

Taqman MGB 探针快速定量检测 VHSV 方法的研究^①

许建明^② 张念之 蒋一男 张利峰* 夏 春^③

(中国农业大学动物医学院农业部预防兽医学重点实验室 北京 100094)

(* 北京出入境检验检疫局 北京 101113)

摘 要 为建立准确实时地定量检测病毒性出血性败血症病毒(VHSV),在 VHSV-N 基因保守区设计了 Taqman MGB 探针与引物对,随后,采用体外转录技术获得了 VHSV-N 基因 RNA,并以此为绝对定量标准品,建立了绝对定量(AQ)检测 VHSV 的实时荧光 RT-PCR 法(AQ-RT-PCR 方法),并与世界动物卫生组织(OIE)推荐的普通 RT-PCR 法进行了比较。此荧光 RT-PCR 法特异性好,与其他鱼类弹状病毒无交叉反应。检测线性范围为 $10^{10} \sim 10^2$ 拷贝/反应,灵敏度达 10^2 拷贝/反应。此检测灵敏度比 OIE 推荐的 RT-PCR 法高出 5 个数量级,比嵌套 RT-PCR 高出 1 个数量级。此法是出入境检疫 VHSV 的有效方法。

关键词 病毒性出血性败血症病毒(VHSV),Taqman MGB 探针,荧光 RT-PCR 法,定量检测

0 引 言

病毒性出血性败血症(viral hemorrhagic septicemia, VHS)是一种危害水产养殖业的重要疾病,属于世界动物卫生组织(OIE)规定须申报的一种疫病^[1]。VHS 主要流行分布于北半球,可感染数十种鱼类,死亡率可达 30% ~ 100%^[2,3]。VHS 病原为病毒性出血性败血症病毒(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV),属弹状病毒科(*Rhabdoviridae*)粒外弹状病毒属(*Novirhabdovirus*),为不分节段的单链负股 RNA 病毒^[4]。VHSV 基因组约 11kb,其 3' 至 5' 依次编码核蛋白(nucleoprotein, N)、磷蛋白、基质蛋白、糖蛋白、非结构蛋白以及 RNA 聚合酶^[1,4]。迄今为止,由于没有 VHS 商用疫苗甚至缺乏有效防控措施^[1],VHS 一旦进入我国引起爆发流行,无疑将会给水产养殖业造成重大损失。

目前,国际上检测 VHSV 通常采用细胞培养分离病毒法^[5-7]、反转录聚合酶链反应法(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)^[7-9]以及酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[11,12]。细胞培养分离 VHSV 法结果可靠,但检测周期长,不适合用于快速诊断^[7-9]。ELISA、中和试验(neutralization test)、间接荧光抗体

试验(indirect fluorescent antibody test, IFAT)、RT-PCR 法在 VHSV 检测上均取得了可靠的结果^[9-12]。其中,Veronica 等(2006 年)报道了 Taqman 探针实时荧光 RT-PCR 法(Real-time RT-PCR)检测 VHSV^[13]。Veronica 认为在 N 基因设计探针其效率高于 G 基因;并证明了实时荧光 RT-PCR 法比普通 RT-PCR 法以及细胞培养分离病毒法更可靠,其灵敏度为 0.5 个感染单位^[13]。然而,随着 VHSV 分离株的增加,我们发现 Veronica 等使用的探针序列所在的 VHSV-N 区域变异较大,其探针不能匹配 GenBank 中的部分分离株(如 AB179621、DQ427105、EF079895、X59241 等),有漏检的可能。为了建立更可靠、精确的 VHSV 检测法,本文在重新分析 VHSV-N 序列的基础上,在其高保守区设计了 Taqman MGB 探针,并以体外转录的 VHSV-N 基因片段作为绝对定量(absolute quantitative, AQ)检测标准品,建立了实时定量检测 VHSV 的 AQ-RT-PCR 方法。本法与 OIE 推荐的 RT-PCR 法相比,具备更快速、灵敏以及操作简单等优点。

