

文章编号: 1674 - 7054(2016) 03 - 0307 - 07

对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒实时 荧光 LAMP 检测方法的建立及应用

李红梅^{1,2}, 江晓¹, 任春华¹, 赵哲¹, 胡超群¹

(中国科学院南海海洋研究所/热带海洋生物资源与生态重点实验室/广东省应用海洋生物学
重点实验室, 广州 510301; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 笔者研究构建了一种基于 ESE-Quant tube scanner 设备的新型实时荧光环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) IHNV 检测方法, 评价其敏感性、特异性、反应速度和实际检测结果。结果表明, IHNV 实时 LAMP 检测方法在 63 °C 条件下, 30 min 内检测到 10⁶ 稀释的基因组 DNA, 可检测到 24 个质粒拷贝; 与 27 种包括多种水生动物以及对虾常见病原 DNA 均无交叉反应。通过对 152 份实际样品的检测, 实时荧光 LAMP 检测方法的检出阳性率为 59.87%, 与 real-time PCR 方法相当, 高于其他检测方法。本研究建立的 IHNV 实时 LAMP 检测方法对现场诊断具有较大的应用潜力。

关键词: 传染性皮下及造血组织坏死病毒; 实时荧光 LAMP; ESE-Quant tube scanner

中图分类号: Q 786 S 917.4 文献标志码: A DOI: 10. 15886/j. cnki. rdsxb. 2016. 03. 005

目前, 大约有 20 种不同的对虾病毒造成对虾的大量死亡和严重的经济损失, 严重影响了对虾养殖业的可持续发展^[1-2]。其中传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV) 为对虾的主要病毒病原体之一, 为细角对虾浓核病毒(*Penaeus stylirostris* densovirus, PST DMV) 家族的细小病毒, 是一种 DNA 病毒^[3]。1981 年, IHNV 感染导致了从哥斯达黎加和厄瓜多尔商业进口到夏威夷的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 幼虾 90% 的死亡^[4-6]。Hsieh 等也报道了 IHNV 导致大量的幼年期罗氏沼虾的死亡^[7], 并可引起凡纳滨对虾^[8]和斑节对虾(*Penaeus monodon*) 产生慢性矮小残缺综合症(RDS) 这是一种慢性, 非致死性疾病^[9-10]。IHNV 宿主广泛, 主要有感染养殖和野生凡纳滨对虾、细角滨对虾(*P. Stylirostris*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、宽沟对虾(*Penaeus latisulcatus*)、加州美对虾(*F. californiensis*) 和斑节对虾与澳洲对虾杂交的虾^[11]。病毒性感染发病后难以控制, 因此预防疾病并控制疾病的传播, 减少损失变得尤为重要^[12-13]。然而迄今为止, 尚无降低 IHNV 感染的有效预防和治疗措施^[14]。目前已开发用于检测对虾病毒疾病的方法包括生物测定、组织病理学、斑点原位杂交、聚合酶链反应^[15]和实时定量 PCR^[16]。OIE 标准推荐的 IHNV 的检测方法为 Real-Time PCR 方法和普通 PCR 方法^[17]。基于 PCR 的检测方法很敏感, 具有高度特异性, 但需要昂贵的设备, 且耗时过长, 不适合在养殖场和对虾加工企业进行内部质量控制中使用。迅速判定病因, 减少损失, 需要真正简单快速的现场检测方法。Sun 等开发了 IHNV 的 LAMP 检测方法, 分别用 SYBR-GreenI 和浊度判断结果^[18], 反应时间短, 操作简单。Arunrut 开发的 IHNV 的 LAMP 检测方法, 采用 LAMP 检测与横向流试纸(lateral flowdipstick, LFD) 连用, 进行结果判断^[19]。LAMP 方法是日本学者 Notomi 在 2000 年发明的一种核酸扩增

收稿日期: 2016 - 05 - 20

基金项目: 广东省海洋经济创新发展区域示范专项项目(GD2012 - B03 - 003)、广东省省级科技计划项目(2014B030301064) 和“海洋微生物功能物质及其开发利用的研究”项目资助(KSCX2 - EW - G - 12B)

