渔业研究　2024, 46(6): 572 − 579
Journal of Fisheries Research
http://www.hyyysci.com
DOI:10.14012/j.jfr.2024057

李海平, 葛　辉, 温　凭, 等. 白斑综合征病毒和对虾内参基因双重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 渔业研究, 2024, 46(6): 572 − 579.

白斑综合征病毒和对虾内参基因双重荧光定量 PCR 检测方法的建立

李海平[1]，葛　辉[2*]，温　凭[2]，吴丽云[2]，李慧耀[2]，巫旗生[2*]，
张　哲[2]，杨求华[2]，何丽斌[2]，徐春燕[2]

（1. 福建海洋研究所，福建 厦门 361013；
2. 福建省水产研究所，福建省海洋生物增养殖与高值化利用重点实验室，福建 厦门 361013）

摘要：【背景】白斑综合征病毒（WSSV）是一种高度传染性和致命性的病原体，对全球虾类养殖业构成重大威胁。WSSV 可通过水平传播和垂直传播迅速扩散，虾在感染 WSSV 3~10 d 内累积死亡率最高可达到 100%。由于缺乏有效的预防和治疗措施，开发快速、准确和敏感的 WSSV 检测技术对及时诊断和实施控制措施至关重要。**【目的】**建立一种 WSSV 和对虾内参基因双重荧光定量 PCR 检测方法，提高 WSSV 检测的灵敏度和特异性。**【方法】**首先，基于 WSSV 基因组保守序列设计合成特异性引物和 TaqMan 探针，建立 WSSV 单重荧光定量 PCR 检测体系，经特异性和重复性试验证实，该方法对 WSSV 具有良好的特异性和重复性。在此基础上，设计合成凡纳滨对虾（*Litopenaeus vannamei*）内参基因引物和探针，并对引物碱基进行优化替换，建立 WSSV−对虾内参基因双重荧光定量 PCR 检测体系。**【结果】**敏感性试验结果显示，该双重检测体系对 WSSV 的检测下限可达 15 拷贝·μL^{-1}，在 6.6~6.6×10^5 拷贝·μL^{-1} 范围内，WSSV 质粒标准品的起始模板量对数值与循环阈值（Ct 值）呈良好的线性关系（R^2=0.993 0）。同时，内参基因的引入可有效地区分样本中由核酸提取或操作问题引起的假阴性结果。**【结论】**综上所述，本研究建立的 WSSV−对虾内参基因双重荧光定量 PCR 检测方法灵敏度高、特异性强、重复性好，可为 WSSV 的快速诊断及流行病学调查提供可靠的技术手段，对控制 WSSV 的暴发流行、保障对虾养殖业的可持续发展具有重要意义。

关键词：白斑综合征病毒（WSSV）；荧光定量 PCR；TaqMan 探针；病毒检测；水产养殖
中图分类号：S917.4　**文献标识码：**A　**文章编号：**2096 − 9848 (2024) 06 − 0572 − 08

白斑综合征病毒（White spot syndrome virus，WSSV）属于线头病毒科（Nimaviridae）、白斑病毒属（*Whispovirus*）的唯一成员，是一种快速复制、毒性极强的虾病原体，会引发水生动物严重的综合性传染性疾病[1]。该病毒粒子包被双层囊膜，基因组为环状、双链 DNA，大小约为 300 kb，预测编码约 180 种蛋白，是目前已知最大基因组的无脊椎动物病毒之一[2-3]。

WSSV 的宿主范围广泛，包括所有养殖和野生的海洋虾蟹、虾蛄和淡水虾等[4-6]。WSSV 可通过水平传播和垂直传播，侵染对虾的鳃、肝胰腺、外壳等组织，引起白斑综合征（White spot disease，WSD），导致患病对虾甲壳出现白色钙化斑点。WSSV 传播迅速、致病性强、致死率高，导致宿主在感染 3~10 d 内的累积死亡率最高可达到 100%[7-9]，给全世界对虾养殖业造成巨大的经济损失。

收稿日期：2024-05-30　**修回日期：**2024-09-20
基金项目：福建省属公益类科研院所基本科研专项（2022R1007003、2022R1013007）；2023 年度“揭榜挂帅”科技项目（2023F05）；2023 年度福建省促进海洋与渔业产业高质量发展专项资金项目（FJHYF-L-2023-5）
第一作者：李海平，男，研究实习员，研究方向为海洋生态与生物病害防治。E-mail: lihpsky@163.com
通信作者：葛　辉，男，副研究员，研究方向为水产生物疾病防治。E-mail: 717764449@qq.com
巫旗生，男，助理研究员，硕士，研究方向为海水贝类遗传育种。E-mail: 583036064@qq.com

