福建农业学报 2023,38（6）:652−656 http://www.fjnyxb.cn
Fujian Journal of Agricultural Sciences doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.2023.06.003

陈永聪，方勤美，柯翎. 鲤疱疹病毒 2 型与 3 型双重 PCR 检测方法的建立与应用［J］. 福建农业学报，2023，38（6）：652−656.
CHEN Y C, FANG Q M, KE L. Dual PCR Detection of Type 2 and 3 *Cyprinus Herpesvirus*［J］. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*，2023，38（6）：652−656.

鲤疱疹病毒 2 型与 3 型双重 PCR 检测方法的建立与应用

陈永聪，方勤美，柯　翎*

（福建省农业科学院生物技术研究所，福建　福州　350003）

摘　要：【目的】 鲤疱疹病毒 2 型和 3 型对鲤科鱼类危害严重，本研究旨在建立快捷、高效且能同时检测 2 种鲤疱疹病毒的检测技术。**【方法】** 根据鲤疱疹病毒 2 型和 3 型的 DNA 聚合酶基因保守序列，设计 2 对特异性引物，通过对双重 PCR 反应条件的优化，建立检测鲤疱疹病毒 2 型和 3 型的双重 PCR 方法；使用该方法对试验室保存的鲫和鲤病鱼组织样品进行检测。**【结果】** 该方法能够分别对鲤疱疹病毒 2 型和鲤疱疹病毒 3 型各扩增出 715 bp 和 456 bp 的特异性条带，表现出良好的特异性；敏感性试验结果显示，该方法的检测极限值为 100 copies·μL^{-1}，具有较高的灵敏性。使用该方法对本试验室保存的 18 份临床病料进行 PCR 检测并对 PCR 产物进行测序验证，结果显示 CyHV-2 和 CyHV-3 阳性的各有 3 份，其阳性率都为 33.3%；分别对 2 份 CyHV-2 和 CyHV-3 阳性样品混合后进行检测，结果混合样品均为 CyHV-2 和 CyHV-3 双阳性，与常规检测方法得到的结果相同。**【结论】** 本研究建立的双重 PCR 检测方法特异性强、灵敏度高，可用于 CyHV-2 和 CyHV-3 的快速检测和鉴别诊断。

关键词： 鲤；疱疹病毒；双重 PCR

中图分类号： S941.41　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1008-0384（2023）06−0652−05

Dual PCR Detection of Type 2 and 3 *Cyprinus Herpesvirus*

CHEN Yongcong, FANG Qinmei, KE Ling*

（*Biotechnology Institute*, *Fujian Academy of Agricultural Sciences*, *Fuzhou*, *Fujian*　350003, *China*）

Abstract: 【Objective】 A PCR method for simultaneously detecting Type 2 and Type 3 Cyprinid herpesvirus that cause serious diseases on *Cyprinidae* was developed and tested for clinical diagnosis. 【Methods】 Two pairs of specific primers were designed according to the conserved sequences of the DNA polymerase gene of the two types of virus, CyHV-2 and CyHV-3. PCR reaction conditions of the method were optimized. The assay was applied on the stored tissue samples of diseased *Carassius auratus* and *Cyprinus carpio* to verify validity of the methodology. 【Result】 The newly developed Dual PCR Assay amplified specific bands with the base numbers of 715 bp for CyHV-2 and 456 bp for CyHV-3. It exhibited high sensitivity with a detection limit of 100 copies·μL^{-1}. On the 18 clinical samples, 3 were found to be CyHV-2 and 3 CyHV-3 with a positive detection rate of 33.3%. Furthermore, the assay successfully identified the two type viruses in a mixed sample of CyHV-2 and CyHV-3 in a challenge test. 【Conclusion】 The Dual PCR Assay demonstrated high specificity and sensitivity in simultaneously detecting CyHV-2 and CyHV-3. It could be adequately applied for rapid diagnosis of the viral diseases on carps.

