

WSSV和HHNV二重实时荧光PCR检测方法的建立

谢芝勋¹ 谢丽基¹ 庞耀珊¹ 卢兆发² 谢志勤¹ 孙建华¹
邓显文¹ 刘加波¹ 唐小飞¹

(1)广西兽医研究所,南宁 530001; (2)广西水产畜牧局,南宁 530022)

摘要:根据基因库中对虾白斑综合症病毒 WSSV (AF369029) 和传染性皮下及造血器官坏死病毒 HHNV (AF218226) 基因序列,设计了 WSSV 和 HHNV 的两对特异性引物和两条用不同荧光基团标记的 TaqMan 探针。对反应条件和试剂浓度进行优化,建立了能够同时检测 WSSV 和 HHNV 的二重实时荧光 PCR 方法。该方法特异性好,对 WSSV 和 HHNV 的检测敏感性分别达到 2 和 20 个模板拷贝数;此外抗干扰能力强,对 WSSV 和 HHNV 不同模板浓度进行组合,仍可有效地同时检测这两个病毒。对保存的 30 份经常规 PCR 检测仅为 WSSV 或 HHNV 阳性的样品进行二重实时荧光 PCR 检测,结果都为阳性,其中 1 份为 WSSV 和 HHNV 混合感染。本研究建立的二重实时荧光 PCR 方法用于 WSSV 和 HHNV 的检测具有特异、敏感、快速、定量等优点。

关键词:白斑综合征病毒;对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒;多重实时荧光 PCR

中图分类号: S945.1 4⁺ 6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2320(2009)01-0002-20

对虾白斑综合症病毒 (WSSV)、传染性皮下及造血器官坏死病毒 (HHNV) 是当前严重危害对虾养殖业的两种病毒。WSSV 主要引起对虾甲壳内侧白斑病变,自 1990 年开始在亚洲地区养殖对虾中不断爆发流行,死亡率高达 100%^[1]。HHNV 可引起红额角对虾急性感染并呈现高死亡率 (90%),还可以引起南美白对虾出现慢性/矮小残缺综合症,导致患病对虾生长缓慢,表皮畸形^[2]。感染了 WSSV 和 HHNV 的对虾可终身带毒,通过垂直传播把病毒传给下一代和水平传播传给其他种群。近年来随着对虾种苗和水产品国际贸易交流增多,对虾养殖中 WSSV 和 HHNV 混合感染常有发生,不但给它们之间的鉴别诊断和有效防治增加困难,也给对虾养殖业造成了严重的经济损失^[3]。

实时荧光 PCR 将 PCR 与荧光检测方法相结合,具有操作简便、结果直观、敏感性高、特异性强、重复性好等优点,已成为动物病原检测的重要方法。目前,国内还没有应用实时荧光 PCR 同时检测对虾 WSSV 和 HHNV 的报道。为了提高检测准确性和检测效率,缩短检测周期,本研究采用了二重实

时荧光 PCR 技术,建立同时检测对虾 WSSV 和 HHNV 的二重实时荧光 PCR 技术,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 Lightcycler 210 荧光定量 PCR 仪 (Roche)。荧光定量 PCR 试剂盒 Premix Ex TaqTM 购自 TaKaRa 公司 (大连)。质粒小量提取试剂盒购自北京 BiDev 公司。

1.2 质粒与阳性病料 pMD2WSSV 和 pMD2HH2 NV 阳性重组质粒由本室构建保存^[3]。WSSV、HH2 NV、对虾桃拉病毒 (TSV)、溶血弧菌和链球菌,均由本实验室保存^[4,5],参照文献[3]的方法进行 DNA 抽提。

1.3 标准阳性模板的制备 参照质粒提取试剂盒说明,提取 pMD2WSSV 和 pMD2HHNV 质粒,经紫外分光光度计测定 D260 值,确定质粒 DNA 的浓度,将两个质粒 DNA 混合稀释成终浓度都为 1@10¹⁰ 拷贝 / LL,并 10 倍系统稀释成 1@10¹ 1@10⁰ 拷贝 / LL 等 10 个稀释度, -20℃ 保存备用。

