

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00984

## 荧光定量 PCR 与 LAMP 检测 IHNV 的特异性和灵敏性比较

赵 哲<sup>1</sup> 任春华<sup>1</sup> 江 晓<sup>1</sup> 张吕平<sup>1</sup> 冯 娟<sup>2</sup> 胡超群<sup>1</sup>

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广州 510301;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

**摘要:** 传染性皮下及造血器官坏死病毒(IHNV)是世界各地养殖对虾的重要病毒性病原之一, 给对虾养殖业造成严重经济损失。研究建立了检测 IHNV 的荧光定量 PCR 和环介导等温核酸扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)两种技术, 并对它们的特异性和灵敏性进行了比较。结果显示, 所建立的荧光定量 PCR 检测 IHNV 的方法最低检测限度为 6 个 DNA 拷贝/反应, 在待扩增 DNA 浓度为  $6.038 \times 10^4$ — $6.038 \times 10^9$  cps/mL 范围时, 模板浓度与循环阈值  $C_t$  之间的相关性良好, 决定系数  $r^2$  为 0.99521; 对 5 份白斑综合症病毒基因组 DNA 和 10 份健康对虾基因组 DNA 样品进行荧光定量 PCR 检测, 结果都为阴性; 这说明荧光定量 PCR 检测 IHNV 方法具有灵敏度高、特异性高和精确性高等优点。同样, 所建立的 LAMP 检测 IHNV 的方法在 60min 反应时间内也可检测到最低为 6 个拷贝的 DNA 模板, 反应产物加入荧光染料 SYBR Green I 后反应液呈现明显的亮绿色, 且特异的检测 IHNV DNA 模板, 这说明所建立的 LAMP 检测 IHNV 的方法具有荧光定量 PCR 方法相当的灵敏度、特异性和精确性。考虑到 LAMP 检测方法操作更为简单、方便, 而且不需要昂贵的仪器, LAMP 检测 IHNV 的方法更适合于对虾养殖现场检测的推广使用。

**关键词:** 荧光定量 PCR; LAMP; IHNV; 特异性; 灵敏度

中图分类号: Q-31 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)05-0984-06

传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)是世界各地养殖和野生对虾的重要病毒性病原之一<sup>[1]</sup>。该病毒的感染宿主范围广, 危害非常严重, 对细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)有较高致病性, 造成其幼体和仔虾高达 90%的死亡率; 而感染凡纳滨对虾(*L. vannamei*)可导致慢性矮小残缺综合症(Runt-deformity syndrome, RDS), 使养殖对虾规格参差不齐, 产量下降, 造成 10%—50%的经济损失<sup>[2, 3]</sup>。因此, 国际兽疫局(OIE)将 IHNV 引起的疾病列为必须报告的重要水生动物病毒性疫病之一。Yang, et al.通过原位杂交方法显示 IHNV 普遍存在于我国的很多养殖对虾中<sup>[4]</sup>。但是目前对 IHNV 引起的对虾病害尚无有效的治疗方法, 只能预防, 避免与病

毒病原体的接触是最有效的预防措施, 而这又主要依赖于早期的快速诊断<sup>[5]</sup>。因此, 建立 IHNV 快速、有效、准确的检测和诊断技术是预防此类疫病的重要技术手段之一。

近年来各种基于免疫学的方法或基于 PCR 的方法已被用于 IHNV 的诊断检测<sup>[6, 7]</sup>。由于各种基于 PCR 的检测方法具有较高的敏感性和较好的特异性, 应用最为广泛。荧光定量 PCR(Real-time PCR)和环介导等温核酸扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术都是在传统 PCR 技术基础上发展起来的两种新型体外核酸扩增方法, 是目前国际上公认的灵敏度较高和特异较好的分子检测方法, 已应用到对虾 IHNV 的检测<sup>[8-10]</sup>。然而, 目前还未见到对于这两种新型检测技术在特异性和灵敏度方

收稿日期: 2010-03-10; 修订日期: 2010-06-29

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200803012); 国家虾现代产业技术体系; 农业部海水养殖生态与质量控制重点开放实验室课题(2008B1208)(nycyx-46)资助