Key words: *Cyprinus carpio*；Cyprinus herpesvirus；Double PCR

0　引言

【研究意义】鲫（*Carassius auratus*）、金鱼（*Carassius auratus* L.）、鲤（*Cyprinus carpio*）、锦鲤（*Cyprinus carpio* Koi）均为鲤科鱼类，与人类生活、生产密切相关。2021 年，我国鲤和鲫的产量均达 280 万 t[1]，为人类提供了重要的蛋白质来源[2]。锦鲤和金鱼属于观赏鱼类，其单个鱼体的经济价值较高，且承载了人们的情感寄托[2]。鲤疱疹病毒 2 型（Cyprinid herpesvirus 2，CyHV-2）主要引起鲫造血器官坏死病，该病毒在中国、日本、美国、澳大利亚、新西兰及欧洲一些国家均有报道，可造成养殖

收稿日期： 2023−02−03 初稿；2023−04−11 修改稿

作者简介： 陈永聪（1968 —），男，硕士，农艺师，研究方向：特色水产养殖及药物研发（E-mail：610388747@qq.com）

* 通信作者：柯翎（1979 —），男，硕士，副研究员，研究方向：水产种苗繁育研究（E-mail：13599388598@163.com）

基金项目： 福建省科技计划公益类专项（2020R10270010、2021R1027008）

鲫鱼和金鱼大量死亡，严重危害金鱼、鲫养殖业[3]。鲤疱疹病毒 3 型（Cyprinid herpesvirus 3，CyHV-3）主要引起鲤和锦鲤发生肾脏出血红肿和鳃坏死病变，死亡率达到 80% 以上，甚至可达 100%[4–5]。因此，建立鲤和鲫的鲤疱疹病毒 2 型和 3 型检测手段对二者的预防和控制具有重要意义。【前人研究进展】研究人员对零售、野生、养殖金鱼采样检测，均检测到 CyHV-2 阳性样品[6–7]；在野生鲤和观赏锦鲤中也发现 CyHV-3 的潜伏感染[8]，鲤也可以携带 CyHV-2 但不发病[9]。Waltzek[10] 采用解旋酶基因对 CyHV-2 进行 PCR 检测和鉴定，分辨率达到 78 copies·μL^{-1}；Bercovier 等[11] 采用胸苷激酶（Thymidine kinase，TK）基因对 CyHV-3 进行 PCR 检测和鉴定，分辨率可达到 30 个病毒粒子的水平。两种病毒均可感染鲤、鲫、锦鲤、金鱼等鲤科鱼类。随着锦鲤、金鱼等观赏鲤科鱼类的线上和线下的销售越来越活跃，鱼类病毒在国内跨区域传播的风险逐渐增加。而且鲤和鲫的杂交品种繁多，病毒的感染情况较为复杂。【本研究切入点】对于两种病毒还未有成熟有效的防控药物或疫苗。因此，在实际检测的需求中，需要能够同时对两种病毒进行检测。【拟解决的关键问题】本研究根据鲤疱疹病毒 2 型和 3 型的聚合酶基因，设计 2 对特异性引物，通过对双重 PCR 反应条件的优化，建立检测鲤疱疹病毒 2 型和 3 型的双重 PCR 方法，以期丰富和完善鲤疱疹病毒 2 型和 3 型检测方法，为两种疱疹病毒预控工作提供参考。

1　材料与方法

1.1　病毒

石斑鱼神经坏死病毒（Grouper nervous necrosis virus，GNNV）、石斑鱼虹彩病毒（Grouper iridovirus，SGIV）、大黄鱼虹彩病毒（Yellow croaker iridovirus，YCIV）、蛙虹彩病毒（Frog virus，FV）、鳗疱疹病毒（Anguillae herpesvirus，AHV）、鲤疱疹病毒 2 型（CyHV-2）、鲤疱疹病毒 3 型（CyHV-3）由本实验室保存。

1.2　主要试验试剂

Taq 2×PCR Master Mix with Dye 购自武汉艾博泰克生物技术有限公司。2000 DNA Marker、琼脂糖、Gelstain 等购自北京全式金生物技术有限公司。其他试剂均采用国产分析纯试剂。

1.3　标准品的制备

将 CyHV-2、CyHV-3 相应的 DNA 聚合酶基因 DNA 片段合成并连接到 pUC57 载体上，从而构建 CyHV-2 和 CyHV-3 的标准质粒，并根据以下公式计算其拷贝数：拷贝数（copies·μL^{-1}）=6.02×10^{23}（copies·mol^{-1}）× 质粒浓度（ng·μL^{-1}）×10^{-9} /质粒分子量（g·mol^{-1}）。

