

白斑综合征病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立

何琳¹, 徐海圣^{1*}, 王美珍², 戎华南²

(1. 浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310029; 2. 慈溪市水产技术推广中心, 浙江 慈溪 315300)

摘要:根据对虾白斑综合征病毒(WSSV)囊膜蛋白VP28基因保守序列,利用Primer Explorer v4.0软件设计了4条引物,建立了白斑综合征病毒环介导等温扩增快速检测方法,对反应温度和反应时间等参数进行了优化,同时将建立的LAMP检测方法 with 巢式PCR进行了比较分析。结果表明,LAMP最适反应在64℃恒温条件60 min内完成,凝胶电泳呈现梯型条带;反应体系中添加SYBR Green I荧光染料后,绿色的阳性结果明显区别于橙色阴性结果。LAMP方法的最低检出限为100拷贝/ μ L,灵敏度较巢式PCR高100倍,而且LAMP方法在1 h内即可完成检测,操作简单,无需复杂仪器,肉眼可直接观察检测结果。用建立的LAMP方法对临床发病南美白对虾样品进行了检测,结果表明,LAMP方法适合对虾白斑综合征病毒的现场快速检测。

关键词:对虾; 白斑综合征病毒; 环介导等温扩增; 快速检测

中图分类号:S 945.4

文献标识码:A

对虾白斑综合征(white spot syndrome)于1992年首次发现于中国台湾,1993年5-8月在中国大陆沿海从南到北的养殖场暴发,此后在世界范围内传播,每年给对虾养殖业造成数百亿元的经济损失,成为威胁对虾养殖业的主要疾病^[1-3]。1995年,国际兽疫局(OIE)、联合国粮农组织(FAO)以及亚太地区水产养殖发展网络中心(NACA)将其列为需要报告的水生动物病毒性疫病之一。对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)能感染所有养殖对虾种类,被感染后对虾表现出非常高的死亡率,累积死亡率通常在第一次明显感染迹象出现后3~10 d达到100%^[1-3]。为了有效控制该病的暴发流行,在对虾养殖过程中及时对WSSV进行检测显得十分重要。目前国内外已有较多方法用于WSSV的检测,包括聚合酶链式反应(PCR)^[4-5]、原位PCR^[6]、核酸分子杂交^[7-8]、酶联免疫吸附测定法^[9]、实时定量PCR^[10]等,但是这些方法均存在操作程序复杂繁琐,检测时间较长,成本较高,对检测场地、设备、人员素质要求较高等缺点,

不能满足现场快速检测的需要。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一项新型的核酸扩增技术,核酸链通过在等温环境条件下的循环置换扩增实现对靶序列的放大^[11]。由于LAMP扩增过程依赖识别靶序列6个独立区域,反应特异性很强,并且核酸扩增过程是在恒温条件下进行,普通水浴锅或有稳定热源的设备就能满足反应要求,检测成本大大降低;反应形成一系列不同长度茎环结构的DNA产物,可以通过电泳、SYBR Green I染色、观察沉淀等方法检测^[11-12]。环介导等温扩增快速检测方法是目前最简便、快速的病毒检测技术,无需昂贵的检测仪器,结果判定形象直观,特别适合于现场快速诊断病毒性疾病。

本文建立了对虾白斑综合征病毒的环介导等温扩增快速检测方法,并对反应温度和反应时间等参数进行了优化,克服了LAMP技术假阳性偏高的缺点,实现了对虾病毒诊断特异、敏感、简便、快速的目标,特别适合在对虾基层养殖场中大规模推广应用。

收稿日期:2009-12-15 修回日期:2010-01-05

资助项目:浙江省科技计划项目(2005C33053);宁波市农业科技攻关项目(2008C10041);宁波市海洋与渔业专项资金项目(7-3)

通讯作者:徐海圣, Tel:0571-86971834, E-mail:hsxu@zju.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 病样采自浙江杭州及宁波对虾养殖场,体长 3~5 cm。 *Bst* DNA Polymerase (M0275V) 购自纽英伦 (NEB) 生物技术(北京)有限公司; Betaine (B2629) 购自 Sigma 公司; SYBR Green I 为北京鼎国生物技术有限责任公司进口分装; DNA 提取试剂盒、pMD-18 T-Vector 及大肠杆菌感受态细胞 JM109 购自大连宝生物公司。