作者简介: 赵哲(1980—), 男, 安徽亳州人; 博士; 主要从事海洋生物病害研究。E-mail: zhaozhe@scsio.ac.cn

通讯作者: 胡超群, 研究员; E-mail: cqhu@scsio.ac.cn

面进行比较的相关报道。因此,我们在建立荧光定量 PCR 和 LAMP 检测 IHNV 方法的同时,对它们的特异性和灵敏度进行了比较。

1 材料与方法

1.1 对虾病样的采集

IHNV 和白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)感染样本分别取自广东省湛江东海岛和电白等地的对虾养殖场,干冰运输到实验室后-80 保存备用;样本表现出典型的病毒感染病症,且经 PCR 检测证实有病毒携带。健康对虾对照购买于广州某菜市场,经 PCR 检测证实无病毒携带。

1.2 基因组总 DNA 提取

取 IHNV 感染对虾、WSSV 感染对虾和健康对虾的肌肉组织 30 mg 于灭菌碾磨中捣碎,使用 Fermentas 公司的基因组 DNA 提取试剂盒(Genomic DNA Purification Kit)提取基因组总 DNA。操作步骤按照试剂盒提供的 Protocol 进行,最后用 50 μL 灭菌去离子水溶解,-20℃保存备用。

1.3 重组质粒的构建、制备和定量

参照 GenBank 中已知 IHNV 的基因组序列,用 Primer Premier 5 软件设计一对特异引物 NS2-F/NS2-R(表 1),利用 PCR 从上述提取的 IHNV 感染阳性基因组 DNA 中扩增一个大小为 1140 bp 的片段 NS2,此片段包含了荧光定量 PCR 和 LAMP 两种检测方法的靶序列。PCR 反应程序为 94 预变性 5min,然后 94 变性 30s,55 退火 40s,72 延伸 45s 扩增 30 个循环,最后 72 延伸 10min。用 DNA 回收试剂盒纯化得到目的片段,将其克隆到 pMD18-T 载体(Takara 公司)中,构建重组质粒 pMD18-NS2;转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,于氨苄抗性平板上挑

取克隆,菌落 PCR 检测含有目的片段的重组子,并通过测序验证。

将测序正确的重组子放大培养,用 Omega 公司的质粒提取试剂盒制备重组质粒 pMD18-NS2。然后用 Invitrogen 公司的 Qubit™ 定量荧光计和 Quant-iT dsDNA HS 定量试剂盒对 pMD18-NS2 质粒进行定量,其浓度为 25 μg/mL。根据公式:质粒拷贝数=[质粒浓度(μg/mL)×10<sup>-6</sup>/(324.5×2×质粒长度)]×6.023×10<sup>23</sup>,计算出 pMD18-NS2 质粒拷贝数大约为:6.038×10<sup>12</sup> cps/mL。

1.4 荧光定量 PCR 检测 IHNV 方法的建立

根据 GenBank 中已知 IHNV 基因组序列,用 ABI Primer Express 2 引物设计软件,设计一对引物和一个 MGB 探针(表 1),扩增目的片段长度共 72 bp。引物和探针由上海基康生物工程有限公司合成。根据 TaqMan® Universal PCR Master Mix 试剂盒说明书对上、下游引物 Realtime-F/Realtime-R 和 MGB 探针浓度进行优化,首先在反应体系中探针浓度和其他条件不变情况下,将上、下游引物以终浓度 100、200、400 和 800 nmol/L 进行矩阵组合,进行荧光定量 PCR,观察最佳扩增效果以选择最佳引物浓度;然后在反应体系中引物浓度和其他条件不变情况下,将 MGB 探针终浓度稀释为 50、100、150、200 和 250 nmol/L MGB 进行荧光定量 PCR,观察最佳扩增效果以选择最佳 MGB 探针浓度。反应体系体积为 20 μL,依次加入 10 μL 2×TaqMan® Universal PCR Master Mix,1 μL pMD18-NS2 质粒(2.5 ng/μL)作为模板和适当体积的引物、MGB 探针,剩余体积补加灭菌去离子水。反应程序为:50 ,2min;94 ,10min;然后 94 15s,60 1min 扩增 40 个循环;其中在 60 复性和延伸 1min 时收集荧光信