1.4　引物的设计与合成

根据 GenBank 中鲤疱疹病毒 2 型的基因序列（KM2007221.1）和 3 型的基因序列（MN913971.1），根据 CyHV-2、CyHV-3 的 DNA 聚合酶序列设计 2 对特异性引物（表 1），并由福州尚亚生物技术有限公司合成。

表 1　双重 PCR 引物序列
Table 1　Sequence of primer for Dual PCR Assay

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence (5′-3′)	片段长度 Fragment length/bp
CyHV-2-F	CTGATTATTACGGAGAGTATGAC	715
CyHV-2-R	CTGTGAGACTTTTGTAGATTATTC	
CyHV-3-F	CTATGCTGGAACTGGTGATC	456
CyHV-3-R	GAGAGATTCTGACGGTGAAG	

1.5　双重 PCR 检测方法的建立与优化

将 CyHV-2、CyHV-3 的质粒拷贝数换算到同一数量级后按比例混合，以混合后的质粒为 DNA 模板，进行双重 PCR 扩增。2 对引物（10 μmol·L^{-1}）的添加量均设 0.1～0.6 μL 的 6 个梯度处理，退火温度设置 9 个梯度（52～68 ℃），其他反应条件参考 *Taq* 2 × PCR Master Mix with Dye 的说明书，根据扩增结果选择最佳引物量和退火温度。

1.6　敏感性试验

将 CyHV-2、CyHV-3 的质粒拷贝数稀释到同一数量级后，10 倍梯度稀释，含量范围为 1×10^{0} ～ 1×10^{11} copies·μL^{-1}，以各梯度含量的混合质粒为 DNA 模板，采用优化后的双重 PCR 检测方法进行 PCR 扩增，测试该方法的灵敏性。

1.7　特异性试验

分别以 CyHV-2、CyHV-3、GNNV、SGIV、YCIV、FV、AHV 的 DNA 或 cDNA 为模板，采用优化后的双重 PCR 检测方法进行扩增，同时以 CyHV-2 和 CyHV-3 的混合 DNA 为模板，分别进行只添加单对引物的单重 PCR 反应，以检测该方法的特异性。

1.8　临床样品检测

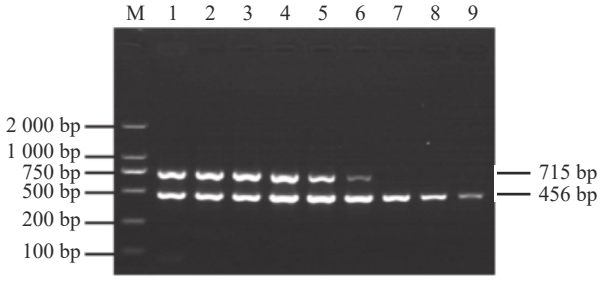
取本实验室保存的 18 份锦鲤和金鱼疑似感染组织样品作为 DNA 模板，同时分别对 2 份 CyHV-2 和 CyHV-3 阳性样品进行人工混合，用优化后的双重 PCR 检测方法进行 PCR 扩增并对扩增产物进行测

序；分别以国家标准《金鱼造血器官坏死病毒检测方法》（GB/T 36194—2018）和水产行业标准《鲤疱疹病毒检测方法第一部分：锦鲤疱疹病毒》（SC/T 7212.1—2011）推荐的检测方法为标准，将阳性和双阳性样品分别通过两种病毒的常规检测方法进行检测验证，以验证上述方法的可靠性。

2 结果与分析

2.1 双重 PCR 最佳退火温度和最佳引物浓度的选择

根据 PCR 扩增结果，退火温度选择 58 ℃ 进行后续试验（图 1），引物浓度选择加入 0.3 μL 进行后续试验（图 2）。最佳的 PCR 体系总计 20 μL，Template 2 μL、CyHV-2-F（10 μmol·L^{-1}）0.3 μL、CyHV-2-R（10 μmol·L^{-1}）0.3 μL、CyHV-3-F（10 μmol·L^{-1}）0.3 μL、CyHV-3-R（10μmol·L^{-1}）0.3μL、*Taq*2×PCRMaster Mix with Dye 10 μL、Nuclease-free Water 6.8 μL；后续试验采用的 PCR 反应程序如下：95 ℃ 30 s，（95 ℃ 30 s，58 ℃ 60 s，68 ℃ 60 s）30 个循环，68 ℃ 5 min，12 ℃+∞。



M：2000 DNA Marker；1～9：退火温度依次是 52、54、56、58、60、62、64、66、68 ℃。

M: 2000 DNA Marker；1–9: annealing temperatures of 52 ℃, 54 ℃, 56 ℃, 58 ℃, 60 ℃, 62 ℃, 64 ℃, 66 ℃, and 68 ℃, respectively.

