



鳃疱疹病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用

李英英, 杨金先, 陈曦, 陈强, 宋铁英*, 葛均青*

(福建省农业科学院生物技术研究所, 福建福州 350003)

摘要: 为了建立鳃疱疹病毒 (*Anguillid herpesvirus*, AngHV) 的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测方法, 利用 PCR 扩增出 AngHV *ORF49* 的序列, 克隆至 pET-32a 载体, 构建重组质粒 pET-32a-ORF49, 作为 qPCR 的标准品; 根据 *ORF49* 序列设计引物, 以梯度稀释的质粒标准品为模板, 进行 SYBR Green I qPCR 扩增, 制作标准曲线, 建立 AngHV 的 qPCR 检测方法, 并评价其灵敏性、特异性、重复性和应用效果。结果显示, qPCR 的阈值循环数 (cycle threshold value, C_T) 与标准品的拷贝数线性关系良好, 且线性范围广, 获得的标准曲线相关系数 (R^2) 达到 0.999, 扩增效率为 100.855%; 该方法特异性好, 可特异性检测 AngHV, 而对鲤疱疹病毒 III 型 (*Cyprinid herpesvirus 3*, CyHV-3)、蛙虹彩病毒 (*Rana grylio virus*, RGV) 和鳃虹彩病毒 (*Eel iridovirus*, EIV) 无扩增; 该方法重复性强, 组内和组间变异系数分别小于 1% 和 2%; 该方法灵敏性高于普通 PCR 法, 最低可检测到 10 个病毒拷贝, 而普通 PCR 法为 1 000 个病毒拷贝。qPCR 检测发现, 在感染 AngHV 的欧洲鳃主要组织内均可检测到 AngHV, 并且鳃、鳍和皮肤黏液内的病毒量显著高于其他组织; 对保存的 25 份疑似鳃“脱黏败血综合征”病料进行检测, 阳性检出率为 96%, 而普通 PCR 法的阳性检出率仅为 76%。本研究建立的 AngHV SYBR Green I qPCR 检测方法灵敏性高、特异性强、重复性好, 可用于 AngHV 的快速和定量检测, 对鳃“脱黏败血综合征”的防控也具有重要意义。

关键词: 鳃疱疹病毒; 荧光定量 PCR; SYBR Green I; 检测方法

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

鳃疱疹病毒 (*Anguillid herpesvirus*, AngHV) 是养殖鳃的一种重要病毒性病原, 由 Sano 等^[1]首次从日本养殖的日本鳃 (*Anguilla japonica*) 体内分离, 此后, 从世界多地的不同品种鳃体内均分离出 AngHV^[2-6], 血清学和基因序列分析表明, 亚洲和欧洲分离的 AngHV 为同一病毒种^[2, 7-8]。本课题组前期采用 PCR 法从福建省的养殖鳃

体内检测出 AngHV, 并利用鳃卵巢细胞系 (Eel ovary cell line, EO) 从鳃“脱黏败血综合征”病料中分离出 AngHV, 这是我国大陆首次分离出该病毒^[9]。鳃“脱黏败血综合征”是养殖鳃幼鳃阶段的主要疫病, 病鳃常呈现“脱黏”、“红头”、“败血”等症状, 具有发病率高、传染性强、死亡率高等特点; 若成鳃发病, 则发病急、病症重,

收稿日期: 2020-07-08 修回日期: 2020-11-30

资助项目: 国家自然科学基金 (31101933); 福建省公益类科研院所基本科研专项 (2017R1019-5); 福建省农业科学院项目 (AC2017-1)

第一作者: 李英英, 从事水产病害防控研究, E-mail: liyingying80@126.com

通信作者: 宋铁英, E-mail: tieyingsong@163.com; 葛均青 (照片), E-mail: jqge@163.com



多呈现“败血”症状,引起大量死亡,给养殖业者造成巨大的经济损失。攻毒实验和流行病学分析表明, AngHV 是鳃鲈“脱黏败血综合征”的致病病原。流行病学调查表明, AngHV 的致病性与环境、水温等密切相关,水温低时一般不发病,而水温升高时,发病率随之升高。因此,建立快速、灵敏的 AngHV 检测方法,对于 AngHV 的早期诊断和防控具有重要意义。

AngHV 属于疱疹病毒目 (*Herpesvirales*) 鱼蛙疱疹病毒科 (*Alloherpesviridae*) 鲤疱疹病毒属 (*Cyprinivirus*), 其基因组为线性双链 DNA, 基因组全长 248 kb, 含 136 个开放阅读框 (ORF)^[10], 由一段独特的长序列以及两侧 11 kb 的末端重复序列组成。基因序列分析表明^[11], AngHV 与鱼蛙疱疹病毒科其他病毒基因序列的同源性均较低, 仅有 19%~58%。

