

鲤疱疹病毒 2 型微滴式数字 PCR 检测方法的建立及比较分析*

赵欣^{1,2} 贾鹏^{2,3} 刘莹^{2,3} 王津津^{2,3} 史秀杰^{2,3}
潘广^{2,3} 郑晓聪^{2,3} 于力^{2,3} 何俊强^{2,3} 刘荭^{2,3①} 吴志新^{1①}

(1. 华中农业大学水产学院 武汉 430070; 2. 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心 深圳 518045; 3. 深圳市检验检疫科学研究院 深圳 518001)

摘要 本研究建立了定量检测鲤疱疹病毒 2 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)的微滴式数字 PCR (Droplet digital PCR, ddPCR)检测方法,并与实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR, qPCR)检测方法的灵敏性、重复性、特异性和临床样品检测做了比较分析。结果表明,与 qPCR 相比,ddPCR 具有相同的特异性,其灵敏性比 qPCR 低 20 倍。在定量 CyHV-2 DNA 时,ddPCR ($R^2=0.994$)和 qPCR ($R^2=0.994$)均表现出良好的线性关系,且 2 种检测方法间的定量值呈正相关($R^2=0.989$)。在定量检测相同稀释度的 CyHV-2 DNA 时,qPCR 的定量值始终比 ddPCR 高 10 倍。ddPCR 的组内和组间重复变异系数(CV)分别为 0.59%–11.26%和 6.55%–23.21%,而 qPCR 为 16.57%–27.56%和 22.31%–56.73%,说明 ddPCR 具有更好的稳定性。在临床样品定量检测时,ddPCR 的检出率稍高于 qPCR。本研究建立的 ddPCR 能够准确定量检测 CyHV-2,将为 CyHV-2 相关研究提供有益参考。

关键词 微滴式数字 PCR; 鲤疱疹病毒 2 型; 实时荧光定量 PCR; 定量检测

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)04-0126-08

鲤疱疹病毒 2 型也称为金鱼造血器官坏死病毒(Goldfish haematopoietic necrosis virus, GFHNV),因该病原是第 2 个自鲤科鱼类分离的疱疹病毒,按照国际病毒分类委员会(ICTV)的系统命名规则,正式命名为鲤疱疹病毒 2 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)。该病毒属于疱疹病毒目(Herpesvirales)、疱疹病毒科(Alloherpesviridae)、鲤疱疹病毒属(Cyprinivirus),该属还包括鲤疱疹病毒 1 型(CyHV-1)、鲤疱疹病毒 3 型(CyHV-3)和鳗鲡疱疹病毒 1 型(Anguillid herpesvirus 1, AngHV-1)。CyHV-2 对金鱼(*Carassius auratus*)和鲫鱼(*Carassius aumtus*)

养殖业危害巨大,主要发生在春、秋季节,发病率受水温影响较大,15–25℃时易发病,水温高于 25℃时,发病率降低(Groff *et al*, 1998)。1992 年,日本首次报道金鱼暴发该病,死亡率接近 100% (Jung *et al*, 1995)。随后,在美国(Groff *et al*, 1998; Goodwin *et al*, 2006a)、澳大利亚 (Stephens *et al*, 2004)、英国 (Jeffery *et al*, 2007)、匈牙利(Doszpoly *et al*, 2011)和我国台湾(Chang *et al*, 1999)均有相关报道。最近,在法国也有该病的相关报道(Boitard *et al*, 2015)。随着观赏鱼国际贸易全球化,该病毒在全球范围内流行的风险增高。

* 国家质量监督检验检疫总局科技项目(2013IK043)和深圳市科技创新委国际合作项目(GJHZ20150316155421411)共同资助[This work was supported by General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2013IK043), and Shenzhen Science and Technology Innovation Committee (GJHZ20150316155421411)]. 赵欣, E-mail: zxstar4328@163.com

① 通讯作者: 刘荭, 研究员, E-mail: liuhong@szciq.gov.cn; 吴志新, 教授, E-mail: wuzhixin@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2016-03-13, 收修改稿日期: 2016-04-05

实时荧光定量PCR方法(Quantitative real-time PCR, qPCR)因其操作简便、灵敏性高、特异性强和快速高效等优点已得到广泛应用。但qPCR在定量时需依赖于标准曲线,而标准曲线的质量易受到引物和探针浓度、DNA纯度以及标准品等因素的影响,导致其精确性达不到绝对定量的要求(Cankar *et al*, 2006)。另外,qPCR易受反应抑制因子的影响而导致假阴性,从而干扰结果判断。