1 材料和方法

1.1 病毒和细胞系

病毒性出血性败血症病毒(VHSV)、传染性造血

① 国家质检总局(2007IK031)资助项目。

② 男,1983 年生,硕士;研究方向:微生物学与免疫学。

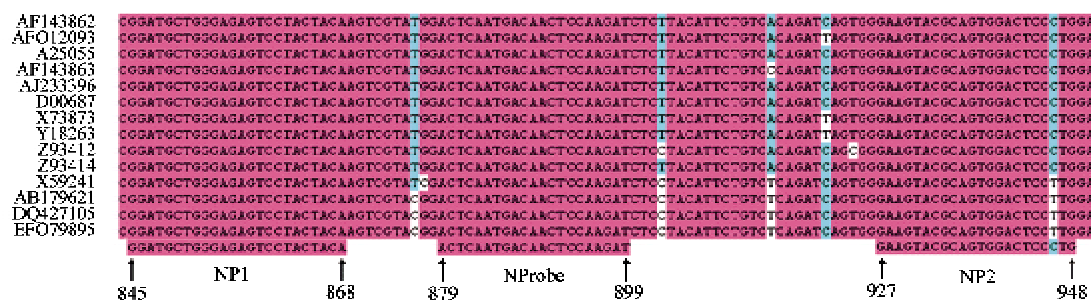
③ 联系人, E-mail: xiachun@cau.edu.cn
(收稿日期:2008-04-09)

组织坏死病病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)、鲤春病毒血症病毒 (spring viraemia of carp virus, SVCV)^[14] 和鲤鱼上皮瘤细胞系 (epithelioma papulosum cyprini, EPC)^[14] 均由北京出入境检验检疫局技术中心鱼病检测室保存。

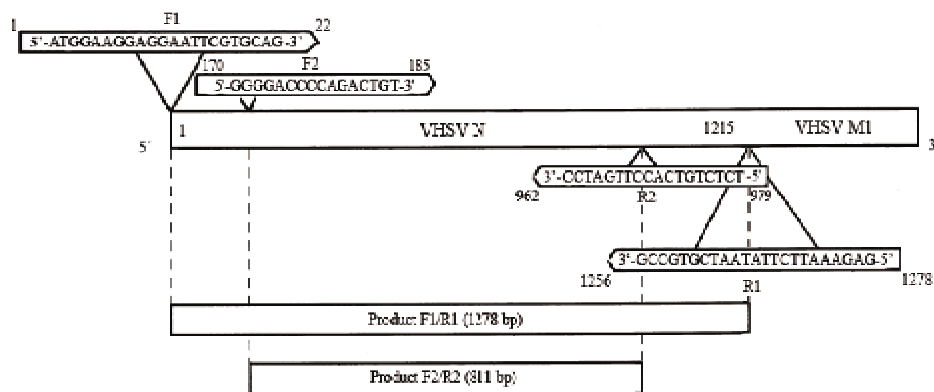
1.2 Taqman MGB 探针与引物对设计

如图 1(a) 所示, 首先采用 DNAMAN V5.2.2 软件对 GenBank 中的 VHSV-N 基因 (A25055、AB179621、AF143863、AF012093、AF143862、AJ233396、

D00687、DQ427105、EF079895、X59241、X73873、Y18263、Z93412、Z93414) 进行比对, 再使用 Primer Express V2.0 软件在 VHSV-N 序列高保守区设计 Taqman MGB 探针 (N Probe) 及特异性引物对 (NP1 和 NP2)。探针的 5' 端用 VIC 标记。如图 1(b) 所示, 在 VHSV-N 基因的两端分别设计引物 F1 和 R1 以克隆与制备标准品, 此对引物扩增的核酸片段的大小为 1278bp。另外, 合成 OIE 所推荐 PCR 用引物对 (F2/R2), 该对引物可扩增出 811bp 的核酸片段。



(a) VHSV-N 基因序列与 Taqman MGB 探针和引物序列



(b) PCR 扩增标准品引物 (F1/R1) 以及 OIE 推荐 PCR 引物对 (F2/R2)