目前, 已建立了多种检测 AngHV 的方法, 包括免疫过氧化物酶单层实验 (IPMA)^[3]、原位杂交^[12]、PCR^[13-15] 及免疫间接荧光抗体实验 (IFAT)^[16] 等。随着分子生物学技术的发展, qPCR 法因其快速、灵敏、准确等特点被广泛用于病原检测^[17-19]。为建立 AngHV 的 qPCR 检测方法, 我们针对 AngHV 的多个基因序列设计了多对引物, 通过优选, 筛选出一对扩增 ORF49 部分序列的引物, 该引物扩增 AngHV 基因组 DNA 特异性强、扩增效率高。AngHV 的基因组序列分析表明^[10], ORF49 全长 690 bp, 预测编码一个多跨膜蛋白, 与鲤疱疹病毒 III 型 (*Cyprinid herpesvirus 3*, CyHV-3) 的 ORF83 同源, 但仅有 26% 的一致性, 而在鲃疱疹病毒 I 型 (*Ictalurid herpesvirus 1*, IcHV-1)、蛙疱疹病毒 I 型 (*Ranid herpesvirus 1*, RaHV-1) 和蛙疱疹病毒 II 型 (RaHV-2) 中无同源基因; 病毒粒子结构蛋白的分析表明^[20], ORF49 为病毒囊膜蛋白, 其对应基因高度保守, 基于该基因序列建立 AngHV 的检测方法, 有利于病毒的准确检出。本实验以筛选的引物对为基础, 建立了特异性强、灵敏性高的检测 AngHV 的 SYBR Green I qPCR 方法, 为快速、准确地定量检测 AngHV 提供了新的技术手段, 对鳃鲈“脱黏败血综合征”的防控也具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 细胞系与病毒株

EO 细胞系、鲤瘤上皮细胞系 (Epithelioma

papilloma cyprinid cell line, EPC) 由本实验室保存。鳃鲈疱疹病毒福建株 (AngHV-FJ)、蛙虹彩病毒 (*Rana grylio virus*, RGV) 和鳃鲈虹彩病毒 (*Eel iridovirus*, EIV) 由本实验室分离并保存。CyHV-3 和锦鲤鳍条组织细胞系 (Koi-fin cell line) 由中山大学生命科学学院董传甫副教授惠赠。

1.2 主要试剂及仪器

Premix TaqTM (Ex TaqTM Version 2.0 plus dye) 试剂盒、TB Green[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒、DNA Marker、限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。主要仪器包括 PCR 仪 (Applied Biosystems Veriti PCR, Thermo Fisher Scientific)、qPCR 仪 (QuantStudio 3, Thermo Fisher Scientific)、超微量紫外可见分光光度计 (DA-11, DeNovix)、凝胶成像分析系统 (WD-9413C, 北京六一生物科技有限公司) 等。

1.3 质粒标准品的制备

根据 GenBank 中 AngHV 参考株的基因组序列 (NC_013668.3), 设计特异性扩增 ORF49 序列的引物对 49F (5'-GGATCCATGATTTGTTGG-GCGG-3') 和 49R (5'-GAATTCTCATACGCAGCTCCCAAG-3')。将 AngHV-FJ 接种 EO 细胞系, 待细胞产生典型病变后, 收集细胞, 用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 用引物对 49F/49R 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收并纯化目的片段, 进行测序验证。将目的片段克隆至 pET-32a 载体, 用质粒抽提试剂盒提取质粒 DNA 后进行酶切、测序鉴定, 获得质粒 pET-32a-ORF49; 用超微量紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 用 DNA/RNA copy number calculator (<http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>) 计算单位体积 (μ L) DNA 样品中质粒的拷贝数, -80°C 保存备用。

1.4 qPCR 检测方法的建立

引物的设计 根据获得的 AngHV-FJ ORF49 的序列, 用 DNASTAR lasergene V7.1 软件设计

qPCR 检测的引物对 AngHV_qF (5'-CCGTGGTG-GTGCTCTTATCTACA-3') 和 AngHV_qR (5'-TCCTCCGCGCGCTCCACAG-3')。

标准曲线的建立 将质粒 pET-32a-ORF49 DNA 按 10 倍比稀释为 $10^8 \sim 10^1$ 个/ μL 8 个浓度梯度, 作为模板, 用引物对 AngHV_qF/AngHV_qR, 使用 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行 qPCR 扩增, 每个浓度设置 3 个重复, 阴性对照用灭菌 ddH₂O 代替模板, 制作标准曲线。反应体系和反应条件参照试剂盒的使用说明书进行, 反应体系为 20 μL : 2×Mix 10 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.8 μL , Dye II 0.4 μL , DNA 1 μL , ddH₂O 7 μL 。扩增条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。

灵敏性检测 以梯度稀释的 pET-32a-ORF49 为模板, 利用设计的引物对 AngHV_qF/AngHV_qR 分别进行 qPCR 和普通 PCR 扩增, 分析 2 种方法所能检测的最低 AngHV 拷贝数。

特异性检测 将 AngHV-FJ、CyHV-3、RGV 和 EIV 分别接种细胞, 待多数细胞发生典型细胞病变后收集细胞, 用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 作为模板, 用建立的 qPCR 方法进行扩增, 评价检测方法的特异性。

