第 39 卷第 4 期
2015 年 4 月

水 产 学 报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

Vol. 39, No. 4
Apr., 2015

文章编号:1000 - 0615(2015)04 - 0580 - 09

DOI:10.11964/jfc.20141109582

牡蛎疱疹病毒魁蚶株交叉引物等温扩增检测方法的建立及初步应用

赵小金[1,2]，张盛静[1]，白昌明[2]，岳志芹[3]，
王崇明[2*]，尹伟力[3]，蔡生力[1]，黄 倢[2]

(1. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071;
3. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心,山东 青岛 266002)

摘要: 为建立牡蛎疱疹病毒魁蚶株快速、灵敏、准确和操作简便的检测方法,实验根据已测序完成的 OsHV-1-SB 全基因组序列,选择其保守区域,建立了交叉引物等温扩增检测方法,并对反应温度、dNTPs、Mg^{2+} 浓度和反应时间进行了优化。结果显示,最佳温度为 63 ℃,反应时间为 60 min,dNTPs 浓度为 1.4 mmol/L,Mg^{2+} 浓度为 6 mmol/L。该方法检测灵敏度为 30 拷贝的质粒 DNA,并且特异性较强,与贝类常见病原急性病毒性坏死病毒、鲍鱼疱疹病毒、派琴虫、包纳米虫、马尔泰虫以及对虾白斑综合征病毒和副溶血弧菌均无交叉反应。使用实验建立的 CPA 检测方法对 2012 年分别采自韩国庆尚南道、山东长岛、辽宁大连共计 22 份 OsHV-1-SB 感染情况未知的魁蚶样品进行了检测。研究表明,实验所建立的 OsHV-1-SB 的 CPA 检测方法简单、快速、灵敏且特异性强。由于其检测结果可通过简单离心或者向反应管中加入核酸荧光染料 GeneFinder™进行肉眼观察,所以可以在沿海贝类养殖厂及条件简陋的实验室使用,具有较好的应用前景。

关键词: 魁蚶; 牡蛎疱疹病毒魁蚶株; 交叉引物等温扩增; 检测

中图分类号: S 917.1　　**文献标志码**:A

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)俗称赤贝、血贝、大毛蚶,属瓣鳃纲(Lamellibranchia)、翼形亚纲(Pteriomorphia)、蚶目(Arcoida)、蚶科(Arcidae)。魁蚶为冷水性贝类,主要分布于中国、日本、朝鲜半岛及俄罗斯东南部沿海,在我国南北部沿海均有分布,以黄海北部较多。魁蚶肉质鲜美,具有很高的经济价值,深受国内外市场的欢迎[1-2]。

疱疹病毒是一种大型的包膜病毒,基因组为线性双链 DNA,大小介于 125 ~ 245 kb。国际病毒分类委员会 2012 年发表的病毒分类第九次报告,将原来的疱疹病毒科提升为疱疹病毒目,在疱疹病毒目中增设软体动物疱疹病毒科[3]。从 20 世纪 70 年代以来,世界上很多国家都先后发现过由疱疹病毒导致的不同贝类死亡的现象。现已从美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)、太平洋牡蛎(*C. gigas*)、欧洲牡蛎(*Ostrea edulis*)、葡萄牙牡蛎(*C. angulata*)、新西兰扁牡蛎(*Tiostrea chilensis*)、澳大利亚扁牡蛎(*O. angasi*)、近江牡蛎(*C. rivularis*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)、台湾杂色鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)和澳大利亚鲍鱼(*Haliotis* sp.)中发现了疱疹样病毒,并引起这些贝类发生大规模死亡[4]。

牡蛎疱疹病毒魁蚶株(SB strain of Ostreid herpesvirus-1,OsHV-1-SB)由 2012 年 6 月本实验室从山东长岛、莱州、日照和即墨等地的养殖基地样

收稿日期:2014-11-27　　**修回日期**:2015-01-07

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(20603022013025);国家质检总局科研专项(2013IK040)

通信作者:王崇明,E-mail:wangcm@ysfri.ac.cn

品中检测获得,健康魁蚶感染后,主要表现为反应迟钝、触碰后双壳不闭合或闭合缓慢,外套膜内缩,内脏团呈灰白色或黑灰色。出现上述症状的个体一般 1 d 内就会死亡,其死亡率可达到 75%。

交叉引物等温扩增(cross priming amplification,CPA)技术是一种最近发展起来的新型等温扩增技术,CPA 扩增体系中除包含具有链置换功能的 Bst DNA 聚合酶外,还包括扩增引物和两条交叉引物,在合适的反应体系下,这些寡聚核苷酸链能依靠 Bst DNA 聚合酶的高活性的链置换特性,使 DNA 的循环扩增能不断完成[5-8]。该技术不仅摆脱了对精密仪器设备的依赖,反应时间也大大缩短。本研究依据 CPA 技术中的单交叉原理建立了一种 OsHV-1-SB 的 CPA 检测方法,并将其与 PCR 方法进行了比较,以期为 OsHV-1-SB 的诊断提供一种现场快速高灵敏度的检测方法。