图 1 探针与 PCR 用引物对位置与序列

1.3 实时荧光 RT-PCR 定量检测 VHSV

1.3.1 VHSV-N 标准品制备

用 TRIZOL (Invitrogen) 从接种 VHSV 的上皮瘤细胞系 (EPC) 细胞中提取病毒 RNA, 具体操作按照试剂说明书进行。然后用随机引物 (pdN6) 对病毒 RNA 进行反转录, 体系 (25 μ l) 如下: 5 $\times$ 反应缓冲液 2.5 μ l, dNTP (10 mM) 1.5 μ l, 随机引物 (pdN6, 50 μ M) 1.0 μ l, RNA 酶抑制剂 (40 U/ μ l) 0.5 μ l, M-MLV (200 U/ μ l) 1.0 μ l, DEPC 处理水 8.5 μ l, 模板 10 μ l。反应条件: 37 $^{\circ}$ C 1h, 95 $^{\circ}$ C 5min, 4 $^{\circ}$ C 保存。对 RT 产物再用特异性引物对 (F1/R1) 进行 PCR 扩增。PCR

反应体系 (25 μ l) 如下: 10 $\times$ 反应缓冲液 2.5 μ l, $MgCl_2$ 溶液 (25 mM), 3 μ l, dNTP (10 mM) 0.5 μ l, 上游引物 F1 (25 μ M) 1 μ l, 下游引物 R1 (25 μ M) 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 0.5 μ l, DEPC 处理水 16.5 μ l, 反转录产物 1 μ l。反应条件: 1 个循环: 95 $^{\circ}$ C 5min; 32 个循环: 95 $^{\circ}$ C 45s, 60 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min 45s; 1 个循环: 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段。将回收的目的片段与 pGEM-T Easy 载体连接。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 测序鉴定。

用 *Mlu* I 对质粒进行酶切, 纯化回收线性片段

作为模板,用 Promega RiboMAX™ Large Scale RNA Production System—T7 试剂盒(Promega)进行体外转录。反应体系(50 μ l)如下:5 $\times$ T7 转录缓冲液 10 μ l, rNTPs(ATP, CTP, GTP, UTP 各 25mM) 15 μ l, 线形 DNA 模板 12 μ l, DEPC 处理水 8 μ l, T7 RNA 聚合酶 5 μ l。混匀,置 37 $^{\circ}$ C, 温浴 4h, 然后向反应体系中加入 1 μ l RQ1 DNA 酶, 37 $^{\circ}$ C 温浴 30min, 除去 DNA 模板。然后用 TRIzol 提取纯化。将体外转录得到的病毒 RNA 片段纯化后,用分光光度计测得样品在 260nm 波长处的 OD 值为 0.176, 计算得到 RNA 浓度为 9.19×10^{11} 拷贝/微升, 将样品进行 10 倍系列稀释, 得到浓度分别为 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 , 1.0 拷贝/微升的 RNA 溶液。

1.3.2 实时荧光 RT-PCR 反应体系的优化

为得到高效率的反应体系,我们对反应体系中的探针和引物的浓度配比、镁离子的浓度、酶的浓度分别进行了优化,建立了如下反应体系(25 μ l):5 $\times$ 反转录缓冲液(Mg^{2+} , 15mM) 5 μ l, dNTP (10mM) 0.5 μ l, RNA 酶抑制剂 0.5 μ l, M-MLV 反转录酶(200 U/ μ l) 0.25 μ l, Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l) 0.25 μ l, 上游引物 NP1 (10 μ M) 1.5 μ l, 下游引物 NP2 (10 μ M) 1.5 μ l, 探针 N Probe (10 μ M) 0.5 μ l, DEPC 处理水 5 μ l, 模板 10 μ l。在 ABI7900 荧光 PCR 仪上进行 PCR 扩增,反应条件如下:1 个循环:42 $^{\circ}$ C 30min, 95 $^{\circ}$ C 5min; 40 个循环:95 $^{\circ}$ C 10s, 60 $^{\circ}$ C 1min。

1.3.3 标准曲线的绘制及灵敏度检测

以 10 倍系列梯度稀释的 RNA 溶液($1.0 \sim 10^9$ 拷贝/微升)作为定量标准品,以优化后的反应体系进行实时荧光 RT-PCR。然后用 SDS 2.3 软件绘制绝对定量标准曲线,同时确定该定量检测方法的灵敏度。并用公式 $E = [10^{(-1/s)}] - 1$ (S 为标准曲线的斜率)计算反应的效率^[13]。