重复性检测 取 10^4 、 10^5 、 10^6 个/ μL 3 个浓度的 pET-32a-ORF49 作为模板进行 qPCR 扩增, 每个浓度设 3 个重复, 根据阈值循环数 (cycle threshold value, C_T 值) 的变异系数分析该方法的组内重复性; 实验重复 3 次, 分析组间重复性。

1.5 qPCR 检测方法的应用

感染 AngHV 的鳗鲡主要组织器官内 AngHV 的检测 选取健康黑仔期欧洲鳗鲡 (*A. anguilla*) 20 尾, 腹腔注射 AngHV-FJ, 在攻毒后第 7 天 (发病高峰期) 选取具明显脱黏、败血症状的欧洲鳗鲡, 采集主要组织 (鳍、鳃、皮肤黏液、皮肤、肌肉、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑和肠道), 用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 作为模板, 用建立的 qPCR 方法检测各组织的病毒载量, 分析病毒的分布情况。采用 SPSS 16.0 for Windows 对所得数据进行单因子方差分析, Duncan 法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时差异显著, 数据用“平均值±标准差”表示。

临床样品检测 用建立的 qPCR 检测方法对课题组 2008—2019 年采集并保存的 25 份疑似

患“脱黏败血综合征”的鳗鲡组织样品进行检测; 同时用引物对 AngHV_qF/AngHV_qR 和 Premix Taq™ 试剂盒对样品进行普通 PCR 扩增, 比较 2 种检测方法的 AngHV 检出率。

2 结果

2.1 AngHV ORF49 的 PCR 扩增和克隆

提取感染 AngHV-FJ 的 EO 细胞 DNA, 用引物对 49F/49R 进行 PCR 扩增, 得到约 690 bp 的片段 (图 1-a)。测序分析显示, 扩增获得的 AngHV-FJ ORF49 的序列与 GenBank 中 AngHV 参考株 ORF49 的序列完全一致。进一步将该片段克隆至 pET-32a 载体, 经双酶切及测序鉴定, 获得重组质粒 pET-32a-ORF49 (图 1-b)。

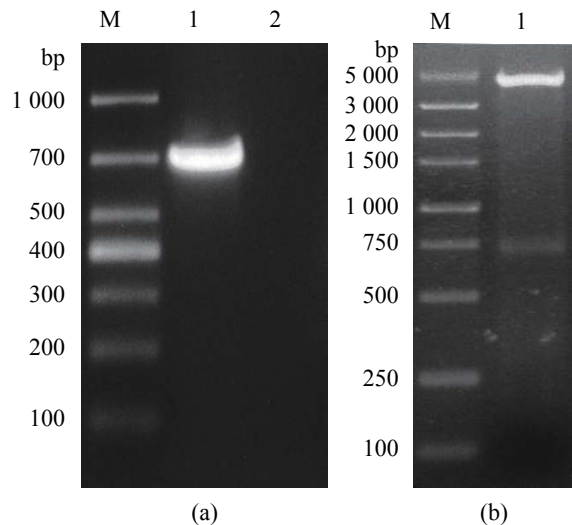


图 1 AngHV ORF49 的 PCR 扩增和克隆

(a) AngHV ORF49 的 PCR 扩增, M. DL1000 DNA marker, 1. AngHV-FJ, 2. 阴性对照; (b) pET-32a-ORF49 的双酶切鉴定, M. DL5000 DNA marker, 1. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切

Fig. 1 PCR amplification and cloning of AngHV ORF49

(a) PCR amplification of AngHV ORF49, M. DL1000 DNA marker, 1. AngHV-FJ, 2. negative control; (b) restriction enzyme digestion of the pET-32a-ORF49, M. DL5000 DNA marker, 1. double enzyme digestion by *Bam*H I / *Xho* I

2.2 AngHV SYBR Green I qPCR 标准曲线的建立

以 $10^8 \sim 10^1$ 个/ μL 10 倍比稀释的质粒 pET-32a-ORF49 DNA 为模板, 进行 qPCR 扩增, 用质粒拷贝数与 C_T 值绘制标准曲线 (图 2), 质粒拷贝数与 C_T 值的线性关系为 $y = -3.2859x + 37.427$, 相关系数 R^2 为 0.999, 扩增效率为 100.855%, 表明该

qPCR 的 C_T 值与 $10^8 \sim 10^1$ 拷贝的 *ORF49* 有较好的线性关系。熔解曲线图显示, $10^8 \sim 10^1$ 拷贝质粒的熔解曲线均只有一个熔解峰, T_m 值为 $88.34 \sim 88.95^\circ\text{C}$, 表明反应产物均为 *ORF49* 的特异性扩增, 无非特异性扩增或引物二聚体产生 (图 3)。