作者简介: 李红梅(1986 -) 女, 中国科学院大学 2016 级博士研究生, 主要从事病原快速检测研发. E-mail: hongmeili22@ 126. com

通信作者: 胡超群(1962 -) 男, 研究员, 主要从事海洋水产养殖、病害控制及生物技术研究. E-mail: hucq@ sc-sio. ac. cn

技术^[20],该技术针对靶基因的6或8个区域设计4或6条特异引物,不需要模板的热变性和长时间温度循环,对设备要求低。LAMP结果判断最初通过琼脂糖凝胶电泳,后发展为用浊度仪分析反应的副产物 $MgCl_2$ ^[21-22],再后来采用SYBR染料法进行结果判断,更为简单方便^[23-24],但由肉眼观察结果,难免主观。笔者根据Genbank登录的IHHNV基因序列(AF218266),设计并筛选一套IHHNV的特异性LAMP引物,运用德国ESE-quant tube scanner设备进行LAMP实验,精确控制反应温度,结果为数据输出,由溶解曲线来判断结果是否特异,可有效排除假阳性反应,并减少人为主观误差,适合于病原微生物的现场、野外的快速检测,可在基层普及应用^[25]。笔者建立的IHHNV LAMP检测方法与OIE标准Real-time PCR方法、普通PCR^[17]以及Sun和Arunrut分别报道的LAMP检测方法^[18-19]进行比较,旨在为野外及基层的现场快速检测IHHNV提供可靠的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料 IHHNV感染阳性对虾样本来源于中科院南海海洋研究所,样品呈典型的传染性皮下及造血组织坏死病症,于70%的酒精中-20℃保存。检测的152个样品采集于广东湛江、江门、茂名和汕头等地对虾养殖场,以及水产市场及水产加工企业的原料虾。

1.2 LAMP引物的设计 根据GenBank发布的IHHNV基因组序列及相关文献资料^[24],选取病毒主要非结构蛋白NS1基因为靶位点(登录号:AF218266.2),按照LAMP引物的设计原则,使用在线设计软件Primer Explorer version 4(<http://primerexplorer.jp/e>)设计6条IHHNV LAMP引物(表1)。引物由上海生工有限公司合成。

表1 IHHNV实时荧光LAMP扩增的引物序列

Tab.1 Primers used for the real-time LAMP targeted on NS1 gene of IHHNV

Primer name	Sequences 5' - 3'
IHHNV-FIP	GAGACAACCGACGACATC
IHHNV-BIP	TCTCTGATGACGAAGGTGT
IHHNV-F3	GTTGTGTTCCGCTACTACAGCTCGATCATGGAAGCAATGGA
IHHNV-B3	TGAAGGGACTCCCAACGGATCTCACTCTCTCCAGTCC
IHHNV-FL	CATCGGTAGGTTCCAGTCC
IHHNV-BL	CGGACGAAATGGACGGAA

1.3 基因组DNA的提取 取IHHNV感染阳性对虾的肌肉组织100~200 mg置于装有500 μL PBS的无菌EP管中,用玻璃匀浆器对其进行研磨,离心收集研磨后的上清液用于DNA提取;采用Magen水生动物DNA快速提取试剂盒(欣研生物,广州)对样品总的DNA提取,操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.4 重组质粒的构建与定量 以提取的含IHHNV的阳性对虾DNA为模板,用所设计的LAMP引物的外引物IHHNV-F3与IHHNV-B3进行PCR反应,回收扩增片段与pMD18-T载体连接,连接产物转化DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆并进行测序。选择包含目标片段的pMD18-T-NS1重组质粒进行下面的实验。根据公式计算出pMD18-T-NS1拷贝数。

$$\text{质粒拷贝数} = [\text{质粒浓度} \times 10^{-6} / (324.5 \times 2 \times \text{质粒长度})] \times 6.023 \times 10^{23}$$