114 荧光定量 PCR 方法的建立

114.1 引物与 Taqman 探针的设计与合成 根据 GenBank 中 WSSV 基因序列 (AF369029) 和 HHNV 基因序列 (AF218226) 中的保守片段, 采用 Primer Express 2.0 软件, 设计两对特异性引物和两条 Taqman 探针, 由 TaKaRa 公司合成。

wssv1 seq2415 5'GCCAGCCCCGTGAACTG23

wssv1 seq2492 5'ACGTCCAACCTCGTTATCATTC23

Ihhnv (mod) 53F 5'AGGAGACTCAAACACCT2

TCCATCT23

Ihhnv (mod) 130R 5'GACTGATTCTGGGTTCT2

TCGA23

Taqman 探针序列: wssv1 seq2439T 5'ROX2 TCAGTGTCTATCCAAACAA GTCCGA 2E CL IPSE 2S

Ihhnv (mod) 78F 5'FAM 2CAAAACCTCATCG2 GAAAGTCCTACCGCTCTC2TAMRA23

114.1.2 引物、探针以及试剂浓度的筛选 应用质粒 pMD2WSSV 和 pMD2HHNV 作为检测样品, 将 WSSV 和 HHNV 的引物和探针终浓度在 0.12 μmol/L 之间, 进行不同浓度的配比, 筛选出能够同时检测对虾 WSSV 和 HHNV, 且对 Ct 值和扩增效率影响不大的引物和探针配比浓度; 在使用的荧光定量 PCR 试剂盒中, 添加不同浓度的 MgCl₂、dNTP 和 Taq 聚合酶, 筛选出对实验结果较好的添加浓度, 建立二重实时荧光 PCR 方法。

114.1.3 二重实时荧光 PCR 扩增反应总体积为 20 μL, 其中 Real time PCR Premix 10 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 0.125 μL, 2.5 mmol/L dNTP 0.15 μL, 5 U/μL Taq 聚合酶 0.125 μL, WSSV 上、下游引物及探针终浓度都为 0.16 μmol/L, HHNV 上、下游引物及探针终浓度都为 0.14 μmol/L, 模板 2 μL, 余下用灭菌 DEPC 水补足, 均匀混合, 置 Lightcycler 荧光定量 PCR 仪上进行自动化扩增反应。温度转换率为 20 s/°C, 在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。反应程序为: 95 °C 预变性 20 s, 然后按 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火延伸 30 s 进行 40 个循环, 最后于 40 °C 结束反应。

115 二重实时荧光 PCR 的敏感性试验与标准曲线的建立 将质粒 pMD2WSSV 和 pMD2HHNV 混合并 10 倍系统稀释成 1 @10¹ ~ 1 @10⁷ 拷贝/μL 的标准品, 进行二重荧光定量 PCR, 重复试验 6 次, 并与本实验室已建立的普通 PCR^[3] 及单重单检的荧光定量 PCR 进行比较。PCR 结束后, 取 PCR 反应液用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定产物。

116 二重实时荧光 PCR 的特异性试验 加入对虾 WSSV 的基因组 DNA 作模板, 同时加入针对 WSSV 和 HHNV 的引物、探针进行实时荧光 PCR 检测, 对仪器中的每个检测孔同时收集 FAM 和 ROX 两种荧光信号, 确定该方法的引物与探针在 WSSV 和 HHNV 之间的特异性。用同样的方法进行 HHNV 的二重单检特异性试验。利用本研究建立的二重荧光定量检测方法, 对实验室保存的其他对虾病毒如链球菌、TSV 和溶血弧菌进行检测, 进一步确定对虾 WSSV 和 HHNV 二重实时荧光 PCR 方法的特异性。

117 重复性试验 用 1 @10⁶ 拷贝/μL 的 WSSV 和 HHNV 混合的阳性样品, 分 3 个标本同时检测。通过计算 Ct 值的标准差 (S) 和变异系数 (CV) 来验证荧光定量 PCR 的批内重复性。3 d 后重复检测保存于 -20 °C 的模板 DNA, 来验证模板的稳定性及荧光定量 PCR 的批间重复性。