微滴式数字PCR方法(Droplet digital PCR, ddPCR)是近年发展起来的快速、准确、可实现绝对定量的新技术。与传统qPCR方法不同,它不依赖于标准曲线,因而定量结果更精确(Hayden *et al*, 2013)。ddPCR方法基于将样品系列稀释到一定浓度后,使其分布在一定数目的微滴中,从而使大部分微滴中的模板数为1或0,然后,以每个微滴为一个独立单位进行PCR扩增。在扩增结束后,对每个微滴中的荧光信号进行读取。根据泊松概率分布函数(Poisson distribution)计算出样品中的DNA拷贝数(Pinheiro *et al*, 2013)。该方法采用终点检测,不依赖 C_q 值,从而使ddPCR反应受扩增效率的影响大大降低,同时也提高了对反应抑制因子的耐受能力,提高了方法的准确性和重复性(Zimmermann *et al*, 2013; Pinheiro *et al*, 2013)。本研究旨在建立特异、准确、灵敏的CyHV-2 ddPCR定量检测方法,并与传统qPCR进行比较,以期为CyHV-2定量检测提供新方法和借鉴。

1 材料与方法

1.1 病毒

临床样品共30份,包括23份患病鲫鱼样品和7份健康鲫鱼样品均采自江苏省各地区;CyHV-3(Koi herpesvirus)DNA由中山大学提供;斑点叉尾鲷病毒(Channel catfish virus, CCV)购自ATCC公司;流行性造血器官坏死病毒(Epizootic hematopoietic necrosis virus, EHN)由悉尼大学OIE蛙病毒参考实验室提供;中华鳖虹彩病毒(Soft-shelled turtle iridovirus, STIV)由本实验室保存。

1.2 DNA的提取

使用Dneasy Blood Tissue Kit(Qiagen, 美国)抽提CyHV-2阳性样品、临床样品、CCV、EHN、STIV的DNA,具体步骤详见试剂盒说明书。再用ddH₂O对所抽提的CyHV-2阳性样品DNA进行20倍系列稀释,共7个稀释度,用于本实验方法灵敏性和重复性评价。

1.3 标准质粒的制备与稀释

采用Goodwin等(2006b)设计的上下游引物进行普通PCR反应,扩增出170 bp产物,使用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit对此PCR产物进行纯化,再连接到pMD™18-T载体中,构建标准质粒。标准质粒的浓度使用分光光度计测定。标准质粒浓度计算公式如下:

$$\text{质粒拷贝数(copies/}\mu\text{l)} = 6.02 \times 10^{23} (\text{copies/mol}) \times \text{质粒浓度(g/}\mu\text{l)} / \text{质粒分子量(g/mol)}$$

本研究标准质粒浓度为 2.3×10^{11} copies/ μl 。用ddH₂O将标准质粒进行10倍系列稀释,共8个稀释度(2.3×10^8 – 2.3×10^1 copies/ μl),以此构建qPCR标准曲线。

1.4 引物和探针

1.4.1 qPCR反应体系和条件 本研究中,qPCR方法所引用为Goodwin等(2006b)中的引物。Goodwin等(2006b)在设计该引物时选取CyHV-2 DNA聚合酶基因的保守区域,该基因是病毒保守基因(李莉娟等, 2013)。其中,上游引物序列为5'-TCGGTTGGAC-TCGGTTTGTG-3', Taqman探针序列为5'-FAM-CC-GCTTCCAGTCTGGGCCACTACC-BHQ1-3',下游引物序列为5'-CTCGGTCTTGATGCGTTTCTTG-3'(Goodwin *et al*, 2006b)。qPCR总反应体系为20 μl ,其中,10 μl 2 \times QuantiNova™ (QN) Probe PCR Master Mix,上下游引物(900 nmol/L)各0.9 μl ,探针(250 nmol/L)0.5 μl 。qPCR反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,共40个循环,是基于Goodwin等(2006b)方法和试剂盒推荐的温度,并且经过实验室优化确认的反应条件。每个样品设定3个重复。扩增结束后,使用7500 System Software软件分析实验数据。

1.4.2 ddPCR反应体系和条件优化 使用QX100™型微滴式数字PCR系统(Bio-Rad, 美国)(包括微滴发生板、微滴发生器、PCR仪、微滴分析仪)进行实验。ddPCR实验步骤包括配制体系、生成微滴、扩增循环和信号读取(Hindson *et al*, 2013)。ddPCR使用的引物和探针与qPCR相同。ddPCR总反应体系为20 μl ,其中,10 μl 2 \times ddPCR Supermix™ for Probes (Bio-Rad, 美国),上下游引物(900 nmol/L)各0.9 μl 、探针(250 nmol/L)0.5 μl , DNA模板2.5 μl 。微滴生成使用配套的微滴生成卡(Bio-Rad, 美国)和微滴生成仪(Bio-Rad, 美国),将20 μl PCR体系和70 μl 微滴生成油(Droplet generation oil)分别加入微滴生成卡,覆

盖专用胶垫后置入微滴生成仪,将生成的微滴转移至96孔板中,并置于PCR仪(Bio-Rad,美国)进行扩增,扩增程序如下:95℃ 10 min;95℃ 10 s,58℃ 60 s,共40个循环;扩增结束后,98℃热失活10 min。每个模板设置3个重复。扩增结束后,将96孔板放入微滴读取仪中读取信号,并使用QuantaSoft软件(Bio-Rad,美国)分析数据。