2.3 AngHV SYBR Green I qPCR 的灵敏性、特异性和重复性检测

用 $10^8 \sim 10^0$ 个/ μL 拷贝的 10 倍比稀释的 pET-32a-ORF49 DNA 为模板, 分别进行 SYBR Green I

qPCR 和普通 PCR 扩增。结果显示, 普通 PCR 的最低检出拷贝数为 1 000 个 (图 4-a), 而 SYBR Green I qPCR 的最低检出拷贝数可达 10 个 (图 4-b); SYBR Green I qPCR 法比普通 PCR 法的灵敏性高 100 倍。

以 AngHV-FJ、CyHV-3、EIV 和 RGV 的基因组 DNA 和 pET-32a-ORF49 为模板, 进行 SYBR Green I qPCR 扩增的特异性检测。结果显示, AngHV-FJ 和 pET-32a-ORF49 均有扩增曲线产生, 而 CyHV-3、EIV、RGV 和阴性对照均无扩增信号 (图 5), 表明该方法的特异性好。

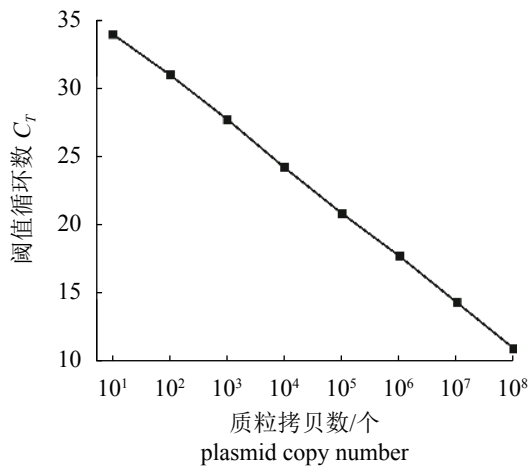


图 2 AngHV SYBR Green I qPCR 检测的标准曲线
Fig. 2 Standard curve plot of the AngHV SYBR Green I qPCR assay

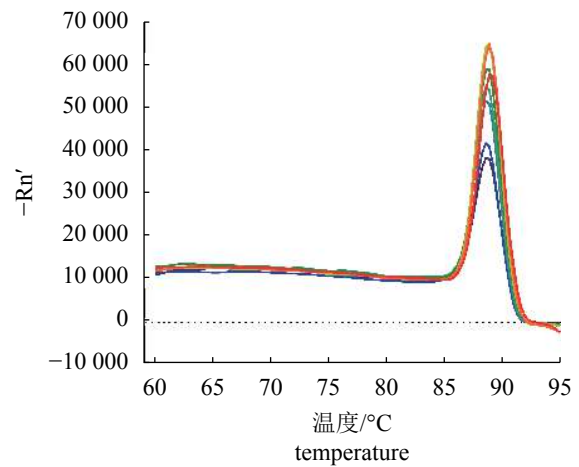
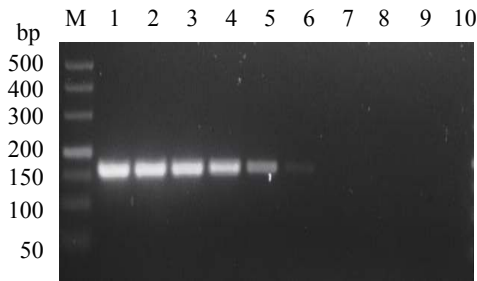
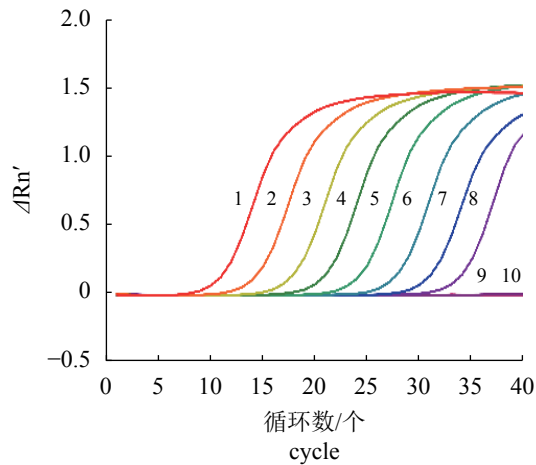


图 3 AngHV SYBR Green I qPCR 检测的熔解曲线
Fig. 3 Metting curve of the AngHV SYBR Green I qPCR assay



(a)



(b)

图 4 普通 PCR 和 SYBR Green I qPCR 检测灵敏性

(a)AngHV 普通 PCR 的检测灵敏性, M. DL500 DNA marker, 1~9 依次为 $10^8 \sim 10^0$ 个拷贝的重组质粒, 10. 阴性对照; (b)AngHV SYBR Green I qPCR 的检测灵敏性, 1~9 依次为 $10^8 \sim 10^0$ 个拷贝的重组质粒, 10. 阴性对照

Fig. 4 Sensitivity of conventional PCR assay and SYBR Green I qPCR assay in detection of AngHV