1.2 DNA 提取

取 200 mg 南美白对虾鳃部组织,按 DNA 提取试剂盒说明提取 DNA,用作巢式 PCR 及

LAMP 检测模板。

1.3 对虾 WSSV 阳性模板的确认

将 1.2 中制备的检测模板,参照文献[4]的方法对白斑综合征病毒进行巢式 PCR 检测,并对巢式 PCR 产物进行测序与对比分析,确认制备的检测模板呈 WSSV 阳性后,进行 LAMP 检测方法的建立。以双蒸水、健康南美白对虾鳃部组织 DNA 作为阴性对照。

1.4 LAMP 引物设计

根据 GenBank 白斑综合征病毒 (WSSV) 囊膜蛋白 VP28 基因序列 (AF369029)^[13],利用 Primer Explorer 4.0 软件,设计一套 LAMP 引物,包括两条内引物 (FIP, BIP)、两条外引物 (B₃, F₃) (序列见表 1)。

表 1 白斑综合征病毒环介导等温扩增检测的引物序列
Tab.1 Primers used for LAMP of envelope protein gene of WSSV

引物名称 primer name	序列 sequences
FIP	5'-CTGCAACCTCAAAAATAGCCTCTGTTTTGGCAGTTTCTCCGTTCTTTTGT-3'
BIP	5'-GCGAGCAAGGCAATTTTCAGCTTTTCAAATCCAAGAGGCACTCCAAT-3'
F ₃	5'-CTCCTGCGATAAAGGGATGTC-3'
B ₃	5'-AGTTGGATGGATTGAGGCGT-3'

1.5 LAMP 反应条件

采用总体积为 25 μL 的反应体系,其中包括: MgSO₄、betaine、dNTPs、内引物、外引物、1 × ThermoPol Buffer 以及适量的 DNA 模板;混匀,37 °C 保温 10 min,之后 94 °C 5 min,冰上冷却后加入 *Bst* DNA 聚合酶于 65 °C 温育 60 min,80 °C 灭活 2 min;产物于 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 LAMP 反应体系及反应条件优化

选择不同浓度梯度的 Mg²⁺、dNTPs、betaine、不同浓度比例的内外引物,电泳观察扩增效果,确定最佳反应体系。

改变反应时间和温度分别进行 LAMP 反应,电泳观察扩增效果,确定最佳反应条件。

1.7 灵敏度与特异性试验

根据 GenBank 中 WSSV 囊膜蛋白 VP 28 基因序列 (AF369029)^[13],设计包含有 LAMP 检测目标序列的上下游基因序列引物 Pf 和 Pr, Pf: 5'-CGATTTCCCTCCCCCGTCTT-3', Pr: 5'-AGCCAACCAAGCACCCGT-3';利用 1.2 中制备的 WSSV 检测模板,扩增包含目标序列的上下游基因序列,并将该序列 (625 bp) 连接至 T 载体

(pMD-18 T-Vector) 上,制备含有目标序列的重组质粒 pMDWSSV;紫外分光光度计检测质粒 A₂₆₀ 吸光度值,根据质粒分子量计算质粒浓度,定量后将重组质粒原液 10 倍系列稀释为 10⁷~10⁰ 拷贝/μL,分别取每一数量级稀释液 2 μL 作为用作检测模板,比较 LAMP 和巢式 PCR 的检测灵敏度。

用建立的 LAMP 反应体系分别检测对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒 (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)、对虾桃拉病毒 (taura syndrome virus, TSV)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*),验证 LAMP 检测方法的特异性。

1.8 抗污染实验

以 1.2 中制备的检测模板,分 3 组进行 LAMP 扩增反应。dTTP 组:加 dATP、dCTP、dGTP、dTTP,不加 dUTP; dTTP/dUTP 组:加 dATP、dCTP、dGTP、dTTP/dUTP 各 50%; dUTP 组:加 dATP、dCTP、dGTP、dUTP,不加 dTTP。3

组中除 dNTP 不同外,其它成分和扩增条件相同。每组扩增产物分抗污染组和非抗污染组进行,非抗污染组中每管加上上述各组 LAMP 扩增产物 1 μL ,其余为 dTTP/dUTP 组反应液组分。抗污染组除具有非抗污染组所有组分外,每管另加 UNG 酶 0.5 U。按 1.6 确定的反应条件进行 LAMP 反应。