1　材料与方法

1.1　实验材料

魁蚶病料　　感染 OsHV-1-SB 的魁蚶样品,2012 年采自山东长岛养殖海区,经 PCR 鉴定为阳性,本实验室保存。

主要试剂　　10 × ThermoPol Reaction Buffer、Bst DNA 聚合酶(8 000 U/mL)购自 New England Biolabs;Premix Ex Taq、dNTPs(10 mmol/L)、pMD18-T 购自 TaKaRa 生物工程有限公司(大连);GeneFinder™ 购自厦门百维信生物技术有限公司;Betaine 购自 Sigma-Aldrich 公司;质粒小提试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Zymo 公司。

实验仪器　　PCR 仪(美国应用生物系统公司,Applied Biosystems);电泳仪(北京六一仪器厂 DYY-16B 型稳压稳流电泳仪);Fuji Film(LAS 3000)凝胶成像系统;NanoDrop 2000c 超微量分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2　CPA 引物设计

根据本实验室已测序完成的 OsHV-1-SB 全基因组序列,选择其保守序列作为靶序列。利用 PrimerExplorer 4.0 软件,设计出一套 CPA 引物(表 1)。为便于对 CPA 扩增产物进行特异性检验,在引物 1 s 中引入限制性内切酶 *Hin*d III 的识别序列 AAGCTT。

表 1　OsHV-1-SB CPA 引物

Tab.1　Primers used for OsHV-1-SB CPA assay

引物 primer	引物序列(5′-3′) primer sequence
1s	TGCACAGATTCTCTGGTAAGTCG-AAGCTT-CGGTGTCACAGAATAAGGTT
2a	TGCACAGATTCTCTGGTAAGTCG
3a	TTTACCATCTCCAACAGGATGTG
4s	AACTAATTCCCTATCATCTACCT
5a	ATCTCGTCATCCATGTGTCCTACT

注:引物 1s 中序列“AAGCTT”为引入的限制性内切酶 *Hin*d III 的识别序列

Notes:that AAGCTT is the recognition site of restriction enzyme *Hin*d III

1.3　OsHV-1-SB 粗提液的制备和病毒总 DNA 的提取

将采集的 PCR 检测为阳性的魁蚶样品在冰上解冻,取其外套膜、鳃及肝胰腺组织在冰上用过滤海水反复冲洗,加入 9 倍体积的除菌过滤海水,在冰浴中用高速匀浆机 20 000 r/min 匀浆 4 ~ 5 次,每次 1 min;匀浆液经 400 目筛绢过滤除去杂质后,1 000 × *g*,4 ℃离心 30 min,取上清液;2 500 × *g*,4 ℃离心 1 h,取上清液;7 500 × *g*,4 ℃离心 30 min,取上清液;用 0.45 μm 滤膜过滤除菌即为 OsHV-1-SB 粗提液,-80 ℃超低温冰箱保存备用[9]。

按照天根公司生产的 TIANamp Genomic DNA Kit 说明书上的方法提取 OsHV-1-SB 粗提液的总 DNA。

1.4　CPA 反应体系的建立和条件优化

CPA 反应初始体系总体积为 25 μL,其中包括:4 mmol/L $MgCl_2$、1.2 mol/L Betaine、1.0 mmol/L dNTPs、1.6 mmol/L 引物 1a、0.8 mmol/L 引物 2a/3a、0.2 mmol/L 引物 4s/5a、10 × ThermoPol Buffer 2.5 μL、Bst DNA 聚合酶 8 U 以及适量的 DNA 模板,于 65 ℃温育 60 min,85 ℃灭活 10 min;并对产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,使用凝胶成像仪照相。

反应温度的优化　实验中扩增温度按照59、61、63、65、67 和 69 ℃依次递增,每个温度条件下分别设置 3 个重复进行实验,从中选出 CPA 的最佳反应温度。

Mg^{2+}浓度的优化　在选定的温度下,将 $MgCl_2$ 的终浓度以 2、4、6、8、10 和 12 mmol/L 依次递增,每个浓度条件下设置 3 个重复,从而选定最佳 $MgCl_2$ 浓度。

dNTPs 浓度的优化　在选定的温度以及优化后的 $MgCl_2$ 浓度下,将 dNTPs 的终浓度以 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 和 2.0 mmol/L 依次递增,每个浓度条件下设置 3 个重复,从而选定最佳 dNTPs 用量。

反应时间的优化　在选定的温度以及优化后的 $MgCl_2$ 和 dNTPs 浓度下,扩增时间按照 20、30、40、50 和 60 min 依次递增,设置 3 次重复,确定最佳扩增时间。