1.5 实时荧光LAMP反应体系 根据前期研究工作^[26]确定了LAMP反应体系为25 μL,其成分包括内引物FIP和BIP各1.6 μmol·L⁻¹,外引物F3和B3各0.2 μmol·L⁻¹,环引物FLP和BLP各0.8 μmol·L⁻¹,1×恒温缓冲液,1 mol·L⁻¹甜菜碱,6 mmol·L⁻¹ MgSO₄,1.6 mmol·L⁻¹ dNTP,10 U *Bst* DNA聚合酶,0.5 μL 10× SYTO-9,1~100 ng DNA模板。按照ESE-Quant tube scanner(德国QIAGEN公司)的使用说明,将反应混合物置于反应孔中,63℃恒温反应60 min,最后80℃下保持5 min结束反应。

1.6 灵敏度试验 用紫外分光光度计测定质粒pMD18-T-NS1的DNA浓度,算出质粒的拷贝数。将质粒进行10倍倍比稀释,稀释度从10⁻¹到10⁻⁸,浓度分别为1 ng·μL⁻¹,100 pg·μL⁻¹,10 pg·μL⁻¹,1 pg·μL⁻¹,100 fg·μL⁻¹,10 fg·μL⁻¹,1 fg·μL⁻¹,100 ag·μL⁻¹,每个稀释度取2 μL作为模板加入到LAMP

反应体系中,在 ESE-Quant tube scanner 仪器上进行 LAMP 扩增,检测本研究建立的实时荧光 LAMP 的灵敏度。

1.7 与其他 IHNV 检测方法的灵敏度比较分析 为确定本研究建立的实时荧光 LAMP 检测方法的灵敏度水平,以梯度稀释的 IHNV 阳性 DNA(从 10^1 到 10^8 倍稀释)为模板,分别按 OIE 推荐的普通 PCR、Real-time PCR 及 Sun 和 Arunru 分别发表的 LAMP 方法^[18-19]的要求进行扩增反应。普通 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,Real-time PCR 扩增结果在 ABI 7500 上直接读取结果,其他 2 种 LAMP 方法在 ESE-Quant tube scanner 检测仪器上进行扩增分析。

1.8 特异性试验 以水生动物 DNA 和对虾常见病原 DNA 为 LAMP 模板进行特异性试验。笔者试验的 27 种水生动物 DNA 和对虾常见病原 DNA 包括健康凡纳滨对虾,虾蛄(*Oratosquilla oratoria*),墨吉对虾(*Banana prawn*),北极虾(*Pandalus borealis*),北方长额虾(*Pandanus borealis*),鳕鱼(*Gadus*),大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*),比目鱼(*Paralichthys olivaceus*),鲱鱼(*Clupea pallasii*)的基因组 DNA、对虾白斑综合症病毒(*white spot syndrome virus*),爱德华氏菌(*Edwardsiella*) DNA,无乳链球菌(*S. agalactiae*),豚鼠气单胞菌(*A. caviae*),霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*),蜡芽芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, Frankland),弗氏柠檬酸菌(*Citrobacter Werkman and Gillen*),肺炎克雷伯菌(*Klebsiella Pneumoniae*),绿脓杆菌(*P. Aeruginosa*),维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*),耶尔森氏菌(*Y. intermedia*),单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*),副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*),志贺氏菌(*Shigella castellani*),沙门氏菌(*salmonella*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),大肠杆菌 O2 和 O157:H7。分别将 27 种水生动物 DNA 和对虾常见病原 DNA 加入到 LAMP 反应体系中,在 ESE-Quant tube scanner 进行实时荧光 LAMP 扩增,检测本研究建立的 IHNV 实时荧光 LAMP 检测方法的特异性。

1.9 实际样品的检测 用所建立的 IHNV 实时荧光 LAMP 检测方法和普通 PCR,real-time PCR 及 2 种 LAMP 方法对 152 个实际样品进行检测,并比较它们的实际应用性。

2 结果与分析

2.1 实时荧光 LAMP 检测 IHNV 的灵敏度 构建含 IHNV 实时荧光 LAMP 扩增靶位点的 pMD18-T-NS1 质粒,用紫外分光光度计测量质粒浓度,并将质粒稀释到浓度为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $100 \text{ ag} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 分别作为模板进行扩增,结果见图 1。由图 1 可见,建立的 LAMP 方法能检测到最低质粒浓度为 $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 出峰时间在 20 min 内。通过公式换算成质粒拷贝数显示,本研究建立的实时荧光 LAMP 检测方法最低能检测到 $24 \text{ 拷贝} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