为了优化ddPCR反应条件,使用温度梯度PCR仪(Bio-Rad,美国),设置反应温度梯度为65.0℃、63.8℃、62.0℃、59.1℃、55.7℃、52.9℃、51.0℃、50.0℃,对退火温度进行优化。其他步骤同ddPCR反应过程,最后使用QuantaSoft软件分析实验数据,选取最佳退火温度。

2 结果

2.1 qPCR方法标准曲线的建立

将标准质粒的8个稀释度作为模板进行qPCR反应,以此构建了标准曲线(图1)。构建的标准曲线为: $y = 0.741x + 1.0454$,线性相关系数为 $R^2 = 0.994$,qPCR扩增效率 $E = 134\%$ 。根据该标准曲线,根据未知样品的 C_t 值即可计算样品中的CyHV-2起始拷贝数。

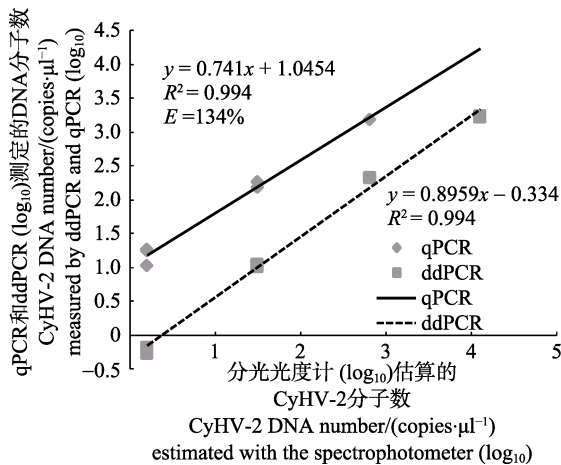


图1 ddPCR和qPCR方法对系列稀释CyHV-2 DNA的定量

Fig.1 Quantification of serially diluted CyHV-2 DNA standard by ddPCR and qPCR

2.2 ddPCR方法检测结果

ddPCR方法检测结果见图2和表1。从图2和表1可以看出,ddPCR反应中,微滴生成仪生成的油滴数大于10000,油滴数能够满足实验要求,保证了模板DNA分子的分布符合泊松概率分布函数。空白

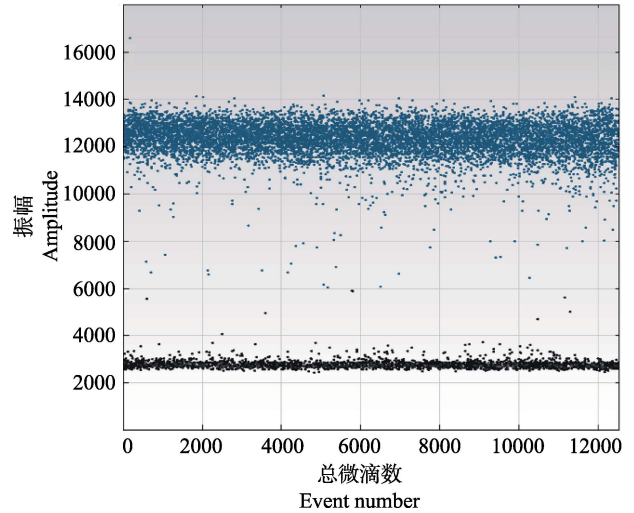


图2 ddPCR方法扩增CyHV-2 DNA的一维散点
Fig.2 One-dimensional scatter plot of selected wells/CyHV-2 DNA fluorescent droplet amplified by ddPCR

对照中没有检测到阳性微滴,表明该体系没有污染或非特异性扩增。

2.3 ddPCR反应温度优化筛选结果

对ddPCR反应的退火温度进行了优化筛选。结果表明,在50.0–59.1℃之间,随着温度的升高,荧光强度的信号逐渐增强,阳性微滴和阴性微滴界限逐渐明显,中间弥散的微滴数减少。当温度由59.1℃依次升高到65℃时,阳性微滴总数和阴性微滴总数趋于稳定,但二者中间弥散的微滴数逐渐变多(图3)。因而,本研究最终将ddPCR定量检测CyHV-2 DNA的最佳退火温度确定为59.1℃。