表 1 本研究所用引物序列及作用  
Tab. 1 Primers used in the study

| 引物名称<br>Primers | 序列 (5'-3')<br>Sequences                      | 用途<br>Usage |
|-----------------|----------------------------------------------|-------------|
| NS2-F           | CTCGAGGCAACGAGTGTTTATAGAC                    | 质粒构建        |
| NS2-R           | GGATCCGTCCGTATACTGCGTCTT                     |             |
| Realtime-F      | CTCCGGACACCAACCAATA                          | 荧光定量<br>PCR |
| Realtime-R      | GCAGCAAAGGTAAC TCCCAAT                       |             |
| MGB-probe       | FAM-GACATAGAGCTACAATP-MGB                    | LAMP        |
| LAMP-FIP        | GCTCTCTCTCCATCGGTAGGTTTTTCGACGACATCAGGAAAGCG |             |
| LAMP-BIP        | TGTAGTAGCGGAACACAACCCGTTTTGTCCATTTCGTCCGGTCC |             |
| LAMP-F3         | ACCACAAAAGAGACAGGCG                          |             |
| LAMP-B3         | CACTCTCTTCCAGTCGCCT                          |             |

号,反应结束后由计算机根据反应过程中产生的荧光信号进行数据处理。绘制标准曲线时,将质粒 pMD18-NS2 作标准品,10 倍系列稀释进行荧光定量 PCR。荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司的 StepOne Plus。

### 1.5 LAMP 技术检测 IHNV 方法的建立

根据 GenBank 中已知 IHNV 基因组序列,用 PrimerExplorer V4 软件设计 4 条 LAMP 引物(表 1)。检测 IHNV 的 LAMP 反应体系为: 10×Thermopol 反应缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L 的 dNTP 1.0  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  的 LAMP-FIP 和 LAMP-BIP 各 2.0  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  的 LAMP-F3 和 LAMP-B3 各 0.5  $\mu\text{L}$ , 2 mol/L 的甜菜碱 12.5  $\mu\text{L}$ , 8 U/ $\mu\text{L}$  的 *Bst* DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ , DNA 检测样品 1  $\mu\text{L}$ , 剩余体积补加灭菌去离子水至总体积 25  $\mu\text{L}$ 。将恒温金属浴调至 64 后,把上述反应液置于其中反应 60min; 反应结束后,琼脂糖凝胶电泳分析 LAMP 反应产物,或加入 1  $\mu\text{L}$  SYBR Green I 荧光染料轻轻振荡,直接观察反应液的颜色变化判断结果。

### 1.6 荧光定量 PCR 与 LAMP 检测 IHNV 的特异性比较分析

将提取的 IHNV<sup>+</sup>和 WSSV<sup>+</sup>基因组 DNA 以及健康对虾基因组 DNA 分别作为扩增模板,按照所建立的荧光定量 PCR 与 LAMP 检测方法,进行特异性比对实验。

### 1.7 荧光定量 PCR 与 LAMP 检测 IHNV 的灵敏度比较分析

将 pMD18-NS2 质粒进行梯度稀释作为扩增模板,待扩增质粒拷贝数分别为:  $6.038 \times 10^7$ 、 $6.038 \times 10^6$ 、 $6.038 \times 10^5$ 、 $6.038 \times 10^4$ 、 $6.038 \times 10^3$ 、 $6.038 \times 10^2$ 、 $6.038 \times 10^1$  cps/mL; 阴性对照为灭菌去离子水。按照所建立的荧光定量 PCR 与 LAMP 检测方法进行灵敏度比对实验。

## 2 结果

### 2.1 荧光定量 PCR 检测 IHNV 的方法

在优化上、下游引物浓度时,以产生最大荧光域值 $\Delta Rn$ 的最小引物浓度为最佳;而在优化探针浓度时,以产生最小循环数( $C_t$ 值)的最小探针浓度为最佳。优化后上、下游引物浓度分别为 400 nmol/L 和 800 nmol/L,探针浓度为 100 nmol/L。因此最佳的 20  $\mu\text{L}$  反应体系体积组合为: 10  $\mu\text{L}$  2×TaqMan<sup>®</sup>

Universal PCR Master Mix, 400 nmol/L 的上游引物、800 nmol/L 的下游引物和 100 nmol/L 的 MGB 探针,1  $\mu\text{L}$  的扩增模板,剩余体积补加灭菌去离子水。以 10 倍系列稀释的标准质粒( $6.038 \times 10^4$ — $6.038 \times 10^9$  cps/mL)为模板进行扩增的标准曲线(图 1),模板浓度与可检测到荧光信号的循环数呈负相关,其决定系数  $r^2$  为 0.99521,扩增的效率  $E$  为 1.02。