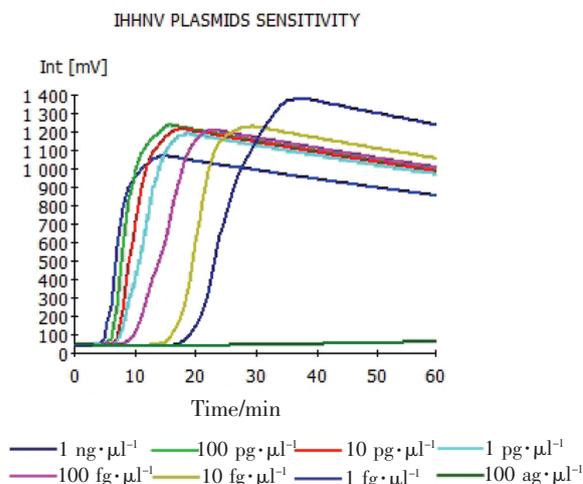


图 1 实时荧光 LAMP 质粒灵敏度
Fig.1 Real time fluorescence LAMP plasmids sensitivity

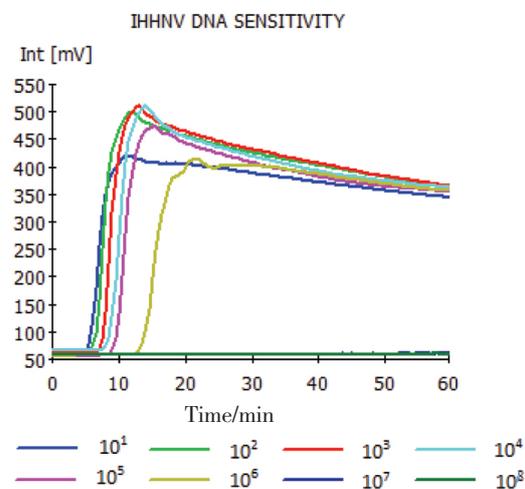


图 2 实时荧光 LAMP IHNV DNA 灵敏度
Fig.2 Real time fluorescence LAMP IHNV DNA

2.2 与其他 IHNV 检测方法的灵敏度比较 以 10 倍倍比稀释的 IHNV 阳性基因组 DNA 分别作为模板进行实时荧光 LAMP 扩增 结果见图 2。由图 2 可见, 10^1 倍到 10^6 倍稀释的 DNA, 出峰时间逐步延后, 最晚大约在 12 min。说明建立的实时荧光 LAMP 检测方法能检测 10^6 倍稀释的 IHNV 阳性基因组 DNA。与 OIE Real-time PCR 以及 SUN 的 LAMP 引物一样, 均能检测到 10^6 倍稀释的 DNA, 而 OIE 普通 PCR 能检测到 10^5 倍稀释的 DNA, Arunrut 的 LAMP 引物检测到 10^4 倍稀释 DNA 结果见图 3 ~ 5。

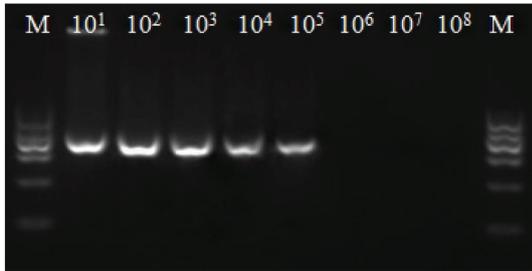


图 3 OIE 普通 PCR IHNV DNA 灵敏度
Fig.3 PCR (OIE) IHNV DNA sensitivity

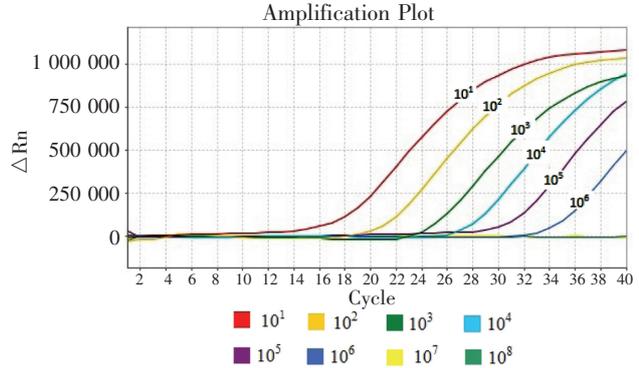


图 4 OIE real-time PCR IHNV DNA 灵敏度
Fig.4 Real-time PCR (OIE) IHNV DNA sensitivity