1.5　CPA 产物的酶切鉴定

使用优化后的反应体系对 OsHV-1-SB 进行 CPA 核酸扩增,对产物进行 *Hin*d III 酶切,酶切结果通过 2% 琼脂糖凝胶电泳并拍照观察。

1.6　CPA 灵敏度实验

靶序列引物设计　根据本实验室已测序完成的 OsHV-1-SB 基因组序列,选取其保守序列使用 Premier 5.0 软件设计上下游引物,上游引物 CPA-F:5′-ACGAGCTAGAACAACTGACTAGACG-3′,下游引物 CPA-R:5′-ATGATGATGTGGTTTTTGTTT-GTTG-3′,预计扩增片段大小为 700 bp。

重组质粒的构建　以提取的感染 OsHV-1-SB 的魁蚶总 DNA 为模板,PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min;产物 4 ℃保存。1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增结果。将扩增出约 700 bp 的目的片段进行胶回收,然后将该目的基因连接至 pMD18-T 载体中,做 TA 克隆并测序。

从测序正确的 TA 克隆菌体中提取质粒,电泳检测纯度,分光光度计测量其浓度,计算质粒拷贝数,再进行 10 倍梯度系列稀释成 3×10^7 ~ 3×10^0 拷贝/μL 进行 CPA 和常规 PCR 灵敏度测试。CPA 体系采用“1.4”中优化后的配比,常规 PCR 反应体系同上。

1.7　CPA 特异性实验

分别以贝类常见病原急性病毒性坏死病毒(AVNV,acute viral necrosis virus)、鲍鱼疱疹病毒(abalone herpes viruses)、派琴虫(*Perkinsus* sp.)、包纳米虫(*Bonamia* sp.)、马尔泰虫(*Marteilia* sp.)以及对虾白斑综合征病毒(WSSV,white spot syndrome virus)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)核酸作为待检样品,以牡蛎疱疹病毒魁蚶株呈阳性的核酸作为阳性对照,设置 3 次重复,检验 CPA 方法的特异性。

1.8　利用 CPA 进行实际样品的检测

使用已优化的 CPA 方法对 2012 年分别采自韩国庆尚南道、辽宁大连和山东长岛的 OsHV-1-SB 感染情况未知的 22 份魁蚶样品进行检测,使用核酸荧光染料 GeneFinder™ 染色并观察颜色变化。

2　结果

2.1　CPA 反应条件的优化

反应温度　对 OsHV-1-SB CPA 反应体系进行不同温度梯度(59,61,63,65,67 和 69 ℃)扩增,结果显示当 CPA 反应体系反应温度为 63 ℃时,可以得到最清晰明亮的特异性条带(图 1)。因此,选择 63 ℃作为 CPA 检测 OsHV-1-SB 的反应温度。

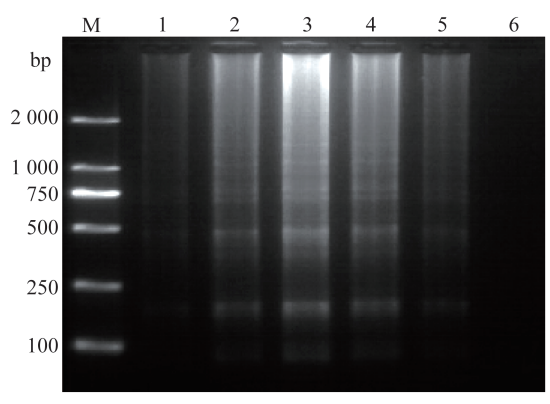

图 1　OsHV-1-SB CPA 反应体系温度优化

M. DL 2000™ DNA Marker; 1 ~ 6. 分别对应 59、61、63、65、67 和 69 ℃

Fig. 1　Optimization of the reaction temperature of the OsHV-1-SB CPA assay

M. DL 2000™ DNA Marker; lanes 1 – 6 are different reaction temperatures:59,61,63,65,67 and 69 ℃ respectively

Mg^{2+}浓度　确立最适反应温度为 63 ℃后,对 OsHV-1-SB CPA 反应体系中 Mg^{2+} 浓度(2,4,6,8,10,12 mmol/L)进行优化,结果显示当 Mg^{2+} 浓度为 6 mmol/L 时有最清晰的特异性条带(图 2),因此,在 OsHV-1-SB CPA 反应体系中以 6 mmol/L 作为最佳 Mg^{2+} 浓度。