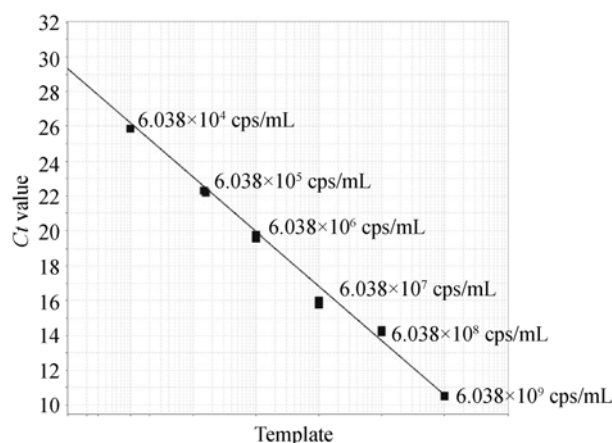


图 1 标准曲线

Fig. 1 Standard curve

模板浓度为  $6.038 \times 10^4$ — $6.038 \times 10^9$  cps/mL, 每个模板梯度做了 2 次重复实验,结果反应了模板浓度与循环阈值的相关性  
Template concentration is from  $6.038 \times 10^4$  to  $6.038 \times 10^9$  cps/mL, and each concentration was repeated two times in one experiment. The result reveals correlation between the template concentration and  $C_t$  value

### 2.2 LAMP 检测 IHNV 的方法

LAMP 反应产物经凝胶电泳分析结果(图 2A): 以阳性对照 pMD18-NS2 质粒和 IHNV 阳性 DNA 为模板的反应产物在凝胶中呈典型的梯状扩增条带,而以无菌去离子水为模板的反应产物无明显的扩展条带。另外,进行了内、外引物缺失条件下 LAMP 扩增,结果显示缺失任何一条外引物都不能生成 LAMP 的梯状扩增条带(图 2A),说明了每条外引物的必要性。向反应液中直接加入荧光染料后,根据颜色变化即可用肉眼判断结果(图 2B),LAMP 反应阳性(有梯状扩增条带)的反应液呈现明显的亮绿色,而反应阴性(无梯状扩增条带)的反应液则为橙黄色。

### 2.3 荧光定量 PCR 与 LAMP 检测 IHNV 的特异性比较

为了比较荧光定量 PCR 与 LAMP 方法检测 IHNV 特异性,我们选择了 3 个 IHNV 基因组 DNA, 5 个 WSSV 基因组 DNA 和 10 个健康对虾基

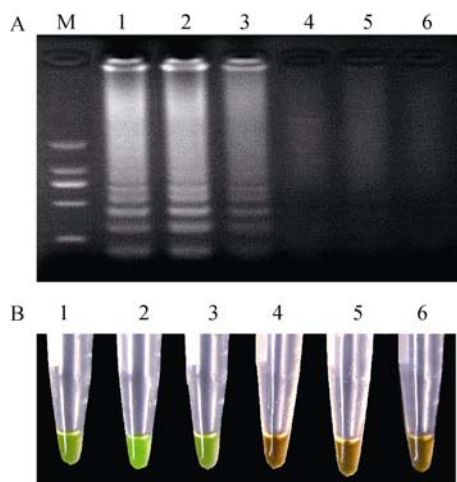


图2 LAMP 检测 IHNV 的反应产物经凝胶电泳(A)和荧光染料显色(B)分析结果

Fig. 2 Results of LAMP amplified product using electrophoretic analysis and visual inspection by addition of SYBR Green I

1. pMD18-NS2 质粒为模板; 2—3. IHNV 阳性 DNA 为模板; 4. 缺少 FIP 引物下 pMD18-NS2 质粒为模板; 5. 缺少 BIP 引物下 pMD18-NS2 质粒为模板; 6. 阴性对照; M. 标准分子量 DL2000  
1. pMD18-NS2 plasmid; 2—3. IHNV DNA; 4. pMD18-NS2 plasmid in the absence of FIP; 5. pMD18-NS2 plasmid in the absence of BIP; 6. Negative control; M. DNA Marker DL2000