(a) detection sensitivity of the AngHV PCR assay, M. DL500 DNA marker, lanes 1-9 represent recombinant plasmid ranging from $10^8 \sim 10^0$ copies, lane 10. negative control; (b) plot 1-9 represent recombinant plasmid ranging from $10^8 \sim 10^0$ copies, 10. negative control

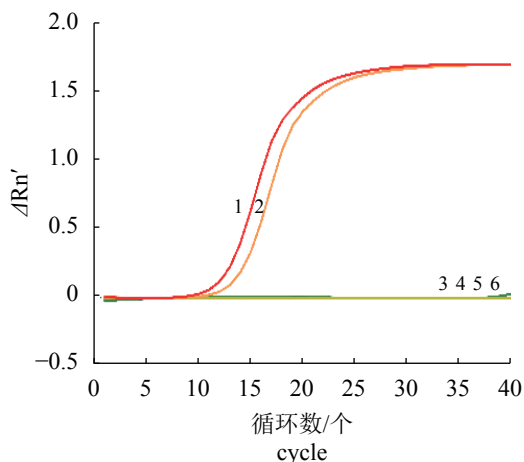


图5 AngHV SYBR Green I qPCR 检测的特异性

1. AngHV-FJ, 2. pET-32a-ORF49, 3. CyHV-3, 4. EIV, 5. RG, 6. 阴性对照

Fig. 5 Detection specificity of the AngHV SYBR Green I qPCR assay

1. AngHV-FJ, 2. pET-32a-ORF49, 3. CyHV-3, 4. EIV, 5. RG, 6. negative control

取 10^4 、 10^5 和 10^6 个/ μL 拷贝的质粒 pET-32a-ORF49 进行 SYBR Green I qPCR 的重复性检测。结果显示, 组内变异系数均小于 1%, 分别为 0.19%、0.05% 和 0.42% (表 1); 组间变异系数均小于 2%, 分别为 1.13%、1.07% 和 1.13% (表 1), 表明该方法重复性好, 可保证检测结果的稳定性和可靠性。

2.4 AngHV SYBR Green I qPCR 方法的应用

用建立的 AngHV SYBR Green I qPCR 方法检测 AngHV 感染鳃鲰主要组织内的 AngHV, 结果显示, 在鳃鲰的鳃、鳍、皮肤黏液、皮肤、肌肉、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑和肠道内均可检测到较高含量的 AngHV, 并且在鳃、鳍和皮肤黏液内的 AngHV 含量显著高于其他组织 ($P < 0.05$) (图 6)。

分别用建立的 SYBR Green I qPCR 法和普通

PCR 法对实验室 2008—2019 年收集的 25 份疑似鳃鲰“脱黏败血综合征”病料进行检测。结果显示, 普通 PCR 法共检出 19 份阳性样品, 阳性检出率为 76%; 而 qPCR 法检出 24 份阳性样品, 阳性检出率为 96%, 高于普通 PCR 法。

3 讨论

AngHV 病是养殖鳃鲰的重要流行性疾病, 一旦发病, 起病急、病程短、死亡率高, 由于缺少有效的防控措施, 常造成较大的经济损失, 严重威胁着鳃鲰养殖业的发展。目前已建立的检测 AngHV 的方法中, 原位杂交法操作复杂, 且需要使用同位素标记, 对操作人员的健康可能存在安全隐患; IPMA 和 IFAT 均需要 AngHV 抗体, 而该抗体不易获得; 常用的 PCR 法无法对病毒进行准确定量, 且扩增后需琼脂糖电泳才可判定扩增结果, 操作步骤多、需时久。qPCR 技术不仅具有灵敏性高、特异性好、快速、准确等特点, 且操作简单、易于实现, 因此被广泛用于水产病原检测^[18, 21-23]。AngHV 的重要特征是潜伏感染^[6-7], 建立 AngHV 的 qPCR 检测方法, 可对样品中的 AngHV 进行快速、准确定量, 在发病初期 AngHV 含量较低时即可实现准确诊断, 有利于在疾病暴发前期采取有效防控措施, 降低经济损失。

根据荧光信号标记方法的不同, qPCR 分为染料法和探针法。van Beurden 等^[24]建立了 AngHV 的探针法检测方法, 该方法可有效检测组织悬液和细胞中的 AngHV, 多用于临床诊断。与探针法相比, 荧光染料法成本较低、简单易行、更易推广应用。本研究建立的 AngHV SYBR Green I qPCR 检测方法, 标准曲线的相关系数达 0.999, 扩增效率为 100.85%, 线性范围广, 标准品性质稳定、重复性好、灵敏性高, 是普通

表 1 AngHV SYBR Green I qPCR 检测的重复性

Tab. 1 Detection repeatability of the AngHV SYBR Green I qPCR assay

质粒拷贝数/ plasmid copy number	组内变异系数 C.V. in the group		组间变异系数 C.V. among the groups	
	组内 C_T 值 C_T values in the group	变异系数/% C.V.	组间 C_T 值 C_T values among the groups	变异系数/% C.V.
10^6	16.70±0.07	0.42	16.74±0.19	1.13
10^5	19.74±0.01	0.05	19.88±0.21	1.07
10^4	23.05±0.04	0.19	23.33±0.26	1.13