1992 年，白斑综合征暴发于中国台湾地区，此后迅速传播至整个亚洲及欧美的主要对虾养殖地区，引起全球性对虾流行病，给对虾养殖业造成了重大损失[10]。1995 年世界动物卫生组织、联合国粮农组织和亚太地区水产养殖发展网络中心同时将 WSSV 列为需要监测的重要水生动物疫病病原。2009 年，中国农业部公告第 1125 号《一、二、三类动物疫病病种名录》将 WSSV 列为水生生物一类动物疫病病毒。目前，尚未发现有效的防治药物，开发新的、操作简单快速、准确度高和灵敏性高的 WSSV 检测技术，加强对无特定病原亲虾及产生的幼虾、成虾携带感染情况的实时监测，从而在疫病流行早期阶段及时做出诊断，并采取隔离措施是控制 WSSV 传播的关键，对预防和降低 WSD 的暴发，保障中国对虾养殖业的持续健康发展具有重要意义[11]。

聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction，PCR）体外快速扩增特定基因技术，最早被应用于 β-珠蛋白基因的扩增和镰状细胞贫血的诊断分析，此后在分子生物学、医学研究、疾病诊断等领域得到了迅速的应用和发展[12]。1996 年，美国应用生物系统公司推出荧光定量 PCR（Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction，qPCR）技术，实现了 PCR 从定性到定量的飞跃。荧光定量 PCR 技术是将荧光基团加入到 PCR 反应体系中，并在实验过程中，通过对荧光信号积累实时监测整个 PCR 反应的进程，再根据得到的标准曲线对未知的模板进行定量的分析[13]。该技术主要包括染料结合、杂交探针、水解探针、荧光标记引物以及分子信标等方法[14]；其中，TaqMan 水解探针法因特异性高且能进行多重反应，被广泛应用于基因的定量检测中，在荧光定量 PCR 技术市场中占据重要的位置，成为了不可缺少的病原体检测手段，对于水生动物疫病的防控具有重要的意义[15]。

目前，国内尚未发布 WSSV 荧光定量检测的相关标准，农业农村部在 WSD 诊断规程中仍推荐采用套氏 PCR。然而，在实际工作中，该方法存在检测时间长、操作复杂繁琐、容易污染和不能定量等缺点，无法满足对 WSSV 进行快速定量的检测需求。本研究基于荧光定量 PCR 技术，建立 WSSV TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法，并建立同时检测 WSSV 和对虾内参基因的多重荧光定量 PCR 检测方法，旨在为苗种检疫、生产检测、水产养殖病害防控和流行病学分析提供技术支持。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　样品来源

虾 WSD 阳性样品为本实验室攻毒试验收集的患 WSD 的凡纳滨对虾（*Litopenaeus vannamei*），经 PCR 检测并测序后，确认为 WSD 感染。WSSV 阳性样品、传染性皮下及造血组织坏死病毒阳性样品（Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus，IHHNV）、肝肠胞虫阳性样品（Enterocytozoon hepatopenaei，EHP）、对虾急性肝胰腺坏死病阳性样品（Acute hepatopancreatic necrosis disease，AHPND）、虾血细胞虹彩病毒阳性样品（Shrimp hemocyte iridescent virus，SHIV）、副溶血弧菌阳性样品（Vibrio parahemolyticus，VP）、虾核酸（凡纳滨对虾总核酸）、细胞肿大虹彩病毒阳性样品、斜带石斑鱼神经坏死病毒（Nervous necrosis virous，NNV）阳性样品和鱼核酸（斜带石斑鱼总核酸）等均由本实验室保存。pMD18-WSSV 重组质粒（插入 GenBank 中白斑综合征病毒基因 MG264599.1 片段）由本实验室保存。

1.1.2　主要试剂

2×TaqProbe qPCR Mastermix 购自生工生物工程（上海）股份有限公司；DNA 提取试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司；序列合成和 DNA 测序委托生工生物工程（上海）股份有限公司完成；其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3　主要仪器

荧光定量 PCR 仪（Gentier 48E 型全自动 PCR 分析系统）为西安天隆科技有限公司产品。

1.2　对虾 DNA 提取及 PCR 检测

分别取患 WSD 的凡纳滨对虾样品和健康凡纳滨对虾鳃部组织约 20 mg，参照天根基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA，−20 ℃ 保存备用。并以此为模板，参照 GB/T 28630.2—2012《白斑综合征（WSD）诊断规程》中的套式 PCR 检测法，同时以双蒸水作为空白对照进行 PCR 扩增[16]。

1.3　WSSV 和凡纳滨对虾内参基因引物、探针的设计

1.3.1　WSSV

根据 GenBank 中 WSSV 基因，序列号分别为：MG264599.1、MF768985.1、KT995471.1、KR08386-6.1、AF332093.3、AF440570.1、KY827813.1、AF36-9029.2，通过比对它们的保守序列，采用 Primer Premier 5.0 和 Primer Express 3.0 软件设计虾 WSSV