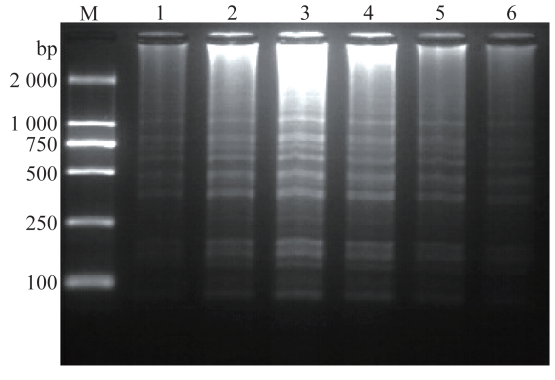

图 2　OsHV-1-SB CPA 反应体系 Mg^{2+} 优化

M. DL 2000™ DNA Marker; 1 ~ 6. 分别对应 2、4、6、8、10 和 12 mmol/L Mg^{2+} 浓度

Fig. 2　Optimization of the Mg^{2+} concentration of the OsHV-1-SB CPA assay

M. DL 2000™ DNA Marker; lanes 1 – 6 are different Mg^{2+} concentrations: 2, 4, 6, 8, 10 and 12 mmol/L respectively

dNTPs 浓度　　在已确定最适温度和最佳 Mg^{2+} 浓度的条件下,将 dNTPs 终浓度按照 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 和 2.0 mmol/L 依次递增进行扩增,结果显示,在终浓度为 1.4 mmol/L 时条带最清晰(图 3),因此,选择 1.4 mmol/L 作为 OsHV-1-SB CPA 最适 dNTPs 浓度。

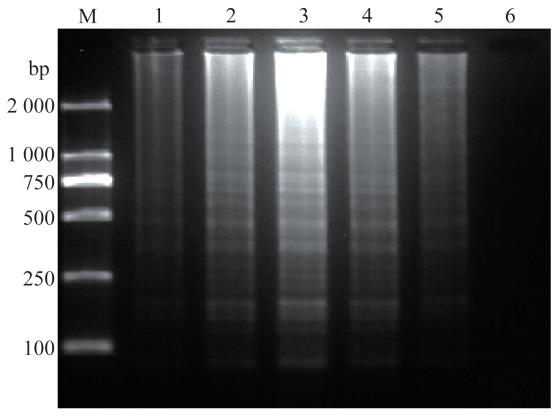

图 3　OsHV-1-SB CPA 反应体系 dNTPs 浓度的优化

M. DL 2000™ DNA Marker; 1 ~ 6. 分别对应 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 和 2.0 mmol/L

Fig. 3　Optimization of the dNTPs concentration of the OsHV-1-SB CPA assay

M. DL 2000™ DNA Marker; lanes 1 – 6 are different dNTPs concentrations: 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 and 2.0 mmol/L respectively

反应时间的优化　　在已优化温度、Mg^{2+} 浓度和 dNTPs 浓度的基础上,对反应时间进行了优化(图 4),最终选择 60 min 作为 OsHV-1-SB CPA 反应的最佳时间。

2.2　CPA 产物的酶切鉴定

对 CPA 产物加入 *Hin*d III 进行特异性酶切,同时以不加酶产物和健康魁蚶核酸扩增产物作为对照,2% 琼脂糖凝胶电泳观察条带(图 5),结果显示,OsHV-1-SB 核酸 CPA 产物酶切后呈现大小不等的 5 条片段。

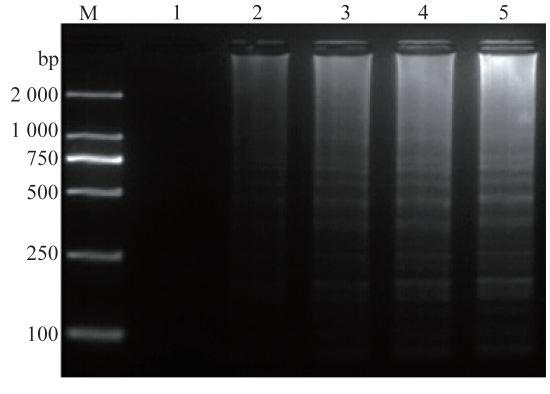

图 4　OsHV-1-SB CPA 反应体系时间优化

M. DL 2000™ DNA Marker; 1 ~ 5. 分别对应 20、30、40、50 和 60 min

Fig. 4　Optimization of reaction time of the OsHV-1-SB CPA assay

M. DL 2000™ DNA Marker; lanes 1 – 5 are diferent reaction time: 20, 30, 40, 50 and 60 min respectively

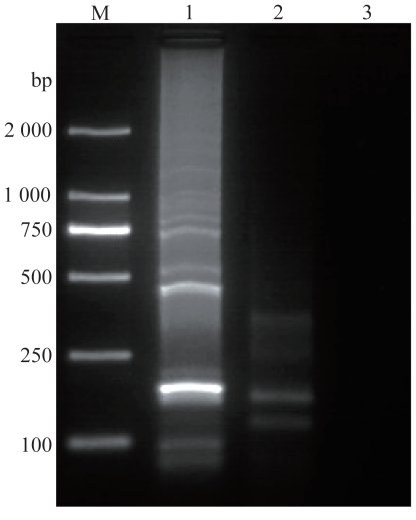

图 5　CPA 产物酶切鉴定

M. DL 2000™ DNA Marker; 1. 不加酶对照; 2. 酶切组; 3. 健康魁蚶核酸扩增产物对照

Fig. 5　CPA products digested by restriction enzyme *Hin*d III

M. DL 2000™ DNA Marker; lane 1. undigested CPA products; lane 2. CPA products after *Hin*d III digestion; lane 3. negative control