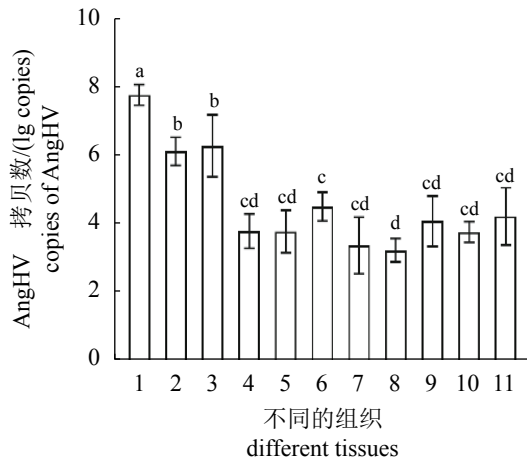


图6 AngHV感染鳗鲡主要组织内AngHV的分布情况

1. 鳃, 2. 鳍, 3. 皮肤黏液, 4. 皮肤, 5. 肌肉, 6. 心脏, 7. 肝脏, 8. 脾脏, 9. 肾脏, 10. 脑, 11. 肠道; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 6 Distribution of AngHV in the main tissues of eels infected with AngHV

1. gill, 2. fin, 3. skin mucus, 4. skin, 5. muscle, 6. heart, 7. liver, 8. spleen, 9. kidney, 10. brain, 11. intestine; different letters mean significant difference ($P < 0.05$)

PCR法的100倍; 特异性强, 与其他几种近缘DNA病毒无交叉扩增; 临床应用结果表明, 该方法对疑似AngHV样品的阳性检出率远高于普通PCR法, 为快速、准确地定量检测样品中的AngHV提供了新的检测方法, 可应用于AngHV病的诊断和流行病学研究。

疱疹病毒宿主广泛, 人类、哺乳动物、鸟类和鱼类等均可感染, 属于机会病原, 可在宿主体内长期存在而不发病, 当宿主免疫系统受抑制或感染剂量较大时才致病^[25]。目前, 已发现许多鱼类疱疹病毒可引起宿主发病并大量死亡, 但发病的部位和特征表现多样化, 如鲤疱疹病毒I型(CyHV-1)可引起鲤(*Cyprinus carpio*)眼球出血并导致大量死亡^[26-27]; 鲤疱疹病毒II型(CyHV-2)主要引起金鱼(*Carassius auratus*)造血组织坏死, 导致贫血, 进而死亡^[28-30]; CyHV-3可使感染鲤鳃部发炎、增生、坏死, 并可导致造血组织坏死, 致死率高^[31-32]; AngHV可使感染鳗鲡体表黏液分泌增多, 鳃增生, 皮肤坏死, 肾脏肿大, 皮肤、鳃、肌肉和肝脏等出血, 造成大量死亡^[33]。不同品种鳗鲡感染AngHV后病变部位和病症有所不同, 此前采集病料分离或检测AngHV, 多根据临床症状或经验采集肝脏、脾

脏、肾脏或鳃等部位^[4-6, 9, 16]。本研究用建立的SYBR Green I qPCR方法检测AngHV感染鳗鲡不同组织内的AngHV, 表明各组织内均可检测到大量AngHV, 其中鳃、鳍和皮肤黏液内的病毒含量远高于其他组织, 有助于鳗鲡体内AngHV病毒载量较低时阳性样品的检出, 提高检测的准确率, 对于AngHV病的早期诊断和防控研究等具有重要意义。

参考文献 (References):

- [1] Sano M, Fukuda H, Sano T. Isolation and characterization of a new herpesvirus from eel[M]// Perkins F O, Cheng T C. Pathology in Marine Science. New York: Academic Press, 1990: 15-31.
- [2] Ueno Y, Kitao T, Chen S N, *et al.* Characterization of a herpes-like virus isolated from cultured Japanese eels in Taiwan[J]. *Fish Pathology*, 1992, 27(1): 7-17.
- [3] Davidse A, Haenen O L M, Dijkstra S G, *et al.* First isolation of herpesvirus of eel (*Herpesvirus anguillae*) in diseased European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Europe[J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1999, 19(4): 137-141.
- [4] Lee N S, Kobayashi J, Miyazaki T. Gill filament necrosis in farmed Japanese eels, *Anguilla japonica* (Temminck & Schlegel), infected with *Herpesvirus anguillae*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1999, 22(6): 457-463.
- [5] Haenen O L M, Dijkstra S G, van Tulden P W, *et al.* *Herpesvirus anguillae* (HVA) isolations from disease outbreaks in cultured European eel, *Anguilla anguilla* in the Netherlands since 1996[J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2002, 22(4): 247-257.
- [6] Jakob E, Neuhaus H, Steinhagen D, *et al.* Monitoring of *Herpesvirus anguillae* (HVA) infections in European eel, *Anguilla anguilla* (L.), in northern Germany[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(6): 557-561.
- [7] van Nieuwstadt A P, Dijkstra S G, Haenen O L M. Persistence of herpesvirus of eel *Herpesvirus anguillae* in farmed European eel *Anguilla anguilla*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 45(2): 103-107.
- [8] Chang P H, Pan Y H, Wu C M, *et al.* Isolation and molecular characterization of herpesvirus from cultured European eels *Anguilla anguilla* in Taiwan[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 50(2): 111-118.