特异性引物和 TaqMan 探针。引物与探针均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。经过试验初筛，参照 20 μL 实时荧光定量 PCR 反应体系：模板 5 μL，上、下游引物各 0.2 μmol·L^{-1}、qPCR MasterMix 10 μL，探针 0.04 μmol·L^{-1}。PCR 条件：95 ℃ 5 min；95 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s、35 ℃ 30 s，共 40 个循环[17]，同时以双蒸水作为空白对照进行 PCR 扩增。选择一套效果较好的引物及探针，用于 WSSV 荧光定量 PCR 检测。引物序列：WSSV-F1（GGAAACGGTAACGAATCTGAA），WSSV-R1（TGAGCGTTCATTGTGCTCTT），荧光定量 PCR 特异性扩增片段的大小为 81 bp，TaqMan 探针 5’端标记荧光基团 FAM，3’端标记猝灭基团 BHQ1，探针 WSSV-P1 为 5’FAM-TCCAGAATGCTCTGCCAAGGAACAGA-BHQ1-3’。

1.3.2 凡纳滨对虾 18S 内参基因

根据凡纳滨对虾序列，采用 Primer Premier 5.0 和 Primer Express 3.0 软件，设计对虾 18S 内参基因特异性引物和 TaqMan 探针。引物与探针均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。经过试验初筛，选择一套效果较好的引物及探针，用于对虾 18S 内参基因荧光定量 PCR 检测。引物序列：Lv-18S-F3：TACAATGGCTATCACGGGTAA，Lv-18S-R3：CGCCTGCTGCCTTCCTTA，荧光定量 PCR 特异性扩增片段的大小为 93 bp，TaqMan 探针 5’端标记荧光基团 HEX，3’端标记猝灭基团 BHQ1，探针 Lv-18S-P3 为：5’HEX-TTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAAT-BHQ1-3’。

1.3.3 凡纳滨对虾 18S 内参基因引物碱基位点替换优化

在 1.3.2 凡纳滨对虾 18S 内参基因引物序列基础上，对对虾 18S 内参基因引物序列的碱基位点进行替换优化，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。经过试验初筛，选择一套效果较好的引物及探针，用于后续与 WSSV 引物组合建立双重荧光定量 PCR 检测方法。引物序列：Lv-18S-F3-T1：TACAATGGCTATCACGGGTAG，Lv-18S-R3-T3：CGCCTGCTGCCTTCCTGG。

1.4 标准曲线建立

将 WSSV 重组质粒进行 10 倍梯度稀释，使其浓度（Concentration，C）依次为 6.6×10^5、6.6×10^4、6.6×10^3、6.6×10^2、6.6×10、6.6 拷贝·μL^{-1} 后，作为标准品模板，采用 1.3 所述的方法，分别进行荧光定量 PCR 检测；利用数据分析软件进行分析，建立起始模板拷贝数（x）对数（logC）与循环阈值（Cycle threshold，Ct 值）（y）间的标准曲线和线性回归方程。

1.5 特异性试验

分别以 WSSV、IHHNV、EHP、AHPND、SH-IV、VP、细胞肿大虹彩病毒、NNV 等阳性样品，虾核酸（凡纳滨对虾总核酸）和鱼核酸（斜带石斑鱼总核酸）等为模板扩增，以双蒸水作为空白对照，进行荧光定量 PCR 检测，判断引物是否有非特异性扩增，以 WSSV 质粒标准模板为阳性对照，评价引物特异性。

1.6 建立 WSSV 和凡纳滨对虾内参基因双重检测方法

在已建立的 WSSV 实时荧光定量检测方法的基础上，分别与碱基位点替换前的凡纳滨对虾内参基因引物和碱基位点替换优化后的凡纳滨对虾内参基因引物结合组成双重荧光定量 PCR，根据扩增反应的 Ct 值和扩增曲线的相对荧光强度值（Relative Fluorescence unit，RFU）选择最佳的双重组合。

1.7 敏感性试验

采用健康凡纳滨对虾核酸代替双蒸水对 WSSV 核酸样品进行 10 倍浓度梯度稀释，并以此为模板（浓度依次为 1.5×10^5、1.5×10^4、1.5×10^3、1.5×10^2、1.5×10、1.5、0.15 拷贝·μL^{-1}）分别进行荧光定量 PCR 检测，根据扩增结果判断该双重检测方法的敏感性。

1.8 重复性试验

将重组质粒进行 10 倍浓度梯度稀释，利用建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法进行检测，每个浓度重复 3 次，进行批内试验。并选 3 个不同的样品进行 3 次批间试验，分别进行 TaqMan 荧光定量 PCR 检测。根据检测的 Ct 值，分别计算其平均值、标准差及其变异系数，判断该反应体系检测方法的稳定性。

1.9 临床样本的检验

对临床采集的 12 份样品，同时应用建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法和农村农业部在 GB/T 28630.2—2012《白斑综合征（WSD）诊断规程》中推荐采用的套氏 PCR 检测方法进行 WSSV 检测，将结果进行比对，比较二者的符合率。