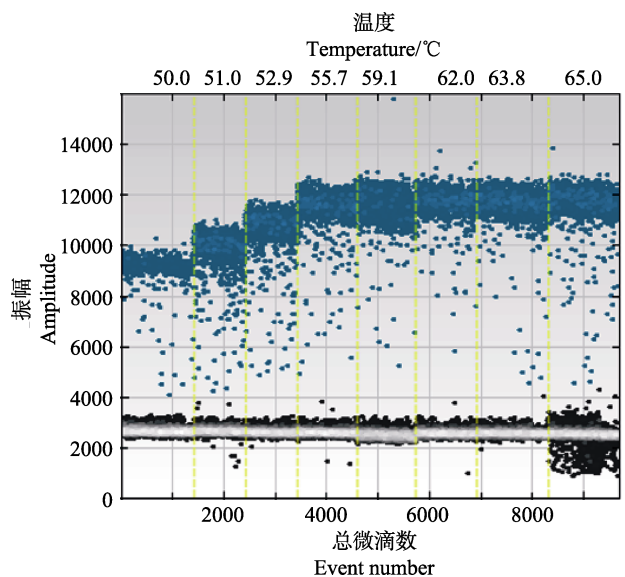


图3 ddPCR反应温度优化
Fig.3 Optimization of reaction temperature in ddPCR

2.4 ddPCR 与 qPCR 灵敏性及线性关系

以临床样品中抽提的 CyHV-2 DNA ($1.25 \times 10^4 - 0.2 \times 10^{-3}$ copies/ μl)为模板, 评价 ddPCR 方法的灵敏性。ddPCR 检测 CyHV-2 DNA 下限为 1.6 copies/ μl , 而 qPCR 检测 CyHV-2 的 DNA 下限为 0.08 copies/ μl (表 1)。由此可见, ddPCR 检测 CyHV-2 DNA 的灵敏性比 qPCR 低 20 倍。ddPCR 和 qPCR 方法间的定量值呈正相关($R^2=0.989$) (图 4), 但在定量检测相同稀

度的 CyHV-2 DNA 时, qPCR 方法的定量值始终比 ddPCR 方法高 10 倍(表 1)。ddPCR 方法的线性相关系数为 $R=0.994$, qPCR 方法的线性相关系数为 $R^2 = 0.994$, 表明 2 种方法的线性关系良好(图 1)。

2.5 重复性分析

通过组内重复实验和组间重复实验比较分析 qPCR 和 ddPCR 方法的重复性, 结合定量结果的变异系数(Coefficients of variation, CV)对方法的准确性进

表 1 ddPCR 和 qPCR 的灵敏性实验
Tab.1 Sensitivity test of the ddPCR and qPCR assays

样品 Sample ^a (copies/ μl)	ddPCR					qPCR				
	总微滴数 Number of droplets ^b (in 20 μl rxn)	阳性微滴数 Positive droplets ^c (in 20 μl rxn)	DNA 分子数 (拷贝/ μl) Normalized detected target DNA ^d (copies/ μl)	平均数 \pm 标准差 Mean \pm SD	变异 系数 CV (%)	Cq 值 Cq values ^e	DNA 分子数 Detected target DNA ^f (copies/ μl)	平均数 \pm 标准差 Mean \pm SD	变异 系数 CV (%)	
1.25×10^4	11986.00	9381.00	1680.00	169.00 \pm 10.00	0.59	23.39	12878.27	11949.20 \pm 1979.76	16.57	
	12639.00	9854.00	1700.00			23.34	13293.55			
	12524.00	9405.00	1690.00			23.82	9675.78			
6.25×10^2	12521.00	2106.00	210.00	212.67 \pm 3.06	1.44	26.69	1433.13	1345.37 \pm 232.93	17.31	
	12661.00	2139.00	212.00			26.60	1521.67			
	12503.00	2179.00	216.00			27.11	1081.31			
3.1×10^1	11370.00	110.00	10.70	10.70 \pm 0.50	4.67	30.42	119.84	151.29 \pm 31.13	20.58	
	12095.00	87.00	10.20			29.79	182.09			
	13772.00	162.00	11.20			30.06	151.94			
1.6×10^0	14604.00	8.00	0.67	0.60 \pm 0.07	11.26	33.24	18.28	15.45 \pm 4.26	27.56	
	12196.00	6.00	0.54			33.30	17.51			
	11836.00	6.00	0.59			34.07	10.55			
0.8×10^{-1}	12897.00	0	0	/	/	35.89	3.13	/	/	
	14049.00	1.00	0.08			37.32	2.95			
	13741.00	0	0			n.d	0.00			
0.4×10^{-2}	14045.00	0	0	n.d ^g	n.d	n.d	0.00	n.d	n.d	
	13381.00	0	0			n.d	0.00			
	12286.00	0	0			n.d	0.00			
0.2×10^{-3}	13381.00	0	0	n.d	n.d	n.d	0.00	n.d	n.d	
	14179.00	0	0			n.d	0.00			
	13470.00	0	0			n.d	0.00			
ddH ₂ O	12359.00	0	0	n.d	n.d	n.d	0.00	n.d	n.d	
	12638.00	0	0			n.d	0.00			
	13355.00	0	0			n.d	0.00			

a: CyHV-2 DNA 的浓度是由分光光度计估算; b: ddPCR 反应形成的总微滴数; c: ddPCR 反应收集到 CyHV-2 的阳性信号; d: CyHV-2 分子数根据泊松概率分布函数(Poisson distribution)计算; e: Cq:qPCR 定量循环值; f: CyHV-2 分子数由 qPCR 绝对定量测定; g: n.d 为没有检测到 DNA 分子(阴性反应)

a: Concentration of CyHV-2 DNA was estimated by the spectrophotometer; b: The total number of droplets in ddPCR reaction; c: Number of droplets showing positive signal for CyHV-2 targets in ddPCR reaction; d: Number of target CyHV-2 in each microliter measured following the Poisson law; e: Cq: Quantification cycle values for qPCR; f: Number of target CyHV-2 per microliter measured by qPCR; g: n.d: Not detected (negative reaction)