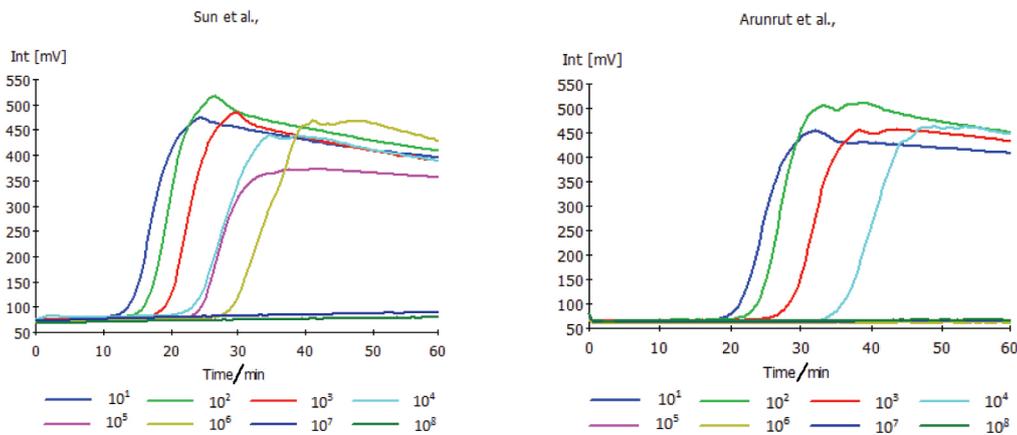


图 5 2 种 LAMP 方法 IHNV DNA 灵敏度
Fig.5 IHNV DNA sensitivity in two LAMP methods

2.3 实时荧光 LAMP 检测 IHNV 的特异性 以 27 种水生动物 DNA 和对虾常见病原 DNA 分别作为 LAMP 检测模板, 在 ESE-Quant tube scanner 进行实时荧光 LAMP 实验, 检测本研究建立的 IHNV 实时荧光 LAMP 检测方法的特异性。结果显示, 本研究建立的实时荧光 LAMP 检测方法只对 IHNV 阳性基因组扩增, 而对其他 27 种 DNA 均没有扩增反应, 说明建立的 IHNV 实时荧光 LAMP 检测方法具有很好的特异性, 结果见图 6。

2.4 实际样品检测结果 通过对 152 个实际样品进行检测, 结果显示(表 2), 本研究建立的实时荧光 LAMP 方法能检出 91 个阳性, 阳性检出率为 59.87%; OIE Real-time PCR 能检出 93 个阳性, 阳性检出率为 61.18%; 普通 PCR 检测出 77 个阳性, 阳性检出率为 50.66%。而其他 2 种 LAMP 方法, 其中 Sun 的引物检出率为 53.29%, Arunrut 的引物检出率为 42.11%。

表 2 152 个实际样品的检测结果

Tab.2 Testing of 152 unknown samples

检测方法 Test methods	检出阳性率/% Positive rate
This study	59.87%
Sun et al.,2006	53.29%
Arunrut et al.,2011	42.11%
PCR	49.34%
Real-time PCR	61.18%