118 二重实时荧光 PCR 的干扰性试验 将对虾 WSSV 和 HHNV 标准样品按不同的浓度进行组合 (10³ 和 10⁸, 10⁸ 和 10³, 10⁹ 和 10⁸, 10⁸ 和 10¹), 分别进行二重实时荧光 PCR 和单重实时荧光 PCR 检测, 确定浓度相差较大时 WSSV 和 HHNV 之间的检测是否存在相互干扰现象。

119 二重实时荧光 PCR 检测临床病料 利用建立的对虾 WSSV 和 HHNV 二重实时荧光 PCR 方法, 检测实验室保存的各 15 份的 WSSV 和 HHNV 病料 (经常规 PCR 检测为单独 WSSV 或 HHNV 阳性) 的 DNA, 检测经常规 PCR 检测为单一感染的病料是否存在混合感染, 评价其临床实用性。

2 结 果

2.1 pMD2HHNV 质粒 DNA 浓度的测定

提取的质粒 DNA 经核酸蛋白仪测定, pMD2WSSV 质量浓度为 301.36 μg/mL, 可换算为 117 @ 10¹⁰ 拷贝/μL; pMD2HHNV 质量浓度为 491.5 μg/mL, 可换算为 3 @ 10¹⁰ 拷贝/μL。

2.2 引物、探针浓度

不同的引物和探针终浓度配比试验结果显示, 不同的引物和探针终浓度对试验结果影响比较大, WSSV 上、下游引物及探针终浓度分别为 0.16 μmol/L, HHNV 上、下游引物及探针终浓度分别为 0.14 μmol/L, 对质粒标准品的检测可获得较小的 Ct 值, 但获得的曲线并不表现典型的 S 形^[6]。在 20 μL 的反应体系中添加 2.5 mmol/L MgCl₂ 0.125 μL,

215mmol/L dNTP 015LL, 5U /LL Taq 聚合酶 01125LL, 可使检测获得较高的扩增效率, 实时扩增曲线光滑, 呈典型的 S 状。

213 二重实时荧光 PCR 的标准曲线及灵敏度

以 10 倍系列稀释的 WSSV 和 HHNV 质粒混合液 ($1 @ 10^7$) $1 @ 10^0$ 拷贝 /LL) 为模板进行扩增, 扩增效率分别为 961.2% 和 971.7%, 标准误差分别为 010254 和 010879。荧光定量 PCR 的敏感性结果 (图 1、图 2 和表 1)。从图中的荧光曲线可见, 对 WSSV 的检测 $1 @ 10^0$ 拷贝 /LL 仍有荧光曲线, 对 HHNV 的检测 $1 @ 10^1$ 拷贝 /LL 仍有荧光曲线, 表明该检测方法对 WSSV 的灵敏度为 2 拷贝, 对 HHNV 的灵敏度为 20 拷贝, 比常规 PCR 敏感性高 100 倍, 重复检测的结果一致。图中低浓度检测时, 其荧光曲线梯度间隔并不明显, 但其 Ct 值与具有良好梯度间隔的单重单检的 WSSV 或 HHNV 荧光定量 PCR Ct 值的变异系数并不大, 都在 3% 以内。