基因组 DNA 作为两种方法的扩增模板。结果显示, IHNV 基因组 DNA 用荧光定量 PCR 与 LAMP 两种方法扩增均为阳性, 而 WSSV 基因组 DNA 和健康对虾基因组 DNA 用两种方法检测均为阴性反应。该结果表明荧光定量 PCR 与 LAMP 两种方法都能特异检测 IHNV。

#### 2.4 荧光定量 PCR 与 LAMP 检测 IHNV 的灵敏度比较

为了比较荧光定量 PCR 与 LAMP 方法检测 IHNV 灵敏度, 我们将 pMD18-NS2 质粒以 10 倍梯度进行系列稀释, 从  $6.038 \times 10^1$ — $6.038 \times 10^7$  cps/mL 区间取每一数量级的稀释液 1  $\mu$ L 作为两种方法的扩增模板。结果显示: 荧光定量 PCR 能检测到的最低稀释度为  $6.038 \times 10^3$  cps/mL (大约相当于检测最低限度为每个反应 6 个 DNA 拷贝量), 在 28 循环处可见到明显的扩增曲线(图 3A); 同样, 使用 LAMP 方法能检测到的最低稀释度也为  $6.038 \times 10^3$  cps/mL, 反应液加入荧光染料后可见明显的颜色反应(图 3B)。这说明我们建立的荧光定量 PCR 与 LAMP 两种检测 IHNV 方法具有相同的灵敏度, 每个反应都可最低检测到 6 个拷贝数 DNA。

### 3 讨论

对虾病害是全球对虾养殖业面临的首要问题, 其中由病毒引起的疾病是制约该产业长期可持续发展的一个重要因素。随着我国凡纳滨对虾养殖业的迅速发展, IHNV 的危害也日见明显, 建立灵敏和准确 IHNV 检测技术已迫在眉睫<sup>[11]</sup>。

荧光定量 PCR 是目前灵敏度较高、特异性较好、重现性稳定的核酸分子定性、定量检测标准方法之一, 克服了传统 PCR 技术的假阳性及不能定量等缺点, 在病原体测定和基因表达研究等方面有着广泛的应用前景。本研究建立了 TaqMan-MGB 探针荧光定量 PCR 检测 IHNV 的方法, 检测最低限度为每个反应大约 6 个 DNA 拷贝量, 测定结果准确可靠、灵敏。但为了适应对虾养殖现场检测的使用、推广, 不仅要求检测方法具有高灵敏性和准确性, 而且快速、简单、成本低等特点也是必不可少。显然, 荧光定量 PCR 技术并不适合对虾养殖现场检测的推广使用, 因为该技术需要投入昂贵的仪器, 结果分析也相当复杂。

LAMP 是由日本学者 Notomi, *et al.* 在 PCR 基础上发明的一种新型核酸扩增技术<sup>[12]</sup>。与 PCR 技术相比, 该技术针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异引物, 增强了反应的特异性; 不需要模板的热变性、长时间温度循环, 利用一种链置换 DNA 聚合酶(*Bst* DNA polymerase)在等温条件下就能完成反应, 缩短了检测时间; 扩增产物呈特征性梯状条带, 加入荧光染料, 观察反应液的颜色变化, 直接用肉眼判读结果, 不需要繁琐的电泳和紫外观察等过程, 操作简单、方便; 特别是它不需使用昂贵的热循环仪, 凝胶电泳和紫外检测等设备, 成本较低; 适合于病原微生物的现场快速检测、战时野外及基层普及应用。本研究也建立了 LAMP 技术检测 IHNV 的方法, 通过 60min 的等温反应即可检测到大约 6 个 DNA 拷贝量, 灵敏度与建立的 TaqMan-MGB 探针荧光定量 PCR 检测 IHNV 的方法相当, 而且特异性也较高。值得指出的是, LAMP 技术对反应模板的质量要求不高。我们将感染 IHNV 的对虾组织经简单匀浆后直接裂解制备的上清液作为模板, 使用 LAMP 方法也能灵敏地检测到(此结果本文未显示)。根据以上分析, 我们将荧光定量 PCR 与 LAMP 两种方法检测 IHNV 的各自特点做一归纳(表 2), 通过对比