2.3 CPA 灵敏度实验

以构建好的重组质粒 pMD18-CPA 为模板，进行 10 倍梯度稀释至 3×10^0 拷贝/μL，同时以 PCR 反应为对照，结果显示，CPA 反应可检测灵敏度达到 30 拷贝/μL，灵敏度是 PCR 的 100 倍（图 6）。

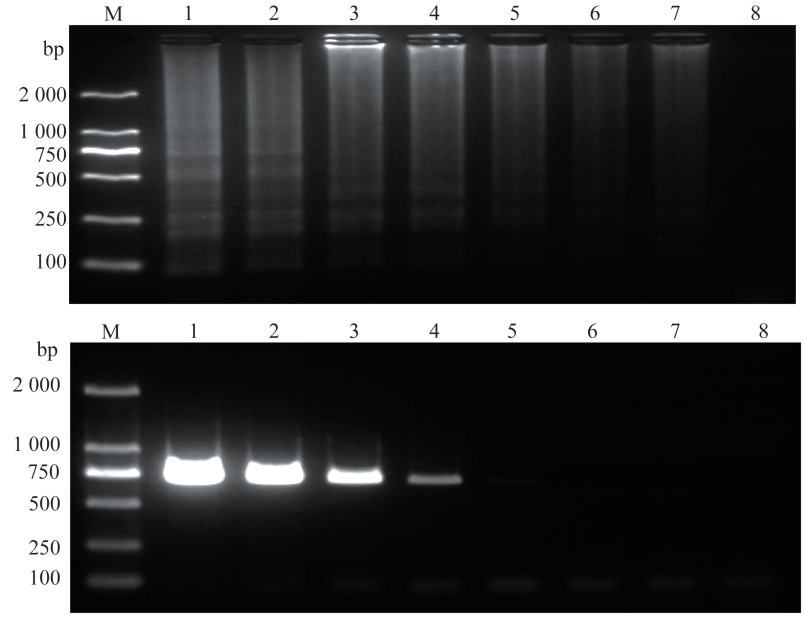

图 6 CPA 灵敏度(上)和 PCR 灵敏度(下)的比较

M. DL 2000™ DNA Marker；1～8. 10 倍系列稀释的质粒标准品，分别为 3×10^7，3×10^6，3×10^5，3×10^4，3×10^3，3×10^2，3×10^1 和 3×10^0 拷贝/μL

Fig. 6 Comparison of sensitivities of CPA and conventional PCR assay

M. DL 2000™ DNA Marker; lanes 1 – 8. Assays conducted with 10 – fold serial dilutions of the Plasmid (pMD18-CPA) DNA; 3×10^7, 3×10^6, 3×10^5, 3×10^4, 3×10^3, 3×10^2, 3×10^1 and 3×10^0 copies per μL respectively

2.4 CPA 特异性实验

使用已优化的反应体系检测 CPA 特异性显示，只有 OsHV-1-SB 扩增得到明亮清晰的条带（图 7），显示 CPA 反应具有较好的特异性。

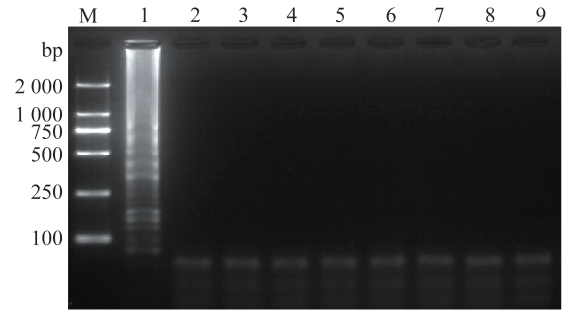

图 7 CPA 反应特异性实验

M. DL 2000™ DNA Marker；1. 牡蛎疱疹病毒魁蚶株；2. 急性病毒性坏死病毒；3. 鲍鱼疱疹病毒；4. 派琴虫；5. 包纳米虫；6. 马尔泰虫；7. 白斑综合征病毒；8. 副溶血弧菌；9. 空白对照

Fig. 7 CPA specificity detection with OsHV-1-SB specific primers

M. DL 2000™ DNA Marker; 1. OsHV-1-SB; 2. AVNV; 3. abalone herpes virus; 4. *Perkinsus* sp.; 5. *Bonamia* sp.; 6. *Marteilia* sp.; 7. WSSV; 8. *V. parahaemolyticus*; 9. negative control