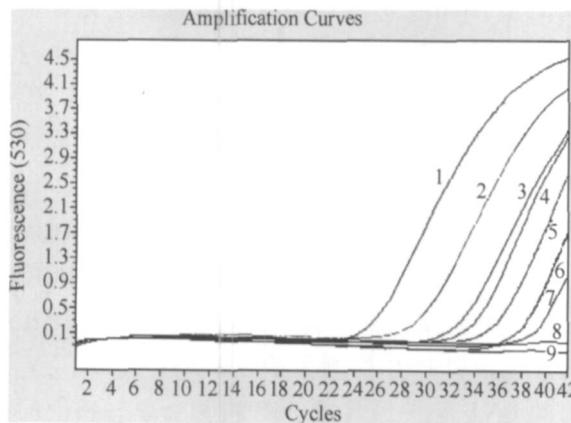


图 1 HHNV 的敏感性试验

Fig 1 Sensitivity of the multiplex real-time PCR for HHNV
 $11 10^7$ 拷贝 /LL; $21 10^6$ 拷贝 /LL; $31 10^5$ 拷贝 /LL; $41 10^4$ 拷贝 /LL;
 $51 10^3$ 拷贝 /LL; $61 10^2$ 拷贝 /LL; $71 10^1$ 拷贝 /LL; $81 10^0$ 拷贝 /LL;
 $11 10^7$ copies /LL; $21 10^6$ copies /LL; $31 10^5$ copies /LL; $41 10^4$ copies /LL;
 $51 10^3$ copies /LL; $61 10^2$ copies /LL; $71 10^1$ copies /LL; $81 10^0$ copies /LL;
91 Negative control

214 二重实时荧光 PCR 的特异性

在反应体系中, 只加入 WSSV 或 HHNV 的 DNA 作为模板, 同时加入针对 WSSV 和 HHNV 的引物、探针进行实时荧光 PCR 检测, 结果只得到相应病毒的特异性荧光曲线, 证实所设计的引物探针具有特异性。通过对感染对虾的其他病毒如链球菌、TSV 和溶血弧菌的检测 (图 3 和图 4), 结果证

实, 该方法特异性强, 与其他检测对象无交叉反应。

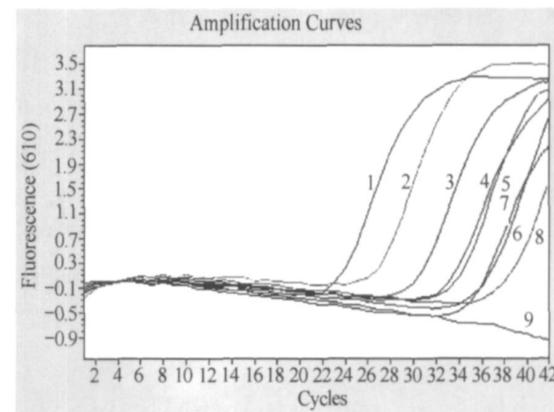


图 2 WSSV 的敏感性试验

Fig 2 Sensitivity of the multiplex real-time PCR for WSSV
 $11 10^7$ 拷贝 /LL; $21 10^6$ 拷贝 /LL; $31 10^5$ 拷贝 /LL; $41 10^4$ 拷贝 /LL; $51 10^3$ 拷贝 /LL;
 $61 10^2$ 拷贝 /LL; $71 10^1$ 拷贝 /LL; $81 10^0$ 拷贝 /LL;
91 空白对照
 $11 10^7$ copies /LL; $21 10^6$ copies /LL; $31 10^5$ copies /LL; $41 10^4$ copies /LL;
 $51 10^3$ copies /LL; $61 10^2$ copies /LL; $71 10^1$ copies /LL; $81 10^0$ copies /LL;
91 negative control

表 1 WSSV 和 HHNV 不同浓度的 Ct 值

Tabl 1 The Ct value of different concentration of WSSV and HHNV

样品	浓度 Concentration (copies /LL)							
	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
WSSV	221.04	251.66	281.91	311.60	321.27	331.82	351.69	361.74
HHNV	241.61	281.54	311.60	321.88	331.98	351.34	361.45	> 42

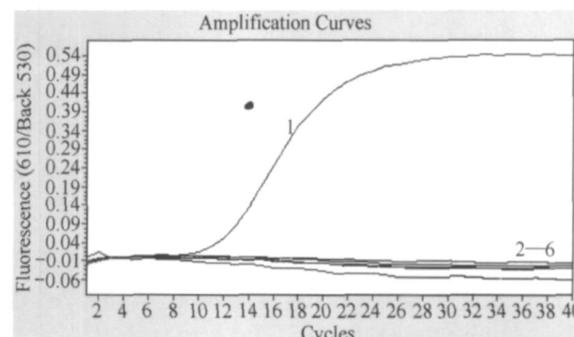


图 3 WSSV 的特异性试验

Fig 3 The specificity of WSSV
11WSSV; 21 HHNV; 31 TSV; 41 链球菌; 51 弧菌; 61 阴性
11WSSV; 21 HHNV; 31 TSV; 41 Strep toccoccus; 51 Vibri; 61 Negative