以 1.7 中制备的重组质粒原液 10 倍系列稀释为检测模板,分 dTTP 组、dTTP/dUTP 组、dUTP 组进行 LAMP 扩增反应,比较反应体系加入 dUTP 对 LAMP 灵敏度的影响。

1.9 对虾白斑综合征病毒 LAMP 检测方法

对浙江杭州和宁波 3 个养殖场共 60 份怀疑感染白斑综合征病毒的对虾病样分别用巢式 PCR 及 LAMP 方法进行检测,比较实际检测的效果。

2 结果

2.1 对虾白斑综合征病毒 LAMP 检测方法建立

根据设计的一套特异性引物对 WSSV 囊膜蛋白 VP 28 基因进行 LAMP 扩增(图 1-A),WSSV 基因泳道产生阶梯状条带,以双蒸水、健康南美白对虾鳃部组织 DNA 作为检测模板的阴性对照均未有条带出现;加入荧光染料 SYBR Green I 后,阳性反应管呈现绿色荧光,而阴性对照管为橙色(图 1-B)。结果表明,LAMP 引物能够有效扩增 WSSV 囊膜蛋白 VP28 基因。

2.2 反应体系及反应条件的优化

优化后的反应体系为:总体积 25 μL 体系中含有引物 FIP 和 BIP 2 $\mu\text{mol/L}$,引物 F₃ 和 B₃ 0.25 $\mu\text{mol/L}$,dUTP 和 dTTP 0.5 mmol/L,dATP、dCTP 和 dGTP 1.0 mmol/L,Tris-HCl 20 mmol/L,KCl 10 mmol/L,(NH₄)₂SO₄ 10 mmol/L,MgSO₄ 2 mmol/L,Triton X-100 0.1%,Betaine 0.8 mol/L。

在不同温度和时间条件下分别进行 LAMP 扩增,(图 2,图 3),在 58~68 $^{\circ}\text{C}$ 均有扩增,64 $^{\circ}\text{C}$ 时效果最好。64 $^{\circ}\text{C}$ 时体系 15 min 即有扩增,30 min 时电泳条带明显,60 min 时效果最好。

2.3 LAMP 检测灵敏度与特异性试验

将 10 倍系列稀释的模板分别进行 LAMP 和巢式 PCR 检测(图 4),LAMP 方法的检测限为 100 拷贝/ μL ,而巢式 PCR 的检测限为 10 000 拷贝/ μL ,即 LAMP 的检测限比巢式 PCR 低 100 倍。

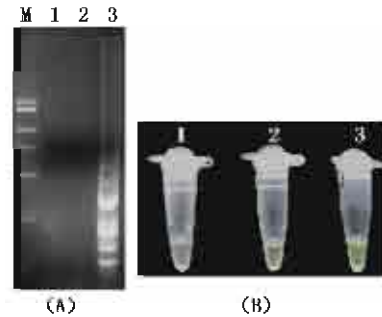


图 1 WSSV 环介导等温扩增反应的检测结果
琼脂糖凝胶电泳(A)及 SYBR Green I 染色(B)
M:DNA 标准;1:阴性对照(双蒸水);2:阴性对照(健康虾组织);3:白斑综合征病毒。

Fig.1 Result of detection of WSSV by LAMP
2% agarose gel electrophoresis (A) and visual
observation using SYBR Green I (B)
M:DL2000 DNA Ladder; 1:Negative control(Water bidistilled);
2:Negative control(Healthy shrimp tissue); 3:WSSV.

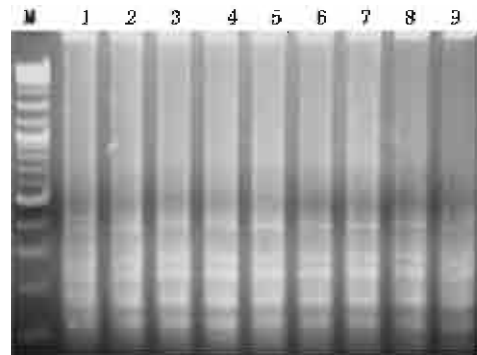


图 2 温度对 LAMP 扩增的影响
Fig.2 Effect of temperatures on LAMP amplification
M:2-log DNA Ladder; 1:58 $^{\circ}\text{C}$; 2:60 $^{\circ}\text{C}$; 3:62 $^{\circ}\text{C}$; 4:63 $^{\circ}\text{C}$;
5:64 $^{\circ}\text{C}$; 6:65 $^{\circ}\text{C}$; 7:66 $^{\circ}\text{C}$; 8:67 $^{\circ}\text{C}$; 9:68 $^{\circ}\text{C}$