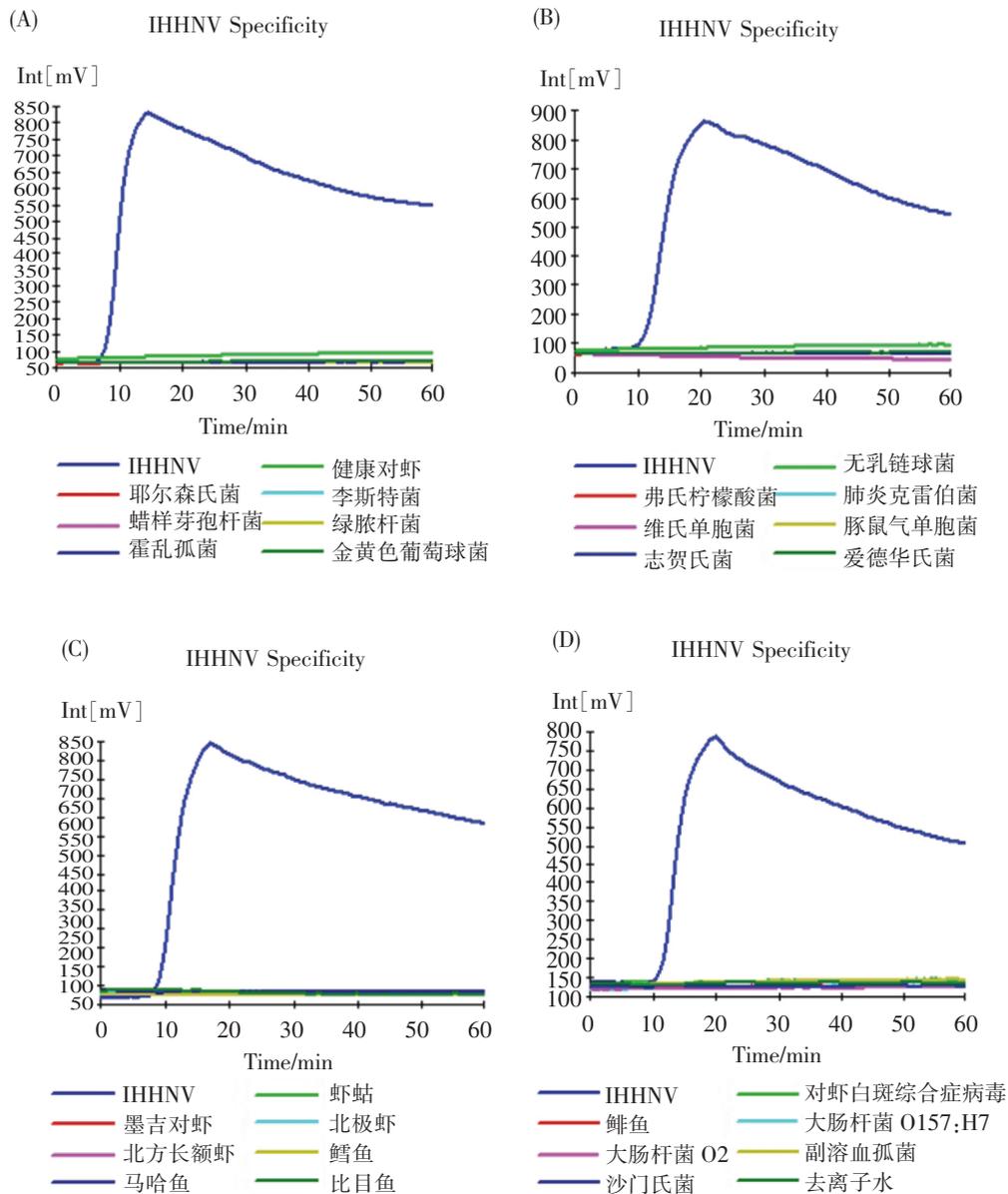


图 6 实时荧光 LAMP 引物的特异性
Fig.6 IHNV specificity of primers detected by Real-time Fluorescence LAMP

3 讨 论

本研究对 GenBank 收录的 IHNV 地理株基因组序列进行比对发现非结构蛋白基因 NS1 是一个高度保守的基因。针对 NS1 基因上的一段序列设计 6 条引物,其中包括 1 对环引物,从而把反应时间缩短到 30 min 以内就可判别阴阳性。与 OIE 推荐的 Real-time PCR 以及 PCR 方法相比,节约了大量的反应时间。灵敏度结果显示可检测到大约 24 个 DNA 拷贝(图 1),与 OIE Real-time PCR 检测方法和 Sun 的 LAMP 检测方法^[18]灵敏度相当,高于 OIE 普通 PCR 检测方法以及 Arunrut 的 LAMP 方法^[19](图 2);特异性好,与健康对虾、对虾白斑综合征病毒等 27 种 DNA 均无交叉反应。对实际样品的阳性检出率与 OIE Real-time PCR 相当,高于其他几种方法的检出率,表明该方法能够满足检测需求。