- [9] 葛均青, 杨金先, 龚晖, 等. 鳃鲰疱疹病毒的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1579-1583.
Ge J Q, Yang J X, Gong H, *et al.* Isolation and identification of a herpesvirus from cultured European eels *Anguilla anguilla* in China[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1579-1583(in Chinese).
- [10] van Beurden S J, Bossers A, Voorbergen-Laarman M H A, *et al.* Complete genome sequence and taxonomic position of *Anguillid herpesvirus 1*[J]. Journal of General Virology, 2010, 91(4): 880-887.
- [11] Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, *et al.* Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide[J]. Journal of Virology, 2007, 81(10): 5058-5065.
- [12] Shih H H, Hu C W, Wang C S. Detection of *Herpesvirus anguillae* infection in eel using *in situ* hybridization[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2003, 19(2): 99-103.
- [13] Shih H H. A polymerase chain reaction for detecting Herpesvirus anguillae in asymptomatic eels[J]. Taiwan, 2004, 49(1): 1-6.
- [14] Rijsewijk F, Pritz-Verschuren S, Kerkhoff S, *et al.* Development of a polymerase chain reaction for the detection of *Anguillid herpesvirus* DNA in eels based on the herpesvirus DNA polymerase gene[J]. Journal of Virological Methods, 2005, 124(1-2): 87-94.
- [15] 葛均青, 杨金先, 李友娟, 等. 鳃鲰病毒性疾病病料中鳃鲰疱疹病毒的PCR检测[J]. 福建农业学报, 2012, 27(9): 961-964.
Ge J Q, Yang J X, Li Y J, *et al.* Polymerase chain reaction for the detection of *Herpesvirus anguillae* in eel viral disease samples[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2012, 27(9): 961-964(in Chinese).
- [16] Varvarigos P, Vendramin N, Cappellozza E, *et al.* First confirmation of Herpesvirus anguillae (HVA) and infectious pancreatic necrosis (IPN) virus infecting European eels *Anguilla anguilla* farmed in Greece[J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 2011, 31(3): 101-111.
- [17] 荣小军, 廖梅杰, 张正, 等. 迟缓爱德华氏菌SYBR Green I实时荧光定量PCR检测方法的建立及其应用[J]. 水产学报, 2013, 37(12): 1829-1838.
Rong X J, Liao M J, Zhang Z, *et al.* Development of an SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Edwardsiella tarda* and its application[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(12): 1829-1838(in Chinese).
- [18] 周勇, 曾令兵, 张辉, 等. 鲤疱疹病毒II型TaqMan实时PCR检测方法的建立及应用[J]. 水产学报, 2013, 37(4): 607-613.
Zhou Y, Zeng L B, Zhang H, *et al.* Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the *Cyprinid herpesvirus II*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(4): 607-613(in Chinese).
- [19] 刘礼辉, 胡蕾, 杨圆圆, 等. 舒伯特气单胞菌实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(8): 17-24.
Liu L H, Hu L, Yang Y Y, *et al.* Development and application of a real-time PCR assay for detection of *Aeromonas schuberti*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2019, 47(8): 17-24(in Chinese).
- [20] van Beurden S J, Leroy B, Wattiez R, *et al.* Identification and localization of the structural proteins of *Anguillid herpesvirus 1*[J]. Veterinary Research, 2011, 42(1): 105.
- [21] 周勇, 曾令兵, 孟彦, 等. 大鲵虹彩病毒TaqMan实时荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 水产学报, 2012, 36(5): 772-778.
Zhou Y, Zeng L B, Meng Y, *et al.* Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the giant salamander iridovirus[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(5): 772-778(in Chinese).
- [22] 刘春, 曾伟伟, 王庆, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)弹状病毒TaqMan实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J]. 水产学报, 2014, 38(1): 136-142.
Liu C, Zeng W W, Wang Q, *et al.* Establishment and application of TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR for detecting the hybrid snakehead rhabdovirus[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(1): 136-142(in Chinese).
- [23] 刘帅, 王荻, 卢彤岩, 等. 实时荧光定量PCR扩增特异性 *vapA* 基因检测杀鲑气单胞菌[J]. 水产学报, 2017, 41(12): 1928-1935.
Liu S, Wang D, Lu T Y, *et al.* Real-time PCR detection