行判定。组内重复实验中，同一次实验中的 4 个 CyHV-2 DNA 稀释度作为模板进行 ddPCR 和 qPCR 实验，每个样品 3 个重复。结果显示，ddPCR 定量检测中 CV 最小值为 0.59%，最大值为 11.26%；qPCR 的 CV 最小值为 16.57%，最大值为 27.56% (表 1)。在组间重复实验时，用上述同样的模板，以相同的 qPCR 和 ddPCR 反应条件分不同时间进行 3 次组间重复实验，ddPCR 定量检测的 CV 范围为 6.55%–23.21%；qPCR 检测的 CV 范围为 22.31%–56.73% (表 2)。结果表明，ddPCR 方法具有更好的重复性。

2.6 特异性分析

采用 CyHV-3、CCV、EHNV 和 STIV 共 4 种水生 DNA 病毒，和 CyHV-2 比较验证 ddPCR 和 qPCR 的特异性。结果表明，这 2 种方法均能检出 CyHV-2。其他 4 种病毒和空白对照的检测结果均为阴性(表 3)，表明所建立的 ddPCR 方法与 qPCR 方法检测结果一致，具有相同的特异性。

2.7 临床样品检出率分析

运用 ddPCR 和 qPCR 对江苏省各地区采集的 23 份

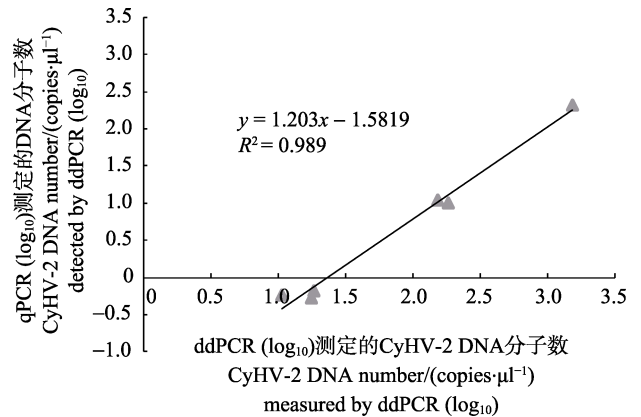


图 4 测定 CyHV-2 DNA 时 ddPCR 方法和 qPCR 方法之间的线性相关性

Fig.4 Correlation between measured CyHV-2 numbers of CyHV-2 DNA standard using ddPCR and qPCR

患病鲫鱼样品和 7 份无症状的鲫鱼样品进行定量检测，每份样品 3 个重复。检测结果用阳性检出率 (Positive percentage, 即检测呈阳性的样品在总样品中所占的比例)分析 2 种方法检测结果的差异性。结果显示, 23 份患病鲫鱼样品经 ddPCR 检测均为阳性。而 qPCR 检出 22 份阳性, 1 份阴性。2 种方法均未从

表 2 ddPCR 和 qPCR 组间重复实验
Tab.2 Replicate of the intra-assay using ddPCR and qPCR

样品 Sample ^a (copies /μl)	ddPCR					qPCR			
	总微滴数 Number of droplets ^b (in 20 μl rxn)	阳性微滴数 Positive droplets ^c (in 20 μl rxn)	DNA 分子数 Normalized detected target DNA ^d (copies/μl)	平均数± 标准差 Mean±SD	变异 系数 CV (%)	Cq 值 Cq values ^e	DNA 分子数 Detected target DNA ^f (copies/μl)	平均数± 标准差 Mean±SD	变异 系数 CV (%)
1.25×10 ⁴	10671.00 ^h	9805.00	1790.00			23.39	12878.27		
	11986.00 ⁱ	9381.00	1680.00	1680.00±110.00	6.55	24.87	8149.03	10723.56±2392.41	22.31
	12186.00 ^j	8125.00	1570.00			24.23	11143.39		
6.25×10 ²	12964.00	2321.00	225.00			26.69	1433.13		
	12522.00	2106.00	210.00	228.33±20.21	8.85	28.06	739.32	1111.07±349.56	31.46
	12181.00	2640.00	250.00			27.50	1160.77		
3.10×10 ¹	16042.00	136.00	12.00			30.42	119.84		
	11370.00	110.00	10.70	11.73±0.93	7.92	31.75	58.88	91.44±30.69	33.57
	11821.00	141.00	12.50			31.10	95.60		
1.60×10 ⁰	15065.00	6.00	0.45			33.24	18.28		
	14604.00	8.00	0.67	0.61±0.14	23.21	35.45	5.46	11.40±6.47	56.73
	12471.00	8.00	0.72			35.08	10.45		
ddH ₂ O	11529.00	0.00	0.00			n.d	0.00		
	12359.00	0.00	0.00	n.d ^g	n.d	n.d	0.00	n.d	n.d
	9627.00	0.00	0.00			n.d	0.00		