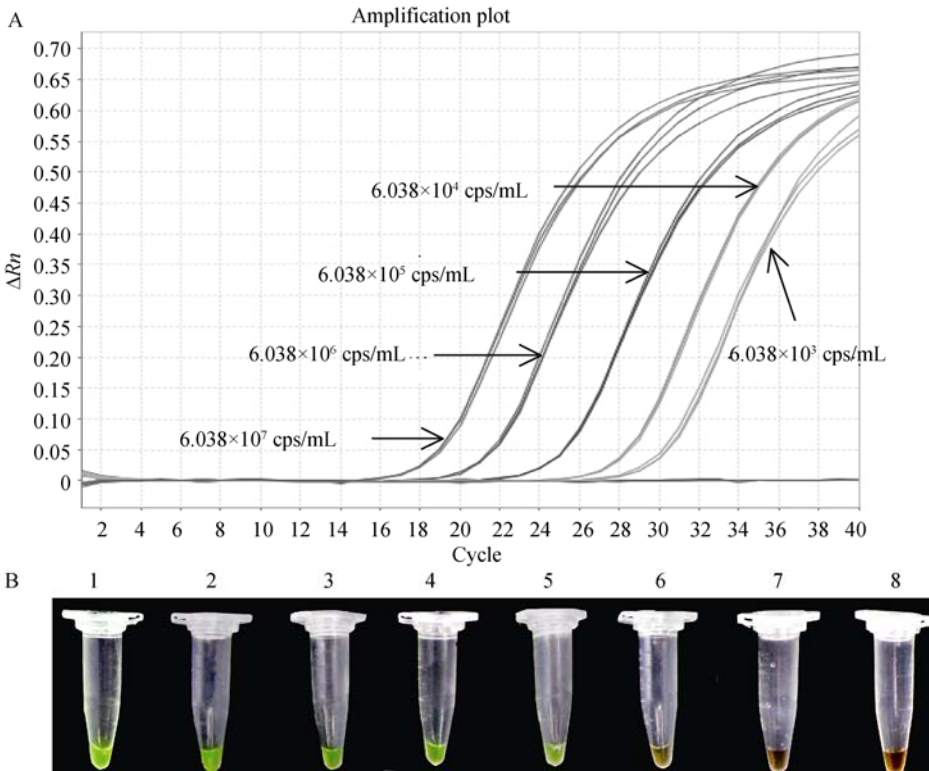


图 3 荧光定量 PCR 和 LAMP 两种方法检测 IHNV 灵敏度比较

Fig. 3 Comparison of sensitivity between Real-time PCR and LAMP methods for IHNV detection

A. 荧光定量 PCR 检测 IHNV 的扩增曲线图, 检测模板浓度从  $6.038 \times 10^7$  到  $6.038 \times 10^1$  cps/mL, 每个浓度梯度做 3 次重复; B. 荧光显色 LAMP 检测 IHNV 的扩增产物, 管#1—7 分别为  $6.038 \times 10^7$ — $6.038 \times 10^1$  cps/mL 的 pMD18-NS2 质粒模板, 8 为阴性对照

A. Amplification plot of real-time PCR for IHNV detection, Template concentration is from  $6.038 \times 10^1$  to  $6.038 \times 10^7$  cps/mL, and each concentration was repeated three times in one experiment; B. Visual inspection of LAMP products by addition of SYBR Green I. 1—7: Different concentrations of pMD18-NS2 with  $6.038 \times 10^7$  to  $6.038 \times 10^1$  cps/mL. 8: Negative control

表 2 荧光定量 PCR 与 LAMP 两种方法检测 IHNV 的优缺点比较

Tab. 2 Characteristics comparison between real-time PCR and LAMP methods for IHNV detection

|      | Real-time PCR | LAMP |
|------|---------------|------|
| 灵敏度  | 较高            | 较高   |
| 特异性  | 较好            | 较好   |
| 模板质量 | 高             | 不高   |
| 检测时间 | 较短            | 短    |
| 检测成本 | 较低            | 较高   |
| 操作步骤 | 简单            | 繁琐   |
| 结果分析 | 简便            | 复杂   |

显示, LAMP 技术检测 IHNV 的方法更适合对虾养殖现场检测的推广使用。

参考文献:

[1] Tang K F, Poulos B T, Wang J, *et al.* Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates and characteristics of their infection

[J]. *Dis Aquat Organ*, 2003, 53: 91—99

[2] Primavera J H, Quintio E T. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. *J Crustac Biol*, 2000, 20: 796—802