1.3.4 重复性试验

将浓度 $10^3 \sim 10^9$ 拷贝/微升的 10 倍系列梯度稀释的 RNA 溶液作为模板,进行实时荧光 RT-PCR。在不同时间对每个浓度的标准品分别进行 5 次重复,比较分析同一浓度各次测得 Ct 值,以验证该方法的重复性。

1.4 特异性试验

1.4.1 病毒培养

按常规方法对 EPC 细胞进行消化传代。即用含 10% 胎牛血清、800 ~ 1000 U/ml 的青霉素和链霉素的 199 培养基培养 EPC 细胞,使其贴壁生长至单层,然后分别接种滴度为 $10^{8.5}$ TCID₅₀ ml⁻¹ 的 IHNV、

滴度为 $10^{8.5}$ TCID₅₀ ml⁻¹ 的 VHSV 以及滴度为 $10^{8.2}$ TCID₅₀ ml⁻¹ 的 SVCV 病毒悬液^[1]。随后将接种过 IHNV、VHSV 的 EPC 细胞置于 15 $^{\circ}$ C 培养箱中培养;将接种过 SVCV 的 EPC 细胞置于 20 $^{\circ}$ C 培养箱中培养,并连续观察细胞病变(cytopathic effect, CPE), 80% 以上细胞出现 CPE 时收毒。

1.4.2 病毒的检测

用上述实时荧光 RT-PCR 法对细胞培养的 IHNV 和 SVCV 进行检测。病毒核酸提取按照说明书进行;实时荧光 RT-PCR 参照 1.3.2 进行。

1.5 OIE RT-PCR 检测 VHSV-N 标准品

以 OIE 水生动物诊断手册^[1]中所推荐的用于检测 VHSV 的 RT-PCR 法对 10 倍系列梯度稀释的 VHSV-N 标准品($1.0 \sim 10^9$ 拷贝/微升)进行检测。RT-PCR 反应体系(25 μ l)如下:Read-to-Go RT-PCR bead (Amersham) 1/4 粒, 10 $\times$ 反应缓冲液 1.25 μ l, MgCl₂ 溶液(25mM), 1.5 μ l, dNTP (10mM) 0.5 μ l, Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l) 0.25 μ l, 上游引物 F2 (25 μ M) 1 μ l, 下游引物 R2 (25 μ M) 1 μ l, DEPC 处理水 9.5 μ l, 模板 10 μ l。反应条件如下:1 个循环:50 $^{\circ}$ C 30min, 94 $^{\circ}$ C 2min; 35 个循环:94 $^{\circ}$ C 30s, 52 $^{\circ}$ C 30s, 68 $^{\circ}$ C 1min; 1 个循环:68 $^{\circ}$ C 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存^[1]。反应结束后,以 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳鉴定。

1.6 嵌套 PCR 检测 VHSV-N 标准品

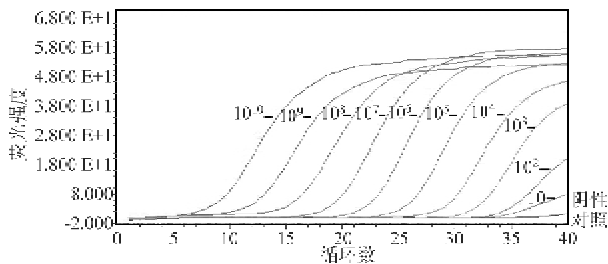
以引物对 F1/R1 对 10 倍系列梯度稀释的 VHSV-N 标准品($1.0 \sim 10^9$ 拷贝/ μ l)进行 RT-PCR,反应体系同 1.5,反应条件同 1.3.1。反应结束后,再以 OIE 推荐引物 F2 和 R2 分别对上述 RT-PCR 产物进行嵌套 PCR 检测。体系(25 μ l)如下:10 $\times$ 反应缓冲液 2.5 μ l, MgCl₂ 溶液(25mM), 3 μ l, dNTP (10mM) 0.5 μ l, Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l) 0.5 μ l, 上游引物 F2 (25 μ M) 1 μ l, 下游引物 R2 (25 μ M) 1 μ l, DEPC 处理水 15.5 μ l, F1/R2 RT-PCR 产物 1 μ l。反应条件如下:1 个循环:95 $^{\circ}$ C 5min; 32 个循环:95 $^{\circ}$ C 45s, 52 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min 45s; 1 个循环:72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后,RT-PCR 和嵌套 PCR 产物分别在 1% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定。