a,b,c,d,e,f,g 的注释与表 1 相同；h: ddPCR 和 qPCR 的第 1 次组间重复试验；i: ddPCR 和 qPCR 的第 2 次组间重复试验；j: ddPCR 和 qPCR 的第 3 次组间重复试验

The note of a, b, c, d, e, f, g and the tab.1 are the same; h: ddPCR and qPCR the first intra-assay; i: ddPCR and qPCR the second intra-assay; j: ddPCR and qPCR the third intra-assay

表 3 ddPCR 和 qPCR 的特异性实验
Tab.3 Specificity of the ddPCR and qPCR assays

病毒分离株 Virus strain	ddPCR			qPCR	
	总微滴数 Number of droplets ^a (in 20 μ l rxn)	阳性微滴数 Positive droplets ^b (in 20 μ l rxn)	DNA 分子数 Normalized detected target DNA ^c (copies/ μ l)	Cq 值 Cq values ^d	DNA 分子数 Detected targets ^e DNA (copies/ μ l)
CyHV-2	10494.00	2415.00	231.00	26.50	1627.56
	11699.00	2287.00	218.00	26.89	1427.32
	11972.00	2302.00	223.00	27.03	1140.39
CyHV-3	12271.00	0	0	n.d ^f	0
	10593.00	0	0	n.d	0
	12485.00	0	0	n.d	0
CCV	10231.00	0	0	n.d	0
	10915.00	0	0	n.d	0
	11725.00	0	0	n.d	0
EHNV	10563.00	0	0	n.d	0
	11259.00	0	0	n.d	0
	11715.00	0	0	n.d	0
STIV	12146.00	0	0	n.d	0
	12622.00	0	0	n.d	0
	12387.00	0	0	n.d	0
ddH ₂ O	11562.00	0	0	n.d	0
	12155.00	0	0	n.d	0
	11731.00	0	0	n.d	0

a: ddPCR 反应形成的总微滴数; b: ddPCR 反应收集到 CyHV-2 的阳性信号; c: CyHV-2 分子数根据泊松概率分布函数(Poisson distribution)计算; d: Cq: qPCR 定量循环值; e: CyHV-2 分子数由 qPCR 绝对定量测定; f: n.d 为没有检测到 DNA 分子(阴性反应)

a: The total number of droplets in ddPCR reaction; b: Number of droplets showing positive signal for CyHV-2 targets in ddPCR reaction; c: Number of target CyHV-2 in each microliter measured following the Poisson law; d: Cq: quantification cycle values for qPCR; e: Number of target CyHV-2 per microliter measured by qPCR; f: n.d: not detected (negative reaction)

7 份健康鲫鱼样品中检测到 CyHV-2 核酸。因此, ddPCR 方法的阳性检出率为 76.67%, qPCR 方法的阳性检出率为 73.33%, 表明 ddPCR 方法在 CyHV-2 定量检测中具有有一定实际应用优势。

3 讨论

定量检测是病毒致病机理研究、病毒载量测定及免疫基因表达等的重要手段。qPCR 作为一种定量检测技术已经被应用于上述领域(安伟等, 2015; 王瑞等, 2015; 陈雪峰等, 2015)。ddPCR 作为一种新兴的定量技术, 将模板随机分布于 20000 个微滴中, 每个含有模板的微滴均是一个独立的 PCR 反应体系, 实现了不依赖标准曲线而对目标样本的绝对定量, 同时也使体系受反应抑制因子的影响大大降低(Hindson *et al*, 2013)。目前, 已经有一些研究报道了定量检测 CyHV-2 的 qPCR 方法(Goodwin *et al*, 2006b; 周勇等, 2013; 徐晔等, 2014; 于力等, 2015), 但 qPCR 方法因其定量

结果依赖于标准曲线, 以及 PCR 反应体系中引物与模板、探针与模板之间错配对结果精确性的影响(Strain *et al*, 2013), 方法的应用受到一定限制(Purcell *et al*, 2013)。