由于 ESE-Quant tube scanner 体积非常小,尺寸仅仅是 17.4 cm × 18.8 cm,质量在 1 kg 以内,包含了反应模块和荧光检测模块,并且带有充电电池,很适合在养殖基地等室外使用^[27]。此外,ESE-Quant tube scanner 比任何移动 PCR 设备都便宜得多。自从 2010 年 Lucchi 等^[28]首次报道了利用 ESE-Quant tube scanner 系统进行 LAMP 扩增的数据采集,并且将该方法用于疟疾的快速检测,基于 ESE-Quant tube scan-

ner 进行的研究越来越多,不仅在人类疾病的快速检测、植物检疫和食品安全检测也广泛使用。Jaymin 等基于 ESE-Quant tube scanner 开发的针对疟原虫的 LAMP 检测方法,比传统检测方法灵敏度更高,特异性更好^[29]。Zhang 等基于此平台,通过人工感染尖孢镰刀菌,建立针对尖孢镰刀菌的高灵敏度实时定量 LAMP 方法,为香蕉种植基地的香蕉枯萎病防治提供有效依据^[30]。笔者开发的 IHNV 实时荧光 LAMP 检测方法是一个适用于对虾养殖场快速检测的非常有前途的核酸检测方法。

综上所述,本研究基于 ESE-Quant tube scanner 检测平台上建立的 IHNV 的实时荧光 LAMP 检测方法,不仅操作简单,反应速度快,特异性好,灵敏度高,成本低廉,而且可以直观、实时地观察反应的进行情况,可用于实验室分析,也适合对虾养殖现场的诊断,能为 IHNV 快速检测和大规模疫病的监控提供技术支持。

参考文献:

- [1] Gabriel A G, Felipe A V. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential [J]. *Recent Research Developments in Microbiology* 2000(4): 333-348.
- [2] Walker P J, Winton J R. Emerging viral diseases of fish and shrimp [J]. *Veterinary Research* 2010, 41(6): 51.
- [3] Tattersall P, Bergoin M, Boom M E, et al. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Amsterdam: Elsevier 2005: 353-69.
- [4] Lightner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp [M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society 1996.
- [5] Lightner D V, Redman R M, Bell T A. Detection of IHNV virus in *penaeus stylirostris* and *penaeus vannamei* imported into hawaii [J]. *Journal of the World Aquaculture Society* 1983, 14: 212-225.
- [6] Lightner D V, Redman R M, Bell T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp [J]. *Journal of Invertebrate Pathology* 1983, 42(1): 62-70.
- [7] Hsieh C Y, Chuang P C, Chen L C, et al. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Aquaculture* 2006, 258: 73-79.
- [8] Kalagayan H, Godin D, Kanna R, et al. IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii [J]. *Journal of the World Aquaculture Society* 1991, 22: 235-243.
- [9] Lightner D V, Redman R M, Bell T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of Penaeid shrimp [J]. *Journal of Invertebrate Pathology* 1983, 42(1): 62-70.
- [10] Primavera H, Quintio E T. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *penaeus monodon* [J]. *Journal of Crustacean Biology* 2000, 20: 796-802.
- [11] Escobedo-Bonilla C M. Application of RNA interference (RNAi) against viral infections in shrimp: A review [J]. *Journal of Antivirals and Antiretrovirals* 2013(5): 1-12.
- [12] Bell T A, Lightner D V. A handbook of normal penaeid shrimp histology [M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1988.
- [13] Lotz J M. Special Topic Review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture [J]. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 1997, 13(4): 405-413.
- [14] Praveen R, Muhammed P S, Kjersti K, Kathy L F, et al. Molecular epidemiology and diagnostics of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus [J]. *Journal of Virology* 2012, 23(2): 203-214.
- [15] Lightner D V, Redman R M. Shrimp diseases and current diagnostic methods [J]. *Aquaculture* 1998, 164, 201-220.
- [16] Tang K F, Lightner D V. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in Penaeid shrimp by real-time PCR [J]. *Diseases of Aquatic Organisms* 2001, 44, 79-85.
- [17] OIE. 2015. "Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis" In: *Manual for Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2015*, The OIE Aquatic Animal Health Standards Commission. [Online]. Available: [Http://www.Oie.Int/Fileadmin/Home/Eng/Health_Standards/Aahm/Current/Chapitre_Ihvn.Pdf](http://www.oie.int/Fileadmin/Home/Eng/Health_Standards/Aahm/Current/Chapitre_Ihvn.Pdf).
- [18] 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]. *Journal of Virological Methods* 2006, 131(1): 41-46.
- [19] Arunrui N, Prombun P, Saksmerprom V, et al. Rapid and sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick [J]. *Journal of Virological*