[3] Chayanburakul K, Lightner D V, Flege T W, *et al.* Different responses to an infection by Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in *Penaeus monodon* and *P. vannamei* [J]. *Dis Aquat Organ*, 2005, 67: 191—200

[4] Yang B, Huang J, Song X L, *et al.* Detection of IHNV in shrimp by dot blot hybridization with digoxigenin labeled DNA probe by PCR [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(1): 95—98 [杨冰, 黄健, 宋晓玲, 等. PCR 法制备地高辛标记 DNA 探针斑点杂交检测对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHNV). 中国水产科学, 2004, 11(1): 95—98]

[5] Yang B, Song X L, Huang J, *et al.* Development of a polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis viru [J]. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(1): 1—5 [杨冰, 宋晓玲, 黄健, 等. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHNV) PCR 检测方法的建立. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 1—5]

- [6] Zhang Q Y. A review of viral diseases of aquatic animal in China [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(1): 89—101 [张奇亚. 我国水生动物病毒病研究概况. 水生生物学报, 2002, **26**(1): 89—101]
- [7] Lightner D V, Redman R M. Shrimp diseases and current diagnostic methods [J]. *Aquaculture*, 1998, **164**: 201—220
- [8] Dhar A K, Roux M M, Klimpel K R. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, **39**: 2835—2845
- [9] Tang K F, Lightner D V. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR [J]. *Dis Aquat Org*, 2001, **44**: 79—85
- [10] Sun Z F, Hu C Q, Ren C H, *et al*. Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Virol Methods*, 2006, **131**: 41—46
- [11] Yang B, Song X L, Huang J, *et al*. Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China [J]. *Vet Microbiol*, 2007, **120**: 63—70
- [12] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(12): E63

## COMPARATIVE STUDY OF SPECIFICITY AND SENSITIVITY FOR IHNV DETECTION BETWEEN REAL-TIME PCR AND LAMP METHODS

ZHAO Zhe<sup>1</sup>, REN Chun-Hua<sup>1</sup>, JIANG Xiao<sup>1</sup>, ZHANG Lü-Ping<sup>1</sup>, FENG Juan<sup>2</sup> and HU Chao-Qun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) is one of the most important pathogens infecting penaeid shrimp and causes huge economic losses in the shrimp culture industry worldwide. Because no commercial vaccine is yet available, the most effective way of containing the disease is by the routine screening of juveniles and adults for the presence or absence of the virus. Therefore, our goal is to establish a simple and rapid examination system for infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in places such as shrimp ponds. Two detection methods, real-time PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP), were developed for IHNV diagnosis, and then their specificity and sensitivity were compared in the study. Using the real-time PCR method, the assay had a detection limit of six copies of DNA template of IHNV, and had a correlation coefficient of 0.99521 between template concentration and threshold cycle value at the template concentration of  $6.038 \times 10^4$  to  $6.038 \times 10^9$  cps/mL. Furthermore, the approach had no signal response to genomic DNA of white spot syndrome virus and shrimp. The result revealed that the detection method had high specificity and sensitivity for IHNV detection. However, the costly real-time thermal cycler and technically demanding were deemed to be not appropriate for IHNV detection in field conditions. LAMP was a novel, sensitive and rapid detection technique and could be applied for disease diagnosis in aquaculture. Here, a set of four primers was designed using PrimerExplorer V4 software by targeting the IHNV genome DNA, and used to develop the LAMP method for IHNV detection. Using the detection system, target DNA was amplified and visualized on agarose gel within 60min under isothermal condition at 64°C. Also, the LAMP amplicon was observed directly in the reaction tube by addition of SYBR Green I for a naked-eye inspection. Sensitivity assay showed that the method also had a detection limit of six copies of DNA template of IHNV. Moreover, genomic DNA of white spot syndrome virus and shrimp were unable to be detected within 60min using the LAMP method. Overall, these data revealed that the LAMP method had an equivalent to the real-time PCR method in specificity and sensitivity for IHNV detection. Considering that the LAMP method had great advantage in its performance and low cost, this technique was more suitable for IHNV detection in field conditions. Therefore, the LAMP method could be applied routinely to check the shrimp in hatcheries and growout ponds, so that virus carrying shrimp could be found during the early infection stages and counter measures could be devised before the infection becomes epizootic.

**Key words:** Real-time PCR; LAMP; IHNV; Specificity; Sensitivity