图 1 最佳退火温度 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification under optimized annealing temperature

2.2 敏感性试验

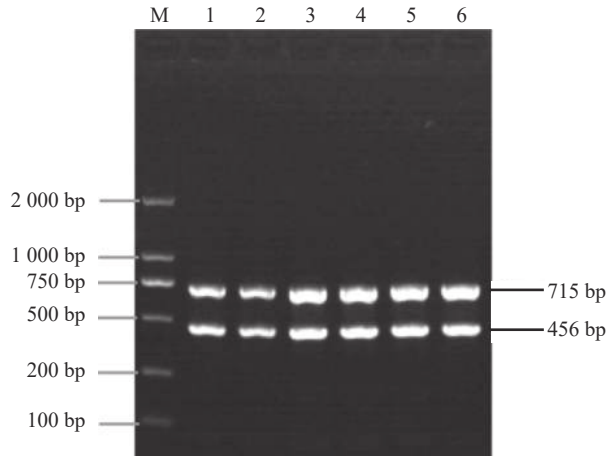
分别以 1×10^{10}～1×10^{1} copies·μL^{-1} 的混合质粒为模板进行双重 PCR 扩增，结果显示，随着模板浓度的降低，目的条带的亮度也逐渐降低，该方法能检测到的质粒最低极限为 100 copies·μL^{-1}（图 3）。

2.3 PCR 特异性试验

特异性试验表明，GNNV、SGIV、YCIV、FV、AHV 为模板的双重 PCR 反应均未扩增出任何条带（图 4）。以 CyHV-2 和 CyHV-3 为模板的双重 PCR 反应和分别添加单对引物进行的单重 PCR 反应均可扩增出相应的目的条带，无交叉反应。

2.4 临床样品检测结果

利用建立的双重 PCR 方法对本实验室保存的

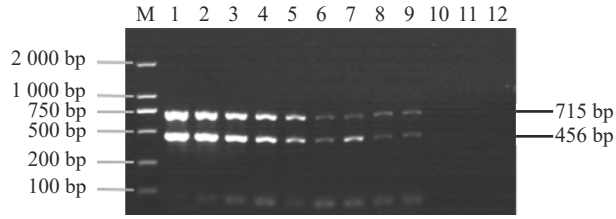


M：2000 DNA Marker；1～6：引物添加量分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6 μL。

M: 2000 DNA Marker; 1–6: amounts of added two pairs of primers 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 0.6 μL, respectively.

图 2 最佳引物用量的双重 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification with optimized primer concentration



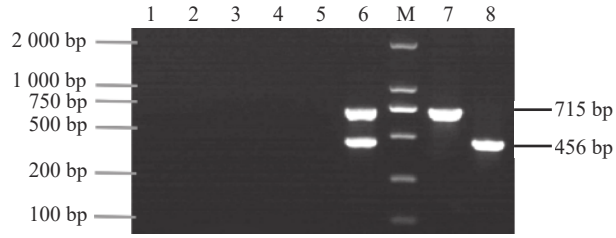
M：2000 DNA Marker；1：CyHV-2 和 CyHV-3 混合质粒初始含量 1×10^{11} copies·μL^{-1}；2～12：以 10 倍比稀释 1×10^{10} ～1×10^{0} copies·μL^{-1} 混合质粒含量。

M: 2000 DNA Marker; 1: mixed plasmid of CyHV-2 and CyHV-3 as template (initial concentration 1×10^{11} copies·μL^{-1}) ; 2–12: diluted at 10 times ratio 1×10^{10}–1×10^{0} copies·μL^{-1}.