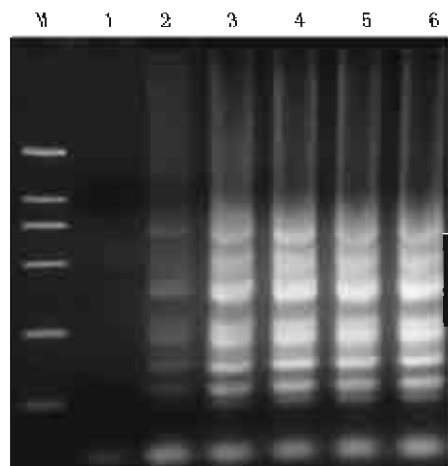


图 3 时间对 LAMP 扩增的影响
Fig.3 Effect of time on LAMP amplification
M:DL2000 DNA Ladder; 1:0 min; 2:15 min; 3:30 min;
4:45 min; 5:60 min; 6:75 min

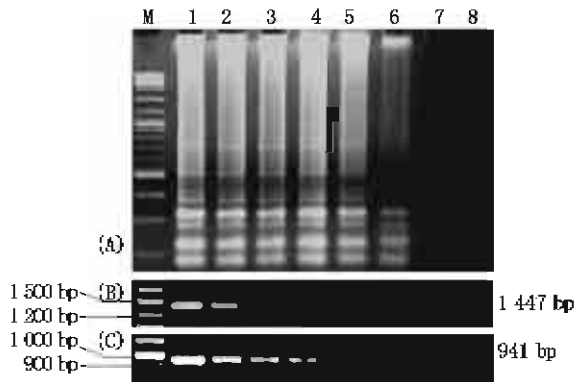


图4 LAMP与巢式PCR对WSSV DNA检测的灵敏度比较

(A) LAMP检测; (B) 一步PCR检测; (C) 二步PCR检测。
M; DNA标准; 1~8; 重组质粒10倍系列稀释为检测模板,
 $10^7 \sim 10^0$ copies/ μL 。

Fig. 4 Sensitivity of WSSV-DNA detection by LAMP and nested PCR

(A) LAMP products; (B) one-step PCR products;
(C) two-step PCR products.
M; 2-log DNA Ladder; 1~8; Amplification products
using 10-fold diluted plasmid carried WSSV-DNA as template,
 $10^7 \sim 10^0$ copies/ μL , respectively.

用建立的LAMP反应体系检测对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒、桃拉病毒、嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、大肠杆菌,结果显示建立的LAMP体系对感染WSSV的对虾检测呈阳性,而对其他病原检测均为阴性,无交叉反应,与预期结果吻合,具有高的特异性。

2.4 抗污染试验

组常dTTP组中的抗污染组和非抗污染组LAMP反应均为阳性,扩增效率几乎相同;dTTP/dUTP组中抗污染组为LAMP反应为阴性,非抗污染组为阳性;dUTP组抗污染组和非抗污染组LAMP反应均为阴性。当反应体系中加入一定量dUTP时,LAMP扩增效率和灵敏度降低,当dTTP/dUTP各占50%时,灵敏度降低10倍(图5),当体系中只有dUTP而无dTTP时,几乎没有明显的扩增反应。

2.5 对虾白斑综合征病毒LAMP检测方法的应用

对60份怀疑感染WSSV的南美白对虾病样进行检测,其中巢式PCR检出阳性样品41份,LAMP检出阳性样品45份。将巢式PCR检出阴性而LAMP检出为阳性的对虾样品参考 Xie

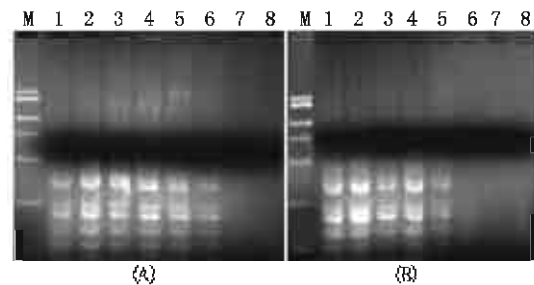


图5 dUTP对LAMP灵敏度的影响

M; DNA标准; 1~8; 重组质粒10倍系列稀释为检测模板,
 $10^7 \sim 10^0$ copies/ μL 。A; dTTP; B; dTTP/dUTP

Fig. 5 Effect of dUTP on sensitivity of LAMP

M; DL 2000 Ladder; 1~8; Amplification products using
10-fold diluted plasmid carried WSSV-DNA as template,
 $10^7 \sim 10^0$ copies/ μL , respectively.