- Methods 2011 ,171(1) : 21 -25.
- [20] Notomi T ,Okayama H ,Masubuchi H ,et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research. 2000 ,28: E63.
- [21] Mori Y ,Nagamine K ,Tomita N ,et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications 2001 ,289(1) : 150 -4.
- [22] Yasuyoshi M ,Masataka K ,Norihiro T ,et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 2004 ,59: 145 -157.
- [23] Nagamine K ,Hase T ,Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. Molecular and Cellular Probes. 2002 ,16(3) : 223 -229.
- [24] Buhlmann A ,Pothier J F ,Rezzonico F ,et al. Erwinia amylovora loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight [J]. Journal of Microbiological Methods 2013 ,92(3) : 332.
- [25] Mori K ,Lemaire-Chamley M ,Asamizu E ,et al. Comparative analysis of common genes involved in early fruit development in tomato and grape [J]. Plant Biotechnology ,2013 ,30: 295 -300.
- [26] 赵哲 ,任春华 ,江晓 ,等. 荧光定量 PCR 与 LAMP 检测 IHNV 的特异性和灵敏性比较 [J]. 水生生物学报 ,2010 ,34(5) : 984 -989.
- [27] Qiagen website. available: <http://www.qiagen.com/Products/ESEQuantTubeScanner.aspx?r=603>. Accessed 2014 Jul 21.
- [28] Lucchi N W ,Demas A ,Narayanan J ,et al. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria [J]. PLoS One ,2010 ,5(10) : 1373.
- [29] Jaymin C P ,Jenna O ,Maniphet X ,et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the species-specific identification of plasmodium vivax [J]. PLoS One 2013 ,8(1) : e54986.
- [30] Zhang X ,Zhang H ,Pu JJ ,et al. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of Fusarium oxysporum f. sp. cubense tropical race 4 in Soil [J]. PLoS One. 2013 8(12) : e82841.

Rapid Detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) by Real-time Fluorescence Loop-mediated Isothermal Amplification Assay

LI Hongmei^{1,2} ,JIANG Xiao¹ ,REN Chunhua¹ ,ZHAO Zhe¹ ,HU Chaoqun¹

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology / Key Laboratory of Applied Marine Biology of Guangdong Province , South China Sea Institute of Oceanology , Chinese Academy of Sciences , Guangzhou 510301 , PR China; 2. University of Chinese Academy of Science; Beijing 100049)

Abstract: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) causes large economic losses to the shrimp aquaculture industry in the world. It is necessary to develop a fast , easy and accurate method to detect IHNV. In this study , we developed a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for IHNV detection on a small ESE-Quant Tube Scanner device and evaluated its sensitivity , specificity and rapidity. This method had a detection limit of 10⁶ dilution template of genomic DNA within 30min under isothermal condition at 63C , and 24 copies of plasmid were detected. Furthermore , the approach had no non-specific signal response to other DNAs , including those of 27 species of aquatic animals and penaeid shrimp pathogens. This method had a positive detection rate of 59.87% , similar to that of the real-time PCR but higher than other detection methods , and hence has great application potential in on-the-spot detection of IHNV in shrimps.

Keywords: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus; real-time loop-mediated isothermal amplification assay; ESE-Quant tube scanner