2 结果与分析

2.1 荧光定量 PCR 标准曲线的绘制

对 10 倍梯度稀释的质粒标准模板进行荧光定

量 PCR 扩增，绘制 Ct 值与标准模板拷贝数对数值（logC）之间线性关系的标准曲线。结果如图 1 显示，质粒标准模板在 6.6~6.6×10^5 拷贝·μL^{-1} 范围内，均出现明显的荧光信号，Ct 值在 20~36 之间。经数据分析建立标准曲线（图 2），对应的线性回归方程 Ct=−3.155 1log$C$+37.567 0，相关系数 R^2=0.993 0，表明 Ct 值与标准模板拷贝数对数值（logC）之间呈良好的线性关系，建立的 WSSV 荧光定量 PCR 反应体系稳定。

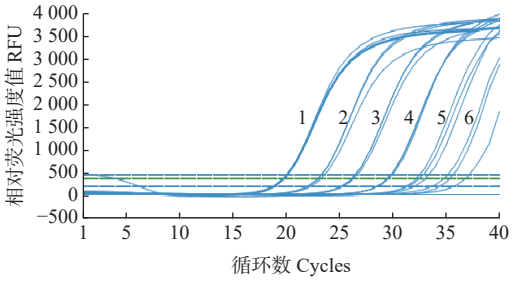

图 1　pMD18-WSSV 重组质粒的荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig. 1　Amplification plot of qPCR for pMD18-WSSV recombinant plasmid

注：1 为 6.6×10^5 拷贝·μL^{-1}；2 为 6.6×10^4 拷贝·μL^{-1}；3 为 6.6×10^3 拷贝·μL^{-1}；4 为 6.6×10^2 拷贝·μL^{-1}；5 为 6.6×10^1 拷贝·μL^{-1}；6 为 6.6 拷贝·μL^{-1}。

Notes: 1 means 6.6×10^5 copies·μL^{-1}; 2 means 6.6×10^4 copies·μL^{-1}; 3 means 6.6×10^3 copies·μL^{-1}; 4 means 6.6×10^2 copies·μL^{-1}; 5, 6 mean 6.6×10^1, 6.6 copies·μL^{-1}, respectively.

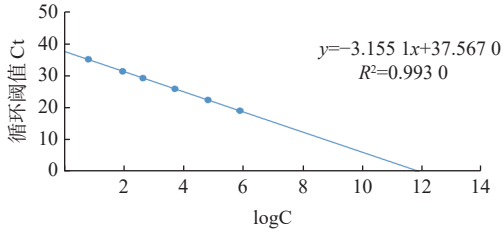

图 2　荧光定量 PCR 检测 WSSV 的标准曲线

Fig. 2　Standard curves of qPCR for WSSV

2.2　荧光定量 PCR 引物特异性检测

以常见病原 WSSV、IHHNV、EHP、AHPND、SHIV、VP、细胞肿大虹彩病毒、NNV 等阳性样品，虾核酸（凡纳滨对虾总核酸）和鱼核酸（斜带石斑鱼总核酸）的核酸为模板进行检测，结果显示只有 WSSV 出现扩增曲线（图 3），Ct 值分别为 23.81、23.68 和 23.61；而其他病原阳性样品及阴性对照（健康虾总核酸）、空白对照均未检测到荧光信号，没有非特异性扩增，判为阴性。说明设计的引物和探针对 WSSV 检测具有良好的特异性。

2.3　对虾 18S 内参基因引物碱基位点替换

对虾内参基因引物碱基位点替换前、后的荧光定量扩增对比结果如图 4 所示，对虾内参基因引物碱基位点替换后的扩增反应的 Ct 值从 16.37、16.57 和 16.47 升高至 26.4、26.51 和 26.34；而扩增曲线的 ΔRn 未见下降，且略有增强；将用于后续双重荧光定量 PCR 试验组合。

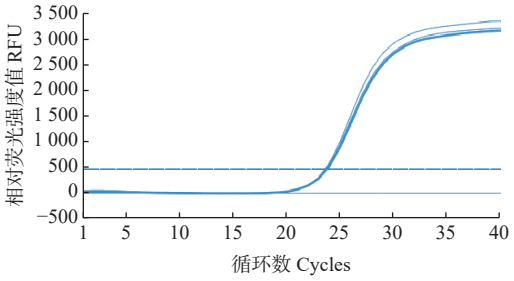

图 3　荧光定量 PCR 特异性检测结果

Fig. 3　Specificity evaluation of qPCR

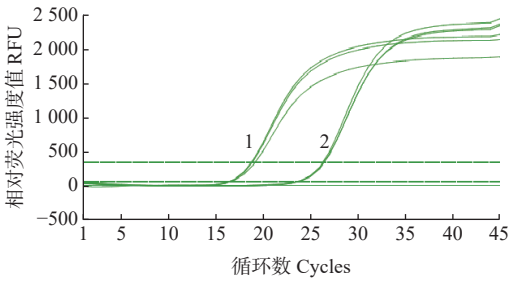

图 4　凡纳滨对虾 18S rRNA 荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig. 4　The amplification curve of qPCR for 18S rRNA of *L. vannamei*

注：1 表示 18S 内参基因引物；2 表示 18S 内参基因引物碱基位点替换。

Notes: 1 means 18S rRNA primer; 2 means substitution site in 18S rRNA primer.