等^[14]的方法,制成病毒悬液,经第四腹节注射4组健康克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)进行人工感染。5~6 d收集濒死及死亡个体,经巢式PCR及LAMP检测均为阳性。

3 讨论

环介导等温扩增(LAMP)技术是一种快速、灵敏的检测方法,能在恒温条件下1 h内对数个拷贝的DNA进行 10^9 倍的扩增^[11-12],可作为病毒病原的快速检测方法。本文针对白斑综合征病毒(WSSV)囊膜蛋白VP28基因,利用Primer Explorer v4.0软件设计了特异性引物,建立了了对虾白斑综合征病毒LAMP快速检测方法,反应过程快捷,只需将反应混合液在恒温64℃条件下保持1 h后加入荧光染料SYBR Green I即可肉眼观察结果,而且检测灵敏度是巢式PCR方法的100倍。

目前国内外白斑综合征病毒最常用的检测方法是聚合酶链式反应(PCR)^[4-5],但PCR反应必须在有温度循环的条件下才能实现基因扩增,95℃高温变性过程必不可少,温度循环的过程损失了很多时间,而LAMP反应在恒温条件下进行,不需要高温使DNA双链解链,省去了DNA高温变性的过程,节约了检测时间。另外,同PCR依赖于价格昂贵的PCR仪相比,LAMP反应是在恒温环境下进行,普通水浴锅或其它有稳定热源的装置就可以,仪器成本大大降低,更有利于现场快速检测。实验中发现LAMP方法的检测限为100拷贝/ μL ,而巢式PCR的检测限为10 000拷贝/

μL , LAMP 的检测限比巢式 PCR 低 100 倍, 即 LAMP 检测灵敏度比巢式 PCR 高两个数量级, 远高于普通 PCR 和巢式 PCR, 从实验中对怀疑感染白斑综合征病毒的凡纳滨对虾病样检测结果可知, 巢式 PCR 检测有假阴性现象, LAMP 病毒检出率高于巢式 PCR。

由于 LAMP 极高的灵敏度和极大的 DNA 扩增量, 极易造成扩增产物的污染和检测的假阳性结果, 实验采用 dUTP 和 UNG 酶进行了抗污染实验, 效果明显, 解决了限制 LAMP 技术中的易被污染干扰的问题。实验中, dTTP 组中加入 dTTP, 未加 dUTP, 抗污染组和非抗污染组 LAMP 反应均为阳性, 扩增效率几乎相同, 说明 UNG 酶不能降解含 dTTP 的 LAMP 扩增产物; dTTP/dUTP 组中均加入了一定量的 dUTP, 抗污染组 LAMP 反应为阴性, 非抗污染组为阳性, 说明 UNG 酶能选择性降解含 dUTP 的 LAMP 扩增产物, 但体系中加入 dUTP 后扩增效率和检测灵敏度会降低, 当体系中只有 dUTP 而无 dTTP 时, 几乎没有明显的扩增反应。我们发现只要每条扩增的链中有数个 dUTP 掺入, 就能被 UNG 酶识别并降解, 但随着 dUTP 量的增加扩增效率明显降低, 这说明在抗污染实际操作中, 只需在常规 dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 混合物中加入适量 dUTP (介于 dTTP/dUTP 总量的 25% 至 50%) 就能达到抗污染的效果。

白斑综合征病毒 LAMP 快速检测方法具有特异、灵敏、快速的特点, 在解决了易被污染和假阳性偏高问题后, 具有良好的实际应用前景, 可以检出对虾白斑综合征发病早期或隐性感染阶段养殖对虾体内携带的较低数量的病毒, 可在现场对养殖对虾进行及时检测, 在白斑综合征发病早期检测出 WSSV 的存在, 为养殖者和管理者采取必要的措施提供参考, 避免白斑综合征的大规模暴发。

参考文献:

- [1] Escobedo-Bonilla C M, Alday-Sanz V, Wille M, *et al.* A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus [J]. *J Fish Dis*, 2008, 31 (1): 1-18.
- [2] Lo C F, Ho C H, Chert C H, *et al.* Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis in reproductive organs [J]. *Dis Aquat Organ*, 1997, 30(1): 53-72.
- [3] Lo C F, Ho C H, Peng S E, *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [J]. *Dis Aquat Organ*, 1996, 27(3): 215-225.
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1151.2-2002 对虾白斑病毒 (WSV) 聚合酶链式反应 (PCR) 检测方法 [S]. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准, 2002.
- [5] Kim C K, Kim P K, Sohn S G, *et al.* Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in Penaeid shrimp [J]. *J Fish Dis*, 1998, 21(1): 11-17.
- [6] Jian X F, Lu L, Chen Y G, *et al.* Comparison of a novel in situ polymerase chain reaction (ISPCR) method to other methods for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus vannamei* [J]. *Dis Aquat Organ*, 2005, 67(1-2): 171-176.
- [7] Durand S V, Lightner D V, Nunan L M, *et al.* Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of Penaeid shrimp [J]. *Dis Aquat Organ*, 1996, 27(1): 59-66.
- [8] Wang C S, Tsai Y J, Chen S N. Detection of white spot disease virus (WSDV) infection in shrimp using *in situ* hybridization [J]. *J Invertebr Pathol*, 1998, 72(2): 170-173.
- [9] Chen Z J, Wang C S, Shih H H. Quantal assay of white spot syndrome virus using a capture ELISA [J]. *J Fish Dis*, 2002, 25(4): 249-251.
- [10] Durand S V, Redman R M, Mohney L L, *et al.* Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV [J]. *Aquaculture*, 2003, 216 (1-4): 9-18.
- [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63-e63.
- [12] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(3): 223-229.
- [13] Van Hulten M C, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001(1): 286: 7-22.
- [14] Xie X X, Li H Y, Xu L M, *et al.* A simple and

efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles[J]. *Virus*

Res, 2005,108(1-2):63-66.

Development of rapid detection for white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification

HE Lin¹, XU Hai-sheng^{1*}, WANG Mei-zhen², RONG Hua-nan²

(1. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Spreading Center of Technology in Aquatic Science of Cixi City, Zhejiang Province, Cixi 315300, China)

Abstract: A rapid, sensitive and simple method for white spot syndrome virus (WSSV) detection was established. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay is a novel method of gene amplification with high specificity, sensitivity and rapidity, which can be applied for disease diagnosis in shrimp aquaculture. The method is performed under isothermal conditions with a set of four specially designed primers that recognize six distinct sequences of the target. In the present study, a set of four specific primers were designed based on the conservative sequence of envelope protein gene VP28 using Primer Explorer v4 software, and a rapid detection of WSSV was established by using LAMP assay. The parameters of reaction time and temperature were optimized, and its specificity and sensitivity were assessed. The reactions were carried out at 58, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 °C for different time (15 - 75 min). A plasmid pMDWSSV carrying target sequence of LAMP detection was constructed. Ten-fold diluted pMDWSSV ($10^7 - 10^0$ copies/ μ L) was used as template for LAMP assay to investigate the detection limit. To determine the specificity, LAMP assays were carried out with DNA templates from other pathogens (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus IHNV, Taura Syndrome Virus TSV, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *E. coli*). The results showed the optimum LAMP assay for the rapid detection of WSSV was performed at 64 °C for 60 min. The LAMP assay had an unequivocal detection limit of 100 copies/ μ L, and it was 100 times lower than that of the nested PCR. The nucleic acids of other pathogens were not amplified by this LAMP system with the specific primers, which showed a good specificity. The resulting amplicons were detected using visual observation after the addition of SYBR Green I and gel electrophoresis. We investigated the efficacy of uracil-N-glycosylase (UNG) in preventing contamination in the LAMP assay procedure and explored its effect on the amplification efficiency. Products of LAMP with dUTP adding could be lysed by UNG. UNG could prevent LAMP products contamination effectively, but its effect on amplification efficiency was visible. The LAMP assay could be finished within an hour, requiring only a regular laboratory water bath or heat block for reaction and the result could easily be detected using visual observation. Clinical suspected WSSV-infected diseased shrimp samples were detected by both LAMP and PCR assay, which indicated LAMP could be more sensitive for WSSV detection.

Key words: shrimp; white spot syndrome virus; loop-mediated isothermal amplification; rapid detection

Corresponding author: XU Hai-sheng. E-mail: hsxu@zju.edu.cn