本研究建立了一种定量检测 CyHV-2 的 ddPCR 方法, 同时, 利用 ddPCR 和 qPCR 这 2 种检测方法对 CyHV-2 DNA 进行测定, 就灵敏性、重复性、特异性和临床样品检测 4 个方面做了比较。在定量检测相同稀释度 CyHV-2 DNA 时, ddPCR 与 qPCR 的定量值呈线性正相关, 但 qPCR 方法的定量值始终比 ddPCR 方法高 10 倍, 推断可能是由于用于 qPCR 方法的标准质粒起始浓度被高估。因为标准质粒溶液中存在的其他 DNA、RAN 或蛋白会影响分光光度计测定值的准确性, 导致标准质粒浓度测定值偏大或偏小(Jones *et al*, 2014)。在定量不同稀释度 CyHV-2 DNA 时, ddPCR 方法的灵敏性比 qPCR 方法低 20 倍。然而, 在实际应用过程中, ddPCR 方法的检出率却高于 qPCR 方法。分析其原因可能与 qPCR Cq 值的有效性

判定有关。qPCR 能够检测到更低稀释度的 CyHV-2 DNA (0.8×10^{-1} copies/ μ l), 但 C_q 值 > 35 。根据 qPCR 方法的定量原理, C_q 值与起始模板浓度的对数呈线性关系, 在分析 qPCR 方法定量结果时通常认为, C_q 值在 15–35 为可信, 太大或太小都会导致定量结果不准确(Schmittgen *et al*, 2008)。因此, 根据 2 种方法在定量检测 CyHV-2 DNA 的灵敏性和临床样品的检出率结果, ddPCR 和 qPCR 方法的灵敏性相当。

本研究在进行方法特异性分析时, 由于资源限制, 使用病毒种类有限, 没有使用 CyHV-1 进行验证。但这对 ddPCR 方法应用于临床样品 CyHV-2 的定量检测影响不大。原因是 ddPCR 使用的引物和探针与 qPCR 相同(Goodwin *et al*, 2006b), Goodwin 等(2006b)在进行 qPCR 特异性分析时, 已经确认了其对 CyHV-1 没有非特异性扩增。另外, CyHV-2 主要感染金鱼和鲫鱼, 而 CyHV-1 主要感染鲤鱼, 在分析结果时应注意结合样品种属, 有助于避免 CyHV-1 非特异性检出的分析。因此, 在检测金鱼和鲫鱼的临床样品时, ddPCR 受到 CyHV-1 干扰有限。本研究建立了一种快速、准确、灵敏的定量检测 CyHV-2 的 ddPCR 方法, 能够很好地应用于 CyHV-2 定量分析, 对 CyHV-2 致病机理和组织定量检测等具有参考价值。

参 考 文 献

- An W, Xiao Y, Zhang MH, *et al*. Development of a SYBR Green I based real-time RT-PCR assay for rapid diagnosis of spring viremia of carp virus. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2015, 37(9): 699–702 [安伟, 肖雨, 张明辉, 等. 鲤春病毒血症病毒 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 方法的建立. *中国预防兽医学报*, 2015, 37(9): 699–702]
- Boitard PM, Baud M, Labrut S, *et al*. First detection of Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in goldfish (*Carassius auratus*) in France. *Journal of Fish Diseases*, 2015, 39(6): 673–680
- Cankar K, Štebih D, Dreo T, *et al*. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology*, 2006, 6(4): 1–15
- Chang PH, Lee SH, Chiang CH, *et al*. Epizootic of herpes-like virus infection in goldfish, *Carassius auratus* in Taiwan. *Fish Pathology*, 1999, 34(4): 209–210
- Chen XF, Yang GL, Gao Q, *et al*. Development and application of the PCR detection method of pathogenic enterobacters in the larvae of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 99–105 [陈雪峰, 杨国梁, 高强, 等. 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 幼体病原肠杆菌 PCR 检测技术的建立与应用. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 99–105]
- Doszpoly A, Benko M, Csaba G, *et al*. Introduction of the family Alloherpesviridae: The first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 2011, 133(3): 174–181
- Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, *et al*. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(2): 540–546
- Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, *et al*. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 1003–1005
- Goodwin A, Khoo L, LaPatra S, *et al*. Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (Cyprinid herpesvirus 2) in the USA: Molecular confirmation of isolates from diseased fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2006a, 18(1): 11–18
- Goodwin AE, Merry GE, Sadler J. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (Cyprinid herpesvirus 2) in moribund and healthy goldfish: Validation of a quantitative PCR diagnostic method. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2006b, 69(2–3): 137–143
- Groff JM, LaPatra SE, Munn RJ, *et al*. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1998, 10(4): 375–378
- Jeffery K, Bateman K, Bayley A, *et al*. Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30(11): 649–656
- Jung SJ, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18(3): 211–220
- Jones M, Williams J, Gärtner K, *et al*. Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, 'efinetheraind'. *Journal of Virological Methods*, 2014, 202(100): 46–53
- Li LJ, Luo YZ, Liu XQ, *et al*. Molecular surveillance of Cyprinid herpesvirus 2 in goldfish cultured in China. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32(1): 92–96 [李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鱼鲤疱疹病毒 II 型的分子诊断. *华中农业大学学报*, 2013, 32(1): 92–96]
- Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, *et al*. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(2): 1003–1011
- Purcell MK, Thompson RL, Garver KA, *et al*. Universal reverse-transcriptase real-time PCR for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 106(2): 103–115
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101–1108
- Strain MC, Lada SM, Luong T, *et al*. Highly precise

- measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS One*, 2013, 8(4): e55943
- Stephens FJ, Raidal SR, Jones B. Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus. *Australian Veterinary Journal*, 2004, 82(3): 167–169
- Wang R, Li LP, Huang T, *et al.* Real-time quantitative PCR for detection of *Streptococcus agalactiae* from tilapia tissue. *South China Fisheries Science*, 2015(3): 41–46 [王瑞, 李莉萍, 黄婷, 等. 罗非鱼组织内无乳链球菌实时荧光定量PCR检测方法建立. *南方水产科学*, 2015(3): 41–46]
- Xu Y, Duan HA, Zhou Y, *et al.* Establishment of real-time PCR assay for detection of Cyprinid herpesvirus 2. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(12): 952–956 [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. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(12): 952–956]
- Yu L, Wang JJ, Shi XJ, *et al.* Establishment of Taqman real-time PCR for Cyprinid Herpesvirus 2. *Chinese Journal of Animal Health*, 2015, 32(10): 80–84 [于力, 王津津, 史秀杰, 等. 鲤科疱疹病毒2型 Taqman 实时荧光PCR方法的建立. *中国动物检疫*, 2015, 32(10): 80–84]
- Zimmermann BG, Grill S, Holzgreve W, *et al.* Digital PCR: A powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 2008, 28(12): 1087–1093
- Zhou Y, Zeng LB, Zhang H, *et al.* Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the Cyprinid herpesvirus II. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 607–613 [周勇, 曾令兵, 张辉, 等. 鲤疱疹病毒II型 TaqMan real-time PCR检测方法的建立及应用. *水产学报*, 2013, 37(4): 607–613]

(编辑 陈严)

Development and Evaluation of Droplet Digital PCR Assay for the Detection of CyHV-2 and Comparative Analysis

ZHAO Xin^{1,2}, JIA Peng^{2,3}, LIU Ying^{2,3}, WANG Jinjin^{2,3}, SHI Xiujie^{2,3}, PAN Guang^{2,3}, ZHENG Xiaocong^{2,3}, YU Li^{2,3}, HE Junqiang^{2,3}, LIU Hong^{2,3}^①, WU Zhixin¹^①

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; 2. Animal and Plant Inspection and Quarantine Technology Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045; 3. Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine Sciences, Shenzhen 518001)

Abstract CyHV-2 (Cyprinid herpesvirus 2) is a double-stranded DNA virus first isolated from goldfish, *Carassius auratus* (L). It is classified as a member of the genus Cyprinivirus, which includes carp pox (CyHV-1), koi herpesvirus (CyHV-3) and anguillid herpesvirus-1 (AngHV-1). It has an icosahedral shape with an average diameter of 100–110 nm. CyHV-2 can cause approximately 50% to 100% mortalities in cultured goldfish when water temperature is between 15°C and 25°C. Therefore, rapid and precise detection of CyHV-2 is needed to prevent and control disease outbreak. In this study we established a droplet digital PCR (ddPCR) method used for accurate quantification of CyHV-2 DNA. The ddPCR method was compared with the quantitative real-time PCR (qPCR) in the aspect of the sensitivity, reproducibility, specificity and practical application. In terms of detecting CyHV-2 DNA, the sensitivity of the ddPCR assays was 20-fold lower than qPCR. The correlation coefficient (R^2) obtained from linear regression analysis showed a good linearity of amplification for both ddPCR ($R^2=0.994$) and qPCR ($R^2=0.994$) assays. A positive correlation ($R^2=0.989$) was observed between ddPCR and qPCR assays. To determine the same dilution series of CyHV-2 DNA, the expected numbers of DNA copies calculated by qPCR was 10-fold higher than the number of copies determined by ddPCR. CyHV-2 DNA reproducibility determined by ddPCR was found to be significantly more stable than by qPCR. The ddPCR assay had no cross-reaction with other similar fish herpesviruses, including CyHV-3, CCV (Channel catfish virus)、STIV (Soft-shelled turtle iridovirus) and EHNV (Epizootic hematopoietic necrosis virus). By contrast, the specificity of ddPCR was consistent with qPCR. Therefore, the ddPCR method was proven to be more precise than qPCR. This new absolute quantitation tool will be useful to standardize quantitative detection of CyHV-2 DNA.

Key words ddPCR; CyHV-2; qPCR; Quantitative detection

① Corresponding author: LIU Hong, E-mail: liuhong@szciq.gov.cn; WU Zhixin, E-mail: wuzhixin@mail.hzau.edu.cn