2.4　双重荧光定量 PCR 检测方法的建立

利用健康凡纳滨对虾核酸代替双蒸水，对 WSSV 核酸样品进行 10 倍浓度梯度稀释，并以此为模板，分别进行单重 WSSV 荧光定量检测、WSSV−对虾内参基因双重荧光定量检测和 WSSV−对虾内参基因碱基位点替换双重荧光定量检测。结果显示（图 5a 和图 5b），当使用优化前的对虾内参基因引物进行双重 PCR 检测时，WSSV 基因检测的 Ct 值和 ΔRn 出现较大的变动，因此需要对筛选获得的对虾内参基因引物进行碱基位点替换优化。对虾内参基因引物碱基位点替换后，使用优化后的对虾内参基因引物进行双重 PCR 检测，结果显示 WSSV 基因检测的 Ct 值和 ΔRn 无明显变化（图 5a

和图 5c），说明以优化后的对虾内参基因引物建立的双重荧光定量 PCR 方法不影响 WSSV 的检出。

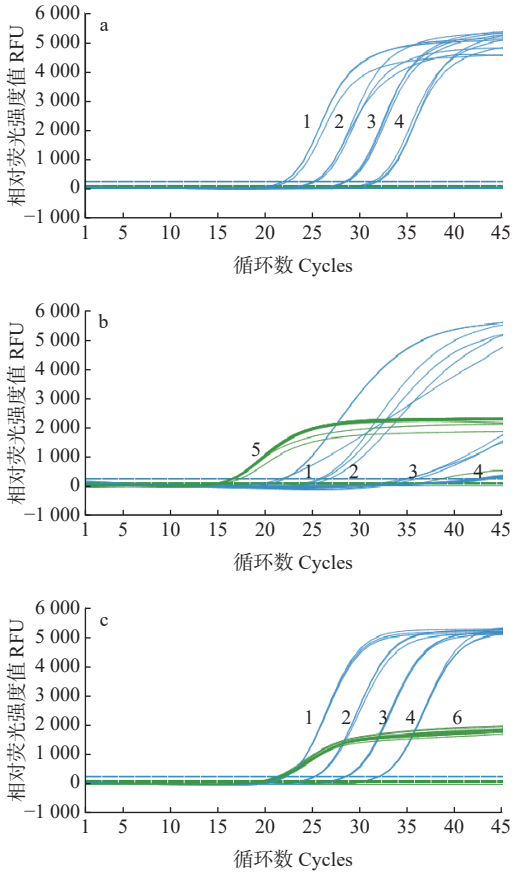

图 5 WSSV−凡纳滨对虾 18S rRNA 双重荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig. 5 The amplification curve of duplex qPCR for WSSV−18S rRNA of *L.vannamei*

注：a 表示 WSSV qPCR 扩增曲线；b 表示 WSSV-18S rRNA qPCR 扩增曲线；c 表示 WSSV-18S rRNA 引物碱基位点替换 qPCR 扩增曲线。1~4 为 WSSV 荧光定量 PCR 扩增曲线；5 为对虾 18S 内参基因引物 PCR 扩增曲线；6 为对虾 18S rRNA 引物碱基位点替换 PCR 扩增曲线。

Notes: a means the amplification curve for WSSV; b means the amplification curve for WSSV-18S rRNA of *L.vannamei*; c means the amplification curve for WSSV-18S rRNA with primer's base site substitution of *L.vannamei*. 1−4 mean the amplification curve for WSSV; 5 means the amplification curve for 18S rRNA of *L.vannamei*; 6 means the amplification curve for WSSV-18S rRNA with primer's base site substitution of *L.vannamei*.

2.5 荧光定量 PCR 敏感性

以 10 倍梯度稀释的模板荧光定量 PCR 扩增，结果显示高浓度模板（1.5×10^4~1.5×10^5 拷贝·μL^{-1}）的扩增曲线呈典型的 S 形，低浓度模板（1.5×10^1~1.5×10^3 拷贝·μL^{-1}）的扩增曲线因未达扩增平台期而呈半 S 形，模板浓度为 1.5 拷贝·μL^{-1} 和 0.15 拷贝·μL^{-1} 各 3 个样品分别扩增出 2 和 1 条曲线，空白对照未出现任何扩增曲线（图 6）。

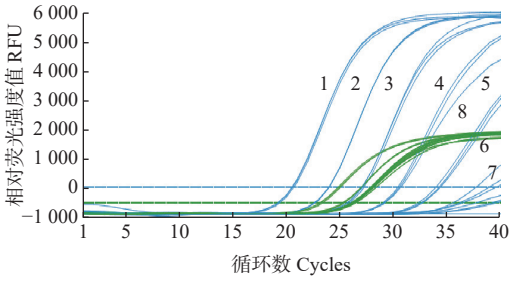

图 6 荧光定量 PCR 的敏感性检测结果

Fig. 6 Sensitivity of qPCR

注：1 为 1.5×10^5 拷贝·μL^{-1}；2 为 1.5×10^4 拷贝·μL^{-1}；3 为 1.5×10^3 拷贝·μL^{-1}；4 为 1.5×10^2 拷贝·μL^{-1}；5 为 1.5×10^1 拷贝·μL^{-1}；6 为 1.5 拷贝·μL^{-1}；7 为 0.15 拷贝·μL^{-1}；8 为凡纳滨对虾 18S 内参基因引物碱基位点替换 PCR 扩增曲线。