2 结果

2.1 实时荧光 RT-PCR 检测 VHSV-N 标准曲线及灵敏度

将 10 倍系列梯度稀释的 RNA 溶液($1.0 \sim 10^9$ 拷贝/ μ l)作为绝对定量标准品进行实时荧光 RT-PCR,

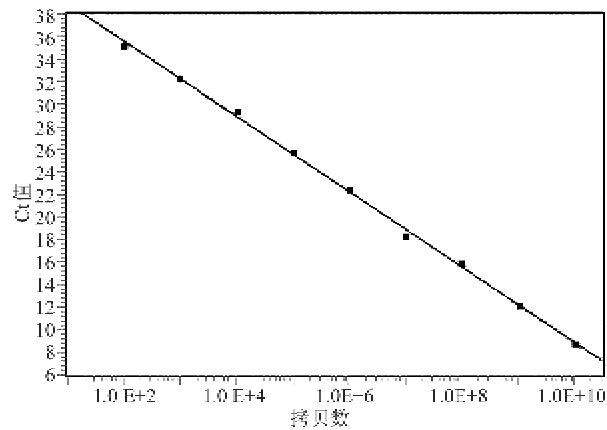
绘制绝对定量标准曲线,结果如图 2。图 2(a)是在 ABI9700 荧光 PCR 仪上对 10 倍系列梯度稀释的 RNA 标准品进行扩增得到的曲线图。图 2(b)是用 SDS 2.3 软件绘制的标准曲线,斜率为 -3.34,相关系数为 0.9986,效率为 99.25%,线形回归方程为 $Y = -3.34X + 42.27$ 。从图 2 的结果中可以看出,反应在 $10^2 \sim 10^{10}$ 拷贝/反应的浓度范围内有极好的线性关系,该定量方法,最低可以定量检测到 10^2 拷贝/反应的目的 RNA。



(a) 10 倍系列稀释标准品的 PCR 扩增曲线,从左到右分别为 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 0 拷贝/反应的模板量对应的扩增曲线

2.2 标准品的重复性检测

分别对 $10^3 \sim 10^9$ 拷贝/ μ l 系列浓度的 VHSV-N 标准品重复 5 次实时荧光 RT-PCR 检测,结果如表 1 所示。各模板浓度重复检测的变异系数 (coefficient variability, CV) 小,显示出了良好的重复性。



(b) 标准曲线,横坐标值表示每反应中的起始拷贝数,纵坐标值表示 Ct 值

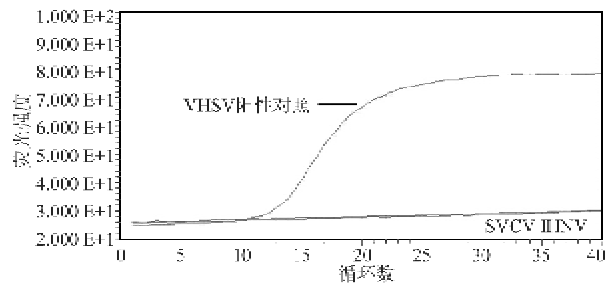
图 2 实时荧光 RT-PCR 扩增 VHSV-N 标准品绝对定量标准曲线

表 1 实时荧光 RT-PCR 扩增 VHSV-N 标准品的重复性检测

模板量 (拷贝/反应)	Ct 值					平均值	变异系数 (CV)
	1	2	3	4	5		
10^{10}	7.1	7.4	7.2	7.3	7.1	7.22	1.81%
10^9	10.5	10.3	10.1	9.8	10.1	10.16	2.57%
10^8	13.9	13.9	13.9	13.6	13.9	13.84	0.97%
10^7	17.1	17.8	17.4	17.5	17.9	17.54	1.83%
10^6	20.8	20.7	21.4	19.6	21.4	20.78	3.54%
10^5	25.0	24.0	24.5	23.5	25.4	24.48	3.10%
10^4	28.2	28.9	28.0	28.4	29.3	28.56	1.86%