2.5 CPA 反应产物的可视化鉴定

将 CPA 产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，产物呈特殊的梯形条带，这是扩增方法的典型特征。在 CPA 反应扩增过程中，生成大量的反应副产物 – 焦磷酸镁白色沉淀，反应产物呈浑浊状。所以也可通过肉眼直接观察反应后管中是否形成白色沉淀或出现浑浊来定性判断是否发生扩增反应（图 8）。另一种方法是通过加入核酸荧光染料 GeneFinder™ 来判断 CPA 反应的结果，如果反应混合物变为黄绿色，则有扩增产物产生；若保持橙色不变，则无扩增产物产生（图 9）。

2.6 CPA 检测实际魁蚶样品的应用

对 2012 年 3 批分别采自韩国庆尚南道、山东长岛、辽宁大连的共 22 份 OsHV-1-SB 感染情况未知的魁蚶样品取外套膜，提取核酸，使用已建立的 CPA 反应体系，并以重组质粒作为阳性对照，模板加无菌水为阴性对照，CPA 扩增后加入 GeneFinder™ 显色

(图 10),采样信息及阳性比率如下(表 2)。

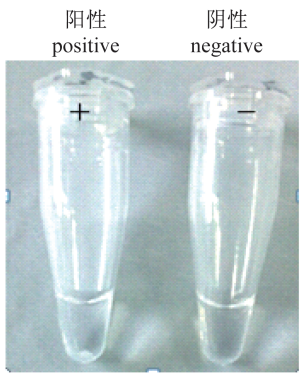

图 8　肉眼观察 CPA 产物

Fig. 8　Inspection of CPA results

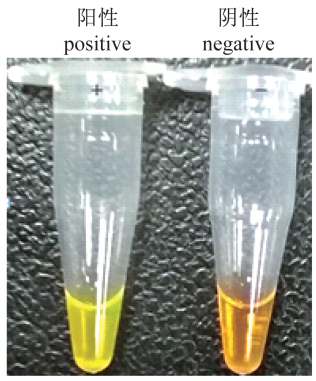

图 9　GeneFinder™染色观察 CPA 产物

Fig. 9　Inspection of CPA results by adding GeneFinder™

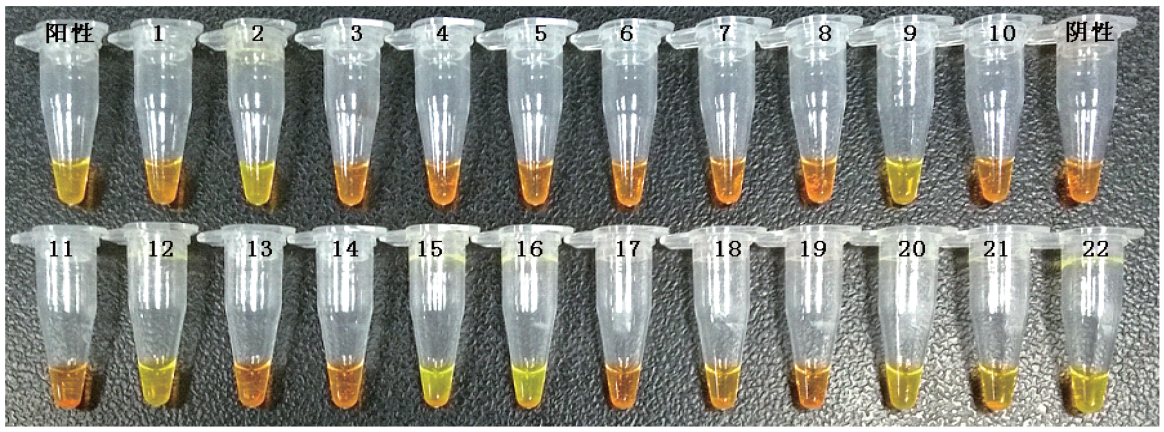

图 10　样品检测结果

1 ~ 10 为韩国庆尚南道样品; 11 ~ 16 为山东长岛样品; 17 ~ 22 为辽宁大连样品

Fig. 10　Results of CPA assays

1 – 10. samples collected from Korea Gyeongsangnam-do; 11 – 16. samples collected from Changdao; 17 – 22. samples collected from Dalian

表 2　样品信息和阳性比率

Tab. 2　Sample information and positive rate

采样地点 sampling site	采样时间 sampling time	样品数量/只 no. of samples	阳性样品编号 no. of positive samples	阳性比率/% prevalence
韩国庆尚南道 Korea Gyeongsangnam-do	2012-06	10	1、2、9	30
山东长岛 Changdao	2012-07	6	12、15、16	50
辽宁大连 Dalian	2012-06	6	17、18、20、21、22	83.33