图 3 双重 PCR 敏感性试验结果

Fig. 3 Sensitivity of Dual PCR Assay

9 份金鱼和 9 份锦鲤临床样品进行检测，同时设阳性和阴性对照。分别在金鱼和锦鲤样品中得到 3 个 PCR 阳性条带，经测序得到的阳性条带的序列与相应的标准样品序列的同源性均大于 95%，综合 PCR



M：2000 DNA Marker；1：石斑鱼神经坏死病毒；2：石斑鱼虹彩病毒；3：大黄鱼虹彩病毒；4：蛙虹彩病毒；5：鳗疱疹病毒；6：CyHV-2 和 CyHV-3 的混合样品；7：CyHV-2；8：CyHV-3。

M: 2000 DNA Marker; 1: GNNV; 2: SGIV; 3: YCIV; 4: FV; 5: AHV; 6: mixed sample of CyHV-2 and CyHV-3; 7: CyHV-2; 8: CyHV-3.

图 4 PCR 特异性试验结果

Fig. 4 Specificity of Dual PCR Assay

和测序的两者结果，判定 CyHV-2 和 CyHV-3 阳性样品各有 3 份，阳性率均为 33.3%；对 2 份 CyHV-2 和 CyHV-3 阳性临床样品进行混合，经双重 PCR 检测，混合样品均为 CyHV-2 和 CyHV-3 双阳性。经过国家标准和水产行业标准的检测和判定，其结果与本试验的判定结果一致（表 2）。以上结果表明，本研究建立的双重 PCR 方法具有较好的临床实用性，可用于临床样品的检测，同时能够检测到共感染的样品。

表 2　样品检测结果

Table 2　Detection on clinical samples by Dual PCR Assay

检测方法 Detection method	鱼种 Fish species	阳性样品数/样品数 Positive samples/Total samples	
		CyHV-2	CyHV-3
《金鱼造血器官坏死病毒检测方法》（GB/T 36194—2018） Detection method of goldfish haemotopoietic necrosis virus	金鱼	3/9	—
	混合样	2/2	—
《鲤疱疹病毒检测方法第一部分：锦鲤疱疹病毒》（SC/T 7212.1—2011） Detection methods of cyprinid herpesvirus(CyHV)Part 1: Koi herpevirus	锦鲤	—	3/9
	混合样	—	2/2
双重PCR方法 Double PCR detection	金鱼	3/9	—
	锦鲤	—	3/9
	混合样	2/2	2/2

3　讨论与结论

由于鲤科鱼类能够在属间水平相互杂交，因此品种繁多，同时鲤疱疹病毒 2 型和 3 型对鲤科鱼类绝大多数品种都具有感染能力，仅仅检测一种病原效率较低，需要一种能够同时检测两种病毒的检测方法。张文等[12] 采用双重实时荧光定量 PCR 检测方法同时对鲤浮肿病毒（Carp edema virus，CEV）和 CyHV-3 进行了检测。该试验根据 CEV 的 *P4a* 基因和 CyHV-3 的 ORF7 保守基因序列设计。CEV 和 CyHV-3 的检测灵敏度均为 1.5×10^{1} copies·μL^{-1}，而本研究中采用双重 PCR，灵敏度仅与之相差 1 个数量级。徐晔等[13] 根据 CyHv-2 的 DNA 聚合酶基因，设计的荧光定量检测方法灵敏度为 5 copies·μL^{-1}，灵敏度较高，但实时荧光定量 PCR 方法需要的仪器、试剂、引物等较为昂贵。本研究中采用双重 PCR 可使用普通 PCR 仪进行试验，两对引物无交叉反应，且对 GNNV、SGIV、YCIV、FV、AHV 等 5 种常见水生动物病毒无扩展条带，具备良好的特异性；与常规检测方法能达到同样的检测效果，且能够同时对金鱼和锦鲤的两种病毒进行检测，不仅大大节约了检测所需时间，同时也节省了试剂，使检测成本显著下降，具备高效、便捷、经济和准确等优点。彭军辉等[14] 根据 DNA 聚合酶基因（2、3 型）、解旋酶基因（2 型）和胸苷激酶基因（3 型）的保守序列设计了 3 对引物，建立了检测 CyHV-2 和 CyHV-3 的三重 PCR 检测方法，PCR 产物的电泳结果会产生两个条带，需要通过两个条带的位置和 PCR 产物的测序结果来判定两种病毒。而本研究中，仅需要 2 对引物的位置和 PCR 产物的测序结果即可根据 PCR 产物大小差异，实现便捷的判定 CyHV-2 和 CyHV-3 的快速鉴别诊断。

