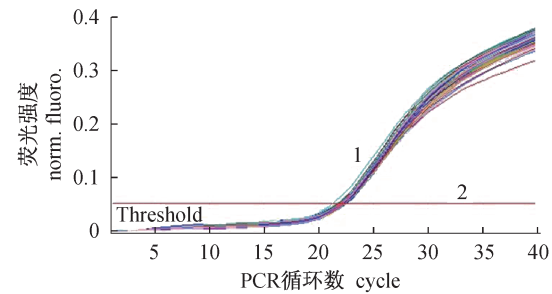


图 3 72 次重复性试验结果  
1. 72 个平行样重复; 2. 阈值。  
Fig. 3 Results of 72 repetitious detections  
1. 72 repetitious detections; 2. threshold.

以大鲵虹彩病毒(GSIV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲫的基因组总 DNA、 $1 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  重组质粒、 $1 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$  重组质粒为模板, 进行实时荧光定量 PCR 特异性检测, 结果表明, 含 CyHV-2 解旋酶编码基因的重组质粒有典型扩增曲线, 荧光信号值高(图 4), 检测结果为阳性。该样品的对照组 GSIV、KHV、鲫基因组 DNA 无特异性扩增信号。

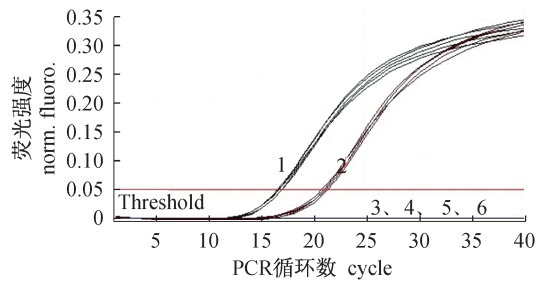


图 4 特异性试验

1.  $1 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  重组质粒; 2.  $2.1 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$  重组质粒; 3~6. KHV、GSIV、鲫基因组、水。

Fig. 4 Specificity of real-time PCR

1.  $1 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  recombinant plasmid; 2.  $2.1 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$  recombinant plasmid; 3~6. KHV, GSIV, Crucian Carp genome, water.

#### 2.4 疑似患病鲫实时荧光定量检测结果

取 2012 年收集的江苏射阳和宝应疑似患病鲫肾脏组织,通过超速离心提取病毒粒子。以离心纯化的病毒作为被检测材料、以浓度为  $1 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  的重组质粒和去离子水分别作为阳性对照和空白对照,进行疑似患病鲫的 CyHV-2 病原的荧光定量 PCR 检测。结果发现,两份患病样品经过扩增,有“S”型扩增曲线(图 5)。江苏射阳和宝应疑似患病鲫的  $C_t$  值分别为 22.46 和 30.5。根据标准曲线计算出反应体系中江苏射阳和宝应疑似患病鲫的病毒量分别为  $6.89 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  和  $3.02 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

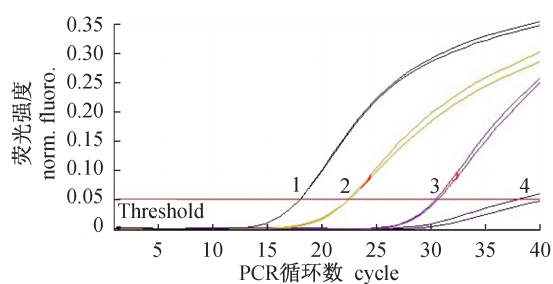


图 5 感染 CyHV-2 的检测样品的实时荧光定量 PCR 扩增曲线

1.  $1 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  重组质粒; 2. 江苏省射阳县患病鲫样; 3. 江苏省宝应县患病鲫样; 4. 水。

Fig. 5 Amplification plot of real-time PCR of CyHV-2 infected samples

1.  $1 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  recombinant plasmid; 2. sick crucian from Sheyang, Jiangsu Province; 3. sick crucian from Baoying, Jiangsu Province; 4. water.

### 3 讨论

我国是继匈牙利后第二个从养殖鲫体内分离得到鲤疱疹病毒 II 型的国家<sup>[12]</sup>。目前,对鲤疱疹病毒 II 型感染引起的造血器官坏死症的诊断与鲤疱疹病毒 II 型的检测只能参照金鱼体内分离的鲤疱疹病毒 II 型的诊断和检测方法进行,缺乏可对鲫体内鲤疱疹病毒 II 型进行快速、准确、定性定量分析的检测方法。本研究建立的 *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 方法,检测反应的灵敏度高,可达 10 个病毒核酸分子拷贝数,荧光定量 PCR 方法较之细胞培养、电镜观察法又具有耗时短、操作简便、分析准确等特点。为了验证本研究建立的 *TaqMan* 荧光定量 PCR 技术检测鲤疱疹病毒 II 型的特异性,选择了大鲵虹彩病毒(GSIV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲫的基因组总 DNA 作为对照。检测结果表明,仅鲤疱疹病毒 II 型核酸有典型扩增曲线,而大鲵虹彩病毒(GSIV)、锦鲤疱疹病毒(KHV)、鲫的基因组总 DNA 没有扩增曲线,与阴性对照的结果一致,表明所建立的方法具有特异性。与 Goodwin 等<sup>[7]</sup>基于金鱼体内分离出的病毒合酶基因建立的荧光定量方法相比本方法能特异性的检测鲫体内病理处的鲤疱疹病毒 II 型。检测该方法的稳定性和重复性实验中,对同一阳性样品 72 次重复在同一次试验间获得的  $C_t$  值进行分析,72 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本重合, $C_t$  值读数范围为 21.31~22.55,标准偏差为 0.2,变异系数为 0.88%。建立标准曲线的 6 个不同稀释梯度标准质粒 DNA 分别做 3 次重复,其  $C_t$  值变异系数在 0.23%~0.59%,表明该方法重复性好,稳定性强。对江苏射阳和宝应疑似患病鲫肾脏组织核酸作为被检测材料,进行疑似患病鲫的 CyHV-2 病原的荧光定量 PCR 检测。结果发现,两份患病样品经过扩增,有“S”型扩增曲线,证明该方法有较好的应用价值。