3　讨论

常见的病原检测方法一类是以聚合酶链式反应[10-12](polymerase chain reaction, PCR)为代表的传统核酸变温扩增技术,其耗时 2 ~ 3 h,需要精密的 PCR 仪实现目的片段的扩增,并要以电泳槽进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。另一类则是近 10 年发展起来的核酸等温扩增技术,例如环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)[13]、交叉引物扩增技术(cross priming amplification, CPA)[7]、滚环扩增技术(rolling circle amplification, RCA)[14]等。CPA 作为一种近年新出现的等温扩增技术,目前已有多种应用于人类以及食品中传染病病原的 CPA 检测方法[15-18]。在水产动物病原诊断方面,Yang 等[19]建立了对虾白斑综合征病毒的交叉引物等温扩增

方法。

本研究建立的 CPA 检测方法特异性良好,只对 OsHV-1-SB 产生特异性扩增反应,对 OsHV-1-SB 阳性质粒的最低检测量为 30 拷贝,其检测灵敏度为传统 PCR 技术的 100 倍。由于 CPA 反应灵敏度高,其反应试剂、实验器材及环境易因受到微量 DNA 模板污染而导致假阳性结果的出现,另外 CPA 反应扩增效率极高,打开反应管时,反应产物易形成气溶胶而污染周围环境,所以配制反应体系时要注意操作,防止 DNA 模板污染试剂,而且应将配制反应体系的区域与观察反应结果的区域进行严格分区,防止假阳性结果的出现。

CPA 反应体系成分比较复杂,其中 Mg^{2+} 浓度、温度对反应的影响最大;Mg^{2+} 在很大程度上会影响引物退火温度以及 Bst DNA 聚合酶的活性;而温度主要影响 Bst DNA 聚合酶的活性。由于 CPA 反应产物大量合成,消耗了大量的 dNTPs,产生了大量的焦磷酸盐,焦磷酸盐与镁离子结合生成焦磷酸镁白色沉淀,因此,CPA 反应产物的判断不仅可以通过琼脂糖凝胶电泳,也可根据沉淀量的多少,即浑浊度来判断产物量的多少进而对样品阴阳性进行判定。同时,也可使用 GeneFinder™ 核酸染料染色,肉眼观察反应产物颜色变化判定阴阳性。

应用建立的 OsHV-1-SB CPA 检测方法,对 2012 年分别采自韩国庆尚南道、山东长岛、辽宁大连的共 22 份 OsHV-1-SB 感染情况未知的魁蚶样品进行检测,在反应结束后的产物中加入核酸荧光染料 GeneFinder™,并进行肉眼观察,感染样品与阳性对照均有明显的黄绿色,与阴性对照所显橙色有明显的差异,表明本研究所建 OsHV-1-SB 的 CPA 检测方法可以通过向反应产物管中加入 GeneFinder™ 核酸染料,观察管中混合液颜色变化来判断靶序列是否进行了扩增。同时,也可通过简单离心观察反应后管中是否形成白色沉淀或出现浑浊来定性判断是否发生扩增反应,具有较强的实用性,可适用于现场快速诊断。

综上所述,本实验建立的 OsHV-1-SB 的 CPA 检测方法具有特异性强、灵敏度高、方便快捷等优点,实验过程仅需一个恒温水浴锅即可完成反应扩增,且检测结果可以通过肉眼直接观察,适用于基层实验室对于样品的快速检测,具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] Yao H W, Guo J, Jing N N. Culture status and research progress on genetic diversity of *Scapharca broughtonii*[J]. Hebei Fisheries, 2010(5): 45 – 47. [姚红伟,郭晋,景娜娜. 魁蚶增养殖状况及遗传多样性研究进展. 河北渔业,2010(5):45 – 47.]

[2] Yu R H, Li Q. New techniques for bottom sowing multiplication and cultivation of the pollution-free ark shell (*Scapharca broughtonii* Schrenck) [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2009(3): 87 – 90. [于瑞海,李琪. 无公害魁蚶底播增养殖稳产新技术. 海洋湖沼通报,2009(3):87 – 90.]

[3] Zhang Z X. Revisions on phylogenetic relationships of virus in the ninth reports of ICTV[J]. Chinese Journal of Virology, 2012, 28(5): 595 – 599. [张忠信. ICTV 第九次报告对病毒分类系统的一些修改. 病毒学报,2012,28(5):595 – 599.]

[4] Ren W C. Detection methods, sequence of the complete genome of acute viral necrobiotic virus isolated from scallop *Chlamys farreri*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009. [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和核酸诊断技术的研究,青岛:中国海洋大学,2009.]

[5] Fang R, Li X, Hu L, *et al*. Cross-priming amplification for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(3): 845 – 847.

[6] Zhao Y L, Zhang X, Zhang H W, *et al*. Rapid and sensitive detection of *Enterobacter sakazakii* by cross-priming amplification combined with immuno-blotting analysis[J]. Molecular and Cellular Probes, 2010, 24(6): 396 – 400.

[7] Xu G L, Hu L, Zhong H, *et al*. Cross priming amplification: Mechanism and optimization for isothermal DNA amplification [J]. Scientific Reports, 2012, 2: 246.