Notes: 1 means 1.5×10^5 copies·μL^{-1}; 2 means 1.5×10^4 copies·μL^{-1}; 3 means 1.5×10^3 copies·μL^{-1}; 4 means 1.5×10^2 copies·μL^{-1}; 5 means 1.5×10^1 copies·μL^{-1}; 6 means 1.5 copies·μL^{-1}; 7 means 0.15 copies·μL^{-1}; 8 means the amplification curve for 18S rRNA with primer's base site substitution of *L. vannamei*.

2.6 荧光定量 PCR 重复性检测

应用建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法进行批内和批间重复试验，每个浓度梯度设置 3 个平行重复，根据试验取得的 Ct 值计算平均值、标准差和组内的变异系数。检测结果显示，批内和批间变异系数为 0.24~1.46（表 1 和表 2），满足 qPCR 对于批内和批间重复性要求。表明该检测方法具有良好的重复性，扩增结果稳定可靠。

表 1 白斑综合征病毒 WSSV 荧光定量 PCR 批内重复性检测

Tab. 1 Intra-batch variability qPCR test of WSSV

模板量/（拷贝·μL^{-1}） Template amount/ (copies·μL^{-1})	Ct 均值 Mean Ct	标准差 Standard deviation	变异系数/% Coefficient of variation
6.6×10^3	22.25	0.21	0.93
6.6×10^2	25.71	0.38	1.46
6.6×10^1	29.05	0.32	1.09

表 2 白斑综合征病毒 WSSV 荧光定量批间重复性检测

Tab. 2 Inter-batch variability qPCR test of WSSV

模板量/（拷贝·μL^{-1}） Template amount/ (copies·μL^{-1})	Ct 均值 Mean Ct	标准差 Standard deviation	变异系数/% Coefficient of variation
5.5×10^2	25.61	0.33	1.31
4.5×10^2	25.90	0.06	0.24
2.5×10^1	29.98	0.28	0.95

2.7　临床样品的检测

应用建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法对 12 份临床样品进行检测，检出感染 WSSV 的样品 7 份；同时，与 GB/T 28630.2—2012《白斑综合征（WSD）诊断规程》中的套氏 PCR 检测方法进行比对，2 种方法的符合率为 100%。

3　讨论

WSSV 可引发对虾白斑病，是全球虾类养殖中地理分布广、感染性强、传播速度快、发病时间短、致死率高、宿主范围广、危害最大的一种病毒，会对养殖业产生巨大的破坏，造成严重的经济损失。在对虾养殖业中，WSSV 在个体间或群体间的水平传播较普遍，是主要的传播方式。发生对虾病的养殖场排出的废水、育苗时期购入的携带 WSSV 病毒的虾苗、运输过程中盛放感染 WSSV 病害水产品的设备等，均会造成 WSSV 大范围的水平传播。目前，尽管在该病毒的形态和基因组织结构等方面取得了显著的进展，但是仍无法有效地防控该病的发生并阻断其传播，只能早发现、早防疫，因此该病毒的快速检测至关重要。

至今，已建立了许多诊断 WSSV 的方法，包括传统组织学检测、目视检查法、生化检验法、电子显微镜技术、细胞培养方法、免疫学的酶联免疫吸附检测（Enzyme-linked immuno sorbent assay，ELISA）技术、分子生物学的环介导等温扩增（Loop-mediated isothermal amplification，LAMP）检测方法、核酸探针和 PCR 技术等。其中，多重 PCR 在同一反应体系中加入多对不同 PCR 引物和相应的模板，可在同一管反应中同时扩增出 1 条以上的目的基因，已经被广泛应用在植物病毒传播、烟草土传病害、动植物源成分、食品中的致病菌和病毒等方面的检测。多重 PCR 法较其他检测方法具有成本低、耗时较短、单次检测量大、灵敏度高、特异性好、线性范围宽且操作简单、快速、防污染等特点，可实现对产物的定量检测。在利用多重 PCR 开展检测过程中，引物设计是反应成功的关键[18]。在一个 PCR 反应体系中，多对引物同时扩增，可能会出现引物间干扰的情况，引物的设计及靶序列的选择不当均可能降低其灵敏度或导致扩增失败，而扩增效率的一致性更是多重 PCR 技术被广泛运用的一大难题。