利用 10 倍稀释法对已知其浓度的病毒 DNA 进行梯度稀释后制作标准曲线可对未知浓度的鲤疱疹病毒 II 型进行相对定量。由于无需电泳检测、不使用溴化乙锭,保障了试验人员的安全,从核酸的提取到实时荧光定量 PCR 反应完成只需要 3 h 的时间,大大提高了检测的效率,这对于鲤疱疹病毒的早期诊断以及防控技术研究等有重要意义。

## 参考文献:

- [ 1 ] 肖俊,罗永巨. 我国鲫研究进展[J]. 广西水产科技,2010(4):12-18.
- [ 2 ] Groff J M, LaPatra S E, Munn R J, *et al.* A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1998, 10 ( 4 ) : 375 - 378.
- [ 3 ] Waltzek T B, Kelley G O, Stone D M, *et al.* Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus ( CyHV-3 ) in the family Herpesviridae [ J ]. *Journal of General Virology*, 2005, 86 ( 6 ) : 1659 - 1667.
- [ 4 ] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* ( L. ) [ J ]. *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18 ( 3 ) : 211 - 220.
- [ 5 ] Chang P H, Lee S H, Chiang H C, *et al.* Epizootic of herpes-like virus infection in goldfish, *Carassius auratus* in Taiwan [ J ]. *Fish Pathology*, 1999, 34 ( 4 ) : 209 - 210.
- [ 6 ] Goodwin A E, Khoo L, LaPatra S E, *et al.* Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus ( cyprinid herpesvirus 2 ) in the USA : molecular confirmation of isolates from diseased fish [ J ]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18 ( 1 ) : 11 - 18.
- [ 7 ] Goodwin A E, Merry G E, Sadler J. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent ( Cyprinid herpesvirus 2 ) in moribund and healthy goldfish : validation of a quantitative PCR diagnostic method [ J ]. *Disease of Aquatic Organisms*, 2006, 69 ( 2 - 3 ) : 137 - 143.
- [ 8 ] Waltzek T B, Kurobe T, Goodwin A E, *et al.* Development of a polymerase chain reaction assay to detect cyprinid herpesvirus 2 in goldfish [ J ]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2009, 21 ( 1 ) : 60 - 67.
- [ 9 ] Cutrin J M, Oliveira J G, Bandin I, *et al.* Validation of real time RT-PCR applied to cell culture for diagnosis of any known genotype of viral haemorrhagic septicaemia virus [ J ]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 162 ( 1 - 2 ) : 155 - 162.
- [ 10 ] Zhou S, Hou Z, Li N, *et al.* Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood [ J ]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103 ( 5 ) : 1897 - 1906.
- [ 11 ] 肖艺,曾令兵,徐进,等. 锦鲤鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性 [ J ]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34 ( 8 ) : 767 - 774.
- [ 12 ] Doszpoly A, Benko M, Csaba G, *et al.* Introduction of the family Alloherpesviridae : the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary [ J ]. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 2011, 133 ( 3 ) : 174 - 181.

## Establishment of a *TaqMan* real-time PCR assay for detecting the Cyprinid herpesvirus II

ZHOU Yong, ZENG Lingbing\*, ZHANG Hui, FAN Yuding, XU Jin

(*Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China*)

**Abstract:** A 1 446 bp coding region of Cyprinid herpesvirus II (CyHV-2) DNA helicase gene was amplified by PCR and cloned into pMD19T vector for the construction of recombinant plasmid. After being identified and confirmed with PCR reaction, 10-fold serial dilutions of recombinant plasmid were used as standard templates for *TaqMan* real time PCR to quantify the virus genomic copy number and generate standard curve. Herein, a *TaqMan* real-time PCR of detecting CyHV-2 was developed. It had a good linear relationship between the initial templates and  $C_t$  values with a detection range from  $1 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  to  $1 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ , the correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.999 1, and the slope value of standard curve was -3.412. The detection results showed that the specificity of this assay was high for CyHV-2 without cross-reactions with DNA templates from KHV and GSIV. The diseased crucian carp from Sheyang and Baoying, Jiangsu Province, were detected with the established method and the results showed that the content of CyHV-2 were  $6.89 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  and  $3.02 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ , respectively. The real-time PCR assay described here with high sensitivity and accuracy is considered to be a powerful tool for the rapid detection and quantification of CyHV-2 in fish.

**Key words:** crucian carp; hematopoietic necrosis disease; Cyprinid herpesvirus II (CyHV-2); *TaqMan* real-time PCR; detection method

**Corresponding author:** ZENG Lingbing. E-mail: zenglingbing@ gmail. com