2.3 特异性试验

分别接种 IHNV、VHSV 和 SVCV 的 EPC 细胞在培养 4~5 天后,均出现 80% 以上的病变。以建立的 VHSV 实时荧光 RT-PCR 对 IHNV 和 SVCV 进行特异性检测,结果如图 3 所示。除 VHSV 阳性对照外,



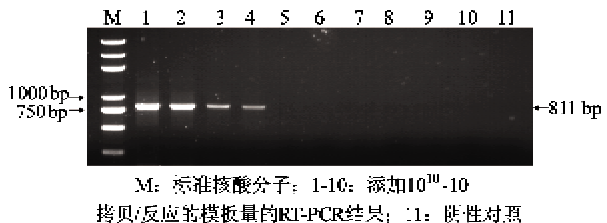
VHSV: 结果阳性; IHNV: 结果阴性; SVCV: 结果阴性

图 3 实时荧光 RT-PCR 法特异性试验

IHNV 和 SVCV 扩增结果均为阴性,这说明本法与其它两种鱼类弹状病毒之间无交叉反应,特异性良好。

2.4 实时荧光 RT-PCR 法与 OIE RT-PCR 法比较

本文按照 OIE 水生动物诊断手册^[1]中推荐的 RT-PCR 法对 10 倍系列梯度稀释的 VHSV-N 标准品 ($1.0 \sim 10^9$ 拷贝/ μ l) 进行了检测。结果如图 4 所示。



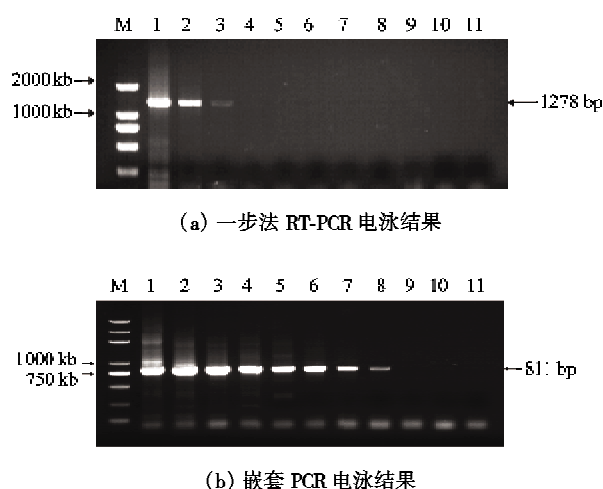
M: 标准核酸分子; 1-10: 添加 $10^{10} \sim 10^1$ 拷贝/反应的模板量的 RT-PCR 结果; 11: 阴性对照

图 4 OIE 推荐的 RT-PCR 法检测 VHSV-N 标准品结果

RT-PCR法最低可以检出 10^7 拷贝/反应的模板量,灵敏度远低于实时荧光 RT-PCR 法(图 2(a))。

2.5 实时荧光 RT-PCR 法与嵌套 PCR 法比较

以自建的一步法 RT-PCR 和嵌套 PCR 对 10 倍系列梯度稀释的 VHSV-N 标准品($1.0 \sim 10^9$ 拷贝/ μL)进行检测,结果如图 5 所示。图 5(a)为自建的一步法 RT-PCR 检测结果,最低可检测到 10^8 拷贝/反应的模板量;图 5(b)为嵌套 PCR 结果,该法使检测灵敏度提高了 5 个数量级,可检测出 10^3 拷贝/反应的模板量。但灵敏度仍低于实时荧光 RT-PCR 法(图 2(a))。