另外，目前虽然还未发现有 CyHV-2 和 CyHV-3 混合感染病例，但随着养殖产业的发展和新品种的不断出现，对于可能出现的混合感染情况，采用本研究建立的双重 PCR 方法亦可进行有效检测。

综上所述，本研究建立了一种快速、特异、灵敏的检测鲤疱疹病毒 2 型和 3 型的双重 PCR 方法，为试验室 CyHV-2 和 CyHV-3 的快速确诊、养殖场和交易市场的流行病学调查、病毒的综合防控提供了技术支撑，为 CyHV-2 和 CyHV-3 在鲤科鱼类中的分子诊断及流行病学调查奠定了基础。

参考文献：

［1］ 农业农村部渔业渔政管理局，全国水产技术推广总站，中国水产学会. 2021中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 25.

［2］ BALON E K. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: From Roman gourmets to the swimming flowers［J］. *Aquaculture*, 1995, 129（1/2/3/4）: 3−48.

［3］ GOODWIN A E, SADLER J, MERRY G E, et al. Herpesviral haematopoietic necrosis virus (C_yHV-2) infection: Case studies from commercial goldfish farms［J］. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32（3）: 271−278.

[4] HEDRICK R P, GILAD O, YUN S, et al. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2000, 12（1）: 44−57.

[5] AOKI T, HIRONO I, KUROKAWA K, et al. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide [J]. *Journal of Virology*, 2007, 81（10）: 5058−5065.

[6] BECKER J A, TWEEDIE A, RIMMER A, et al. Incursions of *Cyprinid herpesvirus 2* in goldfish populations in Australia despite quarantine practices [J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 53−59.

[7] 李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鱼鲤疱疹病毒 II 型的分子诊断 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32（1）：92−96.
LI L J, LUO Y Z, LIU X Q, et al. Molecular surveillance of Cyprinid herpesvirus 2 in goldfish cultured in China [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32（1）: 92−96.（in Chinese）

[8] XU J R, BENTLY J, BECK L, et al. Analysis of koi herpesvirus latency in wild common carp and ornamental koi in Oregon, USA [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 187（2）: 372−379.

[9] GOODWIN A E, KHOO L, LAPATRA S E, et al. Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (cyprinid herpesvirus 2) in the USA: Molecular confirmation of isolates from diseased fish [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006, 18（1）: 11−18.

[10] WALTZEK T B, KUROBE T, GOODWIN A E, et al. Development of a polymerase chain reaction assay to detect cyprinid herpesvirus 2 in goldfish [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2009, 21（1）: 60−67.

[11] BERCOVIER H, FISHMAN Y, NAHARY R, et al. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis [J]. *BMC Microbiology*, 2005, 5: 13.

[12] 张文, 徐立蒲, 吕晓楠, 等. 鲤浮肿病毒和锦鲤疱疹病毒三重PCR检测方法的建立及初步应用 [J]. 检验检疫学刊, 2019, 29（1）：1−5.
ZHANG W, XU L P, LV X N, et al. Establishment and preliminary application of triplex PCR detection method for carp edema virus and koi herpesvirus [J]. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2019, 29（1）: 1−5.（in Chinese）

[13] 徐晔, 段宏安, 周毅, 等. 鲤科疱疹病毒2型TaqMan荧光定量PCR检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36（12）：952−956.
XU Y, DUAN H A, ZHOU Y, et al. Establishment of real-time PCR assay for detection of Cyprinid herpesvirus 2 [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36（12）: 952−956.（in Chinese）

[14] 彭军辉, 安伟, 张明辉. 鲤疱疹病毒2型和3型三重PCR检测方法的建立与应用 [J]. 渔业科学进展, 2021, 42（6）：158−164.
PENG J H, AN W, ZHANG M H. Establishment and application of the triplex PCR method for simultaneous detection of cyprinid herpesvirus 2 and cyprinid herpesvirus 3 [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42（6）: 158−164.（in Chinese）

（责任编辑：张梅）