本研究的双重荧光定量 PCR 敏感性试验中，模板为 15 拷贝·μL^{-1} 时，3 个重复的 Ct 值分别为 34.25、34.35 和 33.97，仍有明显的扩增曲线，且重复性较好；接近于陈信忠等[19] 建立的单重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法最低检测限（10 拷贝·μL^{-1}）和 Mendoza-Cano F 等[20] 建立的 SYBR 实时荧光定量 PCR（12 拷贝·μL^{-1}）。当模板为 1.5 拷贝·μL^{-1} 时，3 个重复的 Ct 值分别为 38.86、37.68 和未扩增出曲线，重复性较差。因此，为保证检测结果的准确性，在实际检测工作中，以 Ct 值 35.00 为临界值，若检测样品的 Ct 值小于或等于 35.00，且有扩增曲线，判为 WSSV 阳性；Ct 值大于 35.00，且有扩增曲线，则重复 1 次，若结果一致，则判为 WSSV 阳性；Ct 值大于 35.00，或重复结果未出现扩增曲线，判为 WSSV 阴性。

本研究通过筛选靶基因、对比目标区域片段、设计特异性引物和探针，建立了 WSSV TaqMan 探针型荧光定量 PCR 检测方法。该检测方法对 WSSV 模板产生特异性单一扩增产物，对非目标模板和阴性对照均未产生扩增，具有较好的重复性，重复性试验中 Ct 值变异系数均<1.5%。此外，本研究采用引物序列碱基位点替换优化的方法，解决了不同靶基因扩增效率的一致性问题，建立了 WSSV−对虾内参基因双重 PCR 检测方法，对对虾 WSSV 的检测下限可达 15 拷贝·μL^{-1}，具有较好的灵敏度。双重荧光定量 PCR 方法不仅弥补了普通 PCR 检测的耗时长、步骤繁琐等不足，解决了样品检测易产生假阳性的问题；同时，还解决了由操作不当、核酸提取不成功而造成的假阴性问题。多重 qPCR 反应在同一体系下进行，在很大程度上节省了试剂盒材料，达到了检测更加快速、精准，提高检测效率的目的。综上所述，本研究建立的 WSSV−对虾内参基因双重 qPCR 检测体系具有良好的准确性、可靠性和实用性，可作为水产养殖过程中 WSSV 准确、快速、稳定的检测手段。

参考文献（References）：

[1] Walker P J, Gudkovs N, Padiyar P A, *et al*. Longitudinal disease studies in small-holder black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) farms in Andhra Pradesh, India. Ⅰ. High prevalence of WSSV infection and low incidence of disease outbreaks in BMP ponds[J]. Aquaculture, 2011, 318(3 − 4): 277 − 282.

[2] Qiu W, Geng R, Zuo H L, *et al*. Toll receptor 2 (Toll2) positively regulates antibacterial immunity but promotes white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp

[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2021, 115: 103878.

[3] Shekar M, Pradeep B, Karunasagar I. White spot syndrome virus: genotypes, epidemiology and evolutionary studies[J]. Indian Journal of Virology, 2012, 23(2): 175 − 183.

[4] 刘训猛，陈静，袁锐，等. 江苏地区养殖中华绒螯蟹白斑综合征病毒（WSSV）流行病学调查[J]. 江苏海洋大学学报（自然科学版），2020，29（1）：51 − 55.
Liu X M, Chen J, Yuan R, *et al*. Epidemiological investigation of white spot syndrome virus (WSSV) on cultured *Eriocheir sinensis* in Jiangsu area[J]. Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition), 2020, 29(1): 51 − 55.

[5] Chakraborty A, Otta S, Joseph B, *et al*. Prevalence of white spot syndrome virus in wild crustaceans along the coast of India[J]. Current Science, 2002, 82(11): 1392 − 1397.

[6] 陈红莲，王永杰，张静，等. 安徽省克氏原螯虾白斑综合征病毒检测及疾病分析[J]. 水产养殖，2020，41（2）：12 − 16.
Chen H L, Wang Y J, Zhang J, *et al*. Disease analysis and detection of white spot syndrome virus of *Procambarus Clarkii* in Anhui[J]. Journal of Aquaculture, 2020, 41(2): 12 − 16.

[7] Desrina, Prayitno S B, Verdegem M C J, *et al*. White spot syndrome virus host range and impact on transmission[J]. Reviews in Aquaculture, 2022, 14(4): 1843 − 1860.

[8] Lightner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp[M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996.

[9] Zhu G H, Li S H, Wu J, *et al*. Identification of functional gene modules associated with STAT-mediated antiviral responses to white spot syndrome virus in shrimp[J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 212.

[10] Patil P K, Geetha R, Ravisankar T, *et al*. Economic loss due to diseases in Indian shrimp farming with special reference to *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and white spot syndrome virus (WSSV)[J]. Aquaculture, 2021, 533: 736231.

[11] 吴丽云. 对虾白斑综合征病毒可视化环介导等温扩增（LAMP）快速检测方法的建立[J]. 渔业研究，2019，41（6）：478 − 486.
Wu L Y. Establishment of rapid detection for shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Journal of Fisheries Research, 2019, 41(6): 478 − 486.

[12] 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.

[13] Schmittgen T D. Real-time quantitative PCR[J]. Methods, 2001, 25(4): 383 − 385.