M: 标准核酸分子;1-10: 分别为 10^{10} - 10^1 拷贝/反应的模板量对应的 RT-PCR 结果;11: 阴性对照

图 5 嵌套 PCR 法检测 VHSV-N 标准品结果

3 讨论

本研究使用 Taqman MGB 探针建立了 VHSV 的快速定量检测方法。与一般 Taqman 探针不同, Taqman MGB 探针在其 3' 端标记了一种称为小沟结合物(minor groove binder, MGB)的非荧光性淬灭基团,它仅吸收报告基团的能量但不发光,从而更加降低了 PCR 过程中本底荧光信号的干扰。并且, MGB 可以稳定探针与模板杂交,提高探针的退火温度,从而缩短了探针长度,使荧光报告基团和淬灭基团的距离更近,淬灭效果更好,提高了探针的特异性^[15]。

靶基因与探针位点的选择是实时荧光 RT-PCR 成功与否的关键。Veronica 等根据 VHSV 多顺反子转录递减的特点,在 VHSV-N 基因和 VHSV-G 基因区域分别设计了 Taqman 探针,其检测结果 VHSV-N 探针效率要高于 VHSV-G 探针^[13]。本文进一步比

较了最近 2 年在 GenBank 登录的 VHSV-N 基因序列,发现部分新分离株在 VHSV-N 区域存在碱基替换。结果也显示了 Veronica 等设计的 Taqman 探针序列不能匹配所有的 VHSV 分离株,有漏检的可能。因此,我们重新在 VHSV-N 基因的高保守区设计了 Taqman MGB 探针。通过 Blast,结果显示此探针能完全匹配 GenBank/DBJ/EMBL 中的 VHSV-N 基因序列,其检出率明显优于 Veronica 的探针。

本文首次使用了体外转录的 VHSV-N RNA 作为定量标准品,这样标准品能平行地显示出目的样品的反转录效率,保证了实验的准确。在 $10^2 \sim 10^{10}$ 拷贝/反应范围内实时荧光 RT-PCR 显示出了良好的线性关系,最低可准确定量检出 10^2 拷贝/反应的模板量。当模板量降至 10 拷贝/反应时,虽然仍可被检出,但是反应管中荧光量的增加值较小,已不能准确定量,只能进行定性。另外,通过比较标准品重复检测的 Ct 值可以看出,各浓度样品重复检测的变异系数小,说明该检测体系稳定并具有良好的重复性。同时,本实验体系与 IHNV 和 SVCV 鱼类弹状病毒不存在交叉反应,特异性好。

为了进一步确认本方法的灵敏性,我们构建了 OIE 推荐的 RT-PCR 法检测系统并自建了嵌套 PCR 法来检测 VHSV-N 标准品。对于同一系列稀释的 VHSV-N 标准品, OIE 推荐的 RT-PCR 的灵敏度为 10^7 拷贝/反应,远远低于本实时荧光 RT-PCR 法 10^2 拷贝/反应的灵敏度。嵌套 PCR 的检出灵敏度为 10^3 拷贝/反应。十分明显,嵌套 PCR 的灵敏度要远高于 OIE 推荐的 RT-PCR 的灵敏度,大约相差了 4 个数量级,而实时荧光 RT-PCR 的灵敏度又比嵌套 PCR 高出了 1 个数量级。必须说明的是本方法与 Veronica 等建立的方法难以精确地进行比较,主要是因为 Veronica 等以病毒病灶形成单位(focus forming units, f.f.u.)计算检出灵敏度,其检出灵敏度为 1.6 f.f.u./反应^[13]。一般而言,1.6 f.f.u. 中所含病毒基因组的拷贝数要大于 10^2 拷贝^[16]。Overturf 等(2001 年)报道,以 Taqman 探针定量检测 IHNV 感染的鲑鱼脑肾组织时,其最低可以检测 100 基因拷贝/反应的模板量^[17]。这与本方法的结果类似。

综上所述,本文用 Taqman MGB 探针建立了实时荧光 RT-PCR 法定量检测 VHSV。此方法在具备快速、灵敏、特异等特点的基础上,还具有定量准确的优点。同时,其检出灵敏度也优于已有的普通 RT-PCR 法、嵌套 PCR 法和一般荧光 RT-PCR 法。