[8] Ke Y H, Wang Y F, Wang Z J, *et al*. Sensitive and rapid detection of bla_{NDM-1} in clinical samples by isothermal cross-priming amplification[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 95(2): 215 – 217.

[9] Zhang S, Wang C M, Song X L, *et al*. Cloning, expression of acute viral necrosis virus IAP-86 gene and studies of its anti-apoptotic mechanism [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(2): 274 – 281. [张帅,王崇明,宋晓玲,等. 急性病毒性坏死病毒 IAP-86 基因的克隆、表达及抗凋亡研究. 水产学报,2014,38(2):274 – 281.]

[10] Saiki R K, Scharf S, Faloona F, *et al*. Enzymatic

amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. Science,1985,230(4732):1350 – 1354.

[11] Bugawan T L, Apple R, Erlich H A. PCR-based DNA typing for the HLA-A locus using immobilized oligonucleotide probes(reverse dot blot)[J]. Human Immunology,1994,39(2):134.

[12] Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, *et al*. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase[J]. Science, 1988, 239(4839):487 – 491.

[13] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research,2000,28(12):e63.

[14] Fire A, Xu S. Rolling replication of short DNA circles[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(10):4641 – 4645.

[15] Song L H,Fu L Y, Zhao Z T, *et al*. Application of cross priming amplification diagnostic technology to detecting dengue virus infections transferred by vector mosquitoes at suzhou port[J]. Journal of Southwest Forestry College,2010,30(B06):8 – 10.
[宋凌浩,符丽媛,赵志田,等. CPA 恒温扩增技术在口岸蚊媒携带登革病毒检测中的应用. 西南林学院学报,2010,30(B06):8 – 10.]

[16] Zhang J, Tian Q, Zhu S F, *et al*. Rapid on-site detection of Acidovorax citrulli by cross-priming amplification[J]. Molecular and Cellular Probes, 2012,26(4):175 – 176.

[17] Qin Q, Zhu J L. Establishment and optimization of cpa-nucleic acid test strip for rapid detection of *Vibrio cholerae*[J]. Biotechnology Bulletin, 2013(7):167 – 171.[秦强,朱金玲. CPA-核酸试纸条快速检测霍乱弧菌方法的建立与优化. 生物技术通报,2013(7):167 – 171.]

[18] Qi J, Zhang X, Jiang G Q, *et al*. A Cross Prime Amplification Detection of *Shigella*[J]. Food Research and Development,2013,34(11):65 – 67.
[祁军,张霞,蒋刚强,等. 交叉引物等温扩增技术检测志贺氏菌. 食品研究与开发,2013,34(11):65 – 67.]

[19] Yang H L,Huang J,Yang B. *et al*. The establishment and application of isothermal cross priming amplification techniques in detecting penaeid shrimp white spot syndrome virus[J]. Letters in Applied Microbiology,2014,59(2):200 – 206.

Establishment and application of a cross priming isothermal amplification technique for detection of SB strain of *Ostreid herpesvirus*-1

ZHAO Xiaojin[1,2], ZHANG Shengjing[1], BAI Changming[2], YUE Zhiqin[3], WANG Chongming[2*], YIN Weili[3], CAI Shengli[1], HUANG Jie[2]

(1. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, *China*;
2. *Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071, *China*;
3. *Technical Center of Shandong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao* 266002, *China*)

Abstract: In order to establish a simple, rapid, sensitive and specific method for detection of the SB strain of *Ostreid herpesvirus*-1 (OsHV-1), a cross priming amplification (CPA) assay was developed based on primers developed according to the conserved regions selected across the whole genome sequences of the SB strain of OsHV-1. Then the reaction temperature, time and concentrations of dNTPs and Mg^{2+} were optimized. Our results showed the optimum temperature and time of the assay were 63 ℃ and 60 min, and the optimum concentration of dNTP and Mg^{2+} were 1.4 mmol/L and 6 mmol/L respectively. The CPA assay was highly sensitive with detection limit approximately 30 copies recombinant plasmid DNA per μL. The assay was also highly specific for OsHV-1-SB detection, with no cross-reactions was found when acute viral necrosis virus, abalone herpes viruses, *Perkinsus* sp., *Bonamia* sp., *Martelia* sp., white spot syndrome virus and *Vibrio parahaemolyticus* were used as controls. The prevalence of OsHV-1-SB in 22 blood clams, *Scapharca broughtonii*, collected from Gyeongsangnam-do in Korea, Shandong and Liaoning Province in China were detected with the CPA assay established in this study. The results showed that the CPA assay is a simple, rapid, sensitive, specific and reliable technique. Additionally, since the results of CPA assay could be read directly through centrifugation of the reaction mix or adding GeneFinder™ to the mix, this assay can be used in shellfish farms and local laboratories with poor conditions.

Key words: *Scapharca broughtonii*; OsHV-1-SB; CPA; detection

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