- of *Aeromonas salmonicida* by amplification of specific *vapA* gene[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(12): 1928-1935(in Chinese).
- [24] van Beurden S J, Voorbergen-Laarman M A, Roozenburg I, *et al.* Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of *Anguillid herpesvirus 1*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(1): 95-104.
- [25] Hanson L, Dishon A, Kotler M. Herpesviruses that infect fish[J]. *Viruses*, 2011, 3(11): 2160-2191.
- [26] Sano T, Fukuda H, Furukawa M. Herpesvirus cyprini: biological and oncogenic properties[J]. *Fish Pathology*, 1985, 20(2-3): 381-388.
- [27] Sano T, Morita N, Shima N, *et al.* *Herpesvirus cyprini*: lethality and oncogenicity[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1991, 14(5): 533-543.
- [28] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18(3): 211-220.
- [29] 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]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2006, 69(2-3): 137-143.
- [30] 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.
- [31] Hedrick R P, Gilad O, Yun S, *et al.* A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2000, 12(1): 44-57.
- [32] Davidovich M, Dishon A, Ilouze M, *et al.* Susceptibility of cyprinid cultured cells to cyprinid herpesvirus 3[J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(8): 1541-1546.
- [33] Hangalapura B N, Zwart R, Engelsma M Y, *et al.* Pathogenesis of *Herpesvirus anguillae* (HVA) in juvenile European eel *Anguilla anguilla* after infection by bath immersion[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 78(1): 13-22.

Establishment and application of SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR for detection of *Anguillid herpesvirus*

LI Yingying, YANG Jinxian, CHEN Xi, CHEN Qiang, SONG Tieying*, GE Junqing*

(Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: China owns the largest eel culture industry in the world. Since 1990s, "mucus sloughing and hemorrhagic septicemia disease" has become one of the main epidemic diseases of cultured juvenile eel, with typical symptoms of "mucus sloughing", "red head" and "hemorrhagic septicemia", and high morbidity and mortality. The disease could also be found in adult eels with typical symptoms of "hemorrhagic septicemia", resulting in a huge number of deaths, and enormous economic losses to the industry. Cultivation experience showed that the disease might be caused by viral pathogen. We had *Anguillid herpesvirus* 1 (AngHV) isolated from the clinical samples of the disease. Further pathogenicity and epidemiological analysis showed that AngHV was the pathogenic agent of eel "mucus sloughing and hemorrhagic septicemia disease". A rapid and sensitive detection method for AngHV is of great significance for the early diagnosis, prevention and control of AngHV disease. Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) method has been widely used in pathogen detection. To establish SYBR Green I qPCR method for detection of AngHV, the sequence of AngHV *ORF49* was amplified by PCR and cloned into pET-32a vector to construct the standard plasmid pET-32a-ORF49. Primers were designed according to *ORF49* sequence, and a SYBR Green I qPCR method was developed for AngHV detection using serially diluted standard plasmid as templates, then the sensitivity, repeatability, specificity and application effects of the method were evaluated. The results showed that the cycle threshold value (C_T) of the qPCR assay had a good linear relationship with the copy number of the standard plasmid, the correlation coefficient (R^2) of the obtained standard curve was 0.999, and the amplification efficiency was 100.855%. The melting curve analysis showed that there was only one melting peak with T_m values of 88.34-88.95 °C. Amplication specificity analysis indicated that the method could specifically detect AngHV, and had no amplification of *Cyprinid herpesvirus* 3 (CyHV-3), *Rana grylio virus* (RGV) and Eel iridovirus (EIV). The coefficient of variation within and between groups was less than 1% and 2%, respectively, which indicated that the method was repeatable. The qPCR method could detect a minimum of 10 viral copies with higher sensitivity than conventional PCR method which has detection limit of 1 000 copies. Application analysis indicated that AngHV could be detected in the main tissues of AngHV infected *Anguilla anguilla* with 5.70×10^7 copies in gill, 1.91×10^6 copies in mucus, 1.31×10^6 copies in fin, 3.31×10^4 copies in heart, 1.75×10^4 copies in intestine, 1.25×10^4 copies in kidney, 6.51×10^3 copies in skin, 6.26×10^3 copies in muscle, 6.13×10^3 copies in brain, 2.48×10^3 copies in liver and 1.81×10^3 copies in spleen. The amounts of virions in gills, fins and skin mucus were significantly higher than those in other tissues. The positive detection rate of the qPCR method for the 25 suspected *Anguilla* spp. "mucus sloughing and hemorrhagic septicemia disease" samples was 96%, while that of the conventional PCR method was only 76%. In conclusion, the established SYBR Green I qPCR method has high sensitivity, strong specificity and good repeatability, and can be used for rapid and quantitative detection of AngHV, which would be helpful for the prevention and control of *Anguilla* spp. "mucus sloughing and hemorrhagic septicemia disease".

Key words: *Anguillid herpesvirus*; real-time fluorescence quantitative PCR; SYBR Green I; detection method

Corresponding authors: SONG Tieying. E-mail: tieyingsong@163.com;

GE Junqing. E-mail: jqge@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31101933); Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund of Fujian Province (2017R1019-5); Fujian Academy of Agricultural Sciences (AC2017-1)