参考文献

- [1] World Organization for Animal Health (OIE). Manual of diagnostic tests for aquatic animals; Viral haemorrhagic septicemia. <http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A-00022.htm>; OIE, 2006
- [2] The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). Viral Hemorrhagic Septicemia. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.htm>; CFSPH, 2007
- [3] Skall H F, Olesen N J, Møllergaard S. Viral haemorrhagic septicemia virus in marine fish and its implications for fish farming a review. *J Fish Dis*, 2005, 28(9): 509-529
- [4] Betts A M, Stone D M. Nucleotide sequence analysis of the entire coding regions of virulent and avirulent strains of viral haemorrhagic septicemia virus. *Virus Genes*, 2000, 20(3): 259-262
- [5] Lorenzen E, Carstensen B, Olesen N J. Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis Aquat Organ*, 1999, 37(2): 81-88
- [6] Olesen N J, Jørgensen P E V. Comparative susceptibility of three fish cell lines to Egtved virus, the virus of viral haemorrhagic septicemia (VHS). *Dis Aquat Organ*, 1992, 12: 235-237
- [7] Knusel R, Bergmann S M, Einer-Jensen K, et al. Virus isolation vs RT-PCR: which method is more successful in detecting VHSV and IHNV in fish tissue sampled under field conditions? *J Fish Dis*, 2007, 30(9): 559-568
- [8] Lopez-Vazquez C, Dopazo C P, Oliveira J G, et al. Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral haemorrhagic septicemia virus. *J Virol Methods*, 2006, 133(2): 167-174
- [9] Dopaz C P, Bandin I, Lopez-Vazquez C, et al. Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus from Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* caught at the Flemish Cap. *Dis Aquat Organ*, 2002, 50(3): 171-179
- [10] Fregeneda-Grandes J M, Olesen N J. Detection of rainbow trout antibodies against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) by neutralisation test is highly dependent on the virus isolate used. *Dis Aquat Organ*, 2007, 74(2): 151-158
- [11] Olesen N J, Lorenzen N, Jørgensen P E V. Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF) and plaque neutralization test (50 % PNT). *Dis Aquat Organ*, 1991, 10: 31-38
- [12] Mourton C, Bearzotti M, Piechaczyk M, et al. Antigen-capture ELISA for viral haemorrhagic septicemia virus serotype I. *J Virol Methods*, 1990, 29(3): 325-333
- [13] Chico V, Gomez N, Estepa A, et al. Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, 2006, 132(1-2): 154-159
- [14] 张利峰, 张鹤晓, 乔卫虹等. 荧光 RT-PCR 检测鱼类鲤春病毒血症病毒的研究. *检验检疫科学*, 2005, 15(6): 22-25
- [15] Kutyavin I V, Afonina I A, Mills A, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(2): 655-661
- [16] Bae H G, Nitsche A, Teichmann A, et al. Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *J Virol Methods*, 2003, 110(2): 185-191
- [17] Overturf K, LaPatra S E, Powell M. Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. *J Fish Dis*, 2001, 24: 325-333

Absolute quantitative real-time RT-PCR assay for rapid detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) with Taqman MGB probe

Xu Jianming, Zhang Nianzhi, Jiang Yanan, Zhang Lifeng*, Xia Chun
(Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Ministry of Agriculture,
College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)
(* Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 101113)

Abstract

An absolute quantitative (AQ) real-time RT-PCR (AQ-RT-PCR) method is established and developed for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) detection. Firstly, the Taqman MGB probe and the primers are designed from highly conserved regions of nucleoprotein (N) gene of VHSV. Secondly, the AQ-RT-PCR method is established using the quantitative standard samples obtained from the *in vitro* transcribed VHSV N gene. The comparison of the AQ-RT-PCR with the conventional RT-PCR shows that the AQ-RT-PCR is more specific and there are no cross reactions with other fish *Rhabdoviridae* viruses. The linear range of the AQ-RT-PCR assay is from 10^{10} copies/reaction to 100 copies/reaction. The low quantitative detection limit is 100 copies/reaction. The sensitivity of the AQ-RT-PCR is higher than the conventional RT-PCR by five orders of magnitude and also by one order of magnitude than the nested PCR. The AQ-RT-PCR method will be efficiently used in entr-exit detection of VHSV.

Key words: viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), Taqman MGB probe, real-time RT-PCR, quantitative detection