215 重复性试验

用 $1 @ 10^6$ 拷贝 /LL 的 WSSV 和 HHNV 混合的阳性样品, 分为 3 个标本同时检测, Ct 值的标准差 (S) 分别为 01189 和 01323, 变异系数 (CV) 分别为 0170% 和 1110%, 3d 后重复检测保存于 -20℃ 的模

板 DNA(表 2)。结果说明此方法具有良好的准确性和重复性。

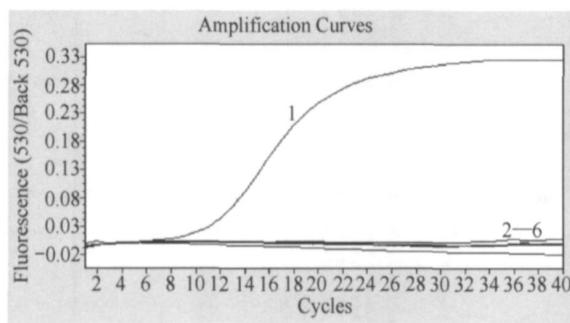


图 4 HHNV 的特异性试验

Fig 4 The specificity of HHNV

11 HHNV; 21W SSV; 31TSV; 41 链球菌; 51 弧菌; 61 阴性
11 HHNV; 21W SSV; 31 TSV; 41 Streptococcus 51Vibriq 6 Negative

表 3 不同浓度的 WSSV 与 HHNV 的定量 PCR 的 Ct 值

Tabl 3 The Ct value of real time PCR for different concentrations of WSSV and HHNV

	WSSV 和 HHNV 不同浓度组合			
	Different concentrations of WSSV and HHNV (copies/LL)	10^3 and 10^8	10^8 and 10^3	10^0 and 10^8
WSSV 单重荧光 PCR Ct 值 The Ct value of WSSV real time PCR	331.19	181.69	351.74	191.59
多重荧光 PCR Ct 值 The Ct value of multiplex real time PCR	331.89	191.46	361.68	191.36
CV (%)	11.04	21.02	21.04	01.59

217 二重实时荧光 PCR 检测临床病料

对各 15 份经普通 PCR 检测为单一 WSSV 阳性或单一 HHNV 阳性的病料进行荧光定量 PCR。结果 15 份经普通 PCR 检测为单一 WSSV 阳性的病料检测的拷贝数在 $3134 @ 10^3$ ~ $1182 @ 10^7$ 拷贝 /LL 之间, 未见有 WSSV 和 HHNV 混合感染, 15 份经普通 PCR 检测为单一 HHNV 阳性的病料检测的拷贝数在 $5149 @ 10^4$ ~ $1116 @ 10^7$ 拷贝 /LL 之间, 其中一份为 HHNV 和 WSSV 混合感染, 拷贝数分别为 $6178 @ 10^6$ 和 $3134 @ 10^3$ 拷贝 /LL。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出, 它是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时检测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术不仅实现了对 DNA 模板的定量, 而且具有灵敏度高、特异性强、准确可靠、能实现多重反应、自动化程度高、无污染、实时性好等特点。

表 2 Realtime PCR 的批间重复性

Tabl 2 The Realtime PCR results of 3 repetitive detections

样品 Sample	时间 Time (d) Time (d)	同一模板不同检测时间的 Ct The Ct value of the same sample in different time				
		1	4	7	S	CV
WSSV		251.34	261.84	261.23	01.53	21.03%
HHNV		271.62	271.11	281.54	01.07	21.13%

216 二重实时荧光 PCR 的干扰性试验

将 WSSV 或 HHNV 的标准品按不同的浓度进行组合, 发现当一个模板浓度较高而另一个模板浓度较低时, 所建立的方法依然可以同时检测到 WSSV 或 HHNV, 并且与 WSSV 单重荧光定量 PCR 比较, 检测的 Ct 值的变异并不大(表 3), 对 HHNV 的检测结果类似。