[14] Mcdonough E A, Barrozo C P, Russell K L, *et al*. A multiplex PCR for detection of *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, Legionella pneumophila*, and *Bordetella pertussis* in clinical specimens[J]. Molecular and Cellular Probes, 2005, 19(5): 314 − 322.

[15] 蒋彩云，乔琨，许旻，等. 利用 RT-qPCR 技术筛选菊黄东方鲀的最适内参基因[J]. 渔业研究，2020，42（2）：105 − 116.
Jiang C Y, Qiao K, Xu M, *et al*. Selection of appropriate reference genes for real-time quantitative PCR analysis in *Takifugu flavidus*[J]. Journal of Fisheries Research, 2020, 42(2): 105 − 116.

[16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局，中国国家标准化管理委员会. 白斑综合征（WSD）诊断规程 第 2 部分：套式 PCR 检测法：GB/T 28630.2—2012[S]. 北京：中国标准出版社，2012.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Diagnostic protocols for white spot disease—part 2: nested PCR method: GB/T 28630.2—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.

[17] 马来，童桂香，韦信贤，等. 基于 TaqMan-MGB 探针的虾肝肠胞虫荧光定量 PCR 检测方法[J]. 西南农业学报，2020，33（6）：1319 − 1326.
Ma L, Tong G X, Wei X X, *et al*. TaqMan-MGB-based fluorescent quantitative PCR for detection of *Enterocytozoon hepatopenaei*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(6): 1319 − 1326.

[18] 官昭瑛，李慧敏，何曼文，等. 多重 PCR 技术在快速检测中的应用[J]. 山东化工，2021，50（3）：85 − 88.
Guan Z Y, Li H M, He M W, *et al*. Application of multi-

plex PCR technology in rapid detection[J]. Shandong Chemical Industry, 2021, 50(3): 85 − 88.

[19] 陈信忠，任聪，龚艳清，等. 实时荧光定量 PCR 法检测对虾白斑综合征病毒 [J]. 检验检疫学刊，2009，19（2）：7 − 11.
Chen X Z, Ren C, Gong Y Q, *et al*. Real-time fluorescence quantitative PCR in detecting white spot syndrome virus in penaeid shrimp[J]. Journal of Inspection and Quarantine, 2009, 19(2): 7 − 11.

[20] Mendoza-Cano F, Sánchez-Paz A. Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the white spot syndrome virus in marine crustaceans[J]. Virology Journal, 2013, 10(1): 186.

Development of a duplex real-time fluorescent quantitative PCR assay for simultaneous detection of white spot syndrome virus and shrimp reference gene

LI Haiping[1]，GE Hui[2*]，WEN Ping[2]，WU Liyun[2]，LI Huiyao[2]，WU Qisheng[2*]，
ZHANG Zhe[2]，YANG Qiuhua[2]，HE Libin[2]，XU Chunyan[2]
(1. Fujian Institute of Oceanography, Xiamen 361013, China;
2. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China)

Abstract: [**Introduction**] The white spot syndrome virus (WSSV) is a highly infectious and lethal pathogen that poses a significant threat to the global shrimp farming industry. WSSV can spread rapidly through both horizontal and vertical transmission, leading to mortality rates of up to 100% within 3−10 days post-infection. Due to the absence of effective prevention and treatment measures, developing rapid, accurate, and sensitive detection technologies for WSSV is crucial for timely diagnosis and implementation of control measures to prevent disease spread. [**Objective**] This study aimes to establish a sensitive and specific duplex real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) method for the simultaneous detection of WSSV and an endogenous control gene in shrimp. [**Methods**] First, specific primers and TaqMan probes were designed based on the conserved sequences of the WSSV genome, establishing a single WSSV qPCR detection system. Specificity and repeatability tests confirmed that the method had excellent specificity for WSSV without cross-reactivity, with the coefficient of variation for different gradients of plasmid standards being less than 1.5%, indicating high repeatability. Subsequently, primers and probes for the endogenous control gene of *Litopenaeus vannamei* were designed and synthesized, and the primer sequences were optimized to establish a duplex qPCR detection system. [**Results**] Sensitivity tests revealed that the detection limit of the duplex system for WSSV was 15 copies·μL^{-1}, with a strong linear relationship between the logarithmic value of the initial template amount and the cycle threshold (Ct) value of WSSV plasmid standards within the range of 6.6 to 6.6×10^5 copies·μL^{-1}(R^2=0.998). Furthermore, the incorporation of the endogenous control gene effectively distinguished false-negative results caused by nucleic acid extraction or operational issues in the samples. [**Conclusion**] In conclusion, the established duplex qPCR detection method for WSSV and the shrimp endogenous control gene exhibits high sensitivity, strong specificity, and good repeatability. This method provides a reliable technical approach for the rapid diagnosis and epidemiological investigation of WSSV, which is crucial for controlling WSSV outbreaks and ensuring the sustainable development of the shrimp farming industry.

Key words: white spot syndrome virus (WSSV); real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR); TaqMan probe; virus detection; aquaculture