点^[7]。在实验室检测中, 当样品量非常大时, 单重荧光 PCR 在成本和时间方面就存在一定的劣势, 迫切需要一种高通量、低成本、高效率的方法来进行批量的快速检测。采用多对引物扩增检测多个模板的多重荧光 PCR, 克服了单重荧光 PCR 的不足。但是建立一个多重荧光 PCR 方法比单重的要复杂得多: 第一, 对引物的要求更高。需要保证各个引物之间没有干扰, 有相近的退火温度, 不会产生非特异性扩增。第二, 对试剂的要求更高。由于多重荧光 PCR 多对引物对试剂的竞争, 进行多重荧光 PCR 时, 试剂反应浓度的合适范围更窄, 需要对试剂浓度的配比进行更仔细的探索。第三, 需要保证不同探针所标记的荧光基团间无相互干扰, 使用的荧光 PCR 仪有相应的多个检测通道^[8]。

本研究通过进行 WSSV 和 HHNV 的二重实时荧光 PCR 检测, 筛选出了 WSSV 和 HHNV 的最佳引物和探针的浓度组合, 但获得的曲线并不表现典型的 S 状, 通过在反应体系中添加 MgCl₂, dNTP 和 Taq 聚合酶适量, 可使检测获得较高的扩增效率, 实

时扩增曲线光滑呈典型的 S 状, 说明 MgCl₂ dNTP 和 Taq 聚合酶的浓度对扩增效率的影响非常重要。

本研究采用具有多个激光通道的 LightCycler210 荧光 PCR 仪, 在同一反应管内, 由两对 PCR 特异性引物对 WSSV 和 HHNV 进行扩增检测反应, 同时收集代表 WSSV 和 HHNV 的荧光信号, 从而建立了能够同时检测 WSSV 和 HHNV 的多重实时荧光 PCR 方法, 实现了一管二检的目的, 并且 PCR 反应只需要约 30 min 的时间, 大大提高了检测速度。另外, 根据特异性荧光曲线的峰值, 可以估算样品中相应病毒的含量。

低浓度检测时, 所建立的二重实时荧光 PCR 的荧光曲线梯度间隔并不明显, 本试验对试剂及引物浓度进行优化也未能消除这个现象, 推测其可能原因是由于两个模板对试剂的竞争而相互影响造成的。但所建立的二重实时荧光 PCR 的 Ct 值, 与具有良好梯度间隔的单重单检的 WSSV 或 HHNV 荧光定量 PCR Ct 值的变异系数并不大(3% 以内), 因此并不影响对 WSSV 和 HHNV 的检测。

WSSV 和 HHNV 在临幊上经常出现混合感染^[3], 两种病毒的含量可能会相差较大。因此, 本研究将 WSSV 和 HHNV 的模板浓度进行调整、组合, 从而探讨高浓度模板对低浓度模板是否存在干扰现象。结果发现, 一个模板浓度较高而另一个模板浓度较低时, 所建立的方法依然可以同时检测到 WSSV 或 HHNV, 并且与单重的荧光定量 PCR 比较, Ct 值的变异系数并不大, 表明高浓度的模板对低浓度模板的扩增检测干扰不明显。在对虾的 30 份临幊样品的检测中, 有一份为 WSSV 和 HHNV 的混合感染, 而常规 PCR 并未能检出, 说明二重实时荧光 PCR 能检测以潜伏感染的形式存在、病毒量很低的病毒, 因此二重实时荧光 PCR 方法的建立, 对于 WSSV 和 HHNV 的有效防治和培育出具有自主知识产权的 SPF 亲虾群具有很高的实用价值。

参考文献:

- [1] Lei Z W, Huang J K, ou Y T, et al. Review on research of molecular epidemiology of white spot syndrome (WSS) in prawn [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(3): 260~264 [雷质文, 黄健, 寇运同, 等. 对虾白斑综合症 (WSS) 的分子流行病学研究进展. 中国水产科学, 2002, 9(3): 260~264]
- [2] Bell T A, Lightner D V. HHNV virus. Infectivity and pathogenicity studies in Penaeus stylostris and Penaeus vannamei [J]. Aquaculture, 1984, 38: 185~194
- [3] Xie Z X, Pang Y S, Liu J B, et al. Studies on development of two temperature multiplex PCR for WSSV and HHNV [J]. Marine Science, 2005, 29(12): 9~12 [谢芝勋, 庞耀珊, 刘加波, 等. 二温式多重 PCR 检测鉴别对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 和传染性皮下及造血器官坏死病毒 (HHNV) 的研究与应用. 海洋科学, 2005, 29(12): 9~12]
- [4] Pang Y S, Xie Z X, Xie Z Q, et al. Development and application of two-temperature PCR for the detection of white spot syndrome virus in penaeid shrimp [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2003, 4(43): 45~49 [庞耀珊, 谢芝勋, 谢志勤, 等. 二温式 PCR 检测对虾白斑综合症病毒. 中国兽医杂志, 2003, 4(43): 45]
- [5] Pang Y S, Xie Z X, He JM. Two-temperature reverse transcription polymerase chain reaction (RT2PCR) for the detection of taura syndrome virus in Penaeus vannamei [J]. Marine Sciences, 2004, 2(54): 57 [庞耀珊, 谢芝勋, 何竟铭, 等. 二温式 RT2PCR 检测对虾 Taura 综合征病毒的研究. 海洋科学, 2004, 2(54): 57]
- [6] Paladino S, Kay I D, Flexman JP, et al. Rapid detection of vanA and vanB genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2483~2486
- [7] Zhang H, Li B, Zhou X, et al. Progress and application of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(Suppl): 5~12 [张贺, 李波, 周虚, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及应用. 动物医学进展, 2006, 27(增刊): 5~12]
- [8] Tichopad A, Diger M, Schwarz G, et al. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction setup [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(20): 122~122

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX REALTIME PCR ASSAY FOR DETECTION OF WSSV AND HHNV

XIE Zhixun¹, XIE LiJi¹, PANG YaoShan¹, LU ZhaoFa², XIE Zhiquin¹, SUN JianHua¹,
DENG XianWen¹, LIU JiaBo¹ and TANG XiaoFei¹

(1)Guangxi Veterinary Research Institute Nanning 530001; 2)Guangxi Bureau of Fishery and Animal Husbandry, Nanning 530022)

Abstract White spot syndrome virus (WSSV) and Infectious hypodermal and haematozoic necrosis virus (HHNV) are responsible for significant economic loss in the shrimp industry. In order to simultaneously and massively identify WSSV and HHNV, two pairs of primers and two TaqMan probes were designed and synthesized according to the conserved gene sequences of WSSV (AF369029) and HHNV (AF218226) in GenBank. The reaction parameters such as the concentration of two pair of primers, two TaqMan probes and the reaction buffer were optimized to develop a multiplex realtime PCR assay for the rapid detection of WSSV and HHNV. The multiplex realtime PCR assay was found to be specific and be able to detect and differentiate WSSV and HHNV, and no positive results were observed when nucleic acid from Vibrio Taura Syndrome Virus and Strophococcus were used as multiplex realtime PCR templates. The developed multiplex realtime PCR assay was compared with that of routine PCR. The sensitivity of multiplex realtime PCR assay was 2 and 20 template copies for WSSV and HHNV respectively and its sensitivity was 10³ and 10² times higher than that of the routine PCR. The samples were examined using the multiplex realtime PCR repeatedly and the results indicated that the multiplex realtime PCR was reproducible. Different concentrations of WSSV and HHNV could be identified when mixed together which implied the assay could be applied to clinical confirmation for simultaneous infection of WSSV and HHNV. The multiplex realtime PCR results of 30 routine PCR positive samples showed that one specific amplified curve was displayed when shrimp was infected by only one of these two viral pathogens whereas two specific amplified curves were displayed when shrimp was infected by two viral pathogens. The result indicated that multiplex realtime PCR was able to detect and differentiate the presence of each pathogen in infected clinical shrimp. This multiplex realtime PCR assay is a quick, sensitive, specific and quantitative tool for detection of WSSV and HHNV, and it will be useful for the control of WSS and HHN in shrimp.

Key words WSSV; HHNV; Multiplex realtime PCR